

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**“ESTUDO DE PRODUTOS NATURAIS E DERIVADOS SINTÉTICOS
BUSCANDO INIBIDORES SELETIVOS DAS CATEPSINAS L E V”**

Emerson Finco Marques*

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM QUÍMICA, área de concentração: QUÍMICA ORGÂNICA.

Orientador: Dr. Paulo Cezar Vieira

***bolsista FAPESP**

**São Carlos - SP
2011**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

M357ep

Marques, Emerson Finco.

Estudo de produtos naturais e derivados sintéticos
buscando inibidores seletivos das catepsinas L e V /
Emerson Finco Marques. -- São Carlos : UFSCar, 2011.
135 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2011.

1. Produtos naturais. 2. Catepsinas lisossomais. 3.
Inibidores enzimáticos. 4. Gênero Zanthoxylum. 5.
Alcalóides. I. Título.

CDD: 547.3 (20ª)

De tudo ficaram três coisas:

A certeza de que estamos começando,

A certeza de que é preciso continuar e

*A certeza de que podemos
ser interrompidos antes de terminar*

Fazer da interrupção um caminho novo,

Fazer da queda um passo de dança,

Do medo uma escola,

Do sonho uma ponte,

Da procura um encontro,

E assim terá valido a pena existir!

Fernando Sabino

Dedico este trabalho...

Aos meus pais, que venceram na vida juntos com todas as dificuldades e fizeram com que eu chegasse até aqui.

Às minhas irmãs Solange e Aline, que sempre estiveram ao meu lado.

Agradecimentos

Aos meus pais, Sérgio e Mária, e minhas irmãs Solange e Aline, que sempre estiveram do meu lado e me ajudaram a chegar até aqui..

Ao Professor Dr. Paulo Cezar Vieira pela amizade, pela orientação e ensinamentos transmitidos nestes últimos anos e acima de tudo pela confiança depositada em mim, por ter sido extremamente aberto a todas as minhas idéias e empreitadas.

Ao Professor João Batista Fernandes por ter sido o primeiro a me aceitar para trabalhar no laboratório de Produtos Naturais e devido a isto ter me tornado apaixonado pela área.

À professora Dra. Maria Fátima Graças Fernandes da Silva pelos ensinamentos e por todo o suporte desprendido.

Aos demais professores do DQ-UFSCar pelos ensinamentos e contribuição na minha formação, em especial à professora Dra. Quézia Bezerra Cass e ao professor Dr. Edson Rodrigues Filho.

À professora Dra. Arlene Corrêa e seus alunos pela colaboração e por cederem os compostos sintéticos e ao professor Dr. Rafael Guido.

À professora Dra. Richele Priscila Severino por ter me acompanhado desde a iniciação, pela amizade, pelos ensinamentos incalculáveis, mostrando que não existem barreiras para nossos ideais.

Aos meus amigos da Turma de 2004 de Química Licenciatura , Thales, Barbie, Cabelo, Tássia, Lilica, Cyber, Fabrício, Pantera, Puttini, por todo o suporte psicológico, amizade, desabafos, companheirismo e por me tornarem uma pessoa melhor e fazerem parte dos melhores anos da minha vida.

Aos meus amigos do Bloco 30, em especial ao Luiz Fernando Gorup, ao Boniek Gontijo Vaz e a Camila Palombo.

Aos meus colegas e amigos conquistados nestes quase sete anos dentro do PN, em especial as grandes amigas e pessoas Dra. Tatiane Regina Albarici, Dra. Ana Paula Terezan e Dra. Simone Simote.

A Ariani, pela competência e auxílio neste trabalho.

Ao professor Massuo Jorge Kato e Professor Paolo Di Mascio do Instituto de química da USP, por terem me apoiado na finalização deste trabalho e a todos que me ajudaram e deram suporte no IQ-USP.

A Giovana Cássia Freitas e ao Thiago Sevilhano pela amizade, pelo compareirismo e por todo apoio desprendido na finalização deste trabalho.

Aos funcionários do DQ e técnicos, em especial a Luciana, ao Waldir e ao Ademir.

À vida, pelos caminhos traçados e alcançados, pelas oportunidades e aprendizados imutáveis.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram na realização deste trabalho.

A FAPESP pela bolsa concedida.

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

μg	micro-grama
μL	micro-litro
μM	micro-molar
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
\emptyset	Diâmetro
δ	Deslocamento químico em partes por milhão (ppm)
λ_{em}	Comprimento de onda de emissão
λ_{ex}	Comprimento de onda de excitação
ACN	Acetonitrila
Asn	Asparagina
Bn	Grupo benzila
Cat	catepsina
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COSY	Correlation spectroscopy
Cys	Cisteína
<i>d</i>	duplete
DAD	Detector de Conjunto de Fotodiodos
DCM	diclorometano
<i>dd</i>	duplo duplete
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTE	Ditioeritritol
E	Enzima
E-64	L-3-carboxi- <i>trans</i> -2,3-epoxipropionil-leucilamido(4-guanino)butano
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EI	Complexo enzima-inibidor
EM	Espectrometria de Massas
EP	Complexo enzima-produto
ES	Complexo enzima-substrato
ESI	Complexo enzima- substrato-inibidor
eV	Elétron-volt

FDA	Food and Drug Administration
h	Altura
His	Histidina
HMBC	<i>Heterocuclear Multiple Quantum Correlation</i>
HSQC	<i>Heterocuclear Single Quantum Correlation</i>
HTS	High throughput screening
Hz	Hertz
IC ₅₀	Potência inibitória
IE	Impacto Eletrônico
<i>J</i>	Constante de acoplamento
K _i	Constante de dissociação do complexo enzima-inibidor
K _m	Constante de Michaelis-Menten
M	Molar (mol/L)
<i>m</i>	Multiplete
m/z	Relação massa/carga
MCA	7-amino-4-metilcumarina
MeOD	Metanol deuterado
MHz	Mega hertz
NCEs	New Chemical Entities
P	Produto
PDB	Protein Data Base
pH	Potencial hidrogeniônico
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
SAR	Relação Estrutura Atividade
<i>s</i>	singleto
SPE	Extração em fase sólida
<i>t</i>	triplete
USA	United State of America
UV-vis	Região do Ultra Violeta e Visível
V _{max}	Velocidade máxima de reação
Z-FR-MCA	Carbobenzoxi-fenilalanina-arginina-7-amino-4-metilcumarina
DHP	Didridrotestosterona

S	Seletividade
HIV	Human immunodeficiency virus
HMG-CoA	hidroxi-3-methyl-glutaril-CoA
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fármacos que atuam por mecanismo inibição enzimática	8
Tabela 2. Expressão, localização e atividade fisiológica das catepsinas.....	10
Tabela 3. Espécies do gênero <i>Zanthoxylum</i> , partes vegetais e localização.	27
Tabela 4. Extratos das diferentes espécies do gênero <i>Zanthoxylum</i>	29
Tabela 5. Condições experimentais utilizadas para as catepsinas.....	35
Tabela 6. Valores de inibição dos extratos de <i>Zanthoxylum</i> (250 µg) frente a catepsina L... 44	44
Tabela 7. Concentrações das diluições a partir da solução estoque dos extratos de ZAFD. 45	45
Tabela 8. Valores de inibição das diluições dos extratos de <i>Zanthoxylum</i> frente a catepsina L (250; 100; 50; 25; 10; 0,5; 0,1;0,01; 0,001 µg / poço).....	45
Tabela 9. Valores de inibição frente a catepsina L para diferentes ensaios.....	47
Tabela 10. Valores de inibição para as frações de ZAFD (250 µg).....	48
Tabela 11. Dados de RMN ¹ H das cumarinas 2, 3 e 5.....	69
Tabela 12. Dados de RMN ¹ H das cumarinas 5 e 6.	71
Tabela 13. Dados de RMN ¹³ C das cumarinas 5 e 6.....	77
Tabela 14. Dados de RMN ¹ H dos alcalóides 7 e 8.....	84
Tabela 15. Dados de RMN ¹³ C do alcalóide 9.	89
Tabela 16. Dados de RMN de ¹ H e de ¹³ C da substância 10.....	92
Tabela 17. Valores de inibição a 25 µM para os compostos isolados de <i>Z. acuminatum</i> frente a catepsina L e V.	94
Tabela 18. Valores de potência e de seletividade dos alcalóides acridônicos isolados frente as catepsinas L e V.	96
Tabela 19. Valores de potência e de seletividade dos ácidos <i>N</i> -aril antranílicos frente às catepsinas L e V.	101
Tabela 20. Valores de potência e de seletividade dos alcalóides acridônicos sintéticos frente a catepsina L e V.	105
Tabela 21. Valores de potência e de seletividade dos alcalóides sintéticos 4-quinolínicos-2-substituídos sintéticos frente a catepsina L e V.....	107
Tabela 22. Valores de dissociação do complexo EI (K _i).	120

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas de alguns dos Produtos Naturais utilizados como fármacos.....	3
Figura 2. Diferentes fontes terapêuticas (N = 1184).....	4
Figura 3. Substâncias isoladas do gênero <i>Zanthoxylum</i>	6
Figura 4. Mecanismo de hidrólise de peptídeos pelas cisteíno peptidases.....	15
Figura 5. Estrutura do substrato comercial Z-FR-MCA.....	16
Figura 6. Equilíbrio cinético verificado entre enzima e substrato.....	17
Figura 7. Esquema clássico de inibidor competitivo.....	18
Figura 8. Esquema clássico de inibidor não-competitivo.....	18
Figura 9. Esquema clássico de inibidor incompetitivo.....	19
Figura 10. Esquema do sistema de extração em cartucho.....	30
Figura 11. Cromatogramas e análises por CCD das frações obtidas de ZAFD 5-8.....	33
Figura 12. Cromatograma com eluição gradiente da fração SPE_1_ZAFD_2. Condições cromatográficas: gradiente linear de 5% a 100% de ACN (solvente B) em 60 minutos; vazão 1mL/min; $\lambda = 334$ nm com detecção em DAD; $V_{inj}=20 \mu\text{L}$; $[] = 0,2$ mg/mL.....	34
Figura 13. Cromatograma com eluição isocrático da fração SPE_1_ZAFD_2. Condições cromatográficas: gradiente linear de 5% a 100% de ACN (solvente B) em 60 minutos; vazão 1mL/min; $\lambda = 334$ nm com detecção em DAD; $V_{inj}=20 \mu\text{L}$; $[] = 0,2$ mg/mL.....	34
Figura 14. Esquema geral dos ensaios enzimáticos com substrato fluorogênico.....	36
Figura 15. Gráfico ilustrativo de determinação dos valores de potência (IC_{50}).....	37
Figura 16. Controle da Atividade Catalítica da Catepsina L.....	43
Figura 17. Gráfico de comparação para diferentes ensaios do extrato CH_2Cl_2 de folhas de <i>Z. acuminatum</i>	48
Figura 18. Cromatograma em eluição gradiente do extrato bruto de ZAFD. Condições cromatográficas: Usando gradiente linear de 5% a 100% de ACN (solvente B) em 60 minutos, vazão 1 mL/min. λ DAD, $V_{inj}= 20\mu\text{L}$, $[] = 10$ mg/mL.....	50
Figura 19. Cromatograma em eluição gradiente do extrato bruto de ZAFM. Condições cromatográficas: Usando gradiente linear de 5% a 100% de ACN (solvente B) em 60 minutos, vazão 1 mL/min. λ DAD, $V_{inj}= 20\mu\text{L}$, $[] = 10$ mg/mL.....	51
Figura 20. Ampliação do espectro de RMN ^1H do extrato CH_3OH de <i>Z. acuminatum</i> (DMSO, 200 MHz).....	52
Figura 21. Cromatograma referente a cumarina 5. Condições cromatográficas: Usando gradiente linear de 5% a 100% de ACN (solvente B) em 60 minutos, vazão 1 mL/min. λ DAD, $V_{inj}= 20\mu\text{L}$, $[] = 0,01$ mg/mL.....	52
Figura 22. Cromatograma referente ao alcalóide 7. Condições cromatográficas: Usando gradiente linear de 5% a 100% de ACN (solvente B) em 60 minutos, vazão 1 mL/min. λ DAD, $V_{inj}= 20\mu\text{L}$, $[] = 0,01$ mg/mL.....	53
Figura 23. Cromatograma referente ao alcalóide 8. Condições cromatográficas: Usando gradiente linear de 5% a 100% de ACN (solvente B) em 60 minutos, vazão 1 mL/min. λ DAD, $V_{inj}= 20\mu\text{L}$, $[] = 0,01$ mg/mL.....	53
Figura 24. Espectro de RMN de ^1H da substância 1 (200 MHz, CDCl_3).....	58
Figura 25. Espectro de CG-EM da substância 1 (IE em 70 eV).....	58
Figura 26. Esquema geral para a rota biosintética das cumarinas.....	59

Figura 27. Espectro de RMN de ^1H da cumarina 2 (200 MHz, MeOD)	61
Figura 28. Espectro de massas da cumarina 2 (ESI q-TOF).	61
Figura 29. Espectro de RMN de ^1H da substância 3 (400 MHz, CDCl_3)	62
Figura 30. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância 3 (400 MHz, CDCl_3).....	63
Figura 31. Espectro de massas da cumarina 3 (ESI q-TOF)	63
Figura 32. Espectro de RMN de ^1H da substância 4 (400 MHz, CDCl_3)	64
Figura 33. Espectro de COSY ^1H - ^1H da substância 4 (400 MHz, CDCl_3).....	64
Figura 34. Mapa de contorno do experimento de HSQC da substância 4 (400 MHz, CDCl_3)	65
Figura 35. Mapa de contorno do experimento de HMBC da substância 4 (400 MHz, CDCl_3)	66
Figura 36. Espectro de massas da substância 4 (ESI TOF)	67
Figura 36. Espectro de massas da substância 4 (ESI TOF)	68
Figura 37. Espectro de RMN ^1H da substância 5 (300 MHz, CDCl_3)	70
Figura 39. Espectro de RMN ^{13}C da substância 5 (300 MHz, CDCl_3).....	72
Figura 40. Espectro RMN COSY ^1H - ^1H da substância 5 (300 MHz, CDCl_3).....	73
Figura 41. Mapa de contorno do experimento RMN HSQC da substância 5 (300 MHz, CDCl_3).....	74
Figura 42. Mapa de contorno do experimento de HMBC da substância 5 (300 MHz, CDCl_3)	75
Figura 43. Espectro de massas $[\text{M}+\text{Na}]$ da substância 5 e EM/EM 30 eV (ESI q-TOF).....	76
Figura 44. Rearranjo de McLafferty para a geração do fragmento m/z 163.	76
Figura 45. Espectro de EM/EM do íon $[\text{M}+\text{Na}]$ de razão m/z de 337 (ESI-q-TOF).....	76
Figura 51. Espectro de RMN de ^1H da substância 7 (400 MHz, CDCl_3)	83
Figura 52. Espectro de RMN de ^1H da substância 8 (400 MHz, CDCl_3)	83
Figura 53. Espectro de massas da substância 7 (ESI Q-TOF).....	84
Figura 54. Espectro de massas da substância 8 (ESI Q-TOF).....	84
Figura 55. Espectro de RMN de ^1H da substância 9 (300 MHz, MeOD).....	85
Figura 56. Espectro de COSY ^1H - ^1H da substância 9 (300 MHz, MeOD).....	86
Figura 57. Mapa de correlações de HSQC da substância 9 (300 MHz, MeOD).....	87
Figura 58. Mapa de correlações de HMBC da substância 9 (300 MHz, MeOD).....	87
Figura 59. Espectro de massas da substância 9 (ESI Q-TOF).....	88
Figura 60. Espectro de RMN de ^1H da substância 10 (200 MHz, CDCl_3).	90
Figura 61. Mapa de correlações de HSQC da substância 10 (400 MHz, CDCl_3).	91
Figura 62. Mapa de correlações de HMBC da substância 10 (400 MHz, CDCl_3).	91
Figura 63. Espectro de massas da substância 10 com respectivas variações de energia de colisão (ESI Q-TOF – 15 / 25 / 35 / 45 eV).....	93
Figura 64. Gráfico de IC_{50} da substância 5 frente a catepsina L.	95
Figura 65. Gráfico de IC_{50} da substância 5 frente a catepsina V.....	95
Figura 66. Estrutura geral para o ácido <i>N</i> -aril antranílico	100
Figura 67. Gráfico de Lineawaver-Burk do composto PN_AC_01 frente à catepsina L.	112
Figura 68. Gráfico de Lineawaver-Burk do composto PN_AC_03 frente à catepsina L.	112
Figura 69. Gráfico de Lineawaver-Burk do composto AC_01 frente a catepsina L.....	113
Figura 70. Gráfico de Lineawaver-Burk do composto AC_05 frente a catepsina L.....	113
Figura 71. Gráfico de Lineawaver-Burk do composto PN_AC_01 frente a catepsina V.....	114
Figura 72. Gráfico de Lineawaver-Burk do composto PN_AC_03 frente a catepsina V.....	114

Figura 73. Gráfico de Lineawaver-Burk do composto AC_01 frente a catepsina V.	115
Figura 74. Gráfico de Lineawaver-Burk do composto AC_05 frente a catepsina V.	115
Figura 75. Gráfico de Lineawaver-Burk do composto A_10 frente a catepsina L.....	117
Figura 76. Gráfico de Lineawaver-Burk do composto A_11 frente a catepsina L.....	117
Figura 77. Gráfico de Lineawaver-Burk do composto A_10 frente a catepsina V.	118
Figura 78. Gráfico de Lineawaver-Burk do composto A_11 frente a catepsina V.	118
Figura 80. Gráfico padrão para determinação do valor de K_i	120
Figura 81. Modo de interação proposto por docagem molecular com o programa FlexX para o substância AC_05 frente a catepsina L.....	123
Figura 82. Modo de interação proposto por docagem molecular com o programa FlexX para o substância AC_05 frente a catepsina V.....	123

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1. Metodologia para a preparação dos extratos	28
Fluxograma 2. Fracionamento da fração ZAFD em eluição gradiente	31
Fluxograma 3. Fracionamento da fração ZAFD 8 – 9 por SPE.....	32

RESUMO

ESTUDO DE PRODUTOS NATURAIS E DERIVADOS SINTÉTICOS BUSCANDO INIBIDORES ESPECÍFICOS DAS CATEPSINAS L e V. Este trabalho descreve a busca de metabólitos secundários bioativos em espécies de plantas do gênero *Zanthoxylum* e a partir de derivados sintéticos visando inibidores específicos das catepsinas L e V.

Os produtos naturais estão envolvidos em cerca de 50% de todos os fármacos comercializados. As catepsinas representam uma classe de enzimas que têm função primária de degradar aleatoriamente proteínas nos lisossomos e também estão envolvidas em diferentes patologias, tais como aterosclerose, artrite reumatóide, osteoporose e diferentes tipos de cânceres. Neste trabalho foi realizado o monitoramento dos extratos do gênero *Zanthoxylum* por ensaios fluorimétricos e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Dentre as espécies avaliadas, os extratos mais promissores foram os extratos metanólico e diclorometânico e de *Zanthoxylum acuminatum*, sendo este último selecionado para isolamento. A metodologia cromatográfica levou ao isolamento de um triterpeno; o lupeol (**1**), as cumarinas; a umbeliferona (**2**), heradenol (**3**), nordentatina (**4**), anisocumarina (**5**), derivado do 6', 7'-epoxi-7-geraniloxicumarina (**6**); alcalóides do tipo cantinônicos; 5-metoxicantin-6-ona (**7**), 4,5-dimetoxicantin-6-ona (**8**); um alcalóide β -carbonílico; 7-hidroxi-1-etil- β -carbolina (**9**); e um do tipo acridônico; arborinina (**10**). Todos foram ensaiados na concentração de 25 μ M e a cumarina **5** apresentou inibição superior a 50%, mostrando maior atividade e seletividade frente a catepsina L. O valor de potência (IC_{50}) deste composto foi 30 μ M para a catepsina L e de 102 μ M para a catepsina V. Além disso, foram determinados os valores de potência, seletividade e mecanismo de ação para alcalóides acridônicos isolados de *Swinglea glutinosa*, ácidos *N*-aril antranílicos, alcalóides acridônicos sintéticos e uma série de alcalóides 4-quinolínicos-2-substituídos. O composto considerado mais promissor foi o alcalóide acridônico **AC_05**, com valor IC_{50} de 0,5 μ M e K_i 0,18 μ M. Além disto, este composto **AC_05** apresentou-se como um inibidor competitivo frente as duas catepsinas, estando de acordo com o modelo de interação proposto por modelagem molecular.

ABSTRACT

STUDY OF NATURAL PRODUCTS AND SYNTHETIC DERIVATIVES SEARCHING SPECIFIC INHIBITORS OF CATHEPSINS L AND V.

The present work describes the search of bioactive secondary metabolites in plant species of genus *Zanthoxylum* and synthetic derivatives seeking specific inhibitors of cathepsins L and V.

The natural products are involved in approximately 50% of all drugs marketed.

Cathepsins represent a class of enzymes that has the primary function of randomly degrade proteins at lysosomes, but are also involved in different pathologies, such as, atherosclerosis, rheumatoid arthritis, osteoporosis and various cancers. This work was carried out monitoring *Zanthoxylum* extracts by fluorimetric assays and by *High-performance liquid chromatography* (HPLC). Among the species studied, the most promising extracts were methanol and dichloromethane extracts of *Zanthoxylum acuminatum*, the latter being selected for isolation. The chromatographic methodology afforded the isolation of a triterpene: lupeol (**1**), the coumarins umbelliferone (**2**), heradenol (**3**), nordentatin (**4**), anisocoumarin (**5**), derivated of 6',7'-epoxy-7-geranyloxycoumarin (**6**); canthinonic alkaloids 5-methoxycantin-6-one (**7**), 4,5-dimehoxycantin-6-ona (**8**); β -carboline alkaloid; 7-hydroxi-1-ethyl- β -carboline (**9**); and acridone alkaloid arborinine (**10**). All were tested at concentration of 25 mM and coumarin **5** inhibited over 50%, showing more activity and selective against cathepsin L. The value potency (IC_{50}) of this compound was 30 μ M for cathepsin L and 102 μ M for cathepsin V. Furthermore, were determined the potency values, selectivity and mechanism of action acridones alkaloids isolated from *Swinglea glutinosa*, *N*-aryl anthranilic acids, synthetic acridone alkaloids and a series of alkaloids 4-quinoline-2-substituted. The most promising compound was the alkaloid acridone AC_05 with a IC_{50} of 0.5 μ M and K_i of 0.18 μ M. Moreover, the compound AC_05 presented as a competitive inhibitor against both cathepsins, which is consistent with the interaction model proposed by molecular modeling.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	2
1.1	Produtos naturais como precursores de fármacos	2
1.2	Estratégias para a descoberta de candidatos a fármacos	5
1.3	Gênero <i>Zanthoxylum</i>	5
1.4	Enzimas como alvo terapêutico.	7
1.5	Cisteíno peptídeos lisossomais.	9
1.5.1	Catepsinas como alvo terapêutico	11
1.5.2	Catepsinas estudadas	13
1.5.3	Características estruturais e mecanismos de ação das catepsinas	15
1.6	Substratos fluorogênicos	16
1.7	Inibidores enzimáticos	17
1.7.1	Modo de ligação e mecanismo de ação	17
2	OBJETIVO	23
2.1	Objetivo geral	23
2.2	Objetivos específicos	23
3	Metodologia	25
3.1	Materiais	25
3.1.1	Solventes	25
3.1.2	Suporte para cromatografia	25
3.1.3	Reagentes	25
3.1.4	Enzimas	26
3.2	Equipamentos	26
3.3	Coleta e Identificação do Material Vegetal	27
3.4	Preparação dos Extratos	28
3.5	Metodologia para extração em fase sólida	29
3.6	Metodologia para CLAE Analítico	31
3.7	Metodologia para isolamento dos metabólitos.	31
3.7.1	Fracionamento do extrato ZAFD	31
3.7.2	Fracionamento da fração ZAFD 5 – 8	32
3.7.3	Isolamento e purificação da cumarina da fração SPE_1_ZAFD_2	34
3.8	Metodologia dos ensaios enzimáticos	35
3.8.1	Metodologia e condições gerais dos ensaios cinéticos em placa de Elisa	35

3.8.2	Triagem de inibidores frente a catepsina L e V	36
3.8.3	Determinação da potência dos inibidores (IC ₅₀)	37
3.8.4	Determinação da seletividade (S)	38
3.8.5	Determinação do Mecanismo de Ação	38
3.8.6	Modelagem Molecular dos inibidores frente a catepsina L e V	39
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	41
4.1	Atividade enzimática	43
4.1.1	Biomotoramento dos extratos de <i>Zanthoxylum</i>	43
4.2	Perfil cromatográfico dos extratos brutos/frações	49
4.3	Substâncias identificadas	54
4.4	Determinação estrutural	57
4.4.1	Triterpeno	57
4.4.2	Cumarinas	59
4.4.2	Alcalóides	81
4.5	Estudo de produtos naturais na busca por inibidores	94
4.5.1	Produtos naturais isolados de <i>Zanthoxylum acuminatum</i>	94
4.5.2	Produtos naturais isolados de <i>Swinglea glutinosa</i>	95
4.6	Estudo de produtos sintéticos na busca de inibidores	99
4.6.1	Produtos sintéticos: ácidos <i>N</i> -aril antranílicos	99
4.6.2	Produtos sintéticos: alcalóides acridônicos	104
4.6.3	Produtos sintéticos: alcalóides 4-quinolínicos-2-substituídos	107
4.7	Determinação do mecanismo de inibição	110
4.8	Estudos de docagem modelagem e modelos de interação.	121
5	Conclusões, Perspectivas e Considerações finais	124
6	Referências	127



Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Produtos naturais como precursores de fármacos

Desde os primórdios da civilização humana faz-se o uso de substâncias naturais, provenientes de diferentes fontes, com finalidade terapêutica. Os relatos mais antigos são datados de 3500 a 5000 anos a.C., descritos em placas de argila da Mesopotâmia e também em papiros do antigo Egito.

Nos dias modernos os produtos naturais ainda são a grande fonte de agentes terapêuticos e inovação para o tratamento de diversas doenças infecciosas causadas por bactérias e fungos, cânceres, distúrbios lipídicos e imunomoduladores (CLARD & WALSH, 2004), sendo vistos como alvo importante e uma das maiores fontes de novas drogas pois (STICHER, 2008):

- Apresentam alta diversidade estrutural e biológica;
- Agregam substâncias com massa relativa <2000 Da;
- Podem ser facilmente absorvidos e metabolizados pelo organismo humano;
- Alta diversidade estrutural biológica

Diferentes produtos naturais foram descobertos e utilizados no tratamento de várias doenças. Na Figura 1 são apresentadas algumas estruturas de origem natural, isoladas de bactérias e plantas e utilizadas como fármacos: *estaurosporina* **(1)**, empregada no mecanismo de inibição de proteínas quinases no sítio de ATP, *efedrina* **(2)**, usada como adrenérgico, *morfina* **(3)**, utilizada no tratamento hipnoanalgésico, *Taxol* **(4)** empregado nos tratamentos de câncer e *vancomicina* **(5)** usada no tratamento de infecções de bactérias gram-positivas nas quais é verificada resistência a penicilina, esta também de origem natural (CLARDY & WALSH, 2004; SCHENKEL *et al.*, 1999).

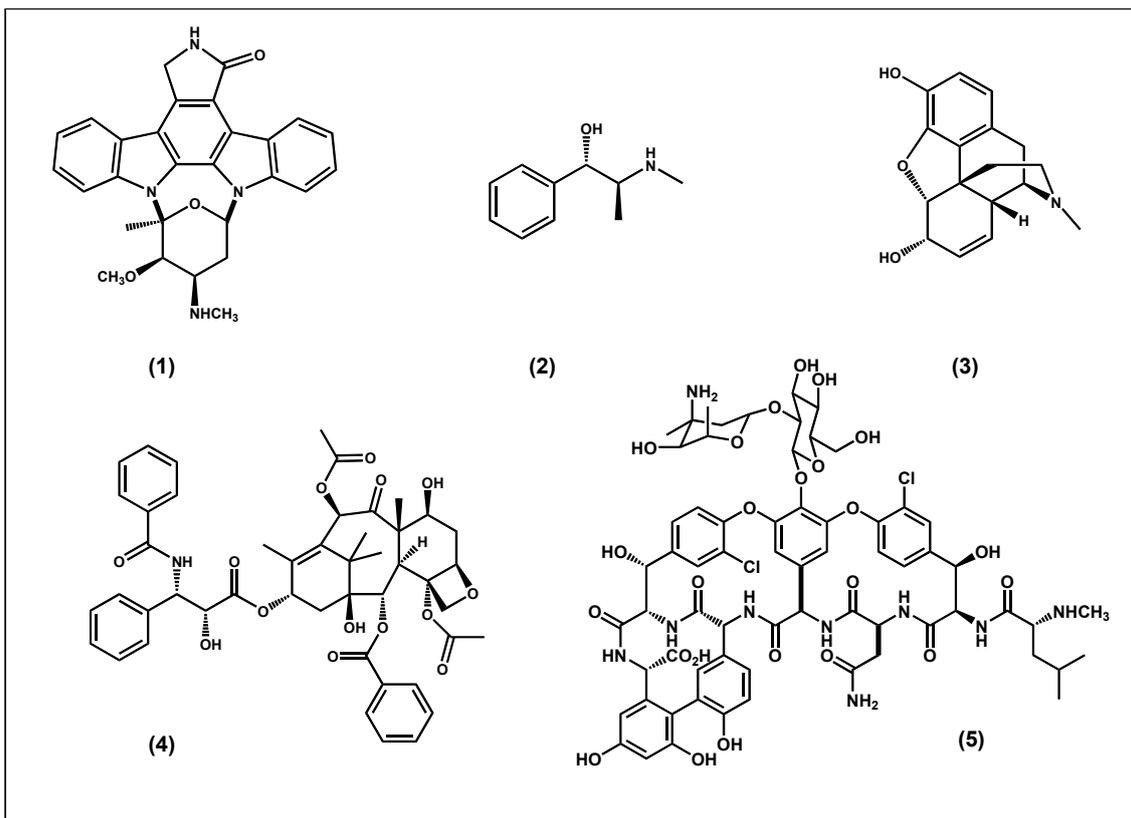


Figura 1. Estruturas de alguns dos Produtos Naturais utilizados como fármacos.

De acordo com dados do USA - FDA (Food and Drug Administration) do total de Novas Substâncias Ativas (NASs – New Active Substances) registradas nos últimos 25 anos (período de 01/1981 a 06/2006), cerca de 5% são produtos naturais e aproximadamente 28% são espécies químicas derivadas de produtos naturais com modificações sintéticas (NEWMAN & CRAGG, 2007). Na Figura 2 é possível observar que, em geral, os produtos naturais estão envolvidos direta ou indiretamente em aproximadamente 50% dos fármacos aprovados pela FDA.

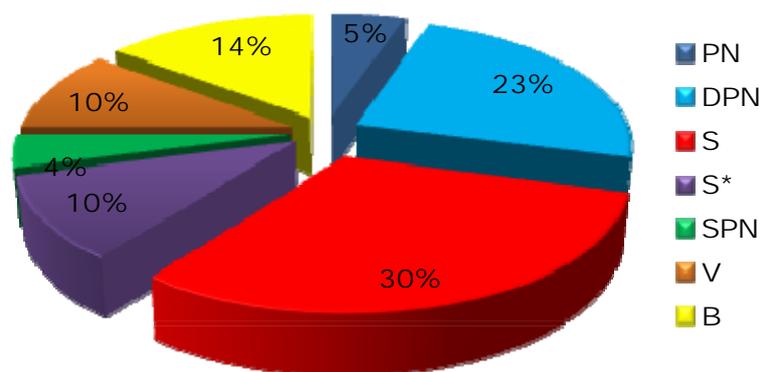


Figura 2. Diferentes fontes terapêuticas (N = 1184).

PN: produtos naturais; **DPN:** derivado de produto natural; **S:** sintéticos; **(S*)** produtos naturais mimitizados (apresentam influência dos produtos naturais ou são protótipos com derivatizações sintéticas, grupo farmacofórico ou imitação da natureza); **SPN:** sintético baseado em produto natural; **V:** vacinas; **B:** Biológicos (peptídios ou proteínas isolados de organismos/linhagens de células ou produzidos biotecnologicamente). FONTE: (NEWMAN & CRAGG, 2007).

Um dos grandes desafios atuais para os grupos de pesquisa em produtos naturais distribuídos pelo mundo é a descoberta de substâncias que sejam bioativas, bem como seus respectivos análogos (LEE *et. al.* 2010). Assim, as plantas representam um alvo de estudo importante na busca destas novas substâncias, sendo consideradas uma fonte promissora de diversidade molecular para inibidores enzimáticos seletivos e de síntese para inúmeros compostos bioativos.

A exploração racional da biodiversidade brasileira, estimada em cerca de 22% das espécies vegetais do planeta (FERRO *et. al.* 2006) (a maior existente no mundo) torna-se essencial para a vida humana e desenvolvimento econômico do Brasil; seu estudo sustentável e consciente, através de uma abordagem interdisciplinar química e biológica, faz-se instrumento importante na busca de novos fármacos ou substâncias que sirvam como seus protótipos.

1.2 Estratégias para a descoberta de candidatos a fármacos

A descoberta de novos fármacos é um caminho que desprende longo tempo de pesquisa e altos investimentos financeiros. No decorrer da história este caminho passou por várias etapas, com a descoberta de fármacos tais como penicilina e benzodiazepínicos e programas de busca aleatória de substâncias sintetizadas que apresentassem atividade biológica. (SILVERMAM, 1992).

Os programas de busca aleatória de triagem de substâncias são baseados na metodologia HTS (*High Throughput Screening*), que utiliza grandes bibliotecas de substâncias químicas avaliadas frente a um alvo pré determinado.

A grande meta dos programas HTS não é a identificação de novas drogas mas sim determinar pontos iniciais para a química medicinal, ou seja, novas substâncias químicas que possam servir de parâmetro para o desenvolvimento de um novo fármaco. Além disto, busca ensaiar grande diversidade de compostos e assim verificar relações entre estrutura química e atividade biológica.

A metodologia pautada na utilização de grandes bibliotecas de substâncias alvos apresenta-se como a principal metodologia para a descoberta de novas moléculas bioativas. O escalonamento desta metodologia, utilizando bancos de dados de extratos de plantas, fungos, ou qualquer outro alvo relevante, assim como bibliotecas de substâncias isoladas e não somente sintéticas passa a ser um desafio para os programas HTS; isto representa caminhos alternativos para a descoberta de novas espécies químicas bioativas.

1.3 Gênero *Zanthoxylum*

A família Rutaceae é largamente distribuída pelas regiões dos trópicos úmidos e temperados, reunindo cerca de 1.600 espécies de árvores e arbustos em 150 gêneros. Na região neotropical ocorrem 52 gêneros; destes, 33 no Brasil, com centro de dispersão na Amazônia e na Mata Atlântica (SOUZA *et al.*, 1999). O gênero *Zanthoxylum* pertence à família Rutaceae e é constituído por cerca de 250 espécies de árvores e arbustos (ARRUDA *et al.*, 1992).

A sinonímia do gênero *Zanthoxylum*, com o táxon mais próximo *Fagara*, foi por muito tempo causa de controvérsia. *Zanthoxylum* foi mantido separado do gênero *Fagara* com base nas estruturas de seus periantos e, posteriormente, observou-se que três espécies apresentavam morfologia de transição entre os dois gêneros. Morfologicamente e anatomicamente, *Zanthoxylum* é considerado originado através da redução do duplo perianto de *Fagara*; assim, *Fagara* foi considerada sub-gênero de *Zanthoxylum*.

Estudos realizados por WATERMAN mostraram que a distribuição de alcalóides e cumarinas nos dois gêneros reforçam a combinação em um único gênero. (ARRUDA *et al.*, 1992), o qual é responsável pela produção de diferentes classes de metabólitos secundários. Investigações fitoquímicas de diferentes espécies revelaram a presença de diferentes classes de alcalóides, com destaque para os cantinônicos (FERREIRA *et al.*, 2002 e FERREIRA *et al.*, 2007) e benzofenantridínicos (TANE *et al.*, 2005; HU *et al.*, 2007; FERNANDES *et al.*, 2009), cumarinas (CHEN *et al.* 2005; SMITH *et al.*, 2005), flavonóides (FERNANDES *et al.*, 2009), polifenóis (KUSUDA *et al.* 2006), terpenos, (GUEDES *et al.*, 2008) e lignanas (FACUNDO *et al.* 2005; MBAZE *et al.*, 2009) (Figura 3).

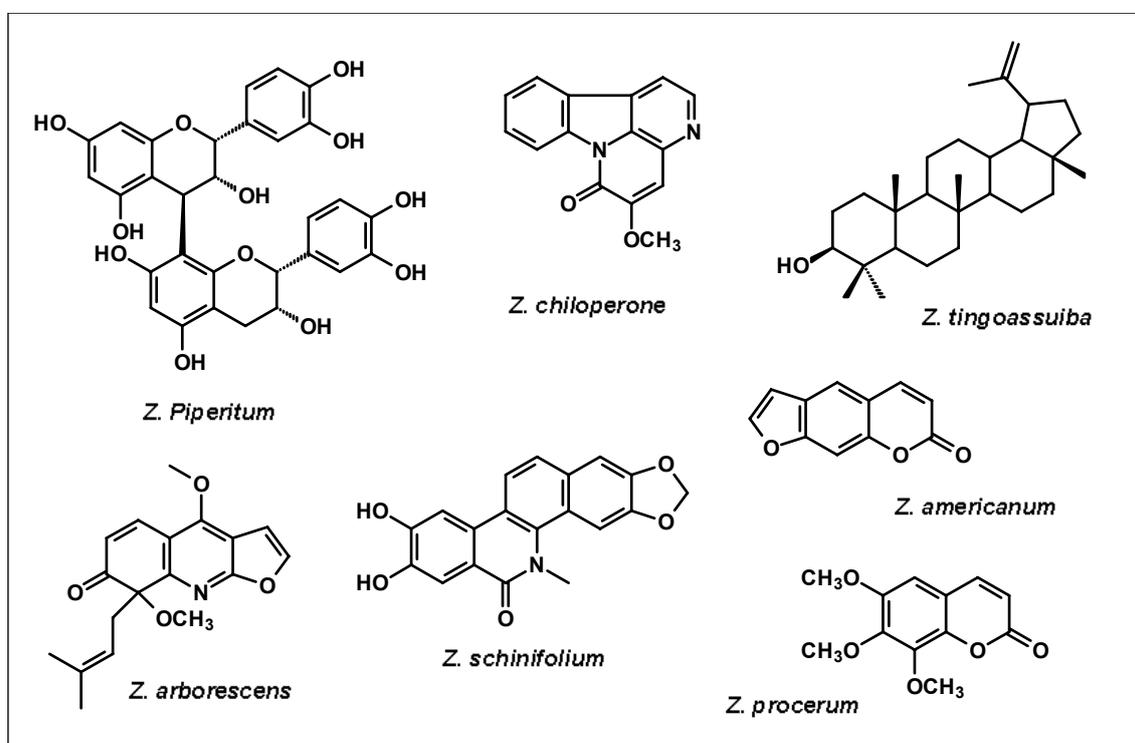


Figura 3. Substâncias isoladas do gênero *Zanthoxylum*

Desta forma, o emprego do gênero *Zanthoxylum* é muito promissor, pois são descritos na literatura diversas atividades biológicas, tais como atividade antichagásica, tripanocida, antiplasmódica, anti-HIV, antiinflamatória, anti-helmíntica (MOCECELLI *et al.*, 2009), bactericida (FARNSWORTH *et al.*, 1976), fungicida (AHMAD *et al.*, 2003), leishmanicida (FERREIRA *et al.*, 2002), anti-reumática, antileucêmica (LEWIS, 1983) e inseticida (MACRAE *et al.*, 1984).

A medicina moderna utiliza diferentes espécies de *Zanthoxylum* para o tratamento de inúmeras doenças tais como problemas cardiovasculares, tuberculose e malária, entre outras (FACUNDO *et al.*, 2005). Também são encontradas patentes da utilização de extratos com espécies do gênero para o tratamento de doenças cerebrovasculares como mal de Parkinson e aterosclerose (Patent Number: CN101502585) e um gel indicado para a prevenção de doenças da pele (Patent Number: CN101385800-A).

1.4 Enzimas como alvo terapêutico.

Enzimas são macromoléculas responsáveis por catalisar reações biológicas essenciais para a manutenção da vida. Dentre todas as biomoléculas existentes, são as mais notáveis em função de alta especificidade e poder catalítico. Processos nos quais há problemas de regulação da atividade catalítica enzimática levam a estados patológicos; em alguns casos, a mutação de genes responsáveis pela produção de enzimas específicas pode levar a um nível anormal de concentração ou acarretar um aumento da atividade catalítica enzimática; ambos processos resultam em patologias específicas. (COPELAND, 2005).

A inibição seletiva de enzimas em organismos infecciosos, como vírus, bactérias e parasitas multicelulares, representam intervenção terapêutica eficiente que pode levar a cura de doenças infecciosas. Esta estratégia é bem representada na medicina moderna, com uma significativa parcela de fármacos antivirais, antibióticos e antiparasitários em uso clínico nos quais propriedade e eficiência terapêutica processam-se por inibição enzimática (Tabela 1).

Enzimas são alvos atrativos na busca para intervenção farmacológica frente à inúmeras doenças, cerca de 50% dos medicamentos atuais agem sobre um mecanismo de inibição enzimático.

Tabela 1. Fármacos que atuam por mecanismo inibição enzimática

COMPOSTO	ENZIMA ALVO	USO CLÍNICO
Acetazolamida	Anidrase Carbônica	Glaucoma
Amphenavir, indinavir, nelfinavir, ritonavir, saquinavir	HIV protease	AIDS
Alopurinol	Xantina oxidase	Gota
Argatroban	Trombina	Doença do Coração
Aspirina	Ciclooxigenase	Inflamação, dor, febre
Amoxicilina	Proteínas ligadas a parede celular	Infecção bacteriana
Captopril, enalapril	Enzima conversora da angiotensina	Hipertensão
Carbidopa	Dopa descarboxilase	Doença de Parkinson's
CI-1040, PD0325901	MAP quinase quinase	Câncer
Clavulanato	β -lactamase	Resistência Bactericida
Digoxina	Sódio e Potássio ATPase	Doença do Coração
Efavirenz, nevirapina	Transcriptase reversa	AIDS
Epristerida, finasterida, dutasterida	Esteróide 5 α -redutase	Hiperplasia benigna da próstata, calvície masculina
Fluorouracil	Timidilato sintase	Câncer
Leflunomida	Diidroorotato desidrogenase	Inflamação
Lovastatina e similares	HMG-CoA redutase	Redução do Colesterol
Nitecapona	Catecol-O-metiltransferase	Doença de Parkinson
Norfloxacina	DNA girase	Infecções do trato urinário
Omeprazol	H ⁺ , K ⁺ ATPase	Úlceras pepticas
PALA	Aspartato transcarbamilase	Câncer
Sorbinol	Aldose redutase	Diabete retinopática
Trimetoprima	Diidrofolato redutase bacteriano	Infecção bactericida
Viagra, Levitra	Fosforodiesterase	Disfunção erétil

(Fonte: COPELAND, 2005).

1.5 Cisteíno peptidases lisossomais.

Cisteíno peptidases lisossomais são encontradas em diferentes formas de vida tais como fungos, vírus, bactérias, plantas, invertebrados, peixes e mamíferos; formam uma numerosa e importante família de enzimas do tipo papaína (TURK & GUNCAR, 2003).

As peptidases, também conhecidas como proteases, representam uma larga família de enzimas responsáveis pela clivagem de ligações peptídicas, estão envolvidas na regulação de diferentes processos biológicos e são classificadas em endopeptidases e exopeptidases, de acordo com o tipo de aminoácido presente em seu respectivo sítio catalítico: serino, cisteíno, aspartil, metalo e treonina peptidases e (MOHAMED & SLOANE, 2006).

