

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

**“ESTUDO QUÍMICO DE *BOWDICHIA VIRGILIOIDES*
(FABACEAE) NA BUSCA DE INIBIDORES SELETIVOS DE
CISTEÍNO PEPTIDASES”**

TAYNARA LOPES SILVA*

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

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira

*** Bolsista FAPESP**

**São Carlos – SP
2014**

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

S586eq

Silva, Taynara Lopes.

Estudo químico de *Bowdichia virgilioides* (Fabaceae) na busca de inibidores seletivos de cisteíno peptidases / Taynara Lopes Silva. -- São Carlos : UFSCar, 2015. 97 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2014.

1. Produtos naturais. 2. Enzimas. 3. Inibidores enzimáticos. 4. Cerrados. I. Título.

CDD: 547.3 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Departamento de Química
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Curso de Mestrado Acadêmico

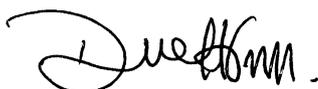
Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de dissertação de Mestrado Acadêmico da candidata Taynara Lopes Silva, realizada em 31 de março de 2014:



Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira



Prof. Dr. João Henrique Ghilardi Lago



Profa. Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza

Dedico este trabalho à minha mãe Elane, meu maior exemplo de amor, determinação e perseverança.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira pela orientação, amizade e ensinamentos transmitidos.

Aos demais professores do Laboratório de Produtos Naturais pelos ensinamentos e contribuição para minha formação.

À Profa. Dra. Richele Priscila Severino pela amizade, prontidão e conhecimento transmitidos.

À Karla Malaquias pela amizade, pelas análises de CG-EM e pelo tempo despendido a me ajudar.

À minha mãe Elane por apoiar minhas decisões, pelo amor e dedicação.

Ao meu irmão Guthemberg por todo amor, amizade e apoio.

Ao Rayner pelo amor, companheirismo, incentivo e dedicação e por sempre apoiar minhas decisões.

A todos os amigos do Laboratório de Produtos Naturais pela amizade, e incentivo.

À Monique pela contribuição e amizade.

Aos funcionários e técnicos do DQ, em especial à Luciana Vizotto.

À FAPESP pela bolsa concedida.

A Deus pela minha vida, pois sem ela nada disso teria sido possível.

Abreviaturas e Símbolos

μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micro molar
δ	Deslocamento químico em partes por milhão (ppm)
\emptyset	Diâmetro
λ_{em}	Comprimento de onda de emissão
λ_{ex}	Comprimento de onda de excitação
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
AcOEt	Acetato de etila
Asn	Asparagina
Cat	Catepsina
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
Cys	Cisteína
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTE	Ditioeritritol
E-64	L-3-carboxi-trans-2,3-epoxipropionil-leucilamido(4-guanino)butano)
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EM	Espectrometria de massas
EtOH	Etanol
eV	Elétron-volt
F.E	Fase estacionária
h	Altura
Hex	Hexano
His	Histidina
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Correlation</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
Hz	Hertz
IC ₅₀	Concentração que inibe 50% da atividade enzimática

<i>J</i>	Constante de acoplamento
min	minutos
m	Multiplete
M	Molar (mol/L)
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
MeOH	Metanol
MHz	Mega-hertz
pH	Potencial hidrogeniônico
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
s	Singleto
Ser	Serina
t	Triplete
TMS	Tetrametilsilano
UV	Ultravioleta
Z-FR-MCA	Carbobenzoxi-fenilalanina-arginina-7-amino-4-metilcumarina

Lista de Tabelas

TABELA 1.1 – Fármacos comercializados que atuam por inibição enzimática (Adaptado de (COPELAND, 2005)).....	7
TABELA 3.1 – Quantidade de massa vegetal seca e massa obtida dos extratos.	20
TABELA 3.2 - Quantidade de massa particionada e massa obtida em cada partição com os respectivos códigos utilizados, sendo C = caule; F = folha; H = partição hexânica; A = partição acetato de etila.	21
TABELA 3.3 - Condições cromatográficas utilizadas em cada fracionamento de CH.	22
TABELA 3.4 – Condições cromatográficas utilizadas em cada fracionamento de CA.	24
TABELA 3.5 – Massas dos produtos obtidos das reações de esterificação de Fischer.	27
TABELA 4.1 – Porcentagens de inibição dos extratos e partições líquido-líquido. ...	31
TABELA 4.2 – Porcentagens de inibição das frações obtidas de CH.	32
TABELA 4.3 – Porcentagens de inibição das frações obtidas de CH ₂	32
TABELA 4.4 – Porcentagens de inibição das frações obtidas de CH ₃	33
TABELA 4.5 – Porcentagens de inibição das frações obtidas de CH _{3.3}	33
TABELA 4.6 – Porcentagens de inibição das frações obtidas de CA.....	35
TABELA 4.7 – Porcentagens de inibição das frações CA ₄	36
TABELA 4.8 – Substâncias isoladas do caule de <i>B. virgilioides</i>	38
TABELA 4.9 – Dados de RMN ¹ H da substância 6 comparados com dados da literatura utilizados para comparação.....	46
TABELA 4.10 – Dados de RMN ¹ H da substância 8	54
TABELA 4.11 – Dados de RMN ¹ H da substância 9	59
TABELA 4.12 – Valores de porcentagem de inibição da substância 5	63
TABELA 4.13 – Porcentagens de inibição a 100µM das substâncias isoladas de CA frente às catepsinas K, L e V.....	64
TABELA 4.14 – Produtos obtidos nas reações de esterificação.	66
TABELA 4.15 – Porcentagens de inibição dos ésteres obtidos e dos ácidos livre frentes as catepsinas K, L e V.....	72
TABELA 4.16 – Compostos identificados nas frações obtidas de FH com seus respectivos IK e <i>m/z</i>	78
TABELA 4.17 – Porcentagens de inibição das frações obtidas de FH.....	89

Lista de Figuras

FIGURA 1.1 – Estrutura química da curcumina.	1
FIGURA 1.2 – Área ocupada pelo bioma Cerrado (Fonte: http://www.dcs.ufla.br/Cerrados/Portugues/CIntroP.htm)	2
FIGURA 1.3 – Diterpenos isolados das sementes de <i>B. nítida</i>	4
FIGURA 1.4 – Espécie <i>Bowdichia virgilioides</i>	5
FIGURA 1.5 – Substâncias isoladas de <i>B. virgilioides</i>	6
FIGURA 1.6 – Papel fisiológico das catepsinas lisossomais em mamíferos.	8
FIGURA 1.7 – Estruturas químicas dos inibidores de catepsina K que passaram por estudos pré-clínicos.	10
FIGURA 1.8 – Sobreposição estrutural das catepsinas K (verde), V (ciano), L (amarelo) e S (magenta). Em destaque os resíduos conservados entre as catepsinas. Resíduos pertencentes à tríade catalítica estão indicados com a legenda em vermelho (SEVERINO, 2008).	13
FIGURA 1.9 – Mecanismo de hidrólise peptídica pela cisteíno peptidase.	14
FIGURA 1.10 – Estrutura do inibidor irreversível de cisteíno peptidases (E-64).....	14
FIGURA 1.11 – Biflavonas naturais inibidoras de catepsina B.....	15
FIGURA 1.12 – Alcaloides acridônicos naturais inibidores de catepsina V.....	16
FIGURA 1.13 – Flavonoides naturais inibidores de catepsina V.....	16
FIGURA 3.1 – Fluxograma da partição líquido-líquido dos extratos etanólicos de <i>B. virgilioides</i>	20
FIGURA 3.2 – Fluxograma do fracionamento da partição hexânica do caule de <i>B. virgilioides</i>	22
FIGURA 3.3 – Fluxograma do fracionamento da partição acetato de etila do caule de <i>B. virgilioides</i>	23
FIGURA 3.4 – Fluxograma do fracionamento da partição hexânica das folhas de <i>B. virgilioides</i>	24
FIGURA 3.5 - Ácidos carboxílicos utilizados nas reações de esterificação.....	26
FIGURA 3.6 – Esquema de geral dos ensaios enzimáticos com o substrato fluorogênico Z-FR-MCA, mostrando o ponto de clivagem pelas catepsinas.	28
FIGURA 4.1 – Espectro de RMN ¹ H da substância 1 (400MHz, CDCl ₃).	40
FIGURA 4.2 – Espectro de RMN ¹ H da substância 2 (400MHz, CDCl ₃).	41
FIGURA 4.3 – Espectro de RMN ¹ H da mistura das substâncias 3 e 4 (400MHz, CDCl ₃).	42
FIGURA 4.4 – Espectro de RMN ¹ H da substância 5 (400MHz, CDCl ₃).	44
FIGURA 4.5 – Espectro de RMN ¹ H da substância 6 (400MHz, CDCl ₃).	45
FIGURA 4.6 – Possíveis isômeros para lignanas furofuranicas.	46
FIGURA 4.7 – Espectro de RMN ¹ H da substância 7 (400MHz, (CD ₃) ₂ CO)	48
FIGURA 4.8 – Mapa de contorno de HSQC da substância 7 (400MHz, (CD ₃) ₂ CO)..	49

FIGURA 4.9 – Mapa de contorno de HMBC da substância 7 (600MHz, (CD ₃) ₂ CO). 50	50
FIGURA 4.10 – Espectro de NOE da substância 7 (400MHz, (CD ₃) ₂ CO).....	51
FIGURA 4.11 – Espectro de massas da substância 7 obtido por inserção direta com ionização no modo negativo.	51
FIGURA 4.12 – Espectro de RMN ¹ H da substância 8 (400MHz, CDCl ₃).	53
FIGURA 4.13 – Ampliação do espectro de RMN ¹ H da substância 8 (400MHz, CDCl ₃).	53
FIGURA 4.14 – Espectro de RMN ¹ H da substância 9 (400MHz, CD ₃ OD).	55
FIGURA 4.15 – Ampliação do espectro de RMN ¹ H da substância 9 (400MHz, CD ₃ OD).	55
FIGURA 4.16 – Mapa de contorno de HSQC da substância 9 (400MHz, CD ₃ OD). ...	56
FIGURA 4.17 – Mapa de contorno de HMBC da substância 9 (400MHz, CD ₃ OD). ...	57
FIGURA 4.18 – Possíveis estruturas químicas da substância 9	57
FIGURA 4.19 – Espectro de RMN ¹ H da substância 9 (400MHz, (CD ₃) ₂ CO).	58
FIGURA 4.20 – Espectro RMN ¹ H de Calycosin-7-O-β-D-glucopiranosidico em diferentes solventes, A em CD ₃ OD e B em (CD ₃) ₂ CO	58
FIGURA 4.21 – Espectro de RMN ¹ H da substância 10 (400MHz, CD ₃ OD).	60
FIGURA 4.22 – Espectro de NOE da substância 10 (400MHz, CD ₃ OD).....	61
FIGURA 4.23 – Esquema geral da reação de esterificação de Fischer.	66
FIGURA 4.24 – Estrutura geral de éster de butila.	67
FIGURA 4.25 – Espectro de RMN ¹ H de 12a (400MHz, CDCl ₃).	67
FIGURA 4.26 – Espectro de RMN ¹ H de 13a (400MHz, CD ₃ OD).	68
FIGURA 4.27 – Espectro de RMN ¹ H de 14a (400MHz, CD ₃ OD).	68
FIGURA 4.28 – Espectro de RMN ¹ H de 15a (400MHz, CD ₃ OD).	69
FIGURA 4.29 – Estrutura geral de éster de octila.	69
FIGURA 4.30 – Espectro de RMN ¹ H de 12b (400MHz, CD ₃ OD).	70
FIGURA 4.31 – Espectro de RMN ¹ H de 13b (400MHz, CD ₃ OD).	70
FIGURA 4.32 – Espectro de RMN ¹ H de 14b (400MHz, CD ₃ OD).	71
FIGURA 4.33 – Espectro de RMN ¹ H de 15b (400MHz, CD ₃ OD).	71
FIGURA 4.34 – Espectros de RMN ¹ H das frações obtidas de FH (400MHz, CDCl ₃).	74
FIGURA 4.35 – Sobreposição dos cromatogramas obtidos de FH2 (---), FH3 (---), FH4 (---), FH5 (---), FH6 (---).	75
FIGURA 4.36 – Cromatograma de íons totais de FH2.	75
FIGURA 4.37 – Cromatograma de íons totais de FH3.	76
FIGURA 4.38 – Cromatograma de íons totais de FH4.	76
FIGURA 4.39 – Cromatograma de íons totais de FH5.	77
FIGURA 4.40 – Cromatograma de íons totais de FH6.	77

FIGURA 4.41 - Principais fragmentações de ligações que caracterizam os triterpenos encontrados nas frações obtidas de FH.	83
FIGURA 4.42 – Ampliação do espectro de massa (A) α -amirina e (B) β -amirina, mostrando a maior abundância de m/z 203 para β -amirina, em função da maior estabilidade do íon formado.	84
FIGURA 4.43 – Espectro de massas do triterpeno lupeol obtido por impacto eletrônico de 70eV.	84
FIGURA 4.44 – Espectro de massas do triterpeno lupenona obtido por impacto eletrônico de 70eV.	84
FIGURA 4.45 – Espectro de massas do triterpeno α -amirina obtido por impacto eletrônico de 70eV.	85
FIGURA 4.46 – Espectro de massas do triterpeno β -amirina obtido por impacto eletrônico de 70eV.	85
FIGURA 4.47 – Espectro de massas do esteroide sitosterol obtido por impacto eletrônico de 70eV.	85
FIGURA 4.48 – Espectro de massas do esteroide campesterol obtido por impacto eletrônico de 70eV.	86
FIGURA 4.49 – Espectro de massas do esteroide estigmasterol obtido por impacto eletrônico de 70eV.	86
FIGURA 4.50 – Espectro de massas obtido por impacto eletrônico de 70eV com fragmentações características do hexadecanoato de etila.	86
FIGURA 4.51 – Espectro de massas obtido por impacto eletrônico de 70eV com fragmentações características do ácido linoleico.	87
FIGURA 4.52 – Espectro de massas obtido por impacto eletrônico de 70eV com fragmentações características do octanoato de etila.	87
FIGURA 4.53 – Espectro de massas obtido por impacto eletrônico de 70eV com fragmentações características do hexadecanoil glicerol.	87
FIGURA 4.54 – Espectro de massas obtido por impacto eletrônico de 70eV com fragmentações características do monoestearato glicerol.	88
FIGURA 4.55 – Espectro de massas obtido por impacto eletrônico de 70eV com fragmentações características do heptacosano.	88
FIGURA 4.56 – Espectro de massas obtido por impacto eletrônico de 70eV com fragmentações características do docosanoato de etila.	88
FIGURA 4.57 – Espectro de massas obtido por impacto eletrônico de 70eV com fragmentações características do nonacosano.	89

Resumo

ESTUDO QUÍMICO DE *BOWDICHIA VIRGILIOIDES* (FABACEAE) NA BUSCA DE INIBIDORES SELETIVOS DE CISTEÍNO PEPTIDASES

Este trabalho descreve o isolamento de metabólitos secundários bioativos da espécie vegetal *Bowdichia virgilioides* buscando inibidores seletivos das catepsinas K, L e V. As catepsinas são enzimas que têm como função primária a degradação de proteínas nos lisossomos e também estão relacionadas ao desenvolvimento de doenças como osteoporose, artrite reumatoide, aterosclerose e diferentes tipos de cânceres. Neste projeto foi realizado o estudo biomonitorado dos extratos etanólicos do caule e das folhas das respectivas frações obtidas de *B. virgilioides* por ensaio fluorimétrico de inibição frente às enzimas estudadas. Os extratos de *B. virgilioides* foram submetidos a sucessivos fracionamentos utilizando diferentes técnicas cromatográficas levando a várias substâncias puras. As substâncias isoladas tiveram suas estruturas elucidadas por RMN uni- e bi-dimensionais e espectrometria de massas. O estudo das frações hexânica e de acetato de etila do caule resultou no isolamento de onze substâncias sendo 2 triterpenos: lupeol e lupenona; a mistura dos esteroides β -sitosterol e estigmasterol; 1 éster derivado do ácido *trans p*-cumárico; 1 lignana furofurânica: siringaresinol; 1 derivado benzofurano: bowdenol; 1 derivado do cumestrol: 8-metoxicumestrol e 3 isoflavonas: 7, 3'-diidroxí-4'-metoxí-isoflavona, 5, 4'-diidroxí-7'-metoxí-isoflavona e 4-hidroxí-7'-metoxí-isoflavona. Todas foram ensaiadas na concentração de 100 μ M. O 8-metoxicumestrol apresentou inibição superior a 70% para a catepsina V. A potência deste inibidor foi determinada e o valor de IC₅₀ encontrado foi de 17,4 \pm 1,0 μ M frente à catepsina V. O éster derivado do ácido *trans p*-cumárico apresentou inibição superior a 70% para as catepsinas L e V na concentração de 50 μ g/mL. Então, foram preparados uma série de 8 ésteres derivados dos ácidos *p*-hidroxibenzóico, *p*-cumárico, cinâmico e ferúlico, que foram avaliados com relação às suas atividades inibitórias frente às catepsinas estudadas na concentração de 100 μ M. O ester *p*-Cumarato de n-octila apresentou melhor porcentagem de inibição para as três enzimas. Os constituintes da fração hexânica das folhas de *B. virgilioides* foram analisados em mistura utilizando as técnicas de RMN ¹H e CG-EM.

Abstract

CHEMICAL STUDY OF *BOWDICHIA VIRGILIOIDES* (FABACEAE) IN THE SEARCH FOR SELECTIVE INHIBITORS OF CYSTEINE PEPTIDASES

This work describes the isolation of bioactive secondary metabolites of the plant species *Bowdichia virgilioides* in the search for selective inhibitors of cathepsins K, L and V. Cathepsins are enzymes that have as primary function the degradation of proteins in the lysosomes, and are also related to development of diseases such as osteoporosis, rheumatoid arthritis, atherosclerosis and various cancers. This dissertation describes the bioactivity-guided study of the ethanol extracts and fractions obtained from the stems and leaves of *B. virgilioides* through fluorimetric inhibition assay of the enzymes studied. The extracts of *B. virgilioides* were subjected to successive fractionations using different chromatographic techniques leading to several pure substances. The isolated substances had their structures elucidated by NMR uni- and bi-dimensional and mass spectrometry. The hexane and ethyl acetate fractions of stem afforded eleven substances: 2 triterpenes, lupeol and lupenona; the mixture of steroids β -sitosterol and stigmasterol; 1 ester derivative of *trans* *p*-coumaric acid; 1 furofuran lignan, syringaresinol; 1 Benzofuran derivative, bowdenol; 1 coumestrol derivative, 8-methoxycoumestrol, and 3 isoflavones, 7,3'-dihydroxy-4'-methoxyisoflavone, 5,4'-dihydroxy-7'-methoxyisoflavone and 4-hydroxy-7-methoxyisoflavone. All compounds were tested on their ability to inhibit the enzymes at a concentration of 100 μ M. 8-Methoxycoumestrol showed inhibition superior to 70% for cathepsin V. The potency of this inhibitor was determined and the IC₅₀ value was found to be 17.4 \pm 1.0 μ M for cathepsin V. The ester derivative of *trans* *p*-coumaric acid also showed good inhibition above 70% for cathepsin L and V at a concentration of 50 μ g/mL. So, a series of 8 esters derived from *p*-hydroxybenzoic acid, *p*-coumaric acid, cinnamic and ferulic were prepared, and have been evaluated regarding their inhibitory activities of the cathepsins at a concentration of 100 μ M. *n*-Octyl *p*-coumarate ester showed the best percentage inhibition for the three enzymes. The constituents of the hexane fraction of leaves of *B. virgilioides* were analyzed using the techniques ¹H NMR and GC-MS.

Sumário

1 – Introdução	1
1.1 – Produtos Naturais na Descoberta de Novos Fármacos	1
1.2 – Cerrado	2
1.3 – Família Fabaceae e o Gênero Bowdichia.....	3
1.4 – <i>Bowdichia virgilioides</i>	4
1.5 – Enzimas como Alvo Terapêutico	6
1.6 – Cisteíno Peptídeos Lisossomais.....	7
1.7 – Catepsinas Estudadas.....	9
1.7.1 – Catepsina K.....	9
1.7.2 – Catepsina L	11
1.7.3 – Catepsina V.....	11
1.8 – Características Estruturais e Mecanismo de Ação	12
1.9 – Inibidores de Cisteíno Peptídeos	14
2 – Objetivos	17
3 – Materiais e Métodos	18
3.1 – Materiais.....	18
3.1.1 – Solventes.....	18
3.1.2 – Suportes para cromatografia	18
3.1.3 – Reagentes.....	18
3.1.4 – Enzimas.....	18
3.1.5 – Equipamentos	19
3.2 – Coleta e Identificação do Material Vegetal	19
3.3 – Extratos Vegetais	19
3.4 – Fracionamento da Partição Líquido-Líquido Hexânica do Caule (CH)	21
3.5 – Fracionamento da Partição Líquido-Líquido Acetato de Etila do Caule (CA)	22
3.6 – Fracionamento da Partição Hexânica das Folhas (FH)	24
3.6.1 – Análise das Frações Obtidas de FH por CG-EM.....	25
3.6.2 – Determinação do Índice de Retenção de Kovats (IK).....	25
3.7 – Reações de Esterificação.....	25
3.8 – Ensaio Enzimático	27

3.9 – Triagem, Identificação e Seleção de Frações e Inibidores das Catepsinas K, L e V	28
3.10 – Determinação da Potência dos Inibidores (IC ₅₀)	29
4 – Resultados e Discussão	30
4.1 – Estudo Biomonitorado por Atividade Enzimática	30
4.1.1 – Biomonitoramento dos Extratos e Partições.....	30
4.1.2 – Ensaio Enzimático das Frações Obtidas de CH	31
4.1.3 – Ensaio enzimático das frações obtidas de CA	34
4.2 – Substâncias Identificadas.....	37
4.3 – Elucidação Estrutural	39
4.3.1 – Substância 1.....	39
4.3.2 – Substância 2.....	40
4.3.3 – Substâncias 3 e 4.....	41
4.3.4 – Substância 5.....	43
4.3.5 – Substância 6.....	44
4.3.6 – Substância 7.....	47
4.3.7 – Substância 8.....	51
4.3.8 – Substância 9.....	54
4.3.9 – Substância 10.....	59
4.3.10 – Substância 11.....	61
4.4 – Atividade Enzimática das Substâncias Isoladas de <i>B. virgilioides</i>	62
4.4.1 – Ensaio Enzimático das Substâncias Isoladas de CH.....	62
4.4.2 – Ensaio Enzimático das Substâncias Isoladas de CA.....	63
4.5 – Reações de Esterificação.....	65
4.6 – Ensaio Enzimático dos Produtos Obtidos das Reações	71
4.7 – Avaliação dos constituintes da fração hexânica das folhas (FH).....	73
4.8 – Ensaio Enzimático das Frações Obtidas de FH.....	89
5 – Conclusão	91
6 – Referências bibliográficas	92

1 – Introdução

1.1 – Produtos Naturais na Descoberta de Novos Fármacos

A natureza, de uma forma geral, é responsável pela produção de grande parte das substâncias orgânicas conhecidas, entretanto, a maior parcela da diversidade química conhecida e descrita na literatura é do reino vegetal. A variedade e a complexidade das micromoléculas que constituem os metabólitos secundários de plantas ainda são inalcançáveis por métodos laboratoriais (VIEGAS Jr, BOLZANI & BARREIRO, 2006). Os vegetais têm sido fonte de medicamentos há milênios, sendo muitos fármacos desenvolvidos a partir deles (CRAGG & NEWMAN, 2013).

Há muitos anos os produtos naturais têm sido fonte de inspiração para a maioria dos fármacos aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration*). Entre o ano de 2005 e 2010, 19 fármacos baseados em produtos naturais foram aprovados para comercialização em todo o mundo. Os produtos naturais também foram as principais fontes de diversidade química de materiais de partida durante a condução da descoberta farmacêutica ao longo do século passado (MISHRA & TIWARI, 2011).

Diversidade estrutural, no entanto, não é a única razão pela qual os produtos naturais são de interesse para o desenvolvimento de fármacos. Uma característica adicional importante é que muitas vezes eles possuem atividades biológicas altamente específicas com base em mecanismos de ação. (CRAGG & NEWMAN, 2013).

O fato de um grande número de compostos derivados de produtos naturais estarem em várias fases de desenvolvimento clínico indica que essa classe, utilizada como modelo, é ainda uma fonte promissora de candidatos a novos fármacos. Um exemplo disto é a curcumina (FIGURA 1.1), um polifenol extraído dos rizomas de *Curcuma longa* (um tempero popular indiano da família Zingiberaceae), que tem sido significativamente considerada contra o câncer do cólon metastático (MCC). A curcumina está passando por ensaios de fase I e II, enquanto um ensaio de fase III em doentes com MCC já está em andamento (MISHRA & TIWARI, 2011).

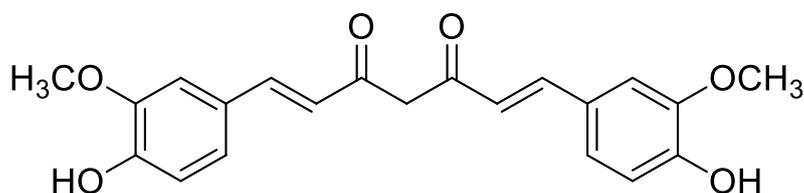


FIGURA 1.1 – Estrutura química da curcumina.

O Brasil é um país com grande biodiversidade sendo detentor da maior floresta equatorial e tropical úmida do planeta, e não pode abdicar de seu potencial para os produtos naturais (PINTO et al., 2002). Assim, a exploração racional da biodiversidade brasileira torna-se um instrumento promissor na busca de novos fármacos.

1.2 – Cerrado

O Cerrado brasileiro é a maior formação de savana da América, o segundo maior bioma do Brasil estendendo por cerca de 2 milhões de hectares e está localizado basicamente no planalto central (FIGURA 1.2) (BATLLE-BAYER, BATJES & BINDRABAN, 2010).

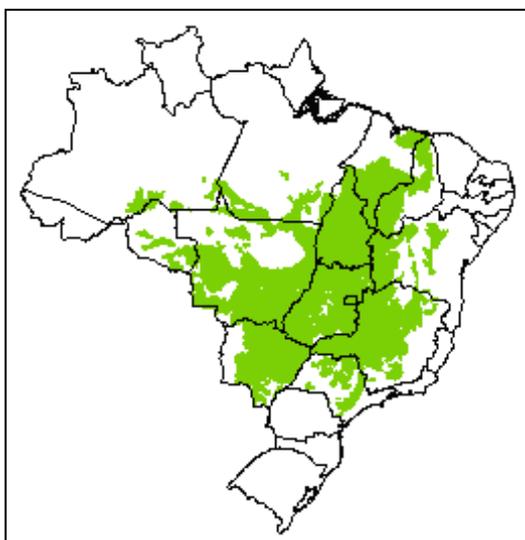


FIGURA 1.2 – Área ocupada pelo bioma Cerrado (Fonte: <http://www.dcs.ufla.br/Cerrados/Portugues/CIntroP.htm>)

Sendo um ecossistema com condições climáticas bastante específicas, com longos períodos de seca, intercalados com chuvas bastante intensas, os compostos químicos produzidos pela flora do cerrado, fundamentais para a adaptação e o equilíbrio das plantas, também podem ser muito úteis para os seres humanos. Substâncias, que em geral são produzidas em pequenas quantidades, e muitas vezes utilizadas como agentes de defesa das plantas contra predadores ou para atrair polinizadores, podem apresentar importante atividade biológica servindo como modelos para o desenho de novos fármacos (ANDRADE, 2013).

Dada a sua importância ecológica e a conversão permanente para agricultura, o Cerrado é considerado como um bioma ameaçado. Estima-se que 50% do Cerrado é terra potencialmente arável e que dois terços poderiam ser incorporados à

agricultura e pecuária. (BATLLE-BAYER, BATJES & BINDRABAN, 2010). Outro fator muito importante relacionado a este bioma é em relação ao desmatamento e às queimadas, sendo que a média anual de desflorestamento nesta área é de 14,2 mil Km² (ANDRADE, 2013).

Considerado um dos biomas de maior diversidade florística, o Cerrado possui uma riquíssima flora com mais de 10.000 espécies de plantas, com 4.400 endêmicas dessa área, muitas destas ainda insuficientemente conhecidas, (SILVA JÚNIOR et al., 2009). Este bioma é apontado como grande detentor de diversidade biológica, no entanto, ainda há carência de estudos voltados para a identificação das espécies de plantas pertencentes a ele, principalmente quando comparada à diversidade e à área ocupada (NETO & MORAIS, 2003). Por essas características o bioma Cerrado apresenta-se como uma promissora fonte de substâncias com potencial atividade biológica.

1.3 – Família Fabaceae e o Gênero *Bowdichia*

A família Fabaceae, pertence à ordem Fabales e possui ampla distribuição geográfica (SANTOS et al., 2010). É uma das maiores famílias botânicas, sendo a maior das angiospermas. Esta família é tradicionalmente dividida em três subfamílias com características morfológicas muito distintas: Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae (ou Faboideae), sendo esta última a maior delas (OLIVEIRA, 1999).

A família Fabaceae compreende 650 gêneros e cerca de 18.000 espécies com hábitos variados, podendo ser herbáceas, trepadeiras, arbustivas ou arbóreas (SILVA, 2009). No bioma Cerrado, constitui a família mais representativa em número, com aproximadamente 800 espécies (SANTOS et al., 2010). Embora seja uma família cosmopolita, sua diversidade está concentrada nas regiões tropicais e subtropicais, sendo que no Brasil há cerca de 200 gêneros (RODRIGUES & MACHADO, 2006).

O gênero *Bowdichia* pertencente à subfamília Faboideae é composto predominantemente por espécies arbóreas, distribuídas na América do Sul tropical (RODRIGUES & TOZZI, 2007). Plantas deste gênero são tradicionalmente utilizadas para o tratamento de diversas doenças incluindo reumatismo, úlceras de pele, diabetes, herpes, disenteria e asma (BARROS et al., 2010).

O gênero *Bowdichia* possui 19 espécies, no entanto somente duas foram estudadas do ponto de vista químico e farmacológico: *Bowdichia nitida* e *Bowdichia*

virgilioides (SILVA, 2009). Estudos com *B. nitida* mostraram a presença de alcaloides, triterpenoides e isoflavonoides. Das sementes desta espécie foram isolados diterpenos (FIGURA 1.3), que revelaram atividade citotóxica contra células de carcinoma de cólon humano, além de atividade antiplasmódica (MATSUNO et al., 2008; MATSUNO et al., 2009).

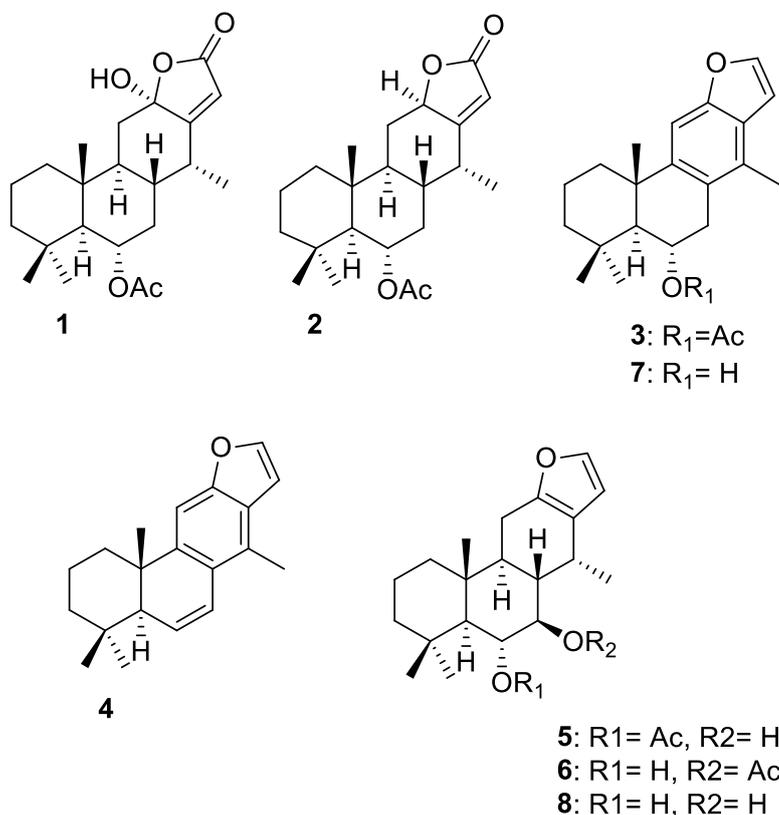


FIGURA 1.3 – Diterpenos isolados das sementes de *B. nitida*.

1.4 – *Bowdichia virgilioides*

B. virgilioides (FIGURA 1.4) uma planta pertencente à família Fabaceae, é uma árvore de tamanho médio encontrada nas florestas tropicais da América do Sul (ALMEIDA et al., 2006). No Brasil encontra-se distribuída pelas Regiões Sudeste, Centro Oeste, Norte e Nordeste e é conhecida popularmente como sucupira-preta (BARROS et al., 2010).

Na medicina popular as diferentes partes de *B. virgilioides* são utilizadas na forma de infusões para o tratamento de diversas doenças. As cascas são utilizadas para a cura de feridas, como úlceras e também como antidiabetes. As sementes são utilizadas para o tratamento de reumatismo, artrite e doenças de pele (AGRA et al., 2013). O caule de *B. virgilioides* é relatado como tendo atividades antifúngica (SILVA

JÚNIOR et al., 2009), analgésica e anti-inflamatória (SILVA et al., 2010; THOMAZZI et al., 2010; BARROS et al., 2010).

A medicina popular vem oferecendo grande contribuição à ciência, devido a uma gama de conhecimentos e práticas médicas de caráter empírico. Com isso, o estudo das plantas medicinais a partir de seu emprego por uma dada população, constitui um aparato útil na elaboração de estudos farmacológicos e fitoquímicos, por já estarem consagradas pelo uso contínuo (VILA VERDE, PAULA & CANEIRO, 2003). *Bowdichia virgilioides* é uma espécie utilizada na medicina popular e que possui um alto potencial farmacológico, desta forma torna-se um alvo de grande relevância a ser estudado na busca de substâncias bioativas.



FIGURA 1.4 – Espécie *Bowdichia virgilioides*.

A importância desta planta promoveu a sua inclusão na primeira farmacopeia brasileira. Estudos com extratos de *B. virgilioides* relataram atividade biológica variada para esta planta, incluindo antimalárica, hipoglicemiante e inibitória da enzima acetilcolinesterase comprovada pela literatura (ALMEIDA et al., 2006).

Estudos fitoquímicos realizados com a casca e raízes revelaram a presença de taninos e terpenoides, (BARROS et al., 2010) lupeol, alcaloides (TORRENEGRA, BAUEREIB & ACHENBACH, 1989), constituintes voláteis (ARRIAGA et al., 1998), flavonoides (ARRIGA, GOMES & BRAZ-FILHO, 2000; VELOZO et al., 1999) e um benzofurano (MELO et al., 2001). Houve também relatos de um novo alcaloide isolado da casca do caule de *B. virgilioides* (Figura 1.5g) (BARBOSA-FILHO et al., 2004). A FIGURA 1.5 mostra algumas substâncias químicas isoladas de *B. virgilioides*.

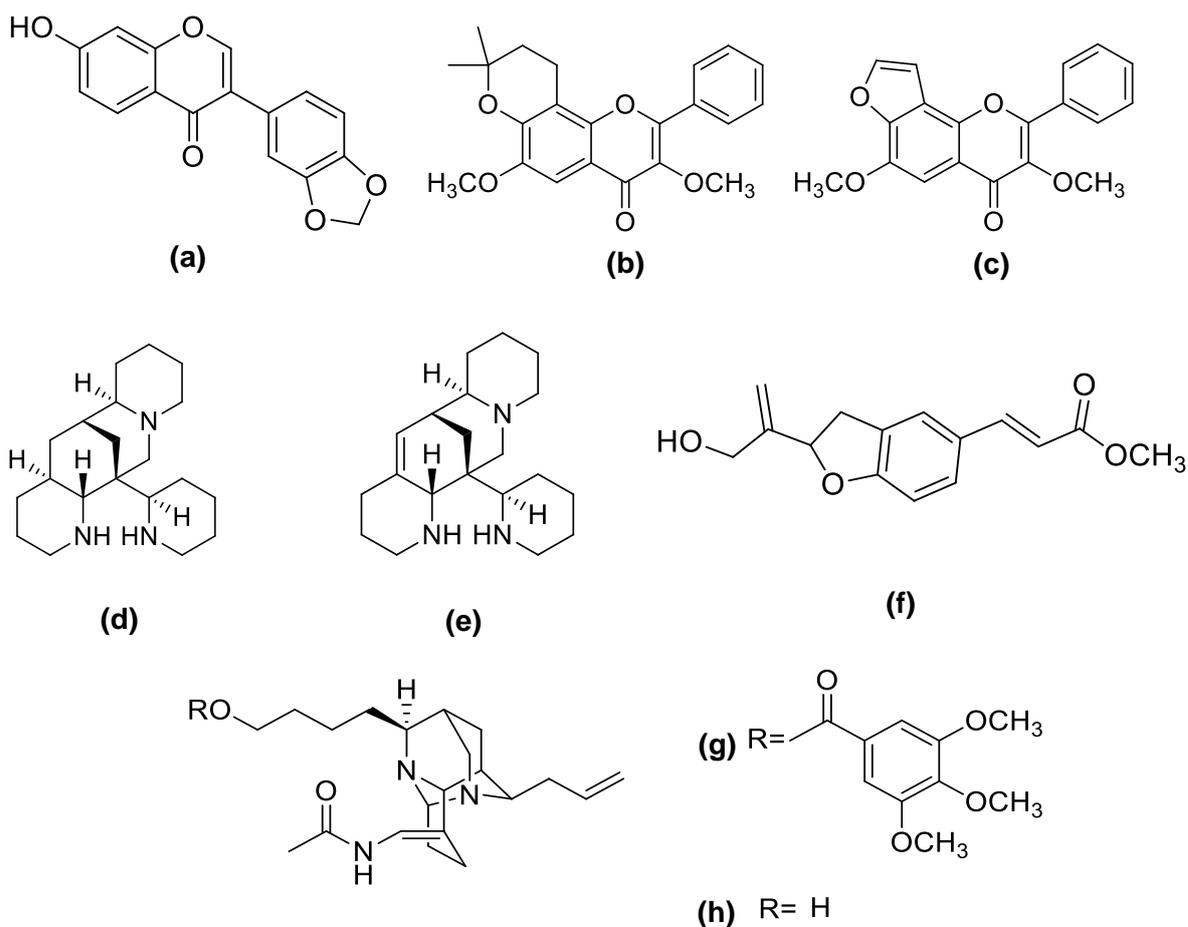


FIGURA 1.5 – Substâncias isoladas de *B. virgilioides*.

