



PREPARAÇÃO E SCREENING VIRTUAL DE UMA BIBLIOTECA DE COMPOSTOS DE BAIXO PESO MOLECULAR ORIUNDOS DE COGUMELOS CONTRA PROTEÍNAS DA FAMÍLIA BCL-2

Bianca Ferreira Borges

Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar no âmbito da dupla diplomação com a Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Orientadores

Prof. Dr. Rui Abreu
Prof. Dr. Rafael Porto Ineu

Bragança
2018



PREPARAÇÃO E SCREENING VIRTUAL DE UMA BIBLIOTECA
DE COMPOSTOS DE BAIXO PESO MOLECULAR ORIUNDOS DE
COGUMELOS CONTRA PROTEÍNAS DA FAMÍLIA BCL-2

Bianca Ferreira Borges

**Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção do Grau
de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar**

Orientadores

Rui Miguel Vaz de Abreu

Rafael Porto Ineu

Bragança

2018

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação aos meus pais, **Álvaro** e **Alessandra**, que sempre me apoiaram em todos os meus objetivos e não mediram esforços para eu realizar meus sonhos e aprendesse cada vez mais.

AGRADECIMENTOS

Gostaria primeiramente de agradecer a **Deus** por todas as bênçãos concedidas durante todo meu percurso acadêmico até os dias de hoje, me dando muita força, paciência e sabedoria para sempre ter boas escolhas e inclusive muita determinação para concretizar meus objetivos e alcançar sonhos que eram inalcançáveis em minha mente.

Aos meus pais **Álvaro** e **Alessandra**, meu padrasto **Roberto** e minha madrasta **Flávia**, meus irmãos **Lucas Henrique** e **Ana Beatriz**, que são meus principais incentivadores e que acreditaram também no meu potencial, me orientaram e ensinaram valores que levarei para vida toda. Aos meus avós **Mauro** e **Eleonor**, que são exemplos de pessoas para mim e que torceram muito para eu estar aqui hoje finalizando mais uma etapa da minha vida. A minha avó **Marisa** que está sempre em meu coração e me encorajou a conquistar sempre meus sonhos. Aos meus tios e tias, primos e primas por todo amor e confiança que depositaram em mim.

Um agradecimento especial ao meu padrasto **Roberto**, que é também meu pai de coração, meu tio e meu melhor amigo. Que me proporcionou ao longo de toda a minha trajetória momentos incríveis e que me orientou/ orienta, me da muita força para eu poder conquistar todos os meus sonhos da melhor maneira e que me ensinou valores como ser humano, profissional e filha que levarei por toda a minha vida. Devo muito a ele o lugar onde eu cheguei hoje.

Ao meu orientador do Instituto Politécnico de Bragança (IPB), professor **Rui Abreu** e da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), professor **Rafael Porto Ineu** por toda paciência, confiança e todos os ensinamentos compartilhados durante essa etapa muito importante em minha vida. Sou grata por terem me proporcionado o primeiro contato com área de Bioinformática que é muito desafiadora e apaixonante.

As minhas amigas **Estefânia**, **Naiara** e **Núbia** de Campo Mourão por toda paciência, incentivo e por terem me proporcionado momentos maravilhosos durante todos esses anos. Aos colegas do IPB pela recepção e carinho e a **Cláudia** que me auxiliou diretamente em minha tese de Mestrado.

A todos os **professores** que tive no decorrer da minha vida, que foram essenciais na minha formação e que contribuíram para eu construir todos os meus valores de hoje e por todos os conhecimentos proporcionados.

A minha prima **Brunna Carvalho** e seu marido **Nuno Carvalho** que foram minha família aqui em Portugal, que me acolheram, aconselharam e me incentivaram sempre a conquistar os meus sonhos.

A minha amiga **Jacqueline Carvalho** de Campo Mourão, que me acompanhou desde do início da minha graduação, me proporcionou grandes momentos e por inúmeros acontecimentos engraçados, todo apoio e ensinamentos que irei lembrar por toda a minha vida.

E a todos que direta ou indiretamente me acompanharam, aconselharam e auxiliaram a realizar este trabalho.

Por fim ao grupo BioChemCore que permitiu me a realização deste trabalho.

RESUMO

Os cogumelos apresentam uma grande diversidade na sua composição química, quer de compostos de alto peso molecular, quer compostos de baixo peso molecular (LMW-“Low Molecular Weight”). Devido a sua composição química os cogumelos apresentam inúmeras bioatividades, incluindo: atividade antioxidante, antitumoral, antimicrobiana entre outras. A atividade antitumoral de cogumelos tem sido associada a presença de polissacarídeos nos cogumelos, no entanto ha uma crescente base de conhecimento que mostra que compostos LMW também tem um papel essencial na atividade antitumoral de diferentes espécies de cogumelos. Neste trabalho começou-se por realizar uma pesquisa bibliográfica, de forma a selecionar compostos LMW, presentes em diferentes espécies de cogumelos e associados de alguma forma a uma atividade antitumoral. No total selecionaram-se 115 compostos que formaram a nova biblioteca LMW 2.0, que foi cuidadosamente preparada para estudos *in silico*.

Em uma segunda parte do trabalho foram realizados estudos de screening virtual da biblioteca LMW 2.0 utilizando o software de docking molecular AutoDock 4.0, de forma a tentar estimar quais os compostos da biblioteca que poderão ser os melhores inibidores de 3 proteínas da família Bcl-2: a Bcl-2 (linfoma de célula B 2), a Bcl-XL (linfoma de células B extra grandes) e a MCL-1 (leucemia mieloide-1). Estas proteínas foram escolhidas pois estão envolvidas nas vias de sinalização da apoptose promovendo a sua inibição, sendo atualmente conhecidos alvos terapêuticos em processo tumorais. Assim este trabalho teve como objetivo tentar identificar compostos LMW, presentes em cogumelos, que possam potenciar a apoptose tumoral, interagindo com a família Bcl-2 de proteínas anti-apoptóticas.

No geral a proteína MCL-1 parece ser mais sensível aos compostos da biblioteca LMW 2.0, com valores de K_i (constante de inibição) estimados mais baixos, variando entre 17,1 nM e 64,7 nM para os dez melhores compostos. De seguida os melhores resultados foram obtidos para a Bcl-XL com valores entre os 51,5 e 185,6 nM e finalmente os resultados menos interessantes foram da Bcl-2 com valores de K_i entre 140,7 nM e 281 nM. Os compostos glicosilados apresentaram no geral uma melhor capacidade inibidora estimada. A visualização em detalhe das conformações de interação previstas mostra que a melhor capacidade inibidora dos compostos glicosilados fica provavelmente a dever-se à interação da glucose com alguns aminoácidos polares que formam a orla exterior do centro ativo das proteínas em estudo.

Palavras chave: Screening Virtual, Docking Molecular, Família Bcl-2, LMW.

ABSTRACT

Mushrooms exhibit great diversity in their chemical composition, both in high molecular weight compounds and in low molecular weight (LMW) compounds. Due to their chemical composition mushrooms have numerous bioactivities, including: antioxidant, antitumor, antimicrobial and others. The antitumor activity of mushrooms has been associated with the presence of polysaccharides in mushrooms, however a growing knowledge base as emerged showing that LMW compounds also play an essential role in the antitumor activity of different species of mushrooms. In this work, a bibliographical research was performed in order to select LMW compounds, present in different species of mushrooms, and associated in some way with an antitumor activity. In total, 115 compounds were selected establishing the new LMW 2.0 library. These compounds were carefully prepared for *in silico* studies and will be made available to the scientific community.

In a second part of the work, virtual screening studies of the LMW 2.0 library were performed using AutoDock 4.0 molecular docking software, in an attempt to estimate which library compounds may be the best inhibitors of Bcl-2 family proteins: a Bcl-2 (B-cell lymphoma 2), Bcl-XL (extra-large B-cell lymphoma) and MCL-1 (myeloid leukemia-1). These proteins were chosen because they are involved in the apoptosis signalling pathways promoting apoptosis inhibition, and are currently known therapeutic targets in several tumor types. Thus, this work aims to identify LMW compounds, present in mushrooms, which could potentially promote tumoral apoptosis by interacting with the Bcl-2 family of anti-apoptotic proteins.

Overall the MCL-1 protein appears to be more sensitive to LMW 2.0 library compounds with lower estimated K_i (inhibition constant) values, ranging from 17.1 nM to 64.7 nM for the top ten compounds. The best results were then obtained for Bcl-XL with values between 51.5 and 185.6 nM and finally the less interesting results were Bcl-2 with K_i values between 140.7 nM and 281 nM. Glycosylated compounds generally presented better estimated inhibitory capacity. The detailed visualization of predicted interaction conformations shows that the best inhibitory capacity of the glycosylated compounds is probably due to the interaction of glucose with several polar amino acids that form the outer edge of the active centre of the proteins under study.

Key words: Virtual Screening, Molecular Docking, Bcl-2 Family, Low molecular weight compound.

Lista de Figuras

Figura 1: Estrutura tridimensional da Bcl-2 (esquerda) (PDB: 4IEH com o ligando co-cristalizado do tipo nitrobenzenosulfonamida) e estrutura em espiral da proteína Bcl-2, com o código no PDB de 4IEH (direita).....	10
Figura 2: Processo de apoptose e a interação entre proteínas pertencentes a 3 tipos de proteínas da família Bcl-2. Família anti-apoptótica: MCL-1; Bcl-B (B Cell Lymphoma), Bcl-XL and Bcl-W. Família ativadora pró-apoptótica: PUMA (p53 upregulated modulator of apoptosis); BID (BH3 interacting-domain); BIM (Bcl-2-like protein); BAD (Bcl-2-associated death promoter); NOXA (Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein Família efetora pró-apoptótica: BAX (BCL2-Associated X Protein); BAK (Bcl-2 homologous antagonist/killer).	11
Figura 3: Cluster realizado para os estudos de docking molecular da biblioteca LMW 2.0.	21
Figura 4: Esteroides que formam a biblioteca LMW 2.0.....	25
Figura 5: Continuação dos esteroides que compõem a biblioteca LMW 2.0.	26
Figura 6: Quinonas, hidroquinonas e terpenos que formam a biblioteca LMW 2.0.....	29
Figura 7: Aminas, amidas, isoflavonas, flavonas, catecóis, fenóis, ácidos gordos, alcalóides e aldeídos que formam a biblioteca LMW 2.0.....	30
Figura 8: Representação do peróxido de ergosterol (32) em 2D (esquerda) realizado no Marvin Sketch e em 3D feito no Pymol (direita).....	31
Figura 9: Correlação entre os valores de pKi experimental e estimado, obtido usando AD4 para os inibidores co-cristalizados presentes nas 4 estruturas selecionadas do PDB para a proteína Bcl-2.....	35
Figura 10: Correlação entre os valores de pKi Experimental e pKi Estimado, obtido utilizando AD4, com as todas as estruturas selecionadas (A) e após a remoção das estruturas 3WIZ e 3QKD(B).....	37
Figura 11: Correlação entre os valores de pKi Experimental e pKi Estimado, obtido utilizando AD4, com as estruturas cristalizadas selecionadas da MCL-1 (A).	39
Figura 12: Conformação de ligação prevista do top 3 dos compostos da biblioteca LMW 2.0 contra a Bcl-XL. Os compostos estão representados na cor verde em formato “sticks and balls”: (A)- Glucosídeo Egnol (54); (B)- Hericerina H (48) e (C)- (3 β ,5 α ,8 α ,22E)-5,8-epidioxiergosta-6,22-dien-3-il- β -D-glucopiranosídeo (3). As pontes de hidrogénio são representadas a amarelo tracejado.....	46
Figura 13: Conformação de ligação prevista do top 3 dos compostos da biblioteca LMW 2.0 contra a MCL-1. Os compostos estão representados na cor verde em formato “sticks and balls”: (A)- (22E)-5 α ,6 α -epoxiergosta-8,14,22-trien-3 β ,7 β -diol (9); (B)- Ganodermanondiol (a20c) e (C)- (22E)-19-norergosta-5,7,9,22-tetraen-3 β -ol (7). As pontes de hidrogénio são representadas a amarelo tracejado.....	48

Lista de Tabelas

Tabela 1: Compostos LMW com potencial antitumoral isolado de cogumelos da biblioteca LMW 1.0.....	6
Tabela 2: Enumeração da quantidade de pequenos compostos presentes em diferentes bibliotecas virtuais.....	13
Tabela 3: Coordenadas X, Y e Z utilizada para definir o ponto de origem do grid para cada proteína.....	19
Tabela 4: Esteroides que compõem a biblioteca de compostos LMW 2.0 presentes nos cogumelos.....	23
Tabela 5: Compostos que formam a biblioteca de compostos LMW 2.0 presentes em cogumelos.....	27
Tabela 6: Estruturas experimental da proteína Bcl-2 presentes no Protein Data Bank.....	33
Tabela 7: Estruturas experimentais da proteína Bcl-XL presentes no Protein Data Bank.....	33
Tabela 8: Estruturas experimentais da proteína MCL-1 presentes no Protein Data Bank.....	34
Tabela 9: Resultado dos cross-docking e re-docking usando as estruturas cristalizadas da Bcl-2, realizado por AD4.....	35
Tabela 10: Re-docking e cross-docking com o AD4 utilizando as estruturas cristalizadas da Bcl-XL selecionadas.....	37
Tabela 11: Re-docking e cross-docking com o AD4 utilizando as estruturas cristalizadas escolhidas da Bcl-XL, após a remoção da 3WIZ e 3QKD.....	37
Tabela 12: Re-docking e cross-docking com o AD4 utilizando as estruturas cristalizadas da MCL-1 selecionadas.....	38
Tabela 13: Resultados dos cross-docking e re-docking usando as estruturas cristalizadas da MCL1, aplicado por AD4 após a retirada das estruturas 3WIX e 4WGI.....	39
Tabela 14: Screening Virtual da biblioteca LMW 2.0 contra a proteína Bcl-2: indicação dos 10 compostos com melhor Ki estimado.....	40
Tabela 15: Screening Virtual da biblioteca LMW 2.0 contra a proteína Bcl-XL: indicação dos 10 compostos com melhor Ki estimado.....	41
Tabela 16: Screening Virtual da biblioteca LMW 2.0 contra a proteína MCL-1: indicação dos 10 compostos com melhor Ki estimado.....	42

Lista de Abreviaturas

ΔG	Energia de ligação
3D	Três dimensões
Å	Angström
AD4	AutoDock 4
ADT	AutoDock Tools
BAD	Promove a morte da célula associado a Bcl-2
Bak	Antagonista/assasino Bcl-2
Bax	Proteína associada Bcl-2
Bcl-2	Linfoma de células B 2
Bcl-W	Proteína 2 como Bcl-2
Bcl-XL	Linfoma de células B extra grande
BH	Homólogo da proteína Bcl-2
BID	Domínio de interação BH3
BIM	Proteína 11 como Bcl-2
CA	Clavictona A
CB	Clavictona B
CD	Clavictona D
Cdc2	Proteína quinase dependente de ciclina 1
COX-2	Inibidor da ciclo oxigenase
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
Formato pdbqt	Formato Protein Data Bank, carga (q) e tipo de átomo (t)
Formato sdf	Formato Structure data file
HMW	Compostos de alto peso molecular
HTS	Screening de alto rendimento
<i>In silico</i>	Métodos realizados por simulações computacionais
Ki	Constante de inibição
LBVS	Screening Virtual baseado no ligando
LMW	Compostos de baixo peso molecular

MCF7	Linhagem de cancro de mama
MCL-1	Leucemia de células mielóides 1
nM	Nanomolar
PDB	Protein Data Bank
Pki	$-\log_{10}K_i$, diferença entre os valores experimentais e estimados de K_i
PKC β	Proteína quinase C beta
PubChem	Banco de dados de compostos químicos
PUMA	Modulador de apoptose p53
RMN	Ressonância magnética nuclear
RNA	Ácido ribonucleico
SBVS	Screening Virtual baseado na estrutura
TM	Domínio transmembranar
Vina	AutoDock Vina
VS	Screening Virtual

ÍNDICE

RESUMO	iv
ABSTRACT	v
Lista de Figuras	vi
Lista de Tabelas.....	vii
Lista de Abreviaturas.....	viii
1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	1
1.1 Motivações e objetivos	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1 Importância dos cogumelos	2
2.1.1 Bioatividades conhecidas de cogumelos	3
2.2. Composição química dos cogumelos (LMW e HMW).....	5
2.2.1 Compostos de alto peso molecular (HMW) nos cogumelos	5
2.2.2 Compostos de baixo peso molecular (LMW) nos cogumelos.....	6
2.3 A família das proteínas Bcl-2 como alvo terapêutico.....	7
2.3.1 Apoptose celular.....	8
2.3.2 A família das proteínas Bcl-2.....	9
2.4. Ferramentas <i>in silico</i> de modelação molecular.....	12
2.4.1. Representação química de pequenos compostos: bibliotecas virtuais	13
2.4.2. Screening virtual de bibliotecas de compostos utilizando docking molecular.....	14
3. METODOLOGIA	17
3.1 Preparação da biblioteca LMW 2.0 de 115 compostos	17
3.2 Preparação para docking molecular das estruturas 3D das proteínas em estudo.....	18
3.3 Re-Docking e Cross-Docking dos ligandos co-cristalizados contra as estruturas 3D das proteínas da família Bcl-2	18
3.4 Screening virtual da biblioteca LMW 2.0 contra as proteínas da família Bcl-2.....	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	22
4.1 Preparação da biblioteca virtual de compostos LMW 2.0 presente em cogumelos...22	22
4.2 Screening Virtual da biblioteca LMW 2.0.....	31
4.2.1 Seleção de estruturas 3D das proteínas Bcl 2, Bcl-XL e MCL-1	32
4.2.2. Re-docking e Cross-Docking das proteínas Bcl-2, Bcl-XL e MCL-1	34
4.2.3 Screening Virtual da biblioteca LMW 2.0 contra a Bcl-2, Bcl-XL e MCL-1	40
4.2.4. Análise estrutural da conformação de ligação dos compostos com melhor potencial inibidor da Bcl-2, Bcl-XL e MCL-1.....	42
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS.....	49
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
ANEXOS	67

1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1 Motivações e objetivos

Os estudos *in silico* de modelação molecular fornecem informações importantes para a compreensão e análise da estrutura tridimensional de diferentes compostos, bem como o estudo de possíveis interações entre estes compostos. As técnicas de modelação molecular têm sido muito usadas como técnicas de auxílio ao processo do desenvolvimento de novos fármacos. Estes métodos computacionais de modelação molecular incluem estudos de minimização de energia e otimização geométrica de compostos, análise conformacional da estrutura de compostos, estudos de docking molecular e simulações de dinâmica molecular entre outros.

Neste trabalho utilizaram-se algumas das técnicas de modelação molecular para, numa primeira fase preparar uma biblioteca de compostos de baixo peso molecular (LMW-“Low Molecular Weight”), presentes em cogumelos, e de seguida realizaram-se estudos *in silico* de docking molecular de forma a testar os compostos selecionados como potenciais inibidores de 3 proteínas da família das Bcl-2: a Bcl-2, a Bcl-XL e a MCL-1.

Estas proteínas, assim como praticamente todas as proteínas da família Bcl-2, estão envolvidas na regulação do processo de apoptose celular que ocorre normalmente no organismo. No entanto foram selecionadas estas 3 pois sabe-se que estão relacionadas com processos tumorais em que ha uma regulação anormal das vias de sinalização celular envolvidas na apoptose. De facto, estas proteínas estão referenciadas como proteínas-alvo no desenvolvimento de novos fármacos anti-tumorais tendo como objetivo ativar a apoptose tumoral. Em virtude disso, o objetivo geral do presente trabalho é descobrir compostos de baixo peso molecular presentes em cogumelos que possam estar promovendo a angiogênese tumoral, interagindo com a família Bcl-2 de proteínas anti-apoptóticas e os objetivos específicos são:

- a) Seleção e preparação de uma biblioteca de compostos LMW 2.0 presentes em cogumelos;
- b) Seleção e preparação das estruturas tridimensionais de membros da família de proteínas Bcl-2: Bcl-2, Bcl-XL e MCL-1;
- c) Screening virtual da biblioteca de compostos LMW, contra as estruturas selecionadas das proteínas Bcl-2, Bcl-XL e MCL-1 utilizando docking molecular.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Importância dos cogumelos

O consumo de cogumelos é uma antiga tradição dos países asiáticos, principalmente na China, onde começaram a ser cultivados cerca de 600 anos a.C, a partir da espécie *Auricularia auricula*, também conhecida como orelha de pau (AIDA et al., 2009).

Dentre as espécies conhecidas de fungos, 12.000 são classificadas como cogumelos, sendo que destas pelo menos 2.000 espécies são comestíveis. Aproximadamente 35 espécies são cultivadas comercialmente e 20 são cultivadas em escala industrial. O cogumelo mais cultivado no mundo é do tipo *Agaricus bisporus* (champignon), seguido do *Lentinus edodes* (shiitake), *Pleurotus spp* (cogumelo ostra), *Auricularia auricula* (cogumelo orelha de pau) e *Volvariella volvacea* (cogumelo palha) (APUD SANCHEZ, 2004).

Os cogumelos possuem grande importância na indústria alimentar, mas também podem ser usados pela indústria farmacêutica como matéria-prima para o desenvolvimento de novos fármacos.

Consumidos devido à sua textura, aroma e sabor, os cogumelos são uma excelente escolha tanto pelo seu valor nutricional quanto pelas suas propriedades medicinais (VALVERDE; HERNÁNDEZ-PÉREZ; PAREDES-LÓPEZ, 2013). Podem ser encontrados no comércio na forma natural ou processada (conservas ou desidratados) e, dependendo das condições de processamento e de estocagem, podem ocorrer variações na sua composição (PAULI, 2010).

Em peso seco, os cogumelos contêm grandes quantidades de hidratos de carbono (~60%), fibras (~34%) e proteínas (~23%), incluindo todos os aminoácidos essenciais e, em menores quantidades, minerais e algumas vitaminas como riboflavina, niacina e folato (MATTILA; SUONPAA; PIIRONEN, 2000) além de baixos teores de lipídeos (~5%). Esses valores variam muito de acordo com o substrato usado, as condições de cultivo e frutificação e o estágio de desenvolvimento do cogumelo (MATTILA et al., 2001).

Nos últimos anos, muita atenção tem sido dada aos efeitos fisiológicos provocados pelos alimentos, devido à crescente preocupação dos consumidores com a sua saúde. Os consumidores

procuram substituir substâncias artificiais por fontes naturais de nutrientes como ervas e plantas, normalmente na forma de suplementos dietéticos, nutracêuticos e alimentos funcionais (ARIHARA, 2006).

Os cogumelos podem ser considerados alimentos nutracêuticos porque estudos comprovam a sua eficácia quando consumidos como suplementos dietéticos produzidos a partir da extração dos princípios ativos (FORTES; NOVAES, 2005).

Dentre os nutrientes funcionais estão alguns oligossacarídeos fermentáveis, que são classificados como alimentos prebióticos, que permitem alteração na composição e atividade da microbiota gastrointestinal, conferindo benefícios à saúde como redução do cancro do cólon, diminuição da absorção de colesterol pela corrente sanguínea e queda na incidência de diabetes (GIBSON et al., 2004). Os cogumelos são fontes de prebióticos porque contêm hidratos de carbonos como quitina, hemicelulose, β e α -glucanas, mananas, galactanas e xilanas. A quitina é um polissacarídeo insolúvel em água e, por não ser hidrolisada pelas enzimas do organismo humano, confere aos hidratos de carbonos de cogumelos, a característica de prebiótico (AIDA et al., 2009).

Nesse contexto, os cogumelos têm sido utilizados para estimular a imunidade, melhorar a qualidade de vida dos diabéticos, evitar riscos de doenças tais como a osteoporose e a úlcera gástrica e agir como antioxidante efetivo (GUTERREZ et al., 2004). Porém, mais estudos sobre estas propriedades biológicas ainda são necessários.

2.1.1 Bioatividades conhecidas de cogumelos

Devido à sua composição química variada, foram observados e estudados vários efeitos dos cogumelos. Estas atividades benéficas incluem atividade antitumoral, antioxidante, imunomoduladora, antihipercolesterolêmica, anti-bacteriana, anti-fúngica, anti-inflamatória, anti-viral e anti-diabética entre outras (VALVERDE, HERNÁNDEZ-PÉREZ e PAREDES-LÓPEZ, 2013; WASSER, 2014).

De acordo com Fortes e Novaes (2007) há evidências científicas que apontam que as β -glucanas exercem atividade antitumoral; as β -proteoglucanas, atividade antitumoral, antiviral e anti-trombocítica; a lecitina exerce propriedade antitumoral, antimutagênica e hemaglutinizante; o ergosterol funciona como anticarcinogênico e inibidor da angiogênese; o ácido linoléico como

bactericida; os esteróides atuam contra os tumores; arginina como anticarcinogênico e glutamina com efeitos anti-oxidantes, entre outros.

Os cogumelos possuem diferentes compostos oriundos do metabolismo secundário, como compostos fenólicos, poliacetídeos, triterpenóides e esteróides que são específicos para cada tipo de cogumelos e têm diferentes efeitos em humanos. Muitos desses compostos têm sido usados no tratamento de muitos problemas de saúde, incluindo o cancro (FERREIRA et al., 2010).

De acordo com Smith, Rowen e Sullivan (2012), o mecanismo da ação antitumoral ainda não é totalmente conhecido, mas pesquisadores acreditam que esses polissacarídeos estimulam a produção de muitos tipos de células do sistema imunitário, agindo como imunomoduladores, podendo regular a resposta imune tanto positivamente quanto negativamente.

Muitos estudos concluíram que os cogumelos comestíveis possuem potentes antioxidantes. Os antioxidantes encontrados nos cogumelos são principalmente compostos fenólicos (ácidos fenólicos e flavonóides), seguido por tocoferóis, ácido ascórbico e carotenóides. Essas moléculas foram quantificados em muitas espécies diferentes principalmente na Finlândia, Índia, Coréia, Polônia, Portugal, Taiwan e Turquia (FERREIRA; BARROS; ABREU, 2009). Os antioxidantes são compostos com potencial de neutralizar os radicais livres, retardando ou inibindo a ação de oxidação. Os antioxidantes necessitam estar em quantidades suficientes para neutralizar os efeitos tóxicos dos radicais livres que são constantemente produzidos.

Os cogumelos, como outros organismos segregam compostos antimicrobianos para sobreviver e prosperar no meio ambiente; incluindo compostos de baixo peso molecular tais como terpenos, esteróides, antraquinonas, derivados de ácido benzoico e quinolonas; e (ii) compostos de alto peso molecular, principalmente peptídeos e proteínas (ALVES et al., 2012). Apesar de esta propriedade estar provada, a produção de antibióticos ainda é realizada tendo como base compostos isolados de micro fungos (KORZYBSKI; KOWOWSZYK-GINDIFER; KURYLOWICZ., 2013). Apesar da grande variedade de antibióticos existentes (por exemplo, aminoglicosídeos, beta-lactâmicos, oxazolidinonas, lincosamidas e quinolonas; GUARLERZI et al., 2013), relataram-se uma grande resistência a esses antibióticos devido ao uso inadequado dos mesmos. Por isso, o desenvolvimento de antibióticos tem sido um dos desafios científicos mais

importantes, podendo os cogumelos ser uma fonte interessante para a descoberta de novos antibióticos.

2.2. Composição química dos cogumelos (LMW e HMW)

Há muitos compostos identificados em cogumelos com bioatividades conhecidas, principalmente actividade antioxidante, antitumoral, antimicrobiana entre outras. Os compostos identificados em cogumelos são geralmente separados em dois grandes grupos: os de baixo peso molecular (LMW – “Low Molecular Weight”, por exemplo quinonas, cerebrosídeos, isoflavonas, catecóis, aminas, terpenos, esteroides entre outros) e os de elevado peso molecular (HMW – “High Molecular Weight”, por exemplo homo e heteroglicanos, glicano, glicoproteínas, glicopeptídeos, proteoglicanos, proteínas e complexos RNA-proteína) (ATTARAT; PHERMTHAI, 2015). Quer os compostos LMW, quer os compostos HMW podem estar envolvidos na actividade antitumoral dos cogumelos.

2.2.1 Compostos de alto peso molecular (HMW) nos cogumelos

Os compostos HMW com potencial antitumoral são estruturalmente caracterizados por possuir cadeias longas que incluem homo e hetero polissacarídeo, glicoproteínas, glicopeptídeos, proteínas e complexos de RNA-proteína (PATEL; GOYAL, 2012)

Atualmente, são comercializados diversos produtos derivados dos cogumelos incluindo: Cogumelo do sol® (*Agaricus sylvaticus*), Agaricus JUN-17® (*Agaricus blazei*), Lentinan® (*Lentinus edodes*), Krestin® (*Trametes versicolor*), Schizophyllan® (*Schizophyllum communis*), Grifron® Maitake (*Grifola frondosa*), Reishi® (*Ganoderma lucidum*), entre outros. (FORTES; NOVAES, 2007).