Nos mamíferos, uma das mais importantes cisteíno peptidases são as catepsinas lisossomais. O termo catepsina foi introduzido em 1929 por Willstätter e Bamann para diferenciar uma protease que era ativa em pH ácido, da protease da pepsina porém, atualmente, este termo descreve proteases intermoleculares que encontram-se localizadas em lisossomos com valor de pH fracamente ácido (OTTO *et al.*, 1997). Todas as cisteíno peptidases lisossomais de mamíferos são conhecidas como catepsinas, embora o contrário não seja verdadeiro (PALERMO & JOICE, 2007).

As catepsinas estão distribuídas entre as famílias das aspartil endopeptidases (catepsinas D e E), serino peptidases (catepsinas A e G) e cisteíno peptidases (B, C, F, H, K, L, O, S, V, W e X) (TURK *et al.*, 2002 e BROMME *et al.*, 2002). Atualmente, após o seqüenciamento do genoma humano, foram catalogadas 11 catepsinas: B, C, F, H, K, L, O, S, V, W e X (CATALDO & NIXON, 1990). Estas enzimas são geralmente conhecidas como enzimas que degradam aleatoriamente proteínas presentes nos lisossomos, estão envolvidas em processos fisiológicos seletivamente controlados e possuem funções associadas a sua restrita localização tecidual, como descrito na **Erro! Fonte de referência não encontrada.**

Entretanto, recentemente foi demonstrado que algumas dessas enzimas não se encontram estritamente nos lisossomos e podem se acumular em diferentes tecidos e células (MOHAMED & SLOANE, 2006), o que leva a processos patológicos como progressão de tumores (PALERMO & JOYCE, 2007),

aterosclerose (HEENEMAN *et al.*, 2007), doença de Alzheimer (CATALDO & NIXON, 1990), artrite reumatóide e osteoporose (YASUDA *et al.*, 2004).

Tabela 2. Expressão, localização e atividade fisiológica das catepsinas

Nome	Expressão	Função
Catepsina B	Ubíquo	Lisossomal, extracelular; processamento proteolítico de APP na invasão de tumores e metástase
Catepsina C	Ubíquo	Lisossomal; ativação de serino proteases, fator XIII de neuramidases
Catepsina F	Coração; músculos do esqueleto; cérebro; testículos; ovário;	Lisossomal: papel na invasão de tumores e metástase
Catepsina H	Cérebro; fígado; rins; amígdala	Lisossomal; degradação da cadeia invariante (Ii)
Catepsina K	Predominantemente em ossos (osteoclastos); presente na maioria dos tecidos epiteliais	Lisossomal, extracelular; reabsorção óssea; degradação de ECM e fibrinogênio
Catepsina L	Ubíquo	Lisossomal, extracelular; nuclear (truncada); apresentação de antígeno, degradação Ii, regulação do ciclo celular.
Catepsina O	Amplamente expressa	Lisossomal; proteína turnover
Catepsina S	Macrófagos alveolares, testículos, células epiteliais, células-T, baço	Lisossomal, extracelular; Ii, degradação, arteriogenese, AP, angiogenese
Catepsina V	Predominantemente em tímica; testículos; presente no cérebro; córnea epitelial; células N, pele, baço e células-T citotóxicas	Lisossomal; AP, degradação Ii
Catepsina W	Baço, células-T citotóxicas; células NK	Resposta imune, regulação da atividade citotóxica das células T
Catepsina X	Amplamente expressa; diversos tumores primários e células cancerígenas	Lisossomal; não-proteolíticos na adesão celular

1.5.1 Catepsinas como alvo terapêutico

Nos últimos anos, diferentes funções fisiológicas específicas foram descobertas e descritas para diferentes catepsinas.; além disso, estas enzimas foram associadas a diferentes processos patológicos, despertando grande interesse para o entendimento real destes processos, assim como, grande interesse pelas indústrias farmacêuticas (KUESTER, *et al.*, 2008).

As catepsinas têm sido associadas à progressão de câncer em diferentes tecidos, como relatado nos últimos anos em diversos artigos, principalmente para o caso da catepsina B: em alguns casos de câncer, mudanças na expressão ou na atividade das catepsinas ajudam na determinação de um diagnóstico ou prognóstico desta doença. Também foi verificado aumento da expressão da catepsina B, atividade e localização em tumores humanos e em ratos de laboratório (BERDOWSKA, 2004).

Estudos com células tumorais demonstram que a regulação biossintética dos níveis de produção de uma ou mais catepsinas leva a super regulação, associação com a membrana e secreção de uma catepsina específica. Extensos estudos de expressão de catepsinas em diferentes tipos de câncer, incluindo melanoma e carcinomas de pulmão, cólon, próstata e mama revelaram um aumento da expressão das catepsinas B, L ou D em humanos (VASILJEVA, *et al.*, 2007). A localização da catepsina B e L aumenta, bem como altera o nível de gravidade dos tumores humanos (KUESTER, *et al.*, 2008).

As catepsinas também estão envolvidas em diferentes processos inflamatórios: catepsinas D, B e L são importantes para a degradação intracelular de proteínas e o aumento nos valores da expressão destas está relacionado a doenças inflamatórias como problemas de periodontia, artrite reumatóide, aterosclerose, pancreatite e gastrite (KUESTER, *et al.*, 2008). Há também estudos com ratos deficientes em catepsina D, os quais nasceram normais, mas morreram após 26 dias devido a massa intestinal necrosada, tromboembolismo e linfopenia (MENZEL, *et al.*, 2006).

A remodelação de proteínas da matriz extracelular (ECM) também envolve as catepsinas; a destruição de tecidos ricos em elastina durante processos de inflamação está associada ao acúmulo local de macrófagos que contêm altos níveis

de enzimas elastinólíticas como as catepsinas B e L (FIEBIGER, et al., 2002). Esta remodelagem da matriz extracelular (ECM) é um dos mecanismos subjacentes em doenças cardiovasculares, processo no qual as catepsinas desempenham papel central, associadas ao desenvolvimento e progressão de doenças cardiovasculares (LUTGENS, *et al.*, 2007).

A expressão de algumas catepsinas é altamente regulada em tipos específicos de células, como a catepsina K nos osteoclastos, e a catepsina S nas células imunes; foi demonstrado em ratos deficientes que a catepsina K está associada à remodelagem óssea, enquanto a catepsina S é a principal enzima que processa a cadeia invariante do antígeno MHC class II, estando envolvida em diversas doenças degenerativas, como o mal de Alzheimer (MOHAMED & SLOANE, 2006; MUNGER *et al.*, 1995).

Inibidores da catepsina K foram originalmente desenvolvidos para o tratamento de doenças que envolvem a excessiva perda óssea, como osteoporose. Neste caso, a catepsina K é secretada pelos osteoclastos ósseos e apresenta-se como potente colagenase. Diversas companhias farmacêuticas apresentam diferentes inibidores, baseados na catepsina K, em fase de testes pré-clínicos e clínicos. Os resultados iniciais demonstram que estes potentes inibidores são capazes de, não somente prevenir a reabsorção óssea, como também permitir sua reformulação (PALERMO & JOYCE, 2007). Além disto, testes clínicos que utilizam os inibidores da Novartis AFG-495 e GSK reduziram, de modo experimental, a metástase óssea (GAUTHIER *et al.*, 2008).

Alguns inibidores baseados na catepsina S também estão em fase de testes clínicos contra artrite reumatóide e psoríase, além de outras doenças auto-imunes, como esclerose e lúpus, demonstrando que as catepsinas representam um alvo terapêutico de grande importância e relevância (PALERMO & JOYCE, 2007). Desta forma a busca de inibidores para as catepsinas representa uma intervenção terapêutica de suma importância e imensa contribuição para a saúde humana.

1.5.2 Catepsinas estudadas

1.5.2.1 Catepsina L (EC 3.4.22.15)

A catepsina L é descrita em humanos e em diferentes tipos de organismos, estando envolvida basicamente na degradação de proteínas nos lisossomos, na morfogênese dos folículos capilares, no processo de diferenciação epidermal e também na formação de antígenos (TURK & GUNCAR, 2003).

A catepsina L em células normais é transcrita a partir de uma pré-proteína através do complexo de Golgi, armazenada como a enzima “madura” nos lisossomos, não apresentando a pró-catepsina nenhuma atividade catalítica. A catepsina L é expressa na maioria das células eucarióticas.

Estudos com ratos deficientes em catepsina L apresentaram distintos problemas na MHC classe II processados em células epiteliais do timo, comprometimento das funções do miocárdio, hiperplasia epidermal, acantose, hiperqueratinose e perda progressiva de pelagem (LETO *et al.*, 2010; PETERMAN, *et al.*, 2006).

Evidências sugerem que a catepsina L, juntamente com outras proteinases, como a catepsina B, podem facilitar a progressão de tumores, estando esta hipótese sustentada por grande número de observações experimentais e clínicas, em que é verificado um aumento da expressão celular da catepsina L em muitos tumores humanos. Além disto, o aumento de sua expressão celular é associado com o início de tumores mais agressivos e/ou com resultados clínicos mal sucedidos (LANKELMA *et al.*, 2010).

A catepsina L está envolvida na regulação da reabsorção óssea em condições normais e patológicas, estando em menor concentração nos osteoclastos que a catepsina K. O envolvimento da catepsina L em metástase de doenças ósseas é bem fundamentado, uma vez que alterações na expressão desta enzima têm sido observadas em tumores ósseos, como osteosarcoma, tumores de células gigantes do osso, mieloma múltiplo e chondrosarcoma (LETO *et al.*, 2010).

A catepsina L também participa da invasão de células de melanona; recentemente foi demonstrado que células de melanona não metastáticas são convertidas em células metastáticas pela super expressão da catepsina L. A

associação da catepsina L com a membrana em humanos e células de melanoma sugere uma função extra lisossomal em metástases (ISHIDOH & KOMINAMI, 1998). Além disso, também foi verificado que o potente inibidor da catepsina L, a cistatina C, bloqueia a mobilidade e invasão de células de melanoma (COX *et al.*, 1999; ERVIN & COX, 2005).

1.5.2.2 Catepsina V (EC 3.4.22.43)

A catepsina V é predominantemente expressa no timo, nos testículos e na córnea epitelial, sendo descrita como a mais abundante protease encontrada na córnea epitelial (BROMME *et al.*, 1999). Seu papel fisiológico ainda não é bem definido, entretanto, há indícios que ela esteja envolvida no controle da seleção das células T humanas (TOLOSA *et al.*, 2003).

A atividade elasteolítica da catepsina V é descrita como a mais potente dentre as enzimas proteolíticas conhecidas (YASUDA *et al.*, 2004); sua presença é verificada em macrófagos nas áreas de formação de placas ateroscleróticas (LUTGENS, *et al.*, 2007).

Dados demonstram que a expressão específica da catepsina V no timo sugere que a mesma pode representar um papel crítico na apresentação de antígenos do timo ainda maior que em relação a catepsina L e apresenta-se como novo alvo para o tratamento de desordens auto-imune (BROMME *et al.*, 1999).

As catepsinas V e L apresentam alta similaridade, com identidade de 77% para a proenzima e 80% para a enzima madura; também apresentam genes de codificação próximos, assim como a organização dos seus cromossomos. No geral, as similaridades na seqüência e a organização genômica sugerem que a catepsina V e L divergiram na evolução. Apesar da semelhança entre as catepsinas V e L, elas diferem na especificidade do substrato e da distribuição tecidual.

1.5.3 Características estruturais e mecanismos de ação das catepsinas

As catepsinas apresentam atividade proteolítica altamente conservada e são formadas por uma tríade catalítica dos resíduos: Cys25, His159 e Asn175, de acordo com a numeração da papaína.

O grupo imidazol do resíduo de histidina polariza o grupo SH do resíduo de cisteína levando a desprotonação do tiol, formando um par iônico altamente nucleofílico, o qual é estabilizado por ligação de hidrogênio pelo resíduo Asn175. O resíduo de cisteína ataca o carbono do grupo carbonila da ligação peptídica do substrato levando a formação de um intermediário tetraédrico. Em seqüência, por processo de acilação, este intermediário tetraédrico libera a porção C-terminal do substrato, deixando a enzima acilada (enzima-substrato tiol éster). Um segundo intermediário tetraédrico é formado a partir da hidrólise do complexo E-S-tiol-éster, que em seguida sofre uma reação de desacilação, liberando a porção N-terminal e a enzima livre ao meio (Figura 4) (OTTO *et al.*, 1997 e LECAILE *et al.*, 2002).

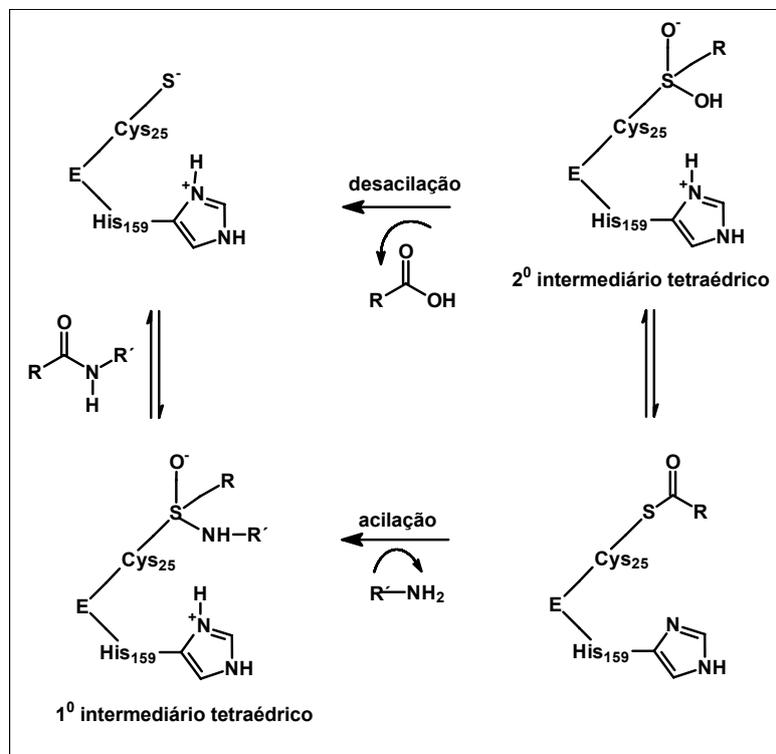


Figura 4. Mecanismo de hidrólise de peptídeos pelas cisteíno peptidases.

1.6 Substratos fluorogênicos

A utilização de substratos fluorogênicos propiciou um avanço considerável no estudo das peptidases. Dentre esses, destacam-se os peptídeos que contêm a sonda fluorescente 7-amino-4-metilcumarina (MCA). Estes substratos, quando hidrolisados, apresentam um espectro de absorção e de emissão diferentes daqueles da 7-amino-4-metilcumarina (MCA) ligados aos peptídeos. O fator limitante no uso destes substratos é permitir o estudo da especificidade dos sub-sítios S. Esta restrição deve-se ao fato da fluorescência aparecer somente quando a ligação X-MCA (X = diferentes aminoácidos) é clivada e o produto fluorescente é liberado. O uso do substrato fluorescente Z-Phe-Arg-MCA (ZFRMCA), Figura 5, tem sido amplamente utilizado devido à sua alta sensibilidade em relação a dosagem do produto fluorescente 7-amino-4-metilcumarina (BARRET & KIRSCHKE, 1981).

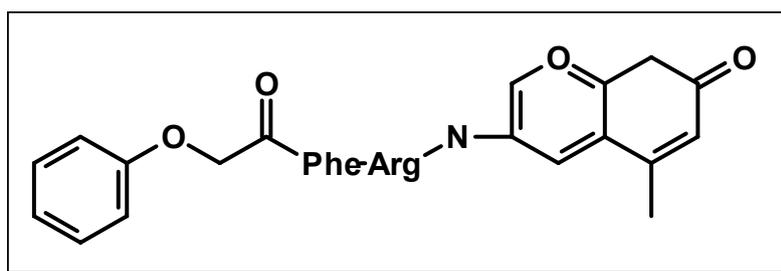


Figura 5. Estrutura do substrato comercial Z-FR-MCA

As diferenças espectrais dos diversos substratos (peptidil-MCA) e do produto de hidrólise permitem que as atividades enzimáticas das peptidases sejam acompanhadas a partir de um fluorímetro usando os comprimentos de onda de excitação de 380 nm e de emissão de 460 nm (JULIANO et al., 2002).

Por outro lado, o estudo de especificidades pode ser estendido a inibidores provenientes de coleções de substâncias isoladas de plantas e produtos sintéticos, que proporcionam um ensaio com grande variedade estrutural levando a informações do modo de interação destes inibidores com as enzimas e assim um maior entendimento das relações de estrutura e atividade.

1.7 Inibidores enzimáticos

Inibidores enzimáticos são substâncias que modificam a atividade catalítica de uma enzima agindo através da redução da velocidade da reação; interagem com uma enzima por meio de ligações reversíveis e irreversíveis, alterando assim o equilíbrio que é estabelecido entre a enzima, o substrato e o produto de interesse. No geral, as reações catalisadas por enzimas ocorrem através da associação de uma enzima (E) ao seu substrato (S), levando a formação de um complexo denominado complexo enzima-substrato (E•S).

A formação deste complexo acontece de forma rápida e reversível; em seqüência, o complexo E•S atinge um rápido estado de transição (ES^\ddagger) levando ao complexo enzima-produto (E•P), que se dissocia rapidamente liberando a enzima intacta (E) e o produto de interesse (P) no meio (esse processo é ilustrado na Figura 6); a formação das espécies é determinante na velocidade da reação e formação dos produtos. (COPELAND, 2005).



Figura 6. Equilíbrio cinético verificado entre enzima e substrato

1.7.1 Modo de ligação e mecanismo de ação

Os inibidores enzimáticos atuam através de mecanismos que podem ser reversíveis ou irreversíveis; para tanto, associam-se a enzima formando um complexo enzima-substrato que podem ser formado por ligação intermolecular covalente (E•I) ou covalentes (E-I). Os inibidores irreversíveis acarretam a inativação da enzima enquanto que os reversíveis ligam-se a enzima levando a uma perda da atividade enzimática que pode ser recuperada com a remoção do inibidor (COPELAND, 2000).

Na busca de inibidores enzimáticos para o planejamento de fármacos é desejável que o inibidor ligue-se a enzima de forma não covalente, rápida e reversivelmente, sem alterar a estrutura da enzima, levando a formação do complexo (E•I). Os inibidores reversíveis podem ser classificados em três tipos:

- 1) **inibidores competitivos**: são substâncias que competem diretamente com o substrato natural pelo sítio de ligação enzimática, levando a formação das espécies $E \bullet S$ ou $E \bullet I$. Estes inibidores normalmente apresentam estruturas que se assemelham ao substrato natural, porém diferem por não apresentar reatividade e não levar a formação de produtos pela ação da enzima, como mostrado na Figura 7.

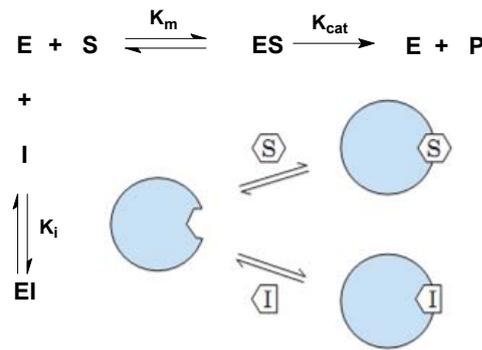


Figura 7. Esquema clássico de inibidor competitivo

- 2) **inibidores não competitivos**: são substâncias que mostram afinidade tanto para enzima livre como para o complexo $E \bullet S$, ligando-se aos sítios que participam da ligação ao substrato bem como ao sítio que participa da catálise. Estes inibidores induzem mudanças na estrutura da enzima, levando a modificação do sítio ativo, impedindo uma interação eficaz com o substrato, como mostrado na Figura 8:

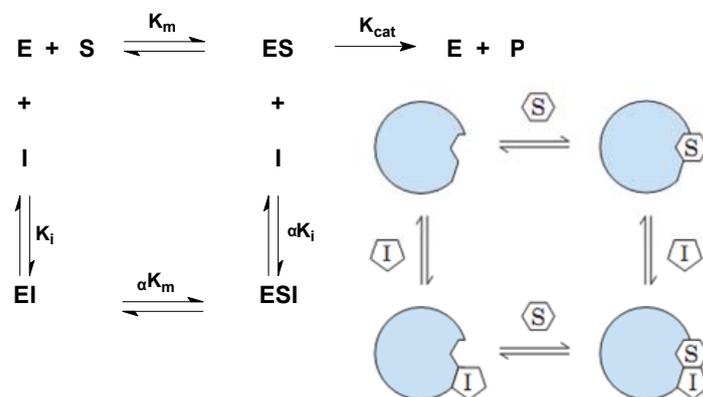


Figura 8. Esquema clássico de inibidor não-competitivo

3) **inibidores incompetitivos**: são substâncias que se ligam diretamente ao complexo E•S e não a enzima livre. Estes inibidores afetam a atividade catalítica da enzima sem afetar a ligação ao substrato, como mostrado na Figura 9:

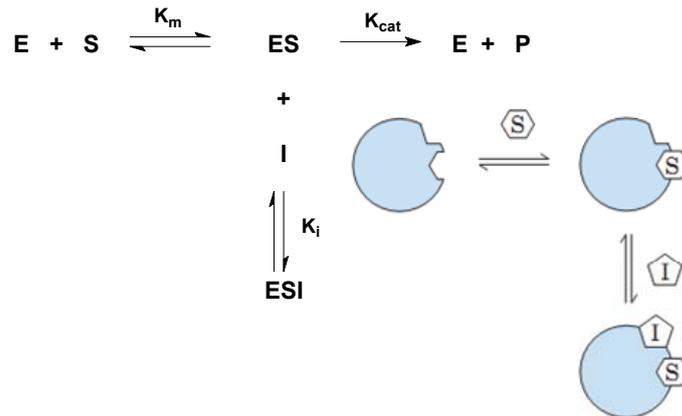


Figura 9. Esquema clássico de inibidor incompetitivo.



Objetivos

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo geral a busca de inibidores seletivos para enzimas, a partir de extratos de plantas do gênero *Zanthoxylum*, de substâncias isoladas e de derivados sintéticos.

2.2 Objetivos específicos

1. Aplicação de metodologia fluorimétrica na triagem enzimática com extratos de plantas do gênero *Zanthoxylum*;
2. Aplicação de perfil cromatográfico, via CLAE, nas análises de extratos brutos e frações;
3. Isolamento e identificação de metabólitos secundários ativos do extrato de *Zanthoxylum* selecionado;
4. Triagem bioquímica com compostos isolados e determinação de potência IC_{50} para os inibidores mais promissores;
5. Determinar IC_{50} , seletividade e mecanismo de ação dos alcalóides acridônicos isolados de *Swinglea glutinosa* frente a catepsina L;
6. Triagem bioquímica com compostos sintéticos;
7. Determinar IC_{50} , K_i , seletividade e mecanismo de ação dos inibidores sintéticos mais promissores;
8. Estudo de interações intermoleculares através de modelagem molecular.



Metodologia

3 Metodologia

3.1 Materiais

3.1.1 Solventes

- **Solventes:** foram utilizados solventes comerciais (Hexano, Diclorometano, Acetato de Etila, Metanol), recuperados e destilados no DQ – UFSCar;
- **Solventes para HPLC:** solventes comerciais ULTRA ANALYSIS, marca Tedia;
- **Solventes para ensaio:** Dimetilsulfóxido (DMSO), marca Mallinckrodt Chemicals;
- **Solvente para RMN:** CDCl_3 , MeOD, marca Sigma Aldrich.

3.1.2 Suporte para cromatografia

- Sílica gel 60 (70-230 mesh);
- Sílica do tipo “flash” (230-400 mesh);
- Sephadex LH-20 da Amershan Pharmacia Biotech AB;
- C-18 da Phenomenex (5 e 10 μm);
- CCDA – com sílica gel 60 F_{245} , $\phi = 0,2$ mm em folhas de alumínio da Sigma Aldrich.

3.1.3 Reagentes

- Substrato Z-FR-MCA (Cbz-Phe-Arg-MCA ou 7-amino-4-metilcumarina), marca Bachem Inc. e Sigma;
- Inibidor E-64 (L-3-carboxi-*trans*-2,3-epoxipropionil-leucilamido(4-guanino)butano);
- DTT, marca Sigma Aldrich;

- Acetato de Sódio trihidrato, marca J.T. Baker;
- EDTA, marca J.T. Baker.

3.1.4 Enzimas

- Catepsina L e V são enzimas recombinantes humanas e foram cedidas pelo Prof. Dr. Dieter Brömme, da University of British Columbia, Vancouver

3.2 Equipamentos

Evaporadores rotativos

- Extratos e frações foram evaporados em evaporadores do tipo Büchi Rotavapor R-114 com banho Büchi Waterbath B-480, e recirculador refrigerado NESLAB, modelo CFT-25, mantido a 5⁰C.

CLAE

analítico

- Equipamento marca Shimadzu, modelo SPD-M10A, com detector de fotodiodo e software CLASS-VP;

Preparativo

- Equipamento marca Shimadzu, modelo SPD-M10A, com detector de Ultravioleta e software CLASS-VP.

Fluorímetro

- Equipamento com leitor de Placa com 96 poços, Molecular Devices, marca Corporation – Spectra, modelo MAX GEMINI XS

RMN

- Espectrômetros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio, marca Bruker, modelos DRX 200 MHz, DRX 300 MHz e 400 MHz.
-

GC e GC/MS

- Cromatógrafo à gás com detector FID, marca Shimadzu, modelo GC-17^A;
- Cromatógrafo à gás acoplado a espectrômetro de massas, marca Shimadzu, modelo GCMS_QP5000, equipado com coluna apolar DB-5 (30 m x 0,25 mm) e ionização via impacto eletrônico (70 eV).

MS

- Espectrômetro de massas de alta resolução com fonte eletrospray (ESI) e analisador de massas q –TOF, marca Bruker Daltonics.

3.3 Coleta e Identificação do Material Vegetal

Todas as espécies do gênero *Zanthoxylum* e suas respectivas partes vegetais foram coletadas pelo grupo de Produtos Naturais da UFSCar, com a colaboração com Prof. Dr. José Rubens Pirani, do Departamento de Botânica da Universidade de São Paulo (USP – São Paulo), responsável pela identificação das mesmas (Tabela 3):

Tabela 3. Espécies do gênero *Zanthoxylum*, partes vegetais e localização.

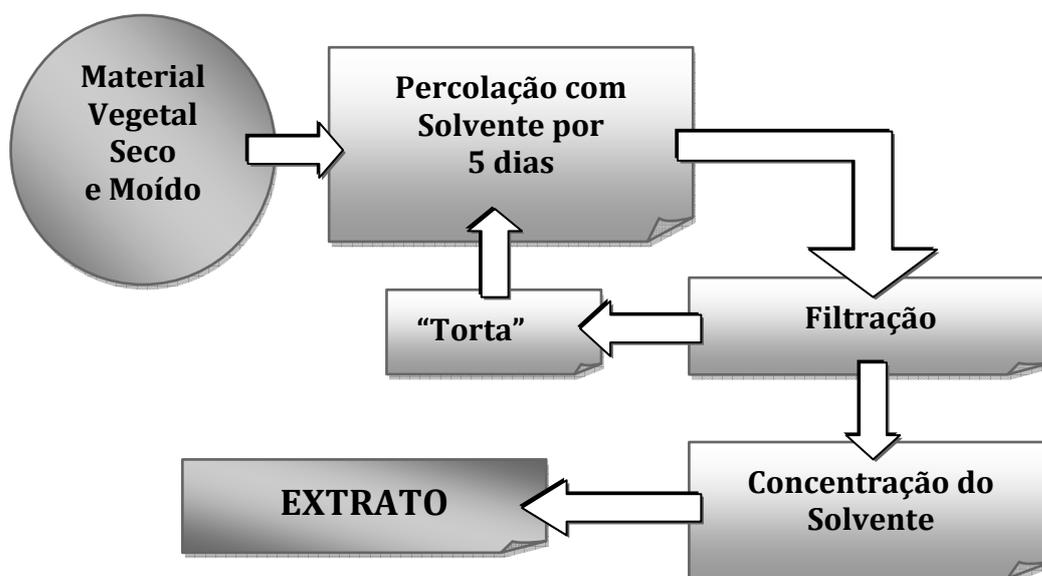
ESPÉCIE	Partes Vegetais (g)	Local de Coleta
<i>Zanthoxylum sp</i>	Folhas (217g) Galhos (44g)	Reserva Pau Brasil/Porto Seguro - Bahia
<i>Zanthoxylum ridelianum</i>	Folhas (620g)	Serra do Cabral – Minas Gerais
<i>Zanthoxylum arenarium</i>	Folhas (504g)	Estrada Piuma/Maratraizes – ES
<i>Zanthoxylum pohlianum</i>	Folhas (282g) Galhos (1224g)	Estrada Praia do Sol - Minas Gerais
<i>Zanthoxylum minutiflorum</i>	Folhas (570g) Galhos (450g)	Estrada Rio Bananal/Fazenda Santo Antônio, Linhares – Espírito Santo
<i>Zanthoxylum acuminatum</i>	Folhas (620g) Galhos (345g) Caule (517g)	Estrada Rio Bananal/Fazenda Santo Antônio. Linhares – Espírito Santo

A análise deste material levou à separação das espécies em cinco grupos de plantas, uma vez que as espécies *Z. arenarium* e *Z. pohlianun* são, na verdade, a espécie *Z. monogynum*.

3.4 Preparação dos Extratos

As diversas partes vegetais foram secas separadamente em estufa com circulação de ar a 45^o C e, após, pulverizadas em moinho do tipo Willey. A extração do material vegetal moído foi realizada por maceração utilizando os solventes hexano, diclorometano e metanol, durante cinco dias, por três vezes, conforme representado no

Fluxograma 1.



Fluxograma 1. Metodologia para a preparação dos extratos

No total, foram obtidos 31 extratos, conforme mostrado na Tabela 4; destes extratos, foram selecionados os extratos diclometânico e metanólico e ensaiados frente a catepsina L e a catepsina V.

Tabela 4. Extratos das diferentes espécies do gênero *Zanthoxylum*

Espécie	Parte Vegetal	código	Massa dos Extratos (g)
<i>Zanthoxylum sp</i>	Folhas	ZFH	6,9491
		ZFD	4,4244
		ZFM	0,3514
	Galhos	ZGH	0,4007
		ZGD	0,2977
		ZGM	2,2426
<i>Zanthoxylum ridelianum</i>	Folhas	ZRFH	12,7042
		ZRFD	10,8817
		ZRFM	7,5599
<i>Zanthoxylum arinarium</i>	Folhas	ZArFH	8,2984
		ZArFD	19,2734
		ZArFM	39,1876
<i>Zanthoxylum poliano</i>	Folhas	ZPFH	3,3961
		ZPFD	5,6724
		ZPFM	38,5929
	Galhos	ZPGH	1,0812
		ZPGD	4,3151
		ZPGM	14,4906
<i>Zanthoxylum minutiflorum</i>	Folhas	ZMFH	1,5383
		ZMFD	16,6364
		ZMFM	56,4990
	Galhos	ZMFH	1,0268
		ZMFD	2,0998
		ZMFM	16,5011
<i>Zanthoxylum acuminatum</i>	Folhas	ZAcFH	2,7433
		ZAcFD	8,0040
		ZAcFM	4,8014
	Galhos	ZAcFH	0,3800
		ZAcFD	-
		ZAcFM	1,7368
	Caule	ZAcCH	1,8770
		ZAcCD	-
		ZAcCM	16,400

F = folhas; G = galhos; C = caule; H = hexano; D = diclorometano; M = metanol

3.5 Metodologia para extração em fase sólida

A extração em fase sólida (SPE) foi realizada com o auxílio de cartucho prepSep C₁₈, marca Fisher Scientific; esta extração consiste em um procedimento de pré-tratamento da amostra, realizada em quatro etapas:

- 1) **Condicionamento:** ativação da fase estacionária por solvatação, a qual depende do tipo de metodologia a ser empregado na separação;

- 2) **Aplicação da Amostra:** espera-se a retenção dos compostos de interesse, enquanto os interferentes são descartados na eluição;
- 3) **Lavagem:** remoção de interferentes menos retidos que os compostos de interesse. A fase móvel utilizada depende do modo de eluição e das características da amostra;
- 4) **Eluição:** eluição dos compostos retidos, usando solventes que rompam as interações do analito com a fase estacionária.

Para a extração em fase sólida utilizou-se o procedimento no qual um cartucho foi condicionado com metanol (3 vezes o seu volume final de 6 mL) e em seguida com água (1 vez o seu volume final de 6 mL), conforme apresentado na Figura 10:

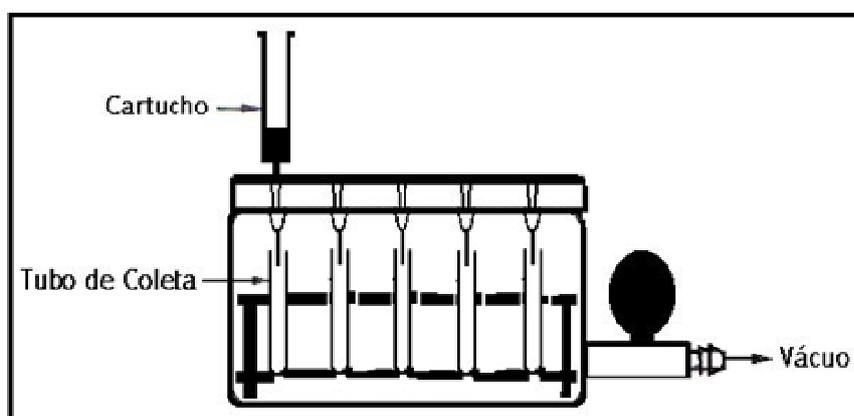


Figura 10. Esquema do sistema de extração em cartucho.

A amostra, extrato ZAFD, foi solubilizada em metanol, filtrada em filtro de teflon de 0,45 μm e, em seguida, aplicada um volume de 100 μL no cartucho já condicionado. Após a aplicação utilizou-se 10 mL de uma mistura de $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$ (7:3) para eluição da amostra.

Em seqüência às aplicações do extrato, procedeu-se a limpeza do cartucho: eluição de 5 mL de água após, de 10 mL de metanol e, por fim, 10 mL de acetonitrila.

A metodologia empregada foi escalonada para uma coluna contendo C_{18} , a fim de reproduzir em larga escala o procedimento de extração em fase sólida por cartucho SPE, com a finalidade de reter clorofila e obter os metabólitos de interesse.

3.6 Metodologia para CLAE Analítico

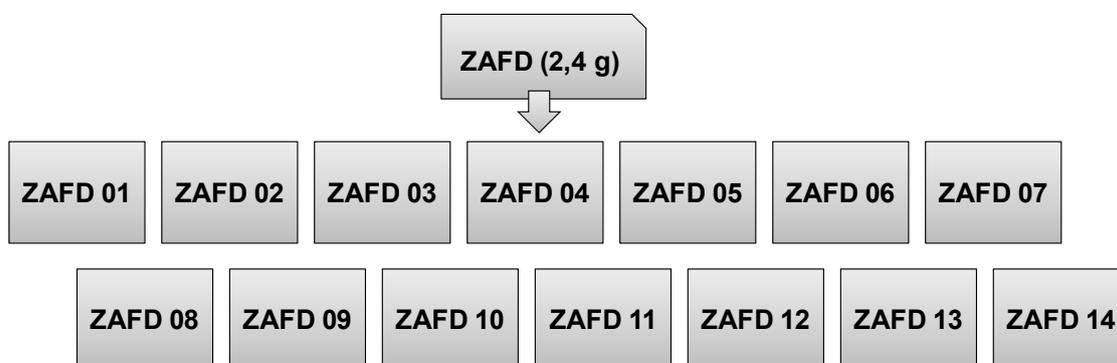
O perfil cromatográfico para os extratos selecionados foi realizado a partir de uma eluição gradiente exploratória, utilizando eluição em fase reversa com coluna de 15 x 0.7 mm.

O gradiente de eluição foi realizado empregando como fase móvel solvente acetonitrila e variando-se a concentração deste solvente de 5 a 100% em 60 minutos, com acondicionamento da coluna por 20 minutos; este método está baseado na proposta de SNYDER e DOLAN (1996).

3.7 Metodologia para isolamento dos metabólitos.

3.7.1 Fracionamento do extrato ZAFD

A fração ZAFD foi submetida a uma coluna contendo sílica como fase estacionária (\varnothing x h = 18,0 x 4,0 cm) e eluições de gradiente com: hexano 100%, hexano/acetato 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9 e 100% acetato, acetato/metanol 9,5:0,5, 9:1, 7:3 e 100% metanol. Esta separação forneceu 14 frações de 800 mL, como mostrado no Fluxograma 2:



Fluxograma 2. Fracionamento da fração ZAFD em eluição gradiente.

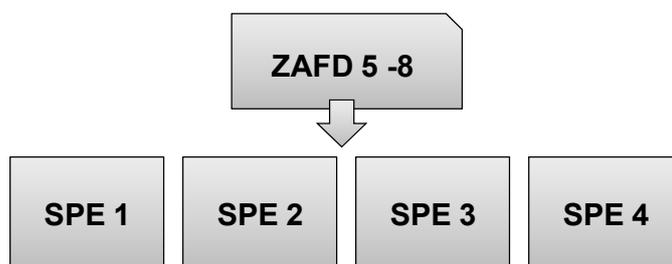
- Na fração 2 verificou-se a presença de um sólido branco e identificado como o triterpeno lupeol; esta fração foi codificada como substância **1**.
- Da fração 4 foram isolados um sólido de coloração branco-amarelada, identificado como cumarina umbeliferona (7-hidroxycumarina) e codificado como substância **2**, além de um alcalóide acridônico identificado como arborinina e codificado como substância **10**. Estes compostos foram

purificados e isolados por cromatografia em camada delgada preparativa em hexano/acetato (8:2).

- As frações 5 – 8 e as frações 9 – 11 foram avaliadas por CLAE-DAD e reunidas em duas novas frações, as quais foram submetidas à metodologia SPE em coluna.

3.7.2 Fracionamento da fração ZAFD 5 – 8

A fração ZAFD 5 -8 foi submetida a uma coluna em fase reversa (C₁₈) (Ø x h = 18,0 x 4,0 cm) e eluições de gradiente com MeOH/H₂O 9:1, metanol 100%; diclorometano 100%; após lavagem com acetona foram obtidas quatro novas frações, como descrito no Fluxograma 3:



Fluxograma 3. Fracionamento da fração ZAFD 8 – 9 por SPE

As frações foram ensaiadas frente a catepsina L nas mesmas condições que os extratos brutos; a fração SPE 1 apresentou inibição de 100%; estas frações também foram avaliadas pelas técnicas analíticas CLAE-DAD, CCD e RMN, como mostrado na Figura 11; foi constatada a presença de alcalóides e cumarinas.

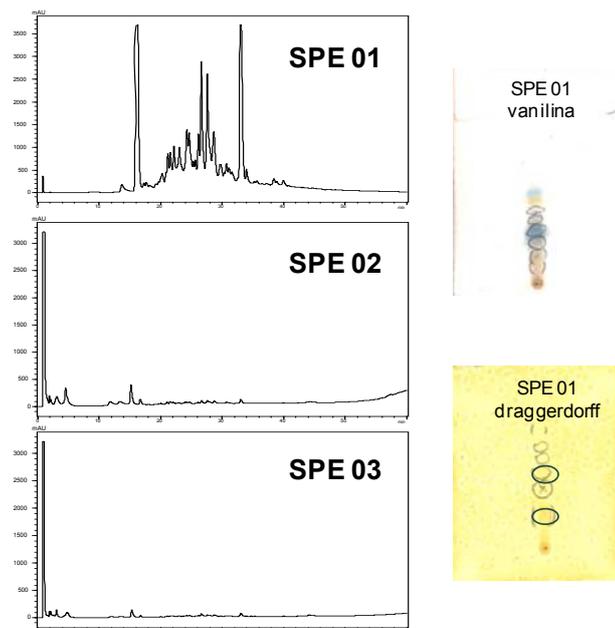


Figura 11. Cromatogramas e análises por CCD das frações obtidas de ZAFD 5-8

A fração SPE 1 foi submetida à eluição gradiente em fase reversa em coluna (C_{18}) ($\varnothing \times h = 18,0 \times 4,0$ cm) com MeOH/H₂O e gradiente 40% a 75% (taxa gradiente de 5%), 80%, 90% e 100% de metanol, seguida de DCM 100%, obtendo-se 12 novas frações.

Destas frações foram isoladas as seguintes substâncias:

- Da fração 1 foi identificada cumarina umbeliferona (7-hidroxycumarina), codificada como substância **2**.
- Da fração 2 foi identificada cumarina de coloração marrom, a qual foi isolada e purificada a partir de CLAE preparativo; esta substância foi codificada como substância **3**.
- As frações 3 e 4 foram combinadas e desta combinação foram extruídos dois alcalóides cantinónicos, codificados respectivamente como substância **7** e **8**, além de um alcalóide β -carbonílico, codificado como substância **9**, todos isolados por cromatografia em camada delgada preparativa.
- A fração 5 apresentou uma mancha azulada bem intensa quando revelada em solução de vanilina. Posterior separação por CCDP levou ao isolamento de duas cumarinas com substituinte *O*-geranila, codificadas respectivamente como substâncias **5** e **6**.

- Da fração 8 foi isolada, pela técnica analítica CCDP, uma cumarina de coloração amarelada, codificada como substância 4.

3.7.3 Isolamento e purificação da cumarina da fração SPE_1_ZAFD_2

Foi realizado perfil cromatográfico em fase reversa e eluição gradiente acetoneitrila/água, como mostrado na Figura 12. Seqüencialmente, foi realizada análise em eluição isocrática utilizando-se fase móvel acetoneitrila/água (7:3), como mostrado na Figura 13, com posterior escalonamento para escala semi-preparativa levando ao isolamento da cumarina codificada como substância 3.

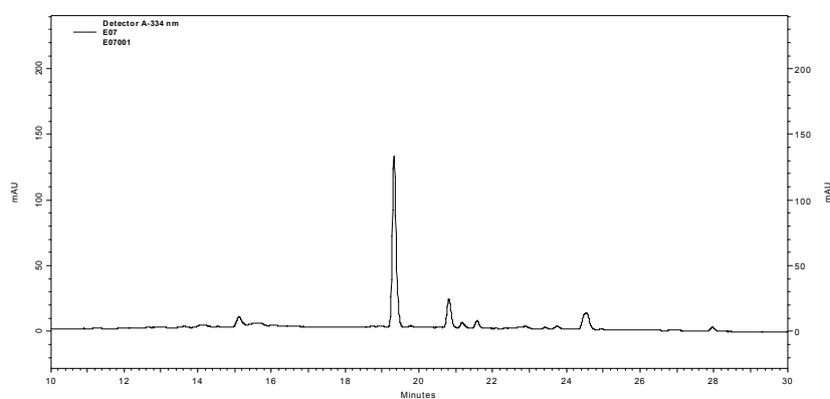


Figura 12. Cromatograma com eluição gradiente da fração SPE_1_ZAFD_2. Condições cromatográficas: gradiente linear de 5% a 100% de ACN (solvente B) em 60 minutos; vazão 1mL/min; $\lambda = 334$ nm com detecção em DAD; $V_{inj}=20$ μ L; [] = 0,2 mg/mL

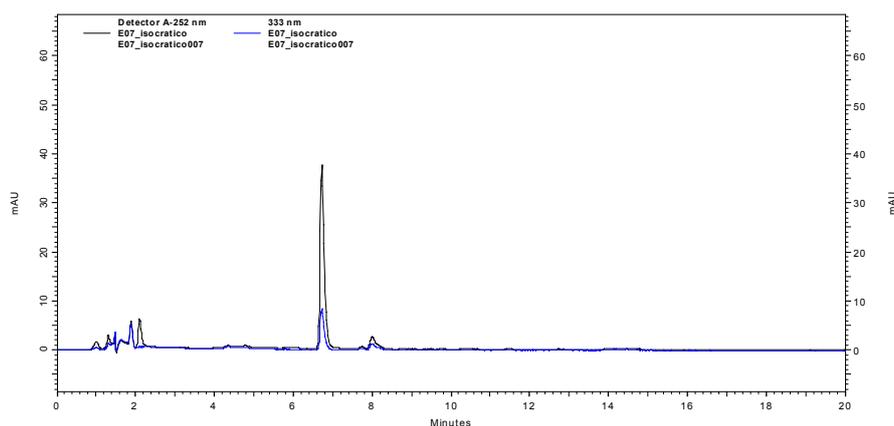


Figura 13. Cromatograma com eluição isocrático da fração SPE_1_ZAFD_2. Condições cromatográficas: gradiente linear de 5% a 100% de ACN (solvente B) em 60 minutos; vazão 1mL/min; $\lambda = 334$ nm com detecção em DAD; $V_{inj}=20$ μ L; [] = 0,2 mg/mL

3.8 Metodologia dos ensaios enzimáticos

3.8.1 Metodologia e condições gerais dos ensaios cinéticos em placa de Elisa

A determinação da atividade enzimática é baseada na hidrólise do substrato ZFR-MCA monitorada diretamente pelo aumento de fluorescência em função do tempo de reação. Este experimento foi realizado em placa de Elisa com volume final de 200 μL , temperatura 27^oC, comprimento de onda de excitação (λ_{ex}) 380 nm e emissão (λ_{em}) 460 nm. Para os ensaios foram utilizadas as catepsinas L e V e condições experimentais como descrito na Tabela 5:

Tabela 5. Condições experimentais utilizadas para as catepsinas.

