

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
LABORATÓRIO DE PRODUTOS NATURAIS

**BUSCA POR INIBIDORES DE CATEPSINAS EM PLANTAS  
DO CERRADO PAULISTA E AVALIAÇÃO DA PROTEÓLISE  
TUMORAL *IN VITRO***

**SUELEM DEMUNER RAMALHO\***

Tese apresentada como parte dos  
requisitos para obtenção do título de  
Doutor em Ciências, área de concentração  
Química Orgânica.

**Orientador: Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira**

**\*Bolsista CNPq**

São Carlos-SP

2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
LABORATÓRIO DE PRODUTOS NATURAIS

**BUSCA POR INIBIDORES DE CATEPSINAS EM PLANTAS  
DO CERRADO PAULISTA E AVALIAÇÃO DA PROTEÓLISE  
TUMORAL *IN VITRO***

**SUELEM DEMUNER RAMALHO\***

Tese apresentada como parte dos  
requisitos para obtenção do título de  
Doutor em Ciências, área de concentração  
Química Orgânica.

**Orientador: Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira**

**\*Bolsista CNPq**

São Carlos-SP

2015

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

R165bi

Ramalho, Suelem Demuner.

Busca por inibidores de catepsinas em plantas do cerrado paulista e avaliação da proteólise tumoral *in vitro* / Suelem Demuner Ramalho. -- São Carlos : UFSCar, 2015.  
179 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2015.

1. Química orgânica. 2. Câncer. 3. Catepsinas. 4. Plantas dos cerrados. 5. Inibidores enzimáticos. I. Título.

CDD: 547 (20<sup>a</sup>)



Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Suelem Demuner Ramalho, realizada em 27/03/2015:

Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira  
UFSCar

Profa. Dra. Dulce Helena Siqueira Silva  
UNESP

Prof. Dr. Tiago Venâncio  
UFSCar

Profa. Dra. Maria Luiza Vilela Oliva  
USP

Prof. Dr. Alzir Azevedo Batista  
UFSCar

*“A mente que se abre a uma nova idéia  
jamais voltará ao seu tamanho original”.*

*Albert Einstein*

*Dedico este trabalho...*

*Aos meus pais, Valdeliro e Cecília, por  
todo apoio, confiança, amor e incentivo em  
todos os momentos de minha vida.*

*Amo vocês!*





## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira pelos ensinamentos, paciência e orientação deste trabalho.

Aos demais professores do Laboratório de Produtos Naturais - UFSCar Prof. Dr. João Batista Fernandes, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Fátima das G. Fernandes da Silva e Prof. Dr. Moacir Rossi Forim pela contribuição na minha formação.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Bonnie F. Sloane da Universidade de Wayne State (WSU) pelo acolhimento, ensinamentos e colaborações.

Ao Prof. Dr. Jeremy J. Kodanko e ao aluno Raj Sharma do Departamento de Química da Universidade de Wayne State (WSU) pela colaboração e obtenção do composto sintético.

Aos amigos, funcionários e professores do Departamento de Farmacologia da Universidade de Wayne State (WSU) pelo auxílio, acolhimento e agradável convivência, em especial Aimalie, Sue, Neha, Anita e Kingsley.

Aos amigos do Laboratório de Produtos Naturais e ao grupo do Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira pelo auxílio, amizade e momentos de alegria.

Às alunas Lorena, Marcela e Liliane pela amizade e contribuições nos artigos.

Aos funcionários e técnicos do Departamento de Química da UFSCar que contribuíram para realização deste projeto, em especial a Luciana Vizonotto pelo auxílio, incentivo e amizade.

A toda minha família e amigos pelo amor, compreensão e carinho.

Ao Douglas pelo amor, carinho, incentivo e companheirismo. Tudo se torna mais fácil e gratificante ao seu lado.

À minha madrinha Zenilda e Ana Beatriz pelo amor e carinho.

Aos meus pais e minha irmã pela força, amor, e incentivo. Obrigada por todo apoio.

A Deus por minha inteligência, saúde e sabedoria.

A CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro, em especial CNPq pela bolsa concedida.

## ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$\delta$	deslocamento químico em partes por milhão (ppm)
$\phi$	diâmetro
AcOEt	acetato de etila
ACS	American Cancer Society
Asn	asparagina
CA-074	L-3- <i>trans</i> -(propilcarbamil)oxirano-2-carbonil)-L-iso-leucil-L-prolina
CA-074Me	éster metílico da L-3- <i>trans</i> -(propilcarbamil)oxirano-2-carbonil)-L-iso-leucil-L-prolina
CTSB	catepsina B
CTSL	catepsina L
CCD	cromatografia em camada delgada
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
COSY	correlation spectroscopy
Cys	cisteína
<i>d</i>	duplete
<i>dd</i>	duplo duplete
<i>dt</i>	duplo tripleto
DMSO	dimetilsulfóxido
DMSO- <i>d</i> 6	dimetilsulfóxido deuterado
DQ	dye quenched
DTE	ditioeritritol
E-64	L-3-carboxi- <i>trans</i> -2,3-epoxipropionil-leucilamido(4-guanino)butano)
ECM	matriz extracelular
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
ESI	electrospray
EtOH	etanol

FDA	Food and Drug Administration
His	histidina
HMBC	heteronuclear multiple quantum correlation
HSQC	heteronuclear single quantum coherence
Hz	hertz
IC <sub>50</sub>	potência inibitória
INCA	Instituto Nacional do Câncer
<i>J</i>	constante de acoplamento
kDa	quilodalton
<i>K<sub>i</sub></i>	constante de afinidade
<i>K<sub>m</sub></i>	constante de Michaelis-Menten
<i>m</i>	multiplete
MeOH	metanol
MeOH- <i>d</i> 4	metanol deuterado-d4
MHz	mega hertz
MMA	Ministério do Meio Ambiente
<i>m/z</i>	relação massa carga
PBS	tampão fosfato salino
PCC	clorocromato de piridínio
RMN de <sup>1</sup> H	ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN de <sup>13</sup> C	ressonância magnética nuclear de carbono-13
<i>s</i>	simpleto
TNBC	triple negative breast cancer
UV	ultravioleta
<i>V<sub>max</sub></i>	velocidade máxima da reação
Z-Arg-Arg-MCA	carbобенzoxi-arginina-arginina-7-amino-4-metilcumarina
Z-Phe-Arg-MCA	carbобенzoxi-fenilalanina-arginina-7-amino-4-
metilcumarina	
WHO	World Health Organization

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 - Representação do sítio ativo das cisteíno proteases (EREZ, FAZ & BIBBI, 2009).....	5
FIGURA 1.2 - Representação dos subsítios das cisteíno proteases (MAGANHI, 2013). ....	6
FIGURA 1.3 - Estrutura da catepsina L humana (adaptada de TURK et al., 2002).....	8
FIGURA 1.4 - Estrutura da catepsina B humana (TOMOO, 2010).....	10
FIGURA 1.5 - Gráfico duplo recíproco de inibidor competitivo (COPELAND, 2005).....	12
FIGURA 1.6 - Gráfico duplo recíproco de inibidor não competitivo ( $\alpha= 1$ ) (COPELAND, 2005).....	13
FIGURA 1.7 - Gráfico duplo recíproco de inibidor incompetitivo (COPELAND, 2005). ....	14
FIGURA 1.8 - Estrutura da substância E-64 que atua como inibidor irreversível sobre as catepsinas. ....	15
FIGURA 1.9 - Biflavonoides isolados de <i>Taxodium mucronatum</i> e <i>Cycas guizhouensis</i> como inibidores da catepsina B. ....	15
FIGURA 1.10 - Alcaloides acridônicos inibidores da catepsina V.....	16
FIGURA 1.11 - Inibidores da catepsina K em testes clínicos e pré-clínicos.....	17
FIGURA 1.12 - Imagem ilustrativa da espécie <i>Myrcia lingua</i> Berg.....	21
FIGURA 3.1 - Esquema geral de inibição enzimática pelas catepsinas (adaptado SEVERINO, 2008).....	44
FIGURA 4.1 - Estrutura da mistura de ácidos anacárdicos ( <b>I</b> ).....	62
FIGURA 4.2 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da mistura de ácidos anacárdicos ( <b>I</b> ) (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). ....	63
FIGURA 4.3 - Mapa de contornos COSY da mistura de ácidos anacárdicos ( <b>I</b> ) (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). ....	63
FIGURA 4.4 - Espectro de HSQC da mistura de ácidos anacárdicos ( <b>I</b> ) (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). ....	64
FIGURA 4.5 – Cromatograma de íons totais da mistura de ácidos anacárdicos ( <b>I</b> ).....	65
FIGURA 4.6 - Estrutura do ácido quínico ( <b>II</b> ). ....	68
FIGURA 4.7 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>II</b> (400 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ ).....	70
FIGURA 4.8 - Ampliação da região $\delta$ 3,50 a 4,20 do espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>II</b> . ....	70

FIGURA 4.9 - Ampliação da região $\delta$ 1,80 a 2,10 do espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>II</b> . .....	71
FIGURA 4.10 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>II</b> (100 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ ). .....	72
FIGURA 4.11 - Mapa do contorno do experimento de HSQC da substância <b>II</b> (400 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ ). .....	73
FIGURA 4.12 - Estrutura do ácido gálico ( <b>III</b> ). .....	73
FIGURA 4.13 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>III</b> (400 MHz, $\text{MeOH-}d_4$ ). .....	74
FIGURA 4.14 - Estrutura do ácido protocatecuico ( <b>IV</b> ). .....	74
FIGURA 4.15 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>IV</b> (400 MHz, $\text{MeOH-}d_4$ ). .....	75
FIGURA 4.16 - Estrutura da miricetina 3- <i>O</i> -(4'- <i>O</i> -acetil)- $\alpha$ -ramnosídeo ( <b>V</b> ). .....	76
FIGURA 4.17 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>V</b> (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ ). .....	79
FIGURA 4.18 - Mapa de contornos COSY da substância <b>V</b> (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ ). .....	79
FIGURA 4.19 - Mapa de correlações HSQC da substância <b>V</b> (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ ). .....	80
FIGURA 4.20 - Mapa de correlações HMBC da substância <b>V</b> (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ ). .....	80
FIGURA 4.21 - Estrutura da miricetina 3- <i>O</i> - $\alpha$ -ramnosídeo ( <b>VI</b> ). .....	81
FIGURA 4.22 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>VI</b> (400 MHz, $\text{MeOH-}d_4$ ). .....	84
FIGURA 4.23 - Mapa de contornos COSY da substância <b>VI</b> (400 MHz, $\text{MeOH-}d_4$ ). .....	84
FIGURA 4.24 - Mapa de correlações HSQC da substância <b>VI</b> (400 MHz, $\text{MeOH-}d_4$ ). .....	85
FIGURA 4.25 - Mapa de correlações HMBC da substância <b>VI</b> (400 MHz, $\text{MeOH-}d_4$ ). .....	85
FIGURA 4.26 - Estrutura da miricetina 3- <i>O</i> - $\beta$ -glicosídeo ( <b>VII</b> ). .....	86
FIGURA 4.27 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>VII</b> (400 MHz, $\text{MeOH-}d_4$ ). .....	89
FIGURA 4.28 - Mapa de contornos COSY da substância <b>VII</b> (400 MHz, $\text{MeOH-}d_4$ ). .....	89
FIGURA 4.29 - Mapa de correlações HSQC da substância <b>VII</b> (400 MHz, $\text{MeOH-}d_4$ ). .....	90
FIGURA 4.30 - Mapa de correlações HMBC da substância <b>VII</b> (400 MHz, $\text{MeOH-}d_4$ ). .....	90
FIGURA 4.31 - Estrutura da quercetina 3- <i>O</i> - $\alpha$ -ramnosídeo ( <b>VIII</b> ). .....	91
FIGURA 4.32 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>VIII</b> (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ ). .....	94
FIGURA 4.33 - Mapa de contornos COSY da substância <b>VIII</b> (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ ). .....	94
FIGURA 4.34 - Mapa de correlações HSQC da substância <b>VIII</b> (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ ). .....	95
FIGURA 4.35 - Estrutura do ácido 3- <i>O</i> -acetil ursólico ( <b>IX</b> ). .....	97

FIGURA 4.36 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>IX</b> (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). .....	97
FIGURA 4.37 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>IX</b> (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). .....	98
FIGURA 4.38 - Espectro de RMN de $^{135}\text{DEPT}$ da substância <b>IX</b> (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). .....	100
FIGURA 4.39 - Estrutura do ácido 3- <i>epi</i> -ursólico ( <b>X</b> ). .....	100
FIGURA 4.40 - Demonstração da hidroxila na posição axial. ....	101
FIGURA 4.41 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>X</b> (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). .....	102
FIGURA 4.42 - Estrutura da mistura de ácidos ursólico e oleanólico ( <b>XI</b> ). ....	102
FIGURA 4.43 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>XI</b> (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). .....	103
FIGURA 4.44 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de <b>XI</b> (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). .....	104
FIGURA 4.45 - Estrutura do orselinato de metila ( <b>XII</b> ). .....	105
FIGURA 4.46 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>XII</b> (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). .....	105
FIGURA 4.47 - Mapa de correlações HSQC da substância <b>XII</b> (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). .....	107
FIGURA 4.48 - Mapa de correlações HMBC da substância <b>XII</b> (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). .....	107
FIGURA 4.49 - Expansão do mapa de correlações HMBC da substância <b>XII</b> (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). .....	108
FIGURA 4.50 - Estrutura do ácido ursólico ( <b>XIII</b> ). .....	108
FIGURA 4.51 - Demonstração da hidroxila na posição equatorial. ....	109
FIGURA 4.52 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>XIII</b> (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). .....	110
FIGURA 4.53 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>XIII</b> (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). .....	112
FIGURA 4.54 - Reação de hidrogenação. ....	113
FIGURA 4.55 - Estrutura do ácido anacárdico saturado ( <b>XIV</b> ). .....	113
FIGURA 4.56 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>XIV</b> (400 MHz, $\text{MeOH-}d_4$ ). .....	114
FIGURA 4.57 - Estrutura da miricetina ( <b>XV</b> ). .....	114
FIGURA 4.58 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>XV</b> (400 MHz, $\text{MeOH-}d_4$ ). .....	115
FIGURA 4.59 - Estrutura da 3,7,3'- <i>O</i> -metil quercetina ( <b>XVI</b> ). .....	116
FIGURA 4.60 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>XVI</b> (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ ). .....	117
FIGURA 4.61 - Mapa de correlações HMBC da substância <b>XVI</b> (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ ). .....	117
FIGURA 4.62 - Estrutura da 3,7,3',4'- <i>O</i> metil quercetina ( <b>XVII</b> ). .....	118

FIGURA 4.63 - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância <b>XVII</b> (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ).....	118
FIGURA 4.64 - Mapa de correlações HMBC da substância <b>XVII</b> (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )..	119
FIGURA 4.65 - Estrutura da 3,5,7,3',4'- <i>O</i> metil quercetina ( <b>XVIII</b> ).....	120
FIGURA 4.66 - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância <b>XVIII</b> (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ). ....	120
FIGURA 4.67 - Mapa de correlações HMBC da substância <b>XVIII</b> (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ).	121
FIGURA 4.68 - Estrutura da 3- <i>O</i> -acetil-ursolato de metila ( <b>XIX</b> ).....	122
FIGURA 4.69 - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância <b>XIX</b> (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ). ....	122
FIGURA 4.70 - Estrutura do ácido 3-oxo-oleanólico ( <b>XX</b> ).....	123
FIGURA 4.71 - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância <b>XX</b> (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	124
FIGURA 4.72 - Estrutura do ácido 3-oxima-oleanólico ( <b>XXI</b> ).....	124
FIGURA 4.73 - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância <b>XXI</b> (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ). ....	125
FIGURA 4.74 - Estrutura do ácido 3- <i>O</i> -acetil-oleanólico ( <b>XXII</b> ).....	126
FIGURA 4.75 - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância <b>XXII</b> (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	126
FIGURA 4.76 - Estrutura dos derivados de flavonoides obtidos de fontes diversas. ....	130
FIGURA 4.77 - Estrutura dos derivados de triterpenos obtidos de fontes diversas.....	134
FIGURA 4.78 - Gráficos duplo recíproco de Lineaweaver-Burk para as substâncias <b>XV</b> (a), <b>I-PN</b> (b) e <b>I-SA</b> (c).....	138
FIGURA 4.79 - Gráficos duplo recíproco de Lineaweaver-Burk para as substâncias <b>X</b> (a), <b>XXI</b> (b), <b>XXII</b> (c) e <b>X-PN</b> (d). ....	139
FIGURA 7.1 - Ilustração do cultivo de células tumorais no modelo 3D (SAMENI et al., 2012).....	149
FIGURA 7.2 - Síntese do inibidor <b>JK_2</b> complexado com rutênio (II).....	151
FIGURA 8.1 - SDS/PAGE da catepsina B e procatepsina B presente no lisado celular. (1) controle positivo catepsina B; (2) linhagem tumoral MDA-MB-231; (3) linhagem tumoral Hs578T. ....	153
FIGURA 8.2 - SDS/PAGE da catepsina L e procatepsina L presente no lisado celular. (1) controle positivo catepsina L; (2) linhagem tumoral MDA-MB-231; (3) linhagem tumoral Hs578T. ....	153
FIGURA 8.3 - Inibidor sintético dipeptídeo nitrila (substância <b>JK_1</b> ). Fórmula molecular: C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> .....	156
FIGURA 8.4 - Imagens em modelo 3D referente à degradação do DQ-colágeno IV pela linhagem de câncer de mama MDA-MB-231; Fluorescência em verde representa produtos de	

degradação do colágeno IV (25 µg/ml) e azul representa núcleos das células tumorais (corante Hoeschst 33342); (A) imagem controle negativo (DMSO); (B) imagem controle positivo (CA-074/ CA-074 Me (5 µM cada)); (C) imagem inibidor **JK\_1** (30 µM). Cada unidade da imagem apresentada corresponde a 42.68 µm. Amplificação: 20X..... 159

FIGURA 8.5 - Imagens em modelo 3D referente à degradação do DQ-colágeno IV pela linhagem de câncer de mama Hs578T; Fluorescência em verde representa produtos de degradação do colágeno IV (25 µg/ml) e azul representa núcleos das células tumorais (corante Hoeschst 33342); (A) imagem controle negativo (DMSO); (B) imagem controle positivo (CA-074/ CA-074 Me (5 µM cada)); (C) imagem inibidor **JK\_1** (30 µM). Cada unidade da imagem apresentada corresponde a 42.68 µm. Amplificação: 20X..... 159

FIGURA 8.6 - Imagens em modelo 3D referente à degradação do DQ-colágeno IV pela linhagem de câncer de mama Hs578T; Fluorescência em verde representa produtos de degradação do colágeno IV (25 µg/ml) e azul representa núcleos das células tumorais (corante Hoeschst 33342); (A) imagem controle negativo (DMSO); (B) imagem inibidor **JK\_2** (1 µM) no escuro; (C) imagem inibidor **JK\_2** (1 µM) sob exposição da luz. Cada unidade da imagem apresentada corresponde a 42.68 µm. Amplificação: 20X..... 162

FIGURA 8.7 - Imagens em modelo 3D referente à degradação do DQ-colágeno IV pela linhagem de câncer de mama MDA-MB-231; Fluorescência em verde representa produtos de degradação do colágeno IV (25 µg/ml) e azul representa núcleos das células tumorais (corante Hoeschst 33342); (A) imagem controle negativo (DMSO); (B) imagem inibidor **JK\_2** (1 µM) no escuro; (C) imagem inibidor **JK\_2** (1 µM) sob exposição da luz. Cada unidade da imagem apresentada corresponde a 42.68 µm. Amplificação: 20X..... 162

FIGURA 8.8 - Imagens em modelo 3D referente à degradação do DQ-colágeno IV pela linhagem de câncer de mama MDA-MB-231; Fluorescência em verde representa produtos de degradação do colágeno IV (25 µg/ml) e azul representa núcleos das células tumorais (corante Hoeschst 33342); (A) imagem controle negativo (DMSO); (B) imagem do complexo cis-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(MeCN)<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> (1 µM) no escuro; (C) imagem do complexo cis-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(MeCN)<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> (1 µM) sob exposição da luz. Cada unidade da imagem apresentada corresponde a 42.68 µm. Amplificação: 20X..... 164

FIGURA 8.9 - Imagens em modelo 3D referente ao ensaio de viabilidade celular na linhagem MDA-MB-231; Fluorescência verde (2 µM calcein AM) refere-se as células vivas e fluorescência vermelha (4 µM ethidium homodimer-1) refere-se as células mortas; (A) imagem controle negativo (DMSO); (B) imagem inibidor **JK\_2** (1 µM) no escuro; (C) imagem inibidor **JK\_2** (1 µM) sob exposição da luz. Amplificação: 10X..... 165

FIGURA 8.10 - Imagens em modelo 3D referente ao ensaio de viabilidade celular na linhagem Hs578T; Fluorescência verde (2 µM calcein AM) refere-se as células vivas e fluorescência vermelha (4 µM ethidium homodimer-1) refere-se as células mortas; (A) imagem controle negativo (DMSO); (B) imagem inibidor **JK\_2** (1 µM) no escuro; (C) imagem inibidor **JK\_2** (1 µM) sob exposição da luz. Amplificação: 10X..... 165



## LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1 - Alguns inibidores enzimáticos em uso clínico (Adaptada de COPELAND, 2005).....	4
TABELA 3.1 - Relação do material vegetal, extratos e suas respectivas massas obtidas.....	28
TABELA 4.1 - Inibição enzimática das subfrações provenientes de MLF1 na dosagem de 125 µg/ ml.....	61
TABELA 4.2 - Identificação dos ácidos anacárdicos por ESI (-)-MS.....	65
TABELA 4.3 - Inibição enzimática das subfrações provenientes de MLF2 na dosagem de 125 µg/ ml.....	67
TABELA 4.4 - Inibição enzimática das subfrações provenientes de MLF294 na dosagem de 125 µg/ ml.....	67
TABELA 4.5 - Dados de RMN de <sup>1</sup> H do ácido quínico (II) e comparação com a literatura...69	69
TABELA 4.6 - Dados de RMN de <sup>1</sup> H do ácido protocatecuico e comparação com a literatura. ....	75
TABELA 4.7 - Dados de RMN de <sup>1</sup> H e projeção de <sup>13</sup> C da miricetina 3-O-(4''-O-acetil)-α-ramnosídeo (V) e comparação com a literatura. ....	78
TABELA 4.8 - Dados de RMN de <sup>1</sup> H e projeção de <sup>13</sup> C da miricetina 3-O-α-ramnosídeo (VI) e comparação com a literatura.....	83
TABELA 4.9 - Dados de RMN de <sup>1</sup> H e projeção de <sup>13</sup> C da miricetina 3-O-β-glicosídeo (VII) e comparação com a literatura.....	88
TABELA 4.10 - Dados de RMN de <sup>1</sup> H e projeção de <sup>13</sup> C da quercetina 3-O-α-ramnosídeo (VIII) e comparação com a literatura.....	93
TABELA 4.11 - Inibição enzimática das subfrações provenientes de MLC1 na dosagem de 125 µg/ ml.....	96
TABELA 4.12 - Dados de RMN de <sup>13</sup> C do ácido 3-O-acetil ursólico (IX) e comparação com a literatura.....	99
TABELA 4.13 - Dados de RMN de <sup>1</sup> H e projeção de <sup>13</sup> C do orselinato de metila (XII) e comparação com a literatura. ....	106
TABELA 4.14 - Dados de RMN de <sup>13</sup> C do ácido ursólico (XIII) e comparação com a literatura.....	111
TABELA 4.15 - Valor de K <sub>m</sub> sobre as catepsinas humanas B e L.....	127
TABELA 4.16 - Inibição enzimática das substâncias isoladas das folhas de <i>M. lingua</i> e derivados.....	129
TABELA 4.17 - Potência (IC <sub>50</sub> ) dos flavonoides sobre CTSB e CTSL.....	131

TABELA 4.18 - Inibição enzimática dos triterpenoides provenientes do caule de <i>M. lingua</i> e derivados. ....	133
TABELA 4.19- Potência (IC <sub>50</sub> ) dos triterpenoides sobre CTSB e CTSL. ....	135
TABELA 4.20 - Valores de $K_i$ sobre CTSB. ....	137
TABELA 4.21 - Valores de $K_i$ sobre CTSL. ....	139
TABELA 8.1 - Inibição dos flavonoides e biflavonoides sobre a catepsina B celular. ....	154
TABELA 8.2 - Inibição dos triterpenos sobre a catepsina L celular. ....	155
TABELA 8.3 - Avaliação da potência (IC <sub>50</sub> ) dos compostos sintéticos sobre a catepsina B humana purificada. ....	157
TABELA 8.4 - Avaliação da potência (IC <sub>50</sub> ) dos compostos sintéticos sobre a catepsina B presente no lisado celular. ....	157

## LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 3.1 - Fluxograma da partição líquido-líquido dos extratos. ....	27
ESQUEMA 3.2 - Fracionamento da fração MLF1. ....	29
ESQUEMA 3.3 - Fracionamento da fração MLF2. ....	30
ESQUEMA 3.4 - Resumo do fracionamento das frações MLF291 e MLF292.....	31
ESQUEMA 3.5 - Fracionamento da fração MLF291-HI. ....	32
ESQUEMA 3.6 - Fracionamento da fração MLF291-G. ....	33
ESQUEMA 3.7 - Fracionamento da fração MLF292-H. ....	34
ESQUEMA 3.8 - Fracionamento da fração MLF292-F. ....	35
ESQUEMA 3.9 - Fracionamento da fração MLCE. ....	36
ESQUEMA 3.10 - Fracionamento da fração MLC-1B e MLC-1C. ....	37
ESQUEMA 3.11 - Fracionamento da fração MLC-1BE.....	38
ESQUEMA 3.12 - Fracionamento da fração MLC-1BC.....	39
ESQUEMA 3.13 - Fracionamento da fração MLC-1CD. ....	39

## LISTA DE GRÁFICOS

- GRÁFICO 4.1 - Triagem dos extratos sobre as catepsinas B e L na dosagem de 125 µg/ml. Extrato etanólico (E); caule (C); folha (F); raiz (R); *Drimys brasiliensis* (DB); *Memora axillaris* (MA); *Tabebuia ochracea* (TO); *Erythroxylum suberosum* (ES); *Vochysia tucanorum* (VT); *Dalbergia miscolobium* (DM); *Myrcia lingua* (ML). .....58
- GRÁFICO 4.2 - Triagem das frações sobre as catepsina L na dosagem de 125 µg/ml. Caule (C); folha (F); *Drimys brasiliensis* (DB); *Erythroxylum suberosum* (ES); *Dalbergia miscolobium* (DM); *Myrcia lingua* (ML). .....59
- GRÁFICO 4.3 - Triagem das frações sobre a catepsina B na dosagem de 125 µg/ml. Caule (C); Folha (F); *Drimys brasiliensis* (DB); *Erythroxylum suberosum* (ES); *Dalbergia miscolobium* (DM); *Myrcia lingua* (ML). .....60
- GRÁFICO 8.1 - Quantificação (fluorescência/célula) da degradação do DQ-colágeno IV pela substância **JK\_1** na presença das linhagens MDA-MB-231 e Hs578T; DMSO (controle negativo); CA-074/ CA-074 Me (5 µM cada). .....160
- GRÁFICO 8.2 - Redução da degradação do DQ-colágeno IV total e pericelular pela substância **JK\_1** (30 µM) na presença das linhagens MDA-MB-231 e Hs578T; DMSO (controle negativo); CA-074/ CA-074 Me (5 µM cada).....161
- GRÁFICO 8.3 - Quantificação (fluorescência/célula) da degradação do DQ-colágeno IV pela substância **JK\_2** na presença das linhagens MDA-MB-231 e Hs578T; DMSO (controle negativo). .....163
- GRÁFICO 8.4 - Quantificação (fluorescência/célula) da degradação do DQ-colágeno IV pelo complexo cis-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(MeCN)<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> na presença das linhagens MDA-MB-231 e Hs578T; DMSO (controle negativo). .....164

## RESUMO

BUSCA POR INIBIDORES DE CATEPSINAS EM PLANTAS DO CERRADO PAULISTA E AVALIAÇÃO DA PROTEÓLISE TUMORAL *IN VITRO* – Este trabalho apresenta o estudo biomonitorado de espécies de plantas do cerrado paulista na busca de inibidores enzimáticos de catepsinas B e L. Dentre todos os extratos avaliados, a espécie *Myrcia lingua* Berg. se destacou pela elevada potência. Para avaliação da inibição enzimática foram selecionadas as catepsinas B e L, que são cisteíno proteases responsáveis pela degradação da matriz extracelular. Foram isolados compostos bioativos de diferentes classes sendo que os flavonoides foram os mais ativos sobre CTSB (IC<sub>50</sub> entre 4,9 - 37,2 µM) e os triterpenos mais eficazes sobre CTSL (IC<sub>50</sub> entre 2,4 - 39,5 µM). Os triterpenos foram identificados como inibidores competitivos da CTSL e os flavonoides como inibidores incompetitivos da CTSB. Com intuito de realizar investigação mais detalhada ao nível celular, optou-se por realizar ensaios de avaliação da proteólise tumoral *in vitro* em linhagens de câncer de mama triplamente negativa. Os inibidores naturais apresentaram resultados pouco satisfatórios e com isso buscou-se avaliação de inibidores sintéticos de proteases. O composto sintético dipeptídeo nitrila (JK\_1), inibidor da CTSB, foi complexado com rutênio II (JK\_2) e através da reação de fotoativação buscou-se uma estratégia para delimitar a ação tecidual dos inibidores como forma de obter uma melhor localização do efeito terapêutico na região tumoral. Sobre a catepsina B o inibidor JK\_2 foi menos ativo no escuro (IC<sub>50</sub> 3,4 µM) quando comparado ao exposto a radiação (IC<sub>50</sub> 0,3 µM) apresentando uma razão de 12:1. Nos ensaios de proteólise tumoral 3D visualizou-se inibição da degradação de DQ-colágeno IV através da redução da fluorescência. Deste modo, os resultados obtidos contribuem para a busca de novos protótipos, uma vez que os ensaios proteolíticos em células permitem uma avaliação mais detalhada dos inibidores das proteases, antes de serem encaminhados para testes *in vivo*.

## ABSTRACT

SEARCH FOR CATHEPSIN INHIBITORS USING CERRADO PLANTS AND *IN VITRO* TUMOR PROTEOLYSIS EVALUATION - The aim of this work is search for cysteine proteases inhibitors using a bioactivity-guided assay. We have selected different plants for the initial screening. Among all evaluated extracts, the ones obtained from *Myrcia lingua* Berg. showed to be the most potent. Cathepsin B and L are cysteine proteases which play a role in the degradation of extracellular matrix and facilitate tumor progression. Among the obtained inhibitors, flavonoids were the most active against CTSB (IC<sub>50</sub> values from 4.9 to 37.2 μM). On the other side, triterpenes were more potent against CTSL (IC<sub>50</sub> values from 2.4 to 39.5 μM). The triterpenes showed competitive inhibition and the flavonoids showed uncompetitive inhibition. Aiming to explore enzyme inhibition on tumor cells, we report proteolysis assay using live cell 3D model that allows to localize and to quantify proteolysis in live triple negative breast cancer cells. The natural inhibitors isolated from plants were evaluated against proteases on cell lysate but did not demonstrate good inhibition and we decided to evaluate synthetic cathepsin B inhibitors. A dipeptide nitrile compound (JK\_1) was synthesized and then complexed with ruthenium II (JK\_2). Caged bioactive molecules that can be active upon irradiation became a strategy to reduce side effects in surrounding tissues and facilitate spatial control over cysteine protease activity. On pure enzyme activity assay JK\_2 was less active under dark (IC<sub>50</sub> 3.4 μM) comparing with light irradiation (IC<sub>50</sub> 0.3 μM), corresponding to a ratio of 12:1. Proteolysis assay using live cell demonstrated the inhibition of DQ-collagen IV by reducing fluorescence. Thus, the outcomes of this study could contribute to identify new hits for the development of potential anticancer drugs, once live cell imaging proteolysis assay is useful for verifying the efficacy of cathepsin inhibitors prior to testing in *in vivo* models.

# SUMÁRIO

1	– INTRODUÇÃO (PARTE I)	2
1.1	- Câncer	2
1.2	- Enzimas Como Alvo Terapêutico	3
1.3	- Cisteíno Proteases Lisossomais	4
1.3.1	- Catepsina L (EC 3.4.22.15)	8
1.3.2	- Catepsina B (EC 3.4.22.1)	9
1.4	- Modo de Inibição Enzimática	11
1.4.1	- Competitiva	11
1.4.2	- Não competitiva	12
1.4.3	- Incompetitiva	13
1.5	- Inibidores das Catepsinas	14
1.6	- Plantas do Cerrado como Fonte de Produtos Naturais Bioativos	17
1.6.1	- <i>Tabebuia ochracea</i> (Cham.) Standl.	18
1.6.2	- <i>Memora axillaris</i> K. Schum.	19
1.6.3	- <i>Vochysia tucanorum</i> Mart.	19
1.6.4	- <i>Dalbergia miscolobium</i> Benth.	19
1.6.5	- <i>Erythroxylum suberosum</i> St. Hil.	20
1.6.6	- <i>Drimys brasiliensis</i> Miers.	20
1.6.7	- <i>Myrcia lingua</i> Berg.	20
2	– OBJETIVO GERAL (PARTE I)	22
2.1	- Objetivos específicos	22
3	- PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL (PARTE I)	23
3.1	- Materiais	23
3.1.1	- Materiais cromatográficos	23
3.1.2	- Solventes e Reagentes	23
3.1.3	- Enzimas	24
3.1.4	- Reveladores	24
3.2	- Equipamentos	24
3.2.1	- Dispensor usado na extração	24
3.2.2	- Evaporadores rotativos	24

3.2.3	- Balança analítica .....	24
3.2.4	- Câmara de UV .....	25
3.2.5	- Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear .....	25
3.2.6	- Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	25
3.2.7	- Espectrofluorímetro .....	25
3.3	- Procedimento Experimental.....	25
3.3.1	- Coleta e identificação do material botânico .....	26
3.3.2	- Obtenção de extratos e frações .....	26
3.3.3	- Metodologia para isolamento dos metabólitos de <i>Myrcia lingua</i> Berg. ....	28
3.3.3.1	- Fracionamento da fração hexânica MLF1 .....	28
3.3.3.2	- Fracionamento da fração acetato de etila MLF2 .....	30
3.3.3.3	- Fracionamento da fração hexânica MLC1 .....	35
3.3.4	- Modificações estruturais .....	40
3.3.4.1	- Reação de hidrogenação da substância I para obtenção da substância XIV ..	40
3.3.4.2	- Reação de hidrólise da substância VI para obtenção da substância XV .....	40
3.3.4.3	- Reação de metilação da quercetina (I-SA) para obtenção das substâncias XVI, XVII e XVIII.....	41
3.3.4.4	- Reação de metilação da substância IX para obtenção da substância XIX .....	41
3.3.4.5	- Reação de oxidação de III-SA para obtenção da substância XX.....	41
3.3.4.6	- Reação de formação de oxima (XXI) a partir da substância XX.....	42
3.3.4.7	- Reação de acetilação de III-SA para obtenção da substância XXII.....	42
3.3.5	- Metodologia dos ensaios enzimáticos.....	43
3.3.5.1	- Ensaios enzimáticos sobre as catepsinas B e L.....	43
3.3.5.2	- Determinação do valor de $K_m$ .....	45
3.3.5.3	Determinação da potência ( $IC_{50}$ ).....	45
3.3.5.4	- Determinação do mecanismo de ação .....	45
4	- RESULTADOS E DISCUSSÃO (PARTE I).....	47
4.1	- Substâncias isoladas .....	47
4.2	- Substâncias provenientes de modificações estruturais.....	51
4.3	- Substâncias provenientes de fontes diversas .....	54
4.4	- Ensaios de inibição sobre as catepsinas B e L dos extratos e das frações de plantas do cerrado paulista.....	57
4.5	- <i>Myrcia lingua</i> Berg.....	60
4.5.1	- Estudo biomonitorado da fração MLF1 .....	60



4.5.1.1	- Elucidação estrutural da mistura de ácidos anacárdicos (I).....	61
4.5.2	- Estudo biomonitorado da fração MLF2 .....	66
4.5.2.1	- Elucidação estrutural do ácido quínico (II) .....	68
4.5.2.2	- Elucidação estrutural do ácido gálico (III) .....	73
4.5.2.3	Elucidação estrutural do ácido protocatecuico (IV).....	74
4.5.2.4	- Elucidação estrutural da miricetina 3- <i>O</i> -(4''- <i>O</i> -acetil)- $\alpha$ -ramnosídeo (V).....	76
4.5.2.5	- Elucidação estrutural da miricetina 3- <i>O</i> - $\alpha$ -ramnosídeo (VI).....	81
4.5.2.6	- Elucidação estrutural da miricetina 3- <i>O</i> - $\beta$ -glicosídeo (VII).....	86
4.5.2.7	- Elucidação estrutural da quercetina 3- <i>O</i> - $\alpha$ -ramnosídeo (VIII).....	91
4.5.3	- Estudo biomonitorado da fração MLC1 .....	95
4.5.3.1	- Elucidação estrutural do ácido 3- <i>O</i> -acetil ursólico (IX) .....	96
4.5.3.2	- Elucidação estrutural do ácido 3- <i>epi</i> -ursólico (X).....	100
4.5.3.3	- Elucidação estrutural da mistura dos ácidos ursólico e oleanólico (XI) .....	102
4.5.3.4	- Elucidação estrutural do orselinato de metila (XII) .....	104
4.5.3.5	- Elucidação estrutural do ácido ursólico (XIII) .....	108
4.5.4	- Modificações estruturais .....	112
4.5.4.1	- Reação de hidrogenação da mistura I para obtenção da substância XIV .....	112
4.5.4.2	- Reação de hidrólise da substância VI para obtenção da substância XV .....	114
4.5.4.3	- Reação de metilação da quercetina (I-PN) para obtenção das substâncias XVI, XVII e XVIII.....	115
4.5.4.4	- Reação de metilação da substância IX para obtenção da substância XIX. ..	121
4.5.4.5	- Reação de oxidação de III-SA para obtenção da substância XX.....	123
4.5.4.6	- Reação de obtenção da oxima XXI a partir de XX.....	124
4.5.4.7	- Reação de acetilação do ácido oleanólico (III-SA) para obtenção de XXII.....	125
4.6	Ensaio de Inibição Enzimática .....	127
4.6.1	- Determinação do valor de $K_m$ para Z-FR-MCA .....	127
4.6.2	- Avaliação enzimática e determinação da potência ( $IC_{50}$ ) dos inibidores sobre as catepsinas B e L .....	127
4.6.3	- Flavonoides e derivados .....	128
4.6.4	- Triterpenoides e derivados .....	133
4.6.5	- Determinação do mecanismo de ação e valor do $K_i$ dos flavonoides sobre a catepsina B.....	137
4.6.6	- Determinação do mecanismo de ação e valor do $K_i$ dos triterpenos sobre a catepsina L.....	138

5	- INTRODUÇÃO (PARTE II).....	141
5.1	- Câncer de mama .....	141
5.2	- Proteólise Tumoral (Modelo 3D) .....	142
6	- OBJETIVO GERAL (PARTE II) .....	143
6.1	- Objetivos específicos .....	143
7	- PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL (PARTE II).....	144
7.1	- Equipamentos .....	144
7.1.1	- Espectrofluorímetro .....	144
7.1.2	- Incubadora .....	144
7.1.3	- Sonicador de células.....	144
7.1.4	- Centrífugas .....	144
7.1.5	- Scanner para membranas de Western Blot.....	144
7.1.6	- Microscópio óptico .....	145
7.1.7	- Microscópio confocal.....	145
7.2	- Materiais .....	145
7.3	- Procedimento Experimental.....	146
7.3.1	- Cultivo e Coleta das Linhagens Tumorais .....	146
7.3.2	- Western Blot Análise .....	146
7.3.3	- Triagem Enzimática (enzima pura).....	147
7.3.4	- Avaliação da Inibição Enzimática Celular (lisado celular) .....	147
7.3.5	- Avaliação da Proteólise Tumoral <i>in vitro</i> (Modelo 3D) .....	148
7.3.6	- Ensaio de Viabilidade Celular .....	149
7.3.7	- Fotoativação do Inibidor Sintético Complexado com Rutênio .....	150
8	- RESULTADOS E DISCUSSÃO (PARTE II).....	152
8.1	- Expressão Enzimática .....	152
8.2	- Avaliação dos Produtos Naturais em Inibição Enzimática Celular .....	154
8.3	- Avaliação dos Inibidores Sintéticos em Inibição Enzimática Celular .....	156
8.4	- Avaliação da Proteólise Tumoral <i>In Vitro</i> (Modelo 3D).....	158
9	- CONCLUSÕES .....	167
10	- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	169

# **PARTE I**

## **BUSCA POR INIBIDORES DE CATEPSINAS EM PLANTAS DO CERRADO PAULISTA**

# **1 – INTRODUÇÃO (PARTE I)**

## **1.1 - Câncer**

O termo câncer pode ser definido como uma patologia que constitui um grupo de mais de 100 doenças podendo afetar qualquer parte do organismo. Entretanto, apesar de haver diversos tipos de câncer todos eles se iniciam com o crescimento descontrolado de células anormais. Assim, diferentes tipos de câncer apresentam velocidade de multiplicação de células distintas, podendo ser mais ou menos invasivos e agressivos. Usualmente as intervenções terapêuticas são realizadas através de radioterapia, quimioterapia e intervenção cirúrgica (ACS, 2014; WHO, 2014; INCA, 2014). Em geral, a velocidade de crescimento dos tumores está relacionada com seu tipo de diferenciação, de modo que tumores malignos, em sua maioria, crescem mais rapidamente que as lesões benignas e se espalham através das metástases (CONTRAN, KUMAR & COLLINS, 2000).

Metástases são processos biológicos dinâmicos e complexos envolvendo interação entre células sadias e tumorais e se definem como a capacidade de invadir órgãos vizinhos ou distantes, sendo a principal causa de morte em processos tumorais (INCA, 2014; WHO, 2014; ENGERS & GABBERT, 2000). Atualmente o câncer se apresenta como uma das principais causas de mortes mundiais e a previsão para 2015 é de que ocorram cerca de meio milhão de novos casos. Dentre os diversos tipos conhecidos de cânceres os que apresentam os maiores índices de mortalidade são câncer de mama, próstata, cólon, estômago e pulmão (WHO, 2014).

Compreender e controlar tais doenças malignas requer conhecimentos científicos e experiências que vão desde entendimento dos mecanismos de regulação molecular intracelular até a busca por novas terapias mais seletivas e eficazes. Assim pode-se afirmar que a prevenção e o controle do

câncer estão entre os mais importantes desafios científicos e de saúde pública (INCA, 2014).

## **1.2 - Enzimas Como Alvo Terapêutico**

As enzimas são descritas como macromoléculas responsáveis por catalisarem reações biológicas essenciais para a manutenção da vida. São proteínas e a sua atividade catalítica depende da integridade de suas conformações nativas. Apresentam-se como excelentes alvos para intervenções terapêuticas, sendo assim extremamente atrativas na busca por fármacos frente às inúmeras patologias (COPELAND, 2005; NELSON & COX, 2011).

Estudos descritos na literatura afirmam que aproximadamente 47 % dos medicamentos disponíveis no mercado farmacêutico agem sobre um mecanismo de inibição enzimático, e esta estratégia é bem representada por uma significativa parcela de fármacos antivirais, antiparasitários e antibióticos em uso clínico (Tabela 1.1) (COPELAND, 2005).

Apesar das enzimas serem essenciais para a vida, a sua atividade desregulada pode levar ao desenvolvimento de diversas patologias. A atividade proteolítica das enzimas se faz necessária em diversos processos pró-tumorais tais como angiogêneses e metástases. Conseqüentemente, o aumento da expressão e atividade dessas proteases está relacionado à progressão de tumores malignos e ao mal prognóstico em pacientes cancerígenos (COPELAND, 2005; PALERMO & JOYCE, 2007).

TABELA 1.1 - Alguns inibidores enzimáticos em uso clínico (Adaptada de COPELAND, 2005).

Medicamento	Enzima Alvo	Uso Clínico
Aspirina <sup>®</sup>	Ciclooxigenase	Inflamações, dor e febre
Captopril <sup>®</sup>	ECA	Hipertensão
Lovax <sup>®</sup>	HMG-CoA redutase	Hipercolesterolemia
Miantrex <sup>®</sup>	Dihidrofolato redutase	Câncer
Floxacin <sup>®</sup>	DNA girase	Infecções do trato urinário
Viagra <sup>®</sup>	Fosfodiesterase	Disfunção erétil

### 1.3 - Cisteíno Proteases Lisossomais

As proteases, também conhecidas como peptidases, representam uma grande família de enzimas responsáveis pela clivagem de ligações peptídicas. Sabe-se que o genoma humano codifica mais de 550 proteases que estão envolvidas na regulação de diferentes processos fisiológicos (MOHAMED & SLOANE, 2006; REISER, ADAIR & REINHECKEL, 2010).

Nos mamíferos, uma das mais importantes cisteíno proteases são as catepsinas lisossomais que com base na sua estrutura catalítica podem ser classificadas em serino proteases (catepsinas A e G), aspartil proteases (catepsinas D e E) e cisteíno proteases (OTTO & SCHIRMEISTER, 1997; REISER, ADAIR & REINHECKEL, 2010).

A família das cisteíno proteases humanas constitui a maior família das catepsinas e possui 11 membros (catepsinas B, C, F, H, L, O, S, V, W e X). São caracterizadas por dois domínios, R (direita) e L (esquerda), que se organizam em uma configuração na forma de V. O sítio ativo se localiza na parte inferior da fenda (TURK et al., 2002; BERDOWSKA, 2004;) e é parte de uma tríade catalítica formada por resíduos de cisteína (Cys 25), histidina (His159) e asparagina (Asn 175) (LECAILLE, KALETA & BROMME, 2002;

TOMOO, 2010). A asparagina possui a função de manter os resíduos de cisteína e histidina em geometria favorável frente às etapas do mecanismo catalítico. Esta configuração permite a formação de um par iônico, através da desprotonação do tiol, entre a cisteína e as cadeias laterais da histidina, o qual é estabilizado por ligações de hidrogênio pelo resíduo Asn 175. Dessa forma, o íon tiolato formado realiza um ataque nucleofílico no carbono carbonílico da ligação peptídica do substrato levando a formação de um intermediário tetraédrico. Em pH ótimo, o resíduo de cisteína encontra-se desprotonado e atua como nucleófilo para a formação de uma ligação covalente com o substrato protéico. O resíduo de histidina encontra-se protonado formando um par iônico tiol-imidazol (Figura 1.1) (OTTO & SCHIRMEISTER, 1997; LECAILLE, KALETA & BROMME, 2002; EREZ, FAZ & BIBBI, 2009; REISER, ADAIR & REINHECKEL, 2010).

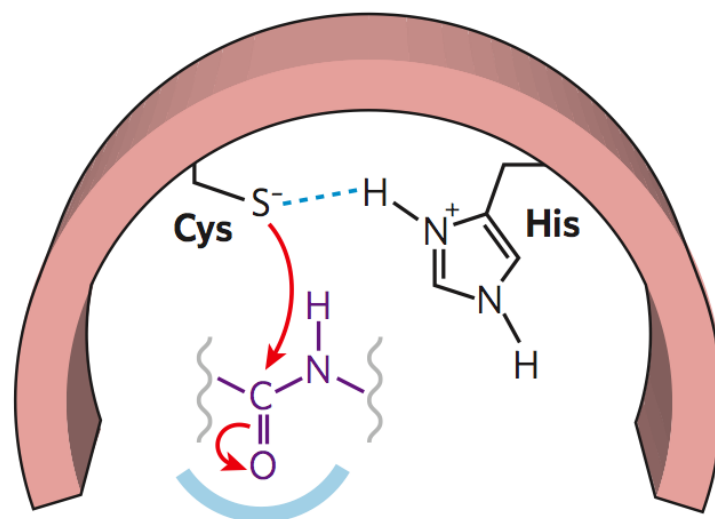


FIGURA 1.1 - Representação do sítio ativo das cisteíno proteases (EREZ, FAZ & BIBBI, 2009).

O sítio catalítico das cisteíno proteases está localizado dentro da região de ligação com o substrato que apresenta bolsos (subsítios) para ligação N-terminal e C-terminal dos aminoácidos. O sítio ativo das proteases pode ser dividido em sete subsítios, onde cada subsítio acomoda de forma específica um

resíduo de aminoácido do substrato. O processo catalítico de uma ligação peptídica não depende somente dos resíduos que formam essa ligação, mas também da natureza dos resíduos presentes na vizinhança, os quais ocupam os subsítios adjacentes. De acordo com a nomenclatura de SCHECHTER & BERGER (1967), subsítios na porção N-terminal são determinados S1, S2, S3... Sn, e subsítios na porção C-terminal são chamados S1', S2', S3'... Sn', sendo que cada subsítio representa quais resíduos de aminoácidos podem se ligar ao substrato de maneira específica. As cisteíno proteases apresentam sete subsítios assim representados por S1-S4 e S1'-S3' ilustrados na Figura 1.2 (SCHECHTER & BERGER, 1967; LECAILLE, KALETA & BROMME, 2002; TOMOO, 2010).

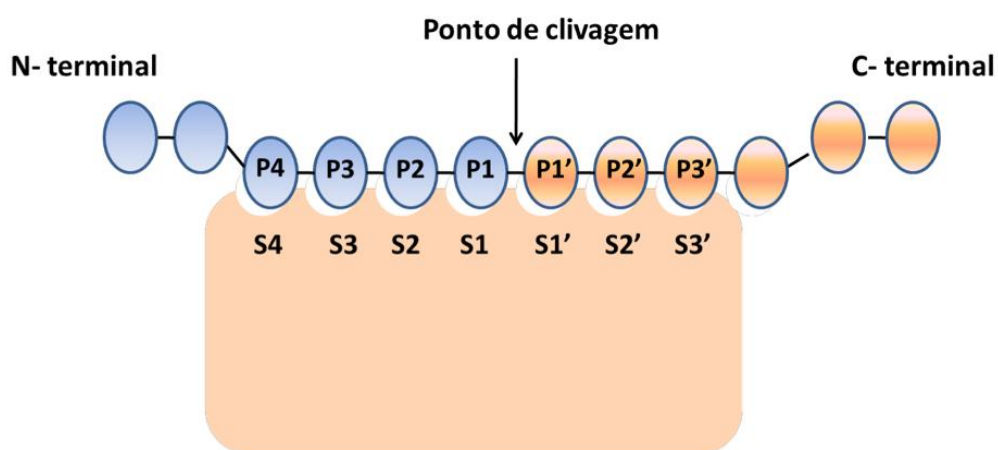


FIGURA 1.2 - Representação dos subsítios das cisteíno proteases (MAGANHI, 2013).

A grande maioria das catepsinas é descrita como endopeptidases (B, L, S, K, F, D, V), entretanto algumas se apresentam como exopeptidases (B, X, C, H). As catepsinas são sintetizadas como precursoras inativas, que se tornam ativas dentro do ambiente ácido dos lisossomos, onde elas funcionam principalmente como proteases intracelulares (OTTO & SCHIRMEISTER, 1997; TURK, TURK & TURK, 2000; PALERMO & JOYCE, 2007; TURK & STOKA, 2007; VASILJEVA & TURK, 2008). No entanto, recentemente demonstrou-se que muitas dessas enzimas não são estritamente encontradas nos



lisossomos, podendo ser extracelulares, acumular-se em diferentes organelas como núcleo e citossol e participar de processos celulares especializados levando a diversas patologias tais como progressão de tumores malignos, metástases (PALERMO & JOYCE, 2007; VASILJEVA & TURK, 2008; WATSON & KREUZALER, 2009), doença de Alzheimer (HOOK, HOOK & KINDY, 2010), artrite reumatóide e osteoporose (YASUDA, KALETA & BROMME, 2005).

Os primeiros relatos que evidenciaram a presença das catepsinas no câncer surgiram por volta de 1930 a partir de estudos de transplante tumorais em ratos. O interesse em catepsinas relacionadas ao processo cancerígeno continua até o presente momento, uma vez que foram confirmadas como possíveis alvos terapêuticos na busca por novos agentes quimioterápicos (VASILJEVA & TURK, 2008).

Estudos afirmam que nos processos cancerígenos as catepsinas podem ser encontradas tanto no meio intracelular quanto extracelular, sendo que as catepsinas B e L são as que mais contribuem para os eventos proteolíticos durante a progressão tumoral, estando por sua vez diretamente envolvidas na degradação de componentes da matriz extracelular (ECM) tais como laminina, fibronectina e colágeno (TURK, KOS & TURK, 2004; MOHAMED & SLOANE, 2006; PALERMO & JOYCE, 2007; AGGARWAL & SLOANE, 2014). Dessa forma uma compreensão cada vez maior das catepsinas e seu mecanismo de ação identificam essas enzimas como alvos terapêuticos promissores no desenvolvimento de novos fármacos antitumorais (EDWARDS & MURPHY, 1998).

Neste trabalho serão abordadas as principais características e funções das catepsinas B e L.

### 1.3.1 - Catepsina L (EC 3.4.22.15)

A catepsina L (Figura 1.3) é uma endopeptidase, sendo considerada a cisteína protease lisossomal com maior atividade proteolítica nos lisossomos (OTTO & SCHIRMEISTER, 1997). É constituída por uma cadeia polipeptídica de 217 resíduos de aminoácidos e massa molecular de 26 kDa (RITONJA et al., 1996).

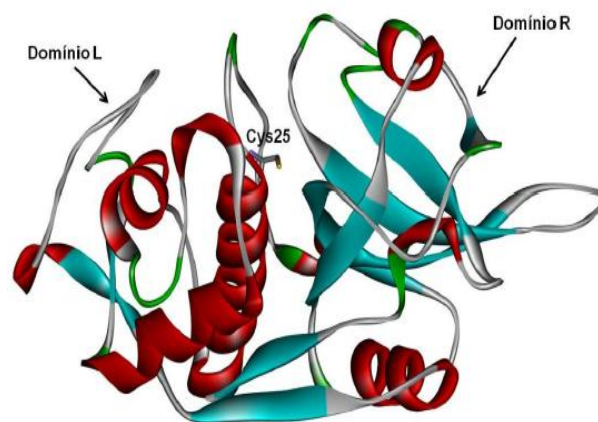


FIGURA 1.3 - Estrutura da catepsina L humana (adaptada de TURK et al., 2002).

De acordo com estudos realizados por MACABEO-ONG e colaboradores (2003) a catepsina L está presente em elevadas quantidades em carcinomas orais, e também se correlaciona com alguns parâmetros clínicos tais como tamanho do tumor e estágio da doença (MACABEO-ONG et al., 2003). O envolvimento da catepsina L em metástase de doenças ósseas encontra-se bem fundamentado, uma vez que sua superexpressão tem sido observada em tumores ósseos como osteosarcoma, mieloma múltiplo e condrosarcoma (LETO et al., 2010). Resultados de ensaios também evidenciaram a superexpressão e contribuição de catepsina L em invasões celulares por melanoma B16 (YANG & COX, 2007) e progressão tumoral em câncer colorretal (TROY et al., 2004).

Estando presente no compartimento lisossomal ácido a catepsina L é proteoliticamente ativa, pois exibe atividade ótima em pH 5,5. Dessa forma, a acidificação do ambiente tumoral causada pelo aumento da glicólise anaeróbia

em células cancerígenas propicia a atividade extracelular da catepsina L. Em ambientes ácidos a catepsina L é capaz de degradar componentes da ECM tais como colágeno tipo I e IV, fibronectina e laminina (HASHIMOTO et al., 2006; LANKELMA et al., 2010).

A degradação da ECM, por sua vez, estimula a liberação de fatores de crescimento no sítio metastático, sugerindo assim que a inibição da catepsina L é capaz de diminuir o avanço da metástase tumoral (LANKELMA et al., 2010).

### **1.3.2 - Catepsina B (EC 3.4.22.1)**

Dentre todas as cisteíno proteases lisossomais, a catepsina B (Figura 1.4) é a mais estudada e também a mais abundante. Atua como endo e exopeptidase, é constituída por uma cadeia polipeptídica de 254 resíduos de aminoácidos e massa molecular de 30 kDa (OTTO & SCHIRMEISTER, 1997; LECAILLE, KALETA & BROMME, 2002).

Apresenta loop de oclusão que é caracterizado por dois resíduos de histidina adjacentes (His<sup>110</sup>, His<sup>111</sup>) responsáveis pela atividade dipeptídica carboxipeptidase da catepsina B (LECAILLE, KALETA & BROMME, 2002; FRLAN & GOBEC, 2006) e sua diferente especificidade (OTTO & SCHIRMEISTER, 1997). O loop de oclusão é flexível e está localizado na região correspondente ao subsítio S3' que limita a orientação do substrato (TOMOO, 2010). Sua estabilidade é dependente do pH e esta é uma característica que distingue a catepsina B das demais cisteíno proteases. Assim, em ambiente onde o pH é neutro prevalece a endopeptidase e em pH ácido apresenta-se como exopeptidase (FRLAN & GOBEC, 2006; ZENG et al., 2006).

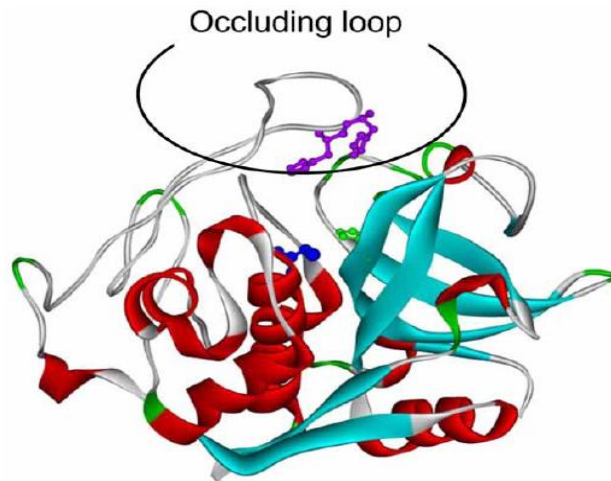


FIGURA 1.4 - Estrutura da catepsina B humana (TOMOO, 2010).

A elevação da atividade da catepsina B está particularmente bem documentada em carcinomas de cólon, mama, próstata, pâncreas e cérebro (SLOANE et al., 1986; LECAILLE, KALETA & BROMME, 2002; BERDOWSKA, 2004), entretanto, além do lisossomo, a catepsina B tem sido localizada na membrana plasmática de células tumorais (GUINEC et al., 1992; MOIN et al., 1998). A acidificação do ambiente tumoral em células cancerígenas propicia a atividade ótima da catepsina B em pH levemente ácido (TURK et al., 2002).

Estudos sobre a progressão do câncer têm mostrado que essa enzima frequentemente aparece em grandes quantidades na maioria dos tumores malignos em estágios invasivos, quando comparada aos tecidos normais ou até mesmo tumores benignos (IACOBUZIO-DONAHUE et al., 1997; SZPADERSKA & FRANKFATER, 2001; AGGARWAL & SLOANE, 2014).

A atividade da catepsina B é controlada por inibidores endógenos específicos, como por exemplo, cistatinas e estefinas. Estudos relatam que em condições fisiológicas há um balanço entre as proteases e seus inibidores, cujo desequilíbrio promove progressão tumoral e aumento das propriedades invasivas do tumor. Dessa forma, a catepsina B é capaz de agir nas células tumorais, levando a degradação da ECM e promoção da angiogênese (FRLAN; GOBEC, 2006; LEVICAR et al., 2002; WATSON; KREUZALER, 2009; WITHANA et

al., 2012). Neste contexto, a catepsina B tem sido considerada um importante alvo terapêutico no processo de intervenção do câncer.

## **1.4 - Modo de Inibição Enzimática**

Inibidores enzimáticos são compostos que interferem com a catálise, diminuindo ou interrompendo as reações enzimáticas. Em relação aos mecanismos cinéticos existentes, os inibidores podem ser classificados em duas classes: reversíveis e irreversíveis (COPELAND, 2005; NELSON & COX, 2011).

Estudos cinéticos podem ser realizados através de diversos métodos, dentre eles o gráfico duplo recíproco empregando o método de Lineweaver Burk, o qual é útil para distinguir entre inibidores competitivos, não competitivos e incompetitivos.

### **1.4.1 - Competitiva**

Inibidores competitivos são definidos como aqueles que se ligam exclusivamente a enzima livre, assim estes compostos competem com o substrato pelo mesmo sítio ativo enzimático. Na inibição competitiva o valor de  $V_{\max}$  se mantém constante, mas o valor de  $K_m$  aparente aumenta com o aumento da concentração do inibidor. Dessa forma o gráfico duplo recíproco (Lineweaver Burk) que representa inibição competitiva é composto por retas que se interceptam no eixo y como demonstrado na Figura 1.5 (COPELAND, 2005).

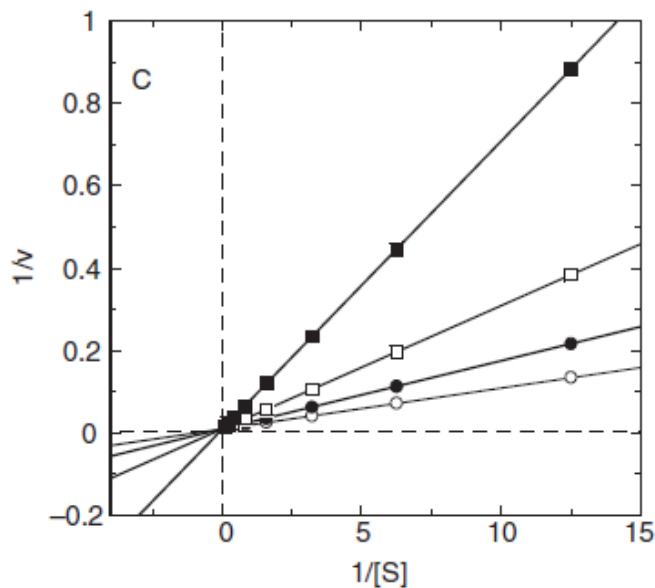


FIGURA 1.5 - Gráfico duplo recíproco de inibidor competitivo (COPELAND, 2005).

Muitos medicamentos relacionados a diversas patologias e disponíveis atualmente no mercado tais como enalapril<sup>®</sup> (enzima conversora de angiotensina-ECA), estatinas (HMG-CoA redutase), miantrex<sup>®</sup> (dihidrofolato redutase), viagra<sup>®</sup> (fosfodiesterase) entre outros atuam como inibidores enzimáticos competitivos (COPELAND, 2005).

### 1.4.2 - Não competitiva

Inibidores não competitivos apresentam afinidade tanto pela enzima livre quanto pelo complexo enzima-substrato. Para este tipo de inibição definem-se duas constantes de dissociação uma referindo-se ao complexo enzima-inibidor ( $K_i$ ) e outra ao referindo-se ao complexo enzima-substrato-inibidor ( $\alpha K_i$ ). Dessa forma quando as retas se interceptam a esquerda do eixo y e acima do eixo x ( $\alpha > 1$ ) diz-se que o inibidor preferencialmente se liga à enzima livre. Por outro lado, quando as retas se interceptam a esquerda do eixo y e abaixo do eixo x ( $\alpha < 1$ ) diz-se que o inibidor se liga preferencialmente ao complexo enzima-substrato. Há ainda a possibilidade das retas do gráfico duplo recíproco (Figura 1.6) se interceptarem a esquerda do eixo y e sobre o eixo x,

sendo neste caso  $\alpha=1$  e assim a afinidade do inibidor pela enzima livre e pelo complexo enzima-substrato são equivalentes (COPELAND, 2005).

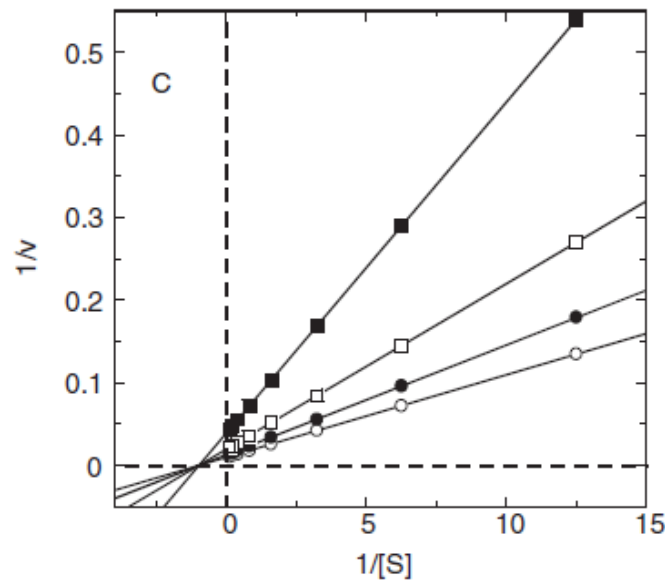


FIGURA 1.6 - Gráfico duplo recíproco de inibidor não competitivo ( $\alpha= 1$ ) (COPELAND, 2005).

### 1.4.3 - Incompetitiva

Inibidores incompetitivos são definidos como aqueles que se ligam exclusivamente ao complexo enzima-substrato, apresentando assim baixa ou nenhuma afinidade pela enzima livre. Dessa forma, neste tipo de inibição ambos os valores de  $K_m$  e  $V_{max}$  aparente diminuem com aumento da concentração do inibidor (COPELAND, 2005). O gráfico duplo recíproco é representado por retas paralelas (Figura 1.7).

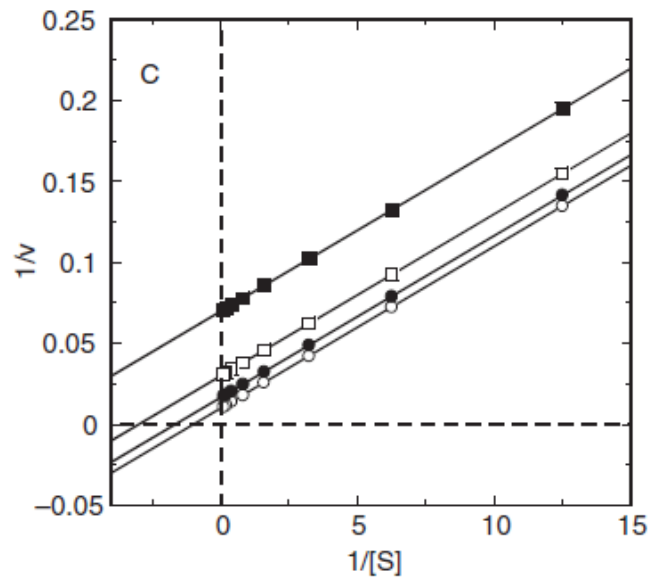


FIGURA 1.7 - Gráfico duplo recíproco de inibidor incompetitivo (COPELAND, 2005).

