



Rita Margarida de Almeida Santos Videira

Pesquisa de Inibidores Enzimáticos em Óleos Essenciais

Estudo da Actividade em BACE-1, uma Protease Aspártica
Envolvida na Doença de Alzheimer

Tese de doutoramento em Ciências Farmacêuticas, ramo de Farmacognosia e Fitoquímica,
orientada pelo Professor Doutor Carlos Manuel Freire Cavaleiro e pelo Professor Doutor Carlos José Fialho Costa Faro
e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

**Pesquisa de inibidores enzimáticos em Óleos Essenciais.
Estudo da actividade em BACE-1, uma protease aspártica
envolvida na Doença de Alzheimer.**

Rita Margarida de Almeida Santos Videira

Universidade de Coimbra

2015

Tese de doutoramento em Ciências Farmacêuticas,
ramo de Farmacognosia e Fitoquímica,
orientada pelo Professor Doutor Carlos Manuel Freire Cavaleiro
e pelo Professor Doutor Carlos José Fialho Costa Faro
e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Agradecimentos

Este trabalho envolveu muita resistência e determinação, mas acima de tudo resultou da contribuição e ajuda de todos vós. Agradecer-vos nunca será demais...

Aos Prof. Doutor Carlos Cavaleiro e Prof. Doutor Carlos Faro, pelo inestimável apoio e orientação. Obrigada pela vossa confiança e paciência, pelos ensinamentos e todos os recursos que colocaram à minha disposição. Por estarem sempre presentes e disponíveis, complementando-se tão bem no acompanhamento desta jornada.

Aos membros do Centro de Neurociências e do Biocant, em particular dos laboratórios de Biotecnologia Molecular e de Biologia Celular, Isaura, Carla, Pedro e Mário, pela vossa valiosa contribuição, camaradagem e paciência e pela forma como facilitaram e tornaram agradável esta aventura.

A toda a equipa do Laboratório de Farmacognosia da Universidade de Coimbra pelo apoio, carinho e confiança que sempre me dedicaram, particularmente a Prof. Doutora Lúcia Salgueiro e Marisa.

Ao grupo Mecanismos Moleculares de Doença do Centro de Neurociências de Coimbra, em particular à Prof. Doutora Cláudia Pereira e à Dra. Rosa Resende pela possibilidade de enriquecer este trabalho e a minha formação no complexo e fascinante meio da experimentação animal associada à doença de Alzheimer.

A todos os meus amigos, desde os mais antigos aos mais recentes, pelo apoio e pela coragem que sempre me transmitiram, pela vossa amizade e por me fazerem rir... vocês são o máximo.

Aos meus pais e ao Marco por tudo, tudo mesmo... Porque sou quem sou graças a vocês e porque sem vocês nada disto teria sentido ou valor... Obrigada pelo amor e apoio incondicionais e por acreditarem sempre, mesmo quando eu duvidava... Este trabalho também é vosso.

Este trabalho foi realizado ao abrigo da bolsa de doutoramento SFRH / BD / 19199 / 2004 da Fundação para a Ciência e a Tecnologia.

Índice

Abreviaturas	v
Resumo	ix
Abstract	xiii
Capítulo 1 – Introdução	1
1.1. <i>Óleos essenciais: fonte de compostos bioactivos</i>	3
1.1.1. Produtos naturais e o desenvolvimento de novos fármacos	3
1.1.2. Estratégia para a obtenção de moléculas activas	5
1.1.3. Plantas aromáticas e óleos essenciais	6
1.1.4. Classificação e diversidade química dos terpenóides	9
1.1.5. Actividade biológica dos óleos essenciais	10
1.2. <i>Proteases aspárticas: função biológica e patologias associadas</i>	15
1.2.1. Definição e classificação	15
1.2.2. Características gerais	16
1.2.3. Fisiopatologia humana	17
1.2.4. Potencial terapêutico dos inibidores de proteases	22
1.3. <i>BACE-1 e a fisiopatologia da doença de Alzheimer</i>	25
1.3.1. Características e definição clínica da doença de Alzheimer	25
1.3.2. Marcadores patológicos: placas senis e tranças neurofibrilares	27
1.3.3. Patogénese: teoria da cascata amilóide	29
1.3.4. Processamento do APP e formação de A β	31
1.3.5. Secretases: um grupo heterogéneo de proteases	33
1.3.6. Estratégias terapêuticas	36
1.3.7. Inibição da β -secretase: benefícios e desafios	40
1.4. <i>Objectivos do estudo</i>	45
Capítulo 2 – Material e Métodos	47
2.1. <i>Materiais</i>	49
2.1.1. Material vegetal	49

2.1.2. Proteases aspárticas e linhas celulares	52
2.1.3. Reagentes	53
2.2. Métodos	55
2.2.1. Extracção dos óleos essenciais	55
2.2.2. Análise de óleos essenciais por combinação de técnicas de cromatografia de fase gasosa e cromatografia de fase gasosa-espectrometria de massa	56
2.2.3. Fraccionamento por cromatografia líquida em coluna e cromatografia em camada fina preparativa	58
2.2.4. Expressão em <i>E. coli</i> e purificação de proBACE-1 recombinante	60
2.2.5. Determinação de constantes de actividade e inibição enzimática	61
2.2.6. Cultura celular e incubação com inibidores	62
2.2.7. Avaliação da viabilidade celular	63
2.2.8. Análise da produção de sAPP β por <i>Western blotting</i>	64
2.2.9. Administração intranasal de inibidores em modelo animal	65
2.2.10. Preparação de amostras de tecido cerebral	66
2.2.11. Determinação de A β ₄₀ por técnicas de ELISA	67
2.2.12. Análise estatística	68
Capítulo 3 – Os óleos essenciais como fonte de diversidade química	69
3.1. Análise e caracterização das amostras vegetais	71
3.1.1. Análise e identificação de constituintes voláteis maioritários	71
Capítulo 4 – O óleo essencial de <i>L. luisieri</i> inibe a actividade da BACE-1	75
4.1. Expressão e purificação de BACE-1 recombinante	77
4.1.1. Expressão em <i>E. coli</i> e purificação de proBACE-1 recombinante	77
4.1.2. Caracterização da actividade enzimática	80
4.2. Efeito dos óleos essenciais na actividade enzimática	83
4.2.1. Avaliação do potencial inibitório dos óleos essenciais	83
4.2.2. Inibição da BACE-1 pelo OE de <i>Lavandula luisieri</i>	85
4.3. Estudo da actividade do OE de <i>L. luisieri</i> em linhas celulares	87
4.3.1. O OE de <i>L. luisieri</i> diminui a produção de A β intracelular	88

Capítulo 5 – Identificação do inibidor da BACE-1 no óleo essencial de <i>L. luisieri</i>	91
5.1. Óleo Essencial de <i>Lavandula luisieri</i>	93
5.1.1. Composição do óleo de <i>L. luisieri</i>	94
5.1.2. Fraccionamento do OE	106
5.2. Avaliação da actividade inibitória dos componentes do OE	119
5.2.1. Efeito das fracções do OE de <i>L. luisieri</i> na actividade enzimática	119
5.2.2. Efeito das fracções do OE na produção de A β intracelular	121
5.2.3. Isolamento e caracterização dos constituintes maioritários da fracção mais activa	122
5.2.4. O principal responsável pela actividade do OE é a 2,3,4,4-tetrametil-5-metileno-ciclopent-2-enona	125
5.2.5. Quantificação e caracterização da inibição celular	126
5.2.6. A 2,3,4,4-tetrametil-5-metileno-ciclopent-2-enona não altera significativamente a viabilidade celular	128
5.2.7. A BACE-1 é um alvo intracelular da 2,3,4,4-tetrametil-5-metileno-ciclopent-2-enona	130
5.3. Potencial inibitório sobre outras proteases aspárticas	131
Capítulo 6 – Inibição em modelo animal da doença de Alzheimer	133
6.1. Estudos de inibição em ratinhos transgénicos 3xTg-AD	135
6.1.1. Diminuição da produção de A β cerebral pelo OE e compostos activos	136
Capítulo 7 – Discussão geral	139
Capítulo 8 – Conclusões finais	153
Capítulo 9 – Referências bibliográficas	159

Abreviaturas

aa	Aminoácido
A β ₄₀	Peptídeo beta amilóide 1-40
A β ₄₂	Peptídeo beta amilóide 1-42
AF	Ácido fórmico
ApoE	Apolipoproteína E
APP	Proteína precursora do amilóide
BACE	<i>Beta-site APP-cleaving enzyme</i>
BHE	Barreira hemato-encefálica
BSA	Albumina sérica bovina
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CHO	Células de ovário de hamster chinês
Da	Dalton
DA	Doença de Alzheimer
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNase	Desoxirribonuclease
DNP	Dinitrofenil
DTT	Ditiotreitol
η	Rendimento
EC ₅₀	Concentração eficaz a 50%
ECF	<i>Enhanced chemifluorescence</i>
ELISA	<i>Enzyme linked immuno sorbent assay</i>
EMEM	<i>Eagle's minimal essential medium</i>
eV	Electrão Volt
FBS	Soro fetal bovino
FID	Detector de ionização de chama

FPLC	<i>Fast performance liquid chromatography</i>
HRP	<i>Horse radish peroxidase</i>
IC ₅₀	Concentração inibitória a 50%
IPTG	Isopropil-β-tiogalactopiranosideo
IR	Índice de retenção
kDa	Kilo dalton
K _i	Constante de inibição
K _i ^{app}	Constante de inibição aparente
K _m	Constante de Michaelis-Menten
LC	Cromatografia líquida
G418	Geneticina
GC	Cromatografia gasosa
GC/MS	Cromatografia gasosa / Espectrometria de massa
mA	Miliampere
MCA	Metoxicoumarina
min	Minuto
OD	Densidade óptica
OE	Óleos essenciais
PAGE	Electroforese em gel de poliacrilamida
PBS	Tampão fosfato salino
PM	Plasmepsina
PPDMA	Pirofosfato de dimetilalilo
PPI	Pirofosfato de isopentenilo
RMN	Ressonância magnética nuclear
SAP	<i>Secreted aspartic proteases</i> do género <i>Candida</i>
sAPP _α	Fragmento solúvel de APP clivado pela α-secretase
sAPP _β	Fragmento solúvel de APP clivado pela β-secretase
SDS	Dodecilsulfato de sódio

SNC	Sistema nervoso central
TACE	Enzima conversora do factor de necrose tumoral α
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina
TLC	Cromatografia em camada fina
TMB	3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina
Tris	2-Amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol
u	Unidade de massa atómica
U.ml ⁻¹	Unidades por mililitro
UV	Ultravioleta
V ₀	Velocidade inicial
wt	<i>Wild type</i> (forma selvagem)

Resumo

Os óleos essenciais têm vindo a ser utilizados em terapêutica com uma extensa lista de possíveis aplicações clínicas. Estes produtos de origem vegetal, obtidos quase exclusivamente por destilação, são constituídos por dezenas de compostos de baixa massa molecular e elevada hidrofobicidade, sendo, por isso, importantes fontes de compostos naturais capazes de ultrapassar barreiras fisiológicas e de permear membranas, com potencial intrínseco para interagir e modular alvos intracelulares e exercer efeitos biológicos.

Nos últimos anos, as proteases aspárticas mereceram atenção reforçada da comunidade científica por integrarem os mecanismos moleculares de diversas patologias graves e de elevada prevalência, tais como a síndrome da imunodeficiência humana adquirida, a malária, a doença de Alzheimer, algumas infecções fúngicas, etc. A identificação e caracterização de inibidores dessas proteases aspárticas e as suas potencialidades como agentes quimioterapêuticos assumiram, então, grande relevância. É o caso da BACE-1, protease aspártica reconhecida como enzima chave no processo neurodegenerativo da doença de Alzheimer, e dos seus potenciais inibidores que, tendo fins terapêuticos, devem demonstrar, não só, selectividade, mas também características favoráveis para passarem a barreira hemato-encefálica e permearem membranas celulares.

Neste contexto, descrevemos nos próximos capítulos a investigação que desenvolvemos com vista à identificação de inibidores da BACE-1, hidrófobos e de baixa massa molecular, aptos para permearem membranas celulares.

A primeira fase deste trabalho correspondeu a um rastreio, sobre várias dezenas de óleos essenciais, tendo em vista evidenciar os óleos que demonstravam efeitos inibitórios sobre a proBACE-1 recombinante. Todos os óleos ensaiados foram caracterizados por elucidação da sua composição. Entre

os que revelaram capacidade inibitória, o óleo essencial de *Lavandula luisieri* foi distinguido como o mais promissor, tendo em conta a potência da inibição e a sua composição singular que inclui raros monoterpenos irregulares de núcleo ciclopentano penta-substituído, usualmente designados como monoterpenos derivados do necrodano.

O óleo de *L. luisieri* inibiu a BACE-1 de forma dependente da concentração, tanto em ensaios bioquímicos de inibição *in vitro* (IC₅₀ de 121,5µg.ml⁻¹), como em ensaios de avaliação da redução da produção de Aβ em linhas celulares (EC₅₀ de 86,2µg.ml⁻¹) que, simultaneamente, comprovaram a capacidade dos componentes do óleo para permear membranas celulares.

Na sequência de fraccionamentos bioguiados, que permitiram a obtenção de fracções com composições menos complexas, aprofundou-se o conhecimento sobre a composição do óleo essencial de *Lavandula luisieri*, até à data, insuficientemente caracterizado. Foram, então, identificados cerca de uma centena de componentes que representam mais de 85% da composição total.

A actividade inibitória das fracções foi avaliada, quer sobre a forma pró-, quer sobre a forma activa da enzima recombinante, caracterizando-se a fracção mais activa (#3.1), maioritariamente constituída por linalol e por um composto de núcleo necrodano, a 2,3,4,4-tetrametil-5-metileno-ciclopent-2-enona, por valores de IC₅₀ de 282,6µg.ml⁻¹ para a inibição enzimática, e de EC₅₀ de 94,5µg.ml⁻¹ para a diminuição da produção de Aβ na linha celular CHO-APPwt.

O linalol e a 2,3,4,4-tetrametil-5-metileno-ciclopent-2-enona, isolados a partir do óleo essencial e de origem sintética, foram avaliados isoladamente revelando que a actividade inibitória da fracção se devia à 2,3,4,4-tetrametil-5-metileno-ciclopent-2-enona. O linalol não produziu efeito algum nas concentrações testadas.

Pelos ensaios de inibição da enzima recombinante com a 2,3,4,4-tetrametil-5-metileno-ciclopent-2-enona não se evidenciaram diferenças na

inibição da forma pró- e da forma activa. De igual modo, quer em termos de potência, quer em termos de modo de inibição não se assinalaram diferenças significativas entre a 2,3,4,4-tetrametil-5-metileno-ciclopent-2-enona isolada a partir do óleo de *L. luisieri* e a de origem sintética. Foi determinado um $K_{i_{app}}$ de 415,8 μ M, ajustando-se os dados a um modelo de inibição competitivo.

A 2,3,4,4-tetrametil-5-metileno-ciclopent-2-enona demonstrou capacidade de inibir a produção de A β em duas linhas celulares, CHO-APPwt e SHSY5Y-APPwt, com EC_{50} de 72,8 μ M e 217,4 μ M, respectivamente, e sem alterações significativas da viabilidade celular nas concentrações inibitórias. A inibição da BACE-1 intracelular foi ainda comprovada pela diminuição da produção de sAPP β , o produto directo da clivagem do APP por aquela enzima. A principal diferença encontrada nos resultados dos ensaios sobre linhas celulares, relativamente aos ensaios enzimáticos, foi o facto de a 2,3,4,4-tetrametil-5-metileno-ciclopent-2-enona isolada a partir do óleo de *L. luisieri* e a sintética não inibirem a produção de A β exactamente com a mesma potência, sendo esta muito superior no primeiro caso. O linalol, contaminante residual da 2,3,4,4-tetrametil-5-metileno-ciclopent-2-enona isolada, parece desempenhar um papel no efeito celular, já que ao ser adicionado à 2,3,4,4-tetrametil-5-metileno-ciclopent-2-enona sintética aumenta ligeiramente a inibição.

Na última fase deste trabalho avaliámos a capacidade dos compostos activos, 2,3,4,4-tetrametil-5-metileno-ciclopent-2-enona e linalol, diminuírem a produção de A β *in vivo*, utilizando um modelo animal da doença de Alzheimer, o rato transgénico 3xTg-AD. Da mesma forma que o observado nas linhas celulares, o óleo total, a fracção e a 2,3,4,4-tetrametil-5-metileno-ciclopent-2-enona reduziram de forma significativa os níveis de A β cerebral (aproximadamente 25% para as concentrações estudadas), sem sinais visíveis de toxicidade, após administração intranasal. Estes resultados permitiram demonstrar que o óleo estudado e alguns dos seus constituintes têm capacidade

para inibir a BACE-1 não só *in vitro*, mas também *in vivo*, característica essencial para um inibidor com utilidade clínica.

Não obstante a falta de selectividade e a potência moderada, o óleo essencial de *L. luisieri* e alguns dos seus componentes apresentam potencial aplicabilidade como inibidores da BACE-1, quer para fins de investigação, quer como protótipos para desenvolvimento de inibidores mais potentes e selectivos com fins preventivos na doença de Alzheimer.

Abstract

Natural products from plants have been widely used in medicine, with several applications in an enormous variety of disorders. Among those natural products, volatile essential oils are potential candidates to enzymatic inhibition, since they have hundreds of low molecular weight and high hydrophobicity active compounds with the ability to pass through cell membranes.

In the last years, aspartic proteases are receiving considerable attention as potential drug targets since they are implicated in several serious diseases, like AIDS, Alzheimer's disease, malaria, hypertension and some fungal infections. The dramatic raising in Alzheimer's disease prevalence and recent findings suggesting that BACE-1 is a key enzyme for the neurodegenerative process has stimulated several groups to search for efficient inhibitors. In order to achieve this goal, the active compounds should not only be selective, but also had the ability to cross cell membranes and the blood brain barrier, what has been a difficult task.

In this work, we analyzed and characterized almost fifty essential oils and started with a preliminary screening assay on recombinant proBACE-1. The results revealed some potential inhibitors, being the most promising one from *Lavandula luisieri*, an atypical essential oil, composed by irregular monoterpenoids with a cyclopentanic skeleton, usually called necrodane skeleton. This oil revealed an IC_{50} of $121,5\mu\text{l.ml}^{-1}$ and this inhibition, as well the ability to cross over the cellular membranes, were confirmed in a cell line, giving a EC_{50} of $86,2\mu\text{g.ml}^{-1}$.

To elucidate which compounds are responsible for the inhibitory effect, the essential oil was analyzed in detail and fractionated. Each fraction was tested on recombinant proBACE-1 and also in BACE-1 activated by the cleavage of pro-domain with clostripain, yielding similar results, with an IC_{50} of $282,6\mu\text{g.ml}^{-1}$ for

the most potent fraction, named #3.1. Like the essential oil, this fraction was able to reduce, in a dose-dependent way, the production of intracellular A β by CHO-APPwt cells, showing an EC₅₀ of 94,5 μ g.ml⁻¹.

The #3.1 fraction was mainly composed by linalool and a cyclopentanic ketone, the 2,3,4,4-tetramethyl-5-methylene-cyclopent-2-enone. Once these two compounds were obtained by organic synthesis, as well as isolated from their original fraction, the enzymatic assays revealed that 2,3,4,4-tetramethyl-5-methylene-cyclopent-2-enone was the major responsible for the inhibitory activity, while linalool had no effect at tested concentrations. At this stage any difference in potency or inhibition model between the two enzymatic forms and the purified or synthetic tetramethyl-5-methylene-cyclopent-2-enone was observed. The kinetic studies revealed a K_{iapp} of 415,8 μ M, fitting the data to a competitive inhibition model. This necrodanic ketone also showed the ability to reduce the A β production in two cell lines, CHO-APPwt and SHSY5Y-APPwt, the EC₅₀ being 72,8 μ M and 217,4 μ M, respectively, without apparent toxicity. A reduction in sAPP β levels, a fragment that directly results from BACE-1 cleavage was also observed, confirming this enzyme as one of the intracellular targets of the inhibitory compounds. Despite the enzymatic assays presented no differences between isolated and synthetic 2,3,4,4-tetramethyl-5-methylene-cyclopent-2-enone, the same was not true for cell experiments, the former being much more potent than the later. Linalool alone had no effect on cells, but trace amounts presented in the isolated ketone sample may play an important role on cellular effect as the inhibition of the synthetic ketone was modestly improved by the mixture of small amounts of linalool.

In the last stage of this work we evaluated the ability of the putative inhibitors to cross the blood brain barrier and reducing A β levels *in vivo*, in a Alzheimer's animal model. The whole oil, its most active fraction and the tetramethyl-5-methylene-cyclopent-2-enone were tested and the results showed

xiv

that all produced a perceptible lowering in brain A β levels (approximately 25% for the concentrations tested), without apparent toxicity, after intranasal administration.

The results presented here described new BACE-1 inhibitors, not expensive and easy to obtain, effective in cell lines and *in vivo*, despite its moderate specificity and potency. Therefore, they present a potential applicability on research, as well as a source of lead compounds, which inhibitory potency and selectivity could be improved by drug design. Probably, they could also be used in aromatherapy, with a preventive effect for Alzheimer's disease.

INTRODUÇÃO

1

1.1. Óleos Essenciais: Fonte de Compostos Bioactivos

1.1.1. Produtos naturais e o desenvolvimento de novos fármacos

A utilização de produtos naturais, particularmente de plantas, na terapêutica remonta às civilizações primitivas, mas só no século XIX se começaram a caracterizar e aplicar os compostos isolados (Liang *et al.*, 2006). Os avanços na Ciência permitiram também reconhecer a enorme diversidade química encontrada na natureza, desenvolvida e aperfeiçoada por milhões de anos de evolução, como uma fonte importante de potenciais compostos activos. De facto, estima-se que existam cerca de 250 000 espécies de plantas, cuja interacção, entre elas ou com outros organismos vivos, é apenas possível pela produção de grande variedade de compostos químicos (Verpoorte, 1998).

Esta diversidade é resultante do metabolismo secundário que, não estando directamente envolvido no crescimento e desenvolvimento (funções desempenhadas pelo metabolismo primário), parece ser indispensável à sobrevivência e adaptação das espécies vegetais. Os metabolitos secundários exercem funções importantes na defesa contra predadores ou agentes patogénicos, na regulação do crescimento de espécies competidoras (Rocha *et al.*, 2001), na polinização, entre muitas outras.

Apesar da bem-sucedida utilização de plantas e extractos naturais no contexto da história e da evolução dos recursos terapêuticos, o desenvolvimento da síntese química e de novos métodos de rastreio em larga escala, orientados para alvos moleculares definidos, ao trazer novas alternativas à investigação,

relegou para plano secundário a pesquisa sobre produtos naturais, de difícil acesso e com composições complexas que comprometiam a respectiva caracterização, não sendo, por isso, competitivas com as bibliotecas de compostos sintéticos (Strohl, 2000).

Porém, o que actualmente se verifica é que a química combinatorial não consegue fornecer estruturas tão variadas e em tão grande número como as que a natureza disponibiliza e pode continuar a disponibilizar. Além disso, ao contrário do que acontece com a maioria dos compostos sintéticos, os produtos do metabolismo secundário das plantas (e de outros organismos) são mediadores de funções biológicas com características físico-químicas que viabilizam a sua interacção com sistemas biológicos, elevando as expectativas sobre a sua adequabilidade farmacocinética. Por outro lado, o potencial de utilização dos metabolitos secundários vegetais é variado, não só enquanto fonte de fármacos de síntese difícil ou de comercialização inviável, como também enquanto fonte de modelos ou de bases para a síntese parcial. O mesmo se aplica a muitas moléculas naturais, mesmo que não dotadas de actividade (Demain, 1999). Uma prova inequívoca da importância destes compostos é o facto de que cerca de metade dos agentes farmacológicos mais consumidos a nível mundial derivarem de produtos naturais (Farnsworth *et al.*, 1985; Harvey, 2000).

Resumindo, a Natureza continua a disponibilizar maior diversidade de estruturas químicas do que a química combinatorial e, por isso, continua a assumir um papel relevante na investigação farmacêutica e na descoberta de estruturas moduladoras de alvos terapêuticos. Apesar do grande número de moléculas e fontes naturais já estudadas, cerca de 90% da biodiversidade mundial está por estudar e os seus metabolitos por testar, o que leva a encarar

com grande optimismo a descoberta de muitas mais estruturas com actividade biológica e potencial terapêutico, a partir de fontes naturais (Harvey, 2000).

1.1.2. Estratégia para a obtenção de moléculas activas

A ideia de que a utilização de um extracto vegetal tem vantagens em relação ao uso dos constituintes isolados não é recente, mas só ultimamente começou a ser investigada de forma racional e sistemática. Assim, o principal factor que contribui para esta opinião é o efeito sinérgico que muitas vezes se observa nestes extractos, provavelmente devido à existência de diferentes alvos farmacológicos para os diferentes componentes da mistura. Este efeito explica também o porquê de muitas vezes o extracto apresentar um melhor efeito terapêutico do que os seus componentes isolados (Yaniv *et al.*, 2005).

No entanto, mesmo que a administração da mistura apresente vantagens, deve ser sempre feita de forma racional, o que só será possível com o conhecimento detalhado da composição, avaliando as eventuais propriedades benéficas ou tóxicas, assim como a estrutura de cada um dos constituintes. Por este motivo, independentemente da utilização do extracto inteiro ou algum dos seus componentes isolados, a estratégia de estudo e desenvolvimento deve seguir os mesmos critérios para garantia de segurança e eficácia.

O primeiro passo envolve a obtenção de extractos brutos, sendo que a utilização de diferentes solventes e procedimentos extractivos pode condicionar o tipo e a quantidade de compostos extraídos. Alguns métodos de extracção são selectivos para determinado grupo de compostos (Verpoorte, 1998), o que se traduz na vantagem de fornecerem extractos de menor complexidade, limitando a ocorrência de substâncias indesejáveis e simplificando e favorecendo as etapas de investigação subsequentes.

Tais extractos podem depois ser sujeitos a técnicas modernas de rastreio em larga escala, com a vantagem de, enquanto misturas complexas, multiplicarem o número de compostos em avaliação num único ensaio.

No caso de haver alguma actividade de interesse, a investigação é normalmente orientada para o isolamento do ou dos compostos responsáveis por essa acção. Habitualmente, este isolamento é quase sempre precedido por um fraccionamento cromatográfico, que pode ser mais ou menos complexo, possibilitando a obtenção de fracções com número mais reduzido de compostos ou mesmo componentes pré-purificados, contribuindo decisivamente para a simplificação dos processos analíticos e de determinação estrutural (Proença da Cunha, 2005; Yaniv *et al.*, 2005). Nesta fase surge também a possibilidade de avaliar e quantificar os efeitos de componentes da mistura, sinalizando as eventuais moléculas activas.

1.1.3. Plantas aromáticas e óleos essenciais

Óleo essencial (OE) é a designação de um tipo de isolado, de origem vegetal, preparado por destilação, raramente por expressão. Os óleos essenciais são misturas complexas de compostos hidrófobos de baixa massa molecular (<300Da), voláteis, com origem no metabolismo secundário das plantas. Aos óleos e aos seus constituintes são atribuídas inúmeras funções ecofisiológicas, desde a protecção contra infecções e parasitas, à atracção de zoopolinizadores e zoodispersores, até à intervenção na regulação do equilíbrio hídrico e térmico da planta, evitando a desidratação (Paúl, 2002). Os constituintes voláteis por, em geral, serem dotados de aroma, designam-se por compostos aromáticos, estendendo-se esse qualificativo às plantas que os produzem e acumulam, deste modo designadas plantas aromáticas (Proença da Cunha, 2005).

Os óleos podem existir em todos os órgãos vegetais e a sua acumulação pode depender do estágio de desenvolvimento da planta e/ou de factores extrínsecos. A síntese dos seus constituintes e a acumulação do óleo estão, na maioria das plantas aromáticas, associadas a estruturas secretoras especializadas internas, como ductos e bolsas, ou externas, como os osmóforos e tricomas glandulares. Para além do facto de indivíduos de uma espécie poderem produzir óleos essenciais de composição distinta na sequência de diferenças genómicas e da respectiva expressão, existe também um elevado nível de relação entre a biossíntese e acumulação de OE e a fisiologia das plantas aromáticas. A produção daqueles metabolitos depende do estado metabólico e de diferenciação da planta, assim como do impacto de factores externos como condições edáficas, temperatura, humidade, intensidade luminosa, etc (Sangwan *et al.*, 2001).

Além da volatilidade (que os distingue dos óleos fixos) e do aroma forte, os óleos essenciais são, em geral, misturas líquidas à temperatura ambiente, menos densas do que a água, com índice de refacção elevado e quase sempre dotadas de poder de rotação da luz polarizada. São solúveis em álcoois e em solventes orgânicos comuns e arrastáveis pelo vapor de água (Silva, 2006). A elevada lipofilicidade dos seus componentes permite-lhes que sejam rapidamente absorvidos pelos tecidos e corrente sanguínea, sendo considerável a capacidade de atravessar barreiras fisiológicas (Perry *et al.*, 2002).

Os óleos essenciais são constituídos maioritariamente por terpenóides, alguns fenilpropanóides, compostos alifáticos e os respectivos derivados funcionalizados, álcoois, cetonas, ésteres, aldeídos, entre outros (Siani *et al.*, 2000). Apesar da importância dos fenilpropanóides para a actividade biológica de alguns óleos essenciais, eles são pouco abundantes, restringindo-se a sua

ocorrência a algumas famílias de plantas aromáticas, e apresentam uma diversidade estrutural muito inferior à observada nos terpenóides.

A designação terpenóide ou isoprenóide engloba todos os compostos resultantes da condensação de duas unidades de pirofosfato de isopentenilo (PPI) ou do seu isômero, pirofosfato de dimetilalilo (PPDMA), derivados da unidade pentacarbonada isopreno (2-metil-1,3-butadieno). Os dímeros dessas unidades, com 10 átomos de carbono – monoterpênos, os trímeros, com 15 átomos de carbono – sesquiterpênos, e os tetrâmeros – diterpênos, são os terpenóides voláteis componentes dos OE. A sua biossíntese (Figura 1) envolve os dois precursores PPI e PPDMA, produtos da via metabólica acetato-mevalonato.

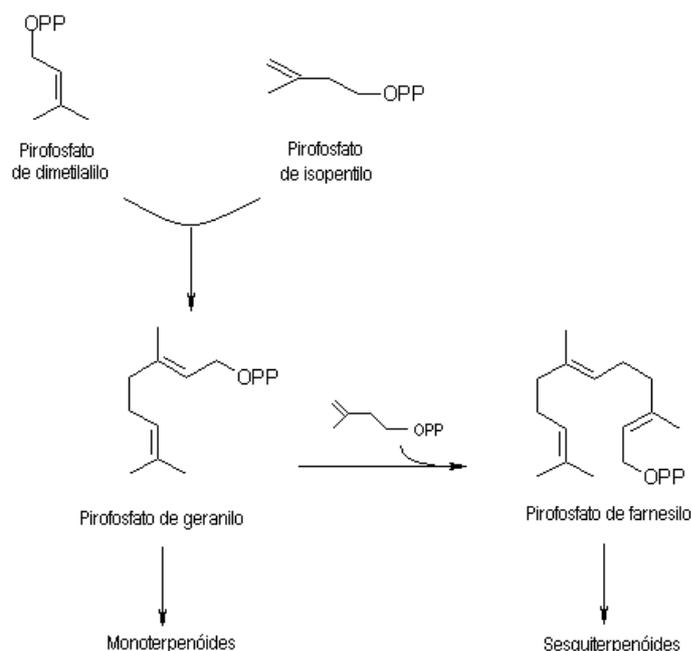


Figura 1. Biossíntese de terpenóides a partir dos precursores PPDMA e PPI. A primeira condensação origina um intermediário com 10 carbonos e a posterior adição de PPI origina o intermediário de 15 (adaptado de Proença da Cunha, 2005).

A condensação dos dois origina o precursor imediato dos monoterpenos, o pirofosfato de geranilo, com 10 carbonos. A condensação deste último com uma nova unidade origina, por sua vez, o precursor dos sesquiterpenos, pirofosfato de farnesilo (Proença da Cunha, 2005) e com mais uma, o pirofosfato de geranilgeranilo, precursor dos diterpenos. Posteriores condensações podem originar precursores com 25, 30 ou mais átomos de carbono, raros ou inexistentes nos óleos essenciais.

1.1.4. Classificação e diversidade química dos terpenóides

Os monoterpenos podem apresentar estrutura linear ou cíclica e, neste caso, mono ou policíclica. Além dos monoterpenos de estrutura regular, resultantes da ligação “cabeça - cauda” das duas unidades pentacarbonadas, podem ainda ocorrer monoterpenos irregulares (Berger, 2007). Na Figura 2 apresentam-se exemplos de monoterpenos ilustrativos de cada categoria.

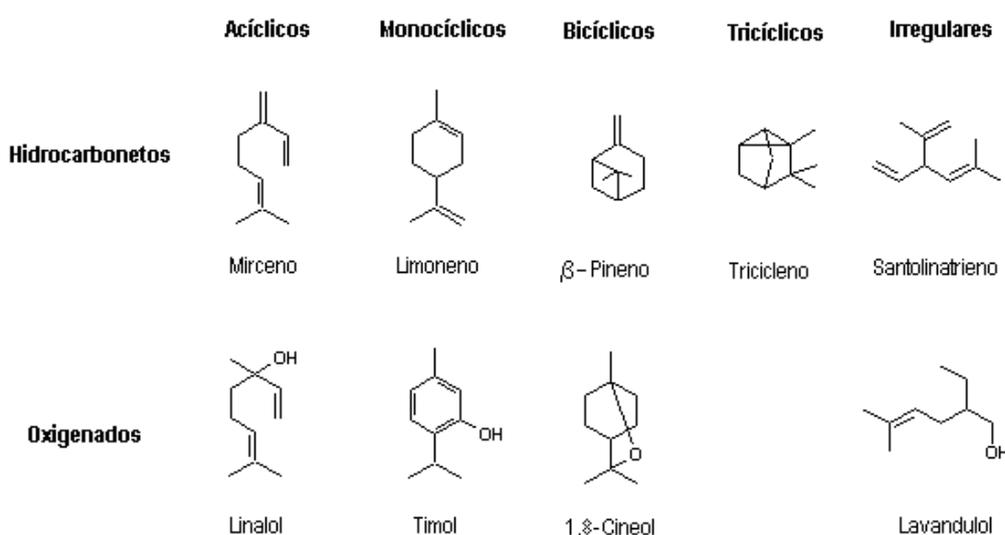


Figura 2. Exemplos de monoterpenos.

Os sesquiterpenos, com mais 5 carbonos que os monoterpenos, apresentam ainda maior diversidade. Aos diferentes esqueletos carbonados de estruturas linear, cíclica ou policíclica, acrescem diversas possibilidades de funcionalização, quer quanto ao tipo e número de grupos funcionais, quer quanto às suas posições, ocorrendo também isomeria. Encontram-se descritos vários milhares de compostos sesquiterpenóides (Paúl, 2002). Na Figura 3 apresentam-se exemplos de sesquiterpenos com diferentes estruturas.

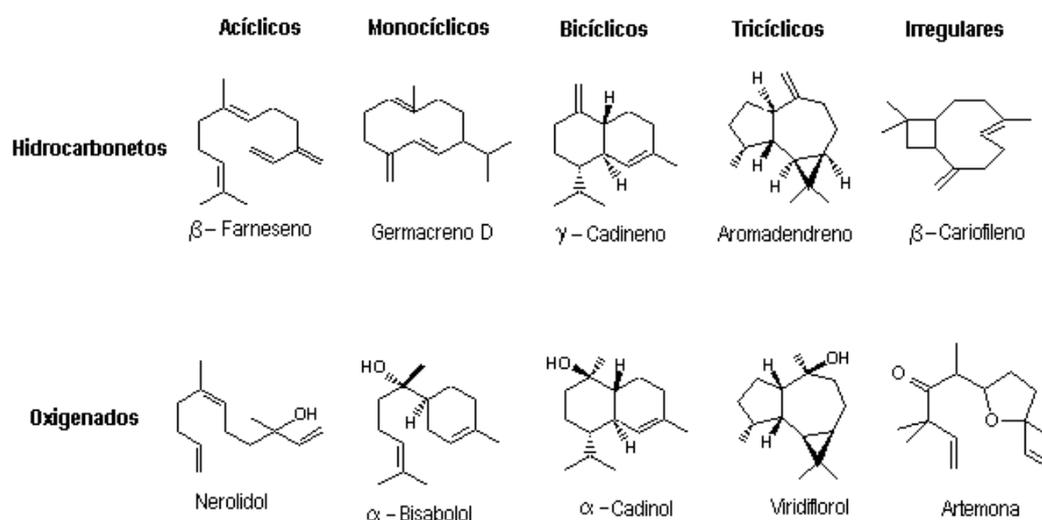


Figura 3. Exemplos de sesquiterpenos.

1.1.5. Actividade biológica dos óleos essenciais

A diversidade estrutural dos constituintes dos OE reflecte-se na multiplicidade das actividades biológicas que lhes são imputadas.

A actividade antimicrobiana foi a primeira a ser documentada cientificamente e é, ainda hoje, a melhor caracterizada, o que se justifica pelo facto de ser uma das actividades que estes compostos desempenham nas

plantas que os produzem. São numerosos os relatos acerca desta actividade em bactérias, fungos e parasitas, e o seu interesse tem aumentado cada vez mais com o aparecimento de resistências aos agentes tradicionais e a necessidade de investigar novas alternativas terapêuticas, tão eficazes quanto seguras (Lee *et al.*, 2005). O efeito antimicrobiano está geralmente associado aos compostos oxigenados, revestindo-se de grande importância a associação entre o carácter lipofílico do esqueleto hidrocarbonado e o carácter hidrofílico do grupo funcional (Berger, 2007). Os mecanismos de acção habituais envolvem a alteração da permeabilidade membranar e a inibição das enzimas da cadeia respiratória, alterando o balanço energético do microrganismo (Proença da Cunha, 2005). Alguns exemplos de terpenóides com actividade antimicrobiana reconhecida incluem os fenóis terpénicos, timol e carvacrol (Bagamboula *et al.*, 2004), o aldeído cinâmico, o 1,8-cineol e o linalol (Simic *et al.*, 2004), activos contra diferentes estirpes de bactérias, de Gram-positivo e de Gram-negativo, contra vários fungos incluindo leveduras oportunistas patogénicas do género *Candida* (Bona da Silva *et al.*, 2008), contra parasitas protozoários (Lopes *et al.*, 1999), *Trypanosoma* sp, *Giardia lamblia* (Machado *et al.*, 2010a), *Leishmania* sp. (Machado *et al.*, 2010b) e até helmintas (Coskun *et al.*, 2008).

A actividade antiviral tem sido particularmente descrita e testada para os vírus do *Herpes simplex*, tipos 1 (HSV-1) e 2 (HSV-2) (de Logu *et al.*, 2000; Minami *et al.*, 2003; Schuhmacher *et al.*, 2003). Embora menos numerosos, existem também relatos da aplicação destes agentes ao controlo de outros vírus, como é o caso do poliovírus-1 (Marongiu *et al.*, 2003), do *Molluscum contagiosum* (Burke *et al.*, 2004), de vários adenovírus (Cermelli *et al.*, 2008), de *influenza* (Zai-Chang *et al.*, 2005), do citomegalovírus (Jassim *et al.*, 2003) e do HIV-1 (Hayashi *et al.*, 1995; Asres *et al.*, 2005). Entre os vários mecanismos de acção possíveis parecem estar a inibição do ciclo de vida e da replicação viral,

assim como da penetração e transmissão celular. Muitos dos óleos e terpenóides descritos com actividade virucida apresentam ainda a vantagem de serem menos tóxicos que os antivirais sintéticos em uso. Alguns exemplos destes compostos incluem o isoborneol (Armaka *et al.*, 1999), o linalol, o citral (mistura de isómeros *cis*- e *trans*-) e o citronelal (Allahverdiyev *et al.*, 2004), o 1,8-cineol e o terpineno-4-ol (Frag *et al.*, 2004), entre outros.

