



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
REGIONAL CATALÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**MICHELLE APARECIDA MACHADO**

**METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Eriotheca pubescens* (Malvaceae):  
ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E INIBITÓRIA DE CATEPSINAS**

**CATALÃO/GO**

**2015**

**MICHELLE APARECIDA MACHADO**

**METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Eriotheca pubescens* (Malvaceae):  
ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E INIBITÓRIA DE CATEPSINAS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Goiás – Regional Catalão, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM QUÍMICA.

Área de concentração: Química

Linha de pesquisa: Produtos Naturais e Meio Ambiente

**Orientadora: Profa. Dra. Richele Priscila Severino**

**Co-orientadora: Profa. Dra. Vanessa G. P. Severino**

**CATALÃO/GO**

**2015**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob orientação do Sibi/UFG.

Machado, Michelle Aparecida  
METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Eriotheca pubescens* (Malvaceae):  
ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E INIBITÓRIA DE CATEPSINAS  
[manuscrito] / Michelle Aparecida Machado. - 2015.  
xviii, 106 f.

Orientador: Profa. Dra. Richele Priscila Severino; co-orientadora  
Dra. Vanessa Gisele Pasqualotto Severino.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Regional  
Catalão, Catalão, Programa de Pós-Graduação em Química, Catalão,  
2015.

Bibliografia.

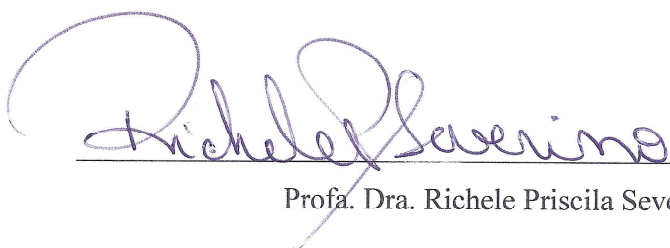
Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, lista de figuras, lista de tabelas.

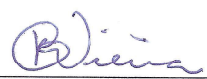
1. *Eriotheca pubescens*. 2. metabólitos secundários. 3. antioxidante.  
4. enzimático. I. Severino, Richele Priscila, orient. II. Severino,  
Vanessa Gisele Pasqualotto, co-orient. III. Título.

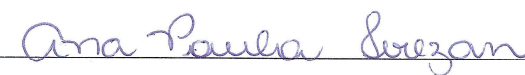


Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
Universidade Federal de Goiás – Regional Catalão  
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química

*Assinatura dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Michelle Aparecida Machado realizada em 19 de março de 2015.*

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Richele Priscila Severino

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Ana Paula Terezan

*Dedico este trabalho...*

*Aos meus pais, IRON e LUZIA, a  
minha irmã PRISCILA, e ao  
WELDER pelo carinho, apoio e  
incentivo incondicionais.*

## AGRADECIMENTOS

À **Deus** pelo dom da vida, por ser meu refúgio, fortaleza e por guiar meus passos em todos os momentos.

À minha orientadora Profa. Dra. **Richele Priscila Severino** pelos ensinamentos acadêmicos e pessoais, pelo apoio, confiança, compreensão e incentivo. Minha admiração e gratidão pela orientação desde a iniciação científica.

À minha co-orientadora Profa. Dra. **Vanessa G. Pasqualotto Severino** pelo incentivo, apoio, disposição em ajudar, pelos ensinamentos e contribuições.

Ao Prof. Dr. **Paulo Cezar Vieira** do Laboratório de Química de Produtos Naturais da Universidade Federal de São Carlos, pela realização dos ensaios enzimáticos e por todas as contribuições.

À Dra. **Ana Paula Terezan** pelo bom convívio, pelas contribuições e conhecimentos transmitidos.

Aos Profs. Dr. **Antônio Gilberto Ferreira**, do Laboratório de RMN do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos e Dr. **Luciano Morais Lião**, do Laboratório de RMN do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, pela realização dos experimentos de Ressonância Magnética Nuclear.

A todos os professores do Programa de Pós Graduação em Química (UFG/RC), pelas contribuições na minha formação. Em especial à Profa. Dra. **Elaine Rosehrer Carbonero** pelo exemplo de dedicação a pesquisa, pelas contribuições e conhecimentos transmitidos.