1.5 – Enzimas como Alvo Terapêutico

Enzimas são macromoléculas responsáveis por catalisar reações biológicas que são essenciais para a vida. Entretanto, processos nos quais são encontrados problemas na regulação de suas atividades catalíticas, como por exemplo, a superexpressão das enzimas que causa um aumento em sua atividade, são causas de diversas patologias. Em alguns processos, a mutação de genes responsáveis pela produção de enzimas pode levar a um nível anormal de concentração de determinada enzima dentro da célula. Isto causa o aumento da formação de produtos de reação que podem levar a patologias (COPELAND, 2005)

Uma avaliação dos mecanismos enzimáticos define enzimas como uma classe especializada de alvos para o desenvolvimento de medicamentos (ROBERTSON, 2005). Elas são alvos atrativos para intervenção farmacológica para um grande número de doenças. Cerca de 50% de todos os medicamentos comercializados atuam sobre um mecanismo de inibição enzimática (COPELAND,

2005). Na TABELA 1.1 são mostrados alguns dos medicamentos comercializados que agem sobre enzimas.

Outro atrativo para o uso de enzimas como alvos terapêuticos é o fato de que enzimas são altamente propensas à inibição por moléculas de baixa massa molecular. Assim as enzimas são comumente alvos de descoberta e desenvolvimento de grandes empresas farmacêuticas (COPELAND, 2005).

TABELA 1.1 – Fármacos comercializados que atuam por inibição enzimática (Adaptado de (COPELAND, 2005)).

Composto	Enzima Alvo	Uso Clínico
Acetazolamida	Anidrase Carbônica	Glaucoma
Aciclovir	DNA polimerase viral	Herpes
Amprenavir, indinavir, nelfinavir, ritonavir, saquinavir	HIV protease	AIDS
Aspirina	Ciclooxigenase	Inflamação, dor, febre
Amoxicilina	Proteínas ligadas à parede celular	Infecção bacteriana
Captopril, enalapril	Enzima conversora da angiotensina	Hipertensão
Efavirenz, nevirapina	Transcriptase reversa	AIDS
Fluorouracil	Timidialato sintase	Câncer
Norfloxacina	DNA girase	Infecções no trato urinário
Viagra, levitra	Fosforodiesterase	Disfunção erétil

1.6 – Cisteíno Peptidases Lisossomais

As peptidases representam uma grande família de enzimas que são responsáveis pela clivagem de ligações peptídicas. Estas enzimas são classificadas de acordo com suas características estruturais e catalíticas, sendo distribuídas entre as famílias das aspartil peptidases (catepsinas D e E), serino peptidases (catepsinas A e G), e as cisteíno peptidases (catepsinas B, C, F, H, K, L, O, S, V, W e X) (TURK et al., 2012).

As cisteíno peptidases lisossomais são amplamente expressas, sendo encontradas em vírus, bactérias, protozoários, fungos, plantas e mamíferos e formam uma numerosa e importante família de enzimas do tipo papaína (OTTO & SCHIRMEISTER, 1997). Em humanos, onze catepsinas foram descritas e caracterizadas no projeto de sequenciamento genômico, sendo elas catepsinas B, C, F, H, K, L, O, S, V, W e X (TURK et al., 2012). Apesar das grandes semelhanças nas estruturas primárias e terciárias entre as catepsinas, essas proteases possuem propriedades enzimáticas distintas, como refletido em suas diferentes especificidades de substratos (TORKAR et al., 2013).

As catepsinas são ativas em meio ácido e em condições normais estão presentes dentro dos lisossomos e participam de importantes processos fisiológicos como reabsorção óssea, processamento de antígenos e degradação proteica (LECAILLE, KALETA & BRÖMME, 2002). As funções biológicas básicas das catepsinas dos mamíferos estão resumidas na FIGURA 1.6.

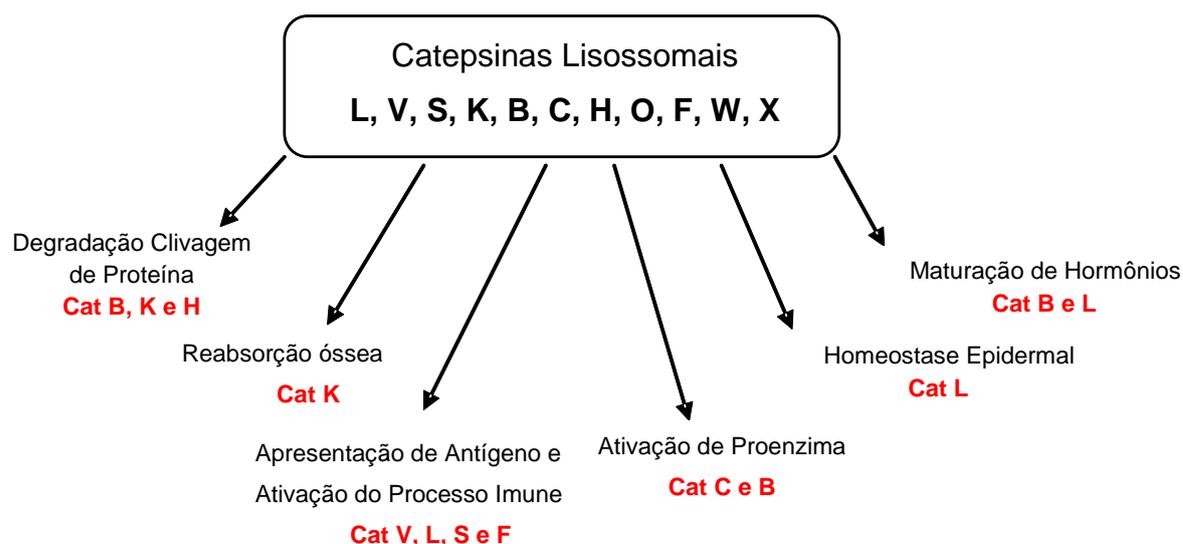


FIGURA 1.6 – Papel fisiológico das catepsinas lisossomais em mamíferos.

Estas enzimas estão envolvidas em numerosos processos fisiológicos e também patológicos, sendo reconhecidas durante décadas como potentes alvos terapêuticos para o tratamento de diversas doenças e desenvolvimento de medicamentos, atraindo a atenção das indústrias farmacêuticas e de pesquisadores acadêmicos (NOVINEC, PAVŠIČ & LENARČIČ, 2012).

Embora as catepsinas sejam conhecidas por degradarem proteínas de forma não seletiva dentro dos lisossomos, tem sido demonstrado que estas enzimas estão também envolvidas em outras vias bioquímicas relevantes, que operam em

processos seletivos e controlados com funções específicas associadas à sua localização tecidual (SEVERINO et al., 2011). Além disso, as catepsinas podem acumular-se em diferentes tecidos e células (MOHAMED & SLOANE, 2006), o que leva a processos patológicos como progressão de tumores (PALERMO & JOYCE, 2008), artrite reumatoide, osteoporose (YASUDA, KALETA & BRÖMME, 2005), distrofia muscular e doenças infecciosas (KOMINAMI, KUNIO & KATUNUMA, 1987). Desta forma a busca de inibidores para as catepsinas representa uma possibilidade de intervenção terapêutica de suma importância e grande contribuição para a saúde humana.

1.7 – Catepsinas Estudadas

1.7.1 – Catepsina K

A catepsina K é a cisteíno protease mais abundantemente expressa nos osteoclastos e desempenha um papel central na mediação da reabsorção óssea (STOCH et al., 2013). É ativa em pH ácido, o que a torna ideal para a degradação do colágeno no compartimento ácido formado entre os osteoclastos e a superfície óssea, a chamada lacuna de reabsorção (BOONEN et al., 2012).

Altamente relevante para o desenvolvimento da osteoporose, a catepsina K é a cisteíno protease associada à reabsorção óssea pelos osteoclastos e regulada negativamente pelo estrogênio. Esta enzima degrada ambos os tipos de colágeno I e II, os quais são os principais componentes da matriz óssea e da cartilagem. Ela é a única entre as cisteíno proteases que pode clivar a tripla hélice de colágeno tipo I, além de clivar telopeptídeos do colágeno nas extremidades N e C-terminais. Assim a catepsina K pode degradar completamente o colágeno insolúvel do osso (BOONEN et al., 2012).

Na última década grandes esforços têm sido realizados no desenvolvimento de inibidores da catepsina K altamente potentes, seletivos e aplicáveis oralmente. Alguns destes inibidores (FIGURA 1.7) passaram por estudos pré-clínicos, no entanto, dois destes, o relacatib e o balicatib, tiveram seus estudos interrompidos devido à falta de seletividade. Relacatib tem uma fraca seletividade sobre as catepsinas B, L, S e V. O Balicatib é seletivo para a catepsina K em ensaios enzimáticos, mas não em ensaios celulares (BOONEN et al., 2012). Por outro lado, o inibidor odanacatib passou por testes clínicos e por testes com humanos saudáveis,

onde demonstrou bons resultados, sendo considerado um inibidor potente e seletivo frente às outras catepsinas humanas conhecidas (STOCH et al., 2013).

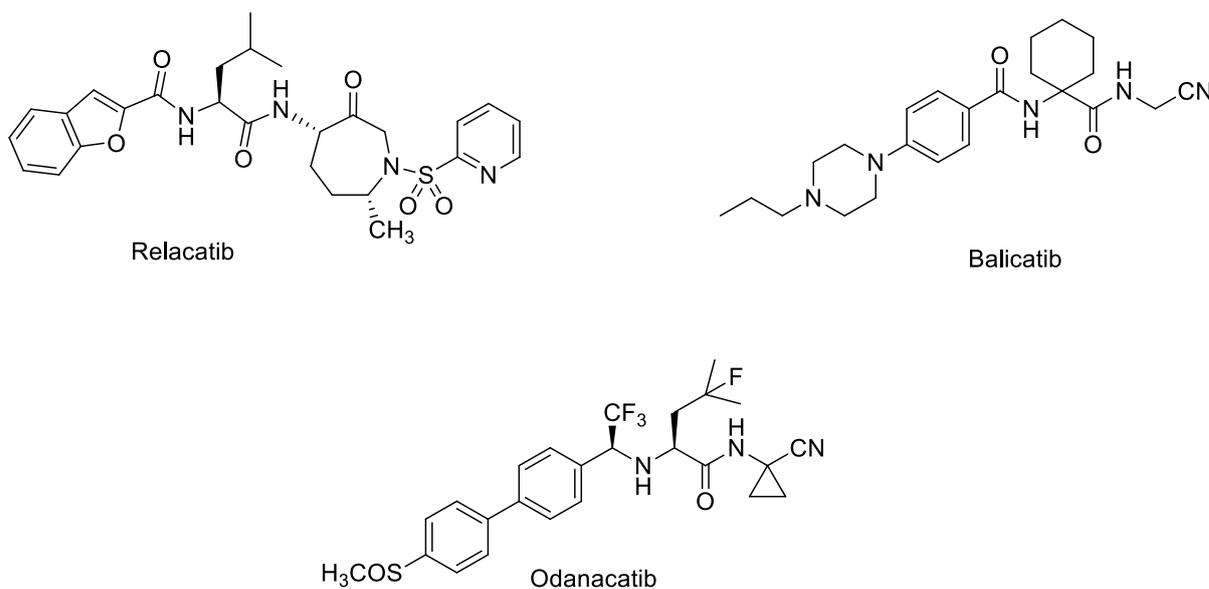


FIGURA 1.7 – Estruturas químicas dos inibidores de catepsina K que passaram por estudos pré-clínicos.

Os medicamentos antirreabsortivos disponíveis atualmente interferem na função dos osteoclastos. Eles inibem tanto a reabsorção quanto a formação óssea, devido ao acoplamento entre estes processos. Por outro lado, os inibidores da catepsina K atingem o processo de reabsorção propriamente dito e não podem interferir com a estimulação da formação óssea dos osteoclastos. Recentemente, uma nova classe de fármacos antirreabsortivos em desenvolvimento mostra que a diminuição da reabsorção óssea não pode ser seguida por uma redução equivalente da formação óssea, como é o caso dos atuais tratamentos de reabsorção óssea. Estes fármacos diminuem a reabsorção óssea por inibição direta da catepsina K, que é a principal responsável pela degradação da matriz óssea pelos osteoclastos (BOONEN et al., 2012).

As evidências genéticas e farmacológicas confirmam o papel fundamental da catepsina K na reabsorção óssea. Em estudos pré-clínicos, os inibidores desta enzima reduziram os níveis de marcadores bioquímicos da reabsorção óssea e aumentaram a densidade mineral óssea. Estes resultados têm apoiado a utilização da catepsina K como um alvo para novas moléculas para o tratamento de osteoporose (STOCH et al., 2013).

1.7.2 – Catepsina L

A catepsina L é descrita em humanos e em diferentes tipos de organismos, tendo como função primária a degradação de proteínas nos lisossomos. (SHENOY & SIVARAMAN, 2011). Esta enzima também possui um papel fundamental em processos biológicos e fisiológicos tais como remodelação óssea, metástase de câncer, invasão de células tumorais, artrite reumatoide e osteoartrite (KUMAR et al., 2010).

Esta enzima está envolvida em metástase de doenças ósseas, uma vez que alterações na expressão desta enzima têm sido observadas em tumores ósseos, como osteosarcoma e tumores de células gigantes do osso (LETO et al., 2010). Embora a catepsina L esteja envolvida na regulação da reabsorção óssea em condições normais e patológicas, o nível de expressão desta enzima nos osteoclastos é baixo em comparação com a catepsina K (LECAILLE, KALETA & BRÖMME, 2002).

Estudos sobre a expressão de catepsinas revelou o aumento da expressão das catepsinas B e L em melanomas e carcinomas de mama, pulmão, cólon e próstata. Recentemente, tem sido demonstrado que as células de melanoma não metastáticas são convertidas em células metastáticas devido à superexpressão de catepsina L. A cistatina C, um potente inibidor desta enzima, bloqueia a mobilidade e invasão de células de melanoma (MARQUES et al., 2012).

A catepsina L é superexpressa em muitas linhagens de células tumorais e em tecidos tumorais, e desempenha um papel importante na invasão e migração de células cancerígenas. Trata-se de um alvo atrativo para o desenvolvimento de inibidores que poderão revelar-se como benéficos no tratamento do câncer, limitando ou interrompendo a metástase (SONG et al., 2013).

1.7.3 – Catepsina V

A catepsina V foi identificada pela primeira vez no timo e no testículo, e associada a doenças como miastenia gravis, diabetes tipo 1 e doenças neurológicas. Esta enzima é também altamente expressa em carcinomas da mama e colo retal (NIWA et al., 2012). Em situações patológicas, tem sido considerada como um potente marcador de diagnóstico para tumores no cólon (SEVERINO et al., 2011). Também está envolvida no controle de células T humanas (responsáveis pela imunidade celular) e apresenta a maior atividade elastolítica entre as enzimas proteolíticas (ALVIM et al., 2010).

Esta enzima possui uma identidade com a catepsina L próximo de 77% para a pró-enzima e 80% para a enzima madura. Além disso, a posição e organização cromossômica dos genes que codificam estas duas enzimas são semelhantes (SOMOZA et al., 2000).

A catepsina V também possui um papel importante na progressão do câncer, de uma forma semelhante à catepsina L. É importante notar que a catepsina L de ratos tem uma identidade sequencial mais elevada com a catepsina V humana do que com a catepsina L humana, sendo que os ratos não possuem catepsina V (NIWA et al., 2012).

Apesar das semelhanças entre as catepsinas V e L, estas duas proteases diferem tanto na especificidade para o substrato quanto na distribuição do tecido. A catepsina V é especificamente expressa no timo, nos testículos e no epitélio da córnea, e essa distribuição limitada contrasta com a catepsina L, que é expressa em todo o corpo (SOMOZA et al., 2000).

Considerando seu grande potencial em apresentar antígeno do timo, a catepsina V pode ser considerada como um alvo de medicamentos para o tratamento de doenças autoimunes (BRÖMME & KALETA, 2002). No entanto, ainda são poucos os inibidores desta enzima descritos na literatura.

1.8 – Características Estruturais e Mecanismo de Ação

As catepsinas K, L, V e S são enzimas com alta identidade sequencial. Estas enzimas também possuem alta homologia entre elas, sendo quase completa a sua sobreposição (FIGURA 1.8) (SOMOZA et al., 2000). Desta forma, a discriminação *in vivo* destas enzimas torna-se difícil e a busca por inibidores que sejam potentes e seletivos a apenas uma das enzimas também é dificultada.

As cisteíno peptidases consistem em dois domínios, chamados de domínio L (esquerdo) e domínio R (direito). A interface entre os dois domínios forma uma fenda em forma de “V” onde está localizado o sítio ativo da enzima (TURK, TURK & TURK, 2000).

O sítio catalítico das cisteíno peptidases é formado por três resíduos de aminoácidos: Cys25, His159 e Asn175 (numeração papaína), sendo que a Cys25 e a His159 formam um par iônico que é estabilizado pelo resíduo de Asn175 através de uma ligação de hidrogênio. Esta tríade catalítica é semelhante ao sítio ativo presente nas serino peptidases (Ser, His, Asp), no entanto, em contraste com as

serino peptidases, o resíduo de cisteína nucleofílico já encontra-se ionizado, permitindo a ligação mais rápida com o substrato, e desta maneira as cisteíno peptidases são consideradas enzimas ativadas (LECAILLE, KALETA & BRÖMME, 2002).

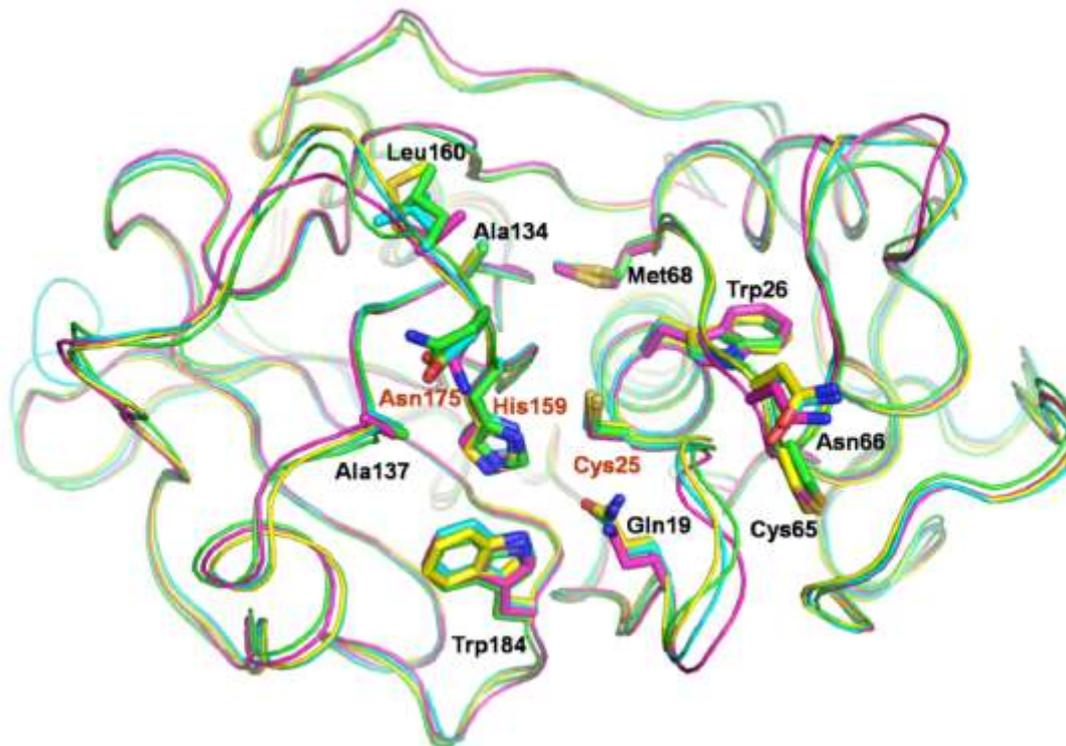


FIGURA 1.8 – Sobreposição estrutural das catepsinas K (verde), V (ciano), L (amarelo) e S (magenta). Em destaque os resíduos conservados entre as catepsinas. Resíduos pertencentes à tríade catalítica estão indicados com a legenda em vermelho (SEVERINO, 2008).

Durante a hidrólise peptídica o resíduo de cisteína ataca o carbono do grupo carbonila da ligação peptídica do substrato levando à formação de um intermediário tetraédrico. O par de elétrons do oxigênio do substrato retorna para que seja formada a ligação dupla original, ocasionando a saída subsequente de uma amina, deixando a enzima acilada (complexo enzima-substrato tio éster). Um novo intermediário tetraédrico é formado a partir da hidrólise do complexo enzima-substrato tior éster, que em seguida sofre uma reação de desacilação, eliminando um ácido carboxílico e a enzima livre ao meio (FIGURA 1.9) (LECAILLE, KALETA & BRÖMME, 2002).

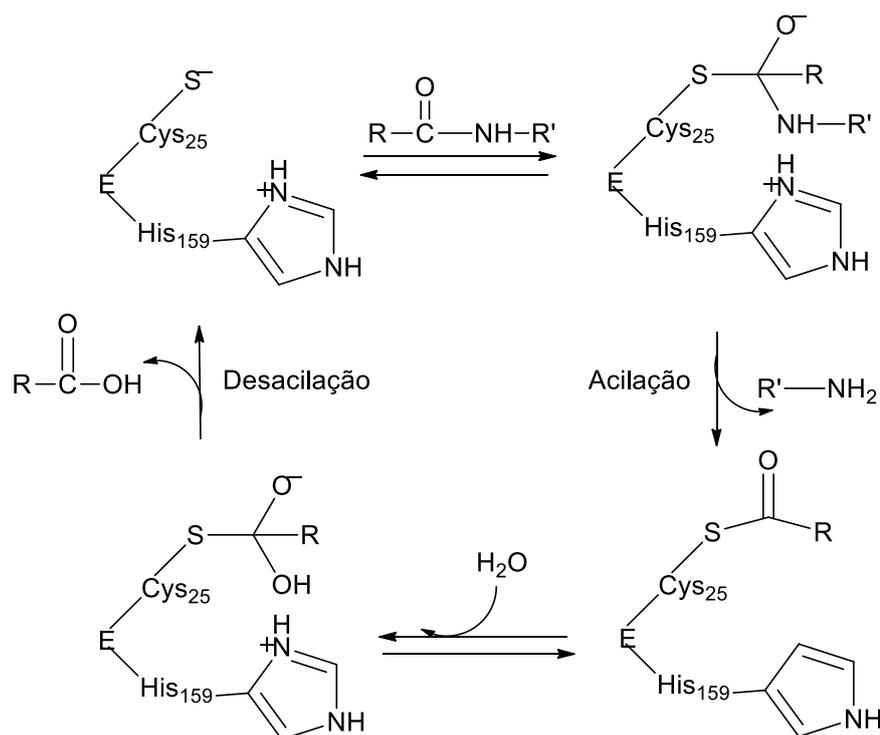


FIGURA 1.9 – Mecanismo de hidrólise peptídica pela cisteíno peptidase.

1.9 – Inibidores de Cisteíno Peptidases

Contendo um grupo tiol no sítio ativo, as cisteíno peptidases são facilmente inibidas por substâncias que possuem grupos reativos que se ligam ao grupo tiol da enzima. Um exemplo bem sucedido são os epóxidos peptídicos, potentes inibidores de cisteíno peptidases. O E-64, *L-trans*-epoxisuccinil leucilamido(4-guanidino)butano (FIGURA 1.10), produzido pelo fungo *Aspergillus japonicus*, foi o primeiro destes compostos a ser isolado e caracterizado como inibidor irreversível para cisteíno peptidase. No entanto, este inibidor não permite distinguir as várias enzimas desta classe. Esse composto é comumente utilizado para titulação do sítio ativo de várias destas enzimas e também como controle positivo (inibição enzimática) em ensaios de inibição (BARRETT et al., 1982).

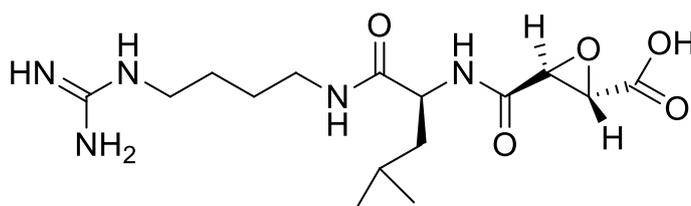


FIGURA 1.10 – Estrutura do inibidor irreversível de cisteíno peptidases (E-64)

A busca por novos inibidores potentes e seletivos para as catepsinas levou ao isolamento de diversos compostos. (ZENG et al., 2006) realizaram o estudo do

extrato acetônico dos galhos e folhas de *Taxodium mucronatum* (Taxodiaceae) e do extrato metanólico das folhas de *Cycas guizhouensis* (Cycadaceae) que levaram ao isolamento de biflavonas (FIGURA 1.11) com atividade inibitória frente às catepsinas B e K, sendo os valores de IC₅₀ determinados para catepsina B.

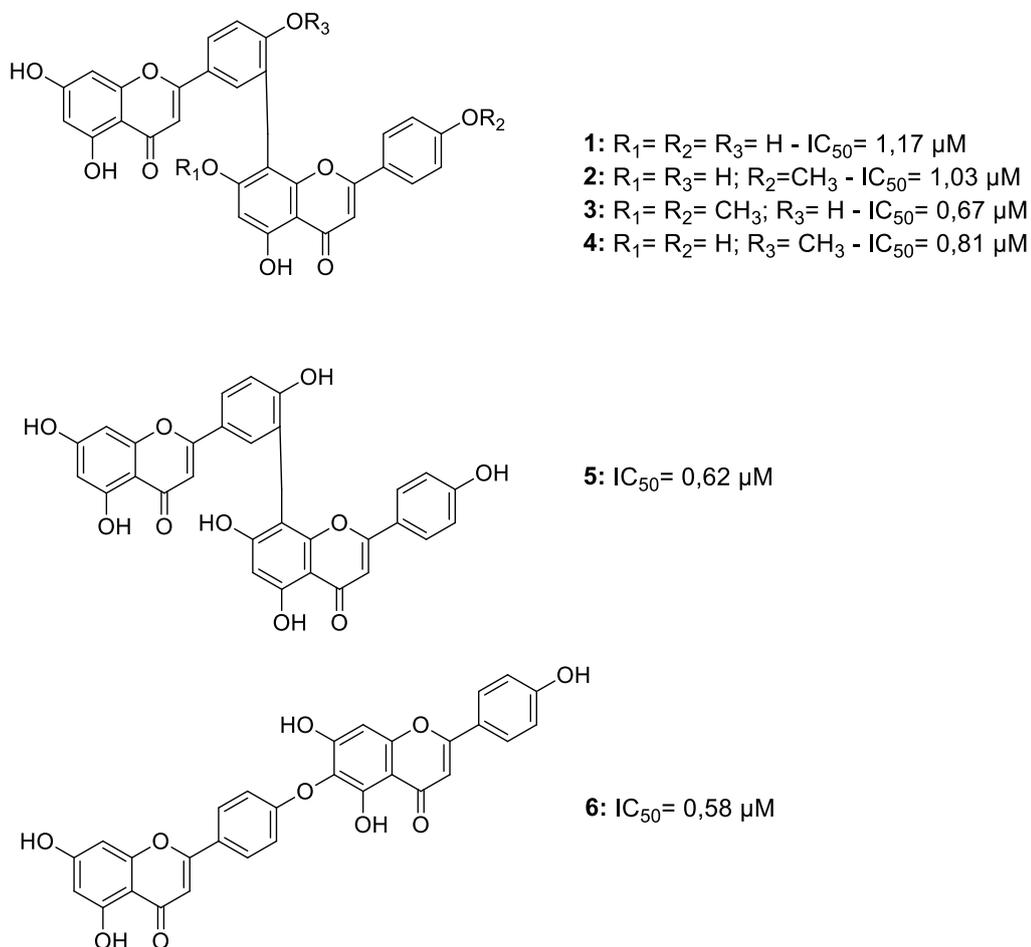


FIGURA 1.11 – Biflavonas naturais inibidoras de catepsina B.

(SEVERINO et al., 2011) relatam a atividade inibitória de uma série de alcaloides acridônicos (FIGURA 1.12) isolados do extrato metanólico do caule de *Swinglea glutinosa* (Bl.) Merr. (Rutaceae) frente à catepsina V. Os estudos da cinética e do tipo de inibição realizados revelaram que estes compostos são inibidores competitivos e reversíveis da enzima alvo.

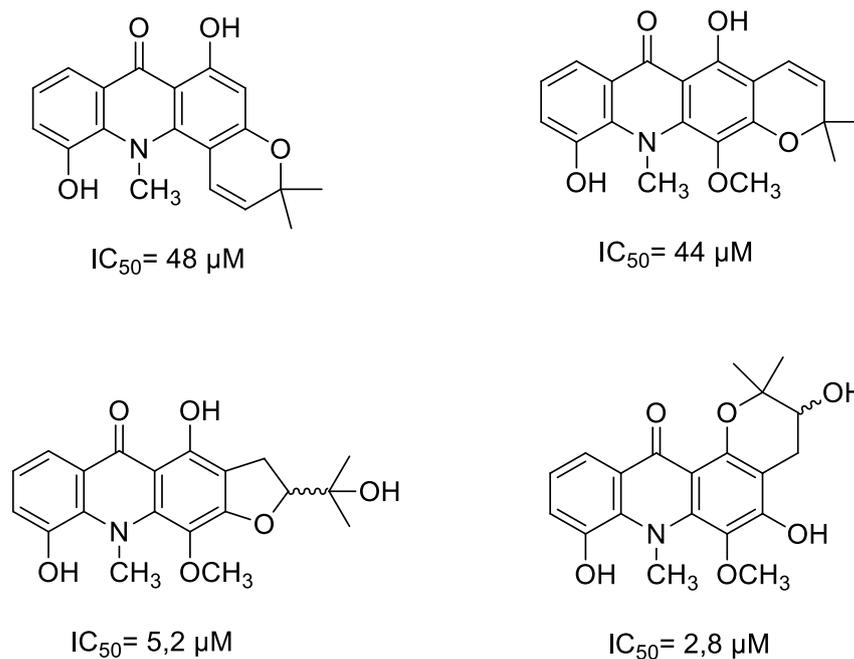


FIGURA 1.12 – Alcaloides acridônicos naturais inibidores de catepsina V.

(ALVIM et al., 2010) relatam a atividade inibitória frente a catepsina V de dois flavonoides isolados de *Vitex polygama* (Verbenaceae) and *Lonchocarpus subglaucescens* (Leguminoseae) (FIGURA 1.13).

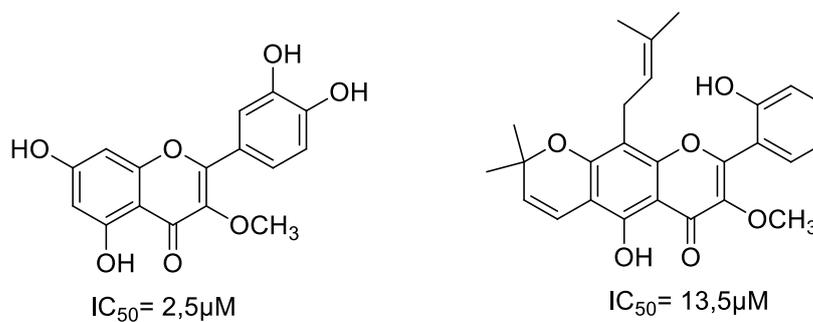


FIGURA 1.13 – Flavonoides naturais inibidores de catepsina V.

2 – Objetivos

Os objetivos desse projeto são:

- Realizar o estudo biomonitorado da espécie *Bowdichia virgilioides*, por meio de ensaios dos extratos, frações e substâncias isoladas frente às catepsinas K, L e V;
- Isolar e identificar as substâncias ativas dos extratos de *B. virgilioides*;
- avaliar a atividade biológica dos extratos, frações e substâncias isoladas frente às três catepsinas;
- Elucidar as estruturas dos compostos ativos através das diferentes técnicas espectroscópicas;
- Encontrar inibidores seletivos para essas enzimas;

3 – Materiais e Métodos

3.1 – Materiais

3.1.1 – Solventes

- Foram utilizados solventes comerciais destilados no DQ-UFSCar;
- Solventes para CLAE: solventes comerciais ULTRA ANALYSIS marca Tedia.
- Solventes para ensaio: Dimetilsulfóxido (DMSO) da marca Mallinckrodt Chemicals
- Solventes para análises espectroscópicas: solventes deuterados MERCK e ALDRICH

3.1.2 – Suportes para cromatografia

- CCDA: Sílica gel com F254, em folhas de alumínio da MERCK;
- Sílica gel 60 (70-230 mesh) denominada sílica comum;
- Sílica gel 60 (230-400 mesh) denominada sílica flash;
- Sephadex LH-20 – Amershan Pharmacia Biotech AB;
- Coluna CLAE: Phenyl 5 μ da marca Hexis;
- Coluna CG: Optima-5 (30m x 0,25mm x 0,25 μ m)

3.1.3 – Reagentes

- Substrato Z-FR-MCA (Carbobenzoxi-fenilalanina-arginina-7-amino-4-metilcumarina) – Sigma;
- Inibidor E-64 [L-3-carboxi-*trans*-2,3-epoxipropionil-leucilamido(4-guanino)butano] – Sigma;
- DTE (ditioeritritol) – Sigma;
- Ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) da J.T. Baker;
- Acetato de Sódio triidratado da J.T. Baker;
- Mistura de padrões de n-alcanos entre C₁₆-C₄₄ – Sigma Aldrich ASTM[®] D5442.

3.1.4 – Enzimas

- As catepsinas K e V são enzimas recombinantes humanas e foram cedidas pelo Prof. Dr. Dieter Brömme, da University of British Columbia, Vancouver – Canadá.

- A catepsina L é recombinante humana, foi expressa em *Pichia pastoris* e gentilmente cedida pelo Dr. Marcio Fernandes Madureira Alves, Universidade Federal de São Paulo.

3.1.5 – Equipamentos

- Evaporadores rotativos: os extratos e frações foram evaporados em evaporadores do tipo Büchi Rotavapor R-114 com banho Büchi Watherbath B-480, e recirculador refrigerado NESLAB, modelo CFT-25 mantido a 25°C.
- CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência): Equipamento da marca Shumadzu, modelo SPD-M10A, com detector de fotodiodo e software CLASS-VP.
- Fluorímetro: Leitor de placa de ELISA modelo SpectraMax M3 da Molecular Devices;
- Análises espectroscópicas: Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear marca Bruker Avance III - 9,4 Tesla (400 MHz para frequência do hidrogênio e 100 MHz para o carbono).
- Espectrômetro de massas: modelo API2000 da marca Applied Biosystems, com fonte de ionização por eletrospray e analisador triplo quadrupolo.
- Cromatógrafo gasoso linha 17A modelo QP5000 da Shimadzu acoplado ao detector de impacto eletrônico de 70eV.

3.2 – Coleta e Identificação do Material Vegetal

A espécie *Bowdichia virgilioides* (Fabaceae) foi coletada no cerrado do centro-oeste brasileiro, na região do Distrito Federal (DF 480, lote 01, SMA - Gama/DF) no estado de Goiás em 14 de dezembro de 2010. Os dados e as coordenadas da coleta (GPS) foram armazenados para coletas futuras. A coleta foi realizada em colaboração com o Prof. Dr. Helder Nagai Consolaro (Departamento de Ciências Biológicas – UFG/CAC), o qual realizou a identificação e catalogação do material vegetal. Os espécimes testemunhos foram depositados no Herbário da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia (CEN), sob o número EG 676.

3.3 – Extratos Vegetais

O caule e folhas de *Bowdichia virgilioides* foram secos em estufa, triturados e submetidos a três extrações com etanol por três dias cada. Os extratos foram

obtidos após evaporação do solvente em evaporador rotativo, a baixa pressão. As massas obtidas em cada uma das etapas estão descritas na TABELA 3.1.

TABELA 3.1 – Quantidade de massa vegetal seca e massa obtida dos extratos.

Parte vegetal	Massa do material vegetal seco (g)	Massa do extrato (g)
Caule (C)	854	69,6
Folha (F)	360	29,2

Os extratos brutos foram submetidos à partição líquido-líquido conforme ilustrado na FIGURA 3.1. Os solventes foram evaporados em evaporador rotativo a baixa pressão e as quantidades massas obtidas em cada partição foram pesadas após estarem totalmente secas (TABELA 3.2).

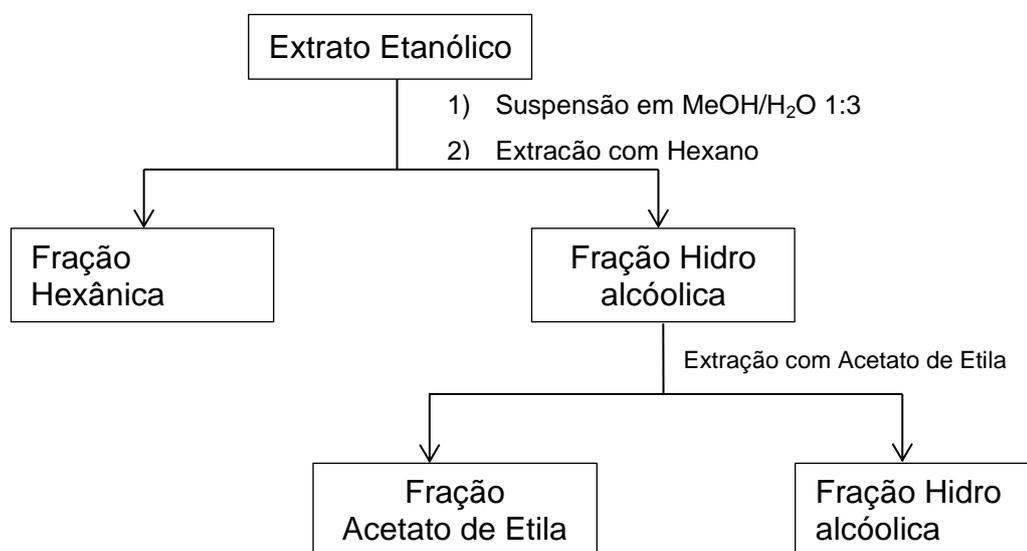


FIGURA 3.1 – Fluxograma da partição líquido-líquido dos extratos etanólicos de *B. virgilioides*.

TABELA 3.2 - Quantidade de massa particionada e massa obtida em cada partição com os respectivos códigos utilizados, sendo C = caule; F = folha; H = partição hexânica; A = partição acetato de etila.

Extrato	Massa dos extratos particionada (g)	Massa da partição obtida (g)		Massa submetida a fracionamento (g)
C	30,2	H	1,26	1,25
		A	11,55	5
F	23,7	H	2,4	1
		A	2,7	não fracionada

As quantidades de massas obtidas nas partições hexânica e acetato de etila foram pequenas quando comparadas a massa de extrato bruto particionada. Isso ocorre devido à espécie estudada ser muito rica em taninos condensados. Durante a partição líquido-líquido a maior parte destes compostos ficam na fração hidroalcolica, por serem polares. Assim, maior quantidade de massa das partições é da partição hidroalcolica, que não foi trabalhada neste projeto.

3.4 – Fracionamento da Partição Líquido-Líquido Hexânica do Caule (CH)

A fração hexânica do extrato etanólicos do caule de *B. virgilioides* foi primeiramente submetida a um fracionamento em coluna de vidro utilizando sílica gel como fase estacionária. Foi utilizado o modo de eluição gradiente, iniciando-se com hexano e aumentando-se a polaridade com acetato de etila. Ao final do processo cromatográfico utilizou-se como fase móvel o metanol para retirar possíveis substâncias ainda retidas na coluna. Todas as frações coletadas foram analisadas por cromatografia de camada delgada analítica (CCDA) e ensaiadas frente às catepsinas em estudo. Após a análise das frações, as que apresentaram porcentagem de inibição acima de 70% foram submetidas a outros fracionamentos a fim de se isolar os metabólitos responsáveis pela atividade inibitória. Os fracionamentos realizados estão mostrados na FIGURA 3.2 e as condições de cada fracionamento estão descritas na TABELA 3.3.