Tampão	Acetato de sódio 100 mM, 5 mM EDTA	
	Catepsina L	Catepsina V
pH	5,5	5,5
[DTT] mM	2,5	2,5
[enzima] nM	~ 2,8	~ 2,8
[ZFR-MCA] μm	10,0	10,0

A concentração de enzima foi utilizada de modo que a hidrólise do substrato não fosse superior a 5% nos 300 primeiros segundos do experimento; os valores de fluorescência obtidos foram convertidos para $\mu\text{M}/\text{min}$ usando-se curva de calibração determinada através da hidrólise total do peptídeo ZFR-MCA.

As enzimas são pré-ativadas com DTT (2,5 mM) por 5 minutos, posteriormente pré-incubadas por 5 minutos, com os possíveis inibidores dissolvidos em DMSO. O controle negativo é realizado na presença de DMSO, enquanto que o controle positivo é feito em presença do inibidor E-64. A determinação da atividade enzimática foi realizada através do monitoramento contínuo e direto da hidrólise do substrato fluorogênico (ZFR-MCA) por 300 segundos (5 minutos).

A metodologia geral utilizada no ensaio está esquematizada na Figura 1.

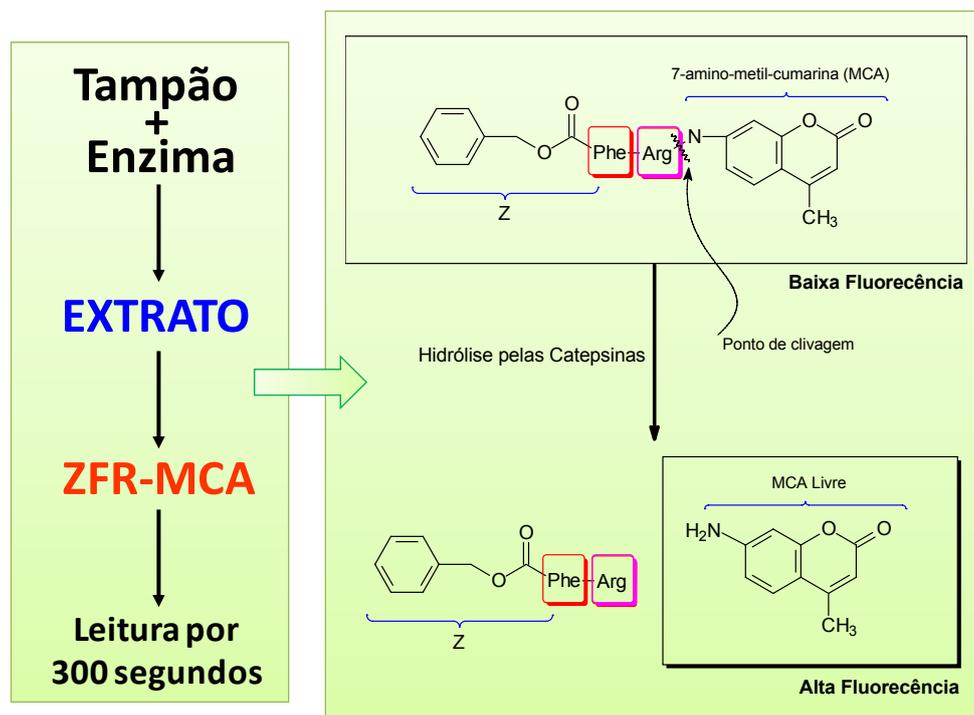


Figura 14. Esquema geral dos ensaios enzimáticos com substrato fluorogênico.

3.8.2 Triagem de inibidores frente a catepsina L e V

A triagem bioquímica com os compostos puros foi realizada em uma dupla triplicata em concentração única de 25 μM . O percentual de inibição foi determinado a partir da atividade enzimática em situações de ausência e presença de inibidor, conforme a equação,

$$\% \text{ Inibição} = 100 \times \left(1 - \frac{V_i}{V_0} \right)$$

onde V_i é a velocidade obtida na presença de inibidor e V_0 , a velocidade obtida na ausência de inibidor.

Os compostos que apresentaram inibição significativa, estimada para valores igual ou superior a 50% frente a catepsina L e V, foram selecionados para a determinação dos valores de IC_{50} . Os processos de triagem representam um importante meio na identificação de candidatos a inibidor, bem como ferramenta útil para a determinação da faixa de potência em que se encontra o inibidor.

3.8.3 Determinação da potência dos inibidores (IC_{50})

A determinação da potência dos inibidores (IC_{50}) é definida como a concentração de inibidor que provoca queda de 50% na atividade da enzima. Este valor é uma convenção utilizada com o objetivo de comparação de valores de potência entre inibidores.

A determinação dos valores da potência foi realizada de maneira direta empregando-se o ensaio cinético apresentado com a utilização de substrato fluorogênico. Os percentuais de inibição foram obtidos em diferentes concentrações de inibidor (6 a 9 concentrações, em dupla triplicata). Nesta determinação foi explorada uma faixa de inibição entre 15 e 90%, com obtenção de uma curva concentração versus resposta. Os dados cinéticos foram obtidos e tratados para a determinação dos valores de IC_{50} , a partir do método de regressão não linear de melhor ajuste empregando o programa Sigmaplot 9.0. Uma curva típica de cinética empregada na análise por regressão linear é apresentada na Figura 15:

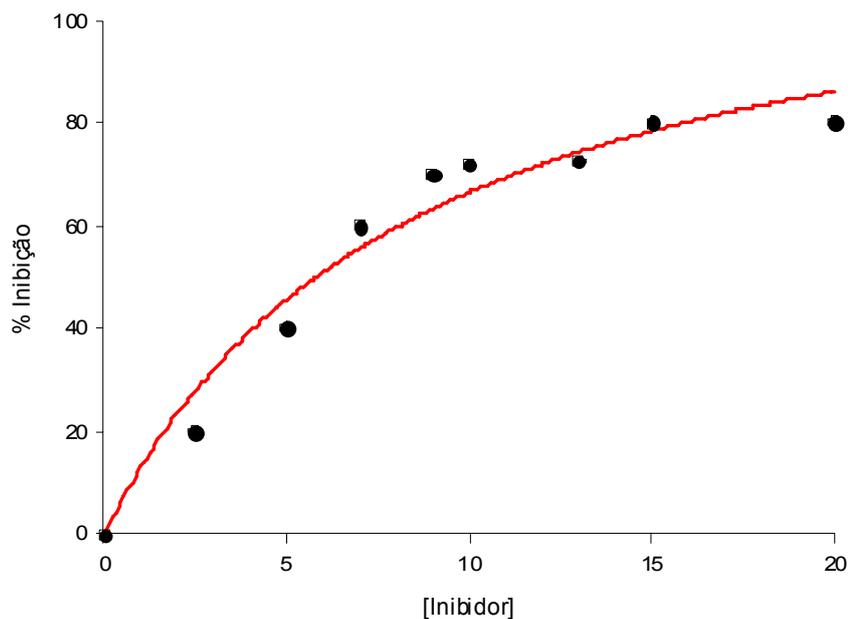


Figura 15. Gráfico ilustrativo de determinação dos valores de potência (IC_{50}).

3.8.4 Determinação da seletividade (S)

A seletividade dos inibidores avaliados neste trabalho foi estabelecida a partir dos dados obtidos com os experimentos de potência. A seletividade enzimática é obtida a partir da razão entre os valores de IC₅₀ de acordo com a equação,

$$S = \frac{IC_{50}(\text{catepsina L})}{IC_{50}(\text{catepsina V})}$$

onde valores iguais à unidade indicam a inexistência de seletividade, valores maiores que 1 indicam seletividade frente a catepsina V e, valores menores que 1, seletividade frente a catepsina L.

3.8.5 Determinação do Mecanismo de Ação

A determinação do mecanismo de inibição dos compostos selecionados frente ao substrato Z-FR-MCA foi obtida a partir de dados experimentais coletados e avaliados pelo método de Lineweaver-Burk. A metodologia experimental consiste em medir a velocidade de reação em 5 concentrações de substratos, na ausência e na presença de quatro diferentes concentrações de inibidor. As concentrações dos inibidores utilizados foram 0,5, 1,0, 3,0, 5,0, 7,0 e 9,0 µM, baseadas nos valores de IC₅₀ obtidos nos experimentos de potência. As concentrações do substrato empregadas foram de 0,8, 1,6, 3,2, 6,4, 9,6, 12,8 e 19 µM para a catepsina L e 3,2, 6,4, 9,6, 12,8, 19 e 39 µM para a catepsina V; estas concentrações foram escolhidas de acordo com valor de K_m para a catepsina L (3,1 µM) e catepsina V (6,2 µM).

Os dados obtidos foram tratados e graficados em gráficos de duplo-recíproco, nos quais tem-se o inverso da velocidade da reação (1/v₀ para o eixo y) em função do inverso da concentração de substrato (1/[S] para o eixo x). Por fim, o mecanismo pelo qual os inibidores atuam é determinado a partir do padrão de intersecção das curvas no plano das coordenadas cartesianas.

3.8.6 Modelagem Molecular dos inibidores frente a catepsina L e V

Esta parte do trabalho foi realizada em colaboração com Prof. Dr Rafael V.C. Guido, Instituto de Física de São Carlos – IFSC USP. Para a realização dos estudos de modelagem foi utilizado o programa de dosagem molecular Flex, no qual inspeção visual foi obtida pelo programa Pymol.



Resultados e

Discussões

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Na busca por inibidores seletivos de cisteíno peptidases foi selecionada a catepsina L, uma vez que os compostos avaliados pelo grupo apresentaram relevante inibição frente a essa enzima. Um fato muito relevante foi a escassez de estudos visando o encontro de inibidores específicos para a catepsina L, principalmente estudos com produtos naturais envolvendo a triagem com extratos.

A importância do estudo desta classe de enzimas está baseada nos processos patológicos nos quais elas estão envolvidas e à dificuldade de se encontrar inibidores seletivos, visto que há similaridade estrutural entre as catepsinas.

As cisteíno peptidases lisossomais representam um alvo de grande interesse para a indústria farmacêutica, pois estão diretamente associadas a inúmeras doenças atuais (SOMOZA *et al*, 2000; LECAILE *et al*, 2002). Um dos grandes desafios é a descoberta de substâncias que possam atuar como inibidor de alta potência bem como apresentem alta seletividade.

Os vegetais são fontes de substâncias com grande variedade estrutural e representam um alvo com alto potencial farmacológico; assim, as plantas apresentam-se como fonte promissora de diversidade molecular na busca de inibidores enzimáticos.

Para o estudo de plantas foi selecionado o gênero *Zanthoxylum*, para o qual foi empregada metodologia desenvolvida e adaptada para placa de Elisa (SEVERINO, 2008), de modo a `biodirecionar` o estudo químico e assim realizar apenas o estudo de extratos que representam entidades químicas com maiores potenciais inibidores enzimáticos das catepsinas.

Ainda de interesse são os extratos que apresentam seletividade frente a catepsina L. Para tal, uma metodologia abordando o acoplamento dos ensaios enzimáticos fluorogênicos com o monitoramento do perfil químico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD) foi adotada, a fim de selecionar os extratos/frações e proceder ao isolamento e purificação dos metabólitos secundários.

A importância do uso de um ensaio na abordagem empregada baseia-se no fato de que o mesmo pode proporcionar uma forma rápida, econômica e

ambientalmente viável para o isolamento apenas dos metabolitos de interesse, pois a descoberta de novas entidades químicas que venham a servir como protótipos para fármacos é um caminho longo que desprende altos investimentos financeiros.

4.1 Atividade enzimática

4.1.1 Biomotoramento dos extratos de *Zanthoxylum*

Os extratos de *Zanthoxylum* foram avaliados quanto à potência como inibidores da catepsina L. Os ensaios enzimáticos foram realizados em fluorímetro de placa de 96 poços ajustado para comprimento de onda de excitação (λ_{ex}) 380 nm e emissão (λ_{em}) 460 nm, com monitoramento direto da hidrólise do substrato Z-FR-MCA através do aumento de fluorescência em função do tempo de reação.

Os ensaios foram realizados com controle da atividade catalítica da enzima no início e final de cada leitura, conforme apresentado na Figura 16, a fim de monitorar a atividade da enzima durante todo o tempo de leitura na placa. Os ensaios foram realizados em triplicata e, para fins estatísticos, um dos pontos foi descartado.

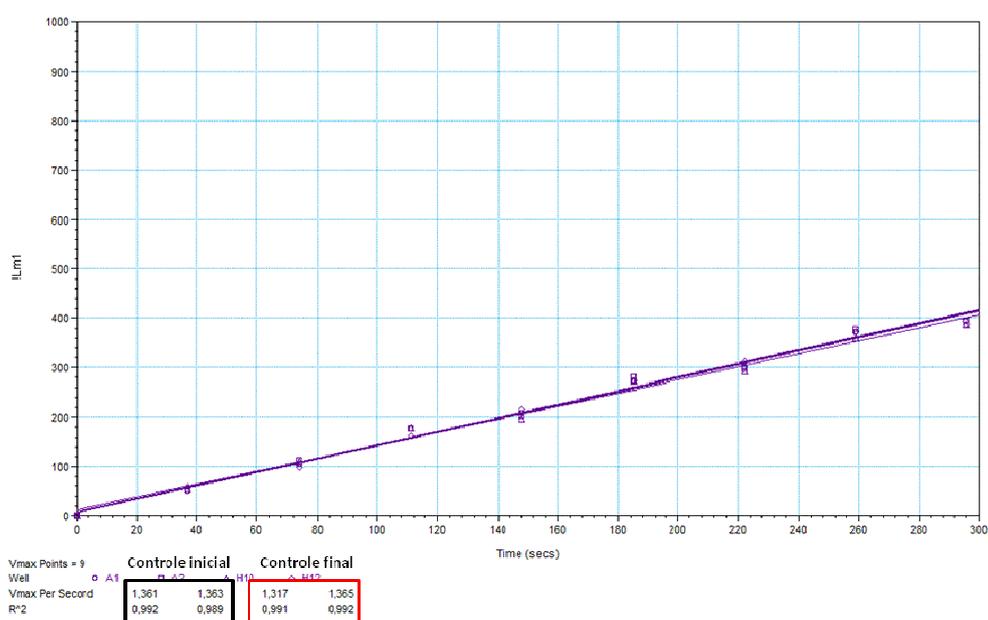


Figura 16. Controle da Atividade Catalítica da Catepsina L.

Para a realização dos ensaios com extratos frente a catepsina L foi utilizada solução estoque de concentração 10 mg/mL em dimetilsulfóxido. Os melhores extratos, selecionados em função da solubilidade apresentada frente ao solvente utilizado para o ensaio enzimático, foram os diclorometânicos e metanólicos.

Baseando-se no volume final do ensaio (200 μ L/ poço), foi verificado que ao adicionar o volume de extrato (5 μ L por poço) foi obtida massa de 250 μ g de

extrato/poço. Todas as soluções estoques foram testadas frente a catepsina L e as respectivas porcentagens de inibição estão apresentadas na Tabela 6:

Tabela 6. Valores de inibição dos extratos de *Zanthoxylum* (250 µg) frente a catepsina L.

EXTRATO	ATIVIDADE ENZIMÁTICA (%)	INIBIÇÃO (%)
ZFD	4	96
ZFM	51	49
ZGM	87	13
ZRFD	55	45
ZRFM	86	14
ZArFD	55	45
ZArFM	49	51
ZPFD	22	78
ZPFM	47	53
ZPGD	20	80
ZPGM	91	9
ZMFD	22	78
ZMFM	43	57
ZMGD	9	91
ZMGM	75	25
ZAcFD	0	100
ZAcFM	0	100
ZAcGM	65	35
ZAcCM	46	54

Assim, foram selecionados para trabalho os extratos alvos que apresentaram inibição enzimática igual ou superior a 70% e, a partir deste resultado, foram feitas oito diluições destas soluções estoques, totalizando nove diferentes concentrações, a fim de encontrar uma relação entre concentração do extrato e poder de inibição.

Uma vez que a solução estoque apresenta o equivalente a 250 µg de extrato/poço, a escolha das concentrações foi baseada no volume final do poço, como descrito na Tabela 7:

Tabela 7. Concentrações das diluições a partir da solução estoque dos extratos de ZAFD

Concentrações (mg mL ⁻¹)	Massa de extrato por poço (µg)
4	100
2	50
1	25
4X10 ⁻¹	10
2 X10 ⁻²	0,5
4 X10 ⁻³	0,1
4 X10 ⁻⁴	0,01
4 X10 ⁻⁵	0,001

As soluções diluídas foram ensaiadas nas mesmas condições que a solução estoque e suas respectivas porcentagens de atividade e inibição encontram-se descritas na Tabela 8:

Tabela 8. Valores de inibição das diluições dos extratos de *Zanthoxylum* frente a catepsina L (250; 100; 50; 25; 10; 0,5; 0,1; 0,01; 0,001 µg / poço)

EXTRATO	ATIVIDADE	INIBIÇÃO
CONTROLE	100	0
ZFD 1	16	84
ZFD 2	42	58
ZFD 3	91	9
ZFD 4	100	0
ZFD 5	100	0
ZFD 6	100	0
ZFD 7	100	0
ZFD 8	100	0
ZFD 9	100	0
CONTROLE	100	0
ZPFD 1	33	67
ZPFD 2	66	34
ZPFD 3	100	0
ZPFD 4	100	0
ZPFD 5	100	0
ZPFD 6	100	0
ZPFD 7	100	0
ZPFD 8	100	0
ZPFD 9	100	0
CONTROLE	100	0
ZPGD 1	13	87
ZPGD 2	46	54

ZPGD 3	100	0
ZPGD 4	100	0
ZPGD 5	100	0
ZPGD 6	100	0
ZPGD 7	100	0
ZPGD 8	100	0
ZPGD 9	100	0
CONTROLE	100	0
ZMFD 1	26	74
ZMFD 2	46	54
ZMFD 3	80	20
ZMFD 4	100	0
ZMFD 5	100	0
ZMFD 6	100	0
ZMFD 7	100	0
ZMFD 8	100	0
ZMFD 9	100	0
CONTROLE	100	0
ZMGD 1	18	82
ZMGD 2	47	53
ZMGD 3	100	0
ZMGD 4	100	0
ZMGD 5	100	0
ZMGD 6	100	0
ZMGD 7	100	0
ZMGD 8	100	0
ZMGD 9	100	0
CONTROLE	100	0
ZAcFD 1	0	100
ZAcFD 2	23	77
ZAcFD 3	44	56
ZAcFD 4	72	28
ZAcFD 5	93	7
ZAcFD 6	100	0
ZAcFD 7	100	0
ZAcFD 8	100	0
ZAcFD 9	100	0
CONTROLE	100	0
ZAcFM 1	8	92
ZAcFM 2	45	55
ZAcFM 3	65	35
ZAcFM 4	93	17
ZAcFM 5	95	5
ZAcFM 6	100	0
ZAcFM 7	100	0
ZAcFM 8	100	0
ZAcFM 9	100	0

O experimento de verificação de dose *versus* resposta demonstrou que os extratos da espécie de *Z. acuminatum* eram os únicos que apresentavam inibição significativa frente a catepsina L após diminuição da concentração.

Os extratos que apresentaram inibição acima de 70% foram ensaiados em triplicata, em dias alternados, a fim de verificar a eficiência da metodologia empregada. Os ensaios demonstraram comportamento muito similar frente a catepsina L; os valores de atividade e inibição apresentaram boa precisão e encontram-se descritos na Tabela 9:

Tabela 9. Valores de inibição frente a catepsina L para diferentes ensaios

EXTRATO	ENSAIO 1	ENSAIO 2	ENSAIO 3	DESVIO PADRÃO
	Inibição (%)	Inibição (%)	Inibição (%)	
ZFD 1 (250 µg)	96	84	99	7,9
ZFD 2 (100 µg)	43	58	51	7,5
ZFD 3 (50 µg)	17	9	6	5,7
ZPFD 1 (250 µg)	78	67	66	6,6
ZPFD 2 (100 µg)	36	34	51	9,3
ZPFD 3 (50 µg)	2	0	3	1,5
ZPGD 1 (250 µg)	80	87	82	3,6
ZPGD 2 (100 µg)	50	54	52	2,0
ZPGD 3 (50 µg)	7	0	1	3,8
ZMFD 1 (250 µg)	78	74	72	3,0
ZMFD 2 (100 µg)	58	54	49	4,5
ZMFD 3 (50 µg)	26	20	24	3,0
ZMGD 1 (250 µg)	91	82	94	6,2
ZMGD 2 (100 µg)	65	53	79	13
ZMGD 3 (50 µg)	0	0	0	0,0
ZAcFD 1 (250 µg)	100	100	89	6,3
ZAcFD 2 (100 µg)	57	57	70	7,5
ZAcFD 3 (50 µg)	39	40	43	2,0
ZAcFD 4 (0,1 µg)	21	28	26	3,6
ZAcFD 5 (0,01 µg)	0	0	2	1,1
ZAcFM 1 (250 µg)	100	92	100	4,6
ZAcFM 2 (100 µg)	62	55	52	5,1
ZAcFM 3 (50 µg)	32	30	37	3,6
ZAcFM 4 (0,1 µg)	14	17	13	2,0
ZAcFM 5 (0,01 µg)	3	6	6	1,7

Os valores obtidos com os extratos para os diferentes ensaios demonstraram reprodutibilidade confiável, como apresentado no gráfico apresentado na Figura 17:

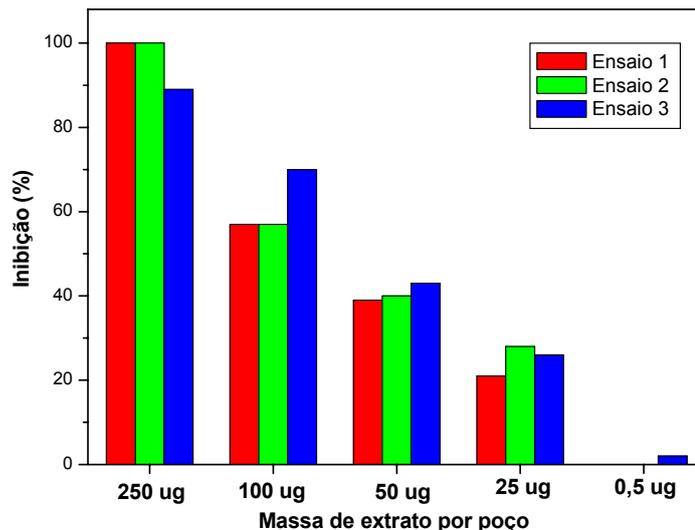


Figura 17. Gráfico de comparação para diferentes ensaios do extrato CH_2Cl_2 de folhas de *Z. acuminatum*

Dentre as espécies estudadas, os extratos de folhas em CH_2Cl_2 e CH_3OH da espécie *Z. acuminatum* apresentaram as maiores porcentagens de inibição a uma concentração, bem como para as diluições e, portanto, foram selecionados para estudo da busca de inibidores.

O extrato ZAFD foi submetido à separação cromatográfica em fase estacionária normal e utilizando fase móvel em ordem crescente de polaridade, originando novas 15 frações. Estas frações foram ensaiadas frente a catepsina L, nas mesmas condições do extrato bruto; foi verificado que as frações ZAFD_05 até ZAFD_08 apresentaram inibição em uma faixa entre 70 a 85%.

As frações de ZAFD_05 a ZAFD_08 foram reunidas e submetidas à coluna de C_{18} fazendo o uso de bomba de vácuo em uma metodologia em extração em fase sólida (SPE), a fim de reter a clorofila e eluir os constituintes de interesse; foram obtidas quatro novas frações, as quais foram ensaiadas nas mesmas condições frente a catepsina L. Os resultados destes ensaios encontram-se descritos na

Auto-referência de indicador não válida.:

Tabela 10. Valores de inibição para as frações de ZAFD (250 μg)

Fração do Extrato	Inibição (%)
SPE_ZAFD_01	100
SPE_ZAFD_02	0
SPE_ZAFD_03	0
SPE_ZAFD_04	0

Em decorrência da alta inibição constatada para fração SPE_ZAFD_01, esta foi submetida a diferentes metodologias cromatográficas visando o isolamento de metabólitos com possível ação inibidora da catepsina L. Da fração SPE_ZAFD_01 foram isolados compostos tais como triterpeno, três cumarinas; pirano e furano cumarina, duas cumarinas 7-geraniladas, dois alcalóides cantinônicos, um alcalóide β - carbolínico e um alcalóide acridônico.

4.2 Perfil cromatográfico dos extratos brutos/frações

O perfil cromatográfico obtido é representativo da diversidade química das espécies estudadas e permite caracterizar as atribuições fundamentais de “integridade”, “semelhança” e “diferenças” encontradas nos extratos analisados (BELTRAME, 2005).

Os extratos que apresentaram inibição da atividade catalítica acima de 50% frente a catepsina L foi traçado um perfil cromatográfico em CLAE-DAD, sendo *Zanthoxylum sp* (folhas CH_2Cl_2); *Zanthoxylum poliano* (folhas e galhos CH_2Cl_2); *Zanthoxylum minutiflorum* (folhas e galhos CH_2Cl_2) e *Zanthoxylum acuminatum* (folhas CH_2Cl_2 e CH_3OH).

Inicialmente, testaram-se as solubilidades dos extratos selecionados, sendo preparada para análise uma solução contendo 10 mg de extrato, solubilizadas em 1 mL de solvente. Todas as amostras foram filtradas em filtro *Millipore*[®] de 0,5 μm .

Para avaliação das características de composição química dos extratos das espécies estudadas foi utilizado análise cromatográfica em coluna C_{18} Hypersil[®], com gradiente de eluição e detector de fotiodo na região entre 200 e 900 nanômetros.

O procedimento cromatográfico com eluição gradiente exploratória foi baseado no método desenvolvido por SNYDER e DOLAN, no qual utiliza-se fase reversa e eluição de mistura de H_2O (solvente A) e solvente orgânico (solvente B; acetonitrila ou metanol) como constituintes da fase móvel.

Neste procedimento varia-se a concentração de B em um intervalo de tempo de 60 minutos, sob vazão constante de 2,0 mL/min. A variação da razão de solvente por minuto ($\Delta\% \text{ B/min.}$) é determinada de acordo com a equação,

$$\%B/\text{min.} = \frac{\Delta\%B}{t_g} = \frac{95}{60} = 1,58\% \text{ B/min}$$

onde % B / min = variação do solvente B por tempo (inclinação do gradiente); $\Delta\%B$ = diferença entre a % final de B e a % inicial e t_g = tempo de gradiente.

SNYDER e DOLAN relatam que o desenvolvimento de um método analítico por CLAE em fase reversa é melhor iniciado e, se possível, finalizado, utilizando-se acetonitrila como solvente B, a mistura de H₂O/ACN como fase móvel apresenta menor viscosidade, ocorre absorção em comprimentos de onda inferiores a 210 nm e há melhor poder de decisão na escolha entre condição gradiente ou isocrática mais apropriada para a análise da amostra

Neste trabalho, o perfil cromatográfico foi utilizado como forma de direcionar e monitorar o extrato estudado, monitorando os compostos de interesse, possíveis inibidores da catepsina L, a partir das bandas cromatográficas verificadas na eluição gradiente utilizada.

Nas Figura 18 e Figura 19 são apresentados o perfis cromatográficos do extrato diclorometânico e metanólico de *Z. acuminatum*, respectivamente. Nos cromatogramas é possível observar que existe uma banda com alta intensidade com tempo de retenção em torno de 32 minutos.

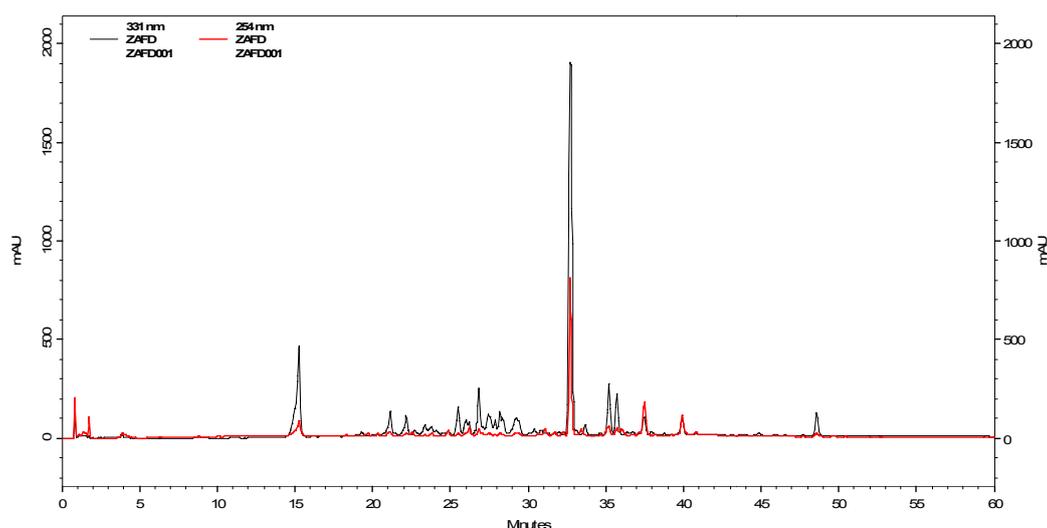


Figura 18. Cromatograma em eluição gradiente do extrato bruto de ZAFD. Condições cromatográficas: Usando gradiente linear de 5% a 100% de ACN (solvente B) em 60 minutos, vazão 1 mL/min. λ DAD, V_{inj} = 20 μ L, [] = 10 mg/mL.

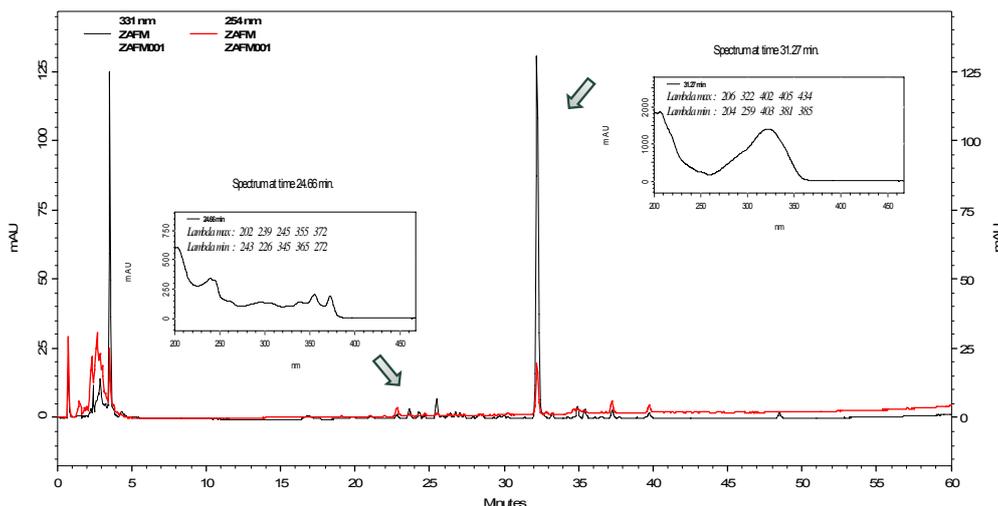


Figura 19. Cromatograma em eluição gradiente do extrato bruto de ZAFM. Condições cromatográficas: Usando gradiente linear de 5% a 100% de ACN (solvente B) em 60 minutos, vazão 1 mL/min. λ DAD, V_{inj} = 20 μ L, [] = 10 mg/mL.

Além das análises cromatográficas CLAE-DAD, foram realizadas análises em cromatografia em camada delgada e RMN de Hidrogênio (400 MHz).

A análise por CCDA, utilizando reagentes específicos e radiação UV, revelou a presença de alcalóides (controle positivo em solução em Draggendorff).

A análise de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio dos extratos brutos indicou a presença de uma substância química majoritária em ambos extratos; de acordo com deslocamentos químicos e multiplicidades (vide Figura 20), pode-se sugerir que esta substância seja uma cumarina:

No espectro de RMN ^1H foram observados sinais em δ = 6,25 ppm (*d*, *J* = 9,5 Hz) e δ = 7,96 ppm (*d*, *J* = 9,5 Hz), atribuídos respectivamente aos hidrogênios olefínicos H-3 e H-4.

O sinal em δ = 7,58 ppm (*d*, *J* = 8,6 Hz) é referente ao H-5; o sinal em δ = 6,91 ppm (*dd*, *J* = 8,6; 2,3 Hz) ao H-6; o sinal em δ = 6,94 (*d*, *J* = 2,3 Hz) é referente ao H-8 do anel aromático. Os demais singletos na região entre δ = 1,0 e 1,7 ppm são referentes à hidrogênios de grupos metílicos: um sinal em δ = 4,61 ppm (*d*, *J* = 6,4 Hz), referente a um hidrogênio oximetilênico e um multipletto entre δ = 5,0 e 5,3 ppm, referente à hidrogênios olefínicos; estes sinais indicaram a presença de um grupo geranila ligado a anel cumarínico.

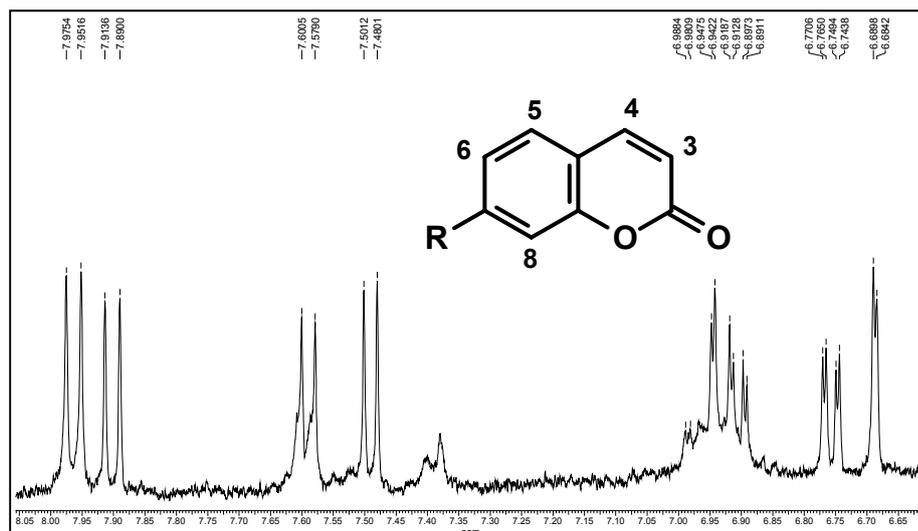


Figura 20. Ampliação do espectro de RMN ^1H do extrato CH_3OH de *Z. acuminatum* (DMSO, 200 MHz).

A análise dos cromatogramas dos extratos brutos mostra três regiões de importância, referentes á bandas com tempo de retenção de 15 e 32 minutos, as quais sugerem a presença de inibidores da catepsina L.

Após procedimento de purificação, estas substâncias foram novamente injetadas e pôde-se então inferir que a substância com tempo de retenção em torno de 15 minutos é referente à cumarina umbeliferona (**2**), enquanto que a substância com tempo de retenção em torno de 32 minutos trata-se da cumarina 7-geranilada (**5**), substância majoritária do extrato, como mostrado na Figura 21:

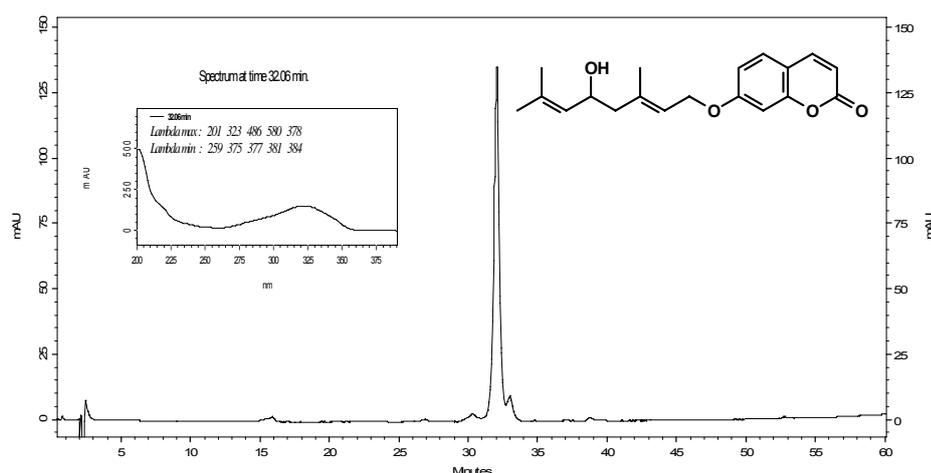


Figura 21. Cromatograma referente a cumarina **5**. Condições cromatográficas: Usando gradiente linear de 5% a 100% de ACN (solvente B) em 60 minutos, vazão 1 mL/min. λ DAD, V_{inj} = 20 μL , $[]$ = 0,01 mg/mL.

Além disso, pôde-se inferir que a banda com tempo retenção 25 minutos refere-se aos seguintes compostos alcalóides cantinônicos: composto 5-metoxicantin-6-ona (**7**), e composto 4,5-dimetoxicantin-6-ona (**8**), como mostrado nas Figuras 22 e 23, e o composto 7-hidróxi-1-etil- β -carbolina (**9**):

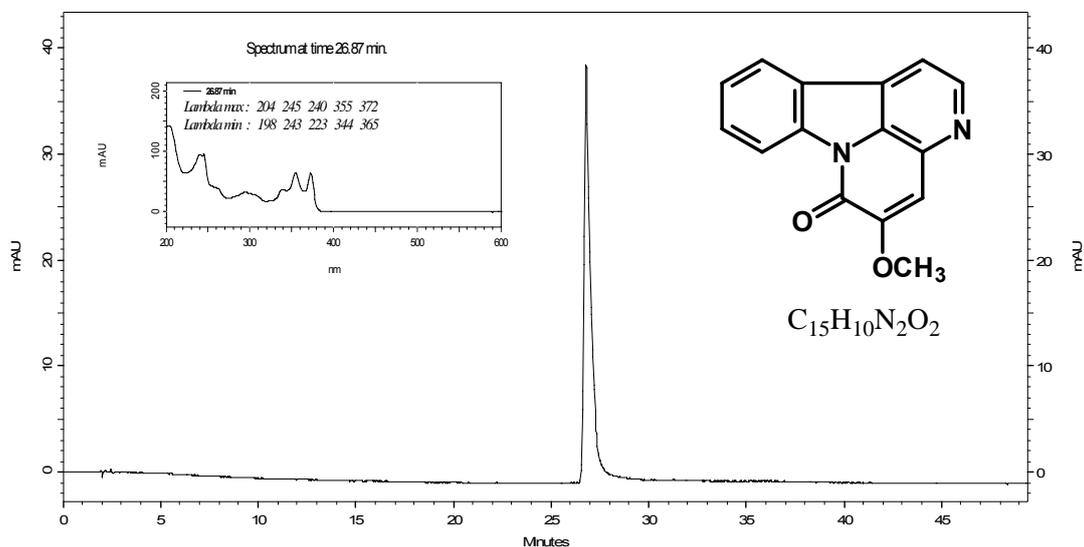


Figura 22. Cromatograma referente ao alcalóide **7**. Condições cromatográficas: Usando gradiente linear de 5% a 100% de ACN (solvente B) em 60 minutos, vazão 1 mL/min. λ DAD, V_{inj} = 20 μ L, [] = 0,01 mg/mL

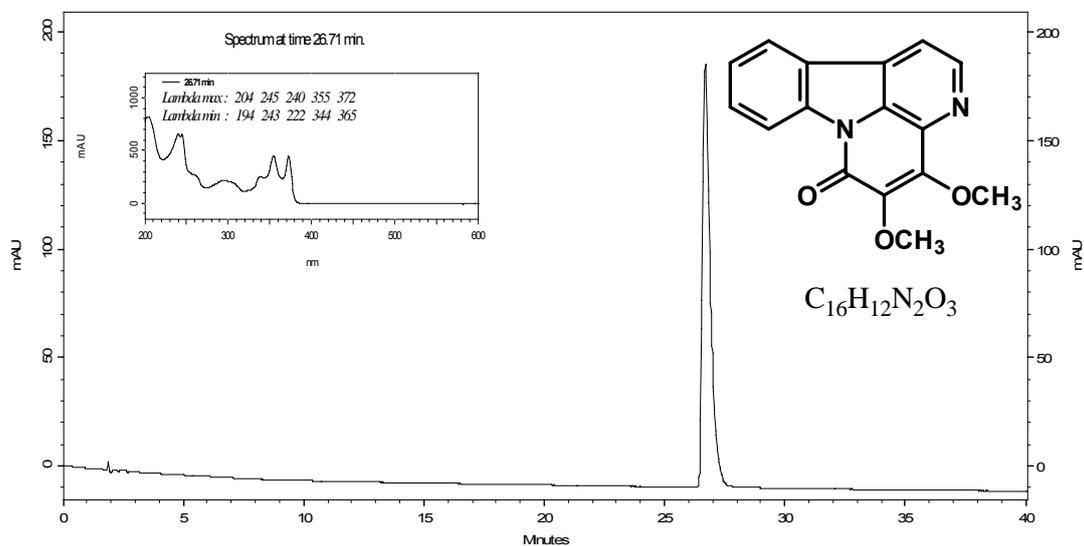
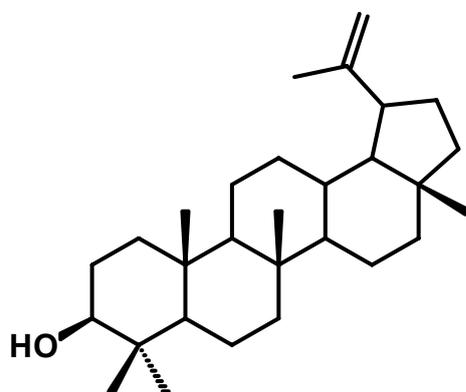


Figura 23. Cromatograma referente ao alcalóide **8**. Condições cromatográficas: Usando gradiente linear de 5% a 100% de ACN (solvente B) em 60 minutos, vazão 1 mL/min. λ DAD, V_{inj} = 20 μ L, [] = 0,01 mg/mL

4.3 Substâncias identificadas

A metodologia cromatográfica levou ao isolamento de um triterpeno; o lupeol (1), as cumarinas; a umbeliferona (2), heradenol (3), nordentatina (4), anisocumarina (5), derivado do 6', 7'-epoxi-7-geraniloxicumarina (6); alcalóides do tipo cantinônicos; 5-metoxicantin-6-ona (7), 4,5-dimetoxicantin-6-ona (8); um alcalóide β -carbonílico; 7-hidroxi-1-etil- β -carbolina (9); e um do tipo acridônico; arborinina (10).