## 1.5 - Inibidores das Catepsinas

Como demonstrado anteriormente, as catepsinas estão associadas a um grande número de patologias, sendo, portanto de grande interesse a busca por novos inibidores enzimáticos potentes e seletivos.

Um dos primeiros inibidores estudados sobre às catepsinas foi o L-*trans*-epoxisuccinil-leucilamido (4-guanidino) butano, originalmente isolado do fungo *Aspergillus japonicus* e conhecido por E-64 (Figura 1.8). Este composto se liga de forma covalente e irreversível à enzima. Estudos demonstraram que o E-64 apresenta atividade inibitória potente sobre as catepsinas, mas não permite distinguir dentre as várias enzimas desta classe sendo vastamente utilizado como controle positivo em ensaios envolvendo inibição das cisteíno proteases. Sabe-se que além das catepsinas, o E-64 também é capaz de se ligar covalentemente a outras proteases como, por exemplo, as calpaínas, que são cisteíno proteases não lisossomais (PALERMO & JOYCE, 2007).



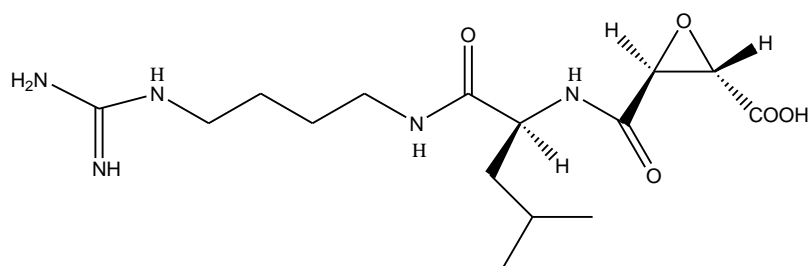


FIGURA 1.8 - Estrutura da substância E-64 que atua como inibidor irreversível sobre as catepsinas.

Tendo em vista a necessidade de investigação de inibidores reversíveis, potentes e seletivos para as catepsinas, estudos do extrato acetônico de galhos e folhas de *Taxodium mucronatum* (Taxodiaceae) e do extrato metanólico das folhas de *Cycas guizhouensis* (Cycadaceae) levaram ao isolamento de biflavonas com expressiva atividade inibitória sobre as catepsinas B e K, sendo os valores de  $IC_{50}$  determinados para a catepsina B (Figura 1.9) (PAN et al., 2005; ZENG et al., 2006).

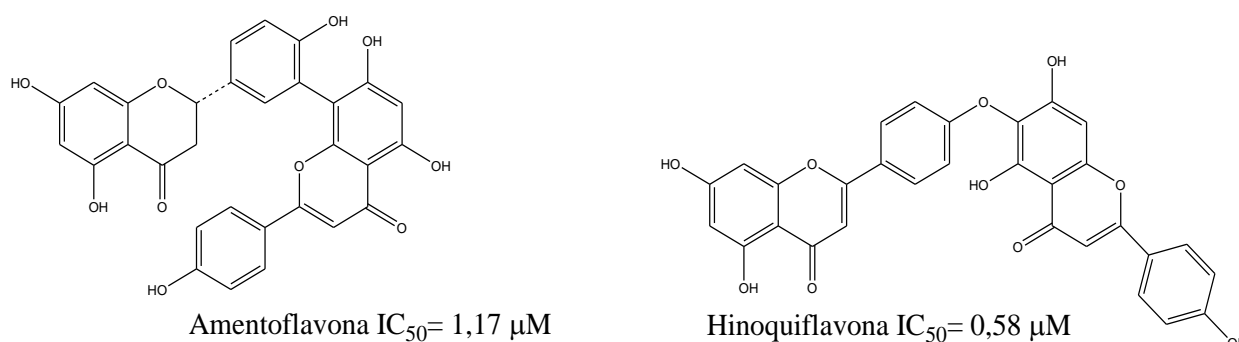


FIGURA 1.9 - Biflavonoides isolados de *Taxodium mucronatum* e *Cycas guizhouensis* como inibidores da catepsina B.

Trabalhos anteriormente desenvolvidos pelo Grupo de Produtos Naturais da UFSCar na busca por inibidores das catepsinas revelaram a atividade inibitória a baixo micromolar de alcaloides acridônicos (Figura 1.10) sobre a catepsina V, isolados do extrato metanólico da casca do caule da *Swinglea glutinosa* (Bl.) Merr. (Rutaceae). Os estudos da cinética demonstraram ainda que estes compostos atuam como inibidores competitivos da catepsina V (SEVERINO et al., 2011).

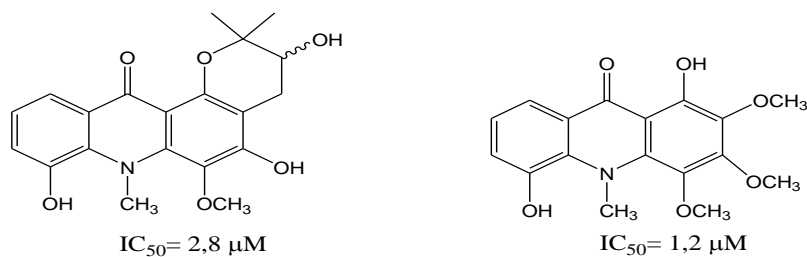


FIGURA 1.10 - Alcaloides acridônicos inibidores da catepsina V.

Particularmente nos últimos anos houve um aumento crescente do interesse de indústrias farmacêuticas por inibidores das cisteíno proteases que possuem papel crucial na terapia de diversas patologias como foi anteriormente apresentado. Catepsina K é uma cisteíno protease predominantemente expressa em osteoclastos, possui papel fundamental na degradação da matriz óssea e se tornou alvo atrativo na terapia da osteoporose e artrite reumatóide (YASUDA et al., 2005; BROMME; LECAILLE, 2009; COSTA et al., 2011; ASADUL et al., 2013).

Apesar de nenhum medicamento inibidor da catepsina K ter sido ainda aprovado pela Food and Drug Administration (FDA), exemplos promissores de inibidores da catepsina K (Figura 1.11) encontram-se atualmente em fase de desenvolvimento em testes clínicos e pré-clínicos, tais como balicatib<sup>®</sup> (Novartis) em fase II e relicatib<sup>®</sup> (GlaxoSmithKline) em fase I. No entanto, recentemente ambos foram descontinuados devido aos efeitos adversos apresentados pela falta de especificidade (BOONEN et al., 2012), e odanacatib<sup>®</sup> (Merck) em fase III que atualmente se encontra sob intensas investigações clínicas (BROMME & LECAILLE, 2009; STOCK et al., 2009; COSTA et al., 2011; BOONEN et al., 2012).

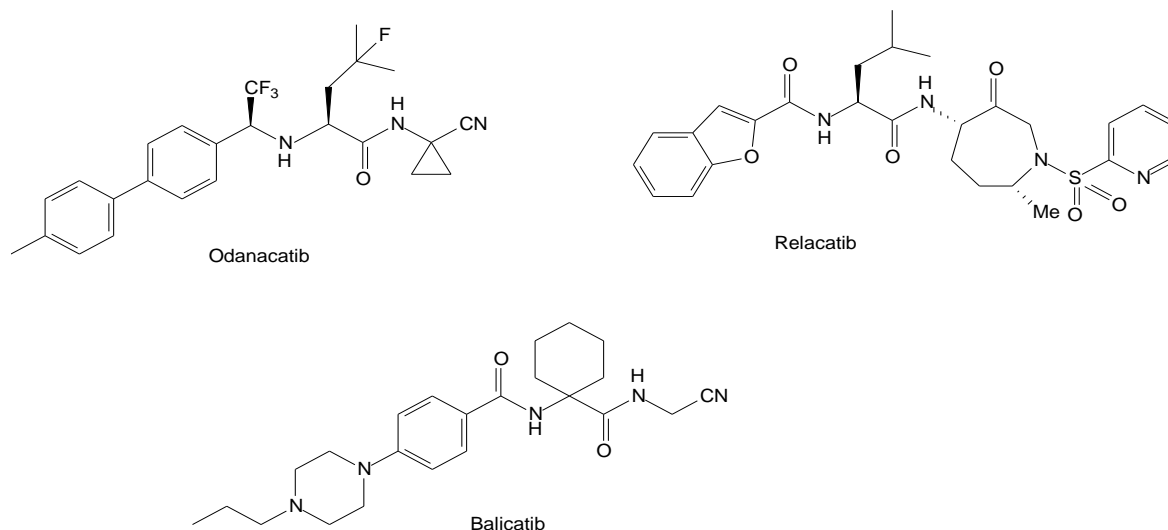


FIGURA 1.11 - Inibidores da catepsina K em testes clínicos e pré-clínicos.

Atualmente existe na literatura uma grande quantidade de inibidores das catepsinas B e L obtidos sinteticamente tais como substâncias derivadas do epoxisucinil (KATUNUMA et al., 2002; TOMOO, 2010), diazometilcetonas e cistatinas (SHENOY & SIVARAMAN, 2011), contudo inibidores provenientes de fontes naturais ainda são escassos. Diante disso, permanece a necessidade da busca de novos inibidores de cisteína proteases que sejam potentes, seletivos e reversíveis com o intuito de auxiliar no desenvolvimento de novos fármacos antitumorais mais seguros, eficazes e menos tóxicos, pois o câncer com seus índices crescentes de mortalidade apresenta-se como um grave problema de saúde pública.

## 1.6 - Plantas do Cerrado como Fonte de Produtos Naturais Bioativos

A procura por inibidores em espécies vegetais que possam ser utilizados como protótipos em testes farmacológicos são uma das formas racionais adotadas para a busca de novos fármacos, devido à grande diversidade de metabólitos que podem ser adquiridos a partir do reino vegetal (NISBET & MOORE, 1997; CRAGG & NEWMAN, 2013; LAHLOU, 2013).

Neste contexto, a triagem de uma variedade de extratos assim como a determinação dos alvos farmacológicos específicos e escolha de técnicas cromatográficas adequadas são estratégias adotadas em estudos químicos e biológicos para obtenção eficaz de novos protótipos (BAKER et al., 2007).

O cerrado é o segundo maior bioma do Brasil, ocupa 22 % do território nacional, detém 5 % da biodiversidade do planeta, porém um dos biomas mais ameaçados do país. Em relação à diversidade biológica apresenta extrema abundância de espécies endêmicas ainda pouco exploradas do ponto de vista químico. Contudo devido às queimadas, exploração predatória e ocupação humana inúmeras espécies correm risco de extinção (MMA, 2014).

A seguir encontra-se a descrição das sete plantas do cerrado paulista selecionadas para investigação e busca por compostos bioativos que possam atuar como inibidores de cisteíno proteases. Vale ressaltar que os critérios adotados para seleção das espécies foram baseados no uso na medicina popular tradicional, presença de metabólitos secundários e falta de estudo químico descrito na literatura.

### **1.6.1 - *Tabebuia ochracea* (Cham.) Standl.**

O gênero *Tabebuia* (Bignoniaceae) compreende cerca 253 espécies, com várias cores de flor. É uma planta nativa do cerrado brasileiro, conhecida popularmente como ipê-do-campo, pau-d'arco-do-campo, piúva, tarumã (ISHARA et al., 2008).

Alcaloides extraídos das folhas de espécies do mesmo gênero apresentaram potente atividade antitumoral *in vitro* (SATHIYA & MUTHUCHELIAN, 2010). O lenho e as raízes de algumas espécies de *Tabebuia* contêm lapachol, uma quinona com atividade antitumoral (VIANA et al., 2003).

### **1.6.2 - *Memora axillaris* K. Schum.**

Pertencente à família Bignoniaceae, conhecida popularmente como ciganinha. Este gênero apresenta 72 espécies (ISHARA et al., 2008), sendo a *Memora axillaris* nativa do Brasil e muito freqüente no cerrado (GRASSI et al., 2005). Ausência de estudos químicos sobre esta espécie motivou o desenvolvimento do presente trabalho.

Espécies desse gênero apresentam comprovada atividade alelopática de compostos isolados de extratos obtidos das folhas e do lenho (GRASSI et al., 2005).

### **1.6.3 - *Vochysia tucanorum* Mart.**

Conhecida popularmente como pau-de-tucano, vinheiro-do-mato, pau-de-vinho, coxa-de-frango, pau-terra, cinzeira, pão-doce, vinhático.

*Vochysia tucanorum* (Vochysiaceae) e outras espécies de seu gênero são utilizadas como anticancerígenas na medicina tradicional em comunidades da América do Sul. Em relação ao perfil químico no gênero *Vochysia* tem-se descrito presença de flavonoides, flavonas e flavonols (GOMES et al., 2009).

### **1.6.4 - *Dalbergia miscolobium* Benth.**

É uma espécie típica do cerrado, surgindo no meio do campo aberto, e possui distribuição neotropical. Pertence à família Fabaceae e subfamília Faboideae. Na família Fabaceae é comumente encontrada a presença de terpenos e isoflavonoides. Este gênero apresenta cerca de 500 espécies. *Dalbergia miscolobium* Benth. é popularmente conhecida como caviúna-do-

cerrado e sapuvussu (GIBBS & SASSAKI, 1998), sendo utilizada como planta ornamental e a casca fornece corante usado em tinturaria.

#### **1.6.5 - *Erythroxylum suberosum* St. Hil.**

Espécie pertencente ao gênero *Erythroxylum* (Erythroxilaceae) que compreende aproximadamente 250 espécies. De *Erythroxylum catuaba* extrai-se um pretenso afrodisíaco chamado catuaba e *Erythroxylum novogranatensis* é utilizada em refrigerantes do tipo "Coca". Alcaloides tropânicos extraídos das raízes de *Erythroxylum pungens* apresentaram atividade citotóxica em linhagens de células tumorais (SENA et al., 2010).

#### **1.6.6 - *Drimys brasiliensis* Miers.**

Popularmente conhecida com cataia ou casca-de-anta, é uma planta restrita da América do Sul. Usada na medicina popular como antiinflamatória e analgésica. Os membros dessa família possuem folhas e cascas aromáticas, sendo muito utilizadas na extração de óleo essencial.

Os principais constituintes identificados em plantas do gênero *Drimys* (Winteraceae) foram monoterpenos e sesquiterpenos (LAGO et al., 2010).

#### **1.6.7 - *Myrcia lingua* Berg.**

Plantas do gênero *Myrcia* (Myrtaceae) são utilizadas na medicina popular para o tratamento de diabetes, diarreia e disenteria. Análises fitoquímicas de varias espécies do gênero revelaram a presença de triterpenos, flavononas e flavonas (GOVAERTS, 2010). O gênero *Myrcia* é um dos maiores gêneros da família Myrtaceae e compreende mais de 300 espécies espalhadas

em todo o território brasileiro (CERQUEIRA et al., 2007; STEFANELLO et al., 2010). A *M. multiflora* (Lam). DC. é utilizada como hipoglicemiante na forma de infusão. Outros estudos do gênero relataram a atividade dos extratos de folhas de *M. fallax* (Rich) DC. sobre às células cancerígenas KB (YOSHIKAWA et al., 1998; LIMBERGER et al., 2004; GOVAERTS et al., 2010; BATISTA et al., 2011) Popularmente conhecida como goiabinha (SAPORETTI et al., 2003) até o momento não há relatos do estudo fitoquímico da *Myrcia lingua* Berg. na literatura e também não foram encontrados registros do uso desta espécie na medicina popular.



FIGURA 1.12 - Imagem ilustrativa da espécie *Myrcia lingua* Berg.

## **2 – OBJETIVO GERAL (PARTE I)**

Realizar o estudo biomonitorado de extratos de plantas do cerrado paulista na busca de inibidores das catepsinas B e L como possíveis protótipos que possam contribuir no estudo e desenvolvimento de novos agentes terapêuticos do câncer atuando no bloqueio das metástases.

### **2.1 - Objetivos específicos**

1. Avaliar extratos e partições líquido-líquido de diferentes espécies do cerrado, sobre as catepsinas B e L;
2. Selecionar as frações promissoras para o estudo biomonitorado.
3. Isolar e identificar os metabólitos responsáveis pela inibição enzimática.
4. Elucidar estruturas dos compostos através de técnicas espectrométricas.
5. Determinar a potência ( $IC_{50}$ ) dos inibidores.
6. Realizar modificações estruturais e avaliar contribuição dos grupos funcionais sobre a atividade enzimática.
7. Determinar o mecanismo de ação e a constante de afinidade ( $K_i$ ) dos inibidores mais promissores sobre CTSB e CTSL.



## **3 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL (PARTE I)**

### **3.1 - Materiais**

#### **3.1.1 - Materiais cromatográficos**

- Cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), preparadas em folhas de alumínio com sílica gel 60 F254, com 0,2 mm de diâmetro (Merck).
- Cromatografia por adsorção: cromatografia em coluna (CC), utilizando como fases estacionárias sílica gel 60 70-230 mesh e 230-400 mesh (Merck).
- Cromatografia por exclusão: cromatografia em coluna, utilizando com fase estacionária Sephadex LH-20 (Amersham Pharmacia Biotech AB).

#### **3.1.2 - Solventes e Reagentes**

- Solventes comerciais destilados na sala de destilação do Departamento de Química da UFSCar.
- Solventes deuterados (Merck e Sigma Aldrich).
- Inibidor irreversível das cisteíno peptidases E-64 (Sigma Aldrich).
- DTE (Sigma Aldrich).
- Substrato Z-Phe-Arg-MCA (Sigma Aldrich).

### **3.1.3 - Enzimas**

- Catepsina L humana recombinante expressa em *Pichia pastoris* de acordo com metodologia descrita por LINNEVERS et al., 1997, sendo fornecida pelo Prof. Dr. Marcio F. M. Alves.
- Catepsina B extraída de fígado humano (Sigma Aldrich).

### **3.1.4 - Reveladores**

- Câmara de luz UV ( $\lambda$  254 nm e 365 nm).
- Solução de vanilina em ácido sulfúrico [vanilina (3 g) foi dissolvida em uma solução contendo 135 ml de água destilada, 135 ml de MeOH e 3 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado].

## **3.2 - Equipamentos**

### **3.2.1 - Dispensor usado na extração**

- Ultra-Turrax IKA T25 basic.

### **3.2.2 - Evaporadores rotativos**

- BUCHI, rotavapor R-200 equipado com banho BUCHI B-490 e recirculador refrigerado NESLAB, modelo CFT-25 mantido a 5 °C.

### **3.2.3 - Balança analítica**

- Sartorius modelo BP210S.

### **3.2.4 - Câmara de UV**

- Cabine tipo Spectroline modelo CM-10 com luz tipo Spectroline modelo ENF- 260C.

### **3.2.5 - Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear**

- Bruker DRX 9,4 T (400 MHz para espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e 100 MHz para espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$ ) - DQ/UFSCar.

### **3.2.6 - Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)**

- Shimadzu LC-10AD (Preparative Liquid Chromatograph), coluna de fase estacionária C-18 ODS Phenomenex (150 x 4,6 mm).

### **3.2.7 - Espectrofluorímetro**

- Leito de Placa de ELISA: Molecular Devices Corporation- Spectra MAX GEMINI XS.

## **3.3 - Procedimento Experimental**

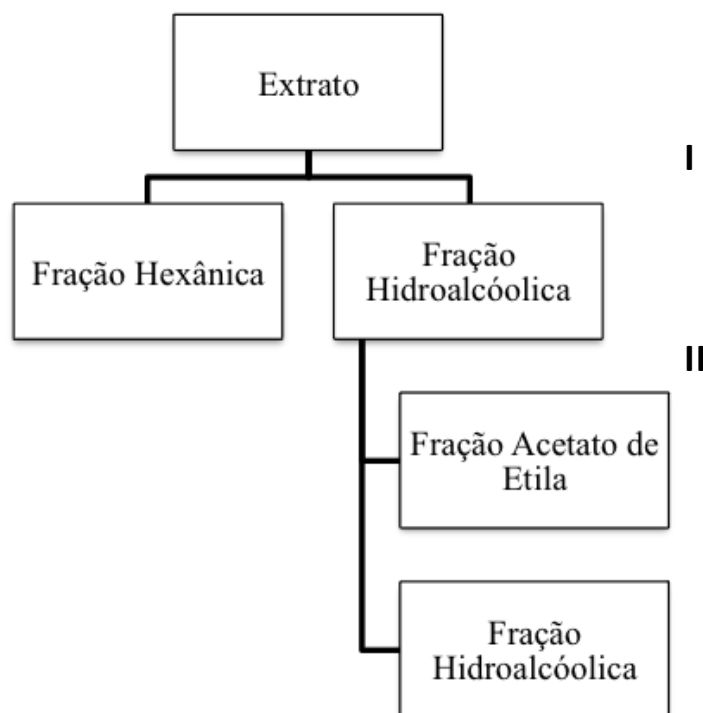
Os procedimentos para a realização do estudo biomonitorado do trabalho, assim como a preparação dos extratos vegetais, fracionamentos, isolamentos, identificação das substâncias e ensaios enzimáticos foram realizados no Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos.

### **3.3.1 - Coleta e identificação do material botânico**

As folhas, galhos e raízes das sete espécies selecionadas (*Tabebuia ochracea*; *Memora axillaris*; *Vochysia tucanorum*; *Dalbergia miscolobium*; *Erythroxylum suberosum*; *Drimys brasiliensis*; *Myrcia lingua*) foram coletados na cidade de São Carlos-SP em maio de 2011 no cerrado da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) sendo identificados pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Inês Salgueiro Lima, Departamento de Botânica da Universidade Federal de São Carlos-SP. Um exemplar da espécie *M. lingua* (8366) foi depositado no Herbário do Departamento de Botânica (HUFSCar) da Universidade Federal de São Carlos, Brasil.

### **3.3.2 - Obtenção de extratos e frações**

As partes vegetais (folhas, galhos e raízes) das espécies coletadas foram secas em estufa a 40 °C com circulação durante aproximadamente dez dias e posteriormente trituradas em moinho. O material seco e moído foi extraído em etanol no extrator Ika Ultra Turrax (T 25) por 5 minutos, 20.000 rpm à temperatura ambiente em uma proporção de três extração a cada 200 g de massa vegetal. O extrato etanólico líquido foi filtrado e concentrado sob pressão reduzida em evaporador rotativo. As massas das partes vegetais, assim como dos extratos brutos obtidos a partir de cada uma delas estão descritas na Tabela 3.1.



ESQUEMA 3.1 - Fluxograma da partição líquido-líquido dos extratos.

Condição I: Suspensão em EtOH : H<sub>2</sub>O (3:1) e extração com hexano.

Condição II: Extração com AcOEt e fração hidroalcóolica.

No total foram preparados 15 extratos e todos foram ensaiados sobre a CTSB e CTSL. Os extratos obtidos foram submetidos à partição líquido-líquido, utilizando como solvente hexano e acetato de etila em uma solução etanol/água (1:3) contendo o extrato. Ao final do processo obtiveram-se três frações a partir de cada extrato (Esquema 3.1), as quais foram ensaiadas sobre as cisteíno proteases. Destes, os mais ativos com atividade superior a 70 % de inibição em uma dosagem de 125 µg/ml foram selecionados para estudos de maior profundidade, com o intuito de isolar os metabólitos responsáveis pela atividade inibitória sobre as catepsinas.

TABELA 3.1 - Relação do material vegetal, extratos e suas respectivas massas obtidas.

<b>Espécie</b>	<b>Parte vegetal/ massa (g)</b>	<b>Código</b>	<b>Massa dos extratos (g)</b>
<i>Drimys brasiliensis</i>	Caules/ 120,0	DBCE	10,0
	Folhas/ 108,0	DBFE	30,0
<i>Memora axillaris</i>	Caules/ 120,0	MACE	5,0
	Folhas/ 148,0	MAFE	14,0
	Raízes/ 42,0	MARE	4,0
<i>Tabebuia ochraceae</i>	Caules/ 144,0	TOCE	4,0
	Folhas/ 144,0	TOFE	14,0
<i>Erythroxilum suberosum</i>	Caules/ 132,0	ESCE	10,0
	Folhas/ 144,0	ESFE	38,0
<i>Vochysia tucanorum</i>	Caules/ 320,0	VTCE	22,0
	Folhas/ 372,0	VTFE	42,0
<i>Dalbergia miscolobium</i>	Caules/ 684,0	DMCE	52,0
	Folhas/ 192,0	DMFE	20,0
<i>Myrcia lingua</i>	Caules/ 228,0	MLCE	24,0
	Folhas/ 90,0	MLFE	32,2

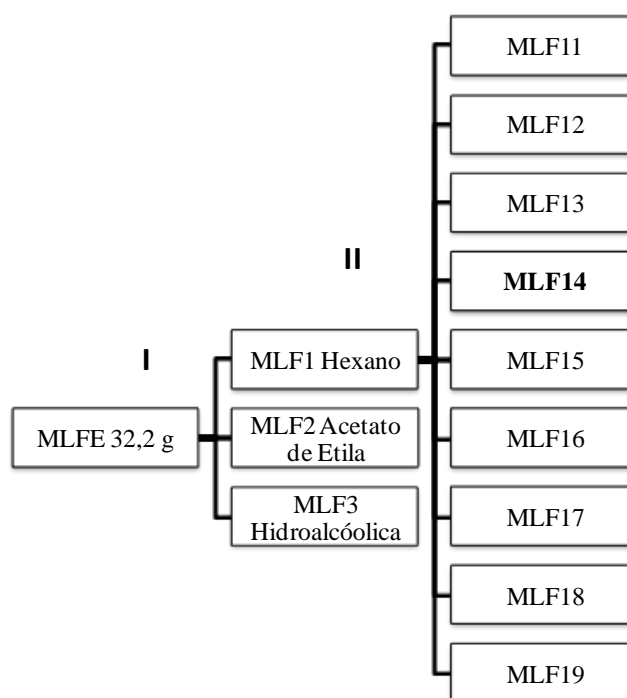
C= caule; F= folhas; E= extrato.

### 3.3.3 - Metodologia para isolamento dos metabólitos de *Myrcia lingua* Berg.

#### 3.3.3.1 - Fracionamento da fração hexânica MLF1

A fração hexânica (MLF1) do extrato etanólico das folhas de *Myrcia lingua* Berg. contendo 1,1 g foi submetida à cromatografia em coluna de sílica gel (70-230 Mesh) como fase estacionária ( $\phi$  x h= 4,0 x 20,0 cm) e como fase móvel mistura dos solventes hexano e acetato de etila em eluição isocrática (9:1) como demonstrado no Esquema 3.2. Esta separação forneceu nove frações e todas foram ensaiadas sobre a CTSB e CTSL a fim de avaliar o potencial

inibitório de cada uma delas e dessa forma dar seguimento no processo de isolamento dos metabólitos ativos mediante os resultados apresentados.



ESQUEMA 3.2 - Fracionamento da fração MLF1.

Condição I: Suspensão em EtOH : H<sub>2</sub>O (3:1). Extração com Hexano e AcOEt.

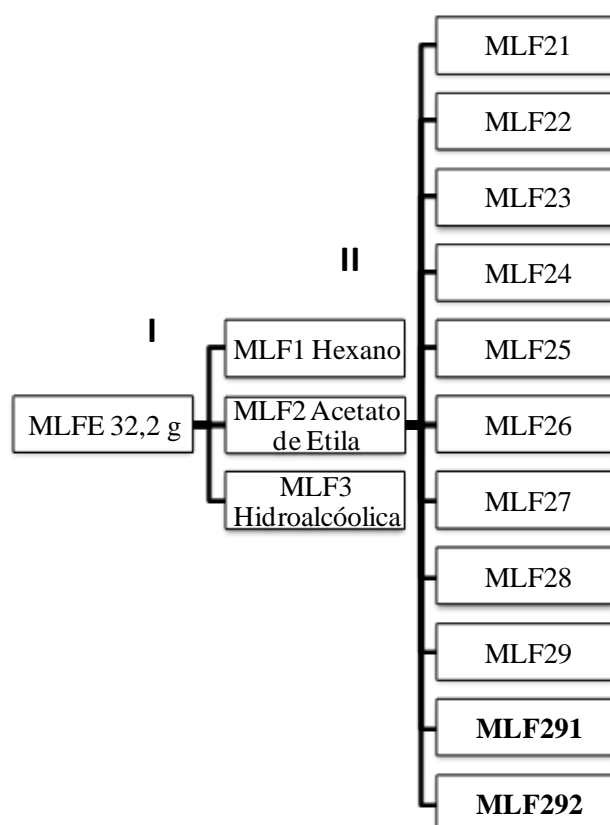
Condição II: Coluna  $\phi$  x h= 4,0 x 20,0 cm. Eluição isocrática: Hex : AcOEt (9:1).

Na fração MLF14 (397,4 mg) verificou-se a presença de um óleo amarelado, identificado como uma mistura ácidos anacárdicos insaturados; apesar de apresentar-se como uma mistura, esta fração foi codificada como substância **I**.

As frações MLF16 (11,4 mg) e MLF17 (39,9 mg) também mostraram atividade inibitória sobre as cisteíno proteases. E devido ao fato de apresentarem semelhante perfil cromatográfico em CCD e em RMN de <sup>1</sup>H, ambas foram reunidas formando a nova fração MLF16-7 (51,3 mg). Esta fração foi submetida à cromatografia por adsorção em coluna e a combinação deu origem a nove subfrações. Entretanto dentre todas as subfrações ensaiadas, a fração MLF16-7G (6,7 mg) foi a que apresentou atividade inibitória e através do espectro de RMN de <sup>1</sup>H verificou-se que era a substância **I**, previamente isolada.

### 3.3.3.2 - Fracionamento da fração acetato de etila MLF2

A fração acetato de etila (MLF2) das folhas de *Myrcia lingua* Berg. contendo 12,0 g foi submetida à cromatografia flash (230-400 Mesh) ( $\phi$  x h= 6,0 x 22,0 cm) e como fase móvel utilizou-se mistura dos solventes hexano e acetato de etila em eluição isocrática (2:8) como demonstrado resumidamente no Esquema 3.3. Esta separação forneceu onze frações. As subfrações MLF291 (121 mg) e MLF292 (3,2 g) apresentaram atividade inibitória superior a 70 % na dosagem de 125  $\mu$ g/ ml e foram selecionadas para os procedimentos subsequentes com o objetivo de isolar os metabólitos secundários responsáveis pela inibição enzimática.



ESQUEMA 3.3 - Fracionamento da fração MLF2.

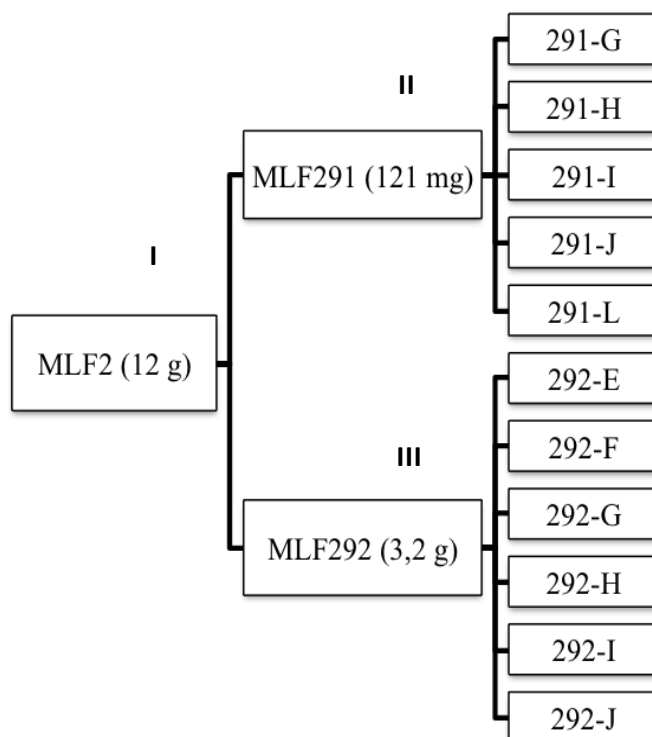
Condição I: Suspensão em EtOH: H<sub>2</sub>O (3:1). Extração com Hexano e AcOEt.

Condição II: Coluna  $\phi$  x h= 6,0 x 22,0 cm. Eluição isocrática: Hex: AcOEt (2:8).



Através do refração de MLF-291 e MLF-292 (Esquema 3.4), obtiveram-se novas subfrações que permitiram o isolamento de substâncias ativas, dentre elas flavonoides glicosilados e derivados do ácido chiquímico.

A subfração MLF-292E (14,5 mg) (Esquema 3.4) apresenta-se como um sólido marrom, refere-se ao ácido quínico (5,2 mg) e foi identificada como a substância **II**. No segundo processo, a subfração MLF-291L (65 mg) foi novamente submetida à cromatografia em coluna com Sephadex LH-20 e através do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  verificou-se que a subfração MLF-291L-1 (36,3 mg) era a substância **II**, previamente isolada.



ESQUEMA 3.4 - Resumo do fracionamento das frações MLF291 e MLF292.

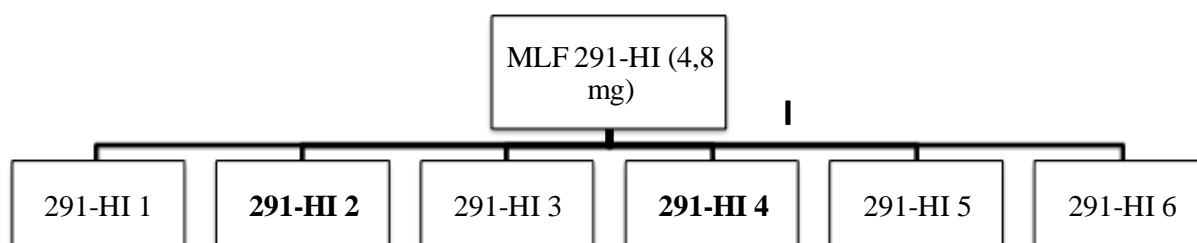
Condição I: Coluna  $\phi$  x h= 6,0 x 22,0 cm. Eluição isocrática: Hex: AcOEt (8:2).

Condição II: Coluna Sephadex LH-20  $\phi$  x h= 2,0 x 140,0 cm. Eluição isocrática: MeOH:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1:1).

Condição III: Coluna Sephadex LH-20  $\phi$  x h= 4,0 x 55,0 cm. Eluição isocrática: MeOH.

Todos os grupos provenientes de MLF-291 e MLF-292 foram analisados por RMN de  $^1\text{H}$  onde se verificou a presença de substâncias com

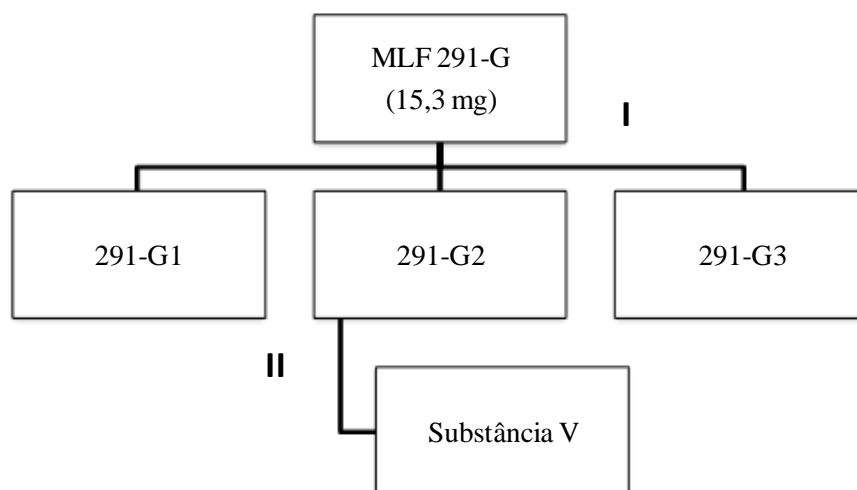
perfil aromático característico da classe dos flavonoides, despertando assim interesse na busca por inibidores potenciais das cisteíno proteases. Seguiu-se o trabalho de fracionamento, onde as frações MLF-291H e I foram reunidas (4,8 mg) por semelhança espectroscópica, submetidas à cromatografia conforme Esquema 3.5, onde se obteve as subfrações 291HI-2 (1,5 mg) e 291HI-4 (0,7 mg), identificadas como as substâncias **III** e **IV**, referentes ao ácido gálico e ácido protocatecuico, respectivamente. As demais subfrações foram verificadas por CCD e RMN de  $^1\text{H}$  e continham principalmente pigmentos.



ESQUEMA 3.5 - Fracionamento da fração MLF291-HI.

Condição I: Coluna Sephadex LH-20  $\phi$  x h= 4,0 x 55,0 cm. Eluição isocrática: MeOH.

Análises de RMN de  $^1\text{H}$  permitiram identificar sinais referentes ao grupamento acetato na fração MLF291-G (15,3 mg), sendo assim submetida a cromatografia com Sephadex LH-20 (1,5 x 47 cm) com eluição isocrática em MeOH, obtendo-se três subfrações. Em seguida a subfração MLF291-G2 (6,5 mg) obtida foi submetida a separação por CLAE utilizando coluna C-18 Phenomenex Luna 10  $\mu\text{m}$  (1,0 x 25 cm) com fluxo contínuo de 4,0 ml/min e eluição isocrática em acetonitrila/ $\text{H}_2\text{O}$  (20:80, v/v) (Esquema 3.6). A detecção foi monitorada em 240 e 350 nm, resultando no isolamento do flavonoide miricetina 3-*O*-(4''-*O*-acetil)- $\alpha$ -ramnosídeo, identificada como substância **V** (0,8 mg) e se apresentou como um sólido amarelado.



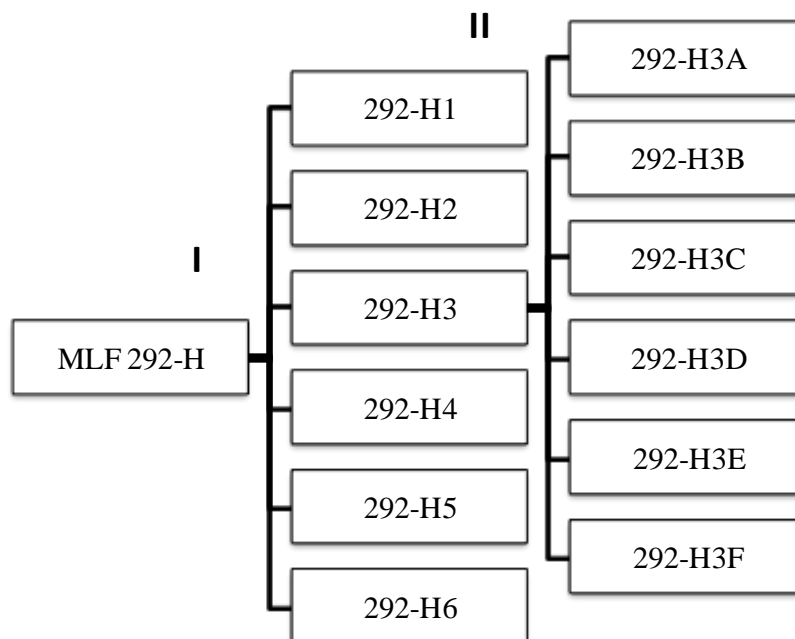
ESQUEMA 3.6 - Fracionamento da fração MLF291-G.

Condição I: Coluna Sephadex LH-20  $\phi$  x h= 1,5 x 47,0 cm. Eluição isocrática: MeOH

Condição II: CLAE coluna C-18 Phenomenex Luna 10  $\mu$ m (1,0 x 25 cm) com fluxo contínuo de 4,0 ml/min. Eluição isocrática: acetonitrila/H<sub>2</sub>O (20:80, v/v).

A amostra MLF292-H (16,5 mg) foi refracionada (Esquema 3.7) por cromatografia com Sephadex LH-20 como fase estacionária. Da subfração 292-H2 foi possível o isolamento de um sólido amarelo identificado como miricetina 3-*O*- $\alpha$ -ramnosídeo (substância **VI**) (2,1 mg). A substância **VI** se apresentou como majoritária nas demais frações estudadas proveniente do acetato das folhas de *M. lingua*, sendo assim submetida a sucessivos processos de purificação e isolada através da cromatografia com Sephadex LH-20 como fase estacionária em diversas outras subfrações descritas a seguir: MLF294-G2A (5,3 mg); MLF294-F4D (12,6 mg); MLF294-F3B1 (6,4 mg); MLF-294I-5-C (11,1 mg).

Seguindo o processo de isolamento e busca de compostos ativos, da fração MLF292-H (16,5 mg) (Esquema 3.7) também foi possível isolar miricetina 3-*O*- $\beta$ -glucosídeo presente na subfração MLF292-H3C e identificada como substância **VII** (1,7 mg). As demais frações continham principalmente pigmentos.

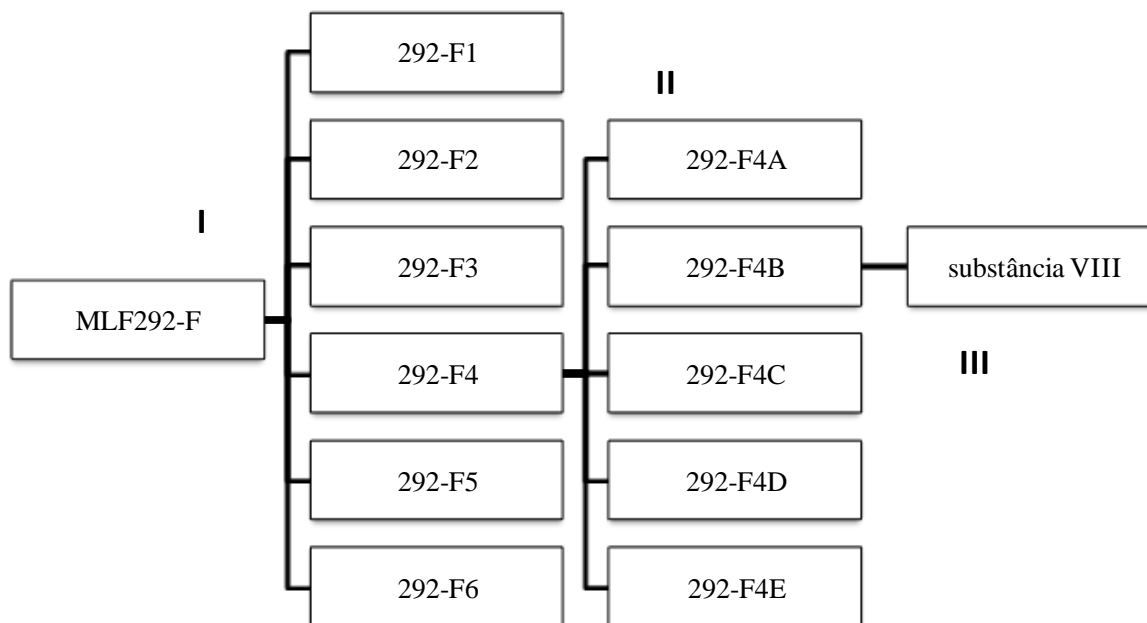


ESQUEMA 3.7 - Fracionamento da fração MLF292-H.

Condição I: Coluna Sephadex LH-20  $\phi$  x h= 1,5 x 47,0 cm. Eluição isocrática: MeOH

Condição II: Coluna Sephadex LH-20  $\phi$  x h= 1,5 x 47,0 cm. Eluição isocrática: MeOH

A amostra MLF292-F (45 mg) foi refractionada por cromatografia Sephadex LH-20 com eluição isocrática em MeOH, obtendo-se seis novas subfrações. A fração 292F-4 (15,3 mg) foi novamente submetida à cromatografia com Sephadex LH-20 e obteve-se 5 subfrações. Posteriormente, o isolamento da quercetina 3-*O*- $\alpha$ -ramnosídeo (substância **VIII**) (0,8 mg) presente na subfração 292F-4B (6,5 mg) foi realizado por CLAE utilizando coluna C-18 Phenomenex Luna 10  $\mu$ m (1,0 x 25 cm) com fluxo contínuo de 4,0 ml/min e eluição isocrática em acetonitrila/H<sub>2</sub>O (20:80, v/v) (Esquema 3.8). A detecção foi monitorada em 240 e 350 nm e verificou-se que as demais frações continham majoritariamente pigmento.



ESQUEMA 3.8 - Fracionamento da fração MLF292-F.

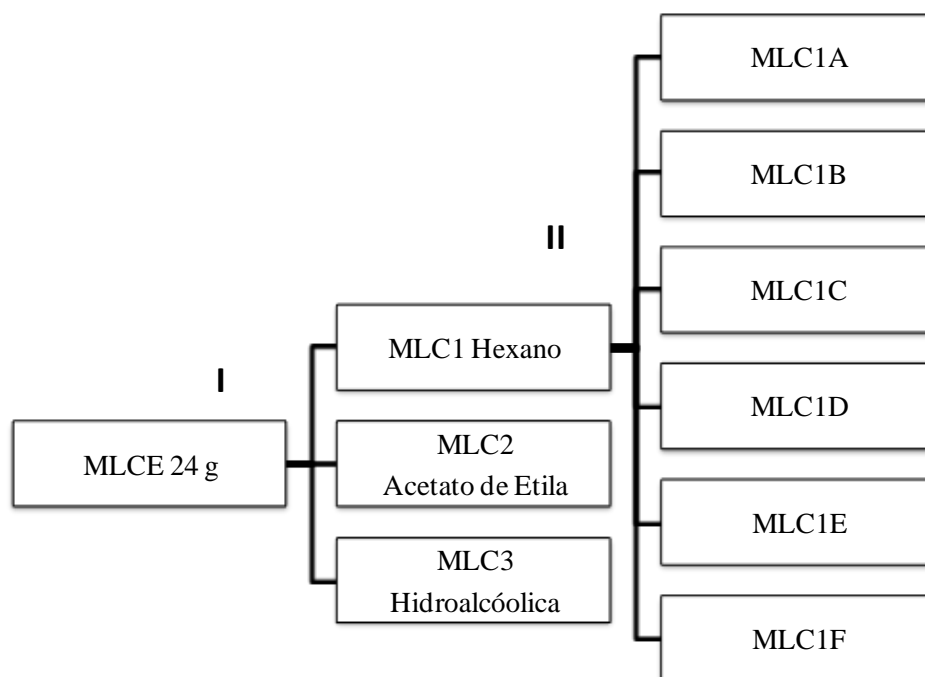
Condição I: Coluna Sephadex LH-20  $\phi$  x h= 1,5 x 47,0 cm. Eluição isocrática: MeOH.

Condição II: Coluna Sephadex LH-20  $\phi$  x h= 1,5 x 47,0 cm. Eluição isocrática: MeOH.

Condição III: CLAE coluna C-18 Phenomenex Luna 10  $\mu$ m (1,0 x 25 cm) com fluxo contínuo de 4,0 ml/min. Eluição isocrática: acetonitrila/H<sub>2</sub>O (20: 80, v/v).

### 3.3.3.3 - Fracionamento da fração hexânica MLC1

A fração hexânica (MLC1) dos caules de *Myrcia lingua* contendo 1,17 g foi submetida à cromatografia em coluna contendo sílica gel (70-230 Mesh) como fase estacionária ( $\phi$  x h= 4,0 x 40,0 cm) e como fase móvel mistura dos solventes hexano e acetona em eluição isocrática (8:2) como demonstrado resumidamente no Esquema 3.9. Esta separação forneceu seis frações e todas foram ensaiadas sobre as catepsinas B e L.

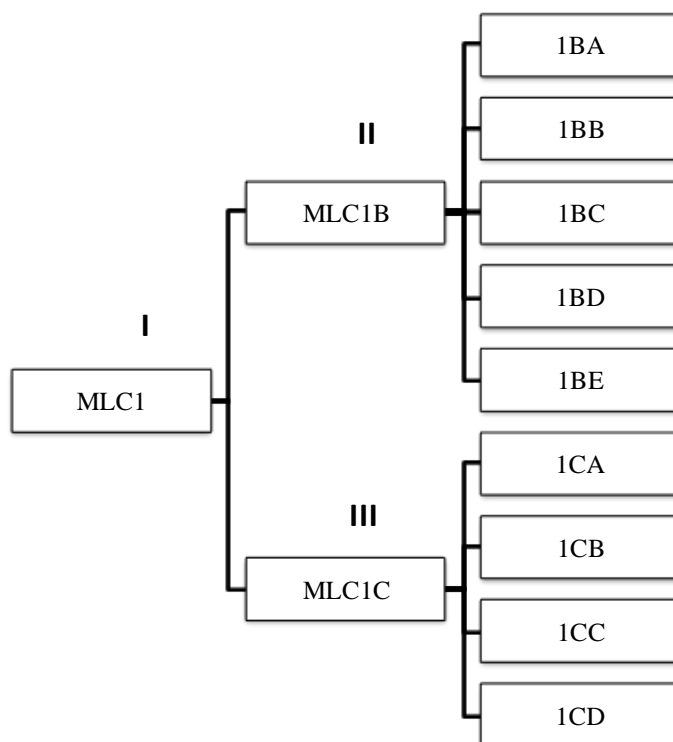


ESQUEMA 3.9 - Fracionamento da fração MLCE.

Condição I: Suspensão em EtOH : H<sub>2</sub>O (3:1). Extração com Hexano e AcOEt.

Condição II: Coluna  $\phi$  x h= 4,0 x 40,0 cm. Eluição isocrática: Hex : Acetona (8:2).

Através do refractionamento de MLC-1B (440 mg) e MLC-1C (249,7 mg), como está demonstrado no Esquema 3.10, obtiveram-se novas subfrações onde se verificou a presença de compostos triterpênicos majoritários. Todos os grupos foram analisados por CCD e RMN de <sup>1</sup>H, sendo reunidos em novas frações através da semelhança espectroscópica e submetidos a novos refractionamentos para o isolamento dos compostos ativos.



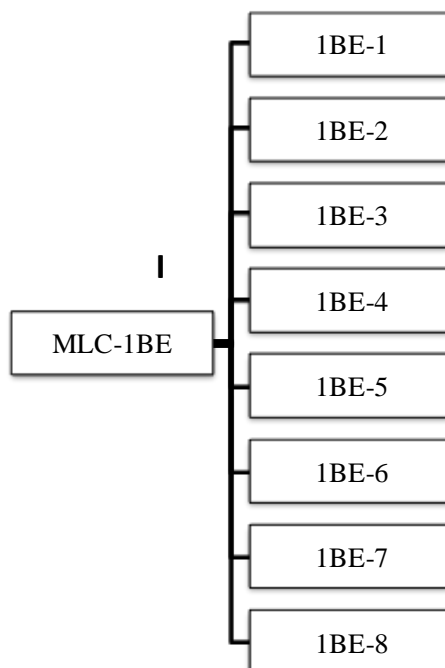
ESQUEMA 3.10 - Fracionamento da fração MLC-1B e MLC-1C.

Condição I: Coluna  $\phi$  x h= 4,0 x 40,0 cm. Eluição isocrática: Hex : Acetona (8:2).

Condição II: Coluna  $\phi$  x h= 2,5 x 35,0 cm. Eluição isocrática: Hex : Acetona (8:2).

Condição III: Coluna  $\phi$  x h= 1,5 x 56,0 cm. Eluição isocrática: Hex : Acetona (8:2).

Da fração MLC-1CB (6,5 mg) obteve-se um sólido branco amorfo identificado como ácido acetil ursólico e codificada como substância **IX**. Seguindo o isolamento, a nova fração MLC-1BE (94,7 mg) foi submetida a cromatografia com Sephadex-LH20 conforme demonstrado no Esquema 3.11. Através de RMN de  $^1\text{H}$  verificou-se que a subfração 1BE-3 (1,9 mg) era o ácido acetil ursólico (**IX**), previamente isolado, e a subfração 1BE-5 era o ácido 3-*epi*-ursólico (2,4 mg) identificado como substância **X**. Também se pode perceber que a subfração 1BE-8 (2,0 mg) continha uma mistura de ácido ursólico e oleanólico aparentemente em quantidades equivalentes (**XI**).

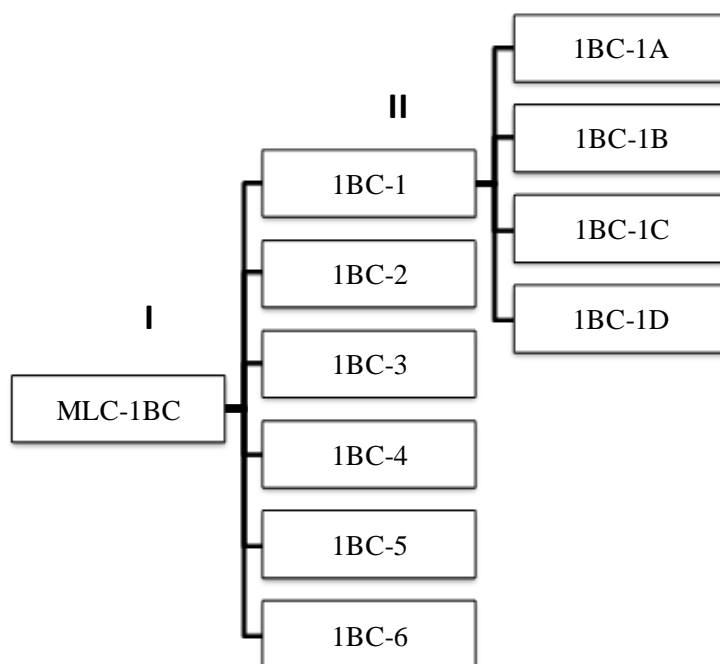


ESQUEMA 3.11 - Fracionamento da fração MLC-1BE.

Condição I: Coluna  $\phi \times h = 1,5 \times 30,0$  cm. Eluição isocrática: Hex : Acetona (9:1).

O ácido acetil ursólico (**IX**) foi obtido em quantidades maiores em diversas subfrações tais como 1BC-2 (37 mg), 1BC-3 (35 mg), 1BC-4 (3 mg), 1BC-5 (19 mg), 1BC-6 (5,3 mg) e 1CA-1 (11,8 mg) tornando-se assim majoritário na fração hexânica do caule. A fração MLC-1BC-1 (12,5 mg) foi posteriormente submetida a uma coluna cromatográfica em Sephadex LH-20 como fase estacionária ( $\phi \times h = 2,5 \times 34,0$  cm), com eluição isocrática utilizando os solventes diclorometano e metanol (1:1) como fase móvel, conforme demonstrado no Esquema 3.12. Todos os grupos obtidos foram avaliados por RMN de  $^1\text{H}$ , proporcionando assim o isolamento do orselinato de metila (0,4 mg) da fração 1BC1-D, sendo identificado como substância **XII**.



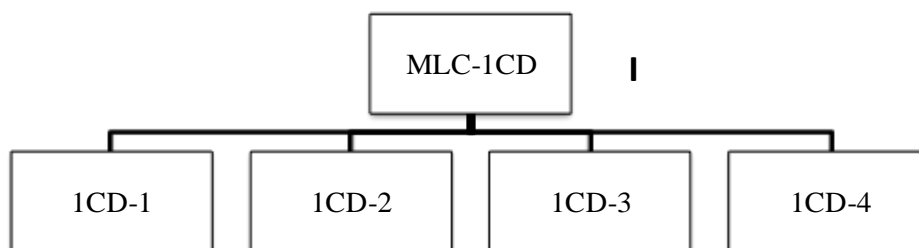


ESQUEMA 3.12 - Fracionamento da fração MLC-1BC.

Condição I: Coluna  $\phi$  x h= 2,5 x 30,0 cm. Eluição isocrática: Hex : AcOEt (9:1).

Condição II: Coluna Sephadex LH-20  $\phi$  x h= 2,5 x 34,0 cm. Eluição isocrática: MeOH :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1:1).

A fração MLC-1CD (62,7 mg) foi submetida à cromatografia em coluna contendo sílica gel (230-400 Mesh) como fase estacionária ( $\phi$  x h= 2,0 x 35,0 cm) e como fase móvel mistura dos solventes hexano e acetona em eluição isocrática (9:1) como demonstrado no Esquema 3.13.



ESQUEMA 3.13 - Fracionamento da fração MLC-1CD.

Condição I: Coluna  $\phi$  x h= 2,5 x 30,0 cm. Eluição isocrática: Hex : Acetona (9:1).

Esta separação forneceu quatro subfrações, sendo que através de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  verificou-se que a subfração 1CD-4 (1,2 mg) tratava-se do ácido ursólico, identificado como substância **XIII**.

### **3.3.4 - Modificações estruturais**

#### **3.3.4.1 - Reação de hidrogenação da substância I para obtenção da substância XIV**

Em um balão de fundo redondo sob agitação magnética adicionou-se paládio 10 % em carvão ativo (1 mg) e a mistura de ácidos anacárdicos (**I**) (41 mg) em metanol (2 ml) deixando-se a atmosfera do balão sob  $\text{H}_2$  e temperatura ambiente. Após 2 horas de reação, filtrou-se a solução em uma coluna previamente empacotada com carvão, celite, sílica e algodão. Posteriormente, evaporou-se o solvente à pressão reduzida em rotaevaporador e obteve-se como produto um sólido amarelado referente ao ácido anacárdico reduzido, denominado substância **XIV** (29,1 mg).

#### **3.3.4.2 - Reação de hidrólise da substância VI para obtenção da substância XV**

Em um balão de fundo redondo o flavonoide glicosilado, previamente identificado como substância **VI** (20 mg), foi dissolvido em EtOH-10 % HCl e refluxado por período de 2 horas. Após este período, procedeu-se a extração sendo a mistura obtida diluída com água destilada e extraída com AcOEt. Após extração da porção glicosídica, ramnose foi identificada na fase aquosa e aglicona permaneceu na fase orgânica, sendo confirmada por CCD. O produto obtido foi identificado com substância **XV** (PIZZOLATTI et al., 2003).

### **3.3.4.3 - Reação de metilação da quercetina (I-SA) para obtenção das substâncias XVI, XVII e XVIII**

A reação de metilação ocorreu com diazometano, após preparar-se uma solução dissolvendo 2,1 g de *p*-toluilsulfonilmetilnitrosamida em 30 ml de éter etílico. Posterior resfriamento da solução em banho de gelo transferiu-se para balão de destilação e acrescentou-se solução de 0,4 g de KOH em 10 ml de EtOH. Posteriormente, deixou-se o sistema em repouso por 5 minutos em banho de gelo e iniciou-se a destilação em banho de óleo e coleta do diazometano.

Após obtenção do diazometano, acrescentou-se uma alíquota do destilado à substância **I-SA** em temperatura ambiente até completa liberação dos gases (N<sub>2</sub>) na capela. A reação foi acompanhada por CCD e a mistura de produtos metilados foi submetida à cromatografia por exclusão obtendo-se assim as substâncias **XVI, XVII e XVIII**.

### **3.3.4.4 - Reação de metilação da substância IX para obtenção da substância XIX**

A reação de metilação ocorreu com diazometano conforme descrição anteriormente mencionada no item 3.3.4.3. Após completa reação na capela, obteve-se composto sólido puro identificado com substância **XIX**.

### **3.3.4.5 - Reação de oxidação de III-SA para obtenção da substância XX**

Em um balão volumétrico, dissolveu-se a substância **III-SA** (15 mg) em 25 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Posteriormente acrescentou-se 50 mg de PCC e manteve-se sob agitação à temperatura ambiente por 1 hora. A reação foi acompanhada por CCD e seguiu-se o isolamento, onde a mistura foi submetida à

cromatografia por exclusão obtendo-se assim a substância **XX** (KUO & LIN, 2004).

#### **3.3.4.6 - Reação de formação de oxima (XXI) a partir da substância XX**

Após obtenção e purificação da substância **XX** conforme procedimento previamente descrito procedeu-se a reação para obtenção da oxima **XXI**. Em um balão contendo 0,5 ml de MeOH dissolveu-se 13,4 mg (0,03 mmol) da substância **XX** acrescido de 19 mg (0,3 mmol) de NH<sub>2</sub>OH/HCl. Após permanecer em refluxo por 5 horas, acrescentou-se 20 ml de água e procedeu-se extração com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e AcOEt. A reação foi acompanhada por CCD e a mistura obtida submetida à cromatografia por adsorção em coluna contendo sílica gel para purificação. Obteve-se sólido identificado substância **XXI** (5 mg) (GARCÍA-GRANADOS et al., 2003).

#### **3.3.4.7 - Reação de acetilação de III-SA para obtenção da substância XXII**

Em balão volumétrico dissolveu-se a substância **III-SA** (12 mg) em 1 ml de piridina e acrescentou-se 1 ml de anidrido acético. Após 24 h em refluxo (60 °C) sob constante agitação, adicionou-se água e extraiu-se com AcOEt. Obteve-se o produto acetilado (substância **XXII**).

### **3.3.5 - Metodologia dos ensaios enzimáticos**

#### **3.3.5.1 - Ensaios enzimáticos sobre as catepsinas B e L**

A determinação da atividade enzimática é baseada na hidrólise do substrato fluorogênico Z-FR-MCA e foi continuamente monitorada pelo aumento da fluorescência em função do tempo reacional. Os experimentos foram realizados em placa de ELISA de 96 poços com coloração preta, tampão acetato (pH 5,5), temperatura de 37 °C, volume final de 200 µl/poço, sendo a fluorescência detectada em espectrofluorímetro com fenda de excitação e emissão ajustada para  $\lambda_{ex}$  380 nm e  $\lambda_{em}$  460 nm, respectivamente.

Nestas condições as enzimas foram pré-ativadas com ditioneitol (DTT) (2,5 mM) por 5 minutos e posteriormente adicionou-se 5 µl do inibidor dissolvido em DMSO, e incubou-se por 5 minutos. Em seguida, acrescentou-se o substrato fluorogênico Z-FR-MCA e fez-se a leitura. Para o controle negativo utilizou-se DMSO, enquanto que para o controle positivo foi usado o inibidor irreversível E-64. A concentração final de DMSO nos ensaios foi 2,5 % (SEVERINO, 2008). A metodologia geral do ensaio de inibição enzimática está demonstrada na Figura 3.1.

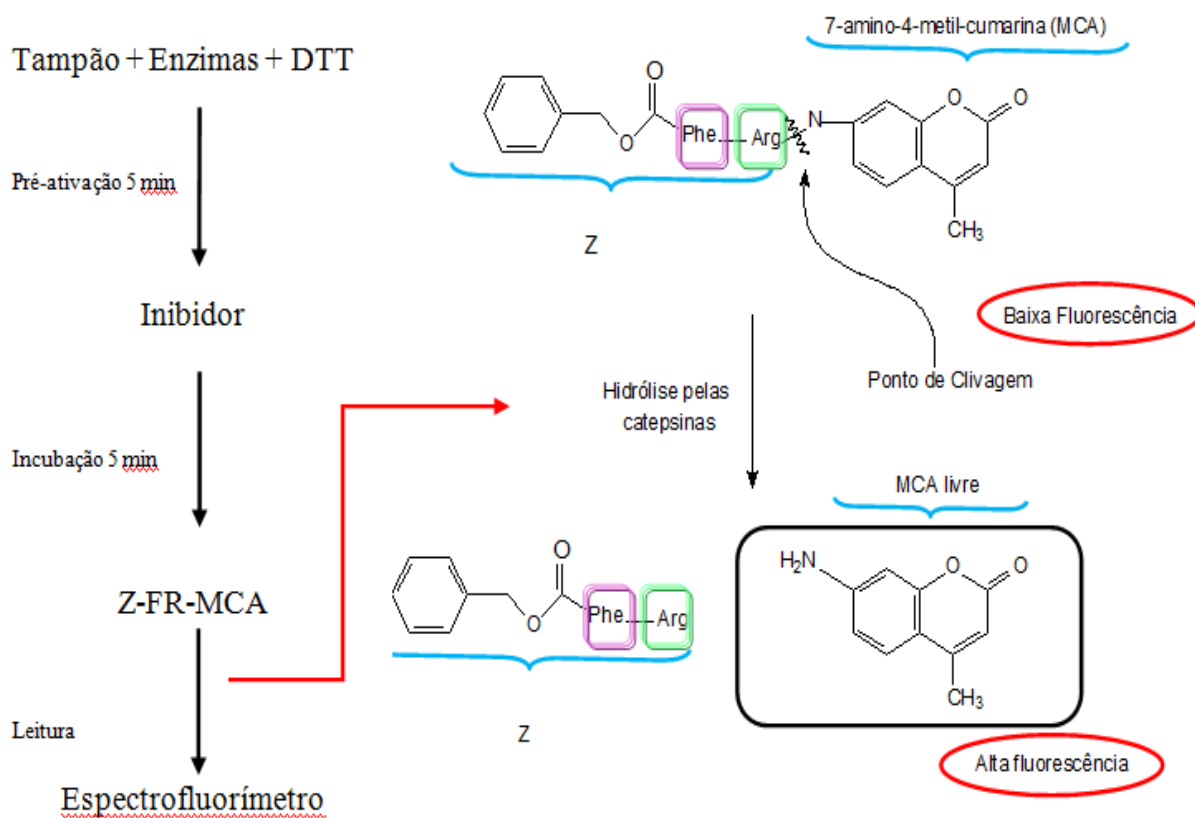


FIGURA 3.1 - Esquema geral de inibição enzimática pelas catepsinas (adaptado SEVERINO, 2008).

Na triagem bioquímica, todos os ensaios foram realizados em triplicata, sendo que para os extratos e frações utilizaram-se dosagens de 125 µg/ml e para as substâncias puras foram 100 µM. O percentual de inibição foi determinado a partir da atividade enzimática em situações de ausência e presença de inibidor através da seguinte equação,

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

onde  $V_i$  se refere a velocidade na presença do inibidor e  $V_0$  a velocidade na ausência de inibidor.

Realizada a triagem inicial, todas as substâncias que apresentaram inibição significativa (superior a 70 %) sobre CTSB e CTSL foram selecionadas para a determinação do  $IC_{50}$ .