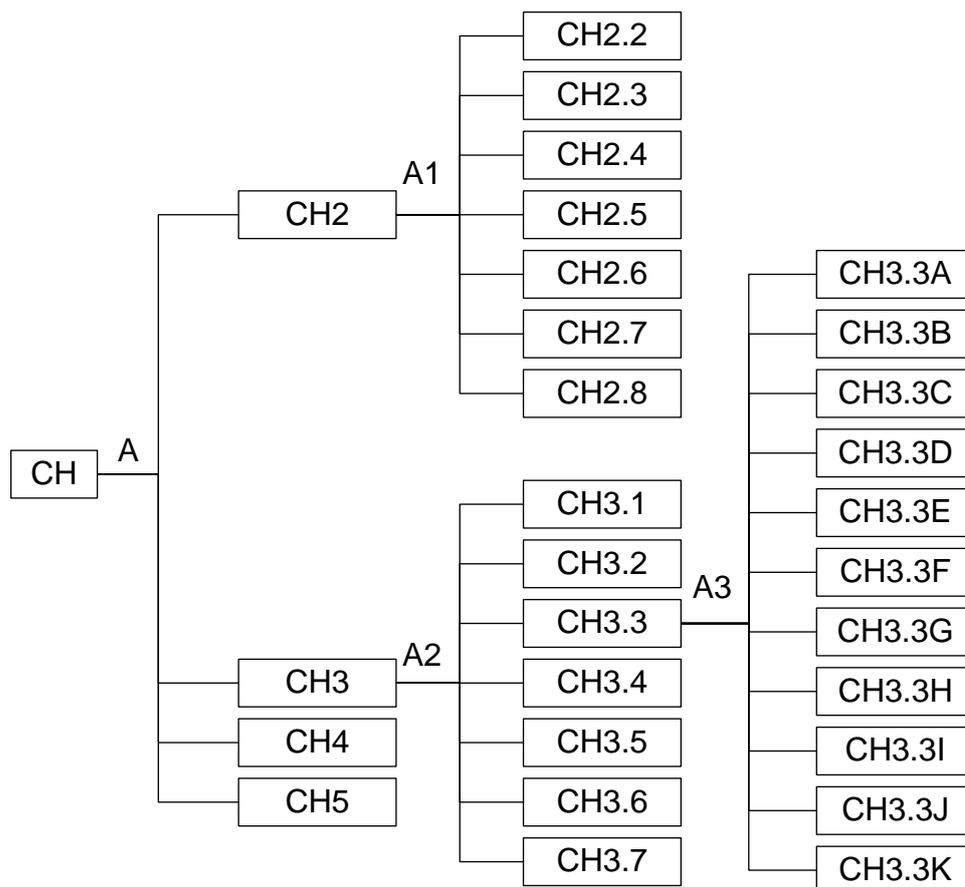


FIGURA 3.2 – Fluxograma do fracionamento da partição hexânica do caule de *B. virgilioides*.

TABELA 3.3 - Condições cromatográficas utilizadas em cada fracionamento de CH.

Código	F.E	h (cm)	Ø (cm)	Eluição
A	Sílica flash	16	7	Gradiente: Hex; AcOEt: MeOH
A1	Sílica flash	25	4	Isocrática: Hex/AcOEt (9,5:0,5)
A2	Sílica flash	28	4	Isocrática: Hex/AcOEt (7,5:2,5)
A3	Sílica flash	25	2	Isocrática: Hex/AcOEt (9,7:0,3)

3.5 – Fracionamento da Partição Líquido-Líquido Acetato de Etila do Caule (CA)

A fração proveniente da partição líquido-líquido acetato de etila do caule de *B. virgilioides* foi submetida a fracionamento em coluna de vidro utilizando sílica gel como fase estacionária. Foi realizada uma eluição isocrática utilizando

diclorometano e metanol como eluentes na proporção 9:1. Ao final do processo cromatográfico utilizou-se metanol 100% como fase móvel para retirada das substâncias retidas na coluna. As frações coletadas foram analisadas por CCDA e ensaiadas frente às enzimas em estudo. As frações que apresentaram porcentagem de inibição acima de 70% foram submetidas a novos fracionamentos a fim de isolar os compostos responsáveis pela atividade inibitória. A FIGURA 3.3 mostra os fracionamentos realizados, e na TABELA 3.4 os dados de cada fracionamento.

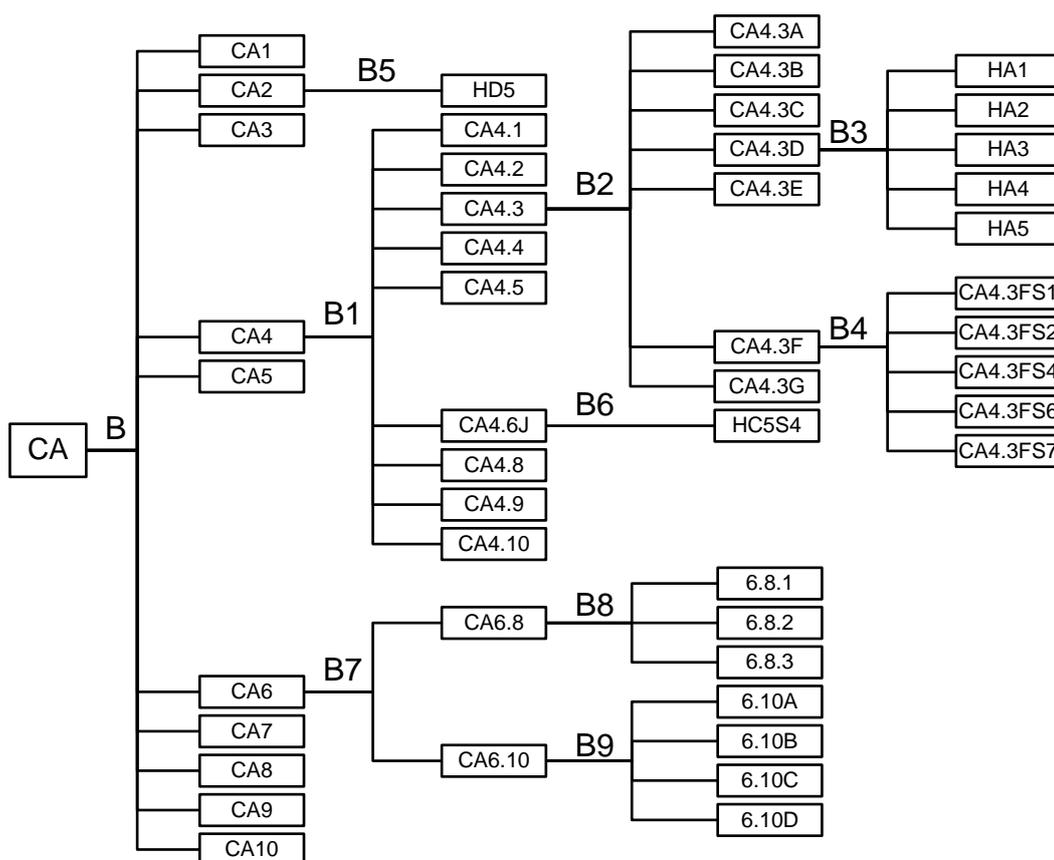


FIGURA 3.3 – Fluxograma do fracionamento da partição acetato de etila do caule de *B. virgilioides*.

TABELA 3.4 – Condições cromatográficas utilizadas em cada fracionamento de CA.

Código	F.E	h (cm)	Ø (cm)	Eluição
B	Sílica flash	20	5	Isocrática: CH ₂ Cl ₂ /MeOH (9:1)
B1	Sílica flash	36	1,5	Isocrática: CH ₂ Cl ₂ /MeOH (9,8:0,2)
B2	Sílica flash	30	2	Isocrática Hex/Acetona (3:2)
B3	Fenil (5µ) (CLAE)	25	0,46	Isocrática: MeOH/H ₂ O (7:3)
B4	Sephadex LH20	53	1,5	Isocrática: MeOH 100%
B5	Fenil Hexil (10µ) (CLAE)	25	0,46	Isocrático: MeOH/H ₂ O (4,7:5,3)
B6	Fenil Hexil (10µ) (CLAE)	25	0,46	Isocrático: EtOH/H ₂ O (4,7:5,3)
B7	Sephadex LH20	50	3	Isocrática: MeOH 100%
B8	Sílica flash	23	2	Isocrática Hex/Acetona (3:2)
B9	Sílica flash	30	1,5	Isocrática Hex/Acetona (3:2)

3.6 – Fracionamento da Partição Hexânica das Folhas (FH)

A fração proveniente da partição líquido-líquido hexânica das folhas de *B. virgilioides* foi submetida a fracionamento em coluna de vidro utilizando sílica gel como fase estacionária e como fase móvel uma mistura dos solventes hexano e acetato de etila na proporção 5:1. Ao final do processo cromatográfico utilizou-se metanol 100% como fase móvel para retirada das substâncias retidas na coluna. As frações coletadas foram analisadas por CCDA e RMN ¹H e ensaiadas frente às enzimas em estudo.

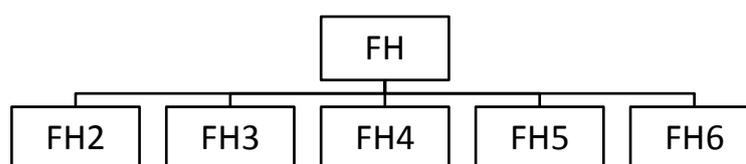


FIGURA 3.4 – Fluxograma do fracionamento da partição hexânica das folhas de *B. virgilioides*.

3.6.1 – Análise das Frações Obtidas de FH por CG-EM

Os constituintes das frações obtidas de FH também foram analisados usando a técnica de cromatografia gasosa aliada à espectrometria de massas (CG-EM).

Programa de temperatura utilizado: Injetor = 250°C; Detector = 290°C impacto eletrônico 70 eV; Temperatura inicial da análise = 150°C (por 5 minutos); Temperatura final da análise = 280°C (por 10 minutos); Taxa de aquecimento = 6°C/min

3.6.2 – Determinação do Índice de Retenção de Kovats (IK).

Para auxiliar na identificação dos compostos voláteis da fração FH calculou-se o índice de Kovats. Os valores foram calculados a partir da análise de uma mistura de hidrocarbonetos lineares, n-alcenos entre C₁₆-C₄₄ – Sigma Aldrich ASTM® D5442. Esta mistura foi submetida às mesmas condições das análises de CG-EM anteriormente descritas. Todos os analitos eluíram durante o gradiente de temperatura, sendo os valores obtidos através da equação:

$$I = 100n + 100n (t_{Rx} - t_{Rz}/t_{R(z+1)} - t_{Rz})$$

Sendo n o número de carbonos do n-alceno com tempo de retenção (t_{Rz}) anterior ao padrão, e ($t_{R(z+1)}$) o tempo de retenção do n-alceno localizado após o padrão avaliado.

3.7 – Reações de Esterificação

As reações de esterificação foram realizadas utilizando diferentes ácidos carboxílicos (FIGURA 3.5) com os álcoois n-butanol e n-octanol.

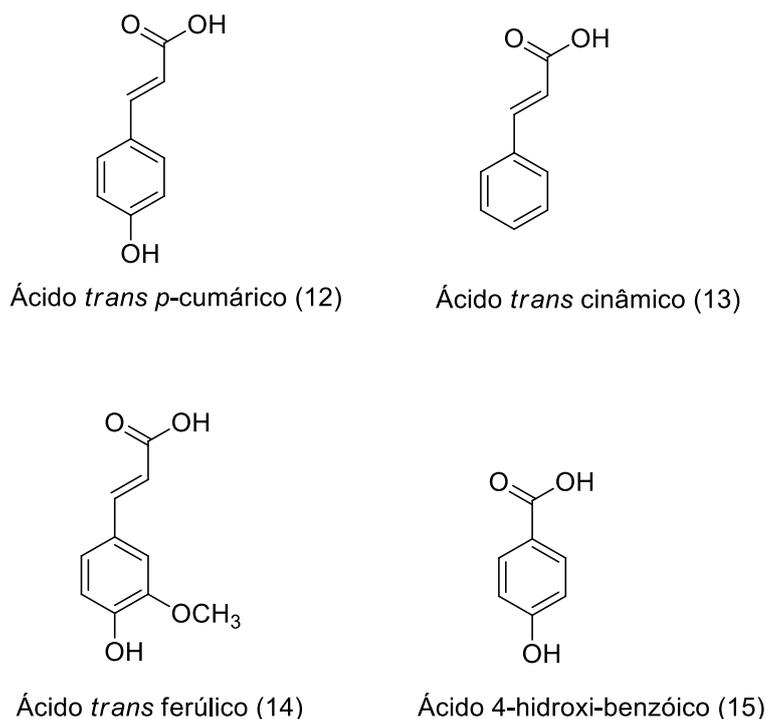


FIGURA 3.5 - Ácidos carboxílicos utilizados nas reações de esterificação.

As esterificações foram realizadas utilizando 10 mg dos ácidos carboxílicos, 1mL de álcool e 30 μ L de ácido sulfúrico em refluxo a 60°C por duas horas. As reações foram acompanhadas por CCDA.

Ao final da reação foram adicionados 15 mL de solução saturada de cloreto de sódio e fez-se a extração do produto formado utilizando com acetato de etila em um funil de separação. Foram feitas 3 extrações com 10mL de acetato de etila em cada uma delas. Após as extrações o solvente foi concentrado em evaporador rotativo para a obtenção do produto e este foi submetido a uma separação cromatográfica para a purificação utilizando sílica flash como fase estacionária e como eluente misturas de hexano e acetato de etila.

Os produtos obtidos em cada uma das reações são mostrados na TABELA 3.5.

TABELA 3.5 – Massas dos produtos obtidos das reações de esterificação de Fischer, sendo (a) produtos obtidos com butanol e (b) produtos obtidos com octanol.

Código da amostra	Massa de produto obtida (mg)	Rendimento (%)
12a	1,4	10
12b	4,7	28
13a	1,9	14
13b	1,3	7
14a	5,4	42
14b	1,0	6
15a	1,1	8
15b	1,6	9

3.8 – Ensaio Enzimáticos

A atividade enzimática foi determinada com base no aumento da fluorescência em função do tempo de reação, através da hidrólise do substrato Z-FR-MCA. Este experimento foi realizado em um fluorímetro utilizando placas de ELISA de 96 poços preta e opaca, com volume final de 200 μ L, temperatura 27 °C, com comprimento de onda de excitação (λ_{ex}) 380nm e emissão (λ_{em}) 460nm.

As enzimas foram pré-ativadas com DTE (2,5 mM) por 5 minutos, em seguida adicionou-se a solução do inibidor em DMSO a ser testado (extratos ou substâncias puras) incubando-se por 5 minutos. Logo após adicionou-se o substrato Z-FR-MCA (10 μ M) e faz-se a leitura de fluorescência em tempo real. A determinação da atividade enzimática foi realizada através do monitoramento contínuo e direto da hidrólise do substrato fluorogênico (Z-FR-MCA) por 300 segundos (5 minutos). (SEVERINO, 2008). A FIGURA 3.6 mostra o esquema da metodologia utilizada no ensaio biológico.

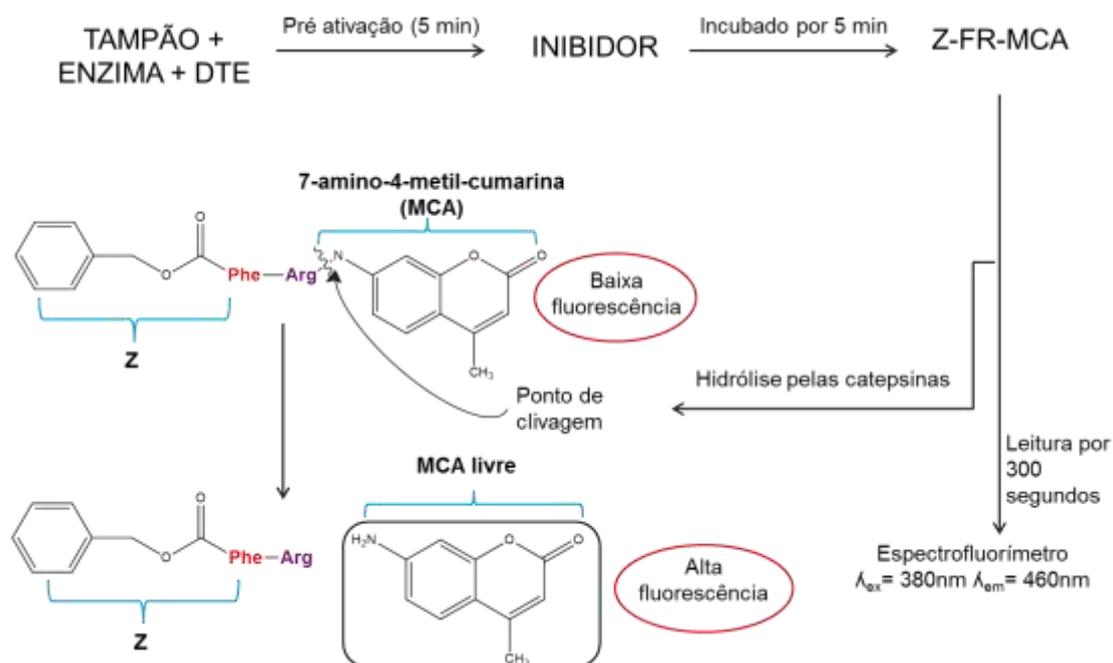


FIGURA 3.6 – Esquema de geral dos ensaios enzimáticos com o substrato fluorogênico Z-FR-MCA, mostrando o ponto de clivagem pelas catepsinas.

3.9 – Triagem, Identificação e Seleção de Frações e Inibidores das Catepsinas K, L e V

Primeiramente foi realizado um ensaio fluorimétrico com os extratos brutos na dosagem de 125 $\mu\text{g/mL}$, para verificar as suas atividades frente às enzimas estudadas. Após a realização das partições líquido-líquido, estas foram ensaiadas na mesma concentração dos extratos brutos, para verificar onde atividade inibitória se tornou mais intensa. Após os primeiros fracionamentos, as frações obtidas também foram submetidas ao ensaio de inibição nas mesmas condições que os extratos e partições a fim de biomonitorar este estudo para as frações que apresentam melhores valores de porcentagem de inibição das enzimas. Todos os ensaios são feitos em triplicata e foi considerado como inibição mínima o valor de 70% para o seguimento do estudo.

O percentual de inibição foi determinado a partir da atividade enzimática na ausência e na presença do inibidor sendo calculado pela equação:

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

Sendo, V_i a velocidade de reação observada na presença de inibidor e V_0 a velocidade de reação observada na ausência do inibidor (velocidade controle).

Realizada a triagem inicial, as substâncias puras obtidas após os tratamentos cromatográficos, foram ensaiadas frente às cisteíno peptidases em uma concentração de $100\mu\text{M}$. Os compostos que apresentaram inibição significativa (superior a 70%) frente às enzimas foram selecionados para a etapa posterior de determinação dos valores de IC_{50} .

3.9.1 – Determinação do IC_{50} dos Inibidores

O valor de IC_{50} é definido como concentração de inibidor que provoca uma queda de 50% na atividade da enzima. Este valor é uma convenção criada e utilizada com o objetivo de se comparar a potência entre inibidores.

A determinação do IC_{50} foi realizada de maneira direta utilizando o ensaio cinético apresentado com a utilização do substrato fluorogênico. Para a obtenção do IC_{50} utilizaram-se dados de inibição do composto quando testado na concentração de $100\mu\text{M}$. Desta forma, determinaram-se os percentuais de inibição utilizando quinze diferentes concentrações de inibidor, construindo assim uma curva concentração versus inibição. Os dados cinéticos foram obtidos e tratados para a determinação do valor de IC_{50} através do método de regressão não linear empregando o programa Sigmaplot 12.

4 – Resultados e Discussão

Na busca por inibidores de cisteíno peptidases escolheu-se a espécie *B. virgilioides* como fonte de substâncias candidatas a inibidores destas enzimas, a partir de um banco de extratos de plantas que possuem atividades frente às catepsinas existente no nosso laboratório.

As catepsinas K, L e V foram selecionadas considerando que trabalhos realizados anteriormente pelo grupo de produtos naturais, (SEVERINO, 2008; MARQUES, 2011; SILVA, 2011) apresentaram compostos com inibição relevante frente a estas catepsinas. Além disso, existem ainda poucos estudos buscando inibidores seletivos para as cisteíno peptidases, principalmente estudos de triagem de extratos de plantas.

Neste estudo foi realizado o estudo biomonitorado dos extratos de *B. virgilioides*, utilizando a metodologia de ensaios enzimáticos desenvolvida e adaptada para placa de ELISA (SEVERINO, 2008), onde é possível avaliar um grande número compostos utilizando pequenas quantidades de amostra.

4.1 – Estudo Biomonitorado por Atividade Enzimática

4.1.1 – Biomonitoramento dos Extratos e Partições

Os extratos e partições obtidos de *B. virgilioides* foram avaliados quanto à capacidade de inibição das catepsinas K, L e V. Todos os ensaios enzimáticos foram realizados em um espectrofluorímetro ajustado para comprimento de ondas de excitação (λ_{ex}) 380nm e emissão (λ_{em}) 460nm sendo feito o monitoramento direto da hidrólise do substrato Z-FR-MCA através do aumento da fluorescência em função do tempo e com controle da atividade catalítica da enzima. Foram utilizadas placas de ELISA de 96 poços. Todos os extratos, partições líquido-líquido e frações obtidas foram ensaiados em triplicata e inicialmente a uma dosagem de 125 $\mu\text{g/mL}$, sendo selecionados para a continuação do estudo as amostra que apresentam inibição enzimática igual ou superior a 70%.

Através dos ensaios enzimáticos frente às catepsinas K, L e V foi possível verificar a alta capacidade inibitória dos extratos brutos de *B. virgilioides*, uma vez que o extrato bruto é o conjunto de metabólitos presentes na planta. Após a particionamento dos extratos ainda pode-se verificar esta alta atividade de inibição,

contudo de forma mais distribuída. A TABELA 4.1 mostra os valores de porcentagem de inibição dos extratos brutos e suas respectivas partições para as três enzimas.

Analisando os dados obtidos foi possível observar que as partições hexânica e acetato de etila do caule e das folhas apresentaram elevados percentuais de inibição, exceto a partição hexânica do caule. Considerando-se os extratos e partições são misturas muito complexas de compostos e isto pode acarretar em resultados falso-negativos, a falsa inibição pode ser causada pela grande complexidade da mistura e não pela falta de substâncias que inibam as enzimas em questão, a primeira fração escolhida para o isolamento das substâncias ativas foi a hexânica do caule (CH) de *B. virgilioides*.

TABELA 4.1 – Porcentagens de inibição dos extratos e partições líquido-líquido.

Extrato	% inibição catepsinas			Partição	% inibição catepsinas		
	K	L	V		K	L	V
C	79	97	99	H	9	91	97
				A	70	97	99
F	69	95	97	H	85	82	98
				A	85	94	99

4.1.2 – Ensaio Enzimáticos das Frações Obtidas de CH

A fração CH foi submetida a uma separação cromatográfica em coluna contendo sílica gel como fase estacionária e utilizando fase móvel em ordem crescente de polaridade, originando 4 novas frações. Após o fracionamento, as frações obtidas foram submetidas aos ensaios enzimáticos. A TABELA 4.2 mostra os valores de porcentagem de inibição para as enzimas estudadas.

TABELA 4.2 – Porcentagens de inibição das frações obtidas de CH.

Fração	% inibição das catepsinas		Fração	% inibição das catepsinas	
CH2	K	38	CH4	K	64
	L	64		L	0
	V	83		V	50
CH3	K	38	CH5	K	26
	L	64		L	0
	V	83		V	53

As frações que mantiveram a atividade enzimática foram CH2 e CH3. Como este estudo é biomonitorado estas foram submetidas a novos fracionamentos (FIGURA 3.2) para o isolamento dos metabólitos responsáveis pela inibição das enzimas. As tabelas 4.3 e 4.4 mostram os valores das porcentagens de inibição das frações obtidas.

TABELA 4.3 – Porcentagens de inibição das frações obtidas de CH2.

Fração	% inibição das catepsinas		Fração	% inibição das catepsinas	
*CH2.2	K	-	CH2.6	K	22
	L	-		L	11
	V	-		V	32
CH2.3	K	79	CH2.7	K	20
	L	45		L	7
	V	94		V	45
CH2.4	K	70	CH2.8	K	76
	L	4		L	76
	V	70		V	95
CH2.5	K	50			
	L	11			
	V	49			

*fracionada antes da realização dos ensaios enzimáticos

TABELA 4.4 – Porcentagens de inibição das frações obtidas de CH3.

Fração	% inibição das catepsinas		Fração	% inibição das catepsinas	
CH3.1	K	67	CH3.5	K	95
	L	79		L	81
	V	61		V	100
CH3.2	K	84	CH3.6	K	90
	L	94		L	86
	V	98		V	99
CH3.3	K	90	CH3.7	K	62
	L	76		L	0
	V	99		V	96
CH3.4	K	88			
	L	66			
	V	100			

Com exceção da fração CH3.1, todas as outras apresentaram valores elevados de porcentagem de inibição. Assim a fração CH3.3 foi escolhida para dar continuidade a este estudo, sendo submetida a novos fracionamentos (FIGURA 3.2) a fim de purificar as substâncias responsáveis pela atividade. Os valores das porcentagens de inibição obtidos estão descritos na TABELA 4.5.

TABELA 4.5 – Porcentagens de inibição das frações obtidas de CH3.3

Fração	% inibição das catepsinas		Fração	% inibição das catepsinas	
CH3.3A	K	33	CH3.3G	K	82
	L	0		L	59
	V	28		V	92
CH3.3B	K	52	CH3.3H	K	80
	L	0		L	52
	V	24		V	100
CH3.3C	K	59	CH3.3I	K	82
	L	0		L	51
	V	31		V	100

Analisando os resultados das tabelas 4.3, 4.4 e 4.5 pode-se observar que existem diversas frações com valores elevados inibição (acima de 70%). Também se pode notar a presença de frações altamente seletivas. No entanto, mesmo com os resultados obtidos optou-se pela não continuidade dos isolamentos dos metabólitos constituintes destas frações, uma vez que através da análise das frações originárias de CH₂ e CH₃ por CCDA e por RMN ¹H foi observado que elas apresentavam majoritariamente triterpenos e esteroides, que já foram previamente avaliados pelo grupo de produtos naturais frente às catepsinas em estudo, os quais não inibiram estas enzimas. Compostos minoritários existentes nestas frações podem ser os responsáveis pela atividade inibitória apresentadas por elas.

Dos fracionamentos realizados com CH foi possível identificar 5 substâncias sendo os triterpenos lupeol e lupenona, a mistura dos esteroides β-sitosterol e estigmasterol e um éster derivado do ácido *trans* *p*-cumárico.

4.1.3 – Ensaios enzimáticos das frações obtidas de CA

A fração CA foi submetida a uma separação cromatográfica em coluna contendo sílica gel como fase estacionária e utilizando o modo de eluição isocrático (FIGURA 3.3). O fracionamento resultou em 14 frações as quais foram analisadas por CCDA, sendo que aquelas que apresentaram similaridade foram agrupadas resultando em 10 frações. Após serem agrupadas todas as frações foram submetidas aos ensaios enzimáticos. Os valores de porcentagem de inibição de cada fração são mostrados na TABELA 4.6.

TABELA 4.6 – Porcentagens de inibição das frações obtidas de CA.

Fração	% Inibição das Catepsinas		Fração	% Inibição das Catepsinas	
CA1	K	87	CA6	K	77
	L	90		L	80
	V	97		V	98
CA2	K	72	CA7	K	69
	L	78		L	75
	V	86		V	99
CA3	K	96	CA8	K	87
	L	94		L	80
	V	99		V	98
CA4	K	82	CA9	K	87
	L	95		L	80
	V	99		V	98
CA5	K	81	CA10	K	59
	L	95		L	77
	V	97		V	96

Analisando os resultados descritos na TABELA 4.6 foi possível notar que todas as frações provenientes do fracionamento de CA tiveram elevados valores de porcentagem de inibição enzimática, sendo interessantes para a busca de compostos que inibam as catepsinas em estudo. A primeira fração escolhida para dar continuidade ao estudo foi a CA4, que foi fracionada conforme mostrado na FIGURA 3.3. Após o fracionamento de CA4 todas as frações foram submetidas aos ensaios enzimáticos, os resultados obtidos estão mostrados na TABELA 4.7.

TABELA 4.7 – Porcentagens de inibição das frações CA4.

Fração	% Inibição das Catepsinas		Frações	% Inibição das Catepsinas	
CA4.1	K	97	CA4.8	K	70
	L	100		L	98
	V	70		V	99
CA4.2	K	87	CA4.9	K	66
	L	100		L	99
	V	100		V	100
CA4.3	K	80	CA4.10	K	89
	L	100		L	96
	V	82		V	96
CA4.4	K	98	CA4.11	K	66
	L	96		L	99
	V	100		V	100
CA4.5	K	95	CA4.12	K	75
	L	98		L	100
	V	97		V	98
CA4.6	K	89	CA4.13	K	41
	L	100		L	10
	V	100		V	88
CA4.7	K	88			
	L	92			
	V	100			

Analisando os resultados da TABELA 4.7 é possível observar que as frações CA4.9 e CA4.11 não inibem de forma significativa a catepsina K. A fração CA4.13 inibe apenas a catepsina V, sendo estas frações interessante na busca de compostos com seletividade.

As demais frações provenientes de CA4 apresentaram elevados percentuais de inibição. Através da análise das frações por CCDA pode-se observar uma grande quantidade de substâncias contidas em cada fração. Sendo assim a fração CA4.3 foi a escolhida para a purificação dos seus constituintes. Esta foi submetida novos

tratamentos cromatográficos (FIGURA 3.3) para a purificação das substâncias presentes nesta fração.

Outras frações provenientes de CA foram submetidas a tratamentos cromatográficos para a purificação de seus constituintes químicos, conforme mostrado na FIGURA 3.3. Por serem realizados fracionamentos apenas para a purificação das substâncias existentes, as subfrações obtidas de cada fracionamento não foram submetidas aos ensaios de inibição enzimática frente às catepsinas.

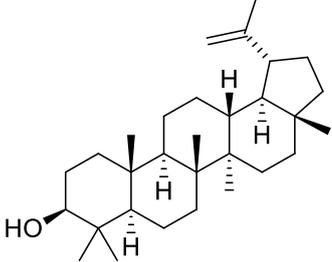
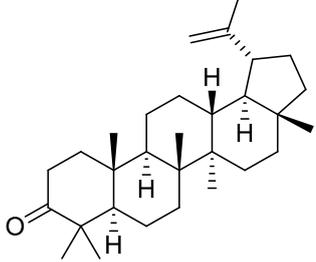
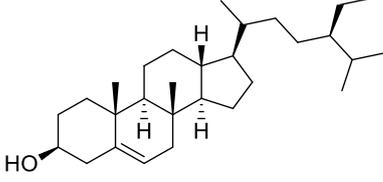
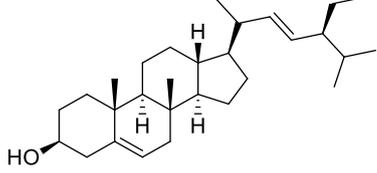
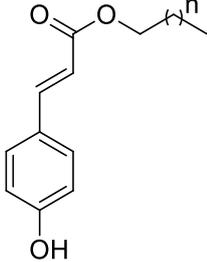
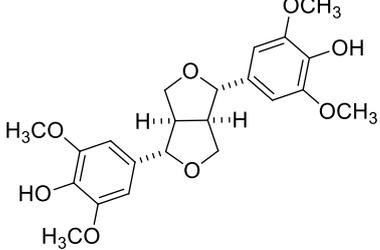
4.2 – Substâncias Identificadas

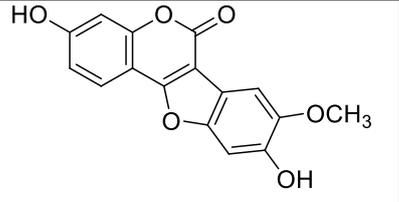
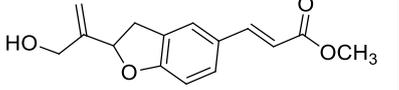
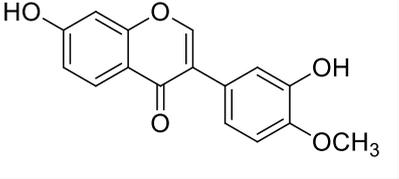
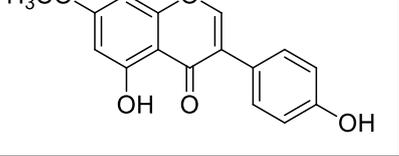
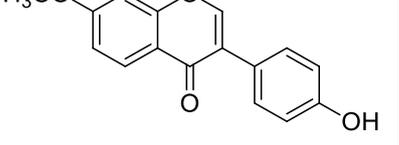
Da fração hexânica do caule de *B. virgilioides* foram isoladas 5 substâncias, sendo dois triterpenos lupeol (1) e lupenona (2), uma mistura dos esteroides β -sitosterol (3) e estigmasterol (4) e um éster derivado do ácido *trans p*-cumárico.

Da fração acetato de etila do caule de *B. virgilioides* foram isoladas 6 substâncias, sendo uma lignana furofurânica: siringaresinol (6); um derivado do coumestrol (7); um derivado benzofurânico: bowdenol (8) e três isoflavonas: 7, 3'-diidroxí-4'-metoxi-isoflavona (9), 5, 4'-diidroxí-7'-metoxi-isoflavona (10) e 4'-hidroxí-7'-metoxi-isoflavona (11).

Todas as substâncias isoladas são mostradas na TABELA 4.8 juntamente com a descrição da fração originária de cada substância.

TABELA 4.8 – Substâncias isoladas do caule de *B. virgilioides*.

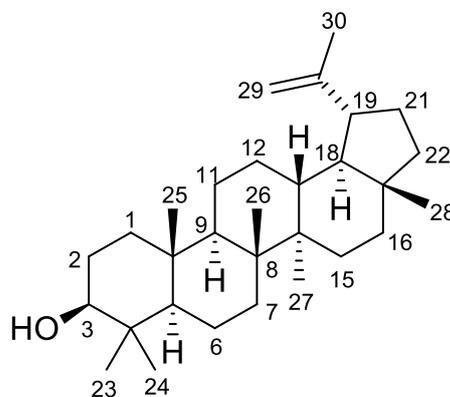
Código da Substância	Estrutura	Fração de Origem	Massa (mg)	Identificação
1		CH2.6 e CH2.7	256	Página 39
2		CH2.2	14,5	Página 40
3		CH3.3D	15,3	Página 41
4		CH3.3D		Página 41
5		CH3.3F	0,8	Página 43
6		CA4.3FS2	0,3	Página 44

7		HA5	0,5	Página 47
8		CA6.8.3	1,2	Página 51
9		HC5S4	1,0	Página 54
10		HD5	0,9	Página 59
11		CA6.10A	0,6	Página 61

4.3 – Elucidação Estrutural

4.3.1 – Substância 1

A substância 1 foi isolada da fração hexânica do extrato etanólico do caule de *B. virgilioides* na forma de um sólido branco, a identificação do composto como lupeol, um triterpeno da classe lupano, foi realizada através da análise dos dados de RMN ^1H .



No espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.1) substância 1 foi possível observar seis singletos na região de δ_{H} 0,76 a 1,06 referentes a hidrogênios de grupos metilas e

um singleto em δ_H 1,68 referente a hidrogênios de grupo metila ligado a carbono insaturado. Também foram observados sinais de deslocamentos químicos em δ_H 4,56 (s) e em 4,69 (s) característicos de hidrogênios de dupla terminal. Um sinal em 3,20ppm (dd, $J= 11,2$ e $5,1$ Hz) referente a um hidrogênio carbinólico (H3), que indica a presença de um grupo hidroxila na posição equatorial (VENKATA, PRAKASH & PRAKASH, 2012). Os dados do RMN 1H sugere a identidade desta substância como sendo o triterpeno lupeol.

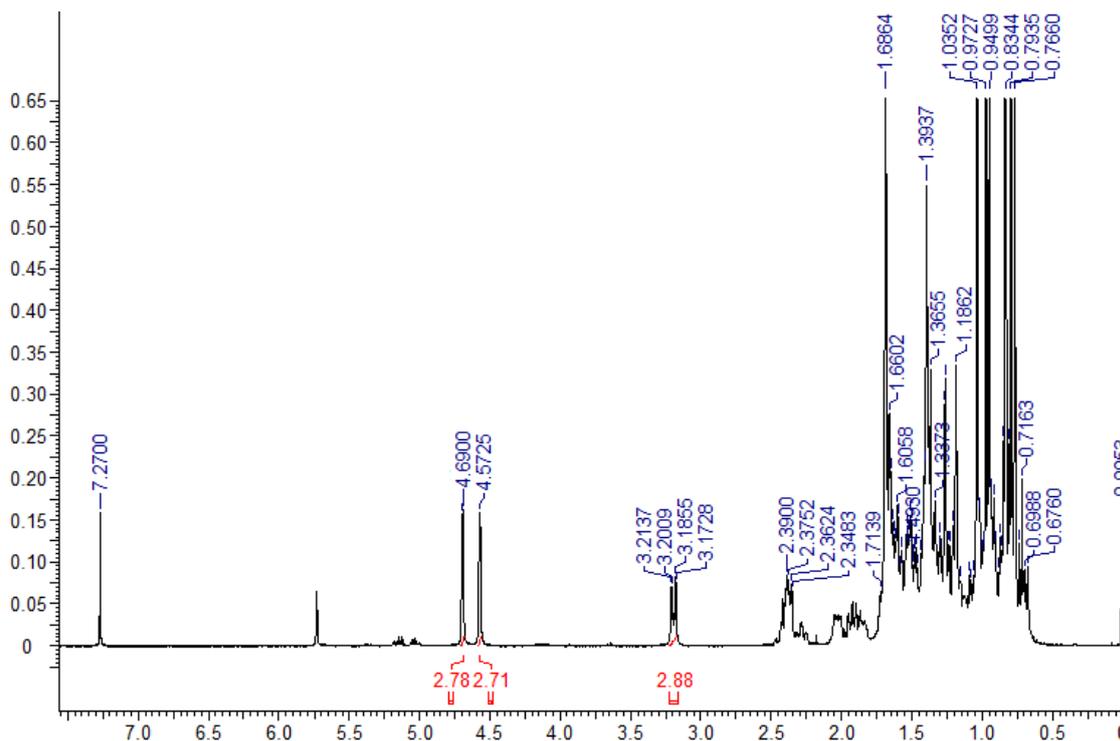
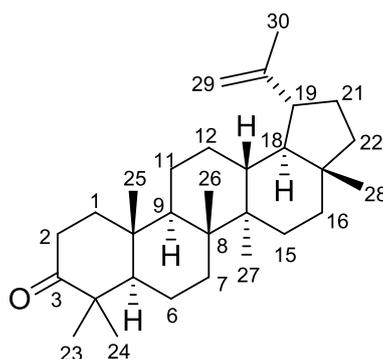


FIGURA 4.1 – Espectro de RMN 1H da substância **1** (400MHz, $CDCl_3$).