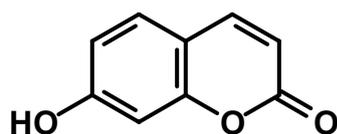
Triterpeno



(1)

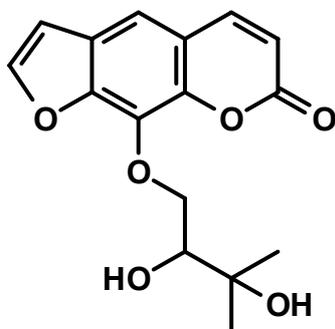
m = 2,9 mg
identificação: p. 57

Cumarinas



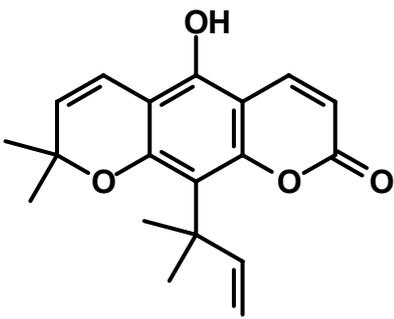
(2)

m = 22 mg
identificação: p. 61



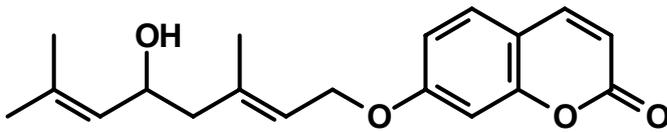
(3)

m = 0,4 mg
identificação: p. 61



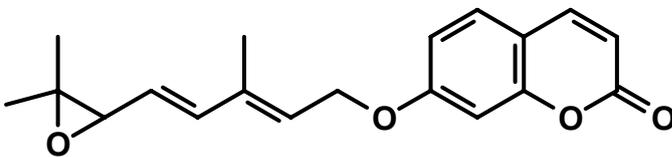
(4)

m = 0,9 mg
identificação: p. 64



(5)

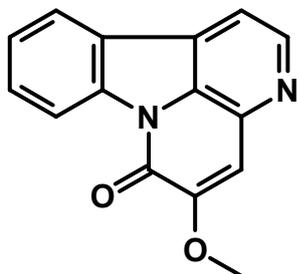
m = 26 mg
identificação: p. 69



(6)

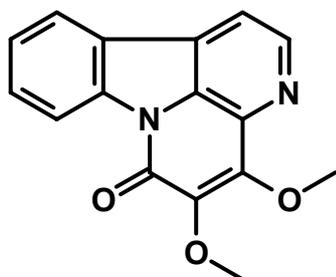
m = 2,1 mg
identificação: p. 75

Alcalóides



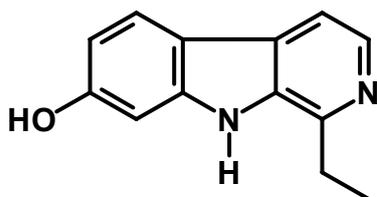
(7)

m = 1,0 mg
identificação: p. 81



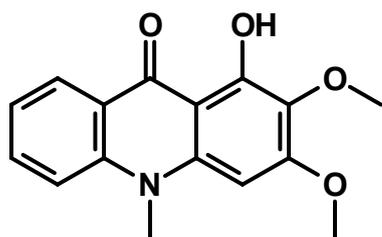
(8)

m = 0,8 mg
identificação: p. 81



(9)

m = 1,6 mg
identificação: p. 84



(10)

m = 2,9 mg
identificação: p. 89

4.4 Determinação estrutural

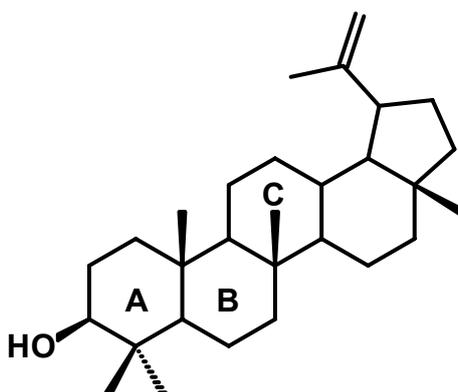
4.4.1 Triterpeno

Os terpenóides formam uma larga e diversa família de produtos naturais derivados da unidade isoprênica C_5 . Dentro da classe dos triterpenos, as diferentes estruturas típicas contêm esqueletos que são representados pela fórmula $(C_5)_n$.

Os triterpenos são compostos que apresentam $(C_5)_6$ igual a C_{30} , ou seja, possuem trinta átomos de carbono em sua estrutura química; são substâncias formadas a partir de duas moléculas de bifosfato de farnesila, as quais fundem-se por adição eletrofílica, levando à formação de hidrocarboneto escaleno; este, por sua vez, sofre ciclização do intermediário 2,3-óxido de escaleno, produzido pela reação catalisada por uma flavoproteína em presença de O_2 e NADPH (DEWICK, 2002).

4.4.1.1 Identificação da substância 1

A substância 1 foi isolada do extrato diclorometânico das folhas de *Z. acuminatum* como um sólido de coloração branca; a identificação deste composto como um triterpeno do grupo lupânico, o lupeol, foi possível graças às técnicas analíticas RMN 1H e CG-EM.



Substância 1

No espectro de RMN ^1H da substância **1**, acima representado na Figura 24, podem ser observados seis singletos na região entre $\delta = 0,77 - 1,05$ ppm, os quais podem ser atribuídos aos hidrogênios metílicos ligados a carbonos terciários. A presença de um singlete em $\delta = 1,69$ ppm correspondente a um grupamento metila ligada a um carbono insaturado. Esses dados, juntamente com os sinais de deslocamento químico em $\delta = 4,58$ ppm (*dd*, $J = 2,4$ e $1,4$ Hz) e em $\delta = 4,70$ ppm (*d*, $J = 2,3$ Hz), atribuídos à átomos de hidrogênio olefínicos, levaram à suposição da natureza do triterpeno como do tipo lupânico.

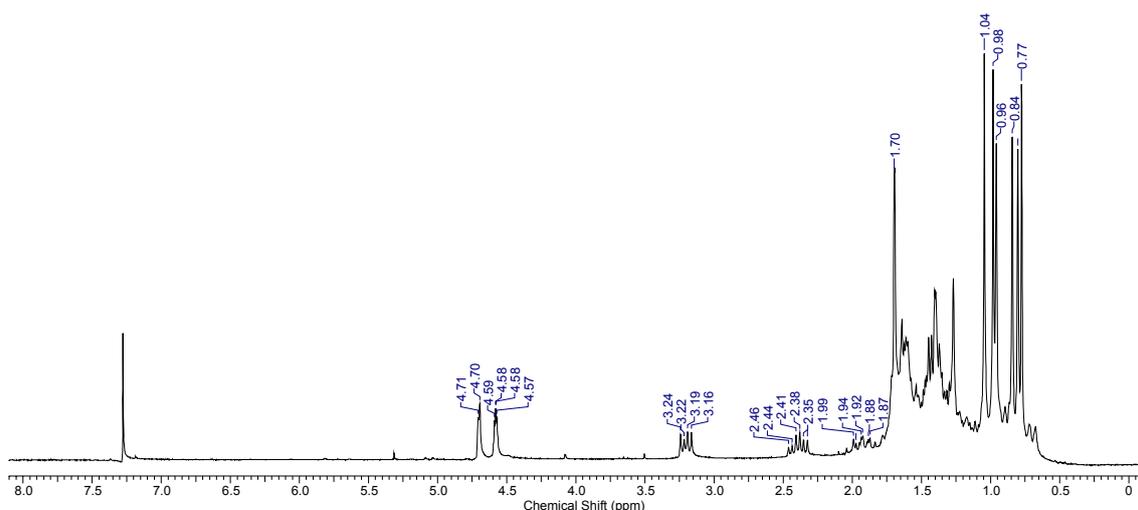


Figura 24. Espectro de RMN de ^1H da substância **1** (200 MHz, CDCl_3)

A presença de um sinal com deslocamento químico em $\delta = 3,20$ ppm (*dd*, $J = 5,1$ e $10,2$ Hz) e atribuído a um hidrogênio carbinólico em C-3 sugere a presença de um grupamento hidroxila disposto em configuração equatorial. Os dados de RMN ^1H sugerem a identidade da substância **1** como triterpeno lupeol e cuja confirmação estrutural foi conseguida através da técnica de espectrometria de massas, Figura 25, com sinal de íon molecular m/z 426 Daltons referente a fórmula estrutural $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$:

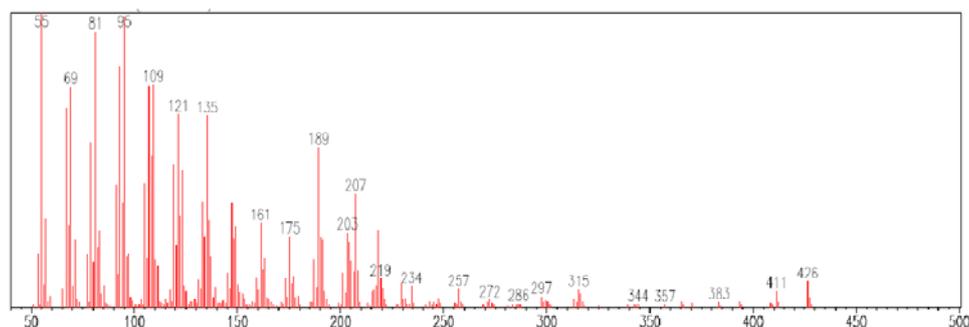


Figura 25. Espectro de CG-EM da substância **1** (IE em 70 eV).

4.4.2 Cumarinas

As cumarinas representam uma classe de metabólitos secundários com ampla distribuição no reino vegetal, com ênfase para as famílias da Umbeliferae/Apiaceae e Rutaceae, as quais apresentam cumarinas com grande diversidade estrutural.

As cumarinas têm origem biossintética a partir do ácido cinâmico, que ao sofrer hidroxilação na posição *orto*, leva a formação do anel lactônico, dando origem a estrutura denominada de cumarina. O ácido 4-cinâmico, por sua vez, leva a formação da umbeliferona.

Além dessas cumarinas, outras estruturas mais complexas são encontradas nas quais carbonos extras são incorporados a partir da unidade isoprênica, um resumo da rota biossintética para as cumarinas esta esquematizada na

Figura 26.

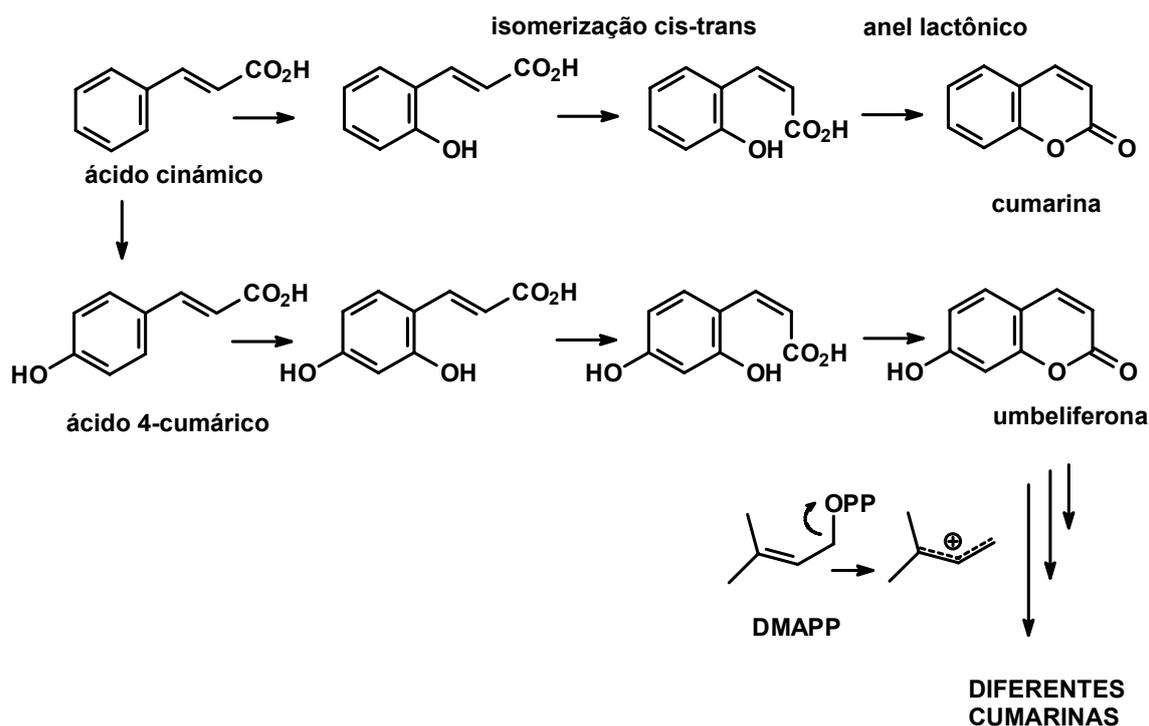


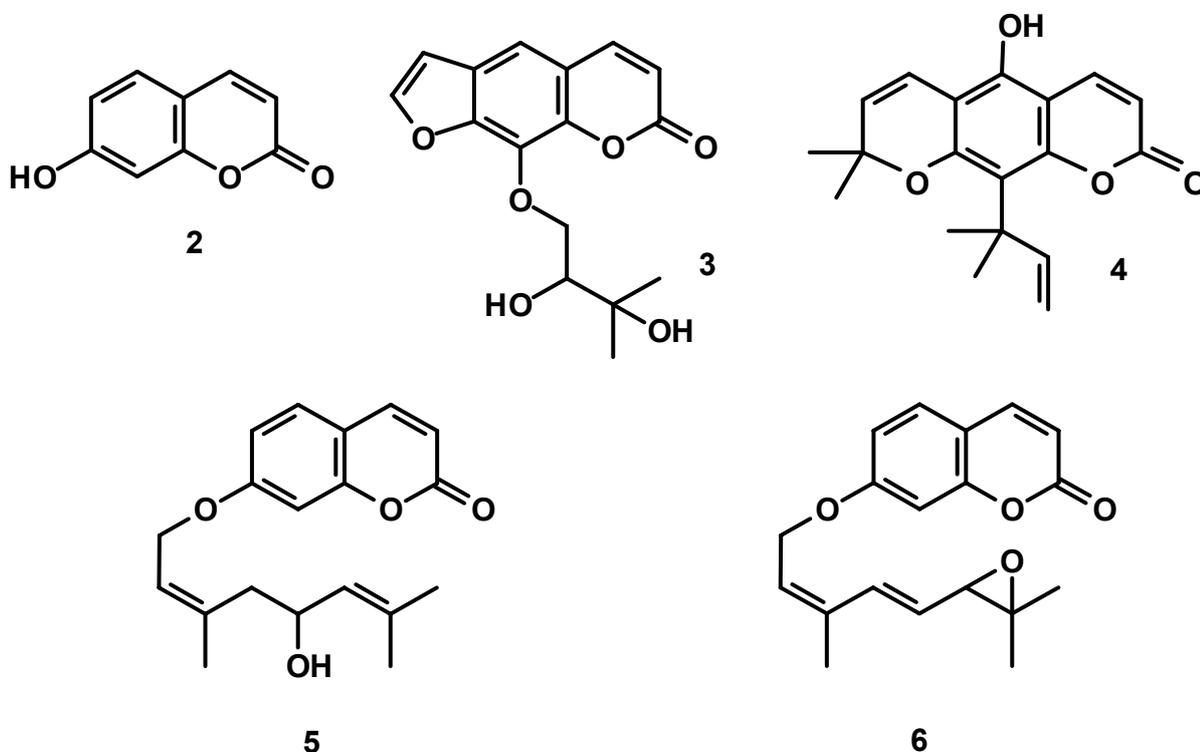
Figura 26. Esquema geral para a rota biossintética das cumarinas

Os espectros de RMN ^1H desta classe de compostos são facilmente identificados pela presença de um sistema AX, referentes a dois dupletos em torno

de $\delta = 6,1 - 6,4$ ppm e $\delta = 7,5 - 8,3$ ppm, característicos de átomos de hidrogênio olefínicos H-3 e H-4 do anel lactônico. (MURRAY, *et al.* 1982).

4.4.2.1 Identificação estrutural das cumarinas 2 – 5

As cumarinas **2** até **6**, cujas estruturas químicas estão apresentadas abaixo, foram isoladas da fração diclorometânica do extrato das folhas de *Z. acuminatum*, identificadas e caracterizadas através de experimentos de RMN de uma e duas dimensões e por espectrometria de massas.



Na análise do resultados dos experimentos de RMN ^1H das substâncias **2** até **6** são observados sinais com deslocamento químico em $\delta = 6,15$ ppm e $\delta = 7,94$ ppm (1H, $J = 10$ Hz), característicos dos átomos de hidrogênio H-3 e H-4 do esqueleto cumarínico.

O espectro de RMN ^1H da cumarina **2**, apresentado na Figura 27, mostra um sinal dubleto com deslocamento químico em $\delta = 7,44$ ppm (1H, $J = 8,5$ Hz), referente ao átomo de hidrogênio H-5 acoplado em posição orto, com grande valor de constante de acoplamento, ao átomo de hidrogênio H-6; um sinal duplo dubleto com

deslocamento químico em $\delta = 6,78$ ppm (1H, $J = 8,5$ e $2,3$ Hz) e referente ao mesmo átomo de hidrogênio H-6 acoplado aos os átomos de hidrogênio H-5 em posição *orto* e H-8 em posição *meta* e um sinal dubleto com deslocamento químico em $\delta = 6,70$ ppm (1H, $J = 2,3$ Hz), atribuído ao átomo de hidrogênio H-8 acoplado com H-6 com pequeno valor de constante de acoplamento:

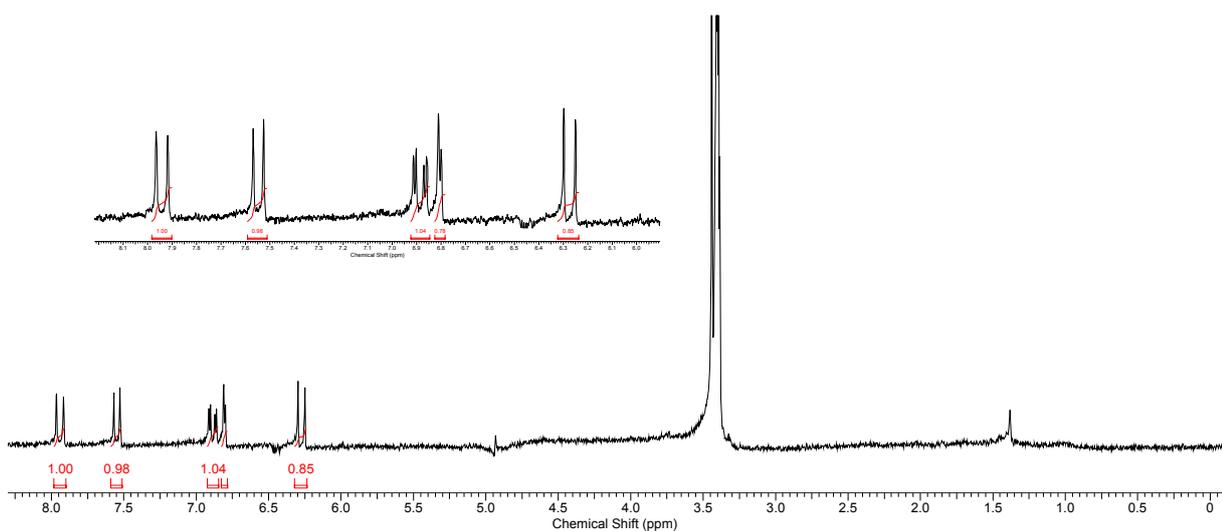


Figura 27. Espectro de RMN de ^1H da cumarina **2** (200 MHz, MEOD)

Estes dados espectroscópicos sugerem a estrutura da cumarina **2** como 7-hidroxicumarina, a qual foi confirmada pelo espectro de massas com sinal do pico $[\text{M}+\text{H}]$ com m/z 163,0470 referente à fórmula molecular $\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_3$; este espectro de massas está apresentado na Figura 28:

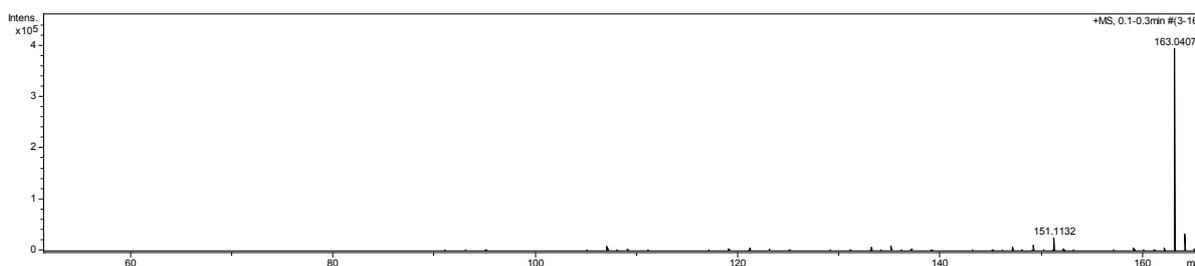


Figura 28. Espectro de massas da cumarina **2** (ESI q-TOF).

A Figura 29 apresenta o espectro de RMN ^1H da cumarina **3**: além dos sinais dos átomos de hidrogênio olefínicos H-3 e H-4 do esqueleto cumarínico, há a

presença de dois sinais dubletos com deslocamento químico em $\delta=7,88$ ppm e $\delta=6,96$ ppm ($J = 2,0$ Hz) referentes aos átomos de hidrogênio de um anel furano.

Segundo MURRAY, duplos dubletos com constantes de acoplamento de 2,0 Hz conferem a uma furanocumarina um anel aromático *orto* com substituinte R em posição *orto* em relação ao átomo de oxigênio do anel furano.

A presença de um sinal singlete largo com deslocamento químico em $\delta=7,57$ ppm, além dos dados de multiplicidade para os átomos de hidrogênio do anel furano e ausência de um acoplamento em W, no caso de um átomo de hidrogênio na posição H-8 (*dd*, $J = 1,0$ Hz), confirmam uma estrutura do tipo furanocumarina substituída em H-8.

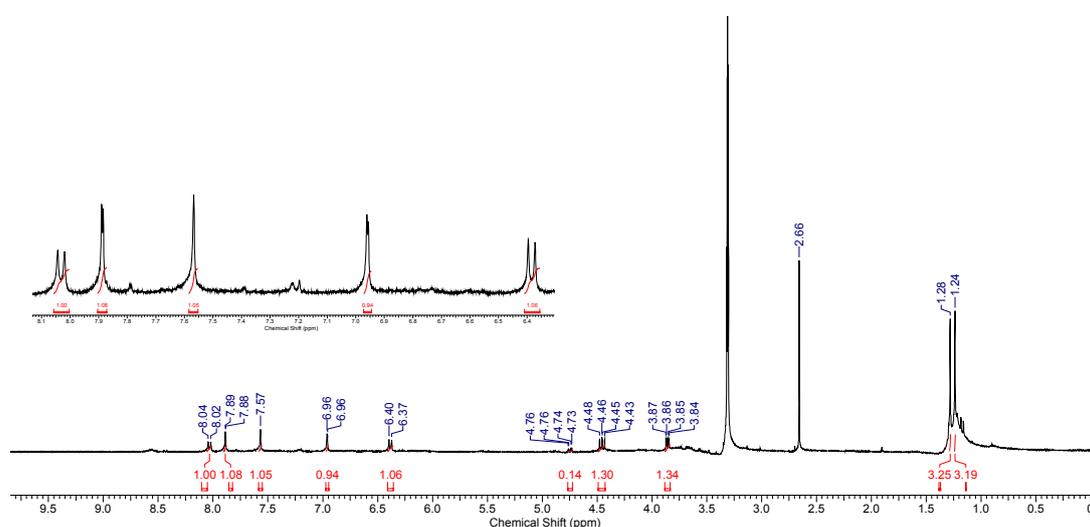


Figura 29. Espectro de RMN de ^1H da substância **3** (400 MHz, CDCl_3)

O substituinte R foi identificado como O-3,3-dimetil-2,3-diidroxipropila; este composto foi caracterizado pela presença de dois sinais singletos com deslocamento químico em $\delta=1,24$ ppm e $\delta=1,28$ ppm, referentes a dois grupos metila, bem como um sistema ABM com deslocamentos químicos em $\delta=4,78$ ppm (*dd*, $J = 2,8$ e 10,0 Hz), $\delta=4,45$ ppm (*dd*, $J = 2,8$ e 10,0 Hz) e $\delta=3,86$ ppm (*dd*, $J = 2,8$ e 8,0 Hz), (Figura 30). A região na qual se encontram estes sinais é mostrada na Figura 30:

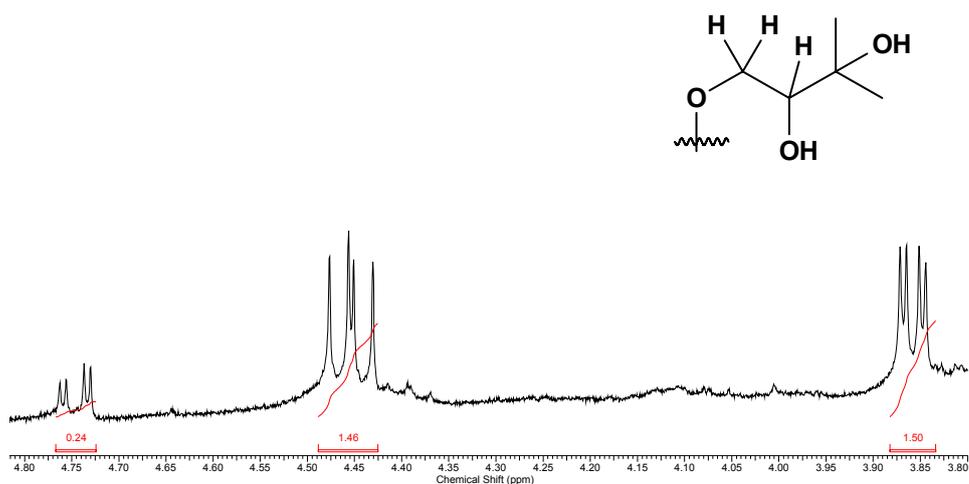


Figura 30. Ampliação do espectro de RMN de ¹H da substância **3** (400 MHz, CDCl₃)

O espectro de massas da cumarina **3** é mostrado na Figura 31; observam-se um pico do íon protonado [M+H] com m/z 305,1015 e um pico do íon com aduto de sódio [M+Na] com m/z 327,0833; estes valores de m/z estão de acordo com a fórmula molecular C₁₆H₁₆O₆ e com dados da literatura, indicando que a estrutura proposta é heradenol (ROCHA, 2004):

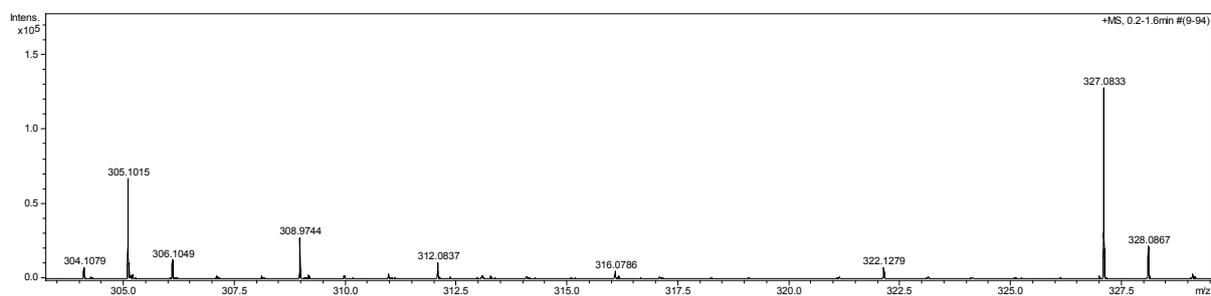


Figura 31. Espectro de massas da cumarina **3** (ESI q-TOF)

No espectro de RMN ¹H da substância **4** mostrado na Figura 32, observam-se dois sinais singletos com deslocamento químico em $\delta=1,44$ ppm (6H) e $\delta=1,65$ ppm (6H) e referentes a quatro grupamentos metila.

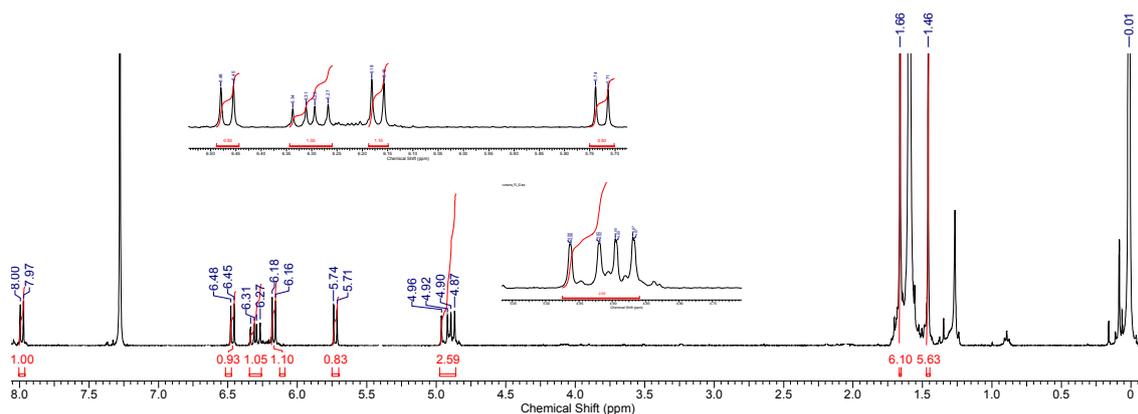


Figura 32. Espectro de RMN de ^1H da substância **4** (400 MHz, CDCl_3)

Além destes sinais, há ainda os sinais referentes aos átomos de hidrogênio H-3 e H-4, presença de sinal dubleto com deslocamento químico em $\delta=6,45$ ppm ($d, J = 10$ Hz) que acopla com um átomo de hidrogênio e um sinal dubleto com deslocamento químico em $\delta=5,71$ ppm ($d, J = 10$ Hz) e referente à átomos de hidrogênio olefínico de um anel crômeno, como mostrado na Figura 33:

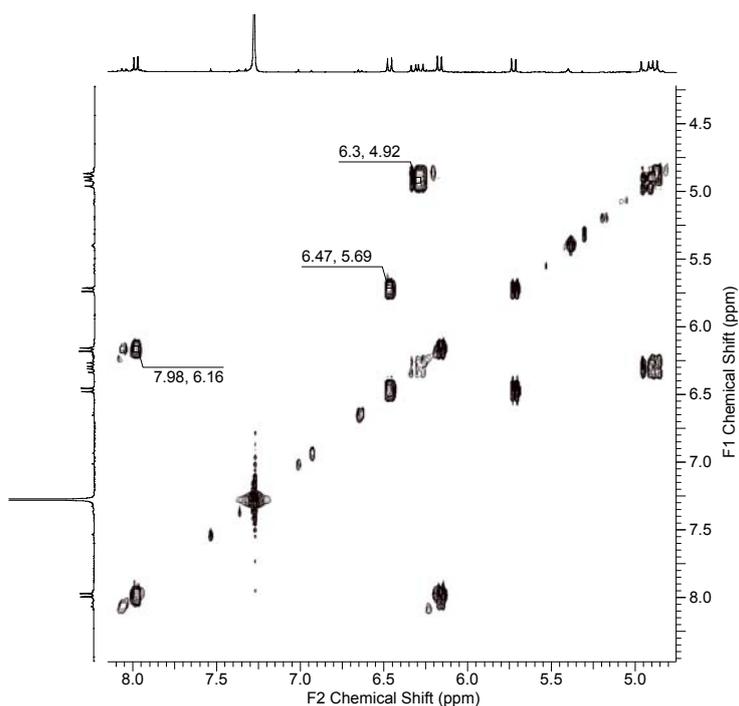


Figura 33. Espectro de COSY ^1H - ^1H da substância **4** (400 MHz, CDCl_3)

Através dos espectros de HMBC e HSQC pode-se atribuir os valores de deslocamentos químicos de todos os carbonos da substância **4**. Segundo MURRAY, sinais de duplos dubletos com deslocamento químico em torno de $\delta= 4,8$ ppm

sugerem a presença de uma ligação dupla terminal. A interpretação do resultado do experimento RMN HSQC, apresentado na Figura 34, mostra a presença de um sinal de um átomo de hidrogênio com deslocamento químico em $\delta=6,29$ ppm (*dd*, $J = 10,8$ e $17,2$ Hz) acoplado a dois sinais de átomos de hidrogênio com deslocamento químico em $\delta= 4,92$ ppm (*dd*, $J = 1,6$ e $17,2$ Hz) e $\delta= 4,86$ ppm (*dd*, $J = 1,6$ e $10,7$ Hz), juntamente com as correlações do sinal com deslocamento químico em $\delta= 6,29$ ppm com o sinal em $\delta=150,0$ ppm e dos sinais com deslocamento químico em $\delta=4,92$ ppm e $4,86$ ppm com o sinal em $\delta=105,8$ ppm:

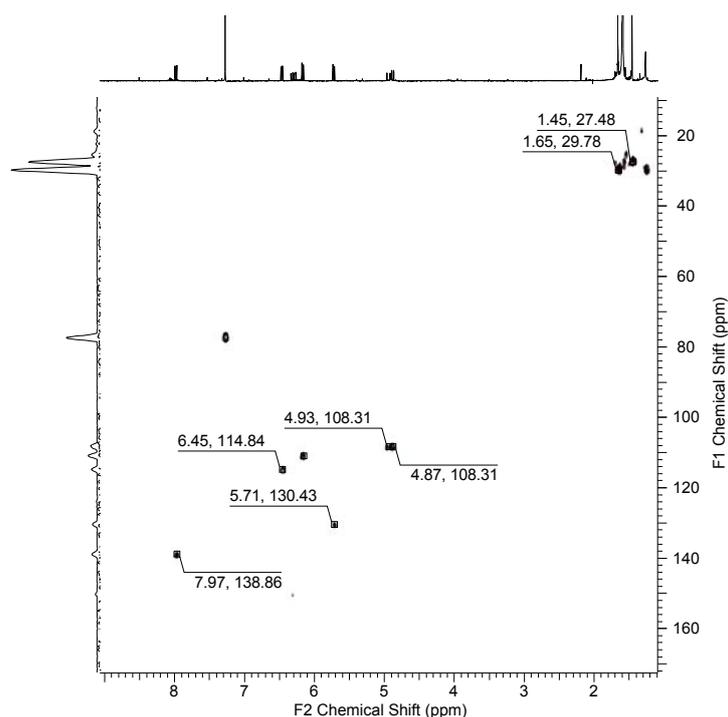


Figura 34. Mapa de contorno do experimento de HSQC da substância **4** (400 MHz, CDCl_3)

O resultado do experimento RMN HMBC apresentado na Figura 35 mostra os acoplamentos verificados entre os grupamentos metila com deslocamento químico em $\delta= 1,65$ ppm (6H) e os átomos de carbono com deslocamento químico em $\delta=30,0$ ppm $\delta=40,1$ ppm, $\delta=110,8$ ppm e $\delta=150,0$ ppm, os quais confirmam a presença de um substituinte 1,1-dimetilalila:

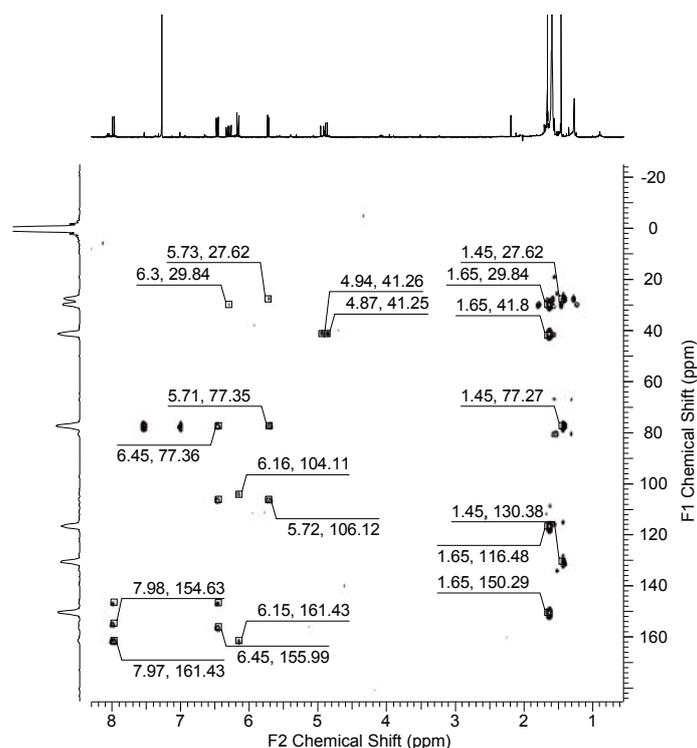
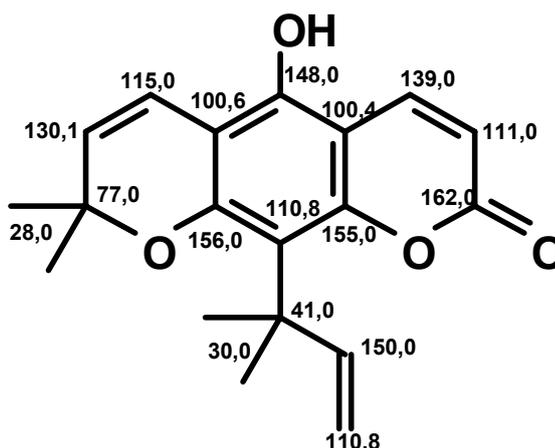


Figura 35. Mapa de contorno do experimento de HMBC da substância **4** (400 MHz, CDCl_3)

A inexistência de um singlete referente a um átomo de hidrogênio aromático levou à suposição da substituição de um grupamento hidroxila, o que pode ser confirmado pela presença de um sinal de átomo de carbono com deslocamento químico em $\delta=148,0$ ppm, como mostrado acima no mapa de contorno para o experimento RMM HMBC.

O sinal do átomo de hidrogênio com deslocamento químico em $\delta=7,94$ ppm referente ao átomo de hidrogênio H-4 e o sinal do átomo de hidrogênio com deslocamento químico em $\delta=6,45$ ppm e referente ao átomo H-3' apresentam acoplamento com o átomo de carbono com deslocamento químico em $\delta=148,0$ ppm, confirmando as presenças da hidroxila em posição C-5 e do anel pirano *meta* linear



O espectro de massas obtido e mostrado na Figura 36 apresenta o pico do íon molecular protonado $[M+H]$ com m/z 313,1421 e referente à fórmula molecular $C_{19}H_{20}O_4$; esta informação, juntamente com os dados espectroscópicos de RMN e da literatura permitiram a identificação da cumarina **4** (SU *et al*, 2009):

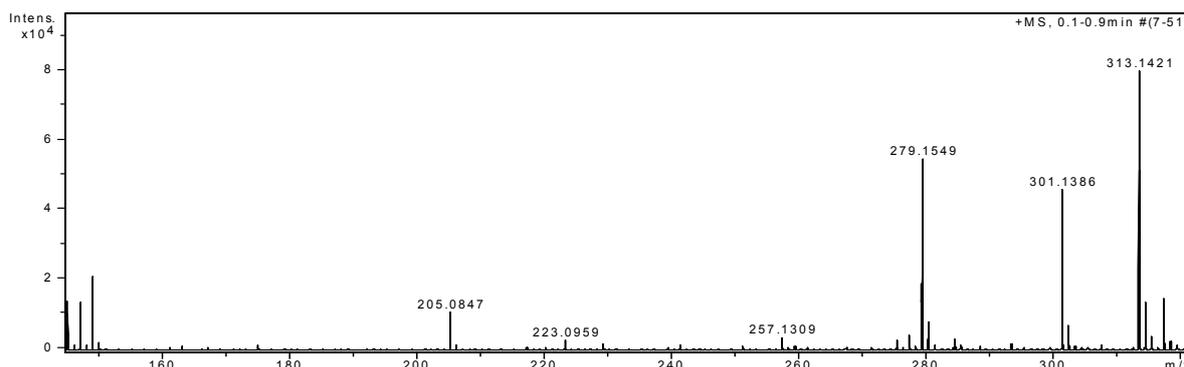
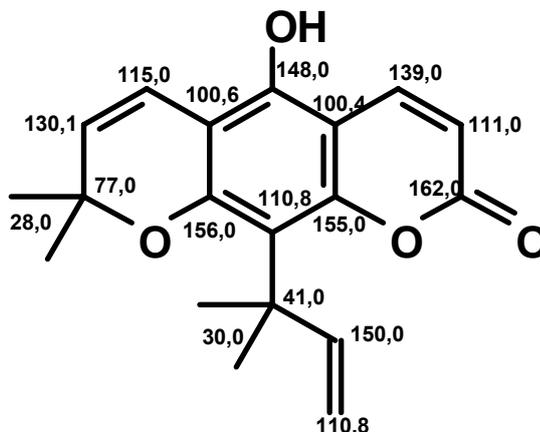


Figura 36. Espectro de massas da substância **4** (ESI TOF)

A inexistência de um singlete referente a um átomo de hidrogênio aromático levou à suposição da substituição de um grupamento hidroxila, o que pode ser confirmado pela presença de um sinal de átomo de carbono com deslocamento químico em $\delta=148,0$ ppm, como mostrado acima no mapa de contorno para o experimento RMM HMBC.

O sinal do átomo de hidrogênio com deslocamento químico em $\delta=7,94$ ppm referente ao átomo de hidrogênio H-4 e o sinal do átomo de hidrogênio com deslocamento químico em $\delta=6,45$ ppm e referente ao átomo H-3' apresentam

acoplamento com o átomo de carbono com deslocamento químico em $\delta=148,0$ ppm, confirmando as presenças da hidroxila em posição C-5 e do anel pirano *meta* linear.



O espectro de massas obtido e mostrado na Figura 36 apresenta o pico do íon molecular protonado $[M+H]$ com m/z 313,1421 e referente à fórmula molecular $C_{19}H_{20}O_4$; esta informação, juntamente com os dados espectroscópicos de RMN e da literatura permitiram a identificação da cumarina **4** (SU *et al*, 2009):

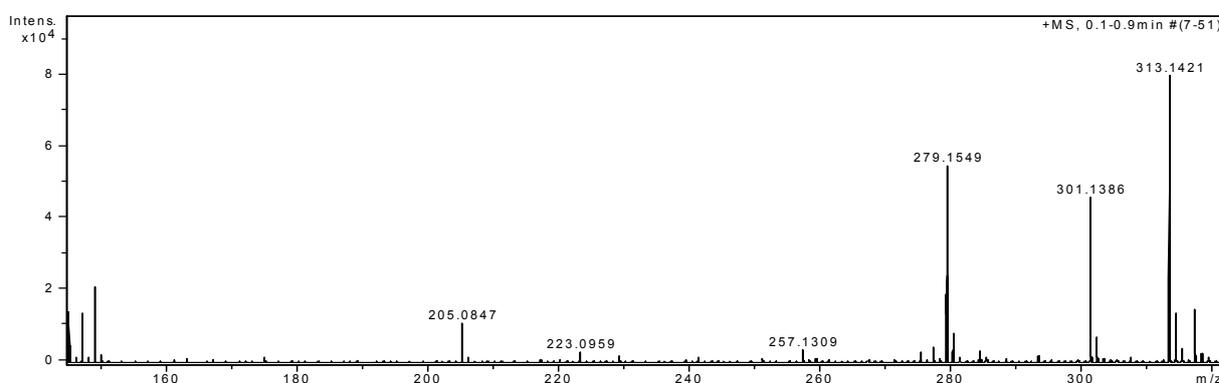


Figura 37. Espectro de massas da substância 4 (ESI TOF)

Os dados de RMN ¹H das cumarinas **2**, **3** e **4** em comparação com os dados da literatura estão sumarizados e apresentados na Tabela 11:

Tabela 11. Dados de RMN ¹H das cumarinas **2**, **3** e **5**.