### **3.3.5.2 - Determinação do valor de $K_m$**

A concentração de substrato utilizada nos ensaios enzimáticos foi estabelecida baseando-se na determinação experimental do valor de  $K_m$  para Z-FR-MCA sobre as catepsinas humanas B e L. Foram utilizadas diferentes concentrações de substrato até completa saturação enzimática e a determinação do valor de  $K_m$  foi feita através do gráfico de regressão não linear de melhor ajuste utilizando o programa SigmaPlot 12.0. Os valores obtidos foram comparados com dados descritos na literatura.

### **3.3.5.3 Determinação da potência ( $IC_{50}$ )**

A obtenção da potência ( $IC_{50}$ ) das substâncias selecionadas foi realizada através da metodologia de inibição enzimática anteriormente apresentada. Assim, para a construção da curva concentração x resposta, utiliza-se dez diferentes concentrações do inibidor, explorando-se valores de inibição no intervalo de 15 a 90 %, para maior confiabilidade dos resultados. Os dados cinéticos foram obtidos e tratados a partir do método de regressão não linear de melhor ajuste utilizando o programa SigmaPlot 12.0.

### **3.3.5.4 - Determinação do mecanismo de ação**

Após obtenção dos valores de  $IC_{50}$ , os inibidores mais promissores foram submetidos aos ensaios cinéticos para determinação do mecanismo de ação e obtenção do valor de  $K_i$  mediante utilização do substrato Z-FR-MCA.

Para realização deste estudo e obtenção de dados, utilizou-se o método de Lineweaver-Burk. O método experimental consiste em medir a velocidade da reação utilizando diferentes concentrações de substrato Z-FR-

MCA, baseada no valor de  $K_m$ , assim como na ausência e em três diferentes concentrações do inibidor, as quais são baseadas no valor de  $IC_{50}$ .

Considerando o valor de  $K_m$  experimental do substrato sobre a catepsina B ( $K_m = 123 \mu M$ ) os valores de substrato utilizados foram 350; 250; 185; 125; 75; 50; 30 e 20  $\mu M$ . Entretanto, considerando o valor de  $K_m$  experimental sobre a catepsina L ( $K_m = 1,2 \mu M$ ) os valores de substrato utilizados foram 7; 5; 4; 2; 1,5; 1; 0,5 e 0,25  $\mu M$ .

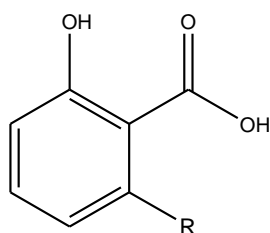
Dessa forma, utilizando gráfico duplo-recíproco determina-se o mecanismo de ação através do modo de intersecção das retas no plano de coordenadas cartesianas (COPELAND, 2005).



## 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO (PARTE I)

### 4.1 - Substâncias isoladas

A partir do estudo biomonitorado foram isoladas treze substâncias presentes no caule e folha da espécie *Myrcia lingua* pertencentes à classe dos flavonoides, triterpenos e derivados do ácido chiquímico.



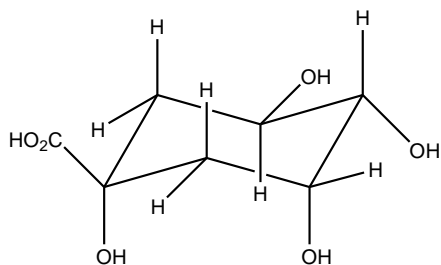
R= An 17:3  
An 17:2  
An 17:1  
An 17:0

#### Mistura de ácidos anacárdicos (I)

Origem: Fração hexânica das folhas de *M. lingua*

Atividade sobre CTSB.

Identificação: p.61

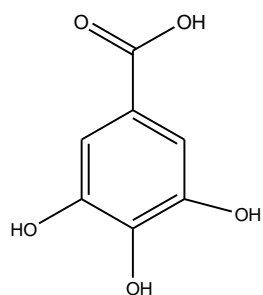


#### Ácido quínico (II)

Origem: Fração acetato das folhas de *M. lingua*

Não apresentou atividade sobre os alvos enzimáticos

Identificação: p.68

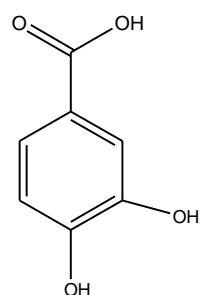


**Ácido gálico (III)**

Origem: Fração acetato das folhas de *M. lingua*

Não apresentou atividade sobre os alvos enzimáticos

Identificação: p.73

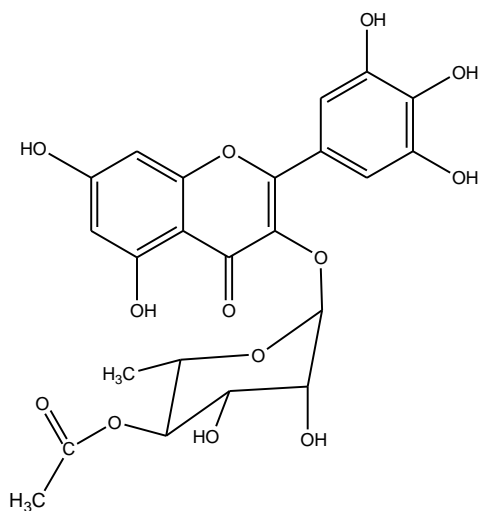


**Ácido protocatechuico (IV)**

Origem: Fração acetato das folhas de *M. lingua*

Não apresentou atividade sobre os alvos enzimáticos

Identificação: p.74

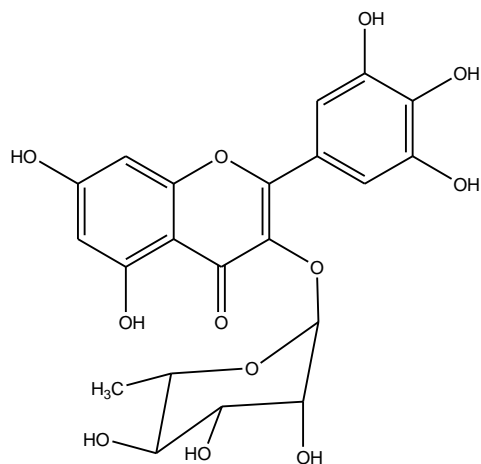


**Miricetina 3-O-(4''-O-acetil)- $\alpha$ -ramnosídeo (V)**

Origem: Fração acetato das folhas de *M. lingua*

Atividade sobre CTSB.

Identificação: p.76

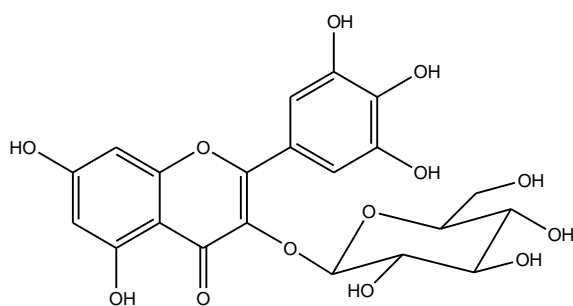


**Miricetina 3-O- $\alpha$ -ramnosídeo (VI)**

Origem: Fração acetato das folhas de *M. lingua*

Atividade sobre CTSB.

Identificação: p.81

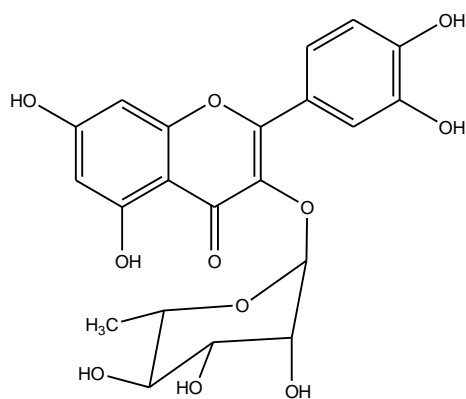


**Miricetina 3-O- $\beta$ -glucosídeo (VII)**

Origem: Fração acetato das folhas de *M. lingua*

Atividade sobre CTSB

Identificação: p.86

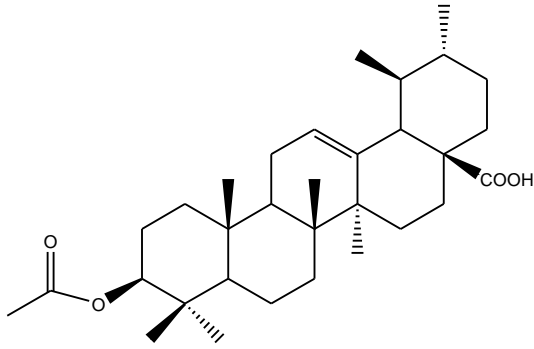


**Quercetina 3-O- $\alpha$ -ramnosídeo (VIII)**

Origem: Fração acetato das folhas de *M. lingua*

Atividade sobre CTSB

Identificação: p.91

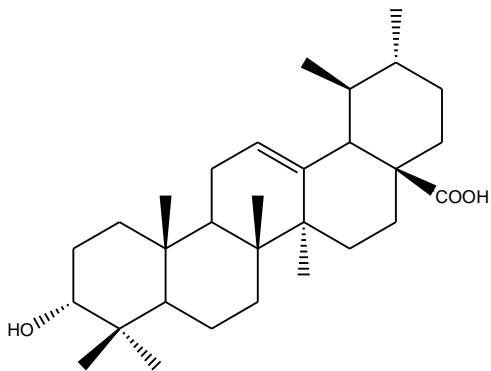


### Ácido 3-acetil ursólico (IX)

Origem: Fração hexânica do caule de *M. lingua*

Atividade sobre CTSL

Identificação: p.96

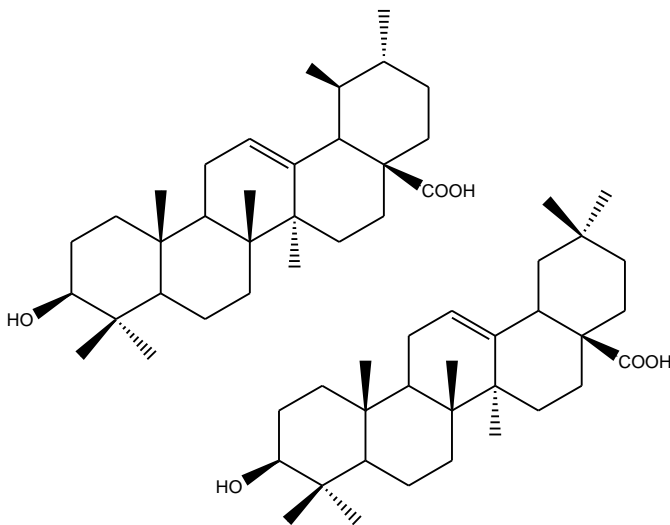


### Ácido 3-epi-ursólico (X)

Origem: Fração hexânica do caule de *M. lingua*

Atividade sobre CTSL

Identificação: p.100

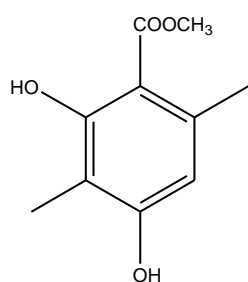


### Mistura do ácido ursólico e oleanólico (XI)

Origem: Fração hexânica do caule de *M. lingua*

Atividade sobre CTSL

Identificação: p.102

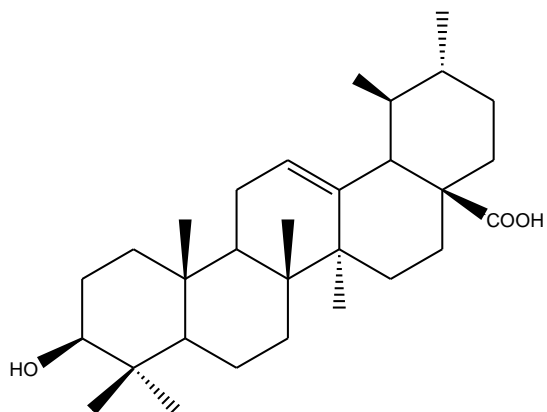


### Orselinato de metila (XII)

Origem: Fração hexânica do caule de *M. lingua*

Não apresentou atividade sobre os alvos enzimáticos

Identificação: p.104



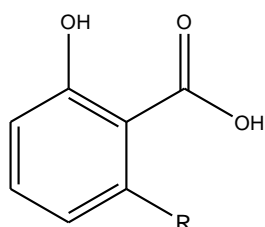
### Ácido ursólico (XIII)

Origem: Fração hexânica do caule de *M. lingua*

Atividade sobre CTSL

Identificação: p.108

## 4.2 – Substâncias provenientes de modificações estruturais



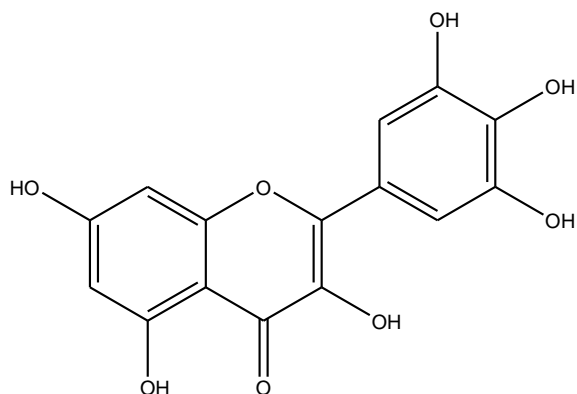
R= An 17:0

### Ácido anacárdico saturado (XIV)

Origem: Reação de Hidrogenação da mistura I.

Atividade sobre CTSB.

Identificação: p. 112

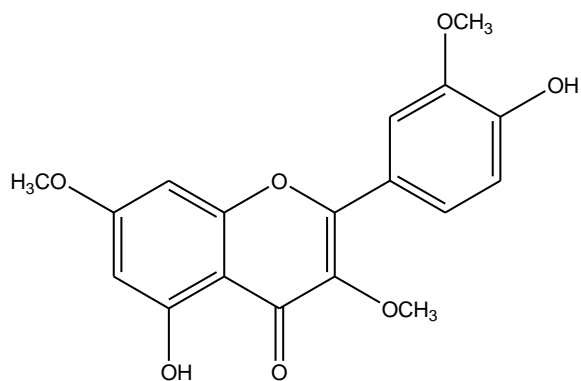


### Miricetina (XV)

Origem: Reação de Hidrólise da substância VI.

Atividade sobre CTSB

Identificação: p. 114

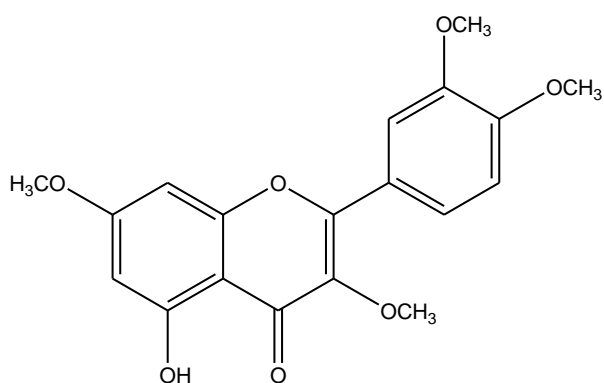


### 3, 7, 3'-*O*-metil quercetina (XVI)

Origem: Reação de metilação da substância I-PN.

Não apresentou atividade sobre os alvos enzimáticos

Identificação: p. 115

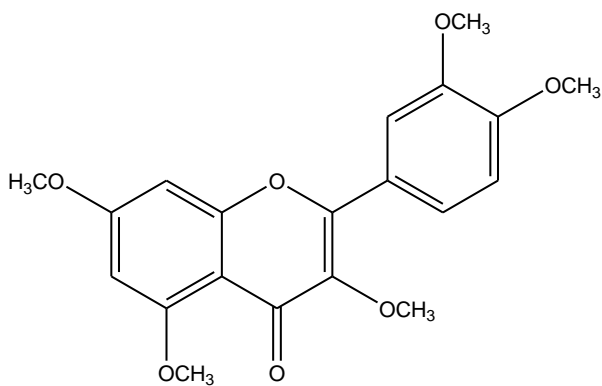


### 3, 7, 3', 4'-*O*-metil quercetina (XVII)

Origem: Reação de metilação da substância I-PN.

Não apresentou atividade sobre os alvos enzimáticos

Identificação: p. 118

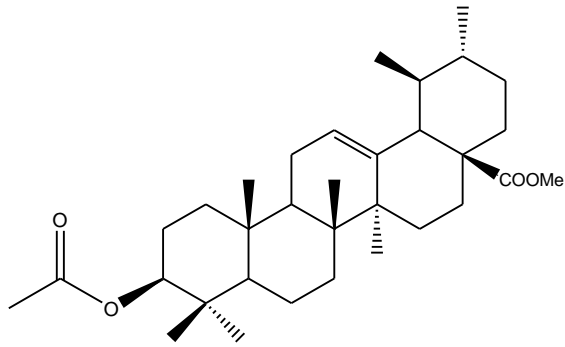


### 3, 5, 7, 3', 4'-*O*-metil quercetina (XVIII)

Origem: Reação de metilação da substância I-PN.

Não apresentou atividade sobre os alvos enzimáticos

Identificação: p. 119

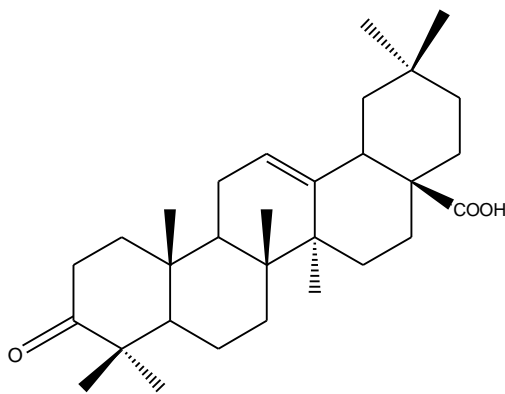


**3-O-acetil ursolato de metila (XIX)**

Origem: Reação de Metilação da substância IX

Não apresentou atividade sobre os alvos enzimáticos

Identificação: p. 121

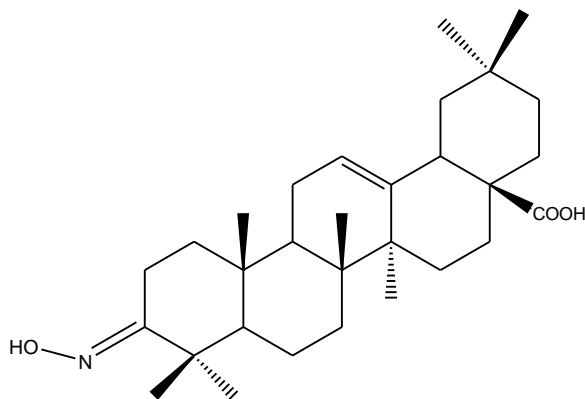


**Ácido 3-oxo-oleanólico (XX)**

Origem: Reação de Oxidação da substância III-SA.

Atividade sobre CTSL

Identificação: p. 123

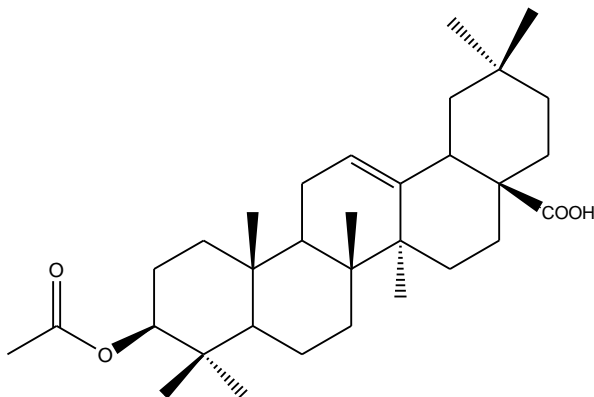


**Ácido 3-oxima-oleanólico (XXI)**

Origem: Reação de obtenção da Oxima a partir da substância XX

Atividade sobre CTSL

Identificação: p.124



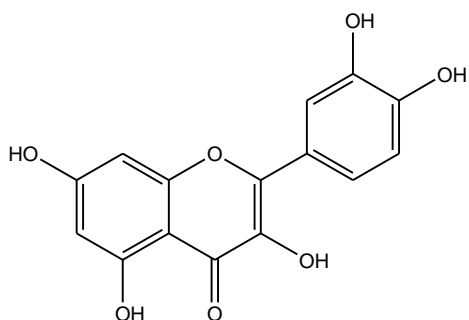
**3-O-acetil-oleanólico (XXII)**

Origem: Reação de Acetilação da substância III-SA

Atividade sobre CTSL

Identificação: p. 125

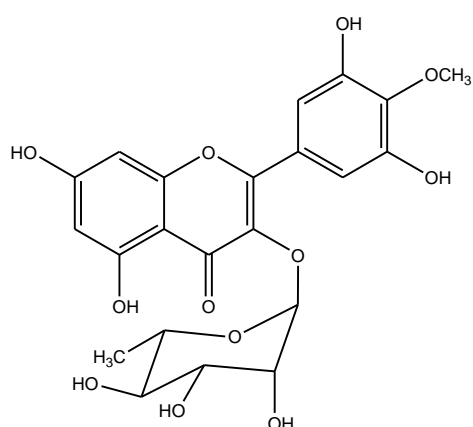
### 4.3 – Substâncias provenientes de fontes diversas



#### **Quercetina (I-PN)**

Origem: Laboratório de Produtos Naturais

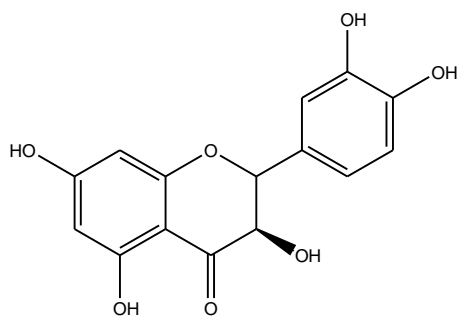
Atividade sobre CTSB



#### **Tamarixetina 3-O- $\alpha$ -ramnosídeo (II-PN)**

Origem: Laboratório de Produtos Naturais

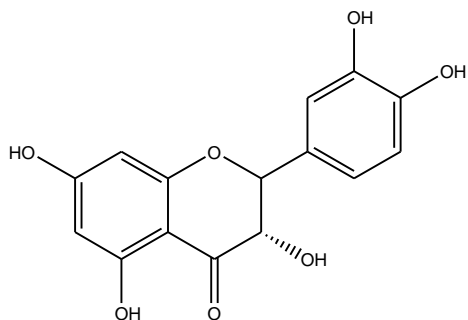
Não apresentou atividade sobre os alvos enzimáticos



#### **Catequina (III-PN)**

Origem: Laboratório de Produtos Naturais

Não apresentou atividade sobre os alvos enzimáticos.

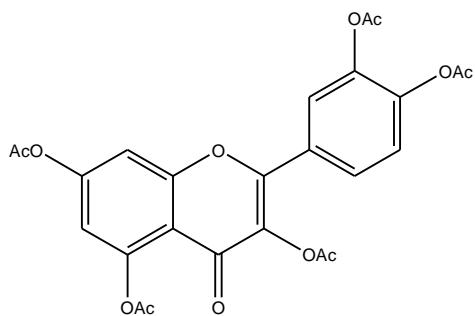


#### **Epicatequina (IV-PN)**

Origem: Laboratório de Produtos Naturais

Não apresentou atividade sobre os alvos enzimáticos.

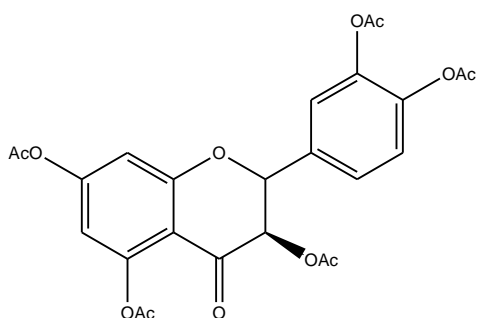




**Quercetina pentacetato (V-PN)**

Origem: Laboratório de Produtos Naturais

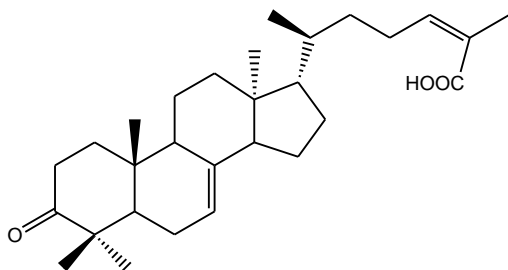
Atividade sobre CTSL



**Catequina pentacetato (VI-PN)**

Origem: Laboratório de Produtos Naturais

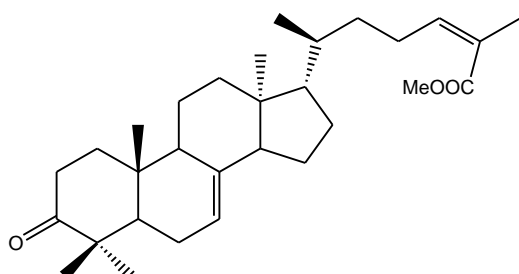
Não apresentou atividade sobre os alvos enzimáticos.



**Ácido masticadienóico (VII-PN)**

Origem: Laboratório de Produtos Naturais

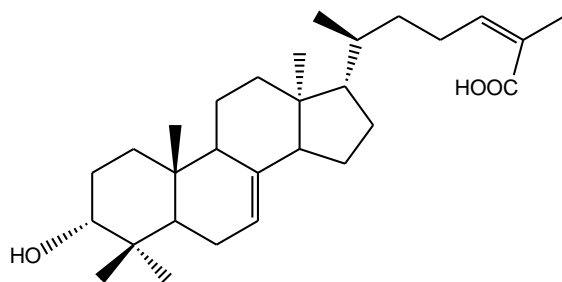
Atividade sobre CTSL.



**Éster metílico do ácido masticadienóico (VIII-PN)**

Origem: Laboratório de Produtos Naturais

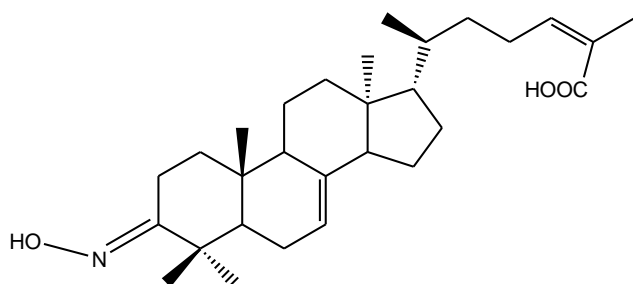
Não apresentou atividade sobre os alvos enzimáticos.



**Schinol (IX-PN)**

Origem: Laboratório de Produtos Naturais

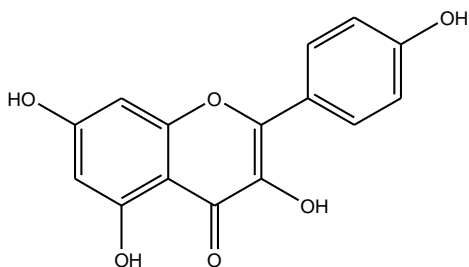
Atividade sobre CTSL



**Ácido 3-oxima masticadienóico (X-PN)**

Origem: Laboratório de Produtos Naturais

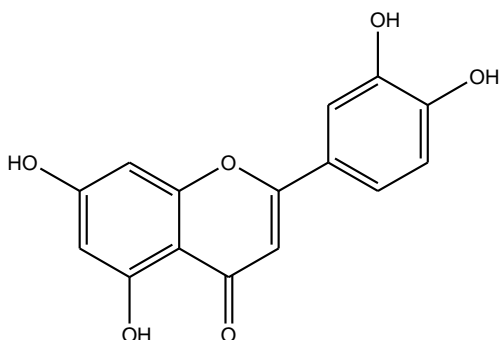
Atividade sobre CTSL



**Kaempferol (I-SA)**

Origem: Sigma Aldrich

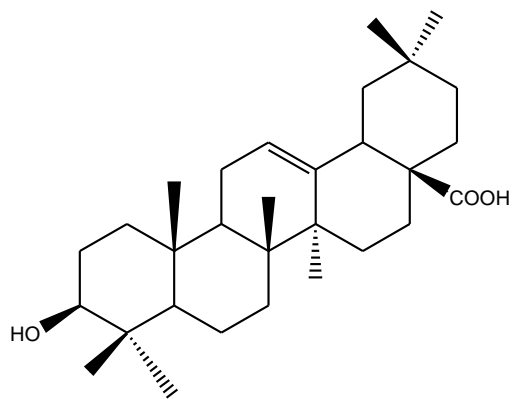
Atividade sobre CTSL.



**Luteolina (II-SA)**

Origem:Sigma Aldrich

Atividade sobre CTSB.



**Ácido oleanólico (III-SA)**

Origem:Sigma Aldrich

Atividade sobre CTSL.

#### **4.4 - Ensaio de inibição sobre as catepsinas B e L dos extratos e das frações de plantas do cerrado paulista**

A evolução da biologia molecular e de novas técnicas genéticas permitiram o isolamento e purificação de muitas enzimas relacionadas a uma grande diversidade de processos patológicos, representando assim alvos moleculares para o desenvolvimento de novos fármacos (VIEGAS, BOLZANI & BARREIRO, 2006).

As diversas espécies de plantas constituem um vasto reservatório de princípios ativos e fonte de uma grande diversidade estrutural, podendo dessa forma servir como compostos modelo para o desenvolvimento de análogos biossintéticos com alto potencial farmacológico (CRAGG, GROTHAUS & NEWMAN, 2009). Assim, por serem pouco exploradas do ponto de vista

científico as espécies provenientes do cerrado apresentam-se como fonte promissora na busca por inibidores enzimáticos.

Na busca por potenciais inibidores das cisteíno proteases relativas aos processos tumorais tais como as catepsinas B e L, foram selecionados extratos de sete plantas do cerrado paulista pertencentes a diferentes gêneros, os quais foram submetidos a triagem bioquímica.

Para os ensaios preliminares dos extratos e frações utilizou-se a dosagem de 125 µg/ ml, anteriormente estabelecida pelo grupo.

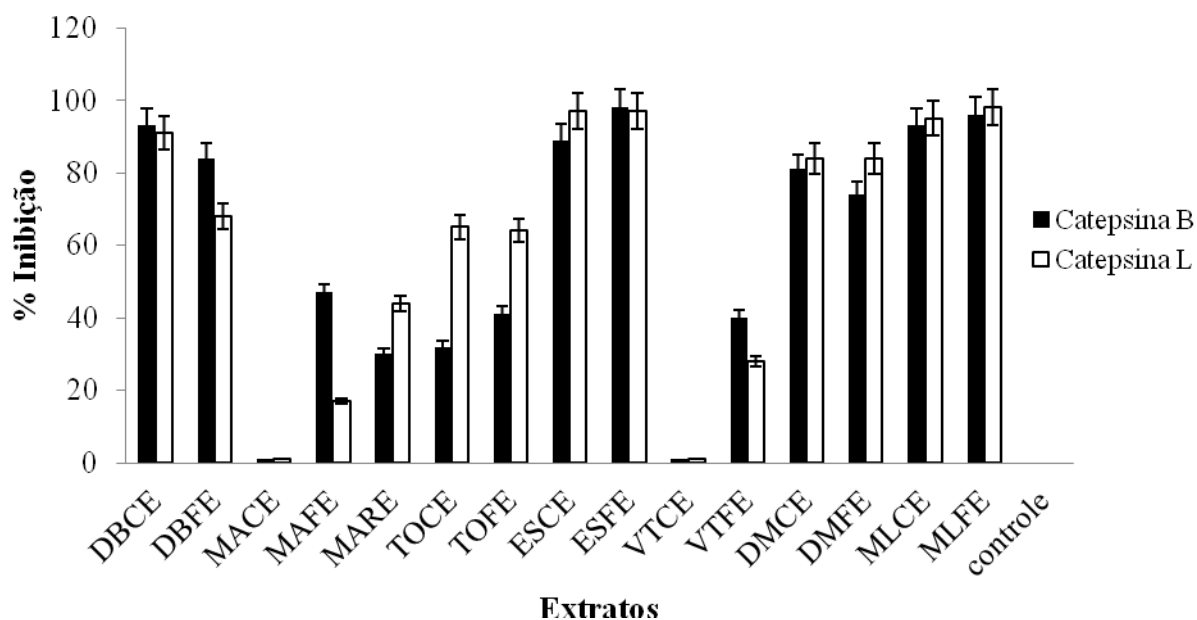


GRÁFICO 4.1 - Triagem dos extratos sobre as catepsinas B e L na dosagem de 125 µg/ml. Extrato etanólico (E); caule (C); folha (F); raiz (R); *Drimys brasiliensis* (DB); *Memora axillaris* (MA); *Tabebuia ochracea* (TO); *Erythroxylum suberosum* (ES); *Vochysia tucanorum* (VT); *Dalbergia miscolobium* (DM); *Myrcia lingua* (ML).

Avaliando a inibição dos extratos sobre as catepsinas B e L pode-se observar através do Gráfico 4.1 que coincidentemente os extratos que apresentaram atividade inibitória foram os mesmos sobre ambas as enzimas, sendo que as espécies mais ativas foram: *Drimys brasiliensis*, *Erythroxylum suberosum*, *Dalbergia miscolobium* e *Myrcia lingua* que apresentaram inibição acima de 70 %.

Dessa forma, mediante os resultados apresentados os extratos ativos DBCE, DBFE, ESCE, ESFE, DMCE, DMFE, MLCE e MLFE foram selecionados para partição líquido-líquido (hexano, acetato de etila e hidroalcoólica) e biomonitoramento através dos ensaios de inibição enzimática.

De forma geral, as espécies que mantiveram os mais altos índices de inibição sobre as catepsinas foram as frações de *Drimys brasiliensis*, *Myrcia lingua*, *Erythroxylum suberosum* e *Dalbergia miscolobium*. Baseado nas informações apresentadas nos Gráficos 4.2 e 4.3 e na ausência até o momento de relatos do estudo fitoquímico na literatura, optou-se por iniciar os estudos de isolamento das substâncias ativas através da fração hexânica (MLF1) das folhas de *M. lingua* Berg., seguida pela fração acetato de etila (MLF2) também das folhas, e posteriormente passando para o estudo das fração hexânica (MLC1) proveniente do caule (MLC) da mesma planta.

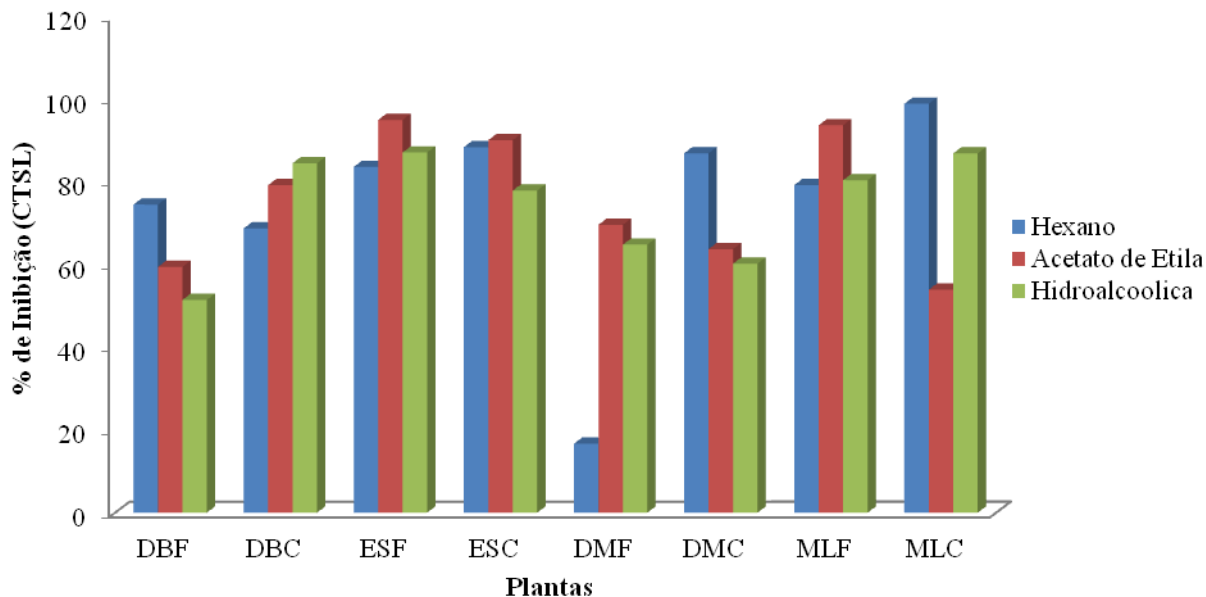


GRÁFICO 4.2 - Triagem das frações sobre as catepsina L na dosagem de 125 µg/ml. Caule (C); folha (F); *Drimys brasiliensis* (DB); *Erythroxylum suberosum* (ES); *Dalbergia miscolobium* (DM); *Myrcia lingua* (ML).

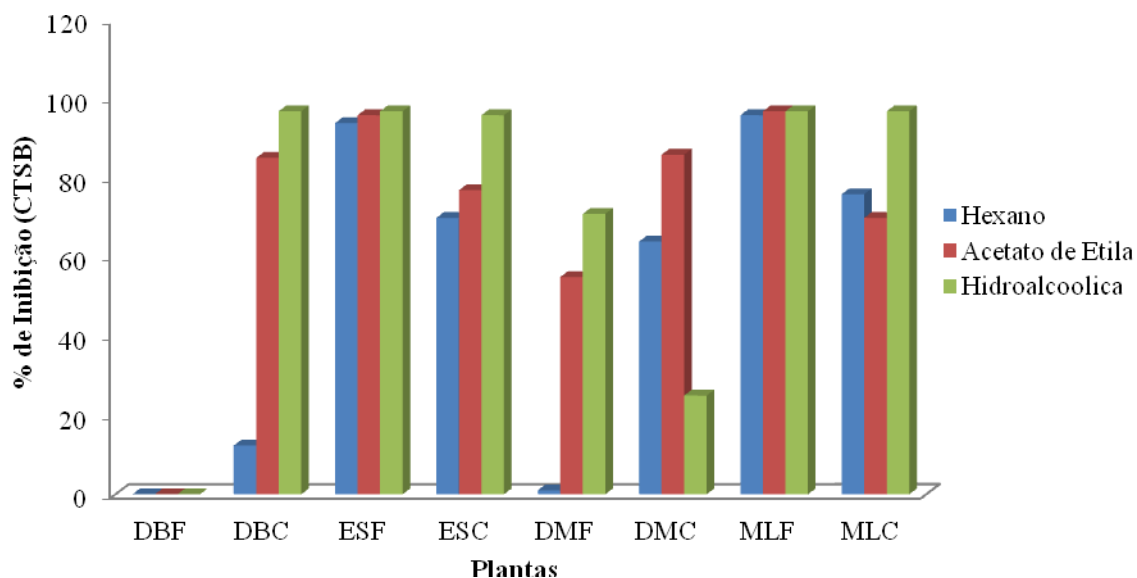


GRÁFICO 4.3 - Triagem das frações sobre a catepsina B na dosagem de 125 µg/ml. Caule (C); Folha (F); *Drimys brasiliensis* (DB); *Erythroxylum suberosum* (ES); *Dalbergia miscolobium* (DM); *Myrcia lingua* (ML).

## 4.5 - *Myrcia lingua* Berg.

### 4.5.1 - Estudo biomonitorado da fração MLF1

Todos os grupos obtidos a partir da fração hexânica das folhas de *M. lingua* (MLF1) foram acompanhados por cromatografia em camada delgada (CCD) e reunidos totalizando nove subfrações. Todos foram ensaiados sobre CTSB e CTSL, a fim de se avaliar o potencial de inibição.

A subfração MLF14 (397,4 mg) refere-se a uma mistura de ácidos anacárdicos e foi identificada como substância **I** (óleo amarelado). Esta mistura foi avaliada como sendo os componentes majoritários da fração e apresentaram inibições significativas sobre ambas as cisteíno proteases (Tabela 4.1).

TABELA 4.1 - Inibição enzimática das subfrações provenientes de MLF1 na dosagem de 125 µg/ ml.

Fração/ massa (mg)	% Inibição CTSB	% Inibição CTSL
MLF11/ 9,6	0,0 ± 0,08	0,0 ± 0,10
MLF12/ 62,1	0,0 ± 0,03	0,0 ± 0,03
MLF13/ 37,2	3,0 ± 0,09	2,0 ± 0,10
MLF14/ 397,4	92,4 ± 0,03	98,7 ± 0,03
MLF15/ 28,3	69,0 ± 0,08	75,0 ± 0,03
MLF16/ 11,4	72,0 ± 0,01	82,0 ± 0,02
MLF17/ 39,9	85,0 ± 0,01	89,0 ± 0,03
MLF18/ 54,3	75,0 ± 0,03	72,0 ± 0,01
MLF19/ 128,6	82,0 ± 0,03	78,0 ± 0,01

Verificou-se através da análise de RMN de  $^1\text{H}$  que todas as subfrações provenientes da fração hexânica das folhas de *M. lingua* (MLF1) que apresentavam resultado positivo sobre as proteases avaliadas, continham os ácidos anacárdicos de forma majoritária. Dessa forma, optou-se por não continuar com a purificação dessas frações, uma vez que se tratavam dos mesmos constituintes previamente isolados e a substância **I** (mistura de ácidos anacárdicos) já havia sido obtida em quantidades satisfatórias.

#### 4.5.1.1 - Elucidação estrutural da mistura de ácidos anacárdicos **(I)**

A mistura de ácidos anacárdicos **(I)** (Figura 4.1) foi isolada do grupo MLF14 proveniente do fracionamento cromatográfico do extrato hexânico das folhas de *M. lingua* (MLF1). Esta mistura foi elucidada através de experimentos de RMN de uma e duas dimensões e espectros de massas, assim como também através da comparação com dados da literatura (CESLA et al., 2006).

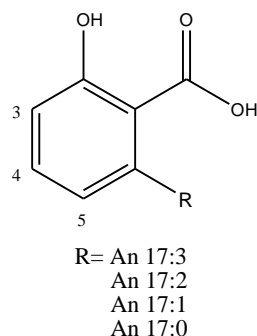


FIGURA 4.1 - Estrutura da mistura de ácidos anacárdicos (I).

A análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 4.2) sugeriu a presença de um derivado fenólico devido à presença de sinais na região de hidrogênios aromáticos que se situam entre  $\delta$  6,79 e  $\delta$  7,39. O sinal em  $\delta$  6,80 pode ser atribuído ao hidrogênio H-3 (1H, *d*,  $J= 8,0$  Hz), em  $\delta$  6,90 corresponde ao hidrogênio H-5 (1H, *d*,  $J= 8,0$  Hz) e em  $\delta$  7,37 relativo ao hidrogênio H-4 (1H, *t*,  $J= 8,0$  Hz). O grupamento R refere-se a uma cadeia alquílica. A caracterização dessa mistura se baseou nos sinais presentes na região entre  $\delta$  5,32 e  $\delta$  5,45 que se referem aos hidrogênios olefínicos, indicando assim insaturações na cadeia alquílica e os hidrogênios alílicos atribuídos aos sinais na região de  $\delta$  2,08 a  $\delta$  3,03. Outro indicativo de mistura de compostos foi a presença de um tripleto em  $\delta$  1,00 integrando para três hidrogênios referente à metila terminal da cadeia e outro sinal bem próximo a este em  $\delta$  0,89 que também se refere à metila.

Através do mapa de contornos COSY (Figura 4.3) tem-se a correlação entre os hidrogênios aromáticos, assim como a correlação dos hidrogênios olefínicos e alílicos com o hidrogênio metilênico em  $\delta$  1,00. Entretanto, nota-se que o outro hidrogênio metilênico, referente à mistura, não possui correlação com os hidrogênios olefínicos.

Através do espectro de HSQC (Figura 4.4) observou-se a correlação dos hidrogênios com os respectivos carbonos.



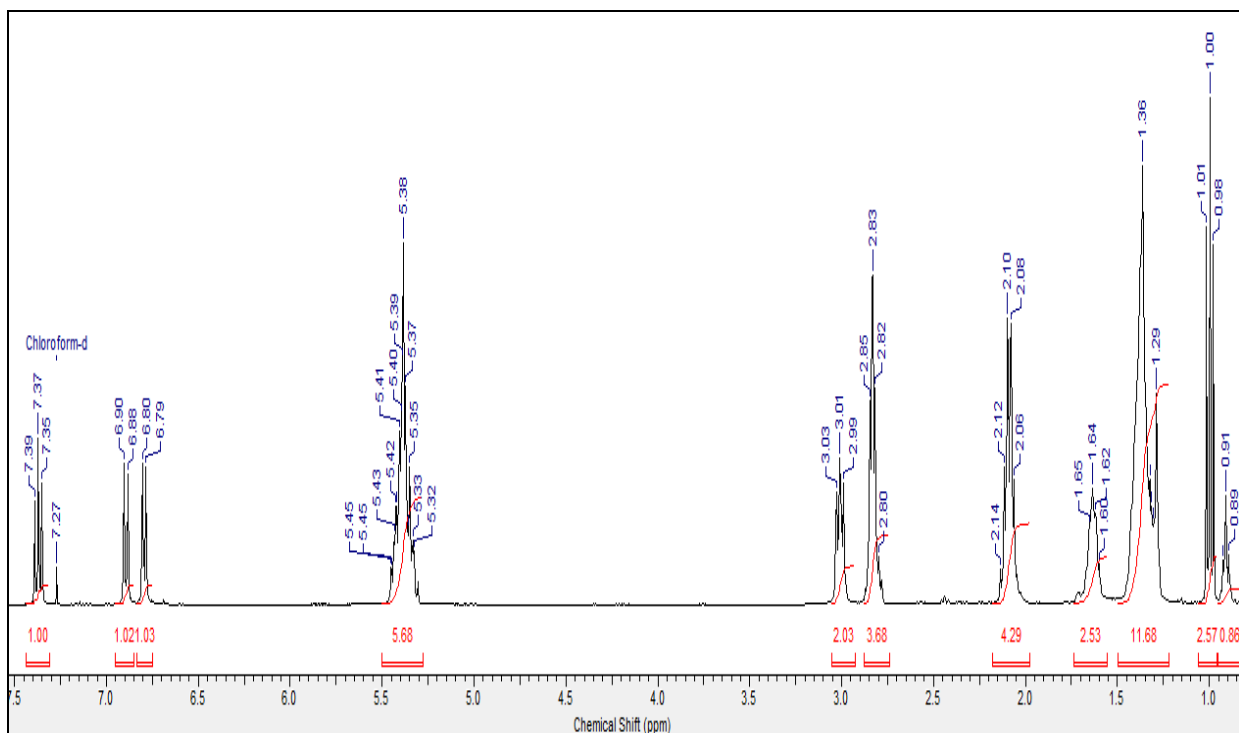


FIGURA 4.2 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da mistura de ácidos anacárdicos (**I**) (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

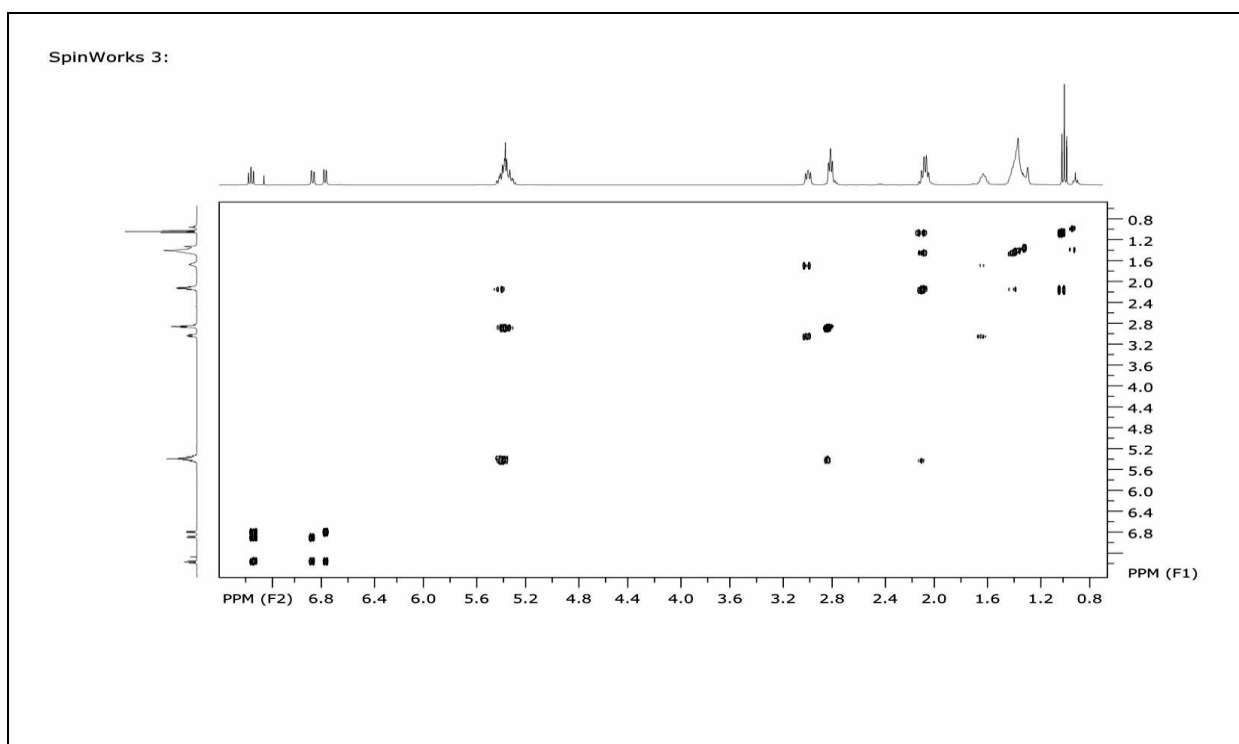


FIGURA 4.3 - Mapa de contornos COSY da mistura de ácidos anacárdicos (**I**) (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

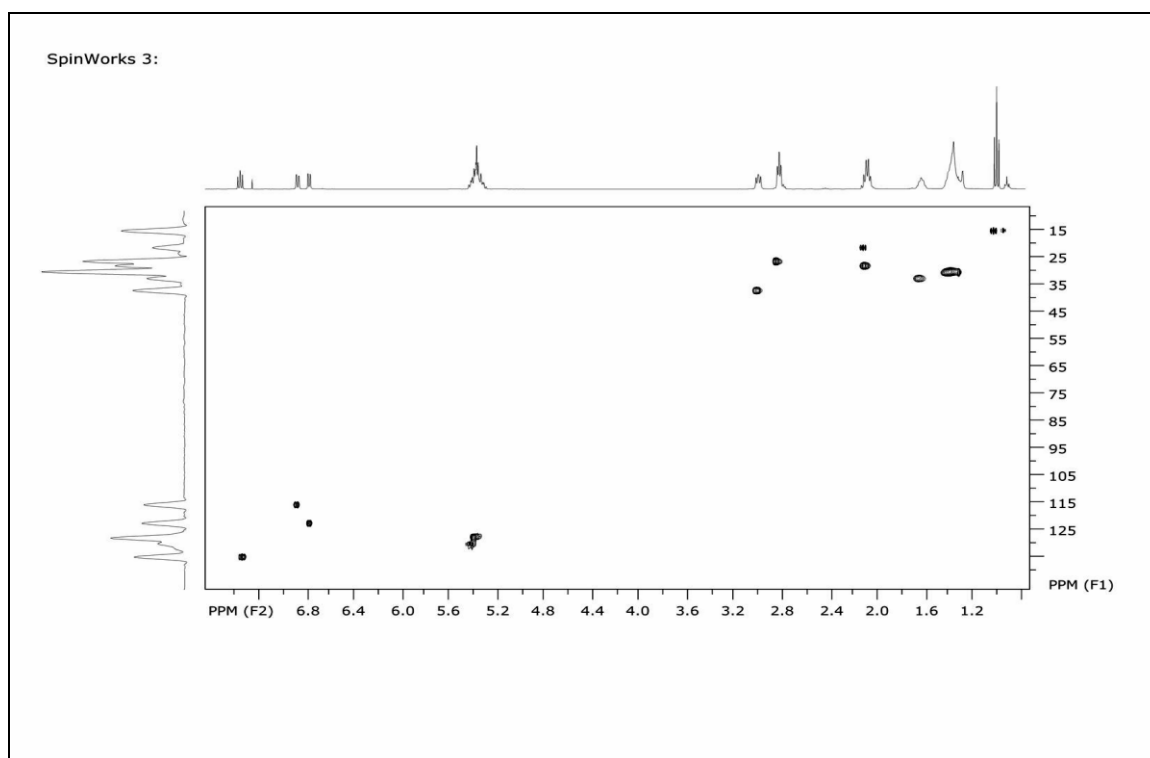


FIGURA 4.4 - Espectro de HSQC da mistura de ácidos anacárdicos (**I**) (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

O cromatograma de íons totais obtido via ESI (-)-MS inserção direta (Figura 4.5) também evidenciou que a substância **I** tratava-se de uma mistura de ácidos anacárdicos, onde os dados obtidos foram compatíveis com aqueles apresentados por CESLA et al., 2006. Dessa forma, os dados espectroscópicos obtidos sugerem a presença de quatro compostos identificados na Tabela 4.2. Através dos dados do cromatograma de íons totais foi possível estabelecer que a cadeia alquílica é constituída por 17 carbonos.

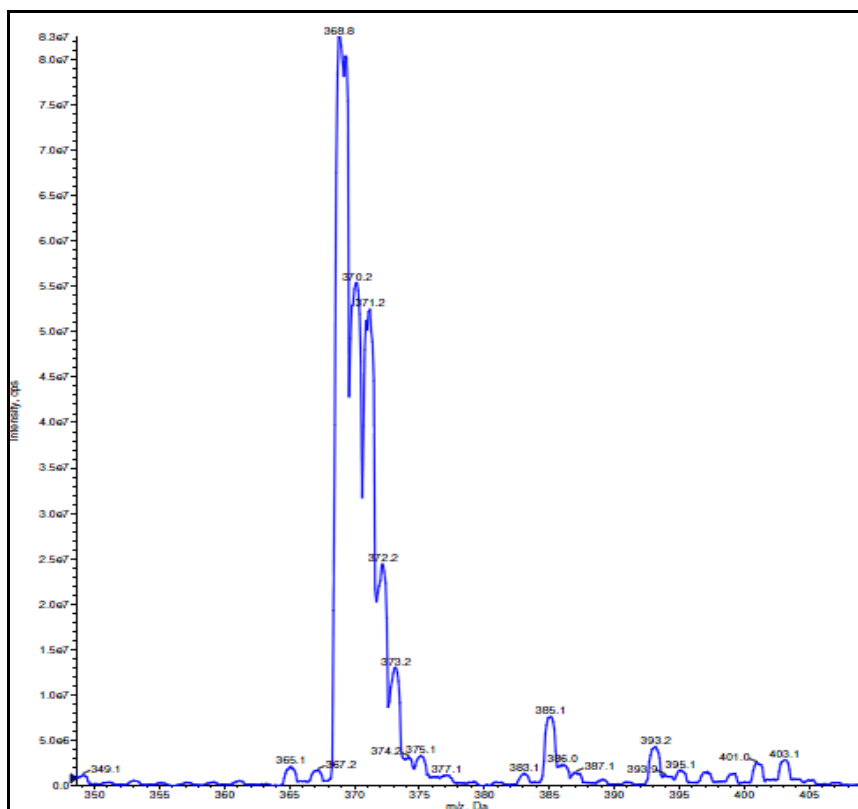


FIGURA 4.5 – Cromatograma de íons totais da mistura de ácidos anacárdicos (I).

TABELA 4.2 - Identificação dos ácidos anacárdicos por ESI (-)-MS.

Ácido anacárdico	Íon [M-H] <sup>-</sup> (m/z)
An 17:3	369,2
An 17:2	371,2
An 17:1	373,2
An 17:0	375,2

O ácido anacárdico é definido como ácido salicílico substituído com uma cadeia alquílica (grupo R) que pode apresentar 13, 15 ou 17 carbonos. Dessa forma, podemos afirmar através dos experimentos realizados que os compostos identificados na mistura (I) possuem 17 carbonos em sua cadeia alquílica (CESLA et al., 2006).

#### 4.5.2 - Estudo biomonitorado da fração MLF2

Todos os grupos obtidos a partir da fração acetato de etila das folhas de *M. lingua* foram acompanhados por cromatografia em camada delgada (CCD) e reunidos em treze subfrações (Tabela 4.3) a partir da semelhança em seus perfis cromatográficos. A fim de se avaliar o potencial de inibição, todas subfrações foram ensaiadas sobre as catepsinas B e L. Entretanto, apesar das subfrações MLF24 até MLF27 apresentarem no geral bons resultados de inibição optou-se por não investigá-las, pois análise por RMN de  $^1\text{H}$  revelou a presença dos ácidos anacárdicos como os componentes majoritários.

Dando seguimento na busca por novos potenciais inibidores as subfrações MLF291 e MLF292 foram selecionadas para investigações subsequentes, pois além dos bons resultados apresentados sobre as catepsinas a análise por RMN de  $^1\text{H}$  revelou a presença de sinais característicos da classe dos flavonoides. Esta situação sugeriu a investigação dessas frações na busca por inibidores, visto que conforme levantamento bibliográfico (PAN et al., 2005; ZENG et al., 2006) esta classe de substâncias se apresentava como inibidores potenciais das cisteíno proteases.

TABELA 4.3 - Inibição enzimática das subfrações provenientes de MLF2 na dosagem de 125 µg/ ml.

Fração/ massa (mg)	% Inibição CTSB	% Inibição CTSL
MLF21/ 9,0	0,0 ± 0,09	0,0 ± 0,10
MLF22/471,1	0,0 ± 0,08	0,0 ± 0,09
MLF23/ 374,2	92,3 ± 0,03	88,9 ± 0,02
MLF24/ 715,9	97,3 ± 0,08	95,0 ± 0,02
MLF25/ 257,9	98,9 ± 0,01	88,3 ± 0,01
MLF26/ 81,9	99,0 ± 0,01	89,2 ± 0,02
MLF27/ 105,6	99,0 ± 0,03	87,0 ± 0,03
MLF28/ 30,1	91,0 ± 0,03	56,6 ± 0,01
MLF29/ 23,5	99,0 ± 0,02	73,9 ± 0,02
MLF291/ 212,0	97,0 ± 0,06	74,6 ± 0,02
MLF292/ 3.200,0	99,0 ± 0,02	71,0 ± 0,02

A subfração MLF292 foi refraçionada, obtendo-se seis novos grupos (Tabela 4.4) que foram purificados posteriormente para isolamento dos componentes bioativos.

TABELA 4.4 - Inibição enzimática das subfrações provenientes de MLF294 na dosagem de 125 µg/ ml.

Fração	% Inibição CTSB	% Inibição CTSL
MLF292-E	70,0 ± 0,02	7,43 ± 0,05
MLF292-F	75,4 ± 0,1	43,7 ± 0,07
MLF292-G	79,2 ± 0,06	57,1 ± 0,08
MLF292-H	82,2 ± 0,05	70,6 ± 0,05
MLF292-I	82,6 ± 0,2	70,8 ± 0,02
MLF292-J	85,4 ± 0,06	71,8 ± 0,1
MLF292-L	56,8 ± 0,01	6,8 ± 0,02

Os dados de inibição das subfrações obtidos sobre as cisteíno proteases permitiram o redirecionamento do estudo bioguiado na busca por inibidores que se apresentaram mais ativos sobre CTSB (Tabela 4.3 e 4.4).

### 4.5.2.1 - Elucidação estrutural do ácido quínico (II)

A substância **II** (Figura 4.6) foi isolada do grupo MLF292-E proveniente dos sucessivos fracionamentos cromatográficos do extrato acetato de etila (MLF2) das folhas de *M. lingua*. O ácido quínico se apresenta fisicamente como um sólido de cor marrom, solúvel em água.

Esta substância teve sua estrutura elucidada através de experimentos de RMN de uma e duas dimensões, assim como também através da comparação com dados da literatura (HASLAM & TURNER, 1971; PAULI, POETSCH & NAHRSTEDT, 1998).

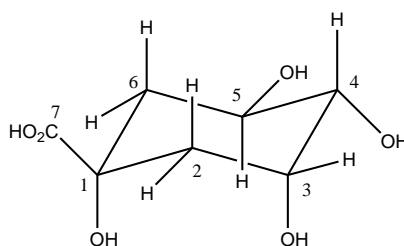


FIGURA 4.6 - Estrutura do ácido quínico (**II**).

De acordo com a literatura, o ácido quínico (**II**) pode existir em duas conformações de cadeira apresentando o grupo carboxílico tanto na posição axial quanto na posição equatorial, e também uma série de conformações em barco. Entretanto, devido ao efeito de impedimento estérico dos grupos funcionais, as conformações em barco se apresentam menos favoráveis devido a menor estabilidade (CORSE et al., 1966).

Através de reações de acetilação previamente descritas na literatura, estudos evidenciaram que em solução o ácido quínico é encontrado somente na conformação de cadeira com o grupo carboxílico em equatorial (CORSE et al., 1966; CORSE & LUNDIN, 1970).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 4.7) utilizando  $\text{D}_2\text{O}$  como solvente mostrou sinais referentes a sete prótons que se situam entre  $\delta$  1,85 e  $\delta$  4,17. O sinal em  $\delta$  4,15 pode ser atribuído ao hidrogênio H-3 (1H, *ddd*,  $J = 3,0$ ;

3,5; 3,5 Hz), em  $\delta$  4,02 correspondente ao hidrogênio H-5 (1H, *ddd*,  $J= 9,5; 11,0; 5,0$  Hz) e um sinal em  $\delta$  3,55 relativo ao hidrogênio H-4 (1H, *dd*,  $J= 3,0; 9,5$  Hz). Todos estes sinais referentes aos hidrogênios H-3, H-5 e H-4 podem ser visualizados na expansão da Figura 4.8.

Os sinais em  $\delta$  2,09 (1H, *ddd*,  $J= 13,5; 5,0; 2,0$  Hz),  $\delta$  2,04 (1H, *dd*,  $J= 14,5; 3,5$  Hz),  $\delta$  1,99 (1H, *ddd*,  $J= 14,5; 3,5; 2,0$  Hz) e  $\delta$  1,88 (1H, *dd*,  $J= 11,0; 13,5$  Hz) foram atribuídos aos hidrogênios H-6 equatorial, H-2 axial, H-2 equatorial e H-6 axial, respectivamente (Figura 4.9). Verifica-se que devido à coplanaridade os hidrogênios H-6 equatorial e H-2 equatorial são capazes de acoplar entre si em longa distância através do  $J_4= 2,0$  Hz.

TABELA 4.5 - Dados de RMN de  $^1\text{H}$  do ácido quínico (**II**) e comparação com a literatura.

Substância II (400 MHz, D <sub>2</sub> O)		Lit. <sup>a</sup> (360 MHz, D <sub>2</sub> O)
H	$\delta$ (ppm), $J$ (Hz)	$\delta$ (ppm), $J$ (Hz)
2 ax	2,04 ( <i>dd</i> , $J= 14,5; 3,5$ )	2,06 ( <i>dd</i> , $J= 14,5; 3,3$ )
2 eq	1,99 ( <i>ddd</i> , $J= 14,5; 3,5; 2,0$ )	2,01 ( <i>ddd</i> , $J= 14,5; 3,7; 2,0$ )
3	4,15 ( <i>ddd</i> , $J= 3,0; 3,5; 3,5$ )	4,08 ( <i>dt</i> , $J= 3,2; 3,3; 3,7$ )
4	3,55 ( <i>dd</i> , $J= 3,0; 9,5$ )	3,38 ( <i>dd</i> , $J= 3,2; 9,2$ )
5	4,02 ( <i>ddd</i> , $J= 9,5; 11,0; 5,0$ )	3,99 ( <i>ddd</i> , $J= 9,2; 11,0; 4,7$ )
6 ax	1,88 ( <i>dd</i> , $J= 11,0; 13,5$ )	1,84 ( <i>dd</i> , $J= 11,0; 13,2$ )
6 eq	2,09 ( <i>ddd</i> , $J= 13,5; 5,0; 2,0$ )	2,12 ( <i>dd</i> , $J= 13,2; 4,7; 2,0$ )

<sup>a</sup>PAULI, POETSCH & NAHRSTEDT, 1998.

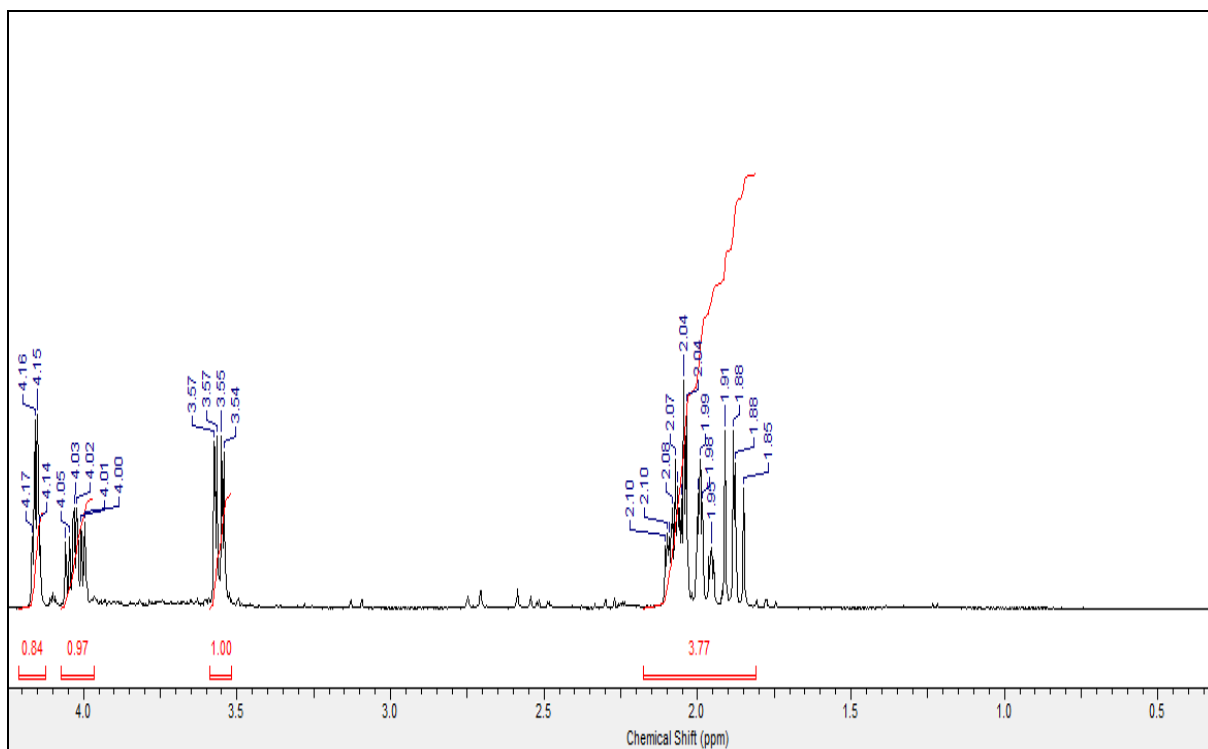


FIGURA 4.7 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **II** (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ).