4.3.2 – Substância 2

A substância **2** foi isolada da fração hexânica do extrato etanólico do caule de *B. virgilioides*. Através dos dados de RMN 1H foi possível identificar o composto como lupenona, um triterpeno com esqueleto do tipo lupano.



No espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.2) foram observados seis singletos na região entre δ_{H} 0,80 e 1,68 integrando pra três hidrogênios cada, referente a hidrogênios de grupos metilas. E em 4,57 e 4,69ppm foram observados dois singletos característicos de hidrogênios de dupla terminal. A ausência do sinal em torno de δ_{H} 3,2 referente ao hidrogênio 3, quando comparado com o lupeol, indica uma oxidação nesta posição, que é característica do triterpeno lupenona (VENKATA, PRAKASH & PRAKASH, 2012).

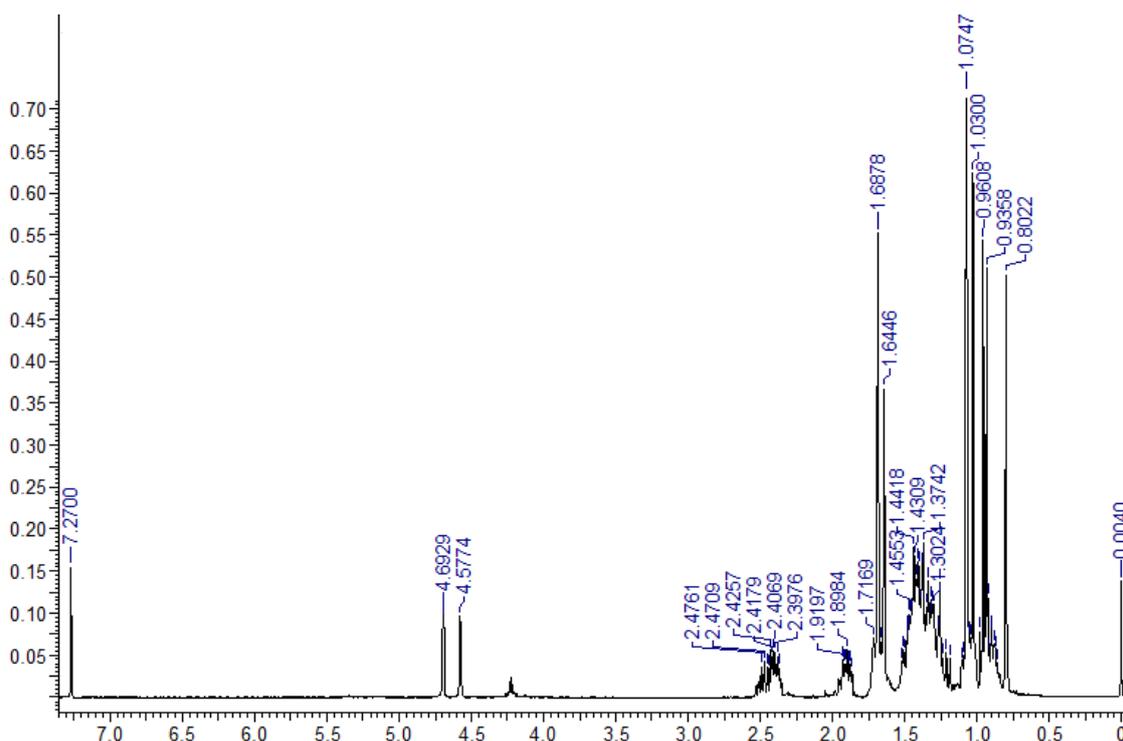
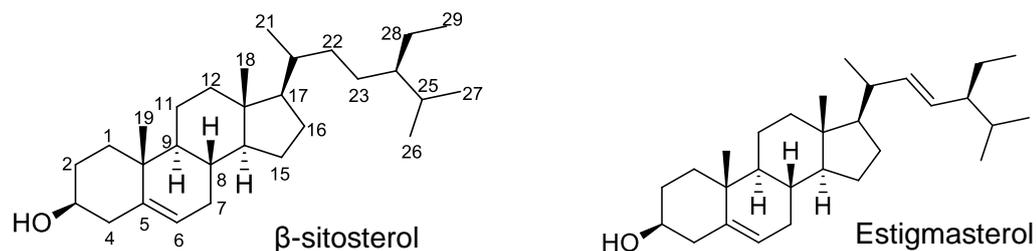


FIGURA 4.2 – Espectro de RMN ^1H da substância **2** (400MHz, CDCl_3).

4.3.3 – Substâncias **3** e **4**

A mistura das substâncias **3** e **4** foi isolada da fração hexânica do extrato etanólico do caule de *B. virgilioides*. A identificação dos compostos como uma

mistura dos esteroides β -sitosterol e estigmasterol foi feita através dos dados de RMN ^1H e em comparação com dados da literatura (COSTA et al., 2010).



No espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.3) foram observados sinais entre δ_{H} 0,6 e 2,3 referentes a hidrogênios de grupos metilas de esteroides, também foi observado um duplete em δ_{H} 5,36 ($J= 5\text{Hz}$) referente a hidrogênios olefinicos (H6), e um multiplete em δ_{H} 3,53 referente a H3. O espectro também apresentou dois duplos dupletos em δ_{H} 5,03 (H-22, $J=15,2$ e $8,52\text{Hz}$) e δ_{H} 5,16 (H-23, $J= 15,2$ e $8,52\text{Hz}$) indicando a presença do estigmasterol.

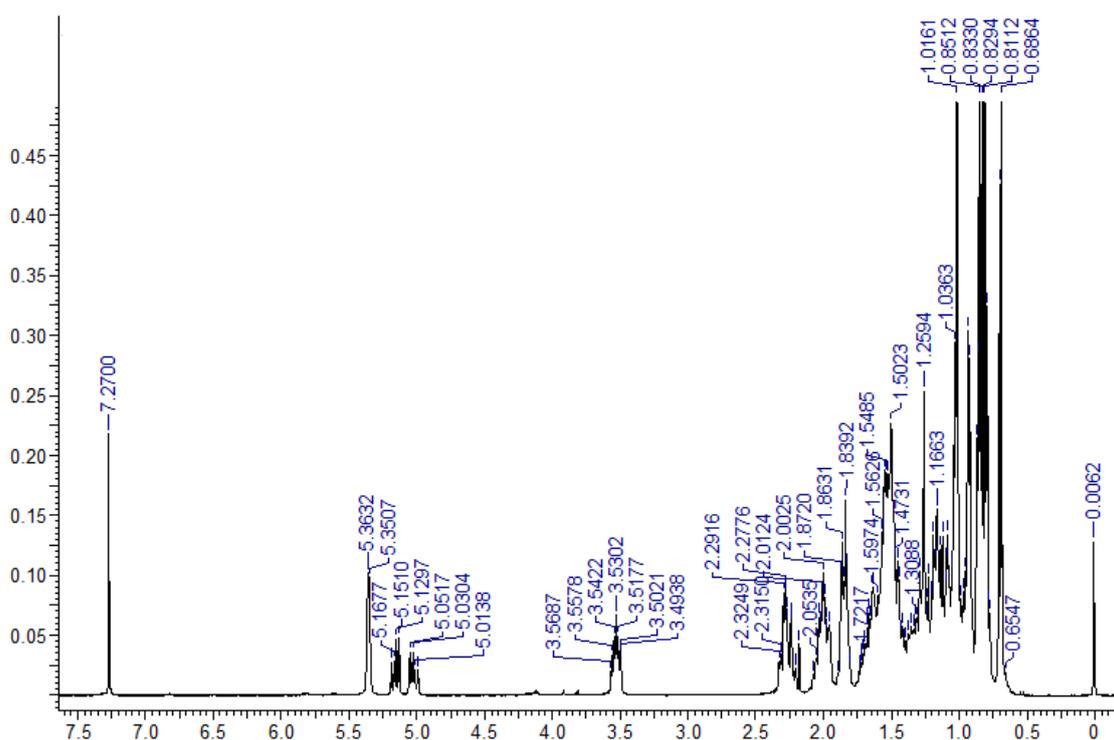
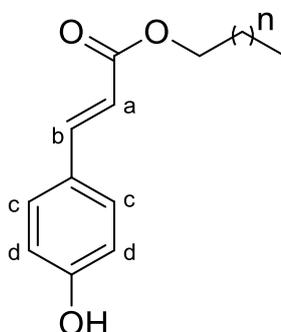


FIGURA 4.3 – Espectro de RMN ^1H da mistura das substâncias 3 e 4 (400MHz, CDCl_3).

4.3.4 – Substância 5

A substância **5** foi isolada da fração acetato de etila do extrato etanólico do caule de *B. virgilioides*. Através dos dados de RMN ^1H foi possível identificar o composto como um éster derivado do ácido *trans p*-cumárico.



No espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.4) da substância **5** foi observado um duplete em δ_{H} 7.44 (2H, $J=8,7\text{Hz}$) e um duplete em δ_{H} 6,86 (2H, $J=8,7\text{Hz}$) referentes aos hidrogênios Hc e Hd respectivamente do anel aromático *para*-dissubstituído. Também foi observado um duplete em δ_{H} 7,65 (Hb) e um duplete em δ_{H} 6,32 (Ha) ambos integrando para um hidrogênio e com constante de acoplamento igual a 16Hz, característica de acoplamentos em *trans* (KORP et al., 1996). A substância isolada encontra-se esterificada por um álcool contendo uma cadeia alquílica longa tendo um grupo metil terminal na sua extremidade. Isto pode ser comprovado através dos sinais de deslocamento químico em δ_{H} 4,19 (t), δ_{H} 1,26 (s) e δ_{H} 0,87 (m) apresentados no espectro de RMN ^1H da substância. Não foi possível fazer o espectro de massas para a determinação da extensão da cadeia alquílica devido a pouca quantidade de massa isolada desta substância (0,8mg). Visto que toda massa obtida foi utilizada para a realização dos ensaios enzimáticos

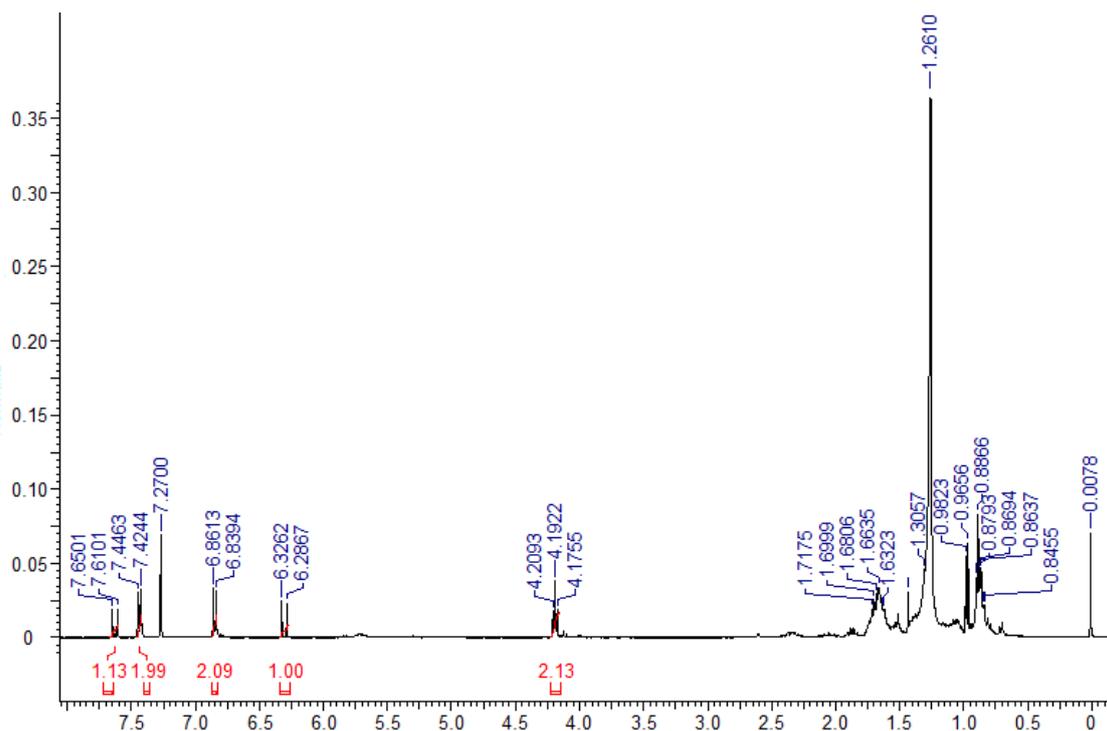
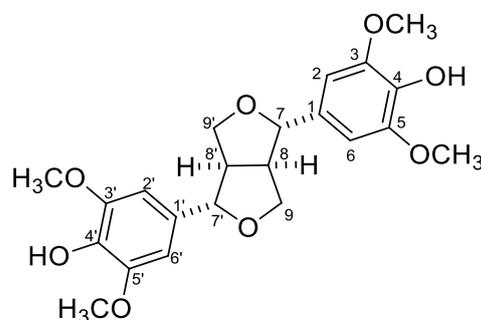


FIGURA 4.4 – Espectro de RMN ^1H da substância **5** (400MHz, CDCl_3).

O ácido *p*-cumárico pertence à família dos ácidos cinâmicos. Ele pode ser formado a partir da perda de amônia do aminoácido fenilalanina seguido de oxidação na posição *para*, ou através apenas da perda de amônia do aminoácido tirosina. Os ácidos cinâmicos são precursores se diversas vias metabólicas nas plantas, dentre elas a das lignanas e cumarinas (DEWICK, 2002).

4.3.5 – Substância **6**

A substância **6** foi isolada da fração acetato de etila do extrato etanólicos do caule de *B. virgilioides*. Através dos dados de RMN ^1H foi possível identificar o composto como sirigaresinol, uma lignana furofuranica.



No espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.5) foi observado um singlete na região de δ_{H} 6,59 (4H) referente aos hidrogênios H2/H2' e H6/H6', um singlete em δ_{H} 5,49

integrando para dois hidrogênios que sugere a presença de duas hidroxilas ligadas a anel aromático e um duplete em δ_H 4,74 (2H, $J= 4,16\text{Hz}$) referente aos hidrogênios H7/H7'. Observou-se também e um duplo duplete na região de δ_H 4,28 (2H, $J= 9,36$ e $6,64\text{Hz}$) referente aos hidrogênios H9a/H9a', um singleto intenso em δ_H 3,91 integrando para doze hidrogênios, que sugere a presença de quatro grupos metoxilas e um multiplete em δ_H 3,10 integrando pra dois hidrogênios atribuído aos hidrogênios H8/H8'. Na região entre δ_H 3,8 e 4,0 é esperado um duplo duplete integrando para dois hidrogênios referente aos hidrogênios H9b/H9b', sendo que este está sobreposto pelo sinal das metoxilas. Através do valor da integral dos sinais nesta região é possível confirmar a presença destes hidrogênios. Os valores as integrais dos sinais de RMN ^1H da substância **6**, indicaram que esta molécula é simétrica. Os dados do RMN ^1H da substância **6** estão descritos na TABELA 4.9 juntamente com os dados da literatura utilizada para comparação.

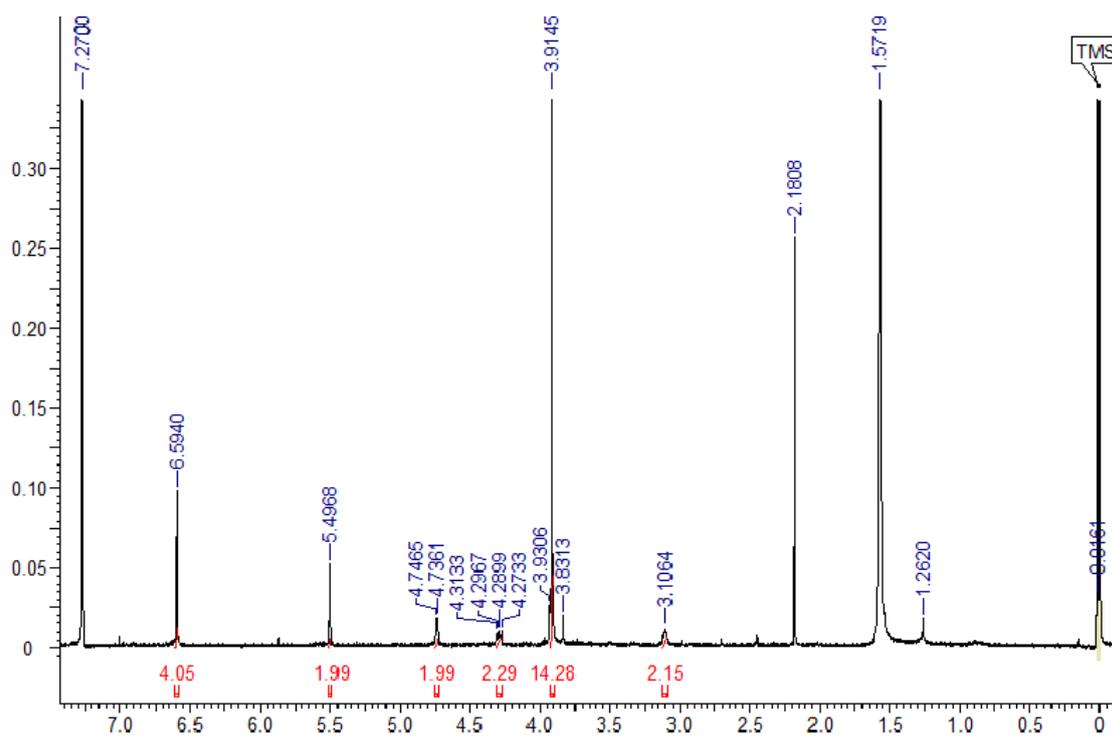


FIGURA 4.5 – Espectro de RMN ^1H da substância **6** (400MHz, CDCl_3).

TABELA 4.9 – Dados de RMN ^1H da substância **6** comparados com dados da literatura utilizados para comparação.

H	δ_{H} (400 MHz, CDCl_3)	δ_{H} (Park et al., 2010) (400 MHz, CD_3OD)
2/2', 6/6'	6,59 (s)	6,65 (s)
7/7'	4,74 (d, J=4,16Hz)	4.70 (d, J=4,0Hz)
9a/9'a	4,28 (dd, J= 9,36 e 6,64Hz)	4,25 (dd, J=9,0 e 6,8Hz)
9b/9'b	3,8-4,0 (dd)	3,82 (dd, J=9,0 e 3,6Hz)
8/8'	3,10 (m)	3,18 (m)
OCH_3	3,91 (s)	3,83 (s)

Através dos dados obtidos com o espectro de RMN ^1H e em comparação com os dados da literatura (Park et al., 2010), foi possível concluir que a substância **6** é uma lignana furofuranica conhecida como siringaresinol. As lignanas furofurânicas possuem três possíveis diastereoisômeros (FIGURA 4.6): o isômero com os dois grupos R em equatorial (diequatorial), o isômero com um grupo R em equatorial e o outro em axial e o isômero com os dois grupos R na axial (diaxial) (RUSSELL & FENEMORE, 1973).

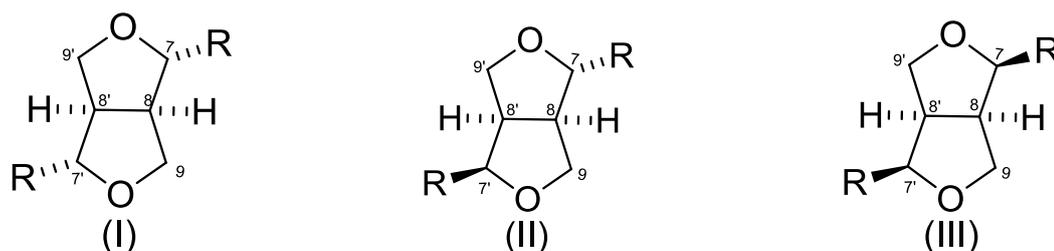


FIGURA 4.6 – Possíveis isômeros para lignanas furofuranicas.

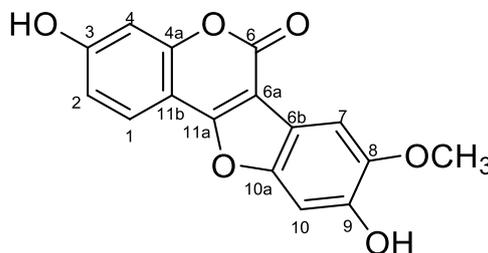
Os isômeros diequatorial (I) e diaxial (III) possuem apenas quatro sinais de deslocamentos químicos diferentes e não oito como o esperado. Os hidrogênios 7 e 7' possuem o mesmo deslocamento químico se apresentando como um único duplete, assim como os hidrogênios 8 e 8' e os hidrogênios 9 e 9'. No isômero (II) axial/equatorial H8 possui deslocamento químico diferente de H8', o mesmo ocorre com os prótons benzílicos H7 e H7' que diferem nos valores de deslocamento químico.

A distinção entre os três isômeros pode ser feita através da análise dos valores de deslocamento químico de H9 e H9' uma vez que eles possuem deslocamentos químicos bastante característicos em cada um dos três isômeros. No isômero com configuração diaxial (III), os sinais de H9 e H9' são observados entre δ_H 3,3 e 3,7 sendo estes blindados pelo efeito do anel aromático. No isômero (I), diequatorial, os prótons metilênicos (H9 e H9') são observados entre δ_H 4,2 e 4,4 devido ao efeito de desblindagem dos grupos R em equatorial. No caso do isômero (II) um dos prótons está mais desblindado e o outro mais blindado, correspondendo a um grupo R em equatorial e o outro grupo R em axial respectivamente (RUSSELL & FENEMORE, 1973).

De acordo com os dados de RMN 1H apresentados no espectro da FIGURA 4.5 pode-se concluir que a substância isolada corresponde a lignana com configuração diequatorial.

4.3.6 – Substância 7

A substância **7** foi isolada da fração acetato de etila do extrato etanólico do caule de *B. virgilioides*. A análise dos espectros de RMN 1H sugeriu que **7** tratava-se do 8-metoxi-cumestrol.



O espectro de RMN 1H (FIGURA 4.7) apresentou um duplete em δ_H 7,88 (1H, $J= 8,5\text{Hz}$) referente ao acoplamento em *orto* de H1 com H2, um duplo duplete em δ_H 7,01 (1H, $J= 8,5$ e $2,3\text{Hz}$) referente ao acoplamento de H2 com uma constante *orto* com H1 e com uma constante *meta* com H4 e um duplete em δ_H 6,94 (1H, $J= 2,3\text{Hz}$) atribuído ao acoplamento de H4 com H2 em *meta*, indicando a presença de um anel aromático trissubstituído. Esses dados foram comparados com dados da literatura (DURANGO et al., 2002) o que possibilitou a sugestão do anel aromático trissubstituído.

Também foi possível observar um singlete em δ_H 7,44 (1H) atribuído a H7 e um singlete em δ_H 7,24 (1H) atribuído a H10, que sugeriu a presença de um segundo anel aromático na molécula, tetrassubstituído. Comparando esses dados com os da literatura (LI et al., 2003) foi proposto o segundo anel aromático da

molécula. Além disso, foi observado um sinal em δ_H 3,99 integrando pra três hidrogênios, característicos de hidrogênios de grupos metoxilas.

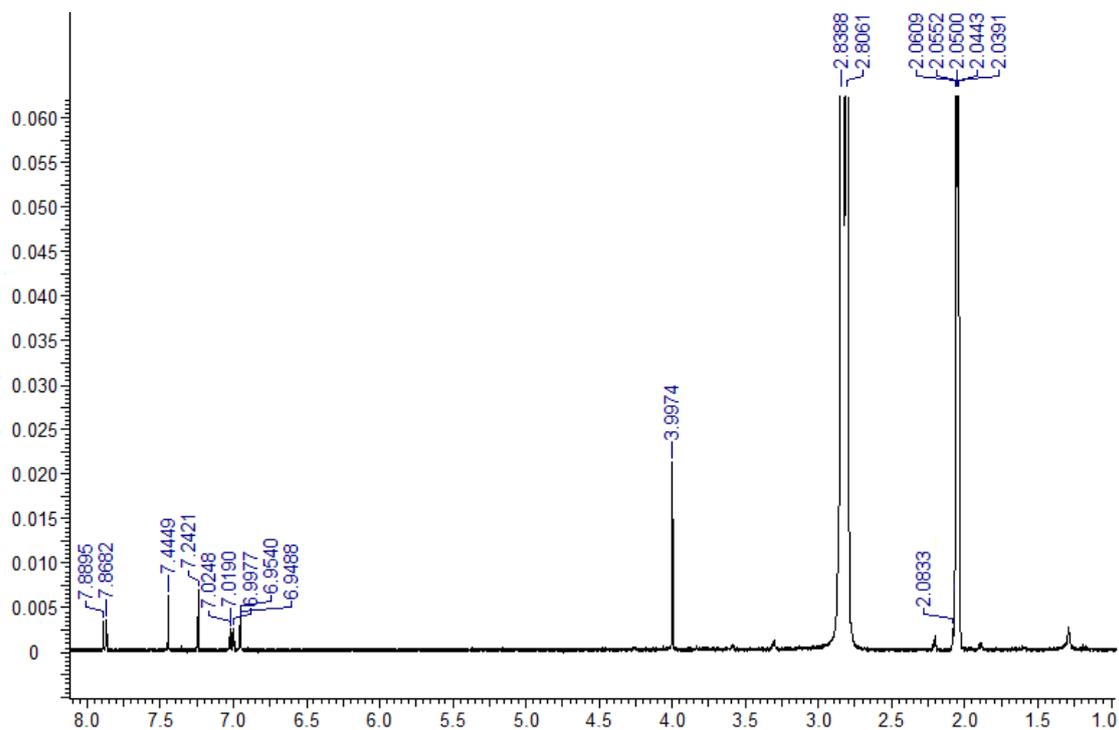


FIGURA 4.7 – Espectro de RMN 1H da substância **7** (400MHz, $(CD_3)_2CO$)

O espectro de HSQC (FIGURA 4.8) de **7** mostrou as correlações dos hidrogênios em δ_H 7,88; 7,01; 6,94; 7,44 e 7,24 com seus respectivos carbonos em δ_C 123,2; 114,1; 103,8; 102,5 e 99,0, confirmando a presença de cinco carbonos metínicos (CH).

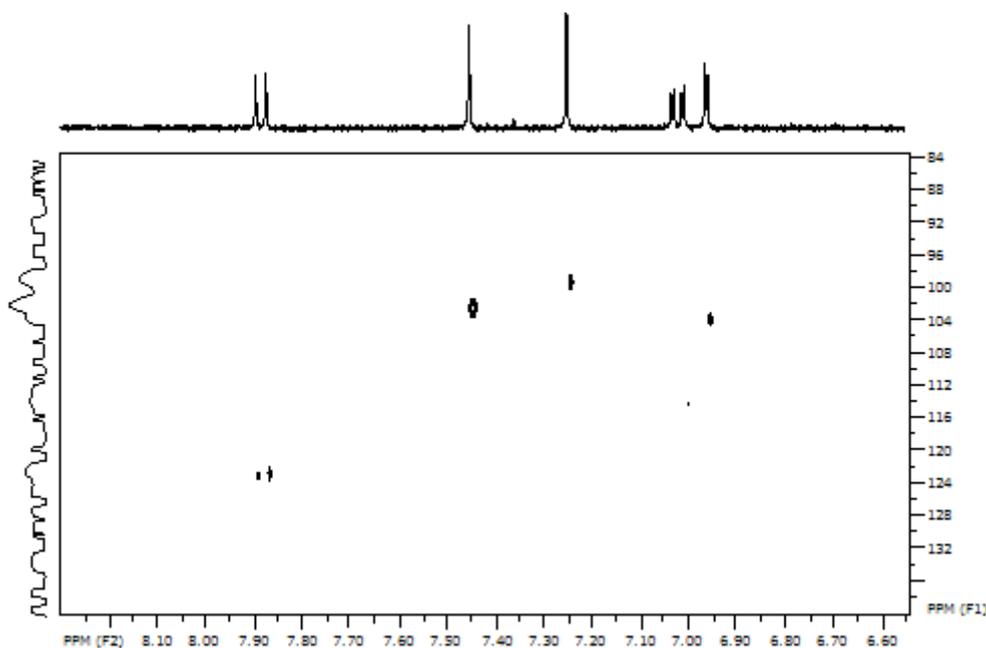


FIGURA 4.8 – Mapa de contorno de HSQC da substância **7** (400MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$).

O espectro de HMBC (FIGURA 4.9) de **7** mostrou a correlação do hidrogênio em δ_{H} 7,88 (H1) com os carbonos δ_{C} 103,8 (H4) (J^4); 156,2 (H3) e 161,1 (H4a) (J^3) e com 105,9 (H11b) (J^2); em δ_{H} 7,01 (H2) com os carbonos em δ_{C} 103,8 (C4) e 105,9 (C11b) (J^3); e em δ_{H} 6,94 (H4) com os carbonos δ_{C} 105,9 (C11b) e 114,1 (C2) (J^3) e com δ_{C} 155,9 (C3) e 161,4 (C4a) (J^2). Com estes dados foi possível confirmar a presença de um anel aromático trissubstituído na molécula, tendo como um dos seus substituintes uma hidroxila.

Também foi possível observar no espectro de HMBC as correlações entre os hidrogênios em δ_{H} 7,4 (H7) com os carbonos δ_{C} 99,4 (C10); 104,1 (C6a); 115,5 (C6b); 147,3 (C8) e 151,1 (C9); em 7,24 (H10) com os carbonos δ_{C} 102,5 (C7); 115,5 (C6b); 147,3 (C8) e 151,1 (C9) e dos hidrogênios em δ_{H} 3,99 com os carbonos 147,3 (C8) e 102,5 (C7). Com estes dados foi proposto um segundo anel aromático na molécula, sendo este tetrassubstituído, possuindo um grupo hidroxila e um metoxila ligados a ele.

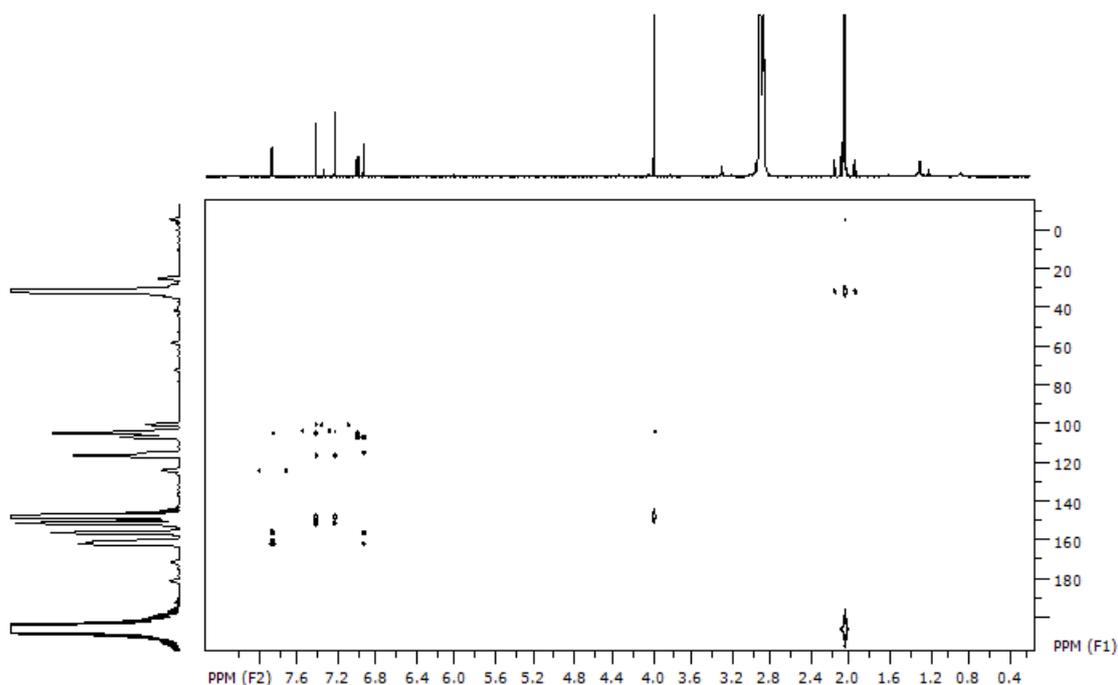


FIGURA 4.9 – Mapa de contorno de HMBC da substância **7** (600MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$).

No experimento de NOE (FIGURA 4.10), ao irradiar o próton em δ_{H} 7,87 foi observado o aumento na intensidade do sinal em δ_{H} 7,00, ao irradiar o próton em δ_{H} 7,00 ocorre o aumento da intensidade do sinal em δ_{H} 7,87. Quando o próton em δ_{H} 6,95 foi irradiado não se observou aumento na intensidade de nenhum sinal e ao irradiar o próton em δ_{H} 3,99 foi observado o aumento da intensidade do sinal em δ_{H} 7,43.

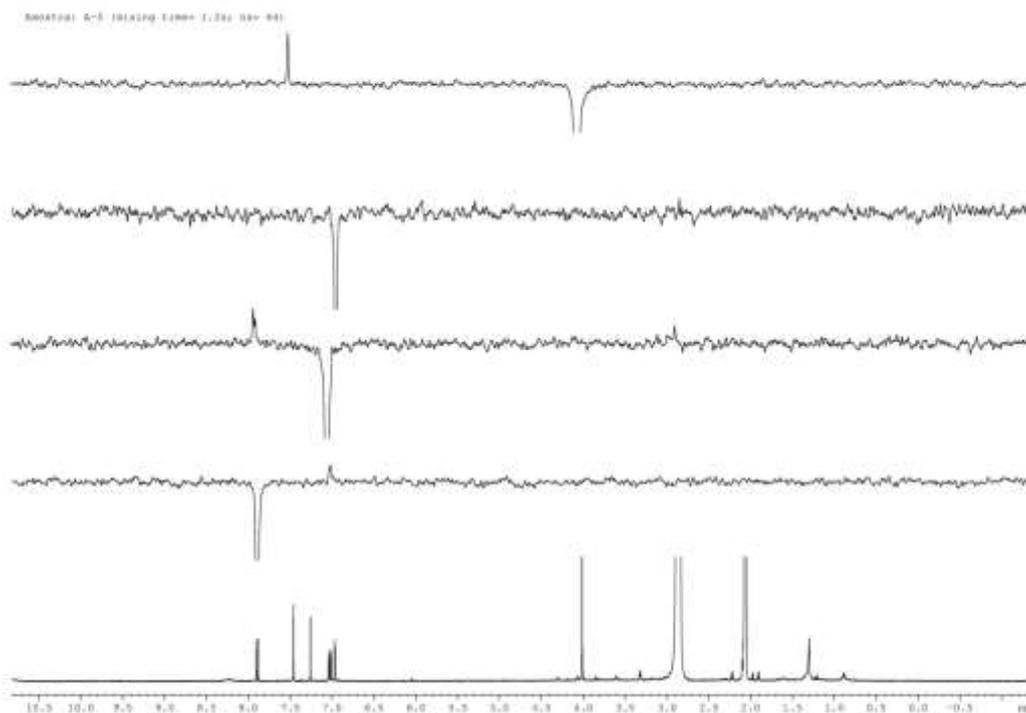


FIGURA 4.10 – Espectro de NOE da substância **7** (400MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$).

O espectro de massas FIGURA 4.11 apresentou o pico do íon quase molecular com relação m/z de 297 referente à fórmula molecular $\text{C}_{16}\text{H}_9\text{O}_6$, que é a massa esperada visto que a ionização foi feita no modo negativo. A análise do conjunto de dados obtidos e a comparação com dados da literatura foi pertinente a identificação da substância **7**.

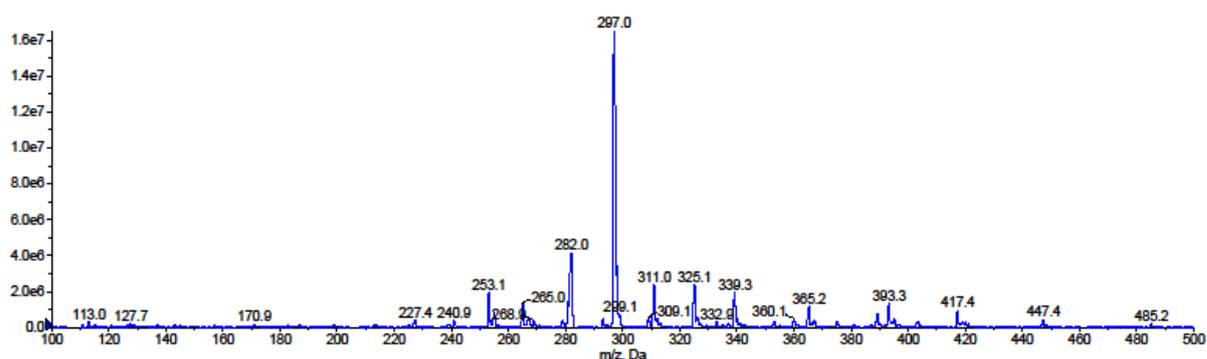
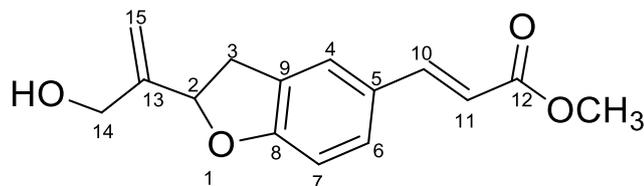


FIGURA 4.11 – Espectro de massas da substância **7** obtido por inserção direta com ionização no modo negativo.

4.3.7 – Substância **8**

A substância **8** foi isolada na forma de um óleo viscoso com coloração amarela. Através da análise dos espectros de RMN ^1H foi possível identificar o composto como bowdenol.



No espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.12) foi possível observar um duplete em δ_{H} 7,66 (H10) e um duplete em δ_{H} 6,28 (H11) ambos integrando para um hidrogênio cada e com constante de acoplamento igual a 16Hz, característica de acoplamentos em *trans*, sugerindo a presença de um sistema carbonílico α,β -insaturado. Foram observados sinais característicos de hidrogênios aromáticos em δ_{H} 7,38 (s largo, H-4), δ_{H} 7,33 (d, $J = 8,3\text{Hz}$, H6) e δ_{H} 6,81 (d, $J = 8,3\text{Hz}$, H7) sugerindo a presença de uma anel aromático trissubstituído. Em δ_{H} 3,79 observou-se um singleto intenso integrando pra três hidrogênios referente aos hidrogênios de grupo metoxilas.

O espectro de RMN ^1H revelou ainda um duplo duplete em δ_{H} 3,42 ($J = 15,7$ e $9,8$ Hz, H3a) e um duplo duplete em δ_{H} 3,17 ($J = 15,7$ e $8,3$ Hz, H3b). Para H2 foi observado um tripleto em δ_{H} 5,40 ($J = 8,3\text{Hz}$), entretanto para este hidrogênio seria esperado um duplo duplete com as constantes de acoplamento de $8,3$ e $9,8\text{Hz}$ referente ao acoplamento de H2 com os hidrogênios 3a e 3b. Também foi observado um singleto em δ_{H} 5,28 integrando pra dois hidrogênios atribuído aos hidrogênios olefínicos (H15), e um multiplete em δ_{H} 4,28 integrando para dois hidrogênios atribuídos aos hidrogênios carbinólicos (H14).