Aos técnicos do Departamento de Química da UFG/RC, em especial à **Márcia**, pela disposição em ajudar.

Aos meus pais, **Iron e Luzia**, pela educação, valores e ensinamentos. Pelo amor e apoio incondicionais, sempre lutando para que eu pudesse alcançar meus objetivos. Obrigada pelas orações e palavras de incentivo!

Ao **Welder** por todo apoio, incentivo e companheirismo, por compartilhar comigo todos os momentos, por compreender minha ausência, pela amizade e amor. Obrigada por fazer parte da minha vida!

À minha irmã **Priscila** pelo incentivo, ânimo e pela torcida em todos os momentos.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Química de Produtos Naturais da UFG/RC: **Andréia, Angélia, Antônia, Evandro, Felipe, Juliana, Luciana, Núbia e Renan**, pela convivência e experiências compartilhadas. Em especial aos amigos e companheiros de bancada **João Gabriel, Leonardo e Michelle Nauara**, pelos bons momentos vividos durante esses anos, pelo conhecimento compartilhado, pelos momentos de descontração e pela amizade.

À Universidade Federal de Goiás, Regional Catalão e ao Programa de Pós-Graduação em Química por fornecerem estrutura física que possibilitou a realização deste trabalho.

À **CAPES** pela bolsa concedida.

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

“Os que desprezam os pequenos acontecimentos nunca farão grandes descobertas. Pequenos momentos mudam grandes rotas.”

*Augusto Cury*

## RESUMO

**METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Eriotheca pubescens* (Malvaceae): ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E INIBITÓRIA DE CATEPSINAS** – No presente trabalho foi realizado o estudo químico de *Eriotheca pubescens* com a finalidade de isolar e identificar estruturalmente metabólitos secundários presentes no caule e nas folhas desta espécie. Além disso, foi realizada avaliação do potencial antioxidante através do método de captura dos radicais livres com DPPH e avaliação do potencial de inibição frente às catepsinas K, L e V através de ensaio *in vitro* utilizando o substrato fluorogênico Z-FR-MCA. O estudo químico do extrato etanólico do caule levou ao isolamento e identificação dos triterpenoides  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina; dois diterpenoides, ácido 7-oxo-labda-8,13-dien-15-oico e o ácido  $\Delta^{13,14}$ -*ent*-labd-8 $\beta$ -ol-15-oico; quatro derivados do ácido benzoico, o ácido *p*-hidroxibenzoico, o ácido 3,4-diidroxibenzoico, o ácido 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoico, o ácido 3-metoxi-4-hidroxibenzoico e o flavonoide quercetina. Do extrato etanólico das folhas foram isolados e identificados dois triterpenoides, sendo estes a lupenona e o lupeol. No ensaio de atividade antioxidante o ácido 3,4-diidroxibenzoico ( $EC_{50}$  de  $0,34 \pm 0,0083$  mM) e a quercetina ( $EC_{50}$  de  $0,11 \pm 0,0057$  mM) apresentam elevado potencial antioxidante. Nos ensaios frente às catepsinas K, L e V, os extratos e a maior parte das frações apresentaram atividade inibitória superior a 50% e das substâncias isoladas e avaliadas o ácido *p*-hidroxibenzoico mostrou-se um moderado inibidor ( $IC_{50}$  de  $135,81 \pm 17,07$   $\mu$ M) e a quercetina um potente e seletivo inibidor ( $IC_{50}$  de  $2,2 \pm 0,2$   $\mu$ M), ambos para catepsina V. Estes resultados são importantes para contribuir com o conhecimento químico e biológico desta espécie, que até o momento não possui relatos de estudos químicos e biológicos.