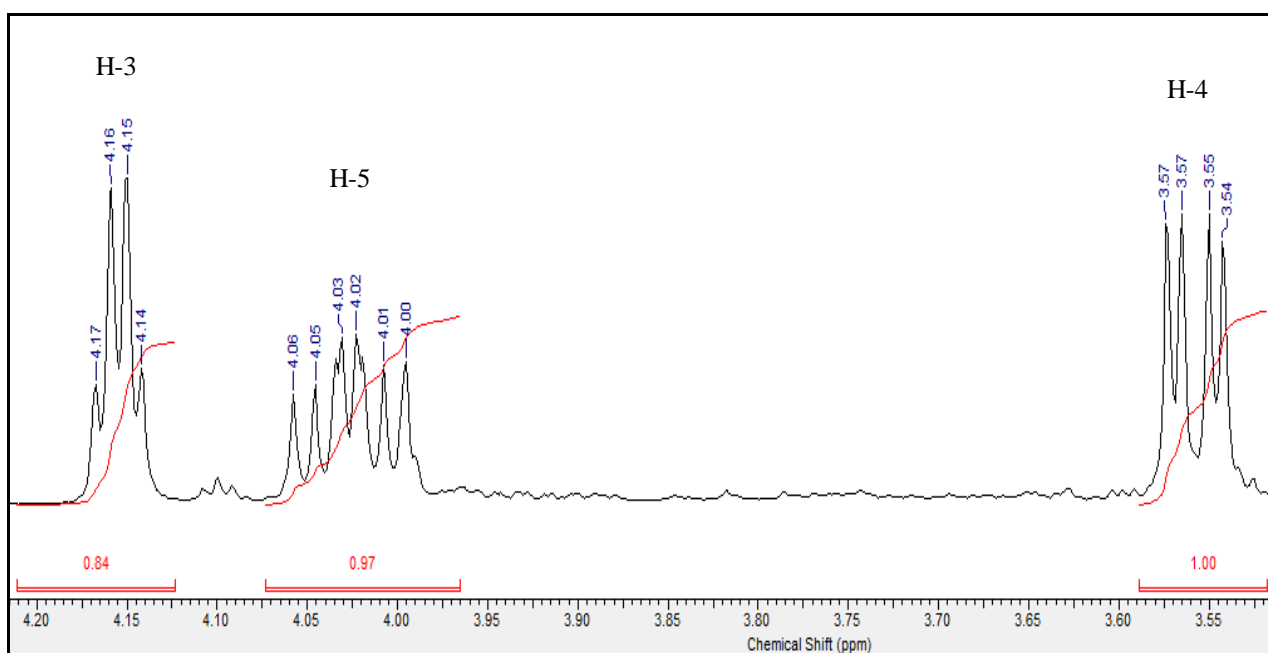


FIGURA 4.8 - Ampliação da região  $\delta$  3,50 a 4,20 do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **II**.



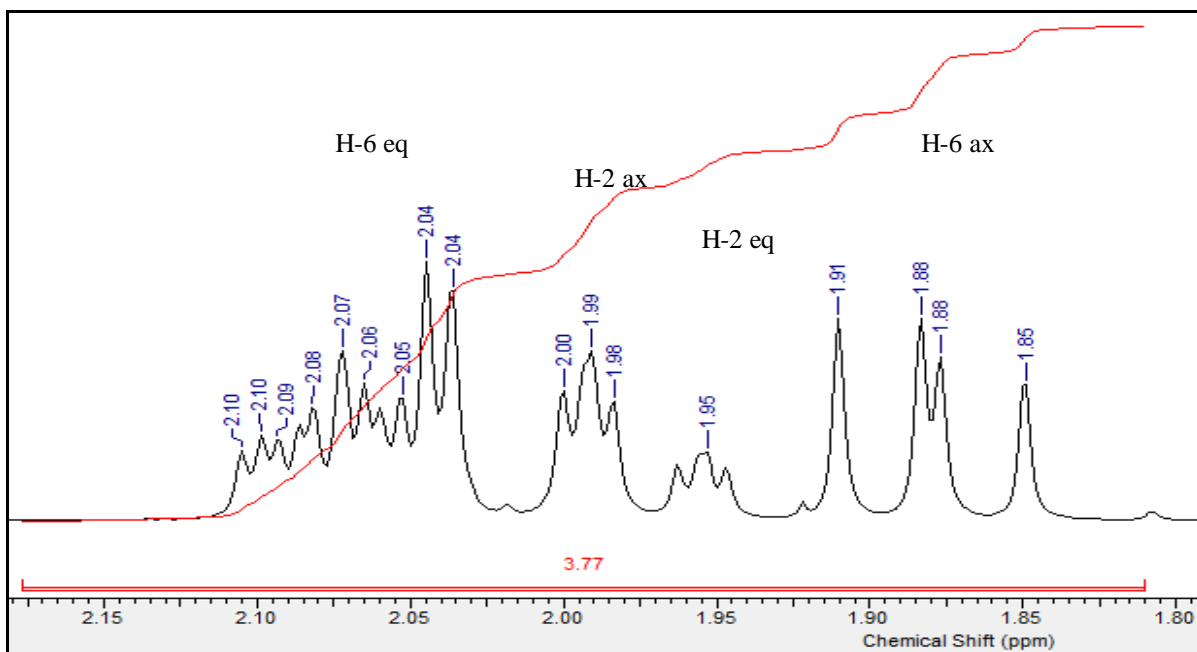


FIGURA 4.9 - Ampliação da região  $\delta$  1,80 a 2,10 do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **II**.

A partir da análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 4.10) foi possível confirmar e atribuir todos os carbonos do esqueleto do ácido quínico (**II**). Para realização deste experimento utilizando  $\text{D}_2\text{O}$  como solvente foi acrescentado o padrão interno TMSP-d4. O sinal em  $\delta$  184,2 foi atribuído ao carbono C-7 que se apresenta bastante desblindado, sendo característico do grupo carboxílico. O sinal em  $\delta$  79,9 foi atribuído ao carbono C-1 e os sinais em  $\delta$  78,0;  $\delta$  73,3 e  $\delta$  69,8 foram atribuídos aos carbonos C-4, C-3 e C-5, respectivamente. Observou-se um sinal em  $\delta$  43,5 referente ao C-6 e em  $\delta$  40,2 referente ao C-2. Assim, a substância **II** foi identificada como ácido quínico.

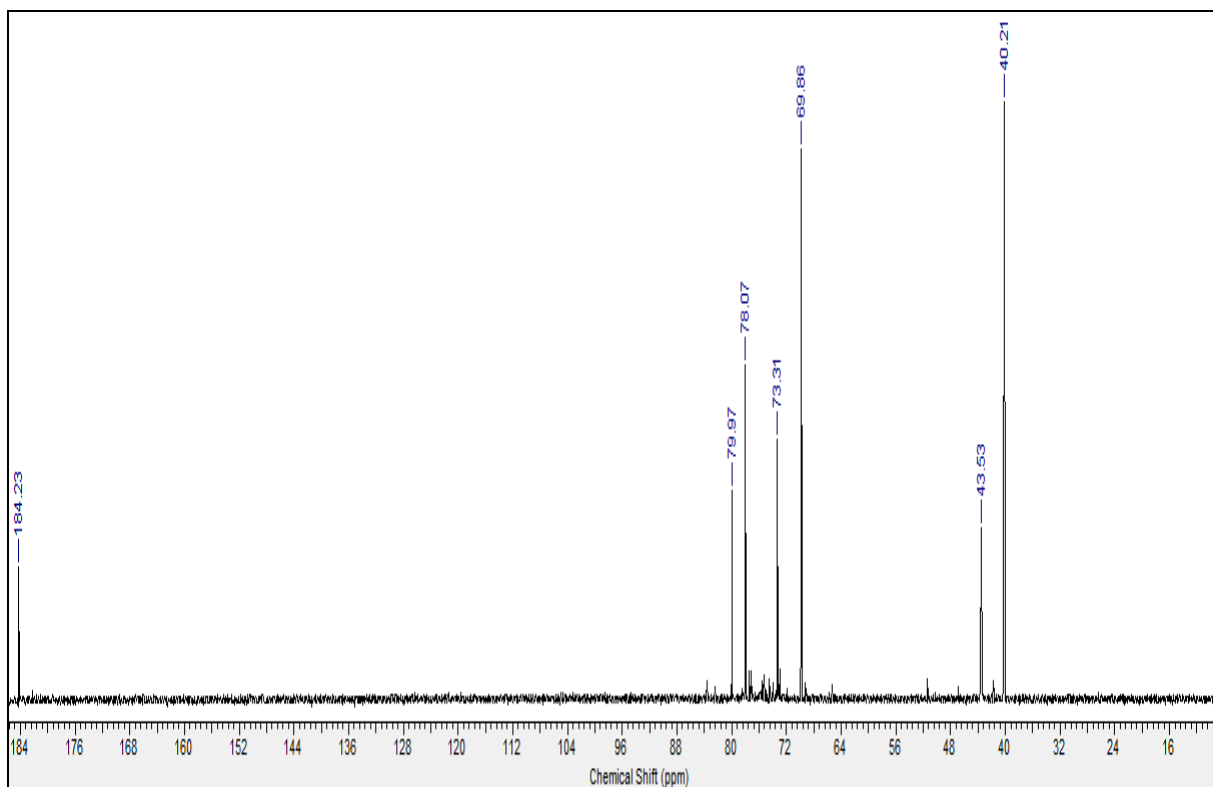


FIGURA 4.10 - Espectro de RMN de <sup>13</sup>C da substância **II** (100 MHz, D<sub>2</sub>O).

No espectro de HSQC (Figura 4.11) pode-se observar a correlação dos sinais em  $\delta$  2,04 e  $\delta$  1,99 referente aos hidrogênios H-2 axial e H-2 equatorial respectivamente, com um sinal de carbono em  $\delta$  40,2; o hidrogênio H-3 ( $\delta$  4,1) correlacionando com o carbono em  $\delta$  73,3; o hidrogênio H-4 ( $\delta$  3,55) correlacionando com o carbono em  $\delta$  74,0 e o hidrogênio H-5 ( $\delta$  4,02) correlacionando com o carbono em  $\delta$  69,8. Os sinais em  $\delta$  1,88 e  $\delta$  2,09 referem aos hidrogênios H-6 axial e H-6 equatorial respectivamente, e se correlacionam com o sinal de carbono em  $\delta$  43,5. Verifica-se que o carbono C-1 em  $\delta$  79,9 não se correlaciona com nenhum sinal de hidrogênio, sendo assim um sinal referente ao carbono quaternário.

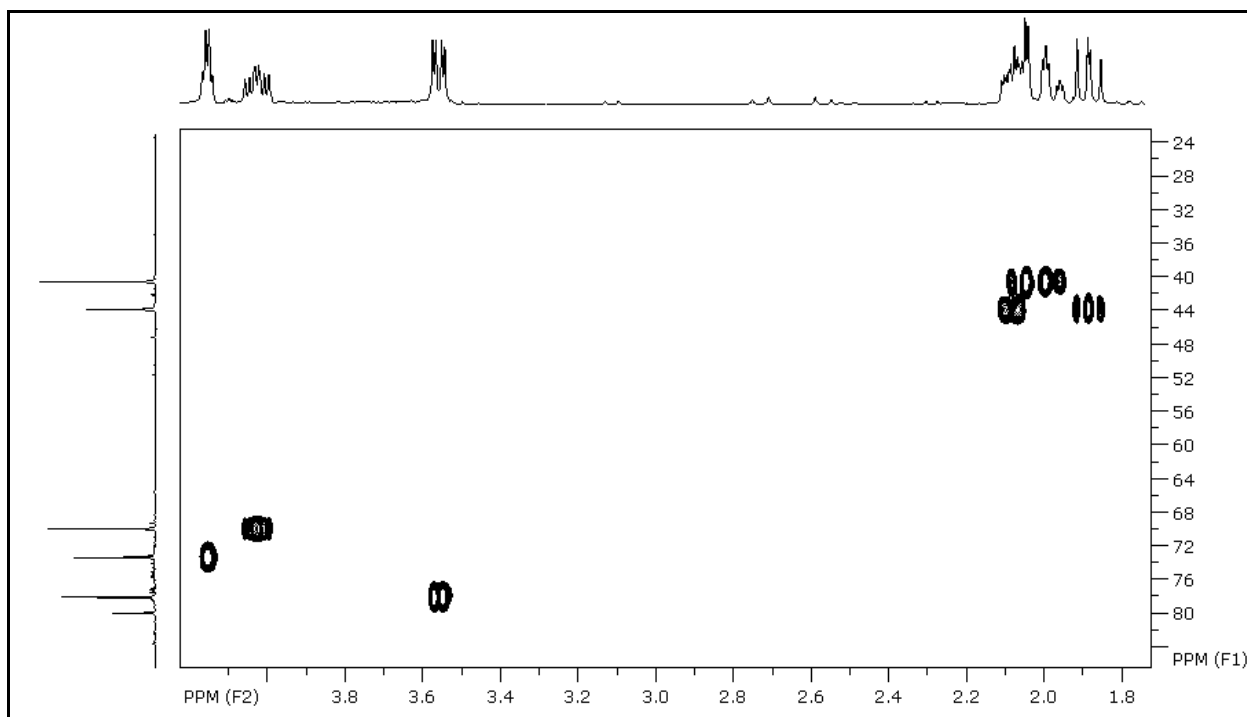


FIGURA 4.11 - Mapa do contorno do experimento de HSQC da substância **II** (400 MHz, D<sub>2</sub>O).

#### 4.5.2.2 - Elucidação estrutural do ácido gálico (**III**)

A substância **III** (Figura 4.12) foi obtida a partir de fracionamentos da subfração MLF-291HI sendo elucidada por experimentos de RMN de <sup>1</sup>H e comparação com dados da literatura (LEE & YANG, 1994).

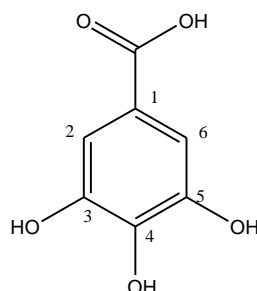


FIGURA 4.12 - Estrutura do ácido gálico (**III**).

Através da análise do espectro de RMN de <sup>1</sup>H obtido em 400 MHz utilizando MeOH-*d*<sub>4</sub> como solvente é possível identificar um único sinal em  $\delta$  7,03 (2H, *s*) demonstrado na Figura 4.13. Este simpleto é referente aos

hidrogênios magneticamente equivalentes H-2 e H-6 presentes no anel aromático do ácido gálico.

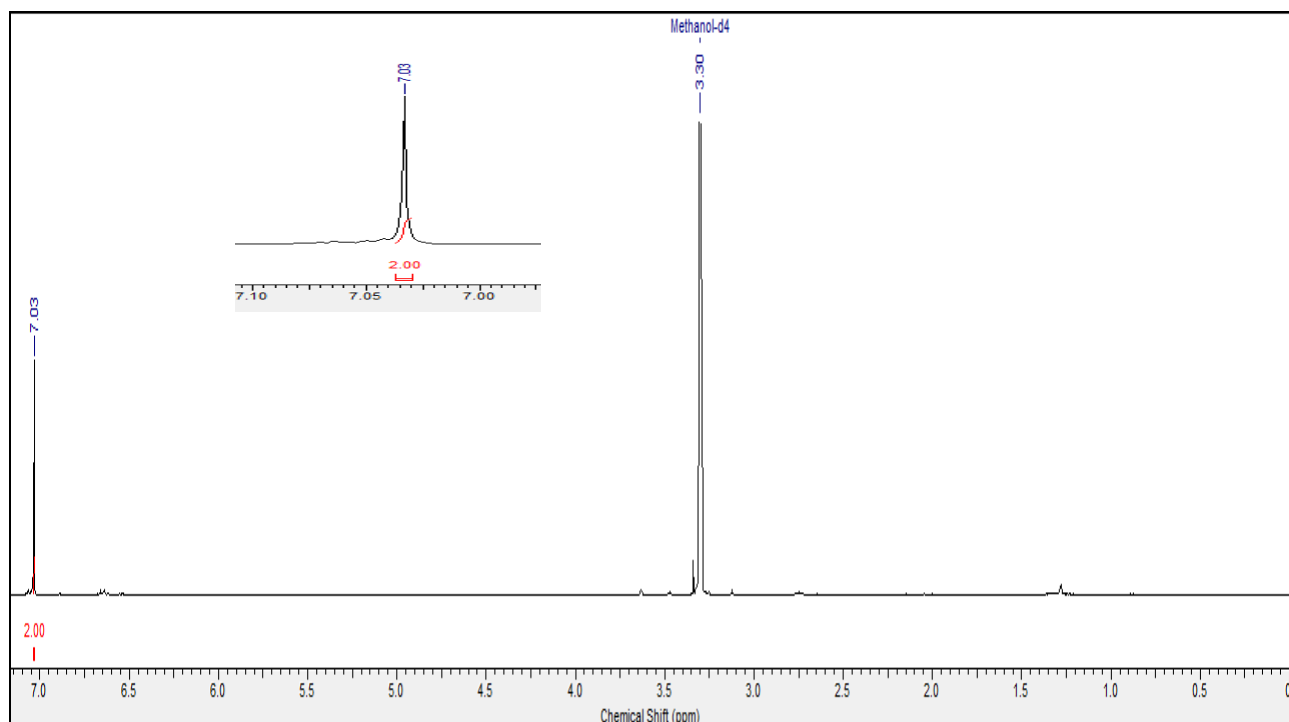


FIGURA 4.13 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **III** (400 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ).

#### 4.5.2.3 Elucidação estrutural do ácido protocatecuico (**IV**)

Assim como a substância **III**, a substância **IV** (Figura 4.14) também foi obtida a partir da subfração MLF-291HI sendo elucidada por experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  e comparação com dados da literatura (LEE et al., 2002).

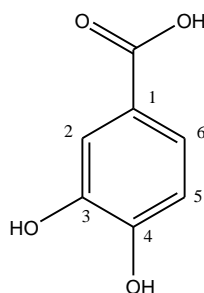


FIGURA 4.14 - Estrutura do ácido protocatecuico (**IV**).

Através da análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtido em 400 MHz utilizando MeOH-*d*4 como solvente é possível identificar três sinais na região de aromático (Figura 4.15). Em  $\delta$  6,72 (1H, *d*,  $J= 8,0$  Hz), em  $\delta$  7,34 (1H, *dd*,  $J= 8,0; 2,0$  Hz) e em  $\delta$  7,41 (1H, *d*,  $J= 2,0$  Hz) sendo atribuídos aos hidrogênios H-5, H-6 e H-2, respectivamente. A partir da multiplicidade dos sinais é possível observar que H-6 apresenta acoplamento em *orto* com H-5 e acoplamento em *meta* com H-2.

TABELA 4.6 - Dados de RMN de  $^1\text{H}$  do ácido protocatecuico e comparação com a literatura.

H	Substância IV (400 MHz, MeOH- <i>d</i> 4)	Lit. <sup>a</sup> (400 MHz, DMSO- <i>d</i> 6)
	$\delta$ (ppm), $J$ (Hz)	$\delta$ (ppm), $J$ (Hz)
2	7,41 ( <i>d</i> , $J= 2,0$ )	7,33 ( <i>d</i> , $J= 1,8$ )
5	6,72 ( <i>d</i> , $J= 8,0$ )	6,78 ( <i>d</i> , $J= 8,2$ )
6	7,34 ( <i>dd</i> , $J= 8,0; 2,0$ )	7,28 ( <i>dd</i> , $J= 8,2; 1,8$ )

<sup>a</sup>LEE et al., 2002.

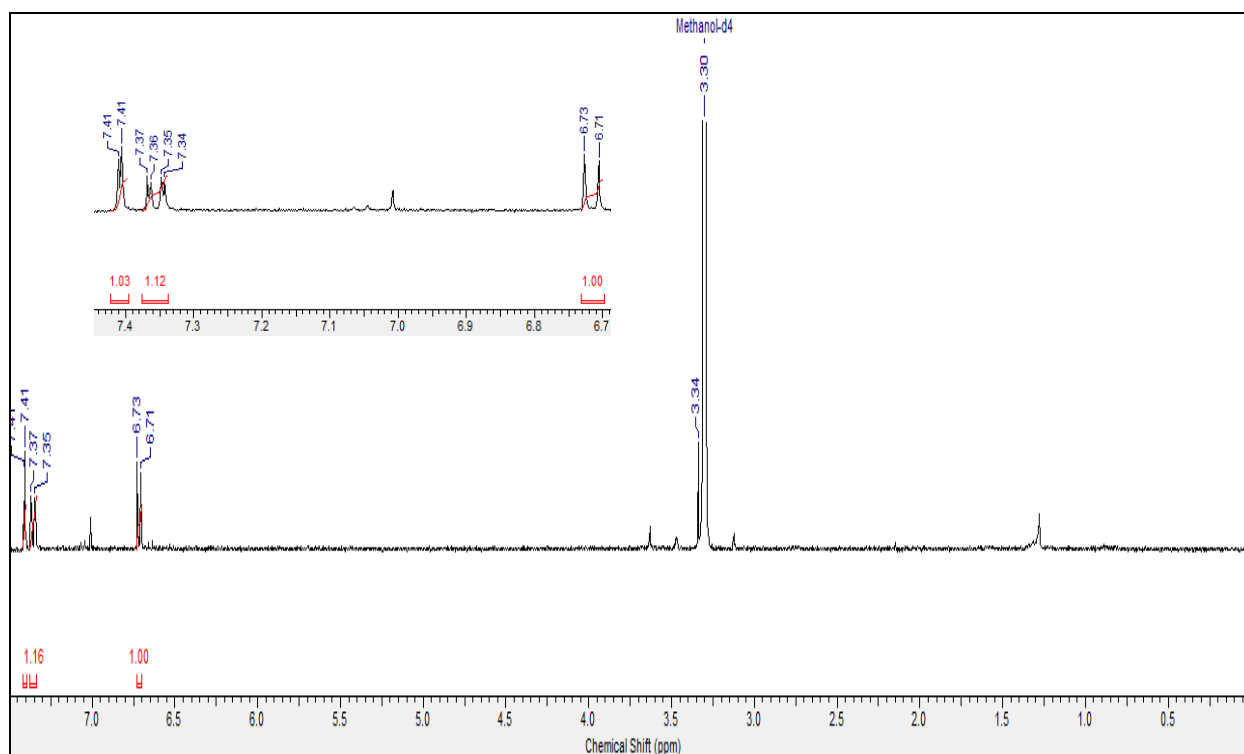


FIGURA 4.15 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância IV (400 MHz, MeOH-*d*4).

#### 4.5.2.4 - Elucidação estrutural da miricetina 3-*O*-(4''-*O*-acetil)- $\alpha$ -ramnosídeo (V)

A substância **V** (Figura 4.16) foi isolada por CLAE a partir da subfração MLF291-G e sua estrutura elucidada através de experimentos de RMN de  $^1\text{H}$ , HSQC, HMBC, COSY e comparação com dados da literatura (MAHMOUD et al., 2001).

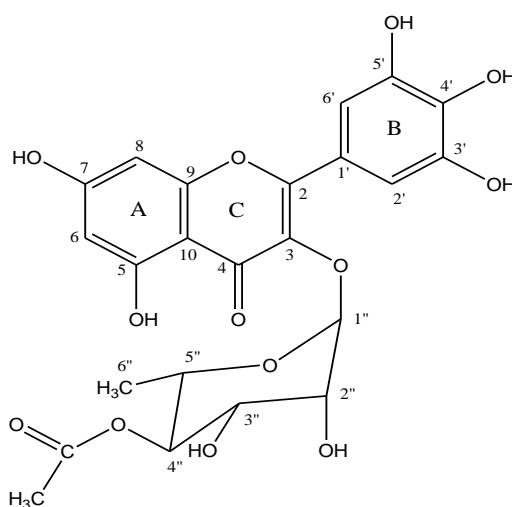


FIGURA 4.16 - Estrutura da miricetina 3-*O*-(4''-*O*-acetil)- $\alpha$ -ramnosídeo (V).

A análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 4.17) mostrou sinais característicos da aglicona miricetina. Foram observados sinais correspondentes aos hidrogênios do anel A em  $\delta$  6,34 (1H, *d*,  $J= 2,0$  Hz) correspondente ao H-8 e em  $\delta$  6,17 (1H, *d*,  $J= 2,0$  Hz) correspondente ao H-6. O sinal referente aos hidrogênios do anel B (H-6' e H-2') se apresenta como um simpleto em  $\delta$  6,84 (2H, *s*) uma vez que estes hidrogênios são magneticamente equivalentes.

No mapa de contornos COSY (Figura 4.18) os acoplamentos dos hidrogênios do anel A são confirmados pela correlação entre o H-6 ( $\delta$  6,17) e H-8 ( $\delta$  6,34). Através do mapa de correlações HSQC (Figura 4.19) estes hidrogênios estão ligados aos carbonos em  $\delta$  98,6 (C-6) e  $\delta$  93,4 (C-8). Em relação ao anel B, ambos os hidrogênios H-6' e H-2' estão ligados ao carbono em  $\delta$  107,7.

No mapa de correlações HMBC (Figura 4.20) foi possível observar que o sinal dos H-2'/H-6' correlaciona-se com os carbonos C-2 ( $\delta$  157,6), C-3'/C-5' ( $\delta$  145,7), C-4' ( $\delta$  136,4) permitindo assim a atribuição dos carbonos no anel B. No anel A foi possível identificar apenas as correlações do H-6 e H-8 com C-10 ( $\delta$  103,4), não sendo observados os sinais de carbono referente à C-5, C-7 e C-9.

Através do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 4.17) verificou-se a presença da ramosa com sinal de metila em  $\delta$  0,72 (*d*,  $J=6,5$  Hz) referente ao H-6". O sinal em  $\delta$  5,17 (*d*,  $J=1,5$  Hz) refere-se ao hidrogênio anomérico (H-1") e este valor de constante é característico de  $\alpha$ -ramnosídeo (SANTOS et al., 2005). Através do mapa de contornos COSY o pode-se verificar que o hidrogênio H-6" correlaciona-se com H-5" que por sua vez se correlaciona com H-4". Há também a existência de correlações entre o H-3" com H-2". Através do mapa de correlações HSQC os hidrogênios H-6" e H-1" estão ligados aos respectivos carbonos C-6" ( $\delta$  17,7) e C-1" ( $\delta$  101,1). Dessa forma, C-5" ( $\delta$  68,2) liga ao H-5", C-4" ( $\delta$  73,4) liga-se ao H-4", C-3" ( $\delta$  67,7) liga-se ao H-3" e C-2" ( $\delta$  69,5) liga-se ao H-2". Através do HMBC confirmou-se a posição de substituição da unidade de ramosa pois o sinal do hidrogênio anomérico H-1" correlaciona-se com C-3 ( $\delta$  134,4).

Por fim, foi possível confirmar a presença do grupamento acetato através do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  com simpleto característico em  $\delta$  2,01 integrando para três hidrogênios. A posição correta deste grupamento foi determinada através do HMBC, onde foi observado correlação do sinal do hidrogênio  $-\text{COCH}_3$  em  $\delta$  2,01 e do sinal do hidrogênio H-4" ( $\delta$  4,72) com a carbonila em  $\delta$  170,5. Através do mapa de correlações HSQC,  $-\text{COCH}_3$  está ligado ao carbono em  $\delta$  22,5. Nota-se também que o H-4" torna-se mais desblindado por estar ligado ao grupo acetato.

TABELA 4.7 - Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e projeção de  $^{13}\text{C}$  da miricetina 3-*O*-(4''-*O*-acetil)- $\alpha$ -ramnosídeo (V) e comparação com a literatura.

	<b>Substância V (400 MHz, DMSO-<i>d</i>6)</b>	<b>Lit.<sup>a</sup> (300 MHz, DMSO-<i>d</i>6)</b>	<b>Substância V (100 MHz, DMSO-<i>d</i>6)</b>	<b>Lit.<sup>a</sup> (75 MHz, DMSO-<i>d</i>6)</b>
H/C	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)
2	-	-	157,6	157,75
3	-	-	134,4	134,24
4	-	-	177,8	177,74
5	-	-	NI	161,38
6	6,17 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 2,0)	6,20 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 1,9)	98,6	98,82
7	-	-	NI	164,37
8	6,34 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 2,0)	6,36 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 1,9)	93,4	93,69
9	-	-	NI	156,50
10	-	-	103,4	104,12
1'	-	-	120,0	119,50
2'	6,86 ( <i>s</i> )	6,86 ( <i>s</i> )	107,7	107,90
3'	-	-	145,7	145,97
4'	-	-	136,4	136,63
5'	-	-	145,7	145,97
6'	6,86 ( <i>s</i> )	6,86 ( <i>s</i> )	107,7	107,90
1''	5,17 ( <i>d</i> , <i>J</i> =1,5)	5,15 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 1,5)	101,1	101,75
2''	4,02 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 1,5; 4,0)	4,02 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 1,5; 3,3)	69,5	70,02
3''	3,77 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 4,0; 9,5)	3,75 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 3,3; 9,5)	67,7	68,04
4''	4,72 ( <i>t</i> , <i>J</i> = 9,5)	4,71 ( <i>t</i> , <i>J</i> = 9,5)	73,4	73,30
5''	3,51 ( <i>m</i> )	3,50 ( <i>m</i> )	68,2	68,04
6''	0,72 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 6,5)	0,72 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 6,1)	17,7	17,20
-COCH <sub>3</sub>	2,01 ( <i>s</i> )	1,99 ( <i>s</i> )	170,5/ 22,5	170,1/ 21,07

<sup>a</sup>MAHMOUD et al., 2001. NI= Não identificado.



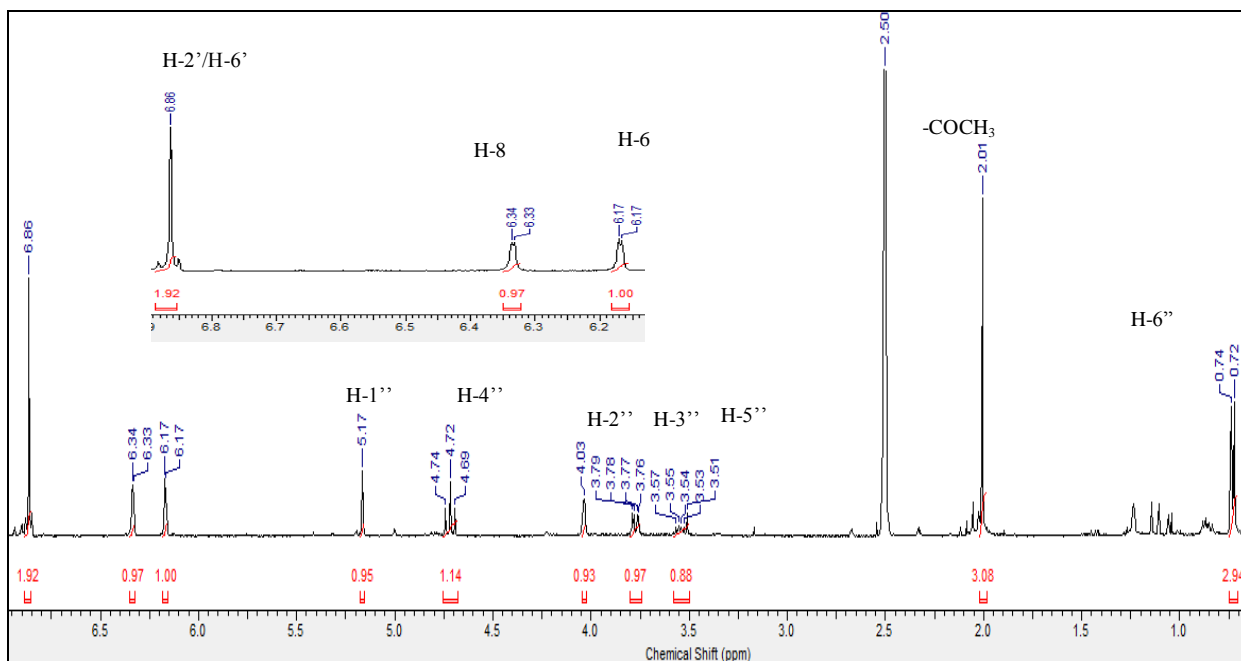


FIGURA 4.17 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância V (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ).

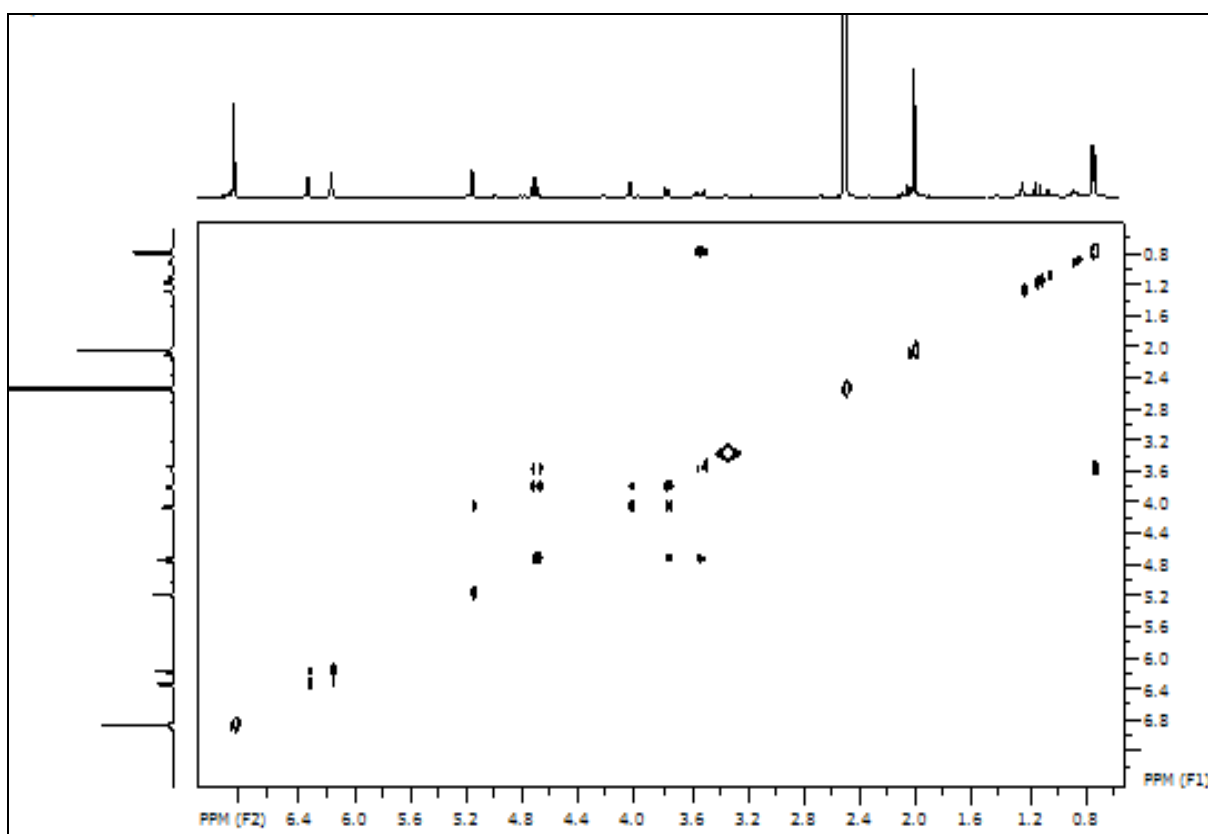


FIGURA 4.18 - Mapa de contornos COSY da substância V (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ).

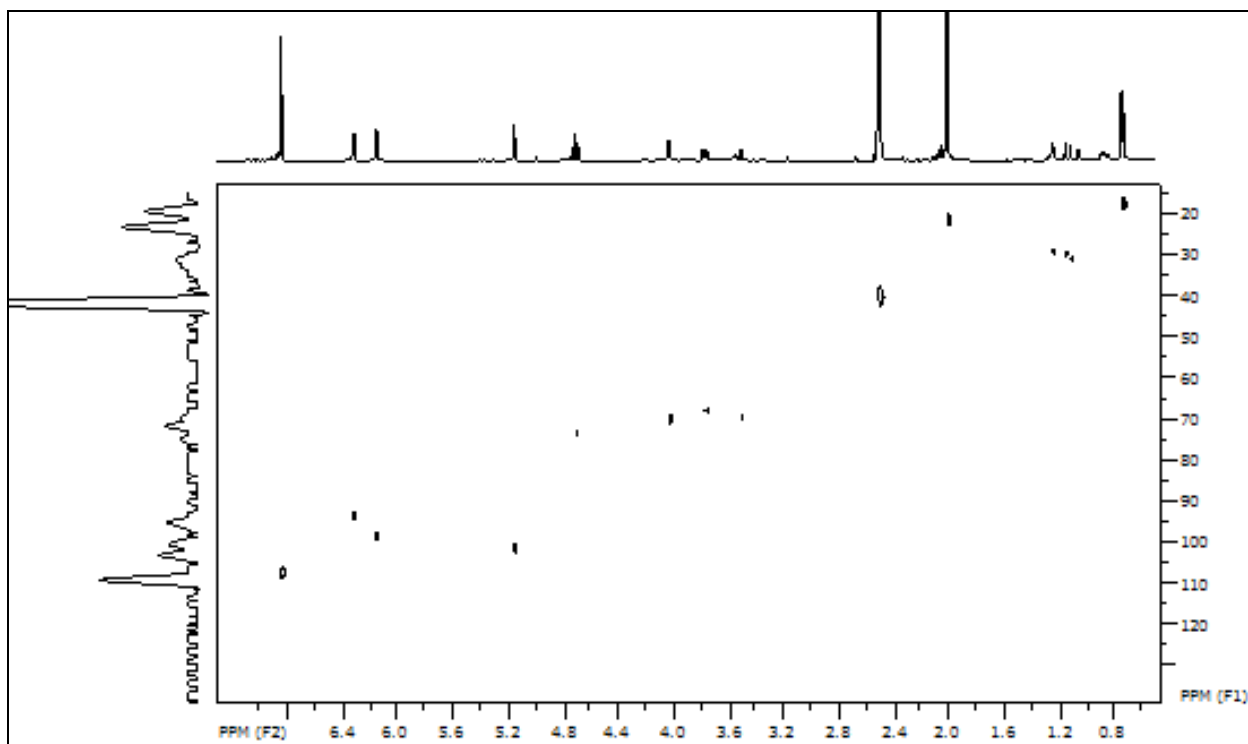


FIGURA 4.19 - Mapa de correlações HSQC da substância V (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>).

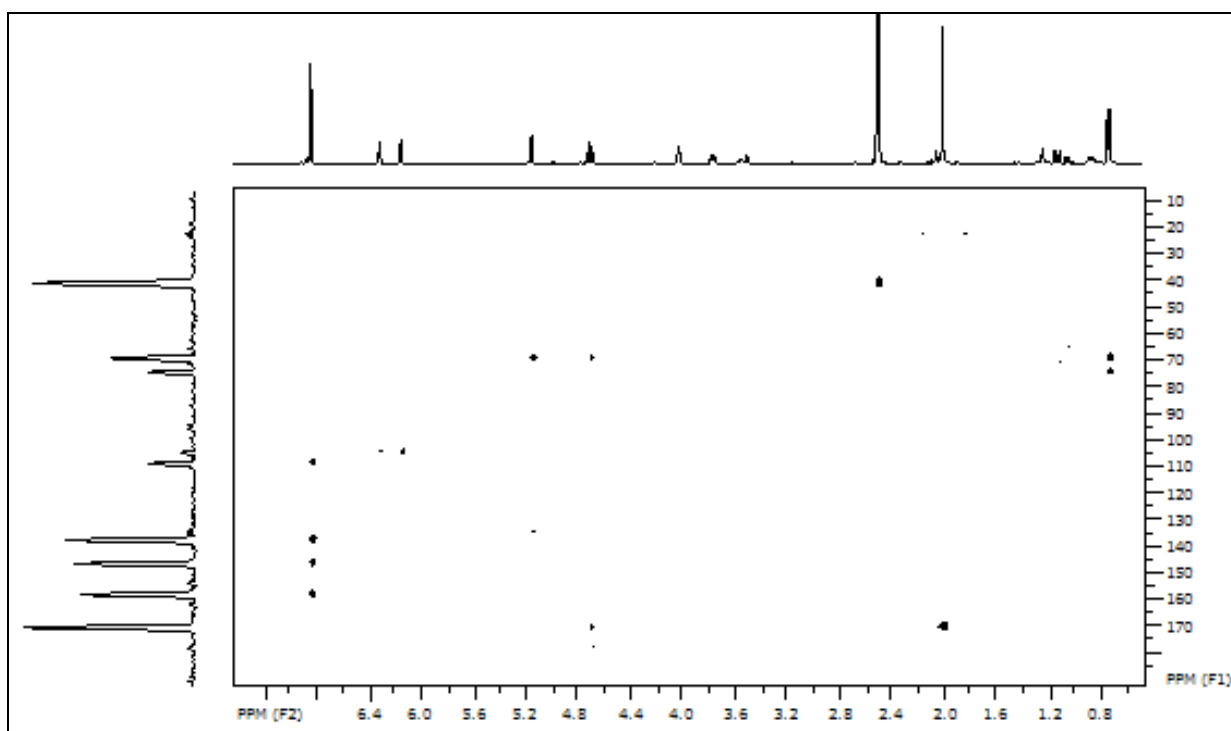


FIGURA 4.20 - Mapa de correlações HMBC da substância V (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>).

#### 4.5.2.5 - Elucidação estrutural da miricetina 3-*O*- $\alpha$ -ramnosídeo (VI)

A substância VI (Figura 4.21) apresenta-se como majoritária no grupo MLF-292 proveniente da fração acetato de etila das folhas de *M. lingua*. Foi obtida através de sucessivos refrações cromatográficas e encontrada em diversas subfrações. Consiste em um sólido amarelo pálido e sua identificação foi realizada por experimentos de RMN de  $^1\text{H}$ , HSQC, HMBC, COSY e comparação com dados da literatura (AROT et al., 1996).

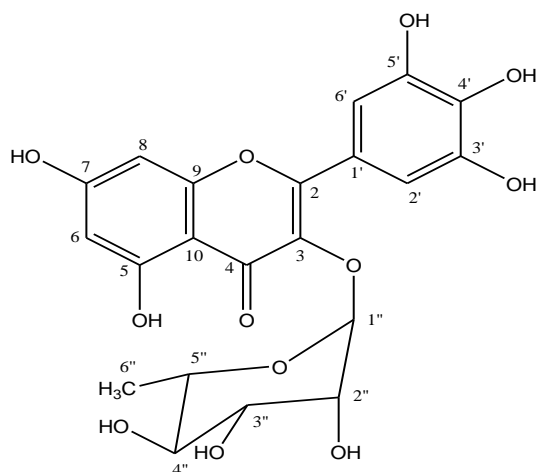


FIGURA 4.21 - Estrutura da miricetina 3-*O*- $\alpha$ -ramnosídeo (VI).

A análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 4.22) mostrou sinais característicos da aglicona miricetina. Foram observados sinais correspondentes aos hidrogênios do anel A em  $\delta$  6,29 (1H, *d*,  $J= 2,0$  Hz) correspondente ao H-8 e em  $\delta$  6,14 (1H, *d*,  $J= 2,0$  Hz) correspondente ao H-6. O sinal referente aos hidrogênios do anel B (H-6' e H-2') se apresenta como um simpleto em  $\delta$  6,93 (2H, *s*) uma vez que estes hidrogênios são magneticamente equivalentes.

Através do mapa de contornos COSY (Figura 4.23) foi possível confirmar os acoplamentos do anel A pela correlação entre o H-6 ( $\delta$  6,14) e H-8 ( $\delta$  6,29). No mapa de correlações HSQC (Figura 4.24) estes hidrogênios estão

ligados aos carbonos em  $\delta$  99,2 (C-6) e  $\delta$  94,0 (C-8). Em relação ao anel B, ambos os hidrogênios H-6' e H-2' estão ligados ao carbono em  $\delta$  108,4.

No mapa de correlações HMBC (Figura 4.25) foi possível observar que o sinal dos H-2'/H-6' correlaciona-se com os carbonos C-2 ( $\delta$  157,8), C-3'/C-5' ( $\delta$  146,3), C-4' ( $\delta$  136,8) permitindo assim a atribuição dos carbonos no anel B. Também foi possível ver as correlações do sinal dos hidrogênios H-2'/H-6' com C-1' ( $\delta$  102,0) e C-2'/C-6' ( $\delta$  108,5). No anel A foi possível identificar apenas as correlações do sinal do hidrogênio H-8 com C-6 ( $\delta$  99,2), C-10 ( $\delta$  104,3), C-9 ( $\delta$  156,4) e C-7 ( $\delta$  165,4) e o hidrogênio H-6 com C-8 ( $\delta$  94,0), C-10 ( $\delta$  104,3), C-7 ( $\delta$  165,4) e C-5 ( $\delta$  161,8).

Através do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  verificou-se a presença da ramnose com sinal característico de metila em  $\delta$  0,95 (*d*,  $J= 6,0$  Hz) referente ao H-6". O sinal em  $\delta$  5,29 (*d*,  $J= 1,4$  Hz) refere-se ao hidrogênio anomérico H-1", sendo este valor de constante característico de  $\alpha$ -ramnosídeo (SANTOS et al., 2005). Através do mapa de contornos COSY foi possível verificar que o hidrogênio anomérico H-1" acopla diretamente com H-2" e este se correlaciona com H-3" em  $\delta$  3,78. O hidrogênio H-3" correlaciona-se então com H-4" ( $\delta$  3,35) e este por sua vez com hidrogênio H-5" ( $\delta$  3,50) que estabelece correlação com H-6" em  $\delta$  0,95. Através do mapa de correlações HSQC verifica-se que os hidrogênios H-1" e H-6" estão ligados aos carbonos C-1" ( $\delta$  102,6) e C-6" ( $\delta$  17,8), respectivamente. Os demais hidrogênios do açúcar se ligam a carbonos na faixa de deslocamento característico de carbonos carbinólicos e foram assim definidos da seguinte forma: H-2" se liga ao C-2" em  $\delta$  70,5; H-3" se liga ao C-3" em  $\delta$  70,7; H-4" se liga ao C-4" em  $\delta$  71,6 ppm e H-5" se liga ao C-5" em  $\delta$  71,2.

No mapa de correlações HMBC o sinal do hidrogênio anomérico H-1" se correlaciona com o carbono C-3 em  $\delta$  134,7 confirmando assim a posição de substituição da unidade de ramnose.

TABELA 4.8 - Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e projeção de  $^{13}\text{C}$  da miricetina 3- $O$ - $\alpha$ -ramnosídeo (VI) e comparação com a literatura.

	Substância VI (400 MHz, MeOH- $d_4$ )	Lit. <sup>a</sup> (250 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	Substância VI (100 MHz, MeOH- $d_4$ )	Lit. <sup>a</sup> (62.5 MHz, $\text{CDCl}_3$ )
H/C	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)
2	-	-	157,8	157,8
3	-	-	134,7	134,56
4	-	-	NI	178,15
5	-	-	161,8	161,65
6	6,14 ( <i>d</i> , $J= 2,0$ )	6,24 ( <i>d</i> , $J= 2,1$ )	99,2	98,88
7	-	-	165,4	164,53
8	6,29 ( <i>d</i> , $J= 2,0$ )	6,36 ( <i>d</i> , $J= 2,1$ )	94,0	93,73
9	-	-	156,4	156,75
10	-	-	104,3	104,28
1'			120,0	119,89
2'	6,93 ( <i>s</i> )	7,04 ( <i>s</i> )	108,5	108,15
3'	-	-	146,3	146,08
4'	-	-	136,8	136,74
5'	-	-	146,3	146,08
6'	6,93 ( <i>s</i> )	7,04 ( <i>s</i> )	108,5	108,15
1''	5,29 ( <i>d</i> , $J= 1,4$ )	5,44 ( <i>d</i> , $J= 0,8$ )	102,6	102,17
2''	4,20 ( <i>m</i> )	4,24 ( <i>m</i> )	70,4	70,17
3''	3,78 ( <i>dd</i> , $J= 3,5;$ 9,5)	3,85 ( <i>dd</i> , $J= 9,2$ )	70,6	70,65
4''	3,35 ( <i>dd</i> , $J= 3,5;$ 9,5)	3,35 ( <i>dd</i> , $J= 9,3$ )	71,6	71,44
5''	3,50 ( <i>m</i> )	3,50( <i>m</i> )	71,2	70,71
6''	0,95 ( <i>d</i> , $J= 6,0$ )	0,98 ( <i>d</i> , $J= 6,0$ )	17,8	17,56

<sup>a</sup>AROT et al., 1996. NI= Não identificado.

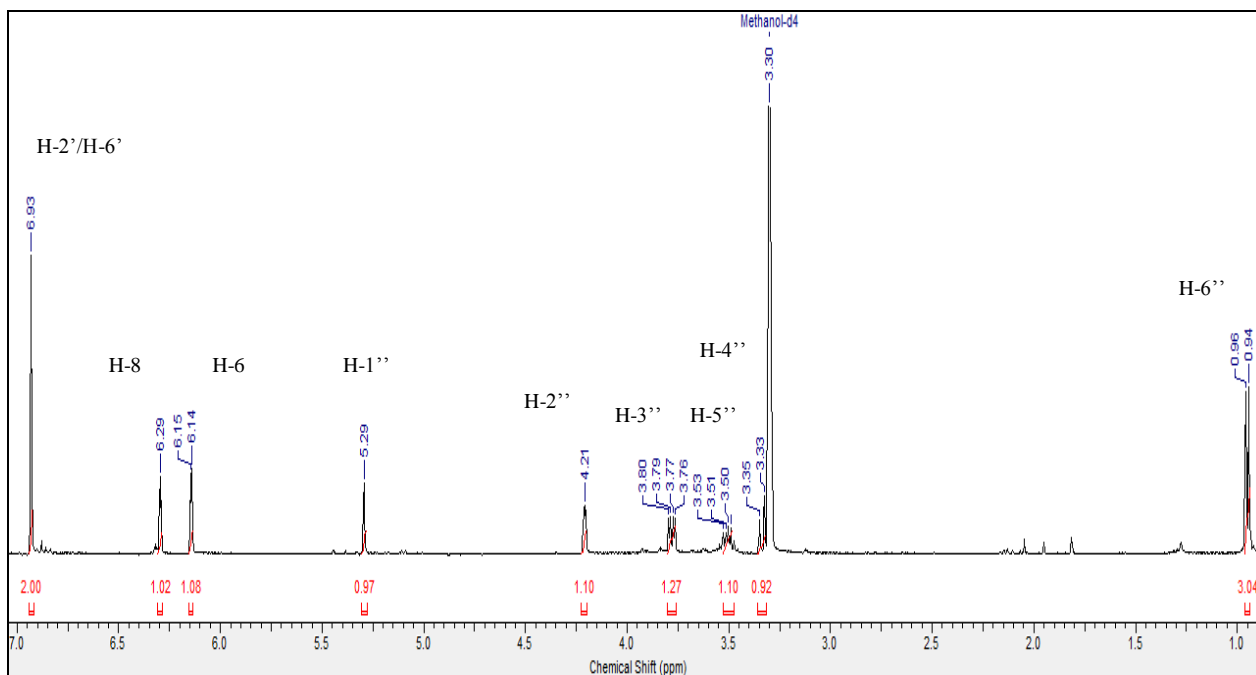


FIGURA 4.22 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância VI (400 MHz, MeOH- $d_4$ ).

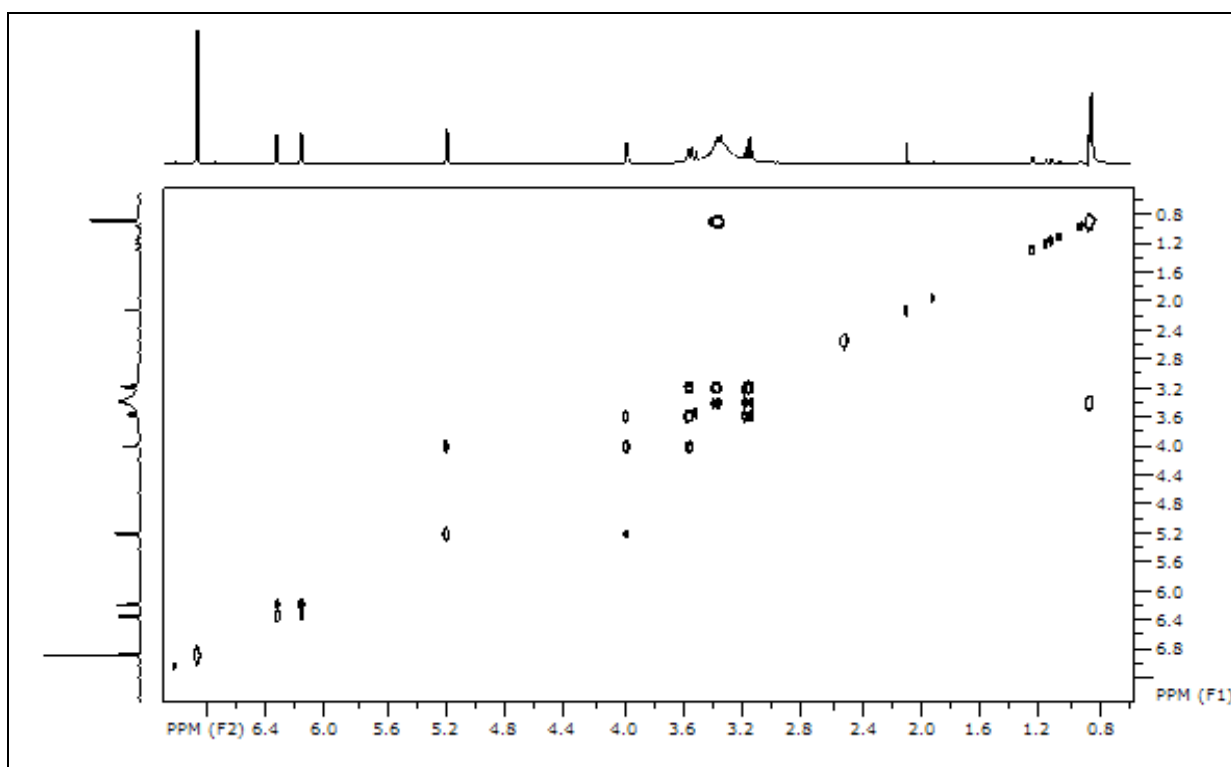


FIGURA 4.23 - Mapa de contornos COSY da substância VI (400 MHz, MeOH- $d_4$ ).

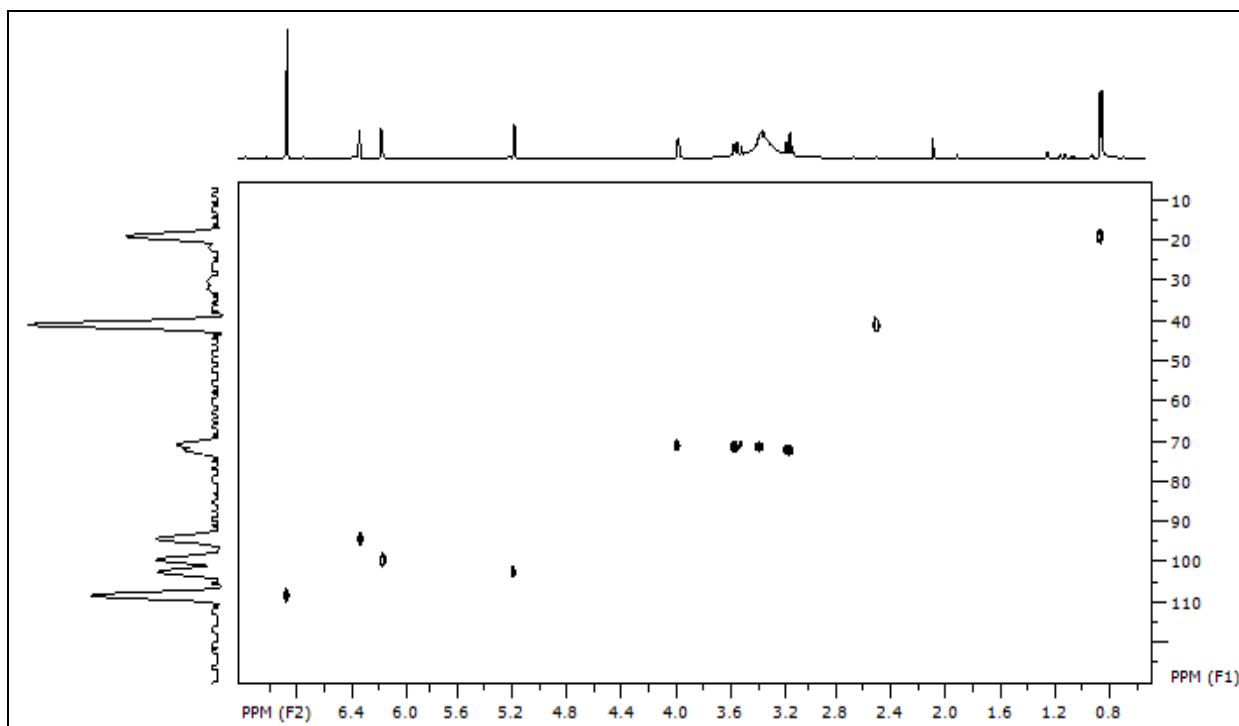


FIGURA 4.24 - Mapa de correlações HSQC da substância **VI** (400 MHz, MeOH-*d*4).

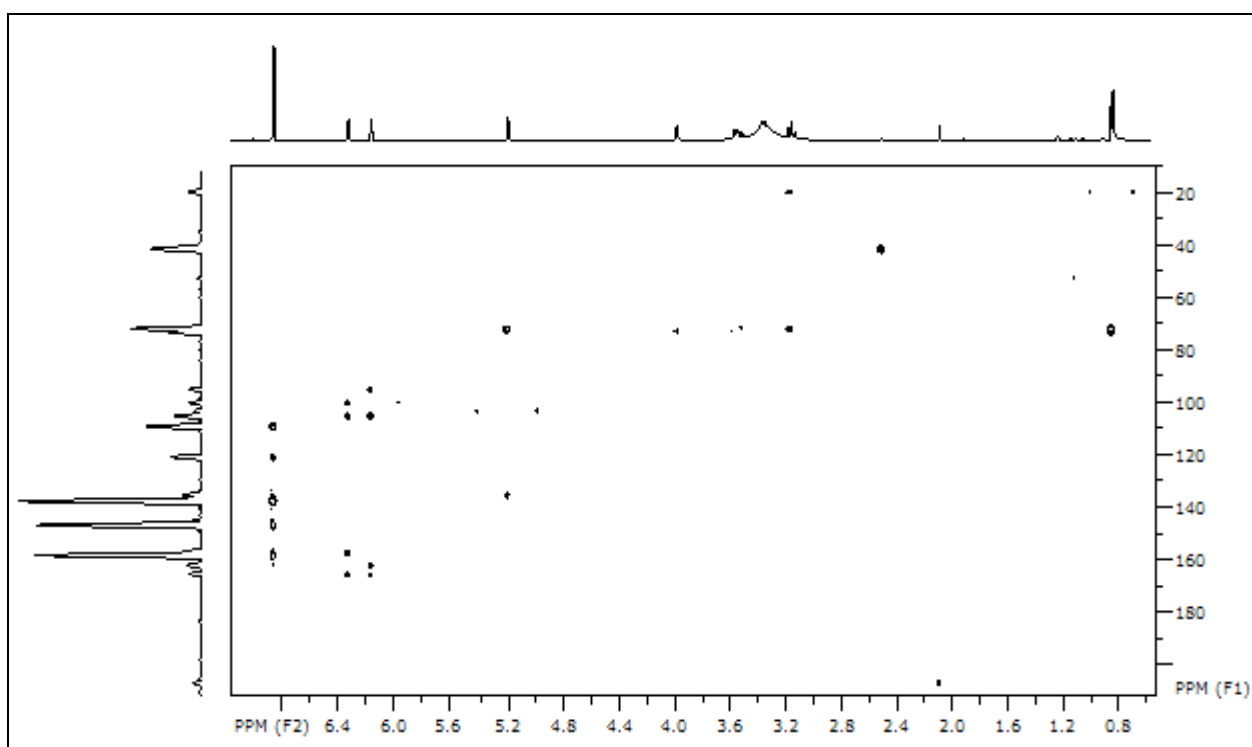


FIGURA 4.25 - Mapa de correlações HMBC da substância **VI** (400 MHz, MeOH-*d*4).

#### 4.5.2.6 - Elucidação estrutural da miricetina 3-*O*- $\beta$ -glicosídeo (VII)

A substância **VII** foi isolada a partir da subfração MLF-292H (16,5 mg) proveniente da fração acetato das folhas de *M. lingua* e sua estrutura elucidada através de experimentos de RMN de  $^1\text{H}$ , HSQC, HMBC, COSY e comparação com dados da literatura (SCHARBERT et al., 2004).

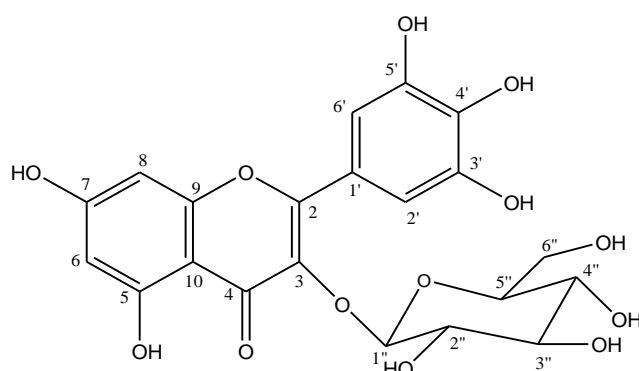


FIGURA 4.26 - Estrutura da miricetina 3-*O*- $\beta$ -glicosídeo (**VII**).

A análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 4.27) mostrou sinais característicos da aglicona miricetina. Foram observados sinais correspondentes aos hidrogênios do anel A em  $\delta$  6,34 (1H, *d*,  $J = 2,0$  Hz) correspondente ao H-8 e em  $\delta$  6,16 (1H, *d*,  $J = 2,0$  Hz) correspondente ao H-6. O sinal referente aos hidrogênios do anel B (H-6' e H-2') se apresenta como um simpleto em  $\delta$  7,30 (2H, *s*) uma vez que estes hidrogênios são magneticamente equivalentes.

No mapa de correlações HSQC (Figura 4.29) os hidrogênios do anel A H-8 e H-6 estão ligados aos carbonos C-8 ( $\delta$  93,7) e C-6 ( $\delta$  99,1), respectivamente. Em relação ao anel B, ambos os hidrogênios H-6' e H-2' estão ligados ao carbono em  $\delta$  108,5.

No mapa de correlações HMBC (Figura 4.30) foi possível observar que o sinal dos H-2'/H-6' correlaciona-se com os carbonos C-2 ( $\delta$  157,2), C-3'/



C-5' ( $\delta$  136,6), C-4' ( $\delta$  144,9) permitindo assim a atribuição dos carbonos no anel B. Também foi possível ver as correlações do H-2'/ H-6' com C-1' ( $\delta$  120,0) e C-2'/C-6' ( $\delta$  108,5). Em relação ao anel A foi possível identificar a correlação do hidrogênio H-8 com C-10 ( $\delta$  103,5), C-5 ( $\delta$  161,2) e C-7 ( $\delta$  165,9) e o hidrogênio H-6 com C-10 ( $\delta$  103,5), C-7 ( $\delta$  165,9) e C-9 ( $\delta$  157,2).

Através do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  verificou-se a presença de sinais característicos dos hidrogênios glicosídicos. A presença de um duplete em  $\delta$  5,15 com constante de 7,2 Hz caracteriza hidrogênio anomérico (H-1'') de  $\beta$ -glicose, os hidrogênios H-6'' apresentaram sinais em  $\delta$  3,90 (*m*) e em  $\delta$  3,81 (*m*), os demais hidrogênios do açúcar apresentaram sinais na faixa de  $\delta$  3,29-3,65. No mapa de correlações HMBC, o sinal do hidrogênio anomérico H-1'' se correlaciona com o carbono C-3 em  $\delta$  136,6 confirmando assim a posição de substituição da unidade glicosídica.

TABELA 4.9 - Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e projeção de  $^{13}\text{C}$  da miricetina 3-*O*- $\beta$ -glicosídeo (VII) e comparação com a literatura.

	Substância VII (400 MHz, MeOH- <i>d</i> 4)	Lit. <sup>a</sup> (500 MHz, CD <sub>3</sub> COD)	Substância VII (100 MHz, MeOH- <i>d</i> 4)	Lit. <sup>a</sup> (125 MHz, CD <sub>3</sub> COD)
H/C	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)
2	-	-	157,2	158,1
3	-	-	136,6	136,1
4	-	-	NI	179,3
5	-	-	161,2	162,3
6	6,16 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 2,0)	6,22 ( <i>d</i> )	99,1	99,0
7	-	-	165,8	165,3
8	6,34 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 2,0)	6,41 ( <i>d</i> )	93,7	93,9
9	-	-	157,2	157,7
10	-	-	103,5	104,7
1'	-	-	120,0	121,0
2'	7,30 ( <i>s</i> )	7,32 ( <i>s</i> )	108,5	109,1
3'	-	-	136,6	137,2
4'	-	-	144,9	145,6
5'	-	-	136,6	137,2
6'	7,30 ( <i>s</i> )	7,32 ( <i>s</i> )	108,5	109,1
1''	5,15 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 7,2)	5,23 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 7,7)	103,7	103,6
2''	3,65 ( <i>m</i> )	3,54 ( <i>dd</i> )	75,7	74,8
3''	3,47 ( <i>m</i> )	3,46 ( <i>dd</i> )	78,4	77,3
4''	3,62 ( <i>m</i> )	3,41 ( <i>dd</i> )	72,9	70,1
5''	3,29 ( <i>m</i> )	3,26 ( <i>m</i> )	78,0	77,6
6a''	3,90 ( <i>m</i> )	3,75 ( <i>dd</i> )	65,6	61,4
6b''	3,81 ( <i>m</i> )	3,64 ( <i>dd</i> )	65,6	61,4

<sup>a</sup> SCHARBERT et al., 2004. NI= Não identificado.