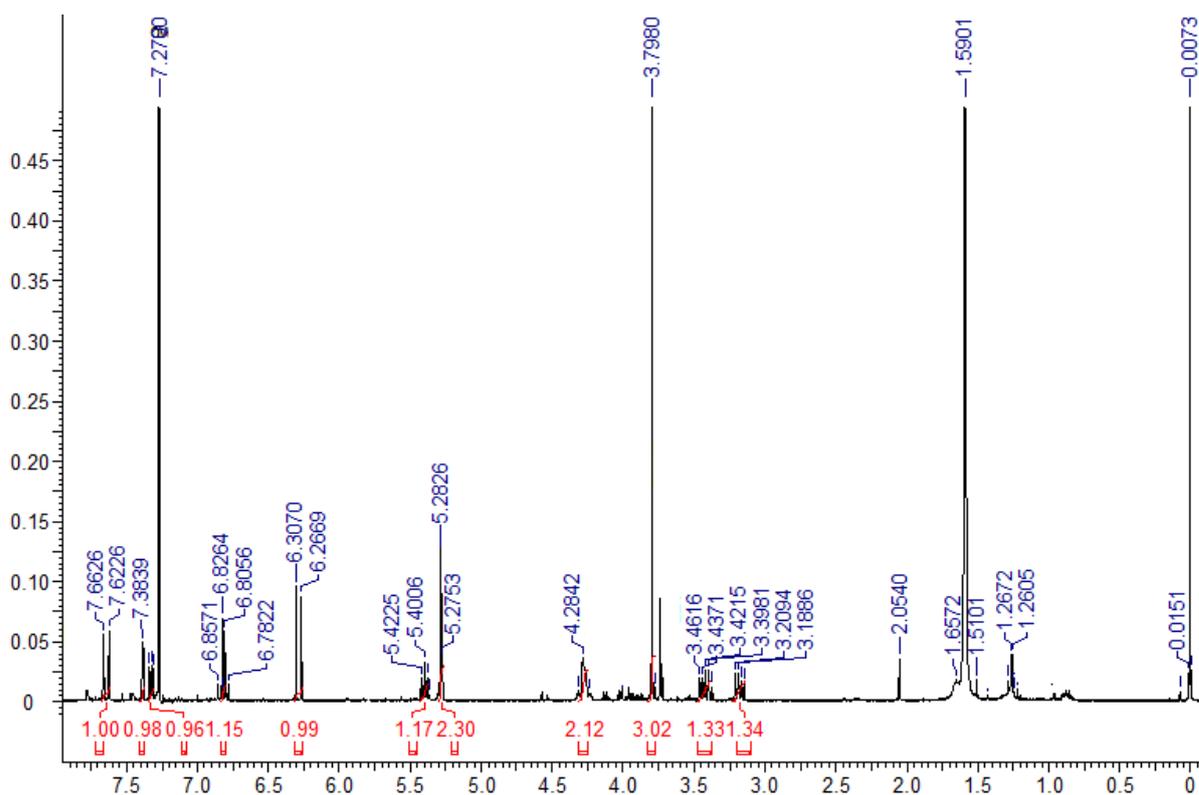


FIGURA 4.12 – Espectro de RMN ¹H da substância **8** (400MHz, CDCl₃).

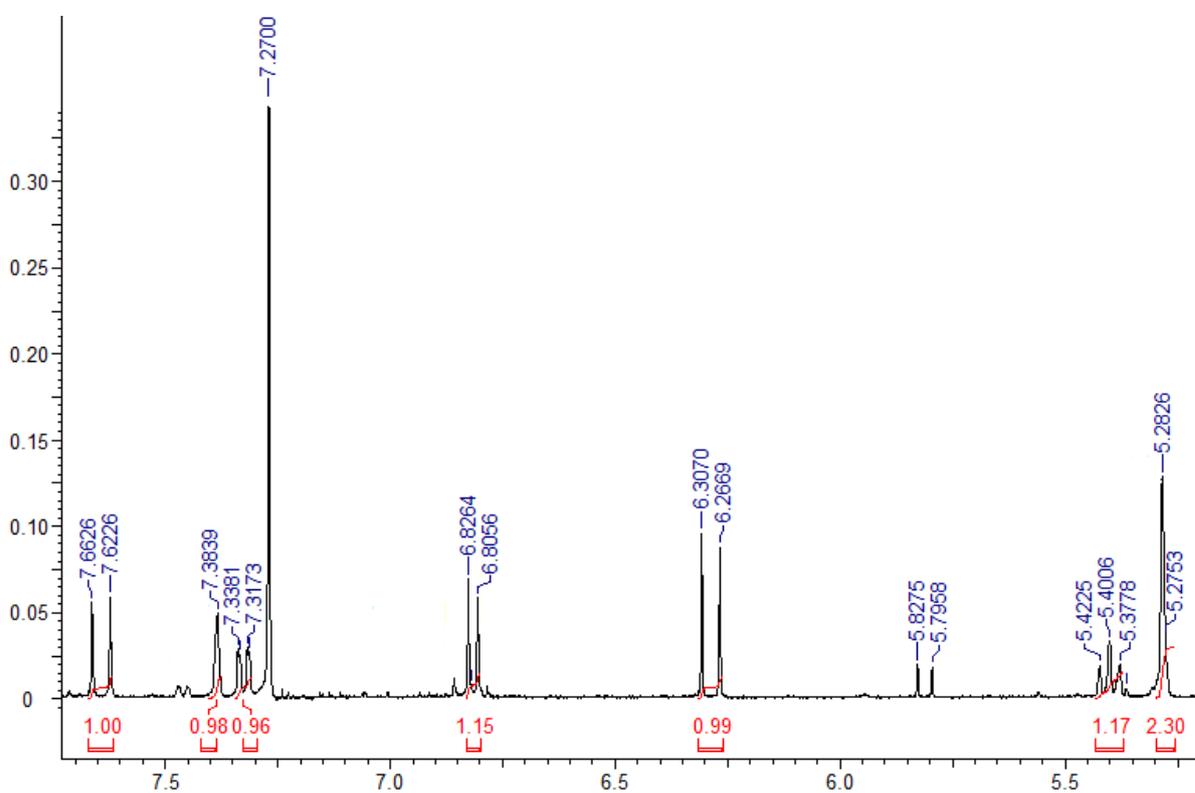


FIGURA 4.13 – Ampliação do espectro de RMN ¹H da substância **8** (400MHz, CDCl₃).

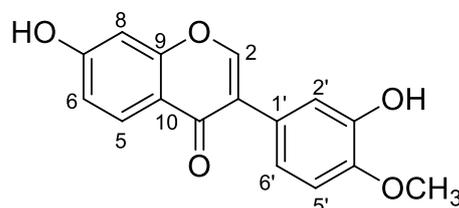
Os deslocamentos químicos de hidrogênio obtidos da substância **8** foram comparados com dados da literatura (MELO et al., 2001) (TABELA 4.10). Assim foi possível concluir que a substância **8** é o derivado benzofurânico, bowdenol.

TABELA 4.10 – Dados de RMN ^1H da substância **8**.

H	δ_{H} (400MHz, CDCl_3)	δ_{H} (MELO et al., 2001) (500MHz, CDCl_3)
2	5,40 (t, J= 8,3Hz)	5,35 (dd, J= 9,5 e 8,3Hz)
3	a 3,42 (dd, J= 15,7 e 9,8Hz) b 3,17 (dd, J= 15,7 e 8,3Hz)	3,37 (dd, J= 15,7 e 9,5Hz) 3,13 (dd, J=15,7 e 8,3Hz)
4	7,38 singleto largo	7,33 (brs)
6	7,33 (d, J= 8,3Hz)	7,28 (d, J= 8,3Hz)
7	6,81 (d, J= 8,3Hz)	6,76 (d, J= 8,3Hz)
10	7,66 (d, J= 16Hz)	7,63 (d, 15,9Hz)
11	6,27 (d, J= 16Hz)	6,24 (d, 15,9Hz)
14	4,28 (m)	4,23 (d, J= 13,7Hz) e 4,22 d, J= 13,7Hz)
15	5,28 (s) 2H	5,23 e 5,27
OCH_3	3,79 (s)	3,75 (s)

4.3.8 – Substância 9

A substância **9** foi isolada da fração acetato de etila do caule de *B. virgilioides*. A análise do espectro de RMN ^1H sugere que **9** é uma isoflavona.



No espectro de RMN ^1H foi observado um singleto em δ_{H} 8,07 (1H) atribuído ao hidrogênio da posição 2, característico de isoflavonas, e um singleto em δ_{H} 3,88 integrando pra três hidrogênios referente a hidrogênios de grupo metoxila.

Também foi observado um duplete em δ_{H} 6,70 (1H, J= 2,0Hz), um duplo duplete em δ_{H} 6,85 (1H, J= 2,0 e 9,0Hz) e um duplete em δ_{H} 7,99 (1H, J= 9,0Hz) atribuídos respectivamente aos hidrogênios 8, 6 e 5 do anel A da isoflavona. E um

duplete em δ_H 7,04 (1H, $J= 1,52\text{Hz}$) atribuído ao hidrogênio 2' e um duplete em δ_H 6,97 (2H, $J= 1,52$) foi atribuído aos hidrogênios 5' e 6' do anel B da isoflavona.

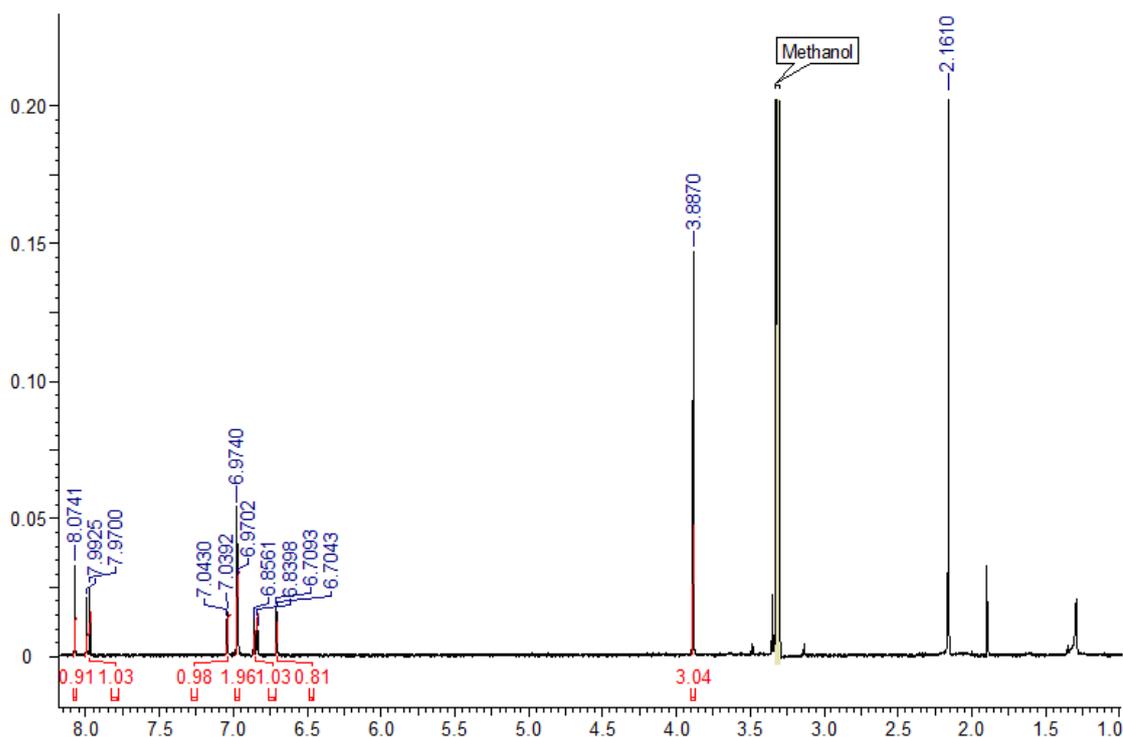


FIGURA 4.14 – Espectro de RMN ^1H da substância **9** (400MHz, CD_3OD).

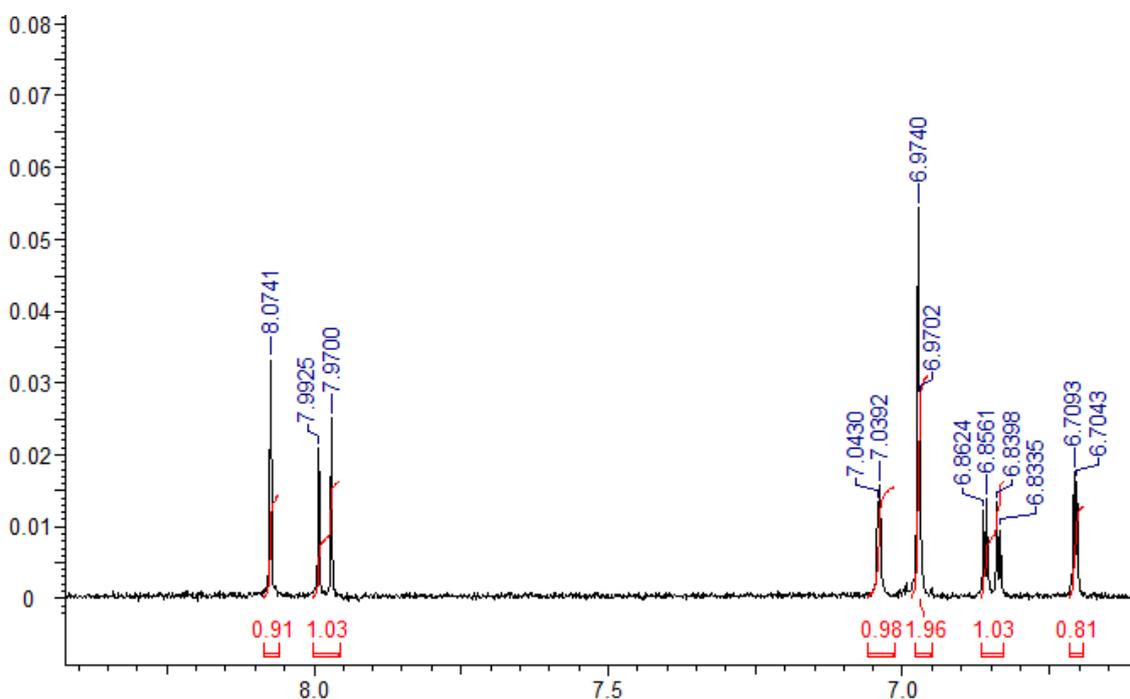


FIGURA 4.15 – Ampliação do espectro de RMN ^1H da substância **9** (400MHz, CD_3OD).

No espectro de HSQC (FIGURA 4.16) foi possível observar as correlações entre os hidrogênios em δ_H 6,70; 6,85; 7,99; 7,04 e 8,07 com seus respectivos

carbonos δ_C 102,8; 117,8; 126,9; 116,5 e 153,1. Também foi observado a correlação entre os hidrogênios 5' e 6' (δ_H 6,97) com os carbonos δ_C 111,7 e 121,5 e a correlação dos hidrogênios do grupo metoxilas (δ_H 3,88) com o carbono δ_C 56,2.

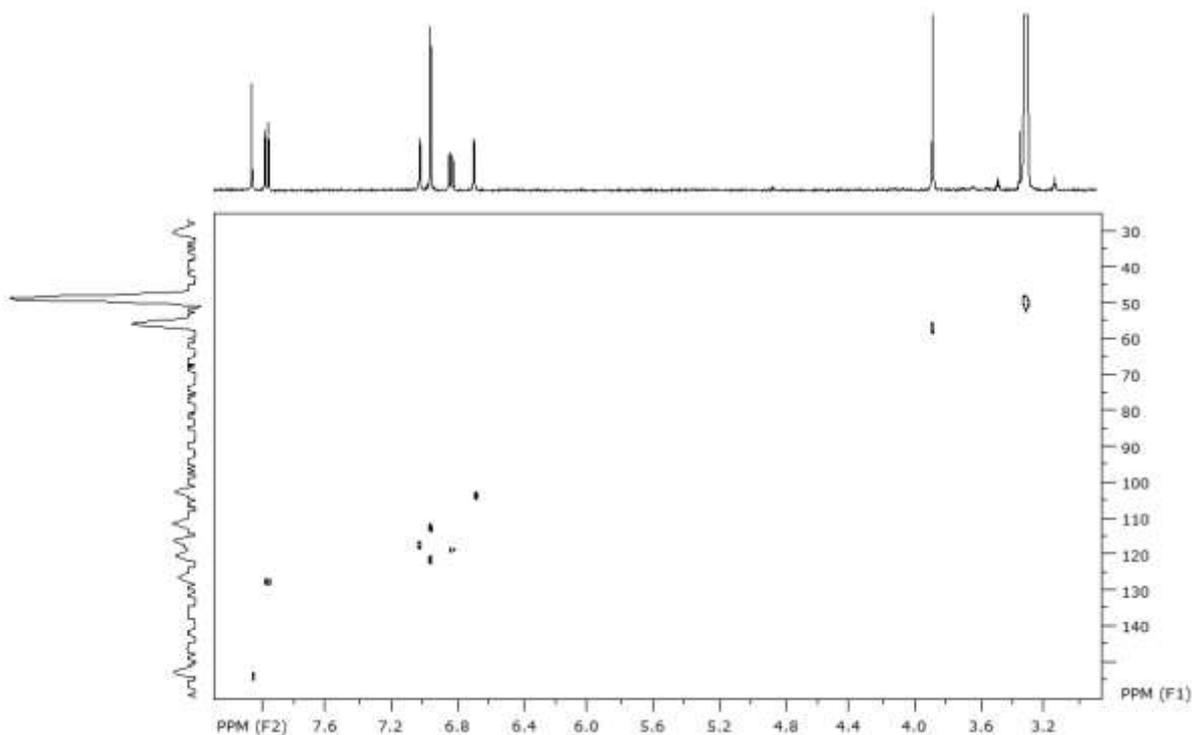


FIGURA 4.16 – Mapa de contorno de HSQC da substância **9** (400MHz, CD₃OD).

No HMBC (FIGURA 4.17) foi possível observar a correlação entre o hidrogênio em δ_H 8,07 (H2) com os carbonos δ_C 124,3 (C1'); 159,1 (C9) e 176,8 (grupo carbonila), entre o hidrogênio em δ_H 7,99 (H5) com os carbonos em δ_C 159,1 (C9); 168,3 (C7) e 175,8 (grupo carbonila), hidrogênio em δ_H 6,84 (H6) com o carbono em δ_C 96,0 (C10). Também foi possível observar a correlação entre os hidrogênios em δ_H 6,96 (H5' e 6') com os carbonos em δ_C 116,5 (C2'); 124,3 (C1') e 146,2 (C4') e os hidrogênios do grupo metoxilas δ_H 3,88 com o carbono δ_C 146,2.

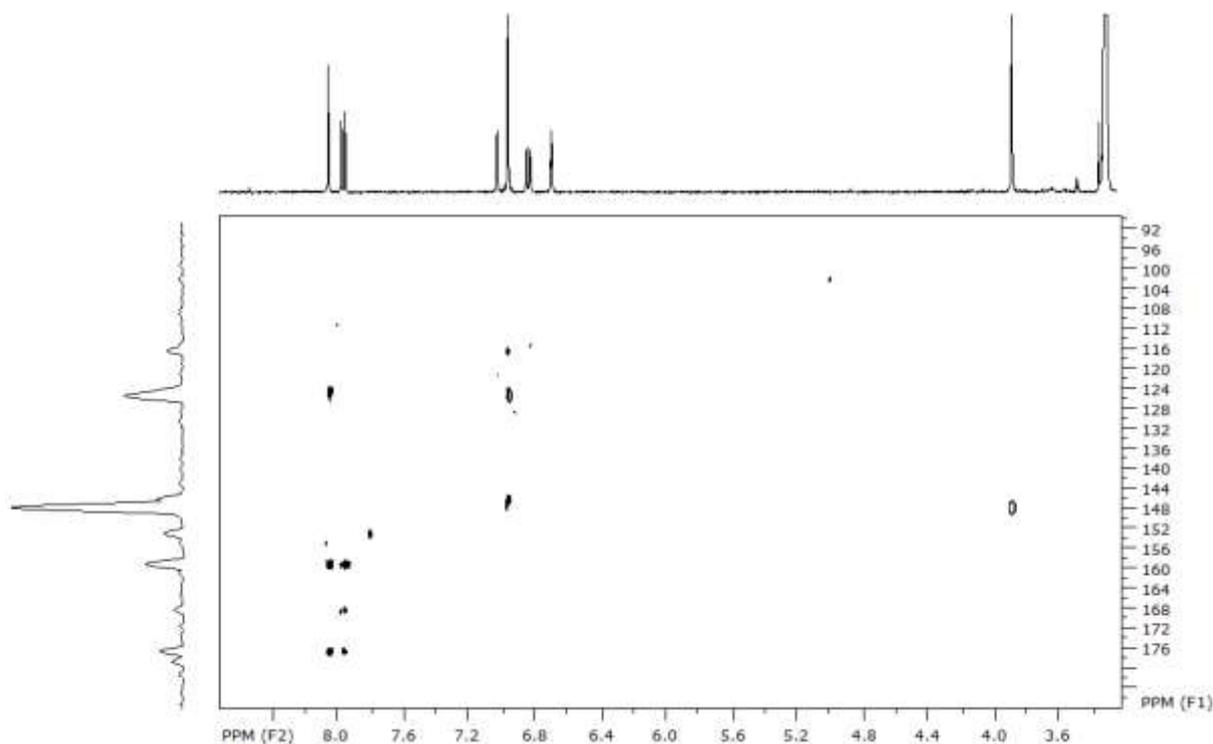


FIGURA 4.17 – Mapa de contorno de HMBC da substância **9** (400MHz, CD₃OD).

Com os dados obtidos no espectro de RMN ¹H, HSQC e HMBC foi possível identificar que o composto **9** como sendo uma isoflavonas com uma oxidação no anel A, sendo esta uma hidroxila na posição 7 e duas oxidações no anel B, sendo estas um grupo hidroxila e um grupo metoxila. Propõe-se que o grupo metoxila encontra-se no anel B devido ao acoplamento de seus hidrogênios em δ_H 3,88 com o carbono δ_C 146,19 e também do acoplamento de δ_H 6,96 com este mesmo sinal de carbono. Com a análise dos dados obtidos foram sugeridas a princípio duas possíveis estruturas (FIGURA 4.18).

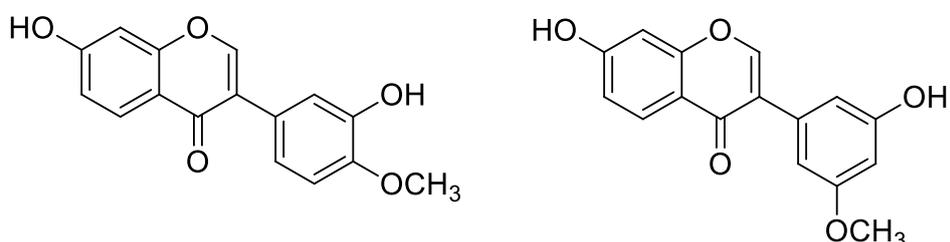


FIGURA 4.18 – Possíveis estruturas químicas da substância **9**.

Para comparar os deslocamentos químicos de hidrogênio com dados da literatura (DU et al., 2006) foi obtido um novo o espectro de RMN ¹H da substância **9** em outro solvente deuterado, a fim de verificar a influência do solvente nos sinais de deslocamento químico dos hidrogênios do anel B.

O uso de $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ na obtenção do espectro de RMN ^1H possibilitou a confirmação da estrutura química da substância **9** através da comparação com os dados da literatura (DU et al., 2006). No espectro de RMN ^1H obtido utilizando $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ (FIGURA 4.19) foi possível observar a separação dos sinais de deslocamento químico de H5' (δ_{H} 6,95, d, $J = 8,3\text{Hz}$) e H6' (δ_{H} 7,05, dd, $J = 8,4$ e $1,8\text{Hz}$), sendo que no espectro utilizando CD_3OD estes sinais estavam sobrepostos (FIGURA 4.14). Assim pode-se concluir que a substância **9** é a 7, 3' diidroxí-4'metoxi-isoflavona. Os dados do RMN ^1H da substância **9** estão descritos na TABELA 4.11 juntamente com os dados da literatura utilizados para comparação.

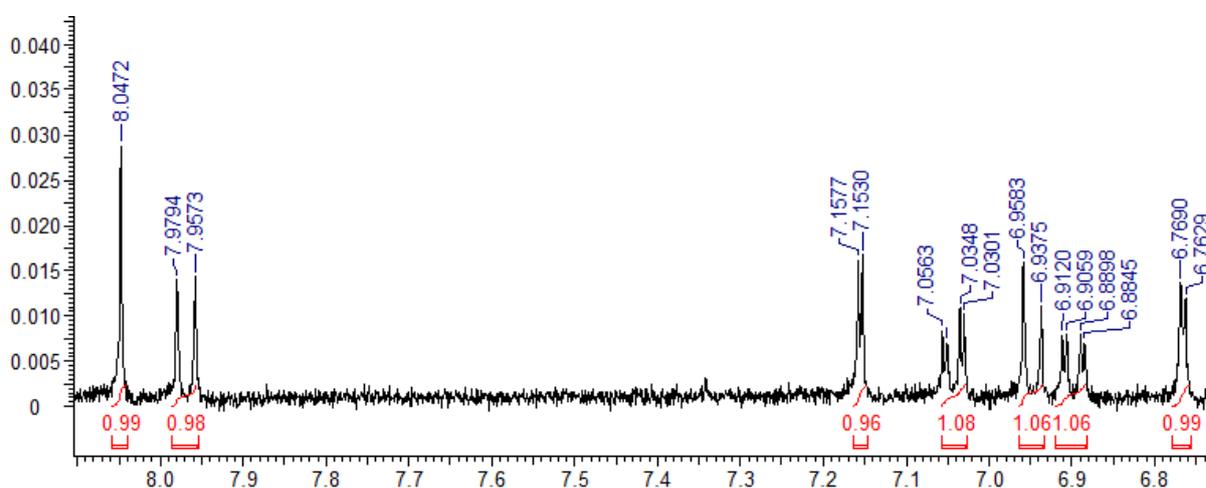


FIGURA 4.19 – Espectro de RMN ^1H da substância **9** (400MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$).

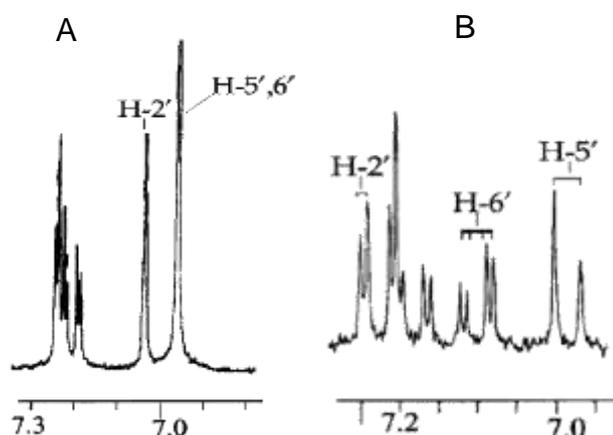
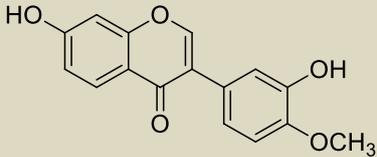
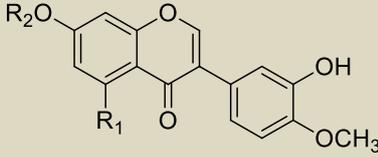


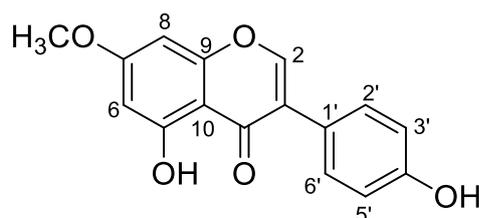
FIGURA 4.20 – Espectro RMN ^1H de Calycosin-7-O- β -D-glucopiranosidico em diferentes solventes, A em CD_3OD e B em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$.

TABELA 4.11 – Dados de RMN ¹H da substância 9.

H			Calycosin-7-O-β-D-glucopiranosidico (DU et al., 2006)  $R_1 = H$ e $R_2 = \beta\text{-D-Glc}$	
	δ_H 400MHz, CD ₃ OD	δ_H 400MHz, (CD ₃) ₂ CO	δ_H 300MHz, CD ₃ OD	δ_H 300MHz, (CD ₃) ₂ CO
2	8,07 (s)	8,04 (s)	8,11 (s)	8,17 (s)
5	7,99 (d, J= 9,0Hz)	7,97 (d, J= 8,8Hz)	8,03 (d, J=8,8Hz)	8,07 (d, J= 8,7Hz)
6	6,85 (dd, J= 9,0 e 2,0Hz)	6,90 (dd, J= 8,8 e 2,4Hz)	6,92 (dd, J= 8,8 e 2,3Hz)	7,01 (dd, J= 8,7 e 2,1Hz)
8	6,70 (d, J= 2,0Hz)	7,76 (d, J= 2,4Hz)	6,83 (d, J= 2,3Hz)	6,91 (d, J= 2,1Hz)
2'	7,04 (d, J= 1,52Hz)	7,15 (d, J= 1,88Hz)	7,03 (t, J= 1,2Hz)	7,17 (d, J= 2,1Hz)
5'	6,97 (d, J= 1,52Hz)	6,95 (d, J= 8,3Hz)	6,95 (d, J= 1,2Hz)	6,98 (d, J= 8,4Hz)
6'	6,97 (d, J= 1,52Hz)	7,05 (dd, J= 8,4 e 1,8Hz)	6,95 (d, J= 1,2Hz)	7,07 (dd, J= 8,4 e 2,1Hz)
OCH ₃	3,88 (s)	3,85 (s)	3,87 (s)	3,78 (s)

4.3.9 – Substância 10

A análise do espectro RMN ¹H sugere que a substância **10** é uma isoflavona.



O espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.21) apresentou um singleto em δ_{H} 8,12 (1H) referente ao hidrogênio H2, característico de isoflavonas e um singleto em δ_{H} 3,88 (3H) referente à presença de um grupo metoxila.

Também foi possível observar um duplete em δ_{H} 6,37 (1H, $J= 2,5\text{Hz}$), um duplete em δ_{H} 6,55 (1H, $J= 2,5\text{Hz}$) atribuído ao hidrogênio 8 e 6 do anel A da isoflavona. Foi observado um duplete em δ_{H} 6,86 (2H, $J= 9,0$) atribuído aos hidrogênios H3' e H5', e um duplete em δ_{H} 7,39 (2H, $J= 8,52$) atribuídos a H2' e H6'. Com os dados de RMN ^1H foi proposto que a substância **10** é uma isoflavona com substituintes oxigenados nas posições 5, 7 e 4', sendo um destes substituintes é um grupo metoxila conforme comprovado pela presença do sinal de deslocamento químico em δ_{H} 3,88.

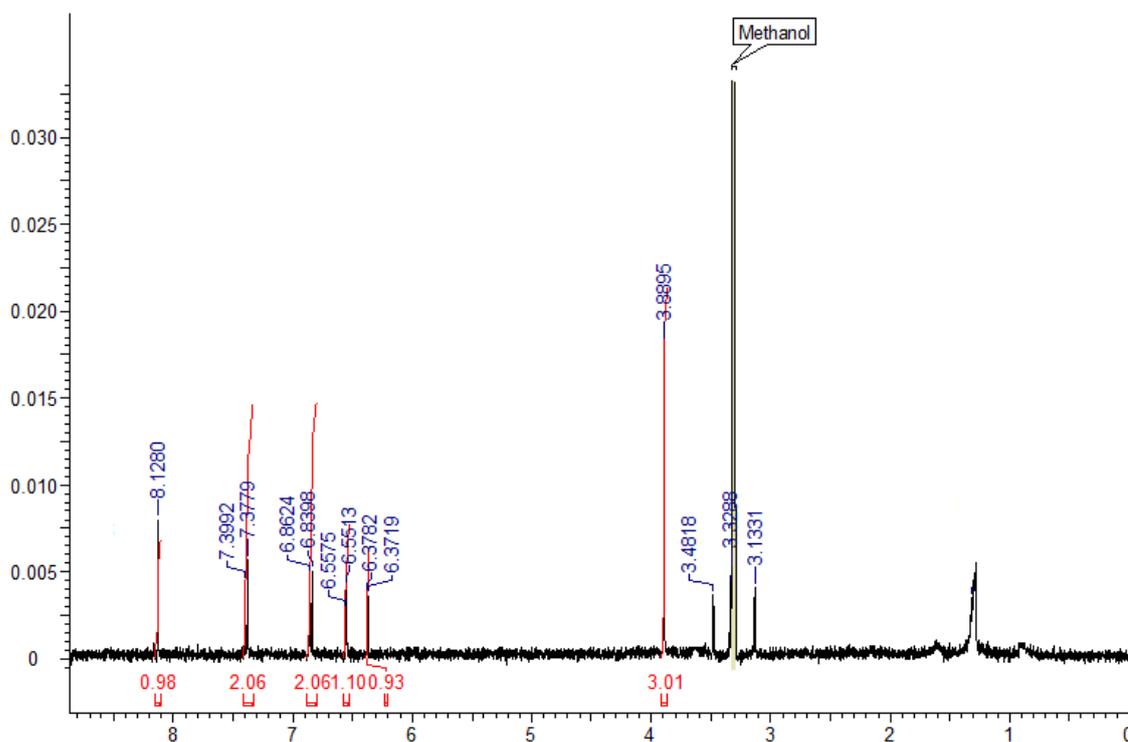


FIGURA 4.21 – Espectro de RMN ^1H da substância **10** (400MHz, CD_3OD).

No experimento de NOE, ao irradiar os prótons em δ_{H} 3,88 foi possível verificar um incremento no sinal em δ_{H} 6,55 (H8) e ao irradiar o próton em δ_{H} 6,55 observou-se um incremento no sinal em δ_{H} 3,88, o que confirmou a presença do grupo metoxila na posição 7 do anel A da isoflavona.

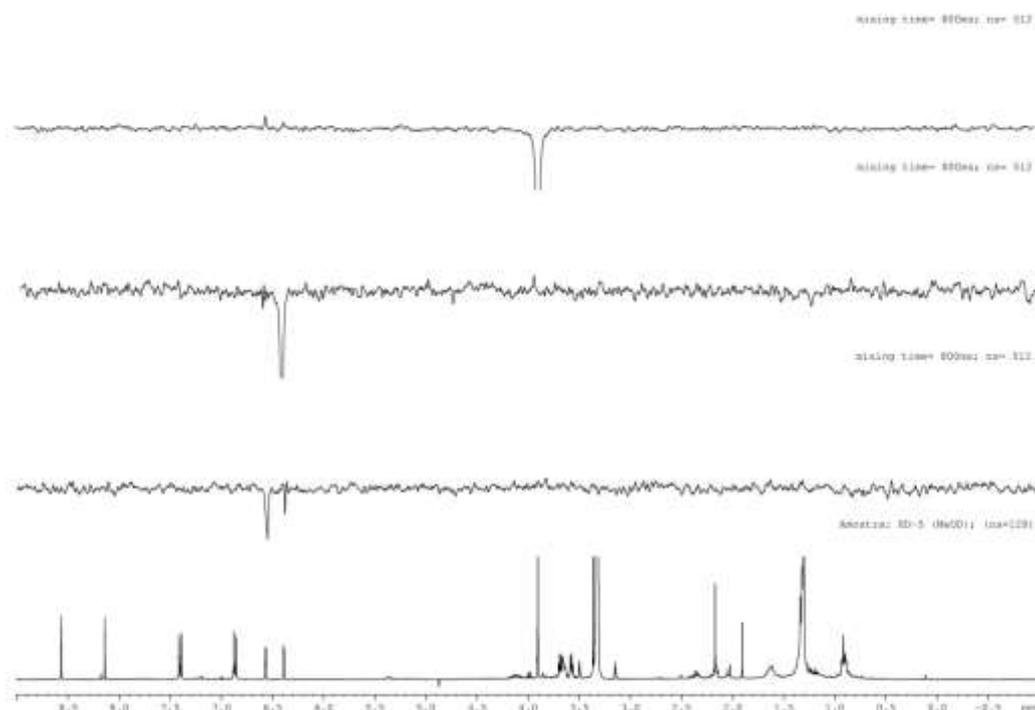
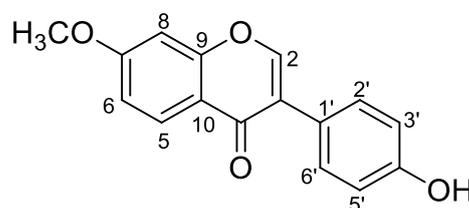


FIGURA 4.22 – Espectro de NOE da substância **10** (400MHz, CD₃OD).

Através dos dados de RMN ¹H, NOE e em comparação com os dados da literatura (VITOR et al., 2004) conclui-se que a substância **10** é a 5,4'-dihidroxi-7-metoxi-isoflavona.

4.3.10 – Substância **11**

A substância **11** foi isolada da fração acetato de etila do caule de *B. virgilioides*. A análise do espectro de RMN ¹H sugere que **11** é uma isoflavona.



No espectro de RMN ¹H foi observado um singlete em δ_H 8,17 (1H) referente ao hidrogênio na posição 2, característico de isoflavonas e um singlete em δ_H 3,84 (3H) referente à presença de um grupo metoxila. Neste mesmo experimento foram observados sinais de deslocamento químicos em δ_H 8,07 (d, J= 9,0Hz), δ_H 6,95 (dd, J= 9,0 e 2,0Hz) e em δ_H 6,85 (d, J= 2,0Hz) atribuídos aos hidrogênios nas posições 5, 6 e 8 respectivamente. Também foi observado um duplete em δ_H 7,01 (J= 8,5Hz) integrando pra dois hidrogênios atribuído aos hidrogênios nas posições 2' e 6' e um

duplete em δ_H 7,49 (J= 8,5Hz) também integrando pra dois hidrogênios atribuído aos hidrogênios nas posições 3' e 5'.

Com os dados obtidos no espectro de RMN 1H , foi possível identificar que a substância **11** é uma isoflavona com uma oxidação na posição 7 do anel A, e outra oxidação na posição 4' do anel B, sendo estas um grupo hidroxila e um grupo metoxilas. Para determinar a posição exata dos substituintes foi realizado o experimento de NOE.

No experimento de NOE ao irradiar o sinal em 6,85ppm (H8) foi observado um aumento na intensidade do sinal em 3,84ppm, sendo este sinal atribuído aos hidrogênios do grupo metoxila. E ao irradiar o sinal em 3,84ppm é possível observar um sinal aumento na intensidade do sinal em 6,85ppm. Assim, foi possível concluir que o grupo metoxila está localizado na posição 7 da isoflavona.

Através dos dados de RMN 1H , e em comparação com os dados da literatura (JOHN et al., 1981) conclui-se que a substância **11** é a 4'-hidroxi-7- metoxi-isoflavona.