A actividade antitumoral dos cogumelos foi associada a polissacarídeos existentes na parede celular do corpo de frutificação dos mesmos que inibem o crescimento de tumores. Neste caso o polissacarídeo mais importante conhecido é a Beta-glucana, que potencializa o sistema imunológico, aumentando as defesas naturais do corpo. Nos cogumelos, ela é constituída por monossacarídeos de D-glicose unidos por ligações glicosídeas $\beta(1\rightarrow3)$ e $\beta(1\rightarrow6)$ (MANZI, 2000).

2.2.2 Compostos de baixo peso molecular (LMW) nos cogumelos

Os cogumelos são considerados uma fonte importante de compostos com propriedades antitumorais (VAZ et al., 2010; RUSSELL; PATERSON, 2006). Vários compostos de baixo peso molecular tais como quinonas, isoflavonas, catecois, aminas, triacilgliceróis e esteróides, foram isolados dos cogumelos e provaram ter algum tipo de atividade antitumoral (FERREIRA et al., 2010; MORADALI et al., 2007).

No artigo de revisão de Ferreira et al, (2010) foram referenciados mais de 40 compostos LMW presentes em cogumelos com algum tipo de atividade antitumoral. Destes compostos foram selecionados 40, que formaram uma primeira biblioteca de compostos LMW presentes em cogumelos (que vamos chamar nesta tese biblioteca LMW 1.0) e que foi já utilizada em diferentes estudos *in silico* de modelação molecular (KHELIFA, 2016; FROUFE; ABREU; FERREIRA, 2012), utilizando diferentes proteínas alvo. A biblioteca LMW 1.0 está apresentada na tabela 1 e vai servir de base para uma nova biblioteca mais alargada de compostos LMW presentes em cogumelos, que vamos chamar biblioteca LMW 2.0. Nesta biblioteca estendida LMW 2.0 vamos incluir novos compostos, que entretanto foram referenciados na literatura desde 2010, como estando presentes em cogumelos e tendo algum tipo de atividade antitumoral.

Tabela 1: Compostos LMW com potencial antitumoral isolado de cogumelos da biblioteca LMW 1.0.

Família do composto	Composto	Bioatividades
Quinonas e hidroquinonas	Panedoxina (a1)	Inibidor NF-kB
	Cicloepoxidol (a2)	
	Clavilactonas CA (a3c)	Inibidor da proteína tirosina quinase
	Clavilactonas CB (a3a)	
	Clavilactonas CD (a3b)	
	Quinona 490 (a4)	Inibidor da DNA polimerase
	Hidroquinona (a5)	Inibidor da matriz metalloproteinase (MMPs)
Isoflavonas Catecóis	Genistein (a7)	Modulador quinase Cdc2
	Hispidin (a8)	Inibidor da PKCB
	Gerronemins A (a9a)	Inibidor da Ciclo-OXigenase-2 (COX-2)
	Gerronemins B (a9b)	
	Gerronemins C (a9c)	
	Gerronemins D (a9d)	
	Gerronemins E (a9e)	
Gerronemins F (a9f)		

Aminas e amidas	2-Aminofenoxazin-3-ona (a10)	Inibidor da aromatase
	Putrescina-1,4-dicinamida (a11)	Induz à apoptose
Sesquiterpenos	Illudin S (a13a)	Agente de alquilação de DNA
	Illudin M (a13b)	
Esterois	5,6-Epoxi-24(R)-metilcolesta-7,22-dien-3 β -ol (a14c)	Inibidor da sulfatase
	Ergosterol (6b)	Inibidor da Cicloxigenase
	Ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona (a16)	
	Ácido Lucidênico O (a17a)	Inibidores da DNA polimerase α , β
	Lactona Lucidênica (a17b)	
	Cervisterol (a18)	Inibição da DNA polymerase α
	Lucidumol A (a19)	Atividade anticancerígena contra algumas linhas celulares
	Lucidumol B (a20a)	
	Ganoderiol F (a20b)	
	Ganodermanondiol (a20c)	
	Ganodermanontriol (a20d)	
	Ácido Ganodérico A (a21a)	Inibidor da proteína NF-KB e AP-1
	Ácido Ganodérico F (a21b)	Prevenção da invasão de células metastáticas
	Ácido Ganodérico W (a22)	Inibidor da DNA topoisomerase
	Ácido Ganodérico X (a23a)	
	Ácido Ganodérico Y (a23b)	
	Ácido Ganodérico T (a23c)	
	Ácido Poliporênico C (a24)	Inibidor MMPs
	Ácido Dehidroebriônico(a25)	Inibidor da DNA topoisomerase II
	Ácido Fomitelico A (a26a)	Inibidor da DNA polimerase α and β
Ácido Fomitelico B (a26b)		

Fonte: Khelifa. (2016) Compostos de baixo peso molecular de cogumelos com potencial para inibir a Bcl-2. Estudos de Docking e Screening Virtual, 36, Figura 13.

2.3 A família das proteínas Bcl-2 como alvo terapêutico

Um dos processos biológicos que é fortemente regulados na célula é a apoptose. Um grande número de proteína está envolvida nos processos de biosinalização que regulam a apoptose e estas proteínas normalmente exercem a sua atividade por intermédio de interações proteína-proteína. Os membros da família de proteínas Bcl-2, estão muito envolvida na regulação da apoptose, sendo que o membro mais estudado desta família é a proteína Bcl-2 que, por ser a mais estudada como alvo terapêutico, é a proteína que dá o nome à família (KANG; REYNOLDS, 2009).

2.3.1 Apoptose celular

A apoptose é um processo de morte celular programada que ocorre naturalmente em organismos multicelulares, quer no seu desenvolvimento quer no funcionamento normal do organismo adulto. De facto a apoptose celular é indispensável ao bom funcionamento dos organismos e ocorre continuamente de forma controlada.

Uma vez ativada, a apoptose começa por um processo de retração da célula que causa perda da aderência com a matriz extracelular e células vizinhas. Os organelos celulares mantêm a sua morfologia, com exceção, em alguns casos, das mitocôndrias que podem apresentar rutura da membrana externa. A cromatina sofre condensação e concentra-se junto à membrana nuclear que se mantêm intacta. A seguir, a membrana celular forma prolongamentos e o núcleo desintegra-se em fragmentos envoltos pela membrana nuclear. Os prolongamentos da membrana celular aumentam de número e tamanho e rompem, originando estruturas contendo partes do conteúdo celular designadas corpos apoptóticos. Os corpos apoptóticos são rapidamente fagocitados por macrófagos e removidos sem causar um processo inflamatório (ZIEGLER; GROSCURTH, 2004). Outra característica muito marcante da morte celular por apoptose é a fragmentação internucleossômica do DNA, a qual possui um padrão característico. Uma endonuclease é ativada e produz fragmentos de DNA de tamanhos variáveis, mas sempre múltiplos de 200 pares de base (SARASTE; PULKKI, 2000).

De uma forma geral podemos dizer que a apoptose é um processo biológico normal que permite a remoção de células supérfluas, infectadas ou danificadas (SULSTON; HORVITZ, 1997; CLAVERÍA et al., 2013). O programa de apoptose fragmenta a célula em vesículas que posteriormente são removidas por fagocitose, protegendo células vizinhas de conteúdos celulares potencialmente nocivos (KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972). A apoptose é o mecanismo de defesa dominante contra o desenvolvimento de tumores e essencial para imunidade, desenvolvimento e a homeostasia de tecidos (HOTCHKISS et al., 2009).

Há dois meios diferentes de indução na morte por apoptose: indução por estímulos extracelulares (extrínseca) e indução intracelular (intrínseca). A indução extracelular de apoptose pode acontecer através dos linfócitos assassinos. A indução de apoptose intracelular acontece quando as células estão danificadas ou estressadas. Todos os acontecimentos relacionados ao

processo é melhor compreendido com a participação da mitocôndria. As mitocôndrias são induzidas a liberar a proteína carreadora de elétrons citocromo c para o citosol. No citosol o citocromo c se liga a uma proteína adaptadora chamada Apaf-1. A Apaf-1 ativada se liga a moléculas procaspases-9 gerando um agregado destas procaspases. Logo em seguida as procaspases-9 são clivadas e ativadas, e seguem ativando outras procaspases gerando uma cascata e a morte celular (LIMA; DUARTE; SÁ, 2010).

2.3.2 A família das proteínas Bcl-2

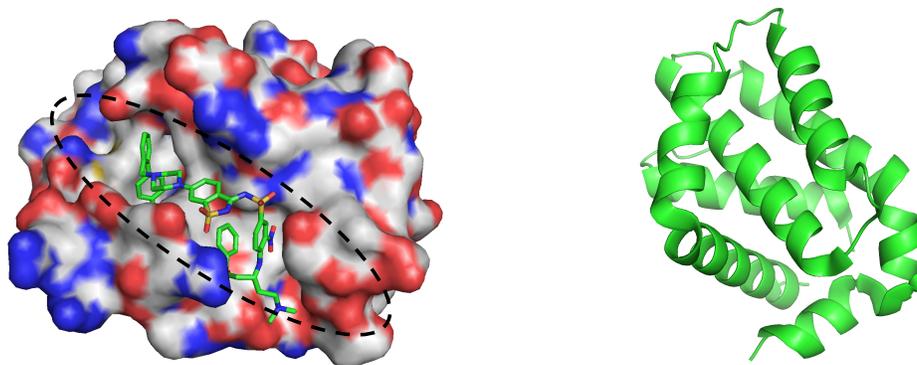
A família Bcl-2 é uma família de proteínas indutoras e repressoras da apoptose, que participam ativamente na regulação da mesma (BORNER, 2002). Parte dos membros da família Bcl-2, incluindo as proteínas Bcl-2, Bcl-XL e MCL-1 inibem a apoptose, pois previnem a liberação do citocromo c e são chamados de reguladores anti-apoptóticos. Por outro lado, outros membros da família Bcl-2, incluindo as proteínas Bax, Bid e Bak são proteínas pró-apoptóticas (HENGARTNER, 2000). A homeostasia em relação ao processo de apoptose é mantida pelo controle da quantidade de proteínas anti-apoptóticas e pró-apoptóticas. Estímulos como por exemplo danos no DNA, levam a um aumento na expressão de proteínas pró-apoptóticas. Esse desequilíbrio induz a apoptose (PETROS et al., 2004).

As proteínas da família Bcl-2 atuam no processo de regulação da apoptose formando dímeros entre duas proteínas iguais (homodímeros) ou com outros membros da família Bcl-2 (heterodímeros). Estas interações proteína-proteína são parte integrante do mecanismo de regulação da apoptose, podendo sinalizar uma resposta anti ou pró-apoptótica (KELEKAR et al., 1997). No conjunto, as proteínas da família Bcl-2 estão intimamente relacionadas com a tomada de decisão celular de iniciar ou não o processo de apoptose.

Entre as proteínas mais estudadas, desta família, estão a Bax (pró-apoptótica) e a Bcl-2 (anti-apoptótica), apresentada na na figura 1, a qual é sobreexpressa em adenomas e carcinomas colorretais (BRONNER et al., 1995). A proteína Bcl-2 foi inicialmente descoberta sobreexpressa em situações de leucemia linfoblástica aguda (PEGORARO et al., 1984) e mais tarde foi demonstrada a sua habilidade para proteger as células da morte celular programada (VAUX; CORY; ADAMS, 1988). Desde então, muitas proteínas da família Bcl-2 com atividades anti-apoptóticas foram descobertas, entre elas a Bcl-XL (linfoma de células B - extra-grande), Bcl-

W(Proteína 2 do tipo Bcl-2), Bcl-B (proteína 10 do tipo Bcl-2) e MCL-1 (leucemia de células mieloides-1) entre outras.

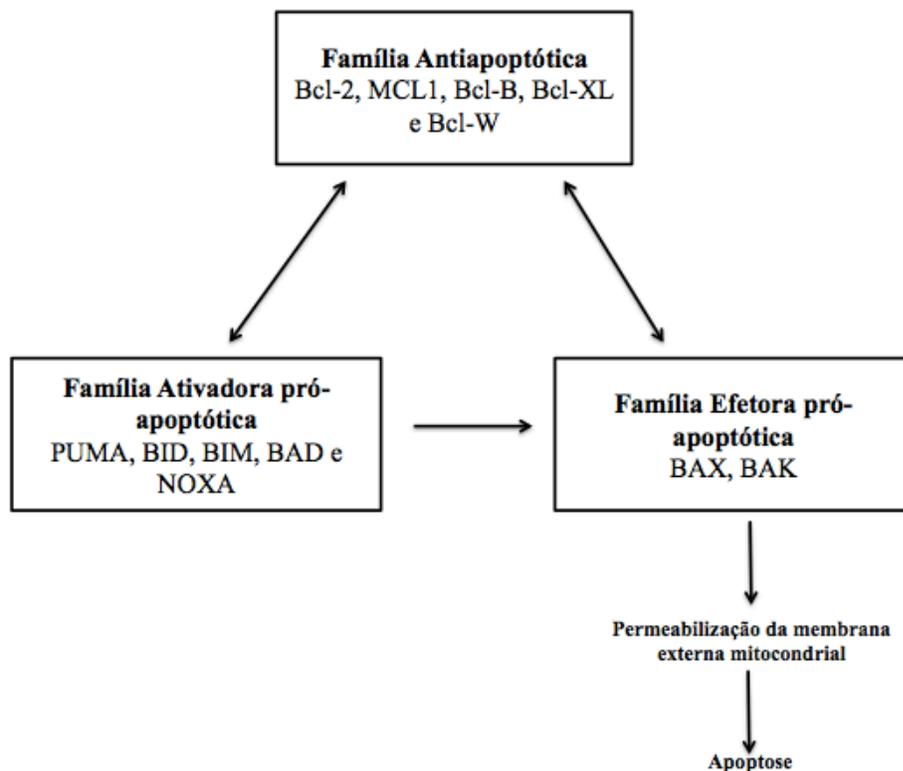
Figura 1: Estrutura tridimensional da Bcl-2 (esquerda) (PDB: 4IEH com o ligando co-cristalizado do tipo nitrobenzenosulfonamida) e estrutura em espiral da proteína Bcl-2, com o código no PDB de 4IEH (direita)



Estruturalmente as proteínas da família Bcl-2 partilham uma estrutura comum que abrange um conjunto de 9 hélices- α . Em solução as proteínas da família Bcl-2 enrolam-se à volta de um centro hidrofóbico, formando desta forma um sulco hidrofóbico superficial onde interage com outras proteínas por interações proteína-proteína. (MUCHMORE et al., 1996).

As proteínas Bax e Bcl-2 são capazes de formar homodímeros (Bax/Bax e Bcl-2/Bcl-2) ou heterodímeros (Bax/Bcl-2), sendo que o equilíbrio entre a formação de homodímeros ou heterodímeros é o que define o pendor anti-apoptótico ou pró-apoptótico das células (PETROS; OLEJNICZAK; FESIK, 2004). A Bcl-2 exerce a sua atividade inibindo a permeabilização da membrana externa da mitocôndria e este processo ocorre, ou por interação com a proteína Bax ou por competição por locais de ligação, que de outra forma seriam ocupados pelo Bax na membrana externa mitocondrial (MURPHY et al., 2000). A Bax pode promover a apoptose através da interação com a mitocôndria, de forma independente da interação com proteínas anti-apoptóticas como mostra na Figura 2 (PETROS; OLEJNICZAK; FESIK, 2004).

Figura 2: Processo de apoptose e a interação entre proteínas pertencentes a 3 tipos de proteínas da família Bcl-2. Família anti-apoptótica: MCL-1; Bcl-B (B Cell Lymphoma), Bcl-XL and Bcl-W. Família ativadora pró-apoptótica: PUMA (p53 upregulated modulator of apoptosis); BID (BH3 interacting-domain); BIM (Bcl-2-like protein); BAD (Bcl-2-associated death promoter); NOXA (Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein Família efetora pró-apoptótica: BAX (BCL2-Associated X Protein); BAK (Bcl-2 homologous antagonist/killer).



Fonte: Adaptado de Khelifa. (2016) Low molecular weight compounds from mushrooms as potential Bcl-2 inhibitors: Docking and Virtual Screening studies, 36, Figura 17.

2.3.2.1 Proteína anti-apoptótica Bcl-XL

A proteína Bcl-XL, também conhecida como linfoma de células B extra grandes, é um dos principais membros anti-apoptóticos da família Bcl-2 (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005). Localiza-se na membrana mitocondrial, local onde promove a estabilização do potencial da membrana e a redução da permeabilidade (KROEMER, 1997). A inibição da Bcl-XL gera a liberação de algumas substâncias como o citocromo c, a pro-caspase 3 e o fator de indução da apoptose (DONOVAN; COTHER, 2004; LESSENE; CZABOTAR; COLMAN, 2008). Esta proteína possui outra característica que é o de formar um canal de íons na membrana lipídica. A Bcl-XL desempenha estas funções através da sua capacidade de regular a libertação mitocondrial

de metabólitos bioenergéticos e íons cálcio, através da sua capacidade de promover a alteração do posicionamento e morfologia da mitocôndria (JONAS, 2013). De acordo com Schott et al (1995), a Bcl-XL está envolvida na sobrevivência de células cancerígenas inibindo a função do p53. Em células de camundongos cancerosas, aquelas que continham Bcl-XL foram capazes de sobreviver, enquanto aquelas que apenas expressaram p53 morreram em um pequeno período de tempo.

2.3.2.2 Proteína anti-apoptótica MCL-1

A proteína MCL-1 (leucemia mieloide-1) foi identificada inicialmente na diferenciação de células de leucemia mieloblástica (KOZOPAS et al., 1993). Pertence a classe das proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2. A proteína MCL-1 pode ser considerada essencial para a sobrevivência, manutenção e desenvolvimento de células estaminais hematopoiéticas e células B e T. Também pode ser encontrada em vários tipos de cancro, incluindo leucemia/linfoma mieloma múltiplo e outros casos não hematopoiéticos de câncros (KOJIMA et al., 2018).

A proteína MCL-1 atua por ligação a proteínas pró-apoptóticas como a Bim e Bak, causando à inibição da apoptose (MOLDOVEANU et al., 2014). A MCL-1 está localizada na matriz mitocondrial, promovendo o funcionamento normal das mitocôndrias, regulando a sua fusão e promovendo a montagem de oligómeros de ATP sintase (SENICHKIN et al., 2018)

Ao comparar a proteína MCL-1 com as outras proteínas Bcl-2 e Bcl-XL, verificamos que a MCL-1 tem um tempo de semi-vida muito curto, pois a mesma possui duas sequências de aminoácidos PEST (prolina (P), ácido glutâmico (E), serina (S) e treonina (T)) que sinalizam a sua estrutura para degradação proteica (SENICHKIN et al., 2018).

2.4. Ferramentas *in silico* de modelação molecular

O uso de ferramentas bioinformáticas está generalizado em quase todas as áreas do conhecimento científico. De entre estas ferramentas *in silico*, as ferramentas de bioinformática estrutural, que analisam e manipulam estruturas tridimensionais (3D) de diferentes moléculas, têm assumido grande importância, principalmente em projetos de descoberta de novos fármacos. Estas ferramentas são particularmente adequadas quando é necessário preparar, gerir e realizar estudos *in silico* de bibliotecas com um grande número de compostos químicos de interesse.

Neste trabalho utilizaram-se ferramentas *in silico* que permitem o desenho e preparação de estruturas 3D de compostos químicos, quer de compostos LMW quer de estruturas de proteínas. Utilizaram-se também ferramentas *in silico* de docking molecular, que permitem avaliar a possibilidade de dois compostos químicos interagirem entre si e de prever a potência dessa interação.

2.4.1. Representação química de pequenos compostos: bibliotecas virtuais

Um passo importante para a realização de estudos de modelação molecular é a correta preparação *in silico* de bibliotecas de pequenos compostos de interesse. Estas bibliotecas virtuais são utilizadas posteriormente em estudos em que se pretende avaliar as suas bioatividades potenciais e realizar outro tipo de estudos de modelação molecular.

Quando se realizam estudos de screening virtual é necessário ter acesso e manipular uma grande quantidade de pequenos compostos, estes compostos estão geralmente organizados em bibliotecas virtuais. Estas, variam muito em tamanho e conteúdo: podem conter dezenas a milhões de compostos, podem estar disponíveis publicamente ou comercialmente, podem ser de âmbito geral ou conter compostos com uma atividade ou propriedade específica ou podem ser compostos de compostos já sintetizados ou compostos virtuais como mostrado na Tabela 2 (ABREU, 2011).

Tabela 2: Enumeração da quantidade de pequenos compostos presentes em diferentes bibliotecas virtuais.

Livraria virtual	Quantidade de compostos	Disponibilidade para VS	Disponibilidade para testes experimentais	Comentários
DTP repository	140 000	Sim, académica	Sim, disponível por solicitação	Compostos sintéticos e naturais
NCI Diveristy Set II	1 364	Sim, académica	Sim, disponível por solicitação	Sintético e natural, grupo químico representante >250mg
ZINC	13 000 000	Sim, académica	Sim, disponível para compra	Vários subconjuntos de acordo a regra de Lipinski de 5
iResearch Library	95 000 000	Sim, comercial	Sim, disponível para compra	Amplo escopo. Fornece também ferramentas comerciais
GDB-11	26 400 000	Sim, académica	Não	Compostos hipotéticos com até 11 átomos de C,O,N e F

GDB-13	977 468 314	Sim, acadêmica	Não	Compostos hipotéticos com até 13 átomos de C, O, N, S e Cl
--------	-------------	----------------	-----	--

Fonte: ABREU, 2011. Antioxidant activity of diarylamines in the benzo[b]thiophene series and antitumoral/antiangiogenic activities of thieno[3,2-b]pyridine derivatives: in vitro studies, QSAR modelling, VEGFR-2 docking and software development, 53, tabela 1.4.

Estas bibliotecas virtuais são usadas principalmente para estudos de screening virtual em que se pretende estimar a possibilidade destes compostos serem inibidores das proteínas alvo de interesse.

2.4.2. Screening virtual de bibliotecas de compostos utilizando docking molecular

Segundo Lyne (2002), o Screening virtual (VS- Virtual Screening) é a aplicação de diferentes métodos *in silico* a uma biblioteca virtual de compostos de interesse, de forma a seleccionar os compostos mais promissores, e que depois são considerados para validação experimental. As metodologias VS podem ser consideradas como a contrapartida computacional dos métodos de avaliação experimental biológicos HTS (High-Throughput Screening) (STAHURA; BAJORATH, 2004). Na descoberta de potenciais novos fármacos, o uso de bibliotecas de compostos quimicamente diversos para realizar estudos de VS é uma estratégia generalizada, principalmente por ser um método rápido e económico para a avaliação de uma grande quantidade de compostos.

As estratégias VS são normalmente divididas em dois grupos, de acordo com o conhecimento ou não da estrutura tridimensional (3D) da proteína alvo: os métodos LBVS (Ligand-Based Virtual Screening) usam a informação da estrutura dos compostos presentes na biblioteca em estudo para realizar a sua avaliação; já os métodos SBVS (Structure-Based Virtual Screening) necessitam de informação da estrutura 3D das proteína-alvo em estudo (OPREA; MATTER, 2004). Os métodos SBVS só podem ser utilizados quando existir informações experimentais sobre a estrutura 3D das proteínas de interesse, o que acontece com as proteínas da família Bcl-2 que foram seleccionadas para este estudo. Neste trabalho iremos usar uma ferramenta SBVS para realizar os estudos de VS que é o docking molecular.

O docking molecular é um método bioinformático estrutural que tenta prever a estrutura do complexo intermolecular formado entre duas moléculas de interesse. Existem vários tipos de docking molecular, dependendo do tipo de moléculas estudadas. O mais comum, e aquele que mais interessa neste estudo, é o docking proteína-ligando, que tenta encontrar a conformação bioativa de um pequeno composto no local de ligação da estrutura da proteína-alvo de interesse (doravante, o termo docking significa docking proteína-ligando). No sentido termodinâmico, é o equivalente a encontrar o mínimo de energia livre global do complexo ligando-proteína (VERKHIVKER et al.,2000).

O docking é um dos métodos mais utilizados em estudos que visam o desenvolvimento de novos fármacos devido à sua capacidade de prever, com um grau razoável de precisão, a conformação de ligação entre os compostos candidatos presentes na biblioteca virtual em estudo e a proteína-alvo (MENG et al., 2011). Após o desenvolvimento dos primeiros algoritmos na década de 1980, o docking tornou-se uma ferramenta essencial de ajuda no processo de descoberta de novos fármacos (LÓPEZ-VALLEJO et al.,2011). Além disso, os algoritmos de docking executam previsões quantitativas de energia de ligação, fornecendo rankings de compostos com base na afinidade de ligação dos complexos ligando-proteína (LÓPEZ-VALLEJO et al.,2011; HUANG; ZOU, 2010).

Em geral, o docking pode ser aplicado em diferentes estágios do processo de descoberta de drogas: (1) previsão do modo de ligação do potencial inibidor no local ativo conhecido da proteína, (2) identificação de novos ligandos usando docking para realizar o VS de bibliotecas de pequenos compostos, (3) previsão das afinidades de ligação de compostos relacionados a partir de uma série ativa (LEACH; SHOICHET; PEISHOFF, 2006). Os softwares de docking executam essas tarefas através de um processo cíclico, no qual a conformação do ligando é avaliada utilizando diferentes algoritmos matemáticos. Este processo é realizado sucessivamente até convergir para uma solução de energia mínima (HUANG; ZOU, 2010; YURIEV, 2011).

Para além da previsão do modo (conformação) de ligação, os softwares de docking normalmente fornecem uma lista ordenada dos compostos em estudo, do mais promissor (menor energia livre de ligação) ao menos promissor (maior energia livre de ligação). Este ranking pode ser usado como único critério para seleccionar moléculas promissoras, ou pode ser combinado

com outros métodos *in silico* de avaliação. Os compostos mais promissores são então selecionados para serem avaliados experimentalmente, de forma a validar ou não a previsão feita pelo estudo de docking (GANGWAL et al., 2015).

Hoje em dia, existem diversos softwares de docking, sendo o mais utilizado o Autodock 4 (AD4). O AD4 necessita do conhecimento das estruturas 3D experimentais da proteína-alvo em estudo. Necessitam portanto de saber o espaço 3D da estrutura (grid) onde se pretende tentar prever a conformação de ligação dos compostos de interesse que deve incluir o local ativo da proteína que está a ser estudada. O AD4 utiliza um algoritmo genético Lamarkiano para pesquisar as possíveis conformações de ligação e no final calcula a energia livre de ligação (ΔG) estimada entre o composto de interesse e o local ativo da proteína. O nosso grupo tem usado preferencialmente o AD4 em trabalho anteriores, embora que tenha utilizado outros softwares de docking. Dependendo da estrutura das proteínas, diferentes softwares de docking podem fornecer melhores resultados e por muitas vezes são utilizados mais de que um software (ABREU et al., 2012). Baseado num trabalho anterior realizado por Khelifa, 2016, onde se utilizou como proteína alvo a Bcl-2, verificou-se que o AD4 forneceu resultados mais precisos. Devido a este facto foi tomada a decisão de utilizar o AD4 neste trabalho. Este software é de acesso livre para instituições académicas e comerciais e é o software de docking mais utilizado pela comunidade científica.

3. METODOLOGIA

3.1 Preparação da biblioteca LMW 2.0 de 115 compostos

Primeiramente realizou-se uma pesquisa bibliográfica a fim de ampliar a biblioteca de 40 compostos de baixo peso molecular (LMW- “Low Molecular Weight”), preparada e utilizada anteriormente pelo nosso grupo, para 115 compostos (FROUFE; ABREU; FERREIRA, 2012). À primeira biblioteca designou-se biblioteca LMW 1.0 e à nova biblioteca LMW 2.0. Para a formação da mesma, a pesquisa foi executada em várias plataformas virtuais incluindo a “PubMed”, “Science Direct” e “Web of Science”, a fim de obter uma maior variedade de espécies de cogumelos com algum tipo de bioactividade.

Posteriormente, a estrutura de cada composto foi desenhada em formato bidimensional (2D), utilizando o software Marvin Sketch versão 1.2.5 (www.chemaxon.com); sendo os compostos guardados no formato digital MRV, específico do Marvin Sketch. Este formato foi o utilizado para preparar as figuras apresentadas neste trabalho. O software Marvin Sketch foi também utilizado para proceder à otimização tridimensional (3D) da estrutura de cada composto. No final cada composto foi guardado em formato digital SDF também pelo software Marvin Sketch.