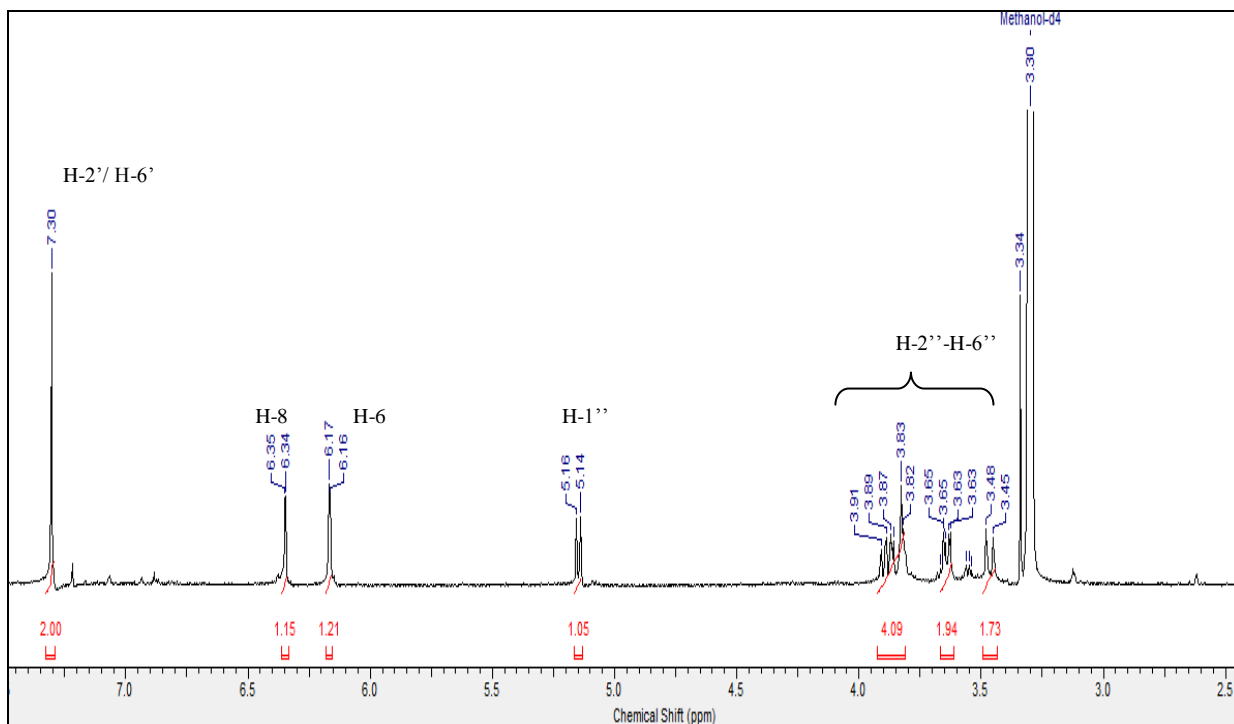


FIGURA 4.27 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **VII** (400 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ).

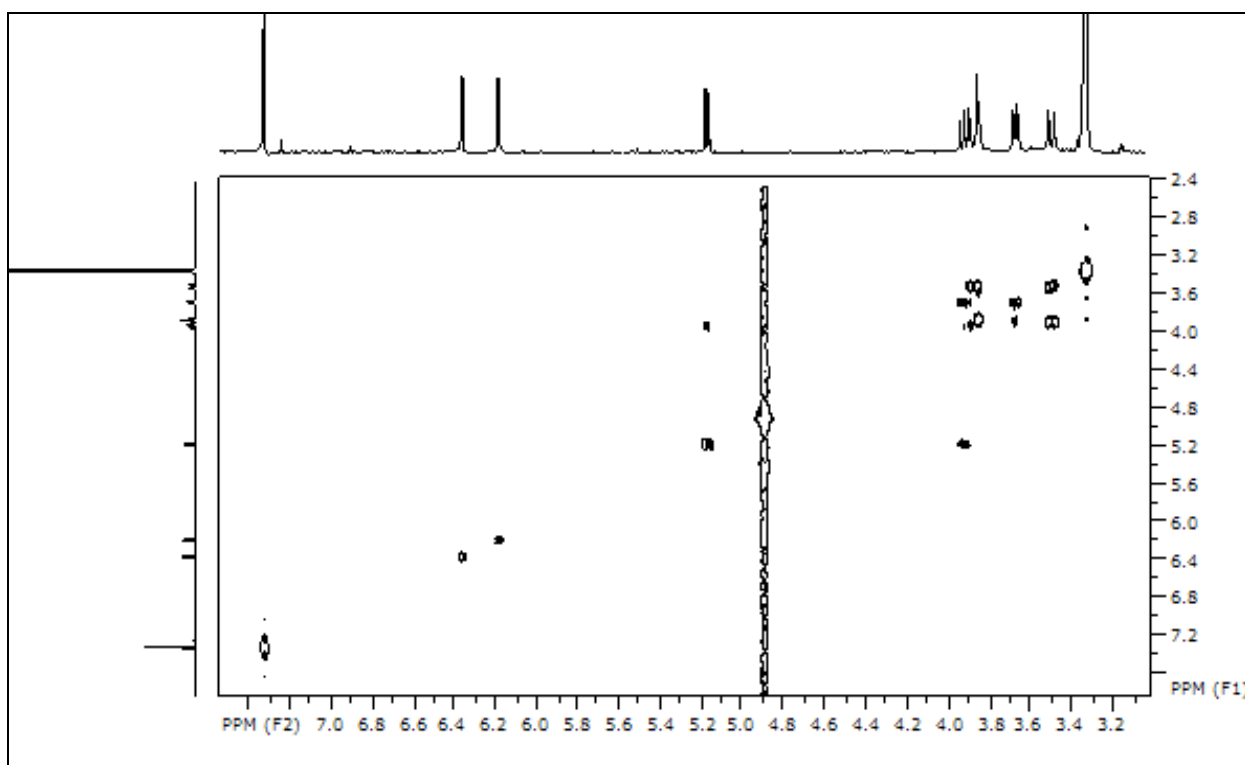


FIGURA 4.28 - Mapa de contornos COSY da substância **VII** (400 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ).

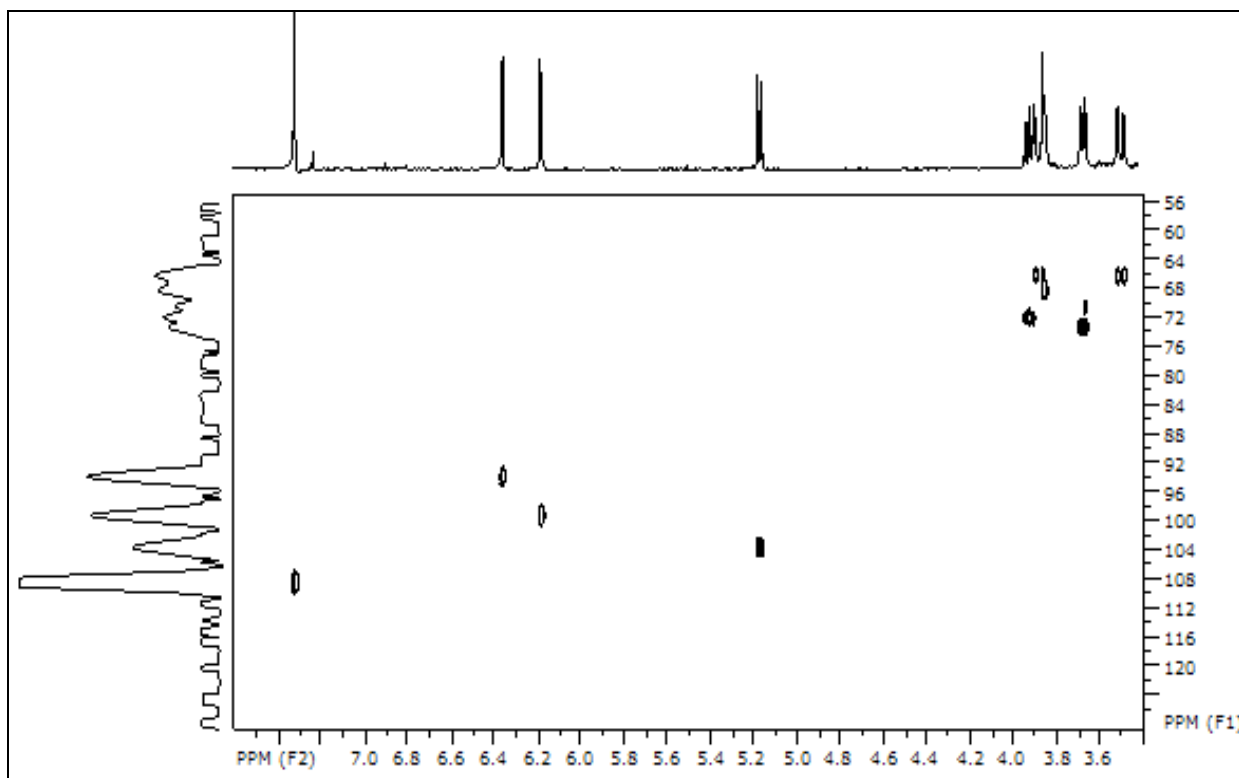


FIGURA 4.29 - Mapa de correlações HSQC da substância **VII** (400 MHz, MeOH-*d*4).

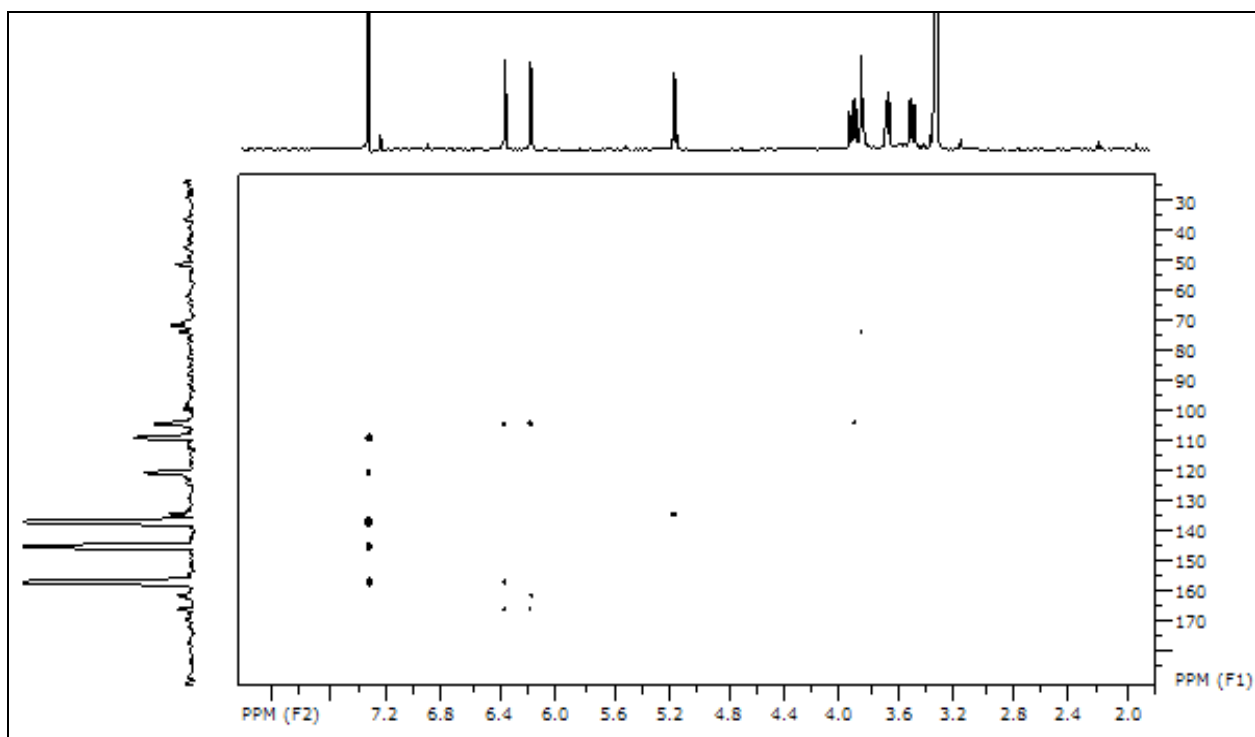


FIGURA 4.30 - Mapa de correlações HMBC da substância **VII** (400 MHz, MeOH-*d*4).

#### 4.5.2.7 - Elucidação estrutural da quercetina 3-*O*- $\alpha$ -ramnosídeo (VIII)

A substância **VIII** (Figura 4.31) foi isolada a partir da subfração MLF292-F4B através de CLAE, sendo proveniente da fração acetato das folhas de *M. lingua*. Sua estrutura foi elucidada através de experimentos de RMN de  $^1\text{H}$ , HSQC, HMBC, COSY e comparação com dados da literatura (SANTOS et al., 2005).

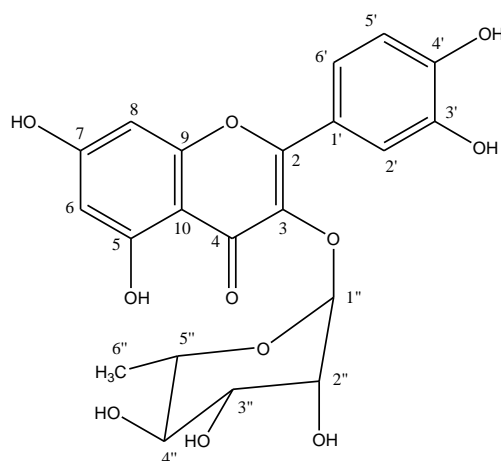


FIGURA 4.31 - Estrutura da quercetina 3-*O*- $\alpha$ -ramnosídeo (**VIII**).

A análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 4.32) mostrou sinais característicos da aglicona quercetina. Foram observados sinais correspondentes aos hidrogênios do anel A em  $\delta$  6,10 (*d*,  $J= 2,0$  Hz) correspondente ao H-8 e em  $\delta$  5,94 (*d*,  $J= 2,0$  Hz) correspondente ao H-6. No anel B há sinais referentes ao sistema de substituição 3', 4' com sinal em  $\delta$  7,24 (*d*,  $J= 2,0$  Hz) referente ao hidrogênio H-2'; em  $\delta$  7,21 (*dd*,  $J= 2,0; 8,0$  Hz) referente ao H-6' e em  $\delta$  6,80 (*d*,  $J= 8,0$  Hz) referente ao H-5'.

No mapa de contornos de COSY (Figura 4.33) acoplamento dos hidrogênios do anel B é confirmado pela correlação entre H-2' ( $\delta$  7,24) e H-5' ( $\delta$  6,80). Através do mapa de correlações de HSQC (Figura 4.34) é possível verificar que os hidrogênios H-2', H-5' e H-6' estão diretamente ligados aos

carbonos C-2' ( $\delta$  115,3), C-5' ( $\delta$  115,8) e C-6' ( $\delta$  121,0), respectivamente. No anel A, os hidrogênios H-6 e H-8 estão ligados aos carbonos C-6 ( $\delta$  99,1) e C-8 ( $\delta$  95,6), respectivamente.

Através do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  verificou-se a presença da rarnose com sinal de metila em  $\delta$  0,81 (*d*,  $J= 6,0$  Hz) referente ao H-6". O sinal em  $\delta$  5,25 (*d*,  $J= 1,4$  Hz) refere-se ao hidrogênio anomérico H-1", sendo este valor de constante característico de  $\alpha$ -ramnosídeo (SANTOS et al., 2005). Através do mapa de contornos de COSY o hidrogênio anomérico H-1" acopla-se com H-2" em  $\delta$  3,97 que por sua vez está acoplado ao H-3" em  $\delta$  3,50. O hidrogênio H-3" correlaciona-se com multipeto em  $\delta$  3,17 que corresponde aos hidrogênios H-4" e H-5".

A substituição do resíduo de açúcar na posição C-3 do flavonoide foi atribuída com base no valor do deslocamento químico para o carbono C-2, uma vez que não foi possível observar a correlação necessária entre os sinais de H-1" e C-3 no mapa de correlações HMBC. Dessa forma, C-2 sofre desblindagem quando a posição C-3 está substituída pelo açúcar, apresentando descolamento de  $\delta$  156,3 (AGRAWAL, 1989).

TABELA 4.10 - Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e projeção de  $^{13}\text{C}$  da quercetina 3-*O*- $\alpha$ -ramnosídeo (VIII) e comparação com a literatura.

	<b>Substância VIII (400 MHz, DMSO-<i>d</i><sub>6</sub>)</b>	<b>Lit.<sup>a</sup> (400 MHz, DMSO-<i>d</i><sub>6</sub>)</b>	<b>Substância VIII (100 MHz, DMSO-<i>d</i><sub>6</sub>)</b>	<b>Lit.<sup>a</sup> (100 MHz, DMSO-<i>d</i><sub>6</sub>)</b>
H/C	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)
2	-	-	156,3	156,84
3	-	-	134,4	134,72
4	-	-	NI	178,24
5	-	-	NI	161,81
6	5,94 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 2,0)	6,20 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 2,2)	99,1	99,30
7	-	-	NI	164,94
8	6,10 ( <i>d</i> , <i>J</i> =2,0)	6,38 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 2,2)	95,6	94,23
9	-	-	NI	157,01
10	-	-	NI	104,54
1'	-	-	NI	121,25
2'	7,24 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 2,0)	7,29 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 2,2)	115,3	116,16
3'	-	-	NI	145,74
4'	-	-	NI	149,0
5'	6,80 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 8,0)	6,88 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 8,0)	115,8	116,0
6'	7,21 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 2,0; 8,0)	7,25 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 2,2; 8,0)	121,0	121,66
1''	5,25 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 1,4)	5,28 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 1,4)	102,9	102,35
2''	3,97 ( <i>m</i> )	3,98 ( <i>m</i> )	70,3	70,59
3''	3,50 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 3,0; 9,0)	3,75 ( <i>m</i> )	71,5	71,71
4''	3,16 ( <i>m</i> )	3,21 ( <i>m</i> )	71,4	71,12
5''	3,17 ( <i>m</i> )	3,50 ( <i>m</i> )	70,9	70,88
6''	0,81 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 6,0)	0,80 ( <i>s</i> )	18,7	18,02

<sup>a</sup>SANTOS et al., 2005. NI= Não identificado.

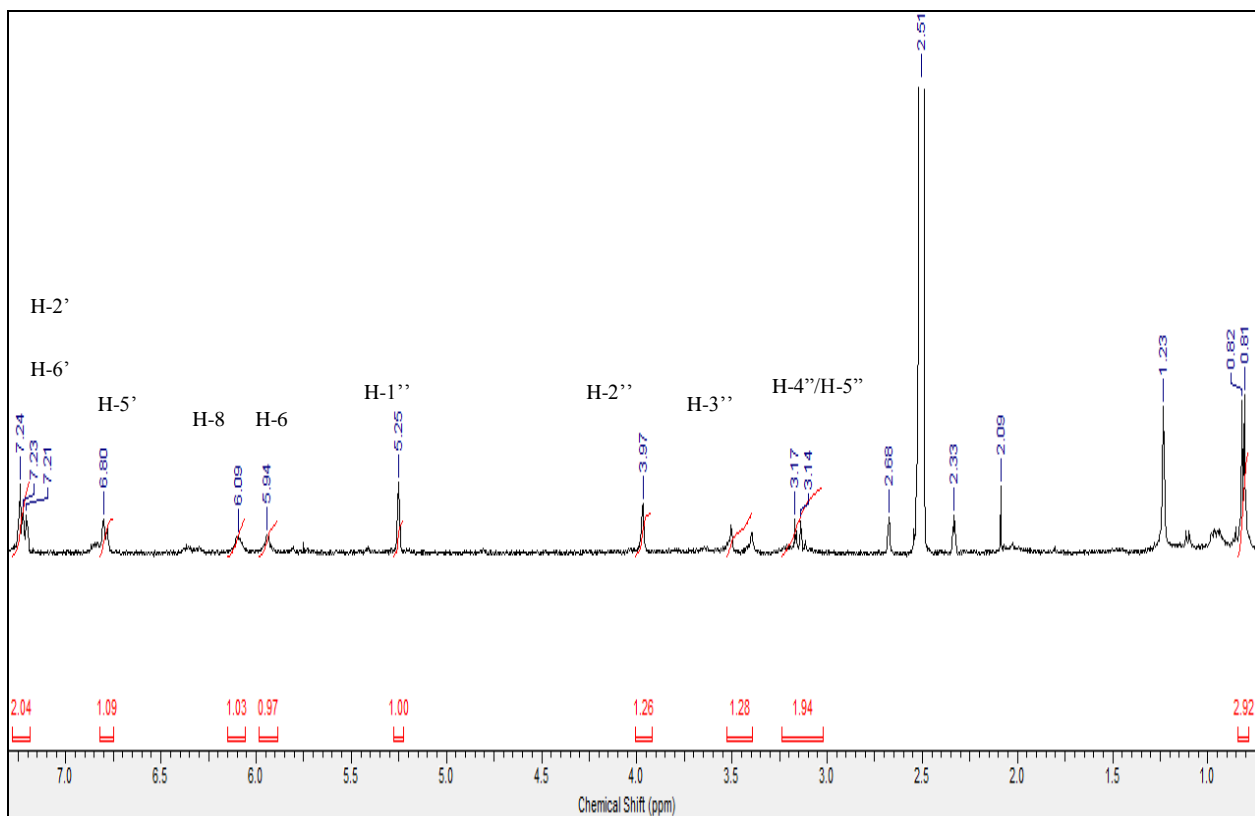


FIGURA 4.32 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **VIII** (400 MHz, DMSO-*d*6).

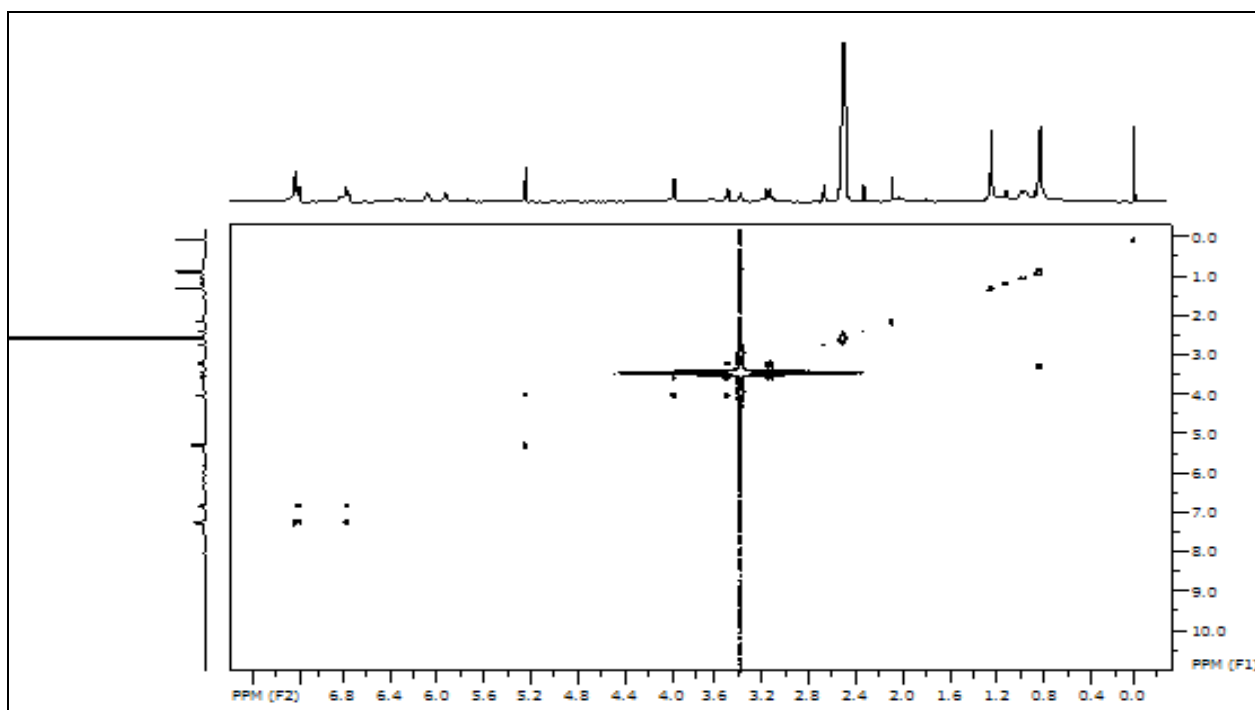


FIGURA 4.33 - Mapa de contornos COSY da substância **VIII** (400 MHz, DMSO-*d*6).



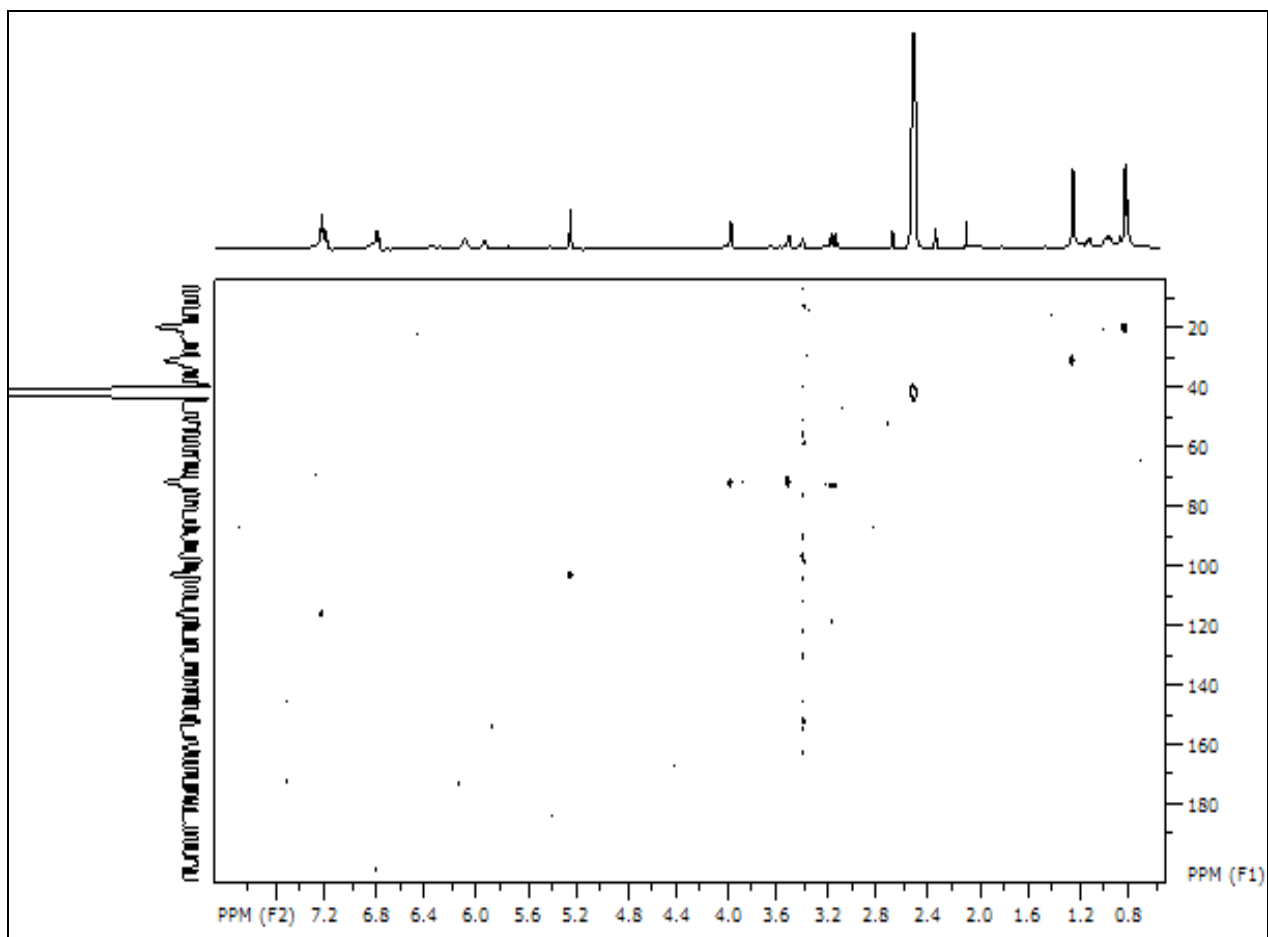


FIGURA 4.34 - Mapa de correlações HSQC da substância VIII (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>).

### 4.5.3 - Estudo biomonitorado da fração MLC1

Os grupos obtidos a partir da fração hexânica dos caules de *M. lingua* foram acompanhados por cromatografia em camada delgada (CCD) e reunidos em novas seis subfrações a partir da semelhança em seus perfis cromatográficos. Com o objetivo de se avaliar o potencial de inibitório das mesmas, todas subfrações obtidas foram ensaiadas sobre as catepsinas B e L. Nota-se que em sua maioria os compostos bioativos isolados desta fração pertencem à classe dos triterpenos.

TABELA 4.11 - Inibição enzimática das subfrações provenientes de MLC1 na dosagem de 125 µg/ ml.

Fração/ massa (mg)	% Inibição CTSB	% Inibição CTSL
MLC1A/ 12,3	7,3 ± 0,03	0,0 ± 0,03
MLC1B/ 440,2	71,3 ± 0,04	95,0 ± 0,05
MLC1C/ 249,7	60,5 ± 0,08	96,7 ± 0,09
MLC1D/ 33,4	59,8 ± 0,05	78,9 ± 0,04
MLC1E/ 32,9	76,5 ± 0,04	68,45 ± 0,01
MLC1F/ 82,4	49,7 ± 0,03	65,78 ± 0,02

Após avaliação dos resultados obtidos optou-se por seguir o isolamento das substâncias ativas a partir das frações MLC1B e MLC1C, as quais apresentaram inibição superior a 80 % sobre CTSL, conforme demonstrado na Tabela 4.11.

#### 4.5.3.1 - Elucidação estrutural do ácido 3-O-acetil ursólico (IX)

A substância **IX** (Figura 4.35) foi isolada a partir da fração hexânica do caule de *M. lingua* (MLC1) e teve sua estrutura elucidada através de experimentos de RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C e comparação com dados da literatura (CHEN et al., 2012).

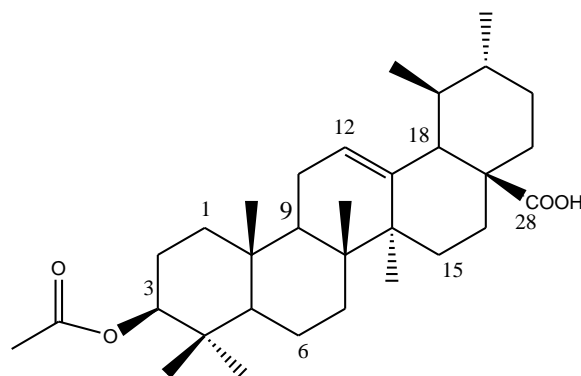


FIGURA 4.35 - Estrutura do ácido 3-*O*-acetil ursólico (**IX**).

Analisando o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **IX** (Figura 4.36) observaram-se sinais entre  $\delta$  1,23-0,66 os quais podem ser atribuídos aos hidrogênios metílicos. Um simpleto bastante desblindado em  $\delta$  2,03 integrando para três hidrogênios é característico do grupamento acetato. Há ainda sinais em  $\delta$  5,25 (1H, *t*,  $J= 4$  Hz) relativo ao hidrogênio H-12 e em  $\delta$  4,50 (1H, *dd*,  $J= 12$ ; 4 Hz) referente ao hidrogênio H-3. Também se observou um duplete em  $\delta$  2,15 referente ao H-18 (1H, *d*,  $J= 11,0$  Hz).

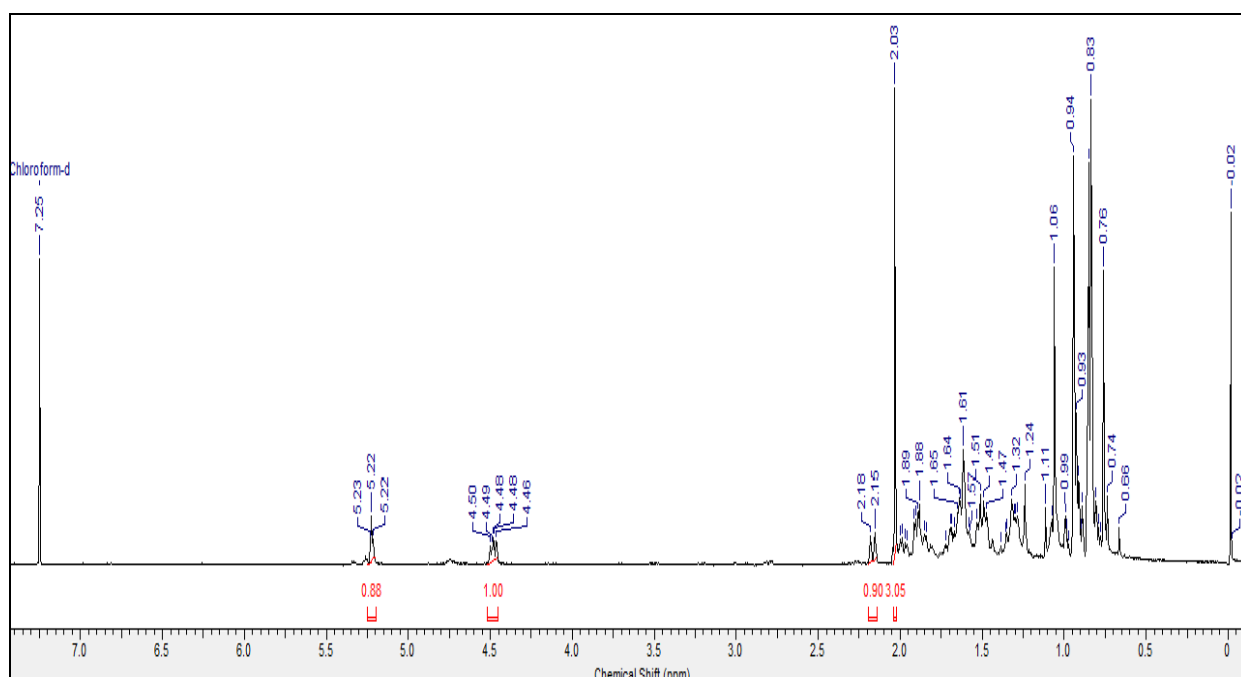


FIGURA 4.36 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **IX** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

A partir da análise dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 4.37) foi possível atribuir os carbonos referentes ao esqueleto ursano. Os sinais em  $\delta$

183,2 e  $\delta$  171,0 referem-se aos carbonos carbonílicos pertencente ao grupamento carboxílico e acetato, respectivamente. Foram observados sinais  $\delta$  125,7 e 137,9 referentes aos carbonos C-12 e C-13 da dupla ligação. Também foi observado sinal em  $\delta$  80,9 relativo ao carbono C-3, característico de carbono ligado a oxigênio (Tabela 4.12).

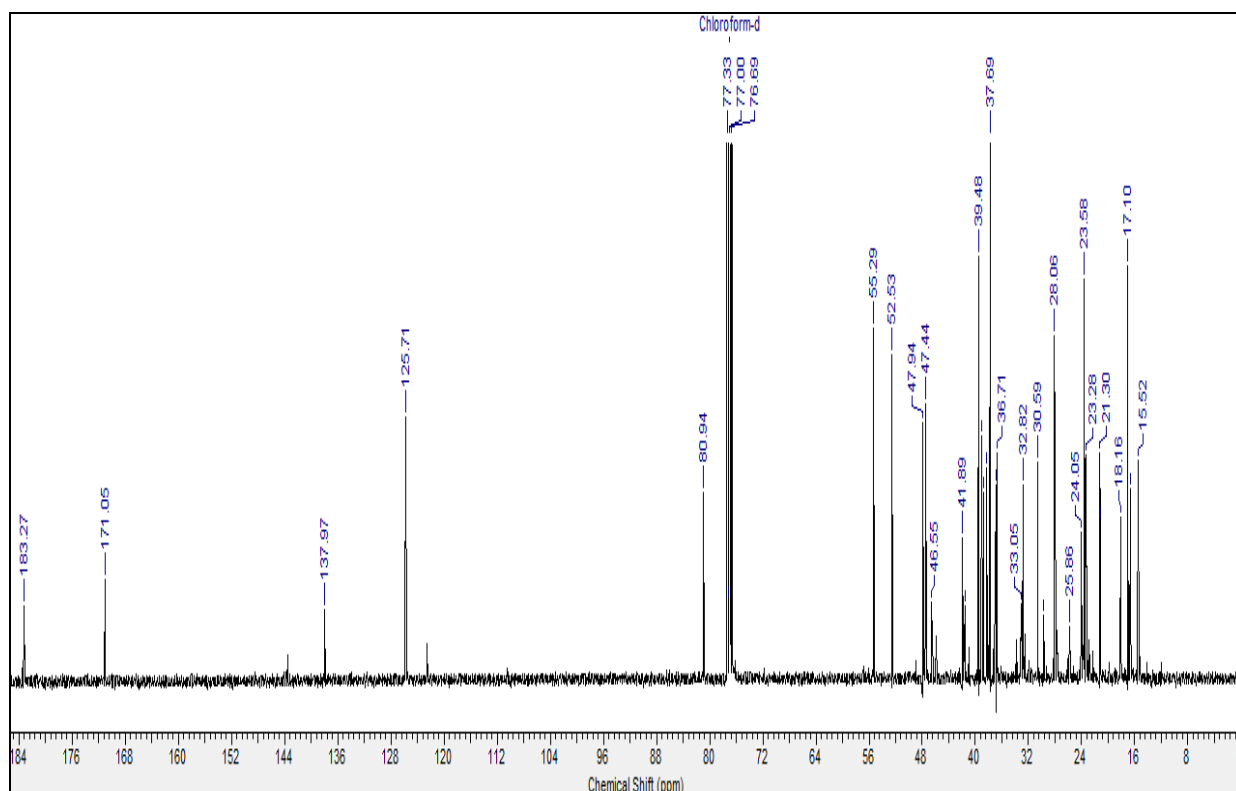


FIGURA 4.37 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **IX** (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

Realizou-se também experimento de RMN de  $^{135}\text{DEPT}$  (Figura 4.38), que permitiu a determinação de todos os sinais referentes aos grupos metilênicos e metínicos. Dessa forma, foi possível estabelecer a presença de nove grupos metilênicos e sete grupos metínicos que permitiram assim confirmar a estrutura do ácido 3-*O*-acetil ursólico.

TABELA 4.12 - Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  do ácido 3-*O*-acetil ursólico (**IX**) e comparação com a literatura.

$^{13}\text{C}$	Substância IX (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	Lit. <sup>a</sup> (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ )
	$\delta$ (ppm)	$\delta$ (ppm)
1	38,2	38,0
2	23,2	23,1
3	80,9	80,6
4	37,6	37,9
5	55,2	54,8
6	18,1	17,7
7	32,8	32,5
8	39,4	40,2
9	47,4	47,2
10	36,7	36,1
11	23,2	22,9
12	125,7	125,6
13	137,9	137,6
14	41,8	41,8
15	27,6	27,6
16	24,0	24,1
17	47,9	47,5
18	52,5	52,2
19	39,0	39,2
20	38,8	38,7
21	30,5	30,3
22	36,9	36,7
23	27,9	27,4
24	15,5	15,3
25	17,0	16,6
26	17,0	16,8
27	23,5	23,2
28	183,2	182,7
29	16,7	16,8
30	21,3	22,0
31	171,0	170,9
32	21,1	20,6

<sup>a</sup>CHEN et al., 2012.

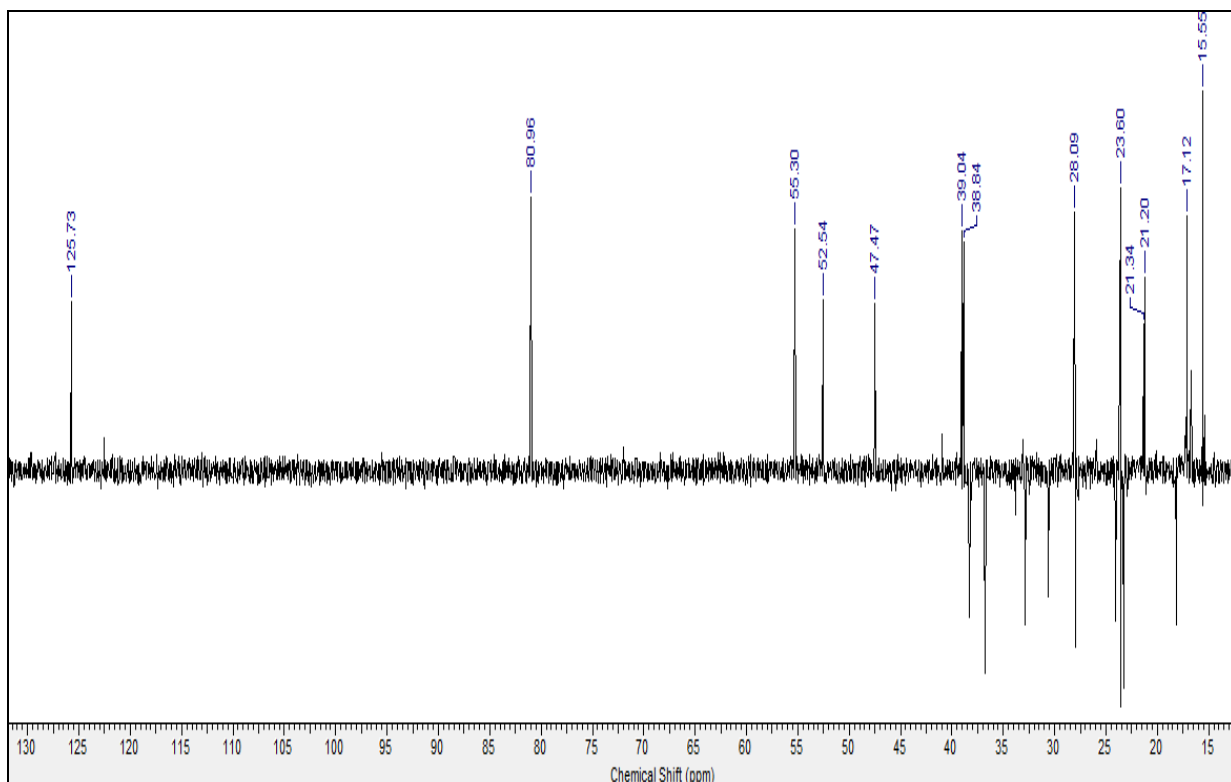


FIGURA 4.38 - Espectro de RMN de  $^{135}\text{DEPT}$  da substância **IX** (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

#### 4.5.3.2 - Elucidação estrutural do ácido *3-epi-ursólico* (**X**)

A substância **X** (Figura 4.39) foi isolada a partir da fração hexânica do caule de *M. lingua* (MLC1) e teve sua estrutura elucidada através de experimentos de RMN de  $^1\text{H}$ .

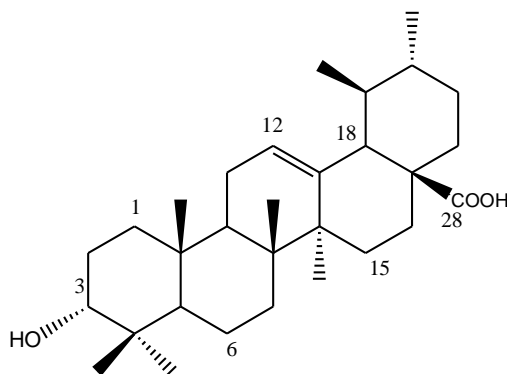


FIGURA 4.39 - Estrutura do ácido *3-epi-ursólico* (**X**).

Nota-se que a substância **X** apresenta grande semelhança estrutural com a substância **IX**, diferenciando-se apenas na posição C-3, onde há substituição do grupamento acetato pela hidroxila em axial (Figura 4.40).

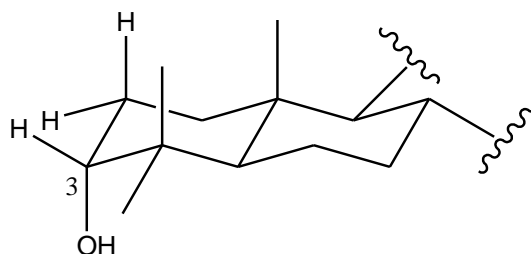


FIGURA 4.40 - Demonstração da hidroxila na posição axial.

Analisando o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **X** (Figura 4.42), observaram-se sinais entre  $\delta$  1,24-0,66 os quais podem ser atribuídos aos hidrogênios metílicos. Sinal em  $\delta$  5,25 (1H, *t*,  $J= 4$  Hz) relativo ao hidrogênio H-12 e em  $\delta$  3,40 (1H, *dd*,  $J= 4$  Hz) relativo ao hidrogênio H-3. Também se observa um duplete em  $\delta$  2,15 referente ao hidrogênio H-18 (1H, *d*,  $J= 11,0$  Hz). A constante de acoplamento referente ao hidrogênio H-3, em equatorial, se deve a correlação com o hidrogênio H-2 em axial e equatorial, e o valor desta constante depende diretamente do ângulo diedro.

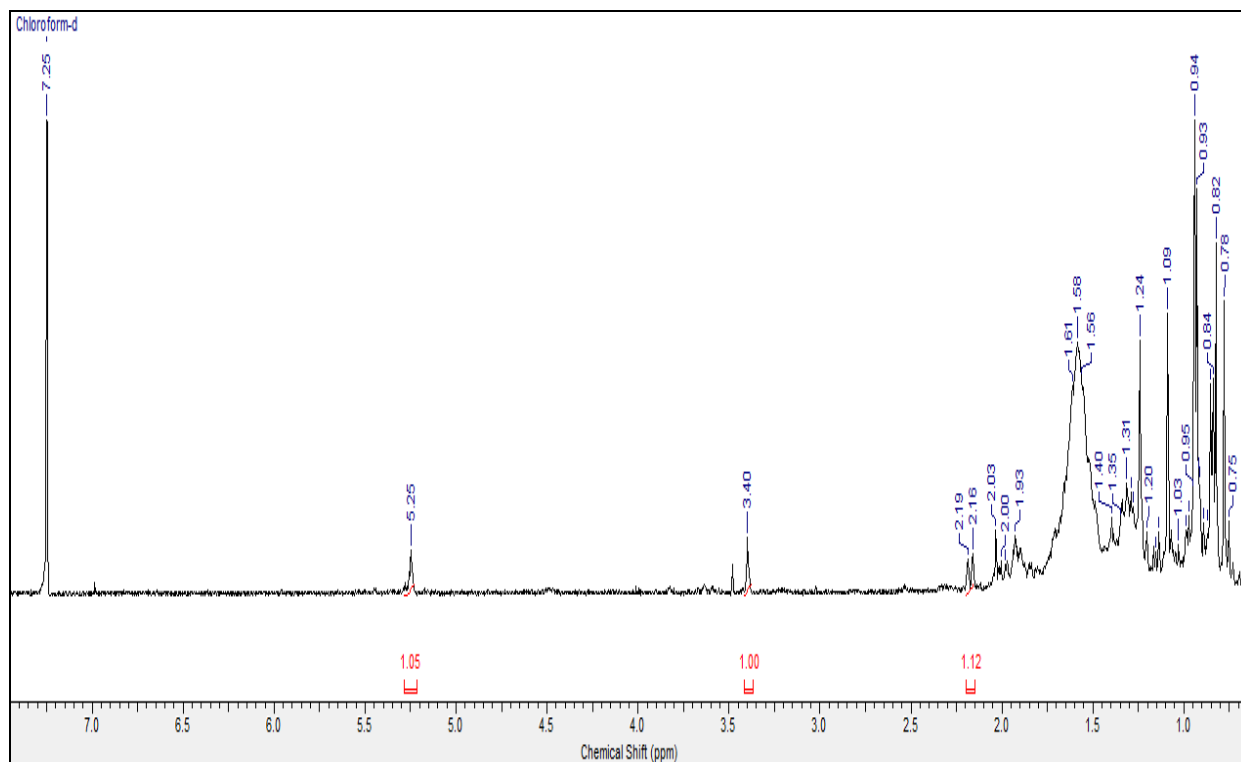


FIGURA 4.41 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **X** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

#### 4.5.3.3 - Elucidação estrutural da mistura dos ácidos ursólico e oleanólico (**XI**)

A mistura de ácidos ursólico e oleanólico (**XI**) (Figura 4.42) foi obtida a partir da fração hexânica do caule de *M. lingua* (MLC1) e a elucidação estrutural de ambos os compostos (ácido ursólico e oleanólico) foi realizada através de experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  e comparação com dados da literatura (GUVENALP et al., 2009).

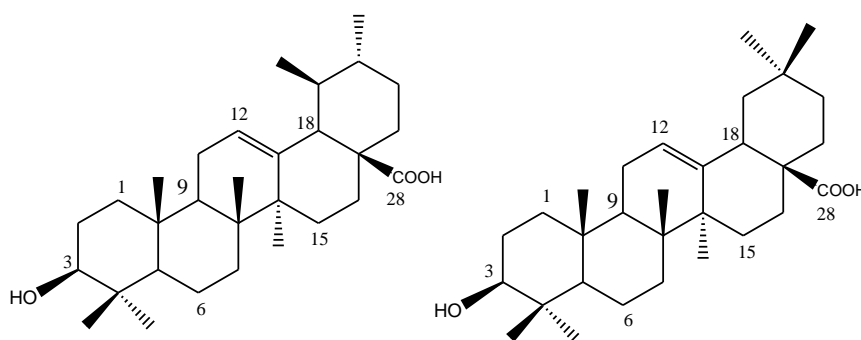


FIGURA 4.42 - Estrutura da mistura de ácidos ursólico e oleanólico (**XI**).



Ambos os compostos apresentam grande semelhança estrutural entre si, diferenciando-se apenas pela posição da metila na posição C-29, o que permite distinguir entre o esqueleto ursano e oleano. Analisando o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **XI** (Figura 4.43), observaram-se sinais na região entre  $\delta$  1,24-0,66 os quais podem ser atribuídos aos hidrogênios metílicos de ambos os compostos. Dois sinais em  $\delta$  5,24 (1H, *t*,  $J= 4$  Hz) e em  $\delta$  5,27 (1H, *t*,  $J= 4$  Hz) relativo ao hidrogênio H-12 do ácido ursólico e oleanólico, respectivamente. Um sinal em  $\delta$  3,20 integrando para dois hidrogênios (2H, *dd*,  $J= 12; 4$  Hz) relativo ao H-3 de ambos os compostos. Também se observou duplete em  $\delta$  2,16 referente ao hidrogênio H-18 (1H, *d*,  $J= 11$  Hz) do ácido ursólico e duplo duplete em  $\delta$  2,83 referente ao hidrogênio H-18 (1H, *dd*,  $J= 11; 4$  Hz) do ácido oleanólico.

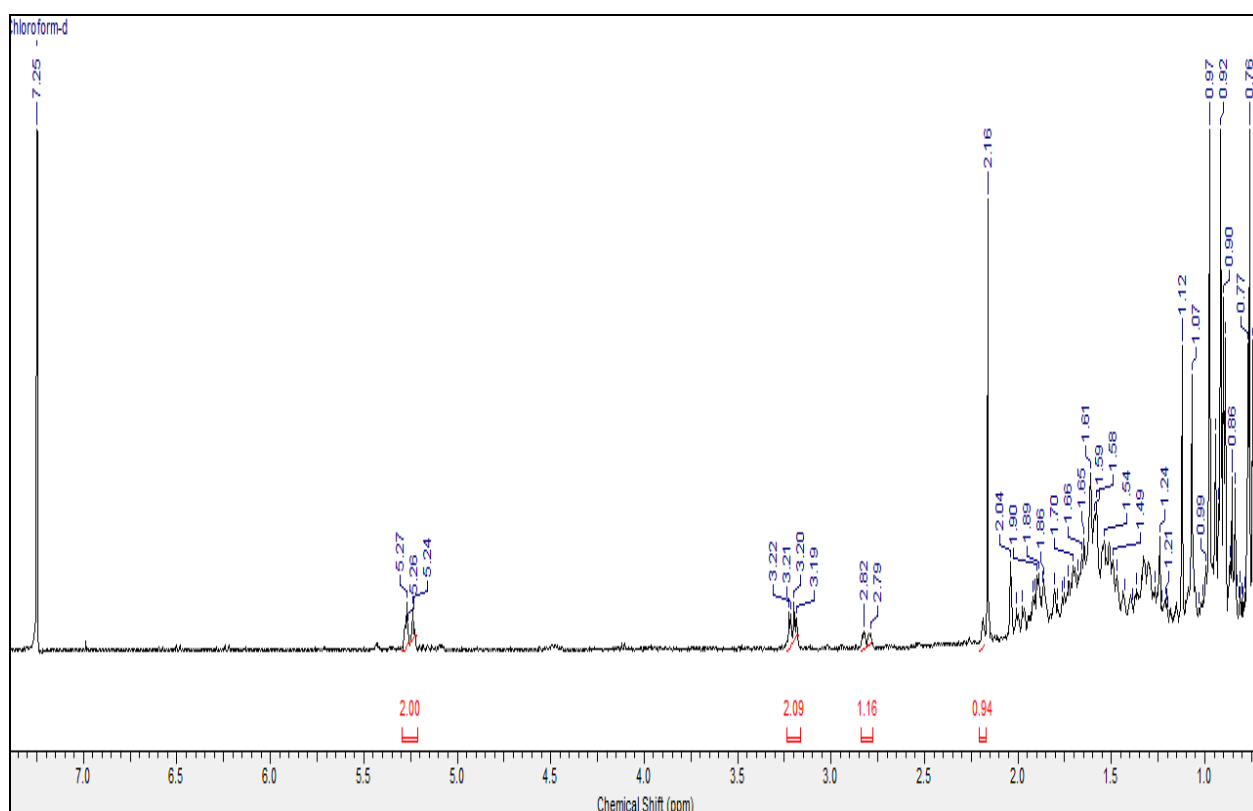


FIGURA 4.43 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **XI** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

A partir da análise dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 4.44) foi possível atribuir os carbonos referentes ao esqueleto ursano e oleano. Foram

observados sinais em  $\delta$  125,7 e 137,9 referentes aos carbonos C-12 e C-13 da dupla ligação do ácido ursólico, assim como sinais em  $\delta$  122,6 e 143,6 referente aos carbonos C-12 e C-13 do ácido oleanólico, confirmando assim a mistura dos compostos. Também foi observado sinal em  $\delta$  79,0 relativo ao carbono C-3, característico de carbono ligado a oxigênio.

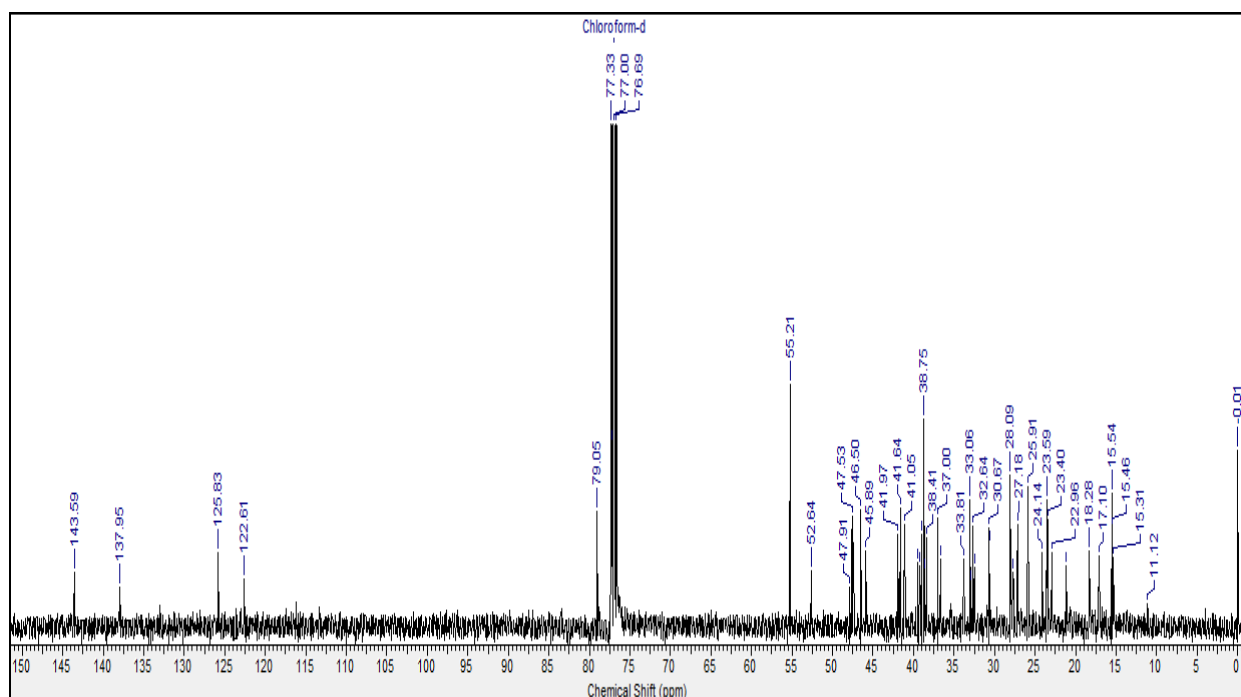


FIGURA 4.44 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **XI** (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

#### 4.5.3.4 - Elucidação estrutural do orselinato de metila (**XII**)

A substância **XII** (Figura 4.45) foi isolada da fração hexânica do caule de *M. lingua* (MLC1) e teve sua estrutura elucidada através de experimentos de RMN de uma e duas dimensões e também através de comparação com dados da literatura (HONGJUAN et al., 2007).

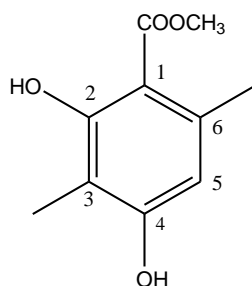


FIGURA 4.45 - Estrutura do orselinato de metila (**XII**).

Pela análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 4.46) observou-se um sinal em  $\delta$  12,02 (1H, *s*) referente ao hidrogênio quelado H-2 da hidroxila, e um sinal na região de aromáticos em  $\delta$  6,20 (1H, *s*) relativo ao hidrogênio H-5. Devido à presença de ligações intermoleculares ainda foi possível observar sinal em  $\delta$  5,03 (1H, *s*) referente ao hidrogênio da hidroxila na posição 4. Nota-se também um sinal referente ao grupamento metoxila em  $\delta$  3,91 e dois singletos em  $\delta$  2,09 (3H, *s*) e 2,45 (3H, *s*) integrando para três hidrogênios cada, cujo deslocamento é característico de grupamento metila ligado ao anel aromático (Tabela 4.13).

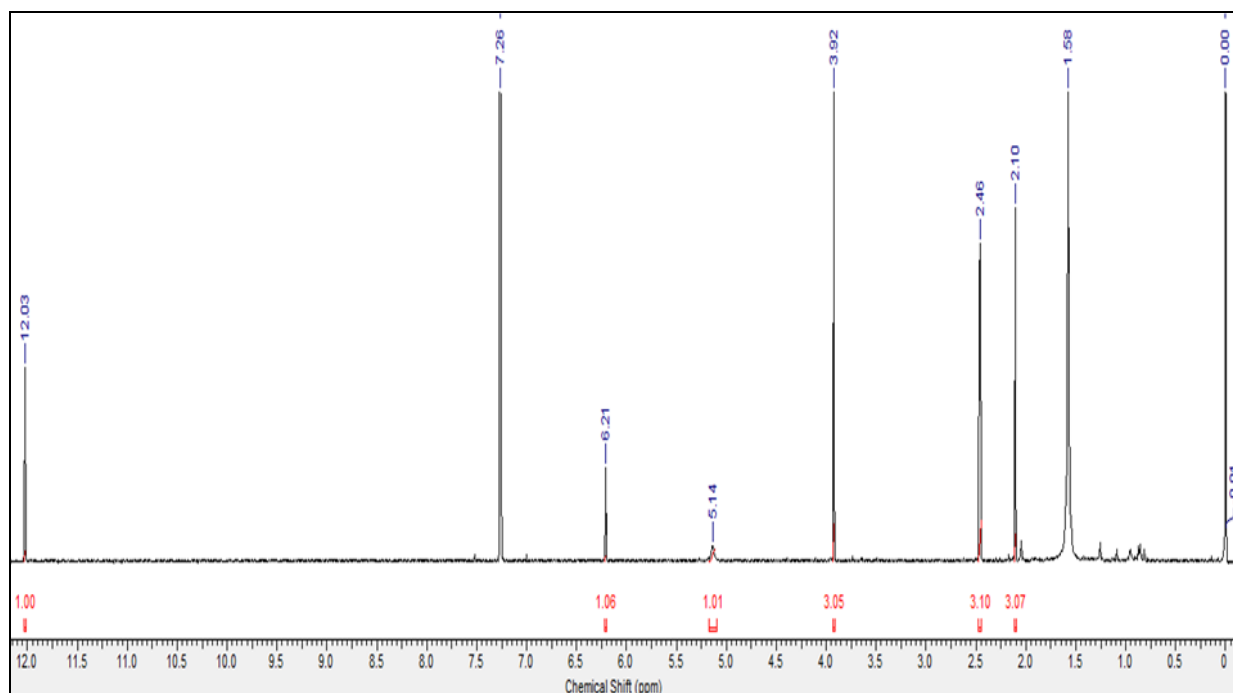


FIGURA 4.46 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **XII** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

TABELA 4.13 - Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e projeção de  $^{13}\text{C}$  do orselinato de metila (**XII**) e comparação com a literatura.

	Substância XII (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	Lit. <sup>a</sup> (600 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	Substância XII (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	Lit. <sup>a</sup> (150 MHz, $\text{CDCl}_3$ )
H/C	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)
1	-	-	105,0	105,2
2	12,02	12,05	158,1	158,0
3	-	-	108,3	108,5
$\text{CH}_3$ -3	2,09	2,10	7,4	7,62
4	5,03	5,34	163,4	163,1
5	6,20	6,21	110,5	110,5
6	-	-	140,0	140,1
$\text{CH}_3$ -6	2,45	2,45	23,8	24,07
C=O	-	-	172,5	172,6
$\text{OCH}_3$	3,91	3,92	52,0	51,8

<sup>a</sup>HONGJUAN et al., 2007.

A atribuição dos sinais de carbonos foi realizada a partir dos experimentos de HSQC e HMBC. Através das correlações observadas no HSQC (Figura 4.47), tem-se hidrogênio H-5 correlacionando com  $\delta$  110,5 (C-5), grupamento metoxila correlacionando com carbono  $\delta$  52,0, grupamento metila em  $\delta$  2,09 e  $\delta$  2,45 correlacionando com carbonos  $\delta$  7,4 e  $\delta$  23,8, respectivamente.

Através do mapa de correlações HMBC foi possível atribuir os sinais de carbono e hidrogênio (Figuras 4.48 e 4.49). Observa-se que o sinal referente ao hidrogênio aromático H-5 se correlaciona com os carbonos em  $\delta$  105,0; 108,3 e 23,8. O hidrogênio quelado H-2 se correlaciona com os carbonos em  $\delta$  105,0; 108,3 e 163,4. Os hidrogênios do grupo metoxila se correlacionam com o carbono carbonílico em  $\delta$  172,5. Observa-se que  $\text{CH}_3$ -6 se correlaciona com carbonos em  $\delta$  105,0; 140,0 e 110,5 e  $\text{CH}_3$ -3 correlaciona-se com outros três carbonos em  $\delta$  108,3; 158,1 e 163,4. Assim, foi possível estabelecer a posição dos substituintes e confirmar a estrutura da substância **XII** (Figura 4.45).