4.4 – Atividade Enzimática das Substâncias Isoladas de *B. virgilioides*

4.4.1 – Ensaios Enzimáticos das Substâncias Isoladas de CH

Dentre as substâncias isoladas da fração hexânica do caule de *B. virgilioides*, os triterpenos (substâncias 1 e 2) e a mistura dos esteroides (substâncias 3 e 4) não inibiram as catepsinas estudadas.

O éster derivado do ácido *trans p*-cumárico (substância 5) foi ensaiado na concentração de 50 μ g/mL onde apresentou inibição significativa frente as catepsinas L e V, os valores das porcentagens de inibição deste composto são mostrados na TABELA 4.12. Este composto foi isolado em pouca quantidade de massa (0,8mg) e toda massa isolada foi utilizada para realização dos ensaios enzimáticos. Com isso, não foi possível fazer o espectro de massas desta substância para a determinação do número de unidades CH₂ presentes na cadeia alquílica do álcool que esterifica o ácido.

TABELA 4.12 – Valores de porcentagem de inibição da substância 5.

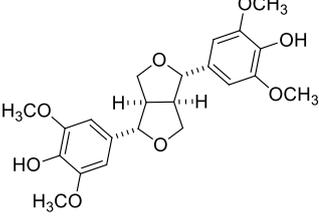
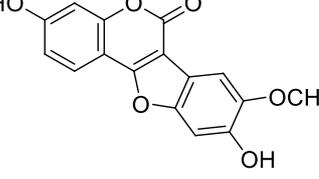
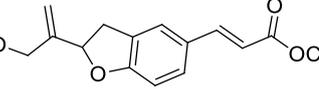
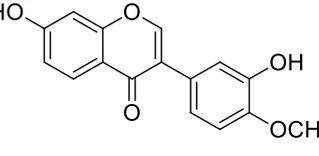
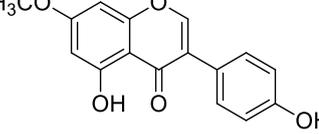
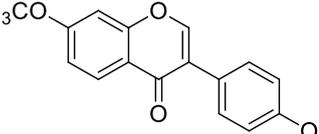
Enzima	% inibição
K	49
L	78
V	94

Diante os resultados obtidos adquiriu-se o ácido *trans p*-cumárico de forma comercial a fim de avaliar a atividade inibitória deste composto na forma livre. Também foram feitas algumas reações de esterificação com este ácido utilizando álcoois com cadeias alquílicas de diferentes tamanhos para avaliar a atividade inibitória dos produtos obtidos. As reações e os ensaios enzimáticos dos produtos obtidos são mostrados nas seções 4.5 e 4.6.

4.4.2 – Ensaios Enzimáticos das Substâncias Isoladas de CA

As substâncias isoladas da fração acetato de etila do caule de *B. virgilioides* foram ensaiadas inicialmente frente às catepsinas K, L e V na concentração de 100 μ M. Os valores das porcentagens de inibição são mostrados na TABELA 4.13.

TABELA 4.13 – Porcentagens de inibição a 100µM das substâncias isoladas de CA frente às catepsinas K, L e V.

Substância	Estrutura	% de Inibição (100 µM)		
		CatK	CatL	CatV
6		0	0	0
7		35	55	78
8		0	0	23
9		4	39	40
10		0	0	12
11		0	16	53

Dentre as substâncias ensaiadas apenas o derivado do cumestrol, substância **7**, apresentou inibição superior a 70% frente à catepsina V, mostrando ser mais ativo frente a esta enzima. Assim, foi feito o ensaio de IC₅₀ desta substância para a avaliação de sua potência como inibidor da catepsina V. O valor de IC₅₀ foi determinado pelo método gráfico de regressão não linear, e o valor encontrado para a substância **7** foi de 17,4 ± 1,0µM.

Dentre as isoflavonas isoladas, substâncias **9**, **10** e **11**, é possível notar uma variação nas porcentagens de inibição. Entre a substância **9** e a substância **10** temos que em **9** há apenas um substituinte no anel A, sendo ele um grupo hidroxila e dois substituintes no anel B, sendo eles um grupo hidroxila e um metoxila. Na

substância **10** ocorre o contrário: no anel A existem dois substituintes, uma hidroxila e uma metoxila, e no anel B apenas uma metoxila. Com a mudança dos substituintes nos anéis A e B pode-se notar uma diferença nas porcentagens de inibição dos compostos frente às catepsinas. Passando de **9** para **10** podemos notar na queda dos valores de inibição destes compostos.

Analisando as substâncias **10** e **11** podemos perceber que a diferenças nas estruturas químicas é apenas um grupo hidroxila na posição 5 em **10**. Com a perda deste grupo em **11** ocorre um aumento na atividade inibitória frente às catepsinas L e V.

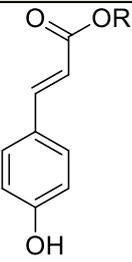
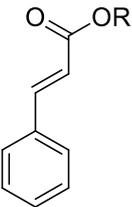
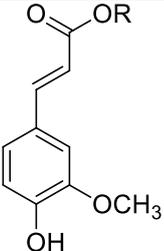
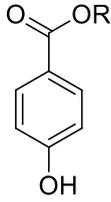
Entre as substâncias **9** e **11** a mudança das posições dos grupos substituintes e a inserção de uma hidroxila a mais na molécula em **9**, com essas diferenças podemos notar o aumento da atividade inibitória de **9** frente às catepsinas K e L e uma diminuição da porcentagem de inibição para a catepsina V.

Observando as estruturas químicas das substâncias **7** e **9** é possível notar uma semelhança entre os grupos substituintes nos anéis aromáticos das duas substâncias e também a semelhança nos padrões de inibição de **7** e **9** frente às catepsinas.

4.5 – Reações de Esterificação

As reações de esterificação foram realizadas para a obtenção de ésteres derivados similares ao éster isolado de *B. virgilioies* (substância **5**). Através do espectro de RMN ¹H (FIGURA 4.4) foi possível observar que o éster isolado possuía uma cadeia alquílica longa, sendo assim, foram escolhidos dois álcoois com cadeias alquílicas de diferentes tamanhos para a realização das reações de esterificação. Para a obtenção dos ésteres de n-butila e n-octila (**12a**, **12b**, **13a**, **13b**, **14a**, **14b**, **15a** e **15b**) foram utilizados álcoois n-butanol e n-octanol. Além do ácido *trans p*-cumárico outros três ácidos carboxílicos com estruturas análogas, foram adquiridos comercialmente (FIGURA 3.5) para a avaliação da atividade inibitória destes compostos de seus ésteres derivados. Os produtos obtidos em cada uma das reações são mostrados na TABELA 4.14.

TABELA 4.14 – Produtos obtidos nas reações de esterificação.

Produtos	Códigos	
	R= CH ₃ (CH ₂) ₃	12a
	R= CH ₃ (CH ₂) ₇	12b
	R= CH ₃ (CH ₂) ₃	13a
	R= CH ₃ (CH ₂) ₇	13b
	R= CH ₃ (CH ₂) ₃	14a
	R= CH ₃ (CH ₂) ₇	14b
	R= CH ₃ (CH ₂) ₃	15a
	R= CH ₃ (CH ₂) ₇	15b

Foram feitas esterificações de Fischer e os produtos obtidos foram caracterizados pela análise dos espectros de RMN ¹H.

As esterificações de Fischer (FIGURA 4.23) consistem em reações de ácidos carboxílicos com álcoois na presença de um ácido que atua como catalisador da reação. Como produtos são obtidos éster e água.

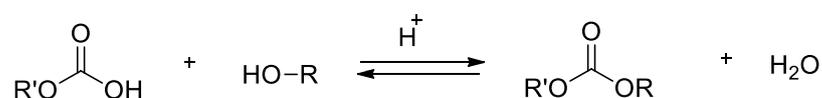


FIGURA 4.23 – Esquema geral da reação de esterificação de Fischer.

A formação dos ésteres de butila (FIGURA 4.24) pode ser evidenciada através dos seguintes sinais de deslocamento químicos: um tripleto em δ_H 4,20 (2H) referente a H1, um quintupeto em δ_H 1,70 (2H) referente a H2, um sextupeto em δ_H 1,4 (2H) referentes a H3 e um tripleto em δ_H 0,9 (3H) referente ao grupo metila terminal H4.

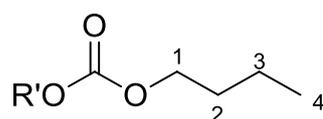


FIGURA 4.24 – Estrutura geral de éster de butila.

As figuras 4.25, 4.26, 4.27 e 4.28, mostram dos espectros de RMN 1H dos ésteres de butila obtidos.

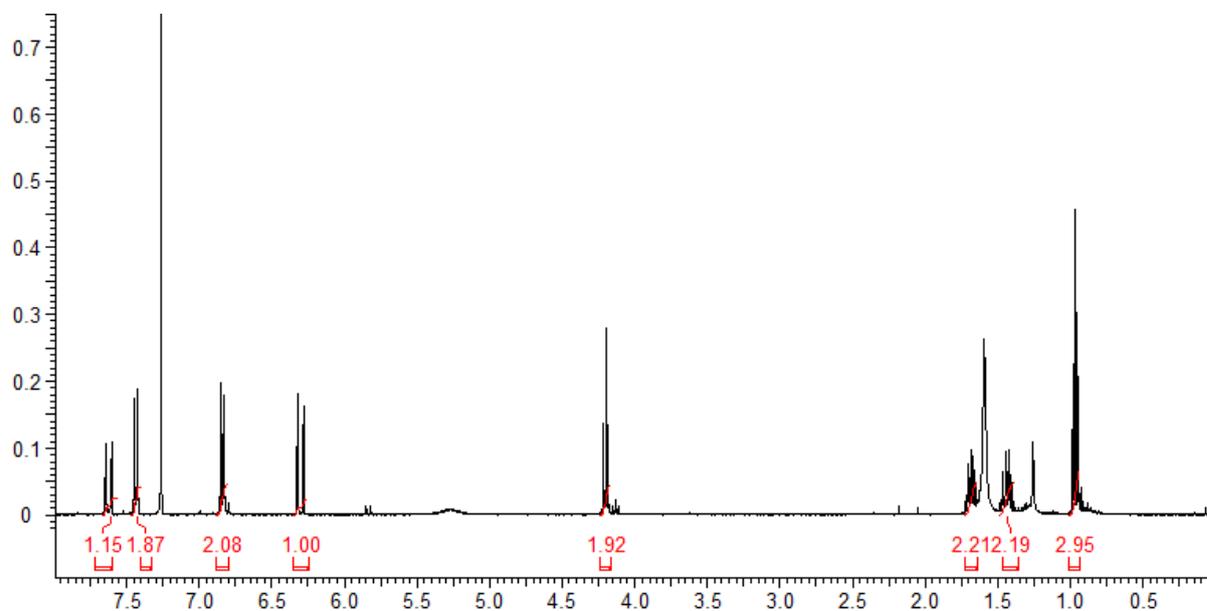
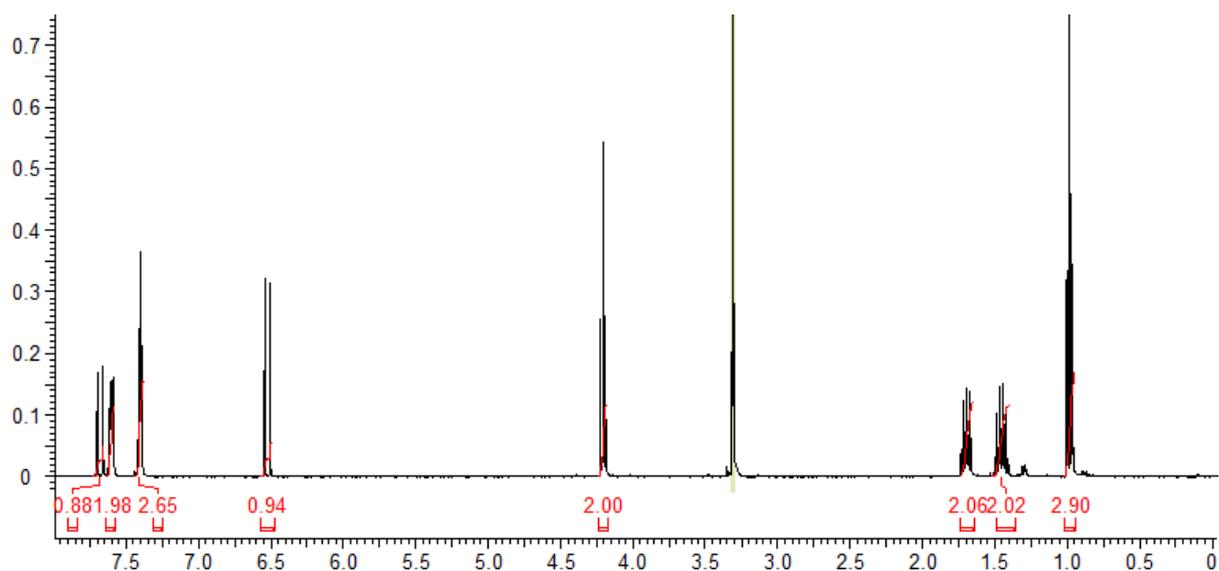
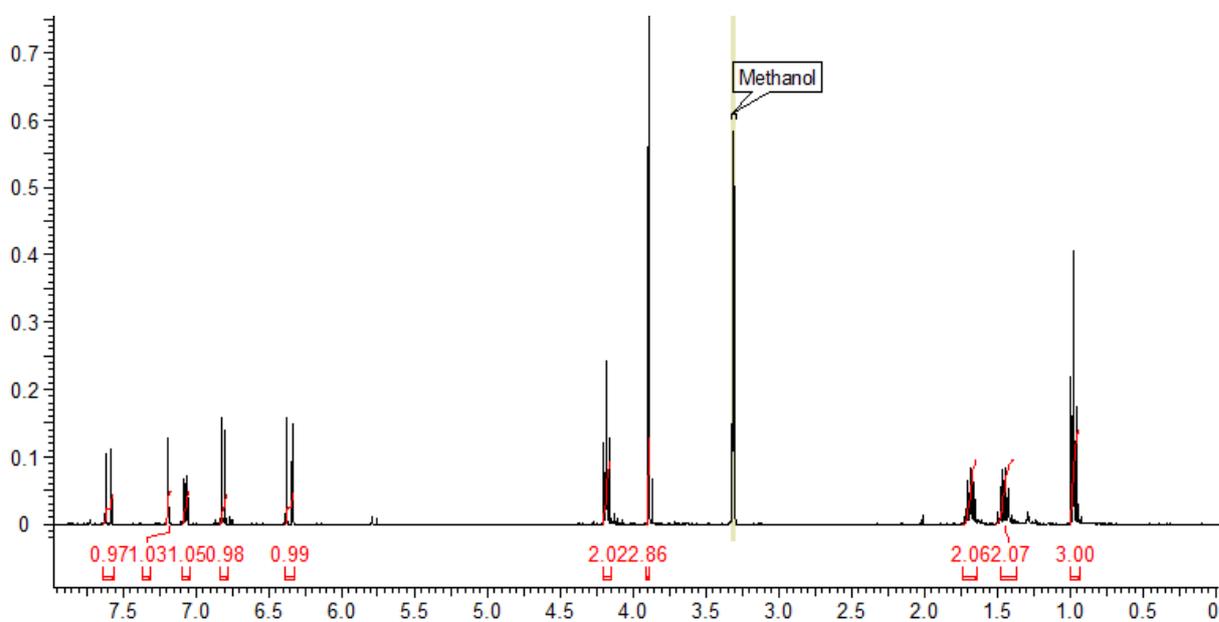


FIGURA 4.25 – Espectro de RMN 1H de **12a** (400MHz, $CDCl_3$).

FIGURA 4.26 – Espectro de RMN ¹H de **13a** (400MHz, CD₃OD).FIGURA 4.27 – Espectro de RMN ¹H de **14a** (400MHz, CD₃OD).

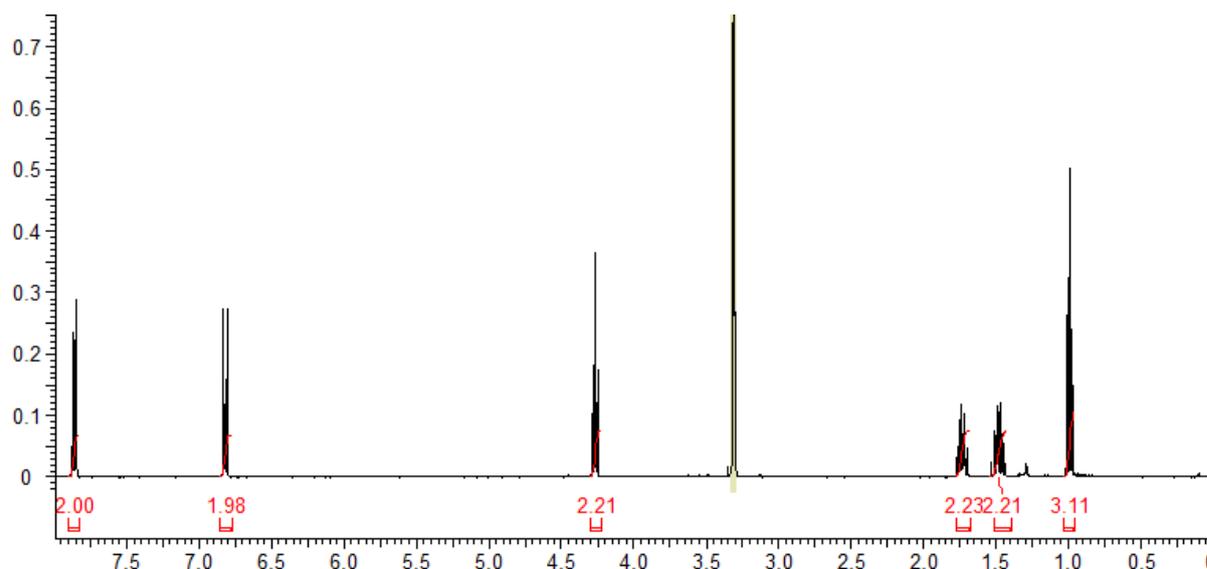


FIGURA 4.28 – Espectro de RMN ^1H de **15a** (400MHz, CD_3OD).

Também foram feitas reações utilizando octanol. A formação dos ésteres de octila (FIGURA 4.29) pode ser evidenciada através dos seguintes sinais de deslocamento químicos de hidrogênios: tripleto em δ_{H} 4,20 (2H) referente a H1, um multipletto em δ_{H} 1,30 (10H) referente a H3, H4, H5, H6 e H7, um quintupletto em δ_{H} 1,7 (2H) referentes a H2 e um tripleto em δ_{H} 0,9 (3H) referente ao grupo metila terminal H8.

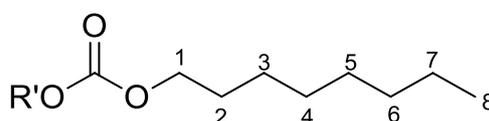
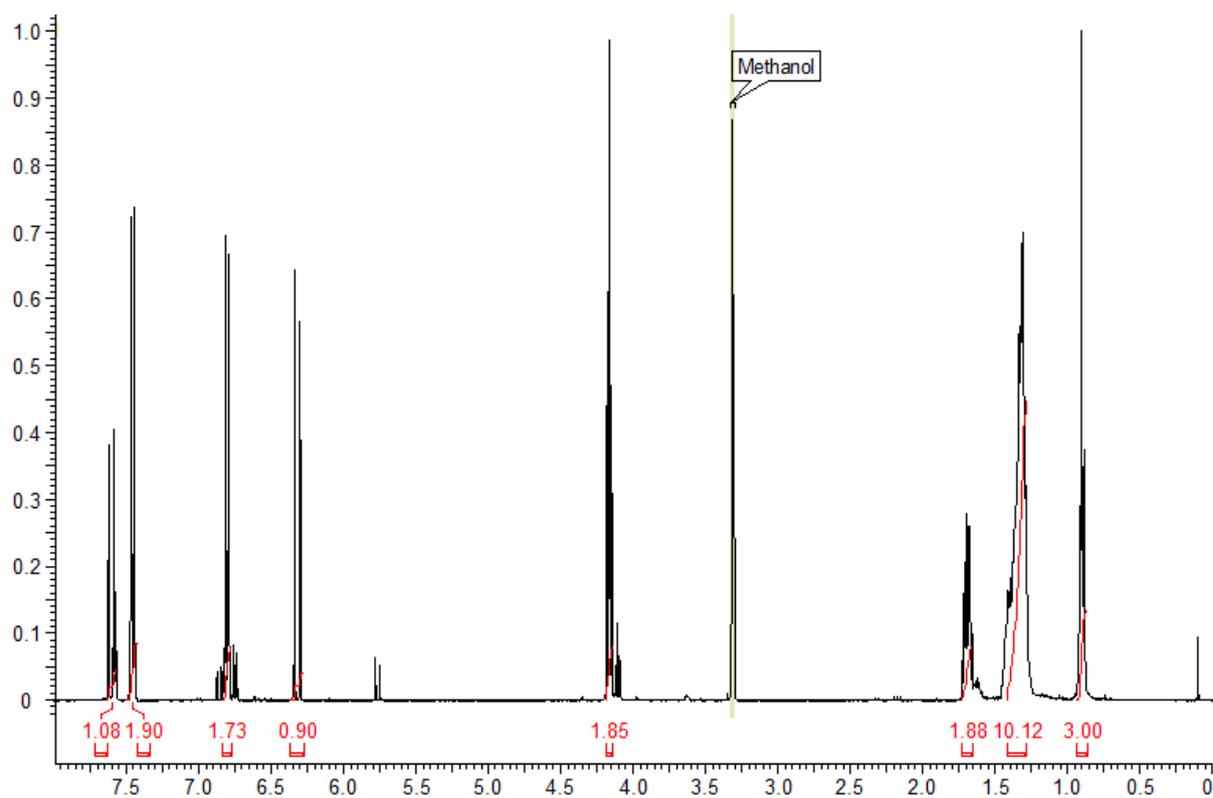
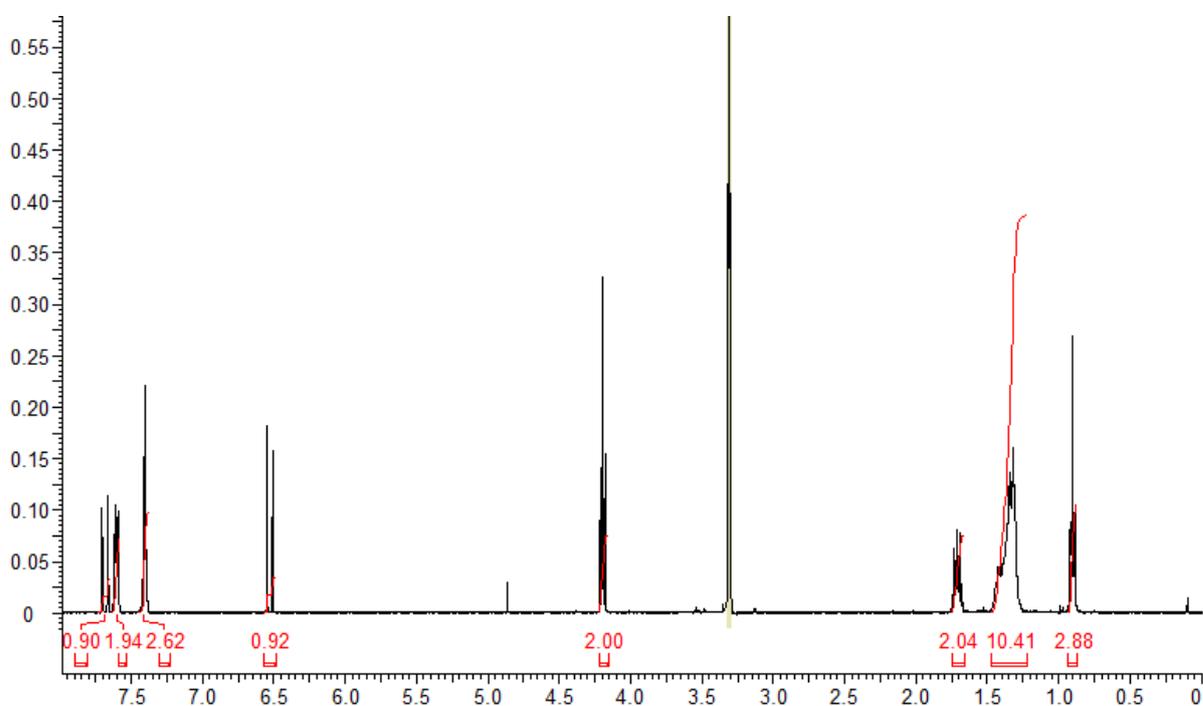


FIGURA 4.29 – Estrutura geral de éster de octila.

Os espectros de RMN de ^1H dos ésteres de octila obtidos são mostrados nas figuras 4.30, 4.31, 4.32, e 4.33.

FIGURA 4.30 – Espectro de RMN ^1H de **12b** (400MHz, CD_3OD).FIGURA 4.31 – Espectro de RMN ^1H de **13b** (400MHz, CD_3OD).

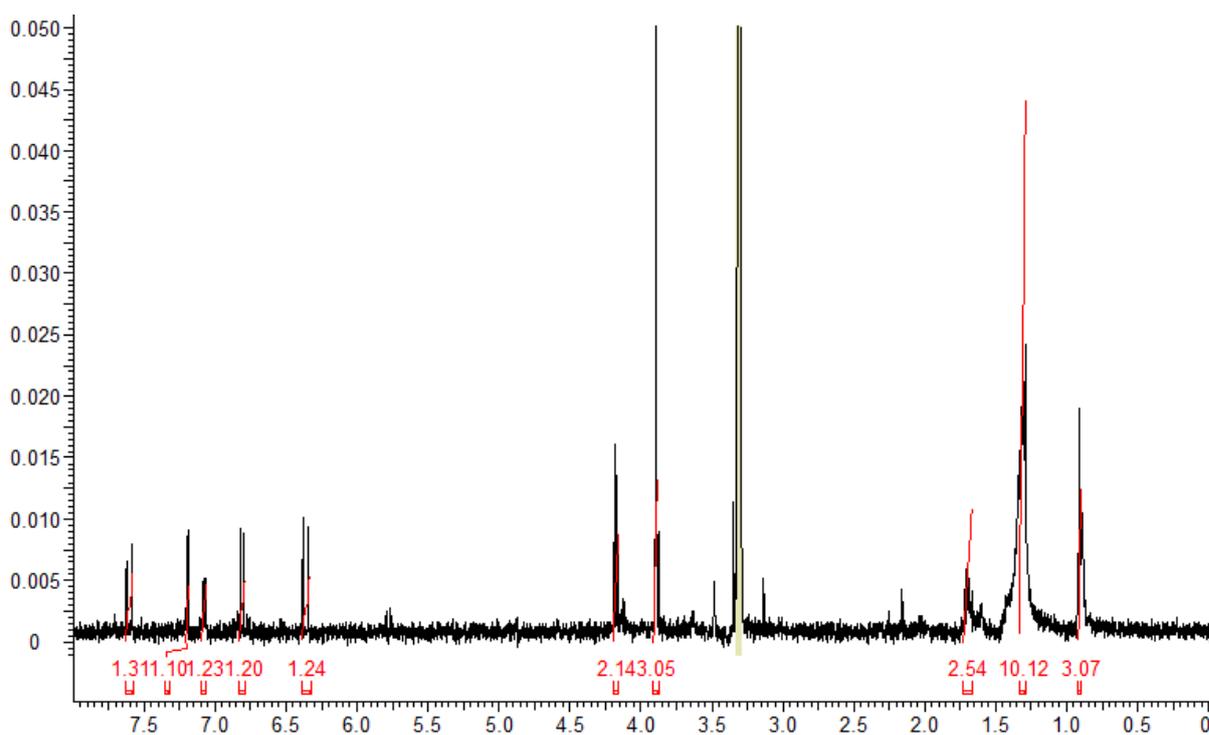


FIGURA 4.32 – Espectro de RMN ^1H de **14b** (400MHz, CD_3OD).

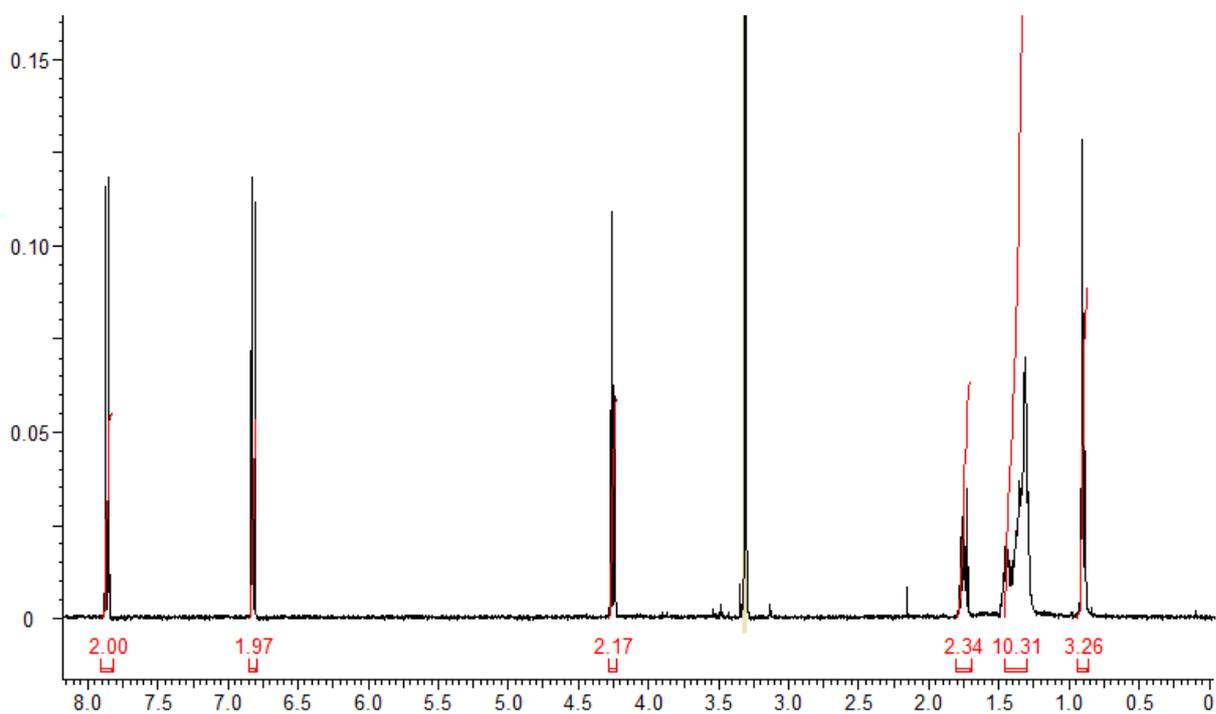


FIGURA 4.33 – Espectro de RMN ^1H de **15b** (400MHz, CD_3OD).

4.6 – Ensaios Enzimáticos dos Produtos Obtidos das Reações

Os produtos obtidos das reações de esterificação foram ensaiados na concentração de $100\mu\text{M}$. A TABELA 4.15 mostra os valores de porcentagens de

inibição dos ésteres obtidos frente as três enzimas, juntamente com as inibições obtidas com os ácidos livres.

TABELA 4.15 – Porcentagens de inibição dos ésteres obtidos e dos ácidos livre frente as catepsinas K, L e V

Amostra	Enzima	% inibição (100µM)	Amostra	Enzima	% inibição (100µM)
12	K	9	13a	K	61
	L	9		L	74
	V	0		V	61
13	K	0	13b	K	0
	L	8		L	0
	V	1		V	0
14	K	3	14a	K	0
	L	6		L	8
	V	0		V	35
15	K	0	14b	K	0
	L	12		L	0
	V	0		V	26
12a	K	0	15a	K	0
	L	0		L	0
	V	39		V	23
12b	K	0	15b	K	44
	L	71		L	67
	V	58		V	52

Analisando os dados apresentados na TABELA 4.15 foi possível verificar que os ésteres obtidos apresentaram diferentes atividades inibitórias quando ensaiados na concentração de 100µM. Além disso pode-se observar que a cadeia alquílica oriunda do álcool bem como a parte aromática proveniente do ácido são importantes na atividade enzimática. Os melhores resultados de inibição foram para os compostos **13a**, **12b** e **15b**, sendo que **13a** apresentou inibição maior que 50% para as 3 enzimas, **12b** e **15b** apresentou maiores inibições frente as catepsinas L e V.

4.7 – Avaliação dos constituintes da fração hexânica das folhas (FH)

Como mostrado na TABELA 4.1, a fração hexânica das folhas é ativa frente às catepsinas. Sendo assim, optou-se pela avaliação dos constituintes químicos desta fração em mistura. Para isto, a FH foi submetida à uma separação cromatográfica (FIGURA 3.4) resultando em 5 subfrações. As frações obtidas foram analisadas inicialmente por RMN ^1H para verificação dos seus constituintes químicos.

Na análise dos espectros de RMN ^1H foi observado que os constituintes majoritários destas frações eram triterpenos devido à presença de sinais característicos destes compostos. Nas 5 frações são observados sinais de hidrogênios de grupos metila, singletos entre δ_{H} 0,6 a 1,7. Além dos sinais de hidrogênios de grupos metilas são observados outros sinais característicos de triterpenos tais como: singletos em δ_{H} 4,5 e 4,7 referentes aos hidrogênios da posição 29 do lupeol e lupenona e tripleto δ_{H} 5,2 referente a H12 da α -amirina. A FIGURA 4.34 mostra os espectros de RMN ^1H das 5 frações obtidas de FH.

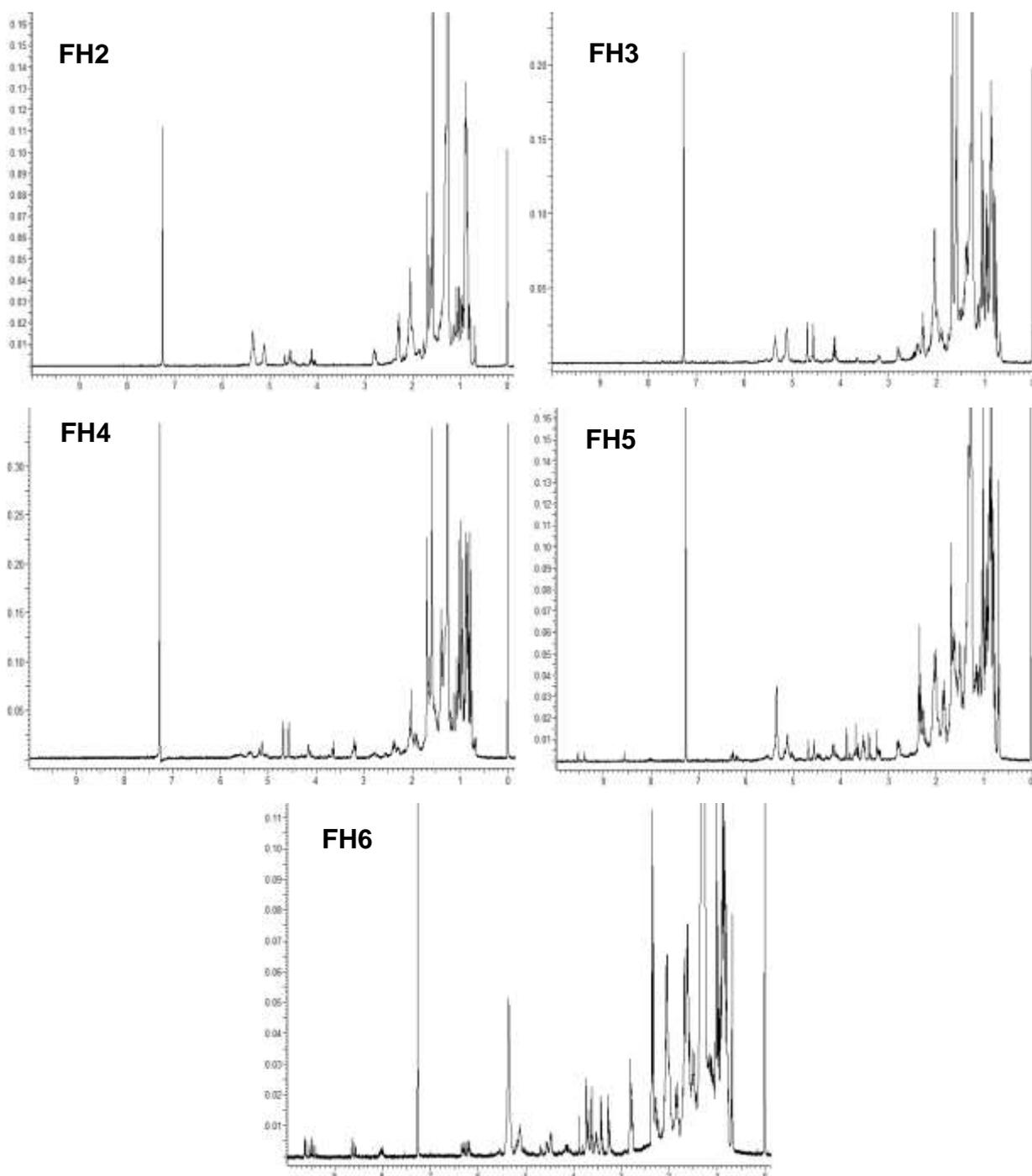


FIGURA 4.34 – Espectros de RMN ¹H das frações obtidas de FH (400MHz, CDCl₃).

Devido à complexidade dos espectros de RMN ¹H destas frações decorrente da mistura das substâncias fez-se também análise utilizando a técnica de cromatografia gasosa aliada à espectrometria de massas para a avaliação dos constituintes das frações separadamente.

As frações analisadas pela CG-EM apresentaram grande similaridade qualitativamente, sendo constituídas principalmente por triterpenos, esteroides,

hidrocarbonetos, ácidos carboxílicos e ésteres. Na FIGURA 4.35, é possível observar a semelhança entre os cromatogramas obtidos.

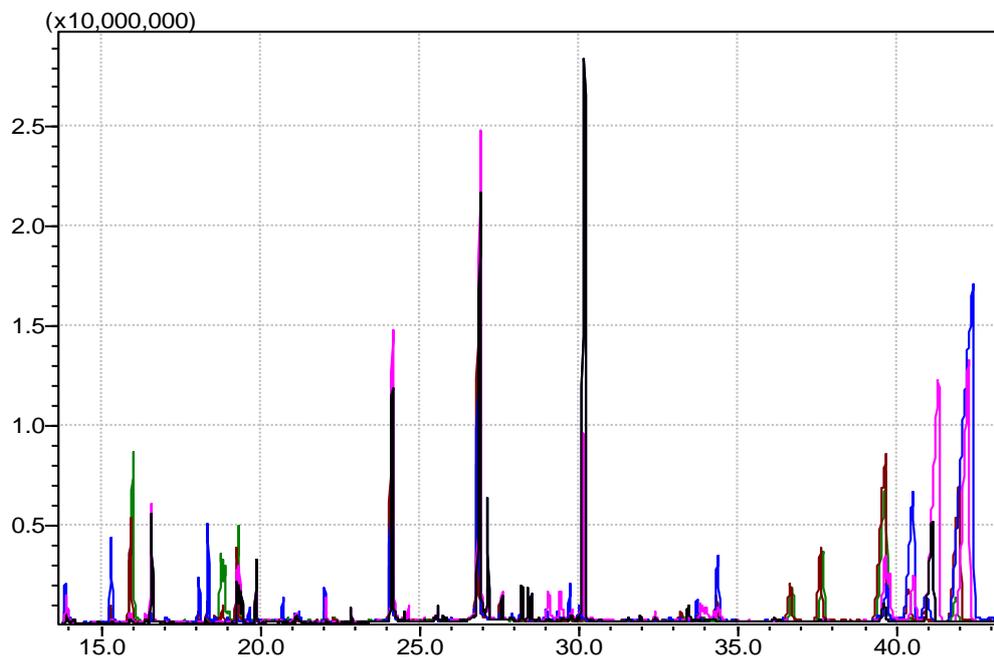


FIGURA 4.35 – Sobreposição dos cromatogramas obtidos de FH2 (---), FH3 (---), FH4 (---), FH5 (---), FH6 (---).