O efeito pernicioso dos processos oxidativos e o facto de estes estarem associados a um grande número de doenças humanas, sendo responsáveis por muitas das alterações moleculares associadas a cada uma, tem aumentado o interesse na procura e utilização de agentes com actividade antioxidante. Os OE surgiram naturalmente como candidatos devido à presença de compostos fenólicos, cujo papel antioxidante é já bem conhecido (Berger, 2007). No entanto, a capacidade antioxidante de alguns óleos essenciais não se limita apenas aos compostos fenólicos, já que alguns hidrocarbonetos, álcoois, cetonas, aldeídos e éteres monoterpénicos também contribuem para a actividade total dos óleos (Edris, 2007). Todos estes constituintes podem actuar como agentes redutores, dadores de hidrogénio ou como *scavengers* e *quenchers* de radicais livres, exercendo efeitos a vários níveis da cadeia oxidativa. Compostos como o terpineno, o terpinoleno, o geraniol, o neral e o geranial (Choi *et al.*, 2000), além dos fenóis, timol e carvacrol (Gulluce *et al.*, 2003), são apenas um pequeno exemplo da variedade de terpenóides com características antioxidantes.

O uso de muitos agentes naturais como agentes terapêuticos com actividade anticancerígena tem modificado a evolução de muitos tipos de cancro humanos (Rocha *et al.*, 2001). Nos últimos anos vários estudos indicaram que muitos compostos da dieta, incluindo terpenóides, podem desempenhar um

papel importante na prevenção do cancro (Elson, 1995; Crowell, 1999; Mo *et al.*, 2004). Este facto, juntamente com o conhecimento do diverso potencial terapêutico dos óleos essenciais, tem conduzido os investigadores no sentido de testar estas substâncias em diferentes tipos de cancro, aproveitando também as vantagens dos mecanismos de acção serem diferentes dos antineoplásicos clássicos e poderem apresentar menor toxicidade. Na realidade, além da actividade citostática aplicada ao tratamento, estes compostos acumulam uma acção preventiva que ocorre maioritariamente pela indução dos mecanismos detoxificantes. Na quimioterapia apresentam efeitos na indução da apoptose e na inibição do crescimento e metabolismo celular, podendo também potenciar o efeito de alguns anti-cancerígenos tradicionais (Edris, 2007). Terpenóides como o limoneno, o ácido ou o álcool perílico, o geraniol, o α -bisabolol, o cadaleno ou o mentol, são exemplos de compostos já estudados para o tratamento de cancros e metástases tão variados como o mamário, gástrico, pulmonar, pancreático, leucemias e melanomas (Berger, 2007).

Desde tempos antigos que a actividade analgésica e anti-inflamatória dos OE tem sido aproveitada, ainda que de forma empírica (Shinde *et al.*, 1999). Hoje em dia existem medicamentos aprovados contendo alguns destes compostos naturais, como é o caso do mentol, descrito como analgésico tópico (Berger, 2007). Muitos outros estudos envolvendo diferentes óleos têm demonstrado esta actividade em modelos animais, submetidos a estímulos nociceptivos (Barocelli *et al.*, 2004) ou a reacções inflamatórias como a formação de edemas (Peana *et al.*, 2002; Sosa *et al.*, 2005).

A nível digestivo, alguns óleos voláteis são dotados de propriedades estimulantes das secreções gástricas e biliares, o que facilita a digestão e tem um efeito hepatoprotector, razões pelas quais são mais utilizados (Berger, 2007).

Podem também exercer efeito inibidor da musculatura lisa do intestino, o que tem justificado o seu uso como anti-espasmódicos, anti-diarreicos e carminativos (Hajhashemi *et al.*, 2000; Sadraei *et al.*, 2001). Por último, outra actividade importante que tem sido investigada é a capacidade de prevenir a formação de úlceras, classificando-se alguns OE como gastroprotectores e anti-ulcerosos (Matsunaga *et al.*, 2000; Barocelli *et al.*, 2004).

Outras actividades descritas envolvem por exemplo a inibição da reabsorção óssea (Mühlbauer *et al.*, 2003) e a inibição da acetilcolinesterase (Perry *et al.*, 2003; Jukic *et al.*, 2007) com potencial utilização na osteoporose e doença de Alzheimer, respectivamente. Apesar de não ser uma actividade farmacológica propriamente dita, o facto de alguns terpenóides e OE aumentarem a permeabilidade celular, permitindo por exemplo, a aplicação transdérmica de outros fármacos, pode constituir uma novidade importante na terapêutica, particularmente na de moléculas activas com vias de administração pouco favoráveis (Edris, 2007). Muitos outros efeitos estão ainda por explorar ou começam agora a ser explorados, o que poderá levar, no futuro, a um aumento significativo da lista atrás descrita.

1.2. Proteases Aspárticas: Função Biológica e Patologias Associadas

1.2.1. Definição e classificação

As proteases constituem uma das maiores e mais diversas famílias de proteínas envolvidas em funções essenciais em todos os organismos vivos e a sua desregulação pode ser destrutiva e ocasionar diversas patologias. No caso dos humanos participam na regulação de processos variados como o catabolismo proteico, coagulação sanguínea, crescimento e migração celular, diferenciação tecidual, desenvolvimento embrionário, inflamação, apoptose, activação de zimogénios, libertação de hormonas e peptídeos activos, entre muitos outros (Dash *et al.*, 2003).

De acordo com o mecanismo de catálise e com os constituintes do local activo, as proteases são hoje classificadas em 7 grupos (MEROPS) (Rawlings *et al.*, 1999; Rawlings *et al.*, 2008), sendo os primeiros a ser descritos os das serínicas, cisteínicas, aspárticas e metaloproteases. Cada uma das classes divide-se ainda em famílias com base nas semelhanças na sequência de aminoácidos e em clãs, de acordo com as relações evolutivas e estruturas terciárias.

As proteases aspárticas (EC 3.4.23) têm sido estudadas e caracterizadas de forma exaustiva e encontram-se largamente distribuídas na natureza, podendo ocorrer em animais, plantas, fungos, vírus, parasitas e bactérias. O seu elevado número e variedade origina 14 famílias e 7 clãs (Rawlings *et al.*, 2008).

Nesta introdução será dado maior destaque às famílias A1 (família pepsina) e A2 (família retropepsina), dado o grande interesse que têm despertado pelo envolvimento dos seus membros em muitas patologias humanas. Na família A1 podem referir-se os casos da BACE na doença de Alzheimer, da renina na hipertensão, da catepsina D nas metástases do cancro da mama, das plasmepsinas na malária e das proteases aspárticas secretadas (Sap) nas infecções por *Candida* (Leung *et al.*, 2000). A protease do HIV-1, envolvida na síndrome de imunodeficiência humana (SIDA), representa o exemplo mais característico da família A2.

1.2.2. Características gerais

As características típicas das proteases aspárticas incluem um pH ótimo ácido que limita a sua localização celular, a inibição pela pepstatina (um hexapeptídeo isolado de *Streptomyces*) e uma preferência geral para clivar ligações peptídicas entre resíduos hidrofóbicos. A sua classificação deriva da presença de dois resíduos aspartato no local activo, localizados em duas tríades conservadas (Dunn, 2002). Estudos cristalográficos revelaram uma estrutura terciária bilobular, com a fenda catalítica situada no meio dos dois lóbulos, cada um deles contribuindo com um resíduo aspartato catalítico (Rawlings *et al.*, 1995). A homologia estrutural entre ambos os lóbulos das proteases eucarióticas e a excepção das virais que possuem uma única tríade catalítica e só são activas como homodímeros, sugere um mecanismo evolutivo decorrente da duplicação do gene ancestral (Tang *et al.*, 1978).

As proteases não virais são sintetizadas sob a forma de precursores inactivos com dois domínios na região N-terminal, uma sequência sinal que é removida quando da entrada no retículo endoplasmático, e um domínio pró, que

protege as células produtoras da degradação. Esta região parece ainda desempenhar funções importantes na aquisição e estabilização de uma estrutura terciária correcta, no controlo do processo de maturação e no endereçamento intracelular (Koelsch *et al.*, 1994). A activação do zimogénio ocorre geralmente por remoção do peptídeo pró e pode ser mediada por outra protease ou ocorrer por auto-catálise, desencadeada por uma descida de pH.

Habitualmente estas enzimas possuem um segmento móvel por cima do local activo, designado *flap*, que, quando fechado, pode ajudar a manter o substrato ligado (Davies, 1990). A catálise pelas proteases aspárticas envolve um mecanismo geral ácido-base, sem formação de intermediários covalentes. A hidrólise do substrato ocorre por activação de uma molécula de água por um dos aspartatos do local activo e o posterior ataque desta ao grupo carbonilo da amida presente no local de clivagem. O ataque pelo azoto da respectiva amida ao outro aspartato origina um intermediário tetraédrico não covalente que é depois convertido nos produtos da reacção (Schmidt, 2003).

Apesar das semelhanças gerais, as proteases desta família apresentam diferenças substanciais no que respeita à localização celular e propriedades catalíticas e conseqüentemente nas suas funções biológicas (Davies, 1990), o que pode ser explorado para a modulação selectiva das suas actividades.

1.2.3. Fisiopatologia humana

A representante da família A1, pepsina, foi uma das primeiras proteases a ser identificada e cristalizada. É produzida pelas células da mucosa gástrica na forma do seu precursor inactivo, o pepsinogénio, sendo a primeira de uma série de enzimas que digere as proteínas ingeridas. A conversão do precursor na forma

activa é autocatalítica e ocorre devido à diminuição do pH resultante da libertação simultânea do suco gástrico (McPhie, 1972).

Apesar de não ser um alvo terapêutico preferencial de nenhuma patologia, o seu estudo é importante para o desenvolvimento de inibidores selectivos de outras proteases aspárticas, devido não só à função fisiológica da pepsina que não deve ser inibida, mas também ao facto de uma ligação a esta proteína diminuir a biodisponibilidade para o alvo real (Fujinaga *et al.*, 1995).

A renina está envolvida no passo limitante de uma cascata de eventos cuja principal função é a regulação do equilíbrio hidroelectrolítico e da pressão arterial. A clivagem do seu substrato, angiotensinogénio, leva à formação da angiotensina I que, por sua vez, é convertida por uma outra enzima na molécula biologicamente activa angiotensina II (Brian, 2003).

A sua produção ocorre nas células justagomerulares do rim sob a forma do precursor pró-renina, à semelhança do que se passa com as outras proteases aspárticas descritas. No entanto, este precursor apresenta como particularidade o facto de possuir dois tipos de activação: uma catalítica e irreversível e outra reversível, não catalítica. No primeiro caso a activação ocorre nas próprias células renais, por clivagem do peptídeo pró por uma outra protease. O segundo tipo de activação pode ocorrer em condições favoráveis de temperatura e pH, ou por ligação ao receptor da renina, envolvendo uma alteração na conformação, que desloca o segmento pró da fenda catalítica (Gradman *et al.*, 2008). Este receptor tem a capacidade de ligar quer a forma precursora quer a forma madura, ambas cataliticamente activas e capazes de desencadear a mesma resposta biológica (Fisher *et al.*, 2005). Além do envolvimento na hipertensão arterial e patologias associadas, via produção de angiotensina, a activação do receptor pela pró-renina parece ter efeitos independentes, como a activação de vias de sinalização intracelulares, que podem estar implicadas por exemplo na

nefropatia e retinopatia diabética (Danser *et al.*, 2005). Assim, a inibição da renina (e pró-renina) pode apresentar, relativamente aos inibidores das outras enzimas envolvidas na cascata de formação da angiotensina II, a vantagem de controlar outras patologias para além da hipertensão arterial. O desenvolvimento desta estratégia tem passado por algumas dificuldades, em parte devido ao carácter peptídico dos inibidores disponíveis, com fracas características farmacocinéticas, mas também devido a custos de produção muito superiores aos dos medicamentos tradicionalmente usados para controlar a hipertensão, como é o caso dos inibidores da enzima conversora da angiotensina (IECA) (Leung *et al.*, 2000). No entanto, existem já estudos bem sucedidos com inibidores não peptídicos, como é o caso do aliskiren (Fisher *et al.*, 2005; Remen *et al.*, 2009).

A catepsina D humana é uma protease intracelular encontrada principalmente nos lisossomas, estando presente em quase todas as células, tecidos e órgãos. Ela é sintetizada no retículo endoplasmático sob a forma de pré-pró-catepsina D, e após a clivagem da região pré, é então encaminhada para o complexo de Golgi e lisossomas. No pH ácido destas vesículas ocorre então a libertação auto-catalítica do domínio pró, com formação da proteína activa (Gacko *et al.*, 2007).

Esta enzima desempenha diversas funções relacionadas com a manutenção e organização celular, incluindo a formação de lisossomas, endereçamento celular de proteínas, processamento e apresentação de antígenos, apoptose e activação de pró-enzimas (Baldwin *et al.*, 1993). Existem também evidências do seu envolvimento em muitos processos patológicos relacionados com estados inflamatórios e neurodegenerativos, doenças reumáticas, distrofia muscular e cancro (Minarowska *et al.*, 2008), particularmente no desenvolvimento de metástases.

As plasmepsinas são um grupo de proteases de parasitas que se podem encontrar num dos mais letais agentes etiológicos da malária, o *Plasmodium falciparum* (Mittl *et al.*, 2006). Uma análise exaustiva do genoma do parasita revelou a existência de, pelo menos, 10 genes que codificam proteínas homólogas das proteases aspárticas do tipo pepsina, encontrando-se três delas (PMI, PMII e PMIV) no seu vacúolo alimentar. Aí, elas participam na degradação da hemoglobina humana que é a principal fonte de alimento do parasita, sendo por isso indispensáveis para o seu crescimento e desenvolvimento (Banerjee *et al.*, 2002). De facto, estudos *in vitro* demonstraram a incapacidade de proliferação dos parasitas nos eritrócitos humanos, quando na presença de inibidores de proteases aspárticas (Corminboeuf *et al.*, 2006).

As proteases aspárticas secretadas por espécies de *Candida*, designadas por SAP, desempenham um papel determinante na virulência, uma vez que a sua inibição ou ausência resulta na incapacidade de infecção ou na diminuição da sua intensidade. Elas estão envolvidas na nutrição, aderência, invasão e disseminação no organismo, através da clivagem de vários substratos como a albumina, queratina, colagénio, hemoglobina e imunoglobulinas (Stewart *et al.*, 2001). Hoje conhecem-se 10 enzimas pertencentes a esta família (Sap 1-10), com características ligeiramente diferentes, o que pode estar relacionado com o desempenho de diferentes funções e/ou conferir vantagem na infecção de meios com condições tão díspares como as mucosas, pele ou órgãos internos (Naglik *et al.*, 2003). De todas elas a mais estudada e bem caracterizada é a Sap-2, tida como a isoenzima dominante nas infecções sistémicas, embora no geral todas elas pareçam estar envolvidas, ainda que em diferentes estágios ou tipos de infecção (Hube *et al.*, 2001).

A BACE-1 é uma protease aspártica transmembranar e apesar de ser expressa na grande maioria dos tecidos humanos, a sua função fisiológica está ainda pouco caracterizada. De facto, na maioria das experiências com ratos transgênicos sem expressão de BACE-1, o fenótipo parece ser normal, a não ser pela ausência de produção de peptídeo β -amilóide, o principal responsável por uma cascata de eventos envolvida na fisiopatologia da doença de Alzheimer (Selkoe, 2001). Mais recentemente tem sido sugerido um papel potencial desta enzima na regulação da mielinização dos nervos periféricos (Glabe, 2006) que, no entanto, poderá não comprometer a sua inibição enquanto estratégia terapêutica, uma vez que esta actividade parece ser mais acentuada no período pós-natal e uma inibição parcial poderá ser suficiente para atrasar a progressão ou o início da doença de Alzheimer, diminuindo assim a sua incidência.

A protease do HIV-1, ao contrário das anteriores, pertence à família A2 e apresenta como principal diferença o facto de apenas ser activa na forma de dímero, onde cada um dos monómeros contribui com um aspartato catalítico (Beck *et al.*, 2002). Esta protease é essencial à replicação e maturação do vírus HIV-1, participando na clivagem de precursores proteicos que vão originar diversas enzimas e proteínas estruturais da matriz e cápside (Peter, 2001). A importância da função que desempenha e, conseqüentemente, a base da utilização de inibidores na terapêutica, é apoiada por muitos estudos realizados ao longo dos últimos 20 anos, que têm permitido que, nos países desenvolvidos, a SIDA comece a ser encarada como uma doença crónica.

1.2.4. Potencial terapêutico dos inibidores de proteases

A importância da descoberta de inibidores para as proteases aspárticas não se resume apenas às que não têm outros inibidores ou tratamentos disponíveis para as patologias associadas. Por exemplo, os inibidores da protease do HIV-1 são por enquanto os únicos que alcançaram algum sucesso, mas todos os dias o vírus sofre novas mutações, originando novas resistências, que tornam a descoberta de diferentes inibidores com diferentes perfis de resistência uma necessidade real (Brik *et al.*, 2003). De forma semelhante, o número de casos de resistência documentados para o parasita da malária começa a atingir proporções preocupantes, tornando essencial a obtenção de novos agentes antimaláricos com diferentes mecanismos de ação. Devido ao papel essencial das proteases para a sobrevivência do parasita, estas podem ser alvos úteis para o desenvolvimento de novos fármacos (Boss *et al.*, 2006). É previsível que o mesmo comece a ocorrer com os fungos do gênero *Candida*.

Para serem eficientes como ferramentas biológicas, os inibidores de proteases não só devem ser potentes, como apresentar uma elevada selectividade para uma enzima em particular. Como potenciais fármacos devem possuir também características farmacocinéticas e farmacodinâmicas apropriadas (Leung *et al.*, 2000). Além do potencial terapêutico, inibidores específicos e potentes destas proteases podem ser úteis no esclarecimento de possíveis funções fisiológicas ou fisiopatológicas ainda desconhecidas.

A maior parte dos inibidores de proteases aspárticas descritos na literatura são de natureza peptídica, geralmente análogos não cliváveis do substrato, obtidos tradicionalmente por *screening* de produtos naturais e posterior otimização estrutural, ou por *design* racional baseado nas estruturas conhecidas da enzima e respectivo substrato (Dash *et al.*, 2003). Ao contrário do

que acontece com os inibidores proteicos de outras classes de proteases, os desta família são relativamente raros na natureza, encontrando-se apenas alguns exemplos no reino animal e vegetal (Kreft *et al.*, 1997; Christeller *et al.*, 1998; Phylip *et al.*, 2001), e em alguns microrganismos (Rich, 1985). Apesar da sua elevada potência *in vitro*, o carácter peptídico destes inibidores e o seu elevado peso molecular dificultam a sua utilização como fármacos, uma vez que apresentam elevada instabilidade e biodisponibilidade reduzida. Devido a isso, a procura por inibidores selectivos, lipofílicos, de natureza não peptídica e baixo peso molecular continua a ser uma necessidade e nos últimos anos têm começado a surgir candidatos como os metabolitos secundários de plantas e microrganismos e seus análogos sintéticos (Lee *et al.*, 2005).

1.3. BACE-1 e a Fisiopatologia da Doença de Alzheimer

1.3.1. Características e definição clínica da doença de Alzheimer

Há pouco mais de um século atrás, o médico alemão Alois Alzheimer apresentava aos seus colegas o caso de uma mulher de 56 anos que sofria de um quadro grave de distúrbios cognitivos, perda de memória e alucinações, acompanhado de alterações morfológicas cerebrais apenas reveladas por autópsia (Goedert *et al.*, 2006). Foi o primeiro caso diagnosticado da doença que mais tarde viria a ser designada, em sua homenagem, de doença de Alzheimer (DA) (Möller *et al.*, 1998). Hoje em dia, a DA é a mais prevalente das doenças degenerativas associadas ao envelhecimento e a principal causa de demência, sendo responsável por 50-70% dos casos em maiores de 65 anos (Blennow *et al.*, 2006). Dado o aumento progressivo da esperança média de vida, o impacto e magnitude desta patologia são cada vez maiores, tornando-a uma prioridade em termos de investigação, reunindo o interesse e recursos de muitas organizações e grupos científicos (Golde, 2003).

Clinicamente pode definir-se como um distúrbio neurológico de progressão lenta e inexorável, cujo primeiro sintoma consiste geralmente na dificuldade em recordar acontecimentos recentes, estendendo-se depois aos nomes de pessoas e objectos. Com o avançar do tempo a situação agrava-se para um declínio cognitivo global, em que é frequente a perda de orientação, alterações de personalidade, confusão e incapacidade de avaliar situações e tomar decisões. Os doentes evoluem para um mutismo quase absoluto,

dependendo de terceiros para as tarefas mais básicas do dia-a-dia como a higiene e a alimentação, e geralmente acabam por morrer 5 a 12 anos após o diagnóstico, muitas vezes devido a infecções ou acidentes potenciados pelo estado de debilidade em que se encontram (Selkoe *et al.*, 2003).

O diagnóstico definitivo é apenas possível por observação das lesões histopatológicas características no cérebro dos indivíduos afectados, após autópsia. O diagnóstico provável é realizado com a obtenção de uma história clínica rigorosa e com recurso à neuroimagiologia e análises bioquímicas para excluir outras possíveis causas de demência (Boss, 2000). Nos últimos anos intensificou-se a procura de biomarcadores que possibilitem um diagnóstico precoce, sendo já utilizado na clínica a detecção e quantificação dos níveis de beta amiloide e proteína tau fosforilada no líquido cefalorraquidiano (Andreasen *et al.*, 2005).

De uma forma geral, a classificação da doença é feita de acordo com a idade em que surge, sendo classificada de precoce se for antes dos 65 anos ou tardia, se for depois. Apesar dos fenótipos clínicos serem praticamente indistinguíveis, é também possível uma classificação de acordo com a heterogeneidade genética, em casos familiares e esporádicos, habitualmente relacionados com o aparecimento precoce e tardio, respectivamente (Tandon *et al.*, 2000). Cerca de 1% dos casos totais pertencem à forma familiar, frequentemente relacionada com mutações autossómicas dominantes, nomeadamente nos genes que codificam a proteína precursora do amiloide (APP) e as Presenilinas I e II. No entanto, a grande maioria dos pacientes sofre da forma esporádica, cujas causas e mecanismos subjacentes parecem ser bem mais complexos e difíceis de caracterizar (Blennow *et al.*, 2006). Neste caso, uma das relações mais estudadas prende-se com a presença do alelo ϵ 4 do gene que codifica a apolipoproteína E (ApoE) que, apesar de muito frequente em

doentes com a forma esporádica da doença, não é uma condição invariável no seu aparecimento (Selkoe, 2001).

Assim, é mais comum falar em factores de risco ou de susceptibilidade e não em causas. Além dos mais óbvios como a idade e a presença do alelo $\epsilon 4$, outros factores de risco estudados são a história familiar de demência, baixo nível educacional, actividade física e mental reduzida, trauma ou lesão cerebral, história prévia de depressão, condições associadas com doença vascular (hipertensão, hipercolesterolemia, diabetes, obesidade) e tabagismo (Mayeux, 2003).

1.3.2. Marcadores patológicos: placas senis e tranças neurofibrilares

Macroscopicamente, o cérebro dos pacientes com Alzheimer apresenta uma atrofia acentuada das matérias branca e cinzenta, com degeneração de neurónios e sinapses, que é acompanhada pela dilatação dos ventrículos e sulcos cerebrais, especialmente nas áreas frontotemporais e do hipocampo. É também aqui que se podem observar as duas lesões microscópicas mais abundantes e características, que funcionam como marcadores neuropatológicos da doença, confirmando o diagnóstico. Estas estruturas anómalas são designadas por placas senis ou neuríticas e tranças ou novelos neurofibrilares.

As placas neuríticas são depósitos esféricos, densos e praticamente insolúveis de proteína e material celular, que se encontram no exterior das células nervosas (Figura 4a). Consistem num núcleo central de peptídeo β -amilóide ($A\beta$) fibrilar, em redor do qual existe uma coroa formada por axónios e dendrites distróficas, células da microglia e astrócitos reactivos, testemunhos da

reacção inflamatória que acompanha estas lesões. É também frequente a presença de placas difusas constituídas apenas por depósitos amorfos de A β ainda não rodeados de outro material celular (LaFerla *et al.*, 2005) e a acumulação do mesmo peptídeo nos vasos sanguíneos das meninges e córtex.

As tranças neurofibrilares surgem no interior dos neurónios e são fundamentalmente constituídas por proteína tau hiperfosforilada, agregada em fibras insolúveis dispostas em hélice (Figura 4b). Esta proteína desempenha um papel fundamental na modulação da formação de microtúbulos, mantendo-os estáveis. A sua hiperfosforilação leva à destabilização do sistema microtubular, com a desintegração do transporte intracelular e das sinapses e a consequente falha na comunicação entre neurónios. Estas profundas alterações na geometria e fisiologia celular afectam a viabilidade, levando eventualmente à morte neuronal e depleção de neurotransmissores (Pastorino *et al.*, 2006).

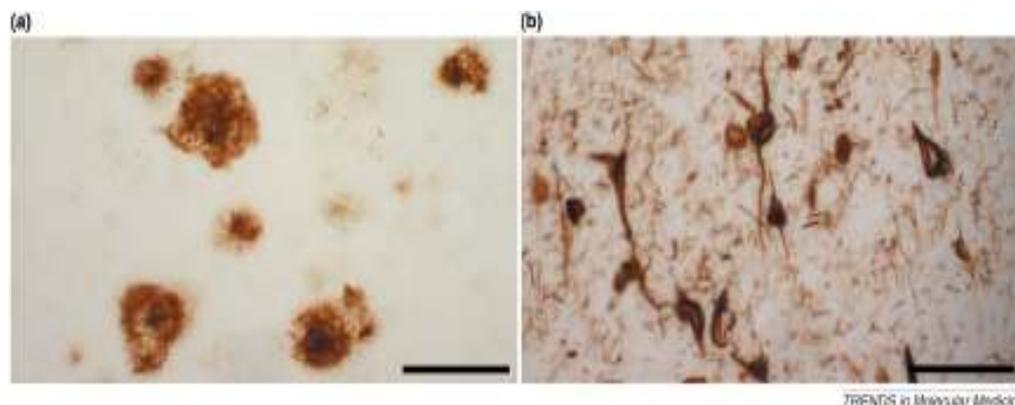


Figura 4. Marcadores neuropatológicos da doença de Alzheimer. (a) Placas neuríticas e **(b)** Tranças neurofibrilares (adaptado de LaFerla, 2005).

1.3.3. Patogênese: teoria da cascata amilóide

Vários modelos têm sido propostos para explicar a cadeia de eventos observada na doença de Alzheimer, mas o que reúne maior número de apoiantes é a hipótese da cascata amilóide (Figura 5). Esta teoria defende que o peptídeo β -amilóide é neurotóxico e que a sua acumulação e deposição no cérebro ao longo dos anos representa o evento central que leva à disfunção neuronal e, eventualmente, às manifestações clínicas da doença.

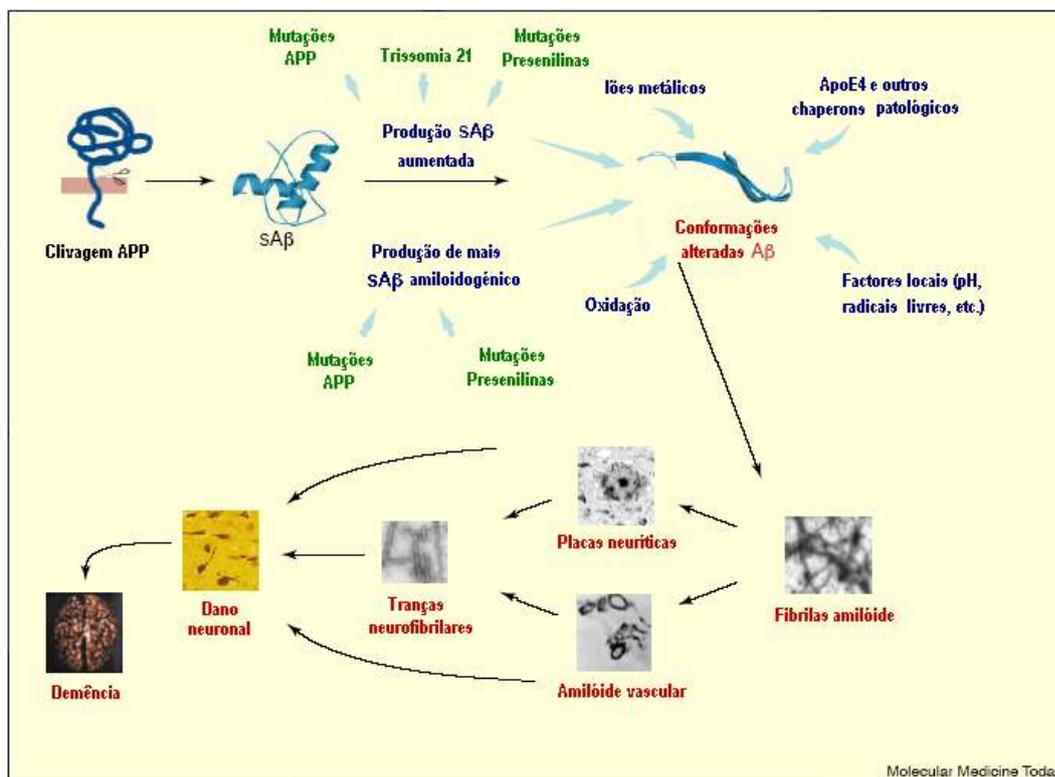


Figura 5. Teoria da cascata amilóide. Os processos e eventuais causas descritos levam a danos na função neuronal e sináptica, originando as deficiências de neurotransmissores e os sintomas cognitivos (adaptado de Soto, 1999).

Todos os indivíduos apresentam uma produção de A β em condições fisiológicas, mas nos doentes de Alzheimer o balanço entre a formação e a *clearance* está alterado, originando um aumento da sua concentração e posterior formação de agregados citotóxicos. A deposição do peptídeo leva à activação de proteínas apoptóticas, astrócitos e células da microglia, originando libertação de citocinas, proteínas de fase aguda e outros mediadores inflamatórios. Estas substâncias e o processo oxidativo gerado são responsáveis pela alteração do funcionamento de diversas proteínas presentes nos neurónios, como é o caso de cinases e fosfatases envolvidas na hiperfosforilação da proteína tau e consequente formação das tranças neurofibrilares. O processo degenerativo difunde-se pelos neurónios, danificando as sinapses, originando a perda progressiva de neurotransmissores (particularmente colinérgicos) e culminando na morte neuronal. A perda de sinapses e células cerebrais é, em última análise, a responsável pela manifestação clínica mais evidente, a demência (Hardy, 2002).

Algumas das descobertas mais significativas nos últimos anos têm suportado esta teoria e o papel fundamental do A β na patogénese da doença de Alzheimer. Um exemplo é o facto de as mutações implicadas nas formas familiares da doença ocorrerem em genes que codificam o substrato (APP) ou enzimas chave (presenilinas) na formação de A β , levando ao aumento da sua produção. Por outro lado, um dos principais factores de risco nas formas esporádicas da doença é a presença do alelo ϵ 4 da ApoE que, por sua vez, também parece estar envolvido no aumento da formação de depósitos cerebrais de A β . Hoje em dia parece também evidente que não são apenas os agregados insolúveis os responsáveis pela toxicidade, estando já descritos efeitos directos nas sinapses por monómeros e oligómeros solúveis de A β (Gouras, 2001).

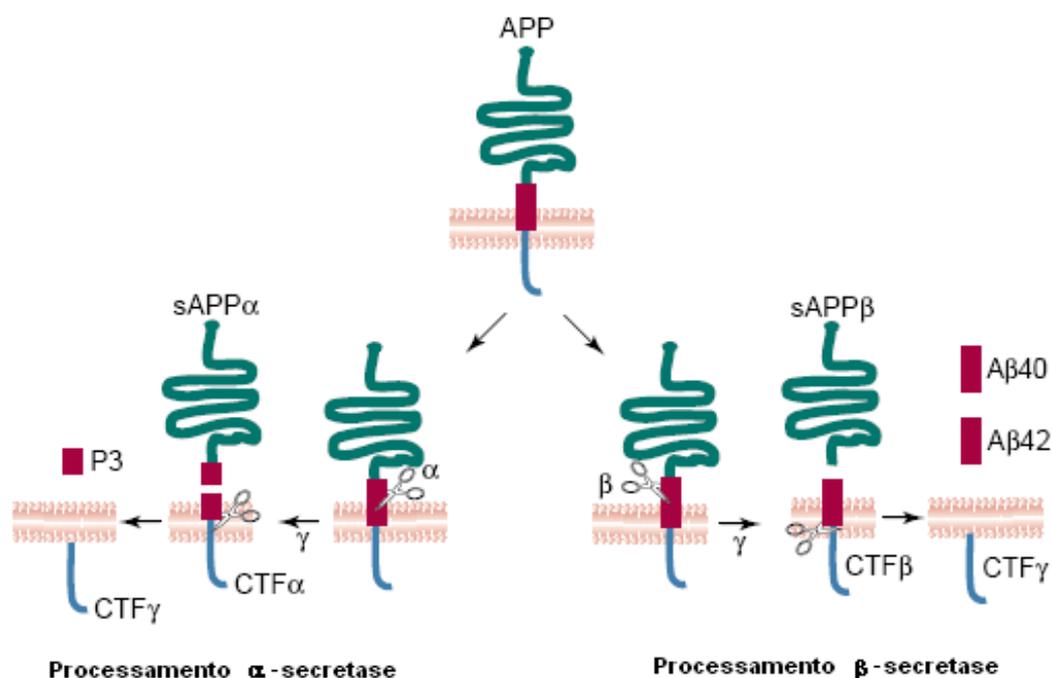
1.3.4. Processamento do APP e formação de A β

O A β é um pequeno peptídeo hidrofóbico, de aproximadamente 4 kDa, podendo apresentar uma grande heterogeneidade nas regiões C e N-terminal. As duas formas mais comuns são constituídas por 40 ou 42 aminoácidos e, apesar da primeira ser mais abundante (aproximadamente 90% do A β produzido), a segunda apresenta uma neurotoxicidade mais acentuada e maior capacidade de agregação (Adlard *et al.*, 2004). Todas as isoformas são geradas pela clivagem do precursor APP, uma proteína transmembranar, constituída por um longo domínio N-terminal extracelular e um pequeno domínio C-terminal intracelular. Esta proteína é codificada pelo cromossoma 21 e pode apresentar diversas isoformas por *splicing* alternativo do transcrito. O APP é expresso numa grande variedade de tecidos humanos, incluindo o cérebro, onde predomina a isoforma constituída por 695 resíduos. As outras isoformas mais comuns, constituídas por 751 e 770 resíduos, são sobretudo expressas noutras regiões do corpo e em células não neuronais, e incluem um domínio homólogo ao inibidor de tipo *Kunitz* de proteases serínicas (Sinha *et al.*, 1999b). O precursor é sintetizado no retículo endoplasmático e sofre maturação pela via secretora, sendo glicosilado e fosforilado no complexo de Golgi. O seu papel fisiológico é ainda largamente desconhecido, mas têm sido propostas funções na transdução de sinal, na estimulação do crescimento e prolongamentos neuronais, na proliferação e adesão celular e como inibidor de proteases serínicas (Annaert *et al.*, 2002).

Durante e após o transporte ao longo da via de secreção, o APP pode ser clivado de duas formas distintas, envolvendo diferentes proteases, habitualmente designadas por α -, β - e γ -secretases (Figura 6).

Em condições fisiológicas normais a via predominante envolve a clivagem pela α -secretase junto ao domínio transmembranar do precursor, com a

libertação para o meio de um grande fragmento N-terminal solúvel, o sAPP α . Fica retido um fragmento com 83 resíduos (C83) que é posteriormente clivado no interior da membrana pela γ -secretase, libertando um pequeno peptídeo de 3 kDa (p3). Esta via é muitas vezes designada por não amiloidogénica, pois além de evitar a formação do A β , origina o fragmento sAPP α , que parece ter propriedades neurotróficas e neuroprotectoras (Allinson *et al.*, 2003).



TRENDS in Molecular Medicine

Figura 6. Processamento do APP. A clivagem mais frequente ocorre via α -secretase, originando um peptídeo não neurotóxico. A β -secretase é responsável pela via amiloidogénica, catalisando o primeiro passo da formação do peptídeo A β . Em ambas as vias os fragmentos ancorados resultantes das primeiras clivagens são processados pela γ -secretase. No caso do C99, esta clivagem é heterogénea, dando origem a peptídeos de diferentes tamanhos (adaptado de Golde *et al.*, 2001).

A clivagem alternativa pela β -secretase pode ocorrer quer durante o transporte pela via secretora, no retículo endoplasmático ou complexo de Golgi, quer nos endossomas formados após internalização do APP não clivado pela α -secretase. Esta via leva à produção de $A\beta$, sendo por isso designada por amiloidogénica. No APP, a região do peptídeo β -amilóide é constituída por 12 a 14 aminoácidos que se encontram no domínio transmembranar, seguidos de 28 resíduos no seu exterior. A clivagem pela β -secretase origina a extremidade N-terminal do $A\beta$ e um fragmento solúvel que se liberta, o sAPP β . O fragmento C-terminal de 99 aminoácidos (C99) que fica ancorado na membrana é posteriormente clivado pela γ -secretase, com libertação do $A\beta$ (LaFerla *et al.*, 2007).

1.3.5. Secretases: um grupo heterogéneo de proteases

Nos últimos anos observou-se um grande esforço no sentido de tentar identificar as proteínas responsáveis por cada uma das actividades catalíticas, mas a sua complexidade e multiplicidade têm dificultado a obtenção de resultados definitivos.

Vários membros de uma família de proteínas membranares têm sido descritos como apresentando actividade de α -secretase. Esta família, designada ADAM por possuir um domínio desintegrina e de metaloprotease, encontra-se largamente distribuída pelo organismo e participa numa grande variedade de eventos celulares. Alguns dados sugerem que a α -secretase será formada por 3 destas proteínas: a ADAM 9, 10 e 17 (também conhecida por TACE). Estas proteínas actuam principalmente na membrana celular, em regiões com baixo conteúdo em colesterol (Bernstein, 2005; Deuss *et al.*, 2008).

A actividade proteolítica da γ -secretase é pouco usual, uma vez que ocorre no domínio transmembranar do APP, não é específica de uma dada sequência e pode produzir uma grande variedade de peptídeos que diferem na região do terminal carboxílico, dependendo da posição do substrato em relação à membrana. Além disso, as dificuldades sentidas na sua identificação e caracterização são também devidas ao facto de parecer ser constituída por um complexo multiproteico de elevado peso molecular, com diferentes intervenientes desempenhando diferentes funções (Evin *et al.*, 2002). O componente catalítico do complexo consiste nas presenilinas (PS), proteases aspárticas transmembranares pouco comuns, com funções biológicas importantes em várias vias de sinalização celular e cujas mutações estão envolvidas nas formas familiares da doença de Alzheimer. As de maior importância são duas proteínas homólogas, PS1 e PS2, expressas na maioria dos tecidos humanos e localizadas predominantemente nas membranas celular, do retículo endoplasmático, complexo de Golgi e endossomas. Apesar do seu papel fundamental no local activo, sozinhas não conseguem explicar a actividade de γ -secretase. A procura dos eventuais auxiliares ou reguladores daquela actividade, revelou ainda o envolvimento de proteínas como a nicastrina, PEN-2 (*presenilin enhancer*) e APH-1 (*anterior pharynx-defective*). A expressão conjunta destes 4 componentes em organismos sem γ -secretase endógena consegue reproduzir na totalidade a sua actividade (Haass, 2004).