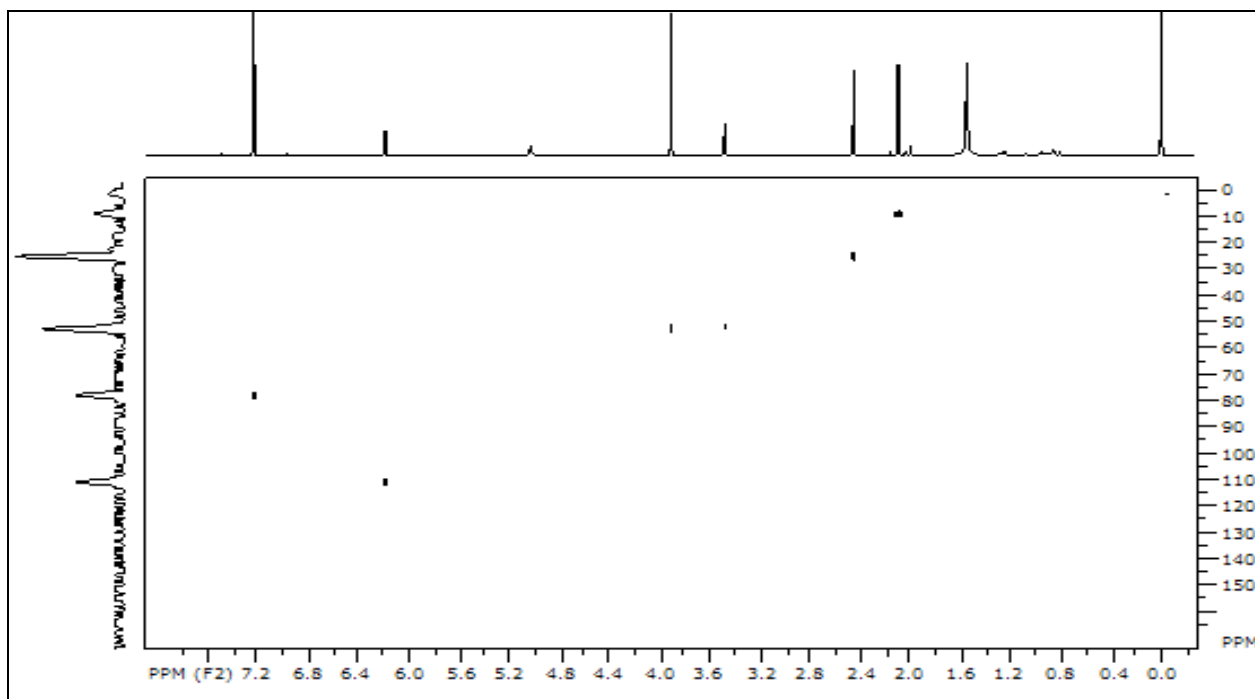


FIGURA 4.47 - Mapa de correlações HSQC da substância **XII** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

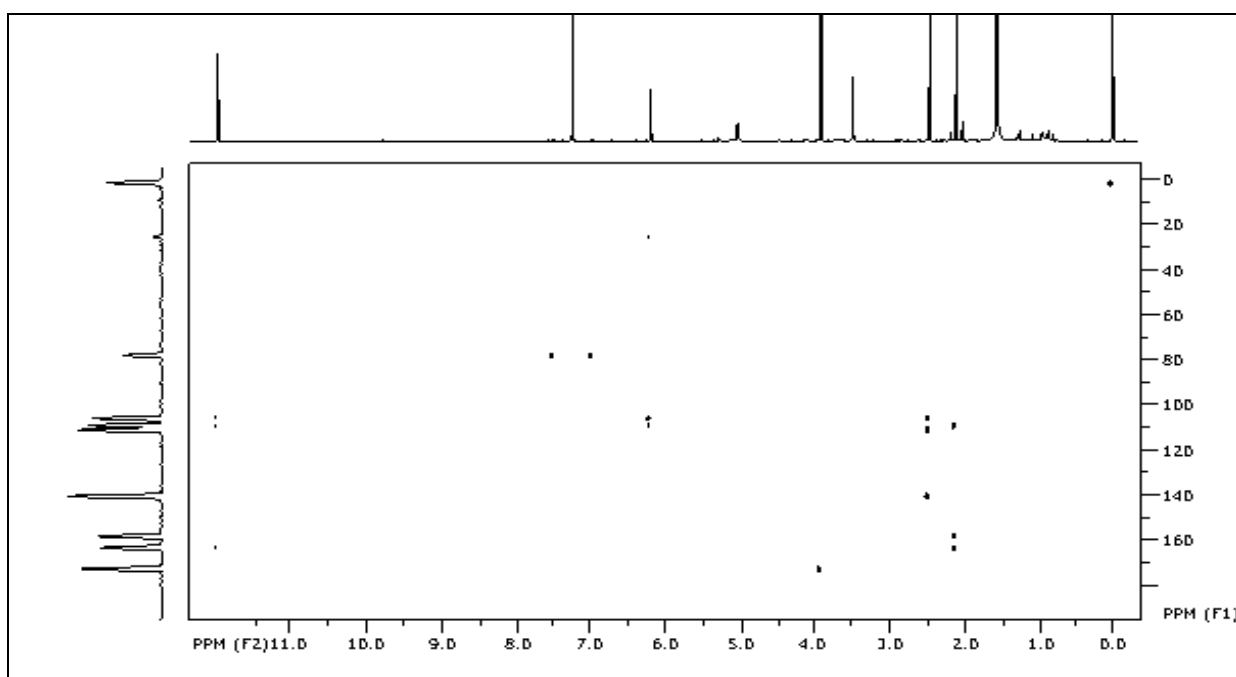


FIGURA 4.48 - Mapa de correlações HMBC da substância **XII** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

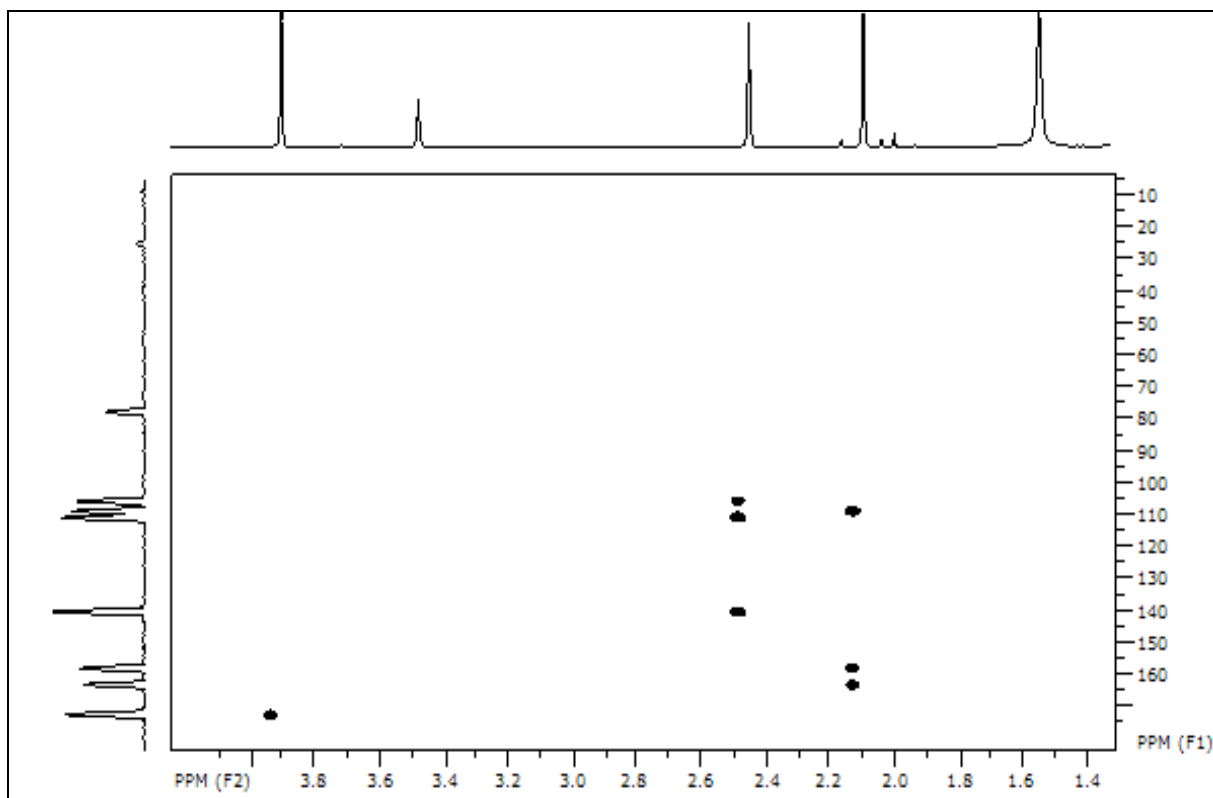


FIGURA 4.49 - Expansão do mapa de correlações HMBC da substância **XII** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

#### 4.5.3.5 - Elucidação estrutural do ácido ursólico (**XIII**)

A substância **XIII** (Figura 4.50) foi isolada da fração hexânica do caule de *M. lingua* (MLC1) e teve sua estrutura elucidada através de experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  e comparação com dados da literatura (GUVENALP et al., 2009).

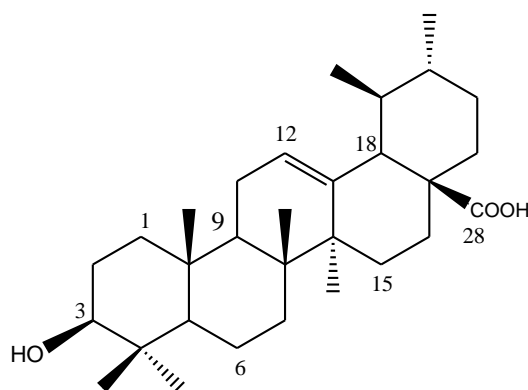


FIGURA 4.50 - Estrutura do ácido ursólico (**XIII**).

Nota-se semelhança entre a substância **XIII** e as substância **IX** e **X**, diferenciando-se apenas na posição C-3, onde há substituição do grupamento acetato pela hidroxila em equatorial (Figura 4.51).

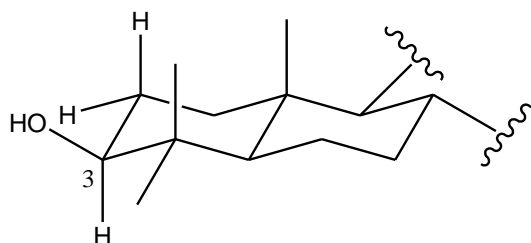


FIGURA 4.51 - Demonstração da hidroxila na posição equatorial.

Analisando o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **XIII** (Figura 4.52) observaram-se sinais entre  $\delta$  1,24-0,66, os quais podem ser atribuídos aos hidrogênios metílicos. Sinal em  $\delta$  5,25 (1H, *t*,  $J= 4$  Hz) relativo ao H-12 e em  $\delta$  3,20 (1H, *dd*,  $J= 12,0; 4,0$  Hz) relativo ao hidrogênio H-3. Também se observou um duplete em  $\delta$  2,15 referente ao H-18 (1H, *d*,  $J= 11,0$  Hz). A constante de acoplamento referente ao hidrogênio H-3, em axial, se deve a correlação com H-2 em axial e equatorial. Dessa forma, como foi mencionado anteriormente, o valor da constante de acoplamento entre hidrogênios adjacentes depende diretamente do ângulo diedro.

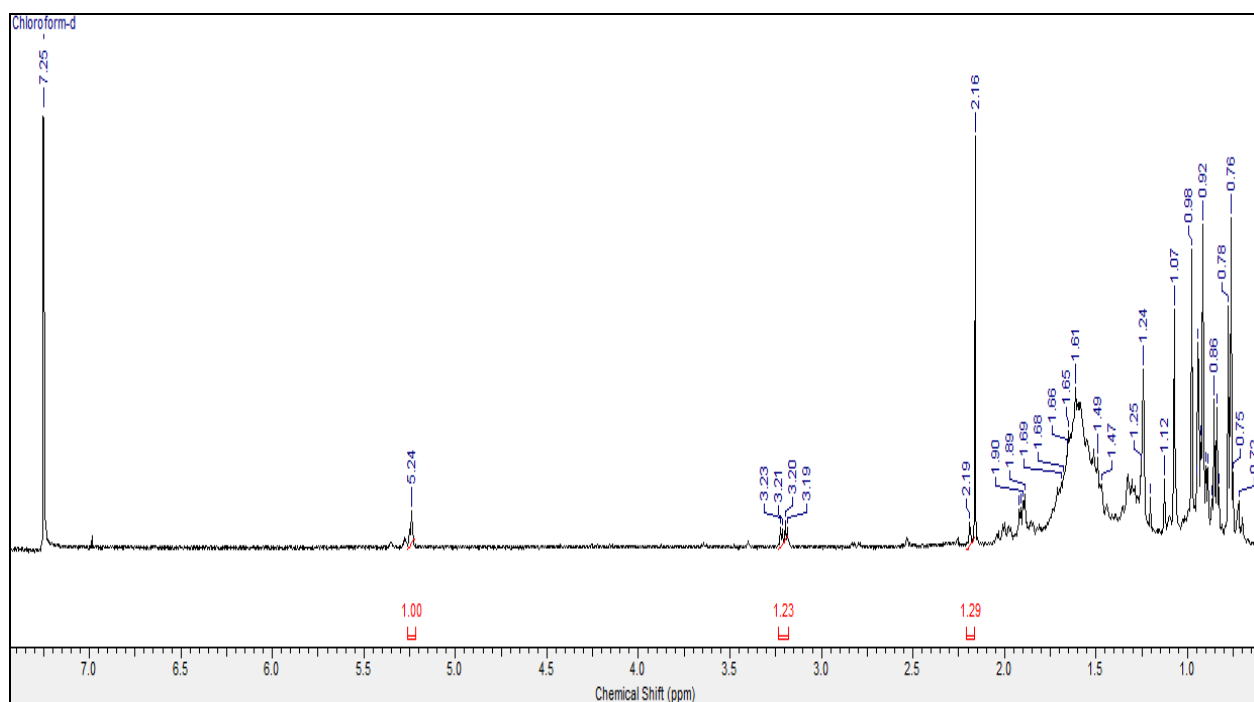


FIGURA 4.52 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **XIII** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

A partir da análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 4.53) e comparação com dados da literatura (Tabela 4.14), foi possível confirmar e atribuir os sinais de carbono característico do esqueleto ursano. Foram observados sinais em  $\delta$  125,8 e 137,9 referentes aos carbonos C-12 e C-13 da dupla ligação, respectivamente. Também foi observado sinal em  $\delta$  79,0 relativo ao carbono C-3, característico de carbono ligado a oxigênio.



TABELA 4.14 - Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  do ácido ursólico (**XIII**) e comparação com a literatura.

	<b>Substância XIII (100 MHz, <math>\text{CDCl}_3</math>)</b>	<b>Lit.<sup>a</sup> (100 MHz, <math>\text{CDCl}_3</math>)</b>
$^{13}\text{C}$	$\delta$ (ppm)	$\delta$ (ppm)
1	39,0	39,2
2	28,0	27,5
3	79,0	78,5
4	38,5	38,7
5	55,2	55,5
6	18,3	18,3
7	32,9	33,1
8	39,4	39,6
9	47,8	47,8
10	36,7	36,9
11	17,0	16,6
12	125,8	125,7
13	137,9	138,4
14	41,9	41,7
15	30,4	29,5
16	24,1	24,1
17	47,5	47,7
18	52,6	53,1
19	38,8	39,2
20	38,7	39,2
21	30,6	30,5
22	36,9	36,9
23	28,1	28,0
24	15,5	15,2
25	15,4	14,8
26	16,9	16,4
27	23,5	23,1
28	NI	180,4
29	23,2	22,9
30	21,2	22,8

<sup>a</sup>GUVENALP et al., 2012. NI= não identificado.

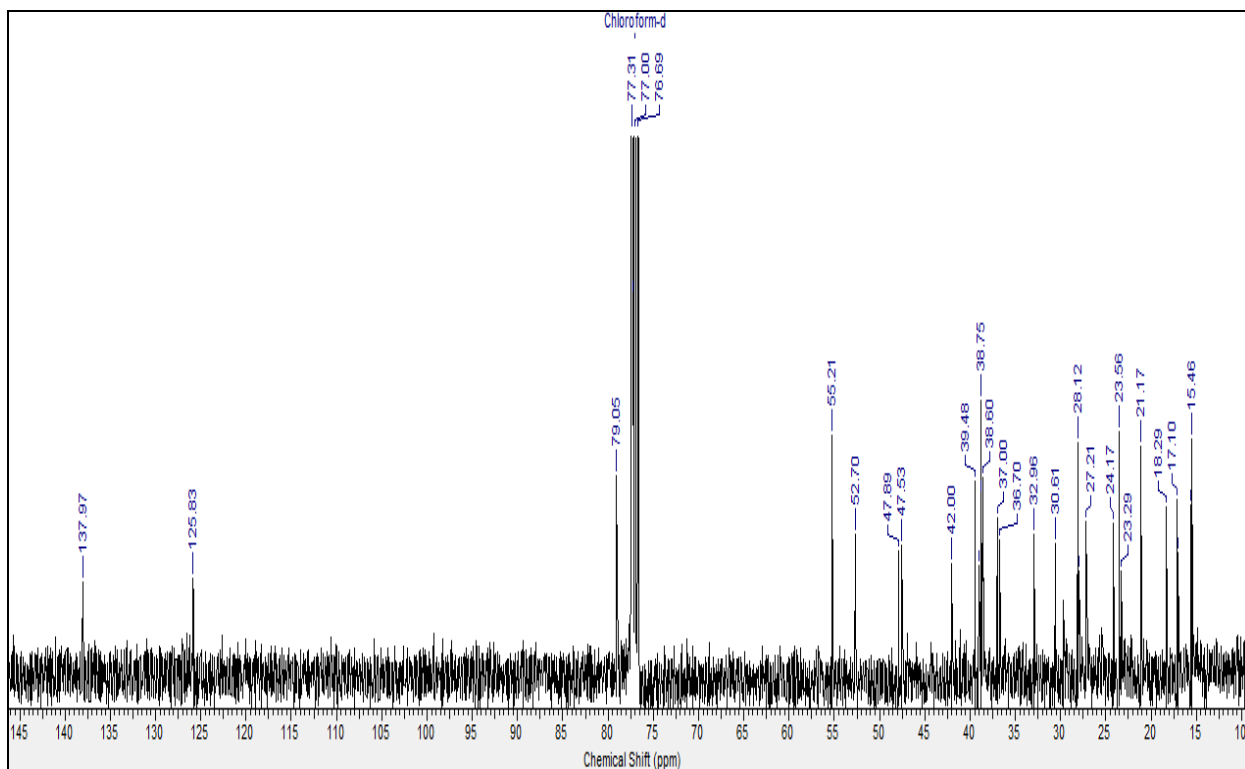


FIGURA 4.53 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **XIII** (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

## 4.5.4 - Modificações estruturais

### 4.5.4.1 - Reação de hidrogenação da mistura I para obtenção da substância XIV

Devido às dificuldades inerentes ao processo de separação da mistura de ácidos anacárdicos insaturados por ser composta de substâncias similares entre si e com o objetivo principal de se avaliar a interferência das duplas ligações na cadeia alquílica sobre a inibição enzimática, optou-se pela reação de hidrogenação catalítica (Figura 4.54). A reação foi realizada utilizando 41 mg do material de partida, paládio/carvão ativo como catalisador e atmosfera de hidrogênio.

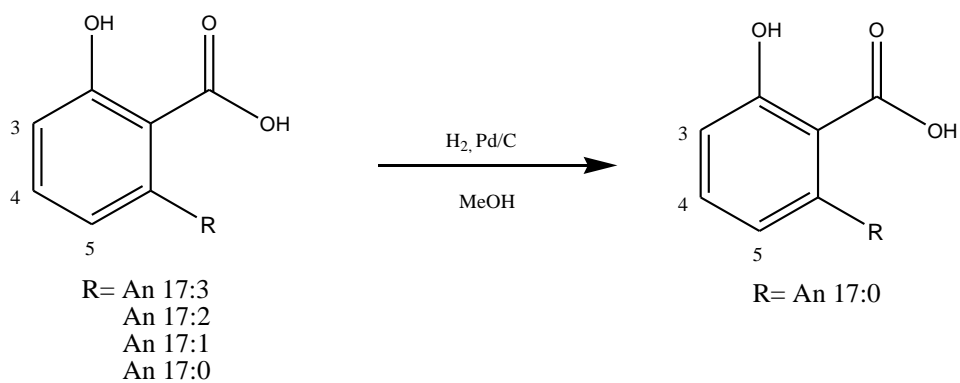


FIGURA 4.54 - Reação de hidrogenação.

Ao final do processo a mistura de ácidos anacárdicos foi convertida em uma substância pura, e obteve-se assim o ácido anacárdico completamente saturado (sólido amarelado) que foi identificado como substância **XIV** (29,1 mg) (Figura 4.55).

A análise de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 4.56) da substância **XIV** revela a completa redução das duplas ligações pela ausência de sinais referentes aos hidrogênios olefínicos na região entre  $\delta$  5,00 e  $\delta$  5,50 e aos hidrogênios alílicos na região de  $\delta$  1,80 a  $\delta$  2,80.

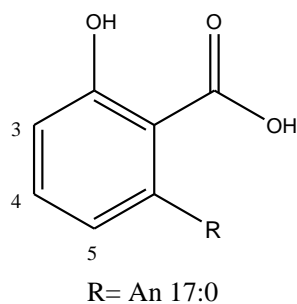


FIGURA 4.55 - Estrutura do ácido anacárdico saturado (**XIV**).

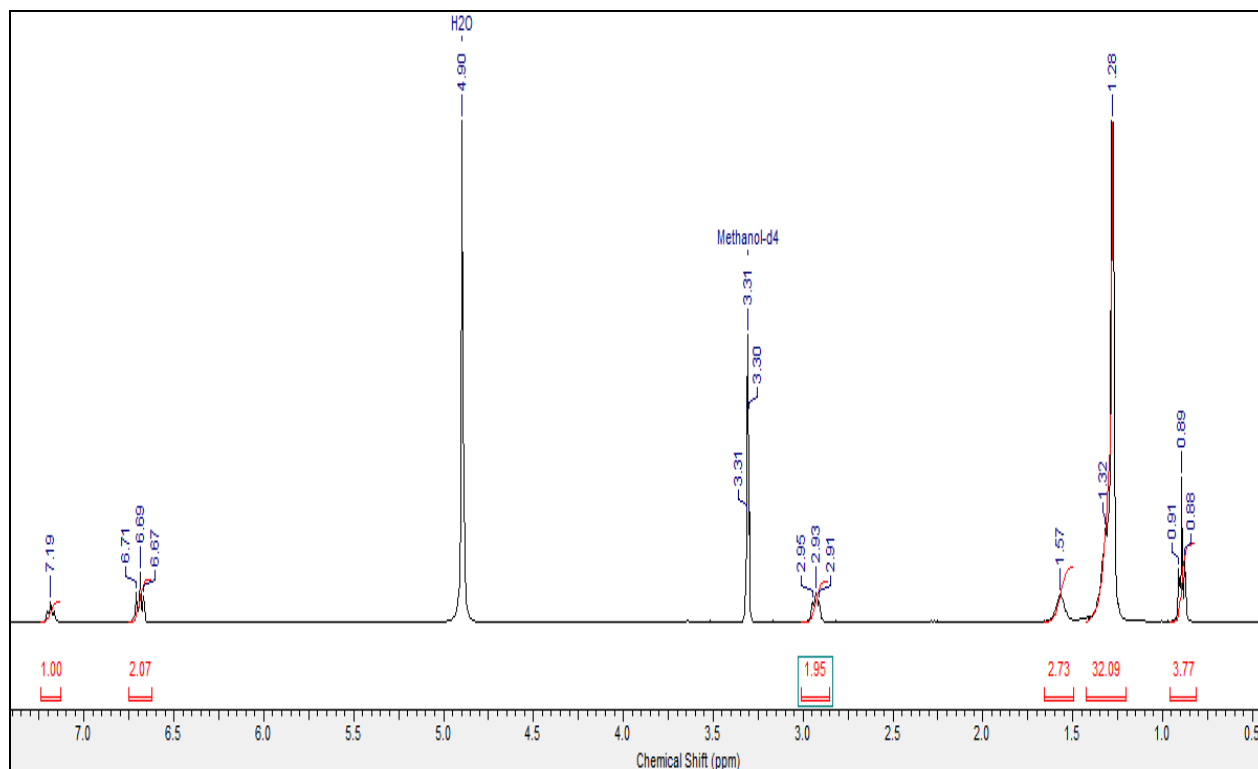


FIGURA 4.56 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **XIV** (400 MHz, MeOH- $d_4$ ).

#### 4.5.4.2 - Reação de hidrólise da substância **VI** para obtenção da substância **XV**

Com o objetivo de avaliar a contribuição dos açúcares na posição C-3 do flavonoide sobre a atividade inibitória nas CTSB e CTSL, a substância **VI** previamente caracterizada como miricetina 3-*O*- $\alpha$ -ramnosídeo (Figura 4.21), foi submetida à reação de hidrólise para obtenção da respectiva aglicona. A miricetina (**XV**) (Figura 4.57) foi obtida com rendimento de 93 % e teve sua estrutura elucidada através de experimentos de RMN de  $^1\text{H}$ .

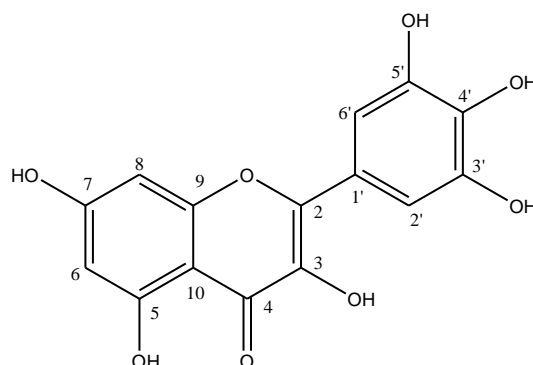


FIGURA 4.57 - Estrutura da miricetina (**XV**).

A análise de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 4.58) revela os sinais de hidrogênios referentes à aglicona, assim como ausência dos sinais referente à unidade de rhamnose que foi completamente removida durante a reação de hidrólise.

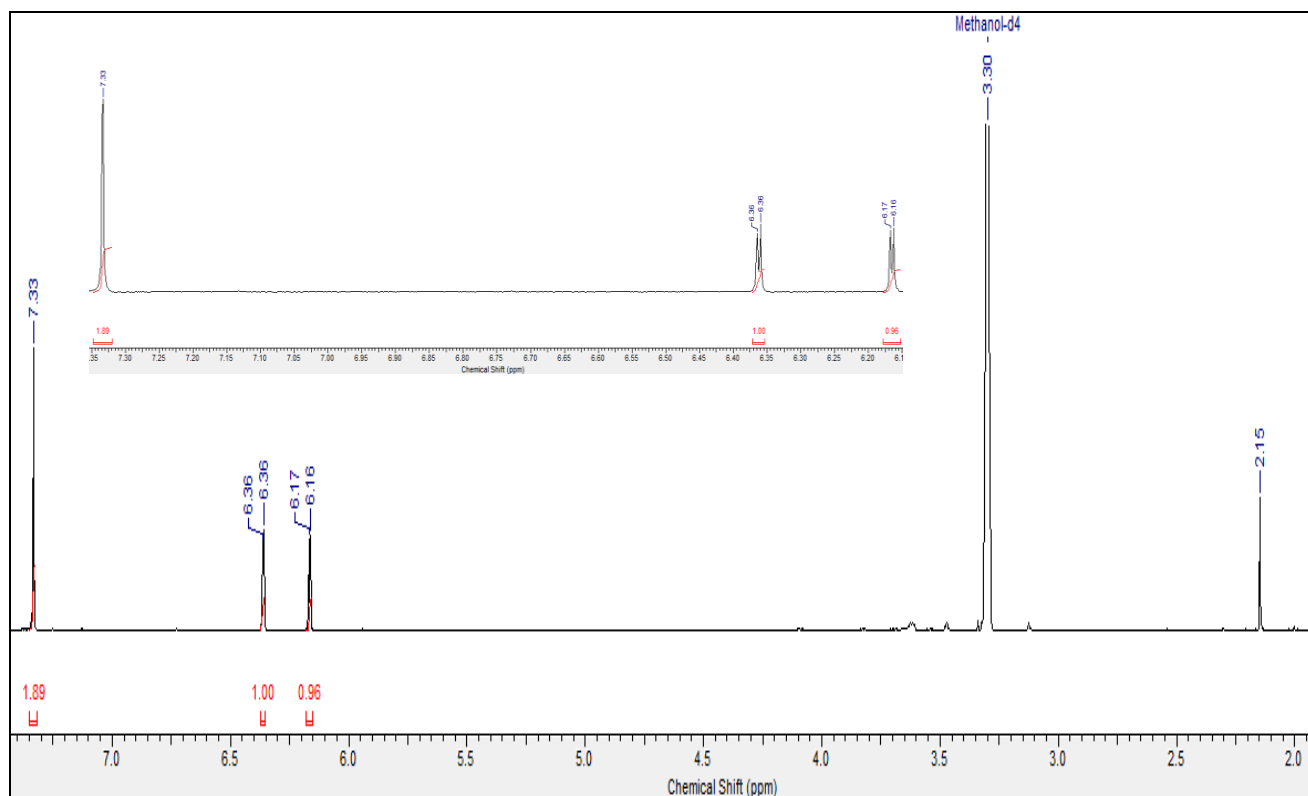


FIGURA 4.58 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **XV** (400 MHz, MeOH- $d_4$ ).

#### 4.5.4.3 - Reação de metilação da quercetina (**I-PN**) para obtenção das substâncias **XVI**, **XVII** e **XVIII**.

Com o objetivo de se avaliar a contribuição das metoxilas sobre a atividade enzimática, o flavonoide quercetina (**I-PN**) obtido comercialmente da Sigma Aldrich foi submetido à reação de metilação com diazometano. Por se tratar de um composto poliidroxilado, os três derivados **XVI** (Figura 4.59), **XVII** (Figura 4.62) e **XVIII** (Figura 4.65) obtidos apresentaram quantidades variadas de metoxilas e em diferentes posições como descrito a seguir. A fim de

facilitar o entendimento, os dados espectroscópicos obtidos de cada composto serão discutidos separadamente.

Analisando o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da 3,7,3'-*O*-metil quercetina (substância **XVI**) (Figura 4.60), observou-se que os sinais referentes aos hidrogênios do anel A e B característicos da quercetina foram mantidos. Foram observados sinais correspondentes aos hidrogênios do anel A em  $\delta$  6,72 (*d*,  $J=2,0$  Hz) correspondente ao H-8 e em  $\delta$  6,35 (*d*,  $J=2,0$  Hz) correspondente ao H-6. No anel B há sinais referentes ao sistema de substituição 3', 4' com sinal em  $\delta$  7,73 (*d*,  $J=2,0$  Hz) referente ao hidrogênio H-2'; em  $\delta$  7,69 (*dd*,  $J=2,0; 8,0$  Hz) referente ao H-6' e em  $\delta$  7,17 (*d*,  $J=8,0$  Hz) referente ao H-5'. Entretanto nota-se a presença de 3 novas metoxilas entre  $\delta$  3,50 e 4,50 obtidas após reação com diazometano.

Através do mapa de HMBC (Figura 4.61) foi possível estabelecer a posição de cada uma das 3 metoxilas presentes no flavonoide. Foi observada a correlação do sinal de hidrogênio em  $\delta$  3,91 (-OCH<sub>3</sub>) com o carbono em  $\delta$  139,7 atribuído ao carbono C-3. Nota-se também a correlação do sinal do hidrogênio em  $\delta$  3,95 (-OCH<sub>3</sub>) com carbono C-7 ( $\delta$  166,7) e correlação do sinal do hidrogênio em  $\delta$  3,97 com carbono C-3' ( $\delta$  150,0) que se correlaciona com hidrogênio H-5' ( $\delta$  7,17).

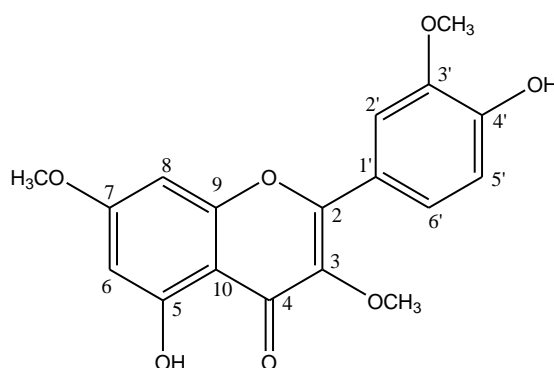


FIGURA 4.59 - Estrutura da 3,7,3'-*O*-metil quercetina (**XVI**).

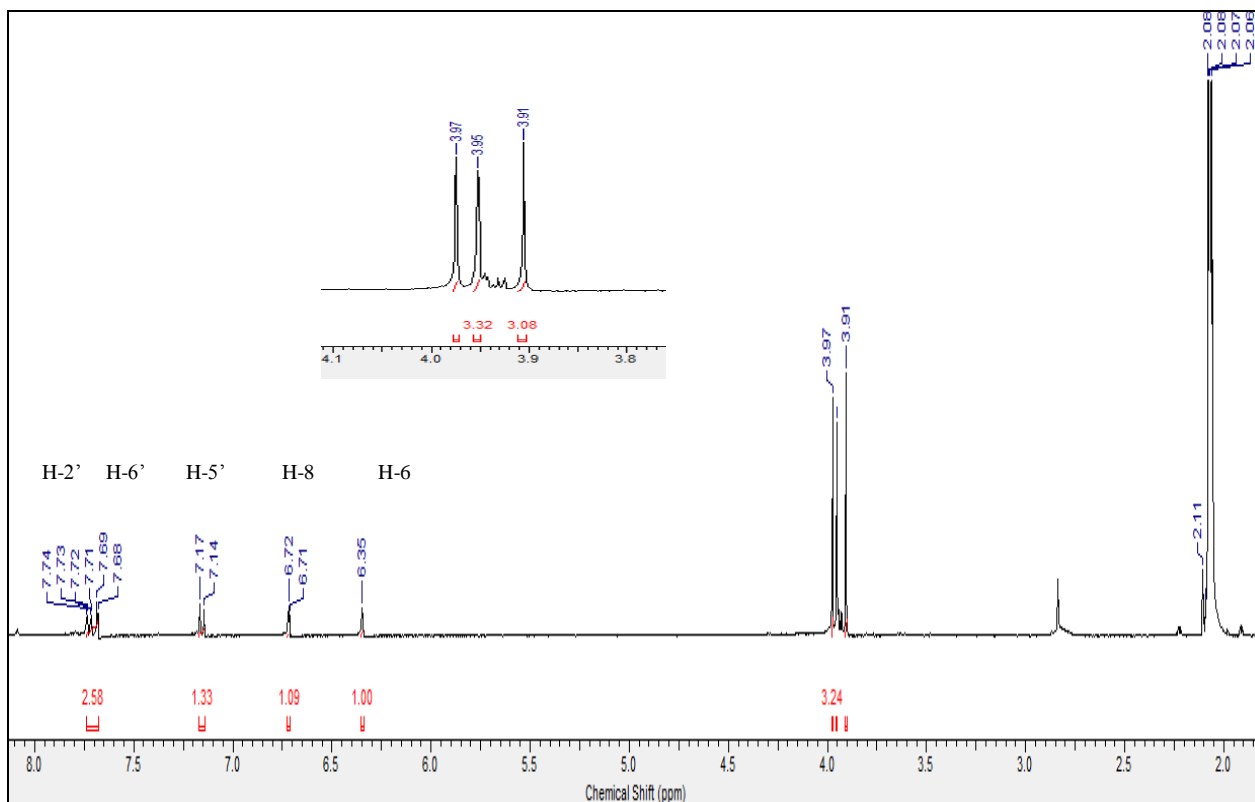


FIGURA 4.60 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **XVI** (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ).

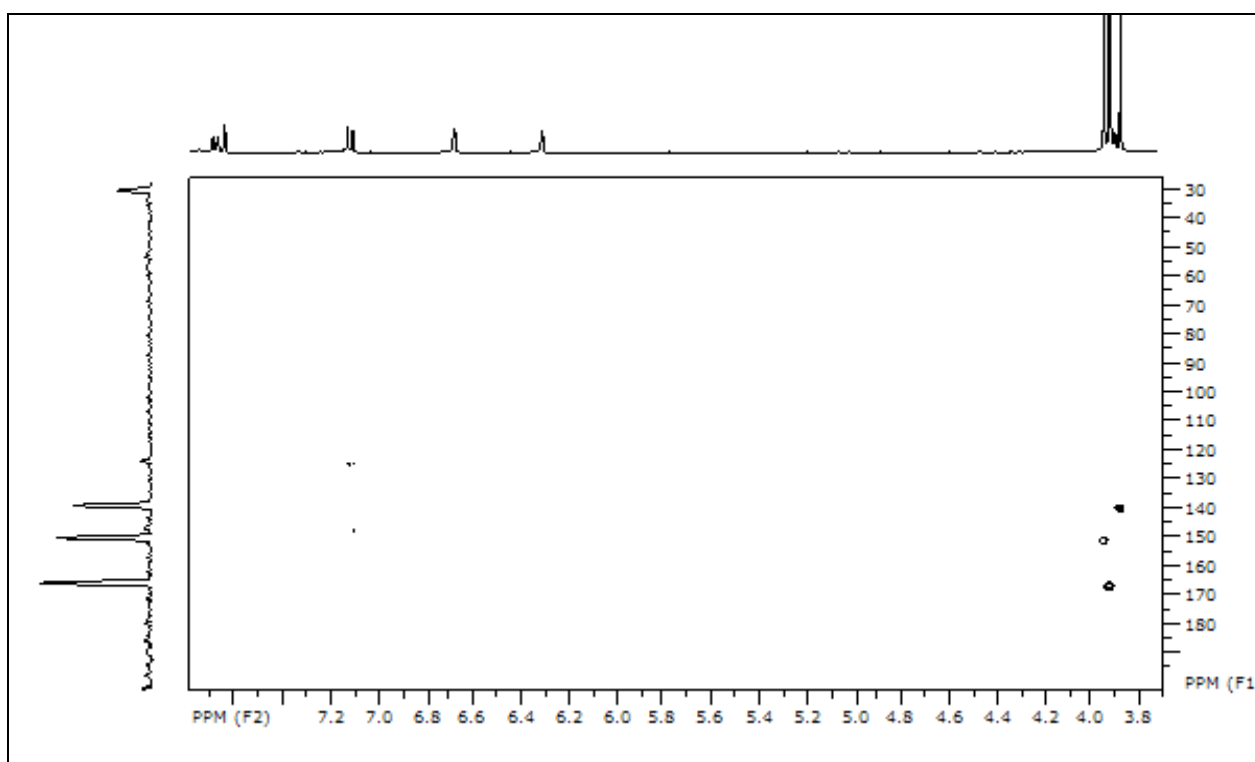


FIGURA 4.61 - Mapa de correlações HMBC da substância **XVI** (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ).

A seguir encontra a elucidação do flavonoide 3,7,3',4'-*O* metil quercetina (Figura 4.62).

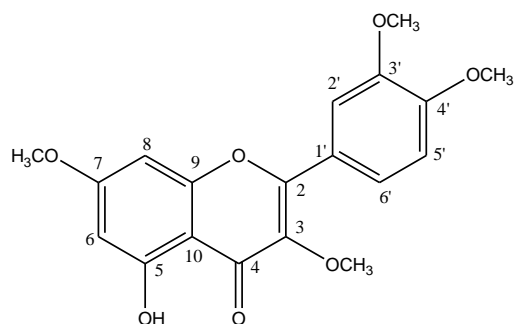


FIGURA 4.62 - Estrutura da 3,7,3',4'-*O* metil quercetina (**XVII**).

Através do mapa de HMBC (Figura 4.64) foi possível estabelecer a posição das 4 metoxilas presentes na 3,7,3',4'-*O* metil quercetina (Figura 4.62). Correlação do sinal de hidrogênio em  $\delta$  3,92 (-OCH<sub>3</sub>) com carbono C-3 em  $\delta$  139,7. Também foi possível estabelecer correlação do sinal de hidrogênio  $\delta$  3,93 (-OCH<sub>3</sub>) com carbono C-3' em  $\delta$  150,0 que por sua vez também se correlaciona com sinal dos hidrogênios H-2' ( $\delta$  7,80) e H-5' ( $\delta$  7,17). Estabeleceu-se correlação do sinal de hidrogênio em  $\delta$  3,93 (-OCH<sub>3</sub>) com carbono C-4' em  $\delta$  153,0 e que também está correlacionado com hidrogênios H-2' ( $\delta$  7,80) e H-6' (7,78). A presença da quarta metoxila na posição C-7 foi confirmada através da correlação do sinal de hidrogênio  $\delta$  3,94 (-OCH<sub>3</sub>) com carbono C-7 em  $\delta$  166,7 que também se correlaciona com sinal dos hidrogênios H-6 ( $\delta$  6,34) e H-8 ( $\delta$  6,69).

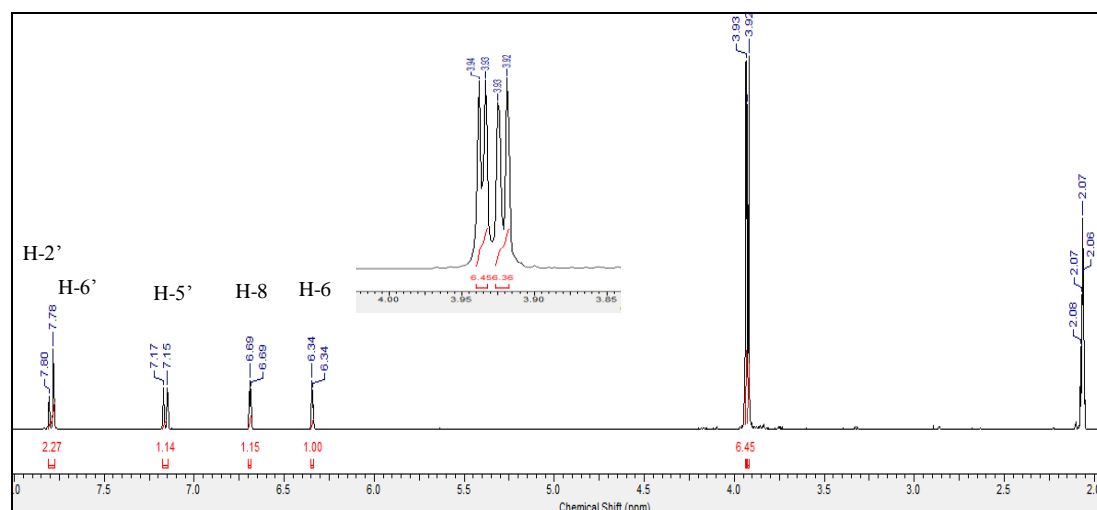


FIGURA 4.63 - Espectro de RMN de <sup>1</sup>H da substância **XVII** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>).



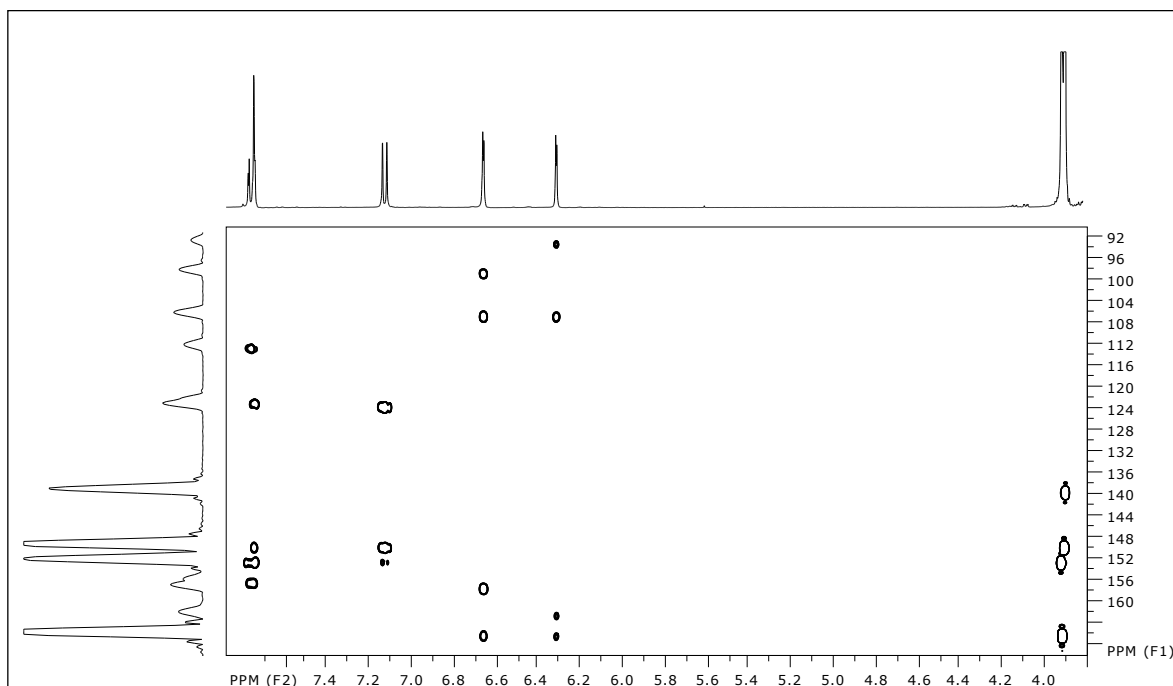


FIGURA 4.64 - Mapa de correlações HMBC da substância **XVII** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>).

A elucidação do flavonoide 3,5,7,3',4'-*O* metil quercetina, substância **XVIII** (Figura 4.65), foi realizada através o mapa de correlações HBMC (Figura 4.7). Foi observada correlação do sinal de hidrogênio em  $\delta$  3,86 (-OCH<sub>3</sub>) com carbono C-3 em  $\delta$  141,5. Também foi possível estabelecer correlação do sinal de hidrogênio em  $\delta$  3,92 (-OCH<sub>3</sub>) com carbono C-3' em  $\delta$  150,3 que por sua vez também se correlaciona com sinal dos hidrogênios H-2' ( $\delta$  7,76) e H-5' ( $\delta$  7,14). Estabeleceu-se correlação do sinal de hidrogênio em  $\delta$  3,92 (-OCH<sub>3</sub>) com carbono C-4' em  $\delta$  153,1 e que também está correlacionado com hidrogênios H-2' ( $\delta$  7,76) e H-6' ( $\delta$  7,73). Estabeleceu-se posição da quarta metoxila através da correlação do sinal de hidrogênio  $\delta$  3,92 (-OCH<sub>3</sub>) com carbono C-5 em 162,3 que por sua vez está correlacionado com sinal do hidrogênio H-8 ( $\delta$  6,75). A presença da quinta metoxila na posição C-7 foi confirmada através da correlação do sinal de hidrogênio em  $\delta$  3,95 (-OCH<sub>3</sub>) com carbono C-7 em  $\delta$  165,8 que também se correlaciona com sinal dos hidrogênios H-6 ( $\delta$  6,48) e H-8 ( $\delta$  6,75).

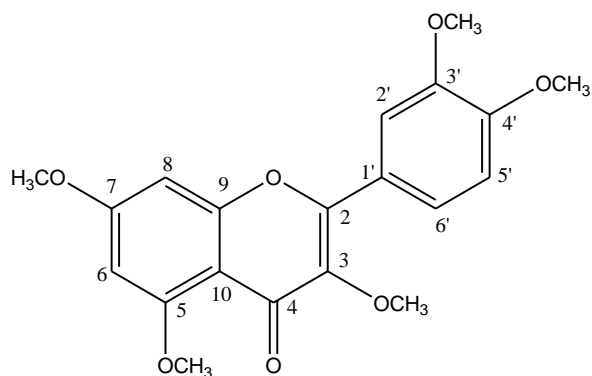


FIGURA 4.65 - Estrutura da 3,5,7,3',4'-*O* metil quercetina (**XVIII**).

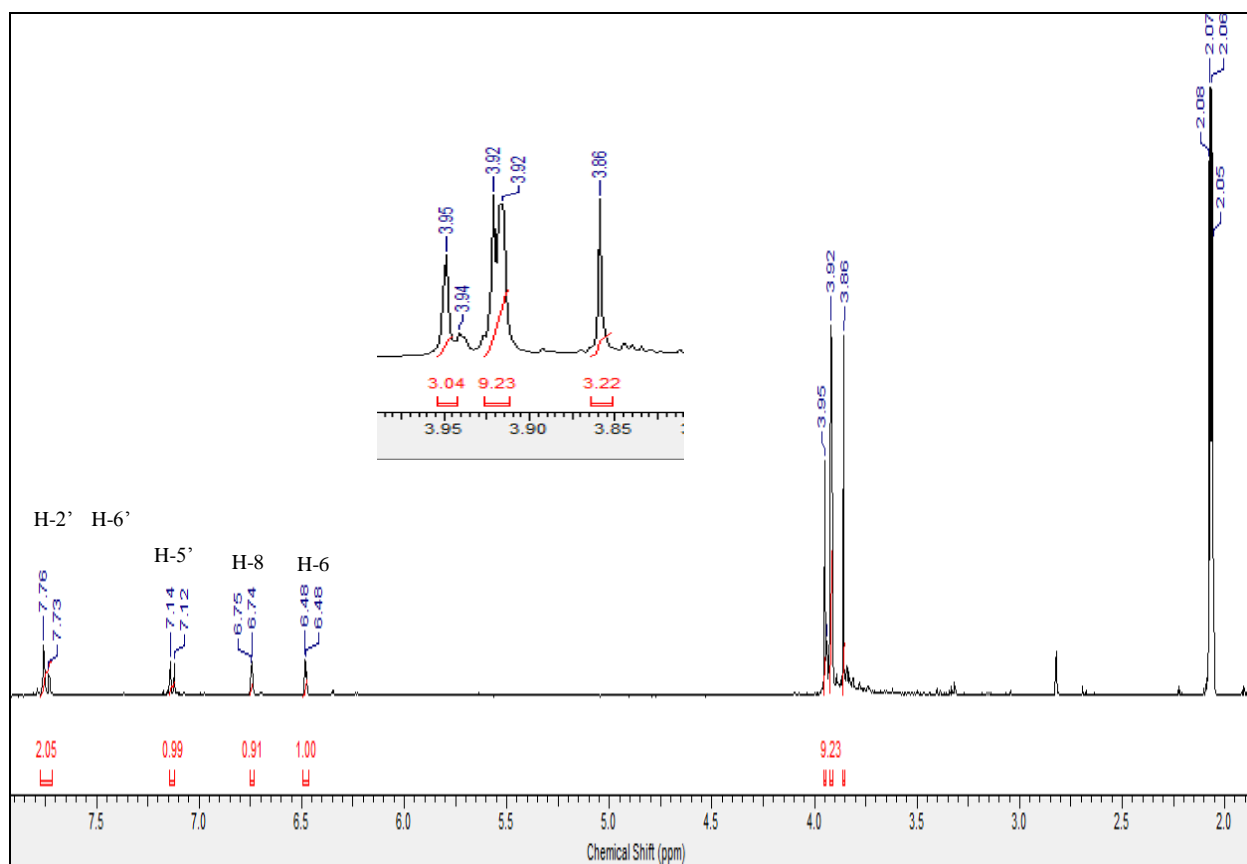


FIGURA 4.66 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **XVIII** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>).

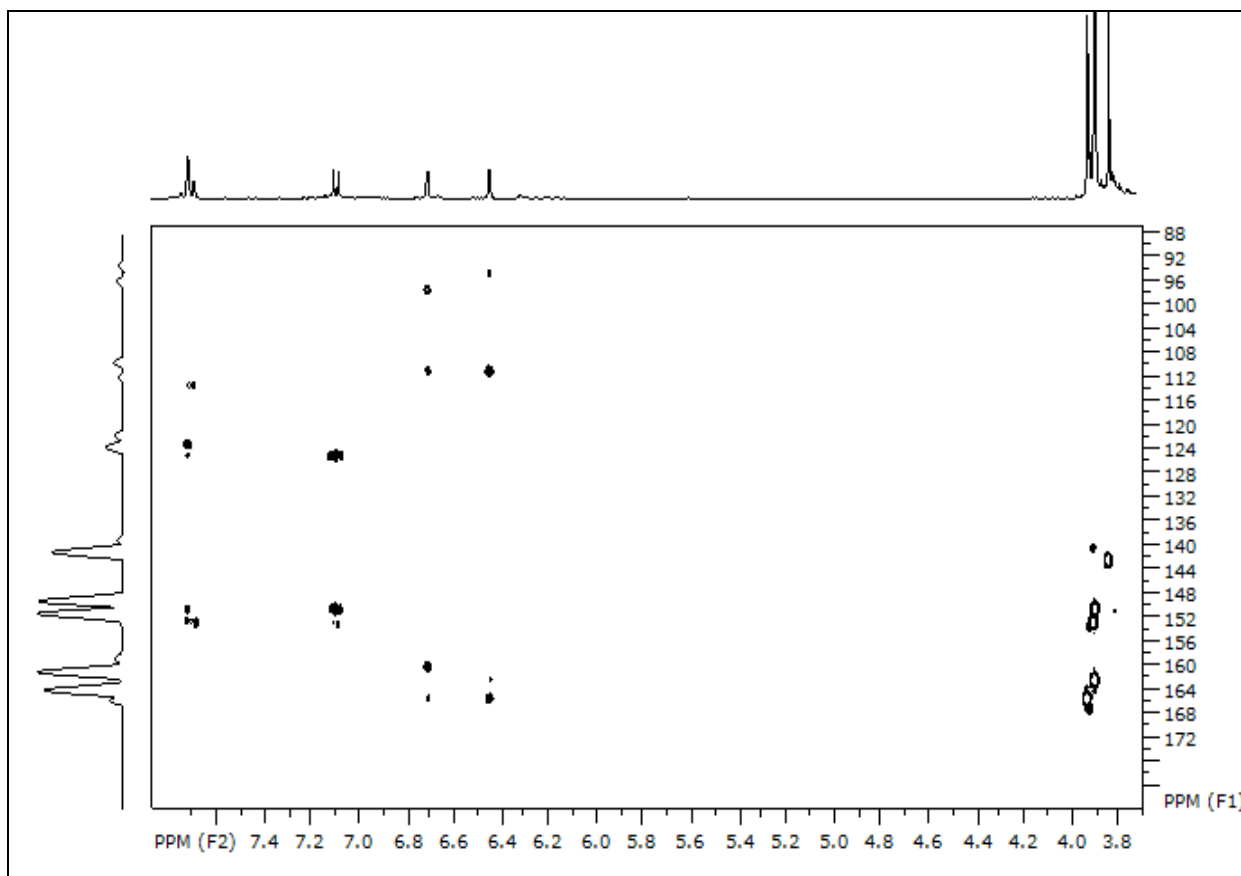


FIGURA 4.67 - Mapa de correlações HMBC da substância XVIII (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>).

#### 4.5.4.4 - Reação de metilação da substância IX para obtenção da substância XIX.

A substância XIX, identificada com 3-*O*-acetil-ursolato de metila (Figura 4.68) foi obtida a partir da reação de metilação com diazometano da substância IX (Figura 4.35), com rendimento de 90 % e teve sua estrutura elucidada através de experimentos de RMN de <sup>1</sup>H. Esta reação permitiu avaliar a importância do grupamento ácido carboxílico (posição C-28) sobre as proteases estudadas.

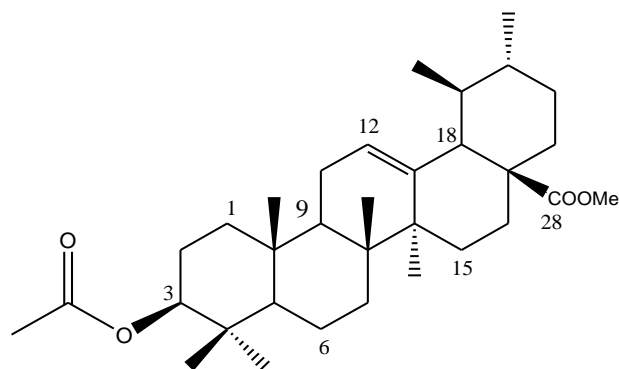


FIGURA 4.68 - Estrutura da 3-*O*-acetil-ursolato de metila (**XIX**).

Analisando o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **XIX** (Figura 4.69), observou-se que os sinais presentes no espectro de hidrogênio da substância **IX** (Figura 4.35 e 4.36) foram mantidos, havendo modificação somente pela presença de um simpleto em  $\delta$  3,59 integrando para três hidrogênios, referente ao sinal da metoxila.

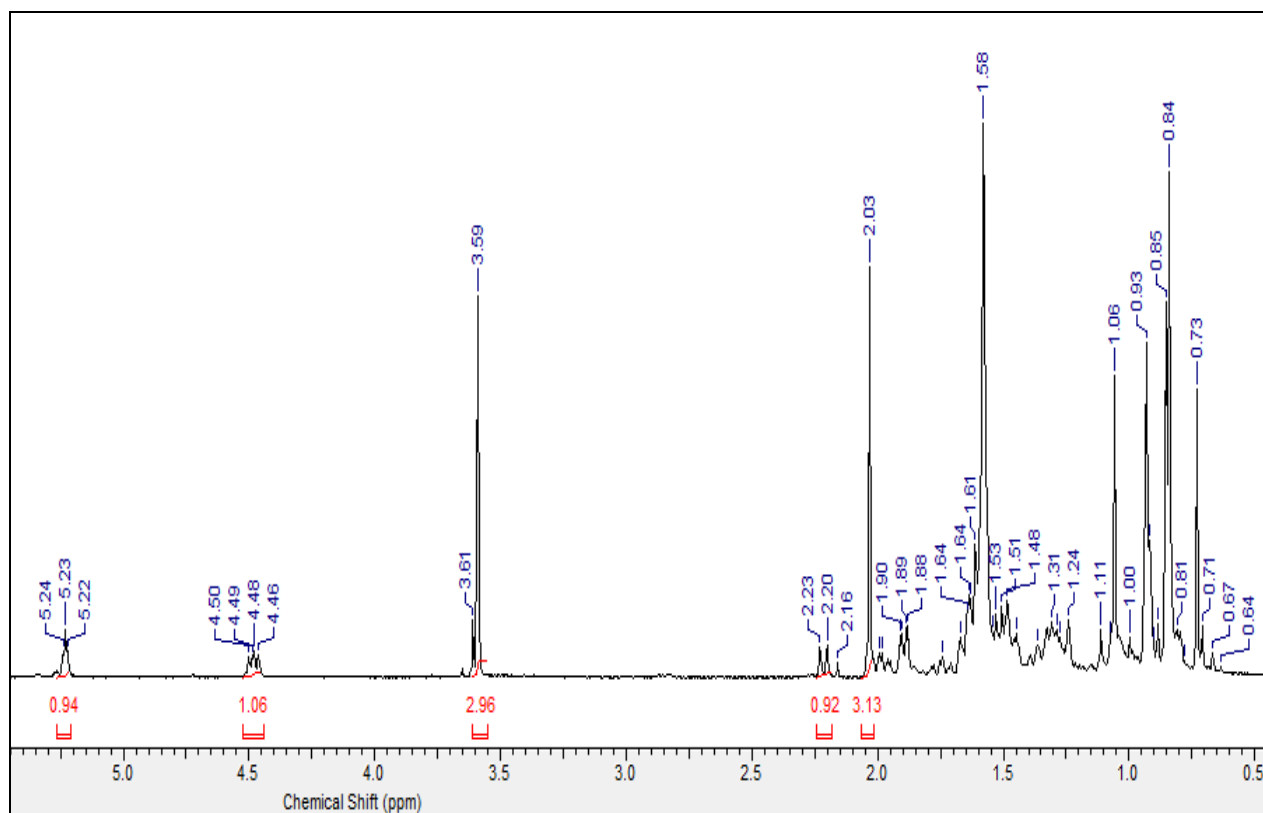


FIGURA 4.69 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **XIX** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

#### 4.5.4.5 - Reação de oxidação de III-SA para obtenção da substância XX

Com o objetivo de observar a contribuição do grupamento hidroxila na posição C-3 do esqueleto triterpênico, procedeu-se a reação de oxidação para obtenção do ácido-3-oxo-oleanólico (**XX**) (Figura 4.70) que teve sua estrutura elucidada através de experimento de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 4.71). O material de partida utilizado, ácido oleanólico (**III-SA**), é comercialmente disponível e foi obtido da Sigma Aldrich. Optou-se por adquirir comercialmente o ácido oleanólico para realização das reações e ensaios subsequentes, uma vez que esta substância havia sido isolada somente em mistura com ácido ursólico (Figuras 4.42 e 4.43) em pequena quantidade impossibilitando assim uma investigação mais detalhada da potência sobre as enzimas estudadas.

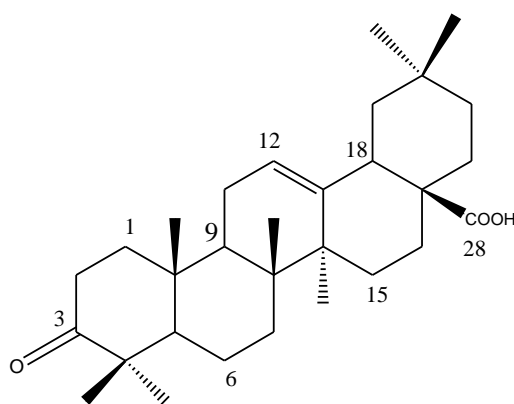


FIGURA 4.70 - Estrutura do ácido 3-oxo-oleanólico (**XX**).

Analisando o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **XX** (Figura 4.71), observaram-se sinais entre  $\delta$  1,26-0,82 os quais podem ser atribuídos aos hidrogênios metílicos do esqueleto ursano. Nota-se também ausência do sinal em  $\delta$  4,50 (*dd*) integrando para um hidrogênio, que se referia ao hidrogênio na posição H-3. O sinal em  $\delta$  2,85 refere-se ao hidrogênio H-18 (1H, *dd*,  $J= 11,0$ ; 4,0 Hz) do ácido oleanólico.

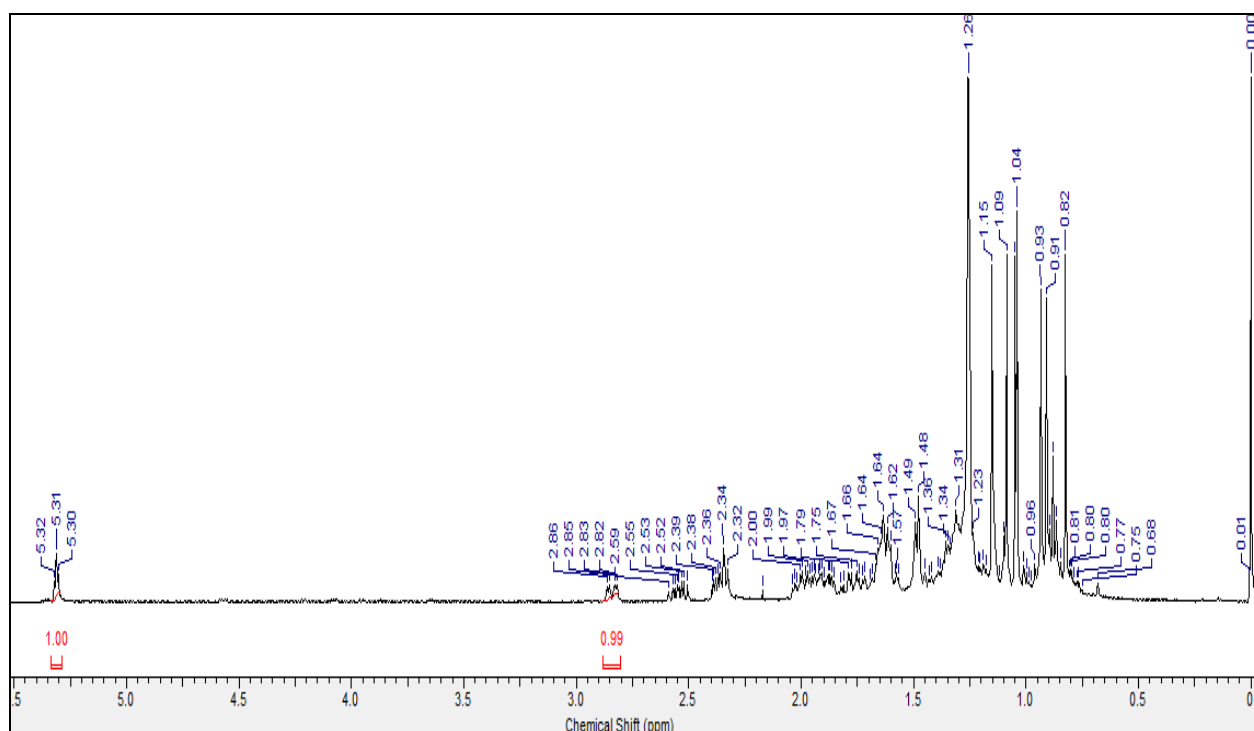


FIGURA 4.71 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **XX** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

#### 4.5.4.6 - Reação de obtenção da oxima **XXI** a partir de **XX**

Após obtenção e purificação da substância **XX**, procedeu-se a sua transformação na **XXI**. O derivado obtido indentificado como ácido 3-oxima oleanólico (Figura 4.72) teve sua estrutura confirmada através de experimento de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 4.73). Realizou-se esta derivatização com o objetivo de explorar o efeito de diferentes substituintes na posição C-3.

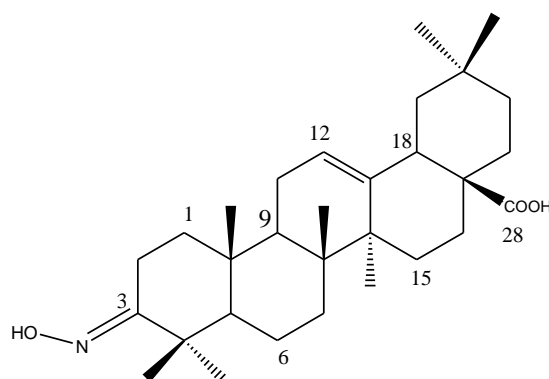


FIGURA 4.72 - Estrutura do ácido 3-oxima-oleanólico (**XXI**).

Analisando o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **XXI** (Figura 4.73) observaram-se sinais entre  $\delta$  1,13-0,76 os quais podem ser atribuídos aos hidrogênios metílicos. O sinal em  $\delta$  3,20 (*dt*,  $J= 14,0$  e  $4,0$  Hz) caracteriza a presença da função oxima na substância **XXI**, uma vez que os pares eletrônicos do oxigênio na oxima causam um efeito anisotrópico desprotetor sobre os núcleos próximos, provocando dessa forma a desblindagem do sinal do hidrogênio H-2.

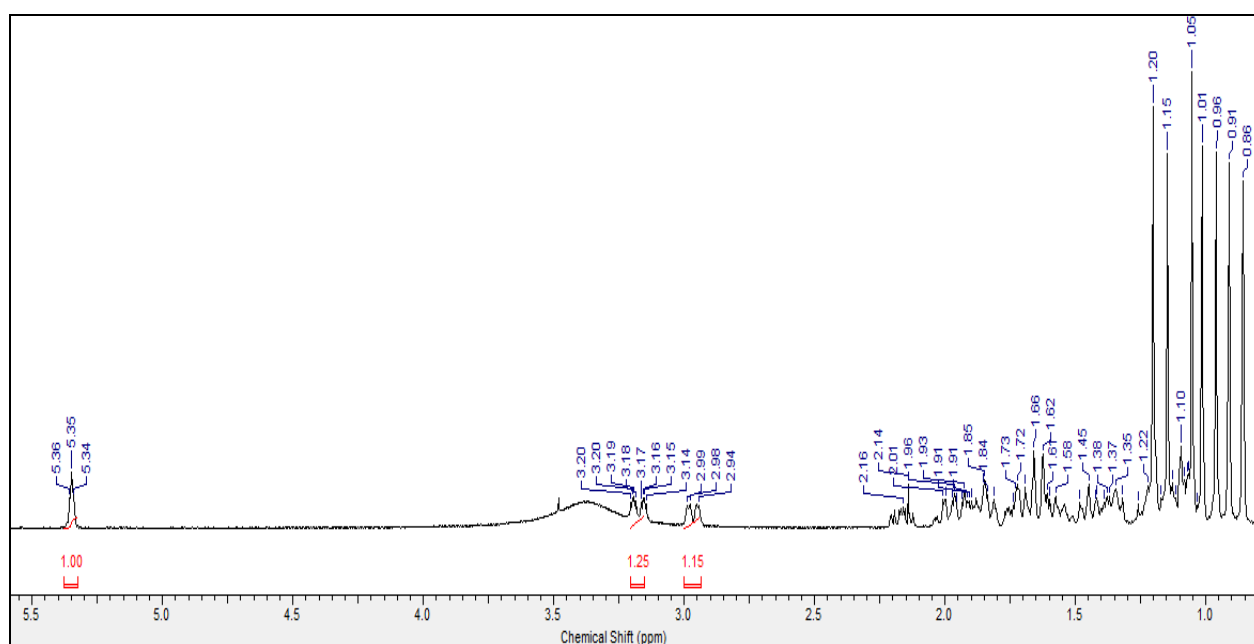


FIGURA 4.73 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **XXI** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

#### 4.5.4.7 - Reação de acetilação do ácido oleanólico (**III-SA**) para obtenção de **XXII**

A partir do ácido oleanólico (**III-SA**) procedeu-se a reação de acetilação para obtenção do ácido 3-*O*-acetil-oleanólico (**XXII**) (Figura 4.74) que teve sua estrutura elucidada através de experimento de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 4.75). Este composto foi obtido a fim de se comparar as atividades entre os esqueletos ursano e oleanano, uma vez que o ácido 3-*O*-acetil ursólico (**IX**)

(Figura 4.35) foi previamente isolado do caule de *M. lingua* como descrito anteriormente.