De seguida, utilizou-se o software AutoDockTools 1.5.2 (ADT) para preparar as estruturas de cada composto da biblioteca LMW 2.0 para os ensaios de screening virtual posteriores. Os ficheiros do tipo SDF foram abertos no ADT e guardados no formato digital PDBQT, formato necessário para a realização dos ensaios de docking molecular. Antes de guardar a representação 3D de cada compostos em formato PDBQT, o ADT realiza os seguintes procedimentos de preparação para cada composto: (i) remoção dos hidrogénios apolares, (ii) adição de cargas elétricas do tipo Gasteiger (iii) definição de quais as ligações covalentes passíveis de sofrer rotação. Cada composto foi depois aberto no software Pymol para inspeção visual da correção da estrutura de cada composto, quer a nível do posicionamento dos átomos, quer da correção das ligações covalentes. Uma vez realizados todos estes passos, os compostos foram considerados preparados e validados para estudos de screening virtual, sendo guardados numa pasta específica com cada composto representado num ficheiro PDBQT individualizado.

3.2 Preparação para docking molecular das estruturas 3D das proteínas em estudo

Uma vez seleccionadas as estruturas 3D experimentais das proteínas da família Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-XL e MCL-1) a utilizar neste trabalho, foi feito o seu download, em formato digital PDB, da base de dados de estruturas PDB (Protein Data Bank) (<http://www.rcsb.org>). O ficheiro PDB foi aberto no software de edição de texto WordPad e a estrutura da proteína foi manualmente separada dos ligandos co-cristalizados presentes na estrutura. Todas as outras moléculas presentes na estrutura foram removidas para não interferir com os ensaios de docking molecular. A proteína e o ligando foram guardados em ficheiros separados no formato digital PDB.

De seguida, utilizou-se o ADT para converter a estrutura de cada proteína e ligando co-cristalizado do formato PDB para PDBQT. Também neste passo o ADT realiza os seguintes procedimentos de preparação para cada composto: (i) remoção dos hidrogénios apolares, (ii) adição de cargas elétricas do tipo Gasteiger (iii) definição de quais as ligações covalentes passíveis de sofrer rotação.

3.3 Re-Docking e Cross-Docking dos ligandos co-cristalizados contra as estruturas 3D das proteínas da família Bcl-2

Os ensaios de validação Re-Docking e Cross-Docking foram realizados por docking molecular, utilizando o software AutoDock 4.0 (AD4). Estes estudos utilizaram as estruturas 3D das proteínas seleccionadas e dos respectivos ligandos co-cristalizados, previamente preparados em formato PDBQT.

Realizaram-se os ensaios de docking, com base na técnica aplicada por KHALIFA, 2016. O AD4 necessita que seja especificado o “espaço de busca” 3D, centrado no local ativo da estrutura da proteína. Para cada estrutura 3D proteica utilizada foi necessário utilizar o ADT para definir o espaço tridimensional (grid) onde se pretendia procurar os possíveis conformações de ligação para cada ligando co-cristalizado. Assim foram definidas, para cada estrutura, as coordenadas X, Y e Z do centro do grid, bem como a grandeza de cada dimensão do grid em Angströms (Å). Na tabela 3 indicamos os parâmetros X, Y e Z definidos para cada estrutura 3D utilizada neste trabalho. O tamanho de cada dimensão X, Y e Z do grid foi definido como sendo 30 Å.

Tabela 3: Coordenadas X, Y e Z utilizada para definir o ponto de origem do grid para cada proteína.

Proteína	PDB ID	Coordenada X	Coordenada Y	Coordenada Z
Bcl-2	4AQ3	-22	5	-12
Bcl-2	4IEH	4	-5	-12
Bcl-2	4LVT	6	-3	-12
Bcl-2	4LXD	23	33	13
Bcl-XL	3ZK6	20	47	1
Bcl-XL	3ZLR	-20	-15	-46
Bcl-XL	4C52	-15	-24	-12
MCL-1	4HW2	1	-46	7
MCL-1	4OQ6	13	10	10
MCL-1	4ZBI	-7	-23	4
MCL-1	5FDR	38	1	19

Uma vez definida a posição do centro e dimensão do grid, foi utilizado o ADT, utilizando a ferramenta disponível AutoGrid4, para criar mapas de afinidade para cada tipo de átomo presente na estrutura das proteínas e dos ligandos co-cristalizados. De forma a obter os 30 Å para cada dimensão, utilizou-se os seguintes parâmetros: número de pontos do grid para as dimensões X, Y e Z foram de 80 x 80 x 80, com espaços regulares de 0.375 Å ($80 \times 0,375 \text{ Å} = 30 \text{ Å}$). Todos os mapas do grid de afinidade foram centrados no sítio ativo e as coordenadas foram selecionadas para abranger o sítio ativo completo para cada estrutura de proteína, (GOODSELL; MORRIS; OLSONI, 2008).

O AD4 utilizou um algoritmo genético Lamarckiano (MORRIS et al., 1998) para realizar os estudos de docking molecular entre os ligandos co-cristalizados e as estruturas PDB selecionadas das proteínas Bcl 2, Bcl-XL e MCL-1. Os parâmetros selecionados para a execução do AD4 foram os seguintes: 2500000 avaliações de energia, número populacional de 150 estruturas e 50 repetições do processo de docking. Estes ensaios de docking molecular utilizando o AD4 foram inicializados diretamente do ADT. Foram mantidos os valores por defeito de outros parâmetros nomeadamente: a posição inicial aleatória dos ligandos, intervalos de etapas de translação de 2,0 Å, taxa de mutação de 0,02, taxa de cruzamento de 0,8 e taxa de pesquisa local de 0,06. Para cada ligando co-cristalizado, o AD4 apresenta os resultados de duas formas: (1) valores de energia livre de ligação (ΔG) estimada e conformação 3D de ligação à proteína em

estudo de cada ligando co-cristalizado estudado. A partir dos valores de ΔG estimados foram determinados os valores das constantes de inibição (K_i) estimados, aplicando a seguinte equação:

$$K_i = \exp ((\Delta G * 1000) / (Rcal * TK)),$$

onde: ΔG é a energia livre de ligação estimada calculada pelo AD4, $Rcal$ é 1,98719 e TK é 298,15. Todos os ensaios de docking molecular foram realizados utilizando computadores pessoais disponibilizados nas salas de informática do IPB.

3.4 Screening virtual da biblioteca LMW 2.0 contra as proteínas da família Bcl-2

Uma vez selecionadas as estruturas de cada um das proteínas em estudo e definidos os parâmetro a utilizar para cada estrutura (tabela 3), foram realizados de seguida os ensaios de screening virtual da biblioteca LMW 2.0. Tendo em consideração o número substancial de estruturas 3D em estudo (11 no total das 3 proteínas em estudo) e o número de compostos da nova biblioteca LMW 2.0 (115 compostos), e estimando que cada ensaio de docking molecular com os parâmetros estudados demora em média 1 hora, foi necessário utilizar ferramentas de automatização de todo o processo de screening virtual. Para esta automatização foi utilizado o software MOLA, uma ferramenta desenvolvida no nosso grupo para este tipo de trabalhos (ABREU, et al., 2010). Este software permite ligar vários computadores em rede formando um cluster de computadores adequado (Figura 3). Para além da preparação do cluster também automatiza os processos de gestão e distribuição dos trabalhos de docking para cada computador da rede. No total foram ligados 10 computadores numa rede e para cada estrutura selecionada foi lançado o processo de screening virtual para a biblioteca LMW 2.0

Figura 3: Cluster realizado para os estudos de docking molecular da biblioteca 2.0.



Fonte: Bio Chem Core. <<http://esa.ipb.pt/biochemcore>>Acessado 2 de julho, 2018

A título de exemplo, para cada uma das 11 estruturas de proteínas utilizadas, o tempo de execução do screening virtual da biblioteca LMW 2.0 passou de aproximadamente 115 horas (4,8 dias), utilizando apenas um computador, para 11,5 horas (0,5 dias), utilizando o cluster implementado pelo software MOLA. No final de cada trabalho de screening virtual, o MOLA também faz uma análise dos resultados criando um ficheiro em formato digital CSV, que pode ser aberto no software Excel, onde os compostos estudados são ordenados por valores crescentes de ΔG estimado. O MOLA também cria uma pasta para cada composto estudado onde é colocada a conformação de ligação estimada pelo AD4. Os resultados obtidos nos ensaios de docking foram analisados no software Pymol (SEELIGER; GROOT, 2010).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Preparação da biblioteca virtual de compostos LMW 2.0 presente em cogumelos

De forma a ampliar a biblioteca virtual anteriormente preparada de 40 compostos (FROUFE; ABREU; FERREIRA, 2012), começou-se por realizar uma pesquisa bibliográfica de novos compostos LMW. A pesquisa bibliográfica foi realizada na literatura científica especializada utilizando os motores de procura “PubMed”, “Science Direct” e “Web of Science”. Para o composto ser elegível para seleção era necessário respeitar 2 requerimentos: primeiro que tivesse sido encontrado na composição de uma espécie de cogumelo e segundo que este composto ou cogumelo apresentasse algum tipo de bioatividade antitumoral. A bioatividade poderia ser, ou uma bioatividade inespecífica como a inibição da atividade anti-proliferativa de uma linha celular tumoral, ou uma bioatividade específica como por exemplo a inibição da atividade de uma proteína que já tivesse sido relacionada como um processo tumoral. No total foram acrescentados 75 compostos que, somados aos 40 compostos da biblioteca LMW 1.0, totalizaram os 115 compostos que compõem a biblioteca virtual LMW 2.0 e que foi utilizada para os restantes estudos *in silico* realizados neste trabalho. Os compostos foram divididos por famílias químicas, sendo os esteróides, apresentados na tabela 3 e representados nas figuras 3 e 4, a família mais representada com 60 compostos. Os restantes 55 compostos, apresentados na tabela 5 e representados nas figuras 6 e 7, correspondem às restantes famílias de compostos incluindo: 8 membros da família dos quinonas e hidroquinonas; 28 membros da família dos terpenos; 2 membros da família das aminas e amidas; 12 membros da família das isoflavonas, flavonas, catecóis e fenóis; 2 membros da família dos ácidos gordos e 3 membros da família dos alcalóides e aldeídos.

Aos compostos novos que foram sendo adicionados à biblioteca LMW 2.0 foram indicados números de 1 a 75. Aos compostos que já faziam parte da biblioteca LMW 1.0 foram indicados os códigos utilizados no artigo de revisão por Ferreira et al. 2010, antecedido da letra a.

Tabela 4: Esteroides que compõem a biblioteca de compostos LMW 2.0 presentes nos cogumelos.

Composto	Código	Espécie	Referência	Bioatividade
(3 β ,5 α ,8 α ,22E,24S)-5,8-epidioxiergosta-6,9(11),22-trien-3-ol	1	<i>Morchella esculenta</i>	LEE et al., 2018	Atividade Antitumoral
Ácido 3- oxo-5 α -lanosta-8-en-21-oico	2	<i>Ganoderma tsugae</i>	LIN et al., 2016	
(3 β ,5 α ,8 α ,22E)-5,8-epidioxiergosta-6,22-dien-3-il β -D-glucopiranosídeo	3	<i>Morchella esculenta</i>	LEE et al., 2018	
(22E,24S)-ergosta-4,22-dien-3-ona	4			
(22E)- 3 β ,5 α -didroxiergosta-7,22-dien-6-ona	5	<i>Pleurotus eryngii</i>	KIKUCHI et al., 2017	Inibição da Aromatase
(22E)- 6 β -metoxiergosta-7,22-dien-3 β ,5 α -diol	6			
(22E)-19-norergosta-5,7,9,22-tetraen-3 β -ol	7			
(22E)-3 β ,5 α ,9 α -tridroxiergosta-7,22-dien-6-ona	8			
(22E)-5 α ,6 α -epoxiergosta-8,14,22-trien-3 β ,7 β -diol	9			
(22E)-ergosta-5,7,22-trien-3-ol	10			
(22E)-ergosta-7,22-dien-3 β -ol	11			
(3 β ,5 α ,22E)-ergosta7,22,24(28)-trien-3-ol	12	<i>Morchella esculenta</i>	LEE et al., 2018	Atividade Antitumoral
24-etilcolsta-5,22-dien-3 β -ol	13	<i>Phellinus baummi</i>	ZHANG et al., 2017	Atividade Antitumoral e Antioxidante
3,4-seco- 8 α ,9 α -epoxi-5 α -lanosta-21-ácido oico 3,4 lactona	14	<i>Ganoderma tsugae</i>	LIN et al., 2016	Atividade Antitumoral
3,4-seco-5 β -lanosta-7,9(11),4(29)-trien-3,21-ácido dióico	15			
3,4-seco-5 β -lanosta-7,9(11),4(29)-trien-3,21-ácido dióico- 3-metil ester	16			
5,6-Epoxy-24(R)-metilcolesta-7,22-dien- 3 β -ol	17	<i>Lepiota americana</i> <i>Cordyceps sinensis</i>	ZAIDMAN et al., 2005	Inibidor da sulfatase
5,8-Epidioxi-24(R)-metilcolesta-6,22-dien-3 -D-glucopiranosídeo	18	<i>Cordyceps sinensis</i>	BOK et al., 1999	Não conhecida
5,6-Epoxi-24(R)-metilcolesta-7,22-dien-3 -ol	19	<i>Pleurotus eryngii</i>	KIKUCHI et al., 2017	Inibição da Aromatase
5 α ,6 α -epoxiergost-8(14)-ene-3 β ,7 α -diol	20			
9,11- peróxido dehidroergosterol	21			
Ácido Dehidroeburicônico	a25	<i>Poria cocos</i>	ZAIDMAN et al., 2005	Inibidor da topoisomerase II do DNA
Ácido Dihidroeburicóico	22	<i>Lentinus e Antrodia camphorata</i>	FILHO, 2009	Atividade antitumoral, antiinflamatória e analgésica
Ácido Eburicóico	23	<i>Antrodia cinnamomea</i>	SU et al., 2012	Atividade Antitumoral
Ácido Fomitélico A	a26a	<i>Ganoderma lucidum</i>	ZAIDMAN et al., 2005; PATERSON, 2006;	Inibidor da DNA topoisomerase
Ácido Fomitélico B	a26b			
Ácido Ganodérico A	a21a			
Ácido Ganodérico F	a21b			
Ácido Ganodérico H	a21c			
Ácido Ganodérico W	a22			
Ácido Ganodérico X	a23a			
Ácido Ganodérico Y	a23b			
Ácido Ganodérico T	a23c			
Ácido Lucidêncio N	24		COTA et al, 2008	Efeito citotóxico frente à linhagens celulares: cancro de fígado humano e leucemia murina
Ácido Lucidênico O	a17a		MORADALI et al., 2007	Inibidor da DNA polimerase α e β
Ácido Marásmico	25	<i>Marusmius conigenus</i> , <i>Lachnella sp.</i> e <i>Peniophora laeta</i>	COTA et al, 2008	Prolonga o tempo de vida de camundongos com leucemia murina
Ácido Poliporênico C	a24	<i>Piptoporus betulinus</i> , <i>Daedalea dickinsii</i>	ZAIDMAN et al., 2005	Inibidor MMP
Antcin K	26	<i>Antrodia cinnamomea</i>	LAI et al., 2016	Agente complementar na terapia do cancro no fígado

Cerevisterol	a18	<i>Ganoderma lucidum</i>	MORADALI et al., 2007	Inibidor da DNA polimerase α
Ergosta- 4,6,8 (14), 22- tetraen-3-ona	a16	<i>Grifola frondosa</i> , <i>Ganoderma applanatum</i> , <i>G.neojaponicum</i>	ZAIDMAN et al., 2005	Inibidor da Cicloxigenase
Ergosterol	a15	<i>Grifola frondosa</i> , <i>Agaricus blazei</i>		
Eringiacetal A	27	<i>Pleurotus eryngii</i>	KIKUCHI, 2015	Citotoxicidade e atividade inibitória contra o oxido nítrico
Estelasterol	28	<i>Lentinus</i>	FILHO, 2009	Citotoxicidade e atividade inibitória contra o oxido nítrico
Ganoderiol F	a20b	<i>Ganoderma lucidum</i>	MORADALI et al., 2007	Atividade Antitumoral
Ganodermanondiol	a20c			
Ganodermanontriol	a20d			
Inotodiol	29	Cogumelo chaga	NGUYET et al., 2018	
Lactona Lucidênica	a17b	<i>Ganoderma lucidum</i>	TANG et al., 2006	Inibidores da DNA polimerase α e β
Lanosterol	30	<i>Inonotus obliquus</i>	GUEDES, 2016	Atividade antitumoral, antiinflamatória, hipoglicêmica e imunomoduladora
Lucidumol A	a19	<i>Ganoderma lucidum</i>	PATERSON, 2006	Atividade Antitumoral
Lucidumol B	a20a			
Pentadecanoato de ergosta-7,22-dien-3 β -il	31	<i>Phellinus baummi</i>	ZHANG et al., 2017	Atividade antitumoral e antioxidante
Peróxido de Ergosterol	32	<i>Pleurotus eryngii</i>	KIKUCHI et al., 2017	Inibição da Aromatase
Pinicolol B	33	<i>Antrodia cinnamomea</i>	WU et al., 2017	Atividade citotóxica nas linhas de células de carcinoma nasofaríngeo
Poliporusterona A	34	<i>Polyporus umbellatus</i>	COTA et al, 2008	Citotoxicidade frente à linhagem de células leucemia murina
Poliporusterona B	35			
Poliporusterona C ,E ,F e G	(36-39)			

A preparação química *in silico* de cada composto foi sujeita a um cuidadoso controlo de qualidade, de acordo como o procedimento descrito na metodologia. A representação bidimensional (2D) inicial de cada composto foi preparada no software Marvin Sketch e a preparação da representação tridimensional (3D) de cada estrutura foi preparada utilizando os softwares Marvin Sketch e AutoDockTools. Cada composto foi então guardado no formato digital PDBQT, necessário para os estudos *in silico* subsequentes. Um passo final de inspeção da correção das estruturas foi realizado utilizando o software Pymol.

Figura 4: Esteroides que formam a biblioteca LMW 2.0.

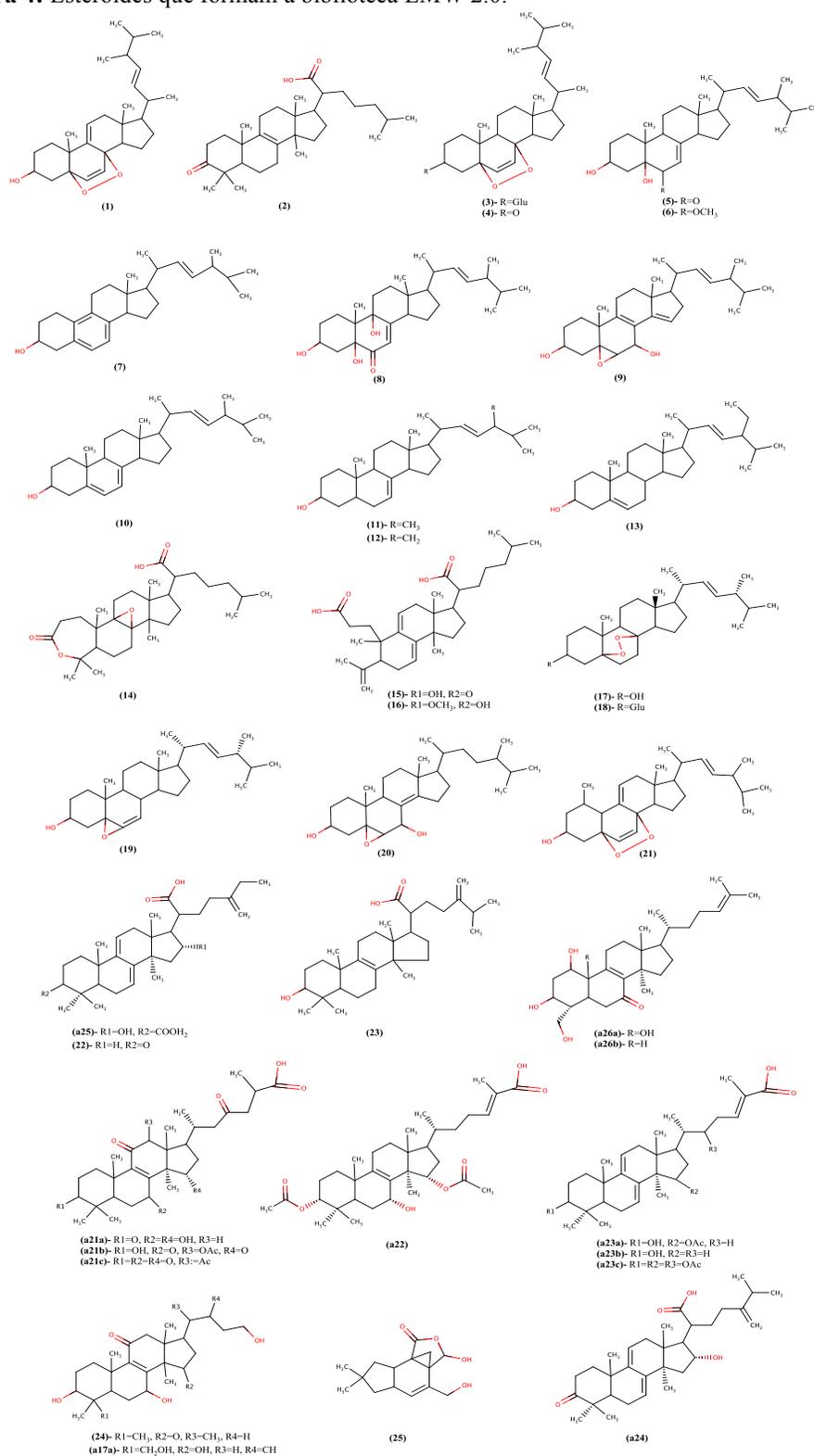


Figura 5: Continuação dos esteroides que compõem a biblioteca LMW 2.0.

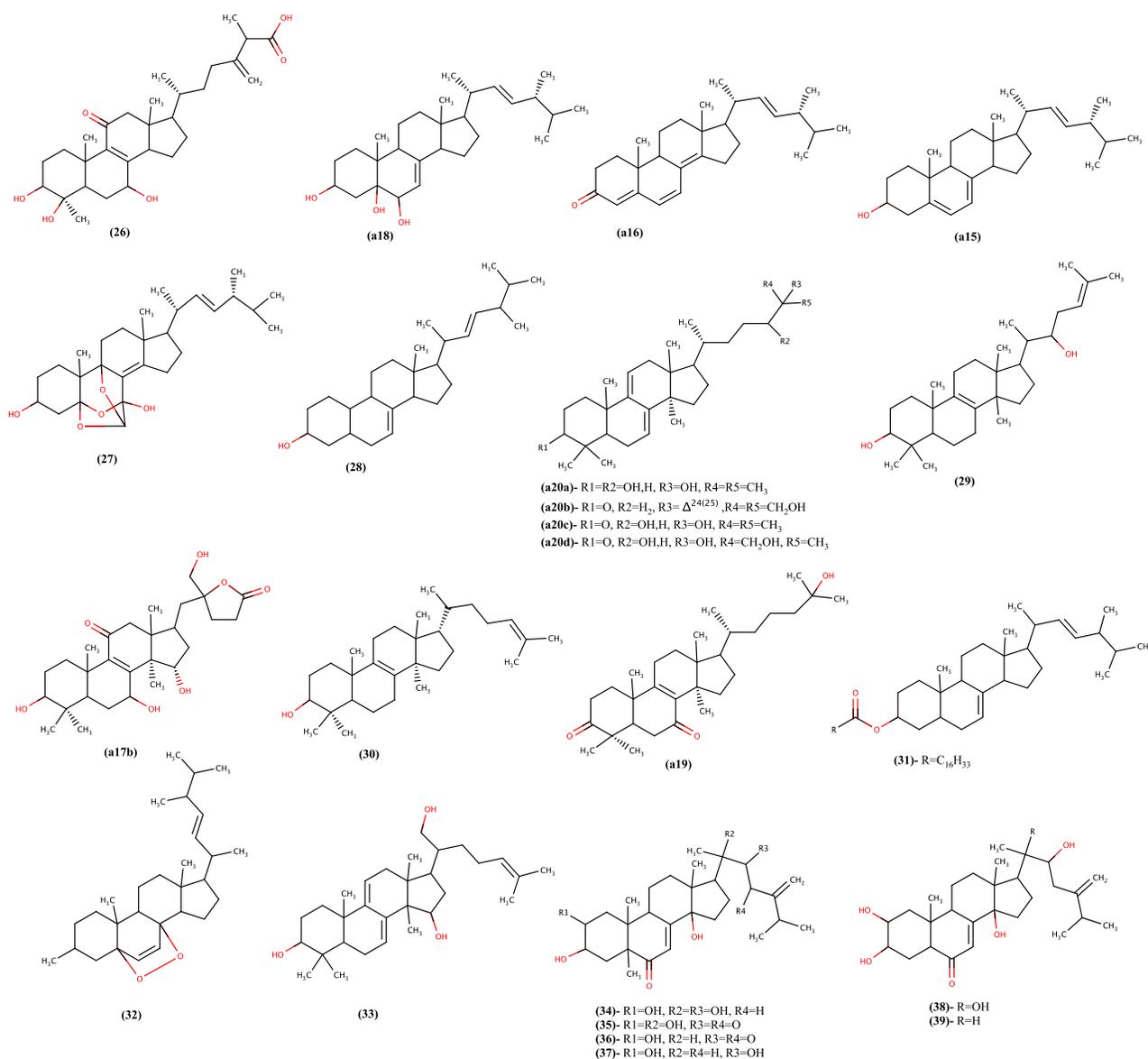


Tabela 5: Compostos que formam a biblioteca de compostos LMW 2.0 presentes em cogumelos.

Família do composto	Composto	Código	Espécie	Referência	Bioatividade
Quinonas e Hidroquinonas	Panedoxina	a1	<i>Panus conchatus</i> , <i>P. rudis</i> , <i>Lentinus crinitus</i>	ZAIDMAN et al., 2005	Inibidor do fator NF-kb
	Cicloepoxidol	a2	Estirpe <i>Xylaria</i> 45-93		Inibidor da proteína tirosina kinase
	Clavilactonas A e B	a3c/a3b	Citocybe clavipes		
	Clavilactonas D	a3b			
	Quinona 490	a4	<i>Agaricus bisporus</i>	ZAIDMAN et al., 2005; TIFFANY et al., 1978	Inibidor da DNA α polimerase
	Hidroquinona	a5	<i>Piptoporus betulinus</i>	ZAIDMAN et al., 2005;	Inibidor da proteinase matrix metalo (MMPs)
Terpenos	Panepoxidiona	72	<i>Lentinus connatus</i>	FILHO, 2009	Atividade Antitumoral
	Ácido Pleurotelico	40	<i>Pleurotus hypnophilus</i>	SULKOWSKA-ZIAJA et al., 2005	Atividade citotóxica
	(+)- torreyol	41	<i>Lignosus rhinocerotis</i>	YAP et al., 2017	Atividade citotóxica contra células MCF7
	1-hidroxi-3-sterpureno	42	<i>Gloephyllum</i>	RASSER; ANKE; STERNER, 2000	Atividade antifúngica, antibacteriana e antitumoral
	Aliacol A	43	Marasmius alliaceus	COTA et al, 2008	Inibem a síntese de ácidos nucleicos em células ascíticas do tumor Ehrlich
	Aliacol B	44			
	Aurisina A	45	<i>Neonothopanus nambi</i>	KANOKMEDHAKUL et al., 2012	Atividade Antitumoral
	Aurisina K	46			
	Colibial	47	<i>Collybia confluens</i>	COTA et al, 2008	Atividade citotóxica em linhagem de células de leukemia promielocítica
	Colossolactona H	48	<i>Ganoderma colossus</i>	CHEN et al., 2016	Citotoxicidade contra células de cancro do pulmão
	Connatus A e B	49 e 50	<i>Lentinus</i>	FILHO, 2009	Atividade antimalárica e citotóxica contra diferentes linhas celulares
	Demetoxiegnol	51	<i>Laetiporus sulphureus</i>	SULKOWSKA-ZIAJA et al., 2005	Atividade Antitumoral
	Dihidrohipnofilina	52	<i>Lentinus</i>	FILHO, 2009	
	Egnol	53	<i>Laetiporus sulphureus</i>	SULKOWSKA-ZIAJA et al., 2005	
	Glucosídeo Egnol	54			
	Henacclinol	55	<i>Lentinus e Panus rudis</i>	FILHO, 2009	
	Hipnofilina	56	<i>Lentinus</i>		
	Iludin M	a13b	<i>Omphalotus illudens</i> , <i>Lamteromyces japonicus</i>	POUCHERET; FONS; RAPIOR, 2006	Agente alquilante de DNA
	Iludin S	a13a			
	Irofulveno	57	<i>Omphalotus olearis e Lampteromyces japonicus</i>	COTA et al, 2008	Atividade Antitumoral
	Merulidial	58	<i>Merulius tremellosus</i>		Inibem a síntese de DNA em células ascíticas de carcinoma de Ehrlich
	Montadial A	59	<i>Bandarzewia montana</i>		Citotoxicidade frente à linhagem linfofítica leucêmica
	Naematolina	60	Panus spp.		Inibem a incorporação de timidina no DNA em células ascíticas de carcinoma de Ehrlich
Naematolona	61				
Nambinona C	62	<i>Neonothopanus nambi</i>	KANOKMEDHAKUL et al., 2012	Atividade Antitumoral	
Pilatina	63	<i>Flagelloscypha pilatii</i>	COTA et al, 2008	Interfere com a síntese de DNA, RNA em células ascíticas de tumor de Ehrlich	
Pleurotelol	64	<i>Pleurotus hypnophilus</i>	SULKOWSKA-ZIAJA et al., 2005	Atividade Citotóxica	
α -cadinol	65	<i>Lignosus rhinocerotis</i>	YAP et al., 2017	Atividade citotóxica contra	

					células MCF7
Aminas e Amidas	2-Aminofenoxazin-3-ona	a10	<i>Lepiota americana</i>	ZAIDMAN et al., 2005; KIM et al., 2000	Inibição da Aromatase
	Putrescina-1,4-dicinamida	a11	<i>Pholiota spumosa</i>	POUCHERET; FONS; RAPIOR, 2006	Indução da apoptose
Isoflavonas, Flavonas, Catecóis e Fenóis	Baicaleína	66	<i>Phellinus baummi</i>	ZHANG et al., 2017	Atividade antitumoral e antiinflamatória
	Fornecina A	67	<i>Pyroformes demidoffi</i>	COTA et al, 2008	Citotoxicidade frente à linhagens de cancro cervical humano
	Fornecina B	68			
	Genisten	a7	<i>Flammulina velupites</i>	ZAIDMAN et al., 2005	Modulador da kinase Cdc2
	Gerronemins A	a9a	<i>Gerronema</i>	ZAIDMAN et al., 2005; SILBERBORTH et al., 2002	Inibidor da Ciclo oxigenase 2 (COX-2)
	Gerronemins B	a9b			
	Gerronemins C	a9c			
	Gerronemins D	a9d			
	Gerronemins E	a9e			
	Gerronemins F	a9f			
Hispidin	a8	<i>P. linteus, Gymnopilus mar- ginatus, G. patriae, G. parvisporus, Ionotus hispidus</i>	ZAIDMAN et al., 2005	Inibidor de PKC β	
Inoscavina A	69	<i>Phellinus baummi</i>	ZHANG et al., 2017	Atividade antitumoral e antioxidante	
Ácidos gordos	(Z,Z)-9,12-ácido octadecadienóico	70	<i>Morchella esculenta</i>	LEE et al., 2018	Atividade Antitumoral
	1-O-octadecil-sn-glicerol	71			
Alcalóides e Aldeídos	3,4-dihidroxi-benzaldeído	73	<i>Phellinus baummi</i>	ZHANG et al., 2017	Atividade Antitumoral
	Hericerina	74	<i>Hericium erinaceum</i>	LI et al., 2015	
	Hericerina A	75			

Figura 6: Quinonas, hidroquinonas e terpenos que formam a biblioteca LMW 2.0.