A identidade da enzima responsável pela actividade de β -secretase é hoje a que apresenta menos dúvidas, tendo já sido descrita por vários grupos em simultâneo (Hussain *et al.*, 1999; Sinha *et al.*, 1999a; Vassar *et al.*, 1999; Yan *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2000) e designada por BACE-1 (*β -site APP cleaving enzyme 1*). Pouco depois da sua descoberta, foi identificada uma proteína homóloga, a

BACE-2, expressa essencialmente no coração, rim e tecidos vasculares, cujo papel no processamento do APP permanece ainda incerto (Bennett *et al.*, 2000).

Assim, a β -secretase é uma proteína constituída por 501 aminoácidos, com um peptídeo sinal N-terminal de 21 aminoácidos, seguido de um domínio pró, mais curto que o habitual, que se estende até ao resíduo 45. A porção extramembranar contém o local activo e é seguida por uma porção transmembranar de 17 resíduos e uma curta cauda citoplasmática, que a distingue de todas as outras proteases da sua classe (Figura 7).

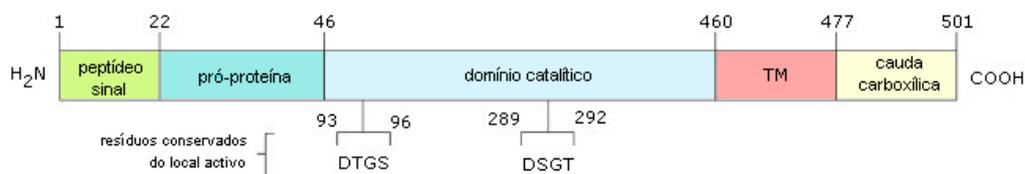


Figura 7. Representação esquemática da estrutura da BACE-1, indicando os respectivos resíduos do local activo (DTG/DSG). TM: domínio transmembranar (adaptado de Selkoe, 2003).

À semelhança do que acontece nos restantes membros da família das proteases aspárticas, o domínio catalítico é constituído por duas sequências conservadas, cada uma com um resíduo aspartato, mas o domínio transmembranar é uma característica distintiva que permite o acesso eficiente da enzima ao local de clivagem no substrato APP (Citron, 2004). Esta enzima é expressa no cérebro e na maioria dos tecidos periféricos, mas a sua actividade é mais acentuada nas células neuronais, particularmente nas regiões do hipocampo, córtex e cerebelo. Localiza-se maioritariamente nos compartimentos intracelulares ácidos do complexo de Golgi e endossomas, embora também possa ser encontrada na membrana plasmática, particularmente em regiões ricas em colesterol (Esler *et al.*, 2001).

Inicialmente expressa como uma pré-pró-proteína inactiva, a maturação da BACE-1 ocorre por glicosilação, fosforilação e formação de 3 pontes

dissulfureto intracelulares, assim como pela clivagem do segmento pró por uma outra protease. Com a excepção da remoção do segmento pré, as outras modificações não são essenciais à actividade, uma vez que a protease recombinante não modificada é activa e apresenta uma especificidade semelhante à nativa (Ghosh *et al.*, 2002). A própria pró-enzima possui actividade, o que parece dever-se ao facto de apresentar duas conformações em equilíbrio, com o bloquear e desbloquear temporário do local activo pelo peptídeo pró (Ermolieff *et al.*, 2000). Na molécula de APP, a BACE-1 reconhece a sequência de clivagem VKM*DA (P3-P2-P1*P1'-P2' segundo a nomenclatura standard de proteases) na zona N-terminal do A β . Devido à especificidade desta enzima, pequenas alterações nesta sequência podem apresentar efeitos dramáticos, como é o caso da mutação encontrada na variante sueca do APP, onde os resíduos KM são substituídos por NL, aumentando muito a eficiência da clivagem, e estando por isso associado a formas precoces e mais agressivas da DA (Citron *et al.*, 1995).

1.3.6. Estratégias terapêuticas

Os únicos fármacos aprovados até hoje para o tratamento da DA foram desenvolvidos partindo do conhecimento dos sintomas da doença, como a perda cognitiva motivada pela depleção de neurotransmissores, em particular da acetilcolina. Estes fármacos são inibidores da acetilcolinesterase, a enzima responsável pela degradação daquele neurotransmissor, aumentando assim o seu tempo de vida e eventual efeito fisiológico. Uma vez que actuam a nível sintomático, não alteram o curso do processo demencial e à medida que mais células neuronais vão morrendo, vão-se tornando ineficazes (Blennow *et al.*, 2006). Apesar disso, existem também evidências que um aumento nos níveis de

acetilcolina pode ter uma acção mais directa no mecanismo da doença, uma vez que este neurotransmissor, ao actuar como agonista dos receptores muscarínicos, parece estimular a produção de sAPP α (Allinson *et al.*, 2003). Em Portugal estão aprovados três destes fármacos, a rivastigmina, o donepezilo e a galantamina.

Estão igualmente aprovados para a melhoria dos sintomas demenciais os inibidores dos receptores NMDA, como é o caso da memantina. O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório, e níveis elevados, como os que ocorrem na DA, são citotóxicos, contribuindo para a morte neuronal. A principal vantagem destes fármacos assenta no facto de serem antagonistas não competitivos dos receptores do glutamato, bloqueando apenas a sua activação patológica e permitindo a função fisiológica durante os processos de formação da memória e aprendizagem (Parsons *et al.*, 1993).

O avanço na investigação das causas e etiologia da doença veio apontar novos alvos terapêuticos com potencial para modificar o curso da mesma. De acordo com a teoria de que a DA resulta de um desequilíbrio entre a produção e a eliminação do peptídeo β -amilóide, as estratégias (Figura 8) passam por prevenir a sua formação e/ou impedir a sua acumulação, podendo actuar também na redução dos seus efeitos neurotóxicos (Golde, 2006).

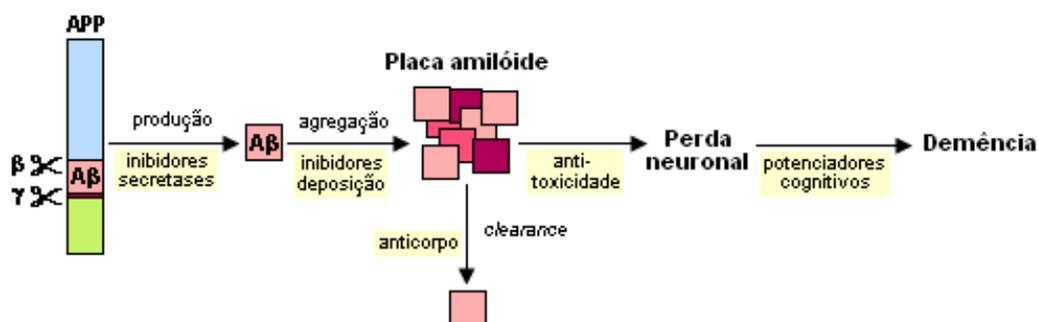


Figura 8. Estratégias terapêuticas baseadas nos eventos chave da cascata amilóide. (adaptado de Citron, 2002).

A imunização com A β (activa) ou anticorpos anti-A β (passiva) tem sido apontada como uma forte arma contra a sua deposição e acumulação, provavelmente por induzir a sua fagocitose por parte da microglia ou por os anticorpos sequestrarem o A β circulante no plasma, potenciando o efluxo deste do cérebro. Apesar da vacinação já se encontrar em fase de ensaios clínicos, estes foram temporariamente interrompidos devido a sinais de inflamação do SNC de diversos participantes (Dominguez *et al.*, 2002). No entanto, estão já em curso vários projectos para desenvolver novas vacinas que não apresentem este efeito secundário e que poderão chegar à fase de ensaios em humanos nos próximos anos (Golde, 2006).

Outra estratégia para a redução da acumulação e toxicidade do A β na DA é o uso de agentes químicos que impeçam a oligomerização e a formação de fibrilas neurotóxicas, possibilitando assim a sua eliminação (Adessi *et al.*, 2002). Além dos níveis elevados de peptídeo β -amilóide, as interacções deste com lipoproteínas, em particular a ApoE, iões metálicos como o cobre (Cu) e zinco (Zn) e glicosaminoglicanos potenciam as alterações conformacionais do A β e sua consequente agregação (Blennow *et al.*, 2006). Alguns quelantes dos iões Cu e Zn, como o clioquinol e a curcumina, demonstraram eficácia na redução da deposição de A β e na solubilização de placas neuríticas (Cherny *et al.*, 2001). Encontra-se também em fase de experimentação um composto (*Alzhemed*) com uma estrutura semelhante à dos glicosaminoglicanos, desenhado para interferir com a ligação do A β a estas moléculas (Aisen *et al.*, 2007). Porém, muitos dos compostos que apresentam um efeito anti-agregação são tóxicos e inespecíficos, o que limita a sua utilização terapêutica. Por outro lado, e apesar da vantagem desta estratégia visar apenas um processo puramente patológico, é necessário que os compostos activos impeçam não só a formação de grandes agregados como as fibrilas, mas também a acumulação de oligómeros intermediários. Se tal

não acontecer pode ainda ocorrer um agravamento da doença, uma vez que, de acordo com estudos recentes, estes pequenos intermediários poderão ser ainda mais tóxicos que as fibrilas de A β (Selkoe *et al.*, 2003).

A utilização de anti-inflamatórios e antioxidantes tenta combater os efeitos neurotóxicos do A β e impedir a propagação da cascata amilóide, mas apenas alguns destes fármacos apresentaram um efeito protector em diferentes estudos epidemiológicos (Blennow *et al.*, 2006). Tal parece dever-se ao facto da protecção não estar unicamente associada ao efeito anti-inflamatório, mas também a uma possível inibição da produção de A β ₄₂, provavelmente por um mecanismo envolvendo a γ -secretase (Cirrito *et al.*, 2003). Este duplo mecanismo de acção pode constituir uma mais-valia na utilização destes agentes, sobrepondo o benefício ao risco de toxicidade gastrointestinal que está geralmente associado ao seu uso prolongado.

Todavia, a melhor forma de prevenir ou alterar o curso da doença poderá passar por uma actuação mais a montante na cascata amilóide, prevenindo a formação do próprio A β (Citron, 2002). Os alvos apontados como os mais promissores para esse efeito são as proteases envolvidas na clivagem do APP. Assim, a inibição parcial da β e γ -secretases ou a potenciação da clivagem pela α -secretase podem ser suficientes para atrasar ou impedir a progressão da DA (Dewachter *et al.*, 2002). Devido à relevância da inibição da β -secretase para este trabalho, esta estratégia será apresentada a seguir, de forma mais detalhada.

1.3.7. Inibição da β -secretase: benefícios e desafios

Dado o papel desempenhado pelas secretases na fisiopatologia da doença de Alzheimer e a já conhecida utilização de diversas proteases como alvos moleculares (Leung *et al.*, 2000), assumiu-se, mesmo antes da sua identidade ser conhecida, que aquelas seriam alvos ideais de intervenção terapêutica. Assim, enquanto muitos grupos procediam a ensaios exaustivos de grandes bibliotecas de compostos em células expressando β - e γ -secretase endógenas, muitos outros concentravam-se na sua identificação e elucidação estrutural (Citron, 2000).

Embora os *screenings* iniciais em modelos celulares não tenham ainda revelado inibidores potentes como no caso da γ -secretase, a BACE-1 parece ser um melhor alvo terapêutico para a prevenção e tratamento da DA. São várias as razões que suportam esta opinião, mas as mais simples relacionam-se com o facto de a β -secretase catalisar o passo inicial da produção de A β , evitando assim a acumulação de fragmentos de APP potencialmente tóxicos, e também com a recente elucidação da sua estrutura, que veio permitir o *design* racional de inibidores. Maior relevância tem sido atribuída aos dados obtidos a partir de experiências com ratinhos a que se procedeu à ablação do gene que codifica esta secretase. Estes animais parecem ser saudáveis, férteis e normais do ponto de vista anatómico, histológico e hematológico, sem alterações óbvias a nível neurológico, exceptuando a incapacidade de produção de A β , o que também sugere uma ausência de mecanismos compensatórios da inibição da β -secretase (Citron, 2004). Outro dos pontos a favor da inibição desta secretase prende-se com o facto de, apesar do local activo ser semelhante ao das outras proteases aspárticas de mamífero (8 sublocais, S4 a S4'), é mais acessível e mais

hidrofílico que o das restantes, o que pode ser explorado para a obtenção de inibidores selectivos. A presença em humanos de poucas proteases aspárticas e com características diferentes da BACE-1 também apresenta vantagens no que respeita à selectividade, merecendo mais atenção a BACE-2 pela sua próxima relação estrutural e a Catepsina D por ser intracelular e de distribuição generalizada em todos os tecidos (Ghosh *et al.*, 2008). Apesar do optimismo gerado por todas estas observações, mais estudos são necessários para determinar com total segurança a ausência de defeitos subtis nos animais mutados ou potenciais efeitos tóxicos ou compensatórios em humanos. É também necessário avaliar a provável existência e função de outros substratos da BACE-1 que possam ser fisiologicamente relevantes.

A clivagem pela β -secretase ocorre intracelularmente, nas membranas dos endossomas, retículo endoplasmático ou complexo de Golgi. Assim, um inibidor desta enzima deve idealmente ser capaz de penetrar nas células e nas membranas subcelulares, para alcançar os locais de produção do peptídeo β -amilóide. Como os alvos são intracelulares, deve possuir também uma elevada selectividade de modo a minimizar a interferência com outras proteases intracelulares e com vias de sinalização celular críticas (Esler *et al.*, 2001). Além disso, uma vez que a maioria do peptídeo β -amilóide é produzido no cérebro, os inibidores têm de ter a capacidade de atravessar a barreira hemato-encefálica (BHE) (Ghosh *et al.*, 2008).

Face a estas características, os inibidores com eventual relevância clínica mostraram-se difíceis de obter, em parte porque a maioria das moléculas têm sido desenhadas tendo como base o substrato APP, mimetizando o estado de transição da catálise pelas proteases aspárticas e apresentando por isso um elevado peso molecular. Os inibidores da BACE-1 de natureza peptídica apresentam também um elevado custo de obtenção, fraca biodisponibilidade e estabilidade *in vivo*, além de não conseguirem atravessar a BHE ou as próprias

membranas celulares, apesar de potentes *in vitro*. O facto de o local activo ser largo também contribui para a dificuldade em desenhar ou encontrar inibidores de menor peso molecular que mantenham uma potência significativa, dificuldades essas já experienciadas na procura de inibidores de outras proteases aspárticas como a renina ou a protease do HIV-1 (Citron, 2002). Embora difícil de alcançar, continua a ser desejável a obtenção de inibidores pequenos, de natureza não peptídica, com elevada potência e selectividade ou que possam ser melhorados quimicamente com base no conhecimento da estrutura da protease e da relação estrutura / actividade.

Alguns exemplos mais conhecidos de inibidores sintéticos da BACE-1 incluem os compostos de natureza peptídica OM99-2 e OM00-3, com valores de K_i na ordem do nanomolar (Ghosh *et al.*, 2008). A partir destes, foram sendo desenhados e sintetizados outros compostos progressivamente mais pequenos, numa tentativa de alcançar as propriedades farmacocinéticas e de biodisponibilidade desejáveis, sem perda de actividade. Um deles, o composto GRL-8234 apresentou resultados promissores em linhas celulares e ratinhos transgénicos, fornecendo um ponto de partida para futuras modificações. O inibidor GSK188909 está descrito como sendo o primeiro com biodisponibilidade oral, capaz de baixar o A β cerebral em ratinhos. Apesar desta biodisponibilidade, a sua penetração no cérebro é limitada, necessitando de uma molécula auxiliar que facilite este transporte (Hussain *et al.*, 2007). O *screening* de vastas bibliotecas de compostos tem sido utilizado como estratégia para descobrir inibidores não peptidomiméticos, com boa biodisponibilidade e que possam ser modificados para aumento de potência. Compostos como as acilguanidinas (Cole *et al.*, 2006) têm actividade *in vivo*, ainda que modesta e pouco selectiva, um problema comum a muitas outras moléculas descobertas desta forma (Huang *et al.*, 2005; Garino *et al.*, 2006; Hamada *et al.*, 2008).

Apesar de nos últimos anos se ter verificado um aumento significativo na pesquisa e publicação de inibidores da BACE-1 (Silvestri, 2009), particularmente de natureza não peptídica, o número de compostos com actividade promissora *in vivo* é ainda limitado (Hussain *et al.*, 2007; Sankaranarayanan *et al.*, 2007; Stanton *et al.*, 2007), mantendo-se esta área de investigação como uma das mais atractivas para o tratamento da doença de Alzheimer.

1.4. Objectivos do

Estudo

Os avanços na Ciência têm revelado alvos moleculares envolvidos em diversas doenças com grande impacto na actualidade. Muitos deles são de natureza enzimática, o que tem desencadeado uma procura intensiva de inibidores ou moduladores da sua actividade. Isolados vegetais, como os óleos essenciais, têm sido utilizados na terapêutica, apresentando actividades biológicas bem documentadas. O facto de serem constituídos por dezenas a centenas de compostos de baixo peso molecular e elevada hidrofobicidade, não só eleva o seu potencial terapêutico, como também permite *screenings* de alto rendimento, indispensáveis à descoberta de novos fármacos.

Algumas das enzimas para as quais os inibidores têm sido muito procurados pertencem à família das proteases aspárticas, uma vez que estão envolvidas em condições patológicas como a SIDA (protease do HIV-1), a malária (plasmepsinas) e a doença de Alzheimer (BACE), entre outras. A identificação recente desta última protease e o aumento da prevalência de doenças degenerativas como a de Alzheimer tem desencadeado um grande interesse no seu estudo. No entanto, a obtenção de inibidores de proteases aspárticas, clinicamente úteis, tem sido difícil e apenas os da protease do HIV-1 têm alcançado algum sucesso comercial. A elucidação da estrutura da BACE-1 tem orientado a procura de inibidores para a síntese de análogos peptidomiméticos do substrato, com capacidade de ligação selectiva ao local activo. Paralelamente, diversos estudos têm incidido em inibidores naturais, particularmente proteínas e

peptídeos de elevado peso molecular, que enfrentam, como os primeiros, problemas relacionados com a fraca estabilidade e biodisponibilidade. Pouco se sabe sobre a existência de pequenas moléculas naturais não proteicas que actuem como inibidores com potencial *in vivo* e, portanto, esta é uma área de investigação muito atractiva, onde os óleos essenciais poderão constituir uma fonte ainda por explorar.

Os principais objectivos deste trabalho são a sinalização da potencial inibição da BACE-1 por óleos essenciais, o reconhecimento e identificação das moléculas inibidoras e a caracterização dessa inibição. A capacidade de inibir a BACE-1 e, conseqüentemente, diminuir a produção de peptídeo β -amilóide em modelos celulares e *in vivo*, num modelo animal da doença de Alzheimer, serão também avaliadas. Outros aspectos analisados envolvem a caracterização e identificação da composição química do óleo com actividade inibitória, assim como a sua potencial actividade contra outras proteases aspárticas.

MATERIAIS E MÉTODOS

2

2.1. Materiais

2.1.1. Material vegetal

Os óleos essenciais incluídos neste estudo integram a colecção de óleos e extractos do Grupo *Drug Discovery* do Centro de Estudos Farmacêuticos da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Como critério principal para a selecção dos óleos a integrar nos ensaios de *screening* de actividade biológica, consideraram-se as respectivas composições, procurando-se que o seu conjunto maximizasse a diversidade e quantidade de compostos constituintes. Privilegiaram-se também os óleos essenciais isolados de plantas nativas ou endémicas da Península Ibérica, não obstante a inclusão de óleos de plantas de outras proveniências. De acordo com esses critérios, o trabalho foi iniciado com um conjunto de 50 óleos essenciais.

Tendo em consideração a similaridade de composições de alguns OE, bem como resultados de ensaios preliminares de avaliação de actividade, o número de amostras foi reduzido para pouco mais de duas dezenas de óleos essenciais (Tabela 1).

Tabela 1 (página seguinte). **Informação geral dos OE mantidos no estudo.** Alguns dos óleos incluídos na fase inicial do estudo foram omitidos dada a similaridade de composição com outros aqui descritos e os resultados preliminares de avaliação de actividade. As amostras são referenciadas pelo número de identificação convencional (**ID**) atribuído segundo o protocolo de recepção de amostras do laboratório.

Capítulo 2

Espécie	ID	Colheita	Data destilação	Material destilado	η	Características óleo
Família Cupressaceae						
<i>Cupressus lusitanicus</i> subsp. <i>pendula</i> L'Her., Stirp	1026	14-12-2004 Coimbra	16-12-2004	Folhas	0,3%	Amarelo pálido
<i>Cupressus sempervirens</i> L.	1028	14-12-2004 Coimbra	20-12-2004	Folhas	0,3%	Amarelo pálido
<i>Juniperus communis</i> subsp. <i>alpina</i> (Sm.) Celak	1042	22-9-1997 Serra da Estrela	24-9-1997	Gálbulas	2,5%	Incolor a amarelo pálido; aroma terebintínico
<i>Juniperus turbinata</i> Guss.	1045	23-11-2002 Alentejo	30-11-2002	Folhas	1,8%	Incolor a amarelo pálido
<i>Juniperus oxycedrus</i> L.	1039	1998	1998	Folhas	1,8%	Amarelo pálido; aroma terebintínico
Família Apiaceae						
<i>Foeniculum vulgare</i> Miller	1022	20-6-2004 Aveiro	23-6-2004	Folhas	0,4%	Incolor; aroma anis
<i>Seseli tortuosum</i> L.	1067	27-12-2004	30-12-2004	Planta inteira	0,5%	-
<i>Chrythmum maritimum</i> L.	1063	27-12-2004 Figueira da Foz	30-12-2004	Planta inteira	n.d	Amarelo escuro
Família Verbenaceae						
<i>Lippia citriodora</i> Kunth	1020	21-10-2003 Viseu	30-10-2003	Planta inteira	0,5%	Incolor a amarelo pálido; aroma cítrico
<i>Lippia graveolens</i> Kunth	732	09-3-2000 Guatemala	2000	Planta inteira	n.d	Amarelo avermelhado; aroma fenólico
Família Asteraceae						
<i>Artemisia chrithmifolia</i> L.	1064	27-12-2004 Mira	30-12-2004	Planta inteira	0,3%	Amarelo
<i>Helichrysum Stoechas</i> (L.) Moench	1051	01-7-2003 Carvoeiro	06-7-2003	Planta inteira	n.d	Amarelo; aroma semelhante a caril
<i>Achillea ageratum</i> L.	754	15-6-2001 Serra de Aire	20-6-2001	Planta inteira	0,7%	-

Tabela 1. (continuação)

<i>Espécie</i>	<i>ID</i>	<i>Colheita</i>	<i>Data destilação</i>	<i>Material destilado</i>	<i>η</i>	<i>Características óleo</i>
Família <i>Lamiaceae</i>						
<i>Mentha cervina</i> L.	942	05-8-2004 Arcos Valdevez	10-8-2004	Planta inteira	> 2%	Amarelo pálido; aroma mentolado
<i>Mentha x piperita</i> L.	1024	15-10-2003 Soure	22-10-2003	Planta inteira	> 2%	Amarelo pálido; aroma mentolado
<i>Lavandula luisieri</i> (Rozeira) Riv. Mart.	894	15-4-2003 Serro Ventoso	28-4-2003	Inflorescências	n.d	Amarelo alaranjado
<i>Lavandula angustifolia</i> Mill.	1001	01-7-2003 Viseu	08-7-2003	Planta inteira	3,8%	Amarelo pálido
<i>Thymus mastichina</i> L.	1041	30-6-1999 Mirandela	07-7-1999	Planta inteira	n.d	-
<i>Thymus capitellatus</i> Hoffmanns. & Link	1043	1992 Porto Alto	19-6-1992	Planta inteira	n.d	-
<i>T. zygis</i> Loeffl. Ex L. subsp. <i>sylvestris</i> (Hoffmanns & Link) Brot. ex Coutinho, chemotype <i>thymol</i> .	1047	2004	06-5-2004	Folhas	1,5%	-
<i>Thymus vulgaris</i> L.	1049	2001	15-11-2001	Folhas	n.d	Amostra congelada
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	832	20-12-2001 Ourém	07-1-2002	Planta inteira	1,4%	Incolor; aroma canforáceo
<i>Origanum vulgare</i> subsp. <i>virens</i> (Hoffmanns. & Link) Bonnier & Layens	950	12-7-2004 Viseu	12-7-2004	Planta inteira	0,6%	Amarelo escuro; aroma fenólico forte
<i>Origanum vulgare</i> L. subsp. <i>vulgare</i>	1046	30-6-1999 Trás-os-Montes	07-7-1999	Folhas	n.d	Amarelo escuro; aroma fenólico forte

Tabela 1. (continuação)

<i>Espécie</i>	<i>ID</i>	<i>Colheita</i>	<i>Data destilação</i>	<i>Material destilado</i>	η	<i>Características óleo</i>
<i>Salvia officinalis</i> L.	905	27-5-2003 Soure	30-5-2003	Inflorescências	> 2%	Amarelo escuro
<i>Teucrium algarbiensis</i>	853	17-5-2002 Algarve	27-5-2002	Planta inteira	n.d	-
<i>Teucrium scorodonium</i> L.	675	01-7-2000 Penacova	2000	Planta inteira	n.d	-
<i>Thymbra capitata</i> (L.) Cav.	1050	14-7-1992 Algarve	1992	Partes aéreas	n.d	Amarelo
Família <i>Theaceae</i>						
<i>Cammelia sinensis</i> (L.) O. Kuntze	876		Amostra comercial			Amarelo pálido

2.1.2. Proteases aspárticas e linhas celulares

Foram ensaiadas as proteases aspárticas BACE-1 e Sap-2, proteínas recombinantes produzidas no laboratório de Biotecnologia Molecular do Biocant, as plasmepsinas II e IV (gentilmente cedidas pelo Prof. John Kay da Cardiff School of Biosciences, Cardiff University), a pepsina e a catepsina D humanas (Sigma Aldrich).

Utilizaram-se também como modelo experimental duas linhas celulares (gentilmente oferecidas pelo Dr. Richard Killick do MRC Centre for Neurodegeneration Research, King's College of London), uma derivada de células de ovário de hamster chinês (CHO) e outra de um neuroblastoma humano (SHSY5Y).

2.1.3. Reagentes

Para os ensaios proteolíticos, o substrato fluorogénico FS-2, da BACE, foi sintetizado pelo laboratório Genosphere Biotechnology (Paris, França) e o inibidor Stat-Val (análogo do substrato da BACE-1) foi adquirido à Sigma-Aldrich (Sintra, Portugal).

Para cultura de células, foi utilizado o meio Ham's F12, o suplemento N2 da Gibco™ (Invitrogen, Reino Unido), soro fetal bovino (FBS), tripsina e mistura de antibióticos, penicilina e estreptomicina (Pen-Strep) da BioWhittaker™ (Lonza, Espanha). O meio essencial Eagle's modificado (EMEM), a mistura de aminoácidos não essenciais, o reagente vermelho de metilo e a solução 0,4% de azul de Tripán foram adquiridos a Sigma-Aldrich (Sintra, Portugal).

Para os ensaios de ELISA, o anticorpo monoclonal 6E10 específico para o A β humano, resíduos 1-17 e o anticorpo monoclonal G2-10, conjugado com a HRP, específico para o A β humano, resíduos 31-40, foram adquiridos à Chemicon International (Temecula, CA, EUA) e The Genetics Company (Zurich, Suíça), respectivamente. O peptídeo sintético A β ₄₀ foi obtido na Bachem AG (Bubendorf, Suíça) e o substrato cromogénico 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) na Pierce (Rockford, EUA).

Para *Western blotting*, o anticorpo policlonal específico para o sAPP β -wt foi obtido na IBL Co (Hamburg, Alemanha) e o sistema de detecção, que inclui a imunoglobulina anti-coelho conjugada com fosfatase alcalina e o substrato ECF, foi adquirido à Amersham Biosciences (GE Healthcare, Portugal).

Os monoterpenos linalol e 2,3,4,4-tetrametil-5-metileno-ciclopent-2-enona foram adquiridos na Sigma-Aldrich (Sintra, Portugal) e Sai Advantium (Hyderabad, India), respectivamente.

2.2. Métodos

2.2.1. Isolamento de óleos essenciais

Todos os óleos essenciais preparados para este trabalho foram obtidos no laboratório por hidrodestilação com aparelho de Clevenger modificado (Figura 9), de acordo com o procedimento descrito na Farmacopeia Portuguesa VIII (Infarmed, 2005), mas sem recurso a solvente orgânico para fixação.

O material vegetal, limpo e secturado, foi colocado em balão de fundo redondo e adicionado de volume conveniente de água destilada. As destilações decorreram durante 3 ou 4 horas. A partir do volume de óleo recolhido foi calculado o rendimento de extracção, expresso em percentagem, volume/massa [% (V/m)].

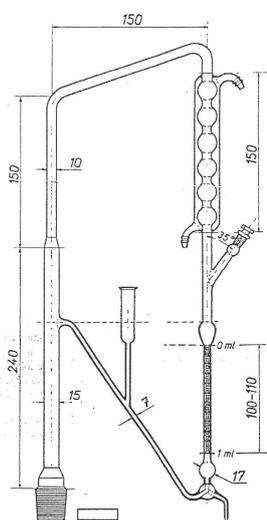


Figura 9. Aparelho de Clevenger modificado para isolamento e doseamento de óleos essenciais. Dimensões em milímetros. (Retirado na íntegra da *Farmacopeia Portuguesa VIII*, 2005).

2.2.2. Análise de óleos essenciais por combinação de técnicas de cromatografia de fase gasosa e cromatografia de fase gasosa - espectrometria de massa

Os óleos essenciais foram analisados por combinação de técnicas de cromatografia de fase gasosa (GC) e de cromatografia de fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS).

A GC analítica foi realizada num cromatógrafo Hewlett Packard 6890 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA USA), equipado com um só injector e amostrador automático e dois detectores de ionização de chama (FID). Esse sistema permite a injeção simultânea da amostra em duas colunas capilares com fases estacionárias de diferentes polaridades. Foram usadas colunas de polidimetilsiloxano com 30m x 0,20mm e espessura de filme de 0,20 μ m (Supelco SPB-1) e de polietilenoglicol com 30m x 0,20mm e espessura de filme 0,20 μ m (SupelcoWax 10). O controlo e operação do sistema, bem como a aquisição e processamento de dados foram realizados por via remota com o programa HP GC ChemStation versão A.05.04 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA USA). As condições analíticas foram: temperatura do forno programada de 70 a 220°C com incrementos de 3°C.min⁻¹, seguido de condição isotérmica a 220°C durante 15 minutos; temperatura do injector e detectores de 250°C; como fase móvel foi usado hélio em fluxo de 1mL.min⁻¹, correspondendo a uma velocidade linear de 30cm.s⁻¹; a injeção foi realizada com divisor de fluxo (modo *split*) com relação de repartição de 1:40. Para a GC-MS foram usados cromatógrafos Hewlett Packard 6890 ou Agilent 6890 associados a detectores selectivos de massa Hewlett Packard 5973 ou Agilent 5973N, equipados, respectivamente, com coluna capilar de polidimetilsiloxano 30m x 0,25mm, espessura de filme 0,25 μ m (Hewlett Packard, HP1) e coluna capilar de polietilenoglicol com 30m x

0,25mm e espessura de filme 0,25 μ m (Agilent, DB-Wax), também operados por via remota com o programa Enhanced ChemStation, Hewlett Packard ou Agilent. As condições analíticas foram: temperatura do forno programada de 70 a 220°C, com incrementos de 3°C.min⁻¹, seguido de condição isotérmica a 220°C durante 15 minutos; temperatura do injector 250°C; como fase móvel foi usado hélio com um fluxo de 1mL.min⁻¹, correspondendo a uma velocidade linear de 30cm.s⁻¹; a injeção foi realizada com divisor de fluxo (modo *split*) com relação de repartição de 1:40; temperatura da interface, 250°C, temperatura da fonte de ionização, 230°C; energia de ionização, 70eV; corrente de ionização, 0,06mA; varrimento de massas, 35 – 350u.

Para todos os picos cromatográficos foram determinados os respectivos índices de retenção, por interpolação linear aos tempos de retenção de *n*-alcanos (série homóloga) segundo o algoritmo de Vandendool e Kratz (Vandendool *et al.*, 1963).

A identidade dos compostos foi estabelecida considerando os espectros de massa e os índices de retenção em colunas SPB-1 (HP-1) e SupelcoWax 10 (DB-Wax).

Os espectros de massa foram comparados com espectros referência do banco de espectros Wiley / NIST, do banco de espectros do laboratório do Centro de Estudos Farmacêuticos ou com espectros publicados na literatura científica. Dessas comparações ou, sempre que necessário, da interpretação do espectro, resultaram hipóteses de identidade sujeitas a validação por compatibilidade com os índices de retenção da identidade proposta em colunas de polaridade distinta. Tal validação pressupõe a observação, em cromatogramas obtidos com colunas de polaridade distinta, de picos com índices de retenção consistentes com os da hipótese formulada e com intensidade (percentagem de área) idêntica em ambos os cromatogramas. Como referências foram utilizados índices de retenção da

base de dados do laboratório, bem como índices publicados na literatura (Davies, 1990; Adams, 2001; Adams, 2007).

O fluxo de trabalho, com processamento de dados cromatográficos, acesso e consulta de bases “fechadas” de dados de índices de retenção, validação de hipóteses de identidade e organização de resultados analíticos, foi realizado com auxílio do programa RetChrom 3.15, cedido por cortesia do autor, Professor Doutor Carlos Cavaleiro, Centro de Estudos Farmacêuticos.

A quantificação de cada constituinte foi realizada por determinação da sua abundância relativa, calculada com base nas áreas dos picos cromatográficos sem qualquer correcção pelos factores de resposta dos detectores FID.

2.2.3. Fraccionamento por cromatografia líquida em coluna e cromatografia em camada fina preparativa

A complexidade dos óleos essenciais torna, por vezes, difícil a identificação de todos os constituintes a partir de uma análise directa. Por outro lado, a interpretação e validação de efeitos ou actividades biológicas exige também o fraccionamento dos óleos e até a individualização dos seus componentes. Por isso o fraccionamento dos óleos essenciais em fracções de composição mais simples reveste-se de grande utilidade.

Para esse efeito, recorreu-se a cromatografia de adsorção, preparativa, com fase estacionária de gele de sílica com granulometria de 200 – 630µm. Foram usadas colunas de 20mm de diâmetro com um leito de fase estacionária de 300mm de comprimento, preparado e equilibrado a partir de cerca de 70g de sílica suspensa em *n*-pentano. Tais condições viabilizaram fraccionamentos de até 1g de óleo essencial.

As eluições realizaram-se seguindo um gradiente descontínuo, iniciado com *n*-pentano, seguindo-se misturas de *n*-pentano e éter dietílico (98:2; 90:10, 80:20, 50:50) até 100% de éter dietílico. A mudança de composição da fase móvel ocorreu sempre que se verificou o esgotamento da eluição.

Cada fracção obtida foi concentrada por evaporação a pressão reduzida num evaporador centrífugo e a composição foi monitorizada por GC-MS. As fracções com idêntica composição qualitativa foram reunidas e mantidas a 4°C até ulterior utilização.

Na sequência do fraccionamento, tendo em vista o isolamento e purificação de compostos recorreu-se à cromatografia em camada fina preparativa, em placas de gele de sílica impregnada com nitrato de prata (AgNO₃) a 10%, com 0,25mm de espessura, preparadas extemporaneamente no laboratório. Antes da utilização, as placas foram activadas por aquecimento a 110°C durante 30 minutos, depois arrefecidas e mantidas em exsiccador. Atendendo à incorporação do nitrato de prata, toda a manipulação das placas, incluindo o próprio desenvolvimento, foi realizada ao abrigo da luz. Em cada placa foi aplicada uma alíquota de 90µl de fracção, distribuída por 6 bandas de 15µl. Cada placa foi levada a desenvolver 2 vezes, numa única dimensão, primeiro com uma mistura de *n*-pentano e acetona 97:3, depois e após secagem, com uma mistura de *n*-pentano e acetona 95:5.

As bandas cromatográficas foram reveladas por observação à luz ultravioleta (254 e 365nm) e assinaladas por picotagem para ulterior destacamento. O material destacado foi recolhido em tubos de centrifugação onde se adicionou volume conveniente de acetona para solubilização dos compostos adsorvidos. Após centrifugação a 3,000xg, durante 5 minutos, as soluções foram recuperadas por decantação e o solvente eliminado por evaporação a pressão reduzida. A pureza e identidade dos compostos isolados foram determinadas por GC e GC-MS.

2.2.4. Expressão em *E. coli* e purificação de proBACE-1 recombinante

A expressão e purificação de proBACE-1 foram realizadas de acordo com o protocolo desenvolvido por Lin e colaboradores (Lin *et al.*, 2000). O cDNA que codifica o domínio proteolítico solúvel da BACE-1 foi subclonado no vector de expressão pET11 e introduzido em *E. coli*, estirpe BL21 star. As células transformadas foram incubadas a 37°C, com agitação, até atingirem uma OD_{600nm} de 0,6 – 0,7. Nessa altura a expressão de proteína foi induzida com a adição de IPTG numa concentração final de 0,5mM e posterior incubação por mais 3 horas. Após centrifugação, as células foram ressuspensas em tampão TN (Tris 50mM; NaCl 50mM; pH 7,4), lisadas com a adição de lisozima (100µg.ml⁻¹) e congeladas. Uma vez descongeladas, foram adicionados DNase (100µg.ml⁻¹) e MgCl₂ (100mM) e a mistura foi deixada em gelo, com agitação ocasional, até total liquefacção. O lisado celular foi então diluído para 1L de tampão TN e deixado a agitar durante a noite a 4°C, para lavagem dos corpos de inclusão. No dia seguinte, o material foi centrifugado a 10,000xg e lavado como anteriormente, mas desta vez com tampão TNT (Triton X-100 a 0,1% em tampão TN). Depois de nova centrifugação a 10,000xg, os corpos de inclusão purificados foram dissolvidos numa solução de 8M de ureia e 100mM de β-mercaptoetanol e diluídos 20x em tampão Tris 20mM, pH 8,0.

Para a purificação, a proteína foi concentrada utilizando um sistema de ultrafiltração por fluxo tangencial (Pellicon 2, Millipore), sendo posteriormente submetida a cromatografia de exclusão molecular, numa coluna S-300 (Amersham Biosciences), equilibrada com tampão 20mM Tris; 0,4M ureia, pH 8,0. As fracções correspondentes à proteína activa foram reunidas e submetidas a duas cromatografias de troca iónica realizadas num sistema de FPLC,

nomeadamente com uma coluna High Q (Bio-Rad) e uma coluna Mono Q (Amersham Biosciences), ambas equilibradas com tampão 20mM Tris; 0,4M ureia, pH 8,0. A eluição ocorreu com um gradiente linear de solução aquosas de NaCl (de 0 a 1M) e as fracções obtidas foram quantificadas e analisadas por SDS-PAGE. Parte da proteína obtida foi activada (clivagem do segmento pró) com incubação durante 15 minutos, a 37°C, por adição do tampão de activação (1:1) Tris-HCl 100mM, pH 8,0; DTT 8mM; CaCl₂ 20mM, contendo 20µg.ml⁻¹ de clostripaína.

2.2.5. Determinação de constantes de actividade e inibição enzimática

A actividade proteolítica das proteases aspárticas foi medida com recurso a dois substratos fluorogénicos, ambos contendo o mesmo fluoróforo (metoxicoumarina), com comprimentos de onda de excitação e emissão de 328 e 393nm, respectivamente.