H/C	2		3		4	
	H* (CDCl ₃)	H ¹ (MEOD)	H* (CDCl ₃)	H ² (CDCl ₃)	H* (CDCl ₃)	H ³ (CDCl ₃)
3	6,27 (d, 10,0 Hz)	6,10 (d, 9,5 Hz)	6,41 (d, 9,5 Hz)	6,37 (d, 9,5 Hz)	6,16 (d, 9,5 Hz)	6,11 (d, 9,6 Hz)
4	7,94 (d, 10,0 Hz)	7,79 (d, 9,5 Hz)	8,06 (d, 9,5 Hz)	8,07 (d, 9,5 Hz)	7,98 (d, 9,5 Hz)	8,09 (d, 9,6 Hz)
5	7,55 (d, 8,0 Hz)	7,42 (d, 8,4 Hz)	7,57 (sl)	7,39 (s)	-	-
6	6,88 (dd, 8,0 e 2,0 Hz)	6,77 (dd, 8,4 e 2,2 Hz)	-	-	-	-
8	6,80 (d, 2,0 Hz)	6,71 (d, 2,2 Hz)	-	-	-	-
1'	-	-	-	-	-	-
2'	-	-	7,88 (d, 2,0 Hz)	7,69 (d, 2,0 Hz)	-	-
3'	-	-	6,96 (d, 2,0 Hz)	6,83 (d, 2,0 Hz)	6,45 (d, 10,0 Hz)	6,56 (d, 10,0 Hz)
4'	-	-	-	-	5,71 (d, 10,0 Hz)	5,69 (d, 10,0 Hz)
5'	-	-	-	-	1,44 (s)	1,44 (s)
6'	-	-	-	-	1,44 (s)	1,44 (s)
1''	-	-	-	-	-	-
2''	-	-	4,45 (dd, 2,8 e 10,0 Hz)	4,78 (dd, 1,0 e 2,4 Hz)	6,29 (dd, 10,8 e 17,2 Hz)	6,30 (dd, 10,6 e 17,3 Hz)
3a''	-	-	4,78 (dd, 2,8 e 10,0 Hz)	4,78 (dd, 8,4 e 9,8 Hz)	4,92 (dd, 1,6 e 17,2 Hz)	4,93 (d, 17,3 Hz)
3b''	-	-	3,86 (dd, 2,8 e 8,0 Hz)	3,82 (dd, 2,4 e 8,4 Hz)	4,86 (dd, 1,6 e 10,7 Hz)	4,87 (d, 10,7 Hz)
4''	-	-	1,24 (s)	1,25 (s)	1,65 (s)	1,66 (s)
5''	-	-	1,28 (s)	1,30 (s)	1,65 (s)	1,66 (s)

Valores experimentais (*); Valores de referência (¹); CHEN *et al*, 2005, (²); ROCHA, 2004, (³); SU *et al*, 2009.

As substâncias 5 e 6 foram isoladas como um sólido viscoso de coloração incolor e identificadas por RMN ¹H, ¹³C, COSY, HSQC, HMBC e Espectrometria de massas.

Nos espectros de RMN ¹H das substâncias 5 e 6, apresentados respectivamente nas Figuras 37 e 38, são observados os sinais característicos de átomos de hidrogênio H-3 e H-4 do anel cumarínico bem como os sinais dos átomos de hidrogênio de um anel aromático C-7 substituído, conforme dados mostrados na **Erro! Fonte de referência não encontrada.**

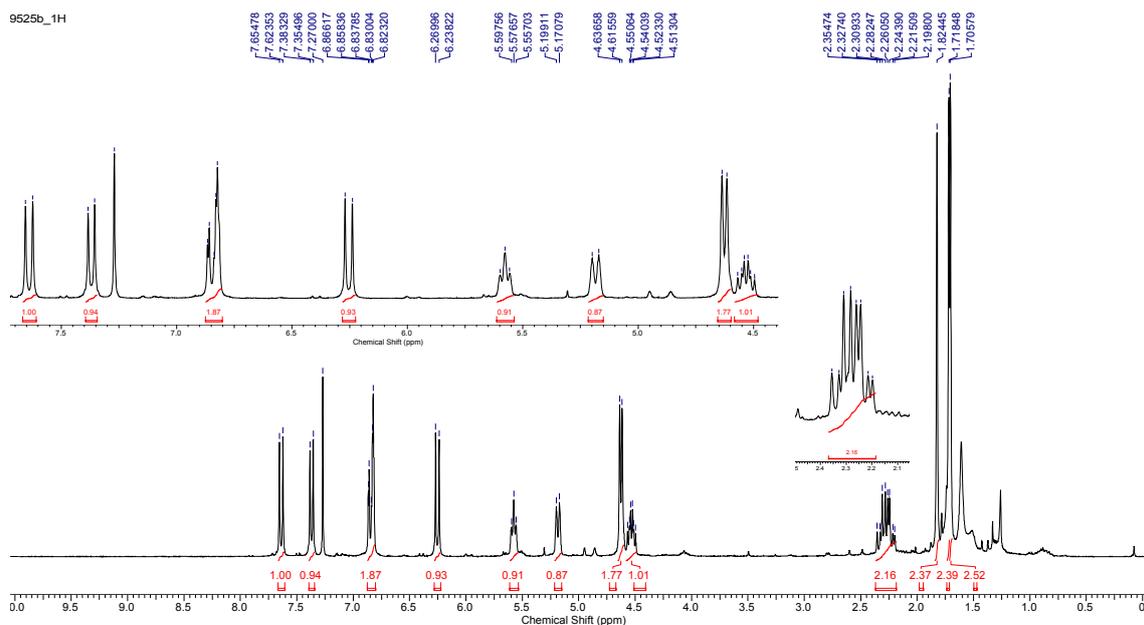


Figura 38. Espectro de RMN ^1H da substância 5 (300 MHz, CDCl_3)

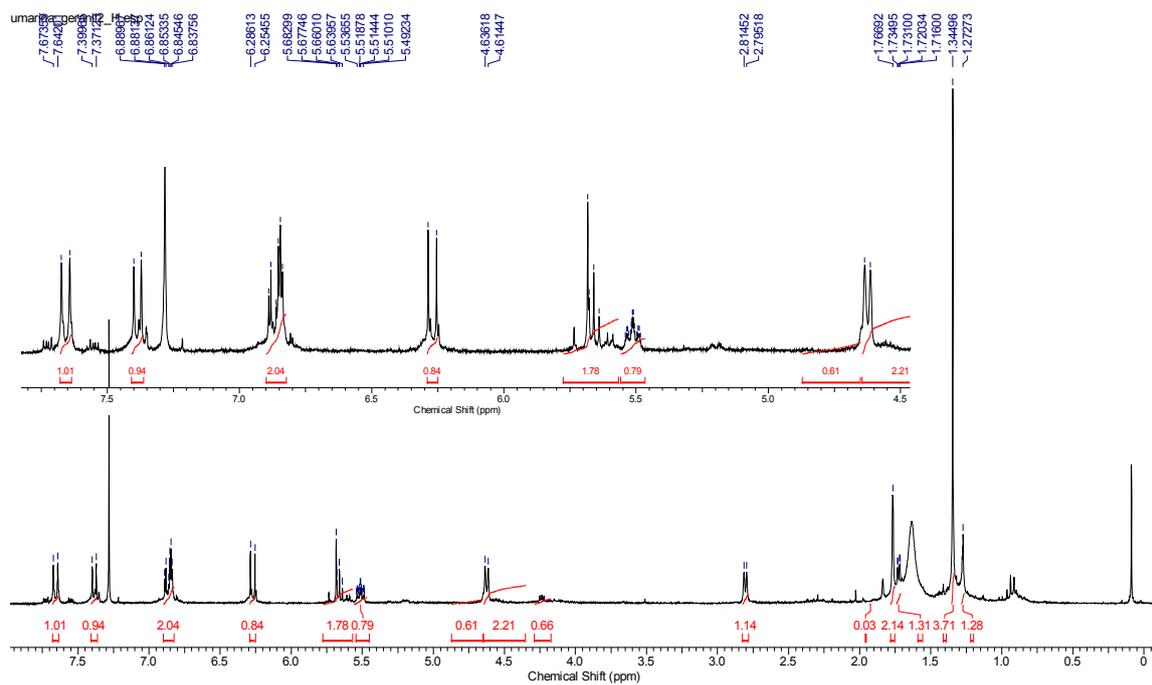


Figura 39. Espectro de RMN ^1H da substância 6 (300 MHz, CDCl_3)

Tabela 12. Dados de RMN ¹H das cumarinas **5** e **6**.

H	5* (CDCl ₃)	5** (CDCl ₃)	6* (CDCl ₃)
3	6,25 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 9,4 Hz)	6,22 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 9,5 Hz)	6,27 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 9,5 Hz)
4	7,64 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 9,4 Hz)	7,62 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 9,5 Hz)	7,65 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 9,5 Hz)
5	7,37 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,2 Hz)	7,34 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 0,5; 8,3 Hz)	7,38 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,2 Hz)
6	6,82 81 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 2,3 Hz)	6,81 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 2,4; 8,3 Hz)	6,81 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 2,3; 8,3 Hz)
8	6,86 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,3 Hz)	6,79 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 2,4; 0,5 Hz)	6,88 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 2,5 Hz)
1'	4,59 (2H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6,4 Hz)	4,59 (2H, <i>br d</i> , <i>J</i> = 6,5 Hz)	4,62 (2H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6,4 Hz)
2'	5,50 (1H, <i>br t</i> , <i>J</i> = 6,4 Hz)	5,55 (1H, <i>tq</i> , <i>J</i> = 6,5; 1,2 Hz)	5,51 (1H, <i>tq</i> , <i>J</i> = 6,5; 1,3 Hz)
3'	-	-	-
4'	2,23 (2H, <i>d</i> , <i>J</i> = 13,6; 6,0 Hz)	2,25 (2H, <i>d</i> , <i>J</i> = 13,8; 6,1 Hz)	~5,6 (2H, <i>m</i>)
5'	4,53 (1H, <i>ddd</i> , <i>J</i> = 7,2; 5,3; 6,0 Hz)	4,51 (1H, <i>ddd</i> , <i>J</i> = 7,3; 5,4; 6,1 Hz)	~5,6 (2H, <i>m</i>)
6'	5,18 (1H, <i>dq</i> , <i>J</i> = 7,2; 1,5 Hz)	5,15 (1H, <i>dq</i> , <i>J</i> = 7,3; 1,4 Hz)	2,8 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 5,8 Hz)
7'	-	-	-
8'	1,71 (3H, <i>sl</i>)	1,67 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 1,4 Hz)	1,35 (3H, <i>s</i>)
9'	1,82 (3H, <i>s</i>)	1,80 (3H, <i>br d</i> , <i>J</i> = 1,2 Hz)	1,27 (3H, <i>s</i>)
10'	1,70 (3H, <i>sl</i>)	1,67 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 1,4 Hz)	1,77 (3H, <i>sl</i>)

(*) Valores experimentais; (**) Valores de referência: ADJUIJ *et al.*, 1989.

Além dos sinais característicos observados no espectro de RMN ¹H da substância **5**, há sinais referentes à átomos de hidrogênio metilênico com deslocamento químico em $\delta=4,59$ ppm (2H, *d*, *J* = 6,4 Hz) e $\delta=2,23$ ppm (2H, *dd*, *J* = 13,6; 6,0 Hz), à átomos de hidrogênio olefínico com deslocamento químico em $\delta=4,53$ ppm (2H, *ddd*, *J* = 7,2; 5,3; 6,0 Hz) e $\delta=5,15$ ppm (1H, *dq*, *J* = 7,2; 1,5 Hz) e à átomos de hidrogênio de grupos metila ligados à átomos de carbono com hibridização sp² e deslocamento químico em $\delta=1,71$ ppm; $\delta=1,82$ ppm e $\delta=1,70$ ppm (3H, *sl*).

O espectro de RMN ^{13}C da substância **5** apresentou sinais de 19 átomos de carbono, indicando a presença de um átomo de carbono lactônico com deslocamento químico em $\delta=161,9$ ppm e atribuído ao átomo de carbono C-2; uma dupla ligação conjugada com grupamento carbonila com deslocamento químico em $\delta =13,1$ ppm e $\delta=143,4$ ppm referentes aos átomos de carbono C-3 e C-4; um átomo de carbono de grupamento éter com deslocamento químico em $\delta=65,2$ ppm e outro átomo de carbono ligado a grupamento hidroxila com deslocamento químico em $\delta=66,4$ ppm e atribuídos, respectivamente, aos átomos de carbono C-1' e C-5', e sinais de duas duplas ligações referentes à cadeia alquílica com deslocamento químico em $\delta =21,7$ ppm, $\delta=138,9$ ppm, $\delta=128,7$ e $\delta=135,7$ ppm referentes, respectivamente, aos átomos de carbono C-2', C-3', C-6' e C-7', como mostrado nas Figuras 39:

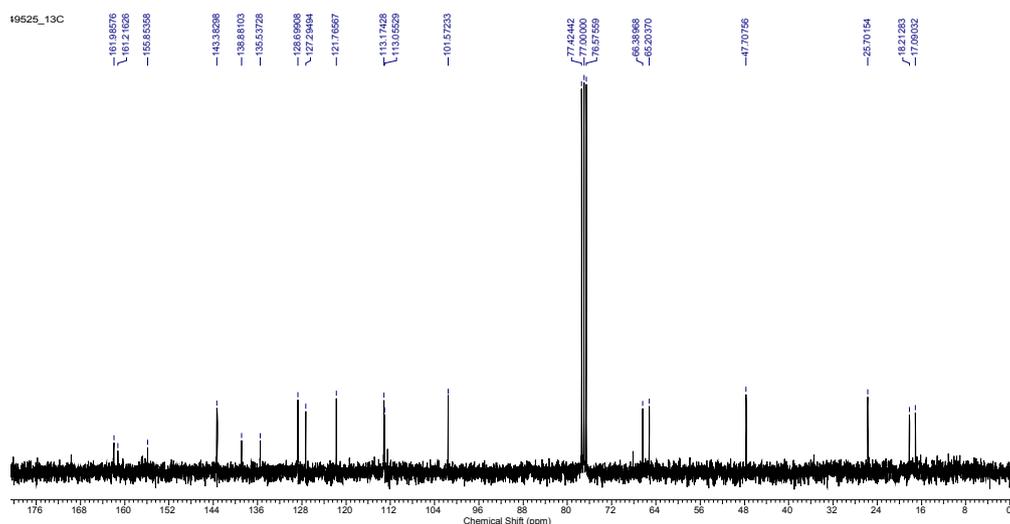


Figura 40. Espectro de RMN ^{13}C da substância **5** (300 MHz, CDCl_3)

Estas multiplicidades indicaram a presença de um substituinte em C-7 O-geranilado; as multiplicidades dos átomos de hidrogênio foram confirmadas a partir do resultado do experimento RMN COSY, apresentado na Figura 41:

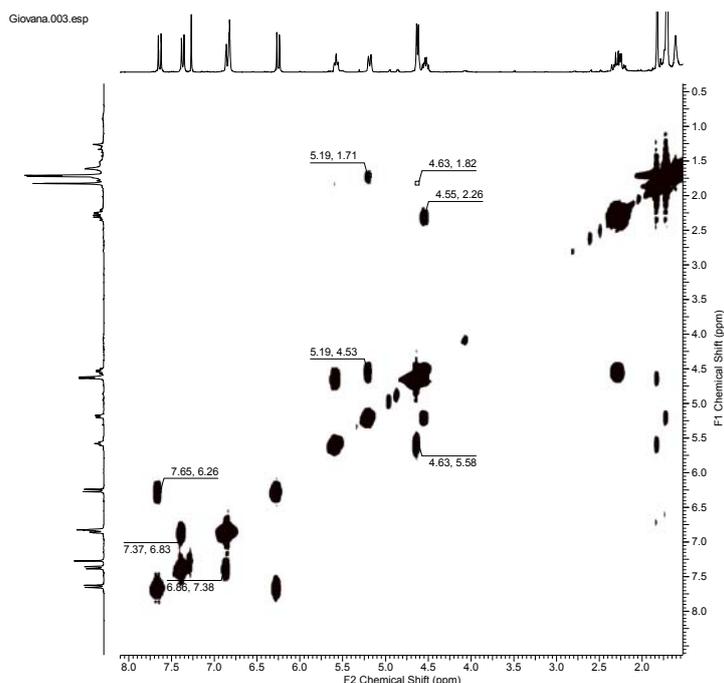


Figura 41. Espectro RMN COSY ^1H - ^1H da substância 5 (300 MHz, CDCl_3)

O resultado obtido no experimento RMN COSY revela que os átomos de hidrogênio alílico com deslocamento químico em $\delta=4,62$ ppm correlacionam-se com os átomos de hidrogênio com deslocamento químico em $\delta=5,57$ ppm, enquanto que o átomo de hidrogênio com deslocamento químico em $\delta=4,53$ ppm correlaciona-se com os átomos de hidrogênio com deslocamento químico em $\delta=2,25$ ppm e $\delta=5,18$ ppm.

O resultado do experimento RMN HSQC mostrado na Figura 42 apresentou correlações entre átomos de hidrogênio H-3 e H-4 e átomos de hidrogênio do anel aromático com os respectivos carbonos. Também foram observadas correlações entre: átomo de hidrogênio com deslocamento químico em $\delta=4,62$ ppm e átomo de carbono com deslocamento químico em $\delta=65,2$ ppm; átomo de hidrogênio com deslocamento químico em $\delta=5,57$ ppm e átomo de carbono com deslocamento químico em $\delta=121,7$ ppm; átomo de hidrogênio com deslocamento químico em $\delta=2,25$ ppm e átomo de carbono com deslocamento químico em $\delta=47,7$ ppm; átomo de hidrogênio com deslocamento químico em $\delta=4,53$ ppm e átomo de carbono com deslocamento químico em $\delta=66,4$ ppm; átomo de hidrogênio com deslocamento químico em $\delta=5,18$ ppm e átomo de carbono com deslocamento químico $\delta=128,7$ ppm; átomo de hidrogênio com deslocamento químico em $\delta=1,82$ ppm e átomo de

carbono com deslocamento químico em $\delta = 8,2$ ppm; átomo de hidrogênio com deslocamento químico em $\delta = 1,70$ ppm e átomo de carbono com deslocamento químico em $\delta = 17,1$ ppm; átomo de hidrogênio com deslocamento químico em $\delta = 1,71$ ppm e átomo de carbono com deslocamento químico em $\delta = 25,7$ ppm.

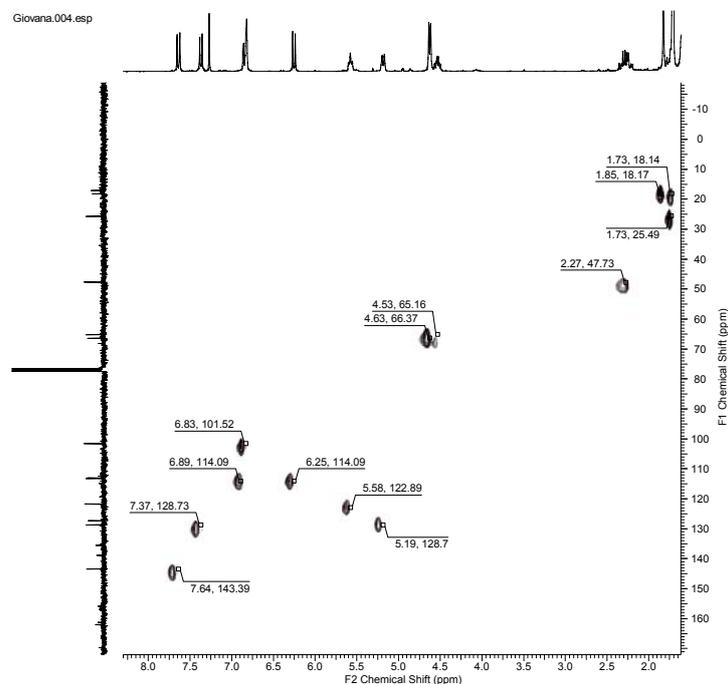
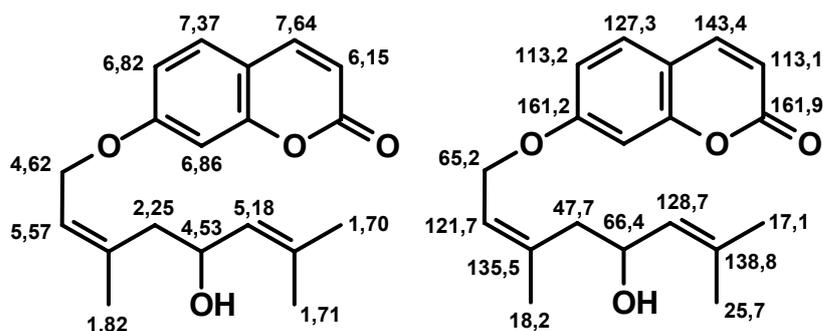


Figura 42. Mapa de contorno do experimento RMN HSQC da substância 5 (300 MHz, CDCl_3)

A análise do resultado experimento RMN HMBC mostrado na Figura 43 permitiu confirmar o esqueleto cumarínico e atribuir as seguintes correlações entre átomos de hidrogênio e carbono de grupo geranila: em $\delta 4,62$ com $\delta 121,7$ (J^2), com $\delta 138,78$ (J^3) e com $\delta 161,2$ (J^3), em $\delta 5,57$ com $\delta 47,7$ (J^2) e com $\delta 18,2$ (J^3) em $\delta 2,25$ com $\delta 18,2$ (J^2), com $\delta 66,4$ (J^2), com $\delta 128,7$ (J^3) e com $\delta 138,8$ (J^2), em $\delta 4,53$ com $\delta 128,7$ (J^2), em $\delta 5,18$ com $\delta 17,1$ (J^3) e com $\delta 25,7$ (J^3), em $\delta 1,82$ com $\delta 47,7$ (J^3), com $\delta 121,7$ (J^3) e com $\delta 138,9$ (J^3), em $\delta 1,70$ com $\delta 25,7$ (J^2) e $\delta 1,71$ com $\delta 17,0$ (J^3) com $\delta 128,7$ (J^2) e $\delta 135,5$ (J^3).



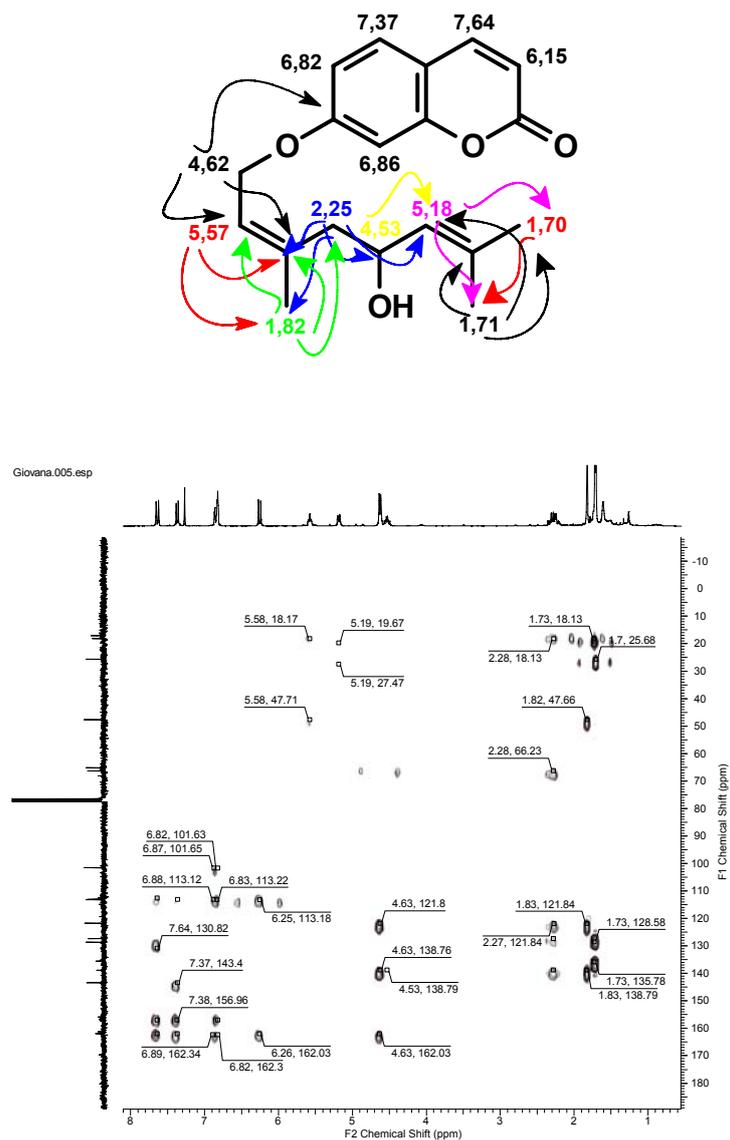


Figura 43. Mapa de contorno do experimento de HMBC da substância **5** (300 MHz, CDCl₃)

O espectro de massas obtido para a substância **5** e apresentado na Figura 43 mostra pico do íon molecular com m/z 337,1415 referente ao íon com aduto de sódio [M+Na], de acordo com a massa molar 314,1518 e fórmula molecular C₁₉H₂₂O₄. Esta informação, juntamente com os dados espectroscópicos de RMN, confirmam a natureza da substância **5** com uma cumarina geranilada com uma oxidação na posição C-5' e conhecida como anisocumarina:

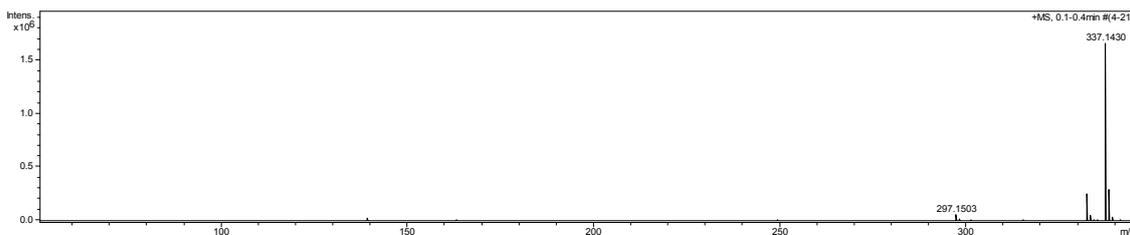


Figura 44. Espectro de massas [M+Na] da substância 5 e EM/EM 30 eV (ESI q-TOF)

Em espectrometria de massas é difícil identificar a razão m/z do íon protonado [M+H] para as cumarinas geraniladas pois estes compostos sofrem rearranjo que leva à perda de um substituinte e formação de uma cumarina hidroxilada na posição C-7, denominada umbeliferona.

O mecanismo proposto para este rearranjo está apresentado na Figura 45:

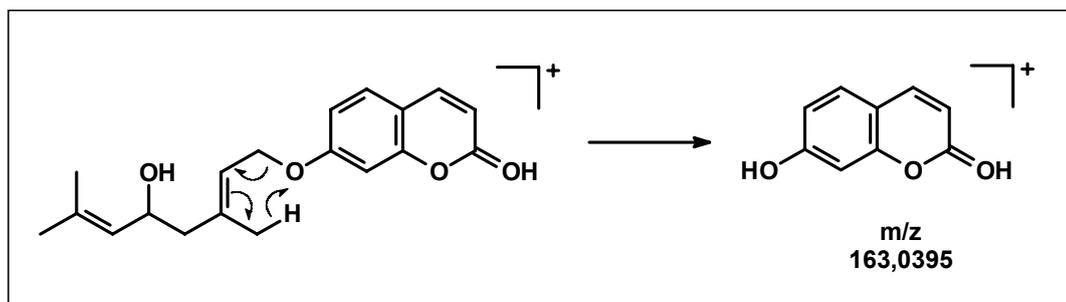


Figura 45. Rearranjo de McLafferty para a geração do fragmento m/z 163.

Na Figura 45 está apresentado o resultado do experimento EM/EM com energia de colisão de 30 eV para o íon com m/z 337,1415, no qual são observados exclusivamente o íon [M+H] com m/z 163 e o respectivo íon [M+Na] com m/z 185:

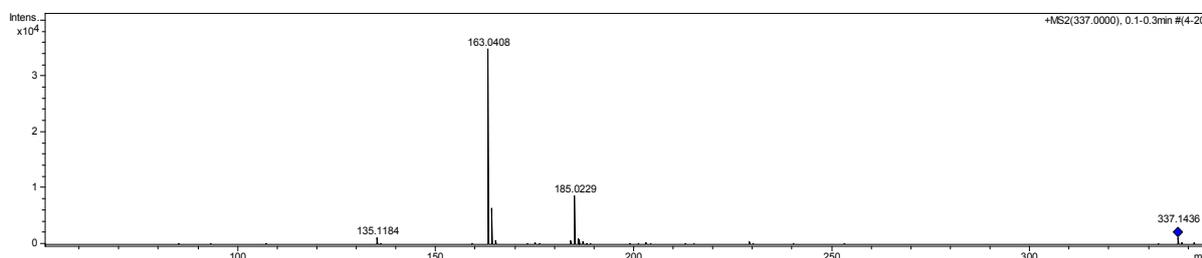


Figura 46. Espectro de EM/EM do íon [M+Na] de razão m/z de 337 (ESI-q-TOF)

Os valores de deslocamentos químicos de átomos de hidrogênio e carbono, comparados com dados da literatura, estão sumarizados nas

não encontrada. eTabela 13. A substância 6 não apresenta estrutura conhecida na literatura tratando-se, portanto, de um composto inédito.

Tabela 13. Dados de RMN ^{13}C das cumarinas 5 e 6.

H/C	5		6
	$^{13}\text{C}^*$	$^{13}\text{C}^{**}$	$^{13}\text{C}^*$
2	161,9	162,1	162,0
3	113,1	113,1	113,0
4	143,4	143,5	143,4
4a	112,1	112,6	112,5
5	127,3	127,4	127,3
6	113,2	113,2	113,3
7	161,2	161,3	161,3
8	101,6	101,7	101,6
8a	155,8	155,9	155,8
1'	65,2	65,3	65,4
2'	121,7	128,8 ^{***}	119,1
3'	138,9	138,9	135,5
4'	47,7	47,7	124,1
5'	66,4	66,5	138,8
6'	128,7	121,8 ^{***}	42,1
7'	135,5	135,5	70,7
8'	17,1	17,1	29,7
9'	18,2	18,2	18,2
10'	25,7	25,7	16,6

(*) Valores experimentais; (**) Valores de referência: ADJUIJ *et al.*, 1989; (***) Valores invertidos.

A substância 6 foi identificada como um isômero de 5. A comparação dos resultados dos experimentos RMN ^1H e suas respectivas multiplicidades indicam tratar-se de isômeros estruturais na porção terminal do grupo geranila: o sinal com deslocamento químico em $\delta=2,8$ ppm (1H, *d*, $J = 5,8$ Hz) referente a um átomo de hidrogênio metínico e a presença de átomos de hidrogênio de grupamento metila com deslocamento químico em $\delta=1,77$ ppm (*s/l*), em $\delta=1,35$ ppm (*s*) e em $\delta=1,27$ ppm (*s*) são característicos de um grupo 6'-7'-epoxigeraniloxi.

Assim, a diferenciação proposta entre 5 e 6 foi a presença de um grupamento epóxido gerado via ciclização intramolecular da substância 5.

No espectro de RMN ^1H da substância 6 mostrado na Figura 46 também foram observados: sinal referente a um átomo de hidrogênio metilênico com deslocamento químico em $\delta=4,62$ ppm (2H, *d*, $J = 6,5$ Hz), sinais de átomos de hidrogênio olefínico com deslocamento químico em $\delta=5,51$ ppm (1H, *tq*, $J = 6,4,6$;

1,2 Hz) e um multipeto com deslocamento químico em $\delta=5,6$ ppm referente a dois átomos de hidrogênio:

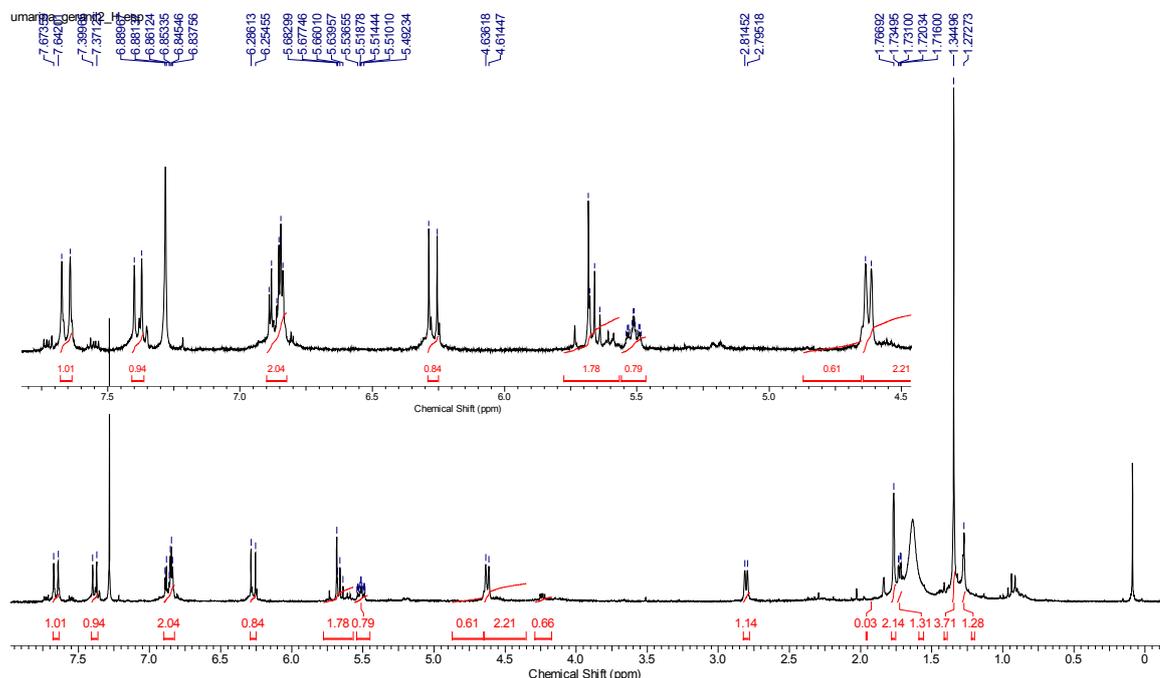
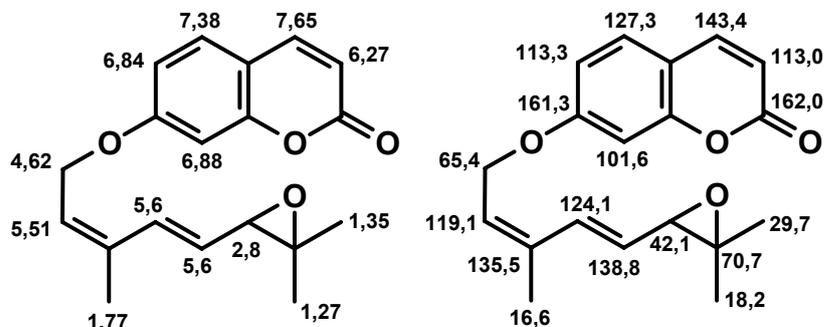


Figura 46. Espectro de RMN ^1H da substância 6 (300 MHz, CDCl_3)

No resultado do experimento RMN COSY mostrado na Figura 48 é possível observar as correlações entre átomos de hidrogênio com deslocamento químico em $\delta=4,62$ ppm e $\delta=5,51$ ppm, $\delta=2,8$ ppm e $\delta=5,68$ ppm, que juntamente com os sinais de correlações observados no espectro do HSQC (Figura) do sinal em δ 2,8 com o carbono em δ 42,1, o multipeto em δ 5,6 com os carbonos em δ 124,1 e δ 140,6 e os sinais de correlações no espectro de HMBC (Figura) possibilitaram as atribuições de todos os hidrogênios e carbonos da substância 6.



Os dados de RMN juntamente com os dados obtidos no espectro de massas (Figura 47) em que é possível ver o íon protonado com relação m/z de 313,1435 estando de acordo com a fórmula molecular $C_{19}H_{20}O_4$ e sua massa molar de 312,1361 confirmam a estrutura da substância 6.

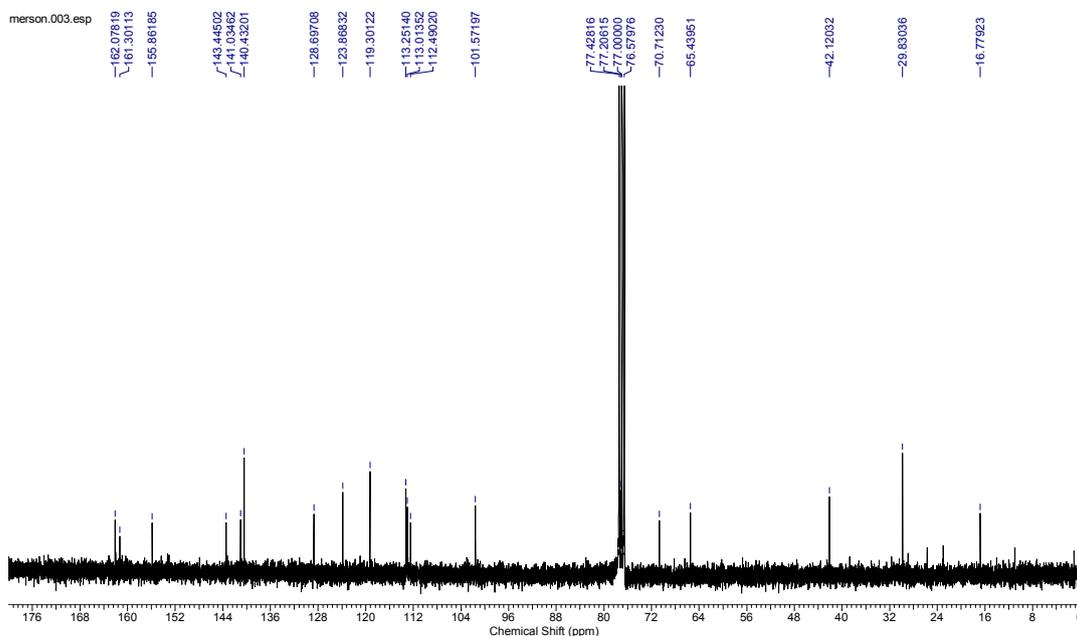


Figura 47. Espectro de RMN de ^{13}C da substância 6 (75 MHz, $CDCl_3$)

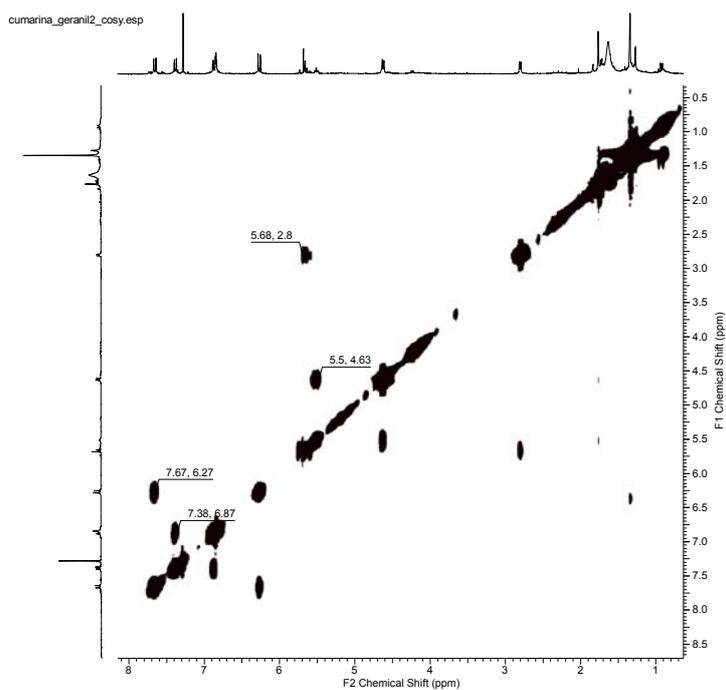


Figura 48. Espectro de COSY ^1H - ^1H da substância 6 (300 MHz, CDCl_3)

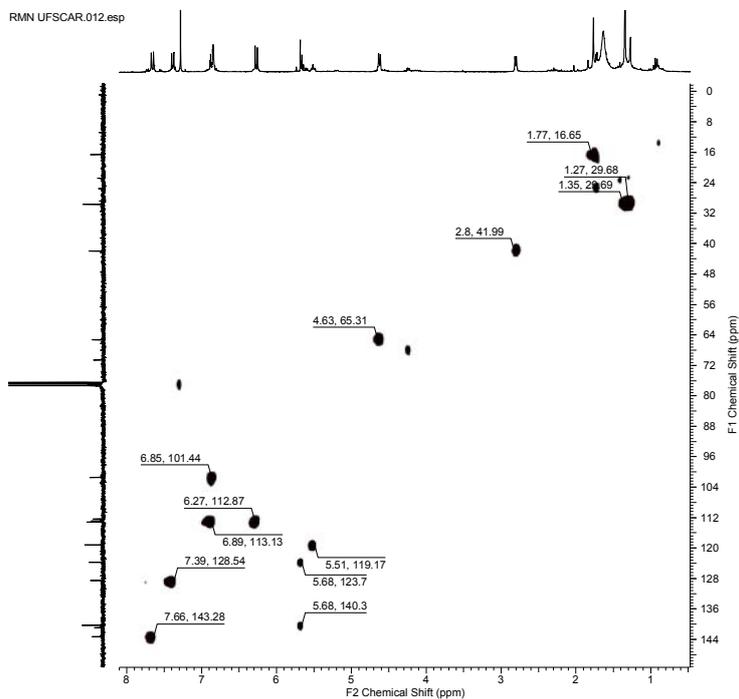


Figura 49. Mapa de contorno do experimento de HSQC da substância 6 (300 MHz, CDCl_3)

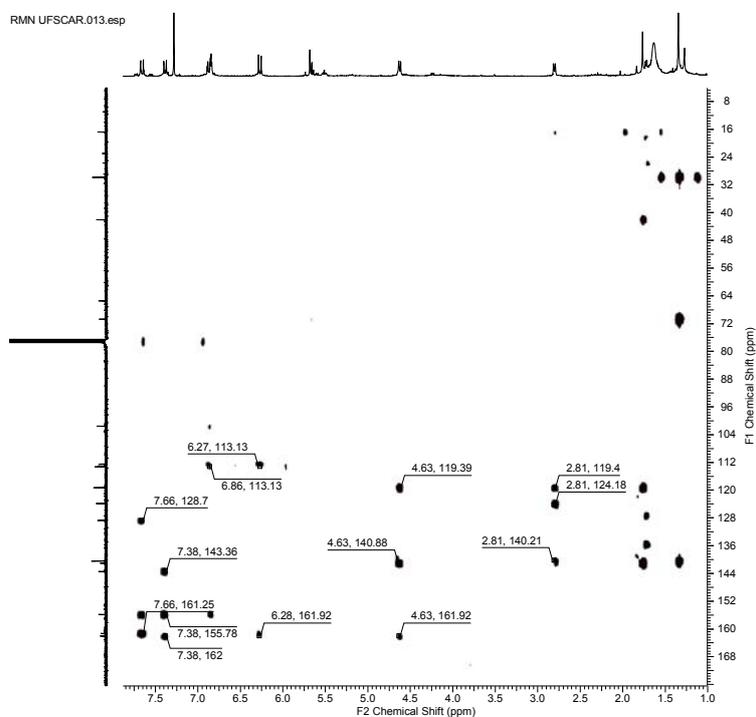


Figura 50. Mapa de contorno do experimento de HMBC da substância 6 (300 MHz, CDCl_3)

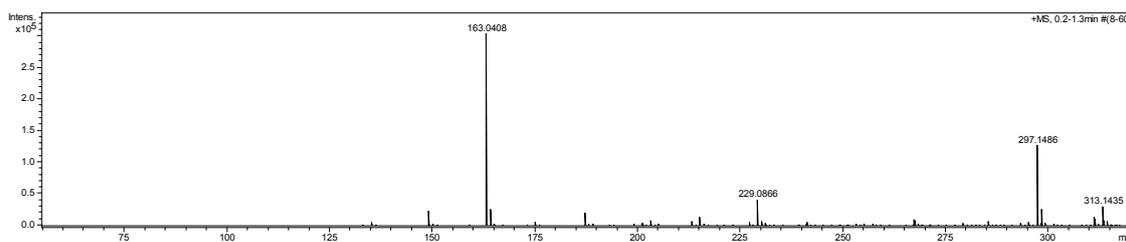


Figura 51. Espectro de massas [M+Na] da substância 6 (ESI q-TOF)

4.4.2 Alcalóides

Os alcalóides representam uma classe de metabólitos secundários com grande diversidade estrutural e constituem cerca de 20% de todas as substâncias naturais descritas (DJALMA, 2005).