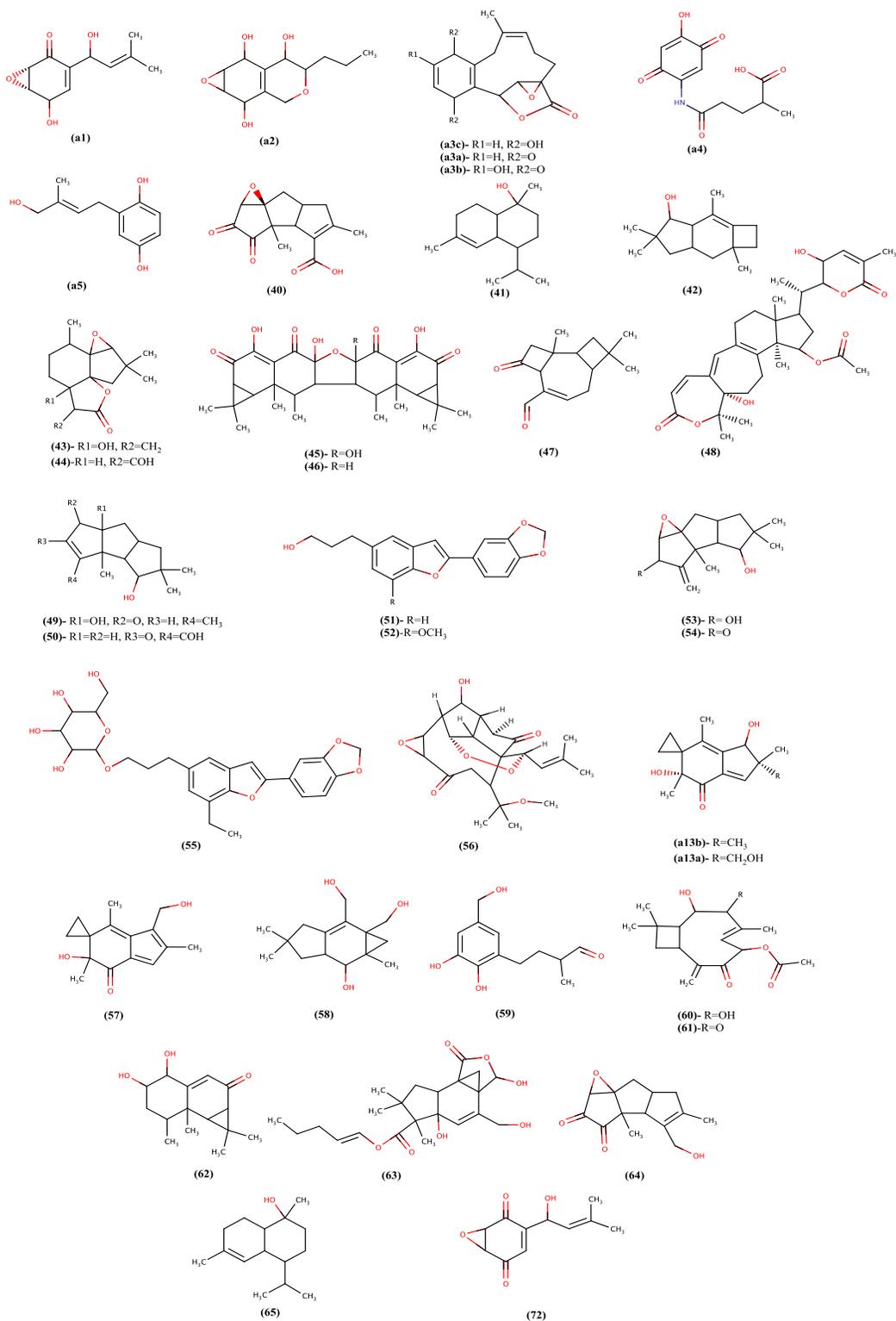
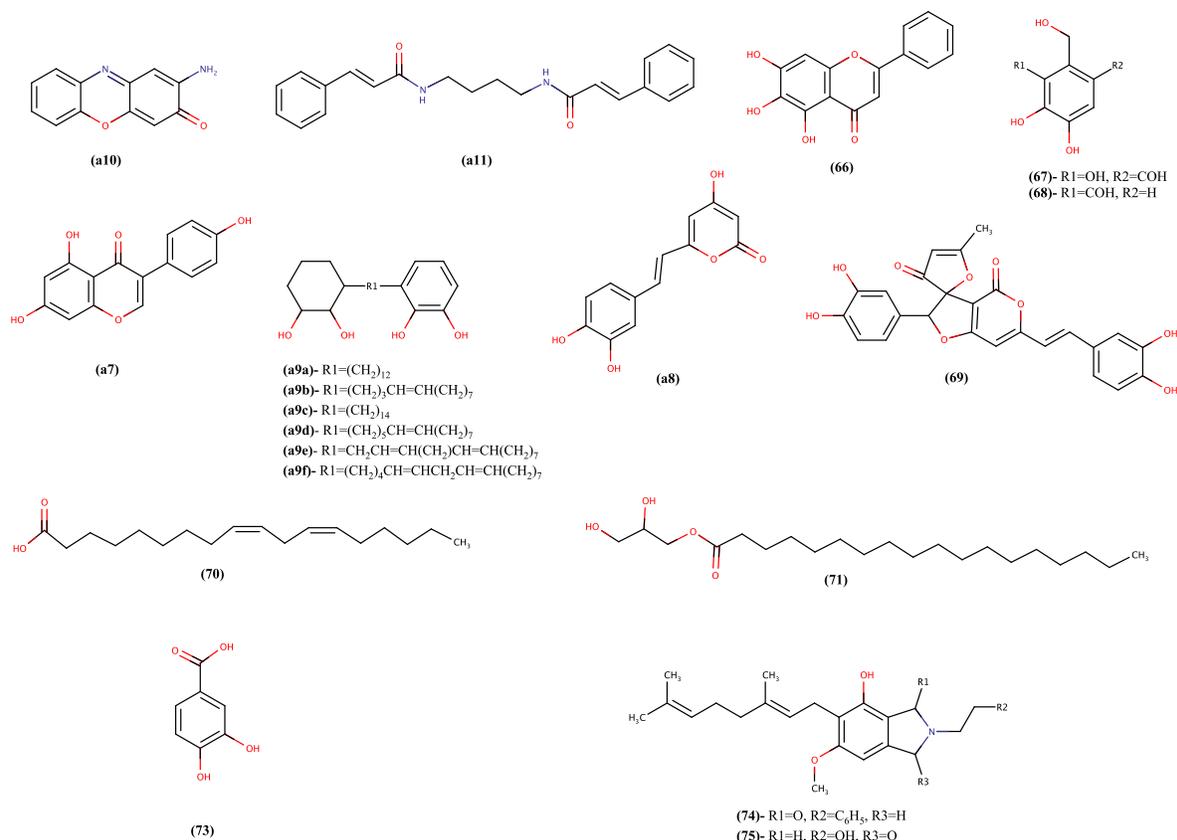


Figura 7: Aminas, amidas, isoflavonas, flavonas, catecóis, fenóis, ácidos gordos, alcalóides e aldeídos que formam a biblioteca LMW 2.0.

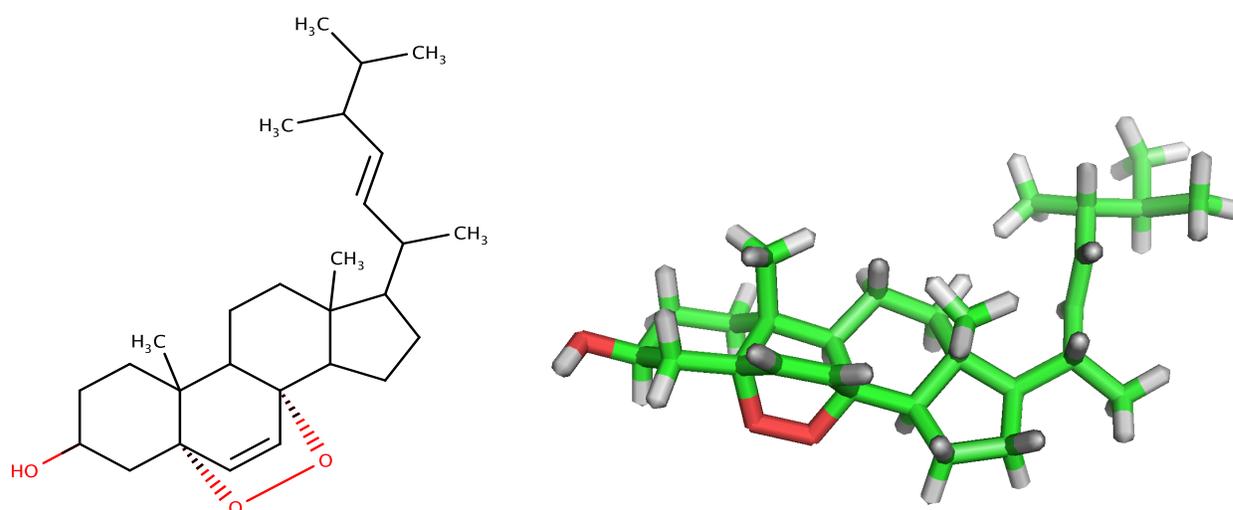


Na figura 8 podemos observar, a título de exemplo, a representação 2D e 3D de um dos membros da biblioteca LMW 2.0, o peróxido de ergosterol (32).

Uma grande quantidade de trabalhos científicos tem sido publicada nos últimos anos nesta área de estudo de bioatividades de diferentes espécies de cogumelos. A biblioteca virtual LMW 2.0 preparada neste estudo não pretende por isso ser exaustiva em relação ao estado da arte nesta área. No início do trabalho o objetivo proposto era o de ampliar a biblioteca para mais de 100 compostos tendo ficado no final em 115 compostos. Mais compostos poderiam ser acrescentados, no entanto, devido às limitações em capacidade de processamento computacional necessários para os estudos subsequentes de modelação molecular, um número maior de compostos poderia por em cause a realização completa de todos os estudos *in silico* de modelação molecular.

A biblioteca LMW 2.0 irá ser disponibilizada à comunidade científica para poder ser utilizada por outras equipas de investigação em outros trabalhos de screening virtual, semelhantes ao que será apresentado na secção seguinte. A biblioteca será disponibilizada nos formatos SDF e PDB, que são os formatos de representação 3D de estruturas químicas mais utilizados na comunidade científica e no formato PDBQT mais específico da ferramenta de docking molecular utilizadas neste estudo, o AD4.

Figura 8: Representação do peróxido de ergosterol (32) em 2D (esquerda) realizado no Marvin Sketch e em 3D feito no Pymol (direita).



4.2 Screening Virtual da biblioteca LMW 2.0

Uma vez preparada a biblioteca virtual LMW 2.0, o passo seguinte foi o de testar virtualmente os compostos como possíveis inibidores de 3 membros da família de proteínas Bcl-2: a Bcl-2, a Bcl-XL e a MCL-1; utilizando o docking molecular. A metodologia de docking molecular é uma ferramenta *in silico* de modelação molecular que permite fazer previsões sobre possíveis modos de ligação entre os compostos em estudo e a estrutura 3D da uma proteína de interesse, assim como fazer previsões sobre a potência da interação composto/proteína. Quando a técnica de docking, ou outra técnica de modelação molecular *in silico*, é utilizada para testar uma biblioteca de muitos compostos designamos o processo como screening virtual. As 3 proteínas de

interesse da família de proteínas Bcl-2 foram selecionadas pois são atualmente reconhecidas como proteínas alvo em alguns processos tumorais, sendo a sua inibição reconhecida como uma provável forma de ativar o processo de apoptose tumoral e desta forma provocar a morte programada de células tumorais.

Este trabalho surge como sequência natural de um estudo anterior, em que se usou a mesma metodologia de screening virtual para estudar os 40 compostos da biblioteca LMW 1.0 como potenciais inibidores da proteína Bcl-2 (KHALIFA, 2016). No presente estudo aumentamos o número de compostos para 115 compostos, estabelecendo a biblioteca LMW 2.0, mas também utilizamos mais 2 proteínas alvo da mesma família Bcl-2: a Bcl-XL e a MCL-1.

O estudo de screening virtual foi realizado em 3 etapas que serão apresentadas: (1) enumeração das estruturas disponíveis no PDB (Protein Data Bank) para cada proteína, (2) ensaios de Re-docking e Cross-Docking para seleção das estruturas 3D mais adequadas e (3) realização de ensaios de screening virtual da biblioteca LMW 2.0, utilizando a metodologia escolhida.

4.2.1 Seleção de estruturas 3D das proteínas Bcl 2, Bcl-XL e MCL-1

No trabalho realizado por KHELIFA, 2016, começou-se por analisar as estruturas experimentais 3D da proteína Bcl-2 disponíveis na base de dados PDB (Protein Data Bank). Em 2016 estavam disponíveis 13 estruturas da Bcl-2. Destas 13 estruturas, 4 foram selecionadas tendo como base 3 critérios: (1) as estruturas terem sido obtidas pela metodologia experimental de cristalografia de raio-X, (2) a estrutura ter sido obtidas na presença de um ligando co-cristalizado e (3) o conhecimento do valor de constante de inibição (K_i) experimental do respetivo ligando co-cristalizado. Realizou-se a mesma pesquisa no PDB para este trabalho e verificou-se a presença de mais 3 estruturas num total de 16 (ver anexo 1). Considerando os critérios indicados anteriormente, as 4 estruturas selecionadas no trabalho de Khelifa (2016), foram mantidas para a realização dos estudos de screening virtual deste trabalho, estando apresentadas na tabela 6 as estruturas utilizadas: 4LVT, 4LXD, 4IEH e 4AQ3.

Tabela 6: Estruturas experimental da proteína Bcl-2 presentes no Protein Data Bank.

PDB	Método	Resolução (Å)	Co-cristalizado	Tipo de ligando	Ki Experimental (nM)	Referência
4LVT	Raio-X	2,05	Sim	LMW	0,044 nM	PARK, C.H., 2013
4LXD	Raio-X	1,90	Sim	LMW	59 nM	PARK, C.H., 2013
4IEH	Raio-X	2,10	Sim	LMW	14 nM	XIE, X. et al., 2013
4AQ3	Raio-X	2,40	Sim	LMW	37 nM	BERTRAND, et al., 2012

Realizou-se o mesmo tipo de pesquisa no PDB para as proteínas Bcl-XL e MCL-1, tendo-se verificado a existência de um total de 50 estruturas para a Bcl-XL (anexo 2) e 48 estruturas para a MCL-1 (anexo 3). Surpreendentemente, apesar da Bcl-2 ter sido a primeira proteína da família das proteínas Bcl-2 a ser relacionada com situações de apoptose tumoral e selecionada para potencial alvo terapêutico, existem mais estrutura e mais recentes para a Bcl-XL e MCL-1.

Os 3 critérios que foram aplicados para a Bcl-2 foram igualmente aplicados para a Bcl-XL e MCL-1, muitas das estruturas foram assim excluídas, ficando um total de 12 e de 16 estruturas para a Bcl-XL e para a MCL-1 respectivamente (a bold no anexo 2 e 3).

Uma vez que os estudos de docking molecular necessitam de um capacidade de processamento computacional muito elevada, assim como de muitos passo de preparação das estruturas proteicas, foi necessário selecionar ainda mais o número de estruturas. O número de estruturas foi então reduzido tendo como base critérios adicionais: (1) os valores de Ki experimentais das estruturas selecionadas abrangerem um gama alargada de valores de concentração e (2) a qualidade das estruturas, verificada pelo parâmetro da Resolução de cada estrutura. No final selecionaram-se 5 e 6 estruturas da Bcl-XL e MCL-1 respetivamente (tabelas 7 e 8).

Tabela 7: Estruturas experimentais da proteína Bcl-XL presentes no Protein Data Bank.

PDB	Método	Resolução (Å)	Co-cristalizado	Tipo de ligando	Ki experimental (nM)	Referência
4C52	Raio-X	2,05	Sim	LMW	22000 nM	BRADY et al., 2014
3WIZ	Raio-X	2,45	Sim	LMW	4,4 nM	TANAKA et al., 2013
3ZK6	Raio-X	2,48	Sim	LMW	460 nM	LESSENE et al., 2013
3ZLR	Raio-X	2,03	Sim	LMW	0,55 nM	LESSENE et al., 2013
3QKD	Raio-X	2,02	Sim	LMW	3 nM	SLEEBS et al., 2011

Tabela 8: Estruturas experimentais da proteína MCL-1 presentes no Protein Data Bank.

PDB	Método	Resolução (Å)	Co-cristalizado	Tipo de ligando	Ki experimental (nM)	Referência
5FDR	Raio-X	2,60	Sim	LMW	17 nM	PELZ et al., 2016
4ZBI	Raio-X	2,50	Sim	LMW	310 nM	BRUKE et al., 2015
4WGI	Raio-X	1,85	Sim	LMW	4500 nM	FANG et al., 2014
4OQ6	Raio-X	1,81	Sim	LMW	3300 nM	PETROS et al., 2014
3WIX	Raio-X	1,90	Sim	LMW	540 nM	TANAKA et al., 2013
4HW2	Raio-X	2,80	Sim	LMW	55 nM	FRIBERG et al., 2012

4.2.2. Re-docking e Cross-Docking das proteínas Bcl-2, Bcl-XL e MCL-1

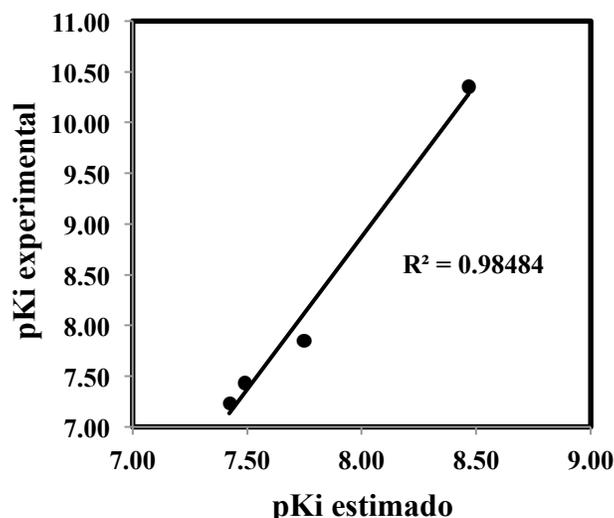
A correta seleção das estruturas 3D experimentais das proteínas em estudo é essencial para os estudos de docking molecular, a realizar com a biblioteca LMW 2.0. Uma vez selecionadas as estruturas é necessário a sua validação para utilização em ensaios de docking molecular. Para isso começou-se por realizar ensaios de docking com os inibidores co-cristalizados experimentalmente nas estruturas 3D das proteínas selecionadas. Estes ensaios são designados de Re-Docking, quando é utilizado o inibidor co-cristalizado presente na própria estrutura e Cross-Docking, quando utilizamos os inibidores co-cristalizados de outras estruturas da mesma proteína. Co-cristalizado significa que, quando a estrutura 3D da proteína em questão foi obtida pela técnica de Cristalografia de raio-X, o inibidor encontrava-se presente e a interagir com a proteína. Desta forma é possível obter experimentalmente a sua conformação de ligação.

Nos ensaios de docking molecular, um dos resultados obtidos é uma previsão da constante de inibição (Ki) estimado do inibidor em questão contra a estrutura da proteína-alvo. Como, para as estruturas selecionadas, temos o conhecimento das constantes de inibição experimental dos ligandos co-cristalizados (Ki experimental), ao realizar os ensaios de Re-Docking e Cross-Docking, é possível comparar estes valores de Ki experimental com os valores de Ki estimados. Esta é a razão porque selecionamos apenas estruturas PDB com inibidores co-cristalizados com Ki experimentais conhecidos. Podemos assim verificar se estes valores são comparáveis, analisar se são correlacionáveis, e desta forma validar a(s) melhor(es) estruturas 3D das proteínas alvo para ensaios posteriores de screening virtual.

Tabela 9: Resultado dos cross-docking e re-docking usando as estruturas cristalizadas da Bcl-2, realizado por AD4.

Inibidor	ΔG estimado (Kcal/mol)					Ki médio estimado (nM)	pki estimado **	Ki experimental (nM)	pki experimental**	Diferenças do pKi***
	4IEH	4AQ3	4LVT	4LXD	Média					
4IEH_lig	-9,91*	-10,90	-10,30	-11,10	-10,57	17,80	7,75	14,00	7,85	-0,10
4AQ3_lig	-9,19	-10,7*	-11,20	-9,72	-10,22	32,40	7,49	37,00	7,43	-0,06
4LVT_lig	-9,13	-12,40	-13,1*	-13,13	-11,55	3,40	8,47	0,04	10,34	-1,89
4LXD_lig	-10,30	-8,46	-10,60	-11,08*	-10,13	37,90	7,42	59,00	7,23	-0,19

*re-docking; **pKi = $-\log_{10}Ki$; *** diferença pKi = (pKi estimado – pKi experimental)

Figura 9: Correlação entre os valores de pKi experimental e estimado, obtido usando AD4 para os inibidores co-cristalizados presentes nas 4 estruturas selecionadas do PDB para a proteína Bcl-2.

Os ensaios de Re-Docking e Cross-Docking para a proteína Bcl-2 já tinham sido realizados por KHELIFA, 2016 e estão apresentados na tabela 9 e no gráfico de correlação (figura 9). Como vimos anteriormente, os pressupostos para a Bcl-2 em relação à disponibilidade de estruturas PDB mantêm-se essencialmente iguais ao tempo do trabalho de 2016 e por isso, para o screening virtual da biblioteca LMW 2.0, manteve-se a seleção das 4 estruturas indicadas. Dos dois softwares de docking utilizados por KHELIFA, 2016, o AutoDock 4 (AD4) foi o que apresentou melhores resultados nas correlações entre os valores de Ki experimentais e Ki estimados. O AD4 fornece os resultados como uma energia livre de ligação estimada (ΔG estimados). Na tabela 9 os resultados são apresentados como a média dos valores de ΔG estimados entre cada ligando co-cristalizado e cada uma das 4 estruturas 3D selecionadas da Bcl-

2. Estes valores de ΔG médios estimados são depois convertidos em K_i estimados, utilizando a fórmula apresentada na metodologia.

A tabela 9 também apresenta os valores K_i experimentais obtidos na literatura para cada ligando co-cristalizado, bem como os valores de K_i convertido para uma escala logarítmica (pK_i s estimados e experimentais) e a diferença pK_i (pK_i Estimado - pK_i Experimental). Idealmente, os valores das diferenças de pK_i deverão ser nulos ou significativamente pequenos, nessa situação os valores K_i estimados corresponderiam exatamente ou aproximadamente aos valores de K_i experimentais para cada ligando co-cristalizado. Como podemos observar na figura 9 o coeficiente de correlação obtida utilizando as 4 estruturas selecionadas da Bcl-2 foi de 0,9848, um valor muito robusto estatisticamente e que permite ter bastante confiança em relação aos resultados no screening virtual da biblioteca LMW 2.0 utilizando a mesma metodologia.

Para a proteína Bcl-XL foram então utilizadas as 5 estruturas selecionadas e realizados os ensaios de Re-Docking e Cross-Docking, (tabela 10). O coeficiente de correlação obtido entre os valores de pK_i experimental e pK_i estimado foi de 0,6764, um valor que já pode ser considerado bastante aceitável para este tipo de estudos *in silico* (figura 10-A).

Devemos lembrar que neste tipo de ensaios de docking, estamos a simplificar algo que é inerentemente complexo e que é a estrutura 3D de uma proteína com os seus milhares de átomos constituintes e respectivas ligações covalentes e ligações inter-moleculares. Em ensaios de docking a estrutura 3D da proteína também é utilizada como uma entidade rígida e parada no tempo, o que é outra simplificação, uma vez que estruturas 3D das proteínas são estruturas dinâmicas com alterações da sua conformação estrutural quando no seu ambiente aquoso natural. Assim, a previsão de K_i s para diferentes compostos, utilizando o docking molecular, para determinar a probabilidade deste composto ser um potencial inibidor proteína em estudo, deve ser sempre considerada com cuidado e tendo sempre em conta as limitações da metodologia.

Tabela 10: Re-docking e cross-docking com o AD4 utilizando as estruturas cristalizadas da Bcl-XL selecionadas.

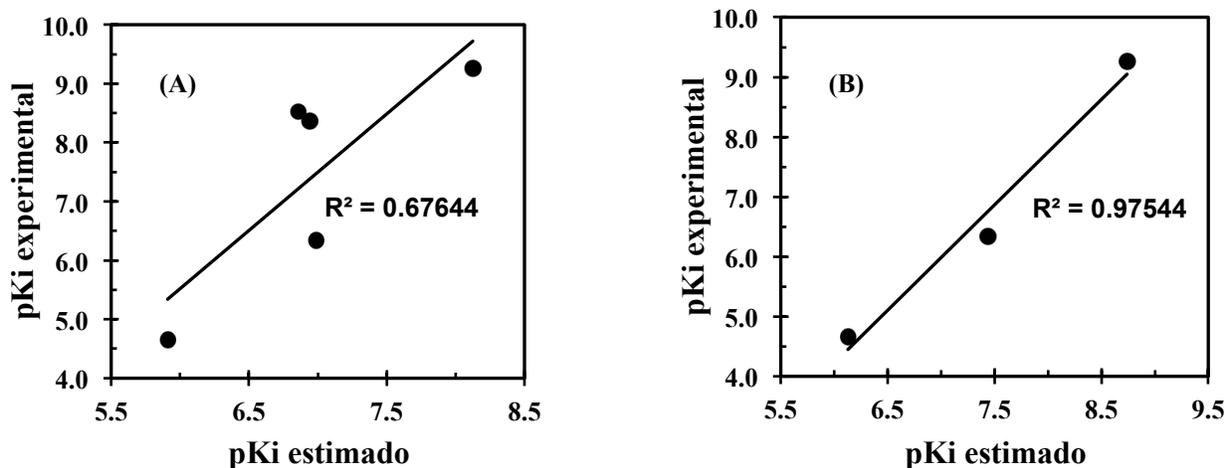
Inibidor	ΔG estimado (Kcal/mol)					Ki médio estimado (nM)	pki estimado **	Ki experimental (nM)	pki experimental **	Diferença do pKis **	
	4C52	3ZLR	3WIZ	3ZK6	3QKD						Média
4C52_lig	-8,7*	-7,42	-7,42	-8,92	-7,81	-8,06	1231,69	5,91	22000,00	4,66	-1,25
3ZLR_lig	-10,58	-13,6*	-9,85	-11,53	-9,80	-11,08	7,51	8,12	0,55	9,26	1,13
3WIZ_lig	-8,04	-7,72	-9,9*	-11,44	-10,16	-9,47	114,79	6,94	4,40	8,36	1,42
3ZK6_lig	-8,53	-11,86	-8,02	-10,06*	-9,20	-9,53	102,69	6,99	460,00	6,34	-0,65
3QKD_lig	-8,72	-8,90	-9,32	-9,20	-10,66*	-9,36	137,74	6,86	3,00	8,52	1,66

*re-docking; **pKi = $-\log_{10}Ki$; *** diferença pKi = (pKi estimado – pKi experimental)

Tabela 11: Re-docking e cross-docking com o AD4 utilizando as estruturas cristalizadas escolhidas da Bcl-XL, após a remoção da 3WIZ e 3QKD

Inibidor	ΔG estimado (Kcal/mol)				Ki médio estimado (nM)	Pki estimado **	Ki experimental (nM)	Pki experimental **	Diferença do pki ***
	4C52	3ZLR	3ZK6	Média					
4C52_lig	-8,7*	-7,42	-8,92	-8,36	744,84	6,13	22000,00	4,66	-1,47
3ZLR_lig	-10,50	-13,6*	-11,50	-11,92	1,82	8,74	0,55	9,26	0,52
3ZK6_lig	-8,53	-11,80	-10,0*	-10,15	36,31	7,44	460,00	6,34	-1,10

*re-docking; **pKi = $-\log_{10}Ki$; *** diferença pKi = (pKi estimado – pKi experimental)

Figura 10: Correlação entre os valores de pKi Experimental e pKi Estimado, obtido utilizando AD4, com as todas as estruturas selecionadas (A) e após a remoção das estruturas 3WIZ e 3QKD(B).