No caso da BACE-1 foi utilizado o peptídeo (MCA)Ser-Glu-Val-Asn-Leu-Asp-Ala-Glu-Phe-Lys(DNP) que contém a sequência de clivagem encontrada na variante sueca do APP, relacionada com o aparecimento precoce da doença de Alzheimer (Ermolieff *et al.*, 2000). No caso das outras proteases (pepsina, catepsina D, plasmepsinas e Sap-2), o substrato usado foi o (MCA)Lys-Lys-Pro-Ala-Glu-Phe-Phe-Ala-Leu-Lys(DNP), que contém a sequência de clivagem otimizada para a generalidade das proteases aspárticas (Dunn *et al.*, 1986). Foi também utilizado como controlo positivo, o inibidor Stat-Val, análogo do substrato da BACE-1, descrito por Sinha e colaboradores (Sinha *et al.*, 1999b). Para a determinação de parâmetros cinéticos, a concentração apropriada de cada protease foi incubada a 37°C em tampão de ensaio (acetato de sódio 100mM,

pH 4,5), com ou sem adição de diferentes concentrações de inibidores em DMSO. As reacções foram iniciadas pela adição de várias concentrações de substrato e o aumento de fluorescência foi registado por 5 a 30 minutos num fluorímetro FluoroMax™ (HORIBA Jobin Yvon). As constantes foram determinadas através do ajuste dos dados de velocidade inicial a modelos de regressão não linear, realizado por software apropriado (GraphPad Prism® e SigmaPlot®).

2.2.6. Cultura celular e incubação com inibidores

Foram realizados ensaios sobre duas linhas celulares, uma derivada de células de ovário de hamster chinês (CHO) e outra de um neuroblastoma humano (SHSY5Y). Ambas as linhagens foram transfectadas de forma estável com a sequência de DNA que codifica o APP *wild type*, o que as torna ideais para este estudo uma vez que, ao sobreexpressarem este precursor, apenas necessitam da acção da β e γ -secretase para libertar o peptídeo A β .

As células CHO-APPwt foram mantidas em meio Ham's F-12 contendo 10% FBS, 100U.ml⁻¹ penicilina, 100mg.ml⁻¹ estreptomicina e 500 μ g.ml⁻¹ de G418. No caso das células SHSY5Y-APPwt a cultura foi mantida com uma mistura 1:1 dos meios EMEM e Ham's F12, enriquecida com 10% FBS, 10% de uma mistura de aminoácidos não essenciais, 14,7 μ g.ml⁻¹ glutamato, 110 μ g.ml⁻¹ piruvato, 100U.ml⁻¹ penicilina, 100mg.ml⁻¹ estreptomicina e 250 μ g.ml⁻¹ de G418. Ambas as linhagens foram incubadas a 37°C, em atmosfera humidificada com 5% de CO₂. Para os ensaios de inibição, as células foram plaqueadas em placas de 6 poços com uma densidade de 1x10⁶ células/poço. No dia seguinte, após ter sido atingida a aderência e confluência pretendidas, o meio de cultura de cada poço foi substituído por 500 μ l de meio fresco, sem soro, contendo diferentes concentrações ou composições de inibidores em DMSO ou apenas veículo nas

condições de controlo. No caso das células SHSY5Y-APPwt, este meio foi também enriquecido com o suplemento de crescimento neuronal N2, necessário à sobrevivência na ausência de soro. Terminado o tempo de incubação adequado a cada linha celular (6 horas para as células CHO-APPwt e 16 horas para as SHSY5Y-APPwt), removeram-se os meios e centrifugaram-se a 350xg durante 5 minutos para sedimentar eventuais células destacadas. Os sobrenadantes foram então congelados a -20°C até posterior análise e quantificação do A β ₄₀ por ELISA ou do sAPP β por Western blot, e as células remanescentes submetidas a um ensaio de viabilidade.

2.2.7. Avaliação da viabilidade celular

A viabilidade das células CHO-APPwt foi avaliada com o corante vermelho neutro. Este ensaio baseia-se na capacidade das células viáveis incorporarem e reterem este corante supravital. Após a remoção do meio e lavagem das células remanescentes, as placas foram incubadas com meio de cultura fresco contendo 0,003% de vermelho neutro, durante 2 horas, a 37°C, numa atmosfera de 5% CO₂. Passado este período, o meio foi removido e as células lavadas com PBS. O corante foi então extraído das células viáveis pela adição de uma solução de 1% de ácido acético em 50% de etanol e a cor homogeneizada por 15 minutos de agitação. A absorvância das soluções foi medida a 540nm (e subtraída do background a 690nm) num espectrofotómetro PowerWave XSTTM (Bio-Tek). Como as células vivas são as responsáveis pela coloração, uma maior absorvância equivale a uma maior viabilidade celular. Os valores de viabilidade para cada condição testada foram expressos como percentagem em relação ao controlo.

No caso das células SHSY5Y-APPwt, devido a interferências existentes entre o meio de cultura e o corante vermelho neutro, utilizou-se o método de

exclusão do azul de tripan. Ao contrário do que acontece na técnica acima descrita, as células vivas excluem este corante, e portanto apenas as células não viáveis aparecem coradas de azul. Para cada condição removeu-se o meio de cultura e sedimentaram-se quaisquer células destacadas por centrifugação. As restantes células foram tripsinizadas, centrifugadas e adicionadas às anteriores, sendo depois ressuspensas em meio de cultura fresco. Esta suspensão foi diluída 1:1 com uma solução de 0,4% de azul de tripan e carregada num hemocitómetro. Um ou dois minutos depois contou-se o número total de células e o número de células coradas (mortas). A viabilidade celular, avaliada pelo número de células não coradas relativamente ao número total, foi também expressa como percentagem em relação ao controlo.

2.2.8. Análise da produção de sAPP β por *Western blotting*

Os mesmos meios celulares foram simultaneamente analisados por *Western blotting* com o objectivo de detectar diferenças nos níveis de sAPP β secretado. Numa primeira fase procedeu-se à sua concentração através de centrifugação a 13,000xg durante 30 minutos, a 4°C, num concentrador Microcon (Millipore). Após uma redução do volume de aproximadamente 10x, foi quantificada a proteína total com o reagente Bio-Rad, de acordo com as instruções do fabricante. Depois de normalizar as amostras em relação ao teor de proteína total, adicionou-se tampão de desnaturação 6x (Tris-HCl 350mM, pH 6,8; SDS 10%; glicerol 30%; DTT 60mM; azul de bromofenol 0,15mM) para uma concentração final de 1x, seguido do aquecimento a 97°C, durante 5 minutos. As proteínas foram então separadas por SDS-PAGE, usando 2 géis com diferentes concentrações de acrilamida, nomeadamente 4% para o gel de concentração e 10% para o de separação, e um tampão de electroforese composto por Tris

25mM; glicina 200mM e SDS 0,05%. Terminada a corrida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (0,45 μ m, Bio-Rad) usando o tampão de transferência (Tris 25mM; glicina 192mM; metanol 20%) descrito por Towbin e colaboradores (Towbin *et al.*, 1979) e as condições de 500mA durante 180 minutos a 10°C. A membrana foi então corada com solução de Ponceau S (0,1% em 5% de ácido acético, Sigma) para um controlo de carregamento de proteína, lavada e bloqueada com uma solução de 5% de leite magro em PBS. Após o bloqueio durante 1 hora à temperatura ambiente, a membrana foi deixada a incubar durante a noite, a 4°C, com o anticorpo específico para o sAPP β numa concentração de 1 μ g.ml⁻¹ em solução de bloqueio. Depois de várias lavagens com uma solução de PBS contendo 0,1% de Tween 20, a membrana foi incubada com o respectivo anticorpo secundário conjugado com a fosfatase alcalina, numa concentração de 1:10,000 em tampão de bloqueio, durante 1 hora, à temperatura ambiente. Finalmente, após novas lavagens com PBS, as bandas foram visualizadas pelo método ECFTM, com um *scanner* de fluorescência Molecular Imager FXTM (Bio-Rad).

2.2.9. Administração intranasal de inibidores em modelo animal

Os ensaios de inibição *in vivo* foram realizados com a colaboração do grupo Mecanismos Moleculares de Doença do Centro de Neurociências de Coimbra. Utilizou-se um modelo animal da doença de Alzheimer, o rato transgénico 3xTg-AD, cuja geração e caracterização estão descritas por Oddo e colaboradores (Oddo *et al.*, 2003). Neste estudo, os animais tinham idades compreendidas entre 4 e 5 meses e um peso médio de 25-30g. Os ensaios, com a duração de 4 dias, compreenderam uma administração diária de inibidores ou

de uma solução 0,9% NaCl (controlo), sendo sacrificados ao 4º dia, 3h após a última dose, por anestesia seguida de deslocamento cervical.

Para a administração intranasal, os ratinhos foram mantidos em posição dorsal (Figura 10) enquanto com uma micropipeta se depositava numa narina o volume de solução a ensaiar. Os animais foram mantidos nesta posição por mais 2-3 minutos para permitir a completa absorção das substâncias.



Figura 10. Posicionamento do ratinho para a administração intranasal das soluções ensaiadas (retirado de *Practical Animal Handling in Small Mammals; Assessing the Health and Welfare of Laboratory Animals Organization*, 2008).

2.2.10. Preparação de amostras de tecido cerebral

Após dissecação do crânio, os cérebros foram removidos, pesados e congelados a -80°C até posterior processamento. Cada cérebro, pesando em média 300mg foi descongelado e homogeneizado com uma solução 2% de SDS contendo o cocktail de inibidores de proteases Complete™ (Roche, Suíça) e $10\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de pepstatina A. Esta mistura foi brevemente sonicada e ultracentrifugada a $100,000\times g$ durante 1 hora a 4°C (Beckman Optima™ TLX). Os sobrenadantes foram recolhidos e identificados como fracção solúvel. O pellet foi então redissolvido com uma solução 70% de ácido fórmico e ultracentrifugado como anteriormente, sendo estes sobrenadantes identificados como fracção

insolúvel. Antes da congelação das fracções, foi determinado o seu teor de proteína total com o reagente BCA™ (Pierce). A recta incluiu concentrações de BSA compreendidas entre 5 e 160 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, as amostras foram diluídas 100x para evitar qualquer tipo de interferência pelo solvente e a absorvância lida a 562nm, após uma incubação de 30 minutos, a 37°C. Com base nestes resultados as amostras foram normalizadas em relação ao teor de proteína total.

2.2.11. Determinação de A β ₄₀ por técnicas de ELISA

Os meios celulares e homogeneizados cerebrais foram analisados por uma técnica de sandwich ELISA, otimizada para determinar a quantidade de A β ₄₀ presente nestas amostras. O primeiro anticorpo (clone 6E10) específico para os resíduos 1-17 do A β humano foi adsorvido durante 6 horas, a 4°C, em placas de 96 poços (Maxisorp, Nunc), numa concentração de 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ em tampão Na₂CO₃ 55mM, pH 9,6. O bloqueio dos restantes locais de ligação com uma proteína inespecífica decorreu durante 1 hora à temperatura ambiente com uma solução contendo BSA (PBS; BSA 3%; Tween20 0,05%). Esta solução foi descartada e foram aplicadas 6 concentrações diferentes de padrão de A β ₄₀ e as amostras diluídas em tampão de bloqueio. No caso dos meios celulares, foram diluídos 2x, enquanto a fracção solúvel dos homogeneizados cerebrais foi diluída 5x. A fracção insolúvel necessitou de um tratamento prévio com tampão de neutralização (Tris base 1M; NaH₂PO₄ 0,5M), antes da diluição com tampão de bloqueio. As diferentes concentrações de padrão utilizadas para a curva de calibração foram preparadas com uma solução que mimetiza a composição da amostra, isto é, constituída por 50% de meio de cultura e 50% de tampão de bloqueio ou 20% de tampão de homogeneização e 80% de tampão de bloqueio para os meios celulares ou homogeneizados cerebrais, respectivamente. A cada

um dos poços foi adicionado o segundo anticorpo específico para os resíduos 31-40 do A β humano (clone G2-10), conjugado com a enzima HRP. A placa foi rapidamente agitada à temperatura ambiente e deixada a incubar a 4°C durante a noite. No dia seguinte os poços foram lavados repetidamente com PBS e incubados com o substrato TMB, durante 20 minutos à temperatura ambiente. A reacção foi parada com H₂SO₄ 2M e a absorvância lida a 450nm num espectrofotómetro PowerWave XSTTM (Bio-Tek). Em cada placa, os valores de concentração de A β ₄₀ das amostras calcularam-se por interpolação na curva de calibração obtida com os padrões.

2.2.12. Análise estatística

O tratamento estatístico dos dados foi realizado recorrendo ao programa GraphPad Prism[®]. Os resultados foram expressos como as médias \pm erro padrão da média do número de experiências indicado. O significado estatístico foi determinado utilizando uma análise de variância simples (“one-way ANOVA”) seguida do teste Dunnett’s de comparação múltipla, que compara cada um dos grupos de tratamento em relação ao controlo. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

**OS ÓLEOS
ESSENCIAIS
COMO
FONTE DE
DIVERSIDADE
QUÍMICA**

3

3.1. Análise e Caracterização das

Amostras Vegetais

As plantas medicinais são usadas desde a Antiguidade para o tratamento das mais variadas patologias e representam uma fonte abundante de compostos bioactivos. O interesse por produtos naturais, nomeadamente extractos vegetais, tem vindo a aumentar com o aparecimento de vários problemas envolvendo a segurança e a farmacocinética de muitos dos compostos de origem sintética. Além disso, os produtos vegetais são ainda capazes de oferecer uma grande diversidade de composições e constituintes que não se encontram comercialmente disponíveis e são difíceis de obter sinteticamente.

Os óleos essenciais produzidos por plantas aromáticas e obtidos pela sua hidrodestilação são misturas complexas, por vezes com mais de uma centena de compostos que, pela sua diversidade e características físico-químicas, em particular a hidrofobicidade e o baixo peso molecular (< 300Da), oferecem elevada probabilidade de satisfazerem condições farmacocinéticas para se assumirem como candidatos a protótipos ou agentes terapêuticos. Justifica-se, por isso, o investimento no estudo das plantas aromáticas, enquanto fonte desses compostos, e na caracterização química dos OE com identificação e quantificação dos seus componentes.

3.1.1. Análise e identificação de constituintes voláteis maioritários

Os óleos escolhidos para o *screening* foram analisados por GC e por GC-MS. Na tabela 2 indicam-se os constituintes maioritários (> 2%) de cada amostra.

Estão representados 16 hidrocarbonetos monoterpênicos, 33 monoterpênos oxigenados (álcoois, ésteres, éteres, cetonas e aldeídos), 5 hidrocarbonetos sesquiterpênicos, 7 sesquiterpenos oxigenados (em geral álcoois ou óxidos) e 3 fenilpropanóides. Entre os compostos minoritários foram ainda identificados compostos alifáticos e diterpenóides, embora a maioria pertença aos grupos químicos acima referidos.

Tabela 2. Constituintes maioritários dos OE.

	<i>Constituintes maioritários (> 2%)</i>	<i>Compostos identificados (N) / Total (%)</i>
<i>Mentha cervina</i>	limoneno (5,4%); isomentona (10,6%); pulegona (74,8%)	(16) /99,5
<i>Mentha x piperita</i>	1,8-cineol (5,8%); mentona (9,8%); mentofurano (10,9%); neo-mentol (4,0%); mentol (44,0%); neo-isomentol (2,9%); pulegona (2,4%); acetato mentilo (7,8%)	(29) /98,6
<i>Lavandula luisieri</i>	3,5-dimetileno-1,4,4-trimetilciclopenteno (2,1%); 1,8-cineol (3,9%); linalol (2,7%); <i>trans</i> - α -necrodol (6,3%); teresantalol (2,5%); 1,1,2,3-tetrametil-4-hidroxi-2-ciclopenteno (2,4%); 2,3,4,4-tetrametil-5-metileno-ciclopent-2-enona (6,1%); isómero acetato necrodilo (2,5%); acetato <i>trans</i> - α -necrodilo (16,6%); acetato lavandulilo (6,7%); acetato liratilo (4,9%); acetato <i>cis</i> - α -necrodilo (2,3%); viridiflorol (3,6%)	(63) /91,3%
<i>Lavandula angustifolia</i>	1,8-cineol (9,0%); <i>E</i> - β -ocimeno (4,2%); linalol (46,5%); cânfora (10,5%); borneol (4,5%); terpinen-4-ol (7,6%); acetato linalilo (3,0%)	(39) /99,7
<i>Lavandula stoechas</i>	α -pineno (6,2%); canfeno (6,0%); 1,8-cineol (11,9%); fenchona (23,1%); linalol (2,1%); cânfora (29,5%); borneol (2,7%); acetato bornilo (3,8%)	(24) /95,0
<i>Lavandula pedunculata</i>	α -pineno (8,9%); canfeno (5,8%); β -pineno (3,9%); 1,8-cineol (16,4%); fenchona (15,0%); linalol (3,9%); cânfora (26,4%)	(36) /97,7
<i>Lavandula sampaiana</i>	α -pineno (2,1%); 1,8-cineol (23,2%); fenchona (13,5%); cânfora (42,9%)	(38) /97,7
<i>Rosmarinus officinalis</i>	α -pineno (11,2%); canfeno (3,4%); mirceno (32,0%); <i>p</i> -cimeno (3,8%); 1,8-cineol (13,7%); limoneno (6,6%); linalol (2,1%); cânfora (11,9%)	(31) /99,8

Tabela 2. (continuação)

	Constituintes maioritários (> 2%)	Compostos identificados (N) / Total (%)
<i>Cupressus lusitanicus pendula</i>	limoneno (25,2%); linalol (10,7%); iso-safrol (9,4%); safrol (12,1%); metileugenol (3,8%); elemol (18,3%); T-muurolol (2,9%)	(20) / 94,9
<i>Juniperus oxycedrus</i>	α -pineno (76,4%); Δ -3-careno (2,7%)	(40) / 97,7
<i>Juniperus turbinata</i>	α -pineno (32,5%); β -pineno (2,5%); mirceno (7,7%); α -felandreno (3,1%), E- β -cimeno (4,9%); β -felandreno (26,1%); acetato α -terpinilo (11,4%)	(30) / 98,6
<i>Foeniculum vulgare</i>	α -pineno (4,0%); mirceno (4,2%); α -felandreno (19,3%); limoneno (7,7%); fenchona (16,1%); estragol (41,9%)	(17) / 99,9
<i>Rosmarinus officinalis</i>	α -pineno (11,2%); canfeno (3,4%); mirceno (32,0%); <i>p</i> -cimeno (3,8%); 1,8-cineol (13,7%); limoneno (6,6%); linalol (2,1%); cânfora (11,9%)	(31) / 99,8
<i>Chritmum maritimum</i>	α -pineno (2,1%); <i>p</i> -cimeno (7,1%); β -felandreno (8,0%); Z- β -ocimeno (5,2%); γ -terpineno (48,7%); óxido de metil timilo (6,3%); dilapiol (13,8%)	(31) / 98,3
<i>Artemisia chritmifolia</i>	α -pineno (4,3%); β -pineno (21,3%); <i>p</i> -cimeno (2,6%); δ -3-careno (4,8%), E-ocimeno (8,6%); Z- β -ocimeno (2,7%); γ -terpineno (6,3%); germacreno D (4,1%); cadina-1,4-dieno (19,2%)	(48) / 89,0
<i>Seseli tortuosum</i>	α -pineno (27,4%); canfeno (2,1%); sabineno (2,0%); β -pineno (16,0%); mirceno (3,0%); limoneno (10,0%); Z- β -ocimeno (8,0%); γ -terpineno (9,3%)	(27) / 90,3
<i>Salvia officinalis</i>	α -pineno (4,3%); canfeno (2,0%); β -pineno (10,9%); 1,8-cineol (20,6%); β -tujona (18,4%); α -tujona (3,2%); cânfora (3,2%); borneol (8,2%); <i>trans</i> - β -cariofileno (3,8%); α -humuleno (5,1%); viridiflorol (10,3%)	(30) / 97,0
<i>Cammelia sinensis</i>	α -pineno (3,1%); α -terpineno (9,4%); <i>p</i> -cimeno (7,0%); 1,8-cineol (5,5%); γ -terpineno (17,7%); α -terpinoleno (3,9%); terpineno-4-ol (35,2%)	(28) / 98,0
<i>Thymbra capitata</i>	<i>p</i> -cimeno (5,5%); γ -terpineno (3,6%); linalol (2,8%); carvacrol (74,6%); E-cariofileno (3,9%)	(28) / 98,1
<i>Origanum virens</i>	mirceno (2,4%); <i>p</i> -cimeno (7,4%), γ -terpineno (7,9%); timol (2,1%); carvacrol (68,2%)	(28) / 99,3
<i>Origanum vulgare</i>	<i>p</i> -cimeno (11,3%); linalol (3,7%); carvacrol (73,0%), E-cariofileno (2,4%)	(21) / 99,1

Tabela 2. (continuação)

	<i>Constituintes maioritários (> 2%)</i>	<i>Compostos identificados (N) / Total (%)</i>
<i>Thymus mastichina</i>	α -pineno (3,6%); sabineno (3,7%); β -pineno (5,3%); mirceno (2,0%); 1,8-cineol (64,6%); limoneno (5,0%); acetato α -terpinilo (5,0%)	(24) /97,7
<i>Thymus capitellatus</i>	α -pineno (4,5%); canfeno (6,5%), sabineno (3,0%); β -pineno (2,0%); 1,8-cineol (58,6%); borneol (10,0%)	(28) /97,9
<i>Thymus vulgaris</i>	<i>p</i> -cimeno (11,7%); γ -terpineno (3,2%); linalol (2,2%); carvacrol (70,3%); E-cariofileno (2,9%)	(29) /98,1
<i>Lippia graveolens</i>	mirceno (3,4%); Δ -3-careno (4,3%); <i>p</i> -cimeno (16,9%); 1,8-cineol (6,6%); <i>trans</i> -hidrato sabineno (2,3%); linalol (5,4%), α -terpineol (3,6%); timol (19,8%), E-cariofileno (2,4%); óxido cariofileno (5,7%)	(46) /90,3
<i>Lippia citriodora</i>	6-metil-5-hepten-2-ona (3,4%); limoneno (8,9%); neral (10,6%); geranial (14,3%), ar-curcumeno (9,4%), nerolidol (2,5%), germacreno D-4-ol (4,1%), espatulenol (6,1%), óxido cariofileno (5,4%)	(75) /97,7

Muitos constituintes são comuns a vários óleos, apesar de ocorrerem em concentrações distintas. São exemplos hidrocarbonetos como o α -pineno, limoneno ou *p*-cimeno, ou os monoterpenos oxigenados 1,8-cineol, linalol ou 4-terpineol. São também comuns algumas cetonas monoterpênicas, particularmente a cânfora, a mentona, a fenchona e as tujonas. Menos abundantes mas igualmente comuns a vários óleos são os sesquiterpenos cariofileno ou o respectivo óxido, bem como o viridiflorol.

O OE de *Lavandula luisieri* destaca-se por possuir na composição componentes exclusivos e de rara ocorrência, não detectados em mais nenhum dos restantes óleos, mesmo nos de outras espécies do género *Lavandula*.

**O ÓLEO
ESSENCIAL DE
L. LUISIERI
INIBE A
ACTIVIDADE
DA BACE-1**

4

4.1. Expressão e Purificação de BACE-1 Recombinante

A BACE-1 é expressa na maioria dos tecidos humanos, mas é no cérebro, particularmente nas células neuronais, que os seus níveis de expressão e actividade são mais elevados. Para a realização de ensaios de inibição em larga escala com a proteína humana purificada é necessário uma grande quantidade da mesma, o que é difícil de obter a partir da sua fonte natural mais abundante, o cérebro humano. Com as novas técnicas de produção de proteína recombinante é possível ultrapassar esta dificuldade, obtendo-se a proteína num elevado grau de pureza, rapidamente disponível para *screening* em larga escala.

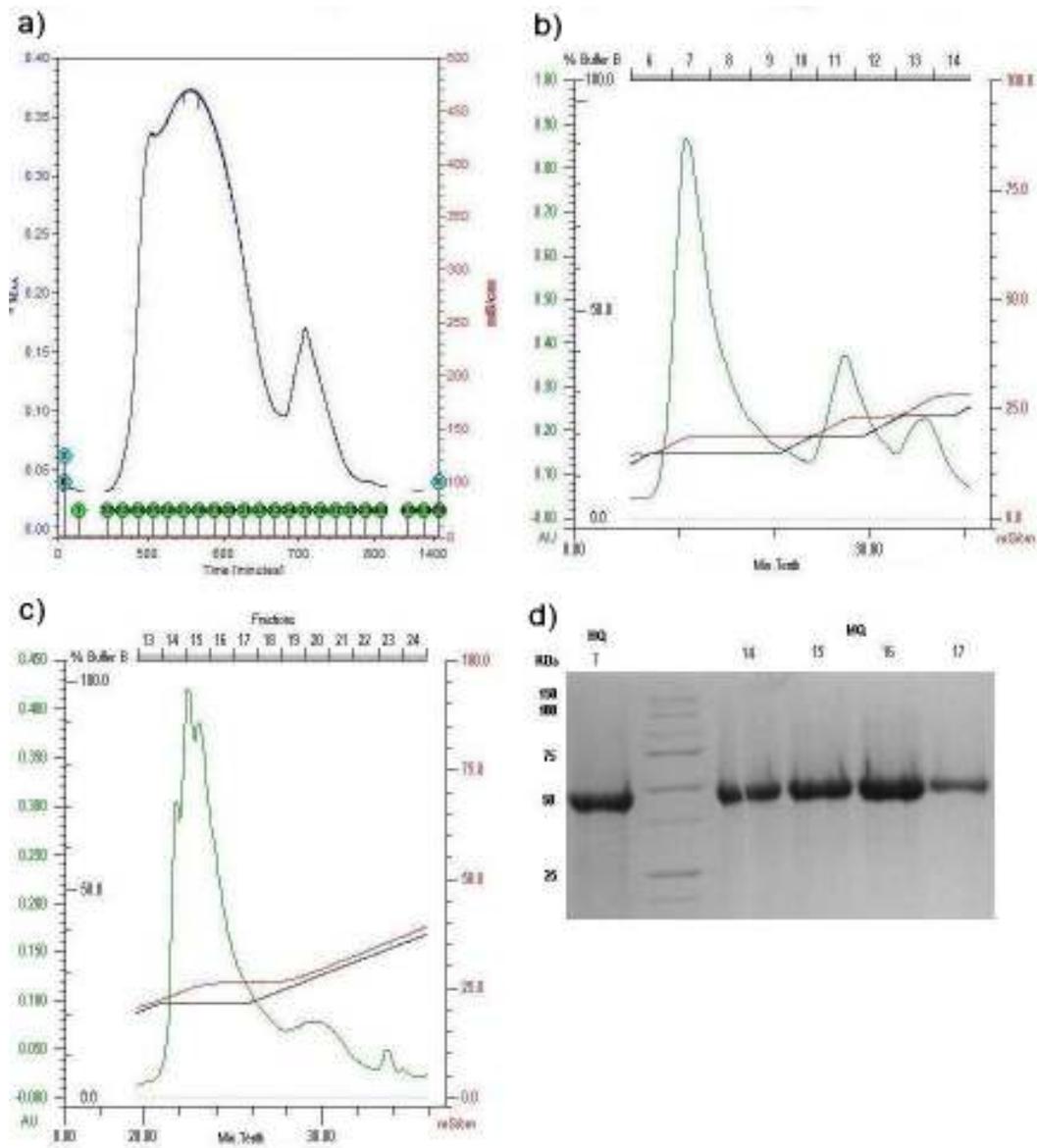
4.1.1. Expressão em *E. coli* e purificação de proBACE-1 recombinante

Para obter a proteína recombinante, o cDNA que codifica o domínio proteolítico solúvel da BACE-1 foi subclonado no vector de expressão pET11 e introduzido em *E. coli*, estirpe BL21 star. Para remover os agregados de proteína ou em estados de *refolding* incorrectos, procedeu-se a uma cromatografia de exclusão em Sephacryl S-300 (Figura 11a), seguida de duas cromatografias de troca iónica, primeiro em High Q (Figura 11b) e finalmente em Mono Q (Figura 11c). As várias fracções recolhidas foram analisadas por SDS-PAGE (Figura 11d), onde se revelou a presença de uma banda maioritária com peso molecular

aproximado de 50KDa, tal como o esperado para a proteína recombinante produzida (Lin *et al.*, 2000).

Em média, em cada uma das purificações foi possível obter cerca de 4mg de proBACE-1 recombinante, com actividade proteolítica.

Figura 11 (página seguinte). **Cromatografias de exclusão molecular e troca iónica e análise electroforética por SDS-PAGE da proBACE-1 recombinante.** **a)** Cromatografia de exclusão molecular em Sephacryl S-300, equilibrada e eluída com tampão 20mM Tris; 0,4M ureia, pH 8,0. As fracções 34-38 (segundo pico), correspondentes à proteína não agregada foram então submetidas a uma cromatografia de troca iónica em High Q. **b)** Cromatografia de troca iónica em High Q equilibrada com tampão 20mM Tris; 0,4M ureia, pH 8,0 e eluída com um gradiente linear de NaCl. A proteína eluída na fracção 7, correspondente ao pico mais abundante deste cromatograma, foi então diluída no tampão de equilíbrio e submetida a uma cromatografia em Mono Q. **c)** Cromatografia de troca iónica em Mono Q equilibrada com tampão 20mM Tris; 0,4M ureia, pH 8,0 e eluída com um gradiente linear de NaCl. As fracções obtidas desta última cromatografia (14-17), que correspondem à proteína recombinante purificada, foram concentradas e analisadas por SDS-PAGE e por ensaios de actividade enzimática com um substrato fluorogénico. **d)** Análise por SDS-PAGE das fracções recolhidas das cromatografias em High Q (**HQ**) e Mono Q (**MQ**). Em todas as fracções é visível uma banda maioritária a cerca de 50 KDa. Os números das fracções no gel correspondem aos números dos respectivos cromatogramas. Gel 12% corado com Comassie. Padrão pré-corado da BioRad.



Após purificação e quantificação, a proteína recombinante obtida foi então caracterizada em termos da sua activação e actividade proteolítica.

4.1.2. Caracterização da actividade enzimática

Os ensaios de avaliação e caracterização da actividade enzimática da proteína recombinante obtida foram realizados com recurso a um substrato fluorogénico. Este peptídeo, com a sequência (MCA)Ser-Glu-Val-Asn-Leu-Asp-Ala-Glu-Phe-Lys(DNP), contém o local de clivagem encontrado na variante sueca do APP, associado ao aparecimento precoce da doença de Alzheimer (Ermolieff *et al.*, 2000). À semelhança do que acontece para as outras proteases aspárticas, os valores de pH óptimo para a BACE-1 situam-se entre 3,5 e 4,5 (Ghosh *et al.*, 2002), motivo pelo qual todos os ensaios foram conduzidos utilizando como tampão de ensaio uma solução 100mM de acetato de sódio, a pH 4,5.

A proBACE-1 recombinante possui actividade proteolítica devido à presença de uma conformação aberta do precursor no qual o segmento pró é deslocado do local activo, expondo a fenda catalítica. Para o substrato utilizado e nas condições experimentais anteriormente descritas foi possível determinar o valor de $4,51\mu\text{M}$ para a constante de Michaelis-Menten (K_m), em concordância com o que se encontra referenciado na literatura (Ermolieff *et al.*, 2000) (Figura 12). Para a determinação das constantes de inibição, e uma vez que a BACE-1, ao contrário das restantes proteases da sua classe, é relativamente insensível à inibição pela pepstatina, foi utilizado o inibidor comercial P10-P4' Stat-Val. Este inibidor consiste num peptídeo análogo do substrato, com a sequência Lys-Thr-Glu-Glu-Ile-Ser-Glu-Val-Asn-(stat)-Val-Ala-Glu-Phe, onde os resíduos da posição P1-P1' foram substituídos por uma estatina e valina, respectivamente. A enzima foi testada com diferentes concentrações de inibidor, observando-se que toda a proBACE-1 testada se encontrava activa, ligando o inibidor numa estequiometria de 1:1.

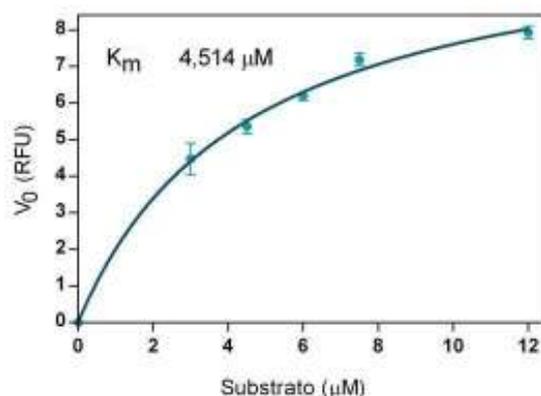


Figura 12. Caracterização da actividade enzimática da proBACE-1 recombinante. Determinação da constante de Michaelis-Menten (K_m). As condições do ensaio incluíram uma concentração de proteína de $1\mu\text{M}$, numa gama de concentrações de substrato de 3 a $12\mu\text{M}$. A velocidade inicial (V_0) foi calculada pelo declive inicial da recta do aumento de fluorescência resultante da clivagem do substrato ao longo do tempo, em unidades arbitrárias de fluorescência (RFU).

Ao contrário do que acontece com a maioria das proteases da sua classe, o processamento proteolítico da proBACE-1 não parece ser autocatalítico, despoletado pelo abaixamento de pH, necessitando de uma outra protease para a clivagem do segmento pró (Ermolieff *et al.*, 2000). Nos ensaios realizados, a protease utilizada para o teste *in vitro* das condições de activação foi a clostripaína, numa concentração de trabalho de $0,36954\text{pmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ em tampão de activação 100mM Tris-HCl pH 8,0, 8mM DTT, 20mM CaCl_2 . A proBACE-1 foi então incubada com a clostripaína, numa razão enzima:substrato de 1:800, durante 3h a 37°C . Foram retiradas amostras em diferentes tempos de incubação, e a actividade da BACE-1 medida após inibição da clostripaína com TLCK. Os ensaios de actividade revelaram um aumento máximo de cerca de 2x em relação à forma pró, para tempos de digestão de 10 – 15 minutos (Figura 13a), o que está de

acordo com os resultados publicados (Ermolieff *et al.*, 2000). A análise por SDS-PAGE mostra a digestão da proBACE-1 com o aparecimento de bandas proteicas de peso molecular inferior (Figura 13b), sendo que o decréscimo de actividade observado nos tempos mais longos de digestão pode resultar da clivagem de ligações peptídicas na própria enzima madura.

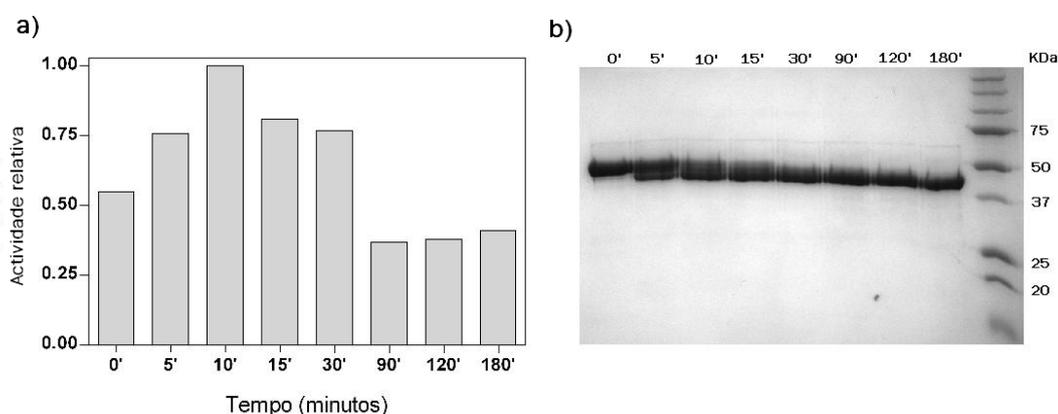


Figura 13. Activação da proBACE-1 com clostripaína. a) Variação da actividade enzimática com o tempo de digestão. Foram retiradas alíquotas em diferentes tempos (de 0' a 180') e a actividade medida com o substrato fluorogénico, a pH 4,5 **b)** Análise por SDS-PAGE das amostras recolhidas a diferentes tempos de digestão. Gel 12% corado com Comassie. Padrão pré-corado da BioRad.

O conjunto dos resultados atrás descritos mostra claramente que as duas formas da BACE-1 recombinante têm propriedades enzimáticas semelhantes às descritas na literatura, podendo ser utilizadas nos ensaios de inibição com os óleos essenciais.

4.2. Efeito dos Óleos Essenciais na Actividade Enzimática

Tradicionalmente, os compostos activos podem ser desenvolvidos por estratégias fundamentadas no *design* racional de fármacos ou resultantes de estratégias de *screening* de um elevado número de moléculas, sejam elas naturais ou obtidas por síntese química.

A diversidade estrutural encontrada no reino vegetal oferece uma grande variedade de compostos bioactivos. Entre estes encontram-se numerosos exemplos de inibidores enzimáticos, incluindo de proteases como a do HIV (Tewtrakul *et al.*, 2006), catepsina D (Roszkowska-Jakimiec *et al.*, 2004) e SAPs (Zhang *et al.*, 2002). Estes e muitos outros casos de sucesso de inibidores naturais, juntamente com o potencial terapêutico e a aplicabilidade dos óleos essenciais a *screenings* em larga escala, sugerem a possibilidade de, desta forma, encontrar moléculas com potencial inibitório da BACE-1. Com esse objectivo, foi avaliada a actividade inibitória de dezenas de OE na enzima recombinante.

4.2.1. Avaliação do potencial inibitório dos Óleos Essenciais

No estudo inicial foram testados em ensaios individuais de actividade com a proBACE-1 recombinante, cerca de 50 óleos essenciais diferentes, alguns constituídos por mais de uma centena de compostos de baixo peso molecular.

Todas as amostras foram diluídas em DMSO para uma concentração de $90\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, e incubadas com a enzima durante 10 minutos, a 37°C , antes da leitura da actividade. A esta concentração, o óleo essencial de *Lavandula luisieri* inibiu a actividade da proBACE-1 em aproximadamente 50%, sendo a mais activa das amostras testadas (Figura 14).