**Palavras-chave:** *Eriotheca pubescens*, metabólitos secundários, antioxidante, enzimático.

## ABSTRACT

### **SECONDARY METABOLITES OF *Eriotheca pubescens* (Malvaceae):**

**ANTIOXIDANT ACTIVITIES AND CATHEPSINS INHIBITORY** – In the present work the chemical study of *Eriotheca pubescens* lead to the isolation and structural identification of secondary metabolites present in the stems and leaves of this species. Furthermore, it was evaluated of antioxidant potential by the capture method of free radicals using DPPH and the study also was lead to search cathepsins K, L, and V inhibitors through *in vitro* test using the fluorogenic substrate Z-FR-MCA. The chemical study of the ethanolic extract from the stem led to the isolation and identification of triterpenoids  $\alpha$ -amyrin and  $\beta$ -amyrin; two diterpenoids, 7-oxo-labda-8,13-dien-15-oic acid and *ent*- $\Delta^{13,14}$ -labd-8 $\beta$ -ol-15-oic acid; four derivatives of benzoic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, 3,4-dihydroxybenzoic acid, 4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzoic acid, 3-methoxy-4-hydroxybenzoic acid and flavonoid quercetin. From the ethanolic extract of the leaves, it has been isolated and identified two triterpenoids, lupenona and lupeol. The compounds 3,4-dihydroxybenzoic acid ( $EC_{50}$  0,34  $\pm$  0,0083 mM) and quercetina ( $EC_{50}$  de 0,11  $\pm$  0,0057 mM) showed high antioxidant potential using DPPH assays. The extracts and the major fractions showed above 50% inhibitory activity against cathepsins K, L and V. The *p*-hydroxybenzoic acid was shown to be a moderate inhibitor ( $IC_{50}$  135,81  $\pm$  17,07  $\mu$ M) and quercetin a potent and selective inhibitor ( $IC_{50}$  2,2  $\pm$  0,2  $\mu$ M), both against cathepsin V. These results are important to contribute the chemical and biological knowledge of this species, which so far has no reports of chemical and biological studies.

**Keywords:** *Eriotheca pubescens*, secondary metabolites, antioxidant, enzymatic.

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.1</b> – Fontes de drogas aprovadas até 2010.....	02
<b>FIGURA 1.2</b> – Fármacos derivados de plantas usados na terapia do câncer...	03
<b>FIGURA 1.3</b> – Fármacos derivados de plantas aprovados de 2000-2013.....	05
<b>FIGURA 1.4</b> – Localização do Cerrado no Brasil.....	07
<b>FIGURA 1.5</b> – Estruturas de alguns produtos naturais isolados de espécies da família Malvaceae.....	12
<b>FIGURA 1.6</b> – Mapa da área de concentração de espécies de <i>Eriotheca</i> no Brasil.....	14
<b>FIGURA 1.7</b> – <b>A)</b> Foto de <i>E. pubescens</i> ; <b>B)</b> Flores e folhas e <b>C)</b> Frutos.....	15
<b>FIGURA 1.8</b> – Mapa de distribuição geográfica de <i>E. pubescens</i> no Brasil.....	16
<b>FIGURA 1.9</b> – Estrutura química do radical DPPH• e sua reação com um antioxidante indicado por RH.....	18
<b>FIGURA 1.10</b> – Estruturas de alguns produtos naturais inibidores de catepsinas.....	21
<b>FIGURA 3.1</b> – Estrutura do [L-3-carboxi- <i>trans</i> -2,3-epoxipropionil-leucilamido(4-guanino)butano] (E-64).....	39
<b>FIGURA 3.2</b> – Esquema geral dos ensaios enzimáticos com o substrato fluorogênico Z-FR-MCA.....	40
<b>FIGURA 4.1</b> – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) da mistura das substâncias I e II.....	46
<b>FIGURA 4.2</b> – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) da substância III....	50
<b>FIGURA 4.3</b> – Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 100 MHz) da substância III...	51
<b>FIGURA 4.4</b> – Mapa de contorno HSQC da substância III (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz)..	52
<b>FIGURA 4.5</b> – Expansão do mapa de contorno HSQC da substância III (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz).....	53
<b>FIGURA 4.6</b> – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) da substância IV....	57
<b>FIGURA 4.7</b> – Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 100 MHz) da substância IV..	58