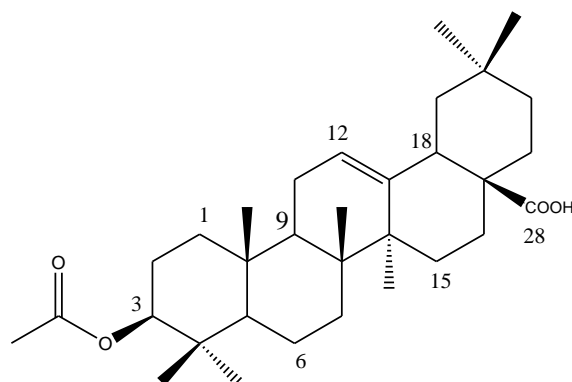


FIGURA 4.74 - Estrutura do ácido 3-*O*-acetil-oleanólico (**XXII**).

Analisando o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **XXII** (Figura 4.75) observaram-se sinais entre  $\delta$  1,13-0,76 os quais podem ser atribuídos aos hidrogênios metílicos. Nota-se um sinal em  $\delta$  4,50 (1H, *dd*,  $J= 12; 4$  Hz) referente ao hidrogênio H-3 e um duplo duplete em  $\delta$  2,83 referente ao hidrogênio H-18 (1H, *dd*,  $J= 11,0; 4,0$  Hz). Um simpleto desblindado em  $\delta$  2,05 (3H, *s*) integrando para três hidrogênios é característico do grupamento acetil.

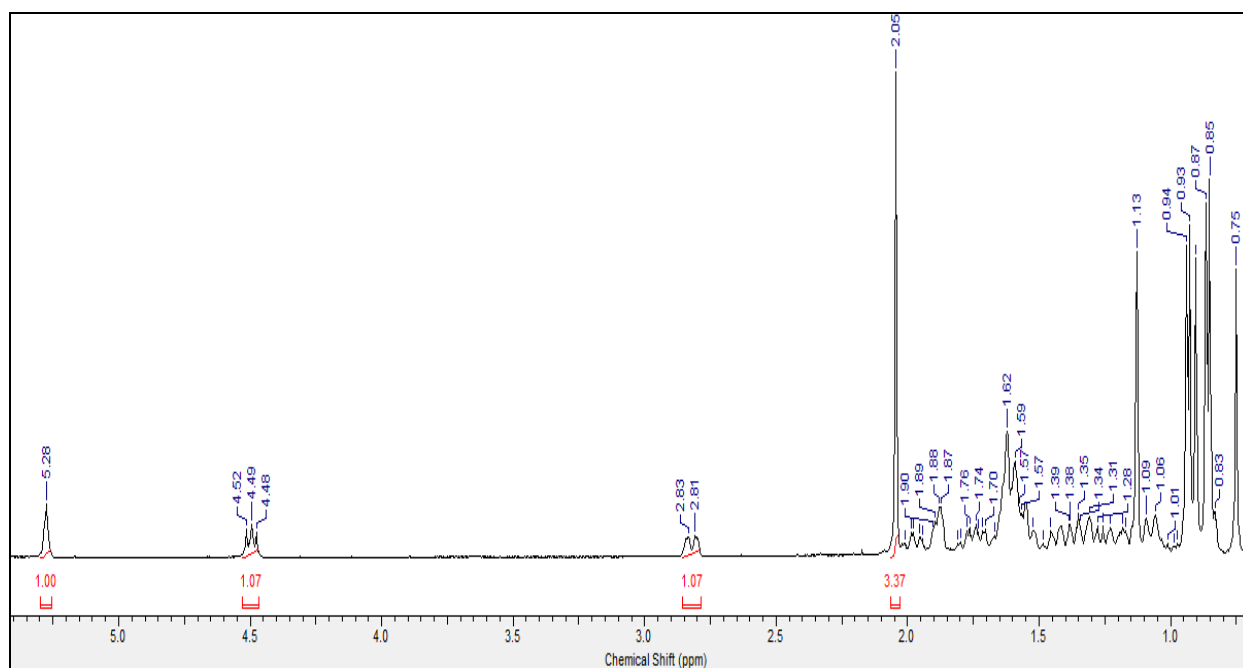


FIGURA 4.75 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **XXII** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



## 4.6 Ensaios de Inibição Enzimática

### 4.6.1 - Determinação do valor de $K_m$ para Z-FR-MCA

O valor de  $K_m$  refere-se à afinidade da enzima pelo substrato (COPELAND, 2005). Conforme procedimento previamente descrito, determinou-se o valor experimental de  $K_m$  sobre as catepsinas humanas B e L, a fim de se estabelecer a concentração do substrato Z-FR-MCA utilizada nos ensaios enzimáticos. Os resultados obtidos (Tabela 4.15) foram comparados com valores da literatura.

TABELA 4.15 - Valor de  $K_m$  sobre as catepsinas humanas B e L.

Enzimas	$K_m$ experimental ( $\mu\text{M}$ )	$K_m$ literatura ( $\mu\text{M}$ )
	Z-FR-MCA	Z-FR-MCA
Catepsina B	123 $\mu\text{M}$	157,5 $\mu\text{M}^b$
Catepsina L	1,2 $\mu\text{M}$	2,4 $\mu\text{M}^a$

<sup>a</sup>MASON, GREEN & BARRET, 1985; <sup>b</sup>REN et al., 2013.

Baseado nos resultados descritos optou-se por trabalhar com as concentrações de 185 e 10  $\mu\text{M}$  de Z-FR-MCA para as CTSB e CTSL, respectivamente.

### 4.6.2 - Avaliação enzimática e determinação da potência ( $\text{IC}_{50}$ ) dos inibidores sobre as catepsinas B e L

Após realização da triagem inicial (100  $\mu\text{M}$ ), todas as substâncias que apresentaram inibição significativa (superior a 70 %) sobre CTSB e CTSL foram selecionadas para a determinação do  $\text{IC}_{50}$ .

A determinação da potência dos inibidores através do IC<sub>50</sub> se refere à concentração do inibidor necessária para reduzir em 50 % a atividade enzimática em condições reacionais estabelecidas (COPELAND, 2005).

A avaliação da eficácia (IC<sub>50</sub>) das substâncias selecionadas foi realizada através da metodologia de inibição enzimática anteriormente apresentada. Assim, para a construção da curva concentração x resposta, utiliza-se no mínimo oito diferentes concentrações do inibidor, explorando-se valores de inibição no intervalo de 15 a 90 %, para maior confiabilidade dos resultados. Os dados cinéticos foram obtidos e tratados a partir do método de regressão não linear de melhor ajuste utilizando o programa SigmaPlot 12.0.

Conforme resultados obtidos sobre as enzimas estudadas, optou-se por discutir separadamente as classes avaliadas (flavonoides e triterpenoides), uma vez que ambas apresentaram perfil inibitório distinto sobre CTSB e CTSL.

### **4.6.3 - Flavonoides e derivados**

As substâncias isoladas da fração acetato de etila das folhas de *Myrcia lingua* e demais derivados semi-sintéticos adquiridos foram ensaiados sobre CTSB e CTSL na dosagem de 100 µM e os resultados obtidos encontram-se apresentados na Tabela 4.16. Nesta tabela também se encontram descritas as atividades de inibição enzimática de alguns outros compostos que apesar de não pertecerem necessariamente a classe dos flavonoides, foram obtidos de espécie *Myrcia lingua* e tiveram sua potência determinada: mistura de ácidos anacárdicos (I), ácido quínico (II), ácido gálico (III), ácido protocatecuico (IV), orselinato de metila (XII) e ácido anacárdico saturado (XIV).

Sabe-se que para explorar o efeito de diferentes grupos substituintes nas estruturas e assim investigar e comparar suas contribuições para a inibição enzimática se faz necessário um maior número de compostos. Diante disso, além dos compostos naturais isolados de *Myrcia lingua* optou-se por avaliar também

outros inibidores obtidos de fontes diversas por com grande semelhança estrutural entre si. Assim a avaliação inibitória dos flavonoides isolados de *M. lingua*, seus derivados semi-sintéticos, juntamente com os demais compostos obtidos do grupo de produtos naturais (PN-UFSCar) e Sigma Aldrich permitiram que várias considerações pudessem ser estabelecidas na busca por inibidores mais potentes e seletivos sobre as cisteíno proteases.

TABELA 4.16 - Inibição enzimática das substâncias isoladas das folhas de *M. lingua* e derivados.

Inibidor	% Inibição (100 $\mu$ M)	
	CTSB	CTSL
<b>I</b>	89,8 $\pm$ 0,4	37,9 $\pm$ 0,2
<b>II</b>	32,3 $\pm$ 0,5	49,8 $\pm$ 0,8
<b>III</b>	60,6 $\pm$ 0,8	54,6 $\pm$ 0,4
<b>IV</b>	51,3 $\pm$ 0,7	44,2 $\pm$ 0,3
<b>V</b>	95,5 $\pm$ 0,5	64,0 $\pm$ 0,8
<b>VI</b>	92,0 $\pm$ 0,2	56,5 $\pm$ 0,8
<b>VII</b>	95,7 $\pm$ 0,8	67,0 $\pm$ 0,4
<b>VIII</b>	89,3 $\pm$ 0,2	26,5 $\pm$ 0,2
<b>XII</b>	4,0 $\pm$ 0,5	5,0 $\pm$ 0,3
<b>XIV</b>	78,7 $\pm$ 0,1	66,2 $\pm$ 0,3
<b>XV</b>	97,0 $\pm$ 0,4	86,7 $\pm$ 0,7
<b>XVI</b>	2,0 $\pm$ 0,3	5,4 $\pm$ 0,3
<b>XVII</b>	3,3 $\pm$ 0,4	4,7 $\pm$ 0,5
<b>XVIII</b>	2,5 $\pm$ 0,5	3,8 $\pm$ 0,2

Os demais compostos avaliados obtidos de outras fontes são (Figura 4.76) quercetina (**I-PN**), tamarixetina 3-*O*- $\alpha$ -ramnosídeo (**II-PN**), catequina (**III-PN**), epicatequina (**IV-PN**), quercetina pentacetato (**V-PN**) e catequina pentacetato (**VI-PN**), kaempferol (**I-SA**), luteolina (**II-SA**).

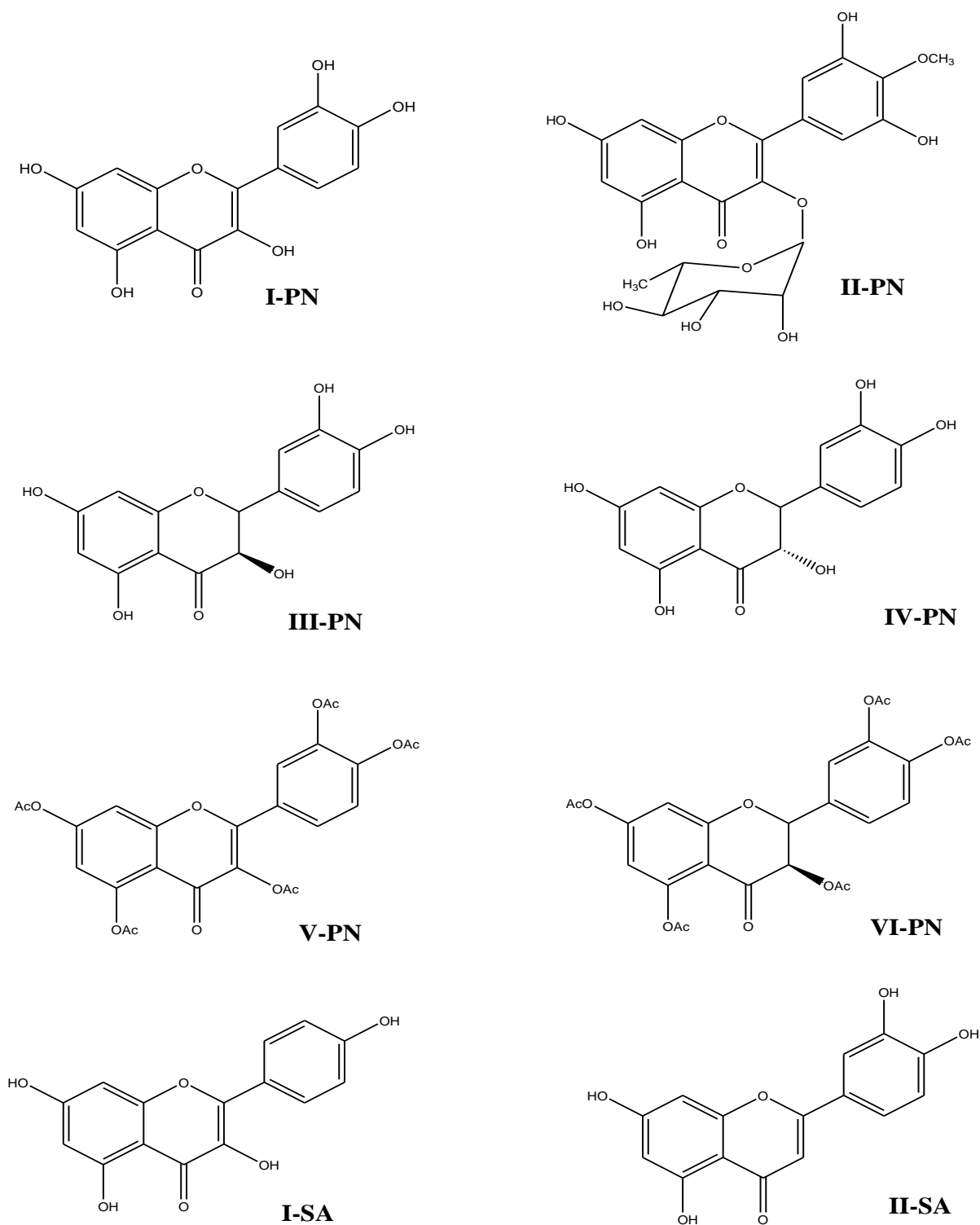


FIGURA 4.76 - Estrutura dos derivados de flavonoides obtidos de fontes diversas.

TABELA 4.17 - Potência (IC<sub>50</sub>) dos flavonoides sobre CTSB e CTSL.

Inibidor	IC <sub>50</sub> (μM)	
	CTSB	CTSL
<b>I</b>	33,8 ± 3,0	180,0 ± 16,4
<b>II</b>	> 250	> 250
<b>III</b>	121,6 ± 9,8	130,5 ± 12,0
<b>IV</b>	> 250	> 250
<b>V</b>	22,4 ± 3,2	ND
<b>VI</b>	37,2 ± 3,0	114,5 ± 10,3
<b>VII</b>	17,2 ± 1,4	ND
<b>VIII</b>	193,4 ± 32,9	> 250
<b>XII</b>	> 250	> 250
<b>XIV</b>	29,2 ± 2,1	70,2 ± 2,8
<b>XV</b>	4,9 ± 0,5	23,9 ± 2,1
<b>XVI</b>	> 250	> 250
<b>XVII</b>	> 250	> 250
<b>XVIII</b>	> 250	> 250
<b>I-PN</b>	8,2 ± 0,9	26,3 ± 1,8
<b>II-PN</b>	> 250	> 250
<b>III-PN</b>	174,2 ± 15,4	179,0 ± 15,9
<b>IV-PN</b>	> 250	> 250
<b>V-PN</b>	> 250	47,2 ± 2,9
<b>VI-PN</b>	> 250	> 250
<b>I-SA</b>	15,0 ± 1,1	28,4 ± 2,3
<b>II-SA</b>	36,2 ± 4,1	79,2 ± 4,1

ND= não determinado.

De forma geral, os flavonoides avaliados apresentaram inibição moderada sobre CTSB e baixa atividade sobre CTSL (Tabela 4.17). As substâncias **II**, **III**, **IV** e **XII** isoladas de *M. lingua* foram praticamente inativas sobre as enzimas avaliadas. Outra substância avaliada foram os ácidos anacárdicos (**I**) que apesar de estarem em mistura, apresentavam atividade

moderada sobre CTSB ( $IC_{50}$  33,8  $\mu$ M). Após reação de hidrogenação obteve-se um único composto totalmente saturado (**XIV**), entretanto a potência manteve-se praticamente inalterada ( $IC_{50}$  29,2  $\mu$ M) evidenciando assim que a presença das duplas ligações na cadeia alquílica exerce pouca contribuição para inibição enzimática.

Dentre todos os flavonoides avaliados os mais ativos foram **XV**, **I-PN** e **I-SA**, com  $IC_{50}$  de 4,9; 8,2 e 15,0  $\mu$ M, respectivamente. Os resultados obtidos demonstraram que a presença do grupo OH no anel B é importante para inibição sobre CTSB e quanto maior o número de hidroxilas presente no anel, maior será a potência como pode ser evidenciado pela miricetina (**XV**) com três hidroxilas no anel B. Estudos da literatura demonstraram que a presença de grupamento OH em compostos fenólicos pode afetar a atividade biológica através da formação de ligações de hidrogênio no sítio ativo enzimático (HARBORNE & WILLIAMS, 2000).

Quando comparamos as substâncias **I-PN** (8,2  $\mu$ M) e **II-SA** (36,2  $\mu$ M), verificou-se a importância do grupo OH na posição C-3, pois a ausência de hidroxila (**II-SA**) levou a diminuição da atividade inibitória sobre CTSB. Ao analisarmos a aglicona **XV** (4,9  $\mu$ M) e seus respectivos flavonoides glicosilados **VI** (37,2  $\mu$ M) e **VII** (17,2  $\mu$ M), nota-se que a presença do açúcar na posição C-3 não contribui para atividade enzimática, pois há um aumento dos valores de  $IC_{50}$ .

Ao avaliarmos os demais flavonoides nota-se que a presença do grupo metoxila no anel provocou diminuição considerável da potência (substância **II-PN**), tornando-se praticamente inativa sobre CTSB com valor de  $IC_{50}$  acima de 250  $\mu$ M. Esta informação também foi confirmada para substâncias **XVI**, **XVII** e **XVIII** que foram obtidas a partir da derivatização da quercetina (**I-PN**) e possuem metoxilas em diferentes posições, com valores de  $IC_{50}$  acima de 250  $\mu$ M. A fim de se estabelecer a contribuição da dupla ligação presente no anel C, avaliamos os flavan-3-ols (**III-PN**, **IV-PN** e **VI-PN**). Todos os compostos

apresentaram baixa atividade sobre às enzimas alvo, demonstrando assim que a presença da dupla neste anel contribui para inibição enzimática.

Posteriormente os inibidores mais potentes (**XV**, **I-PN** e **I-SA**) foram selecionados para estudo cinético e determinação do mecanismo de ação sobre CTSB. Devido à baixa atividade dos flavonoides sobre CTSL o mecanismo de ação não foi determinado para esta enzima.

#### 4.6.4 - Triterpenoides e derivados

As substâncias isoladas da fração hexânica do caule de *M. lingua* e demais derivados semi-sintéticos obtidos, foram ensaiados sobre as catepsinas B e L na dosagem de 100  $\mu$ M (Tabela 4.18).

TABELA 4.18 - Inibição enzimática dos triterpenoides provenientes do caule de *M. lingua* e derivados.

Inibidor	% Inibição (100 $\mu$ M)	
	CTSB	CTSL
<b>IX</b>	46,6 $\pm$ 0,1	91,9 $\pm$ 0,6
<b>X</b>	48,3 $\pm$ 0,2	98,0 $\pm$ 0,1
<b>XIII</b>	53,6 $\pm$ 0,2	96,0 $\pm$ 0,1
<b>XIX</b>	3,5 $\pm$ 0,6	0,0 $\pm$ 0,5
<b>XX</b>	26,7 $\pm$ 0,4	95,0 $\pm$ 0,5
<b>XXI</b>	33,3 $\pm$ 0,2	97,3 $\pm$ 0,7
<b>XXII</b>	36,4 $\pm$ 0,5	93,4 $\pm$ 0,4

A partir dos resultados obtidos, observou-se que as substâncias avaliadas apresentaram uma maior atividade sobre CTSL e posteriormente tiveram seus valores de IC<sub>50</sub> determinados.

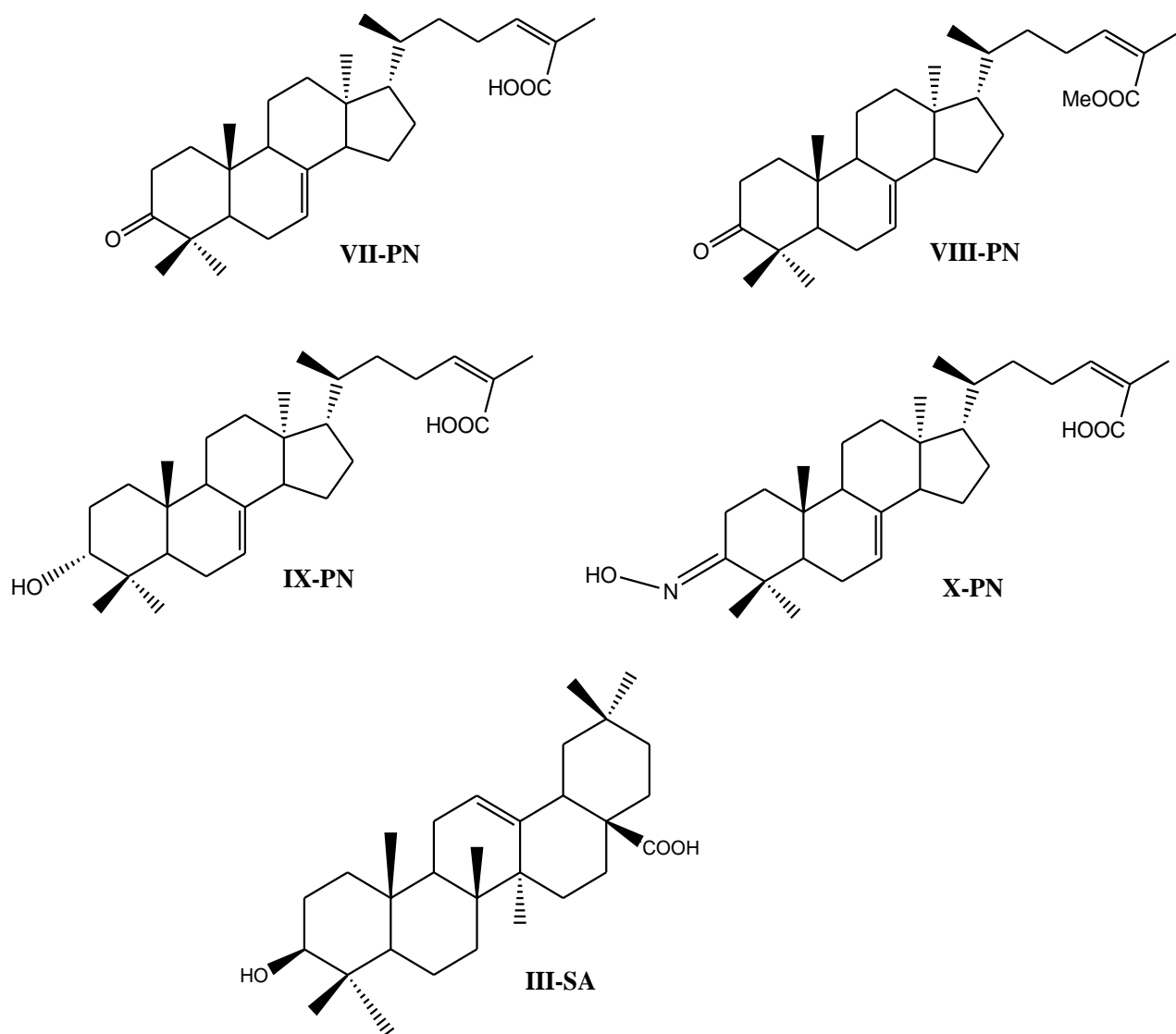


FIGURA 4.77 - Estrutura dos derivados de triterpenos obtidos de fontes diversas.

Após avaliação positiva dos triterpenos isolados da fração hexânica do caule de *Myrcia lingua* Berg. como potenciais inibidores da CTSL, optou-se por avaliar também outros compostos devido a grande similaridade estrutural. Alguns foram previamente isolados pelo grupo de produtos naturais da UFSCar como ácido masticadienóico (**VII-PN**) e o seu correspondente metil éster (**VIII-PN**), schinol (**IX-PN**), ácido 3-oxima masticadienóico (**X-PN**) e outros foram adquiridos comercialmente na empresa Sigma Aldrich como ácido oleanóico (**III-SA**) e submetidos a subsequentes modificações estruturais (**XX**, **XXI** e **XXII**) (Figura 4.77).



Dessa forma, uma série totalizando 12 triterpenoides foi avaliada sobre CTSB e CTSL em relação ao seu potencial de inibição. Os valores de IC<sub>50</sub> obtidos para estes compostos encontram-se descritos na Tabela 4.19.

TABELA 4.19- Potência (IC<sub>50</sub>) dos triterpenoides sobre CTSB e CTSL.

Inibidor	IC <sub>50</sub> (μM)	
	CTSB	CTSL
<b>IX</b>	78,9 ± 6,4	12,3 ± 1,6
<b>X</b>	> 250	6,5 ± 0,9
<b>XIII</b>	> 250	39,5 ± 4,7
<b>XIX</b>	> 500	> 500
<b>XX</b>	> 250	14,7 ± 0,9
<b>XXI</b>	> 250	2,4 ± 0,5
<b>XXII</b>	> 250	9,7 ± 1,8
<b>VII-PN</b>	> 250	9,1 ± 2,3
<b>VIII-PN</b>	> 250	> 250
<b>IX-PN</b>	20,4 ± 2,0	8,2 ± 0,5
<b>X-PN</b>	> 250	2,6 ± 0,2
<b>III-SA</b>	> 250	7,2 ± 1,1

A série de substâncias avaliadas apresentou-se como inibidores da CTSL, entretanto praticamente não apresentaram inibição sobre CTSB.

Sabe-se que para a realização do estudo de relação entre estrutura e atividade é necessária uma grande coleção de compostos, entretanto apesar da série de triterpenoides corresponder a uma pequena coleção, algumas considerações podem ser estabelecidas e posteriormente utilizadas na busca por inibidores mais potentes e seletivos. Esta foi a primeira vez que esta classe de

compostos foi descrita na literatura como inibidores da catepsina L humana (RAMALHO et al., 2014). Assim, dentre os inibidores avaliados os mais potentes sobre CTSL (Tabela 4.19) foram as substâncias **X**, **XXI** e **X-PN** com valores de  $IC_{50}$  6,5; 2,4 e 2,6  $\mu$ M, respectivamente.

Avaliando as potências obtidas pode-se estabelecer que a presença do ácido carboxílico na posição C-28 é de extrema importância para atividade inibitória dos triterpenos sobre CTSL. Os compostos **XIX** e **VIII-PN** diminuíram consideravelmente a inibição (valores de  $IC_{50}$  acima de 250  $\mu$ M) quando o grupamento ácido foi substituído pelo éster metílico correspondente. Por outro lado, a presença do grupo hidroximino na posição C-3 contribuiu significativamente para o aumento da potência nas substâncias **XXI** e **X-PN** quando comparada aos seus precursores (**III-SA** e **VII-PN**). As substâncias (**IX** e **XXII**) que contém o grupamento acetato na posição C-3 apresentaram inibição moderada sobre CTSL, 12,3 e 9,7  $\mu$ M, respectivamente. Outro aspecto que chamou a atenção foi a potência apresentada pelas substâncias **X** e **XIII**. Estes são compostos com grande semelhança estrutural entre si, cuja única diferença é a configuração da hidroxila na posição C-3. A substância **X** que apresenta um grupo  $\alpha$ -OH possui uma potência muito maior ( $IC_{50}$  6,5  $\mu$ M) quando comparado com **XIII** ( $IC_{50}$  39,5  $\mu$ M), demonstrando assim que a posição destes grupamentos é importante para interação com sítio ativo enzimático da CTSL. Assim a partir dos dados apresentados também pode-se confirmar que ambos os esqueletos ursano e oleanano possuem capacidade de inibir CTSL.

Estudos recentes encontrados na literatura descrevem o ácido ursólico como inibidores de metaloproteases (MMPs) em linhagens de glioma C-6 de ratos com  $IC_{50}$  de 20  $\mu$ M para protease MMP-9. As MMPs são enzimas que também se apresentam como superexpressas em células tumorais e se correlacionam com o processo de progressão tumoral (SHISHODIA et al., 2003; SULTANA, 2011; GONÇALVES et al., 2012). O ácido ursólico e seus derivados também têm sido descritos como agentes de baixa toxicidade, o que

impulsiona ainda mais o interesse por esta classe de substâncias (SULTANA, 2011; SALVADOR et al., 2012).

Posteriormente os inibidores mais potentes (**X**, **XXI**, **X-PN**) foram selecionados para estudo cinético e determinação do mecanismo de ação sobre CTSL. Devido à baixa atividade sobre CTSB o mecanismo de ação não foi determinado sobre esta enzima.

#### **4.6.5 - Determinação do mecanismo de ação e valor do $K_i$ dos flavonoides sobre a catepsina B**

Os flavonoides de maior potência (**XV**, **I-PN** e **I-SA**) foram selecionados para determinação do mecanismo de ação utilizando o método do gráfico duplo recíproco de Lineaweaver-Burk, sendo determinados como inibidores incompetitivos da CTSB (Figura 4.78), ou seja, se ligam exclusivamente ao complexo enzima-substrato e os gráficos plotados apresentam-se através de retas paralelas entre si. Obtiveram-se também os valores de  $K_i$  (Tabela 4.20) e a partir dos dados obtidos podemos afirmar que os flavonoides avaliados apresentaram afinidade moderada sobre a enzima.

TABELA 4.20 - Valores de  $K_i$  sobre CTSB.

<b>Inibidor</b>	<b><math>K_i</math> (<math>\mu\text{M}</math>)</b>
<b>XV</b>	11,3
<b>I-PN</b>	9,0
<b>I-SA</b>	11,4

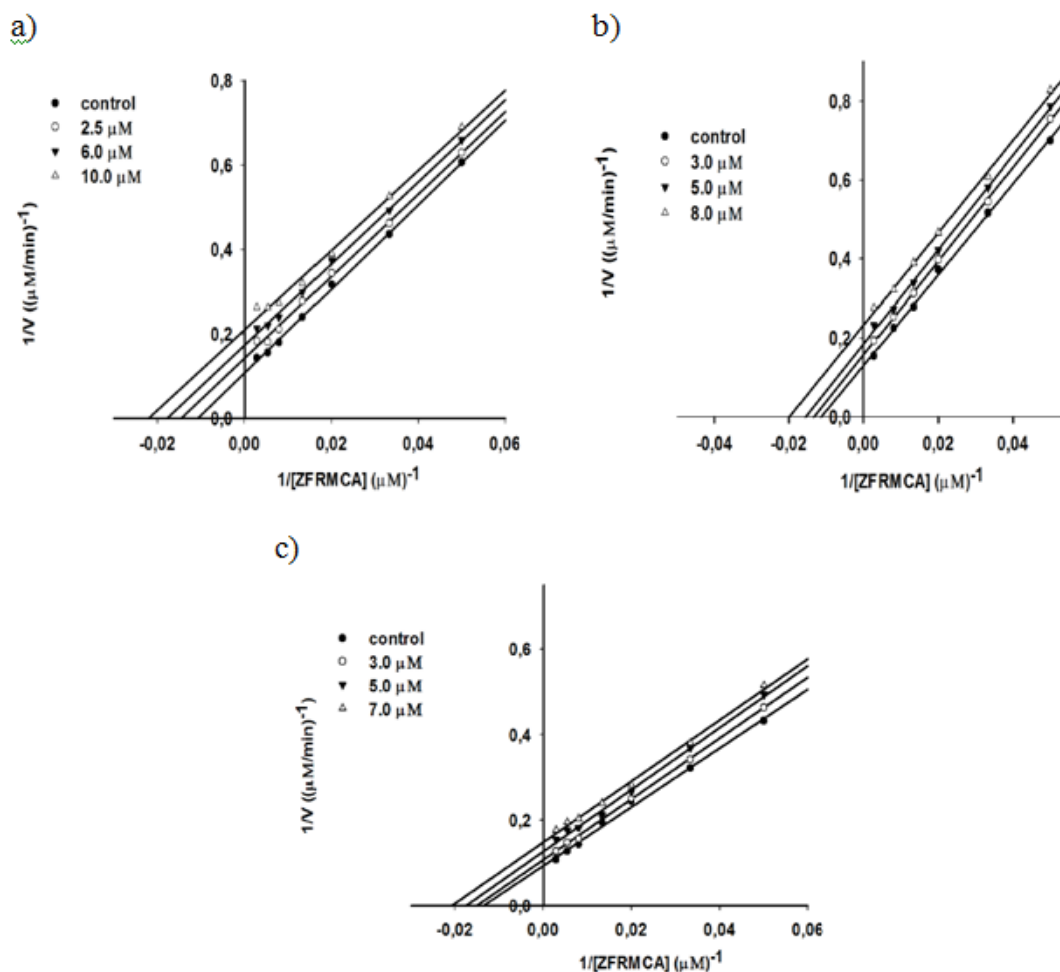


FIGURA 4.78 - Gráficos duplo recíproco de Lineaweaver-Burk para as substâncias **XV** (a), **I-PN** (b) e **I-SA** (c).

#### 4.6.6 - Determinação do mecanismo de ação e valor do $K_i$ dos triterpenos sobre a catepsina L

Os triterpenos selecionados (**X**, **XXI**, **XX-II** e **X-PN**) tiveram seu mecanismo de ação determinado através do gráfico duplo recíproco de Lineaweaver-Burk, e utilizando os resultados obtidos (Figura 4.79) pode-se que estabelecer que os triterpenos atuam como inibidores competitivos da CTSL, ou seja, competem com o substrato pelo sítio ativo enzimático. Os gráficos plotados apresentam-se em retas que se cruzam entre si no intercepto do eixo y. Através deste método obtiveram-se também os valores de  $K_i$  (Tabela 4.21) que correlacionam a afinidade entre a enzima e o inibidor. Os dados obtidos

demonstram que os triterpenos inicialmente avaliados apresentam afinidade moderada sobre CTSL e poderiam ser utilizados como modelos para desenvolvimento de novos compostos mais potentes e também de maior afinidade.

TABELA 4.21 - Valores de  $K_i$  sobre CTSL.

Inibidor	$K_i$ ( $\mu\text{M}$ )
X	19,5
XXI	2,0
XXII	17,0
X-PN	9,2

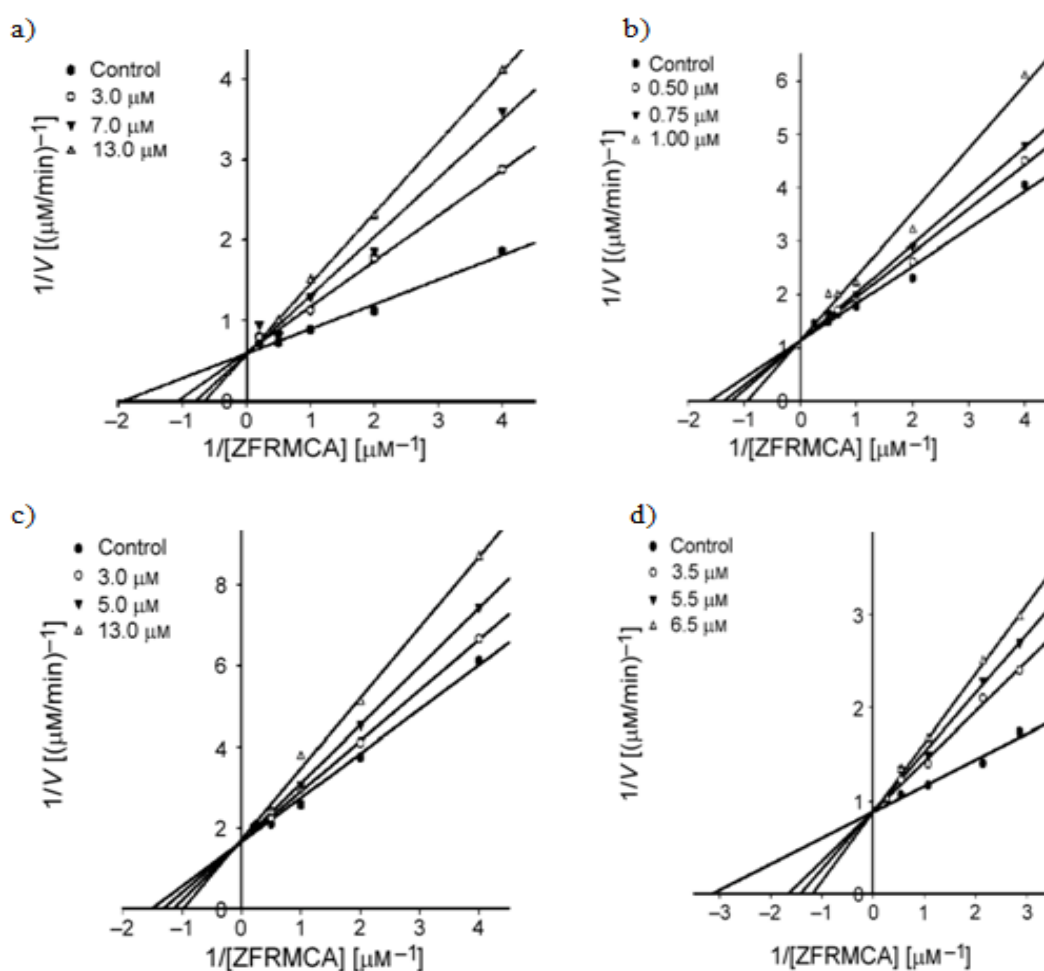


FIGURA 4.79 - Gráficos duplo recíproco de Lineweaver-Burk para as substâncias X (a), XXI (b), XXII (c) e X-PN (d).

## **PARTE II**

### **AVALIAÇÃO DA PROTEÓLISE TUMORAL *IN VITRO* UTILIZANDO MODELOS 3D**

## **5 - INTRODUÇÃO (PARTE II)**

### **5.1 - Câncer de mama**

O câncer de mama caracteriza-se por ser uma doença heterogênea. Baseando-se em características histo-morfológicas pode ser dividido em diferentes subgrupos, sendo este um dos principais fatores por ainda não existir um tratamento padrão estabelecido para tumores de origem mamária (RUIJTER et al., 2011). Nas mulheres o câncer de mama é o mais prevalente tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento, sendo a metástase a principal causa de morte em processos cancerígenos (WHO, 2014).

As estratégias terapêuticas atualmente existentes para o tratamento do câncer de mama tais como terapia hormonal (anti-estrogênio) e uso de alvos terapêuticos (trastuzumab) somente se mostram eficazes quando os alvos e os receptores correspondentes são expressos pela célula tumoral. Células tumorais denominadas triplamente negativas (TNBC) são células que se caracterizam pela ausência de receptores de estrogênio (ER), receptores de progesterona (PR) e receptor 2 do fator de crescimento humano epidermal (HER-2) Estas células não respondem ao tratamento hormonal convencional, são mais agressivas, possuem alta taxa de recorrência e ainda apresentam prognóstico ruim quando comparadas a outros subtipos de carcinomas de mama comumente encontrados. Constituem cerca de 10-20 % dos casos de câncer de mama, sendo mais frequentes em pacientes jovens. (RUIJTER et al., 2011; WEST & MCGROWDER, 2011; CHIOREAN et al., 2013; ANDERSON et al., 2014).

Neste contexto, devido à grande heterogeneidade da doença, ausência de alvos moleculares estabelecidos e terapias específicas, a busca por tratamentos eficazes em TNBC ainda se faz necessária (LEHMANN et al., 2011).

## 5.2 - Proteólise Tumoral (Modelo 3D)

O ensaio de proteólise tumoral em 3D (MAME-mammary architecture and microenvironment engineering) através da microscopia confocal foi estabelecido para avaliar de forma mais precisa e dinâmica as interações existentes entre as células cancerígenas de mama e os componentes da matriz extracelular, uma vez que permite avaliar a proteólise *in vitro* (SAMENI et al., 2000; SAMENI et al., 2009; SAMENI et al., 2012). Em contraste com a utilização de substratos sintéticos convencionais, este ensaio emprega proteínas da matriz extracelular (ECM) tais como DQ-colágeno I e IV marcados (dye quenched) que após serem degradados pelas proteases são capazes de emitir fluorescência na cor verde (SAMENI et al., 2003; SAMENI et al., 2012).

De acordo com diversos trabalhos da literatura as imagens obtidas permitem avaliar as interações existentes entre as células tumorais e o meio celular, e dessa forma o impacto das proteases na metástase e progressão tumoral. Imagens da fluorescência emitida podem ser obtidas de forma contínua ou ainda em vários intervalos sequenciais ao longo de um período de dias. No processo tumoral, as proteases além de ser expressas de forma intracelular também podem ser secretadas pelas células cancerígenas e assim serem detectadas na porção extracelular.

Resultados apresentados por Sameni e colaboradores relatam que o modelo 3D (MAME) permite a quantificação e localização intracelular e extracelular dos produtos fluorescentes provenientes da proteólise (SAMENI et al., 2003; SAMENI et al., 2009; SAMENI et al., 2012). Apesar de ser inicialmente desenvolvido para câncer de mama o modelo possui flexibilidade suficiente para ser empregado em outros tipos de câncer e algumas das principais vantagens desse ensaio baseia-se no fato de utilizar células humanas e permitir o monitoramento em tempo real do comportamento celular (SAMENI et al., 2005; SLOANE et al., 2009; SAMENI et al., 2012).



## **6 – OBJETIVO GERAL (PARTE II)**

Avaliar dos inibidores enzimáticos sobre a proteólise tumoral *in vitro* nas linhagens de câncer de mama triplamente negativas através da degradação de DQ-colágeno IV.

### **6.1 - Objetivos específicos**

1. Cultivar as linhagens celulares de câncer de mama (MDA-MB-231 e Hs587T).
2. Realizar Western Blot e confirmar expressão das proteases nas linhagens celulares utilizadas.
3. Avaliar a inibição enzimática (catepsina B e L) no lisado celular.
4. Determinar a potência (IC<sub>50</sub>) dos compostos promissores sobre as catepsinas B e L no modo celular.
5. Realizar ensaio de proteólise tumoral *in vitro* (modelo 3D) dos compostos ativos previamente avaliados no lisado celular.
6. Obter imagens confocais e quantificar os dados obtidos.

## **7 - PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL (PARTE II)**

### **7.1 - Equipamentos**

#### **7.1.1 - Espectrofluorímetro**

- Tecan SPECTRAFluor Plus microplate reader

#### **7.1.2 - Incubadora**

- Heraeus-HERO cell 150

#### **7.1.3 - Sonicador de células**

- 60 Sonic Dismembrator-Fisher Scientific

#### **7.1.4 - Centrífugas**

- SORVALL T6000D
- SORVALL RC5C PLUS
- Centrifuge 5415R- Eppendorf

#### **7.1.5 - Scanner para membranas de Western Blot**

- Typhoon Imaging Scanner

### **7.1.6 - Microscópio óptico**

- Nikon TMS

### **7.1.7 - Microscópio confocal**

- Zeiss LSM 780
- Zeiss 510 META

## **7.2 - Materiais**

- Substratos: Z-Arg-Arg-MCA e Z-Phe-Arg-MCA adquiridos da Bachem.
- DTE adquirido da Sigma Aldrich.
- E-64, CA-074 e CA-074Me adquiridos da Bachem.
- FBS (soro fetal bovino) adquirido da Invitrogen.
- DMEM (Dulbecco's modified Eagles's medium) adquirido da Sigma Aldrich.
- MEGM (mammary epithelial cell growth medium) adquirido da Sigma Aldrich.
- 3D Matriz (15,65 mg/ml) adquirido da Cultrex.
- Corante Hoeschst 33342 (10 mg/ml) adquirido da Invitrogen.
- DQ-colágeno IV (25 µg/ml) adquirido da Invitrogen.
- Ethidium Homodimer-1 e calceína AM adquirido da Invitrogen.

## **7.3 - Procedimento Experimental**

Os procedimentos para a realização do estudo de avaliação da proteólise tumoral *in vitro* em linhagens tumorais de mama foram realizados no Laboratório da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Bonnie F. Sloane durante doutorado sanduíche (oito meses - bolsista CAPES) no Departamento de Farmacologia na Escola de Medicina em Wayne State University, Detroit-MI de acordo com protocolos descritos na literatura (JEDESZKO et al., 2008).

### **7.3.1 - Cultivo e Coleta das Linhagens Tumorais**

Linhagens tumorais de mama MDA-MB-321 e Hs578T foram obtidas da ATCC (American Type Culture Collection; Rockville, MD) e cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) suplementado com soro fetal bovino 10 % (v/v) (FBS) e antibiótico (mycozap 0,1 %) conforme orientações da ATCC. A linhagem Hs578T exige suplementação do meio com insulina 0,01 mg/ml. As células foram mantidas sob incubação em atmosfera humidificada a 37 °C e 5 % CO<sub>2</sub>. Para fins de coleta celular e realização dos ensaios enzimáticos as células foram cultivadas em discos de 100 mm<sup>2</sup> e confluência de até aproximadamente 80 %. Posteriormente foram lavadas duas vezes com tampão fosfato salino (PBS), removidas e armazenadas em solução (SME) contendo 250 mM sucrose, 25 mM MES, 1 mM EDTA, pH 6,5 e 0,1 % Triton X-100 e mantidas congeladas à temperatura de -20 °C.

### **7.3.2 - Western Blot Análise**

A fim de se obter o lisado celular as amostras mantidas em resfriamento foram sonicadas por 3 vezes de 10 segundos e posteriormente

centrifugadas por 10 minutos a 4 °C e 13 rpm. Foram removidas alíquotas do sobrenadante e aplicaram no SDS-PAGE gel (12 % de acrilamida) onde foram transferidas para membranas de nitrocelulose. Cerca 5 µg de material celular foi aplicado para cada amostra utilizada. Imunoblot foi realizado com anticorpos primários para CTSB (1:4000) e CTSL (1:4000) e anticorpos secundários anti-rabbit (1:10000). Após várias lavagens sequenciais, procedeu-se para câmara escura onde obteve-se o filme com revelação das bandas de proteína estudadas pelo aumento da quimioluminescência.

### **7.3.3 - Triagem Enzimática (enzima pura)**

Nos ensaios cinéticos da catepsinas isoladas a concentração enzimática foi de 10 nM. Acrescentou-se a solução enzimática (50 µl) 1 µl do inibidor dissolvido em DMSO e incubou-se por 10 minutos. Posteriormente foi adicionado 300 µl do tampão contendo 5 mM EDTA, 10 mM DTT, pH 5,2 e incubou-se por 15 minutos a 37 °C. Pipetou-se 100 µl da solução inicial e acrescentou-se 200 µl do tampão contendo 0,6 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,6 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM piperazi-N-N'-bis[2-ethanosulfônico ácido] e 150 µM do substrato Z-Phe-Arg-MCA, pH 7,3. Como controle positivo foi utilizado o inibidor E-64 (10 µM). DMSO como controle negativo. Os ensaios foram realizados em triplicata e foi feita a leitura da fluorescência por um período de 30 minutos com excitação em 360 nm e emissão em 465 nm.

### **7.3.4 - Avaliação da Inibição Enzimática Celular (lisado celular)**

Para avaliar atividade enzimática celular da catepsina B, adicionou-se 50 µl do lisado celular (descrito acima no item 7.3.2) em 1 µl do inibidor dissolvido em DMSO por um período de 10 minutos. Posteriormente acrescentou-se 300 µl do tampão contendo 5 mM EDTA, 10 mM DTT, pH 5,2 e

incubou-se por 15 minutos a 37 °C. Pipetou-se 100 µl da solução inicial e acrescentou-se 200 µl do tampão contendo 0,6 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,6 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM piperazi-N-N-bis[2-etanosulfônico ácido] e 150 µM do substrato Z-Arg-Arg-MCA, pH 7,3. O inibidor CA-074 (10 µM) foi utilizado como controle positivo para os ensaios envolvendo catepsina B e DMSO como controle negativo. Na avaliação da catepsina L realizou-se o mesmo procedimento previamente descrito utilizando Z-Phe-Arg-MCA como substrato e o inibidor E-64 (10 µM) como controle positivo. Os ensaios foram realizados em triplicata e foi feita a leitura da fluorescência por um período de 30 minutos com excitação em 360 nm e emissão em 465 nm.

### **7.3.5 - Avaliação da Proteólise Tumoral *in vitro* (Modelo 3D)**

Antes de iniciar a cultura de células no modelo 3D realizou-se a limpeza e condicionamento das lamínulas de vidro. Foram lavadas com água destilada por 15 vezes consecutivas e depois deixadas em repouso por 3 horas em uma solução de ácido sulfúrico diluído (100 ml de água em 50 ml de ácido sulfúrico). Em seguida, lavadas abundantemente com água destilada afim de remover todo resíduo de ácido sulfúrico e deixadas na estufa a 220 °C por 12 horas.

Para o cultivo de células no modelo 3D, foram utilizadas 2 lamínulas de vidro em cada disco de 35 mm. A matriz adicionou-se DQ-colágeno IV (25 µg/ml) e pipetou-se 50 µl para cobertura homogênea de cada lamínula. A fim de se evitar sua solidificação antecipada a matriz foi mantida a temperatura de 4 °C durante todo o processo. Após aplicação, incubaram-se as lamínulas a 37 °C por 20 minutos para solidificação da matriz. Seguindo procedimento previamente descrito para cultivo celular, foram utilizadas células com 80 % de confluência, as quais foram aplicadas sobre as lamínulas na concentração de aproximadamente 10.000 células em 50 µl. Após adicionar as

células, incubou-se novamente a 37 °C durante 60 minutos para que as células pudessem aderir ao sistema. Posteriormente, acrescentou-se 2 ml do meio de cultura MEGM (mammary epithelial cell growth medium) em 2 % de matriz e respectivo inibidor para cada disco de 35 mm contendo duas lamínulas. As células foram mantidas em incubação em atmosfera humidificada a 37 °C e 5 % CO<sub>2</sub> e realizou-se manutenção do meio de cultura a cada dois dias. Acompanhou-se o crescimento celular e obteve-se imagens utilizando microscópio confocal com lentes de imersão 20X de magnificação após 4 dias de cultivo. Os ensaios foram realizados em triplicatas. Os inibidores CA-074 (5 µM) e CA-074Me (5 µM) foram utilizados como controle positivo e DMSO como controle negativo.

O software Volocity<sup>®</sup> foi utilizado para reconstrução das imagens e quantificação dos dados obtidos. As figuras apresentadas representam uma visão *en face* das imagens obtidas e o processo de quantificação foi realizado considerando a razão entre a fluorescência obtida em cada imagem adquirida e o número de células totais presentes (núcleos).

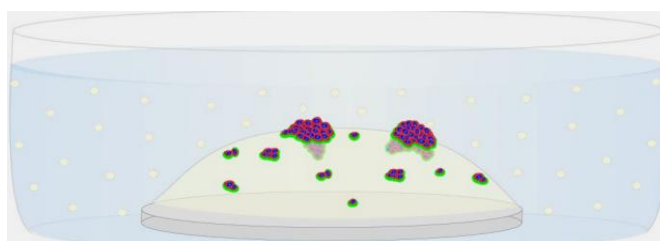


FIGURA 7.1 - Ilustração do cultivo de células tumorais no modelo 3D (SAMENI et al., 2012).

### **7.3.6 - Ensaio de Viabilidade Celular**

Este ensaio tem como objetivo avaliar os efeitos citotóxicos do inibidor sobre as linhagens tumorais de mama. Assim, para avaliação da viabilidade celular, seguiu-se o mesmo procedimento de cultivo celular descrito no item 7.3.5 sem adição do DQ-colágeno IV. Após quatro dias de cultivo foram

acrescentados dois componentes (4  $\mu\text{M}$  ethidium homodimer-1 e 2  $\mu\text{M}$  calceína AM) no meio celular e incubou-se a 37 °C por 30 min. As lamínulas foram lavadas com PBS e acrescentou-se 2 ml do meio de cultura MEGM antes da obtenção das imagens confocais. A calceína AM quando clivada pelas estearases intracelulares emite fluorescência verde, o que permite distinguir as células vivas das células mortas, pois o ethidium homodimer-1 se incorpora ao DNA das células mortas e emite fluorescência vermelha. As imagens foram obtidas através do microscópio confocal e lentes 10X de magnificação.

### **7.3.7 - Fotoativação do Inibidor Sintético Complexado com Rutênio**

Através de colaboração estabelecida com o Prof. Dr. Jeremy Kodando do Departamento de Química, Wayne State University foi sintetizado pelo aluno de doutorado Rajopal Sharma um inibidor da CTSB descrito como um dipeptídeo nitrila (**JK\_1**) (GREENSPAN et al., 2001). Após obtenção do composto e confirmação da atividade enzimática este foi complexado ao rutênio (II). O complexo obtido descrito como  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\mathbf{1})_2](\text{BF}_4)_2$  e identificado como **JK\_2**. A estrutura foi confirmada através de experimentos de RMN de  $^1\text{H}$ , UV-vis, IV, massas e análise elementar. O esquema de síntese encontra-se descrita na Figura 7.2.



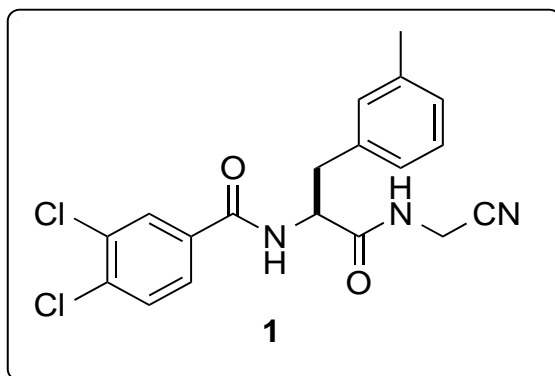
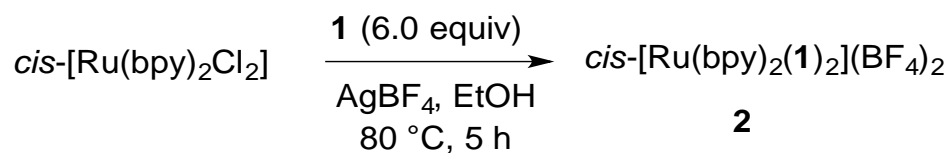


FIGURA 7.2 - Síntese do inibidor **JK\_2** complexado com rutênio (II).

O complexo de rutênio (II) possui boas propriedades fotorreativas. Após obtenção do composto seguiu-se a reação de fotoativação onde os inibidores foram avaliados em duas condições, sob exposição da luz e escuro. Assim, após adição do inibidor as células/enzima foram mantidas no escuro envoltas em papel alumínio (sem radiação) e sob exposição da luz utilizando uma lâmpada de tungstênio (radiação 250 W, 395-750 nm) por 45 min em discos separados. A cada dois dias o procedimento foi repetido e acrescentou-se inibidor.

## **8 - RESULTADOS E DISCUSSÃO (PARTE II)**

Considerando os inibidores de catepsina B e L previamente isolados através do estudo bioguiado de plantas do cerrado paulista (PARTE I) e a diversidade de compostos no Laboratório de Produtos Naturais-UFSCar pertencentes a estas classes (flavonoides e triterpenos) optou-se por selecionar aqueles de maior potência e avaliar a inibição enzimática intracelular em linhagens de câncer de mama (MDA-MB-231 e Hs578T), a fim de se explorar com mais profundidade a capacidade de inibição enzimática dessas substâncias ao nível celular, uma vez que haviam se mostrado ativas sobre a enzima pura.

### **8.1 - Expressão Enzimática**

Antes de iniciar a realização dos ensaios enzimáticos, foi feita verificação por Western Blot para confirmar expressão das proteases (CTSB e CTSL) pelas linhagens celulares tumorais (MDA-MB-231 e Hs578T) cultivadas.

A catepsina B madura e por sua vez ativa, se apresenta em duas formas com uma cadeia (31 kDa) e com duas cadeias (25 kDa e 26 kDa) (MOIN et al., 1992). Três bandas com massa molecular de 31 kDa, 26 kDa e 25 kDa (as duas últimas aparecem como dubleto) em SDS/PAGE gel de poliacrilamida 12 % caracterizam a presença de catepsina B ativa nas células tumorais e também nota-se a presença de bandas com 44/46 kDa e 38 kDa referente a procatepsina B (forma inativa). Todas as formas descritas podem ser visualizadas na Figura 8.1.

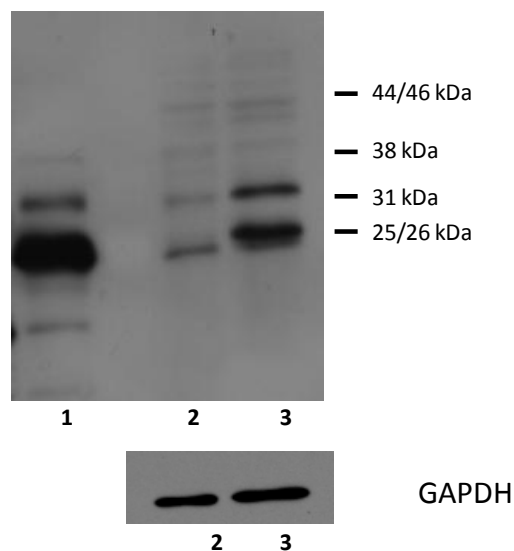


FIGURA 8.1 - SDS/PAGE da catepsina B e procatepsina B presente no lisado celular. (1) controle positivo catepsina B; (2) linhagem tumoral MDA-MB-231; (3) linhagem tumoral Hs578T.

A catepsina L madura e ativa possui 28 kDa (YOKO et al., 2006) e a banda com a respectiva massa molecular pode ser detectada através do SDS/PAGE gel de poliacrilamida 12 % (Figura 8.2). A forma precursora, procatepsina L 41 kDa também se faz presente, entretanto necessita ser ativada para apresentar atividade catalítica.

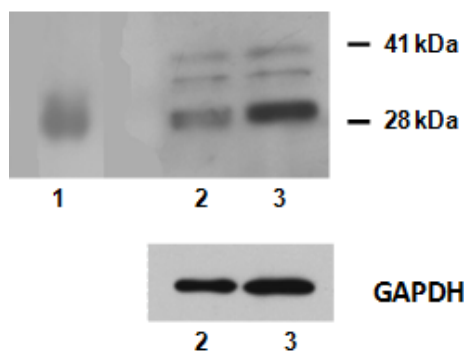


FIGURA 8.2 - SDS/PAGE da catepsina L e procatepsina L presente no lisado celular. (1) controle positivo catepsina L; (2) linhagem tumoral MDA-MB-231; (3) linhagem tumoral Hs578T.

A presença das bandas descritas acima no SDS/PAGE confirmou a expressão das formas ativas e inativas de ambas as catepsinas B e L nas linhagens de câncer de mama MDA-MB-231 e Hs578T avaliadas. As bandas de

GAPDH apresentadas demonstraram que as amostras foram aplicadas em quantidades aproximadas.

## 8.2 - Avaliação dos Produtos Naturais em Inibição Enzimática Celular

Baseado na potência previamente apresentada (PARTE I) os seguintes flavonoides miricetina (**XV**) ( $IC_{50}$  4,9  $\mu$ M), quercetina (**I-SA**) ( $IC_{50}$  8,2  $\mu$ M) e kaempferol (**II-SA**) ( $IC_{50}$  15  $\mu$ M) foram selecionados para inibição da catepsina B celular em câncer de mama. Relatos na literatura descrevem biflavonoides como potentes inibidores da catepsina B humana (ZENG et al., 2006) e baseado nestes dados e devido a semelhança da classe estrutural optou-se também por avaliar os biflavonoides existentes no Laboratório de Produtos Naturais-UFSCar tais como agatisflavona (**XI-PN**), amentoflavona (**XII-PN**) e tetrahidrorobustaflavona (**XIII-PN**).

As substâncias foram avaliadas na dosagem de 100  $\mu$ M e os resultados obtidos sobre CTSB encontram-se descritos na Tabela 8.1.

TABELA 8.1 - Inibição dos flavonoides e biflavonoides sobre a catepsina B celular.

Inibidor (100 $\mu$ M)	Células tumorais (% inibição)	
	Hs578T	MDA-MB-231
<b>XV</b>	9,16	10,2
<b>I-SA</b>	8,36	9,4
<b>II-SA</b>	7,4	6,5
<b>XI-PN</b>	14,8	12,0
<b>XII-PN</b>	7,5	8,5
<b>XIII-PN</b>	15,7	13,8
<b>CA-074<sup>a</sup></b>	95,2	96,5

<sup>a</sup> Inibidor CA-074 (10  $\mu$ M) como controle positivo.

Na avaliação da inibição celular de CTSL em câncer de mama, os seguintes triterpenos provenientes do estudo biomonitorado (PARTE I) e existentes no laboratório foram selecionados baseados na potência previamente apresentada: ácido acetil ursólico (**IX**) ( $IC_{50}$  12,3  $\mu$ M ) e ácido 3-*epi*-ursólico (**X**) ( $IC_{50}$  6,5  $\mu$ M), ácido oleanólico oxima (**XXI**) ( $IC_{50}$  2,4  $\mu$ M ) e ácido masticadienólico oxima (**X-PN**) ( $IC_{50}$  2,6  $\mu$ M). Os resultados obtidos encontram-se descritos na Tabela 8.2.

TABELA 8.2 - Inibição dos triterpenos sobre a catepsina L celular.

Inibidor (100 $\mu$ M)	Células tumorais (% inibição)	
	Hs578T	MDA-MB-231
<b>IX</b>	12,5	10,5
<b>X</b>	5,7	8,4
<b>XXI</b>	16,0	13,7
<b>X-PN</b>	7,2	9,6
<b>E-64<sup>a</sup></b>	96,2	95,4

<sup>a</sup> Inibidor E-64 (10  $\mu$ M) como controle positivo.

Diante dos resultados obtidos para ambas as classes em inibição celular das proteases, podemos assumir que tais compostos mesmo apresentando moderada inibição nas enzimas isoladas não são capazes de inibir as proteases presentes no meio celular das linhagens de câncer de mama avaliadas. Este comportamento pode estar relacionado a diversos fatores tais como baixa afinidade pela enzima alvo, complexidade do meio celular ou até mesmo maior afinidade por outras enzimas presentes no meio. Mesmo com resultados pouco promissores o presente trabalho tinha como objetivo inicial realizar investigação mais detalhada dos inibidores naturais de CTSB e CTSL. Os dados obtidos indicam a baixa eficácia dos inibidores sobre as células tumorais e justifica por sua vez o não avanço para o ensaio de proteólise intracelular *in vitro* (modelo 3D).

### 8.3 - Avaliação dos Inibidores Sintéticos em Inibição Enzimática Celular

Encontram-se descritos na literatura diversos compostos sintéticos como potentes inibidores de cisteíno proteases. O grupo do Prof. Dr. Jeremy Kodanko (Departamento de Química-Wayne State University, Detroit-MI) trabalha com a síntese de compostos orgânicos e inorgânicos na busca por inibidores de proteases e na consequente ativação e potencialização da inibição enzimática pela reação de fotoativação. O composto **JK\_1** (Figura 8.3), inibidor da catepsina B, foi sintetizado pelo aluno de doutorado Rajopal Sharma de acordo com métodos previamente descritos na literatura (GREENSPAN, 2001).

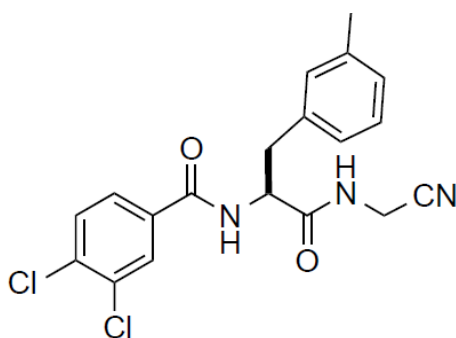


FIGURA 8.3 - Inibidor sintético dipeptídeo nitrila (substância **JK\_1**). Fórmula molecular:  $C_{19}H_{17}Cl_2N_3O_2$

A fim de se explorar o potencial inibitório desta substância, novas modificações estruturais foram realizadas, obtendo-se assim o composto **JK\_2**.

O composto **JK\_2** consiste no complexo de rutênio ligado a duas unidades do composto **JK\_1** e assim descrito como  $[Ru(bpy)_2(1)_2](BF_4)_2$ . Optou-se por este metal pelo fato de o rutênio apresentar excelentes propriedades fotorreativas e boa capacidade de complexação. Através da reação de fotoativação buscou-se uma estratégia para delimitar a ação dos inibidores como forma de obter uma melhor localização e controle do efeito terapêutico na região tumoral, diminuindo assim os efeitos adversos indesejáveis. Dessa forma os compostos foram avaliados sobre a catepsina B isolada para determinação da potência sob exposição da luz e escuro (Tabela 8.3).

TABELA 8.3 - Avaliação da potência (IC<sub>50</sub>) dos compostos sintéticos sobre a catepsina B humana purificada.