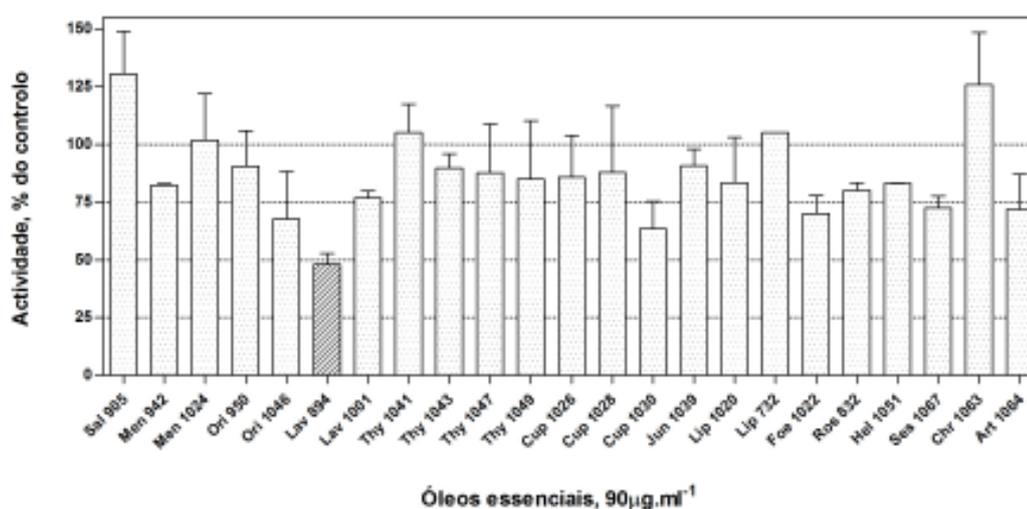


Figura 14. Screening inicial com proBACE-1. Efeito de alguns dos óleos essenciais testados na actividade da proBACE-1 recombinante ($1\mu\text{M}$). Os óleos foram testados numa concentração de $90\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, a actividade enzimática medida com $3\mu\text{M}$ do substrato fluorogénico, a 37°C e expressa como percentagem em relação ao controlo. Os controlos foram ensaiados utilizando o mesmo solvente dos óleos. As barras representam as médias \pm E.P.M de, pelo menos, duas experiências independentes. Encontram-se aqui representados os óleos de *Salvia officinalis* (Sal 905), *Mentha cervina* (Men 942), *M. x piperita* (Men 1024), *Origanum virens* (Ori 950), *O. vulgare* (Ori 1046), *Lavandula luisieri* (Lav 894), *L. angustifolia* (Lav 1001), *Thymus mastichina* (Thy 1041), *T. capitellatus* (Thy 1043), *T. zygis* subsp. *vulgaris* (Thy 1047), *T. vulgaris* (Thy 1049), *Cupressus lusitanicus* subsp. *pendula* (Cup 1026), *C. sempervirens* (Cup 1028), *C. lusitanicus* subsp. *lusitanicus* (Cup 1030), *Juniperus oxycedrus* (Jup 1039), *Lippia citriadora* (Lip 1020), *L. graveolens* (Lip 732), *Foeniculum vulgare* (Foe 1022), *Rosmarinus officinalis* (Ros 832), *Helichrysum stoechas* (Hel 1051), *Seseli tortuosum* (Ses 1067), *Chritmum maritimum* (Chr 1063) e *Artemisia crithmifolia* (Art 1064).

O OE de *L. luisieri* inibe a actividade da BACE-1

4.2.2. Inibição da BACE-1 pelo OE de *Lavandula luisieri*

O óleo essencial de *Lavandula luisieri* apresentou a maior inibição entre todos os óleos testados. Para confirmar estes resultados, os ensaios foram repetidos com outras amostras de óleos da mesma espécie, colhidas em alturas e locais diferentes e com pequenas variações na proporção dos componentes maioritários. Para as mesmas condições experimentais, as novas amostras também apresentaram a capacidade de inibir a proBACE-1, numa percentagem semelhante à reportada para a primeira amostra (Figura 15a).

Para melhor caracterizar a inibição pelo OE de *L. luisieri* e avaliar a dependência da dose, foi realizado um ensaio para a determinação do IC₅₀. Nas mesmas concentrações de enzima (1μM) e substrato (3μM) utilizadas para os ensaios de *screening* e numa gama de concentrações do OE de 1 a 1000μg.ml⁻¹, o IC₅₀ determinado foi de 121,5μg.ml⁻¹ (Figura 15b).

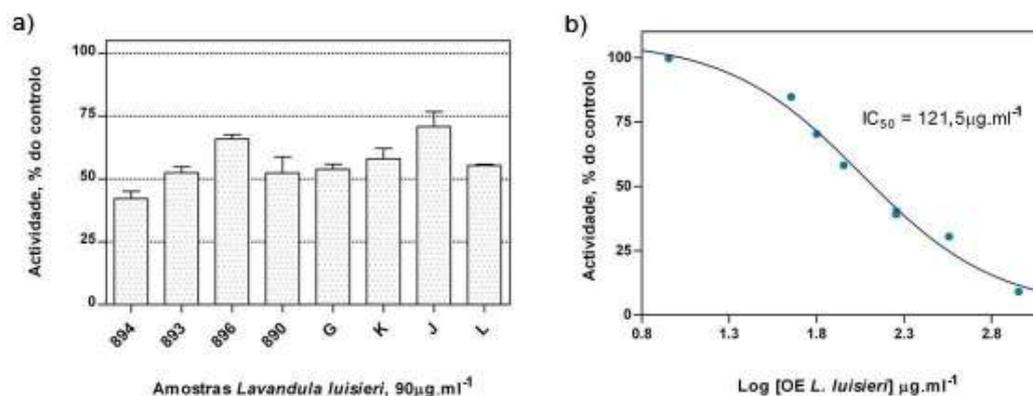


Figura 15. Inibição da proBACE-1 pelo óleo essencial de *Lavandula luisieri*. a) Efeito de diferentes amostras de óleos essenciais de *L. luisieri* colhidos em diferentes épocas e locais. Todos os óleos foram testados numa concentração de 90µg.ml⁻¹, em DMSO, após uma incubação de 10 minutos a 37°C. A actividade da proBACE-1 (1µM) na presença e ausência dos óleos em teste foi medida com o substrato fluorogénico (3µM) e expressa como percentagem relativamente ao controlo. Os números e letras utilizados para representar os diferentes óleos são os correspondentes à identificação das amostras no laboratório de origem. b) Inibição dependente da dose do OE de *Lavandula luisieri*. Este ensaio foi realizado nas mesmas condições experimentais do anterior e o IC₅₀ determinado pela equação da curva sigmoidal dose-resposta.

4.3. Estudo da actividade do OE de

***L. luisieri* em Linhas Celulares**

Geralmente, durante o processo de optimização de um potencial inibidor, e após a realização dos testes enzimáticos *in vitro*, segue-se uma etapa de ensaios celulares. Existem várias razões para que assim seja, sendo que uma das principais se prende com a avaliação da capacidade do inibidor, quando doseado na concentração apropriada, alcançar o efeito celular desejado. No caso da BACE-1, o efeito terapêutico pretendido será a diminuição da produção de A β , mas igualmente importante, uma vez que este alvo é intracelular, é avaliar a entrada do composto na célula e a ligação à enzima, uma vez no seu interior. Os ensaios celulares são também utilizados para comprovar os resultados preliminares do *screening* enzimático, uma vez que muitos deles estão sujeitos a artefactos, podendo originar falsos positivos. Um exemplo desta situação ocorre precisamente nos ensaios fluorogénicos, onde a absorção de luz ou a emissão de fluorescência pelos compostos testados pode constituir uma fonte de erro potencial. Finalmente, e não menos importante, é a possibilidade que os sistemas celulares oferecem de avaliar a toxicidade das moléculas testadas, nas concentrações inibitórias.

Para testar o óleo e eventuais compostos sinalizados foram seleccionadas duas linhas celulares, uma derivada de células de ovário de hamster chinês (CHO) e outra de um neuroblastoma humano (SHSY5Y), ambas transfectadas de forma estável com a sequência de DNA que codifica o APP *wild type*, o precursor do peptídeo β -amilóide. A sobreexpressão do APP e a acção da β - e γ -secretase

endógenas levam a que estas células produzam e secretem A β em quantidades facilmente mensuráveis.

4.3.1. O OE de *L. luisieri* diminui a produção de A β intracelular

A primeira avaliação da actividade celular do óleo essencial de *Lavandula luisieri* foi efectuada em células CHO transfectadas com APPwt (CHO-APPwt). O controlo da produção do peptídeo β -amilóide por estas células foi realizado por comparação com a mesma linha celular transfectada com o vector vazio, que não produziu níveis mensuráveis de A β .

Para os ensaios de inibição, as células foram plaqueadas em placas de 6 poços, com uma densidade de 1×10^6 células/poço. Após atingirem a confluência e aderência desejadas, as células foram incubadas durante 6h com meio fresco contendo diferentes concentrações do óleo essencial, numa gama de 10 a $180 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, ou o veículo nas condições controlo. A análise destes meios por ELISA para a determinação dos níveis de A β_{40} permitiu calcular o EC $_{50}$, o equivalente celular ou animal ao IC $_{50}$, que corresponde à concentração capaz de produzir 50% do efeito em estudo. O valor determinado foi de $86,2 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ (Figura 16).

O OE de *L. luisieri* inibe a actividade da BACE-1

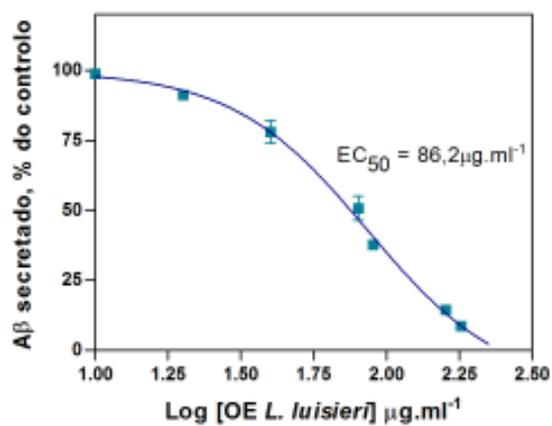


Figura 16. Inibição dependente da dose do OE de *Lavandula luisieri* em células CHO-APPwt. As células foram incubadas com diferentes concentrações de OE, em DMSO, durante 6h a 37°C, 5% CO₂. O Aβ₄₀ secretado nas diferentes condições foi medido por sandwich ELISA e expresso como percentagem relativamente ao controlo. O EC₅₀ foi determinado pela equação da curva sigmoidal dose-resposta.

**IDENTIFICAÇÃO
DO INIBIDOR
DA BACE-1
NO ÓLEO
ESSENCIAL
DE *L. LUISIERI***

5

5.1. Óleo Essencial de *Lavandula luisieri*

Lavandula luisieri (Rozeira) Riv. Mart. é uma espécie aromática endémica da Península Ibérica (Figura 17), encontrando-se particularmente na região sudoeste, razão pela qual é relativamente comum em Portugal (Sanz *et al.*, 2004). Morfologicamente semelhante a outras espécies do género *Lavandula*, nomeadamente *L. pedunculata*, apresenta-se com hábito arbustivo, de pequeno porte e floresce no início da Primavera com espigas constituídas por pequenas flores labiadas de cor violeta, envolvidas e encimadas por brácteas do mesmo tom (Garcia-Vallejo, 1992).



Figura 17. *Lavandula luisieri*, Algarve – 2003 (adaptado de Head, 2005).

Apesar desta semelhança morfológica que, por vezes, torna difícil o seu reconhecimento e colheita, as diferenças encontradas na composição do seu OE consideram-se distintas para esta espécie.

5.1.1. Composição do óleo de *L. luisieri*

O óleo essencial de *L. luisieri* é um líquido à temperatura ambiente com coloração âmbar forte e um aroma ligeiramente canforado e frutado (Lavoine-Hanneguelle *et al.*, 2004). A bibliografia científica descreve uma composição complexa (Figura 18), com a presença de compostos com estrutura monoterpênóide irregular, com núcleo ciclopentânico penta-substituído, até hoje não encontrado em mais nenhuma espécie vegetal.

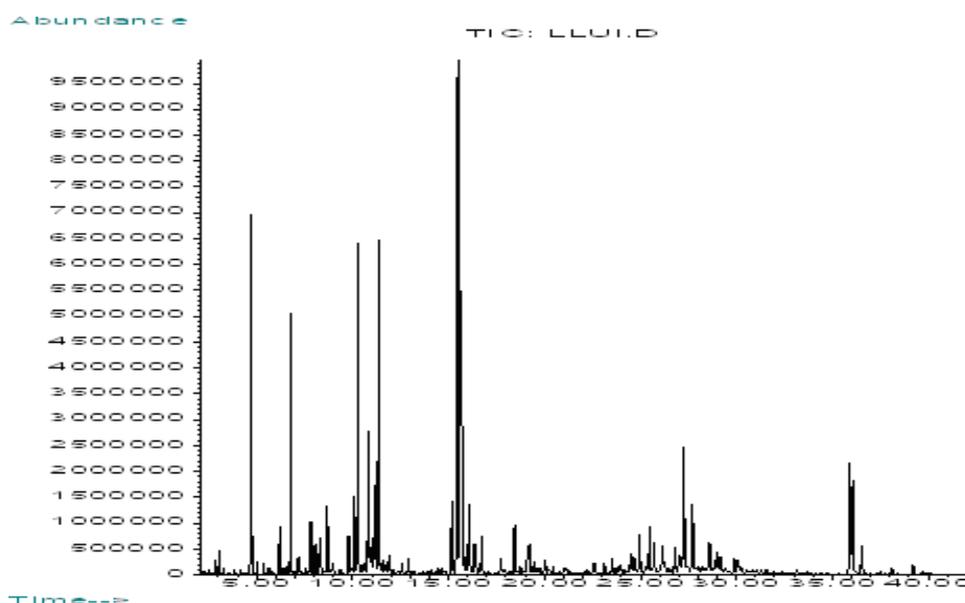


Figura 18. Cromatograma do OE de *Lavandula luisieri*. Os picos com maior área correspondem, por ordem crescente de tempo de retenção, aos compostos 3,5-dimetileno-1,4,4-trimetilciclopenteno, α -pineno, 1,8-cineol, *trans*- α -necrodol e 2,3,4,4-tetrametil-5-metileno-ciclopent-2-enona, acetato de *trans*- α -necrodilo, acetato de lavandulilo e acetato de liratilo. São ainda relevantes dois picos, na porção final do cromatograma, correspondentes a componentes ainda não identificados. (Cromatograma de corrente iônica total obtido em cromatógrafo Hewlett Packard 6890 acoplado a detector de massa Hewlett Packard 5973 e equipado com uma coluna capilar HP1).

Na realidade, alguns destes compostos apenas se encontram noutro organismo vivo, onde foram descobertos pela primeira vez, nomeadamente na secreção defensiva libertada por uma espécie de escaravelho necrófago da América do Sul, o *Nicrodes surinamensis* (Roach *et al.*, 1990). Devido a esta primeira fonte conhecida, o núcleo e respectivos compostos derivados são designados por necrodanos.

A combinação de técnicas de cromatografia gás-líquido de alta resolução, com determinação de índices de retenção para diferentes fases estacionárias, e de cromatografia gás-líquido acoplada com espectrometria de massa, bem como a utilização de bases de dados do laboratório e da bibliografia, permitiram elucidar mais de 80% da composição do óleo essencial de *L. luisieri*. Dado o potencial interesse deste óleo, conforme os resultados dos ensaios de *screening*, foram ainda analisadas diferentes amostras de OE desta espécie, obtidos de plantas colhidas em diferentes locais e datas (Tabela 3).

Tabela 3 (páginas seguintes). **Composição de vários OE de *Lavandula luisieri* provenientes de diferentes locais e datas de colheita.** O nome atribuído às amostras corresponde à identificação atribuída na base de dados do laboratório de Farmacognosia. **894** (Serro Ventoso/2003); **890** (Centro/2003); **893** (Serro Ventoso/2003); **896** (Centro/2003); **G** (Roxo/2005); **J** (Sertã/2005); **K** (Piódão/2003); **L** (Penela/2005).

Composto	IR apolar	IR polar	Porcentagem de Identificação							
			894	890	893	896	G	J	K	L
3,5-dimetileno-1,4,4-trimetilciclopenteno	928	1126	2,1	3,0	0,6	1,2	3,8	3,2	2,8	3,2
α-Pineno	931	1031	1,8	1,0	0,2	2,3	2,0	2,0	1,2	1,4
1,8-Cineol	1019	1213	3,9	3,1	1,5	18,9	10,5	1,1	3,8	1,8
3,4,4-Trimetil-2-ciclohexanona	1052	1446	1,4	0,9	0,8	1,2	1,2	0,3	1,2	0,7
cis-Óxido de linalol (THP)	1055	1438	1,4	0,8	0,4	0,8	0,9	-	0,4	0,2
trans-Óxido linalol (THF)	1069	1466	1,1	0,5	0,2	0,5	0,5	-	0,2	0,3
Linalol	1081	1542	2,7	1,1	1,6	3,1	3,2	1,8	1,6	2,0
Cânfora	1117	1513	1,8	0,8	0,6	0,9	1,5	0,4	1,4	0,7
3,4,5,5-Tetrametil-1,3-ciclopentadienocarboxaldeído	1125	1548	1,2	1,5	0,7	0,7	0,6	0,9	0,9	0,9
trans-α-Necrodol	1130	1660	6,3	6,6	7,2	8,9	8,8	3,5	6,4	8,8
C ₁₀ H ₁₆ O*	1145	1769	2,5	2,9	2,5	1,4	1,9	1,8	1,6	1,6
Lavandulol	1147	1671	0,6	0,6	0,3	0,5	0,4	-	0,3	-
1,1,2,3-Tetrametil-4-hidroximetil-2-ciclopenteno	1154	1715	2,4	2,7	2,4	2,6	2,1	1,0	2,0	2,1
2,3,4,4-Tetrametil-5-metileno-ciclopent-2-enona	1160	1643	6,1	8,2	4,2	2,8	3,3	2,5	3,6	2,7
Isômero acetato necrodilo	1259	1600	2,5	1,9	2,3	2,3	1,9	1,2	1,6	1,8
Acetato trans-α-necrodilo	1268	1591	16,6	14,4	19,4	19,5	16,1	12,0	13,5	15,8
Acetato lavandulilo	1271	1603	6,7	5,9	6,5	7,2	5,7	4,5	4,8	4,4
Acetato liratilo	1271	1653	4,9	4,6	3,2	2,5	2,9	4,1	2,1	3,2
Acetato cis-α-necrodilo	1283	1612	2,3	1,2	1,5	1,4	1,2	0,9	1,1	1,6
Acetato nerilo	1342	1720	0,9	0,9	1,1	1,6	0,7	0,8	0,6	0,9
epi-Cubebol	1478	1875	0,6	0,2	0,8	0,3	0,3	0,7	0,5	0,3
α-Selineno	1484	1708	0,7	-	0,4	0,2	0,2	0,8	1,0	0,9
Cubebol	1500	1927	0,4	0,2	0,8	0,3	0,3	0,6	0,6	0,9
δ-Cadineno	1509	1749	0,9	0,9	0,7	0,4	0,9	2,2	1,7	2,1
Selina 3,7(11)-diene	1530	1769	0,6	0,7	0,6	-	0,9	1,8	1,7	1,8

*Composição elementar obtida pelo espectro de massa

Tabela 3. (continuação)

Composto	IR apolar	IR polar	Percentagem de Identificação							
			894	890	893	896	G	J	K	L
α -Copaen-8-ol	1542	2074	0,7	0,9	0,8	0,5	0,7	2,4	1,3	2,6
Óxido cariofileno	1560	1966	0,8	0,7	0,9	0,4	0,5	0,9	0,6	1,0
Viridiflorol	1572	2068	3,6	3,4	3,3	1,2	2,3	5,1	3,5	4,0
Ledol	1584	2012	0,7	1,0	0,8	0,4	0,5	1,3	-	1,1
1- <i>epi</i> -Cubenol	1609	2049	0,6	1,1	0,6	0,2	0,3	0,8	0,6	0,5
α -Cadinol	1630	2216	0,5	-	1,6	-	0,3	-	0,8	2,5
14-norcadin-5-en-4-ona (Isómero)	1650	2264	0,5	0,2	0,4	0,2	-	0,2	1,1	0,6

Entre os componentes mais abundantes encontram-se seis monoterpenos irregulares, os álcoois *trans*- α -necrodol (**1**) e 1,1,2,3-tetrametil-4-hidroximetil-2-ciclopenteno (**2**), a cetona 2,3,4,4-tetrametil-5-metileno-ciclopent-2-enona (**3**), os ésteres acetato de *cis*- α -necrodilo (**4**) e acetato de *trans*- α -necrodilo (**5**) e o aldeído 3,4,5,5-tetrametil-1,3-ciclopentadienocarboxaldeído (**6**). As respectivas identificações fundamentaram-se nos dados apresentados na tabela 4.

Tabela 4 (páginas seguintes). **Identificação e parâmetros cromatográficos dos terpenóides de núcleo necrodano mais abundantes do OE de *L. luisieri*.** Estão representados, para cada composto, os dados laboratoriais de índices de retenção em coluna SPB-1 (apolar) e SPB-Wax (polar) e o respectivo espectro de massa, assim como a informação referenciada na bibliografia.

	IR apolar	IR polar	Espectro massa
--	--------------	-------------	----------------

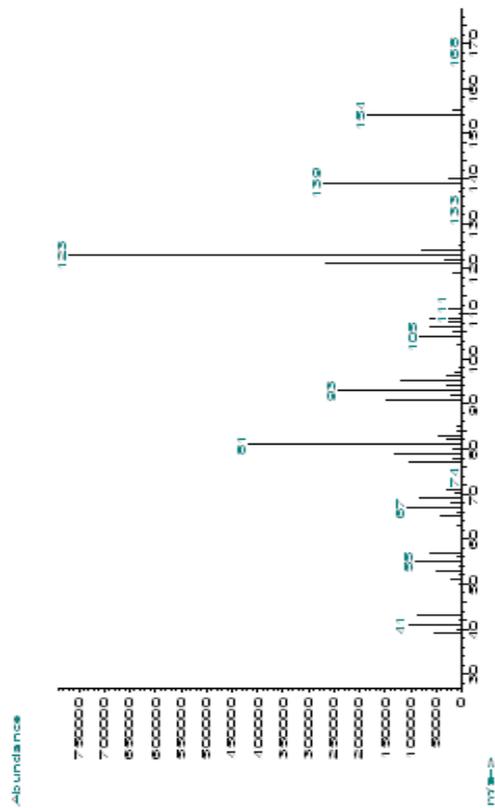


**trans-α-
Necrodol**

1130

1660

(1)



1135 **1663**

Supporte bibliográfico

(Sanz et al., 2004)

(Lavoine-Hanneguelle et al., 2004)

(García-Vallejo, 1992)

Tabela 4. (continuação)

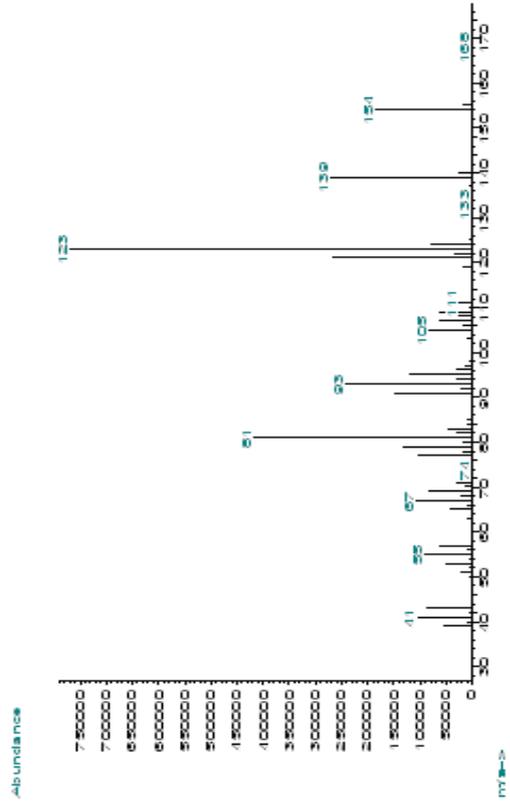
	IR apolar	IR polar	Espectro massa
<p>1,1,2,3-Tetrametil-4-hidroxi-2-ciclopenteno (2)</p> <chem>C[C@H]1C=C(C)C(O)C1</chem>	<p>1154</p>	<p>1715</p>	
<p>Suporte bibliográfico</p>	<p>-</p>	<p>(Lavoine-Hanneguelle et al., 2004)</p>	<p>(Lavoine-Hanneguelle et al., 2004) (Garcia-Vallejo, 1992)</p>

Tabela 4. (continuação)

		IR apolar	IR polar	Espectro massa
2,3,4,4-Tetrametil-5-metileno-ciclopent-2-enona	<chem>CC1=C(C)C(=O)C=C1C</chem>	1160	1643	
Suporte bibliográfico				
		1160	1643	(Baldovini et al., 2005) (Lavoine-Hanneguelle et al., 2004)

Tabela 4. (continuação)

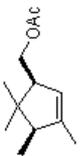
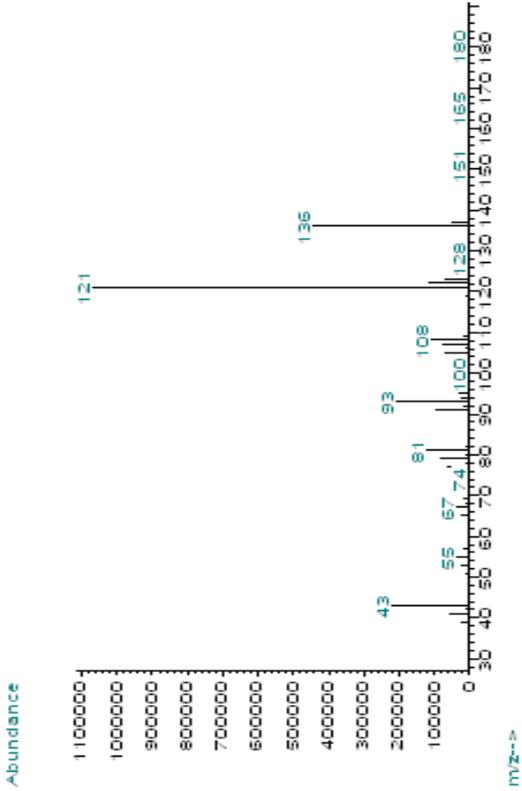
		IR		Espectro massa	
		apolar	polar		
<p>Acetato de cis- α-necrodilo</p>  <p>(4)</p>	1283	1612			
	1287	1602			
<p>Suporte bibliográfico</p>		(Sanz et al., 2004)	(Lavoine-Hanneguelle et al., 2004)		

Tabela 4. (continuação)

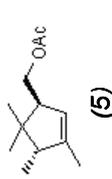
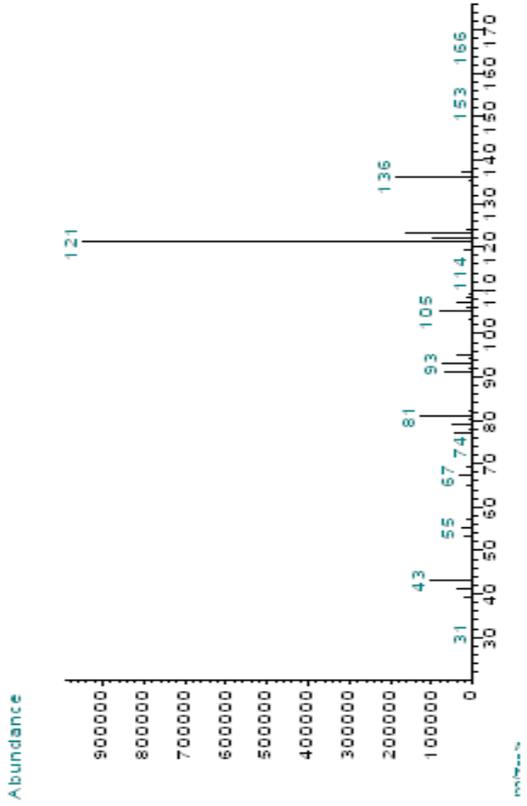
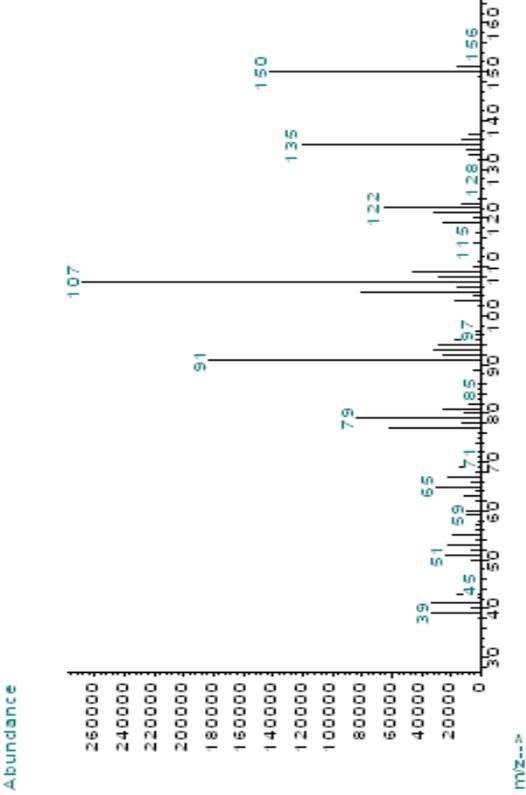
	IR apolar	IR polar	Espectro massa
<p>Acetato de <i>trans</i>-α- necrodilo</p>  <p>(5)</p>	1268	1591	
<p>Suporte bibliográfico</p>	1270	-	<p>(Sanz et al., 2004)</p> <p>(Garcia-Vallejo, 1992)</p>

Tabela 4. (continuação)

	IR apolar	IR polar	Espectro massa
<p>3,4,5,5-Tetrametil-1,3-ciclopentadieno carboxaldeído (6)</p> <chem>CC1=C(C)C(C)C1C=O</chem>	<p>1125</p>	<p>1548</p>	
<p>Suporte bibliográfico</p>	<p>1130</p>	<p>(Baldovini et al., 2005)</p>	<p>-</p>

Além destes compostos, este OE apresenta concentrações significativas de 1,8-cineol (**7**) (Figura 19), viridiflorol (**8**) (Figura 20), acetato de lavandulilo (**9**) e lavandulol (**10**) (Figura 21) e linalol (**11**) (Figura 22). A elevada abundância relativa de ésteres e a quase ausência de cânfora e fenchona são outras das características peculiares do óleo de *Lavandula luisieri* (Garcia-Vallejo, 1992).

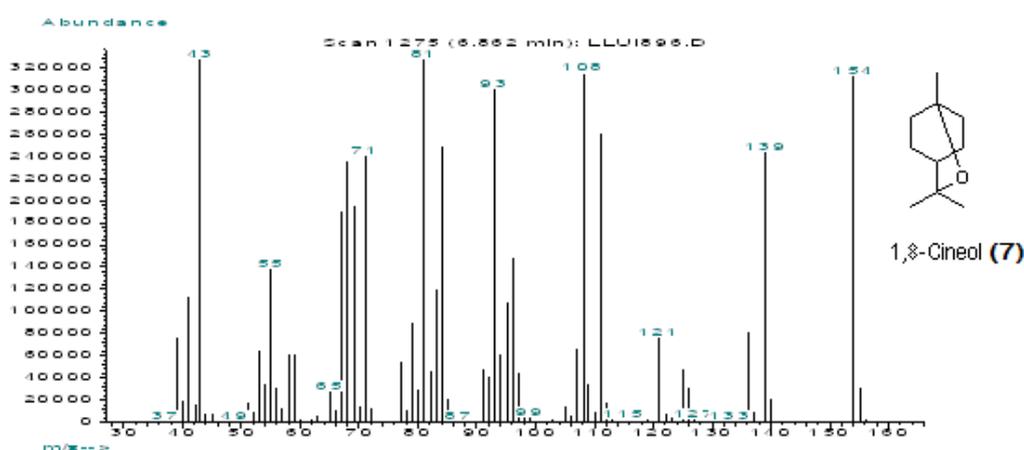


Figura 19. Espectro de massa (70 eV) e estrutura química do 1,8-cineol.

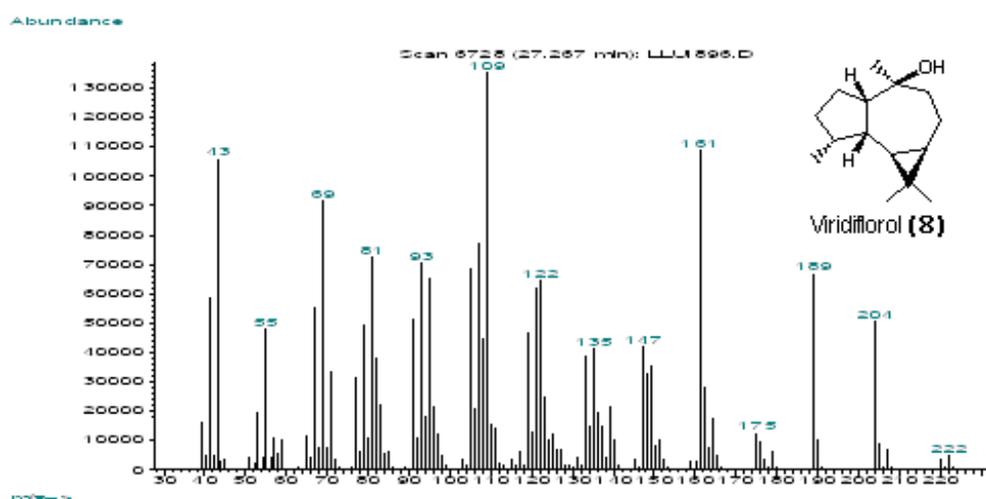


Figura 20. Espectro de massa (70 eV) e estrutura química do viridiflorol.

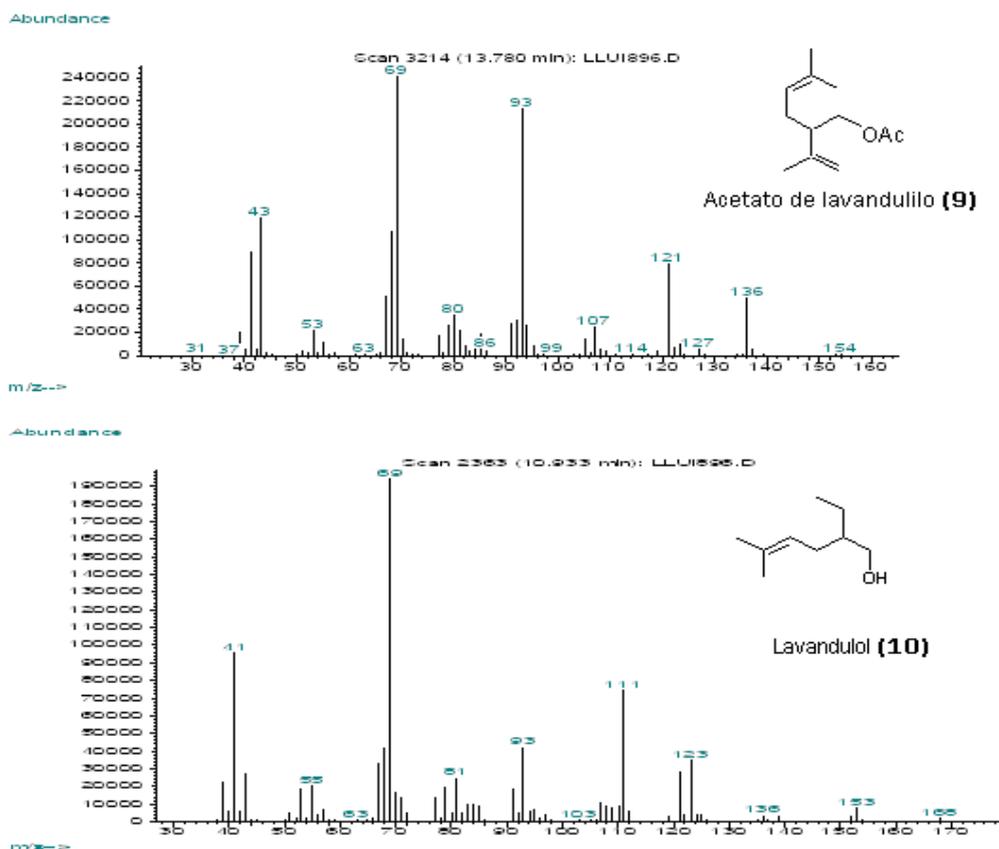


Figura 21. Espectros de massa (70 eV) e estrutura química do acetato de lavandulilo e respectivo álcool lavandulol.

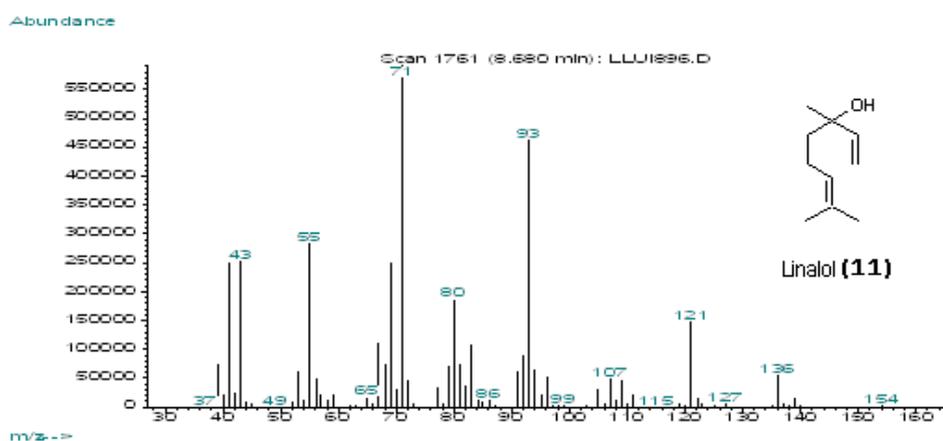


Figura 22. Espectro de massa e estrutura química do linalol.

5.1.2. Fraccionamento do OE

A complexidade geral destes óleos dificultou a identificação de constituintes minoritários, sobretudo os compostos pouco comuns de núcleo necrodano. O fraccionamento do óleo essencial por cromatografia preparativa em coluna, e ulterior isolamento de alguns compostos por cromatografia em camada fina, para além de indispensável para o esclarecimento da actividade biológica, contribuiu decisivamente para a elucidação de algumas estruturas.

No fraccionamento em coluna, o gradiente de polaridade das fases móveis utilizadas permitiu a obtenção sequencial de fracções enriquecidas em compostos com a mesma função química. Por eluição com *n*-pentano, isolaram-se fracções enriquecidas em hidrocarbonetos monoterpénicos e sesquiterpénicos, que representavam uma elevada percentagem da composição total. As eluições ulteriores foram realizadas com fases binárias de *n*-pentano / éter dietílico em gradiente descontínuo de polaridade, por incremento da percentagem de éter dietílico, permitindo a recuperação sequencial de fracções, maioritariamente constituídas por ésteres, óxidos, aldeídos e cetonas e, finalmente, álcoois (Tabela 5).

Tabela 5 (páginas seguintes). **Composição das fracções do OE de *Lavandula luisieri*.** As diferentes fracções foram eluídas com diferentes misturas de *n*-pentano:éter, encontrando-se apenas representadas as de composição química distinta e caracterizadas por um composto maioritário diferente, razão pela qual a numeração das fracções não é sequencial.