Nesta altura do estudo foi necessário ter em conta a processamento computacional necessário para estudar a biblioteca LMW 2.0 completa de 115 compostos. Tendo em conta os recursos computacionais existentes tomou-se a decisão de reduzir o número de estruturas para 3 ou 4 estruturas, de forma a permitir que o trabalho posterior de “screening” virtual fosse possível de ser realizado num período de tempo adequado. Utilizou-se como parâmetro de remoção das proteínas o valor de Diferença de pKis. Quanto maior for este valor, maior a diferença entre o valor de pKi estimado e o experimental, o que indica que o AD4 estará a prever menos corretamente a potência de ligação. Assim, para a Bcl-XL, foram removidas as estruturas 3WIZ e 3QKD mantendo-se as estruturas 4C52, 3ZLR e 3ZK6. O resultado foi uma melhoria da correlação entre valores experimentais e previstos com um coeficiente de correlação de 0,9754 (tabela 11 e figura 10-B). Estas 3 estruturas foram então utilizadas para o screening virtual da biblioteca LMW 2.0.

Para a proteína MCL-1 utilizaram-se as 6 estruturas selecionadas e realizaram-se os ensaios de Re-Docking e Cross-Docking, (tabela 12). O coeficiente de correlação resultante entre os valores de pKi experimental e pKi estimado foi de 0,4397. (figura 11-A).

Tabela 12: Re-docking e cross-docking com o AD4 utilizando as estruturas cristalizadas da MCL-1 selecionadas.

Inibidor	ΔG Estimado (Kcal/mol)							Ki médio estimado (nM)	pKi estimado **	Ki experimental (nM)	Pki experimental **	Diferença do pKi ***
	5FDR	4HW2	3WIX	4OQ6	4WGI	4ZBI	Média					
5FDR_lig	-9,3*	-10,43	-9,67	-11,60	-11,30	-10,00	-10,30	24,50	7,61	17	7,76	-0,15
4HW2_lig	-7,67	-10,1*	-11,10	-8,85	-8,88	-12,10	-9,86	58,52	7,23	55	7,25	-0,03
3WIX_lig	-7,80	-10,67	-12,1*	-10,60	-10,30	-11,80	-10,68	14,80	7,82	540	6,26	-1,56
4OQ6_lig	-6,96	-7,94	-8,72	-8,0*	-8,17	-9,10	-8,17	1019,04	5,99	33000	4,28	1,51
4WGI_lig	-8,84	-10,41	-9,60	-11,70	-9,4*	-10,20	-10,15	36,22	7,44	4500	5,34	2,09
4ZBI_lig	-8,99	-10,50	-12,60	-9,59	-9,86	-10,5*	-10,47	20,92	7,67	310	6,50	1,17

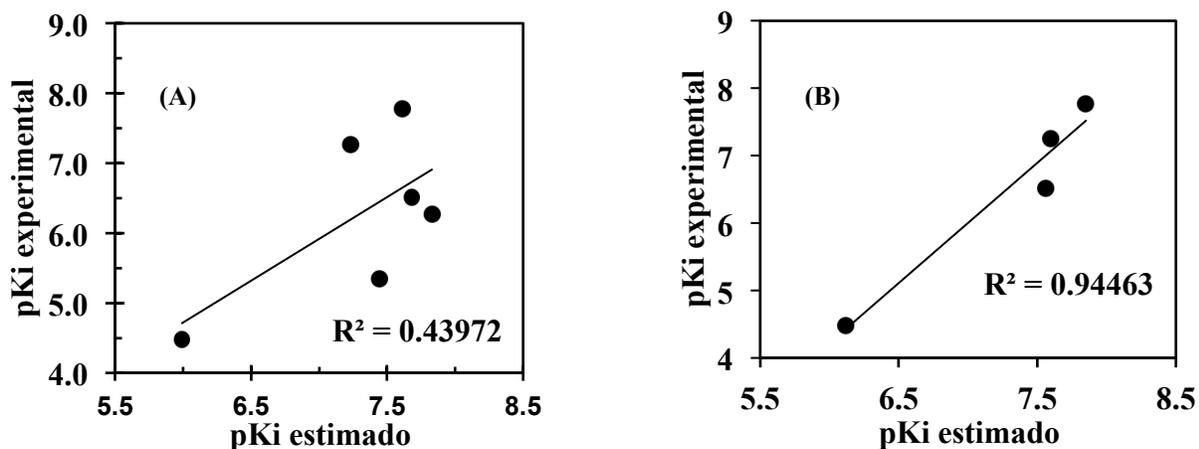
*re-docking; **pKi= $-\log_{10}Ki$; *** diferença pKi = (pKi estimado – pKi experimental)

Tabela 13: Resultados dos cross-docking e re-docking usando as estruturas cristalizadas da MCL1, aplicado por AD4 após a retirada das estruturas 3WIX e 4WGI.

Inibidor	ΔG Estimado (Kcal/mol)					Ki médio estimado (nM)	pKi estimado **	Ki experimental (nM)	Pki experimental **	Diferença do pKi ***
	5FDR	4HW2	4OQ6	4ZBI	Média					
5FDR_lig	-10,4*	-10,07	-11,60	-10,70	-10,71	14,11	7,85	17	7,77	0,08
4HW2_lig	-10,10	-10,4*	-8,85	-12,00	-10,36	25,25	7,59	55	7,26	0,34
4OQ6_lig	-7,94	-8,32	-8,0*	-9,13	-8,34	767,17	6,11	33000	4,48	1,63
4ZBI_lig	-10,50	-11,33	-9,59	-9,8*	-10,31	27,48	7,56	310	6,51	1,05

*re-docking; **pKi= $-\log_{10}Ki$; *** diferença pKi = (pKi estimado – pKi experimental)

Figura 11: Correlação entre os valores de pKi Experimental e pKi Estimado, obtido utilizando AD4, com as estruturas cristalizadas selecionadas da MCL-1 (A).



Para a seleção das estruturas da MCL-1 a utilizar levou-se também em conta a questão dos recursos computacionais existentes, processamento computacional necessário e os mesmos parâmetros apontados anteriormente para a Bcl-XL, tendo-se reduzido a quantidade total de estruturas para 4 estruturas. Assim, para a proteína MCL-1 foram removidas as estruturas 3WIX e 4WGI, pois apresentavam a maior diferença do pKi, ou seja, os valores de pki estimados estavam mais distantes dos valores de pKi experimentais. A remoção das duas estruturas resultou em uma melhora significativa do valor do coeficiente de correlação para 0,9446 (tabela 13 e figura 11-B). Foram assim utilizadas para o screening virtual da biblioteca LMW 2.0, as seguintes estruturas da MCL-1: 5FDR, 4HW2, 4OQ6 e 4ZBI.

4.2.3 Screening Virtual da biblioteca LMW 2.0 contra a Bcl-2, Bcl-XL e MCL-1

Uma vez estabelecidas as estruturas a utilizar para cada uma das 3 proteínas em estudo, realizaram-se de seguida os ensaios de screening virtual da biblioteca LMW 2.0, utilizando o AD4. Assim pretendeu-se tentar prever o potencial inibidor de cada composto, bem com tentar prever a sua conformação tridimensional de ligação. Uma vez que seria exaustivo apresentar em tabela os resultados dos 115 compostos da biblioteca, para cada uma das 3 proteínas, optou-se por apresentar os resultados dos 10 compostos com ΔG médios estimados mais baixos e consequentemente com um K_i estimado também mais baixo. Estes serão o nosso top 10 para cada proteína. Para facilitar a análise dos resultados adicionou-se também uma coluna nas tabelas com a indicação do rank, sendo o composto com número 1 no rank o composto com maior potência de inibição estimada e assim sucessivamente. Os resultados completos de todos os compostos são apresentados nos anexos 4 a 6.

Tabela 14: Screening Virtual da biblioteca LMW 2.0 contra a proteína Bcl-2: indicação dos 10 compostos com melhor K_i estimado.

Família do composto	Composto	Nº	ΔG médio estimado (Kj/mol)	K_i estimado (nM)	Rank
Esteróide	5,8-Epidioxi-24(R)-metilcolesta-6,22-dien-3 -D-glucopiranosídeo	18	-9,35	140,7	1
Terpeno	Colossolactona H	48	-9,25	165,1	2
Esteróide	(3 β ,5 α ,8 α ,22E)-5,8-epidioxiergosta-6,22-dien-3-il β -D-glucopiranosídeo	3	-9,24	168,0	3
Esteróide	Ácido Ganodérico W	a22*	-9,23	171,5	4
Esteróide	Ácido Ganodérico T	a23c*	-9,17	190,6	5
Esteróide	5,8-Epoxy-24(R)-metilcolesta-6,22-dien- 3 β -ol	17	-9,12	205,7	6
Esteróide	Ácido Ganodérico Y	a23b*	-9,12	205,7	6
Esteróide	Ganodermanontriol	a20d*	-9,12	207,4	8
Esteróide	Ergosta- 4,6,8 (14), 22- tetraen-3-ona	a16*	-8,95	274,0	9
Esteróide	Ácido Ganodérico X	a23a*	-8,94	281,0	10

*compostos da biblioteca LMW 1.0.

Ao analisar os resultados do screening virtual como um todo, verificou-se que a proteína MCL-1 apresentou valores de K_i estimado melhores (mais baixos) com valores entre os 17,1 nM para o composto na posição 1 do rank e 64,7 nM para o composto na posição 10. De seguida os melhores resultados foram para a Bcl-XL com valores entre os 51,5 e 185,6 nM e finalmente os

resultados piores foram da Bcl-2 com valores de Ki entre 140,7 nM e 281 nM. Este resultado valida o pressuposto inicial do trabalho de ampliar o estudo para a Bcl-XL e a MCL-1, uma vez que estas proteínas apresentaram melhores resultados e parecem ser mais susceptíveis de inibição pelos compostos naturais presentes em cogumelos e seleccionados para a biblioteca LMW 2.0.

Tabela 15: Screening Virtual da biblioteca LMW 2.0 contra a proteína Bcl-XL: indicação dos 10 compostos com melhor Ki estimado.

Família do composto	Composto	Nº	ΔG médio estimado (Kj/mol)	Ki estimado (nM)	Rank
Terpeno	Glucosídeo Egnol	54	-9,94	51,5	1
Terpeno	Hericerina	74	-9,93	52,9	2
Esteróide	(3 β ,5 α ,8 α ,22E)-5,8-epidioxiergosta-6,22-dien-3-il β -D-glucopiranosídeo	3	-9,89	56,3	3
Flavona	Inoscavina A	69	-9,64	85,4	4
Esteróide	Estelasterol	28	-9,55	99,4	5
Esteróide	Ergosta- 4,6,8 (14), 22- tetraen-3-ona	a16*	-9,43	122,4	6
Esteróide	Ácido Dihidroeburicóico	22	-9,35	139,3	7
Esteróide	Lucidumol A	a19*	-9,31	149,9	8
Esteróide	(22E)-ergosta-5,7,22-trien-3-ol	10	-9,19	184,5	9
Esteróide	(22E,24S)-ergosta-4,22-dien-3-ona	4	-9,18	185,6	10

*compostos da biblioteca LMW 1.0.

Curiosamente os compostos presentes no top 10 são praticamente todos esteróides e terpenos. Embora esta circunstância seja de esperar, uma vez que estes dois grupos representam mais de 76% dos compostos da biblioteca, ainda assim esta maioria é muito expressiva com apenas uma flavona, a Inoscavina A, ser a exceção aparecendo na posição 4 como potencial inibidor da Bcl-XL.

Considerando que muitos destes compostos aparecem conjuntamente em algumas espécies de cogumelos, podemos pressupor que muitas vezes a atividade inibidora contra as proteínas da família Bcl-2 poder ser promovida, não por apenas um destes compostos, mas pelo conjunto de vários compostos a promover sinergisticamente a sua atividade.

Outro aspeto a salientar, que também valida os pressupostos deste trabalho de ampliar a biblioteca em estudo de 40 para 115 compostos, é o facto dos compostos com maior potencial serem quase todos novas adições à biblioteca em estudo. Para ilustrar este facto, podemos verificar que, com a exceção da ganodermanontriol que aparece na posição 2 do rank da MCL-1,

os 3 compostos com maior potencial para cada uma das 3 proteínas serem compostos adicionados de novo aquando da preparação da biblioteca LMW 2.0.

Tabela 16: Screening Virtual da biblioteca LMW 2.0 contra a proteína MCL-1: indicação dos 10 compostos com melhor Ki estimado.

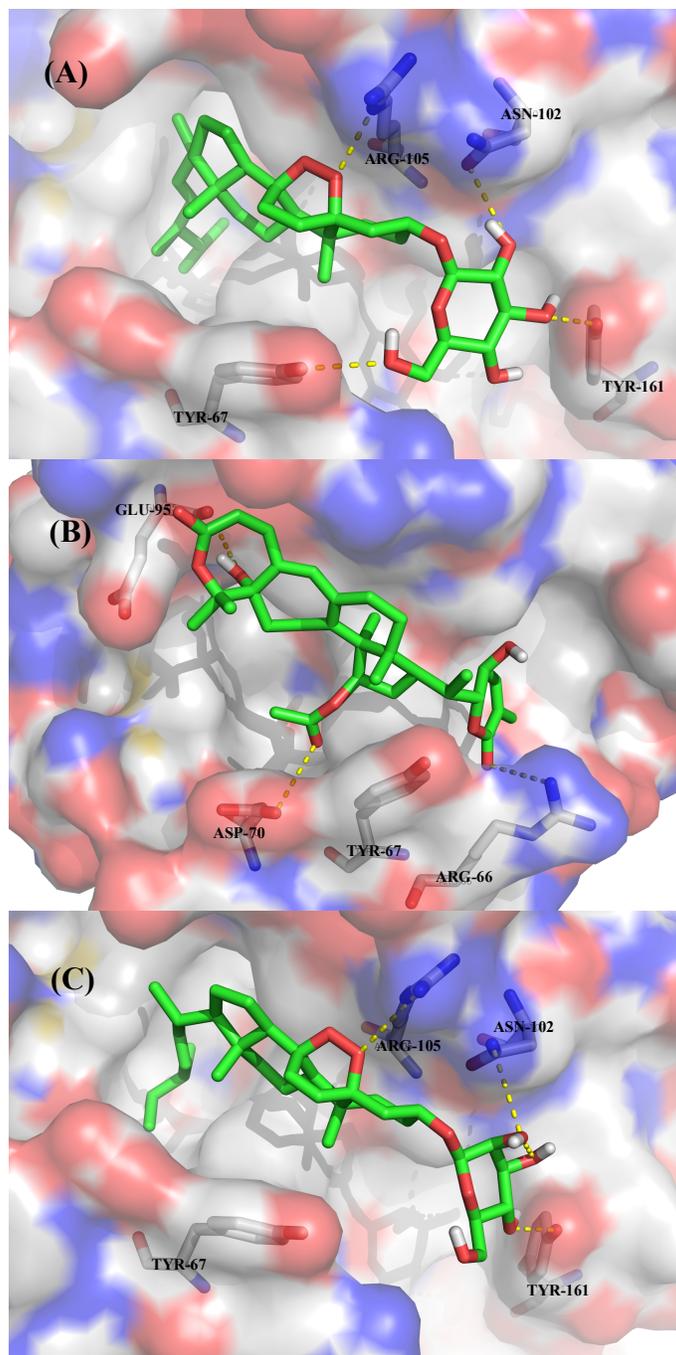
Família do composto	Composto	Nº	ΔG médio estimado (Kj/mol)	Ki estimado (nM)	Rank
Esteróide	(22E)-5 α ,6 α -epoxi ergosta-8,14,22-trien-3 β ,7 β -diol	9	-10,60	17,1	1
Esteróide	Ganodermanondiol	a20c*	-10,34	26,5	2
Esteróide	(22E)-19-nor ergosta-5,7,9,22-tetraen-3 β -ol	7	-10,19	34,1	3
Esteróide	(22E,24S)-ergosta-4,22-dien-3-ona	4	-10,00	47,0	4
Terpeno	Colossolactona H	48	-9,89	56,8	5
Esteróide	Ácido Ganodérico Y	a23b*	-9,87	58,0	6
Esteróide	(3 β ,5 α ,22E)-ergosta7,22,24(28)-trien-3-ol	12	-9,86	59,7	7
Esteróide	9,11- peróxido dehidroergosterol	21	-9,85	60,8	8
Esteróide	(22E)-ergosta-5,7,22-trien-3-ol	10	-9,84	61,5	9
Esteróide	(3 β ,5 α ,8 α ,22E,24S)-5,8-epidioxi ergosta-6,9(11),22-trien-3-ol	1	-9,81	64,7	10

*compostos da biblioteca LMW 1.0.

4.2.4. Análise estrutural da conformação de ligação dos compostos com melhor potencial inibidor da Bcl-2, Bcl-XL e MCL-1

De forma a analisar em melhor detalhe os resultados para cada proteína, analisou-se a conformação de ligação prevista para o top 3 dos compostos com maior potencial de inibição. Esta análise estrutural está apresentada na figura 11, 12 e 13. Em cada figura tentou-se evidenciar os pontos-chave da interação entre cada composto e a estrutura 3D da proteína. Assim representou-se o posicionamento da estrutura dos compostos no centro activo de cada uma das proteínas. Também são representadas as pontes de hidrogénio, previstas pelo AD4, entre os compostos e a estrutura 3D da proteína, bem como os aminoácidos que formam as pontes de Hidrogénio. É importante dizer que o centro ativo representado corresponde à zona de interação proteína-proteína, entre cada uma das 3 proteínas em estudo e outras proteínas que atuam nas vias de sinalização da apoptose. O que se pretende, ao inibir por ligação dos compostos em estudo com a estrutura 3D das proteínas, é impedir a interação entre proteínas e deste modo eventualmente promover a apoptose tumoral.

Figura 11: Conformação de ligação prevista do top 3 dos compostos da biblioteca LMW 2.0 contra a Bcl-2. Os compostos estão representados na cor verde em formato “sticks and balls”: (A)- 5,8-Epidioxi-24(R)-metilcolesta-6,22-dien-3-il- β -D-glucopiranosídeo (18); (B)- Colossolactona H (48) e (C)- (3 β ,5 α ,8 α ,22E)-5,8-epidioxi-ergosta-6,22-dien-3-il- β -D-glucopiranosídeo (3). As pontes de hidrogênio são representadas a amarelo tracejado.



Na Bcl-2 os compostos do top 3 são, por ordem de menor Ki estimado: o 5,8-Epidioxi-24(R)-metilcolesta-6,22-dien-3-il- β -D-glucopiranosideo (18), a Colossolactona H (48) e o (3 β ,5 α ,8 α ,22E)-5,8-epidioxiergosta-6,22-dien-3-il- β -D-glucopiranosideo (3). Na figura 11 representamos a conformação de ligação prevista pelo AD4 para cada um dos 3 compostos. Os esteroides 18 e 3 apresentam uma estrutura muito semelhante, apenas com diferenças nas ligações duplas presentes no esqueleto tetracíclico característico dos esteroides (o tetra-anel ciclopentanoperidrofenantreno). Assim não é surpreendente o modo de ligação ser muito semelhante, com a glucose presente na estrutura direcionada para o solvente e formando pontes de hidrogénio com aminoácidos adjacentes ao centro ativo, nomeadamente a Tir-67, a Asn-102 e a Tir-161. Uma característica que distingue os compostos 18 e 3 é a presença de uma ligação -O-O- entre dois carbonos opostos do anel B do seu esqueleto tetracíclico. Esta ligação -O-O- forma uma ponte de hidrogénio com o aminoácido Arg-105 e esta ligação poderá explicar em parte o forte poder inibidor estimado destes compostos. O AD4 também previu a formação de 3 pontes de hidrogénio entre o composto 48 e os aminoácidos Arg-66, a Tir-67, o Asp-70, o Glu-95 da estrutura da Bcl-2. O sistema de anéis do composto 48 é hidrofóbico, e o seu posicionamento é de molde a ocupar o interior do centro ativo, onde o ambiente químico também é mais hidrofóbico. As pontes de hidrogénio previstas formam-se entre grupos polares do composto 48 e aminoácidos polares que coroam a zona do centro ativo mais exposta ao solvente.

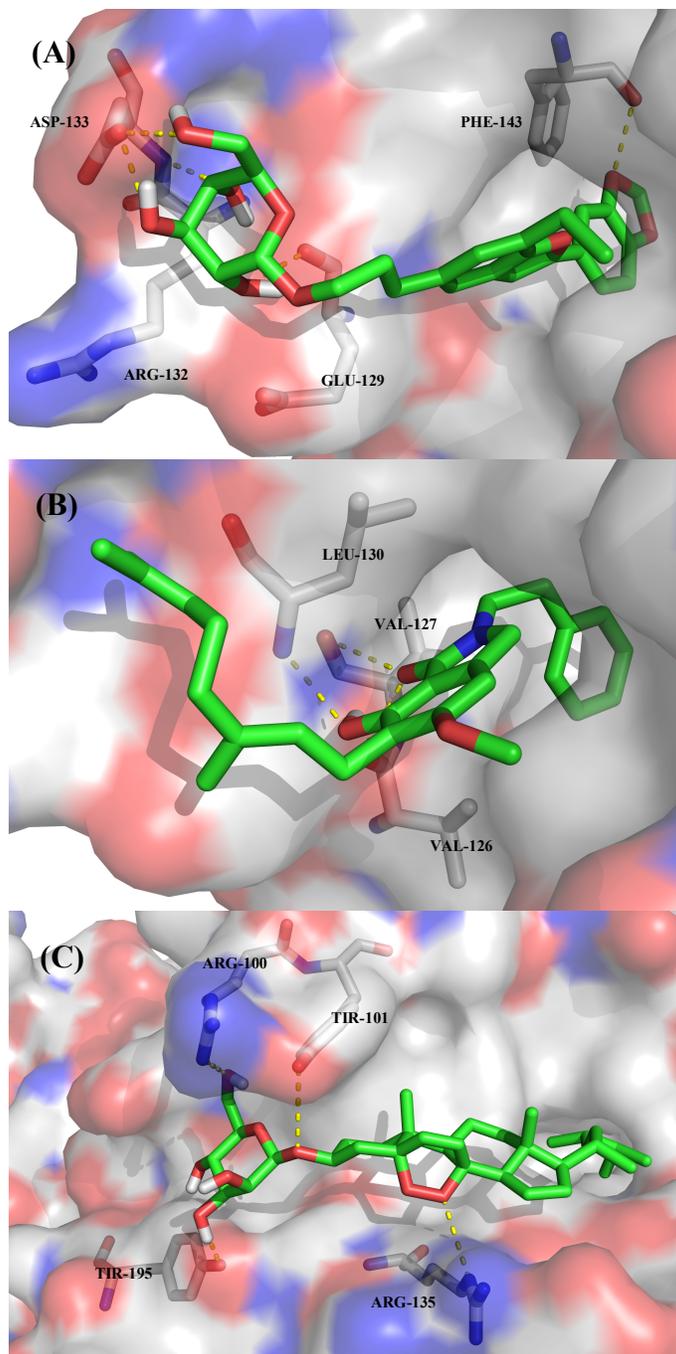
Na Bcl-XL os compostos do top 3 são, por ordem de menor Ki estimado: o Glucosídeo Egnol (54), a Hericerina H (48) e o (3 β ,5 α ,8 α ,22E)-5,8-epidioxiergosta-6,22-dien-3-il- β -D-glucopiranosideo (3). Na figura 12 representou-se a conformação de ligação prevista pelo AD4, para cada um dos 3 compostos. À semelhança do top 3 da Bcl-2, podemos observar que 2 dos compostos do top 3 da Bcl-XL, o 54 e o 3, são compostos glicosilados, ou seja tem na sua constituição uma molécula de glucose. O composto 3 aparece mesmo como potencial inibidor quer na Bcl-2 quer na Bcl-XL. Estas glicosilações parecem assim melhorar a capacidade dos compostos de inibir proteínas da família Bcl-2. Ao observar estruturalmente a conformação prevista de ligação, verificou-se que as glucoses estão posicionadas em zonas exteriores no centro ativo, formando pontes de hidrogénio com os aminoácidos que coroam a centro ativo. Os aminoácidos envolvidos incluem, para o composto 54, os aminoácidos Glu-129, Arg-132, Asp-

133 e Phe-143; para o composto 48 os aminoácidos Val-126, Val-127 e Leu.130 e para o composto 3 os aminoácidos Arg-100, Tir-101, Arg-135 e a Tir-197.

Como indicado anteriormente, o centro ativo das proteínas da família das Bcl-2 tem normalmente uma forma alongada e relativamente grande. Este facto está relacionado como a característica destas proteínas de promoverem a sua função por intermédio de interações proteína-proteína, sendo a zona de interação entre duas moléculas grandes quase sempre bastante alargada. Assim, verificou-se que o centro ativo consegue facilmente acomodar compostos estruturalmente grandes e compridos como os esteroides e os terpenos estudados.

De uma forma geral a estrutura base dos compostos do top 3 das proteínas estudadas é hidrofóbica e é acomodada nas zonas interiores do centro ativo. Já os grupos polares, incluindo os grupos hidroxilo da glucose, estão normalmente mais voltados para fora do centro ativo, ora formando pontes de hidrogénio com resíduos de aminoácidos polares que coroam o centro ativo, ora com as moléculas de água que constituem o solvente. O resultado da conformação de ligação prevista pelo AD4 não representa possíveis moléculas de água que formem estas pontes de Hidrogénio, no entanto o AD4 leva a presença do solvente em consideração, quando calcula os valores de ΔG estimado.