Enzima	IC <sub>50</sub> (μM)			escuro/ luz razão
	JK_1	JK_2 (escuro)	JK_2 (luz)	
<b>CTSB</b>	0,3 ± 0,02	3,4 ± 0,3	0,3 ± 0,01	12

Através dos dados apresentados percebeu-se que o inibidor **JK\_2** é menos ativo no escuro (IC<sub>50</sub> 3,4 μM) quando comparado ao composto exposto a radiação (IC<sub>50</sub> 0,3 μM), apresentando uma razão de 12:1 (Tabela 8.3). Os resultados obtidos estão de acordo com dados previamente descritos na literatura por Respondek e colaboradores e confirmaram que sob exposição da luz há liberação da molécula bioativa (peptídeo nitrila) que se liga ao grupamento tiol presente no sítio ativo enzimático (RESPONDEK et al., 2014).

Após confirmação da atividade inibitória sobre a enzima isolada seguiu-se para avaliação da inibição da CTSB celular presente nas linhagens MDA-MB-231 e Hs578T. O ensaio foi realizado nas mesmas condições descritas anteriormente (exposição da luz e escuro) (Tabela 8.4).

TABELA 8.4 - Avaliação da potência (IC<sub>50</sub>) dos compostos sintéticos sobre a catepsina B presente no lisado celular.

Lisado celular	IC <sub>50</sub> (μM)			escuro/ luz razão
	JK_1	JK_2 (escuro)	JK_2 (luz)	
<b>MDA-MB-231</b>	1,5 ± 0,1	125,8 ± 1,3	1,6 ± 0,2	79,6
<b>Hs578T</b>	0,9 ± 0,1	11,2 ± 0,9	0,9 ± 0,1	12,6

<sup>a</sup>Substrato sintético: Z-Arg-Arg-MCA (seletivo para CTSB).

Para este ensaio envolvendo a inibição da CTSB presente no lisado celular, deve-se obrigatoriamente utilizar o substrato Z-Arg-Arg-MCA que é

seletivo para CTSB. No lisado celular da linhagem MDA-MB-231 houve uma redução significativa da potência do inibidor **JK\_2** no escuro ( $IC_{50}$  125,8  $\mu$ M), apresentando uma razão de aproximadamente 80:1 (Tabela 8.4). Quando comparamos a potência entre o inibidor livre (**JK\_1**) e o complexado com rutênio (**JK\_2**) sob exposição da luz nota-se que os valores de  $IC_{50}$  mantiveram-se praticamente inalterados nas linhagens avaliadas. A avaliação dos resultados no lisado celular está de acordo com aqueles obtidos na presença da CTSB pura, confirmando assim a eficiência da estratégia de fotoativação do inibidor complexado com rutênio (II).

Após a determinação da potência dos inibidores sobre a CTSB presente no lisado celular, seguiu-se para avaliação da proteólise tumoral utilizando o modelo 3D. Com o objetivo de mimetizar o crescimento tumoral *in vivo*, utilizou-se os componentes da matriz extracelular tais como DQ-colágeno IV como substrato em substituição aos substratos sintéticos. Este modelo, como foi descrito anteriormente, permite avaliar e monitorar o comportamento das células vivas em tempo real.

#### **8.4 - Avaliação da Proteólise Tumoral *In Vitro* (Modelo 3D)**

Na avaliação do composto **JK\_1** (30  $\mu$ M) utilizando o modelo de proteólise 3D sobre as linhagens tumorais MDA-MB-231 (Figura 8.4) e Hs578T (Figura 8.5) foi possível visualizar inibição significativa da degradação do DQ-colágeno IV (painel C), através da redução da fluorescência (verde) quando comparado ao controle negativo (DMSO) representado pelo painel A.



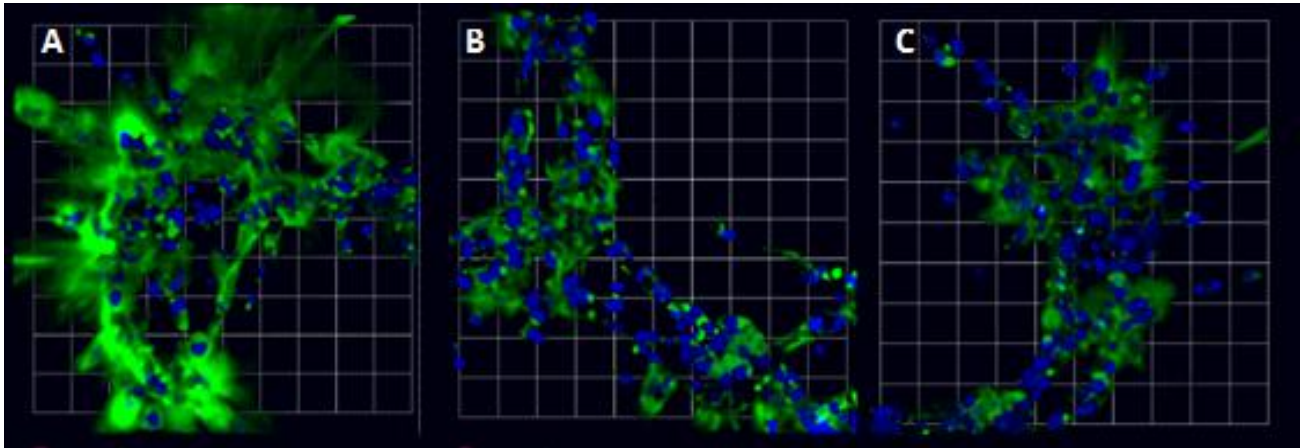


FIGURA 8.4 - Imagens em modelo 3D referente à degradação do DQ-colágeno IV pela linhagem de câncer de mama MDA-MB-231; Fluorescência em verde representa produtos de degradação do colágeno IV (25  $\mu\text{g/ml}$ ) e azul representa núcleos das células tumorais (corante Hoeschst 33342); (A) imagem controle negativo (DMSO); (B) imagem controle positivo (CA-074/ CA-074 Me (5  $\mu\text{M}$  cada)); (C) imagem inibidor **JK\_1** (30  $\mu\text{M}$ ). Cada unidade da imagem apresentada corresponde a 42.68  $\mu\text{m}$ . Amplificação: 20X.

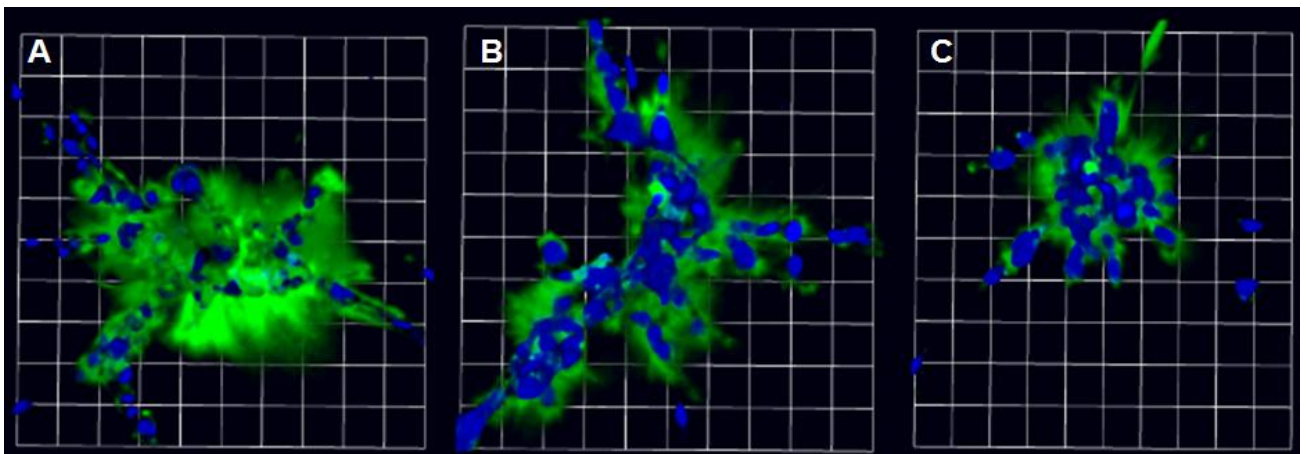


FIGURA 8.5 - Imagens em modelo 3D referente à degradação do DQ-colágeno IV pela linhagem de câncer de mama Hs578T; Fluorescência em verde representa produtos de degradação do colágeno IV (25  $\mu\text{g/ml}$ ) e azul representa núcleos das células tumorais (corante Hoeschst 33342); (A) imagem controle negativo (DMSO); (B) imagem controle positivo (CA-074/ CA-074 Me (5  $\mu\text{M}$  cada)); (C) imagem inibidor **JK\_1** (30  $\mu\text{M}$ ). Cada unidade da imagem apresentada corresponde a 42.68  $\mu\text{m}$ . Amplificação: 20X.

Além da obtenção das imagens, realizou-se também a quantificação do volume total de fluorescência por célula (Gráfico 8.1) presente em todas as imagens adquiridas e confirmou-se através dos valores obtidos a inibição da degradação do DQ-colágeno IV pela substância **JK\_1**. A degradação dos componentes da matriz extracelular tais como colágeno IV pelas proteases superexpressas nas células tumorais é fundamental para o processo de

progressão tumoral, sendo relacionada ao processo de migração e invasão tumoral.

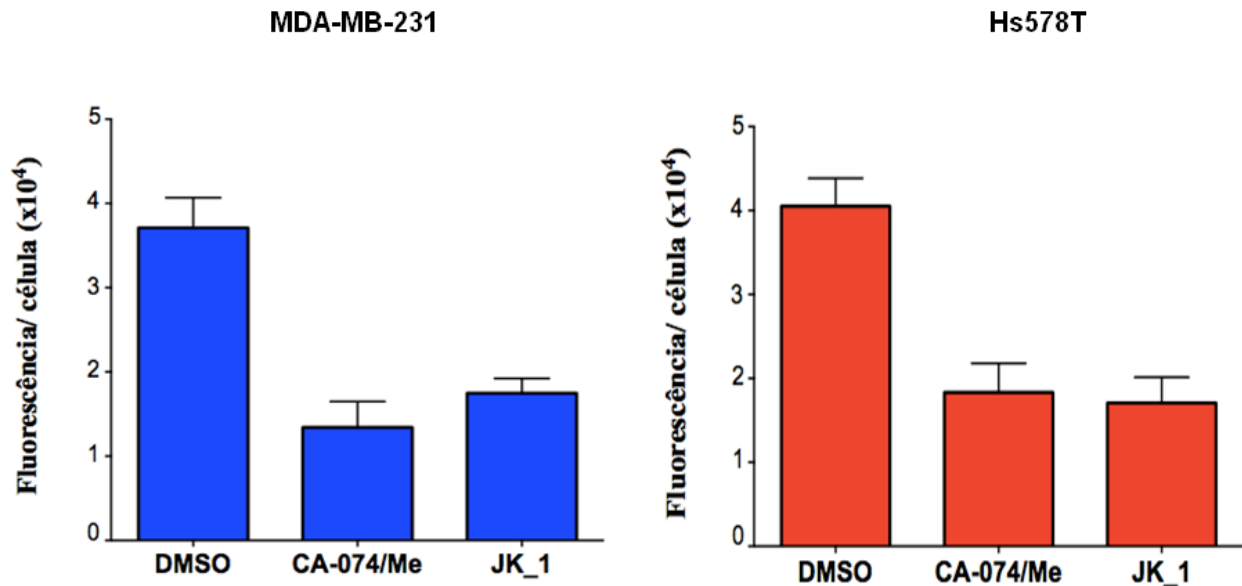


GRÁFICO 8.1 - Quantificação (fluorescência/célula) da degradação do DQ-colágeno IV pela substância **JK\_1** na presença das linhagens MDA-MB-231 e Hs578T; DMSO (controle negativo); CA-074/ CA-074 Me (5 µM cada).

A fragmentação do DQ-colágeno IV pode ocorrer de forma intracelular ou pericelular. Assim, através do modelo de proteólise foi possível estabelecer não só o volume total como também o local onde ocorre a degradação de colágeno. No Gráfico 8.2 observou-se uma redução significativa da proteólise pericelular na presença do inibidor **JK\_1** para ambas as linhagens avaliadas, enquanto a degradação intracelular permaneceu inalterada demonstrando assim que o composto utilizado não foi capaz de atravessar a parede celular, mas promoveu a inibição das proteases no modo extracelular.

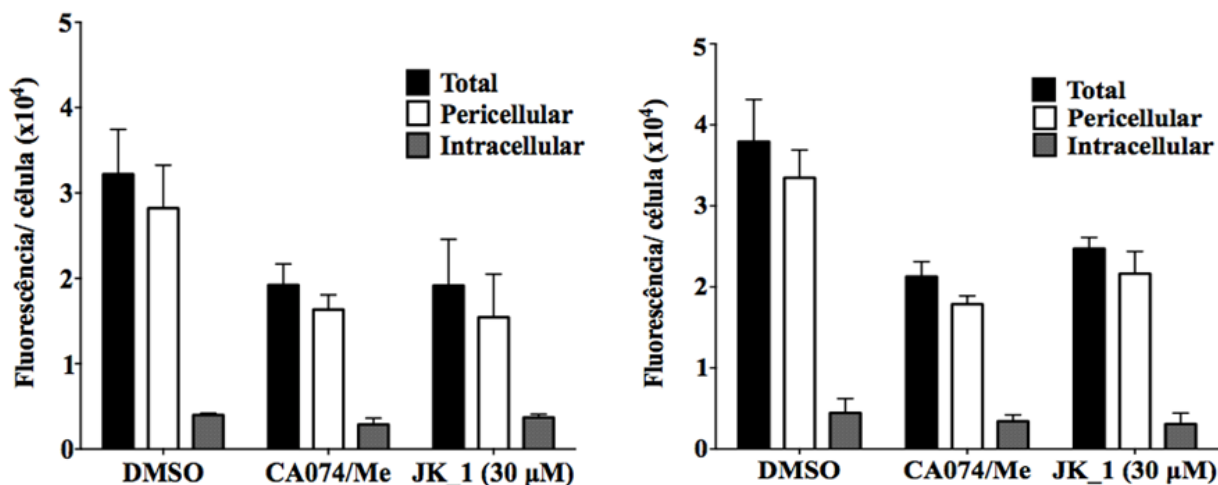


GRÁFICO 8.2 - Redução da degradação do DQ-colágeno IV total e pericelular pela substância **JK\_1** (30 μM) na presença das linhagens MDA-MB-231 e Hs578T; DMSO (controle negativo); CA-074/ CA-074 Me (5 μM cada).

Após a confirmação da atividade do composto livre (**JK\_1**) utilizando o modelo de proteólise tumoral em 3D seguiu-se para a avaliação do composto complexado com rutênio (**JK\_2**), sendo o ensaio realizado em ambas as condições sob exposição da luz e no escuro. Inicialmente avaliou-se a redução da degradação total de DQ-colágeno IV e a partir dos resultados obtidos pode-se perceber uma potencialização da atividade do inibidor complexado quando comparado ao inibidor livre sendo necessária uma menor concentração para obter o efeito esperado. Dessa forma, para os ensaios subsequentes o composto **JK\_2** foi utilizado na dosagem de 1 μM.

As Figuras 8.6 e 8.7 representam a inibição da degradação de DQ-colágeno IV pelo inibidor **JK\_2** nas linhagens MDA-MB-231 e Hs578T, respectivamente. Nota-se em ambas as figuras uma menor fluorescência (verde) no painel C onde o composto complexado com rutênio (II) foi mantido sob exposição da radiação, demonstrando assim a eficiência da reação de fotoativação.

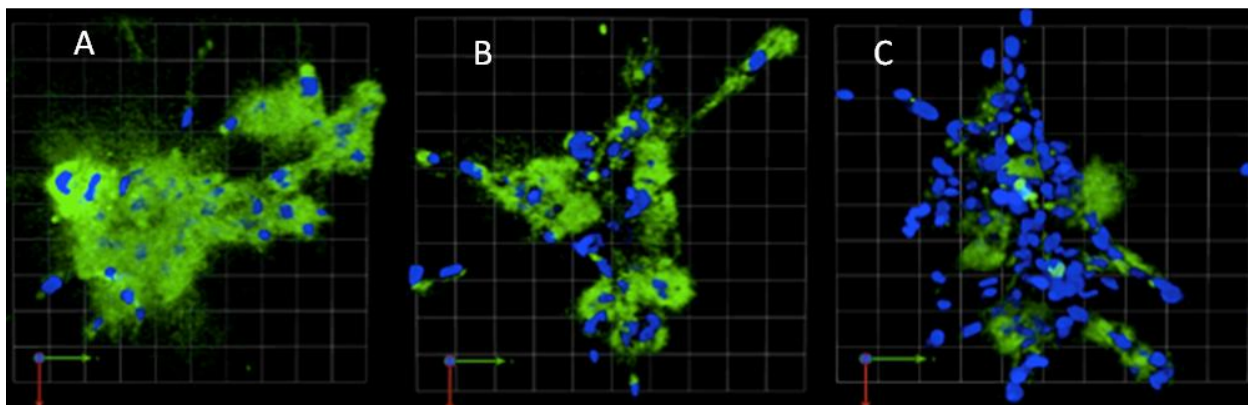


FIGURA 8.6 - Imagens em modelo 3D referente à degradação do DQ-colágeno IV pela linhagem de câncer de mama Hs578T; Fluorescência em verde representa produtos de degradação do colágeno IV (25  $\mu\text{g/ml}$ ) e azul representa núcleos das células tumorais (corante Hoeschst 33342); (A) imagem controle negativo (DMSO); (B) imagem inibidor **JK\_2** (1  $\mu\text{M}$ ) no escuro; (C) imagem inibidor **JK\_2** (1  $\mu\text{M}$ ) sob exposição da luz. Cada unidade da imagem apresentada corresponde a 42.68  $\mu\text{m}$ . Amplificação: 20X.

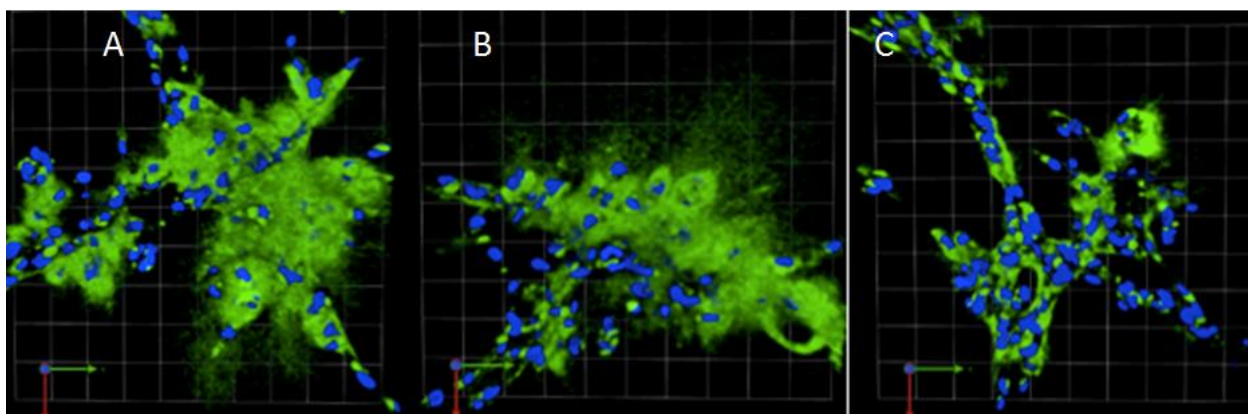


FIGURA 8.7 - Imagens em modelo 3D referente à degradação do DQ-colágeno IV pela linhagem de câncer de mama MDA-MB-231; Fluorescência em verde representa produtos de degradação do colágeno IV (25  $\mu\text{g/ml}$ ) e azul representa núcleos das células tumorais (corante Hoeschst 33342); (A) imagem controle negativo (DMSO); (B) imagem inibidor **JK\_2** (1  $\mu\text{M}$ ) no escuro; (C) imagem inibidor **JK\_2** (1  $\mu\text{M}$ ) sob exposição da luz. Cada unidade da imagem apresentada corresponde a 42.68  $\mu\text{m}$ . Amplificação: 20X.

Após obtenção das imagens, realizou-se a quantificação dos resultados obtidos e confirmou-se a maior inibição da proteólise sob exposição da radiação quando comparado com o escuro (Gráfico 8.3).

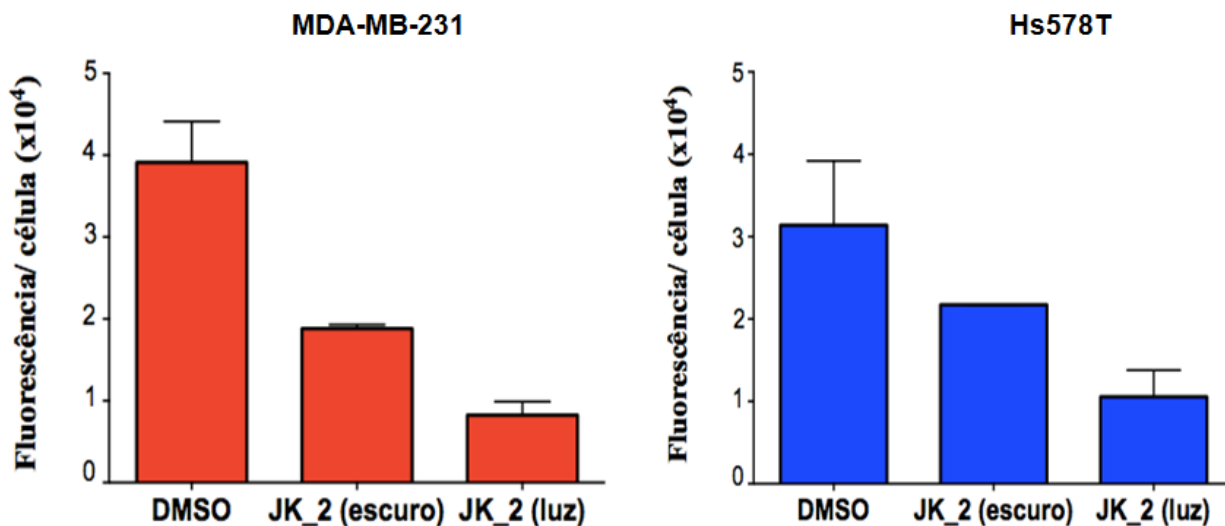


GRÁFICO 8.3 - Quantificação (fluorescência/célula) da degradação do DQ-colágeno IV pela substância **JK\_2** na presença das linhagens MDA-MB-231 e Hs578T; DMSO (controle negativo).

Experimentos controle realizados com complexo *cis*-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(MeCN)<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> na concentração de 1  $\mu$ M demonstraram que este não é capaz de inibir a fragmentação do DQ-colágeno IV. Como pode ser observado na Figura 8.8 e na quantificação dos dados (Gráfico 8.4), os níveis de fluorescência (verde) se mantiveram elevados nas linhagens celulares avaliadas com valores próximos aqueles apresentados pelo controle negativo (painel A). Pode-se afirmar então que o complexo de rutênio não interfere na proteólise tumoral. Os resultados aqui apresentados estão de acordo com dados descritos na literatura por RESPONDEK et al., (2014) e ZAYAT et al., (2007) onde relatam que complexo de rutênio não apresenta toxicidade em estudos envolvendo inibidor da catepsina K e neurotransmissor GABA, respectivamente (RESPONDEK et al., 2014; ZAYAT et al., 2007).



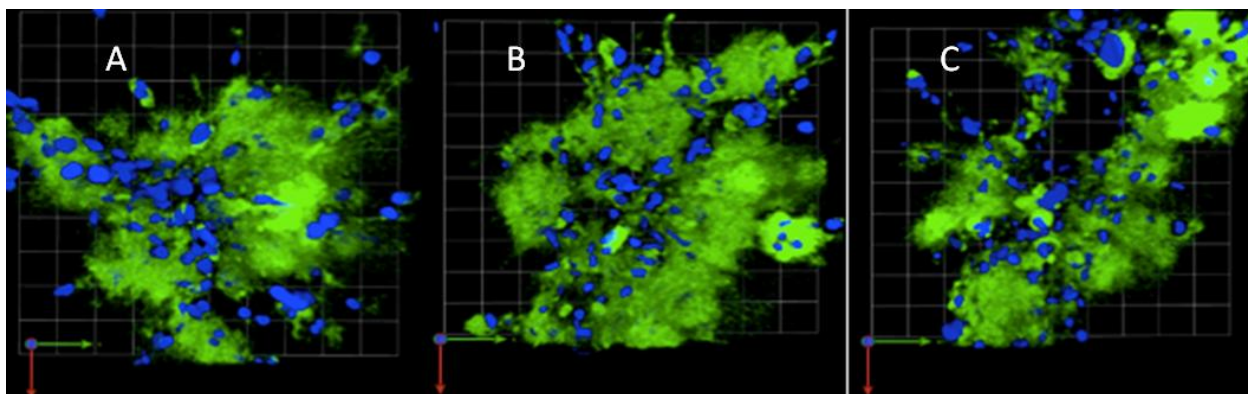


FIGURA 8.8 - Imagens em modelo 3D referente à degradação do DQ-colágeno IV pela linhagem de câncer de mama MDA-MB-231; Fluorescência em verde representa produtos de degradação do colágeno IV (25 µg/ml) e azul representa núcleos das células tumorais (corante Hoeschst 33342); (A) imagem controle negativo (DMSO); (B) imagem do complexo cis-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(MeCN)<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> (1 µM) no escuro; (C) imagem do complexo cis-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(MeCN)<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> (1 µM) sob exposição da luz. Cada unidade da imagem apresentada corresponde a 42.68 µm. Amplificação: 20X.

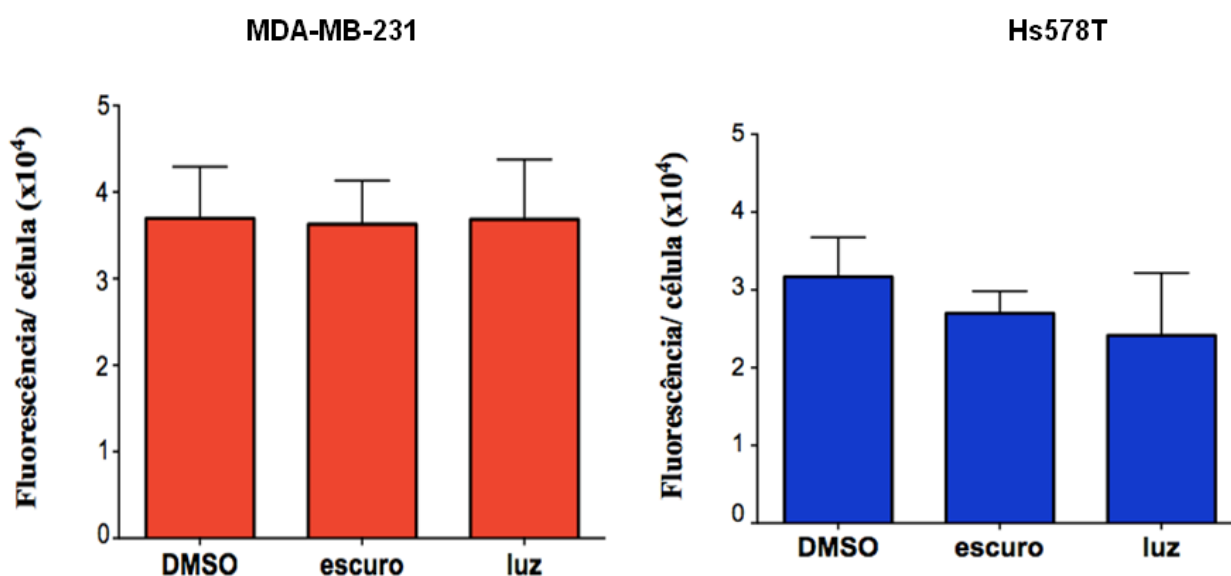


GRÁFICO 8.4 - Quantificação (fluorescência/célula) da degradação do DQ-colágeno IV pelo complexo cis-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(MeCN)<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> na presença das linhagens MDA-MB-231 e Hs578T; DMSO (controle negativo).

Após avaliação da proteólise tumoral *in vitro* e confirmação da eficiência da reação de fotoativação como estratégia eficaz na busca por inibidores de proteases, foram realizados ensaios de viabilidade celular através do modelo 3D para verificar a citotoxicidade do composto **JK\_2** sobre as linhagens de câncer de mama. Neste ensaio foram utilizados componentes que permitem distinguir entre as células vivas e as células mortas. Assim quando as

células permanecem vivas ocorrem emissão da fluorescência verde, pois a calceína AM acrescentada ao meio celular é clivada pelas esterases intracelulares, entretanto quando ocorre morte celular o ethidium homodimer-1 se liga ao DNA e emite fluorescência vermelha.

As Figuras 8.9 e 8.10 apresentaram fluorescência verde, indicando que o inibidor **JK\_2** não apresentou citotoxicidade sobre as linhagens de câncer de mama avaliadas.

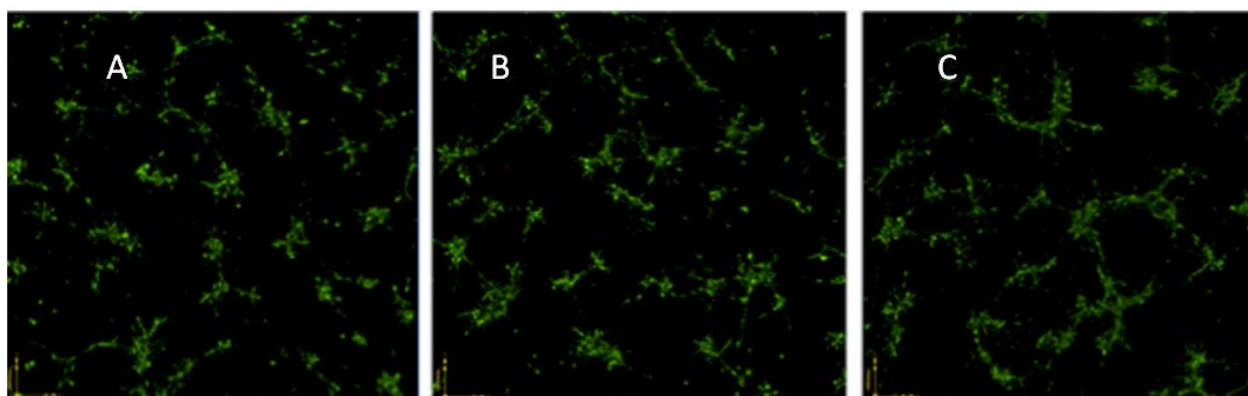


FIGURA 8.9 - Imagens em modelo 3D referente ao ensaio de viabilidade celular na linhagem MDA-MB-231; Fluorescência verde (2  $\mu$ M calcein AM) refere-se as células vivas e fluorescência vermelha (4  $\mu$ M ethidium homodimer-1) refere-se as células mortas; (A) imagem controle negativo (DMSO); (B) imagem inibidor **JK\_2** (1  $\mu$ M) no escuro; (C) imagem inibidor **JK\_2** (1  $\mu$ M) sob exposição da luz. Amplificação: 10X.

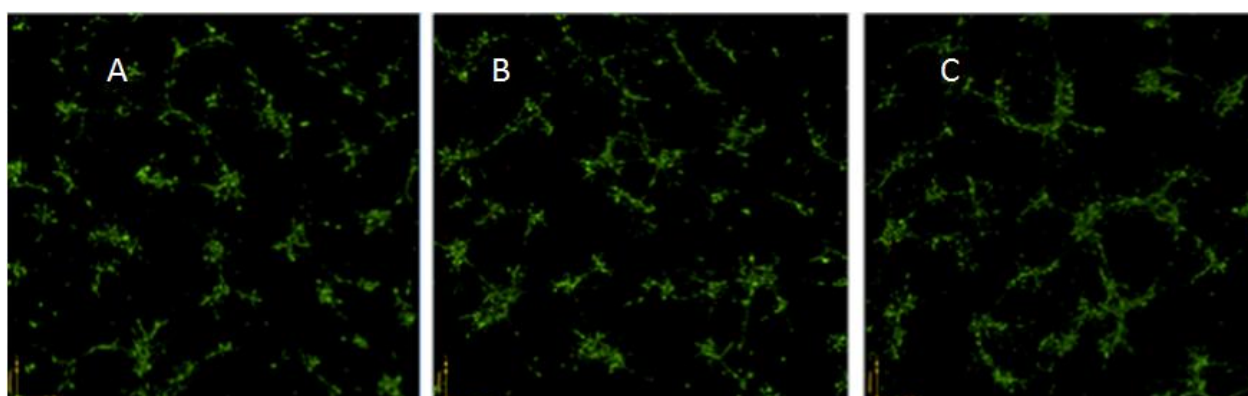


FIGURA 8.10 - Imagens em modelo 3D referente ao ensaio de viabilidade celular na linhagem Hs578T; Fluorescência verde (2  $\mu$ M calcein AM) refere-se as células vivas e fluorescência vermelha (4  $\mu$ M ethidium homodimer-1) refere-se as células mortas; (A) imagem controle negativo (DMSO); (B) imagem inibidor **JK\_2** (1  $\mu$ M) no escuro; (C) imagem inibidor **JK\_2** (1  $\mu$ M) sob exposição da luz. Amplificação: 10X.

Deste modo, os resultados da reação de fotoativação de moléculas bioativas e avaliação da protéólise tumoral *in vitro* se apresentaram como uma estratégia eficaz na busca por inibidores de proteases. Esses experimentos demonstraram redução da degradação de DQ-colágeno IV estando de acordo com os resultados obtidos na avaliação enzima pura e lisado celular e também baixa toxicidade do inibidor complexado ao rutênio. Então, através deste ensaio é possível realizar uma avaliação mais adequada da atuação dos inibidores antes de serem encaminhados para testes *in vivo* utilizando animais.



## 9 - CONCLUSÕES

A realização deste trabalho trouxe informações relevantes no âmbito da química de produtos naturais assim como no estudo enzimático voltado para busca de inibidores de proteases envolvidas no processo tumoral.

Através do estudo biomonitorado das plantas do cerrado foi possível investigar as substâncias bioativas presentes na espécie *Myrcia lingua* Berg., planta que ainda não possui estudo fitoquímico descrito na literatura.

A partir do extrato bruto ativo em ambas catepsinas B e L, foi possível isolar inibidores da CTSL (triterpenos) presentes na fração hexânica do caule e inibidores da CTSB (flavonoides) presentes na fração acetato da folha.

Modificações estruturais que permitiram a identificação de inibidores promissores sobre as catepsinas B e L, sendo que pela primeira vez os triterpenos foram isolados foram identificados como inibidores competitivos da CTSL.

Ambos os esqueletos ursano e oleanano inibiram CTSL e os valores de  $IC_{50}$  obtidos demonstraram a importância do grupo ácido carboxílico (posição C-28) para inibição enzimática. Observou-se também que modificações estruturais na posição C-3 do esqueleto resultaram em compostos mais potentes sobre CTSL.

Flavonoides poli-hidroxilados foram identificados como inibidores incompetitivos da CTSB e observou-se também que o número de hidroxilas presentes no anel B dos flavonoides exerce grande influência sobre a potência.

Os resultados obtidos envolvendo reação de fotoativação de moléculas bioativas e avaliação da proteólise tumoral *in vitro* se apresentaram como uma estratégia eficaz na busca por inibidores de proteases.

Através do modelo de proteólise tumoral *in vitro* (3D) foi possível estabelecer a quantificação total assim como localização intracelular e

extracelular dos produtos fluorescentes provenientes da degradação do DQ-colágeno IV.

Os ensaios proteolíticos utilizados mimetizam crescimento tumoral *in vivo* e permitiram uma avaliação mais adequada da atuação dos inibidores de protease antes de serem encaminhados para testes *in vivo* utilizando animais.

Desse modo, os estudos desenvolvidos neste trabalho permitiram a identificação de inibidores naturais assim como realização de ensaios enzimáticos e proteolíticos que pudessem contribuir no desenvolvimento de novos protótipos de fármacos para estudos posteriores envolvendo proteases que atuam no processo cancerígeno.

Adicionalmente, como resultados obtidos da conclusão deste trabalho foram publicados dois artigos e um terceiro encontra-se em fase de submissão:

Ramalho, S. D.; de Sousa, L. R. F.; Burger, M. C. M.; Lima, M. I. S.; da Silva, M. F. G. F.; Fernandes, J. B. & Vieira, P. C. “Evaluation of flavonol and derivatives as human cathepsin B inhibitor”. *Natural Product Research*, 2015. (DOI:10.1080/14786419.2014.1002404).

Ramalho, S. D.; de Sousa, L. R. F.; Nebo, L.; Maganhi, S. H.; Caracelli, I.; Zukerman-Schpector, J.; Lima, M. I. S.; Alves, M. F. M.; da Silva, M. F. G. F.; Fernandes, J. B. & Vieira, P. C. “Triterpenoids as Novel Natural Inhibitors of Human Cathepsin L”. *Chemistry & Biodiversity*, 11: 1354, 2014.

Artigo submetido:

Ramalho, S. D.; Sharma, R.; Aggarwal, N.; Chalasani, A.; Sameni, M.; Vieira, P. C.; Knoll, J.; Turro, C.; Kodanko, J. J. & Sloane, B. F. “Visualizing inhibition of proteolysis by a light-activated ruthenium compound in live breast cancer cells”. *ACS Chemical Biology*, 2015.

## 10 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, P. K. *Carbon-13 NMR of Flavonoids*. Amsterdam, Elsevier Sc. Publishers, 1989. p. 444.

AGGARWAL, N. & SLOANE, B. F. “Cathepsin B: multiple roles in cancer”. *Proteomics Clin. Appl.*, **8**: 427, 2014.

American Cancer Society (ACS). Acesso em: Abril, 2014.  
<http://www.cancer.org/cancer/cancerbasics/what-is-cancer>

ANDERSON, K.N.; SCHWAB, R. B. & MARTINEZ, M. E. “Reproductive risk factors and breast cancer subtypes: a review of the literature”. *Breast Cancer Res. Treat.*, **144**: 1, 2014.

AROT, L. O. M.; MIDIWO, J. O. & KRAUS, W. “A flavonol glycoside from *Myrsine africana* leaves”. *Phytochemistry*, **43**: 1107, 1996.

ASADUL, M. H.; FARHANA, M. I.; & ISA, N. M. “Cathepsin K inhibitors: a novel target but promising approach in the treatment of osteoporosis”. *Curr. Drug Targets*, **14**: 1591, 2013.

BAKER, D. D.; CHU, M.; OZA, U. & RAJGARHIA, V. “The value of natural products to future pharmaceutical discovery”. *Nat. Prod. Rep.*, **24**: 1225, 2007.

BATISTA, A. N. L.; COLOMBO, R.; PASCOLI, I. C.; TELES, H. L.; SILVA, G. H.; BOMFIM, G. C. C.; BURGOS, R. C. R.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; SILVA, D. H. S. & REIMBERG, M. C. H. “Development and validation of a HPLC method for standardization of herbal and commercial extracts of *Myrcia uniflora*”. *Rev. Bras. Farmacog.*, **21**: 402, 2011.

BERDOWSKA, I. “Cysteine proteases as disease markers”. *Clin. Chim. Acta*, **342**: 41, 2004.

BOONEN, S.; ROSENBERG, E.; CLAESSENS, F.; VANDERSCHUEREN, D. & PAPAPOULOS, S. “Inhibition of cathepsin K for treatment of osteoporosis”. *Curr. Osteoporos. Rep.*, **10**: 73, 2012.

BROMME, D. & LECAILLE, F. “Cathepsin K inhibitors for osteoporosis and potential off-target effects”. *Expert Opin. Investig. Drugs*, **18**: 585, 2009.

CERQUEIRA, M. D.; SOUZA-NETA, L. C.; PASSOS, M. G. V. M.; LIMA, E. O.; ROQUE, N. F.; MARTINS, D.; GUEDESC, M. L. S. & G. CRUZ, F. G.

“Seasonal variation and antimicrobial activity of *Myrcia myrtifolia* essential oils”. *J. Braz. Chem. Soc.*, **18**: 998, 2007.

CESLA, P.; BLOMBERG, L.; HAMBERG, M. & JANDERA, P. “Characterization of anacardic acids by micellar electrokinetic chromatography and mass spectrometry”. *J. Chromatography A*, **1115**: 253, 2006.

CHEN, Z. C.; LI, G.; XIANG, Z. Z. & ZHAN, L. C. “Triterpenes from *Callicarpa integerrima* Champ”. *Acta Pharm Sinic.*, **47**: 77, 2012.

CHIOREAN, R.; BRAICU, C. & NEAGOE, I. B. “Another review on triple negative breast cancer. Are we on the right way towards the exit from the labyrinth?” *The Breast*, **22**: 1026, 2013.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V. & COLLINS, T. *Patologia Estrutural e Funcional*. 6. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan S.A, 2000.

COPELAND, R. A. *Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery*. New Jersey, Wiley, 2005.

CORSE, J. & LUNDIN, R. E. “Diastereomers of quinic acid: Chemical and nuclear magnetic resonance studies”. *J. Org. Chem.*, **35**: 1904, 1970.

CORSE, J.; LUNDIN, R. E.; SONDHEIMER, E. & WAISS, Jr. A. C. “Conformation analyses of D-(-) quinic acid and some of its derivatives by nuclear magnetic resonance”. *Phytochemistry*, **5**: 767, 1966.

COSTA, A. G.; CUSANO, N. E.; SILVA, B. C.; CREMERS, S. & BILEZIKIAN, J. P. “Cathepsin K: its skeletal actions and role as a therapeutic target in osteoporosis”. *Nat. Rev. Rheumatol.*, **7**: 447, 2011.

CRAGG, G. M. & NEWMAN, D. J. “Natural products: a continuing source of novel drug leads”. *Biochim. Biophys. Acta*, **1830**: 3670, 2013.

CRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G. & NEWMAN, D. J. “Impact of natural products on developing new anti-cancer agents”. *Chem. Rev.*, **109**: 3012, 2009.

EDWARDS, D. & MURPHY, G. “Proteases-invasion and more”. *Nature*, **394**: 527, 1998.

ENGERS, R. & GABBERT, H. E. “Mechanisms of Tumor Metastasis: Cell Biological Aspects and Clinical Implications”. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **126**: 682, 2000.

EREZ, E.; FASS, D. & BIBI, E. “How intramembrane proteases bury hydrolytic reactions in the membrane”. *Nature*, **459**: 371, 2009.

FRLAN, R. & GOBEC, S. "Inhibitors of cathepsin B". *Cur. Med. Chem.*, **13**: 2309, 2006.

GARCÍA-GRANADOS, A.; LÓPEZ, P. E.; MELGUIZO, E.; MOLIZ, J. N.; PARRA, A.; SIMEÓ, Y. & DOBADO, J. A. "Epoxides, cyclic sulfites, and sulfate from natural pentacyclic triterpenoids: theoretical calculations and chemical transformations". *J. Org. Chem.*, **68**: 4833, 2003

GIBBS, P. & SASSAKI, R. "Reproductive biology of *Dalbergia miscolobium* Benth. (Leguminosae-Papilionoideae) in SE Brazil: the effects of pistillate sorting on fruit-set". *Ann. Botany.*, **81**: 735, 1998.

GOMES, R. C.; BONAMIM, F.; DARIN, D. D.; SEITO, L.N.; DI STASI, L. C.; DOKKEDAL, A. L.; VILEGAS, W.; SOUZA, A. R. & HIRUMA-LIMA, C. A. "Antioxidative action of methanolic extract and buthanolic fraction of *Vochysia tucanorum* Mart. in the gastroprotection". *J. Ethnopharmacol.*, **121**: 466, 2009.

GONÇALVES, B. M. F.; LEAL, A. S.; JING, Y.; SALVADOR, J. A. R. & MOREIRA, V. A. "Ursane-type pentacyclic triterpenoids as useful platforms to discover anticancer drugs" *Nat. Prod. Rep.*, **29**: 1463, 2012.

GOVAERTS, R., M.; SOBRAL, P.; ASHTON, F. B.; B. K. HOLTS, L. R.; LANDRUM, K.; MATSUMOTO, F. F.; MAZINE, E.; LUGHADHA, C.; PROENCA, L. H.; SOARES-SILVA, P. G. & WILSON, E. L. "World checklist of Myrtaceae". The board of trustees of the royal botanic gardens, Kew. Acesso em: 10 de dezembro, 2012. <http://www.kew.org/wcsp/>

GRASSI, R. F.; RESENDE, U. M.; SILVA, W.; MACEDO, M. L. R.; BUTERA, A. P.; TULLI, E. O.; SAFFRAN, F. P. & SIQUEIRA, J. M. "Estudo fitoquímico e avaliação alelopática de *Memora peregrina*-"ciganinha"- Bignoniaceae, uma espécie invasora de pastagens em Mato Grosso do Sul". *Quím. Nova*, **28**: 199, 2005.

GREENSPAN, P. D.; CLARK, K. L.; TOMMASI, R. A.; COWEN, S. D.; MCQUIRE, L. W.; FARELY, D. L.; VAN DUZER, J. H.; GOLBERG, R. L.; ZHOU, H.; DU, Z.; FITT, J. J.; COPPA, D. E; FANG, Z.; MACCHIA, W.; ZHU, L.; CAPPARELLI, M. P.; GOLDSTEIN, R.; WIGG, A. M.; DOUGHTY, J. R.; BOHACEK, R. S. & KNAP, A. K. "Identification of dipeptidyl nitriles as potent and selective inhibitors of cathepsin B through structure-based drug design". *J. Med. Chem.*, **44**: 4524, 2001.

GUINEC, N.; DALET-FUMERON, V. & PAGANO, M. "Quantitative study of the binding of cysteine proteinases to basement membranes". *FEBS Letters*, **24**: 305, 1992.

- GUVENALP, Z.; OZBEK, H.; KURUUZUM-UZ, H.; KAZAZ, C. & DEMIREZER, L. O. "Secondary metabolites from *Nepeta heliotropifolia*". *Turkish J. Chem.*, **33**: 667, 2009.
- HARBORNE, J. B. & WILLIAMS, C. "Advances in flavonoid research since 1992". *Phytochemistry*, **55**: 481, 2000.
- HASHIMOTO, Y.; KONDO, C.; KOJIMA, T.; NAGATA, H.; MORIYAMA, A.; HAYAKAWA, T. & KATUNUMA, N. "Significance of 32-kDa cathepsin L secreted from cancer cells". *Cancer Biother. Radiopharm.*, **21**: 217, 2006.
- HASLAM, E. & TURNER, M. J. "The shikimate pathway. Part II. Conformational analysis of (-)-quinic acid and its derivatives by proton magnetic resonance spectroscopy". *J. Chem. Soc.*, 1496, 1971.
- HONGJUAN, L.; YINGGANG, L.; ZHIHENG, H. & GUOLIN, Z.; "Chemical Constituents from *Lonicera saccata*". *Chinese J. Appl. Environ. Biol.*, **13**: 188, 2007.
- HOOK, V.; HOOK, G. & KINDY, M. "Pharmacogenetic features of cathepsin B inhibitors that improve memory deficit and reduce  $\beta$ -amyloid related to Alzheimer's disease". *J. Biol. Chem.*, **391**: 861, 2010.
- IACOBUZIO-DONAHUE, C. A., SHUJA, S., CAI, J., PENG, P. & MURNAME, M. J. "Elevations in cathepsin B protein content and enzyme activity occur independently of glycosylation during colorectal tumor progression". *J. Biol. Chem.*, **272**: 29290, 1997.
- Instituto Nacional do Câncer (INCA). Acesso em: Abril, 2014.  
[http://www1.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=322](http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322)
- ISHARA, K. L.; DÉSTRO, G. F. G.; MAIMONI-RODELLA, R. C. S. & YANAGIZAWA, Y. A. N. P. "Composição florística de remanescente de cerrado *sensu stricto* em Botucatu, SP". *Braz. J. Botany*, **314**: 575, 2008.
- JEDESZKO, C.; SAMENI, M.; OLIVE, M.; MOIN, K. & SLOANE, B. F. "Visualizing protease activity in living cells: From two dimensions to four dimensions". IN: *Curr. Protoc. Cell. Biol.* John Wiley & Sons, 2008. cap. 4, unid 4.20.
- KATUNUMA, N.; TSUGE, H.; NUKATSUKA, M. & FUKUSHIMA, M. "Structure-based development of cathepsin L inhibitors and therapeutic applications for prevention of cancer metastasis and cancer-induced osteoporosis". *Advan. Enz. Regul.*, **42**: 159, 2002.

- KUO, Y. H. & LIN, H. Y. "Two novel triterpenes from the leaves of *Ficus microcarpa*". *Helvet. Chim. Acta*, **87**: 1071, 2004.
- LAGO, J. H. G.; CARVALHO, L. A. C.; da SILVA, F. S.; TOYAMA, O. D.; FÁVERO, O. A. & ROMOFF, P. "Chemical composition and anti-inflammatory evaluation of essential oils from leaves and stem barks from *Drimys brasiliensis* Miers (Winteraceae)". *J. Braz. Chem. Soc.*, **21**: 1760, 2010.
- LAHLOU, M. "The success of natural products in drug discovery". *Pharmacol. Pharm.*, **4**: 17, 2013.
- LANKELMA, J. M.; VOOREND, D. M.; BARWARI, T.; KOETSVELD, J.; SPEK, A. H. V.; DE PORTO, A. P. N. A.; ROOIJEN, G. V. & NOORDEN, C. J. F. V. "Cathepsin L, target in cancer treatment?". *Life Sci.*, **86**: 225, 2010.
- LECAILLE, F.; KALETA, J. & BROMME, D. "Human and parasitic papain-like cysteine proteases: their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design". *Chem. Rev.*, **102**: 4459, 2002.
- LEE, I. R. & YANG, M. Y. "Phenolic compounds from *Duchesnea chrysantha* and their cytotoxic activities in human cancer cell". *Arch. Pharm. Res.*, **17**: 476, 1994.
- LEE, S.; KIM, B. K.; CHO, S. H. & SHIN, K. H. "Phytochemical constituents from the fruits of *Acanthopanax sessiliflorus*". *Arch. Pharm. Res.*, **25**: 280, 2002.
- LETO, G.; SEPPORTA, M. V.; CRESCIMANNO, M.; FLANDINA, C. & TUMMINELLO, F. M. "Cathepsin L in metastatic bone disease: therapeutic implications". *Biol. Chem.*, **391**: 655, 2010.
- LEVICAR, N.; KOS, J.; BLEJEC, A.; GOLOUH, R.; VRHOVEC, I.; FRKOVIC-GRAZIO, S. & LAH, T. T. "Comparison of potential biological markers cathepsin B, cathepsin L, stefin A and stefin B with urokinase and plasminogen activator inhibitor-1 and clinicopathological data of breast carcinoma patients". *Cancer Detec. Prev.*, **26**: 42, 2002.
- LIMBERGER, R. P.; SOBRAL, M. & HENRIQUES, A. T. "Óleos voláteis de espécies de *Myrcia* nativas do Rio Grande do Sul". *Quím. Nova*, **27**: 916, 2004.
- LINNEVERS, C. J.; McGRATH, M. E.; ARMSTRONG, A.; MISTRY, F. R.; BARNES, M. G.; KLAUS, J. L.; PALMER, J. T.; KATZ, B. A. & BROMME, D. "Expression of human cathepsin K in *Pichia pastoris* and preliminary crystallographic studies of an inhibitor complex". *Protein Sci.*, **6**: 919, 1997.

MACABEO-ONG, M.; SHIBOSKIA, C. H.; SILVERMANA, S.; GINZINGERB, D. G.; DEKKERA, N.; WONGE, D. T. W. & JORDAN, R. C. K. “Quantitative analysis of cathepsin L mRNA and protein expression during oral cancer progression”. *Oral Oncol.*, **39**: 638, 2003.

MAGANHI, S. *Estudos estruturais de compostos de telúrio e de docking em catepsinas B, K, L e S*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2013. Tese de Doutorado, 117 p.

MAHMOUD, I. I.; MARZOUK, M. S. A.; MOHARRAM, F. A.; EL-GINDI, M. R. & HASSAN, A. M. K. “Acylated flavonol glycosides from *Eugenia jambolana* leaves”. *Phytochemistry*, **58**: 1239, 2001.

MASON, R. W.; GREEN, G. D. J. & BARRET, A. J. “Human liver cathepsin L”, *Biochem. J.* **226**: 233, 1985.

Ministério do Meio Ambiente (MMA). Acesso em: dezembro, 2014.  
<http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>

MOHAMED, M. M. & SLOANE, B. F.; “Cysteine cathepsin: multifunctional enzymes in cancer”. *Nat. Rev. Cancer*, **6**: 764, 2006.

MOIN, K.; CAO, L. DAY, N. A.; KOBLISKI, J. E. & SLOANE, B. F. “Tumor cell membrane cathepsin B”. *Biol. Chem.*, **379**: 1093, 1998.

MOIN, K.; DAY, N. A.; SAMENI, M.; HASNAIN, S.; HIRAMA, T. & SLOANE, B. F. “Human tumour cathepsin B: comparison with normal liver cathepsin B”. *Biochem. J.*, **285**: 427, 1992.

NELSON, D. L. & COX, M. M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. 5ª ed. Porto Alegre, Artmed, 2011.

NISBEST, L. J. & MOORE, M. “Will natural products remain an important source of drug research for the future?” *Curr. Opin. Biotech.*, **8**: 708, 1997.

OTTO, H. H. & SCHIRMEISTER, T. “Cysteine proteases and their inhibitors”. *Chem. Rev.*, **97**: 133, 1997.

PALERMO, C. & JOYCE, J. A. “Cysteine cathepsin proteases as pharmacological targets in cancer”. *Trends Pharmacol. Sci.*, **29**: 22, 2007.

PAN, X.; TAN, N.; ZENG, G.; ZHANG, Y. & JIA, R. “Amentoflavone and its derivatives as novel natural inhibitors of human cathepsin B”. *Bioorg. Med. Chem.*, **13**: 5819, 2005.



PAULI, G. F.; POETSCH, F. & NAHRSTEDT, A. "Structure assignment of natural quinic acid derivatives using proton nuclear magnetic resonance techniques". *Phytochem. Anal.*, **9**: 177, 1998.

PIZZOLATTI, M. G.; CUNHA, A.; SZPOGANICZ, B. & SOUSA, E. "Flavonoides glicosilados das folhas e flores de *Bauhinia forficata* (Leguminosae)". *Quim. Nova.*, **26**: 466, 2003.

RAMALHO, S. D.; DE SOUSA, L. R. F.; NEBO, L.; MAGANHI, S. H.; CARACELLI, I.; ZUKERMAN-SCHPECTOR, J.; LIMA, M. I. S.; ALVES, M. F. M.; DA SILVA, M. F. G. F.; FERANDES, J. B. & VIEIRA, P. C. "Triterpenoids as Novel Natural Inhibitors of Human Cathepsin L". *Chem. Biodivers.*, **11**: 1354, 2014.

REISER, J.; ADAIR, B. & REINHECKEL, T. "Specialized roles for cysteine cathepsins in health and disease". *J. Clin. Investig.*, **10**: 3421, 2010.

REN, X. F.; LI, H. W.; FANG, X.; WU, Y.; WANG, L. & ZOU, S. "High selective azadipeptide nitrile inhibitors for cathepsin K: design, synthesis and activity assay". *Org. Biomol. Chem.*, **11**: 1143, 2013.

RESPONDEK, T.; SHARMA, R.; HERRON, M. K.; GARNER, R. N.; KNOLL, J. D.; CUENY, E.; TURRO, C.; PODGORSKI, I. & KODANKO, J. J. "Inhibition of cathepsin activity in a cell-based assay by a light-activated ruthenium compound". *Chem. Med. Chem.*, **9**: 1306, 2014.

RITONJA, A.; COLIDC, A.; DOLENC, I.; OGRINC, T.; PODOBNIK, M. & TURK, V. "The complete amino acid sequence of bovine cathepsin S and a partial sequence of bovine cathepsin L". *FEBS Letters*, **283**: 329, 1991.

RUIJTER, T. C.; VEECK, J.; HOON, J. P. J.; ENGELAND, M. V. & TJAN-HEIJNEN, V. C. "Characteristics of triple-negative breast cancer". *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **137**: 183, 2011.

SAMENI, M.; DOSESCU, J.; MOIN, K. & SLOANE, B. F. "Functional imaging of proteolysis: stromal and inflammatory cells increase tumor proteolysis". *Mol. Imaging*, **2**:1, 2003.

SAMENI, M.; ANBALAGAN, S.; OLIVE, M. B.; MOIN, K.; MATTINGLY, R. & SLOANE, B. F. "MAME models for 4D live-cell imaging of tumor: microenvironment interactions that impact malignant progression". *J. Vis. Exp.*, **60**: 3661, 2012.

SAMENI, M.; CAVALLO-MEDVED, D.; DOSESCU, J.; JEDEZKO, C.; MOIN, K.; MULLINS, S. R.; OLIVE, M. B.; RUDY, D. & SLOANE, B. F.

- “Imaging and quantifying the dynamics of tumor-associated proteolysis”. *Clin. Exp. Metastasis*, **26**: 299, 2009.
- SAMENI, M.; MOIN, K. & SLOANE, B. F. “Imaging proteolysis by living human breast cancer cell”. *Neoplasia*, **6**: 496, 2000.
- SANTOS, P. M. L.; SCHRIPSEMA, J. & KUSTER, R. M. “Flavonoides O-glicosilados de *Croton campestris* St. Hill. (Euphorbiaceae)”. *Rev. Bras. Farmacogn.*, **15**: 321, 2005.
- SAPORETTI JR, A. W.; NETO, J. A. A. M. & ALMADO, R. P. “Fitossociologia de cerrado *stricto sensu* no município de Abaeté-MG”. *Rev. Árvore*, **27**: 413, 2003.
- SATHIYA, M. & MUTHUCHELIAN, K. “Antitumor potential of total alkaloid extract from *Tabebuia rosea* (Bertol.) DC. leaves on MOLT-4 cells *in vitro*”. *Nat. Sci.*, **8**: 77, 2010.
- SCHARBERT, S.; HOLZMANN, N. & HOFMANN, T. “Identification of the astringent taste compounds in black tea infusions by combining instrumental analysis and human bioresponse”. *J. Agric. Food Chem.*, **11**: 498, 2004.
- SCHECHTER, I. & BERGER, A. “On the size of the active site in proteases. I. papain”. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **27**: 157, 1967.
- SENA, J. G.; da SILVA, M. S.; TAVARES, J. F.; OLIVEIRA, S. L.; ROMERO, M. A. V.; XAVIER, H. S.; BARBOSA, J. M. & BRAZ, R. “Cytotoxic evaluation of pungencine: a new tropane alkaloid from the roots of *Erythroxylum pungens* O. E. SCHULZ”. *Helvet. Chim. Acta*, **9**: 1742, 2010.
- SEVERINO, R. P. *Busca de produtos naturais como inibidores específicos das enzimas*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2008. Tese de Doutorado, 244 p.
- SEVERINO, R. P.; GUIDO, R. V. C.; MARQUES, E. F.; BROMME, D.; SILVA, M. F. G. F.; FERNANDES, J. B.; ANDRICOPULO, A. D. & VIEIRA, P. C. “Acridone alkaloids as potent inhibitors of cathepsin V”. *Bioorg. Med. Chem.*, **19**: 1477, 2011.
- SHENOY, R. T. & SIVARAMAN, J. “Structural basis for reversible and irreversible inhibition of human cathepsin L by their respective dipeptidyl glyoxal and diazomethylketone inhibitors”. *J. Struct. Biol.*, **173**: 14, 2011.
- SHISHODIA, S.; MAJUMDAR, S.; BANERJEE, S. & AGGARWAL, B. B. “Ursolic acid inhibits nuclear factor-kappaB activation induced by carcinogenic

agents through suppression of I $\kappa$ B kinase and p56 phosphorylation: correlation with down-regulation of cyclooxygenase 2, matrix metalloproteinase 9, and cyclin D1” *Cancer Res.*, **63**: 4375, 2003.

SLOANE, B. F.; ROZHIN, J.; JOHNSON, K.; TAYLOR, H.; CRISSMAN, J. D. & HONN, K. V. “Cathepsin B: association with plasma membrane in metastatic tumours”. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **83**: 2483, 1986.

SLOANE, B. F.; YAN, S.; PODGORSKI, I.; LINEBAUGH, B. E.; CHER, M. L.; MAI, J.; CAVALLO-MEDVED, D.; SAMENI, M.; DOSESCU, J. & MOIN, K. “Cathepsin B and tumor proteolysis: contribution of the tumor microenvironment.” *Sem. Cancer Biol.*, **15**: 149, 2005.

STEFANELLO, M. E. A.; CERVI, A. C.; WISNIEWSKI JR, A. & SIMIONATTO, E. L. “Composição e variação sazonal do óleo essencial de *Myrcia obtecta* (O. Berg) Kiaersk. var. *obtectata*, Myrtaceae”. *Rev. Bras. Farmacogn.*, **20**: 82, 2010.

STOCH, S. A.; ZAJIC, S.; STONE, J.; MILLER, D. L.; DYCK, K. V.; GUTIERREZ, M. J.; DECKER, M.; LIU, L.; LIU, Q.; SCOTT, B. B.; PANEBIANCO, D.; JIN, B.; DUONG, L. T.; GOTTESDIERNER, K. & WAGNER, J. A. “Effect of the cathepsin K inhibitor odanacatib on bone resorption biomarkers in healthy postmenopausal women: two double-blind, randomized, placebo-controlled phase I studies”. *Clin. Pharmacol. Therap.*, **86**: 175, 2009.

SULTANA, N. J. “Clinically useful anticancer, antitumor, and antiwrinkle agent, ursolic acid and related derivatives as medicinally important natural product”. *Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **26**: 616, 2011.

SZPADERSKA, A. M. & FRANKFATER, A. “An intracellular form of cathepsin B contributes to invasiveness in cancer”. *Cancer Res.*, **61**: 3493, 2001.

TOMOO, K. “Development of cathepsin inhibitors and structure-based design of cathepsin B-specific inhibitor”. *Cur. Top. Med. Chem.*, **10**: 696, 2010.

TROY, A. M.; SHEAHAN, K.; MULCAHY, H. E.; DUFFY, M. J.; HYLAND, J. M. P. & O’DONOGHUE, D. P. “Expression of cathepsin B and L antigen and activity is associated with early colorectal cancer progression”. *Eur. J. Cancer*, **40**: 1610, 2004.

TURK, B. & STOKA, V. “Protease signalling in cell death: caspases versus cysteine cathepsins”. *FEBS Letters*, **581**: 2761, 2007.

TURK, B.; TURK, D. & TURK, V. “Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers”. *Biochim. Biophys. Acta*, **1477**: 98, 2000.

TURK, V.; TURK, B.; GUNCAR, G.; TURK, D. & KOS, J. “Lysosomal cathepsins: structure, role in antigen processing and presentation, and cancer”. *Advanc. Enz. Regul.*, **42**: 285, 2002.

TURK, V.; KOS, J. & TURK, B. “Cysteine cathepsins (proteases)-on the main stage of cancer?” *Cancer Cell*, **5**: 409, 2004.

VASILJEVA, O. & TURK, B. “Dual contrasting roles of cysteine cathepsins in cancer progression: apoptosis versus tumour invasion”. *Biochimie*, **90**: 380, 2008.

VIANA, L. M.; FREITAS, M. R.; RODRIGUES, S. V. & BAUMANN, W. “Extraction of lapachol from *Tabebuia avellanedae* wood with supercritical CO<sub>2</sub>: an alternative to soxhlet extraction?” *Braz. J. Chem. Eng.*, **20**: 317, 2003.

VIEGAS, C.; BOLZANI, V. S. & BARREIRO, E. J. “Os produtos naturais e a química medicinal moderna”. *Quím. Nova*, **29**: 326, 2006.

ZAYAT, L.; NOVAL, M. G.; CAMPI, J.; CALERO, C. I.; CALVO, D. J. “A new inorganic photolabile protecting group for highly efficient visible light GABA uncaging”. *Chem. Bio. Chem.*, **8**: 2035, 2007.

ZENG, G. Z.; PAN, X. L.; TAN, N. H.; XIONG, J. & ZHANG, Y. M. “Natural biflavones as novel inhibitors of cathepsin B and K”. *Eur. J. Med. Chem.*, **41**: 1247, 2006.

WATSON, C. J. & KREUZALER, P. A. “The role of cathepsins in involution and breast cancer”. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, **14**: 171, 2009.

WEST, D. C. B. & MCGROWDER, D. A. “Triple negative breast cancer: therapeutic and prognostic implications”. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, **12**: 2129, 2011.

World Health Organization (WHO). Acesso em: Março, 2014

<http://www.who.int/cancer/detection/breastcancer/en/>

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>

WITHANA, N. P.; BLUM, G.; SAMENI, M.; SLANEY, C.; ANBALAGAN, A.; OLIVE, M. B.; BIDWELL, B. N.; EDGINGTON, L.; WANG, L.; MOIN, K.; SLOANE, B. F.; ANDERSON, R. L.; BOGYO, M. S. & PARKER, B. S. “Cathepsin B inhibition limits bone metastasis in breast cancer”. *Cancer Res.*, **72**: 1199, 2012.

YANG, Z. & COX, J. L. "Cathepsin L increases invasion and migration of B16 melanoma". *Cancer Cell Internat.*, **7**: 1, 2007.

YASUDA, Y.; KALETA, J. & BROMME, D. "The role of cathepsins in osteoporosis and arthritis: rationale for the design of new therapeutics". *Advanc. Drug Del. Rev.*, **57**: 973, 2005.

YOKO, H.; KONDO, C.; KOJIMA, T.; NAGATA, H.; MORIYAMA, A.; HAYAKAWA, T. & KATUNUMA, N. "Significance of 32-kDa cathepsin L secreted from cancer cells". *Cancer Biother. Radiopharm.*, **21**: 217, 2006.

YOSHIKAWA, M.; SHIMADA, H.; NISHIDA, N.; LI, Y.; TOGUUCHIDA, I.; YAMAHARA, J. & MATSUDA, H. "Antidiabetic principles of natural medicines. II. Aldose reductase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from Brazilian natural medicine, the leaves of *Myrcia multiflora* DC. (Myrtaceae): structures of myrciacitrins I and II and myrciafenonas A and B". *Chem. Pharm. Bull.*, **46**: 113, 199.