<b>FIGURA 4.8</b> – Mapa de contorno HSQC da substância <b>IV</b> (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz)..	59
<b>FIGURA 4.9</b> – Expansão do mapa de contorno HSQC da substância <b>IV</b> (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz).....	60
<b>FIGURA 4.10</b> – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (CD <sub>3</sub> OD, 500 MHz) da substância <b>V</b> .	63
<b>FIGURA 4.11</b> – Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (CD <sub>3</sub> OD, 125 MHz) da substância <b>V</b> .....	64
<b>FIGURA 4.12</b> – Mapa de contorno HSQC da substância <b>V</b> (CD <sub>3</sub> OD, 500 MHz).....	65
<b>FIGURA 4.13</b> – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (CD <sub>3</sub> OD, 400 MHz) da substância <b>VI</b> .....	68
<b>FIGURA 4.14</b> – Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (CD <sub>3</sub> OD, 100 MHz) da substância <b>VI</b> .....	69
<b>FIGURA 4.15</b> – Mapa de contorno HSQC da substância <b>VI</b> (CD <sub>3</sub> OD, 400 MHz).....	70
<b>FIGURA 4.16</b> – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (CD <sub>3</sub> OD, 400 MHz) da substância <b>VII</b> .....	73
<b>FIGURA 4.17</b> – Mapa de contorno HSQC da substância <b>VII</b> (CD <sub>3</sub> OD, 400 MHz).....	74
<b>FIGURA 4.18</b> – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (CD <sub>3</sub> OD, 400 MHz) da substância <b>VIII</b> .....	77
<b>FIGURA 4.19</b> – Mapa de contorno HSQC da substância <b>VIII</b> (CD <sub>3</sub> OD, 400 MHz).....	78
<b>FIGURA 4.20</b> – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (CD <sub>3</sub> OD, 400 MHz) da substância <b>IX</b> .....	81
<b>FIGURA 4.21</b> – Cromatograma da substância <b>IX</b> obtido durante análise por CLAE com detecção em 360 nm.....	82
<b>FIGURA 4.22</b> – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz) da substância <b>X</b> ...	85
<b>FIGURA 4.23</b> – Cromatograma da substância <b>X</b> obtido durante análise por CG-EM.....	86
<b>FIGURA 4.24</b> – Espectro de massas da substância <b>X</b> (IE 70 eV).....	86
<b>FIGURA 4.25</b> – Proposta de fragmentação para a substância <b>X</b> .....	87

<b>FIGURA 4.26</b> – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) da substância <b>XI</b> ..	90
<b>FIGURA 4.27</b> – Cromatograma da substância <b>XI</b> obtido durante análise por CG-EM.....	91
<b>FIGURA 4.28</b> – Espectro de massas da substância <b>XI</b> (IE 70 eV).....	91
<b>FIGURA 4.29</b> – Proposta de fragmentação para a substância <b>XI</b> .....	92
<b>FIGURA 4.30</b> – Efeito de diferentes concentrações de ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico e ácido 3,4-diidroxibenzoico no teste de atividade antioxidante com DPPH.....	94
<b>FIGURA 4.31</b> – Gráfico da porcentagem de inibição enzimática do extrato etanólico do caule de <i>E. pubescens</i> .....	96
<b>FIGURA 4.32</b> – Gráfico da porcentagem de inibição enzimática do extrato etanólico das folhas de <i>E. pubescens</i> .....	96