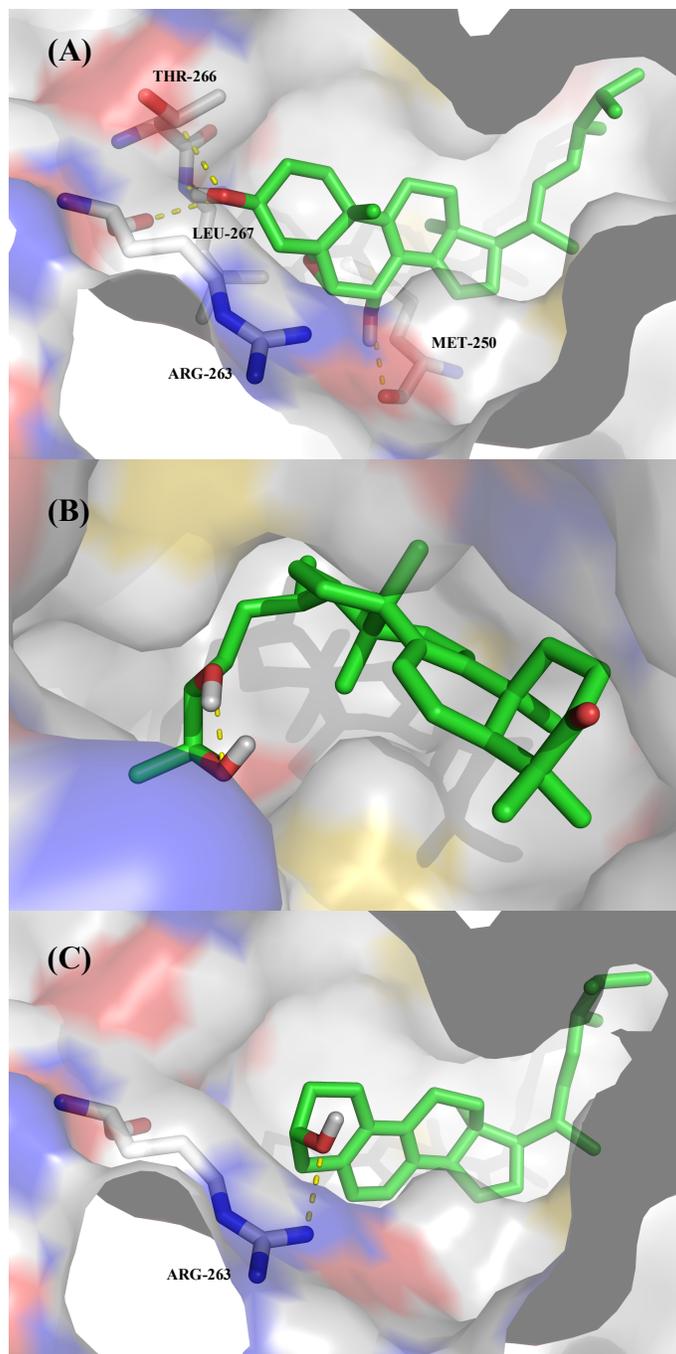
Figura 12: Conformação de ligação prevista do top 3 dos compostos da biblioteca LMW 2.0 contra a Bcl-XL. Os compostos estão representados na cor verde em formato “sticks and balls”: (A)- Glucosídeo Egnol (54); (B)- Hericerina H (48) e (C)- (3 β ,5 α ,8 α ,22E)-5,8-epidioxiergosta-6,22-dien-3-il- β -D-glucopiranosídeo (3). As pontes de hidrogénio são representadas a amarelo tracejado.



Em relação à MCL-1 os compostos do top 3 são, por ordem de menor K_i estimado: o (22E)-5 α ,6 α -epoxiergosta-8,14,22-trien-3 β ,7 β -diol (9), a Ganodermanondiol (a20c) e o (22E)-19-norergosta-5,7,9,22-tetraen-3 β -ol (7). Os compostos 9 e 7 são esteróis, com o grupo hidroxilo como único grupo polar a formar pontes de hidrogénio com vários aminoácidos polares situados na orla do centro ativo. Já o núcleo cíclico apolar característico dos esteroides, o tetra-anel ciclopentanoperidrofenantreno, ocupa como esperado a zona interna do centro ativo da MCL-1. Os aminoácidos envolvidos incluem, para o composto 9, os aminoácidos Met-250, Arg-263, Thr-266 e a Leu-267 e para o composto 7 o aminoácido Arg-263.

O centro ativo do MCL-1, à semelhança da Bcl-2 e Bcl-XL, tem uma conformação alongada, no entanto é bastante mais fechado e estreito, não estando tão exposto ao solvente. Talvez por essa razão, e ao contrário da Bcl-2 e Bcl-XL, os compostos do top 10 sejam todos esteroides mais pequenos, mais apolares e sem glicosilações na sua estrutura. Em relação ao composto a20c não foi estimada nenhuma ponte de hidrogénio como a estrutura 3D da MCL-1, apenas foi estimada uma ponte de Hidrogénio intramolecular entre os dois grupos hidroxilo constituintes do a20c.

Figura 13: Conformação de ligação prevista do top 3 dos compostos da biblioteca LMW 2.0 contra a MCL-1. Os compostos estão representados na cor verde em formato “sticks and balls”: (A)- (22E)-5 α ,6 α -epoxi ergosta-8,14,22-trien-3 β ,7 β -diol (9); (B)- Ganodermanondiol (a20c) e (C)- (22E)-19-norergosta-5,7,9,22-tetraen-3 β -ol (7). As pontes de hidrogénio são representadas a amarelo tracejado.



5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS

O trabalho apresentado teve como primeiro objetivo preparar uma biblioteca de compostos de baixo peso molecular (LMW-“Low Molecular Weight”), presentes em diferentes espécies de cogumelos que tenham sido envolvidos em algum tipo de atividade antitumoral. A esta biblioteca designamos LMW 2.0 uma vez que foi preparada tendo como ponto de partida uma biblioteca de 40 compostos preparada anteriormente e designada LMW 1.0. No final mais 75 compostos foram adicionados ficando a biblioteca LMW 2.0 preparada com um total de 115 compostos. A maior parte dos compostos são esteroides e terpenos (cerca de 52 e 24 %, respectivamente) estando outros tipos de compostos representados em menor número incluindo: quinonas e hidroquinonas, isoflavonas, flavonas, catecóis e fenóis; alcaloides; amins amidas e ácidos gordos. Estes compostos foram cuidadosamente desenhados em formato 2D e otimizados em formato 3D, sendo finalmente guardados em formatos digitais adequados para os estudos *in silico* posteriores.

Em uma segunda fase realizou-se o screening virtual da biblioteca LMW 2.0 contra as proteínas da família Bcl-2: a Bcl-2, a Bcl-XL e a MCL-1. Estas 3 proteínas estão envolvidas em vias de sinalização celular, principalmente no processo de apoptose, e são neste momento alvos terapêuticos reconhecidos em situações em que se pretende estimular a apoptose tumoral.

Muita atenção foi dada à seleção da melhor metodologia a utilizar no screening virtual. Neste estudo, e tendo como base um trabalho anterior realizado no nosso grupo, decidiu-se utilizar a metodologia de docking molecular utilizando o software AutoDock 4.0 (AD4). Foi realizada uma seleção cuidadosa das estruturas 3D a usar para cada uma das 3 proteínas em estudo e no final, após um estudo de validação Re-Docking e Cross-Docking, 3 ou 4 estruturas foram selecionadas para utilização no screening virtual.

Uma vez selecionada a metodologia que seria utilizada executou-se o screening virtual da biblioteca LMW 2.0 de 115 compostos para cada uma das 3 proteínas em estudo. Nos ensaios de docking molecular os resultados são fornecidos como a constante de inibição (K_i) estimado para cada composto, bem como é obtida uma conformação de ligação entre os compostos e a estrutura 3D da proteína.

No geral os compostos da família dos esteroides, mas também alguns terpenos, foram os compostos que apresentaram valores de K_i mais baixos. A proteína MCL-1 pareceu ser mais

susceptível de ser inibida pelos compostos da biblioteca LMW 2.0, com valores de K_i estimados mais baixos, variando entre 17,1 nM e 64,7 nM para os compostos do top 10. De seguida os melhores resultados foram obtidos para a Bcl-XL com valores entre os 51,5 e 185,6 nM e finalmente os resultados piores foram da Bcl-2 com valores de K_i entre 140,7 nM e 281 nM. Os compostos glicosilados, e no geral compostos com maior peso molecular, apresentaram melhor capacidade inibidora estimada. Uma análise detalhada das conformações de ligação estimadas do top 3, para cada proteína, mostrou que a melhor capacidade inibidora dos compostos glicosilados deverá ficar a dever-se à interação da glucose com alguns aminoácidos polares que formam a orla exterior do centro ativo das proteínas em estudo, bem como o seu posicionamento mais exposto ao solvente.

Este estudo apresenta algumas evidências que os esteroides e terpenos, presentes nos cogumelos, podem ser responsáveis, pelo menos parcialmente, pelas atividades antitumorais e pró-apoptóticas que algumas espécies de cogumelos apresentam; e que o mecanismo molecular dessas atividades pode ocorrer por inibição das proteínas da família Bcl-2 estudadas. Ainda assim, é importante ressaltar que os estudos apresentados foram todos realizados com ferramentas bioinformáticas, e que mais estudos são necessários para confirmar experimentalmente as conclusões deste trabalho.

Para trabalhos futuros, várias direções podem ser consideradas:

- Alargamento e disponibilização da biblioteca LMW 2.0 para utilização pela comunidade científica para outros estudos utilizando ferramentas *in silico*.
- Utilização da metodologia *in silico* de Dinâmica Molecular de forma a confirmar a plausibilidade das conformações de ligação dos compostos mais promissores.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, R.M.V. Antioxidant activity of diarylamines in the benzo[b]thiophene series and antitumoral/antiangiogenicactivities of thieno[3,2-b]pyridine derivates: in vitro studies, QSAR modelling, VEGFR-2 docking and software development. Tese (Doutorado em Genética Molecular Comparativa e Tecnológica)- Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Vila real, 2011.

ABREU, R. M. V. et al. Selective Flexibility of Side-Chain Residues Improves VEGFR-2 Docking Score Using AutoDock Vina. **Chem. Biol. Drug Des**, v.79, n.4, p.530–534, 2012.

ABREU, R.M.V et al. Virtual Screening using AutoDock4/Vina on computer clusters. **Journal of Cheminformatics**, v.2, p.10, 2010.

AIDA, F. et al. Mushroom as a potential source of prebiotics: a review. **Trends Food Science Tech**, v.20, i.11-12, p.567-75, 2009.

AMBROSI, E. et al. Structural changes in the BH3 domain of soul protein upon interaction with the anti-apoptotic protein Bcl-XL. **Biochem. J.**, v.438, p.291-301, 2011.

ATTARAT, T; PHERMTHAI, T. Bioactive compounds in three edible lentinus mushrooms. **Walailak Journal of Science and Technology**, v.12, i.6, p. 491-504, 2015.

BERGER, S. et al. Computationally designed high specificity inhibitors delineate the roles of Bcl-2 family proteins cancer. **Elife**, v.5, 2016.

BERTRAND, J.A.; FASOLINI, M., MODUGNO, M. Identification of a Phenylacylsulfonamide Series of Dual Bcl-2/Bcl-Xl Antagonists. **Bioorg.Med.Chem.Lett**, v.22, p.3946, 2012.

BORNER, C. The Bcl-2 protein family: Sensors and checkpoints for life-or-death decisions. **Molecular Immunology**, v.39, n.11, p.615-647, 2002.

BOK, J.W et al. Antitumor sterols from the mycelia of *Cordyceps sinensis*. **Phytochemistry**, v.51, p.891-898,1999.

BRADY, R.M. et al. De-novo designed library of benzoylureas as inhibitors of Bcl-XL: synthesis, structural and biochemical characterization. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.57, p.1323-1343, 2014.

BROUWER, J.M. et al. Conversion of Bim-BH3 from Activator to Inhibitor of Bak through Structure-Based Design. **Molecular Cells**, v.68, i.4, p.659-672, 2017.

BRUNCKO, M. et al. Structure- Guided design of a series of MCL-1 inhibitors with high affinity and selectivity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.58, p.2180-2194, 2015.

BRUNCKO, M. et al. Studies Leading to Potent, Dual Inhibitors of Bcl-2 and Bcl- xL. **J.Med.Chem**, v.50, p.641-662, 2007.

CHEN, S-Y. et al. Colossolactone H, a new Ganoderma triterpenoid exhibits cytotoxicity and potentiates drug efficacy of gefitinib in lung cancer. **Fitoterapia**, v.114, p.81-91, 2016.

CLAVERÍA, C. et al. Mvc-driven endogenous cell competition in the early mammalian embryo. **Nature**, v.500, p.39, 2013.

COTA, B.B. et al. A potent trypanocidal component from the fungus *Lentinus strigosus* inhibits trypanothione reductase and modulates PBMC proliferation. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.103, n.3, p.263-270, 2008.

CZABOTAR, P.E. et al. Mutation to Bax beyond the BH3 domain disrupts interactions with pro-survival proteins and promotes apoptosis. **The Jour. Bio. Chem.**, v.286, n.9, p.7123-7131, 2011.

CZABOTAR, P.E. et al. Structural insights into the degradation of MCL-1 induced by BH3 domains. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.104, p.6217-6222, 2007.

DONOVAN, M.; COTTER, T.G. Control of mitochondrial integrity by Bcl-2 family members and caspase-independent cell death. **Biochem Biophys Acta**, p. 133-47, 2004.

DUTTA, S. et al. Determinants of BH3 binding specificity for MCL-1 versus Bcl-XL. **J. Mol. Biol.**, v.398, p.747-762, 2010.

FANG, C. et al. Single Diastereomer of a macrolactam core binds specifically to myeloid cell leukemia 1 (MCL1). **Acs Med. Chem. Lett.**, v.5, p.1308-1312, 2014.

FERREIRA, I.; BARROS, L., ABREU, R. Antioxidants in wild mushrooms. **Current Medicinal Chemistry**, v.16, n.12, p.1543–1560, 2009.

FERREIRA, I. et al. Compounds from Wild Mushrooms with Antitumor Potential. **Agents Med. Chem**, v.10, n.5, p.424–436, 2010.

FENG, W. et al. Molecular basis of Bcl-XL's Target recognition versatility revealed by the structure of Bcl-XL in complex with the BH3 domain of Beclin-1. **J.Mol. Biol**, v.372, p.223-235, 2007.

FILHO, A.B.B. Estudo químico do Basidomiceto *Lentinus strigellus*, 2009, 221f. Dissertação (Doutorado em Química). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

FIRE, E. et al. Mcl-1-bim complexes accommodate surprising point mutations via minor structural changes. **Protein Science**, v.19, p. 507-519, 2010.

FOLLIS, A.V. et al. The DNA-binding domain mediates both nuclear and cytosolic functions of p53. **Nat.Struct.Mol.Biol.**, v.21, p.535-543, 2014.

FOLLIS, A.V. et al. PUMA binding induces partial unfolding within Bcl-XL to disrupt p53 binding and promote apoptosis. **Nat.Chem.Biol.**, v.9, p.163-168, 2013.

FORTES, R.; NOVAES, M. Efeitos antitumorais de cogumelos comestíveis da família agaricaceae. **Nutr Bras**, v.4, n.4, p.207-17, 2005.

FORTES, R.; NOVAES, M. Efeitos da suplementação dietética com cogumelos Agaricales e outros fungos medicinais na terapia contra o câncer. **Rev Bras Cancerol**, v.52, n.61, p.727-735, 2007.

FRIBERG, A. et al. Discovery of potent myloid cell leukemia 1 (MCL-1) inhibitors using fragment- based methods and structure- based design. **Jour. Med. Chem.**, v.56, p.15-30, 2012.

FROUFE, H. J. C.; ABREU, R. M. V.; FERREIRA, I. C. F. R. Virtual Screening of Low Molecular Weight Mushrooms Compounds as Potential Mdm2 Inhibitors. **J. Enzyme Inhib. Med. Chem.**, v.28, p.1–7, 2012.

GANGWAL, R.P. et al. Structure based virtual screening to identify selective phosphodiesterase 4B inhibitors. **J. Mol. Graph. Model.**, v.57,p.89–98, 2015.

GIBSON, G.R. et al. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. **Nutr Res Rev**, v.17, n.2, p.259-75, 2004.

GOODSELL, D.S.; MORRIS, G.M.; OLSONI, A.J. Automated docking of flexible ligands: applications of AutoDock. *J Mol Recognit* 1996; 9; 1-5; Morris GM, Huey R, Olson AJ. Using AutoDock for ligand-receptor docking. **Curr protoc bioinformatics**, v.11, p.34-37, 2008.

GUARLERZI, C.O. et al. **Antibiotics: Targets, mechanisms and resistance**. Germany: John Wiley & Sons, 2013.

GUEDES, M.P.C.A. Cogumelos em Fitoterapia: Eficácia e Segurança. Monografia (Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, 2016.

GUTERREZ, Z.R. et al. Variation of antimutagenicity of water extracts of *Agaricus blazei* Murril in vitro. **Toxicol in vitro**, v.18, n.3, p.301-309, 2004.

HENGARTNER, M.O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v.407, p.770, 12 out 2000.

HOTCHKISS, R. S. et al. Cell death in disease: Mechanisms and Emerging Therapeutic Concepts, **N. Engl. J. Med.**, v.361, n.16, p.1570-1583, 2009.

HUANG, S.Y.; ZOU, X. Advances and challenges in protein-ligand docking. **Int. J. Mol. Sci.**, v.11, n.8, p.3016–3034, 2010.

JENSON, J.M. et al. Epistatic mutations in PUMA BH3 drive and alternative binding mode to potently and selectively anti-apoptotic Bcl-1. **Elife**, v.6, 2017.

JOHANNES, J.W. et al. Structure based design of non natural peptidic macrocyclic MCL-1 inhibitors. **ACS Med. Chem. Lett.**, v.8, p.239-244, 2017.

JONAS, A.E. Contributions of Bcl-XL to acute and long term changes in bioenergetics during neuronal plasticity. **Biochimica et Biophysica Acta.**, n.1842, p.1168-1178, 2013.

KANG, M. H.; REYNOLDS, C. P. Bcl-2 Inhibitors: Targeting Mitochondrial Apoptotic Pathways in Cancer Therapy. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 4, p. 1126–1132, 2009.

KERR, J.F.; WYLLIE, A.H; CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Journal of Internal Medicine**, v.258, n.6, p.479-517, 1972

KHELIFA, S. Low molecular weight compounds from mushrooms as potential Bcl-2 inhibitors : Docking and Virtual Screening studies. 2016.

KIKUCHI, T. et al. Eringiacetal A, 5,6-*seco*-(5*S*,6*R*,7*R*,9*S*)-5,6:5,7:6,9-Trieoxyergosta-8(14),22-diene-3 β ,7 β -diol, an Unusual Ergostane Sterol from the Fruiting Bodies of *Pleurotus eryngii*. **European Journal of Organic Chemistry**, p. 4645-4649, 2015.

KIKUCHI, T. et al. Ergostane-type sterols from king trumpet mushroom (*Pleurotus eryngii*) and their inhibitory effects on aromatase. **International Journal of Molecular Sciences**, v.18, p.2479, 2017.

KIM, D.S et al. Aromatase and sulfatase inhibitors from *Lepiota americana*. **Planta Med.**, v.66, p.78-79, 2000.

KOEHLER, M.F. et al. Structure-Guided Rescaffolding of Selective Antagonists of Bcl-XL. **Acs Med. Chem. Lett.**, v.5, p.662-667, 2014.

KOJIMA, S. et al. MCL-1, a novel mouse antiapoptotic MCL-1 variant, generated by RNA splicing at a non-canonical splicing pair. **Biochimica et Biophysica Acta- General Subjects**, v.1862, n.3, p. 557-566, 2018.

KORZYBSKI, T.; KOWSZYK-GINDIFER, Z.; KURYLOWICZ, W. Antibiotics: Origin, nature and properties. Poland: **PWN, Polish Scientific Publishers**, 2013.

KOTSCHY, A. et al. The MCL1 inhibitor S63845 is tolerable and effective in diverse cancer models. **Nature**, v.538, p.477-482, 2016.

KOZOPAS, K.M. et al. MCL-1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to Bcl-2. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **90**, p.3516-3520, 1993.

KROEMER, G. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. **Nat med**, v.6, p.614-20, 1997.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. Patologia: Bases Patológicas das Doenças. **Elsevier**, 7^a ed. Rio de Janeiro, 2005.

LAI, C-I. et al. Antcin K, an active triterpenoid from the fruiting bodies of basswood cultivated *Antrodia cinnamomea*, induces mitochondria and endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in human hepatoma cells. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v.6, p. 48-56, 2016.

LEACH, A.R.; SHOICHET, B.K.; PEISHOFF, C.E. Docking and Scoring. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.49, p.5851-5855, 2006.

LEE, E.F. et al. A novel BH3 ligand that selectively targets MCL-1 reveals that apoptosis can proceed without MCL-1 degradation. **J. Cell. Biol.**, v.180, p.341-355, 2008.

LEE, E.F. et al. Conformational changes in Bcl-2 pro-survival proteins determine their capacity to bind ligands. **Journal of Biological Chemistry**, v.284, n.44, p.3058-30517, 2009.

LEE, E.F. et al. Crystal structure of ABT-737 complexed with Bcl-XL: implications for selectivity of antagonists of Bcl-2 family. **Cell Death Differ**, v.14, p.1711-1713, 2007.

LEE, E.F. et al. The functional differences of pro-survival and pro-apoptotic B cell lymphoma 2 (Bcl-2) proteins depend on structural differences in their Bcl-2 homology 3 (Bh3) domains. **J.Biol.Chem**, v.289, p.36001, 2014.

LEE, E.F. et al. Physiological restraint of Bak by Bcl-XL is essential for cell survival. **Genes & Development**, v.30, p.1240-1250, 2016.

LEE, R.S. et al. Bioactivity-guided isolation and chemical characterization of antiproliferative constituents from morel mushroom (*Morchella esculenta*) in human lung adenocarcinoma cells. **Journal of Functional Foods**, v.40, p. 249-260, 2018.

LESSENE, G.; CZABOTAR, P.E.; COLMAN, P.M. Bcl-2 family antagonists for cancer therapy. **Nat Rev Drug Discov**, p. 989-1000, 2008.

LESSENE, G.L. et al. Structure-Guided Design of a Selective Bcl-XL inhibitor. **Nat. Chem. Biol.**, v.9, p.390, 2013.

LI, W. et al. Isolation and identification of aromatic compounds in Lion's Mane Mushroom and their anticancer activities. **Food Chemistry**, v.170, p.336-342, 2015.

LIMA, T.F.O.; DUARTE, D.A.; SÁ, A.L.B. Função Mitochondrial em foco apoptose, termorregulação e DNA mitochondrial. **União das Instituições para o serviço, ensino e pesquisa**, 2010.

LIN, K.W. et al. Triterpenoids and an alkalamide from *Ganoderma tsugae*. **Fitoterapia**, v.108, p.73-80, 2016.

LIU, Q. et al. Apoptotic regulation by MCL-1 through heterodimerization. **J. Biol. Chem.**, v.285, p. 19615-19624, 2010.

LIU, G. et al. High-quality NMR structure of human anti-apoptotic protein domain MCL-1 (171-327) for cancer drug design. **Plos one**, v.9, i.5, 2014.

LÓPEZ-VALLEJO, F. et al. Integrating virtual screening and combinatorial chemistry for accelerated drug discovery. **Comb. Chem.High Throughput Screen.**, v.14, p.475-487, 2011.

LYNE, P.D. Structure-based virtual screening an overview. **Drug Discov. Today**, v.7, p.649–657, 2002.

MANION, M.K. et al. Bcl-XL mutations suppress cellular sensitivity to antimycin A. **The Journal of Biological Chemistry**, v.279, n.3, p.2159-2165, 2004.

MANZI, P.; PIZZOFERRATO, L. β -glucans in edible mushrooms. **Food Chem.**, v.68, n.3, p.315-318, 2000.

MATTILA, P.; SUONPAA, K.; PIRONEN, V. Functional properties of edible mushrooms. **Nutrition reviews**. v.54, P.S91-S93, 2000.

MATTILA, P. et al. Contents of vitamins, Mineral Elements, and Phenolic Compounds in Cultivated Mushrooms. **Journal of Agric.Food Chem.**, v. 49, n.5, p. 2343-2348, 2001.

MENG, X.Y. et al. Molecular docking: A powerful approach for structure-based drug discovery. **Curr. Comput. Aided Drug Des.**, v.7, n.2, p.46–157, 2011.

MILES, J.A. et al. Hydrocarbon constrained peptides- understanding preorganization and binding affinity. **Chem. Sci.**, v.7, p.3694-3702, 2016.

MOLDOVEANU, T. et al. Many players in Bcl-2 family affairs. **Trends Biochem. Sci.** v.39, p.101-111, 2014.

MORADALI, M.F. et al. Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi). **Int Immunopharmacol**, v.7, n.6, p.701–724, 2007.

MORRIS, G.M. et al. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. **J Comput Chem.**, v.19; p.1639-1662, 1998.

MUCHMORE, S.W. et al. Xray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death, **Nature**, v.381, p.335-341, 1996.

MURPHY, K.M. et al. Bcl-2 inhibits Bax translocation from cytosol to mitochondria during drug-induced apoptosis of human tumor cells. **Cell Death Differ.**, v.7, p.102-11, 2000.

NGUYET, T.M.N. et al. The mast cell stabilizing activity of Chaga mushroom critical for its therapeutic effect on food allergy is derived from inotodiol. **International Immunopharmacology**, v.54, p.286-295, 2018.

OBERSTEIN, A. et al. Crystal structure of the Bcl-XL Beclin 1 peptide complex: beclin 1 is a novel BH3-only protein. **J. Biol. Chem.**, v.282, p.13123-13132, 2007.

OKAMOTO, T. et al. Stabilizing the pro-apoptotic BimBH3 helix (BimSAHB) does not necessarily enhance affinity or biological activity. **ACS Chemical Biology**, v.8, p.297-302, 2012.

OLTERSDORF, T. et al. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. **Nature**, v.435, p.677- 681, 2005.

O'NEILL, J.W. et al. Bcl-XL dimerization by three-dimensional domain swapping. **J. Mol. Biol.**, v.356, p.367-381, 2006.

OPREA, T.I.; MATTER, H. Integrating virtual screening in lead discovery. **Curr. Opin. Chem. Biol.** v.8, n.4, p.349–358, 2004.

PAULI, P.A. **Avaliação da composição química, compostos bioativos e atividade antioxidante em cogumelos comestíveis**. 2010. 73 f. Dissertação (Mestrado)-Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Araraquara, 2010.

PARK, C.H. ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. **NAT.MED.**, p.202-208, 2013.

PATEL, S.; GOYAL, A. Recent developments in mushrooms as anti-cancer therapeutics: a review. **3 Biotech**, v. 2, n. 1, p. 1–15, 2012.

PATERSON, R.R.M. Ganoderma- a therapeutic fungal biofactor. **Phytochemistry**, v.67, p.1985-2001, 2006

PEGORARO, L. et al. A 14;18 and an 8;14 chromosome translocation in a cell line derived from an acute B-cell leukemia, **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v.81, p.7166-7170, 1984.

PELZ, N.F. et al. Discovery of 2-indole-acylsulfonamide myeloid cell leukemia 1 (MCL-1) inhibitors using fragment- based methods. **J. Med. Chem.**, v.59, p.2054-2066, 2016.

PEREZ, H.L. et al. Identification of a Phenylacylsulfonamide series of dual Bcl-2/Bcl-XL antagonists. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v.22, p. 3946, 2012.

PETROS, A.M. et al. Fragment- based discovery of potent inhibitors of the anti-apoptotic MCL-1 protein. **Bio. Med. Chem. Lett.**, v.21, p.1484-1488, 2014.

PETROS, A.M. et al. Rationale for Bcl-XL/ Bad peptide complex formation from structure, mutagenesis, and biophysical studies. **Protein Science**, v.9, p. 2528-2534, 2000.

PETROS, A.M. et al. Solution structure of the antiapoptotic protein bcl-2. **Proc.Natl.Acad.Sci, USA** 98, p.3012-3017, 2001.

PETROS, A.M.; OLEJNICZAK, E.T.; FESIK, S.W. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. **Biochim Biophys Acta.**, v.1644, n.2-3, p.83-94, 2004.

RAJAN, S. et al. BH3 induced conformational changes in Bcl-XL revealed by crystal structure and comparative analysis. **Proteins**, 2015.

RASSER, F.; ANKE, T.; STERNER, O. Secondary metabolites from a *Gloeophyllum species*. **Phytochemistry**, v.54, p.511-516, 2000.

REZAEI ARAGHI, R. et al. Iterative optimization yields MCL-1 targeting stapled peptides with selective cytotoxicity to MCL-1 dependent cancer cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.115, p. E886-E895, 2018.

RUSSELL, R.; PATERSON, M. Ganoderma – a therapeutic fungal biofactory. **Phytochemistry**, v.67, n.18, p.1985–2001, 2006.

SANDER, B. et al. A conformational switch regulates the ubiquitin ligase HUWE1. **Elife**, v.6, 2017.

SARASTE, A.; PULKKI, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovascular Res**, v.45, n.3, p.528-537, 2000.

SCHOTT, A.F. et al. Bcl-XL protects cancer cells from p53-mediated apoptosis. **Oncogene**, v.11, n.7, p. 1389-1394, 1995.

SCHROEDER, G.M. et al. Pyrazole and pyrimidine phenylacylsulfonamides as dual Bcl-2/Bcl-XL antagonists. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.22, p.3951-3956, 2012.

SEELIGER, D.; GROOT, B.L. Ligand docking and binding site analysis with PyMOL and Autodock/Vina. **J Comput Aided Mol Des**, v.24, p.417-422, 2010.

SENICHKIN, V.V. et al. Modulation of Mcl-1 transcription by serum deprivation sensitizes cancer cells to cisplatin. **Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects**, v.1862, p.557-566, 2018.

SHAW, S. et al. Optimization of potent and selective tricyclic indole diazepinone myeloid cell leukemia-1 inhibitors using structure- based design. **J. Med. Chem.**, v.61, p. 2410-2421, 2018.

SILBERBORTH, S et al. Gerronemins A-F, cytotoxic biscatechols from a *Gerronema* species. **Phytochemistry**, v.59, p.643-648, 2002.