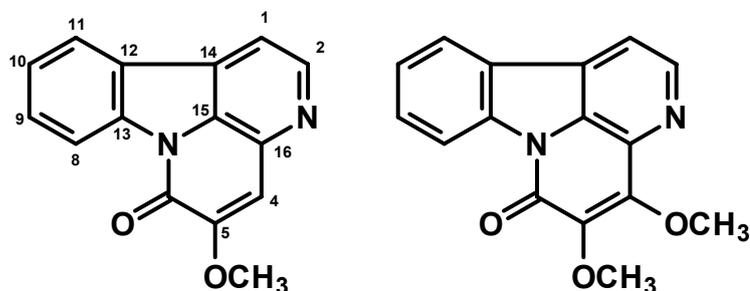
Os alcalóides são bases orgânicas nitrogenadas e representam uma classe de metabólitos secundários encontrados principalmente em plantas, porém, há ocorrências em microorganismos, insetos e anfíbios. Seu caráter básico deve-se à presença de um ou mais átomos de nitrogênios em anéis heterocíclicos (SIMOTE, 2006).

Na família Rutaceae diferentes classe de alcalóides são encontrados e classificados de acordo com sua origem biossintética: os derivados da fenilalanina e tirosina, do triptofano, derivados do ácido antranílico, alcalóides derivados da histidina e alcalóides de origem não definida, como os carbazóis. Os alcalóides derivados do ácido antranílico são considerados marcadores quimiotaxonômicos da família Rutaceae.

4.4.2.1 Alcalóides cantinônicos

As substâncias **7** e **8** foram isoladas do extrato diclorometânico de *Z. acuminatum* e apresentaram-se como sólidos de coloração branca/amarelada sendo identificadas por RMN de ¹H e EM de alta resolução.

Os alcalóides cantinônicos apresentam espectros de RMN de hidrogênio particulares, sendo observados dois dupletos em aproximadamente δ 7,90 e δ 8,80, ambos com constantes de acoplamento igual a 5,0 Hz, referentes aos hidrogênios H-1 e H-2 do anel piridínico (anel B).



Substância 7

Substância 8

Os espectros de RMN de ^1H da substância 7 (Figura 47) e da substância 8 (Figura 48.) quando comparados, indicam que estes compostos diferem pelo número de metoxilas.

O espectro de RMN ^1H destes compostos apresentaram dois dupletos em aproximadamente δ 7,90 e 8,60 ppm, ambos com $J = 5,0$ Hz, que são hidrogênios referentes a H-1 e H-2 de um anel piridínico característico de alcalóides cantinônicos.

Além disto, nos respectivos espectros de RMN de ^1H para os alcalóides 7 e 8 é verificado em comum a presença de sinais de quatro hidrogênios aromáticos em δ 8,13 (*dt*, $J = 7,8, 0,8$ Hz) referente a H-8, δ 7,57 (*ddd*, $J = 7,8, 7,5$ e $1,0$ Hz) referente a H-9 acoplado com uma constante *orto* com H-8 e H-10 e uma meta com H-11, δ 7,74 (*ddd*, $J = 7,8, 7,5$ e $1,0$ Hz) referente a H-10 e δ 8,74 (*dl*, $J = 8,2$ Hz) referente a H-11. Esses dados evidenciam para essas estruturas um anel orto dissubstituído.

A presença de um singlete em δ 7,26 no espectro de RMN ^1H da substância 7 indicou que há apenas uma substituição em C-4 ou C-5, sendo que o sinal em δ 4,08 indica que este substituinte deve ser o grupo metoxila. Para a substância 8 a presença dos dois singletos em δ 4,09 e 4,48 e a ausência do singlete em δ 7,26 evidenciam a substituição em C-4 e C-5 pelos grupos metoxilas.

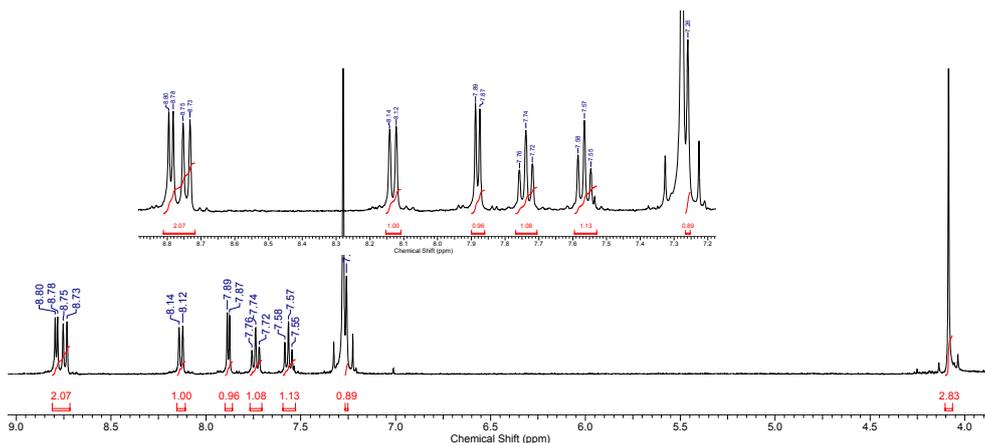


Figura 47. Espectro de RMN de ^1H da substância **7** (400 MHz, CDCl_3)

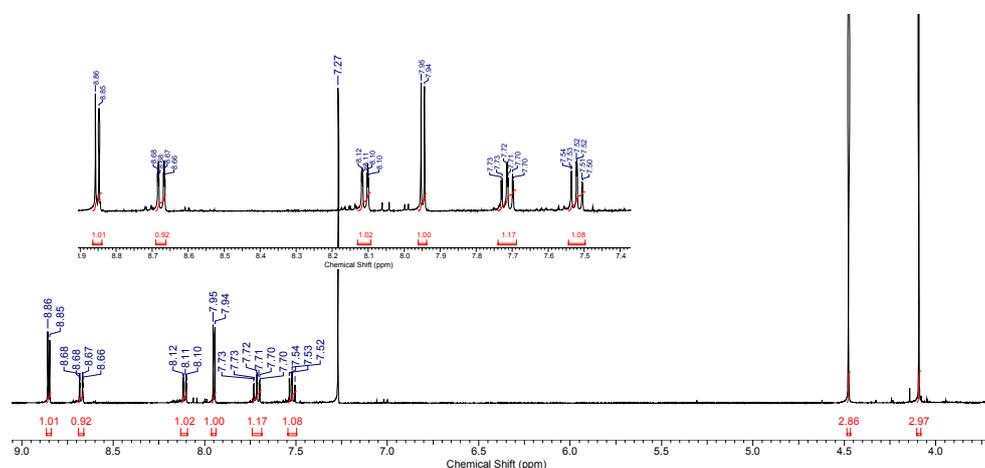


Figura 48. Espectro de RMN de ^1H da substância **8** (400 MHz, CDCl_3)

Os dados de RMN de ^1H das substâncias **5** e **6**, em comparação com os dados da literatura, estão sumarizados na Tabela 14. Estes dados juntamente com os espectros de massas apresentados nas Figura 52 e 53 e seus respectivos picos do íon molecular protonado $[\text{M}+\text{H}]$ com relação m/z de 250,0797, referente à fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$ e o pico do íon molecular com relação m/z de 280,0848, referente a fórmula molecular $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_3$, levaram a identificação do alcalóide **7** como o 5-metóxicantin-6-ona e o alcalóide **8** como o 4,5-dimetóxicantin-6-ona.

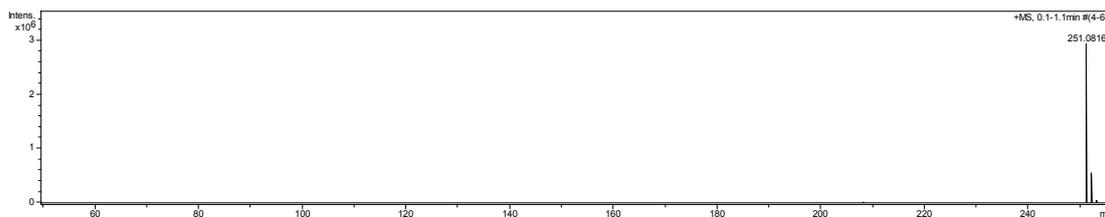


Figura 49. Espectro de massas da substância **7** (ESI Q-TOF)

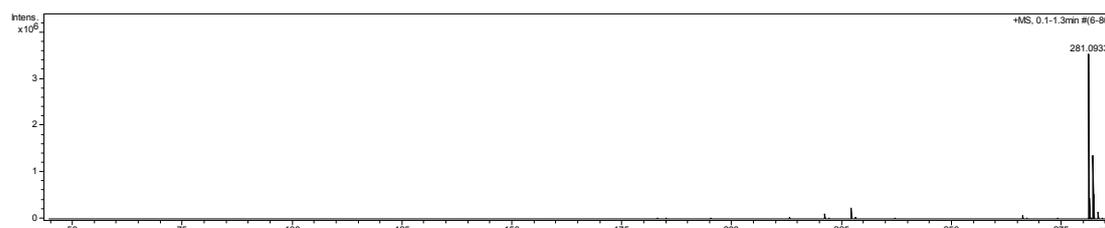


Figura 50. Espectro de massas da substância **8** (ESI Q-TOF)

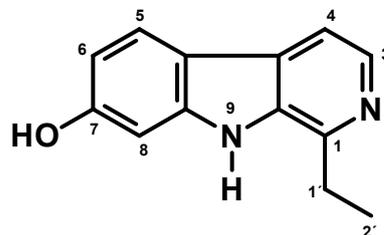
Tabela 14. Dados de RMN ^1H dos alcalóides **7** e **8**

H	5 (CDCl_3 , 400 MHz)	(SIMOTE, 2006) (CDCl_3 , 400 MHz)	6 (CDCl_3 , 500 MHz)	(SIMOTE, 2006) (CDCl_3 , 400 MHz)
1	7,89 (<i>d</i> , $J = 5,0$ Hz)	7,84 (<i>d</i> , $J = 5,1$ Hz)	7,94 (<i>d</i> , $J = 5,0$ Hz)	7,95 (<i>d</i> , $J = 5,0$ Hz)
2	8,79 (<i>d</i> , $J = 5,0$ Hz)	8,76 (<i>d</i> , $J = 5,1$ Hz)	8,85 (<i>d</i> , $J = 5,0$ Hz)	8,86 (<i>d</i> , $J = 5,0$ Hz)
4	7,26 s	7,21, s	---	---
8	8,13 (<i>dt</i> , $J = 7,8$, 0,8 Hz)	8,09 (<i>dt</i> , $J = 8,0$, 1,0 Hz)	8,11 (<i>ddd</i> , $J = 7,8$, 7,6, 0,8 Hz)	8,11 (<i>ddd</i> , $J = 7,8$, 7,6, 0,8 Hz)
9	7,74 (<i>ddd</i> , $J = 7,8$, 7,6, 1,0 Hz)	7,70 (<i>td</i> , $J = 8,1$, 1,2 Hz)	7,52 (<i>ddd</i> , $J = 7,8$, 7,6, 1,0 Hz)	7,52 (<i>ddd</i> , $J = 7,8$, 7,6, 1,0 Hz)
10	7,57 (<i>ddd</i> , $J = 7,8$, 7,5, 1,0 Hz)	7,56 (<i>td</i> , $J = 7,8$, 1,2 Hz)	7,71 (<i>ddd</i> , $J = 8,0$, 7,0, 0,8 Hz)	7,71 (<i>ddd</i> , $J = 8,0$, 7,0, 0,8 Hz)
11	8,74 (<i>d</i> , $J = 8,1$ Hz)	8,71 (<i>d</i> , $J = 8,1$ Hz)	8,67 (<i>td</i> , $J = 8,0$, 1,0 Hz)	8,67 (<i>td</i> , $J = 8,0$, 1,0 Hz)
4- OCH₃	---	---	4,47, s	4,48, s
5- OCH₃	4,08 s	4,07, s	4,09, s	4,09, s

4.4.2.2 Alcalóides β -carbolínico

A substância **9** foi isolada do extrato diclorometânico de *Z. acuminatum* e identificada como alcalóide β -carbolínico por RMN ^1H , HSQC, HMBC e Espectrometria de massas de alta resolução. Os alcalóides β -carbolínico substituídos na posição 1 podem ser identificados por RMN ^1H através dos

deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio H-3 e H-4 na faixa entre $\delta=8,15$ – 8,55 ppm e $\delta=7,80$ – 8,35 ppm, respectivamente, e com constantes de acoplamento na ordem de 5,0 – 6,0 Hz.



Substância 9

No espectro de RMN ^1H obtido para a substância 9 e apresentado na Figura 55 observam-se dois dubletos com deslocamento químico em $\delta=8,17$ ppm (d , $J = 4,4$ Hz) e $\delta=7,88$ ppm (d , $J = 4,4$ Hz), referentes aos átomos de hidrogênio H-3 e H-4 do anel pirimidínico, além de um dubleto com deslocamento químico em $\delta=8,01$ ppm (d , $J = 6,9$ Hz), referente ao átomo de hidrogênio H-5 acoplado tanto em posição *orto* com átomo de hidrogênio H-6 e deslocamento químico em $\delta=6,84$ ppm (dd , $J = 6,9$ e 1,7 Hz) quanto em posição *meta* com deslocamento químico em $\delta=6,99$ ppm (s):

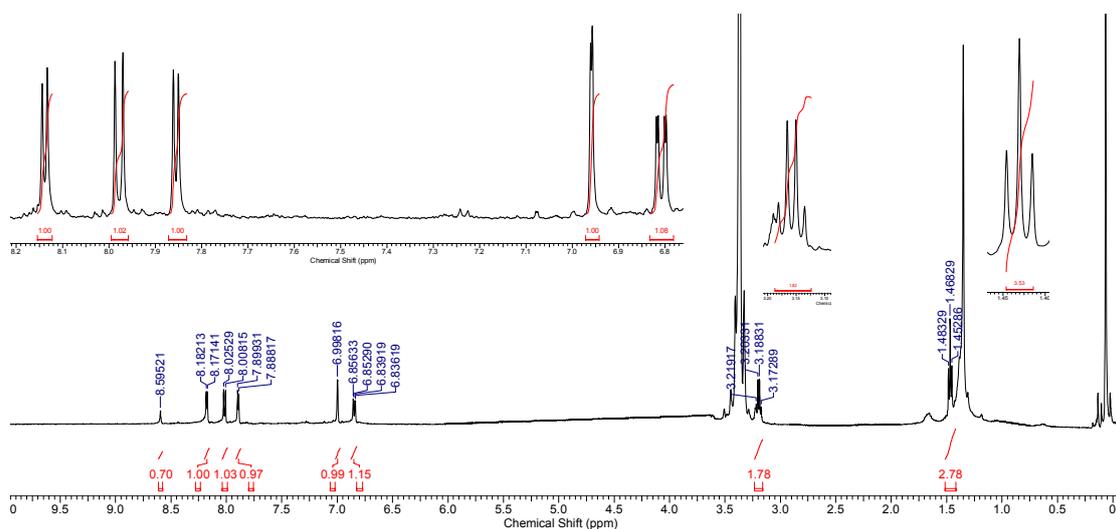


Figura 51. Espectro de RMN de ^1H da substância 9 (300 MHz, MeOD)

No espectro de RMN ^1H acima também são observados um quadrupletto com deslocamento químico em $\delta=3,14$ ppm (q , $J = 6,1$ Hz, 2H) e um tripleto com deslocamento químico em $\delta=1,46$ ppm (t , $J = 6,1$ Hz, 3H), os quais confirmam a presença de um grupo etila como substituinte no átomo de carbono C-1.

O acoplamento destes átomos de hidrogênio pode ser observado no resultado do experimento RMN COSY apresentado na Figura 56:

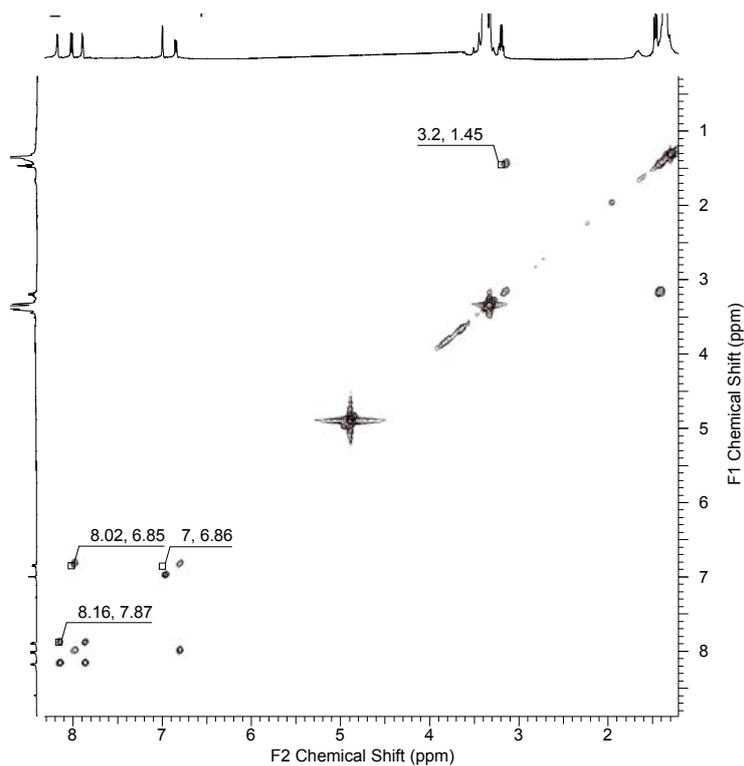


Figura 52. Espectro de COSY ^1H - ^1H da substância **9** (300 MHz, MeOD).

Os experimentos RMN HSQC e HMBC são mostrados nas Figuras 57 e 58:

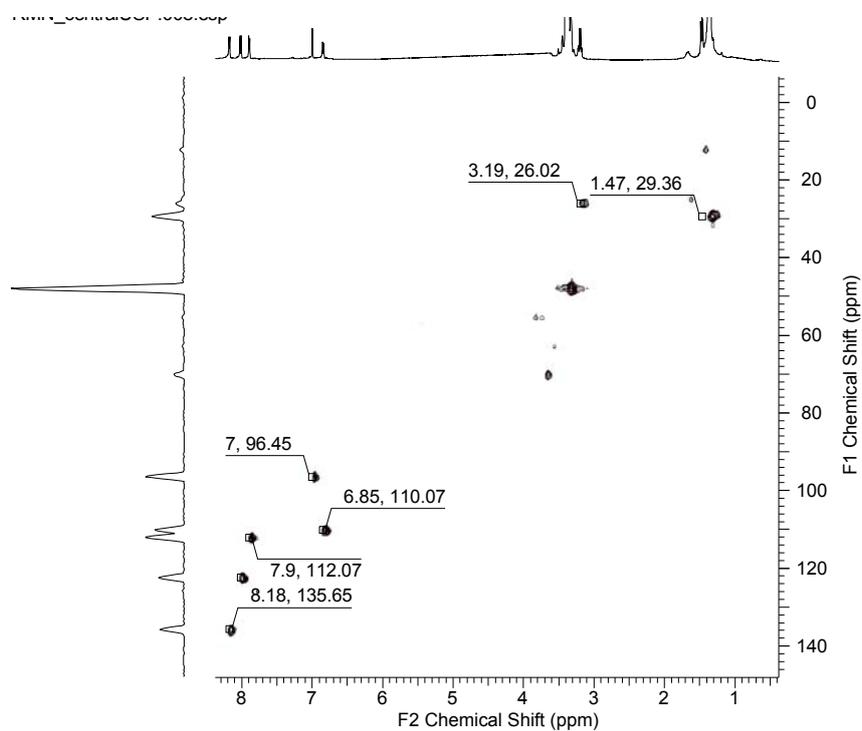


Figura 53. Mapa de correlações de HSQC da substância **9** (300 MHz, MeOD).

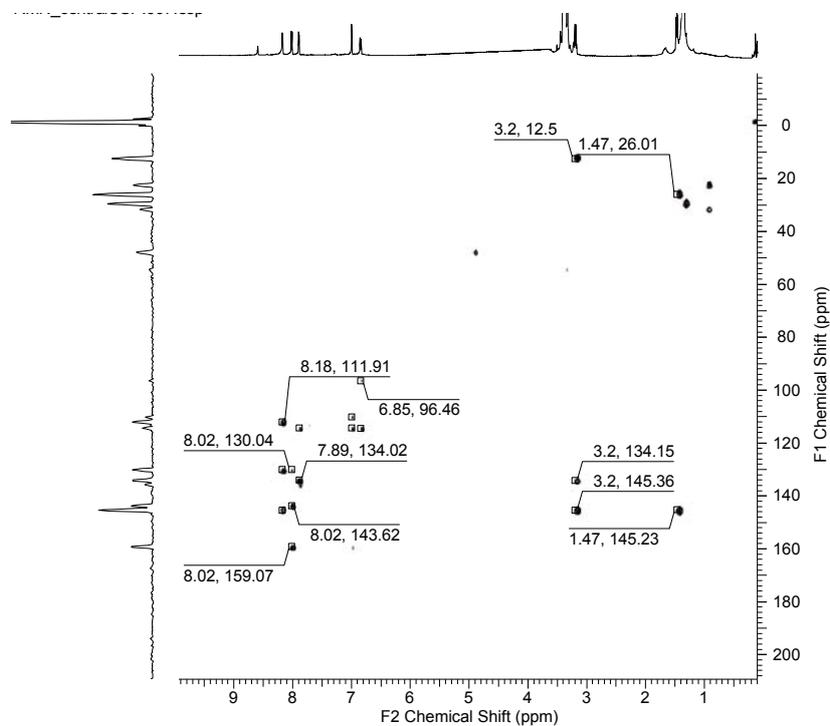


Figura 54. Mapa de correlações de HMBC da substância **9** (300 MHz, MeOD).

Os resultados obtidos nos experimentos RMN HSQC e HMBC permitiram a correlação entre átomos de hidrogênio com deslocamento químico em $\delta=3,18$ ppm e átomos de carbono com deslocamento químico em $\delta=26,0$ ppm, $\delta=125,0$ ppm, $\delta=145,36$ ppm e $\delta=134,1$, os quais podem ser atribuídos, respectivamente, aos átomos de carbonos C-1', C-4a e C-9a.

A partir do sinal com deslocamento químico em $\delta=1,46$ ppm foi possível verificar as correlações dos sinais referentes aos átomos de carbono com deslocamento químico em $\delta=26,0$ ppm, $\delta=29,3$ ppm e $\delta=145,36$ ppm; estas correlações levaram à atribuição dos valores de deslocamentos químicos de todos os átomos de carbono do alcalóide **9**.

Os dados espectroscópicos de RMN ^{13}C apresentados na Tabela 15, juntamente com o pico do íon molecular protonado $[\text{M}+\text{H}]$ com m/z 213,1027 e referente a fórmula molecular $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}$, obtido a partir do espectro de massas apresentado na Figura 59, confirmaram a natureza do alcalóide como 7-hidróxi-1-etil- β -carbonila.

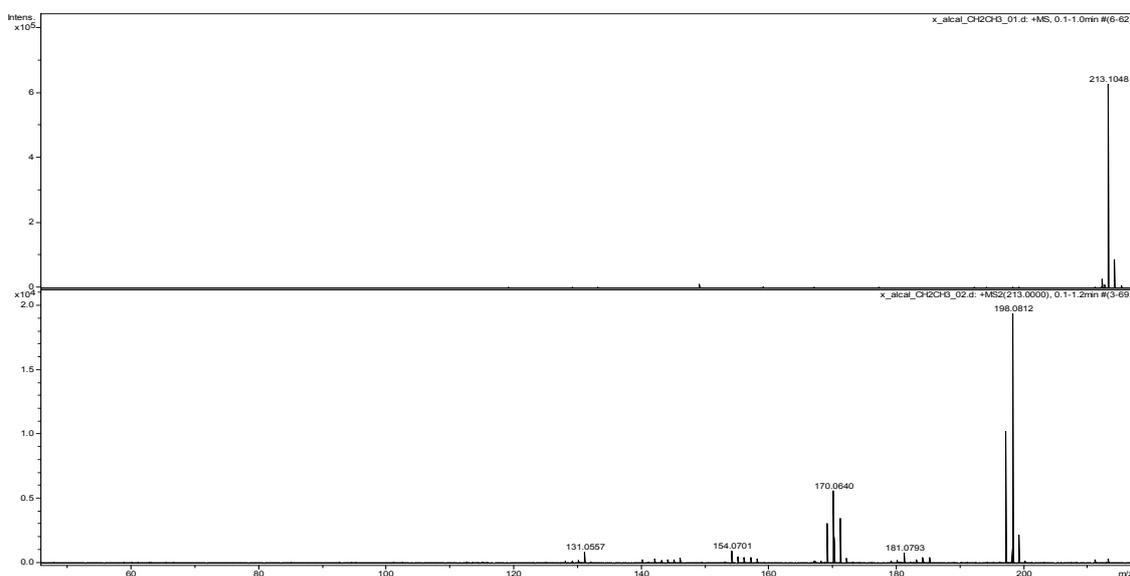


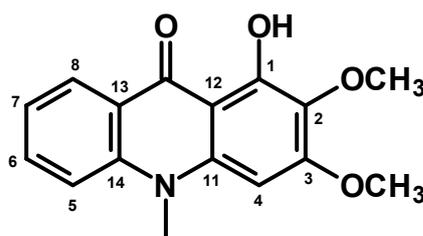
Figura 55. Espectro de massas da substância **9** (ESI Q-TOF)

Tabela 15. Dados de RMN ^{13}C do alcalóide **9**.

C	9
1	145,2
2	-
3	135,6
4	112,0
4a	130,0
5	122,3
5a	143,6
6	110,0
7	159,0
8	96,45
8a	114,3
9	-
9a	134,1
1'	26,0
2'	29,3

4.4.2.3 Alcalóide acridônico

O composto **10** foi isolado como sólido de coloração amarela e identificado por RMN ^1H , HSQC e HMBC, em comparação com a literatura (BERGENTHAL *et al.*, 1979).



Substância **10**

No espectro de RMN ^1H de **10** (Figura 56) é possível verificar a presença de quatro sinais na região de átomos de hidrogênio aromático, com deslocamentos químicos em $\delta=8,37$ ppm (*dd*, $J = 8,0$ e $1,6$ Hz), $\delta=7,69$ ppm (*ddd*, $J = 8,8$; $7,0$ e $1,4$ Hz), $\delta=7,62$ ppm (*dl*, $J = 8,4$ Hz) e $\delta=7,25$ ppm (*ddd*, $J = 8,0$; $7,2$ e $1,2$ Hz), referentes aos átomos de hidrogênio H-8, H-7, H-5 E H-6, respectivamente, evidenciando um anel *orto* substituído

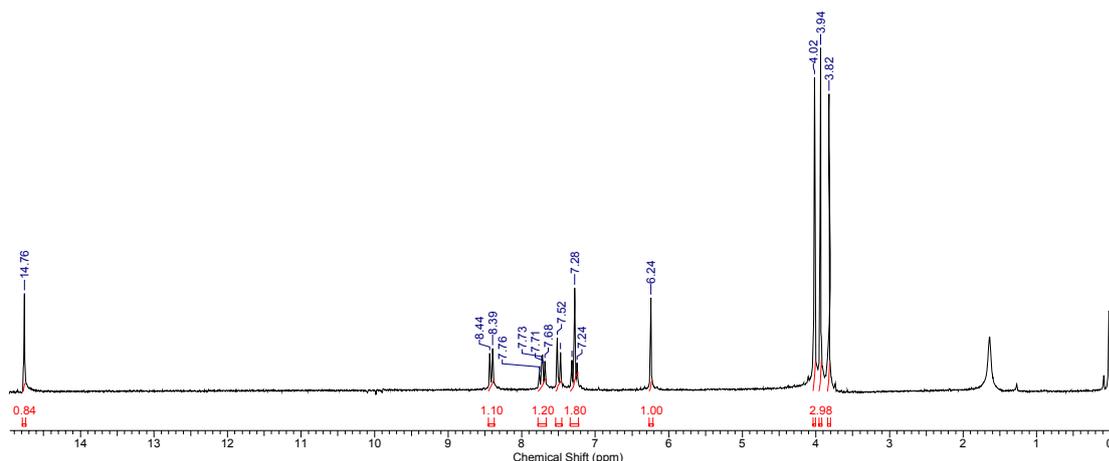


Figura 56. Espectro de RMN de ^1H da substância **10** (200 MHz, CDCl_3).

Além disto, foram observados três singletos relativos a grupos metila ligados a um heteroátomo com deslocamento químico em $\delta=4,02$ ppm, $\delta=3,94$ ppm e $\delta=3,82$ ppm, um singlete de átomo de hidrogênio aromático com deslocamento químico em $\delta=6,24$ ppm e um sinal com deslocamento químico em δ 14,76 ppm referente a um grupo hidroxila quelado.

Estes dados espectroscópicos, em conjunto com o conhecimento de que em plantas da família Rutaceae é verificada a ocorrência de alcalóides derivados do ácido antranílico, sugere que a substância **10** é um alcalóide acridônico.

A presença de um grupo hidroxila quelado evidencia a presença de uma substituição em C-1 por uma hidroxila. Os sinais com deslocamento químico em $\delta=4,02$ ppm, $\delta=3,94$ ppm e $\delta=3,82$ ppm apresentam correlações no mapa de HSQC (apresentado na Figura 57) com átomos com deslocamento químico em $\delta=61,3$ ppm, $\delta=56,2$ ppm e $\delta=34,6$ ppm, confirmando assim a presença de dois grupos metoxila, onde o sinal mais blindado em $\delta=3,82$ ppm correspondente a um grupo $N\text{-CH}_3$.

No mapa de correlações de HMBC, apresentado na Figura 58, o sinal com deslocamento químico $\delta=6,24$ ppm apresenta correlação com os sinais de átomos de carbono com deslocamento em $\delta=130,2$ ppm e 159,8 ppm, confirmando a presença das metoxilas em C-2 e C-3.

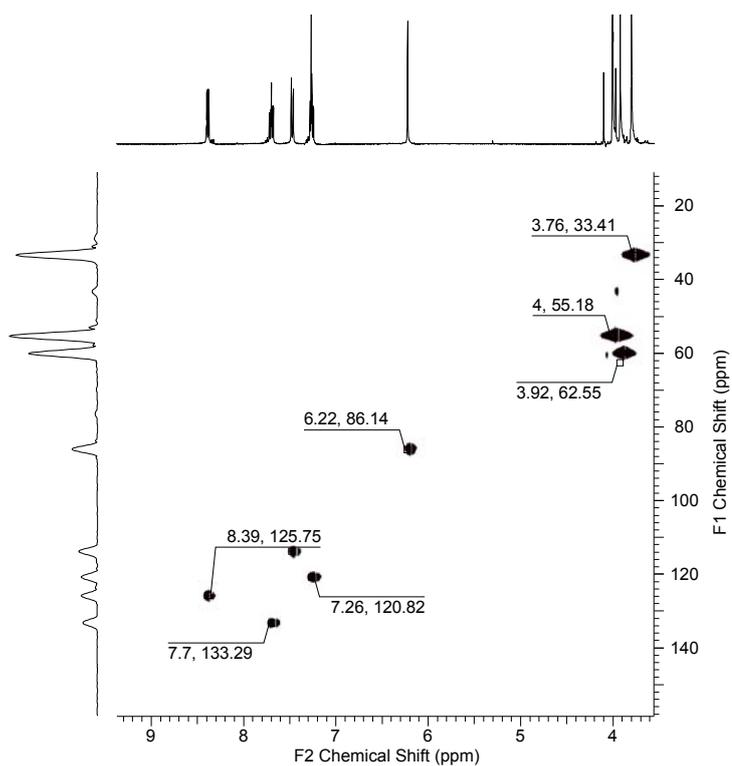


Figura 57. Mapa de correlações de HSQC da substância **10** (400 MHz, CDCl₃).

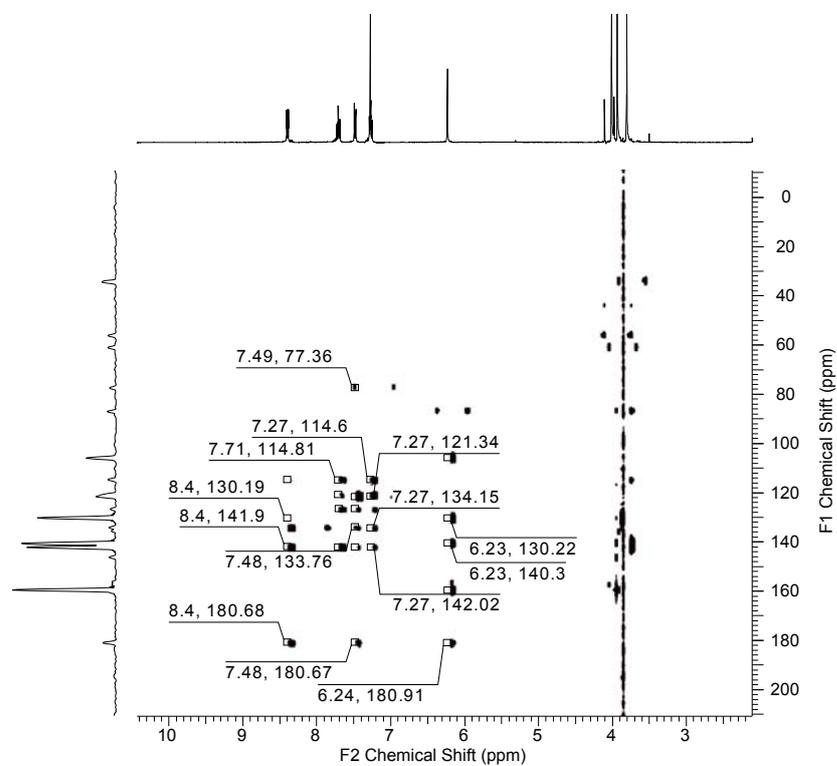


Figura 58. Mapa de correlações de HMBC da substância **10** (400 MHz, CDCl₃).

Os deslocamentos químicos dos átomos de carbono foram atribuídos a partir dos dados obtidos pelos mapas de correlações de HSQC e HMBC; estes dados estão sumarizados juntamente com os dados de RMN¹H na Tabela 16.

Os dados espectroscópicos indicam que o composto **10** é um alcalóide acridônico substituído em C-1, C-2 e C-3; este composto é conhecido como arborinina, com ampla ocorrência na família Rutaceae.

No espectro de massas obtido a partir de respectivas variações de energia de colisão é possível identificar o pico do íon molecular protonado [M+H] m/z 286,1088, correspondente à fórmula molecular C₁₆H₁₅N O₄. Os dados espectrométricos são mostrados na Tabela 16 e na Figura 59:

Tabela 16. Dados de RMN de ¹H e de ¹³C da substância **10**

H/C	¹ H	¹³ C*	¹³ C**
1	-	157,2	155,8
2	-	130,2	130,2
3	-	159,8	159,2
4	6,21 (s)	86,8	86,7
5	7,25 (ddd, J = 8,0; 7,2, 1,2 Hz)	115,3	114,5
6	7,62 (dl, J = 8,4 Hz)	133,9	133,9
7	7,69 (ddd, J = 8,8; 7,0, 1,4 Hz)	121,2	121,4
8	8,37 (dd, J = 8,0, 1,6 Hz)	126,2	126,6
9	-	193,7	180,8
10	-	-	-
11	-	142,6	140,4
12	-	105,4	105,8
13	-	120,0	120,7
14	-	146,6	142,0
N-CH ₃	3,79 (s, 3H)	34,6	34,1
2-OCH ₃	3,91 (s, 3H)	61,3	60,8
3-OCH ₃	4,09 (s, 3H)	56,2	56,0

(*) Valores experimentais; (**) Valores de referência; BERGENTHAL *et al.*, 1979.

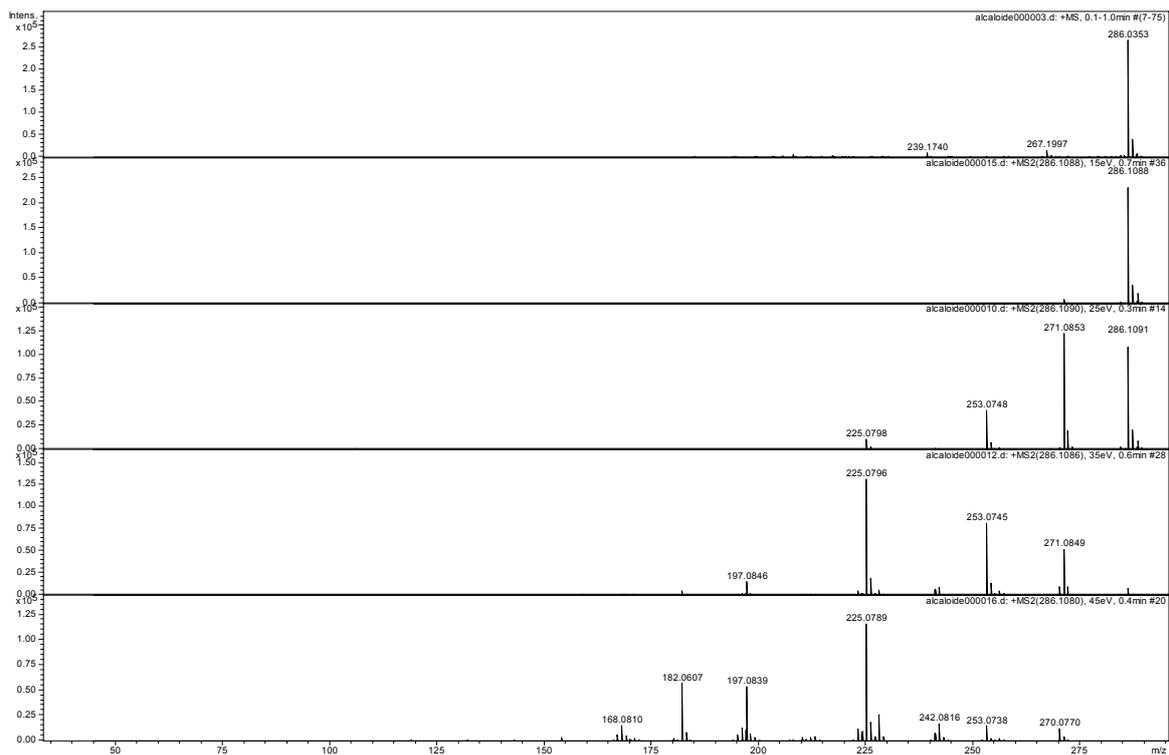


Figura 59. Espectro de massas da substância **10** com respectivas variações de energia de colisão (ESI Q-TOF – 15 / 25 / 35 / 45 eV)

4.5 Estudo de produtos naturais na busca por inibidores

4.5.1 Produtos naturais isolados de *Zanthoxylum acuminatum*

As substâncias isoladas de *Z. acuminatum* foram inicialmente ensaiadas frente a catepsina L e a catepsina V na concentração única de 25 μM , os valores de inibição frente as duas enzimas estão apresentados na Tabela 17.

Tabela 17. Valores de inibição a 25 μM para os compostos isolados de *Z. acuminatum* frente a catepsina L e V.

Substância	Catepsina L (%)	Catepsina V (%)
1	0	0
2	0	15
3	0	14
4	0	0
5	53	8
6	ND*	ND
7	27	17
8	28	15
9	16	15
10	0	0

(*): ND = Não determinado

Dentre os compostos ensaiados, apenas cumarina geranilada, substância **5**, apresentou inibição superior a 50%, mostrando-se mais ativa e seletiva frente a catepsina L. O valor de IC_{50} foi de 30 μM para a catepsina L e de 102 μM para a catepsina V. Estes valores de potência frente às catepsinas L e V foram determinados a partir de método gráfico de regressão não linear e estão apresentados nas Figura 60 e 65:

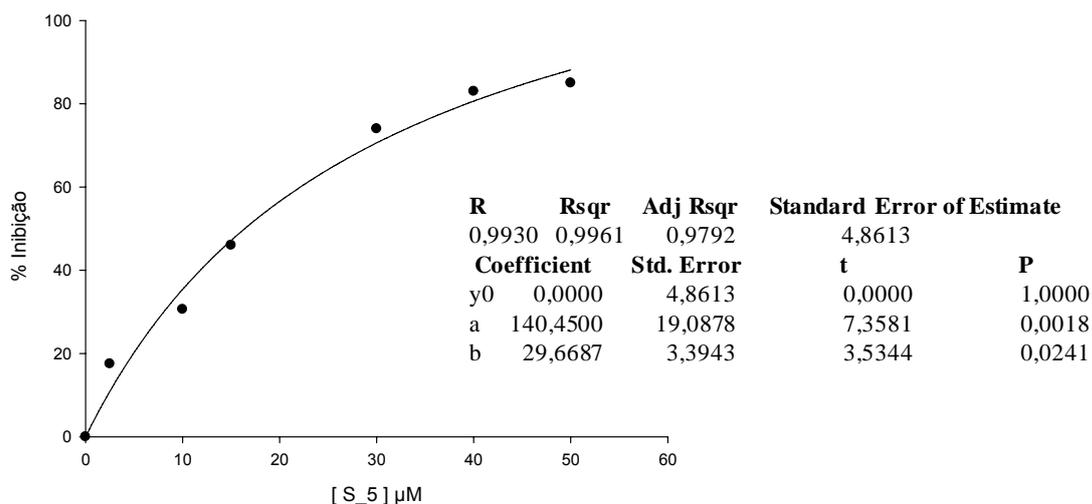


Figura 60. Gráfico de IC₅₀ da substância **5** frente a catepsina L.

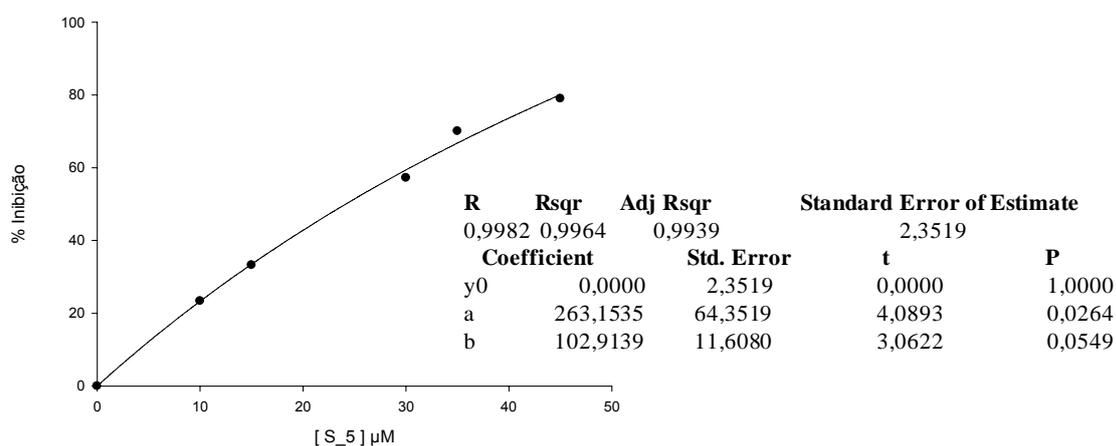


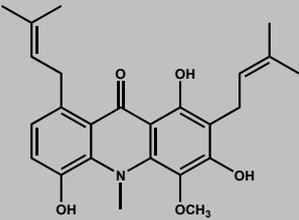
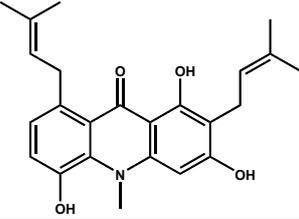
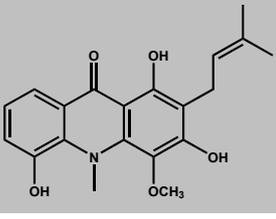
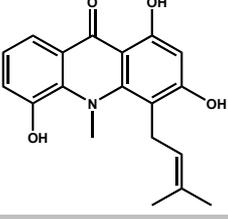
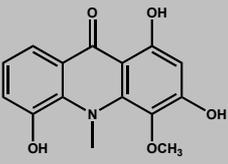
Figura 61. Gráfico de IC₅₀ da substância **5** frente a catepsina V.