Nas figuras 4.36, 4.37, 4.38, 4.39 e 4.40 são mostrados os cromatogramas de íons totais das cinco frações separados e as identificações das bandas cromatográficas são mostradas na TABELA 4.16.

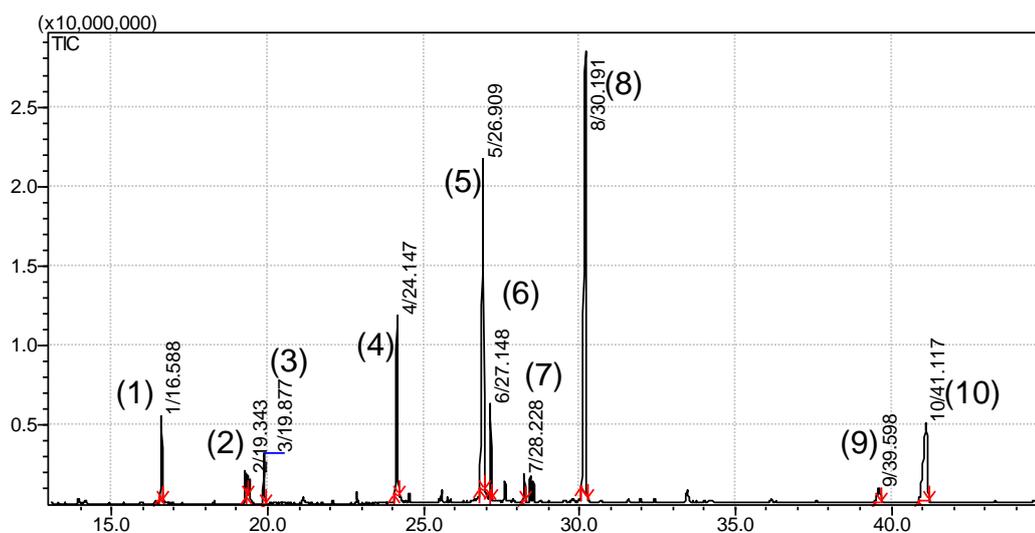


FIGURA 4.36 – Cromatograma de íons totais de FH2.

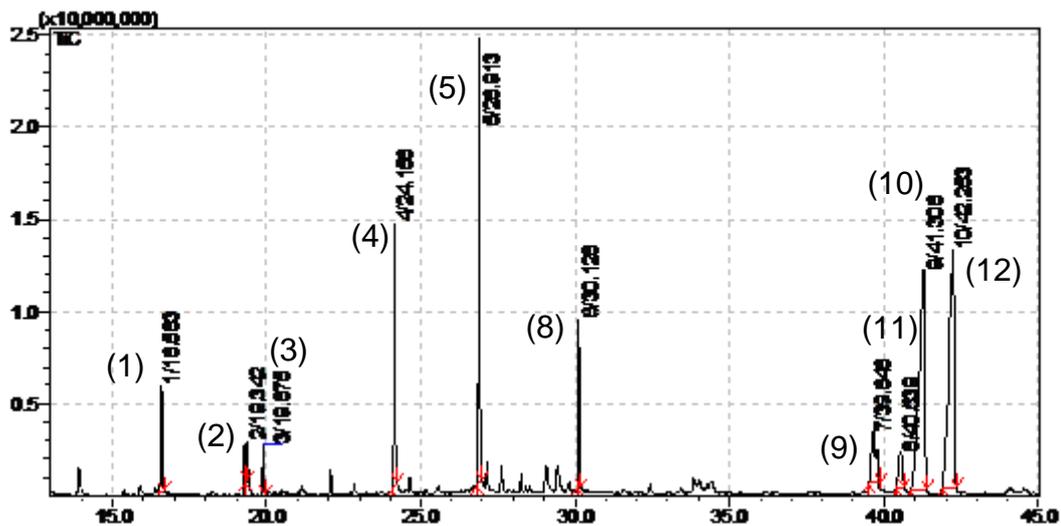


FIGURA 4.37 – Cromatograma de íons totais de FH3.

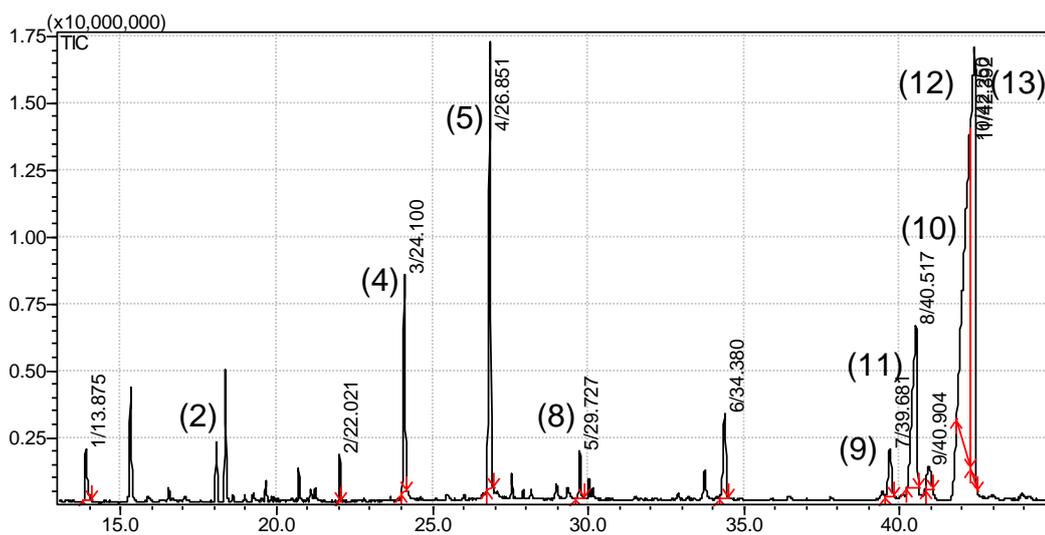


FIGURA 4.38 – Cromatograma de íons totais de FH4.

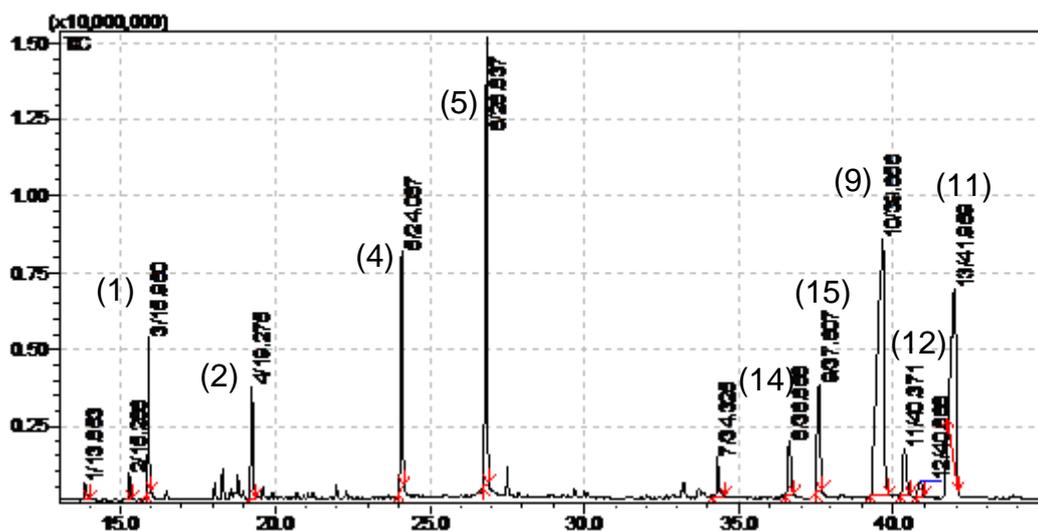


FIGURA 4.39 – Cromatograma de íons totais de FH5.

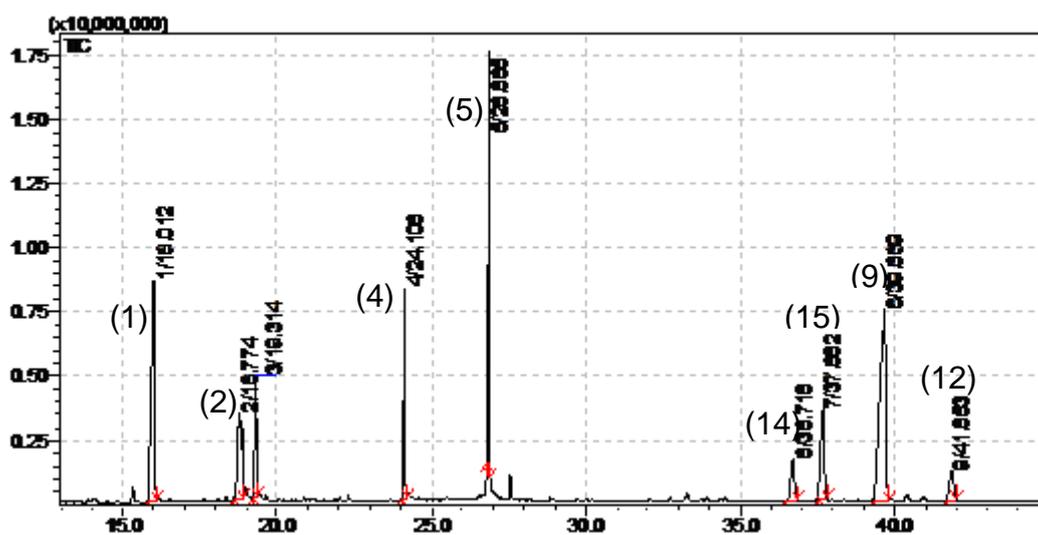
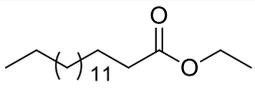
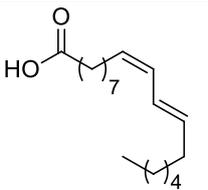
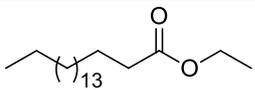
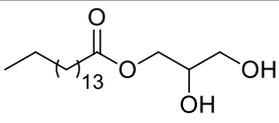
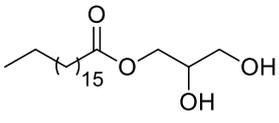
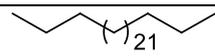
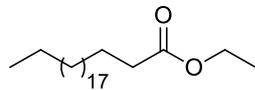
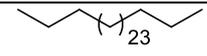
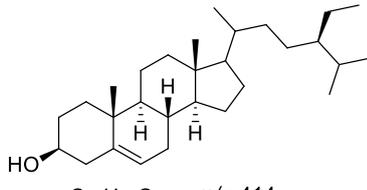
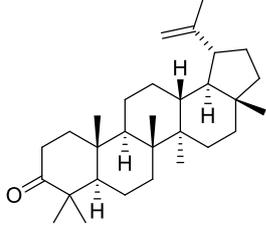
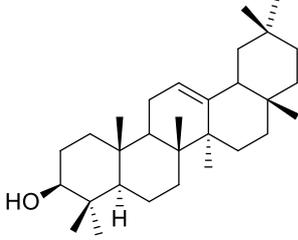
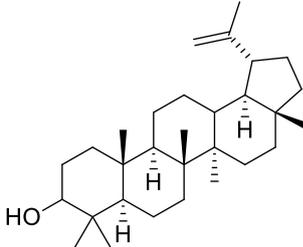
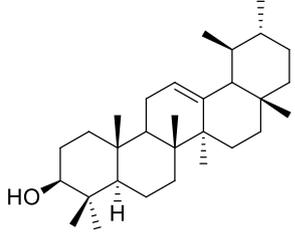
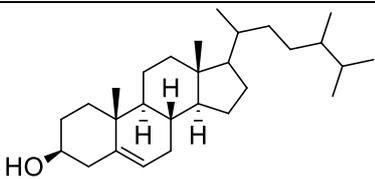
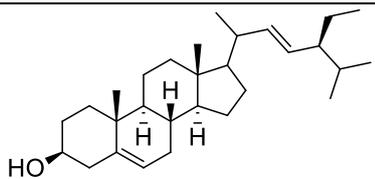


FIGURA 4.40 – Cromatograma de íons totais de FH6

Com análise das frações por CG-EM foi possível confirmar quais triterpenos estavam presentes em cada fração além dos demais compostos presentes nelas. A TABELA 4.16 mostra os compostos identificados, assim como seus respectivos IK e m/z característicos.

TABELA 4.16 – Compostos identificados nas frações obtidas de FH com seus respectivos IK e *m/z*.

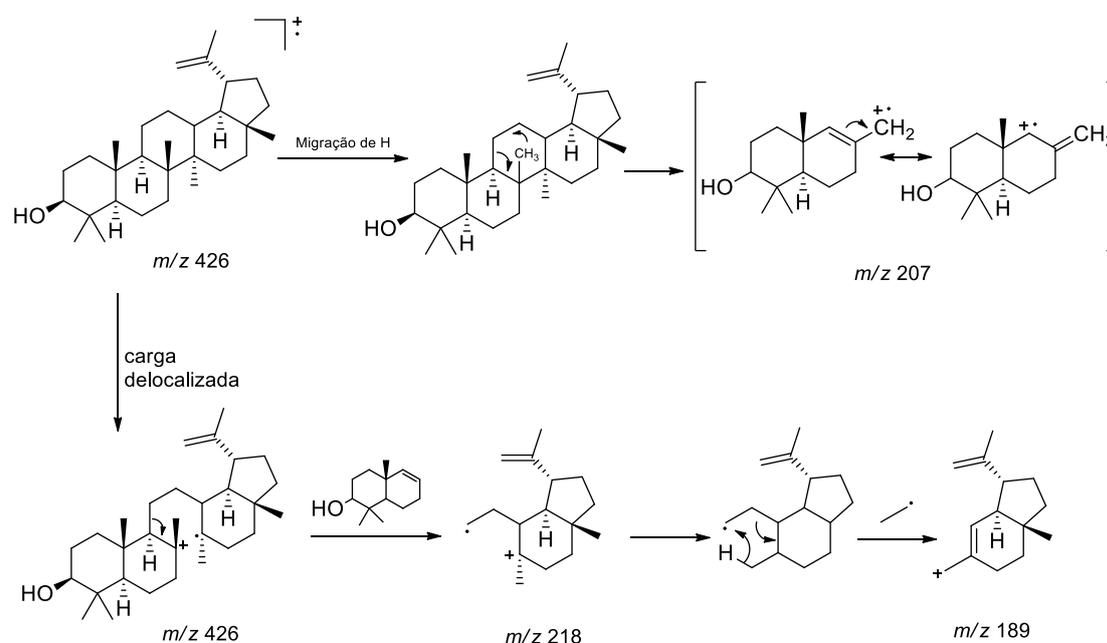
N°	Composto	Estrutura	IK	IK	<i>m/z</i> característicos
			teórico	calculado	
1	Hexadecanoato de etila	 $C_{18}H_{36}O_2$ m/z 284	1975	1978	88, 101, 284
2	Ácido linoléico	 $C_{18}H_{32}O_2$ m/z 280	2140	2144	79, 262
3	Octadecanoato de etila	 $C_{20}H_{40}O_2$ m/z 312	2190	2195	88, 101, 312
4	Hexadecanoil glicerol	 $C_{19}H_{38}O_4$ m/z 330	-	-	98, 239, 314
5	Monoestearato glicerol	 $C_{21}H_{42}O_4$ m/z 358	-	-	98, 267, 327
6	Heptacosano	 $C_{27}H_{56}$ m/z 380	2700	2702	57, 71, 85, 99
7	Docosanoato de etila	 $C_{24}H_{48}O_2$ m/z 408	2796	2793	88, 101
8	Nonacosano	 $C_{29}H_{60}$ m/z 408	2900	2906	57, 71, 85, 99
9	Sitosterol	 $C_{29}H_{50}O$ m/z 414	-	-	163, 330, 273, 414

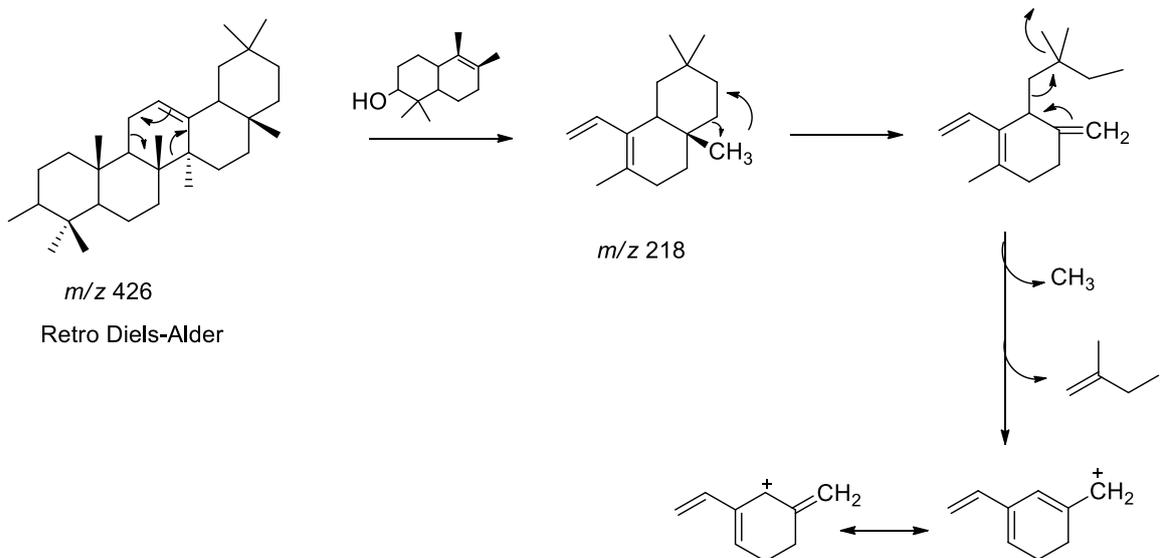
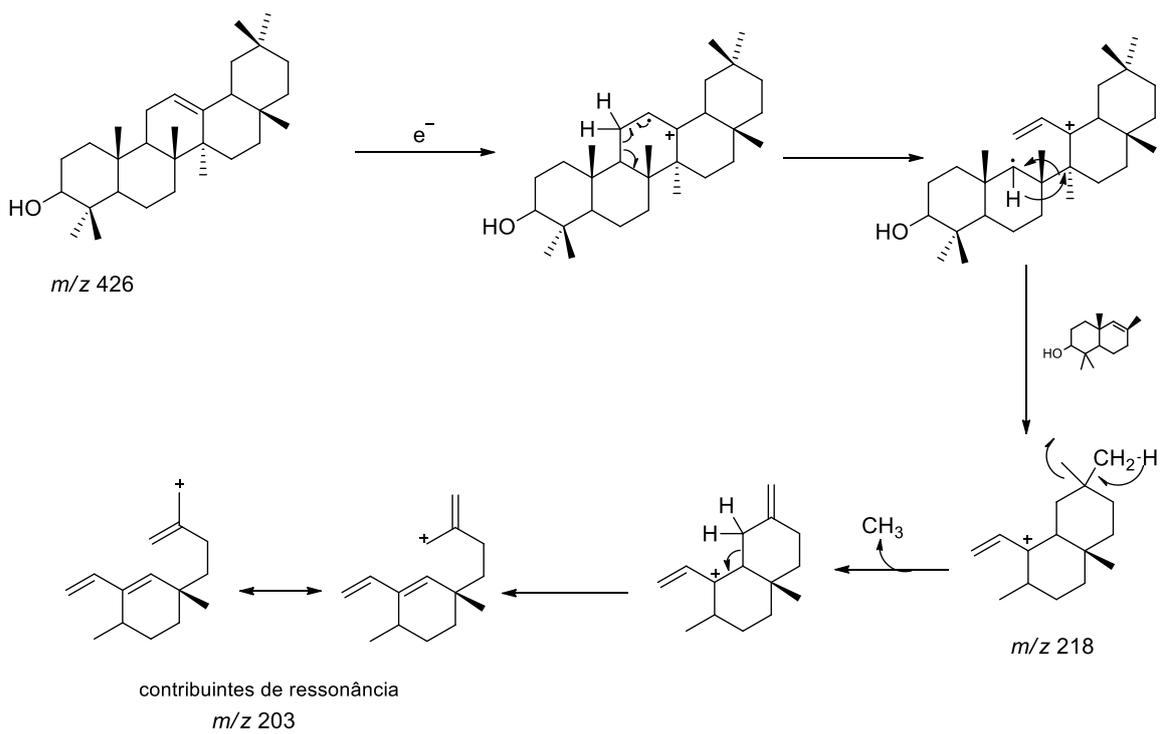
10	Lupenona	 $C_{30}H_{48}O$ m/z 424	-	-	216, 403, 424
11	β -amirina	 $C_{30}H_{50}O$ m/z 426	-	-	133, 207, 218, 426
12	Lupeol	 $C_{30}H_{50}O$ m/z 426	-	-	205, 218, 426
13	α -Amirina	 $C_{30}H_{50}O$ m/z 426	-	-	133, 207, 218, 426
14	Campesterol	 $C_{28}H_{48}O$ m/z 400	-	-	316, 400, 401
15	Stigmasterol	 $C_{29}H_{48}O$ m/z 412	-	-	83, 315, 329, 412, 413

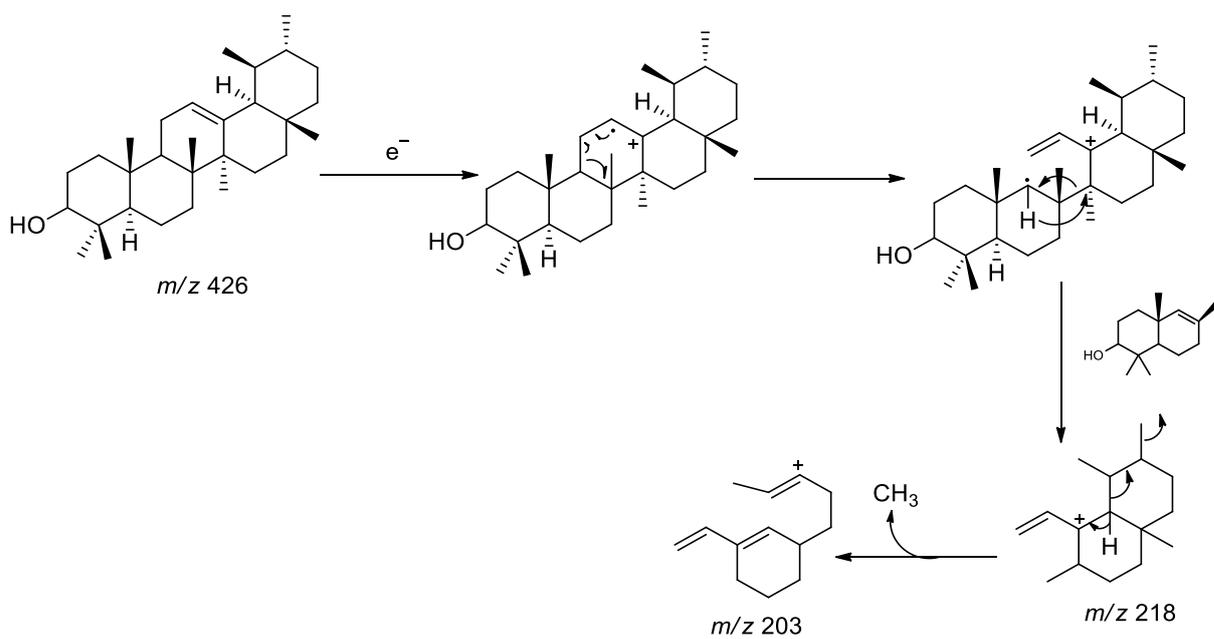
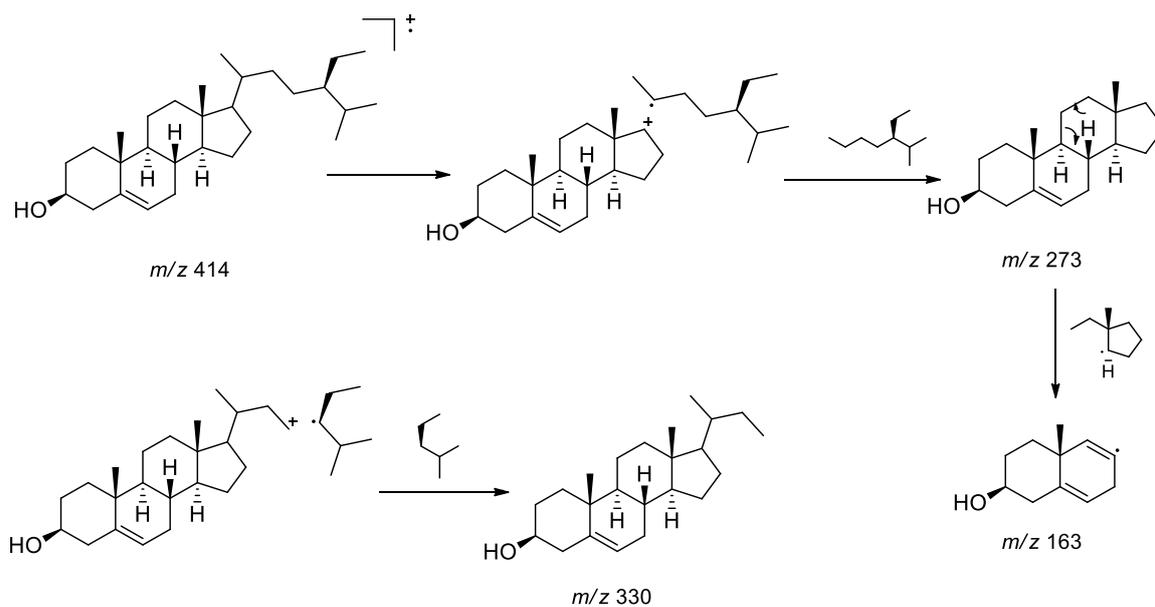
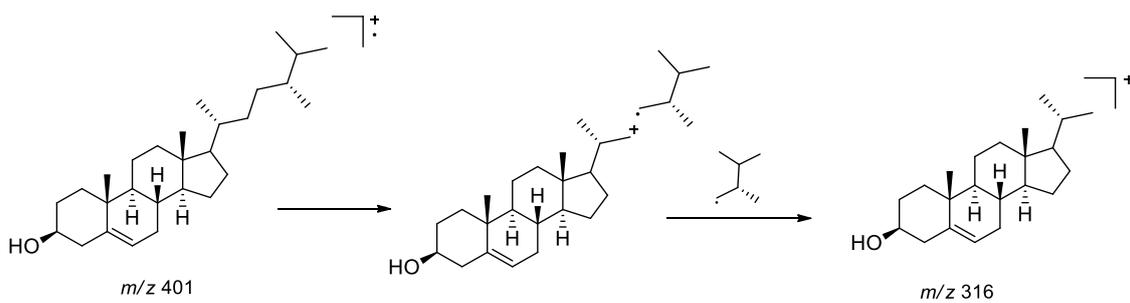
A caracterização dos compostos por CG-MS foi realizada usando comparação com a biblioteca NIST 2010, onde os compostos apresentavam acima de 95% de semelhança, e através da análise dos espectros de massas dessas substâncias. Para a identificação dos triterpenos também foi feita a injeção de padrões para a comparação dos tempos de retenção de cada composto.

Os triterpenos e esteroides consistem em uma classe de composto facilmente analisada por CG-EM, esta é uma eficiente para análise e caracterização de misturas complexas destes compostos (ASSIMOPOULOU & PAPAGEORGIOU, 2005). Na FIGURA 4.41 é possível observar as principais quebras de ligações que caracterizam os triterpenos e esteroides encontrados nas frações.

Lupeol e Lupenona



β -amirina

α -amirina**Sistosterol****Campesterol**

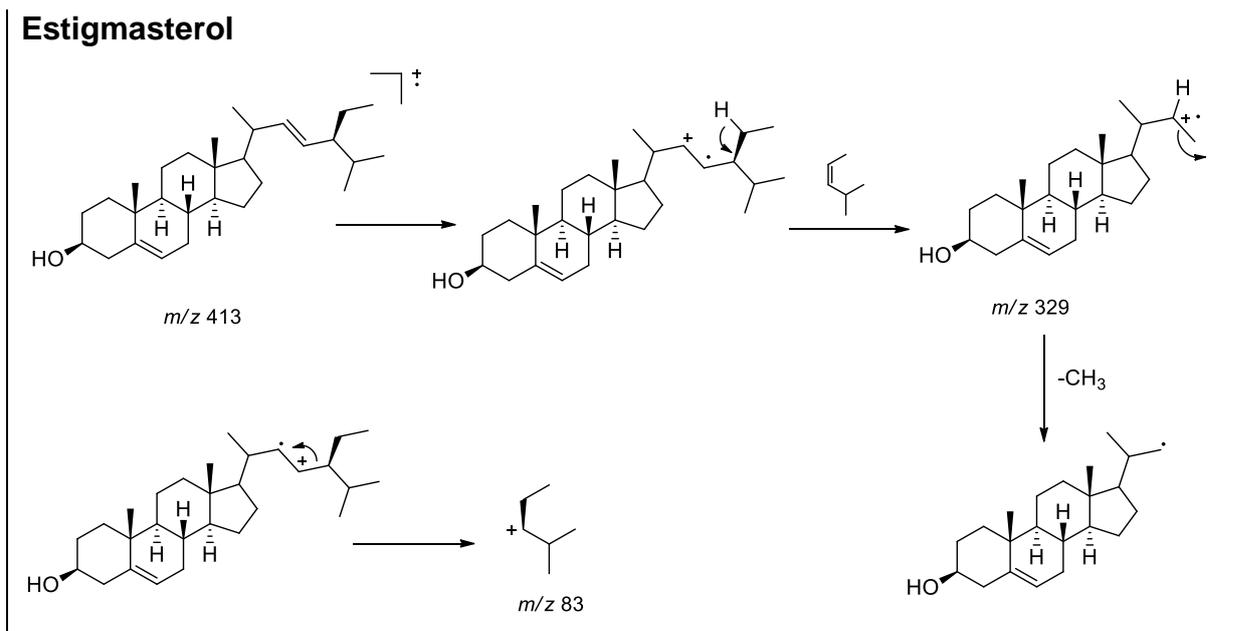


FIGURA 4.41 - Principais fragmentações de ligações que caracterizam os triterpenos encontrados nas frações obtidas de FH.

Os triterpenos lupeol e lupenona seguem o mesmo perfil de fragmentação dos íons característicos, contudo a diferença do tempo de retenção e da massa do íon molecular (lupeona m/z 424 e lupeol m/z 426) torna possível a caracterização destes triterpenos. Os triterpenos α e β -amirina sofrem fragmentação do tipo retro-Diels-Alder do anel C, típica de triterpenos pentacíclicos, originando os íons de maior intensidade como os m/z 218; 207; 203 e 189 (ASSIMOPOULOU & PAPAGEORGIOU, 2005). A diferença estrutural entre estes compostos está na posição das metilas do anel E. Esta diferença fica evidente principalmente observando-se a intensidade do íon m/z 203, que em função da estabilidade do intermediário formado para a β -amirina, é mais abundante no espectro de massa (FIGURA 4.42).

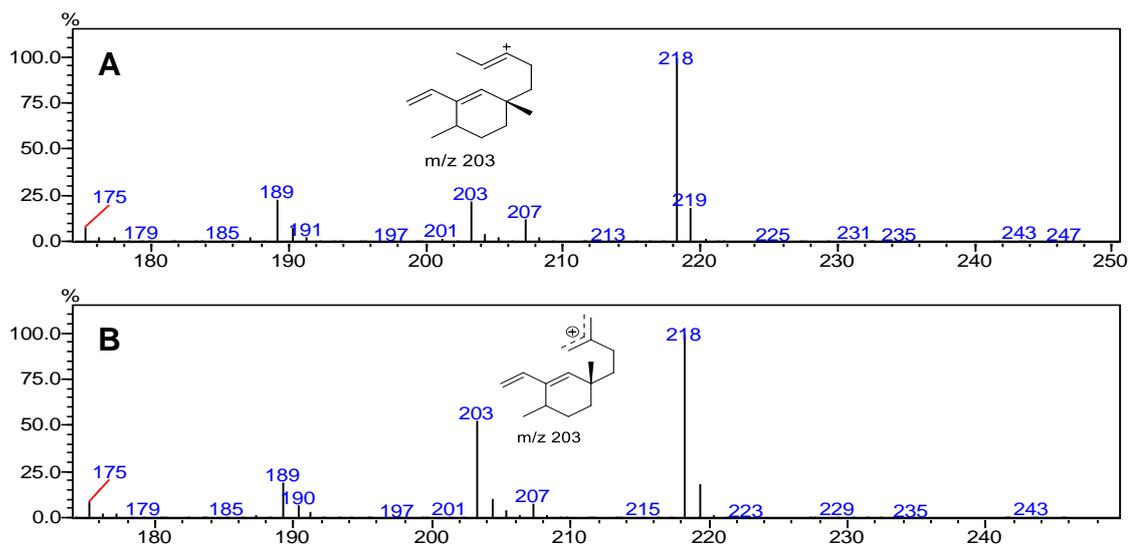


FIGURA 4.42 – Ampliação do espectro de massa (A) α -amirina e (B) β -amirina, mostrando a maior abundância de m/z 203 para β -amirina, em função da maior estabilidade do íon formado.

As figuras 4.43, 4.44, 4.45, 4.46, 4.47, 4.48 e 4.49 mostram os espectros de massa dos triterpenos e esteroides presentes nas frações obtidas de FH.

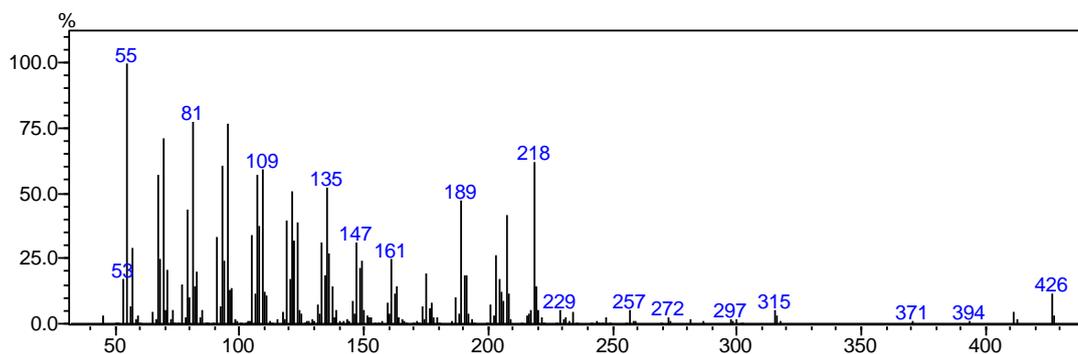


FIGURA 4.43 – Espectro de massas do triterpene lupeol obtido por impacto eletrônico de 70eV.

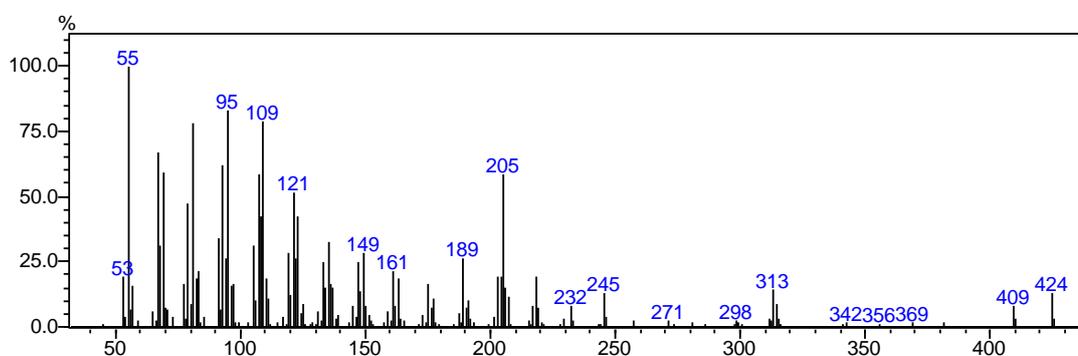


FIGURA 4.44 – Espectro de massas do triterpene lupenona obtido por impacto eletrônico de 70eV.

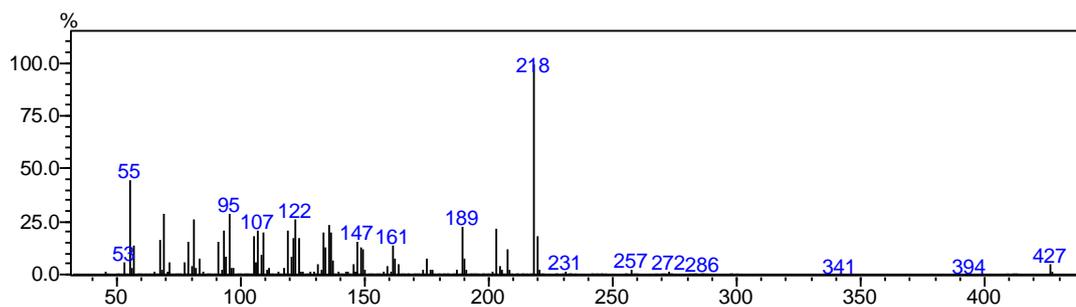


FIGURA 4.45 – Espectro de massas do triterpeneo α -amirina obtido por impacto eletrônico de 70eV.

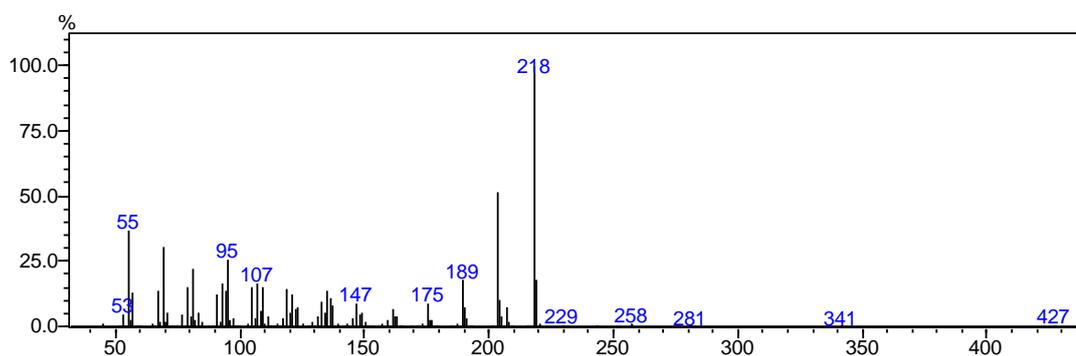


FIGURA 4.46 – Espectro de massas do triterpeneo β -amirina obtido por impacto eletrônico de 70eV.