Identificação do inibidor da BACE-1 no OE de *L. luisieri*

<i>Fracção</i>	<i>IR apolar</i>	<i>IR polar</i>	<i>Composto</i>	<i>%</i>
# 1.1	928	1127	3,5-dimetileno-1,4,4-trimetilciclopenteno	12,4
	930	1028	α-Pineno	12,9
	943	1073	Canfeno	0,7
	970	1115	β -Pineno	3,5
	980	1159	Mirceno	0,7
	1006	1151	Δ -3-Careno	5,2
	1009	1268	<i>o</i> -Cimeno	0,5
	1012	1271	<i>p</i> -Cimeno	1,3
	1020	1203	Limoneno	3,0
	1024	1231	<i>E</i> - β -Ocimeno	1,6
	1361	1476	Ciclosativeno	2,0
	1371	1489	α -Copaeno	2,2
	1410	1588	<i>E</i> -cariofileno	3,9
	1450	1634	Aloaromadendreno	1,2
	1467	1697	Germacreno D	0,6
	1473	1712	β -Selineno	2,9
	1483	1706	α -Selineno	3,5
	1487	1720	α -Muuroleno	0,8
	1499	1747	γ -Cadineno	2,4
	1502	1822	<i>cis</i> -Calameleno	3,4
1509	1747	δ -Cadineno	6,7	
1521	1903	α -Calacoreno	1,3	
1530	1767	Selina-3,7(11)-dieno	4,5	
# 2.2	1081	1391	Nonanal	0,7
	1104	1486	α -Canfolenal	0,5
	1239	1554	Acetato linalilo	0,4
	1259	1598	Isómero do acetato necrodilo	1,9
	1269	1590	Acetato <i>trans</i>-α-necrodilo	55,5
	1272	1601	Acetato lavandulilo	14,2
	1272	1651	Acetato liratilo	0,8
	1283	1610	Acetato <i>cis</i>-α-necrodilo	5,8
1342	1718	Acetato nerilo	1,2	

Tabela 5. (continuação)

Fracção	IR apolar	IR polar	Composto	%
# 2.4	999	1324	4-Propil-4-ciclopenten-1,3-diona	1,5
	1020	1213	1,8-Cineol	52,4
	1127	1545	3,4,5,5-Tetrametil-1,3-ciclopentadienocarboxaldeído	0,3
	1136	1562	Pinocarvona	1,4
	1166	1620	Mirtenal	0,5
	1259	1598	Isómero acetato necrodilo	2,2
	1267	1588	Acetato <i>trans</i> - α -necrodilo	2,9
	1271	1601	Acetato lavandulilo	2,2
	1271	1652	Acetato liratilo	5,4
	1342	1719	Acetato nerilo	0,2
	1359	-	<i>trans</i> - β -Damascenona	1,0
1622	2043	Cubenol	1,9	
# 2.9	1054	1444	3,4,4-Trimetil-2-ciclohexanona	14,4
	1083	1540	Linalol	0,6
	1119	1511	Cânfora	1,4
	1159	1593	4-Terpineol	1,3
	1541	2074	α -Copaen-8-ol	1,9
	1560	1966	Óxido cariofileno	1,5
	1595	2045	1,10-di-<i>epi</i>-Cubenol	34,8
	1607	2050	<i>epi</i>-Cubenol	12,3
1618	-	β -Copaen-4- α -ol	1,0	
# 3.1	1084	1541	Linalol	37,9
	1106	1572	Nopinona	0,6
	1121	1645	<i>trans</i> -Pinocarveol	1,9
	1161	1642	2,3,4,4-Tetrametil-5-metileno-ciclopent-2-enona	28,6
	1220	1703	Óxido <i>trans</i> -Piperitona	0,5
	1571	2068	Viridiflorol	2,2
	1584	2013	Ledol	4,5
	1606	-	1- <i>epi</i> -Cubenol	0,2
	1617	2262	β -Copaen-4- α -ol	3,9
	1617	2172	<i>t</i> -Muurolol	0,4
	1617	2157	<i>t</i> -Cadinol	6,1
1715	-	α -Ciperona	0,6	

Tabela 5. (continuação)

Fracção	IR apolar	IR polar	Composto	%
# 3.2	1083	1539	Linalol	2,2
	1123	1645	cis-Verbenol	0,3
	1131	1657	trans-α-Necrodol	23,9
	1148	1668	Lavandulol	4,2
	1160	1641	2,3,4,4-Tetrametil-5-metileno-ciclopent-2-enona	3,9
	1480	1875	<i>epi</i> -Cubebol	2,0
	1554	2108	Espatuleno	0,9
	1572	2069	Viridiflorol	32,2
	1584	2013	Ledol	4,7
	1618	2261	β -Copaen-4- α -ol	0,9
	1618	2156	<i>t</i> -Cadinol	2,4
1618	2172	<i>t</i> -Muurolol	4,4	
#3.3	1133	1658	trans-α-Necrodol	87,1
	1147	1698	Borneol	0,4
	1148	1668	Lavandulol	0,6
	1155	1712	1,1,2,3-Tetrametil-4-hidroximetil-2-ciclopenteno	0,8
	1161	-	2,3,4,4-Tetrametil-5-metileno-ciclopent-2-enona	0,8
	1500	1926	Cubebol	1,3
	1572	2068	Viridiflorol	2,4
# 3.4	1056	1436	cis-Oxido linalol (THP)	6,8
	1086	1530	2,3,4,5-Tetrametil-2-ciclopenten-1-ona	0,9
	1132	1658	trans-α-Necrodol	33,1
	1139	-	Isopulegol	1,4
	1146	1767	C ₁₀ H ₁₆ O*	2,3
	1148	1668	Lavandulol	0,6
	1155	1713	1,1,2,3-Tetrametil-4-hidroximetil-2-ciclopenteno	18,2
	1158	1840	<i>p</i> -Cimen-8-ol	1,8
	1170	1689	α -Terpineol	0,5
	1177	1781	Mirtenol	0,9
	1196	1825	<i>trans</i> -Carveol	0,5
	1572	2068	Viridiflorol	1,2
	1625	2212	β -Eudesmol	0,5
	1650	2266	14-norcadin-5-en-4-ona (Isómero)	18,3

Tabela 5. (continuação)

Fracção	IR apolar	IR polar	Composto	%
# 3.5	1056	1436	<i>cis</i> -Óxido linalol (THP)	5,7
	1071	1464	<i>trans</i> -Óxido linalol (THF)	4,2
	1086	1530	2,3,4,5-Tetrametil-2-ciclopenten-1-ona	3,6
	1131	1657	<i>trans</i> - α -Necrodol	2,1
	1144	1720	<i>p</i> -Menta-1,5-dien-8-ol	1,5
	1146	1767	C₁₀H₁₆O*	22,0
	1155	1712	1,1,2,3-Tetrametil-4-hidroximetil-2-ciclopenteno	24,2
	1158	1840	<i>p</i> -Cimen-8-ol	5,6
	1170	1687	α -Terpineol	4,9
	1178	1695	Verbenona	4,4
	1622	2184	α -Muurolol	0,8
	1625	2212	β -Eudesmol	0,4
	1631	2216	α -Cadinol	6,0
	1650	2266	14-norcadin-5-en-4-ona (Isómero)	6,2
# 3.6	1070	1464	<i>trans</i>-Óxido linalol (THF)	12,6
	1086	1530	2,3,4,5-Tetrametil-2-ciclopenten-1-ona	1,9
	1126	1668	<i>trans</i> -Verbenol	1,8
	1131	1657	<i>trans</i> - α -Necrodol	0,8
	1146	1768	C₁₀H₁₆O*	33,7
	1155	1713	1,1,2,3-Tetrametil-4-hidroximetil-2-ciclopenteno	5,6
	1158	1840	<i>p</i> -Cimen-8-ol	1,6
	1170	1687	α -Terpineol	7,1
	1177	1695	Verbenona	5,4
	1565	2059	Globulol	1,2
	1621	2184	α -Muurolol	2,3
	1630	2216	α-Cadinol	18,4
# 3.7	1071	1464	<i>trans</i> -Óxido linalol (THF)	5,5
	1127	1667	<i>trans</i>-Verbenol	10,1
	1145	1662	δ -Terpineol	3,8
	1147	1767	C ₁₀ H ₁₆ O*	4,3
	1565	2059	Globulol	5,1
1630	2216	α-Cadinol	58,7	

* Composição elementar obtida pelo espectro de massa

Após este fracionamento e subsequente análise das fracções, resultaram identificados 94 compostos, muitos deles minoritários ou mesmo vestigiais no óleo essencial. Ficou estabelecida a composição mais detalhada alguma vez descrita para o óleo essencial de *L. luisieri* (Tabela 6). Os compostos identificados estão listados por ordem de eluição na coluna SPB-1 e representam 87,9% da composição total do óleo essencial. Predominam os monoterpenos oxigenados (61,8%), seguindo-se os sesquiterpenos oxigenados (12,4%), os hidrocarbonetos sesquiterpénicos (7,1%) e os hidrocarbonetos monoterpénicos (6,4%). Os componentes maioritários são derivados do necrodano, o álcool *trans*- α -necrodol (8,4%) e o seu éster, acetato de *trans*- α -necrodilo (16,0%).

Tabela 6. Composição detalhada do OE de *Lavandula luisieri*. Os compostos encontram-se listados pela ordem de eluição na coluna SPB-1 (apolar). Estão representados, para cada composto, os dados laboratoriais de índices de retenção em coluna apolar SPB-1 (*IR apolar Exp*) e polar SupelcoWax10 (*IR polar Exp*) e os respectivos índices de retenção de referência (*IR apolar Ref* e *IR polar Ref*).

<i>IR apolar Exp</i>	<i>IR apolar Ref</i>	<i>IR polar Exp</i>	<i>IR polar Ref</i>	Composto	%
928	925 ^a	1127	1125 ^b	3,5-Dimetileno-1,4,4-trimetilciclopenteno	2,5
930	930 ^{lnj}	1028	1028 ^{lnj}	α -Pinoeno	2,3
943	943 ^{lnj}	1073	1073 ^{lnj}	Canfeno	0,2
946	945 ^c	n.d	-	Verbeneno	0,1
959	959 ^c	1441	1445 ^d	1-Octen-3-ol	0,2
965	965 ^{lnj}	1126	1126 ^{lnj}	Sabineno	0,1
970	970 ^{lnj}	1115	1115 ^{lnj}	β -Pinoeno	0,1
980	980 ^{lnj}	1159	1159 ^{lnj}	Mirceno	t
1004	1005 ^c	1151	1152 ^d	δ -3-Careno	0,1
1006	1009 ^c	n.d	-	α -Terpineno	t

Tabela 6. (continuação)

<i>IR apolar Exp</i>	<i>IR apolar Ref</i>	<i>IR polar Exp</i>	<i>IR polar Ref</i>	<i>Composto</i>	<i>%</i>
1012	1011 ^{lnj}	1271	1271 ^{lnj}	<i>p</i> -Cimeno	0,1
1020	1020 ^{lnj}	1203	1203 ^{lnj}	Limoneno*	0,1
1020	1020 ^{lnj}	1213	1203 ^{lnj}	1,8-Cineol*	2,1
1024	1024 ^{lnj}	1231	1231 ^{lnj}	Z- β -Ocimeno	0,4
1035	1035 ^{lnj}	1250	1250 ^{lnj}	<i>E</i> - β -Ocimeno	<i>t</i>
1046	1047 ^{lnj}	1248	1248 ^{lnj}	γ -Terpineno	0,1
1054	#	1444	1452 ^b	3,4,4-Trimetil-2-ciclohexanona	0,9
1056	1056 ^c	1436	1439 ^e	<i>cis</i> -Óxido linalol (THP)	0,6
1062	-	n.d	-	<i>Desconhecido</i>	0,2
1070	1072 ^c	1464	1460 ^e	<i>trans</i> -Óxido linalol (THF)	0,3
1071	1076 ^c	n.d	-	α -Terpinoleno	0,2
1081	1081 ^{lnj}	1391	1391 ^{lnj}	Nonanal*	<i>t</i>
1083	1083 ^{lnj}	1540	1540 ^{lnj}	Linalol*	3,1
1086	#	1530	1554 ^b	2,3,4,5-Tetrametil-2-ciclopenten-1-ona	0,2
1104	1104 ^c	1486	1503 ^f	α -Canfolenal	0,1
1106	1105 ^c	1572	1565 ^e	Nopinona	0,1
1119	1119 ^{lnj}	1511	1511 ^{lnj}	Cânfora	1,4
1121	1121 ^{lnj}	1645	1645 ^{lnj}	<i>trans</i> -Pinocarveol	0,2
1123	1123 ^{lnj}	1645	1648 ^{lnj}	<i>cis</i> -Verbenol	<i>t</i>
1125	1130 ^a	1548	#	3,4,5,5-Tetrametil-1,3-ciclopentadienocarboxaldeído ⁽¹⁾	1,5
1127	1126 ^c	1667	1680 ^f	<i>trans</i> -Verbenol	<i>t</i>
1131	1135 ^g	1657	1663 ^b	<i>trans</i> - α -Necrodol ⁽²⁾	8,4
1136	1135 ^c	1562	1545 ^e	Pinocarvona	0,2
1139	1137 ^c	n.d	-	Isopulegol	<i>t</i>

Tabela 6. (continuação)

<i>IR apolar Exp</i>	<i>IR apolar Ref</i>	<i>IR polar Exp</i>	<i>IR polar Ref</i>	Composto	%
1144	1141 ^c	n.d	-	p-Menta-1,5-dien-8-ol	t
1146	-	1767	-	C ₁₀ H ₁₆ O **	2,3
1147	1147 ^{lnj}	1698	1698 ^{lnj}	Borneol *	t
1148	1150 ^c	1668	1677 ^e	Lavandulol *	0,6
1155	#	1712	1713 ^b	1,1,2,3-Tetrametil-4-hidroxi-2-ciclopenteno ⁽³⁾	2,4
1158	1158 ^c	1804	1814 ^d	p-Cimeno-8-ol *	0,1
1159	1159 ^{lnj}	1593	1595 ^{lnj}	Terpineno-4-ol *	0,5
1161	1160 ^a	1642	1655 ^b	2,3,4,4-Tetrametil-5-metileno-ciclopent-2-enona ⁽⁴⁾	5,2
1166	1166 ^{lnj}	1620	1620 ^{lnj}	Mirtenal	t
1170	1170 ^{lnj}	1689	1689 ^{lnj}	α-Terpineol	0,2
1176	1176 ^{lnj}	1781	1781 ^{lnj}	Mirtenol	t
1178	1177 ^c	1695	1698 ^d	Verbenona	0,7
1196	1196 ^{lnj}	1825	1825 ^{lnj}	<i>trans</i> -Carveol	t
1220	1230 ^c	n.d	-	Óxido <i>trans</i> -Piperitona	t
1239	1239 ^{lnj}	1554	1554 ^{lnj}	Acetato linalilo	t
1259	#	1598	1618 ^b	Isômero acetato necrodilo	1,9
1269	1270 ^g	1590	1602 ^b	Acetato <i>trans</i> -α-necrodilo * ⁽⁵⁾	16,0
1271	1273 ^c	1601	1594 ^d	Acetato lavandulilo *	6,1
1272	1276 ^g	1651	#	Acetato liratilo *	3,5
1273	-	1663	-	<i>Desconhecido</i>	0,2
1279	1269 ^a	2235	2231 ^b	Ácido 3,4,5,5-tetrametil-1,3-ciclopentadienocarboxílico ⁽⁶⁾	0,6
1283	1287 ^g	1610	#	Acetato <i>cis</i> -α-necrodilo ⁽⁷⁾	1,2
1290	-	1640	-	<i>Desconhecido</i>	0,7
1299	-	1628	-	<i>Desconhecido</i>	1,0

Tabela 6. (continuação)

<i>IR apolar Exp</i>	<i>IR apolar Ref</i>	<i>IR polar Exp</i>	<i>IR polar Ref</i>	<i>Composto</i>	<i>%</i>
1342	1342 ^{Inj}	1719	1719 ^{Inj}	Acetato de nerilo	1,0
1359	1357 ^c	n.d	-	<i>E</i> - β -Damascenona	<i>t</i>
1360	-	1840	-	<i>Desconhecido</i>	0,7
1361	1360 ^c	1476	1473 ^d	Ciclosativeno	0,4
1371	1369 ^c	1489	1488 ^d	α -Copaeno	0,4
1382	1396 ^d	n.d	-	Sativeno	<i>t</i>
1386	1390 ^c	1540	1546 ^e	β -Cubebeno	0,3
1410	1410 ^{Inj}	1588	1588 ^{Inj}	<i>E</i> -Caryophyllene	0,6
1450	1449 ^c	1634	1639 ^e	Aloaromadendreno	0,4
1467	1467 ^c	1697	1705 ^e	Germacreno D	<i>t</i>
1473	1472 ^c	1712	1711 ^e	β -Selineno	0,4
1475	1469 ^c	n.d	-	<i>epi</i> -Biclosesquifelandreno	0,2
1480	1482 ^c	1875	-	<i>epi</i> -Cubebol	0,5
1483	1480 ^c	1706	1724 ^d	α -Selineno	0,8
1487	1487 ^c	1720	1714 ^e	α -Muuroleno	0,2
1497	-	n.d	-	<i>Desconhecido</i>	0,4
1499	1498 ^c	1747	1752 ^e	γ -Cadineno	0,8
1500	1496 ^c	1926	1964 ^f	Cubebol	<i>t</i>
1502	1492 ^c	1822	1826 ^d	<i>cis</i> -Calameleno	0,6
1509	1508 ^c	1747	1749 ^e	δ -Cadineno	0,6
1521	1520 ^c	1903	1906 ^d	α -Calacoreno	0,4
1523	-	1942	-	<i>Desconhecido</i>	0,9
1529	-	2039	-	<i>Desconhecido</i>	0,3
1530	1531 ^c	1767	#	Selina-3,7(11)-diene	1,0

Identificação do inibidor da BACE-1 no OE de *L. luisieri*

Tabela 6. (continuação)

<i>IR apolar Exp</i>	<i>IR apolar Ref</i>	<i>IR polar Exp</i>	<i>IR polar Ref</i>	Composto	%
1541	1555 ^d	2074	#	α -Copaen-8-ol	1,2
1545	-	1966	-	<i>Desconhecido</i>	0,3
1546	1550 ^c	1914	1915 ^d	Palustrol	0,2
1554	1553 ^c	2108	2129 ^e	Espatuleno	0,3
1558	-	2028	-	<i>Desconhecido</i>	0,2
1560	1560 ^{lnj}	1966	1966 ^{lnj}	Óxido cariofileno	0,7
1565	1563 ^c	2059	2061 ^d	Globulol	t
1566	-	2212	-	<i>Desconhecido</i>	0,4
1571	-	2002	-	<i>Desconhecido</i>	0,3
1572	1572 ^c	2069	2104 ^f	Viridiflorol	3,3
1581	1582 ^c	2020	2015 ^e	Epoxido humuleno	0,3
1583	-	2162	-	<i>Desconhecido</i>	0,4
1584	1582 ^c	2013	2016 ^d	Ledol	0,9
1595	1591 ^c	2045	2074 ^f	1,10-di- <i>epi</i> -Cubenol	t
1607	1608 ^c	n.d	-	<i>epi</i> -Cubenol	t
1617	1615 ^c	2172	2178 ^d	<i>t</i> -Muurolol	0,5
1617	1616 ^c	2156	2165 ^d	<i>t</i> -Cadinol	1,4
1621	1619 ^c	n.d	-	α -Muurolol	0,6
1622	1616 ^c	2043	2074 ^f	Cubenol	t
1625	1622 ^c	n.d	-	β -Eudesmol	t
1625	1630 ^c	2222	2222 ^d	Intermedeol	t
1630	1628 ^c	2216	2221 ^d	α -Cadinol	2,0
1650	1653 ^g	2266	#	14-norcadin-5-en-4-ona (Isómero)	0,5
1715	1713 ^c	n.d	-	α -Cyperona	t

Tabela 6. (continuação)

<i>IR apolar Exp</i>	<i>IR apolar Ref</i>	<i>IR polar Exp</i>	<i>IR polar Ref</i>	<i>Composto</i>	<i>%</i>
1813	-	2499		<i>Desconhecido</i>	1,4
1818	-	2499		<i>Desconhecido</i>	1,1
				Monoterpenos hidrocarbonados	6,4
				Monoterpenos oxigenados	61,8
				Sesquiterpenos hidrocarbonados	7,1
				Sesquiterpenos oxigenados	12,4
				Outros compostos	0,2
				Total identificado	87,9

t: vestígios; *n.d.*: não determinado

inj. IR determinado no laboratório com o composto autêntico

#. Índices de retenção propostos pela primeira vez

*. Quantificação baseada nas áreas dos picos em coluna SupelcoWax10

**. Composição elemental inferida pelo espectro de massa

a. Baldovini *et al.*, 2005

b. Lavoine-Hannequelle *et al.*, 2004

c. Lindstrom *et al.*, 2009

d. El-Sayed, 2009

e. Acree *et al.*, 2004

f. Weyerstahl *et al.*, 1998

g. Sanz *et al.*, 2004

(1), (4), (6). Identificação baseada na literatura (a)

(2), (3). Identificação baseada na literatura (Garcia-Vallejo, 1992; b; g)

(5). Identificação baseada na literatura (a; b)

(7). Identificação baseada na literatura (b; g)

Ainda assim, não foi possível identificar alguns componentes, como são os casos dos compostos com pares de índices de retenção (em colunas SPB1 de

polidimetilsiloxano e SupelcoWax10 de polietilenoglicol) de 1146/1767 e 1259/1600. Para o primeiro há fortes indicações de se poder tratar do teresantalol, enquanto para o segundo concluímos tratar-se de um isómero do acetato de necrodilo. Foram também detectados dois compostos com índices de retenção na coluna SPB1, de 1813 e 1818, co-eluído na coluna SupelcoWax10, com índice de retenção de 2499. Nas fracções, dado o enriquecimento dos componentes minoritários, revelaram-se mais 5 compostos que não tinham sido detectados nas análises sobre o óleo. A identificação ou confirmação de alguns destes constituintes demanda a utilização de outros recursos e, por não serem relevantes para este trabalho reservaram-se para ocasião futura.

5.2. Avaliação da Actividade Inibitória dos

Componentes do OE

Como se encontra acima descrito, foram preparadas fracções do óleo essencial de *Lavandula luisieri*, cada uma delas constituída por 10-20 compostos, um deles sendo um dos componentes maioritários do OE. As fracções foram avaliadas quanto ao seu efeito sobre a actividade enzimática, permitindo, assim, antever a actividade de cada um dos compostos maioritários do OE e avaliar qual ou quais dos seus constituintes são os responsáveis por esta inibição da BACE-1.

5.2.1. Efeito das fracções do OE de *L. luisieri* na actividade enzimática

Nesta fase, o efeito das principais fracções na actividade enzimática foi avaliado não só na proBACE-1 recombinante, como também na forma activa, para determinar eventuais diferenças no potencial inibitório e como modo de aproximação à condição *in vivo*, onde a forma existente sofre a clivagem do segmento pró. Os resultados obtidos com a proBACE-1 e com a BACE-1 activada pela digestão com clostripaína foram similares, representando-se apenas os primeiros (Figura 23a). Com vista a uma melhor avaliação da potência das fracções em teste foram ensaiados paralelamente o inibidor comercial Stat-Val e o óleo essencial total.

Das fracções ensaiadas, a que apresentou maior actividade foi a identificada como #3.1, com uma inibição média de cerca de 40%, inferior à inibição apresentada pelo OE total na mesma concentração ($90\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Nestas condições, o OE de *Lavandula luisieri* apresentou um valor de inibição semelhante ao do inibidor comercial da BACE a 500 nM.

A fracção mais activa foi depois testada numa gama de concentrações de 1 a $1000\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, obtendo-se um valor de IC_{50} de $282,6\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Figura 23b).

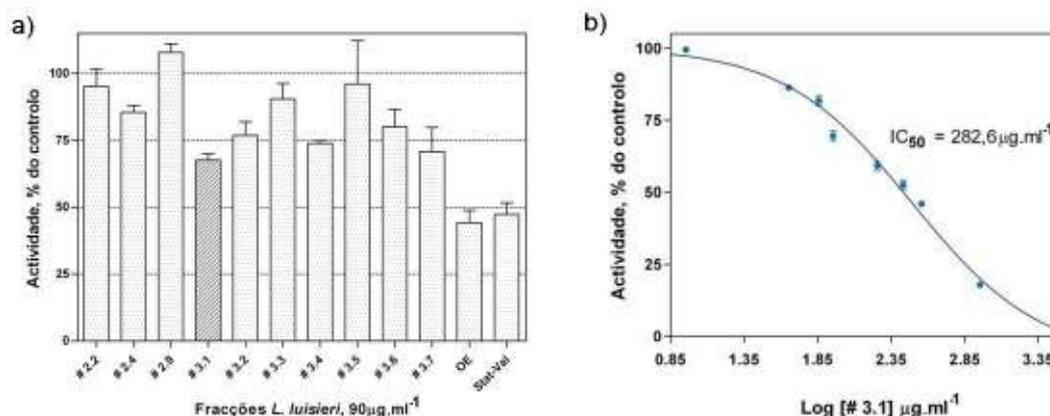


Figura 23. Inibição da proBACE-1 por diferentes fracções do óleo essencial de *Lavandula luisieri*. **a)** Efeito das principais fracções do OE. Todas as fracções e o OE total (OE) foram testados numa concentração de $90\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, em DMSO, após uma incubação de 10 minutos a 37°C . O inibidor comercial (Stat-Val) foi testado numa concentração de 500nM, nas mesmas condições. A actividade da proBACE-1 ($1\mu\text{M}$) na presença e ausência dos óleos em teste foi medida com o substrato fluorogénico ($3\mu\text{M}$) e expressa como percentagem relativamente ao controlo. A identificação das diferentes fracções corresponde à ordem da eluição com diferentes proporções de uma mistura *n*-pentano:éter dietílico no fraccionamento em coluna. **b)** Inibição dependente da dose da fracção #3.1 do OE de *Lavandula luisieri*. Este ensaio foi realizado nas mesmas condições experimentais do anterior e o IC_{50} determinado pela equação da curva sigmoidal dose-resposta.

5.2.2. Efeito das fracções do OE na produção de A β intracelular

Tal como na avaliação da actividade do óleo total, também as diferentes fracções foram testadas na linha celular CHO-APPwt, de acordo com o mesmo procedimento experimental.

Os resultados obtidos foram similares aos dos ensaios enzimáticos no que respeita à fracção mais activa (Figura 24a), que inibiu a produção de A β_{40} em cerca de 70%. Esta fracção (#3.1) foi então ensaiada em diferentes concentrações, numa gama de 45 a 180 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, para a determinação do EC₅₀ (Figura 24b). Nas células CHO-APPwt, o valor de EC₅₀ determinado para a fracção #3.1 foi de 94,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

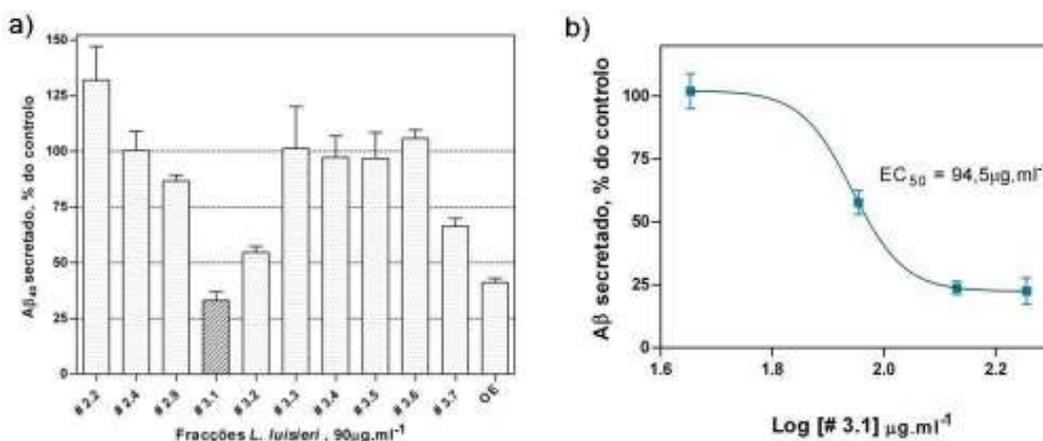


Figura 24. Inibição celular da produção de A β_{40} por diferentes fracções do OE de *L. luisieri*.

a) Efeito das principais fracções do OE em células CHO-APPwt. Todas as fracções e o OE total (OE) foram testados numa concentração de 90 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, em DMSO. O A β_{40} secretado na presença e ausência do óleo e fracções em teste foi medido por ELISA e expresso como percentagem relativamente ao controlo. **b)** Inibição dependente da dose da fracção #3.1 do OE de *L. luisieri*, em células CHO-APPwt. Este ensaio foi realizado nas mesmas condições experimentais do anterior e o EC₅₀ determinado pela equação da curva sigmoidal dose-resposta. Ambos os gráficos representam seis experiências independentes.

5.2.3. Isolamento e caracterização dos constituintes maioritários da fracção mais activa

Devido à complexidade da composição de extractos e de outros isolados de origem vegetal, o isolamento de compostos activos é uma tarefa laboriosa de fraccionamentos sequenciais orientada por ensaios de actividade biológica. Os ensaios de avaliação de actividade inibitória das fracções do óleo de *L. luisieri* apontaram a fracção #3.1 como a mais activa. Esta fracção é constituída maioritariamente por linalol (**11**) e pela cetona monoterpénica, 2,3,4,4-tetrametil-5-metileno-ciclopent-2-enona (**3**) (Figura 25).

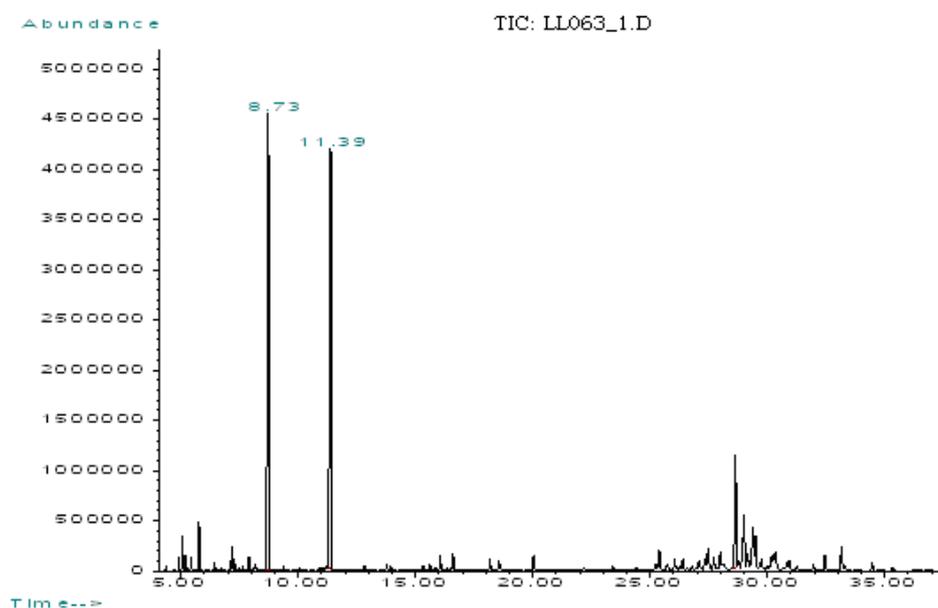


Figura 25. Cromatograma da fracção #3.1 do OE de *Lavandula luisieri*. Os 2 picos com maior área correspondem aos compostos linalol e 2,3,4,4-tetrametil-5-metileno-ciclopent-2-enona, por esta ordem. Cromatograma de corrente iónica total, obtido em cromatógrafo Hewlett Packard 6890 acoplado a detector de massa Hewlett Packard 5973 e equipado com uma coluna capilar HP1.

Com o objectivo de esclarecer a contribuição de cada um dos compostos maioritários para a inibição apresentada pela fracção, assim como para caracterizar essa mesma inibição, procedeu-se à sua obtenção em elevado grau de pureza, quer por síntese química, quer por purificação a partir da fracção original.

Para o isolamento dos compostos a partir da amostra natural, a fracção #3.1 foi submetida a cromatografia em camada fina preparativa. As bandas cromatográficas, correspondentes aos dois componentes maioritários, foram destacadas por raspagem da placa cromatográfica, e seguidamente os compostos foram recuperados por dissolução em acetona com ulterior centrifugação.

As identidades dos compostos isolados foram confirmadas pelos respectivos parâmetros de retenção cromatográfica e pelos espectros de massa. Estes dados foram também validados por confrontação com os adquiridos sobre os mesmos compostos, mas de origem sintética (Figura 26a, 26b).

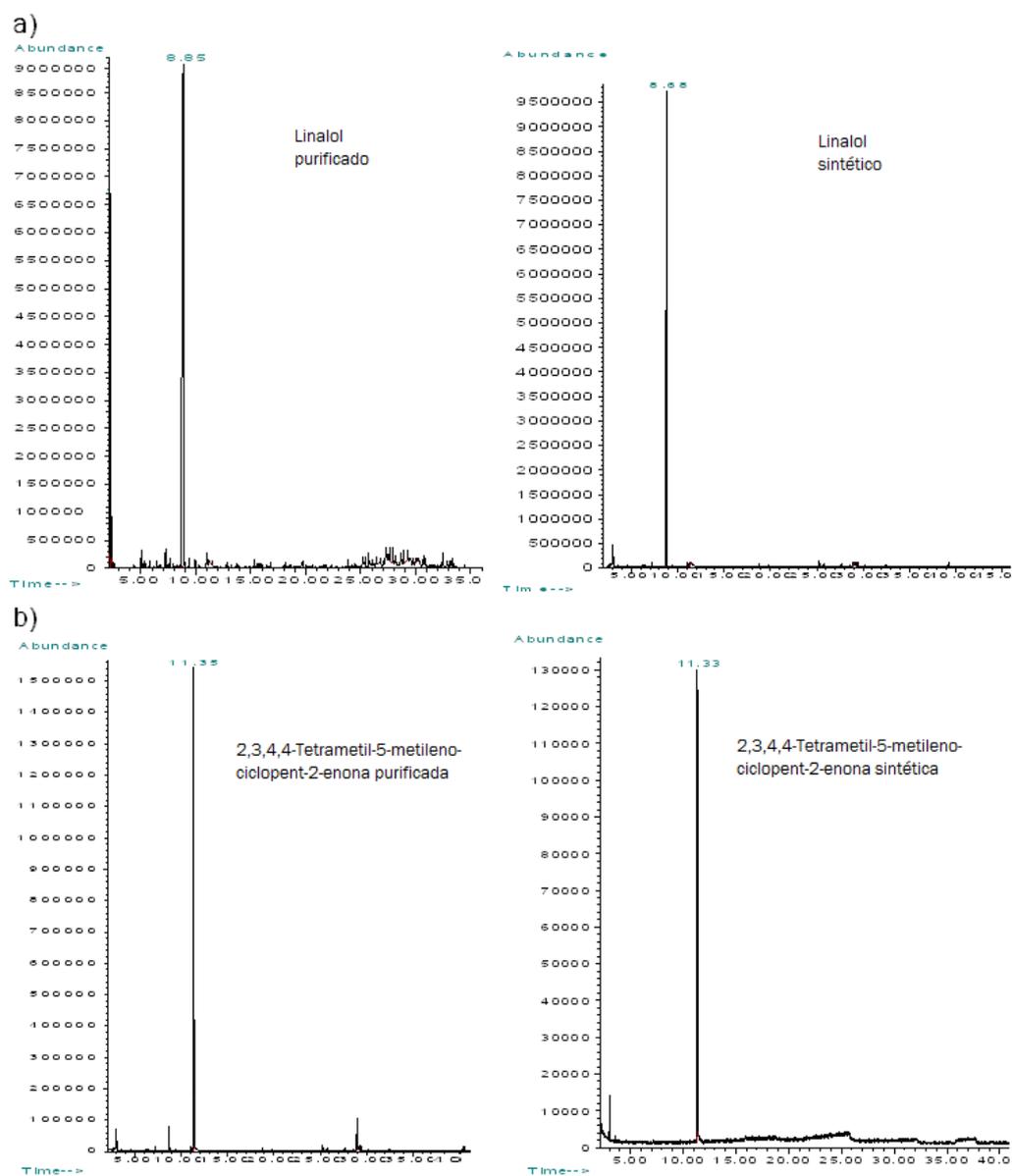


Figura 26. a) Cromatogramas do linalol isolado e de linalol sintético. b) Cromatogramas da 2,3,4,4-tetrametil-5-metileno-ciclopent-2-enona isolada do óleo essencial e sintética. Não obstante vestígios de linalol e de *T*-cadinol, a 2,3,4,4-tetrametil-5-metileno-ciclopent-2-enona foi isolada com um grau de pureza superior a 99%.

5.2.4. O principal responsável pela actividade do OE é a 2,3,4,4-tetrametil-5-metileno-ciclopent-2-enona

Os ensaios de avaliação de actividade inibitória dos compostos isolados sobre a BACE-1 revelaram a inibição pela 2,3,4,4-tetrametil-5-metileno-ciclopent-2-enona (**3**). O linalol parece não afectar a actividade da enzima nas concentrações testadas. Não se detectaram diferenças na inibição enzimática da forma pró e após a activação com clostripaína. Para além disso, a 2,3,4,4-tetrametil-5-metileno-ciclopent-2-enona sintética e a de origem natural apresentaram resultados similares, quer em termos de potência, quer em termos de modo de inibição.

Para a determinação da constante (K_i^{app}) e tipo de inibição, testaram-se várias concentrações de 2,3,4,4-tetrametil-5-metileno-ciclopent-2-enona (0 – 300 μ M) com diferentes concentrações de substrato (3 – 7,5 μ M), analisando-se os resultados obtidos por métodos de regressão não linear com o *software* GraphPad Prism®. Pelas representações de Lineaweaver-Burk (Figura 27a) e de Dixon (Figura 27b), foi possível determinar um K_i^{app} de 415,8 μ M, para uma inibição do tipo competitivo. Nestes ensaios, a proBACE-1 recombinante (1 μ M) foi incubada com cada uma das concentrações de 2,3,4,4-tetrametil-5-metileno-ciclopent-2-enona durante 10 minutos a 37°C e a actividade medida após a adição das diferentes concentrações de substrato.

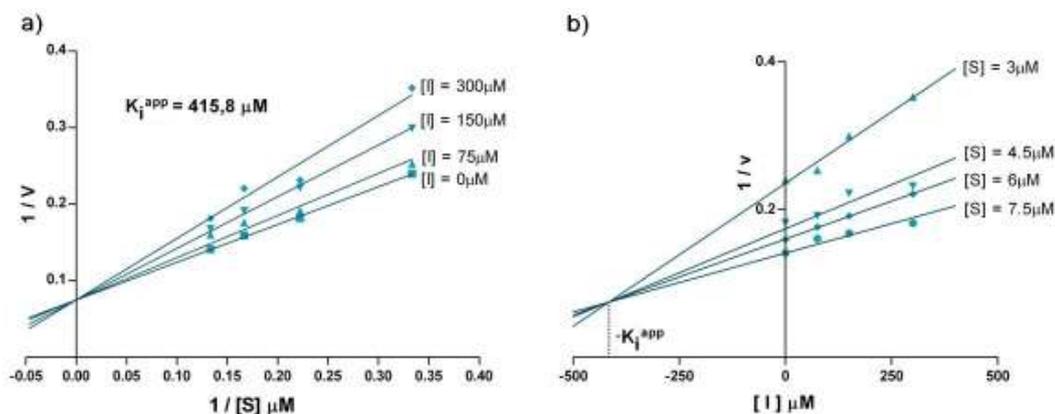


Figura 27. Inibição da proBACE-1 recombinante pelo composto 2,3,4,4-tetrametil-5-metileno-ciclopent-2-enona. **a)** Representação gráfica de Lineweaver-Burk. A constante de inibição aparente determinada por regressão não linear foi de 415,8 μ M, o que está de acordo com o método linear representado. **b)** Representação gráfica de Dixon. Tal como o anterior, este método de linearização confirma o ajuste dos dados a um modelo de inibição competitiva. Ambos os gráficos representam experiências com diferentes concentrações de 2,3,4,4-tetrametil-5-metileno-ciclopent-2-enona **[I]** e substrato **[S]**. A velocidade inicial (**V₀**) foi calculada pelo declive inicial da recta do aumento de fluorescência resultante da clivagem do substrato ao longo do tempo, em unidades arbitrárias de fluorescência (**RFU**).

5.2.5. Quantificação e caracterização da inibição celular

Após a confirmação da actividade do OE e da fracção #3.1 numa linha celular, os ensaios seguintes tiveram como objectivo avaliar o potencial inibitório da 2,3,4,4-tetrametil-5-metileno-ciclopent-2-enona responsável pelo efeito nos ensaios enzimáticos, assim como a caracterização dessa inibição, desta feita, em duas linhas celulares distintas.

Mais uma vez, e à semelhança do que acontecia nos ensaios com BACE-1 purificada, o linalol isolado não apresenta um efeito inibitório significativo em

nenhuma das linhas celulares estudadas. Quer nas células CHO-APPwt, quer nas SHSY5Y-APPwt, a 2,3,4,4-tetrametil-5-metileno-ciclopent-2-enona é a principal responsável pela actividade inibitória, com um EC_{50} de $72,8\mu\text{M}$ (Figura 28a) e $217,4\mu\text{M}$ (Figura 28b), respectivamente.