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1.1</b> – Metabólitos secundários isolados de espécies pertencentes à família Malvaceae.....	11
<b>TABELA 3.1</b> – Massa do material vegetal seco, dos extratos e frações obtidas após extração líquido-líquido.....	28
<b>TABELA 3.2</b> – Sistemas de eluentes utilizados no fracionamento do extrato EPC.....	29
<b>TABELA 3.3</b> – Condições cromatográficas utilizadas no fracionamento da fração EPC 2 descritas no FLUXOGRAMA 3.2.....	31
<b>TABELA 3.4</b> – Condições cromatográficas utilizadas no fracionamento da fração EPC 3 descritas no FLUXOGRAMA 3.3.....	33
<b>TABELA 3.5</b> – Sistemas de eluentes utilizadas no fracionamento da fração EPFH.....	34
<b>TABELA 3.6</b> – Condições cromatográficas utilizadas no fracionamento da fração EPFH 2 descritas no FLUXOGRAMA 3.5.....	37
<b>TABELA 4.1</b> – Dados espectroscópicos de RMN de $^1\text{H}$ obtidos para as substâncias I e II.....	45
<b>TABELA 4.2</b> – Dados espectroscópicos de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ obtidos para a substância III.....	48
<b>TABELA 4.3</b> – Correlações observadas no experimento de HSQC para a substância III.....	49
<b>TABELA 4.4</b> – Dados espectroscópicos de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ obtidos para a substância IV.....	55
<b>TABELA 4.5</b> – Correlações observadas no experimento de HSQC para a substância IV.....	56
<b>TABELA 4.6</b> – Dados espectroscópicos de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ obtidos para a substância V.....	62
<b>TABELA 4.7</b> – Correlações observadas no experimento de HSQC para a substância V.....	62
<b>TABELA 4.8</b> – Dados espectroscópicos de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ obtidos para a substância VI.....	67

<b>TABELA 4.9</b> – Correlações observadas no experimento de HSQC para a substância <b>VI</b> .....	67
<b>TABELA 4.10</b> – Dados espectroscópicos de RMN de <sup>1</sup> H obtidos para a substância <b>VII</b> .....	72
<b>TABELA 4.11</b> – Correlações observadas no experimento de HSQC para a substância <b>VII</b> .....	72
<b>TABELA 4.12</b> – Dados espectroscópicos de RMN de <sup>1</sup> H obtidos para a substância <b>VIII</b> .....	76
<b>TABELA 4.13</b> – Correlações observadas no experimento de HSQC para a substância <b>VIII</b> .....	76
<b>TABELA 4.14</b> – Dados espectroscópicos de RMN de <sup>1</sup> H obtidos para a substância <b>IX</b> .....	80
<b>TABELA 4.15</b> – Dados espectroscópicos de RMN de <sup>1</sup> H obtidos para a substância <b>X</b> .....	84
<b>TABELA 4.16</b> – Dados espectroscópicos de RMN de <sup>1</sup> H obtidos para a substância <b>XI</b> .....	89
<b>TABELA 4.17</b> – Valores de EC <sub>50</sub> para ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico, ácido 3,4-diidroxibenzoico e para o controle positivo quercetina. ....	93
<b>TABELA 4.18</b> – Porcentagem de inibição enzimática das frações de <i>E. pubescens</i> .....	97

**LISTA DE FLUXOGRAMAS**

<b>FLUXOGRAMA 3.1</b> – Fracionamento cromatográfico do extrato etanólico do caule (EPC).....	28
<b>FLUXOGRAMA 3.2</b> – Fracionamento da fração EPC 2.....	30
<b>FLUXOGRAMA 3.3</b> – Fracionamento da fração EPC 3.....	32
<b>FLUXOGRAMA 3.4</b> – Fracionamento da fração EPFH.....	34
<b>FLUXOGRAMA 3.5</b> – Fracionamento da fração EPFH 2.....	36

## LISTA DE ABREVIATURAS/SÍMBOLOS/SIGLAS

$\delta$	deslocamento químico
$\delta_C$	deslocamento químico de carbono
$\delta_H$	deslocamento químico de hidrogênio
$\mu\text{g}$	micrograma
$\mu\text{L}$	microlitro
$\mu\text{M}$	micromolar
a.C	antes de Cristo
AcOEt	acetato de etila
CC	cromatografia de adsorção em coluna aberta
CCD	cromatografia em camada delgada
CE	cromatografia de exclusão em coluna aberta
CG-EM	cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
<i>d</i>	dubleto
DAD	detector de arranjo de diodos
<i>dd</i>	duplo dubleto
<i>ddd</i>	duplo duplo dubleto
Dic	diclorometano
<i>dl</i>	dubleto largo
DMSO	dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
<i>dt</i>	duplo tripleto
DTE	ditioeritreitol
E-64	L-3-carboxi- <i>trans</i> -2,3-epoxipropionil-leucilamido(4-guanino)butano
EC <sub>50</sub>	concentração mínima necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do DPPH
eV	elétrons-volt
F.E.	fase estacionária
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
g	gramas
h	altura
Hex	hexano
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
Hz	Hertz
IE	impacto eletrônico
<i>J</i>	constante de acoplamento