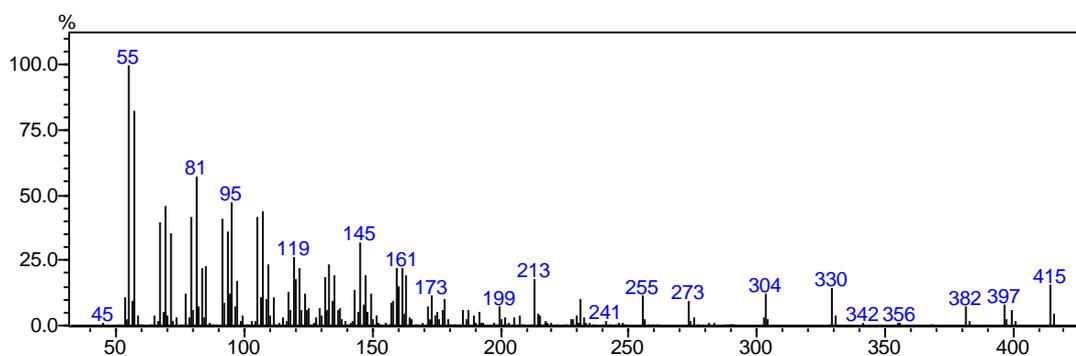


FIGURA 4.47 – Espectro de massas do esteroide sitosterol obtido por impacto eletrônico de 70eV.

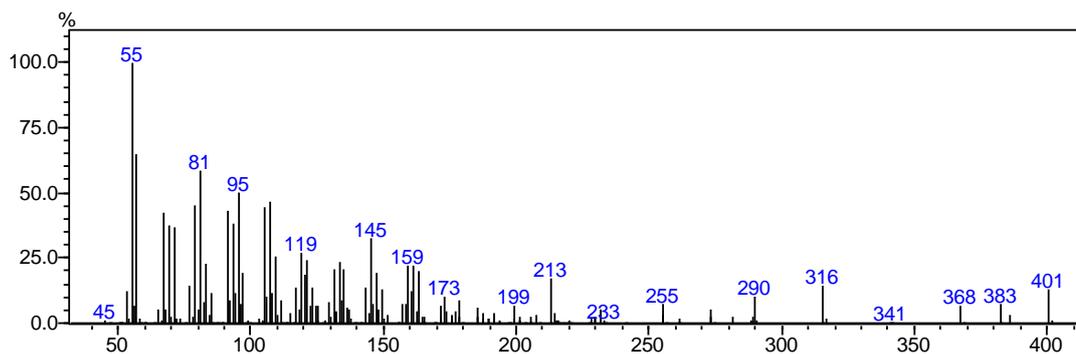


FIGURA 4.48 – Espectro de massas do esteroide campesterol obtido por impacto eletrônico de 70eV.

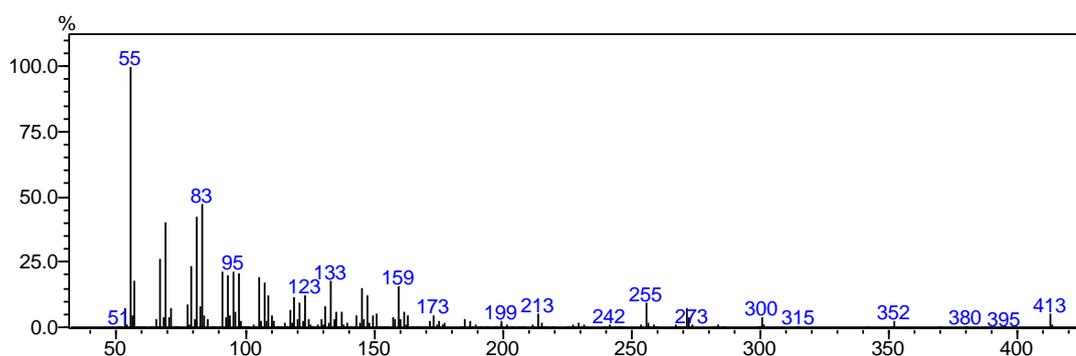


FIGURA 4.49 – Espectro de massas do esteroide stigmasterol obtido por impacto eletrônico de 70eV.

Para confirmação dos hidrocarbonetos e compostos alquílicos funcionalizados, ainda foi calculado o índice de Kovats, que consiste em um método adicional na elucidação da estrutura molecular (ADAMS, 2007). As figuras 4.50, 4.51, 4.52, 4.53, 4.54, 4.55, 4.56 e 4.57 mostram os espectros de massa assim como as fragmentações característica de cada composto.

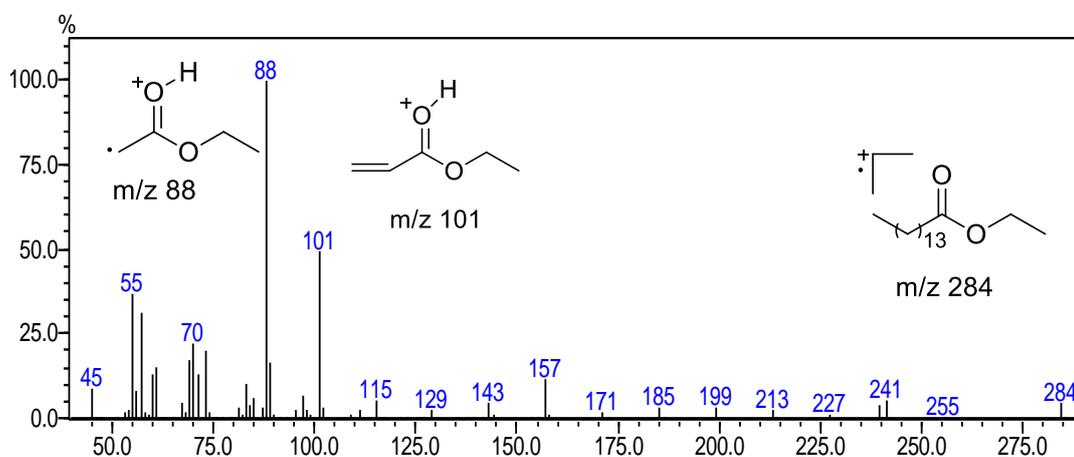


FIGURA 4.50 – Espectro de massas obtido por impacto eletrônico de 70eV com fragmentações características do hexadecanoato de etila.

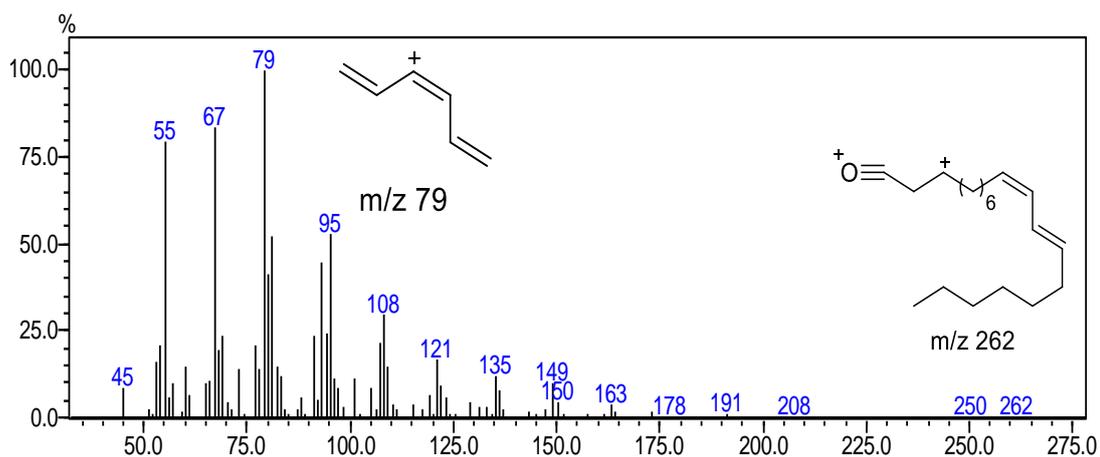


FIGURA 4.51 – Espectro de massas obtido por impacto eletrônico de 70eV com fragmentações características do ácido linoleico.

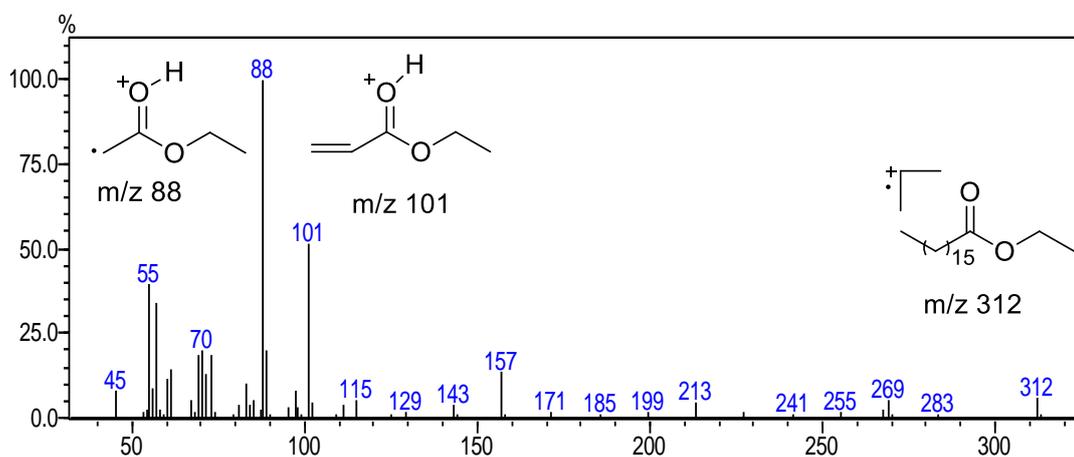


FIGURA 4.52 – Espectro de massas obtido por impacto eletrônico de 70eV com fragmentações características do octanoato de etila.

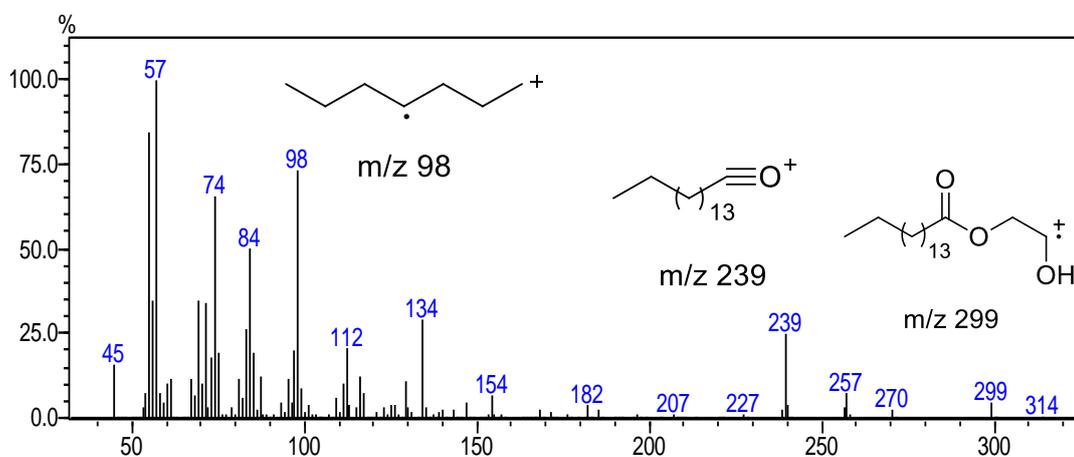


FIGURA 4.53 – Espectro de massas obtido por impacto eletrônico de 70eV com fragmentações características do hexadecanoil glicerol.

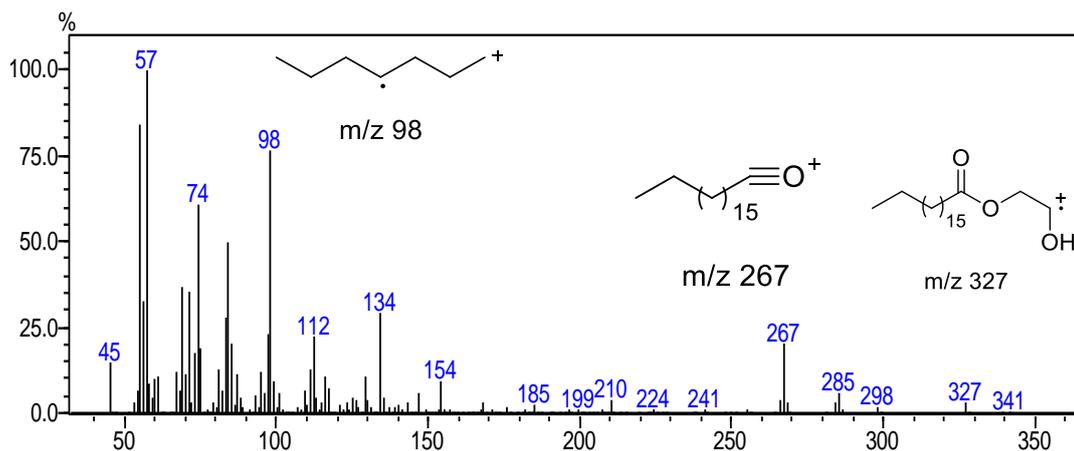


FIGURA 4.54 – Espectro de massas obtido por impacto eletrônico de 70eV com fragmentações características do monoestearato glicérol.

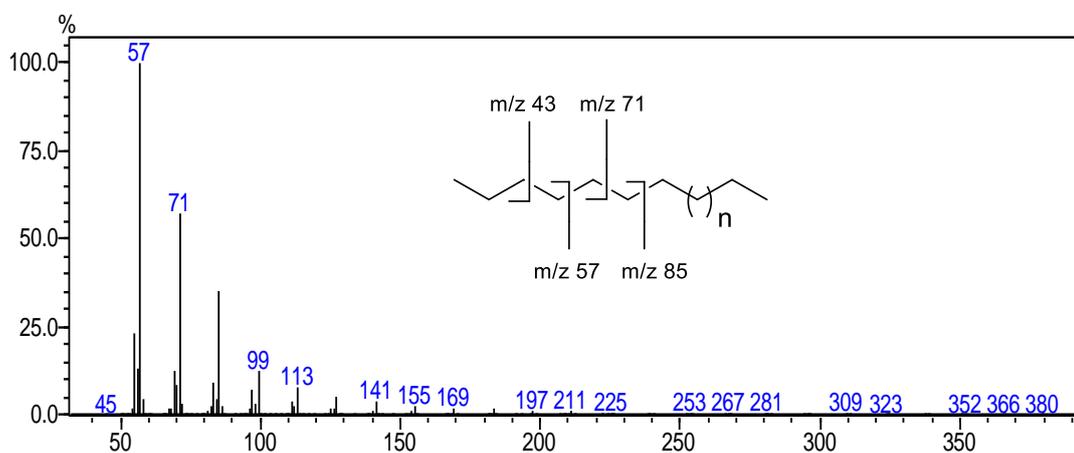


FIGURA 4.55 – Espectro de massas obtido por impacto eletrônico de 70eV com fragmentações características do heptacosano.

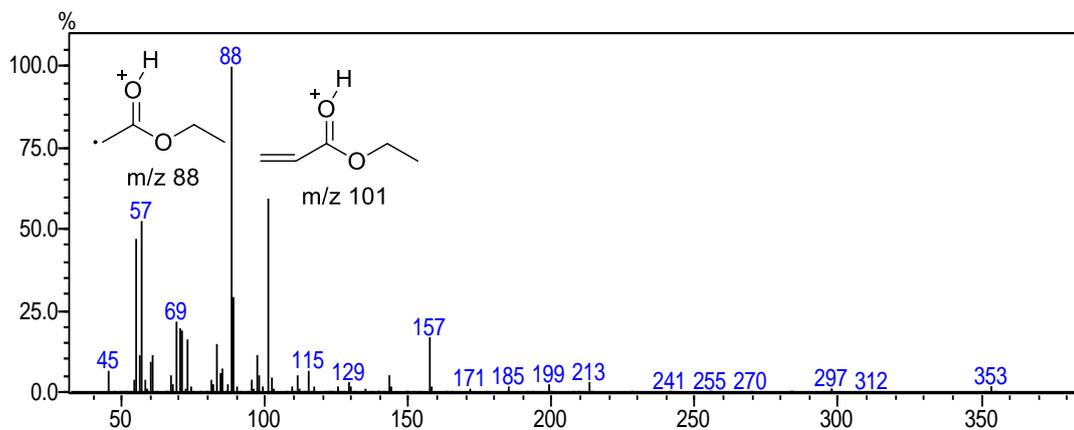


FIGURA 4.56 – Espectro de massas obtido por impacto eletrônico de 70eV com fragmentações características do docosanoato de etila.

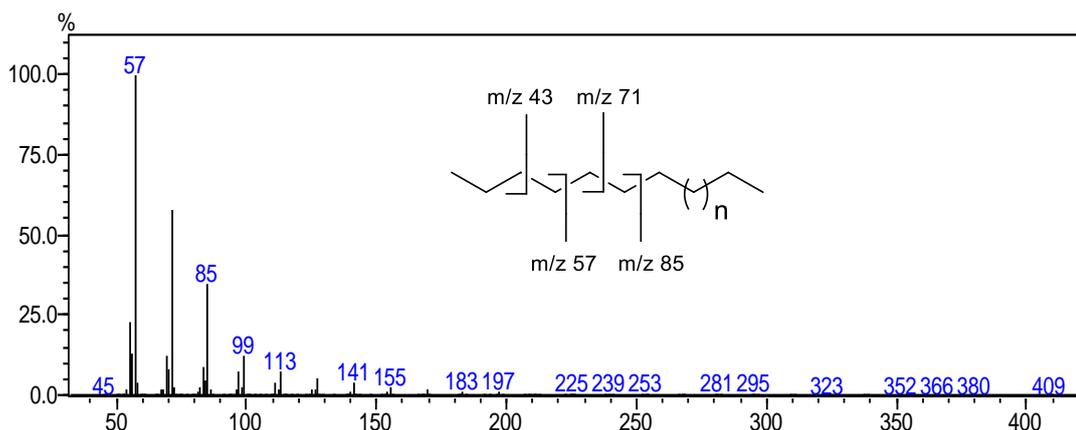


FIGURA 4.57 – Espectro de massas obtido por impacto eletrônico de 70eV com fragmentações características do nonacosano.

4.8 – Ensaios Enzimáticos das Frações Obtidas de FH

A fração FH foi submetida a uma separação cromatográfica em coluna utilizando como fase estacionária sílica gel e como fase e móvel solventes de diferentes polaridades, originando 5 novas frações. As frações obtidas foram submetidas aos ensaios enzimáticos e as porcentagens de inibição são descritas na TABELA 4.17.

TABELA 4.17 – Porcentagens de inibição das frações obtidas de FH.

Fração	% Inibição das Catepsinas		Fração	% Inibição das Catepsinas	
FH2	K	27	FH5	K	72
	L	11		L	57
	V	84		V	98
FH3	K	67	FH6	K	93
	L	50		L	79
	V	95		V	99
FH4	K	55			
	L	46			
	V	94			

Analisando os resultados descritos na TABELA 4.17 é possível notar que as frações FH2, FH3 e FH4 apresentaram porcentagens de inibição superiores a 70% apenas para a catepsina V, o que pode ser um indício de substâncias com maior

seletividade para esta enzima. Para as outras enzimas as porcentagens de inibição foram menores nestas frações. A fração FH5 apresentou porcentagens de inibição superiores a 70% para as catepsinas K e V, sendo para a catepsina V maior que para a K. Já a fração FH6 teve elevados percentuais de inibição para as três enzimas, entretanto o maior deles é para a catepsina V.

De uma forma geral, todas as frações obtidas de FH tiveram a variação de percentuais de inibição semelhantes para as três catepsinas, sendo os maiores percentuais para a catepsina V e os menores percentuais para a catepsina L. Com estes resultados pode-se notar que as frações provenientes de FH possuem compostos que são mais ativos frente à catepsina V.

Feito a análise dos constituintes das frações de FH foi possível observar que os constituintes majoritários destas frações são substâncias que já foram previamente ensaiados, como triterpenos e esteroides, e não apresentaram atividade inibitória frente às enzimas. Entretanto, também foram observados a presenças de outros constituintes além dos triterpenos e esteroides. Assim, as atividades inibitórias apresentadas pelas frações de FH frente às catepsinas podem estar associadas aos constituintes minoritários de cada fração, que ainda não puderam ser identificadas.

5 – Conclusão

Com o estudo dos extratos de *Bowdichia virgilioides* foi possível isolar e realizar a elucidação estrutural de onze substâncias: lupeol, lupenona, β -sitosterol, estigmasterol, 1 éster derivado do ácido *trans p*-cumárico, siringaresinol, bowdenol, 8-metoxi-cumestrol, 7, 3'-diidroxí-4'-metoxi-isoflavona, 5, 4'-diidroxí-7'-metoxi-isoflavona e 4-hidroxí-7-metoxi-isoflavona. Ainda foram identificadas em mistura triterpenos, esteroides e ácidos graxos da fração hexânica utilizando RMN ^1H e CG-EM. O 8-metoxi cumestrol, substância inédita para a planta estudada, apresentou inibição de 70% frente à catepsina V quando ensaiada na concentração de 100 μM . O potencial inibitório deste composto foi expresso pelo IC_{50} de 17 μM . Os resultados ainda revelaram o éster derivado do ácido *trans p*-cumárico, que apresentou inibição superior a 70% para as catepsinas L e V na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$. Como este resultado foi satisfatório, foram sintetizados os ésteres derivados deste ácido e de outros ácidos com estruturas semelhantes a dele a fim de avaliar a relação estrutura/atividade. Foi sintetizada uma série uma série de 8 ésteres derivados dos ácidos *p*-hidroxibenzóico, *p*-cumárico, cinâmico e ferúlico. Os bioensaios realizados com os ésteres revelaram o *p*-cumarato de *n*-octila o éster como o melhor inibidos para as três enzimas.

6 – Referências bibliográficas

- ADAMS, R. P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy. 4th ed. Carol Stream, Allured Publishing Corporation, 2007. 804 p.
- AGRA, I. K. R.; PIRES, L. L. S.; CARVALHO, P. S. M.; SILVA-FILHO, E. A.; SMANIOTTO, S.; & BARRETO, E. "Evaluation of wound healing and antimicrobial properties of aqueous extract from *Bowdichia virgilioides* stem barks in mice". An. Acad. Bras. Cienc., 85 (3): 945, 2013.
- ALMEIDA, J. R. G. D. S.; FILHO, R. N. D. S.; NUNES, X. P.; DIAS, C. D. S.; PEREIRA, F. D. O.; & LIMA, E. D. O. "Antimicrobial activity of the essential oil of *Bowdichia virgilioides* kunt". Rev. Bras. Farmacogn., 16: 638, 2006.
- ALVIM, J.; SEVERINO, R. P.; MARQUES, E. F.; MARTINELLI, A. M.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; SILVAILVA, M. F. D. G. F. Da; & CORRÊA, A. G. "Solution phase synthesis of a combinatorial library of chalcones and flavones as potent cathepsin V inhibitors". J. Comb. Chem., 12 (5): 687, 2010.
- ANDRADE, R. de O. "Laboratório a céu aberto". Pesquisa FAPESP, (208): 40, 2013.
- ARRIAGA, Â. M. C.; MACHADO, M. I. L.; GOMES, G. A.; & CRAVEIRO, A. A. "Volatile constituents from roots of *Bowdichia virgilioides* kunt". J. Essent. Oil Res., 10 (2): 205, 1998.
- ARRIGA, A. M. C.; GOMES, G. A.; & BRAZ-FILHO, R. "Constituents of *Bowdichia virgilioides*". FITOTERAPIA, 71: 211, 2000.
- ASSIMOPOULOU, A. N. & PAPAGEORGIOU, V. . P. "GC-MS analysis of penta- and tetra-cyclic triterpenes from resins of pistacia species. part I. *Pistacia lentiscus* var. chia". Biomed. Chromatogr., 19 (4): 285, 2005.
- BARBOSA-FILHO, J. M.; ALMEIDA, J. R. G. D. S.; COSTA, V. C. D. O.; DA-CUNHA, E. V. L.; SILVA, M. S. DA; & BRAZ-FILHO, R. "Bowdichine, a new diaza-adamantane alkaloid from *Bowdichia virgilioides*". J. Asian Nat. Prod. Res., 6 (1): 11, 2004.
- BARRETT, A. J.; KEMHAVI, A. A.; BROWN, M. A.; KIRSCHKE, H.; KNIGHT, C. G.; TAMAIT, M.; & HANADAT, K. "L-*trans*-epoxysuccinyl-leucylamido(4-guanidino)butane (E-64) and its analogues as inhibitors of cysteine proteinases including cathepsins B , H and L". Biochem. J., 201 (1): 189, 1982.
- BARROS, W. M.; RAO, V. S. N.; SILVA, R. M.; LIMA, J. C. S.; & MARTINS, D. T. O. "Anti-inflammatory effect of the ethanolic extract from *Bowdichia virgilioides* H.B.K stem bark". An. Acad. Bras. Cienc., 82 (3): 609, 2010.
- BATLLE-BAYER, L.; BATJES, N. H.; & BINDRABAN, P. S. "Changes in organic carbon stocks upon land use conversion in the brazilian cerrado: a review". Agric. Ecosyst. Environ., 137: 47, 2010.

BOONEN, S.; ROSENBERG, E.; CLAESSENS, F.; VANDERSCHUEREN, D.; & PAPAPOULOS, S. "Inhibition of cathepsin K for treatment of osteoporosis". *Curr. Osteoporos. Rep.*, 10 (1): 73, 2012.

BRÖMME, D. & KALETA, J. "Thiol-dependent cathepsins : pathophysiological implications and recent advances in inhibitor design", *Curr. Pharm. Des.*, **8**: 1639, 2002.

COPELAND, R. A. *Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery: a guide for medicinal chemists and pharmacologists*. New Jersey, Wiley, 2005. 271 p.

COSTA, D. A.; CHAVES, M. H.; SILVA, W. C. S.; & COSTA, C. L. S. "Constituintes químicos, fenóis totais e atividade antioxidante de *Sterculia striata* st. hil. et naudin". *Acta Amaz.*, 40 (1): 207, 2010.

CRAGG, G. M. & NEWMAN, D. J. "Natural products: a continuing source of novel drug leads". *Biochim. Biophys. Acta*, 1830 (6): 3670, 2013.

DEWICK, P. M. *Medicinal Natural Products*. 2^a ed. 2002. 507 p.

DU, X.; BAI, Y.; LIANG, H.; WANG, Z.; ZHAO, Y.; ZHANG, Q.; & HUANG, L. "Solvent effect in ¹H nmr spectra of 3'-hydroxy-4'-methoxy isoflavonoids from *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus*". *Magn. Reson. Chem.*, 44 (7): 708, 2006.

DURANGO, D.; QUIÑONES, W.; TORRES, F.; ROSERO, Y.; GIL, J.; & ECHEVERRI, F. "Phytoalexin accumulation in colombian bean varieties and aminosugars as elicitors". *Molecules*, 7 (11): 817, 2002.

JOHN, L. I.; NOEL, T. K.; MULHEIEN, L. J.; & LYNE, R. L. "Inducibly-formed isoflavonoids from leaves of soybean". *Phytochemistry*, 20 (4): 795, 1981.

KOMINAMI, E.; KUNIO, I.; & KATUNUMA, N. "Activation of the intramyofibril autophagic-lysosomal system in muscular dystrophy". *Am. J. Pathol.*, 127 (3): 461, 1987.

KORP, R.; VONK, H.; XU, X.; HOFF, W. D.; CRIELAARD, W.; & HELLINGWERF, K. J. "Evidence for *trans-cis* isomerization of the *p*-cumaric acid chromophore as the photochemical basis of the photocycle of photoactive yellow protein". *FEBS Lett.*, **382**: 73, 1996.

KUMAR, G. D. K.; CHAVARRIA, G. E.; CHARLTON-SEVICK, A. K.; ARISPE, W. M.; MACDONOUGH, M. T.; STRECKER, T. E.; CHEN, S.-E.; SIIM, B. G.; CHAPLIN, D. J.; TRAWICK, M. L.; & PINNEY, K. G. "Design, synthesis, and biological evaluation of potent thiosemicarbazone based cathepsin I inhibitors". *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 20 (4): 1415, 2010.

LECAILLE, F.; KALETA, J.; & BRÖMME, D. "Human and parasitic papain-like cysteine proteases: their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design". *Chem. Rev.*, 102 (12): 4459, 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.
- LI, C. C.; XIE, Z. X.; ZHANG, Y. D.; CHEN, J. H.; & YANG, Z. "Total synthesis of wedelolactone". *J. Org. Chem.*, **68** (22): 8500, 2003.
- MARQUES, E. F. Estudo de Produtos Naturais e Derivados Sintéticos Buscando Inibidores das Catepsinas L e V. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2011. Dissertação de Mestrado, 135 p.
- MARQUES, E. F.; BUENO, M. A.; DUARTE, P. D.; SILVA, L. R. S. P.; MARTINELLI, A. M.; SANTOS, C. Y. Dos; SEVERINO, R. P.; BRÖNNE, D.; VIEIRA, P. C.; & CORRÊA, A. G. "Evaluation of synthetic acridones and 4-quinolinones as potent inhibitors of cathepsins L and V". *Eur. J. Med. Chem.*, **54**: 10, 2012.
- MATSUNO, Y.; DEGUCHI, J.; HIRASAWA, Y.; OHYAMA, K.; TOYODA, H.; HIROBE, C.; EKASARI, W.; WIDYAWARUYANTI, A.; ZAINI, N. C.; & MORITA, H. "Sucutiniranes a and b, new cassane-type diterpenes from *Bowdichia nitida*". *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **18** (13): 3774, 2008.
- MATSUNO, Y.; DEGUCHI, J.; HOSOYA, T.; HIRASAWA, Y.; HIROBE, C.; SHIRO, M.; & MORITA, H. "Sucutiniranes c-f, cassane-type diterpenes from *Bowdichia nitida*". *J. Nat. Prod.*, **72** (5): 976, 2009.
- MCGRATH, M. E. "The lysosomal cysteine proteases". *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **28**: 181, 1999.
- MELO, F. N.; NAVARRO, V. R.; SILVA, M. S.; DA-CUNHA, E. V.; BARBOSA-FILHO, J. . M.; & BRAZ-FILHO, R. "Bowdenol, a new 2,3-dihydrobenzofuran constituent from *Bowdichia virgilioides*". *Nat. Prod. Lett.*, **15** (4): 261, 2001.
- MISHRA, B. B. & TIWARI, V. K. "Natural products: an evolving role in future drug discovery". *Eur. J. Med. Chem.*, **46** (10): 4769, 2011.
- MOHAMED, M. M. & SLOANE, B. F. "Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer". *Nat. Rev. Cancer*, **6**: 764, 2006.
- NETO, G. G. & MORAIS, R. G. De "Recursos medicinais de espécies do cerrado de mato grosso: um estudo bibliográfico". *Acta Bot. Bras.*, **17** (4): 561, 2003.
- NIWA, Y.; SUZUKI, T.; DOHMAE, N.; UMEZAWA, K.; & SIMIZU, S. "Determination of cathepsin V activity and intracellular trafficking by n-glycosylation". *FEBS Lett.*, **586** (20): 3601, 2012.
- NOVINEC, M.; PAVŠIČ, M.; & LENARČIČ, B. "A simple and efficient protocol for the production of recombinant cathepsin v and other cysteine cathepsins in soluble form in *Escherichia coli*". *Protein Expression Purif.*, **82** (1): 1, 2012.
- OLIVEIRA, D. M. T. "Morfo-anatomia do embrião de leguminosas arbóreas nativas". *Revta Brasil. Bot.*, **22** (3): 413, 1999.

- OTTO, H.-H. & SCHIRMEISTER, T. "Cysteine proteases and their inhibitors". Chem. Rev., 97 (1): 133, 1997.
- PALERMO, C. & JOYCE, J. A. "Cysteine cathepsin proteases as pharmacological targets in cancer". Trends Pharmacol. Sci., 29 (1): 22, 2008.
- PARK, J.-H.; YEON, S.-W.; CHO, J.-G.; LEE, D.-Y.; KIM, Y.-S.; & BAEK, N.-I. "Lignans from silkworm droppings and their promotional activities on heme oxygenase-1 (ho-1)", J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem., 53 (6): 734, 2010.
- PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. Da S.; LOPES, N. P.; & EPIFANIO, R. De A. "Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas". Quim. Nova, 25: 45, 2002.
- ROBERTSON, J. G. "Mechanistic basis of enzyme-targeted drugs". Biochemistry, 44 (15): 5561, 2005.
- RODRIGUES, R. S. & TOZZI, A. M. G. De A. "Morfologia de plântulas de cinco leguminosas genistóides arbóreas do Brasil (leguminosae-papilionoideae)", Acta Bot. Bras., 21 (3): 599, 2007.
- RODRIGUES, T. M. & MACHADO, S. R. "Anatomia comparada do pulvino primário de leguminosas com diferentes velocidades de movimento foliar". Rev. Bras. Bot., 29 (4): 709, 2006.
- RUSSELL, G. B. & FENEMORE, P. G. "New lignans from leaves of *Macropiper excelsum*". Phytochemistry, 12 (1972): 1799, 1973.
- SANTOS, A. P.; ZATTA, D. T.; MORAES, W. F.; BARA, M. T. F.; FERRI, P. H.; SILVA, M. D. R. R.; & PAULA, J. R. "Composição química, atividade antimicrobiana do óleo essencial e ocorrência de esteróides nas folhas de *Pterodon emarginatus vogel*, fabaceae", Rev. Bras. Farmacogn., 20 (6): 891, 2010.
- SEVERINO, R. P. Busca de Produtos Naturais como Inibidores Específicos de Enzimas. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2008. Tese de Doutorado, 244 p.
- SEVERINO, R. P.; GUIDO, R. V. . C.; MARQUESS, E. F.; BRÖMME, D.; SILVA, M. F. Das G. F. Da; FERNANDES, J. B.; ANDRICOPULO, A. D.; & VIEIRA, P. C. "Acridone alkaloids as potent inhibitors of cathepsin V". Bioorg. Med. Chem., 19 (4): 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 (1): 14, 2011.
- SILVA, J. A. Da Busca de Inibidores da Catepsina K em Plantas Medicinais Utilizadas no Tratamento de Doenças Osteoarticulares. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2011. Tese de Doutorado, 157 p.
- SILVA, J. P. da. Avaliação da atividade antinociceptiva e antiinflamatória do extrato aquoso bruto da casca de *Bowdichia virgilioides* KUNTH. Maceió, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - UFAL, 2009. Dissertação de mestrado, 64 p.

- SILVA, J. P.; RODARTE, R. S.; CALHEIROS, A. S.; SOUZA, C. Z.; AMENDOEIRA, F. C.; MARTINS, M. A.; SILVA, P. M. R.; FRUTUOSO, V. S.; & BARRETO, E. "Antinociceptive activity of aqueous extract of *Bowdichia virgilioides* in mice". J. M. Food, 13 (2): 348, 2010.
- SILVA JÚNIOR, I. F.; FILHO, V. C.; ZACCHINO, S. A.; LIMA, J. C. Da S.; & MARTINS, D. T. De O. "Antimicrobial screening of some medicinal plants from Mato Grosso cerrado". Rev. Bras. Farmacogn., 19: 242, 2009.
- SOMOZA, J. R.; ZHAN, H.; BOWMAN, K. K.; YU, L.; MORTARA, K. D.; PALMER, J. T.; CLARK, J. M.; & MCGRATH, M. E. "Crystal structure of human cathepsin V". Biochemistry, 39 (41): 12543, 2000.
- SONG, J.; JONES, L. M.; CHAVARRIA, G. E.; CHARLTON-SEVCIK, A. K.; JANTZ, A.; JOHANSEN, A.; BAYEH, L.; SOEUNG, V.; SNYDER, L. K.; LADE JR, S. D.; CHAPLIN, D. J.; TRAWICK, M. L.; & PINNEY, K. G. "Small-molecule inhibitors of cathepsin L incorporating functionalized ring-fused molecular frameworks". Bioorg. Med. Chem. Lett., 23 (9): 2801, 2013.
- STOCH, S. A.; ZAJIC, S.; STONE, J. A.; MILLER, D. L.; BORTEL, L. Van; LASSETER, K. C.; PRAMANIK, B.; CILISSEN, C.; LIU, Q.; LIU, L.; SCOTT, B. B.; PANEBIANCO, D.; DING, Y.; GOTTESDIENER, K.; & WAGNER, J. A. "Odanacatib, a selective cathepsin k inhibitor to treat osteoporosis: safety, tolerability, pharmacokinetics and pharmacodynamics-results from single oral dose studies in healthy volunteers". Br. J. Clin. Pharmacol., 75 (5): 1240, 2013.
- THOMAZZI, S. M.; SILVA, C. B.; SILVEIRA, D. C. R.; VASCONCELLOS, C. L. C.; LIRA, A. F.; CAMBUI, E. V. F.; ESTEVAM, C. S.; & ANTONIOLLII, A. R. "Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Bowdichia virgilioides* (sucupira)". J. Ethnopharmacol., 127 (2): 451, 2010.
- TORKAR, A.; LENARČIČ, B.; LAH, T.; DIVE, V.; & DEVEL, L. "Identification of new peptide amides as selective cathepsin I inhibitors: the first step towards selective irreversible inhibitors?". Bioorg. Med. Chem. Lett., 23 (10): 2968, 2013.
- TORRENEGRA, R.; BAUEREIB, P.; & ACHENBACH, H. "Homoomosanine-type alkaloids from *Bowdichia virgilioides*". Phytochemistry, 28 (8): 2219, 1989.
- TURK, B.; TURK, D.; & TURK, V. "Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers". Biochim. Biophys. Acta, 1477: 98, 2000.
- TURK, V.; STOKA, V.; VASILJEVA, O.; RENKO, M.; SUN, T.; TURK, B.; & TURK, D. "Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers". Biochim. Biophys. Acta, 1824 (1): 68, 2012.
- VELOZO, L. S. M.; SILVA, B. P. Da; SILVA, E. M. B. Da; & PARENTE, J. P. "Constituents from the roots of *Bowdichia virgilioides*". FITOTERAPIA, 70: 532, 1999.
- VENKATA, C.; PRAKASH, S.; & PRAKASH, I. "Isolation and structural characterization of lupane triterpenes from *Polypodium vulgare*". R. J. Pharmaceutical Sci., 1 (1): 23, 2012.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. Da S.; & BARREIRO, E. J. "Os produtos naturais e a química medicinal moderna". *Quim. Nova*, 29 (2): 326, 2006.

VILA VERDE, G. M.; PAULA, J. R.; & CANEIRO, D. M. "Levantamento etnobotânico das plantas medicinais do cerrado utilizadas pela população de mossâmedes (go)". *Rev. Bras. Farmacogn.*, **13**: 64, 2003.

VITOR, R. F.; MOTA-FILIPPE, H.; TEIXEIRA, G.; BORGES, C.; RODRIGUES, A. I.; TEIXEIRA, A.; & PAULO, A. "Flavonoids of an extract of *Pterospartum tridentatum* showing endothelial protection against oxidative injury". *J. Ethnopharmacol.*, 93 (2)–(3): 363, 2004.

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

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 (11): 1247, 2006.