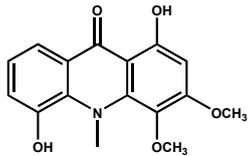
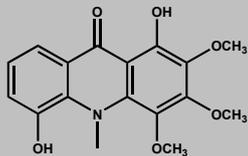
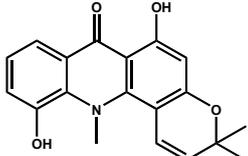
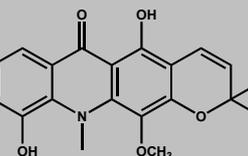
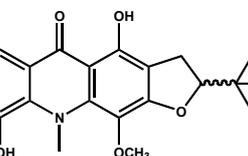
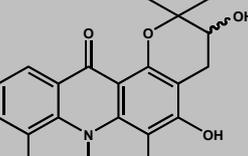
4.5.2 Produtos naturais isolados de *Swinglea glutinosa*

Visando a busca por inibidores específicos para enzimas e baseando-se nos resultados preliminares obtidos em projeto de doutorado anterior (SEVERINO, 2008), no qual os alcalóides acridônicos são substâncias alvos de grande importância na busca por inibidores desta enzima, realizou-se um estudo complementar com os alcalóides isolados de *Swinglea glutinosa* frente à catepsina L.

A série avaliada continha 11 compostos de origem natural sem nenhuma modificação estrutural. Para esta série foi determinado o valor de potencia de inibição (IC_{50}) frente a catepsina L, a fim de comparação entre as catepsinas V e L. Os valores de potência e seletividade obtidos para esta série estão apresentados na Tabela 18:

Tabela 18. Valores de potência e de seletividade dos alcalóides acridônicos isolados frente as catepsinas L e V.

Inibidor	Estrutura	Catepsina L IC_{50} (μ M)	Catepsina V IC_{50} (μ M)*	Seletividade (S)
PN_AC_01		$0,9 \pm 0,1$	$1,5 \pm 0,2$	0,6
PN_AC_02		$0,8 \pm 0,09$	$3,9 \pm 0,9$	0,2
PN_AC_03		$1,7 \pm 0,2$	$2,2 \pm 0,2$	0,8
PN_AC_04		23 ± 2	26 ± 5	0,9
PN_AC_05		19 ± 2	$9,8 \pm 1$	2,0

PN_AC_06		$1,9 \pm 0,2$	$2,2 \pm 0,6$	0,9
PN_AC_07		$1,5 \pm 0,2$	$1,2 \pm 0,1$	1,3
PN_AC_08		62 ± 5	48 ± 5	1,3
PN_AC_09		57 ± 5	44 ± 3	1,3
PN_AC_10		$16 \pm 0,9$	$5,2 \pm 0,2$	3,0
PN_AC_11		$7 \pm 0,5$	$2,8 \pm 0,7$	2,5

* Dados obtidos no projeto FAPESP 2003/12588-0: (SEVERINO, 2008)

O fator de potência deste grupo de compostos pode ser representado pela razão entre os valores maiores e menores. Neste caso, as ordens de grandeza são de aproximadamente 78 para a catepsina L e de 40 para a catepsina V; estes dados não representam uma ampla faixa de distribuição. A presença de inibidores nas faixas de alta, moderada e baixa potência é desejada quando se requer informações

mais detalhadas sobre a natureza das relações entre a estrutura e atividade (SAR) de uma série de compostos.

Por outro lado, a pequena faixa de potência verificada pode ser avaliada como forma a apontar os alcalóides acridônicos como potentes inibidores tanto da catepsina L como da catepsina V. Dentre os compostos testados, a variação entre os valores de IC_{50} encontrados foi de 0,9 a 57 μM para a catepsina L e de 1,5 a 48 μM para a catepsina V.

Dentre os compostos testados, a variação entre os valores de IC_{50} encontrados está entre 0,9 e 57 μM para a catepsina L e entre 1,5 e 48 μM para a catepsina V. Os compostos considerados como os mais potentes da série foram **PN_AC_01** e o **PN_AC_02**, com valores respectivos de IC_{50} de 0,9 e 0,8 μM frente a catepsina L. O composto **PN_AC_07** apresentou-se como o composto mais potente frente a catepsina V, com valor de IC_{50} de 1,2 μM .

Na busca por novas espécies químicas que sirvam como fármacos ou protótipos é de suma importância a seletividade de um composto alvo frente a apenas uma enzima. As catepsinas L e V apresentam alta similaridade, assim, a busca por inibidores seletivos é um grande desafio. A seletividade verificada nesta pequena série de compostos com pouca diversidade estrutural foi baixa, porém, compostos como **PN_AC_05** e **PN_AC_11** apresentaram seletividade cerca de duas vezes maior frente a catepsina V, enquanto que o composto **PN_AC_10**, cerca de três vezes.

A presença do grupo substituinte prenila em C-8 no anel A não interfere na potência destes compostos quando se compara os compostos **PN_AC_01** e **PN_AC_03**; assim também ocorre com a presença de um grupo metoxila em C-4 quando comparados os compostos **PN_AC_01** e **PN_AC_02**.

Para os compostos **PN_AC_03** e o **PN_AC_04** verifica-se que a presença do grupo prenila em C-2 no anel B é grande importância para o mecanismo de inibição, levando a diminuição no valor de potência por um fator de 25 vezes; a ausência do grupo prenila no composto **PN_AC_05** reafirma esta observação.

Além disto, a comparação entre os compostos **PN_AC_05**, **PN_AC_06** e **PN_AC_07** leva à constatação que o grupo metoxila em C-3 ocasiona um aumento da potência, porém, o acréscimo de mais um grupo metoxila em C-2 não ocasiona diferença significativa.

É interessante observar que na série de alcalóides ensaiados a presença do grupo prenila leva a melhor participação na potência em relação aos compostos onde houve ciclização intra-molecular do grupo prenila com formação de um novo anel. Além disto, ao comparar os valores de IC₅₀ dos alcalóides prenilados em relação aos alcalóides que sofreram ciclização, é possível verificar que os prenilados demonstram uma tendência mais seletiva para a catepsina L, enquanto que os ciclizados são mais seletivos para a catepsina V.

Mesmo com a moderada seletividade apresentada nesta série, as informações obtidas são altamente relevantes, podendo servir como subsídio para o planejamento de rotas de síntese de compostos que apresentem maiores valores de potência e seletividade frente a uma das enzimas estudadas. Cabe também ressaltar que os dados obtidos aqui apresentados são inéditos para as enzimas alvos e reforçam a importância dos mesmos.

4.6 Estudo de produtos sintéticos na busca de inibidores

Em prosseguimento na busca por inibidores específicos para a catepsina L, após obtenção de resultado preliminar no qual verificou-se que os alcalóides acridônicos são inibidores de catepsinas, foram ensaiados algumas substâncias sintéticas tais como ácidos *N*-aril antranílicos, alcalóides acridônicos sintéticos e uma série de alcalóides 4-quinolínicos-2-substituídos sintetizados no Laboratório de Síntese de Produtos Naturais da UFSCar.

4.6.1 Produtos sintéticos: ácidos *N*-aril antranílicos

Os ácidos *N*-aril antranílicos foram sintetizados no Laboratório de Síntese de Produtos Naturais da UFSCar, de acordo com metodologia sintética por irradiação com microondas, via acoplamento de Ullmann entre o ácido antranílico e diferentes brometos de aril (BUENO, *et al.*, 2008).

A série avaliada continha 17 compostos nos quais os substituintes foram variados aleatoriamente nas posições R₁; R₂; R₃; R₄ e R₅, como apresentado na Figura 62:

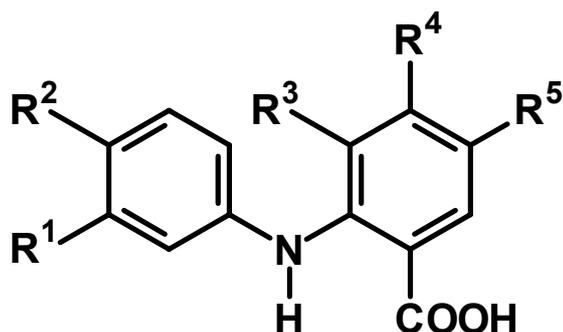


Figura 62. Estrutura geral para o ácido *N*-aril antranílico

Para essa série foram determinados valor de potencia de inibição (IC_{50}) e seletividade (S), os quais estão apresentados na Tabela 19:

O valor de potência para esta série foi de 23 para a catepsina L e 52 para a catepsina V; a variação entre os valores de IC_{50} encontrados está na faixa entre 2,1 e 26,2 μ M para a catepsina L e 0,96 e 25,2 μ M para a catepsina V.

Dentre os ácidos *N*-aril antranílicos o composto mais potente foi o composto **A_11**, com valor de potência de 0,96 μ M, configurando-se um inibidor cerca de três vezes mais seletivo frente à catepsina V. No geral, esta série de compostos demonstrou comportamento mais seletivo frente a catepsina V, como pôde ser verificado para os compostos **A_08**, **A_13**, **A_14**, **A_15**, **A_16** e **A_17**.

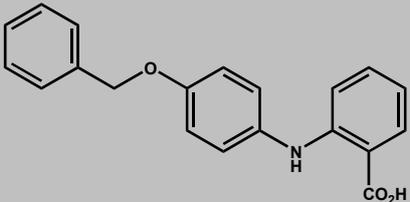
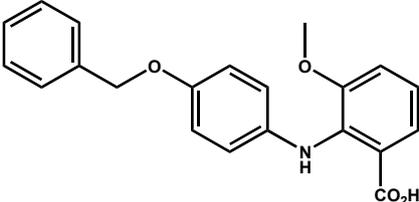
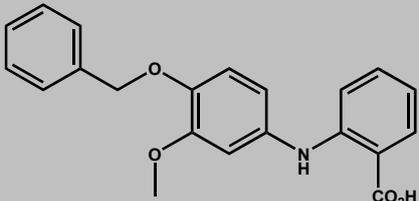
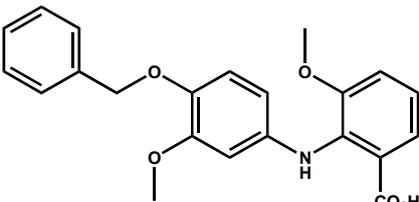
Uma comparação detalhada entre as estruturas dos compostos **A_1** e **A_2**, entre **A_3** e **A_4** e entre **A_6** e **A_7** e suas respectivas potências permitem concluir que há grande relação estrutura e atividade para estes pares de compostos pois a adição de uma metoxila em R-3 leva a diminuição da potência por um fator acima de cinqüenta vezes.

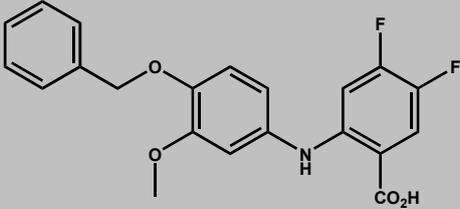
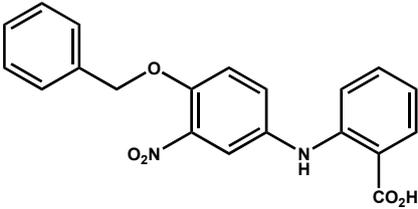
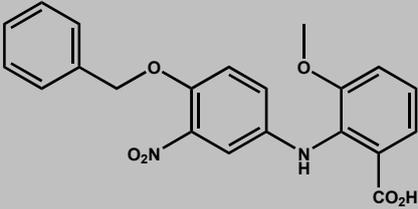
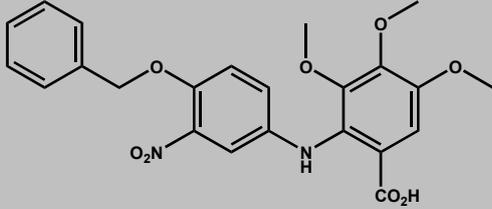
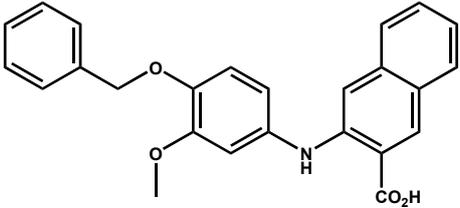
A presença do grupo nitro em R-1 acarreta um aumento na potência inibitória dos compostos **A_6** e **A_8** em comparação com seus respectivos compostos análogos **A_3** e **A_5**, nos quais há presença de uma metoxila em R-1.

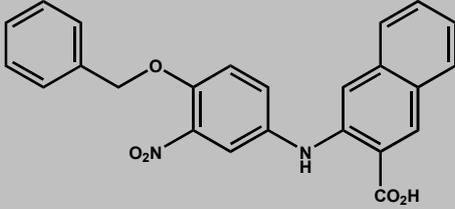
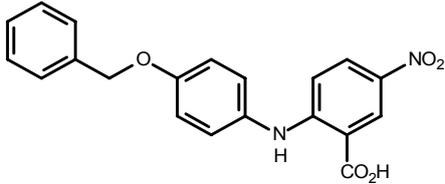
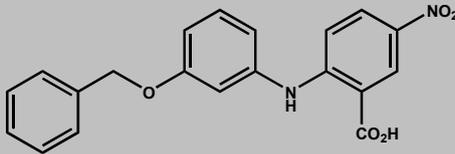
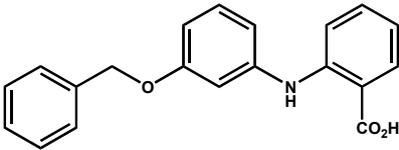
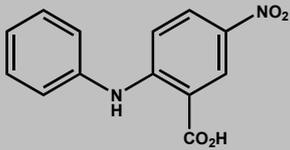
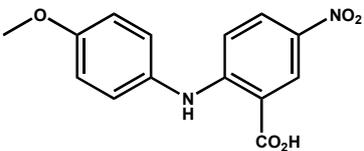
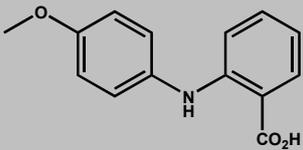
Para os compostos **A_13** e **A_14**, a substituição do grupo benzílico de R-2 para R-1, em comparação com os seus respectivos análogos, demonstrou que a presença de BnO em R-2 levou à maior potência e seletividade deste composto frente a catepsina L. No caso composto **A_14**, onde o substituinte BnO localiza-se em R-1, verifica-se o oposto, ou seja, maior potência e seletividade para a catepsina V.

Os compostos **A_10** e **A_11** apresentam anel aromático adicional e diferem pela presença dos substituintes nitro e metoxil em R-1. Esta diferença estrutural acarretou pequena diferenciação no valor de potência para a catepsina L; também foi observado que a presença do grupo nitro em R-1 possibilitou maior seletividade deste inibidor frente a catepsina V.

Tabela 19. Valores de potência e de seletividade dos ácidos *N*-aril antranílicos frente às catepsinas L e V.

Inibidor	ESTRUTRURA	Catepsina		Seletividade (S)
		L IC ₅₀ (μM)	V IC ₅₀ (μM)	
A_01		3,2 ± 0,4	6,9 ± 0,1	0,5
A_02		> 50	> 50	-
A_03		26 ± 0,3	25 ± 0,3	1,0
A_04		> 50	> 50	-

A_05		$11 \pm 0,3$	$9 \pm 0,4$	1,2
A_06		$5,7 \pm 0,1$	$6,8 \pm 0,2$	0,9
A_07		> 50	> 50	-
A_08		$7,2 \pm 0,2$	$3,5 \pm 0,02$	2,0
A_09		$18,2 \pm 0,04$	$12,3 \pm 1,3$	1,5
A_10		$2,1 \pm 0,005$	$1,8 \pm 0,01$	1,2

A_11		$2,9 \pm 0,3$	$1 \pm 0,06$	3,0
A_12		> 50	> 50	-
A_13		$2,5 \pm 0,05$	$1,5 \pm 0,04$	1,7
A_14		$7,9 \pm 0,23$	$2,1 \pm 0,2$	3,8
A_15		$43 \pm 0,2$	$10 \pm 0,8$	4,4
A_16		$45 \pm 0,04$	$15 \pm 0,5$	3,1
A_17		> 50	> 50	-

4.6.2 Produtos sintéticos: alcalóides acridônicos

Os ácidos *N*-aril antranílicos foram submetidos à ciclização, dando origem a 10 alcalóides acridônicos. Estes compostos foram avaliados frente a catepsina L e catepsina V. Determinou-se a potência de inibição (IC_{50}) e a seletividade (S); os dados obtidos estão apresentados na Tabela 20:

A faixa de potência varia entre 0,46 – 19,3 μ M para a catepsina L e entre 1,65 – 17,9 μ M para a catepsina V; os fatores de potência são de aproximadamente 42 e 11, respectivamente. Estes dados, juntamente com a pequena seletividade verificada, reforçam o potencial da classe como inibidores não seletivos da catepsina L e V.

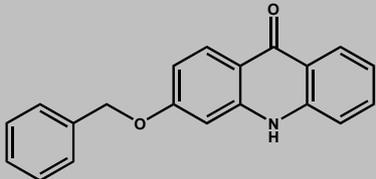
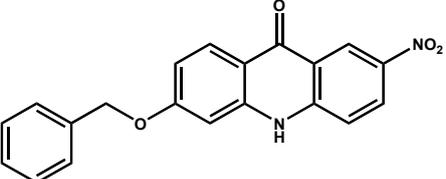
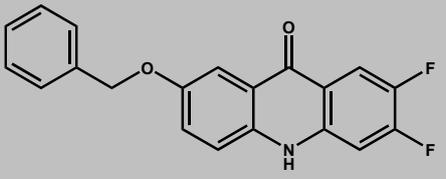
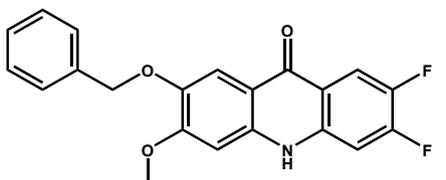
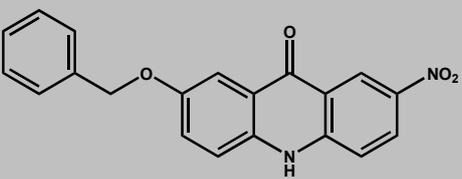
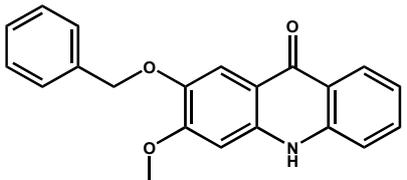
Nesta série avaliada os compostos mais potentes frente a catepsina L foram o composto **AC_05**, apresentando valor de IC_{50} de 0,46 μ M, e o composto **AC_06**, com valor de IC_{50} de 1,06 μ M; comparando-se as estruturas destes dois compostos percebe-se a ausência do grupo nitro na posição 6 e o acréscimo de um grupo metoxila na posição 2. Ambos compostos apresentaram maior seletividade frente a catepsina L.

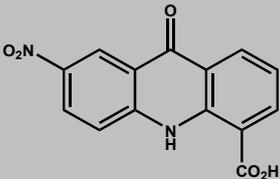
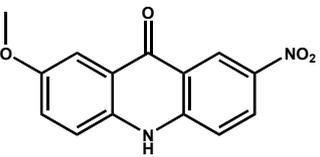
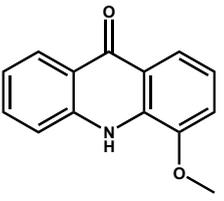
Para a realização do estudo da relação entre estrutura e atividade (SAR) é necessário grande número de compostos; a série de alcalóides acridônicos corresponde a uma pequena coleção, porém, várias considerações podem ser extraídas e utilizadas para o desenho de novas estruturas que sejam mais potentes inibidoras das catepsinas.

Os compostos **AC_03** e **AC_04** apresentam dois átomos de flúor nas posições 6 e 7 e diferem pela presença de um grupo metoxila na posição 2, o que acarretou diminuição no valor de potência de inibição por um fator de cerca de vinte vezes.

A mudança do substituinte benzílico no composto **AC_02** em relação ao **AC_05** não acarretou aumento proporcional no desempenho de potência, demonstrando assim a importância da localização espacial deste substituinte, o qual possivelmente acomoda-se no sítio da enzima de forma mais efetiva e interage de maneira mais eficiente com resíduos de aminoácidos.

Tabela 20. Valores de potência e de seletividade dos alcalóides acridônicos sintéticos frente a catepsina L e V.

Inibidor	ESTRUTURA	Catepsina L IC ₅₀ (μM)	Catepsina V IC ₅₀ (μM)	Seletividade (S)
AC_01		3,9 ± 0,1	3,6 ± 0,1	1,1
AC_02		13 ± 0,1	8,2 ± 0,2	1,5
AC_03		1,5 ± 0,1	4,9 ± 0,3	0,3
AC_04		19 ± 0,1	18 ± 0,2	1,1
AC-05		0,5 ± 0,01	1,7 ± 0,08	0,3
AC_06		1,1 ± 0,02	1,7 ± 0,09	0,7

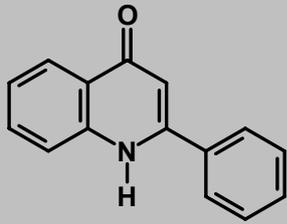
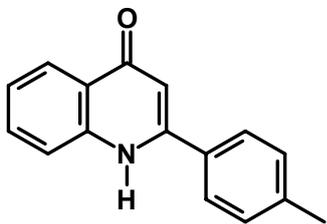
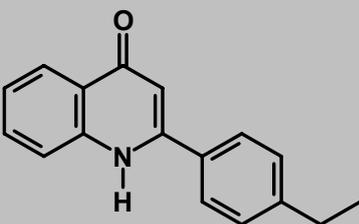
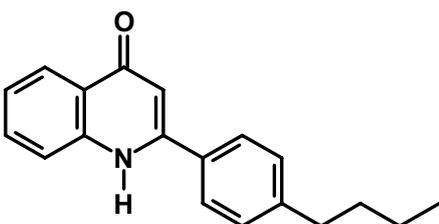
AC_07		$6,8 \pm 0,08$	$7,2 \pm 0,08$	0,9
AC_08		$1,6 \pm 0,005$	$2,0 \pm 0,02$	0,8
AC_09		ND*	ND	-
AC_10		ND	ND	-

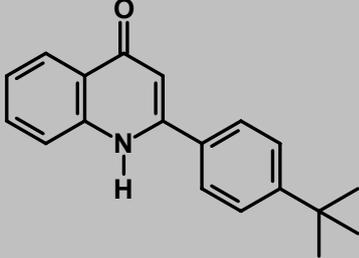
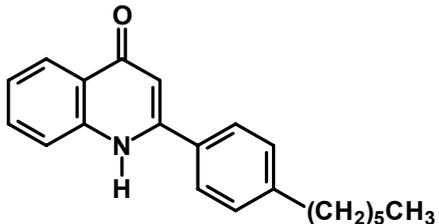
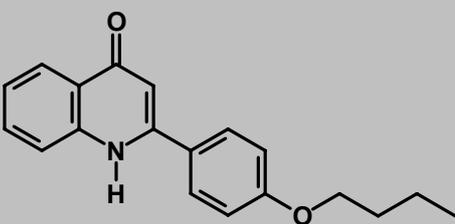
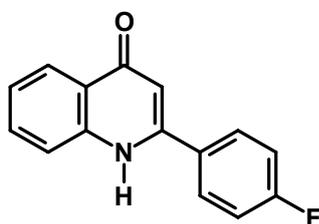
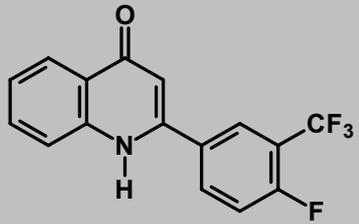
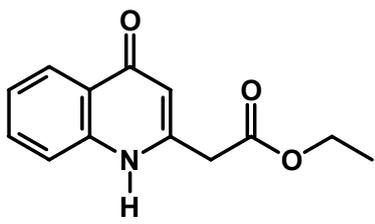
(*) ND = não determinado

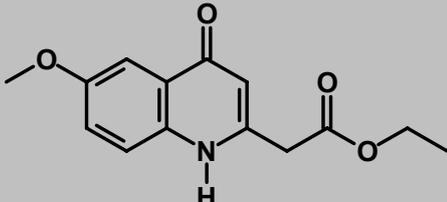
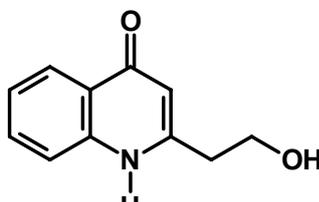
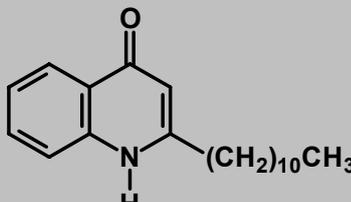
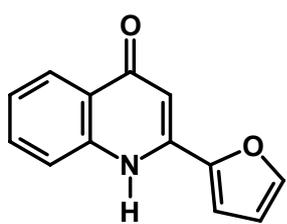
4.6.3 Produtos sintéticos: alcalóides 4-quinolínicos-2-substituídos

Uma série com 14 alcalóides 4-quinolínicos-2-substituídos foi ensaiada e avaliada em relação a seu potencial como inibidores das catepsinas L e V; os resultados obtidos para os valores de potência de inibição (IC_{50}) e seletividade (S) encontram-se descritos na Tabela 21:

Tabela 21. Valores de potência e de seletividade dos alcalóides sintéticos 4-quinolínicos-2-substituídos sintéticos frente a catepsina L e V.

Inibidor	ESTRUTURA	Catepsina L IC_{50} (μ M)	Catepsina V IC_{50} (μ M)	Seletividade (S)
Q_01		$2,6 \pm 0,1$	$4,7 \pm 0,1$	0,6
Q_02		$15 \pm 1,2$	$5,0 \pm 0,9$	3,0
Q_03		$16 \pm 0,3$	$16 \pm 1,5$	1,0
Q_04		$1,6 \pm 0,2$	$5,2 \pm 0,1$	0,3

Q_05		$6,8 \pm 0,6$	$12 \pm 0,9$	0,6
Q_06		$9,0 \pm 0,8$	$8,5 \pm 0,7$	1,0
Q_07		$8,6 \pm 0,7$	$15 \pm 1,1$	0,6
Q_08		$20 \pm 0,8$	$20 \pm 0,5$	1,0
Q_09		$15 \pm 1,3$	$10 \pm 1,1$	1,5
Q_10		$49 \pm 1,4$	$62 \pm 1,2$	0,8

Q_11		$30 \pm 2,3$	$18 \pm 1,9$	1,7
Q_12		$20 \pm 2,1$	$18 \pm 1,7$	1,0
Q_13		$2,9 \pm 0,3$	$9,9 \pm 0,2$	0,3
Q_14		$2,6 \pm 0,1$	$4,7 \pm 0,1$	0,6

Os fatores de potência desta série estudada são de aproximadamente 31 para a catepsina L e de 22 para a catepsina V, com faixas de potências variando entre 1,6 – 49,1 μM para a catepsina L e 2,8 – 61,4 μM para a catepsina V. A seletividade mostrada é pequena mas foi possível observar maior tendência seletiva em relação à catepsina L.

Dentre os compostos avaliados nesta série de alcalóides 4-quinolínicos-2-substituídos, o composto mais potente frente a catepsina L foi o composto **Q_04**, apresentando valor de potência de 1,6 μM . Os compostos **Q_01** e **Q_14** apresentaram valores de IC_{50} de 4,7 μM e foram considerados os compostos mais potentes frente a catepsina V.

No que diz respeito aos compostos **Q_01** a **Q_06**, uma comparação detalhada entre as estruturas avaliadas e suas respectivas potências demonstram

que a presença de grupos substituintes alquílicos no anel B influencia diretamente na potência da séria avaliada.

O composto **Q_04** apresenta valor de IC_{50} de 1,6 μ M frente a catepsina L, enquanto o composto **Q_06** apresenta valor de IC_{50} de 9,0 μ M, demonstrando assim que há um número limite átomos de carbonos para o qual ocorre aumento de desempenho de potência.

Ao compararmos os composto **Q_04** e **Q_07**, podemos inferir que a presença do átomo de oxigênio no composto **Q_07** acarretou diminuição do valor da potência por um fator de dez para ambas catepsinas.

Os compostos **Q_08** e **Q_09** também apresentam substituintes receptores de elétrons quando comparados com composto **Q_01**; também é possível inferir que a presença destes substituintes leva à diminuição do valor de potência frente às catepsinas L e V.

Já os compostos **Q_10** a **Q_14**, quando comparados estruturalmente com outros da série, sofrem perda do anel B; esta perda do anel nos compostos **Q_10** a **Q_12** provocou diminuição do valor de potência: a presença do grupamento hidroxila em relação ao grupamento éster no composto **Q_10** acarretou melhor desempenho de potência em relação ao composto **Q_12**.

O composto **Q_13** possui uma cadeia alquílica com 11 átomos de carbono enquanto no composto **Q_14** há um anel furano; ambos substituintes acarretaram melhor desempenho de potência frente às catepsinas em estudo, entretanto, a presença do substituinte alquílico em **Q_13** permitiu ainda melhores desempenhos de potência e seletividade frente a catepsina L.

4.7 Determinação do mecanismo de inibição

Os inibidores enzimáticos atuam através de mecanismos que podem ser irreversíveis ou reversíveis, para tal associam-se à enzima levando à formação do complexo enzima-substrato que podem ser formados por ligações intermoleculares não covalentes (E•I) ou covalentes (E-I). Os inibidores irreversíveis acarretam a inativação da enzima enquanto que os reversíveis ligam se à enzima levando a uma

perda da atividade enzimática que pode ser recuperada com a remoção do inibidor. (COPELAND, 2000).

Na busca de inibidores enzimáticos para o planejamento de fármacos é desejável que o inibidor se ligue à enzima de forma não covalente, rapidamente e reversível, sem alterar a estrutura da enzima, levando à formação do complexo (E•I). Os inibidores reversíveis podem ser classificados em três tipos: 1) competitivos; 2) não competitivos e 3) incompetitivos.

Dentre os compostos avaliados foram selecionados para a determinação do mecanismo de inibição em Os inibidores enzimáticos atuam através de mecanismos que podem ser reversíveis ou irreversíveis; nestes mecanismos os inibidores enzimáticos associam-se à enzima, levando à formação do complexo enzima-substrato, o qual pode ser formado por ligações inter-moleculares não covalentes (E•I) ou covalentes (E-I).

Os inibidores irreversíveis provocam a inativação da enzima enquanto que os reversíveis ligam-se à enzima, ocasionando perda de atividade enzimática que pode ser recuperada com a remoção do inibidor. (COPELAND, 2000).

Na busca por inibidores enzimáticos úteis ao planejamento de fármacos é desejável que o inibidor ligue-se à enzima de forma não covalente, rápida e reversível, sem provocar alteração estrutural da enzima e levando à formação do complexo (E•I).

Os inibidores reversíveis podem ser classificados em três tipos:

- 1) competitivos;
- 2) não competitivos;
- 3) incompetitivos.

Para a determinação do mecanismo de inibição em relação ao substrato Z-FR-MCA foram selecionados, dentre os compostos avaliados em relação às catepsinas L e V, os seguintes compostos:

- a) Alcalóides naturais: **PN_AC_01** e **PN_AC_03**
- b) Ácidos *N*-aril antranílicos: **A_10** e **A_11**
- c) Alcalóides sintéticos: **AC_01** e **AC_05**

A determinação do mecanismo de inibição deu-se a partir de procedimento cinético que gera um gráfico de duplo recíproco para cada inibidor, conhecido como gráfico de Lineweaver-Burk, a partir do qual obtem-se um perfil que possibilita especificar o tipo de inibição existente.

Neste trabalho acadêmico os alcalóides naturais e sintéticos apresentaram mecanismo de inibição competitivo em relação ao substrato Z-FR-MCA tanto para as catepsinas L quanto V, como pode ser observado nas Figura 63 até Erro! Fonte de referência não encontrada., nas quais é apresentado o perfil gráfico característico para um inibidor competitivo:

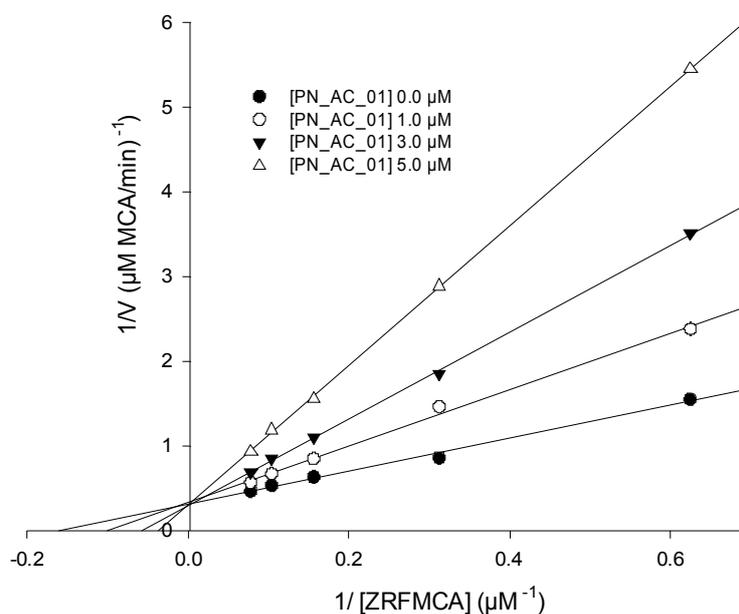


Figura 63. Gráfico de Lineawever-Burk do composto **PN_AC_01** frente à catepsina L.

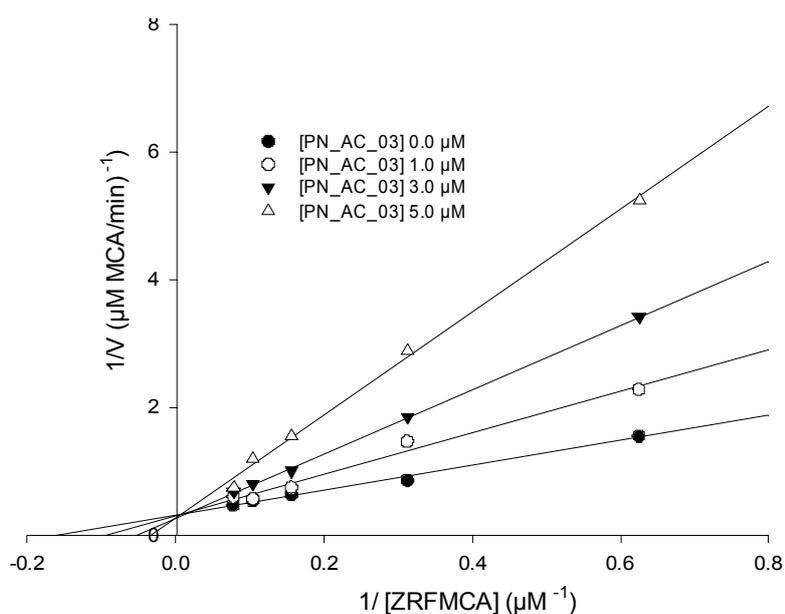


Figura 64. Gráfico de Lineawaver-Burk do composto **PN_AC_03** frente à catepsina L.

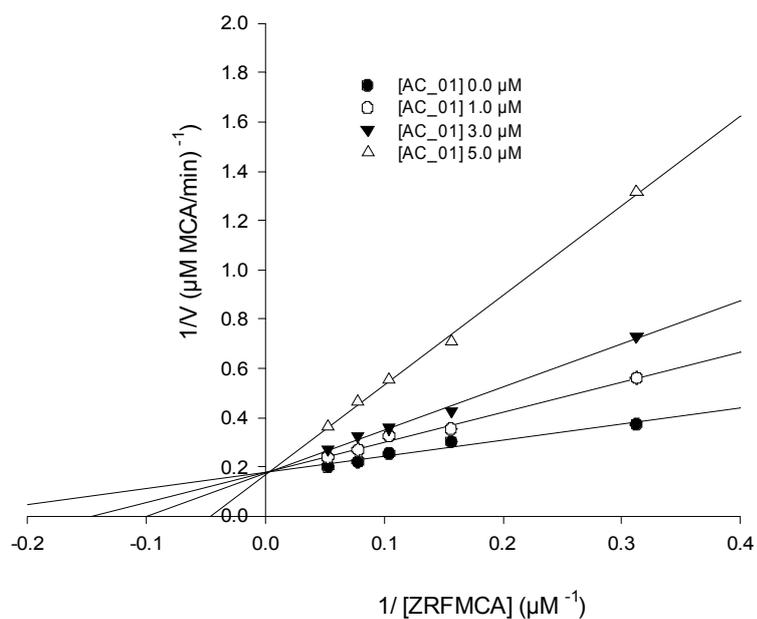


Figura 65. Gráfico de Lineawaver-Burk do composto **AC_01** frente a catepsina L.

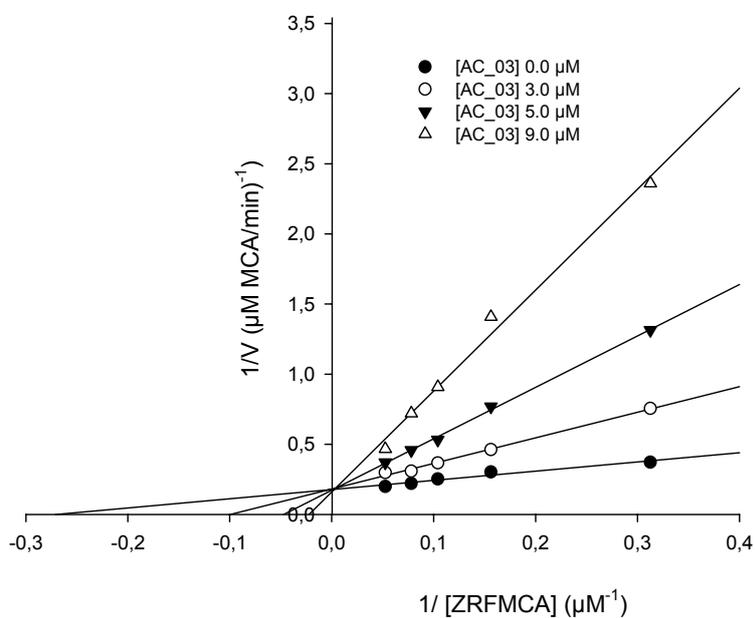


Figura 66. Gráfico de Lineawaver-Burk do composto **AC_05** frente a catepsina L.

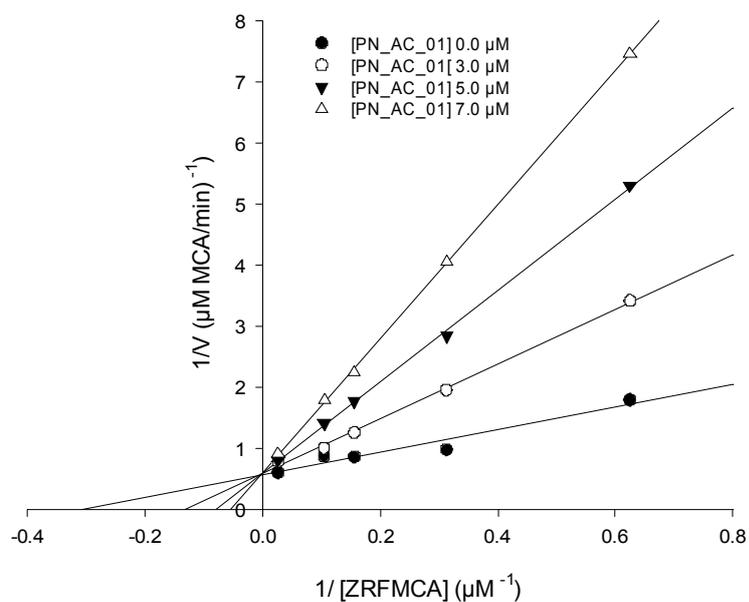


Figura 67. Gráfico de Lineawaver-Burk do composto **PN_AC_01** frente a catepsina V.

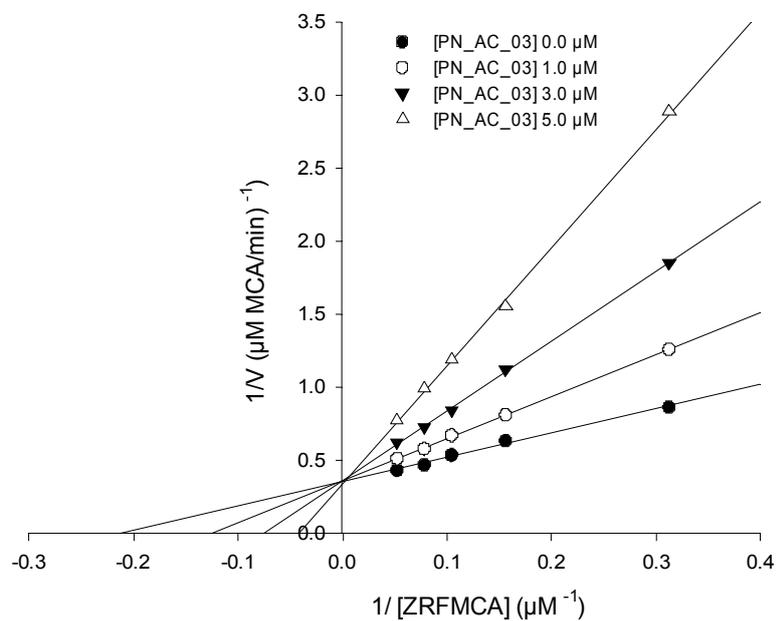


Figura 68. Gráfico de Lineawaver-Burk do composto **PN_AC_03** frente a catepsina V.

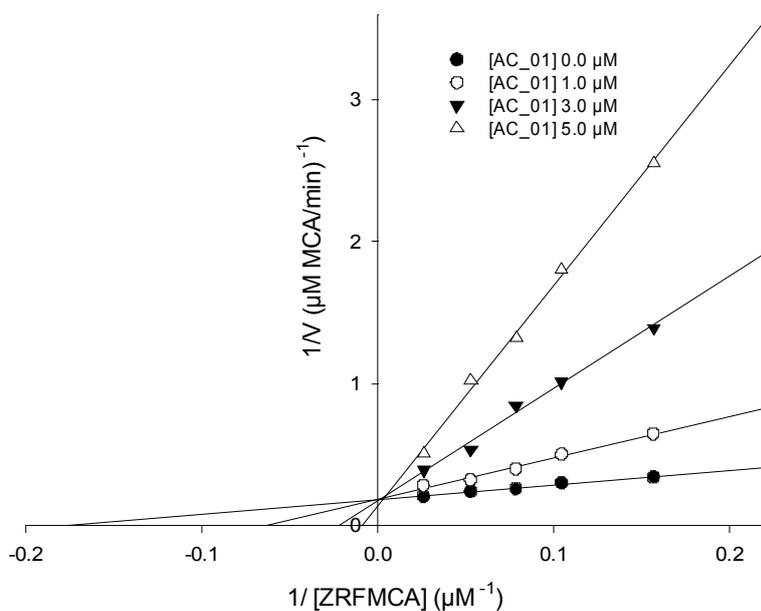


Figura 69. Gráfico de Lineawaver-Burk do composto **AC_01** frente a catepsina V.