SLEEBS, B.E. et al. Quinazoline sulfonamides as dual binders of the proteins B-cell lymphoma 2 and B-cell lymphoma extra long with potent proapoptotic cell- based activity. **J.Med.Chem.**, v.54, p.1914-1926, 2011.

SMITH, B.J. et al. Alpha Beta Peptide Foldamers Targeting Intracellular Protein-Protein Interactions with Activity on Living Cells. **J.Am.Chem**, Soc. 137: 11365, 2015.

SMITH, B.J. Structure- guided rational design of alpha/beta-peptide foldamers with high affinity for Bcl-2 family prosurvival proteins. **Chembiochem**, v.14, p.1564, 2013.

SMITH, J.; ROWAN, N.; SULLIVAN, R. Medicinal Mushrooms: Their therapeutic properties and current medical usage with special emphasis on cancer treatments. n. May, p.4-33, 47-51, 2002.

STAHURA, F.L.; BAJORATH, J. Virtual screening methods that complement HTS. **Comb. Chem. High Throughput Screen.**, v.7, p.259–269, 2004.

STEWART, M.L. et al. The MCL-1 BH3 helix is an exclusive MCL-1 inhibitor and apoptosis sensitizer. **Nat. Chem. Biol.**, v.6, p.595-601, 2010.

SU, Y-C. et al. Eburicoic Acid, n Active Triterpenoid from the Fruiting Bodies of Basswood Cultivated *Antrodia cinnamomea*, induces ER stress-mediated autophagy in human hepatoma cells. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, 2012.

SULSTO, J.E.,; HORVITZ, H.R. Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*, **Dev. Biol.**, v.56, p.110e156, 1997.

SULKOWSKA-ZIAJA, K. et al. Biologically active compounds of fungal origin displaying antitumor activity. **Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research**, v.62, n.2, p.153-160, 2005.

TANAKA, Y. et al. Discovery of potente Mcl-1/Bcl-xL dual inhibitors by using a hybridization strategy based on structural analysis of target proteins. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.56, p.9635-9645, 2013.

TANG, W et al. Ganoderic acid T from *Ganoderma lucidum* mycelia induces mitochondria mediated apoptosis in lung cancer cells. **Life Sci.**,v.80, p.205-211, 2006.

TAO, Z.F. et al. Discovery of a Potent and Selective Bcl-XL inhibitor with in vivo activity. **ACS Med. Chem. Lett**, v.5, p.1088-1093, 2014.

THÉBAULT, S. et al. TCTP contains a BH3-like domain, which instead of inhibiting, activates Bcl-XL. **Scientific Reports**, 2016.

VALVERDE, M.E.; HERNÁNDEZ-PEREZ, T.; PAREDES-LÓPEZ, O. Edible mushrooms: Improving human health and promoting quality life. **International Journal of Microbiology**, v.2015, n. Table 1, p.1-14, 2013.

VAUX, D.L.; CORY, S; ADAMS, J.M. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. **Nature**, v.335, p.440, 1988.

VAZ, J.A. et al. Wild mushrooms *Clitocybe alexandri* and *Lepista inversa*: in vitro antioxidant activity and growth inhibition of human tumour cell lines. **Food Chem Toxicol.**,v.48, p.2881–2884, 2010.

VERKHIVKER, G.M. et al. Deciphering common failures in molecular docking of ligand-protein complexes. **Journal of Computer-aided Molecular Design**, v.14, n.8, p.731-751, 2000.

WASSER, S. Medicinal mushroom science: Current perspectives, advances, evidences, and challenges. **Biomedical Journal**, v.37, n.6, p. 345, 2014.

WU, T-R. et al. Pinicolol B from *Antrodia cinnamomea* induces apoptosis of nasopharyngeal carcinoma cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v.201, p. 117-122, 2017.

WYSOCZANSKI, P. et al. NMR solution structure of a photoswitchable apoptosis activating Bak peptide bound to Bcl-XL. **Journal of the American Chemical Society**, v.134, p.7644-7647, 2012.

XIE, X.; KULATHILA, R. The role of the acidity of N-heteroaryl sulfonamides as inhibitors of bcl-2 family protein-protein interactions. **ACS Med Chem Lett**, v.4, p.186-190, 2013.

YAP, H-Y. et al. Heterologous expression of cytotoxic sesquiterpenoids from the medicinal mushroom *Lignosus rhinocerotis* in yeast. **Microb. Cell Fact**, 2017.

YURIEV, E.; AGOSTINO, M.; RAMSLAND, P.A. Challenges and advances in computational docking: 2009 in review. **J. Mol. Recognit.**, v.24, p.149-164, 2011.

ZAIDMAN, B et al. Medicinal mushroom modulators of molecular targets as cancer therapeutics. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.67, p.453-468, 2005.

ZHANG, H. et al. Characterization of compounds with tumor cell proliferation inhibition activity from Mushroom (*Phellinus baummi*) Mycelia produced by solid-state fermentation. **Molecules**, v.22, p.698, 2017.

ZHOU, H. et al. Design of Bcl-2 and Bcl-XL inhibitors with subnanomolar binding affinities based upon a new scaffold. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.55, p. 4664-4682, 2012.

ZIEGLER U.; GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. **News Physiol Sci**, v.19, n.3, p. 124-128, 2004.

ANEXOS

Anexo 1: Estruturas experimental da proteína Bcl-2 presentes no Protein Data Bank

PDB	Método	Resolução (Å)	Co-cristalizado	Tipo de ligando	Valor Experimental	Referência
5AGW	Raio-X	2,69	Não	Não apresenta	Não	SMITH et al., 2015
5AGX	Raio-X	2,24	Não	Não apresenta	Não	SMITH et al., 2015
5VAU	Raio-X	1,75	Não	Não apresenta	Não	A ser publicado
5VAX	Raio-X	2,00	Não	Não apresenta	Não	A ser publicado
5VAY	Raio-X	1,80	Não	Não apresenta	Não	A ser publicado
4MAN	Raio-X	2,07	Sim	LMW	Não	PARK, C.H., 2013
4LVT	Raio-X	2,05	Sim	LMW	0,044nM	PARK, C.H., 2013
4LXD	Raio-X	1,90	Sim	LMW	59 nM	PARK, C.H., 2013
4IEH	Raio-X	2,10	Sim	LMW	14 nM	XIE, H; KULATHILA, R., 2013
4AQ3	Raio-X	2,40	Sim	LMW	37 nM	BERTRAND et al., 2012
2O21	RMN	N.A	Sim	LMW	Não	BRUNCKO et al., 2007
2022	RMN	N.A	Sim	LMW	67 nM	BRUNCKO et al., 2007
202F	RMN	N.A	Sim	LMW	Não	BRUNCKO et al., 2007
1YSW	RMN	N.A	Sim	LMW	30 nM	OLTERSODORF et al., 2005
1GJH	RMN	N.A	Não	Não apresenta	Não	PETROS et al., 2001
1G5M	RMN	N.A	Não	Não apresenta	Não	PETROS et al., 2001

Anexo 2: Estruturas experimental da proteína Bcl-XL presentes no Protein Data Bank

PDB	Método	Resolução (Å)	Co-cristalizado	Tipo de ligando	Valor Experimental	Referência
5VBI	Raio-X	2,44	Não	Não apresenta	Não	Não publicada
5VB4	Raio-X	2,2	Sim	HMW	Não	Não publicada
3SP7	Raio-X	1,4	Sim	LMW	Não	Não publicada
5VX3	Raio-X	1,95	Sim	HMW	Não	BROUWER et al., 2017
5FMK	Raio-X	1,73	Sim	HMW	Não	LEE et al., 2016
4Z9V	Raio-X	2,1	Sim	HMW	Não	THÉBAULT et al., 2016
4QVE	Raio-X	2,05	Sim	HMW	Não	RAJAN et al., 2015
4QVF	Raio-X	1,53	Sim	HMW	Não	RAJAN et al., 2015
4PPI	Raio-X	2,85	Sim	HMW	Não	RAJAN et al., 2015
4QVX	Raio-X	2,1	Sim	LMW	Não	TAO et al., 2014
4CIN	Raio-X	2,69	Sim	HMW	Não	LEE et al., 2014
4TUH	Raio-X	1,8	Sim	LMW	Não	KOEHLER et al., 2014

4C52	Raio-X	2,049	Sim	LMW	22000 nM	BRADY et al., 2014
4C5D	Raio-X	2,3	Sim	LMW	13000 nM	BRADY et al., 2014
3WIZ	Raio-X	2,45	Sim	LMW	4,4 nM	TANAKA et al., 2013
3ZK6	Raio-X	2,48	Sim	LMW	460 nM	LESSENE et al., 2013
3ZLN	Raio-X	2,29	Sim	LMW	3,4 nM	LESSENE et al., 2013
3ZLO	Raio-X	2,6	Sim	LMW	1,5 nM	LESSENE et al., 2013
3ZLR	Raio-X	2,03	Sim	LMW	0,55 nM	LESSENE et al., 2013
4HNJ	Raio-X	2,9	Não	Não apresenta	Não	FOLLIS et al., 2013
2YQ6	Raio-X	1,8	Sim	HMW	Não	OKAMOTO et al., 2012
2YQ7	Raio-X	1,9	Sim	HMW	Não	OKAMOTO et al., 2012
3SPF	Raio-X	1,7	Sim	LMW	138000 nM	ZHOU et al., 2012
4AQ3	Raio-X	2,4	Sim	LMW	37 nM	PEREZ et al., 2012
4EHR	Raio-X	2,09	Sim	LMW	13 nM	SCHROEDER et al., 2012
3R85	Raio-X	1,95	Sim	HMW	Não	AMBROSI et al., 2011
3QKD	Raio-X	2,02	Sim	LMW	3 nM	SLEEBS et al., 2011
3INQ	Raio-X	2	Sim	LMW	Não	LEE et al., 2009
3IO8	Raio-X	2,3	Sim	HMW	Não	LEE et al., 2009
2YXJ	Raio-X	2,2	Sim	LMW	0,5 nM	LEE et al., 2007
2PIL	Raio-X	2,5	Sim	HMW	Não	OBERSTEIN et al., 2007
2B48	Raio-X	3,45	Não	Não apresenta	Não	O'NEILL et al., 2006
1R2D	Raio-X	1,95	Não	Não apresenta	Não	MANION et al., 2004
1MAZ	Raio-X	2,2	Não	Não apresenta	Não	MUCHMORE et al., 1996
2ME8	RMN	Não apresenta	Não	Não apresenta	Não	FOLLIS et al., 2014
2ME9	RMN	Não apresenta	Não	Não apresenta	Não	FOLLIS et al., 2014
2MEJ	RMN	Não apresenta	Não	Não apresenta	Não	FOLLIS et al., 2014
2M03	RMN	Não apresenta	Não	Não apresenta	Não	FOLLIS et al., 2013
2M04	RMN	Não apresenta	Não	Não apresenta	Não	FOLLIS et al., 2013
2LP8	RMN	Não apresenta	Sim	HMW	Não	WYSOCZANSKI et al., 2012
2LPC	RMN	Não apresenta	Não	Não apresenta	Não	WYSOCZANSKI et al., 2012
2PON	RMN	Não apresenta	Não	Não apresenta	Não	FENG et al., 2007
2OIY	RMN	Não apresenta	Sim	LMW	Não	BRUNCKO et al., 2007
2O2M	RMN	Não apresenta	Sim	LMW	Não	BRUNCKO et al., 2007
2O2N	RMN	Não apresenta	Sim	LMW	Não	BRUNCKO et al., 2007
1YSG	RMN	Não apresenta	Sim	HMW	300000 nM	OLTERSDFORD et al., 2005
1YSI	RMN	Não apresenta	Sim	LMW	36 nM	OLTERSDFORD et al.,

						2005
1YSN	RMN	Não apresenta	Sim	LMW	Não	OLTERSDORF et al., 2005
1G5J	RMN	Não apresenta	Não	Não apresenta	Não	PETROS et al., 2000
1LXL	RMN	Não apresenta	Não	Não apresenta	Não	MUCHMORE et al., 1996

Anexo 3: Estruturas experimental da proteína MCL-1 presentes no Protein Data Bank

PDB	Método	Resolução (Å)	Co-cristalizado	Tipo de ligando	Valor Experimental	Referência
6BW2	Raio-X	2,75	Sim	LMW	Não	SHAW et al., 2018
6BW8	Raio-X	2,9	Sim	LMW	Não	SHAW et al., 2018
5W89	Raio-X	1,42	Sim	HMW	Não	REZAEI ARAGHI et al., 2018
5W8F	Raio-X	1,85	Sim	HMW	Não	REZAEI ARAGHI et al., 2018
5VX2	Raio-X	1,85	Sim	HMW	Não	BROUWER et al., 2017
5UUM	Raio-X	2,35	Sim	HMW	Não	JENSON et al., 2017
5LP8	Raio-X	2,7	Não	Não apresenta	Não	SANDER et al., 2017
5MES	Raio-X	2,34	Sim	LMW	45 nM	JOHANNES et al., 2017
5MEV	Raio-X	2,94	Sim	LMW	116 nM	JOHANNES et al., 2017
5KU9	Raio-X	2,2	Sim	LMW	1490 nM	JOHANNES et al., 2017
5IEZ	Raio-X	2,6	Sim	LMW	Não	LEE et al., 2016
5IF4	Raio-X	2,39	Sim	LMW	Não	LEE et al., 2016
5JSB	Raio-X	2,74	Sim	LMW	Não	BERGER et al., 2016
5LOF	Raio-X	2,2	Sim	LMW	0,19 nM	KOTSCHY et al., 2016
5FC4	Raio-X	1,5	Sim	LMW	231 nM	PELZ et al., 2016
5FDO	Raio-X	2,8	Sim	LMW	361 nM	PELZ et al., 2016
5FDR	Raio-X	2,6	Sim	LMW	17 nM	PELZ et al., 2016
6B4L	Raio-X	2,25	Sim	LMW	Não	BRUNCKO et al., 2015
6B4U	Raio-X	1,95	Sim	LMW	Não	BRUNCKO et al., 2015
5VKC	Raio-X	2,31	Sim	LMW	Não	BRUNCKO et al., 2015
5C6H	Raio-X	2,05	Sim	HMW	Não	À ser publicado
5C3F	Raio-X	1,43	Sim	HMW	Não	MILES et al., 2016
4ZBF	Raio-X	2,2	Sim	LMW	34 nM	BRUKE et al., 2015
4ZBI	Raio-X	2,5	Sim	LMW	310 nM	BRUKE et al., 2015
4WGI	Raio-X	1,85	Sim	LMW	4500 nM	FANG et al., 2014
4OQ5	Raio-X	2,86	Sim	LMW	500 nM	PETROS et al., 2014
4OQ6	Raio-X	1,81	Sim	LMW	3300 nM	PETROS et al., 2014

4BPI	Raio-X	1,982	Não	Não apresenta	Não	SMITH et al., 2013
4BPJ	Raio-X	1,599	Não	Não apresenta	Não	SMITH et al., 2013
3WIX	Raio-X	1,9	Sim	LMW	540 nM	TANAKA et al., 2013
3WIY	Raio-X	2,15	Sim	LMW	610 nM	TANAKA et al., 2013
4HW2	Raio-X	2,8	Sim	LMW	55 nM	FRIBERG et al., 2012
4HW3	Raio-X	2,4	Sim	LMW	320 nM	FRIBERG et al., 2012
4HW4	Raio-X	1,53	Sim	HMW	Não	FRIBERG et al., 2012
3TWU	Raio-X	1,8	Sim	HMW	Não	GUETLER et al., 2011
3PKI	Raio-X	2,49	Sim	HMW	Não	CZABOTAR et al., 2011
3MK8	Raio-X	2,32	Não	Não apresenta	Não	STEWART et al., 2010
3KZ0	Raio-X	2,349	Sim	HMW	Não	DUTTA et al., 2010
3KJ0	Raio-X	1,7	Não	Não apresenta	Não	FIRE et al., 2010
3KJ1	Raio-X	1,945	Não	Não apresenta	Não	FIRE et al., 2010
3KJ2	Raio-X	2,351	Não	Não apresenta	Não	FIRE et al., 2010
2PQK	Raio-X	2	Sim	HMW	Não	FIRE et al., 2010
3IO9	Raio-X	2,4	Não	Não apresenta	Não	LEE et al., 2009
3D7V	Raio-X	2,03	Não	Não apresenta	Não	LEE et al., 2008
2NL9	Raio-X	1,55	Não	Não apresenta	Não	CZABOTAR et al., 2007
2NLA	Raio-X	2,8	Não	Não apresenta	Não	CZABOTAR et al., 2007
2MHS	RMN	Não apresenta	Não	Não apresenta	Não	LIU et al., 2014
2ZBW	RMN	Não apresenta	Não	Não apresenta	Não	LIU et al., 2010

Anexo 4: Resultados do Docking da estruturas selecionadas da proteína Bcl-2 contra a biblioteca 2.0

Família do composto	Composto	Número	4AQ3	4IEH	4LVT	4LXD	Média	Ki estimado (nM)	Rank
Esteróis	(3 β ,5 α ,8 α ,22E,24S)-5,8-epidioxi ergosta-6,9(11),22-trien-3-ol	1	-9,09	-7,99	-7,84	-8,28	-8,300	824,2	32
	3-oxo-5 α -lanosta-8-en-21-ácido oico	2	-10,05	-7,68	-9,14	-7,76	-8,657	450,8	18
	(3 β ,5 α ,8 α ,22E)-5,8-epidioxi ergosta-6,22-dien-3-il β -D-glucopiranosídeo	3	-9,88	-9,21	-8,91	-8,97	-9,242	168,0	3
	(22E,24S)-ergosta-4,22-dien-3-ona	4	-9,86	-8,13	-8,5	-8,08	-8,642	462,4	19
	(22E)-3 β ,5 α -	5	-8,94	-8,7	-8,63	-7,78	-8,512	575,8	21

	didroxi ergosta-7-22-dien-6-ona								
	(22E)- 6 β -metoxi ergosta-7,22-dien-3 β ,5 α -diol	6	-8,25	-7,95	-8,57	-7,64	-8,102	1150,3	43
Esteróis	(22E)-19-nor ergosta-5,7,9,22-tetraen-3 β -ol	7	-9,13	-7,82	-8,11	-7,59	-8,162	1039,5	38
	(22E)-3 β ,5 α ,9 α -tridroxi ergosta-7,22-dien-6-ona	8	-9,13	-8,53	-8,98	-8,05	-8,672	439,5	16
	(22E)-5 α ,6 α -epoxi ergosta-8,14,22-trien-3 β ,7 β -diol	9	-8,89	-7,57	-8,86	-7,76	-8,270	867,0	35
	(22E)-ergosta-5,7,22-trien-3-ol	10	-8,63	-7,87	-9,22	-8,25	-8,492	595,6	22
	(22E)-ergosta-7,22-dien-3 β -ol	11	-8,53	-7,94	-9,15	-8,34	-8,490	598,1	24
	(3 β ,5 α ,22E)-ergosta-7,22,24(28)-trien-3-ol	12	-8,94	-7,93	-8,95	-8,12	-8,485	603,2	25
	24-etilcolsta-5,22-dien-3 β -ol	13	-8,72	-7,58	-7,94	-7,34	-7,895	1632,7	53
	3,4-seco- 8 α ,9 α -epoxi-5 α -lanosta-21-ácido oico 3,4 lactona	14	-8,83	-8,01	-7,86	-7,79	-8,122	1112,1	40
	3,4-seco-5 β -lanosta-7,9(11),4(29)-trien-3,21-ácido dióico	15	-7,75	-5,95	-8,16	-5,84	-6,925	8393,2	77
	3,4-seco-5 β -lanosta-7,9(11),4(29)-trien-3,21-ácido dióico- 3-metil ester	16	-7,96	-6,21	-7,95	-5,09	-6,802	10321,0	81
	5,8-Epoxy-24(R)-metilcolesta-6,22-dien- 3 β -ol	17	-9,41	-9,04	-9,33	-8,71	-9,122	205,7	6
	5,8-Epidioxi-24(R)-metilcolesta-6,22-dien-3 -D-glucopiranosideo	18	-9,6	-9,72	-9,32	-8,75	-9,347	140,7	1
	5,6-Epoxi-24(R)-metilcolesta-7,22-dien-3 -ol	19	-9,1	-8,72	-8,47	-8,43	-8,680	434,0	15
	5 α ,6 α -epoxi ergost-8(14)-ene-3 β ,7 α -diol	20	-8,42	-7,84	-8,33	-7,01	-7,900	1619,0	52
	9,11- peróxido dehidroergosterol	21	-9,2	-7,95	-8,42	-7,84	-8,352	754,3	30
	Ácido Dehidroeburicônico	a25	-8,55	-7,97	-8,05	-7,85	-8,105	1145,5	42
	Ácido Dihidroeburicóico	22	-10,19	-7,71	-8,67	-8,45	-8,755	382,4	13
	Ácido Eburicóico	23	-9,49	-7,68	-8,73	-7,62	-8,380	720,1	28
	Ácido Fomitélico A	a26a	-7,69	-7,44	-7,56	-7,11	-7,450	3460,2	64
	Ácido Fomitélico B	a26b	-7,96	-7,59	-8,4	-7,49	-7,860	1732,1	57
Ácido Ganodérico A	a21a	-9,5	-7,71	-8,81	-7,13	-8,287	841,8	33	
Ácido Ganodérico F	a21b	-8,38	-7,86	-8,00	-7,15	-7,847	1769,0	58	
Ácido Ganodérico H	a21c	-8,99	-7,56	-8,04	-7,56	-8,037	1283,7	45	
Ácido Ganodérico W	a22	-9,75	-8,83	-9,67	-8,67	-9,230	171,5	4	
Ácido Ganodérico X	a23a	-9,13	-9,37	-8,55	-8,70	-8,937	281,0	10	

	Ácido Ganodérico Y	a23b	-9,36	-9,91	-8,58	-8,64	-9,122	205,7	6
	Ácido Ganodérico T	a23c	-9,88	-9,19	-9,05	-8,55	-9,167	190,6	5
	Ácido Lucidêncio N	24	-8,02	-7,45	-7,55	-7,45	-7,617	2608,1	61
	Ácido Lucidênico O	a17a	-8,49	-7,82	-8,04	-7,39	-7,935	1526,1	51
	Ácido Marásmico	25	-6,04	-6,22	-6,5	-6,02	-6,195	28775,6	99
Esteróis	Ácido Poliporênico C	a24	-8,46	-7,65	-7,96	-7,50	-7,892	1639,6	54
	Antcin K	26	-7,61	-7,68	-7,69	-7,38	-7,590	2732,0	62
	Cerevisterol	a18	-8,09	-7,89	-8,40	-7,96	-8,085	1184,8	44
	Ergosta- 4,6,8 (14), 22- tetraen-3-ona	a16	-9,03	-8,70	-9,12	-8,96	-8,952	274,0	9
	Ergosterol	a15	-9,00	-7,95	-8,65	-8,26	-8,465	623,9	27
	Eringiacetal A	27	-8,91	-7,26	-7,92	-7,68	-7,942	1506,9	50
	Estelasterol	28	-9,10	-7,95	-9,15	-8,1	-8,575	518,2	20
	Ganoderiol F	a20b	-8,18	-8,18	-8,04	-7,47	-7,967	1444,7	49
	Ganodermanondiol	a20c	-9,12	-9,20	-8,35	-8,10	-8,692	425,0	14
	Ganodermanontriol	a20d	-9,46	-9,03	-8,78	-9,20	-9,117	207,4	8
	Inotodiol	29	-9,08	-8,58	-8,05	-7,43	-8,285	845,4	34
	Lactona Lucidênica	a17b	-8,97	-8,19	-8,26	-8,48	-8,475	613,4	26
	Lanosterol	30	-9,10	-7,58	-9,00	-7,28	-8,240	912,1	36
	Lucidumol A	a19	-8,89	-7,69	-8,79	-7,89	-8,315	803,6	31
	Lucidumol B	a20a	-8,26	-8,88	-8,77	-7,61	-8,380	720,1	28
	Pentadecanoato de ergosta-7,22-dien-3β- il	31	-8,76	-6,93	-9,30	-7,65	-8,160	1043,9	39
	Peróxido de Ergosterol	32	-9,83	-8,45	-8,79	-8,23	-8,825	339,8	11
	Pinicolol B	33	-9,65	-8,68	-7,84	-8,49	-8,665	445,1	17
	Poliporusterona A	34	-8,79	-7,38	-8,24	-7,13	-7,885	1660,5	55
	Poliporusterona B	35	-9,57	-8,71	-8,12	-7,57	-8,492	595,6	22
Poliporusterona C	36	-9,10	-7,70	-7,76	-6,95	-7,877	1681,7	56	
Poliporusterona E	37	-8,79	-7,63	-8,55	-7,06	-8,007	1350,4	46	
Poliporusterona F	38	-8,20	-6,98	-8,20	-6,79	-7,542	2960,0	63	
Poliporusterona G	39	-8,45	-8,11	-7,64	-7,79	-7,997	1373,3	47	
Quinonas e Hidroquinonas	Panedoxina	a1	-6,62	-5,20	-4,64	-5,26	-5,430	104658,3	110
	Cicloepoxidol	a2	-7,13	-5,13	-4,86	-5,24	-5,590	79890,1	108
	Clavilactonas A	a3c	-7,77	-6,37	-6,71	-6,62	-6,867	9248,6	79
	Clavilactonas B	a3a	-7,77	-6,38	-6,95	-6,61	-6,927	8357,9	76
	Clavilactonas D	a3b	-8,19	-7,00	-6,90	-6,78	-7,217	5123,0	68
	Quinona 490	a4	-7,87	-6,30	-5,89	-6,27	-6,582	14961,8	87
	Hidroquinona	a5	-6,49	-5,24	-5,13	-5,13	-5,497	93389,0	109
Panepoxidiona	72	-6,67	-5,25	-5,18	-5,36	-5,615	76589,2	107	
Terpenos	Ácido Pleurotelico	40	-8,63	-6,60	-6,28	-7,10	-7,152	5717,0	70
	(+)- torreyol	41	-8,41	-6,24	-6,59	-6,08	-6,830	9852,9	80
	1-hidroxi-3-sterpureno	42	-7,44	-6,17	-6,50	-6,58	-6,672	12853,3	85
	Aliacol A	43	-7,85	-5,92	-6,18	-6,05	-6,500	17197,2	89
	Aliacol B	44	-5,81	-5,73	-6,85	-7,02	-6,352	22058,5	92
	Aurisina A	45	-8,47	-7,65	-7,85	-7,94	-7,977	1420,5	48
	Aurisina K	46	-9,05	-7,85	-8,42	-7,63	-8,237	915,9	37
	Colibial	47	-7,50	-6,04	-6,45	-6,81	-6,700	12270,3	83
	Colossolactona H	48	-10,08	-8,83	-9,25	-8,85	-9,252	165,1	2
	Connatus A	49	-7,06	-5,95	-6,24	-6,36	-6,402	20273,3	91
	Connatus B	50	-5,96	-6,10	-5,90	-5,63	-5,897	47543,7	104
	Demetoxiegnol	51	-7,50	-7,01	-6,57	-6,75	-6,957	7945,2	74
	Dihidrohipnofilina	52	-6,56	-5,42	-5,89	-6,78	-6,162	30398,1	100
	Egnol	53	-7,92	-7,28	-7,14	-6,89	-7,307	4401,0	66
	Glucosídeo Egnol	54	-8,25	-7,92	-7,32	-7,01	-7,625	2575,3	60
Henacclinol	55	-7,77	-6,27	-6,89	-6,82	-6,937	8218,0	75	

	Hipnofilina	56	-6,76	-5,79	-6,09	-6,76	-6,35	22151,7	93
	Iludin M	a13b	-7,49	-5,75	-5,62	-6,01	-6,217	27703,3	98
	Iludin S	a13a	-6,97	-5,22	-5,47	-5,34	-5,750	60983,4	106
	Irofulveno	57	-7,39	-5,24	-5,28	-5,93	-5,96	42783,9	103
	Merulidial	58	-7,92	-5,74	-6,01	-6,34	-6,502	17124,7	88
	Montadial A	59	-7,38	-5,10	-4,91	-5,63	-5,755	60470,9	105
	Naematolina	60	-6,34	-6,17	-6,32	-6,53	-6,34	22528,8	94
	Naematolona	61	-6,48	-6,20	-6,19	-6,06	-6,232	27010,7	97
	Nambinona C	62	-6,91	-6,09	-6,12	-6,15	-6,317	23400,8	95
	Pilatina	63	-7,19	-6,13	-7,38	-6,79	-6,873	9170,9	78
	Pleurotelol	64	-7,42	-6,23	-5,84	-6,48	-6,492	17416,2	90
α -cadinol	65	-6,96	-5,76	-5,93	-5,89	-6,135	31842,3	102	
Aminas e amidas	2-Aminofenoxazin-3-ona	a10	-7,92	-5,88	-6,14	-6,53	-6,617	14103,6	86
	Putrescina-1,4-dicinamida	a11	-8,94	-7,28	-8,08	-7,00	-7,825	1837,5	59
Isoflavonas, flavonas, catecóis e fenóis	Baicaleína	66	-8,76	-6,92	-6,71	-6,99	-7,345	4131,1	65
	Fornecina A	67	-6,31	-4,93	-4,73	-4,75	-5,18	159597,3	112
	Fornecina B	68	-6,21	-4,96	-4,47	-4,61	-5,062	194604,9	113
	Genisten	a7	-8,25	-7,00	-6,20	-6,57	-7,005	7333,1	73
	Gerronemins A	a9a	-6,80	-5,79	-6,52	-5,85	-6,24	26670,9	96
	Gerronemins B	a9b	-7,91	-6,74	-6,57	-7,71	-7,232	4994,9	67
	Gerronemins C	a9c	-7,01	-6,00	-6,27	-5,29	-6,142	31441,7	101
	Gerronemins D	a9d	-7,84	-6,41	-6,53	-6,41	-6,797	10408,5	82
	Gerronemins E	a9e	-8,13	-7,09	-6,86	-6,58	-7,165	5597,7	69
	Gerronemins F	a9f	-7,79	-7,07	-7,04	-6,17	-7,017	7180,0	72
Hispidin	a8	-8,24	-6,17	-6,35	-6,02	-6,695	12374,3	84	
Inoscavina A	69	-10,39	-8,72	-7,29	-8,75	-8,787	362,0	12	
Ácidos gordos	(Z,Z)-9,12-ácido octadecadienóico	70	-5,77	-4,29	-4,73	-4,85	-4,91	251731,4	114
	1-O-octadecil-sn-glicerol	71	-4,54	-3,78	-4,34	-3,43	-4,022	1125850	115
Alcalóides e Aldeídos	3,4-dihidroxi-benzaldeído	73	-6,1	-4,90	-4,58	-5,32	-5,225	147924,5	111
	Hericerina	74	-8,79	-8,12	-8,07	-7,5	-8,12	1116,8	41
	Hericerina A	75	-7,81	-7,10	-6,83	-6,74	-7,12	6039,4	71

Anexo 5: Resultados do Docking da estruturas selecionadas da proteína Bcl-XL contra a biblioteca 2.0.