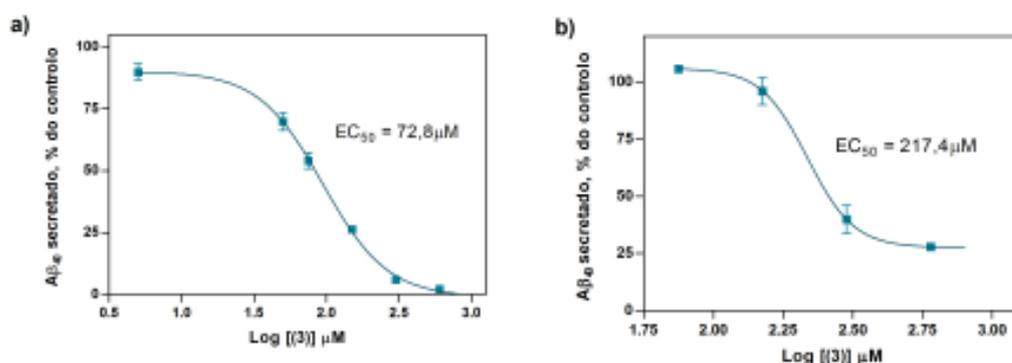


Figura 28. Curvas dose-resposta da 2,3,4,4-tetrametil-5-metileno-ciclopent-2-enona (3) purificada. a) Inibição da produção de $A\beta_{40}$ em células CHO-APPwt. As células foram incubadas durante 6h com diferentes concentrações (5 a $600\mu\text{M}$) de 2,3,4,4-tetrametil-5-metileno-ciclopent-2-enona purificada e o $A\beta_{40}$ secretado foi medido por sandwich ELISA e expresso como percentagem relativamente ao controlo. **b)** Inibição da produção de $A\beta_{40}$ em células SHSY5Y-APPwt. As células foram incubadas durante 16h com diferentes concentrações (5 a $600\mu\text{M}$) de 2,3,4,4-tetrametil-5-metileno-ciclopent-2-enona purificada e o $A\beta_{40}$ secretado foi medido por sandwich ELISA e expresso como percentagem relativamente ao controlo. O EC_{50} foi determinado pela equação da curva sigmoide dose-resposta. Ambos os gráficos representam três experiências independentes.

No entanto, ao contrário do observado nos ensaios enzimáticos envolvendo a proteína purificada, os resultados nas linhas celulares apresentaram uma diferença de potência entre a 2,3,4,4-tetrametil-5-metileno-ciclopent-2-enona purificada e a obtida por síntese, sendo a primeira significativamente mais activa. Foi ainda possível observar que, para cada concentração testada, o efeito inibitório do composto sintético aumentou de

forma modesta (aproximadamente 10%) pela mistura com uma pequena concentração de linalol (Figura 29).

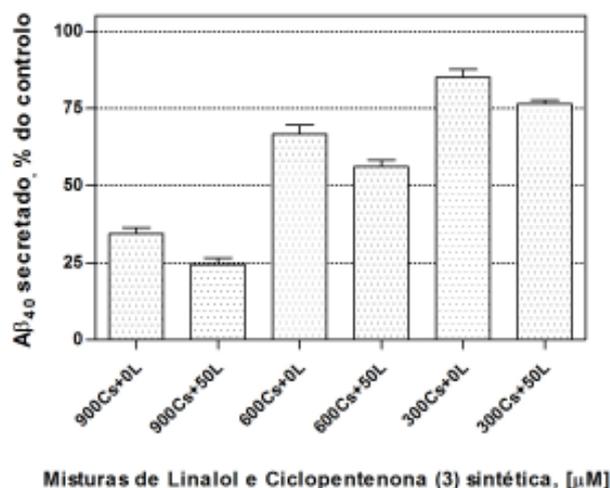


Figura 29. Potenciação do efeito inibitório de 2,3,4,4-tetrametil-5-metileno-ciclopent-2-enona (3) sintética pela adição de linalol em células CHO-APPwt. Para as 3 concentrações da 2,3,4,4-tetrametil-5-metileno-ciclopent-2-enona sintética (Cs) testadas (900, 600 e 300 μ M), a inibição da produção de A β ₄₀ foi aumentada pela adição de 50 μ M de linalol (L). Ambas as diferenças (entre as diferentes concentrações de 2,3,4,4-tetrametil-5-metileno-ciclopent-2-enona e, para cada uma delas, com e sem adição de linalol) são significativas. O A β ₄₀ secretado para o meio de cultura após 6h de incubação com as diferentes misturas foi medido por sandwich ELISA. As barras representam as médias \pm E.P.M de, pelo menos, três experiências independentes.

5.2.6. A 2,3,4,4-tetrametil-5-metileno-ciclopent-2-enona não altera significativamente a viabilidade celular

Uma das vantagens da utilização dos ensaios celulares é a avaliação da toxicidade e do efeito na viabilidade celular pelos compostos em teste. Os óleos essenciais já são usados desde a antiguidade com relativa segurança, apesar de

muitos dos seus constituintes apresentarem um potencial tóxico elevado em determinadas concentrações. De forma a avaliar a eventual toxicidade e segurança de utilização do composto activo, foi determinada a viabilidade celular numa gama de concentrações próxima da inibitória, quer nas células CHO-APPwt (Figura 30a), quer nas células SHSY5Y-APPwt (Figura 30b). No caso das primeiras, não foi aparente um efeito significativo na viabilidade celular, medida com o corante vermelho neutro, sendo superior a 90% da apresentada pelas células tratadas com o veículo. Já no caso das SHSY5Y-APPwt, sujeitas a um maior tempo de incubação e ao teste de exclusão do azul tripan, as maiores concentrações testadas parecem ter sido responsáveis pela morte celular de cerca de 25% das células plaqueadas.

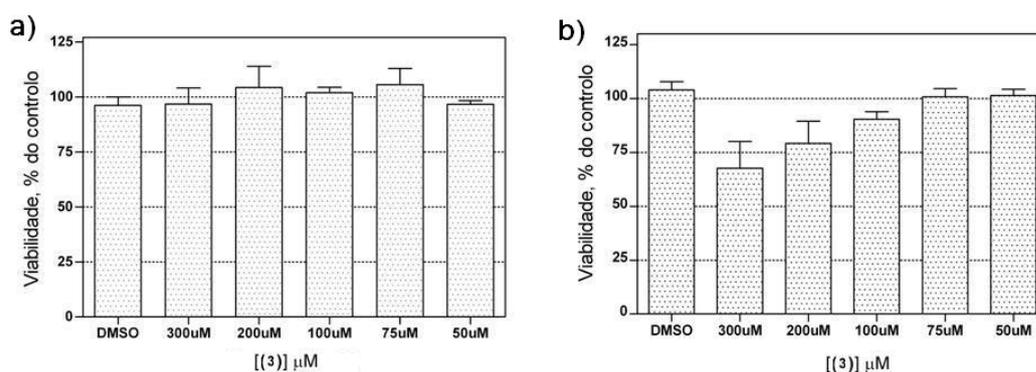


Figura 30. Efeito da 2,3,4,4-tetrametil-5-metileno-ciclopent-2-enona (3) na viabilidade celular.

a) Efeito na viabilidade das células CHO-APPwt. A morte celular foi avaliada após a incubação durante 6h com as diferentes concentrações da ciclopentenona. **b)** Efeito na viabilidade das células SHSY5Y-APPwt. A morte celular foi avaliada após a incubação durante 16h com as diferentes concentrações de 2,3,4,4-tetrametil-5-metileno-ciclopent-2-enona. Em ambas a experiências a gama de concentrações usada foi de 50 a 300μM e as barras representam a média ± E.P.M de três experiências independentes. Estes testes foram realizados no seguimento de todos os ensaios de inibição de modo a descartar a hipótese da redução dos níveis de Aβ₄₀ se dever à morte celular e não à inibição da enzima alvo, considerando-se apenas os resultados e as concentrações em que a viabilidade não foi afectada.

5.2.7. A BACE-1 é um alvo intracelular da 2,3,4,4-tetrametil-5-metileno-ciclopent-2-enona

Dependendo da natureza do alvo molecular e dos ensaios celulares à disposição, alguns testes podem ser realizados para determinar se o fenótipo celular observado (neste caso, a diminuição da produção de A β) é consistente com o mecanismo baseado na inibição da enzima alvo. Se a administração celular de um composto resulta na inibição da enzima alvo na célula, devemos esperar um aumento do substrato e uma diminuição do produto da catálise dentro da célula (Copeland, 2005). Para comprovar o efeito directo da 2,3,4,4-tetrametil-5-metileno-ciclopent-2-enona (**3**) na BACE-1 intracelular, avaliou-se a redução dos níveis de sAPP β , uma espécie que resulta directamente da clivagem pela β -secretase. Através da análise por *western blotting* com o anticorpo anti-sAPP β , foi possível observar um decréscimo significativo destes níveis no meio de cultura, em concordância com a redução dos níveis de A β observados por ELISA (Figura 31).

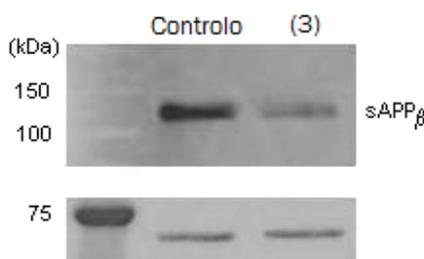


Figura 31. Redução dos níveis de sAPP β secretado pelas células CHO-APPwt. A concentração de 2,3,4,4-tetrametil-5-metileno-ciclopent-2-enona (**3**) usada corresponde ao EC₅₀ determinado. Os meios de cultura referentes ao controlo e à incubação com o inibidor foram concentrados e normalizados para o teor de proteína total, sendo depois analisados por SDS-PAGE (10%) e *western blot* com o anticorpo anti-sAPP β . Esta imagem é representativa de quatro experiências independentes. Na parte inferior encontra-se representada a mesma membrana corada com Ponceau S, como controlo do carregamento de proteína.

5.3. Potencial Inibitório sobre Outras Proteases Aspárticas

Além da potência e da afinidade, outro parâmetro importante na optimização de inibidores enzimáticos é a selectividade de um determinado composto para a enzima alvo. Por razões óbvias não é possível medir a afinidade do inibidor contra todas as proteínas humanas. Em vez disso, a escolha de alvos alternativos é baseada no conhecimento das semelhanças estruturais e mecanísticas com a enzima que se deseja inibir (Copeland, 2005).

Neste caso em concreto, tendo como alvo a BACE-1, os inibidores foram ensaiados contra outras proteases aspárticas humanas, devido à semelhança na estrutura do local activo e no mecanismo de acção entre elas, como são exemplos a pepsina, catepsina D e renina. Adicionalmente, o composto inibidor foi também testado noutras proteases envolvidas em diferentes patologias com relevância clínica, como a Sap-2 de *Candida albicans* e as plasmepsinas II e IV de *Plasmodium falciparum*. Para cada uma das proteases referidas foram realizados ensaios de inibição com a 2,3,4,4-tetrametil-5-metileno-ciclopent-2-enona (**3**). Para a determinação da constante de inibição aparente (K_i^{app}) e tipo de inibição utilizaram-se ensaios de actividade com o substrato fluorogénico (MCA)Lys-Lys-Pro-Ala-Glu-Phe-Phe-Ala-Leu-Lys(DNP), que contém a sequência de clivagem optimizada para a generalidade das proteases aspárticas (Dunn *et al.*, 1986). As diferentes concentrações do inibidor, de enzimas e de substrato foram escolhidas de acordo com ensaios preliminares e com os parâmetros cinéticos de cada uma das proteases. As várias enzimas foram pré-incubadas com as várias concentrações de 2,3,4,4-tetrametil-5-metileno-ciclopent-2-enona durante

10min a 37°C e a actividade medida após a adição das diferentes concentrações de substrato. A 2,3,4,4-tetrametil-5-metileno-ciclopent-2-enona apresentou diferentes potências inibitórias para cada uma das enzimas, sendo que, apenas no caso da renina não foi possível observar nenhum efeito inibitório nos ensaios realizados (Tabela 7).

Tabela 7. Constantes de inibição aparente (K_i^{app}) de proteases aspárticas para a 2,3,4,4-tetrametil-5-metileno-ciclopent-2-enona. As constantes foram determinadas por tratamento dos dados dos ensaios de actividade com os softwares GraphPad Prism® e Sigma Plot®, sendo que os resultados representam a média de, pelo menos, duas experiências independentes.

<i>Proteases aspárticas</i>	K_i^{app} (μM)
Catepsina D	30,8
Pepsina	100,4
Plasmepsina II	376,3
Plasmepsina IV	39,4
Sap-2	438,5

**INIBIÇÃO EM
MODELO ANIMAL
DA DOENÇA DE
ALZHEIMER**

6

6.1. Estudos de Inibição em Ratinhos Transgênicos 3xTg-AD

O uso de modelos animais tornou-se uma parte integrante da avaliação de fármacos, precedendo a sua aplicação em ensaios clínicos em humanos. Estes modelos são usados para confirmar o efeito *in vivo*, definir a penetração dos agentes terapêuticos, as relações dose-resposta e os eventuais efeitos tóxicos associados não só a uma administração crónica, como também ao possível efeito em muitos outros alvos celulares presentes neste sistema complexo.

Uma vez que a BACE-1 se localiza no cérebro, um eventual inibidor só apresentará potencial terapêutico para a doença de Alzheimer se tiver a capacidade de atravessar a barreira hemato-encefálica e produzir uma redução sustentada dos níveis de A β cerebrais. Esta avaliação é possível em modelos animais da DA, como o ratinho transgênico 3xTg-AD (Oddo *et al.*, 2003), que mimetiza muitos dos aspectos críticos da neuropatologia. Com 4 meses de idade estes animais apresentam já uma acumulação intraneuronal de A β no hipocampo, córtex e amígdala, podendo observar-se algumas alterações comportamentais e défice de atenção. Os depósitos extracelulares de A β começam a surgir por volta dos 6 meses, primeiro na forma de placas difusas, que se vão tornando progressivamente mais densas com o avançar da idade e acompanhadas pelo início da patologia neurofibrilar associada à hiperfosforilação da proteína tau (Billings *et al.*, 2005).

A administração de fármacos pode fazer-se por várias vias alternativas, cada uma delas com diferentes vantagens e desvantagens, sendo que as características dos compostos a administrar e do próprio alvo molecular são determinantes para esta escolha. Uma das vias de administração pela qual o interesse tem aumentado nos últimos anos é a intranasal, uma via não invasiva e relativamente indolor. A mucosa nasal apresenta uma grande superfície disponível para a absorção, possibilitando um rápido início de acção e uma distribuição privilegiada para o sistema nervoso central, evitando também o efeito de primeira passagem. Uma grande variedade de moléculas pode ser administrada desta forma, incluindo algumas de peso molecular elevado, particularmente na presença de facilitadores da penetração. A localização cerebral do alvo molecular e a volatilidade das amostras em estudo que as torna candidatas ideais a esta via de administração, justificam a escolha da mesma para os ensaios realizados.

6.1.1. Diminuição da produção de A β cerebral pelo OE e compostos activos

Com o objectivo de avaliar a capacidade de penetração da barreira hemato-encefálica e da redução dos níveis de A β *in vivo*, foram administrados a ratinhos 3xTg-AD, por via intranasal, o óleo total, a fracção #3.1 e a 2,3,4,4-tetrametil-5-metileno-ciclopent-2-enona (**3**) (Figura 32). A dose utilizada para o teste do OE e fracção foi de 32mg.Kg⁻¹.dia⁻¹. No caso da 2,3,4,4-tetrametil-5-metileno-ciclopent-2-enona, uma vez que os ensaios animais requeriam volumes relativamente grandes da solução teste e dada a dificuldade de purificar quantidades significativas do composto a partir da sua fonte natural, apenas se testou a amostra sintética. No entanto, após os resultados obtidos nos ensaios

celulares, e dada a limitação do volume possível de administrar a estes animais, escolheu-se ensaiar a 2,3,4,4-tetrametil-5-metileno-ciclopent-2-enona sintética adicionada de uma pequena proporção de linalol (**11**), já que parece aumentar a sua potência inibitória. Assim, a dose final administrada neste teste foi de $128\text{mg.Kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$, uma mistura de 96mg.Kg^{-1} da cetona com 32mg.Kg^{-1} de linalol. Em todos os 3 ensaios observou-se uma redução significativa nos níveis de $A\beta_{40}$ cerebrais, representando uma inibição média de aproximadamente 25%, sem sinais visíveis de toxicidade.

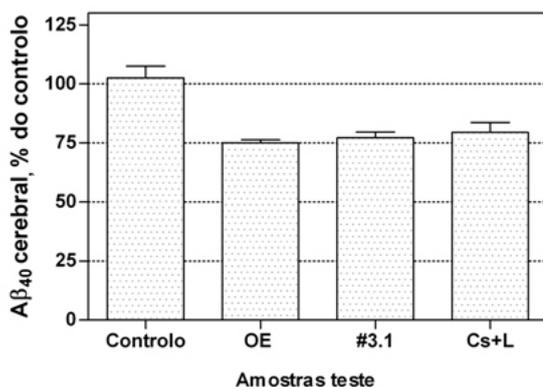


Figura 32. Ensaio de inibição em ratinhos 3xTg-AD de 4-5 meses de idade. As amostras com potencial inibitório foram administradas uma vez por dia, durante 4 dias consecutivos. Os cérebros foram homogeneizados em 2% SDS (fracção solúvel) e 70% ácido fórmico (fracção insolúvel), normalizados para o teor de proteína total e analisados por sandwich ELISA para quantificação do $A\beta_{40}$. O gráfico representa os níveis de $A\beta$ solúveis, uma vez que a fracção insolúvel foi praticamente indetectável para todas as condições. Cada experiência foi repetida com, pelo menos, 6 animais independentes, utilizando-se como controlo a administração intranasal de uma solução 0,9% NaCl. As barras representam média \pm E.P.M. (**OE**) Óleo essencial; (**#3.1**) Fracção #3.1; (**Cs+L**) Mistura de 2,3,4,4-tetrametil-5-metileno-ciclopent-2-enona sintética com linalol.

DISCUSSÃO
GERAL

7

De acordo com a teoria da cascata amilóide, a deposição e acumulação do peptídeo A β resultante do processamento do APP é o evento central no desenvolvimento da doença de Alzheimer (Hardy, 1997; Citron, 2000; Annaert *et al.*, 2002). Deste modo, as 3 secretases envolvidas neste processo representam potenciais alvos terapêuticos, que têm sido objecto de diversos estudos nos últimos anos.

Apesar de ter sido a última a ser identificada e ainda existirem dúvidas quanto à verdadeira estrutura e funcionamento do complexo enzimático, estratégias de *screening* revelaram já uma quantidade substancial de inibidores da γ -secretase, relativamente potentes e efectivos em modelos celulares e animais. Entre os exemplos de algumas destas moléculas já testadas *in vivo* com efeitos promissores encontram-se um composto dipeptídico conhecido como DAPT, a sulfonamida BMS-299897, o análogo benzodiazepínico LY-411575 e a benzolactama LY-450139. De todos eles apenas este último avançou para ensaios clínicos em humanos, com resultados preliminares favoráveis (Wolfe, 2008). Um dos maiores problemas quando se considera a utilização destes inibidores é o seu potencial efeito tóxico, que tem limitado muito os ensaios em humanos. Hoje conhecem-se muitos outros substratos da γ -secretase para além do APP, muitos deles envolvidos em importantes vias de sinalização celular, como os receptores Notch, ErbB-4 e CD44, entre muitos outros. Na ausência de actividade desta secretase, os ratos morrem durante a embriogénese, e se ocorrer na idade adulta surgem problemas na hematopoiese e maturação de timócitos, causando imunossupressão (Sisodia *et al.*, 2001). Além disso, a inibição da γ -secretase resulta na acumulação do fragmento C99, resultante da clivagem pela β -secretase, que parece ter efeitos neurotóxicos em culturas celulares, levantando a hipótese que o mesmo se passe *in vivo* (Dewachter *et al.*,

2002). Uma possível forma de solucionar este problema pode passar pela inibição parcial da γ -secretase, que limite a quantidade de $A\beta$ produzido sem grande interferência na clivagem de outros substratos membranares. Esta eventual janela terapêutica necessita de confirmação experimental, o que pode vir a ser facilitado pelo conhecimento crescente da bioquímica do complexo proteico, assim como pelo desenvolvimento de métodos de ensaio *in vitro*, não celulares, que utilizem os componentes activos purificados. Resultados preliminares com alguns anti-inflamatórios não esteróides (AINEs) apontam para uma alternativa de modulação da γ -secretase que apenas afecta o processamento do APP e não origina acumulação dos produtos de clivagem da β - e α -secretase, podendo assim reduzir eventuais efeitos secundários. O mecanismo de acção parece estar relacionado com um efeito alostérico capaz de alterar a selectividade e locais de proteólise do substrato. Estes fármacos conseguem reduzir a produção de $A\beta_{42}$, a forma mais neurotóxica e a eventual iniciadora na patogénese da DA, favorecendo a produção de formas mais pequenas e solúveis de $A\beta$. Um destes fármacos, o R-flurbiprofeno, que reduz selectivamente a produção de $A\beta_{42}$, encontra-se já em ensaios clínicos de fase III (Wolfe, 2008).

A activação da α -secretase tem sido apontada por alguns como uma outra alternativa terapêutica a ter em consideração, uma vez que parece existir competição entre a α - e a β -secretase para o substrato APP. Aumentar a actividade da α -secretase favorece a clivagem do APP em produtos solúveis, não tóxicos e que parecem ainda desempenhar um efeito neuroprotector, evitando em simultâneo a formação de $A\beta_{42}$ (Christensen, 2007). Do ponto de vista farmacológico, a activação directa de uma enzima representa um desafio, mas existem já algumas evidências sobre fármacos que parecem activar

indirectamente esta secretase (Golde *et al.*, 2001). Estudos epidemiológicos revelaram uma correlação entre os níveis de colesterol e a DA, em concordância com o facto da presença do alelo $\epsilon 4$ da apolipoproteína E representar um factor de risco para esta doença. Assim, níveis elevados de colesterol parecem favorecer a clivagem pela β -secretase em detrimento da α -secretase, verificando-se o contrário quando os níveis são reduzidos. Experiências recentes em modelos animais e estudos retrospectivos em humanos tratados com fármacos antidislipidémicos como as estatinas mostraram um efeito positivo a nível da diminuição da formação de $A\beta$ (Dominguez *et al.*, 2002). Por outro lado, surgiram também alguns estudos onde esta correlação não se verifica, e o facto de não existirem ensaios prospectivos da aplicação destes fármacos para a DA, não torna aconselhável a sua utilização para este fim (Selkoe *et al.*, 2003). Vários outros agentes como certos agonistas muscarínicos, serotonina, glutamato, estrogénios e alguns polifenóis foram já associados à activação indirecta da α -secretase, quer actuando a nível de proteínas cinases moduladores da sua actividade, quer alterando a distribuição subcelular do APP, ou ambos (Golde, 2006). Apesar destes resultados, existem várias preocupações no que se refere a esta estratégia, para além do facto de estes fármacos possuírem outros alvos moleculares importantes que podem impedir a sua utilização por falta de selectividade e eventuais efeitos secundários. O benefício da activação da α -secretase na prevenção ou tratamento da DA pode não ser superior ao risco que representa a estimulação crónica de uma enzima com vários substratos, cada um deles desempenhando papéis fisiológicos relevantes (Selkoe *et al.*, 2003).

Posto isto, apesar das descobertas envolvendo a modulação da α e γ -secretase, a β -secretase continua a ser apontada como um alvo terapêutico preferencial, opção suportada não só pelas dificuldades atrás descritas, mas também pelo facto de a β -secretase catalisar o passo inicial da produção de $A\beta$,

evitando a acumulação de fragmentos de APP potencialmente tóxicos, pela elucidação da sua estrutura que veio permitir o *design* racional de inibidores e pelos estudos em ratinhos que não codificam esta enzima e aparentam um fenótipo saudável e sem mecanismos compensatórios aparentes (Citron, 2004).

Nos últimos anos, vários grupos de investigação têm apresentado novos inibidores da BACE-1, que se revelaram eficazes nos estudos *in vivo*. Estes compostos, de peso molecular mais reduzido do que os peptidomiméticos tradicionais, apresentaram também elevada potência e selectividade para o alvo em causa (Lefranc-Jullien *et al.*, 2005; Asai *et al.*, 2006). No entanto, a sua aplicabilidade clínica está ainda comprometida pela fraca capacidade de penetração da barreira hemato-encefálica e ausência de biodisponibilidade oral (Hussain *et al.*, 2007). Por este motivo, mesmo com este avanço significativo em relação aos inibidores peptidomiméticos ineficazes *in vivo*, continua activa a pesquisa de pequenos inibidores naturais com capacidade de ultrapassarem aquelas limitações, que apresentem eficácia terapêutica, alcançando a fase de ensaios clínicos e por último o mercado farmacêutico.

A utilização de plantas medicinais remonta aos tempos primitivos e nos nossos dias são usadas não só como um todo mas também como matéria-prima para a síntese de novas moléculas com actividade farmacológica. Apesar de toda a investigação já realizada nesta área, apenas se conhece e utiliza uma quantidade limitada de plantas quando comparada com a diversidade existente na Natureza, que constitui um enorme potencial para a descoberta de novas moléculas com interesse terapêutico. As plantas aromáticas e os respectivos óleos essenciais são disso um bom exemplo, conhecendo-se já um grande número de actividades biológicas e de compostos bioactivos, mas estando ainda por explorar um imenso universo de potenciais agentes e acções terapêuticas.

Muitos óleos essenciais têm sido usados como activadores de memória e no tratamento ou alívio sintomático de várias desordens cognitivas (Howes *et al.*, 2003; Imanshahidi *et al.*, 2006). Alguns estão, inclusive, referenciados como inibidores da acetilcolinesterase, úteis no tratamento da doença de Alzheimer (Miyazawa *et al.*, 1998; Ferreira *et al.*, 2006).

Com o objectivo de encontrar inibidores naturais da BACE-1 e eventualmente de outras proteases aspárticas, analisámos, identificámos e testámos diversas amostras de óleos essenciais extraídos de plantas, na sua maioria presentes na flora portuguesa. Obtiveram-se composições diversificadas em número e percentagem de constituintes terpénicos, afectadas por factores climáticos, relacionados com o local e a data de colheita, assim como por factores fisiológicos, relacionados com o órgão produtor do OE dentro da mesma planta.

Os ensaios enzimáticos e celulares sinalizaram o óleo essencial de *Lavandula luisieri* e alguns dos seus componentes, como tendo a capacidade de inibir a BACE-1, de forma dependente da dose. Este OE inibiu a proBACE-1 com um IC_{50} de $121,5\mu\text{g.ml}^{-1}$ e apresentou um EC_{50} de $86,2\mu\text{g.ml}^{-1}$ em células CHO-APPwt.

Ao contrário do que acontece para outras espécies do género *Lavandula*, existem poucos estudos descritos sobre a composição e actividade do OE de *L. luisieri*. A análise e caracterização deste óleo revelaram uma constituição ímpar, com terpenos de estrutura irregular, de núcleo necrodano. A presença de alguns deles em secreções defensivas sugeria um potencial biológico até agora inexplorado, existindo apenas alguns relatos que descrevem propriedades antibacterianas e antifúngicas (Baldovini *et al.*, 2005), antioxidantes (Beirão *et al.*, 2005) e insecticidas (Gonzalez-Coloma *et al.*, 2006) do OE. A observação de

que estes constituintes não se encontram em mais nenhum dos óleos essenciais ensaiados, juntamente com o facto de outros óleos que apresentavam actividade inibitória, serem menos potentes que o óleo de *L. luisieri*, levantou a hipótese de que os principais responsáveis pela inibição poderiam ser os monoterpenos de núcleo necrodano.

Por outro lado, o relativo desconhecimento deste óleo, a par da sua complexidade e da presença de grande número de compostos vestigiais, acrescentaram dificuldade à identificação dos componentes e impuseram a necessidade de fraccionamentos sequenciais e individualização de alguns compostos para melhor esclarecimento da sua estrutura. A preparação de fracções com número limitado de constituintes facilitou o esclarecimento dos compostos activos nos ensaios biológicos.

Foram avaliadas diferentes fracções do OE de *L. luisieri*, cada uma delas caracterizada por um constituinte maioritário de núcleo necrodano. A fracção mais activa, identificada como #3.1, (com 28,6% de 2,3,4,4-tetrametil-5-metileno-ciclopent-2-enona) apresentou valores de $IC_{50} \sim 280\mu\text{g.ml}^{-1}$ em proBACE-1 recombinante e de EC_{50} de $94,5\mu\text{g.ml}^{-1}$ em células CHO-APPwt.

A 2,3,4,4-tetrametil-5-metileno-ciclopent-2-enona (purificada a partir do óleo essencial ou obtida por síntese), com um K_{app} de $415,8\mu\text{M}$ para a proBACE-1, parece ser o principal responsável pela actividade inibitória do óleo, apesar de não se excluir a possibilidade de outros componentes, incluindo os vestigiais ou não detectados, poderem influenciar a actividade. Surgiram algumas limitações na determinação do valor real de K_m para os substratos fluorogénicos usados, dado que, experimentalmente foi difícil observar a saturação dos mesmos dentro dos seus limites de solubilidade. Consequentemente, a capacidade de prever o modo de inibição por ajuste matemático dos dados ficou comprometida. Ainda

assim, a forma das curvas representadas nos gráficos obtidos por métodos de regressão linear sugerem uma inibição do tipo competitivo.

Nos ensaios celulares foi determinado um EC_{50} de $72,8\mu\text{M}$ para a 2,3,4,4-tetrametil-5-metileno-ciclopent-2-enona, em células CHO-APPwt. De igual modo, foi possível correlacionar uma diminuição nos níveis de sAPP β , o fragmento N-terminal do APP resultante da clivagem pela BACE-1, observada por *western blot*, com a diminuição dos níveis celulares de A β_{40} medidos por ELISA, confirmando-se assim a inibição directa da BACE-1.

Para excluir a hipótese de que a inibição ocorresse apenas naquelas células e para determinar o efeito numa linha celular neuronal humana, mais similar ao alvo *in vivo*, a 2,3,4,4-tetrametil-5-metileno-ciclopent-2-enona foi também ensaiada em células SHS-APPwt. Apesar de menos potente, também aqui foi possível observar um efeito inibitório, com um EC_{50} de $217,4\mu\text{M}$. As diferenças na potência e viabilidade observadas para as duas linhas celulares podem ser devidas às características fisiológicas de cada uma que se traduziram em diferentes condições experimentais, nomeadamente a necessidade de um maior tempo de incubação, a utilização de um ensaio de viabilidade diferente e da adição de um suplemento neuronal no caso das SHS.

Os resultados acima descritos revelaram uma maior potência dos compostos testados nos ensaios celulares em relação aos enzimáticos. Tal pode dever-se ao facto de que mais do que um composto seja responsável pela redução da produção de A β , mas apenas um actue directamente na BACE-1 ou simplesmente porque a quantidade de proteína recombinante usada nos ensaios enzimáticos seja muito superior à concentração celular endógena, não reflectindo as condições fisiológicas *in vivo*. Por outro lado, não é possível excluir a hipótese da ocorrência de algum mecanismo de acumulação do composto activo no interior da célula, reforçando o seu efeito. Na prática, este resultado

não se observa habitualmente, uma vez que diferentes compostos apresentam diferentes permeabilidades, e muitos inibidores potentes *in vitro* não apresentam nenhum efeito celular uma vez que não conseguem entrar nas células, ou são transportados activamente para fora destas, atingindo concentrações muito limitadas no seu interior.

Uma característica essencial de qualquer inibidor é demonstrar eficácia *in vivo*. Os estudos no modelo animal 3xTg-AD indicaram que a administração subcrónica (4 dias) do óleo essencial ou da fracção #3.1, numa concentração de 32mg.Kg⁻¹.dia⁻¹, resultaram numa redução de 25% da produção de A β . No entanto, para se observar o mesmo efeito com a 2,3,4,4-tetrametil-5-metilenociclopent-2-enona sintética, foi necessário aumentar a dose para 96mg.Kg⁻¹.dia⁻¹ e adicionar uma pequena quantidade de linalol.

Muitos laboratórios de universidades e de indústrias farmacêuticas têm reportado uma grande variedade de inibidores da BACE-1 nos últimos anos. Como ponto de partida foram desenvolvidos e estudados os análogos do substrato APP, peptidomiméticos com elevado peso molecular. No entanto, e apesar das elevadas potência e selectividade apresentadas, a ausência de actividade em modelos celulares e *in vivo*, determinou a pesquisa e desenvolvimento de inibidores mais pequenos. Os mais representativos e que exibem, até hoje, melhores resultados são compostos heterocíclicos como as pirrolidinas, piperidinas, acilguanidinas, ácidos tetrónicos e coumarinas. Começam também a ser descritos alguns inibidores de BACE-1 extraídos de plantas medicinais, como as catequinas e polifenóis. A grande maioria destes é menos potente que os inibidores peptidomiméticos, com IC₅₀ entre 1-100 μ M (Genevieve *et al.*, 2007), mas manifestam vantagens na penetração cerebral, biodisponibilidade e outros parâmetros farmacocinéticos. A 2,3,4,4-tetrametil-5-

metileno-ciclopent-2-enona foi eficaz em ensaios em modelo animal, numa gama de concentrações semelhante à descrita para alguns daqueles compostos e com uma estrutura aparentada com a dos ácidos tetrónicos.

Outro parâmetro importante na avaliação de inibidores enzimáticos é a especificidade para a enzima alvo. A avaliação de actividade da 2,3,4,4-tetrametil-5-metileno-ciclopent-2-enona noutras proteases aspárticas revelou diferentes potências inibitórias para algumas delas mas, ainda assim, poderá não ser problemática a sua utilização terapêutica em humanos. Esta hipótese deve-se, em primeiro lugar, ao facto da maioria das proteases testadas ser de origem vegetal, viral, parasitária ou fúngica e mesmo nestas, apenas a plasmepsina IV ser inibida com uma potência nitidamente superior. No caso das proteases humanas, a renina é insensível a este composto, ao contrário da pepsina e catepsina D que são inibidas, apresentando um K_i^{app} de 100,4 e 30,8 μ M, respectivamente. Este resultado parece comprometer o que atrás se disse mas, na realidade, a pepsina apresenta uma localização particular (estômago), não parecendo por isso de fácil acesso a uma molécula administrada por via intranasal. A catepsina D representa uma situação mais delicada dada a sua distribuição e localização, contudo, os ensaios celulares e em modelo animal não revelaram sinais de toxicidade, levantando a questão de que a 2,3,4,4-tetrametil-5-metileno-ciclopent-2-enona não seja um inibidor eficiente desta protease *in vivo*.

Além disso, modificações químicas da 2,3,4,4-tetrametil-5-metileno-ciclopent-2-enona podem garantir maior especificidade, se necessário, e produzir formas mais potentes deste inibidor mantendo os parâmetros farmacocinéticos desejáveis.

Por último, os resultados apresentados são consistentes com os de estudos prévios nos quais os óleos essenciais usados como inibidores enzimáticos provaram ser mais potentes do que os seus componentes isolados (Savelev *et al.*, 2003). Isto deve-se provavelmente a um efeito sinérgico e não apenas ao possível efeito aditivo de vários compostos diferentes com capacidade de actuar em mais do que um alvo molecular, o que também poderá explicar a diferença observada nos ensaios com a 2,3,4,4-tetrametil-5-metileno-ciclopent-2-enona sintética e a isolada do OE, já que não foi possível obter esta última com um grau de pureza de 100%. Com o método de purificação usado não foi possível eliminar todos os vestígios de linalol e de *t*-cadinol, que podem contribuir para o efeito inibitório global reportado. De facto, alguns autores descrevem certos monoterpenos, incluindo o linalol, como facilitadores da penetração celular (Shojaei *et al.*, 1999; Aqil *et al.*, 2007), com capacidade de aumentar a permeabilidade membranar, permitindo o acesso de outras moléculas ao interior de células e tecidos. Em concordância, neste trabalho não foi possível observar diferenças de potência entre a 2,3,4,4-tetrametil-5-metileno-ciclopent-2-enona sintética e a purificada nos ensaios enzimáticos com a enzima recombinante isolada, mas apenas nos ensaios celulares e animais, onde é necessário o atravessar de membranas para que se atinja o alvo molecular e se produza o efeito inibitório esperado. O problema não estará então ao nível da acção directa no alvo, mas sim da capacidade de o atingir ou na dificuldade de manter concentrações inibitórias apropriadas na sua proximidade. O terceiro composto, *t*-cadinol, pode também desempenhar alguma actividade inibitória ou facilitadora da penetração celular mas, infelizmente, não foi possível conduzir nenhuma experiência que pudesse esclarecer esse ponto, uma vez que a quantidade em que se encontra presente no OE não permite a sua purificação e também não se encontra comercialmente disponível.

A vantagem da maior potência do extracto total e do eventual efeito de mais do que um composto em mais do que um alvo molecular é apenas contrabalançada pelos riscos inerentes à utilização de uma mistura tão complexa, no que respeita a eventuais efeitos tóxicos de alguns dos seus constituintes. No entanto, a utilização controlada de óleos essenciais para fins medicinais é já uma prática antiga e segura e, face aos resultados apresentados neste trabalho, a utilização do OE de *L. luisieri* em aromaterapia pode apresentar vantagens terapêuticas, nomeadamente na prevenção e tratamento da doença de Alzheimer.

CONCLUSÕES

FINAIS

8

Neste trabalho procedeu-se à pesquisa, identificação e caracterização de inibidores da BACE-1 em extractos vegetais, mais concretamente em óleos essenciais. No início deste projecto a maioria dos inibidores descritos eram análogos peptidomiméticos do substrato ou inibidores naturais de origem proteica, enfrentando problemas como a fraca estabilidade e biodisponibilidade, assim como a ausência de efeito *in vivo*. Hoje, esta permanece uma área de investigação atractiva, concentrando-se agora fundamentalmente na pesquisa de pequenas moléculas naturais com características farmacocinéticas e de permeabilidade mais favoráveis. Tanto quanto sabemos, os óleos essenciais são uma potencial fonte destas moléculas ainda por explorar, apesar de já terem sido descritos como inibidores da acetilcolinesterase, que permanece uma das poucas alternativas terapêuticas em uso no caso da doença de Alzheimer.

Os estudos realizados permitiram concluir que o óleo essencial de *Lavandula luisieri* consegue inibir a BACE-1 de uma forma dependente da dose. O estudo da sua composição química revelou compostos de estrutura irregular, única no reino vegetal, diferenciando-o dos restantes óleos testados. Dada a maior potência inibitória desta amostra e a sua constituição atípica, levantou-se a hipótese que o ou os compostos responsáveis pela actividade biológica seriam aqueles distintivos. Na realidade, as experiências com os compostos isolados demonstraram que o constituinte com maior potência é um monoterpene ciclopentânico de núcleo necrodano, a 2,3,4,4-tetrametil-5-metileno-ciclopent-2-enona. Resultados preliminares dos estudos cinéticos sugerem uma inibição do tipo competitivo.

Os ensaios em linhas celulares permitiram também concluir que o óleo de *L. luisieri* e os seus constituintes conseguem atravessar as membranas, alcançar o alvo intracelular e reduzir a produção do peptídeo β -amilóide. Não podemos, no

entanto, excluir a possibilidade que outro mecanismo que não a inibição directa da BACE-1 possa contribuir para o efeito geral da redução dos níveis de A β .

A utilização do modelo animal da doença de Alzheimer 3xTg-AD permitiu confirmar que o óleo e a 2,3,4,4-tetrametil-5-metileno-ciclopent-2-enona apresentavam a capacidade de serem absorvidos pela mucosa nasal, atravessar a barreira hemato-encefálica e reduzir os níveis de peptídeo β -amilóide, sem toxicidade aparente.