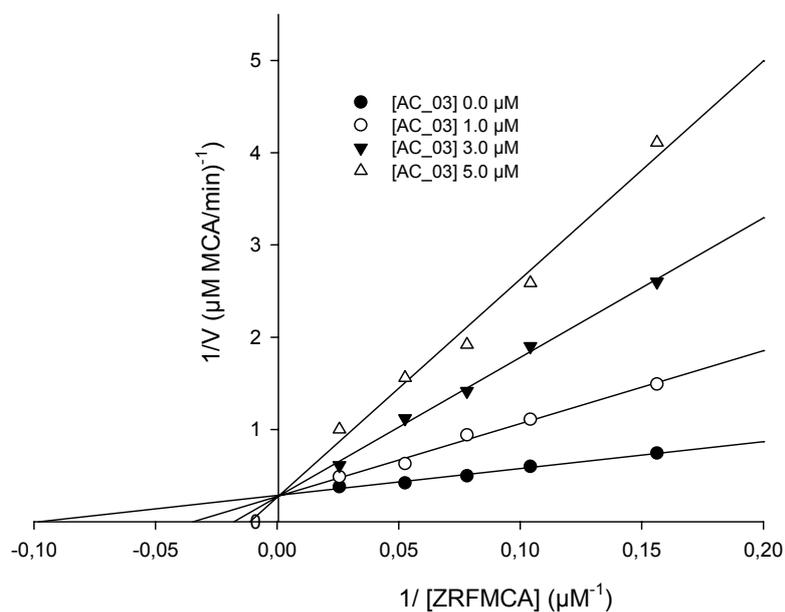


Figura 70. Gráfico de Lineawaver-Burk do composto **AC_05** frente a catepsina V.

De acordo com o gráfico da Figura 74, as intersecções com o eixo y fornecem valores de recíproco da velocidade máxima ($1/V_{\text{max}}$) os quais não são alterados em

presença do inibidor competitivo. Por outro lado, as intersecções com o eixo x fornecem valores de recíproco do K_m aparente ($-1/K_m$), que aumentam com o aumento da concentração de um inibidor competitivo por um fator igual a $(1+[I]/K_i)$.

O valor de V_{max} é constante para todas as concentrações de inibidor, porém, o valor de V_{max} aparente, o qual é definido como $K_m (1 + [I] / K_i)$, aumenta com o aumento da concentração do inibidor. Esse efeito característico do modo de ação dos inibidores competitivos ocorre pois mais substrato é requerido para manter a metade do valor de V_{max} ; os valores de V_{max} permanecem inalterados devido à capacidade do substrato de deslocar totalmente o equilíbrio em condições de saturação, uma vez que competem pelo mesmo sítio da enzima. COPELAND.

Os inibidores e o substrato podem ligar-se separadamente aos sítios da enzima, com concorrência direta dos dois ligantes pelo sítio ativo em comum. Este tipo de mecanismo de alguma maneira pode exercer uma regulação negativa de um para com o outro como, por exemplo, através de uma interação alostérica negativa, a qual pode ser guiada por uma ligação induzida e provocar mudança na conformação.

Este tipo de regulação negativa, via comunicação alostérica e possível mudança de conformação, pode levar à interações do inibidor indiretamente ao sítio ativo. Assim, não se pode presumir que devido ao fato de um inibidor exibir a assinatura cinética de um inibidor competitivo, o mesmo se ligará ao sítio ativo da enzima; entretanto, experimentos de cristalografia de muitos inibidores competitivos em uso clínico têm demonstrado sua ligação direta ao sítio ativo da enzima alvo.

Atualmente, grande número de fármacos atuam sobre um mecanismo de inibição competitivo, dentre os quais podemos citar Lovastatin, que atua na redução do colesterol tendo como enzima alvo a HMG-CoA redutase, Saquinavir, indinavir e ritonavir, que atuam sobre HIV protease, captopril e enalapril que atuam sobre a enzima de conversão da angiotensina I para a angiotensina II a qual provoca aumento na pressão sanguínea e leva à problemas de hipertensão.

Os ácidos *N*-aril antranílicos apresentaram um mecanismo incompetitivo em relação ao substrato Z-FR-MCA para ambas catepsinas, como apresentado nas Figura 71 à Figura 74:

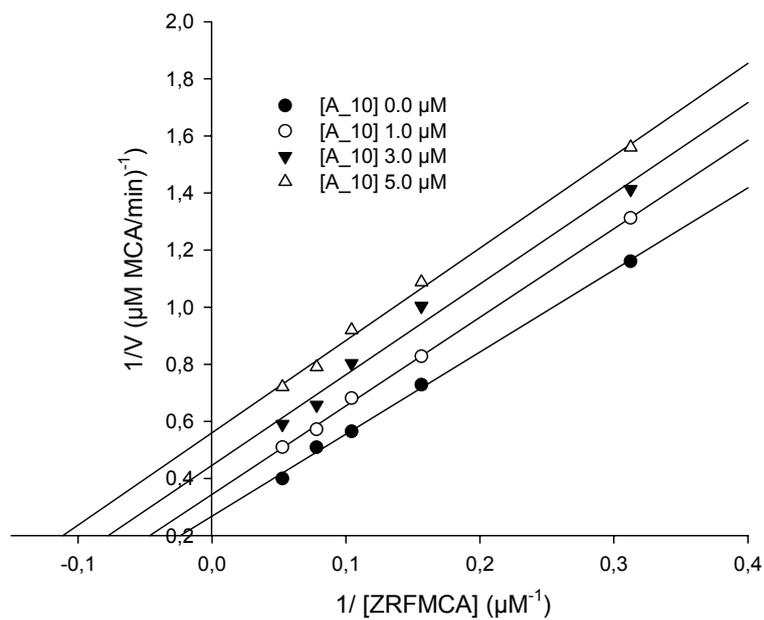


Figura 71. Gráfico de Lineawaver-Burk do composto **A_10** frente a catepsina L.

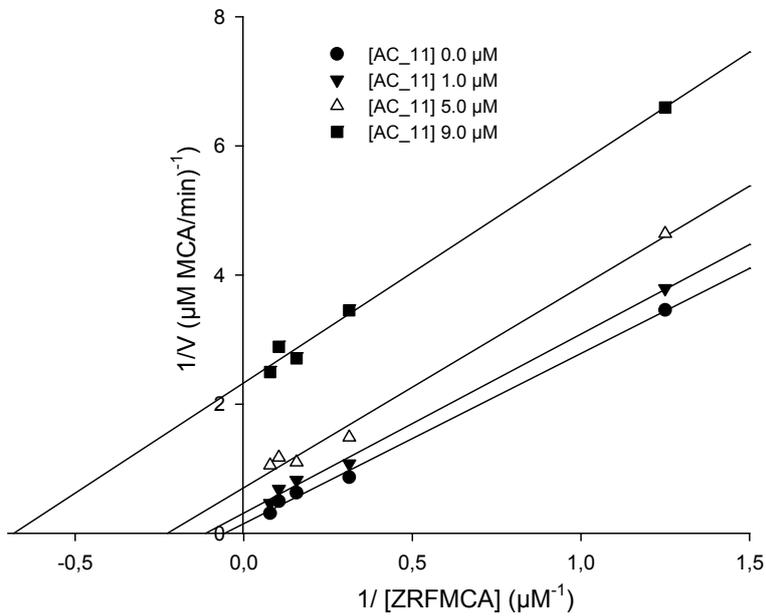


Figura 72. Gráfico de Lineawaver-Burk do composto **A_11** frente a catepsina L.

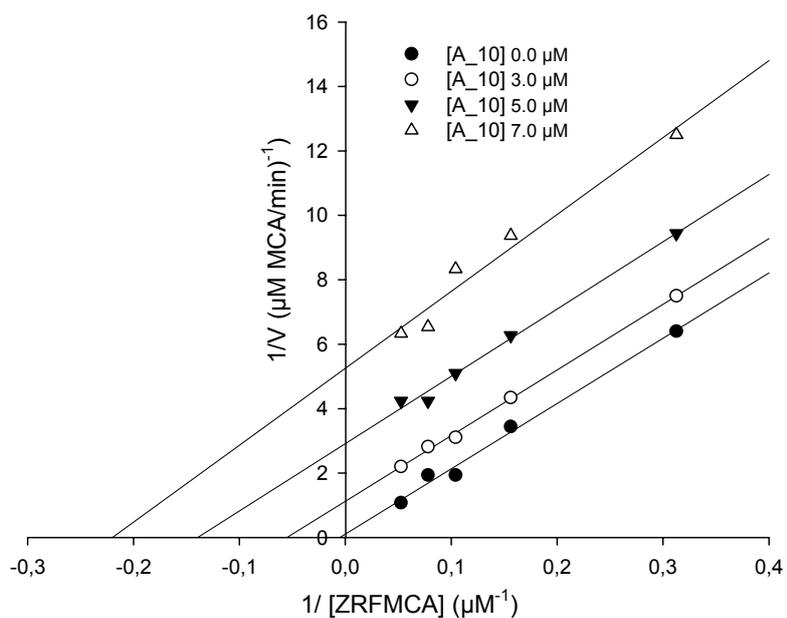


Figura 73. Gráfico de Lineawaver-Burk do composto **A_10** frente a catepsina V.

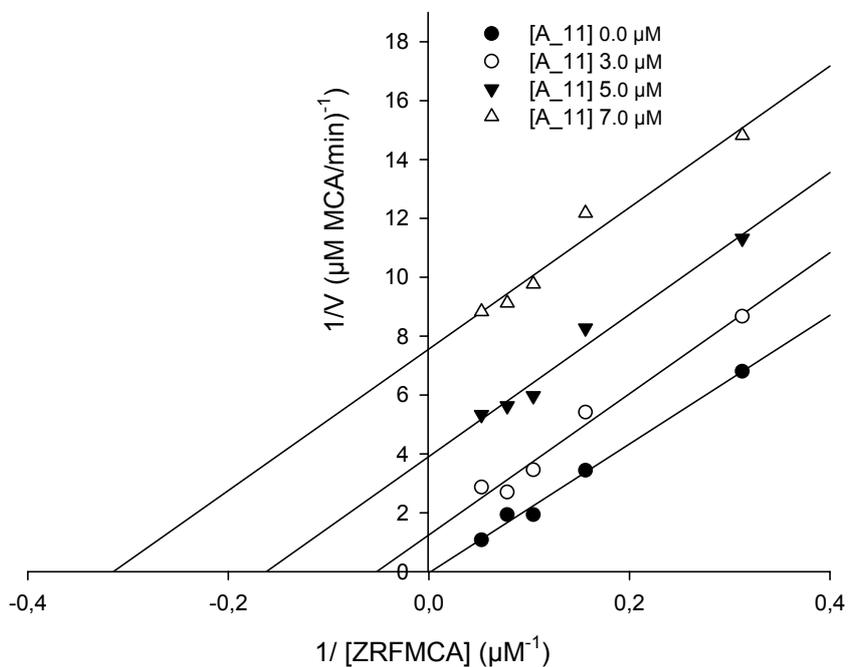


Figura 74. Gráfico de Lineawaver-Burk do composto **A_11** frente a catepsina V.

Nestes gráficos podemos observar o perfil gráfico para este tipo de inibidor, no qual o duplo recíproco é composto por linhas paralelas.

A afinidade dos inibidores incompetitivos é alta em condições de saturação do substrato, bem como para os inibidores não competitivos. Desta forma, dependendo das condições fisiológicas experimentais, esta incapacidade dos inibidores não competitivos e incompetitivos de não vencer as altas concentrações de substrato pode oferecer algumas vantagens clínicas em relação aos outros inibidores.

Dentre alguns fármacos que possuem valor comercial e atuam sobre um mecanismo de inibição incompetitiva podemos citar Metotrexato, utilizado nos tratamentos de câncer e infecções bacterianas e Camptotecin, indicado para o tratamento de câncer, utilizando a enzima topoisomerase. como enzima alvo.

Um fármaco muito conhecido que também atua sob mecanismo de inibição incompetitivo é a finasterida, bem como seus similares epristerida e dudasterida. Estes fármacos atuam sobre a enzima esteróide 5 α -redutase; o fármaco epristerida, por exemplo, liga-se a enzima esteróide 5 α -redutase, conectando o cofator NADPH a seu sítio ativo; este, por sua vez, conecta-se ao hormônio masculino testosterona, dando origem ao complexo terciário enzima-NADPH-testosterona.

Um intermediário enolato da testosterona é formado pela transferência estereoespecífica de um próton do NADPH para o carbono beta a dupla ligação da estrutura da testosterona. Este intermediário enolato é estabilizado pela interação entre um grupo ácido de dentro do sítio ativo que ao doar um próton ao carbono alfa do enolato permite a formação do produto dihidrotestosterona (DHP). DHP e NADP⁺ são liberados, completando o ciclo.

Este inibidor, o epristerida, foi mimetizado a partir do intermediário enolato, proveniente do hormônio natural testosterona e apresenta-se como um inibidor incompetitivo, ligando-se a enzima somente após a formação do complexo binário enzima_NADPH, e como inibidor competitivo em relação à testosterona.

Os resultados obtidos de experimentos de duplo recíproco, além de possibilitarem a verificação gráfica do tipo de mecanismo de inibição, também permitem extrair informações referentes aos valores de K_m e V_{max} . O gráfico da razão V_{max}/K_m versus $[I]$, como descrito na Figura 75, leva a obtenção do valor de K_i que representa a intersecção da reta ao eixo x:

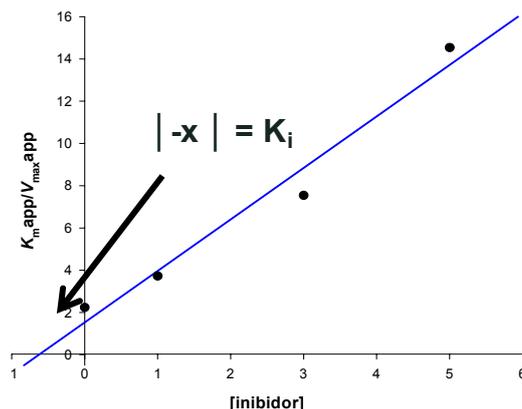


Figura 75. Gráfico padrão para determinação do valor de K_i

Desta forma, os valores da constante de dissociação do complexo EI (K_i) para os inibidores competitivos e incompetitivos foram determinados graficamente e seus respectivos valores estão apresentados na Tabela 22.

Tabela 22. Valores de dissociação do complexo EI (K_i).

Substância	K_i (uM)	
	Catepsina L	Catepsina V
PN_AC_01	1,31	0,49
PN_AC_03	1,32	1,10
AC_01	0,90	1,26
AC_05	0,18	0,40
A_10	1,86	0,85
A_11	1,94	1,09

A busca de inibidores com finalidade terapêutica representa um caminho científico de grande importância, pois cerca de 50% de todos os medicamentos atualmente comercializados atuam sob mecanismo de inibição. É difícil saber qual modalidade de inibidor se mostra mais eficiente *in vivo*, porém, diversas modalidades de inibidores têm sido desenvolvidas e encontram-se em diferentes programas na busca por novas drogas.

4.8 Estudos de docagem modelagem e modelos de interação.

A *docagem molecular* (do inglês, *molecular docking*), também conhecida como *docagem* ou *ancoramento* (do inglês, *docking*) é um dos principais métodos de planejamento baseado na estrutura do receptor (SBDD, *structure-based drug design*) empregados em estudos de química medicinal. A técnica consiste em prever a conformação biotiva de uma pequena molécula (ligante) dentro do sítio de ligação de uma macromolécula (enzima, DNA ou RNA), seguido de avaliação (pontuação) e classificação do modo de ligação proposto (GUIDO 2008).

Nas últimas décadas, a junção entre técnicas experimentais e computacionais assumiram grande importância no processo de planejamento de novos fármacos sendo que a determinação do mecanismo enzimático experimental permite o estabelecimento racional de estudos de modelagem molecular a partir de técnicas avançadas de docagem molecular.

Estudos anteriores levaram a criação de um modelo farmacofórico para a catepsina V (SEVERINO, 2008), obtido a partir de dados cristalográficos da catepsina K em bancos de dados de proteínas (PDB). O modelo gerado foi utilizado para auxiliar na identificação das conformações biotivas dos alcalóides acridônicos naturais **PN_AC_01** a **PN_AC_09**, apresentando bom posicionamento no modelo farmacofórico sugerido, com a existência de interações intermoleculares importantes para o reconhecimento molecular. Além disto, foi verificado que estes compostos se apresentam com os anéis aromáticos A e B localizados em regiões hidrofóbicas, e sugerem que interações hidrofóbicas e de van der Waals são componentes importantes no reconhecimento e potencia destes compostos.

Desta forma, foi selecionado o alcalóide mais potente da série, o **AC_05**. Os experimentos de determinação do tipo do mecanismo de inibição reafirmaram os alcalóides acridônicos como inibidores do tipo competitivo. Baseado nesta valiosa informação foi possível modelar o modo de ligação do inibidor **AC_05** no sítio catalítico das enzimas alvo, a catepsina L e a catepsina V.

A modelagem molecular foi realizada utilizando-se programa FlexX, enquanto que as docagens foram realizadas utilizando-se estruturas cristalográficas de alta resolução depositadas no PDB; a estrutura da catepsina L utilizada foi a de código

3H8B, com resolução de 1.8 Å, e a estrutura escolhida para a catepsina V foi a codificada como 1FH0, com resolução de 1.6 Å.

A análise de docagem molecular com o alcalóide acridônico **AC_05** frente à catepsina V sugere as interações apresentadas na Figura 76 em que a atividade deste composto pode estar associada a interações de hidrogênio com o resíduo Phe69, Gly67 e do resíduo Leu161.

As interações do alcalóide **AC_05** frente à catepsina L se apresentam na Figura 77 em que a maior inibição deste composto pode estar relacionada as interações de ligação de hidrogênio do grupo nitro como os resíduos Cys25 e Gln19, resíduos referentes ao sítio ativo da enzima. O resíduo Gln19 tem uma função biológica importante, pois supostamente este resíduo estabiliza o intermediário de transição do processo catalítico e, portanto, moléculas que interagem com ele influenciam significativamente na atividade biológica da enzima.

O modo de ligação sugerido indica que o inibidor representativo da série, **AC_05**, ocupa a região central do sítio de ambas as isoformas, localizando-se próximo dos resíduos catalíticos Cys25 e His163. Esses resultados estão de acordo com os dados experimentais de cinética enzimática que mostraram que este inibidor interage com as enzimas através de um mecanismo reversível ligando-se de modo mútuo e exclusivamente ao sítio ativo como o substrato natural.

Os estudos de modelagem molecular são preliminares, assim este trabalho poderá servir como auxílio para a realização de estudos mais abrangentes do modo de interação dos alcalóides acridônicos no sítio ativo das catepsinas, principalmente a catepsina L.

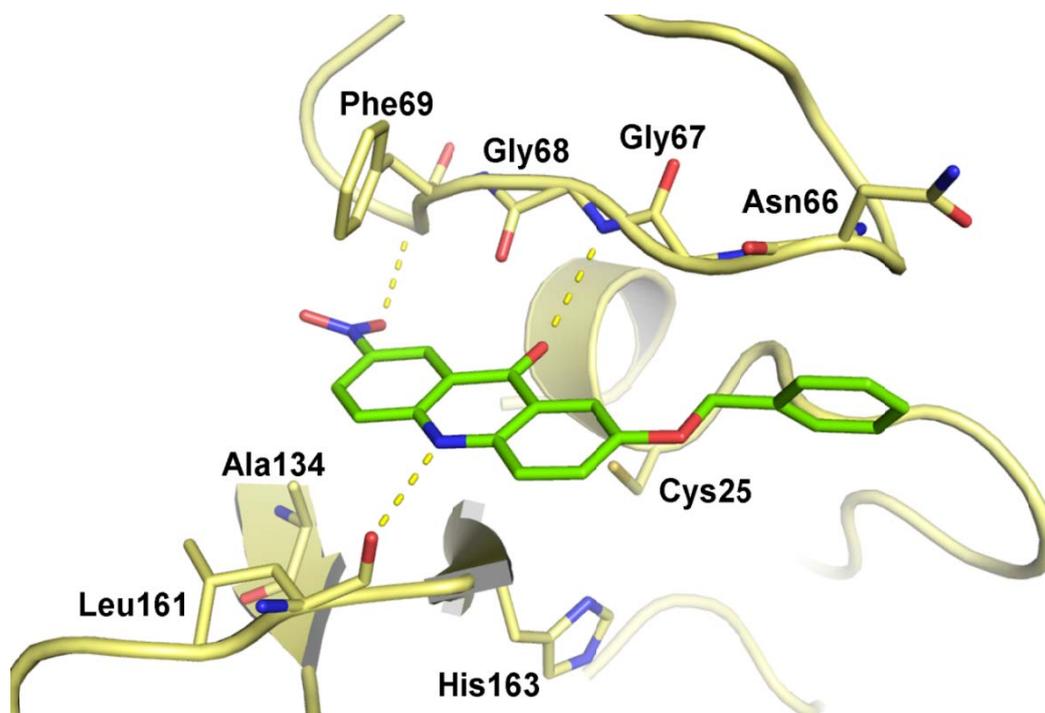


Figura 76. Modo de interação proposto por docagem molecular com o programa FlexX para o substância AC_05 frente a catepsina L

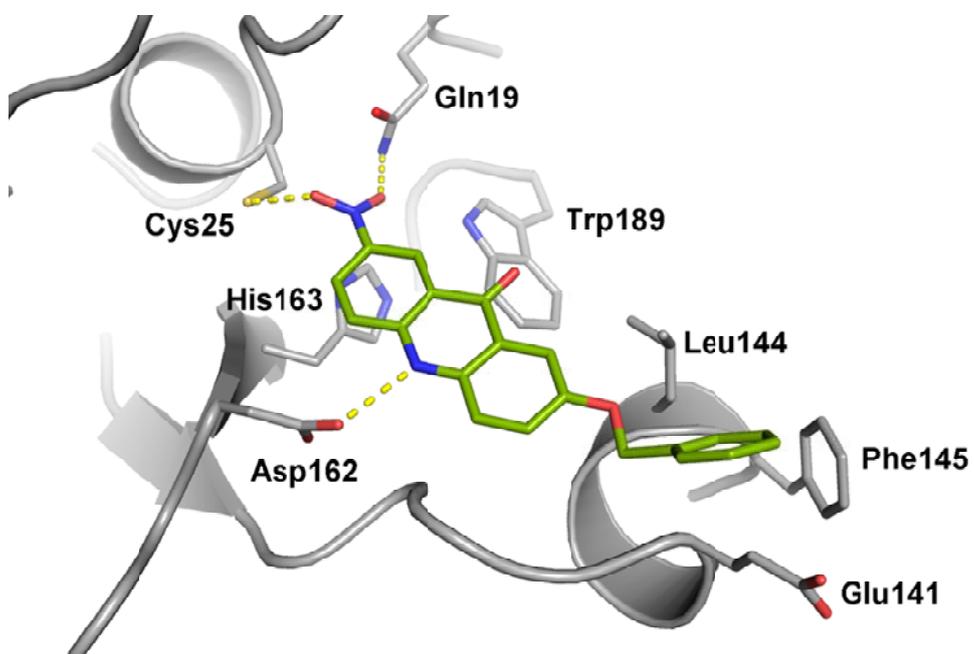


Figura 77. Modo de interação proposto por docagem molecular com o programa FlexX para o substância AC_05 frente a catepsina V



Conclusões

5 Conclusões, Perspectivas e Considerações finais

A metodologia de triagem de extratos de plantas mostrou-se eficiente na otimização e seleção de um extrato alvo; isto, juntamente com a metodologia de monitoramento através de ensaios fluorimétricos por apagamento intramolecular e cromatografia líquida de alta eficiência, levaram a determinação de nova classe de compostos alvos com potencial inibidor das catepsinas L e V, as cumarinas *O*-geraniladas.

A triagem de verificação de potência e a busca por seletividade dos alcalóides acridônicos naturais, dos alcalóides acridônicos sintéticos, dos ácidos *N*-aril antranílicos e dos alcalóides quinolínicos-4-substituídos frente a catepsina L e V mostrou valores de potências na ordem de concentração de inibição em micro-molar e baixa seletividade frente as duas isoformas. O composto mais potente de todas as séries avaliadas foi o AC_05, com valor de potência de 0,5 μM frente à catepsina L.

Este trabalho permitiu confirmar os alcalóides acridônicos como alvos importantes na ação inibidora das catepsinas L e V; assim, levando-se em consideração os resultados aqui obtidos com produtos naturais e sintéticos a partir de rota sintética não guiada, o estudo de estrutura versus atividade (SAR) pode ser realizado visando a potencialização destes compostos e até mesmo verificação de sua seletividade frente as isoformas. Para tanto seria primordial a síntese de compostos visando o acréscimo de grupos doadores, receptores e também capazes de realizar ligação de hidrogênio.

Um estudo interdisciplinar partindo dos resultados obtidos com os produtos naturais entre a síntese orgânica e a física molecular, estudos de dosagem e cristalografia de proteínas podem levar a um entendimento muito amplo e real sobre o modo de interações destes compostos, bem como a uma entidade química com alto potencial para o desenvolvimento de um fármaco.

Outras informações interessantes extraídas deste trabalho acadêmico são os dados de potência obtidos para alcalóides quinolínicos, uma vez que o alcalóide sem substituinte nos anéis A e C apresentou valor de potência na ordem de concentração micro-molar. Este alcalóide apresenta potencial como alvo relevante para a realização de SAR e possível potencialização e seletividade desta classe frente as catepsinas L e V.

Finalmente, os dados obtidos de potência, seletividade, afinidade e mecanismos de ação determinados complementam e dão origem a uma base de dados cinéticos que podem servir para delinear futuros estudos



Referências

6 Referências

- AHMAD, M.U.; RAHMAN, M.A.; HUQ, E.; CHOWDHURY, R. "Alkaloids of *Zanthoxylum budrunga*". *Fitoterapia*, **74**: 191-193, 2003.
- ARRUDA, M. S. P.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F.; PIRANI, J. R. "Chemistry of *Zanthoxylum rhoifolium*: a new secofuroquinoline alkaloid". *Biochem. Syst. Ecol.*, **20**: 173, 1992.
- BAFI-YEBOA, N.F.A.; ARNASON, J.T.; BAKER, J.; SMITH, M.L. "Antifungal constituents of Northern prickly ash, *Zanthoxylum americanum* Mill". *Phytomedicine*, **12**: 370-377, 2005.
- BAKER, D.D.; CHU, M.; OZA, U.; RAJGARHIA, V. "The value of natural products to future pharmaceutical discovery". *Nat. Prod. Rep.*, **24**: 1225-1244, 2007.
- BARRET, A. & KIRSCHKE, H. "Cathepsin-B, cathepsin-H and cathepsin-L". *Methods Enzymol.*, **80**: 189-198, 1981.
- BELTRAME, F.L.; "Caracterização de Duas Espécies (*Trichilia catigua* e *Anemopoegma arvense*) Usadas como Catuaba por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Análise Multivariada". São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2008. Tese de Doutorado.
- BERDOWSKA, I. "Cysteine proteases as disease markers". *Clinica Chimica Acta.*, **342**: 41-69, 2004.
- BERGENTHAL D.; MESTER I.; RÓZSA Z.S.; REISCH J. "¹³C-NMR-Spektren einiger acridon-alkaloide". *Phytochemistry.*, **18**: 161-163, 1979.
- BROMME, D.; KALETA, J.; LECAILLE, F. "Human and parasitic papain-like cysteine proteases: Their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design". *Chem. Rev.*, **102**: 4459-4488, 2002.

BROMME, D.; LI, Z.; BARNES, M.; MEHLER, E. "Human cathepsin V functional expression, tissue distribution, electrostatic surface potencial, enzymatic characterization, and chromosomal localization." *Biochemistry*, **38**: 2377-2385, 1999.

BUENO, M.A.; SILVA, L.R.S.P.; CORRÊA, A.G. "Microwave-promoted synthesis of novel N-arylanthranilic acid". *J. Braz. Chem.*, **19** (7): 1264-1269, 2008.

BUENO, M.A.; SILVA, L.R.S.P.; CORRÊA, A.G. "Microwave-promoted synthesis of novel N-arylanthranilic acid". *J. Braz. Chem.*, **19**: 1264-1269, 2008.

CATALDO, A.M.; NIXON, R.A. "Enzimatically activity lysosomal proteases are associated with amyloid deposits in Alzheimer brain". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**: 3861:3865, 1990.

CHEN, I.S.; LIN, Y.C.; TSAI, I.L.; TENG, C.M.; KO, F.N.; ISHIKAWA, T.; ISHII, H. "Coumarins and anti-platelet aggregation constituents from *Zanthoxylum schifolium*". *Phytochemistry*, **39**: 1091-1097, 2005

CLARDY, J.; WALSH, C. "Lessons from natural molecules". *Nature.*, **432**: 829-837, 2004.

COPELAND, R.A. "Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery". New Jersey, Wiley, 2005.

COX, J.L.; SEXTON, P.S.; GREEN, T.J.; DARMANI, N.A. "Inhibition of B16 melanoma metastasis by overexpression of the cysteine proteinase inhibitor cystatin C". *Melanoma Res.*, **9**: 369-374, 1999.

DEWICK, P. M.; "Medicinal natural products : a biosynthetic approach – 2nd ed. John Wiley & Sons Ltd, England, 2002.

DUARTE, Patrícia Domingos ; SANGI, D. P.; CORREA, A. G. . Síntese de Compostos N-Heterociclos Empregando Micro-ondas. *Revista Virtual de Química*, v. **2**: 204-213, 2010.

EISENTHAL, R. & DANSON, M.J. "Enzyme assays. A Practical Approach". Second Edition. Oxford, Oxford University Press, 2002.

ERVIN, H.; COX, J.L. "Late stage inhibition of hematogenous melanoma metastasis by cystatin C over-expression". *Cancer Cell Int.*, **5**: 14, 2005.

FACUNDO. V. A., SILVEIRA. A.S.P., FILHO. R.B., REZENDE. C.M., PINTO. A.C. "Constituintes químicos de *Zanthoxylum ekmanii* (URB.) ALAIN". *Quim. Nova*, **28**: 224-225, 2005.

FARNSWORTH, N.R.; CORDEL, G.A. "A review of some biologically active compounds isolated from plants as reported in the 1974-1975". *Lloydia*, **39**: 420, 1976.

FERNANDES, C.C.; VIERA, P.C.; SILVA, V.C.; DALLÓGLIO, E.L.; SILVA, L.E.; SOUZA, P.T. "6-Acetyl-N-methyl-dihydrodecarine, a New Alkaloid from *Zanthoxylum riedelianum*". *J. Braz. Chem.*, **20**: 379-382, 2009.

FERREIRA, M.E.; ARIAS, A.R.; ORTIS, S.T.; INCHAUSTI, A.; NAKAYAMA, H.; THOUVENEL, C.; HOCQUEMILLER, R.; FOURNET, A. "Leishmanicidal activity of two canthin-6-one alkaloids, two major constituents of *Zanthoxylum chilopeone* va. *Anustifolium*". *J. Ethnopharmacology*, **80**: 199-202, 2002.

FERREIRA, M.E.; NAKAYAMA, H.; ARIAS, A.R.; SCHININI, A.; BILBÃO, N.V.; ORTIS, S.T.; SERNA, E.; LAGOUTTE, D.; SORIANO-AGATÓN, F.; POUPON, E.; HOCQUEMILLER, R.; FOURNET, A. "Effects of canthin-6-one alkaloids from *Zanthoxylum chiloperone* on Trypanosoma cruzi-infected mice". *J. Ethnopharmacology*, **109**: 258-263, 2007.

FERRO, A.F.P.; BONACCELLI, M.B.M.; ASSAD, A.L.D. "Oportunidades tecnológicas e estratégias concorrenciais de gestão ambiental: O uso sustentável da biodiversidade brasileira". *Gestão & Produção*. **13**: 489-501, 2006.

FIEBIGER, E.; MAEHR, R.; VILLADANGOS, J. "Invariant chain controls the activity of extracellular cathepsin L". *J. Exp. Med.*, **196**: 1263-1269, 2002.

GAUTHIER, J.Y.; CHAURET, N.; CROMLISH, W.; DESMARAIS, S.; DUONG, L.T.; FALGUEYRET, J.P.; KIMMEL, D.B.; LAMONTAGNE, S.; LERICHE, T.; LI, C.S.; MASSÉ, F.; MCKAY, D.J.; GRIFFITH, D.N.; OBALLA, R.M.; PALMER, J.T.;

PERCIVAL, M.D.; RIENDEAU, D.; ROBICHAUD, J.; RODAN, G.A. "The Discovery of odanacatib (MK-0822), a selective inhibitor of cathepsin K". *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **18**: 923-928, 2008.

GUIDO, R.V.C.; "Planejamento de inibidores da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Trypanosoma cruzi*: biologia estrutural e química medicinal". Programa de Pós-Graduação em Física – USP, 2008. Tese de Doutorado.

HU, J.; ZHANG, W.D.; SHEN, Y.H.; ZHANG, C.; XU, L.; LIU, R.H.; WANG, B.; XU, X.K. "Alkaloids from *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC. *Biochem. Syst. Ecol.*, **35**: 114-117, 2007.

ISHIDOH, K.; KOMINAMI, E. "Gene regulation and extracellular functions of procathepsin L". *Biol. Chem.*, **379**: 131-135, 1998.

JULIANO, M.A.; CARMONA, A.K.; JULIANO, L. "Revisão: Uso de peptídeos sintéticos para dosagem de enzimas clinicamente importante". *Folha Médica*, **121**: 211-220, 2002.

KUESTER, D.; LIPPERT, H.; ROESSNER A.; KRUEGER, S. "The cathepsin family and their role in colorectal cancer". *Pathology – Research and Practice*. **204**: 491-500, 2008.

KUSUDA, M.; INADA, K.; OGAWA, T.; YOSHIDA, T.; SHIOTA, S.; TSUCHIYA, T.; HATANO, T. "Polyphenolic constituent structures of *Zanthoxylum piperitum* Fruit and the antibacterial effects of its polymeric procyanidin on methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Biosci. Biotechnol.* *Biochemistry*, **70**: 1423-1431, 2006.

LANKELMA, J.M.; VOOREND, D.M.; BARWARI, T.; KOETSVELD, J.; VAN DER SPEK, A.H.; DE PORTO, A.P.; VAN ROOIJEN, G.; VAN NOORDEN, C.J. "Cathepsin L, target in cancer treatment?". *Life Sci.*, **86**: 225-233, 2010.

LECAILE, F.; KALETA, J.; BROMME, D. "Human and parasitic papain-like cysteine proteases: their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitors design". *Chem. Rev.*, **102**: 4459-4488, 2002

LEE, K.H. "Discovery and development of natural product-derived chemotherapeutic agents based on a medicinal chemistry approach." *J. Nat. Prod.*, **73**: 500-516, 2010

LETO, G.; SEPPORTA, M.V.; CRESCIMANNO, M.; FLANDINA, C.; TUMMINELLO, F.M. "Cathepsin L in metastatic bone disease: therapeutic implications". *Biol. Chem.*, **391**: 655-664, 2010.

LEWIS, J.R.; "Biological Activity of some Rutaceous Compounds. IN: Chemistry and Chemical Taxonomy of the Rutales. WATERMAN, P.G. & GUDON, M.F. (Eds). London, Academic Press, 1983.

LUTGENS, S.P.M.; CLEUTJENS, K.B.J.M.; DAEMEN, M.J.A.P.; HEENEMAN, S. "Cathepsin cysteine proteases in cardiovascular disease". *FASEB J.*, **21**: 3029-3040, 2007.

MACRAE, W.D.; TOWES, G.H.N. "Review Article Number 2. Biological Activity of Lignans". *Phytochemistry*, **23**: 1207, 1984.

MBAZE, L.M.; LADO, J.A.; WANSI, T.P.; SHIAO, T.C.; CHIOZEM, D.D.; MESAİK, M.A.; CHOUDHARY, M.I.; LUCAILLE-DUBOIS, M.A.; WANDJII, J.; ROY, R.; SEWALD, N. "Oxidative burst inhibitory and cytotoxic amides and lignans from the stem bark of *Fagara heitzii* (Rutaceae)". *Phytochemistry*, **70**: 1447-1447, 2009.

MENZEL, K.; HAUSMANN, M.; OBERMEIER, F.; SCHREITER, K.; DUNGER, N.; BATAILLE, F.; FALK, W.; SCHOLMERICH, J.; HERFARTH, H.; TOGLER, G. "Cathepsin B, L and D in inflammatory bowel disease macrophages and potential therapeutic effects of cathepsin inhibition in vivo". *Clinical and Experimental Immunology*, **146**: 169-180, 2006.

MOCCELINI, S.K.; SILVA, V.C.; NDIAYE, E.A.; SOUSA, P.T.; VIEIRA, P.C. "Estudo fitoquímico das cascas das raízes de *Zanthoxylum rigidum* Humb. & Bonpl. ex Willd (RUTACEAE)". *Quim. Nova*, **32**: 131-133, 2009.

MOHAMED, M.M.; SLOANE, B.F. "Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer". *Nature Reviews Cancer*, **6**: 764-774, 2006.

MUNGER, J.S.; HAASS, C.; LEMERE, C.A.; SHI, G.P.; WONG, W.S.F.; TEPLow, D.B.; SELKOE, D.J.; CHAPMAN, H.A. "Lysosomal processing of amyloid precursor protein to A peptides: a distinct role for cathepsin S". *Biochem. J.*, **311**: 299-305, 1995.

MURRAY, R.D.H.; MENDES, L.; BROWN, S.A. "The Natural Coumarins: Occurrence, Chemistry and Biochemistry". 1a ed. London, John Wiley & Sons, 1982.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. "Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years". *J. Nat. Prod.*, **70**: 461-467, 2007.

NGADJUI, B. T.; AYAFOR, J.F.; SONDERGAM, B.L. "Prenylated coumarins from the leaves of *Clausena anisata*". *J. Nat. Prod.*, **52**: 243-247, 1989.

OTTO, H.H.; SCHIRMEISTER, T. "Cysteine proteases and their inhibitors". *Chem. Rev.*, **97**: 133-171, 1997.

PALERMO, C.; JOYCE, J.A. "Cysteine cathepsin proteases as pharmacological targets in cancer". *Cell press.*, **29**: 22-27 2007.

PETERMANN, I.; MAYER, C.; STYPMANN, J.; BINIOSSEK, M.L.; TOBIN, D.J.; ENGELN, M.A.; DANDEKAR, T.; GRUNE, T.; SCHILD, L.; PETERS C.; REINHECKEL, T. "Lysosomal, cytoskeletal, and metabolic alterations in cardiomyopathy of cathepsin L knockout mice". *FASEB J.*, **20**: E587-E597, 2006.

POSTIGO, M.P. "Planejamento racional de inibidores de purina nucleosídeo fosforilase de *Schistosoma mansoni*". São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Física – USP, 2008. Dissertação de Mestrado.

ROCHA, W.C. "Busca de substâncias ativas em plantas amazônicas: *Adiscanthus fusciflorus* (Rutaceae), *Trichilia pallida* e *Trichilia rubra* (Meliaceae)". São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2004. Tese de Doutorado.

SANTOS, D.A.P. "Busca de metabólitos bioativos em plantas das famílias Bignoniaceae e Rutaceae contra parasitas causadores de doenças tropicais

São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2008. Tese de Doutorado.

SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R.; SIMÕES, C.M.O. “FARMACOGNOSIA: da planta ao medicamento”. Santa Catarina, 1a ed. Ed. UFSC, 1999.

SEVERINO, R.P. “Busca de produtos naturais como inibidores específicos de enzimas”. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2008. Tese de Doutorado.

SILVA, C.V.; DETONI, C.B.; VELOZO, E.S.; GUEDES, M.L.S. “Alcalóides e outros etabólitos do caule e frutos de *Zanthoxylum tingoassuiba* A. st. Hil”. *Quim. Nova*, **31**: 2052-2055, 2008.

SILVERMAN, R. B “The organic chemistry of drug action”. Academic Press, New York, 1992.

SIMOTE, S.Y. “Estudo fitoquímico de *Helietta puberula* (Rutaceae), *Simauroba versicolor* (Simaroubaceae) e busca de um processo de microencapsulação de compostos ativos, visando o controle de formigas cortadeiras”. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2006. Tese de Doutorado.

SNYDER, L. R.; DOLAN, J.W. “Initial experiments in high-performance liquid chromatographic method development. I. Use of a starting gradient run”. *J. Chromatography A*, **721**: 3-14, 1996.

SOMOZA, J.R.; ZHAN, H.; BOWMAN, K.K.; YU, L.; MORTARA, K.D.; PALMER, J.T.; CLARK, J.; MCGRATH, M.E. “Crystal structure of human cathepsin V”. *Biochemistry*, **39**: 12543-12551, 2000.

SOUZA, M.A.D.; RIBEIRO, J.E.L.S.; HOPKINS, M.J.G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C.A.; COSTA, M.A.S.; BRITO, J.M.; MARTINS, L.H.P.; LOHMANN, L.G.; ASSUNÇÃO, P.A.C.L.; PEREIRA, E.C.; SILVA, C.F.; MESQUITA, M.R.;

PROCÓPIO, L.C. "Flora da Reserva Ducke, Guia de Identificação das Plantas Vasculares de uma Floresta de Terra-Firme na Amazônia Central", 1999.

STICHER, O. "Natural Products Isolation". *Nat. Prod. Rep.*, **25**: 517-554, 2008.

SU, C.R.; YEH, S.F.; LIU, C.M.; DAMU, A.G.; KUO, T.H.; CHIANG, P.C.; BASTOW, K.F.; LEE, K.H.; W, T.S. "Anti-HBV and cytotoxic activities of pyranocoumarin derivatives." *Bio. Med. Chem.*, **17**: 6137-6143, 2009.

TANE, P.; WABO, H.K.; CONNOLLY, J.D. "A new benzophenanthridine alkaloid from *Zanthoxylum buesgenii*". *Fitoterapia*, **76**: 656-660, 2005.

TOLOSA, E.; LI, W.; YASUDA, Y.; WIENHOLD, W.; DENZIN, L.K.; LAUTWEIN, A.; DRIESSEN, C.; SCHNORRER, P.; WEBER, E.; STEVANOVIC, S.; KUREK, R.; MELMS, A.; BROMME, D. "Cathepsin V is involved in the degradation of invariant chain in human thymus and is overexpresses in myasthenia gravis. *J. Clin. Invest.*, **112**: 517-526, 2003.

TURK , V.; TURK , B.; GUNGAR, G.; TURK, D.; KOS, J. "Lysosomal cathepsins: structure role in antigen presentation and cancer". *Adv. Enzyme Regul.*, **42**: 285-303, 2002.

TURK, D. & GUNCAR, G.; Lysosomal cysteine protease (cathepsinas): promising drug targets, *Acta Crys.*, **D59**: 203-213, 2003.

VASILJEVA, T.; REINHECKEL, C.; PETERS, D.; TURK, V.; TURK, B. "Emerging roles of cysteine cathepsins in disease and their potential as drug targets". *Curr. Pharm. Des.*, **13**: 387-403, 2007.

WATERMAN, P. G.; GRUNDON, M. F. "*Chemistry and Chemical Taxonomy of the Rutales*", Academic Press: London, 1983.

YANG, Z.; COX J. L. "Cathepsin L increases invasion and migration of B16 melanoma". *Cancer Cell International*, **7**: 1-9, 2007.

YASUDA, Y.; LI, Z.; GREENBAUM, D.; BOGBO, M.; WEBER, E.; BROMME, D.
“Cathepsin V, a novel and potent elastolytic activity expressed in activated
macrophages”. *J. Biol. Chem.*, **279**: 36761-36770, 2004.