Família do composto	Composto	Número	4C52	3ZLR	3ZK6	Média	Ki estimado (nM)	Rank
Esteróis	(3 β ,5 α ,8 α ,22E,24S)-5,8-epidioxiergosta-6,9(11),22-trien-3-ol	1	-8,09	-8,46	-9,78	-8,776	368,7	27
	3-oxo-5 α -lanosta-8-en-21-ácido oico	2	-8,32	-6,81	-8,92	-8,016	1329,6	64
	(3 β ,5 α ,8 α ,22E)-5,8-epidioxiergosta-6,22-dien-3-il β -D-glucopiranosideo	3	-9,06	-9,51	-11,10	-9,890	56,3	3
	(22E,24S)-ergosta-4,22-dien-3-ona	4	-8,87	-8,11	-10,57	-9,183	185,6	10
	(22E)-3 β ,5 α -didroxiergosta-7-22-dien-6-ona	5	-8,92	-7,76	-9,87	-8,850	325,8	25
	(22E)-6 β -	6	-8,28	-8,17	-8,83	-8,426	665,6	47

	metoxiergosta-7,22-dien-3 β ,5 α -diol							
	(22E)-19-norergosta-5,7,9,22-tetraen-3 β -ol	7	-7,87	-9,01	-9,88	-8,920	289,5	20
	(22E)-3 β ,5 α ,9 α -tridroxiergosta-7,22-dien-6-ona	8	-8,40	-8,25	-9,27	-8,640	461,3	31
Esteróis	(22E)-5 α ,6 α -epoxiergosta-8,14,22-trien-3 β ,7 β -diol	9	-7,70	-8,56	-10,00	-8,753	383,5	28
	(22E)-ergosta-5,7,22-trien-3-ol	10	-8,63	-9,27	-9,66	-9,186	184,5	9
	(22E)-ergosta-7,22-dien-3 β -ol	11	-8,65	-8,84	-9,68	-9,056	229,8	13
	(3 β ,5 α ,22E)-ergosta-7,22,24(28)-trien-3-ol	12	-8,41	-8,54	-9,70	-8,883	307,9	23
	24-etilcolsta-5,22-dien-3 β -ol	13	-7,77	-9,31	-9,88	-8,986	258,7	18
	3,4-seco-8 α ,9 α -epoxi-5 α -lanosta-21-ácido oico 3,4 lactona	14	-8,09	-7,17	-8,49	-7,916	1574,1	65
	3,4-seco-5 β -lanosta-7,9(11),4(29)-trien-3,21-ácido dióico	15	-6,74	-6,98	-7,17	-6,963	7867,4	85
	3,4-seco-5 β -lanosta-7,9(11),4(29)-trien-3,21-ácido dióico- 3-metil ester	16	-6,38	-4,70	-6,82	-5,966	42305,2	110
	5,8-Epoxy-24(R)-metilcolesta-6,22-dien- 3 β -ol	17	-8,07	-7,68	-9,69	-8,48	-608,3	41
	5,8-Epidioxi-24(R)-metilcolesta-6,22-dien-3 -D-glucopiranosideo	18	-9,18	-7,52	-10,37	-9,023	243,1	17
	5,6-Epoxi-24(R)-metilcolesta-7,22-dien-3 -ol	19	-8,56	-9,03	-9,33	-8,973	264,5	19
	5 α ,6 α -epoxiergost-8(14)-ene-3 β ,7 α -diol	20	-8,38	-7,18	-8,65	-8,07	1215,2	58
	9,11- peróxido dehidroergosterol	21	-8,83	-8,45	-9,82	-9,033	239,1	15
	Ácido Dehidroeburicônico	a25	-7,30	-6,74	-9,21	-7,750	2085,4	69
	Ácido Dihidroeburicóico	22	-9,67	-8,03	-10,36	-9,353	139,3	7
	Ácido Eburicóico	23	-7,36	-8,78	-9,26	-8,466	622,1	42
	Ácido Fomitélico A	a26a	-6,98	-7,91	-8,65	-7,846	1771,5	68
	Ácido Fomitélico B	a26b	-7,65	-8,69	-9,75	-8,696	422,0	29
	Ácido Ganodérico A	a21a	-7,21	-7,73	-9,52	-8,153	1055,7	54
	Ácido Ganodérico F	a21b	-7,05	-7,93	-8,83	-7,936	1521,8	64
	Ácido Ganodérico H	a21c	-7,50	-8,57	-9,54	-8,536	552,8	37
	Ácido Ganodérico W	a22	-8,45	-8,23	-9,09	-8,590	505,2	34
	Ácido Ganodérico X	a23a	-8,62	-8,51	-9,56	-8,896	301,1	22
	Ácido Ganodérico Y	a23b	-8,16	-8,88	-9,67	-8,903	297,7	21
Ácido Ganodérico T	a23c	-7,79	-6,97	-10,93	-8,563	528,5	36	
Ácido Lucidêncio N	24	-6,18	-6,93	-8,43	-7,180	5457,7	77	

	Ácido Lucidênico O	a17a	-6,91	-7,15	-8,99	-7,683	2333,8	70
	Ácido Marásmico	25	-5,62	-7,03	-7,45	-6,700	12270,3	93
	Ácido Poliporênico C	a24	-7,45	-7,78	-9,15	-8,126	1104,3	55
	Antcin K	26	-7,78	-7,70	-9,06	-8,18	1009,3	53
	Cerevisterol	a18	-8,68	-7,98	-8,67	-8,443	647,1	45
	Ergosta- 4,6,8 (14), 22- tetraen-3-ona	a16	-8,96	-9,45	-9,88	-9,43	122,4	6
	Ergosterol	a15	-8,97	-9,27	-8,32	-8,853	323,9	24
	Eringiacetal A	27	-7,80	-7,76	-8,57	-8,043	1271,1	60
	Estelasterol	28	-9,90	-9,10	-9,66	-9,553	99,4	5
	Ganoderiol F	a20b	-7,30	-7,87	-8,94	-8,036	1285,5	61
	Ganodermanondiol	a20c	-7,64	-8,39	-9,96	-8,663	446,4	30
	Ganodermanontriol	a20d	-8,20	-8,18	-8,95	-8,443	647,1	45
	Inotodiol	29	-7,49	-7,46	-8,77	-7,906	1600,9	66
	Lactona Lucidênica	a17b	-7,37	-7,62	-9,19	-8,06	1235,9	59
	Lanosterol	30	-7,34	-6,95	-9,68	-7,99	1390,8	63
	Lucidumol A	a19	-7,94	-9,80	-10,19	-9,31	149,9	8
	Lucidumol B	a20a	-7,58	-8,55	-9,69	-8,606	491,2	33
	Pentadecanoato de ergosta-7,22-dien-3 β - il	31	-7,47	-7,68	-10,38	-8,51	578,2	39
	Peróxido de Ergosterol	32	-8,28	-9,19	-9,62	-9,03	240,4	16
	Pinicolol B	33	-8,52	-8,41	-8,99	-8,64	464,3	31
	Poliporusterona A	34	-8,26	-7,79	-8,60	-8,216	948,7	52
	Poliporusterona B	35	-8,89	-7,52	-8,96	-8,456	632,7	44
	Poliporusterona C	36	-8,92	-7,90	-8,79	-8,536	552,8	37
	Poliporusterona E	37	-7,92	-6,60	-8,53	-7,683	2333,8	70
	Poliporusterona F	38	-7,33	-6,22	-8,22	-7,256	4795,3	79
	Poliporusterona G	39	-8,58	-7,21	-9,27	-8,353	753,3	48
Quinonas e Hidroquinonas	Panedoxina	a1	-5,55	-6,30	-6,48	-6,110	33214,6	107
	Cicloepoxidol	a2	-4,77	-6,45	-6,14	-5,786	57323,8	113
	Clavilactonas A	a3c	-5,90	-7,83	-7,81	-7,180	5457,7	79
	Clavilactonas B	a3a	-5,90	-7,83	-7,81	-7,180	5457,7	79
	Clavilactonas D	a3b	-6,33	-8,16	-8,37	-7,620	2597,1	72
	Quinona 490	a4	-6,49	-7,85	-8,44	-7,593	2716,7	74
	Hidroquinona	a5	-6,03	-6,64	-6,53	-6,400	20359,0	103
	Panepoxidiona	72	-5,97	-6,23	-6,61	-6,270	25354,1	105
Terpenos	Ácido Pleurotelico	40	-6,85	-7,60	-7,74	-7,396	3786,1	74
	(+)- torreyol	41	-6,51	-7,21	-6,89	-6,870	9209,7	88
	1-hidroxi-3-sterpureno	42	-6,32	-6,90	-6,94	-6,720	11863,0	92
	Aliacol A	43	-5,56	-7,49	-6,76	-6,603	14444,8	95
	Aliacol B	44	-5,64	-5,55	-5,87	-5,686	67863,4	113
	Aurisina A	45	-8,55	-7,69	-7,99	-8,076	1201,6	57
	Aurisina K	46	-8,48	-7,74	-8,64	-8,286	843,0	49
	Colibial	47	-6,05	-6,80	-6,86	-6,570	15280,8	97
	Colossolactona H	48	-9,14	-8,05	-10,19	-9,126	204,2	11
	Connatus A	49	-5,73	-6,66	-7,03	-6,473	17988,9	100
	Connatus B	50	-5,43	-6,53	-6,62	-6,193	28856,6	106
	Demetoxiegnol	51	-8,26	-8,64	-8,81	-8,570	522,6	35
	Dihidrohipnofilina	52	-5,81	-6,73	-7,23	-6,59	14773,6	96
	Egnol	53	-8,25	-9,02	-9,15	-8,806	350,5	26
	Glucosídeo Egnol	54	-10,43	-9,70	-9,70	-9,943	51,5	1
	Henacclinol	55	-5,76	-6,98	-6,89	-6,543	15984,3	98
	Hipnofilina	56	-5,84	-7,23	-7,55	-6,873	9158,0	87
	Iludin M	a13b	-5,53	-7,30	-7,02	-6,616	14123,4	94
	Iludin S	a13a	-5,13	-7,13	-7,03	-6,430	19353,8	102

	Irofulveno	57	-5,12	-7,45	-7,69	-6,753	11214,0	91
	Merulidial	58	-6,69	-7,32	-6,46	-6,823	9961,4	89
	Montadial A	59	-6,92	-6,79	-7,30	-7,003	7353,8	84
	Naematolina	60	-5,79	-6,52	-7,18	-6,496	17294,2	99
	Naematolona	61	-5,95	-7,65	-7,81	-7,136	5871,9	83
	Nambinona C	62	-5,93	-5,95	-7,42	-6,433	19245,3	101
	Pilatina	63	-6,08	-6,26	-6,53	-6,290	24512,5	104
	Pleurotelol	64	-6,66	-6,62	-7,04	-6,773	10841,8	90
	α -cadinol	65	-6,28	-7,58	-7,01	-6,956	7956,4	86
Aminas e amidas	2-Aminofenoxazin-3-ona	a10	-6,97	-7,67	-7,33	-7,323	4285,0	76
	Putrescina-1,4-dicinamida	a11	-8,51	-9,48	-9,21	-9,066	226,0	12
Isoflavonas, flavonas, catecóis e fenóis	Baicaleína	66	-8,87	-8,78	-9,48	-9,043	235,1	14
	Fornecina A	67	-5,63	-6,08	-6,42	-6,043	37170,3	108
	Fornecina B	68	-5,47	-6,48	-6,14	-6,030	38016,3	109
	Genisten	a7	-8,05	-8,15	-8,10	-8,100	1155,2	56
	Gerronemins A	a9a	-6,64	-7,59	-7,58	-7,270	4688,6	77
	Gerronemins B	a9b	-8,02	-9,57	-7,94	-8,510	578,2	39
	Gerronemins C	a9c	-6,51	-7,12	-7,81	-7,146	5773,6	82
	Gerronemins D	a9d	-7,65	-9,40	-8,34	-8,463	625,6	43
	Gerronemins E	a9e	-7,74	-8,80	-8,13	-8,223	938,1	51
	Gerronemins F	a9f	-8,09	-8,24	-8,50	-8,276	857,3	50
	Hispidin	a8	-7,64	-8,02	-7,98	-7,880	1674,6	67
	Inoscavina A	69	-8,40	-11,28	-9,25	-9,643	85,4	4
Ácidos gordos	(Z,Z)-9,12-ácido octadecadienóico	70	-5,99	-5,78	-5,96	-5,910	46551,2	114
	1-O-octadecil-sn-glicerol	71	-4,74	-4,78	-5,23	-4,916	248914,7	115
Alcalóides e Aldeídos	3,4-dihidroxi-benzaldeído	73	-5,89	-6,02	-6,02	-5,976	41597,1	111
	Hericerina	74	-8,80	-9,66	-11,32	-9,926	52,9	2
	Hericerina A	75	-6,50	-8,08	-8,24	-7,606	2656,2	73

Anexo 6: Resultados do Docking da estruturas selecionadas da proteína MCL-1 contra a biblioteca 2.0.

Família do composto	Composto	Número	5FDR	4HW2	4OQ6	4ZBI	Média	Ki estimado (nM)	Rank
Esteróis	(3 β ,5 α ,8 α ,22E,24S)-5,8-epidioxi-ergosta-6,9(11),22-trien-3-ol	1	-10,39	-8,58	-11,29	-8,97	-9,807	64,7	10
	3-oxo-5 α -lanosta-8-en-21-ácido oico	2	-9,79	-7,44	-11,16	-8,06	-9,112	209,2	32
	(3 β ,5 α ,8 α ,22E)-5,8-epidioxi-ergosta-6,22-dien-3-il β -D-glucopiranosídeo	3	-10,32	-8,63	-9,80	-9,08	-9,457	116,8	21
	(22E,24S)-ergosta-4,22-dien-3-ona	4	-9,94	-9,26	-11,23	-9,56	-9,997	47,0	4
	(22E)-3 β ,5 α -dihidroxi-ergosta-7,22-dien-6-ona	5	-8,95	-8,32	-11,34	-8,51	-9,280	157,7	26
	(22E)-6 β -metoxi-ergosta-7,22-dien-3 β ,5 α -diol	6	-9,23	-8,65	-9,83	-7,79	-8,875	312,2	38

(22E)-19-norergosta-5,7,9,22-tetraen-3 β -ol	7	-9,54	-11,04	-9,92	-10,25	-10,18	34,1	3
(22E)-3 β ,5 α ,9 α -tridroxi ergosta-7,22-dien-6-ona	8	-9,48	-8,69	-11,39	-8,45	-9,502	108,3	20
(22E)-5 α ,6 α -epoxi ergosta-8,14,22-trien-3 β ,7 β -diol	9	-10,27	-11,38	-9,92	-10,82	-10,59	17,1	1
(22E)-ergosta-5,7,22-trien-3-ol	10	-9,60	-9,35	-10,26	-10,14	-9,837	61,5	9
(22E)-ergosta-7,22-dien-3 β -ol	11	-9,17	-9,19	-10,26	-10,14	-9,512	106,5	18
(3 β ,5 α ,22E)-ergosta7,22,24(28)-trien-3-ol	12	-10,08	-9,23	-10,87	-9,24	-9,855	59,7	7
24-etilcolsta-5,22-dien-3 β -ol	13	-9,81	-8,39	-11,15	-8,02	-9,342	141,9	24
3,4-seco- 8 α ,9 α -epoxi-5 α -lanosta-21-ácido oico 3,4 lactona	14	-9,79	-7,40	-9,73	-8,38	-8,825	339,8	40
3,4-seco-5 β -lanosta-7,9(11),4(29)-trien-3,21-ácido dióico	15	-8,46	-7,84	-8,64	-7,54	-8,120	1116,8	68
3,4-seco-5 β -lanosta-7,9(11),4(29)-trien-3,21-ácido dióico- 3-metil ester	16	-7,03	-6,49	-7,50	-6,79	-6,952	8012,6	88
5,8-Epoxy-24(R)-metilcolesta-6,22-dien- 3 β -ol	17	-10,00	-9,39	-10,06	-9,39	-9,710	76,3	12
5,8-Epidioxi-24(R)-metilcolesta-6,22-dien-3 -D-glucopiranosideo	18	-10,51	-8,67	-9,36	-9,52	-9,515	106,0	17
5,6-Epoxi-24(R)-metilcolesta-7,22-dien-3 -ol	19	-9,20	-8,08	-9,95	-9,49	-9,18	186,6	30
5 α ,6 α -epoxi ergost-8(14)-ene-3 β ,7 α -diol	20	-9,47	-8,86	-10,54	-7,86	-9,182	185,9	29
9,11- peróxido dehidroergosterol	21	-9,76	-9,22	-11,29	-9,11	-9,845	60,8	8
Ácido Dehidroeburicônico	a25	-8,78	-7,31	-8,42	-7,95	-8,115	1126,3	66
Ácido Dihidroeburicóico	22	-9,28	-8,44	-11,47	-9,17	-9,590	93,4	15
Ácido Eburicóico	23	-9,06	-7,94	-9,43	-7,93	-8,590	505,2	47
Ácido Fomitélico A	a26a	-9,50	-8,36	-9,72	-9,02	-9,150	196,3	31
Ácido Fomitélico B	a26b	-9,46	-8,62	-9,64	-9,36	-9,270	160,3	28
Ácido Ganodérico A	a21a	-9,13	-7,43	-9,59	-7,63	-8,445	645,3	50
Ácido Ganodérico F	a21b	-7,87	-7,66	-8,95	-8,74	-8,305	817,3	55
Ácido Ganodérico H	a21c	-9,53	-7,13	-10,75	-8,98	-9,097	214,5	33
Ácido Ganodérico W	a22	-8,84	-8,10	-9,82	-9,00	-8,940	279,8	37
Ácido Ganodérico X	a23a	-9,12	-7,81	-9,22	-8,59	-8,685	430,4	44
Ácido Ganodérico Y	a23b	-10,15	-9,02	-11,17	-9,15	-9,872	58,0	6
Ácido Ganodérico T	a23c	-8,50	-8,69	-9,09	-9,04	-8,830	336,9	39
Ácido Lucidêncio N	24	-8,27	-7,71	-8,61	-8,41	-8,250	896,8	58
Ácido Lucidênico O	a17a	-8,91	-7,23	-8,05	-9,16	-8,337	773,7	53
Ácido Marásmico	25	-6,55	-7,38	-5,89	-6,93	-6,687	12531,9	100

	Ácido Poliporênico C	a24	-9,02	-8,21	-8,89	-7,83	-8,487	600,6	48
	Antcin K	26	-7,83	-6,86	-9,17	-7,42	-7,820	1853,1	71
	Cerevisterol	a18	-9,87	-8,95	-10,21	-9,87	-9,725	74,4	11
	Ergosta- 4,6,8 (14), 22- tetraen-3-ona	a16	-9,79	-8,33	-9,98	-9,94	-9,510	106,9	19
	Ergosterol	a15	-10,11	-8,20	-9,59	-8,37	-9,067	225,7	34
	Eringiacetal A	27	-9,61	-8,91	-10,13	-9,13	-9,445	119,3	22
	Estelasterol	28	-9,71	-9,29	-10,78	-8,69	-9,617	89,2	14
	Ganoderiol F	a20b	-8,66	-7,30	-10,31	-8,49	-8,690	426,7	43
	Ganodermanondiol	a20c	-10,86	-10,38	-10,86	-9,25	-10,33	26,5	2
	Ganodermanontriol	a20d	-10,18	-7,55	-9,76	-9,61	-9,275	159,0	27
	Inotodiol	29	-8,70	-8,50	-9,07	-8,27	-8,635	468,3	45
	Lactona Lucidênica	a17b	-8,47	-7,49	-8,32	-8,67	-8,237	915,9	59
	Lanosterol	30	-9,53	-9,04	-10,63	-9,03	-9,557	98,7	16
	Lucidumol A	a19	-9,22	-8,31	-10,84	-9,08	-9,362	137,2	23
	Lucidumol B	a20a	-9,77	-7,96	-10,56	-9,08	-9,342	141,9	24
	Pentadecanoato de ergosta-7,22-dien-3 β - il	31	-8,35	-7,12	-10,36	-7,38	-8,302	820,8	56
	Peróxido de Ergosterol	32	-9,64	-8,38	-11,17	-9,32	-9,627	87,7	13
	Pinicolol B	33	-7,86	-7,43	-9,67	-8,19	-8,287	841,8	57
	Poliporusterona A	34	-9,94	-6,72	-9,75	-7,26	-8,417	676,0	51
	Poliporusterona B	35	-9,79	-7,73	-9,40	-7,54	-8,615	484,3	46
	Poliporusterona C	36	-8,17	-6,84	-9,29	-7,29	-7,897	1625,8	70
	Poliporusterona E	37	-10,00	-8,37	-10,02	-7,78	-9,042	235,4	35
	Poliporusterona F	38	-8,43	-7,80	-8,37	-8,30	-8,225	935,4	60
Poliporusterona G	39	-10,03	-7,13	-9,96	-7,75	-8,717	407,4	42	
Quinonas e Hidroquinonas	Panedoxina	a1	-5,96	-6,12	-5,23	-5,76	-5,767	59208,5	109
	Cicloepoxidol	a2	-5,77	-6,22	-4,80	-6,11	-5,725	63611,7	110
	Clavilactonas A	a3c	-7,38	-8,19	-7,34	-8,03	-7,735	2138,9	74
	Clavilactonas B	a3a	-7,37	-8,19	-7,34	-8,04	-7,735	2138,9	74
	Clavilactonas D	a3b	-7,77	-7,96	-7,68	-8,21	-7,905	1605,4	69
	Quinona 490	a4	-7,59	-7,48	-6,14	-8,04	-7,312	4364,0	82
	Hidroquinona	a5	-5,52	-5,82	-4,91	-5,92	-5,542	86558,7	112
	Panepoxidiona	72	-6,14	-6,32	-5,37	-6,00	-5,957	42964,8	108
Terpenos	Ácido Pleurotelico	40	-7,38	-7,91	-6,80	-7,71	-7,450	3460,2	78
	(+)- torreyol	41	-7,55	-7,81	-6,48	-7,69	-7,382	3877,7	79
	1-hidroxi-3-sterpurenol	42	-7,19	-7,60	-6,16	-7,48	-7,107	6168,2	85
	Aliacol A	43	-6,72	-6,99	-6,50	-7,66	-6,967	7812,2	87
	Aliacol B	44	-6,72	-6,66	-6,62	-7,21	-6,802	10321,0	94
	Aurisina A	45	-8,25	-7,68	-9,51	-7,40	-8,21	959,4	61
	Aurisina K	46	-8,63	-7,17	-9,45	-8,69	-8,484	603,2	49
	Colibial	47	-6,87	-7,14	-6,33	-7,67	-7,002	7364,1	86
	Colossolactona H	48	-9,69	-8,77	-9,67	-11,41	-9,885	56,8	5
	Connatus A	49	-6,77	-6,95	-6,13	-7,00	-6,712	12014,1	98
	Connatus B	50	-6,17	-6,15	-5,89	-6,69	-6,225	27354,8	107
	Demetoxiegnol	51	-7,87	-8,63	-7,76	-8,24	-8,125	1107,4	65
	Dihidrohipnofilina	52	-6,42	-6,58	-5,93	-6,66	-6,397	20445,1	104
	Egnol	53	-8,07	-8,94	-7,65	-7,99	-8,162	1039,5	63
	Glucosídeo Egnol	54	-8,47	-9,85	-8,25	-8,65	-8,805	351,5	41
	Henacclínol	55	-6,60	-6,93	-6,33	-7,30	-6,79	10541,1	95
	Hipnofilina	56	-6,58	-6,38	-6,28	-6,94	-6,545	15939,4	102
	Iludin M	a13b	-7,23	-7,58	-5,68	-6,73	-6,805	10277,6	93
Iludin S	a13a	-6,93	-7,58	-5,65	-6,78	-6,735	11566,5	97	
Irofulveno	57	-7,01	-7,60	-5,68	-7,00	-6,822	9978,4	92	
Merulidial	58	-6,73	-7,23	-6,06	-6,78	-6,70	12270,3	99	

	Montadial A	59	-6,32	-6,56	-5,20	-6,86	-6,235	26897,0	106
	Naematolina	60	-7,24	-7,25	-7,03	-7,53	-7,262	4748,3	83
	Naematolona	61	-7,60	-7,13	-7,18	-7,45	-7,34	4166,1	80
	Nambinona C	62	-7,03	-5,84	-6,72	-6,98	-6,642	13520,8	101
	Pilatina	63	-8,02	-5,53	-7,46	-7,48	-7,125	5988,6	84
	Pleurotelol	64	-6,03	-7,27	-5,95	-6,53	-6,445	18870,0	103
	α -cadinol	65	-7,01	-7,18	-6,36	-7,16	-6,927	8357,9	89
Aminas e amidas	2-Aminofenoxazin-3-ona	a10	-6,77	-6,79	-6,19	-7,30	-6,762	11041,9	96
	Putrescina-1,4-dicinamida	a11	-8,57	-8,27	-8,23	-8,19	-8,315	803,6	54
Isoflavonas, flavonas, catecóis e fenóis	Baicaleína	66	-8,11	-8,58	-7,38	-8,39	-8,115	1126,3	66
	Fornecina A	67	-5,35	-5,61	-6,04	-5,37	-5,592	79553,7	111
	Fornecina B	68	-5,31	-5,46	-4,71	-5,26	-5,185	158256,1	114
	Genisten	a7	-8,33	-8,63	-7,14	-8,51	-8,152	1057,2	64
	Gerronemins A	a9a	-6,35	-6,65	-7,04	-7,51	-6,887	8941,6	91
	Gerronemins B	a9b	-7,48	-8,15	-7,66	-7,66	-7,737	2129,9	73
	Gerronemins C	a9c	-6,11	-7,38	-7,34	-6,81	-6,91	8608,4	90
	Gerronemins D	a9d	-7,72	-7,10	-8,01	-7,43	-7,565	2849,7	76
	Gerronemins E	a9e	-7,00	-8,86	-8,21	-7,00	-7,767	2024,7	72
	Gerronemins F	a9f	-8,47	-9,57	-8,26	-7,19	-8,372	729,3	52
	Hispidin	a8	-7,47	-7,45	-6,64	-7,77	-7,332	4219,2	81
Inoscavina A	69	-9,45	-9,25	-6,71	-7,37	-8,195	984,0	62	
Ácidos gordos	(Z,Z)-9,12-ácido octadecadienóico	70	-6,21	-6,44	-5,61	-6,84	-6,275	25141,0	105
	1-O-octadecil-sn-glicerol	71	-4,20	-4,37	-5,27	-4,01	-4,462	535744,6	115
Alcalóides e aldeídos	3,4-dihidroxi-benzaldeído	73	-5,29	-5,42	-5,38	-5,50	-5,397	110559,6	113
	Hericerina	74	-8,44	-8,93	-9,72	-8,72	-8,952	274,0	36
	Hericerina A	75	-7,83	-7,30	-7,71	-7,12	-7,49	3234,3	77