Os resultados dos ensaios de viabilidade celular para avaliação da toxicidade dos inibidores revelaram que, nas concentrações inibitórias, esta não é significativa, apesar de, tal como esperávamos dada a complexidade química do óleo essencial, a sua utilização possa acarretar um maior risco do que a utilização da 2,3,4,4-tetrametil-5-metileno-ciclopent-2-enona isolada.

Tal como o que se encontra descrito em estudos prévios da actividade biológica de OE, também os nossos resultados provaram que os extractos totais são mais activos que os seus compostos isolados. É provável que diferentes componentes da amostra total possam actuar em diferentes alvos moleculares ou em mecanismos paralelos que contribuam para o efeito inibitório global. Pensamos ser também esta a razão das diferenças de potência observadas entre o composto activo sintetizado e o isolado no laboratório a partir da sua fonte natural, onde não foi possível eliminar todos os vestígios de outros terpenos. O facto de esta diferença ser visível nos ensaios celulares e animais mas não nos enzimáticos reforça esta teoria. No futuro, os estudos aqui descritos poderiam ser realizados com outros componentes do OE para a clarificação da sua contribuição para o efeito inibitório. A principal dificuldade desta estratégia prende-se com a indisponibilidade comercial de muitos destes compostos e a dificuldade de purificação a partir do próprio óleo.

Finalmente, nos ensaios de selectividade realizados com outras proteases aspárticas foi possível observar a inibição mais ou menos potente de algumas destas, o que poderá ser útil para o desenvolvimento de novos inibidores e modulação de outras patologias associadas a estas enzimas.

De uma forma geral, apesar da selectividade e potência dos inibidores aqui descritos ser moderada, estes são eficazes em linhas celulares e *in vivo*, características ainda difíceis de encontrar entre os vários inibidores já descritos. Outro aspecto distintivo é a relativa facilidade e baixo custo da sua obtenção. Posto isto, o óleo e moléculas aqui apresentados podem ser úteis quer na investigação da BACE-1, de outras proteases aspárticas e respectivas patologias associadas, quer como protótipos modificáveis por química combinatorial no sentido de melhorar a potência e a selectividade sem alterar a farmacocinética favorável.

**REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**

9

- Acree T., Arn H. (2004). Flavornet and human odor space Datu Inc. <http://www.flavornet.org> (accessed 03/2010).
- Adams R.P. (2001). "Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy." Allured Publishing Corporation.
- Adams R.P. (2007). "Identification of essential oil components by gas chromatography / mass spectrometry," Allured Publishing Corporation.
- Adessi C., Soto C. (2002). Beta-sheet breaker strategy for the treatment of Alzheimer's disease. "Drug. Dev. Res." **56**(2): 184-193.
- Adlard P.A., Cummings B.J. (2004). Alzheimer's disease-a sum greater than its parts? "Neurobiol. Aging." **25**(6): 725-733.
- Aisen P.S., Gauthier S., Vellas B., Briand R., Saumier D., Laurin J., Garceau D. (2007). Alzhemed: a potential treatment for Alzheimer's Disease. "Curr. Alzheimer Res." **4**(4): 473-478.
- Allahverdiyev A., Duran N., Ozguven M., Koltas S. (2004). Antiviral activity of the volatile oils of *Melissa officinalis* L. against Herpes simplex virus type-2. "Phytomedicine" **11**(7-8): 657-661.
- Allinson T.M.J, Parkin E.T., Turner A.J., Hooper N.M. (2003). ADAMs family members as amyloid precursor protein a-secretases. "J. Neurosci." **74**(3): 342-352.
- Andreasen N., Blennow K. (2005). CSF biomarkers for mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. "Clin. Neurol. Neurosurg." **107**(3): 165-173.
- Annaert W., de Strooper B. (2002). A cell biological perspective on Alzheimer's disease. "Annu. Rev. Cell Dev. Biol." **18**(1): 25-51.
- Aqil M., Ahad A., Sultana Y., Ali A. (2007). Status of terpenes as skin penetration enhancers. "Drug Discov. Today" **12**(23-24): 1061-1067.

- Armaka M., Papanikolaou E., Sivropoulou A., Arsenakis M. (1999). Antiviral properties of isoborneol, a potent inhibitor of herpes simplex virus type 1. "Antiviral Res." **43**(2): 79-92.
- Asai M., Hattori C., Iwata N., Saido T.C., Sasagawa N., Szabó B., Hashimoto Y., Maruyama K., Tanuma S., Kiso Y., Ishiura S. (2006). The novel β -secretase inhibitor KMI-429 reduces amyloid β peptide production in amyloid precursor protein transgenic and wild-type mice. "J. Neurochem." **96**(2): 533-540.
- Bagamboula C.F., Uyttendaele M., Debevere J. (2004). Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. "Food Microbiol." **21**(1): 33-42.
- Baldovini N., Lavoine-Hannequelle S., Ferrando G., Dusart G., Lizzani-Cuvelier L. (2005). Necrodane monoterpenoids from *Lavandula luisieri*. "Phytochemistry" **66**(14): 1651-1655.
- Baldwin E.T., Bhat T.N., Gulnik S., Hosur M.V., Sowder R.C., Cachau R.E., Collins J, Silva A.M., Erickson J.W. (1993). Crystal structures of native and inhibited forms of human Cathepsin D: implications for lysosomal targeting and drug design. "PNAS" **90**(14): 6796-6800.
- Banerjee R., Liu J., Beatty W., Pelosof L., Klemba M., Goldberg D.E. (2002). Four plasmepsins are active in the *Plasmodium falciparum* food vacuole, including a protease with an active-site histidine. "PNAS" **99**(2): 990-995.
- Barocelli E., Calcina F., Chiavarini M., Impicciatore M., Bruni R., Bianchi A., Ballabeni V. (2004). Antinociceptive and gastroprotective effects of inhaled and orally administered *Lavandula hybrida* Reverchon "Grosso" essential oil. "Life Sci." **76**(2): 213-223.
- Beck Z.Q., Morris G.M., Elder J.H. (2002). Defining HIV-1 protease substrate selectivity. "Curr. Drug Targets: Infect. Disord." **2002**(1): 37-50.

- Beirão A.R.B., Bernardo-Gil M.G. (2005). Antioxidants from *Lavandula luisieri*. 2nd Mercosur Congress on Chemical Engineering 4th Mercosur Congress on Process Systems Engineering.
- Bennett B.D., Babu-Khan S., Loeloff R., Louis J.C., Curran E., Citron M., Vassar R. (2000). Expression analysis of BACE2 in brain and peripheral tissues. "J. Biol. Chem." **275**(27): 20647-20651.
- Berger R.G. (2007). "Flavours and Fragrances." Springer.
- Bernstein H.C. (2005). "Proteases in the brain." Springer.
- Billings L.M., Oddo S., Green K.N., McLaugh J.L., LaFerla F.M. (2005). Intraneuronal A β causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. "Neuron" **45**: 675-688.
- Blennow K., de Leon M.J., Zetterberg H. (2006). Alzheimer's disease. "Lancet" **368**(9533): 387-403.
- Bona da Silva C.D., Guterres S.S., Weisheimer V., Schapoval E.E.S. (2008). Antifungal activity of the Lemongrass oil and Citral against *Candida* spp. "Braz. J. Infect. Dis." **12**(1): 63-66.
- Boss C., Corminboeuf O., Grisostomi C., Meyer S., Jones A.F., Prade L., Binkert C., Fischli W., Weller T., Bur D. (2006). Achiral, cheap, and potent inhibitors of Plasmepsins I, II, and IV. "ChemMedChem" **1**(12): 1341-1345.
- Boss M.A. (2000). Diagnostic approaches to Alzheimer's disease. "BBA-Mol. Basis Dis." **1502**(1): 188-200.
- Brian J.M. (2003). Renin: from "pro" to promoter. "BioEssays" **25**(5): 520-527.
- Brik A., Wong C.H. (2003). HIV-1 protease: mechanism and drug discovery. "Org. Biomol. Chem." **1**(1): 5-14.
- Burke B.E., Baillie J.E., Olson R.D. (2004). Essential oil of Australian lemon myrtle (*Backhousia citriodora*) in the treatment of molluscum contagiosum in children. "Biomed. Pharmacother." **58**(4): 245-247.

- Cermelli C., Fabio A., Fabio G., Quaglio P. (2008). Effect of Eucalyptus essential oil on respiratory bacteria and viruses. "Curr. Microbiol." **56**(1): 89-92.
- Cherny R.A., Atwood C.S., Xilinas M.E., Gray D.N., Jones W.D., McLean C.A., Barnham K.J., Volitakis I., Fraser F.W., Kim Y.S., Huang X., Goldstein L.E., Moir R.D., Lim J.T., Beyreuther K., Zheng H., Tanzi R.E., Masters C.L., Bush A.I. (2001). Treatment with a Copper-Zinc chelator markedly and rapidly inhibits beta-Amyloid accumulation in Alzheimer's disease transgenic mice. "Neuron" **30**(3): 665-676.
- Choi H.S., Song H.S., Ukeda H., Sawamura M. (2000). Radical-scavenging activities of Citrus essential oils and their components: detection using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. "J. Agric. Food Chem." **48**(9): 4156-4161.
- Christeller J.T., Farley P.C., Ramsay R.J., Sullivan P.A., Laing W.A. (1998). Purification, characterization and cloning of an aspartic proteinase inhibitor from squash phloem exudate. "Eur. J. Biochem." **254**(1): 160-167.
- Christensen D.D. (2007). Changing the course of Alzheimer's disease: anti-amyloid disease-modifying treatments on the horizon. "Prim. Care Companion J. Clin. Psychiatry" **9**(1): 32-41.
- Cirrito J.R., Holtzman D.M. (2003). Amyloid β and Alzheimer disease therapeutics: the devil may be in the details. "J. Clin. Invest." **112**(3): 321-323.
- Citron M. (2000). Secretases as targets for the treatment of Alzheimer's disease. "Mol. Med. Today" **6**(10): 392-397.
- Citron M. (2002). Emerging Alzheimer's disease therapies: inhibition of beta-secretase. "Neurobiol. Aging" **23**(6): 1017-1022.
- Citron M. (2004). Beta-secretase inhibition for the treatment of Alzheimer's disease - promise and challenge. "Trends Pharmacol. Sci." **25**(2): 92-97.
- Citron M., Teplow D.B., Selkoe D.J. (1995). Generation of amyloid [beta] protein from its precursor is sequence specific. "Neuron" **14**(3): 661-670.

- Cole D.C., Manas E.S., Stock J.R., Condon J.S., Jennings L.D., Aulabaugh A., Chopra R., Cowling R., Ellingboe J.W., Fan K.Y., Harrison B.L., Hu Y., Jacobsen S., Jin G., Lin L., Lovering F.E., Malamas M.S., Stahl M.L., Strand J., Sukhdeo M.N., Svenson K., Turner M.J., Wagner E., Wu J., Zhou P., Bard J. (2006). Acylguanidines as small-molecule b-secretase inhibitors. "J. Med. Chem." **49**(21): 6139-6428.
- Copeland R.A. (2005). "Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery: a guide for medicinal chemists and pharmacologists." Wiley-Interscience.
- Corminboeuf O., Dunet G., Hafsi M., Grimont J., Grisostomi C., Meyer S., Binkert C., Bur D., Jones A., Prade L., Brun R., Boss C. (2006). Inhibitors of Plasmeprin II–potential antimalarial agents. "Bioorg. Med. Chem. Lett." **16**(24): 6194-6199.
- Coskun S., Girisgin O., Kürkcüoglu M., Malyer H., Girisgin A., Kirimer N., Baser K. (2008). Acaricidal efficacy of *Origanum onites* L. essential oil against *Rhipicephalus turanicus* (Ixodidae). "Parasitol. Res." **103**(2): 259-261.
- Crowell P.L. (1999). Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes. "J. Nutr." **129**(3): 775S-778S.
- Danser A.H.J., Deinum J. (2005). Renin, prorenin and the putative (pro)renin receptor. "Hypertension" **46**(5): 1069-1076.
- Dash C., Kulkarni A., Dunn B., Rao M. (2003). Aspartic peptidase inhibitors: implications in drug development. "Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol." **38**(2): 89-119.
- Davies D.R. (1990). The structure and function of the aspartic proteinases. "Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem." **19**(1): 189-215.
- Davies N.W. (1990). Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and Carbowax 20M phases. "J. Chromatogr." **503**: 1-24.

- De Logu A., Loy G., Pellerano M.L., Bonsignore L., Schivo M.L. (2000). Inactivation of HSV-1 and HSV-2 and prevention of cell-to-cell virus spread by *Santolina insularis* essential oil. "Antiviral Res." **48**(3): 177-185.
- Demain A.L. (1999). Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. "Appl. Microbiol. Biotechnol." **52**(4): 455-463.
- Deuss M., Reiss K., Hartmann D. (2008). Part-time alpha-secretases: the functional biology of ADAM 9, 10 and 17. "Curr. Alzheimer Res." **5**(2): 187-201.
- Dewachter I., Van Leuven F. (2002). Secretases as targets for the treatment of Alzheimer's disease: the prospects. "Lancet Neurol." **1**(7): 409-416.
- Dominguez D.I., Strooper B.D. (2002). "Novel therapeutic strategies provide the real test for the amyloid hypothesis of Alzheimer's disease. "Trends Pharmacol. Sci." **23**(7): 324-330.
- Dunn B.M. (2002). Structure and mechanism of the pepsin-like family of aspartic peptidases. "Chem. Rev." **102**(12): 4431-4458.
- Dunn B.M., Jimenez M., Parten B.F., Valler M.J., Rolph C.E., Kay J. (1986). A systematic series of synthetic chromophoric substrates for aspartic proteinases. "Biochem. J." **237**(3): 899-906.
- Edris A.E. (2007). Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. "Phytother. Res." **In press**.
- El-Sayed A.M. (2009). The Pherobase: Database of Pheromones and Semiochemicals. <http://www.pherobase.com> (accessed 06/2010).
- Elsou C.E. (1995). Suppression of mevalonate pathway activities by dietary isoprenoids: protective roles in cancer and cardiovascular disease. "J. Nutr." **125**(6_Suppl): 1666S-1672S.
- Ermolieff J., Loy J.A., Koelsch G., Tang J. (2000). Proteolytic activation of recombinant pro-memapsin 2 (pro- β -secretase) studied with new fluorogenic substrates. "Biochemistry" **39**(40): 12450-12456.

- Esler W.P., Wolfe M.S. (2001). A portrait of Alzheimer secretases - new features and familiar faces. "Science" **293**(5534): 1449-1454.
- Evin G., Weidemann A. (2002). Biogenesis and metabolism of Alzheimer's disease A β amyloid peptides. "Peptides" **23**(7): 1285-1297.
- Farag R.S., Shalaby A.S., El-Baroty G.A., Ibrahim N.A., Ali M.A., Hassan E.M. (2004). Chemical and biological evaluation of the essential oils of different Melaleuca species. "Phytother. Res." **18**(1): 30-35.
- Farnsworth N.R., Akerele O., Bingel A.S., Soejarto D.D., Guo Z. (1985). Medicinal plants in therapy. "WHO Bulletin" **63**(6): 965-981.
- Ferreira A., Proenca C., Serralheiro M.L.M., Araujo M.E.M. (2006). The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. "J. Ethnopharmacol." **108**(1): 31-37.
- Fisher N.D.L., Hollenberg N.K. (2005). Renin inhibition: what are the therapeutic opportunities? "J. Am. Soc. Nephrol." **16**(3): 592-599.
- Fujinaga M., Chernai M.M., Tarasova N.I., Mosimann S.C., James M.N.G. (1995). Crystal structure of human pepsin and its complex with pepstatin. "Protein Sci" **4**(5): 960-972.
- Gacko M., Minarowska A., Karwowska A., Minarowski L. (2007). Cathepsin D inhibitors. "Folia Histochem. Cyto." **45**(4): 291-313.
- Garcia-Vallejo M.I. (1992). Aceites esenciales de las Lavandulas Ibericas - ensayo de la quimiotaxonomia. Department of Plant Biology. Madrid, University Complutense de Madrid. **PhD Thesis**.
- Garino C., Pietrancosta N., Laras Y., Moret V., Rolland A., Quelever G., Kraus J.L. (2006). BACE1 inhibitory activities of new substituted phenyl-piperazine coupled to various heterocycles: Chromene, coumarin and quinoline. "Bioorg. Med. Chem. Lett." **16**(7): 1995-1999.
- Genevieve E., Vijaya B.K. (2007). BACE inhibitors as potential therapeutics for Alzheimer's disease. "Recent Pat. CNS Drug Discov." **2**(3): 188-199.

- Ghosh A.K., Gemma S., Tang J. (2008). β -Secretase as a therapeutic target for Alzheimer's disease. "Neurotherapeutics" **5**(3): 399-408.
- Ghosh A.K., Hong L., Tang J. (2002). β -Secretase as a therapeutic target for inhibitor drugs. "Curr. Med. Chem." **9**(11): 1135-1144.
- Glabe C. (2006). Avoiding collateral damage in Alzheimer's disease treatment. "Science" **314**(5799): 602-603.
- Goedert M., Spillantini M.G. (2006). A century of Alzheimer's disease. "Science" **314**(5800): 777-781.
- Golde T.E. (2003). Alzheimer disease therapy: Can the amyloid cascade be halted? "J. Clin. Invest." **111**(1): 11-18.
- Golde T.E. (2006). Disease modifying therapy for AD? "J. Neurochem." **99**(3): 689-707.
- Golde T.E., Eckman C.B. (2001). Cholesterol modulation as an emerging strategy for the treatment of Alzheimer's disease. "Drug Discov. Today" **6**(20): 1049-1055.
- Gonzalez-Coloma A., Martin-Benito D., Mohamed N., Garcia-Vallejo M.C., Soria A.C. (2006). Antifeedant effects and chemical composition of essential oils from different populations of *Lavandula luisieri* L. "Biochem. Sys. Ecol." **34**(8): 609-616.
- Gouras G.K. (2001). Current theories for the molecular and cellular pathogenesis of Alzheimer's disease. "Expert Rev. Mol. Med." **31 May**: 1-11.
- Gradman A.H., Kad R. (2008). Renin inhibition in hypertension. "J. Am. Coll. Cardiol." **51**(5): 519-528.
- Gulluce M., Sokmen M., Daferera D., Agar G., Ozkan H., Kartal N., Polissiou M., Sokmen A., Sahin F. (2003). In vitro antibacterial, antifungal, and antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts of herbal parts and callus cultures of *Satureja hortensis* L. "J. Agric. Food Chem." **51**(14): 3958-3965.

- Haass C. (2004). Take five - BACE and the γ -secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid b-peptide generation. "EMBO J." **23**: 483-488.
- Hajhashemi V., Sadraei H., Ghannadi A.R., Mohseni M. (2000). Antispasmodic and anti-diarrhoeal effect of *Satureja hortensis* L. essential oil. "J. Ethnopharmacol." **71**(1-2): 187-192.
- Hamada Y., Ohta H., Miyamoto N., Yamaguchi R., Yamani A., Hidaka K., Kimura T., Saito K., Hayashi Y., Ishiura S., Kiso Y. (2008). Novel non-peptidic and small-sized BACE1 inhibitors. "Bioorg. Med. Chem. Lett." **18**(5): 1654-1658.
- Hardy J. (2002). Testing times for the "amyloid cascade hypothesis". "Neurobiol. Aging" **23**(6): 1073-1074.
- Hardy J. (1997). Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. "Trends Neurosci." **20**(4): 154-159.
- Harvey A. (2000). Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. "Drug Discov. Today" **5**(7): 294-300.
- Hayashi K., Kamiya M., Hayashi T. (1995). Virucidal effects of the steam distillate from *Houttuynia cordata* and its components on HSV-1, Influenza virus, and HIV. "Planta Med." **61**(3): 237-241.
- Head J. (2005). The Iberian Lavenders. "The Mediterranean Garden" **42**.
- Howes M.J.R., Perry N.S.L., Houghton P.J. (2003). Plants with traditional uses and activities, relevant to the management of Alzheimer's disease and other cognitive disorders. "Phytother. Res." **17**(1): 1-18.
- Huang D., Lüthi U., Kolb P., Edler K., Cecchini M., Audetat S., Barberis A., Caflisch A. (2005). Discovery of cell-permeable non-peptide inhibitors of β -secretase by high-throughput docking and continuum electrostatics calculations. "J. Med. Chem." **48**(16): 5108-5111.
- Hube B., Naglik J. (2001). *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. "Microbiology" **147**(8): 1997-2005.

- Hussain I., Hawkins J., Harrison D., Hille C., Wayne G., Cutler L., Buck T., Walter D., Demont E., Howes C., Naylor A., Jeffrey P., Gonzalez M.I., Dingwall C., Michel A., Redshaw S., Davis J.B. (2007). Oral administration of a potent and selective non-peptidic BACE-1 inhibitor decreases β -cleavage of amyloid precursor protein and amyloid- β production in vivo. "J. Neurochem." **100**(3): 802-809.
- Hussain I., Powell D., Howlett D.R., Tew D.G., Meek T.D., Chapman C., Gloger I.S., Murphy K.E., Southan C.D., Ryan D.M. (1999). Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase. "Mol. Cell. Neurosci." **14**(6): 419-427.
- Imanshahidi M., Hosseinzadeh H. (2006). The pharmacological effects of Salvia species on the central nervous system. "Phytother. Res." **20**(6): 427-437.
- Infarmed (2005). "Farmacopeia Portuguesa VIII." Lisboa, Ministério da Saúde.
- Jassim S.A.A., Naji M.A. (2003). Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. "J. App. Microbiol." **95**(3): 412-427.
- Asres K., Seyoum A., Veeresham C., Bucar F., Gibbons S. (2005). Naturally derived anti-HIV agents. "Phytother. Res." **19**(7): 557-581.
- Koelsch G., Mares M., Metcalf P., Fusek M. (1994). Multiple functions of pro-parts of aspartic proteinase zymogens. "FEBS Lett." **343**(1): 6-10.
- Kreft S., Ravnikar M., Mesko P., Pungercar J., Umek A., Kregar I., Strukelj B. (1997). Jasmonic acid inducible aspartic proteinase inhibitors from potato. "Phytochemistry" **44**(6): 1001-1006.
- LaFerla F.M., Green K.N., Oddo S. (2007). Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. "Nat. Rev. Neurosci." **8**(7): 499-509.
- LaFerla F.M., Oddo S. (2005). Alzheimer's disease: Abeta, tau and synaptic dysfunction. "Trends Mol. Med." **11**(4): 170-176.

- Lavoine-Hanneguelle S., Casabianca H. (2004). New compounds from the essential oil and absolute of *Lavandula luisieri* L. "J. Essent. Oil Res." **16**(September / October): 445-448.
- Lee H.C., Cheng S.S., Chang S.T. (2005). Antifungal property of the essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum* leaf against tree pathogenic fungi. "J. Sci. Food Agr." **85**(12): 2047-2053.
- Lefranc-Jullien S., Lisowski V., Hernandez J.F., Martinez J., Checler F. (2005). Design and characterization of a new cell-permeant inhibitor of the β -secretase BACE1. "Br. J. Pharmacol." **145**: 228-235.
- Leung D., Abbenante G., Fairlie D.P. (2000). Protease inhibitors: current status and future prospects. "J. Med. Chem." **43**(3): 395-341.
- Liang X.T., Fang W.S. (2006). "Medicinal chemistry of bioactive natural products". Wiley Interscience.
- Lin X., Koelsch G., Wu S., Downs D., Dashti A., Tang J. (2000). Human aspartic protease memapsin 2 cleaves the β -secretase site of β -amyloid precursor protein. "PNAS" **97**(4 (15 February)): 1456-1460.
- Lindstrom P.J., Mallard W.G. (2009). NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database Number 69, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg MD, 20899, <http://webbook.nist.gov> (accessed 06/2010).
- Lopes N.P., Kato M.J., Andrade E.H., Maia J.G., Yoshida M., Planchart A.R., Katzin A.M. (1999). Antimalarial use of volatile oil from leaves of *Virola surinamensis* (Rol.) Warb. by Waiãpi Amazon Indians. "J. Ethnopharmacol." **67**(3): 313-319.
- Machado M., Sousa M.C., Salgueiro L., Cavaleiro C. (2010a). Effects of essential oils on the growth of *Giardia lamblia* trophozoites. "Nat. Prod. Commun." **5**: 137-141.

- Machado M., Santoro G., Sousa M.C., Salgueiro L., Cavaleiro C. (2010b). Activity of essential oils on the growth of *Leishmania infantum* promastigotes. "Flavour Frag. J." **25**: 156-160.
- Marongiu B., Porcedda S., Caredda A., Gioannis B.D., Vargiu L., Colla P.L. (2003). Extraction of *Juniperus oxycedrus* ssp. *oxycedrus* essential oil by supercritical carbon dioxide: influence of some process parameters and biological activity. "Flavour Frag. J." **18**(5): 390-397.
- Matsunaga T., Hasegawa C., Kawasuji T., Suzuki H., Saito H., Sagioka T., Takahashi R., Tsukamoto H., Morikawa T., Akiyama T. (2000). Isolation of the antiulcer compound in essential oil from the leaves of *Cryptomeria japonica*. "Biol. Pharm. Bull." **23**(5): 595-598.
- Mayeux R. (2003). Epidemiology of neurodegeneration. "Annu. Rev. Neurosci." **26**(1): 81-104.
- McPhie P. (1972). A spectrophotometric investigation of the pepsinogen-pepsin conversion. "J. Biol. Chem." **247**(13): 4277-4281.
- Jukic M., Politeo O., Maksimovic M., Milos M., Milos M. (2007). In vitro acetylcholinesterase inhibitory properties of thymol, carvacrol and their derivatives thymoquinone and thymohydroquinone. "Phytother. Res." **21**(3): 259-261.
- Minami M., Kita M., Nakaya T., Yamamoto T., Kuriyama H., Imanishi J. (2003). The inhibitory effect of essential oils on Herpes simplex virus type 1 replication in vitro. "Microbiol. Immunol." **47**(9): 681-684.
- Minarowska A., Gacko M., Karwowska A., Minarowski L. (2008). Human cathepsin D. "Folia Histochem. Cyto." **46**(1): 23-38.
- Mittl P.R.E., Grütter M.G. (2006). Opportunities for structure-based design of protease-directed drugs. "Curr. Opin. Struct. Biol." **16**(6): 769-775.

- Miyazawa M., Watanabe H., Umemoto K., Kameoka H. (1998). Inhibition of acetylcholinesterase activity by essential oils of *Mentha* species. "J. Agric. Food Chem." **46**(9): 3431-3434.
- Mo H., Elson C.E. (2004). Studies of the isoprenoid-mediated inhibition of mevalonate synthesis applied to cancer chemotherapy and chemoprevention. "Exp. Biol. Med." **229**(7): 567-585.
- Möller H.J., Graeber M.B. (1998). The case described by Alois Alzheimer in 1911. "Eur. Arch. Psychiatry. Clin. Neurosci." **248**(3): 111-122.
- Mühlbauer R.C., Lozano A., Palacio S., Reinli A., Felix R. (2003). Common herbs, essential oils, and monoterpenes potently modulate bone metabolism. "Bone" **32**(4): 372-380.
- Naglik J.R., Challacombe S.J., Hube B. (2003). *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. "Microbiol. Mol. Biol. Rev." **67**(3): 400-428.
- Oddo S., Caccamo A., Shepherd J.D., Murphy M.P., Golde T.E., Kaye R., Metherate R., Mattson M.P., Akbari Y., LaFerla F.M. (2003). Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. "Neuron" **39**(3): 409-421.
- Parsons C.G., Gruner R., Rozental J., Millar J., Lodge D. (1993). Patch clamp studies on the kinetics and selectivity of N-methyl-D-aspartate receptor antagonism by memantine (1-amino-3,5-dimethyladamantan). "Neuropharmacol." **32**(12): 1337-1350.
- Pastorino L., Lu K.P. (2006). Pathogenic mechanisms in Alzheimer's disease. "Eur. J. Pharmacol." **545**(1): 29-38.
- Paúl J.P. (2002). Contribución al conocimiento de los aceites esenciales del género *Eryngium* L., en la Península Ibérica. Facultad de Biología Departamento Biología Vegetal I (Botánica). Madrid, Universidad Complutense de Madrid. **PhD thesis**.

- Peana A.T., D'Aquila P.S., Panin F., Serra G., Pippia P., Moretti M.D.L. (2002). Anti-inflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils. "Phytomedicine" **9**(8): 721-726.
- Perry N.S.L., Bollen C., Perry E.K., Ballard C. (2003). Salvia for dementia therapy: review of pharmacological activity and pilot tolerability clinical trial. "Pharmacol. Biochem. Behav." **75**(3): 651-659.
- Perry N.S.L., Houghton P.J., Jenner P., Keith A., Perry E.K. (2002). Salvia lavandulaefolia essential oil inhibits cholinesterase in vivo. "Phytomedicine" **9**(1): 48-51.
- Peter P.M. (2001). The active site of HIV-1 protease. "Med. Res. Rev." **21**(4): 348-353.
- Phylip L.H., Lees W.E., Brownsey B.G., Bur D., Dunn B.M., Winther J.R., Gustchina A., Li M., Copeland T., Wlodawer A., Kay J. (2001). The potency and specificity of the interaction between the IA3 inhibitor and its target aspartic proteinase from *Saccharomyces cerevisiae*. "J. Biol. Chem." **276**(3): 2023-2030.
- Proença da Cunha A. (2005). "Farmacognosia e Fitoquímica." Fundação Calouste Gulbenkian.
- Rawlings N.D., Barrett A.J., Alan J.B. (1995). [7] Families of aspartic peptidases, and those of unknown catalytic mechanism. "Methods in Enzymology". Academic Press. **Volume 248**: 105-120.
- Rawlings N.D., Barrett A.J. (1999). MEROPS: the peptidase database. "Nucl. Acids Res." **27**(1): 325-331.
- Rawlings N.D., Morton F.R., Kok C.Y., Kong J., Barrett A.J. (2008). MEROPS: the peptidase database. "Nucl. Acids Res." **36**(suppl_1): D320-325.

- Remen L.U., Bezençon O., Richard-Bildstein S., Bur D., Prade L., Corminboeuf O., Boss C., Grisostomi C., Sifferlen T., Strickner P., Hess P., Delahaye S., Treiber A., Weller T., Binkert C., Steiner B., Fischli W. (2009). New classes of potent and bioavailable human renin inhibitors. "Bioorg. Med. Chem. Lett." **19**(23): 6762-6765.
- Rich D.H. (1985). Pepstatin-derived inhibitors of aspartic proteinases. A close look at an apparent transition-state analog inhibitor. "J. Med. Chem." **28**(3): 263-273.
- Roach B., Eisner T., Meinwald J. (1990). Defense mechanisms of arthropods. 83. alpha- and beta-Necrodol, novel terpenes from a carrion beetle (*Necrodes surinamensis*, Silphidae, Coleoptera). "J. Org. Chem." **55**(13): 4047-4051.
- Rocha A.B., Lopes R.M., Schwartzmann G. (2001). Natural products in anticancer therapy. "Curr. Opin. Pharmacol." **1**(4): 364-369.
- Roszkowska-Jakimiec W., Wołczyński S., Chlabicz M. (2004). Effects of cathepsin D inhibitor from *Vicia sativa* L. seed hulls on human skin fibroblasts and breast cancer cells (in vitro studies). "Rocz. Akad. Med. Białymst." **49**(Supplement 1): 234-235.
- Sadraei H., Asghari G.R., Hajhashemi V., Kolagar A., Ebrahimi M. (2001). Spasmolytic activity of essential oil and various extracts of *Ferula gummosa* Boiss. on ileum contractions. "Phytomedicine" **8**(5): 370-376.
- Sangwan N.S., Farooqi A.H.A., Shabih F., Sangwan R.S. (2001). Regulation of essential oil production in plants. "Plant Growth Regul." **34**(1): 3-21.
- Sankaranarayanan S., Price E.A., Wu G., Crouthamel M.C., Shi X.P., Tugusheva K., Tyler K.X., Kahana J., Ellis J., Jin L., Steele T., Stachel S.J., Coburn C., Simon A.J. (2007). In vivo beta-secretase 1 inhibition leads to brain Abeta lowering and increased alpha-secretase processing of APP without effect on Neuregulin-1. "J. Pharmacol. Exp. Ther." **324**(3): 957-969.

- Sanz J., Soria A.C., García-Vallejo M.C. (2004). Analysis of volatile components of *Lavandula luisieri* L. by direct thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. "J. Chromatogr. A." **1024**(1-2): 139-146.
- Savelev S., Okello E., Perry N.S.L., Wilkins R.M., Perry E.K. (2003). Synergistic and antagonistic interactions of anticholinesterase terpenoids in *Salvia lavandulaefolia* essential oil. "Pharmacol. Biochem. Behav." **75**(3): 661-668.
- Schmidt B. (2003). Aspartic proteases involved in Alzheimer's disease. "ChemBioChem." **4**(5): 366-378.
- Schuhmacher A., Reichling J., Schnitzler P. (2003). Virucidal effect of peppermint oil on the enveloped viruses herpes simplex virus type 1 and type 2 in vitro. "Phytomedicine" **10**(6-7): 504-510.
- Selkoe D.J. (2001). Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. "Physiol. Rev." **81**(2): 741-766.
- Selkoe D.J., Schenk D. (2003). Alzheimer's disease: molecular understanding predicts amyloid-based therapeutics. "Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol." **43**(1): 545-584.
- Shinde U.A., Phadke A.S., Nair A.M., Mungantiwar A.A., Dikshit V.J., Saraf M.N. (1999). Studies on the anti-inflammatory and analgesic activity of *Cedrus deodara* (Roxb.) Loud. wood oil. "J. Ethnopharmacol." **65**(1): 21-27.
- Shojaei A.H., Khan M., Lim G., Khosravan R. (1999). Transbuccal permeation of a nucleoside analog, dideoxycytidine: effects of menthol as a permeation enhancer. "Int. J. Pharm." **192**(2): 139-146.
- Siani A.C., Sampaio A.L.F., Sousa M.C., Henriques M.G.M.O., Ramos M.F.S. (2000). Óleos essenciais. "Biotecnologia Cienc. Desenvolv." **3**(16): 37-43.
- Silva E.A.S. (2006). Estudo analítico dos óleos essenciais extraídos de resinas das espécies *Protium* spp. Instituto de Química. S. Paulo, Universidade de S. Paulo. **Master thesis.**

- Silvestri R. (2009). Boom in the development of non-peptidic beta-secretase (BACE1) inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. "Med. Res. Rev." **29**(2): 295-338.
- Simic A., Sokovic M.D., Ristic M., Grujicac-Jovanovic S., Vukojevic J., Marin P.D. (2004). The chemical composition of some Lauraceae essential oils and their antifungal activities. "Phytother. Res." **18**(9): 713-717.
- Sinha S., Anderson J.P., Barbour R., Basi G.S., Caccavello R., Davis D., Doan M., Dovey H.F., Frigon N., Hong J., Jacobson-Croak K., Jewett N., Keim P., Knops J., Lieberburg I., Power M., Tan H., Tatsuno G., Tung J., Schenk D., Seubert P., Suomensaaari S.M., Wang S., Walker D., Zhao J., McConlogue L., John V. (1999a). Purification and cloning of amyloid precursor protein β -secretase from human brain. "Nature" **402**(6761): 537-540.
- Sinha S., Lieberburg I. (1999b). Cellular mechanisms of β -amyloid production and secretion. "PNAS" **96**(20) (28 September): 11049-11053.
- Sisodia S.S., Annaert W., Kim S.H., de Strooper B. (2001). Gamma-secretase: never more enigmatic. "Trends Neurosci." **24**(11): S2-S6.
- Sosa S., Altinier G., Politi M., Braca A., Morelli I., Della Loggia R. (2005). Extracts and constituents of *Lavandula multifida* with topical anti-inflammatory activity. "Phytomedicine" **12**(4): 271-277.
- Soto C. (1999). Plaque busters: strategies to inhibit amyloid formation in Alzheimer's disease. "Mol. Med. Today." **5**(8): 343-350.
- Stanton M.G., Stauffer S.R., Gregro A.R., Steinbeiser M., Nantermet P., Sankaranarayanan S., Price E.A., Wu G., Crouthamel M.C., Ellis J., Lai M.T., Espeseth A.S., Shi X.P, Jin L., Colussi D., Pietrak B., Huang Q., Xu M., Simon A.J., Graham S.L., Vacca J.P., Selnick H. (2007). Discovery of isonicotinamide derived b-secretase inhibitors: in vivo reduction of β -Amyloid. "J. Med. Chem." **50**(15): 3431-3433.

- Stewart K., Abad-Zapatero C. (2001). Candida proteases and their inhibition: prospects for antifungal therapy. "Curr. Med. Chem." **8**(8): 941-948.
- Strohl W.R. (2000). The role of natural products in a modern drug discovery program. "Drug Discov. Today" **5**(2): 39-41.
- Tandon A.A., Rogaeva E.A., Mullan M.B., St George-Hyslop P.H.A. (2000). Molecular genetics of Alzheimer's disease: the role of beta-amyloid and the presenilins. "Curr. Opin. Neurol." **13**(4): 377-384.
- Tang J., James M.N.G., Hsu I.N., Jenkins J.A., Blundell T.L. (1978). Structural evidence for gene duplication in the evolution of the acid proteases. "Nature" **271**(5646): 618-621.
- Tewtrakul S., Itharat A., Rattanasuwan P. (2006). Anti-HIV-1 protease- and HIV-1 integrase activities of Thai medicinal plants known as Hua-Khao-Yen. "J. Ethnopharmacol." **105**(1-2): 312-315.
- Towbin H., Staehelin T., Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. "PNAS" **76**(9): 4350-4354.
- Vandendool H., Kratz P.D. (1963). A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. "J. Chromatogr." **11**: 463-471.
- Vassar R., Bennett B.D., Babu-Khan S., Kahn S., Mendiaz E.A., Denis P., Teplow D.B., Ross S., Amarante P., Loeloff R., Luo Y., Fisher S., Fuller J., Edenson S., Lile J., Jarosinski M.A., Biere A.L., Curran E., Burgess T., Louis J.C., Collins F., Treanor J., Rogers G., Citron M. (1999). Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. "Science" **286**(5440) (22 October): 735-741.
- Verpoorte R. (1998). Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. "Drug Discov. Today" **3**(5): 232-238.

- Weyerstahl P., Marschall H., Thefeld K., Subba G.C. (1998). Constituents of the essential oil from the rhizomes of *Hedychium gardnerianum* Roscoe. "Flavour Fragr. J." **13**, 377-388.
- Wolfe M.S. (2008). Inhibition and modulation of gamma-secretase for Alzheimer's Disease. "Neurotherapeutics" **5**(3): 391-398.
- Yan R., Bienkowski M.J., Shuck M.E., Miao H., Tory M.C., Pauley A.M., J.R.Brashlerk, Stratman N.C., Mathews W.R., Buhlk A.E., Carter D.B., Tomasselli A.G., Parodil L.A., Heinrikson R.L., Gurney M.E. (1999). Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease β -secretase activity. "Nature" **402**(6761): 533-537.
- Yaniv Z., Bachrach U. (2005). "Handbook of Medicinal Plants." Haworth Press.
- Zai-Chang Y., Bo-Chu W., Xiao-Sheng Y., Qiang W. (2005). Chemical composition of the volatile oil from *Cynanchum stauntonii* and its activities of anti-influenza virus. "Colloids Surf. B Biointerfaces." **43**(3-4): 198-202.
- Zhang Z., ElSohly H.N., Jacob M.R., Pasco D.S., Walker L.A., Clark A.M. (2002). Natural products inhibiting *Candida albicans* secreted aspartic proteases from *Lycopodium cernuum*. "J. Nat. Prod." **65**(7): 979-985.