<i>m</i>	múltiplo
<i>m/z</i>	razão massa/carga
MeOH	metanol
mg	miligrama
MHz	Mega-Hertz
mL	mililitro
mM	milimolar
NCE	<i>New Chemical Entity</i>
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
nm	nanômetro
nM	nanomolar
ppm	partes por milhão
<i>R<sub>f</sub></i>	fator de retenção
RMN	ressonância magnética nuclear
RMN de <sup>13</sup> C	ressonância magnética nuclear de carbono
RMN de <sup>1</sup> H	ressonância magnética nuclear de hidrogênio
<i>s</i>	singleto
<i>s/</i>	singleto largo
<i>t</i>	tripleto
UV	ultravioleta
UV-vis	ultravioleta-visível
Z-FR-MCA	carbobenzoxi-fenilalanina-arginina-7-amino-4-metilcumarina
$\lambda_{em}$	comprimento de onda de emissão
$\lambda_{ex}$	comprimento de onda de excitação
$\phi$	diâmetro

## SUMÁRIO

<b>1 – INTRODUÇÃO</b> .....	01
1.1 – OS PRODUTOS NATURAIS E O DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS....	01
1.2 – A RIQUEZA DA FLORA BRASILEIRA E O BIOMA CERRADO.....	06
1.3 – A FAMÍLIA MALVACEAE .....	09
1.4 – O GÊNERO <i>Eriotheca</i> .....	14
1.5 – A ESPÉCIE <i>Eriotheca pubescens</i> .....	15
1.6 – ENSAIO ANTIOXIDANTE .....	16
1.7 – ENSAIO ENZIMÁTICO.....	19
<b>2 – OBJETIVOS</b> .....	23
2.1 – OBJETIVO GERAL.....	23
2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	23
<b>3 – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL</b> .....	24
3.1 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
3.1.1 – Reagentes.....	24
3.1.2 – Solventes.....	25
3.1.3 – Fases Estacionárias .....	25
3.1.4 – Equipamentos .....	25
3.2 – METODOLOGIA.....	27
3.2.1 – Coleta do material vegetal.....	27
3.2.2 – Obtenção dos extratos etanólicos de <i>E. pubescens</i> e extração líquido-líquido.....	27
3.2.3 – Fracionamento cromatográfico do extrato etanólico do caule de <i>E. pubescens</i> (EPC) .....	28
3.2.4 – Fracionamento Cromatográfico da fração EPFH.....	34
3.2.5 – Metodologia do Ensaio Antioxidante .....	38
3.2.6 – Metodologia dos Ensaio Enzimáticos .....	39

<b>4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	41
4.1 – SUBSTÂNCIAS ISOLADAS .....	41
4.2 – IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBTÂNCIAS ISOLADAS DE <i>E. pubescens</i> .....	44
4.2.1 – Identificação estrutural das substâncias <b>I</b> e <b>II</b> .....	44
4.2.2 – Identificação estrutural da substância <b>III</b> .....	47
4.2.3 – Identificação estrutural da substância <b>IV</b> .....	54
4.2.4 – Identificação estrutural da substância <b>V</b> .....	61
4.2.5 – Identificação estrutural da substância <b>VI</b> .....	66
4.2.6 – Identificação estrutural da substância <b>VII</b> .....	71
4.2.7 – Identificação estrutural da substância <b>VIII</b> .....	75
4.2.8 – Identificação estrutural da substância <b>IX</b> .....	79
4.2.9 – Identificação estrutural da substância <b>X</b> .....	82
4.2.10 – Identificação estrutural da substância <b>XI</b> .....	87
4.3 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE CAPTURA DOS RADICAIS LIVRES COM DPPH .....	93
4.4 – ATIVIDADE ENZIMÁTICA FRENTE ÀS CATEPSINAS K, L e V .....	95
<b>5 – CONCLUSÕES</b> .....	98
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	99

## 1 – INTRODUÇÃO

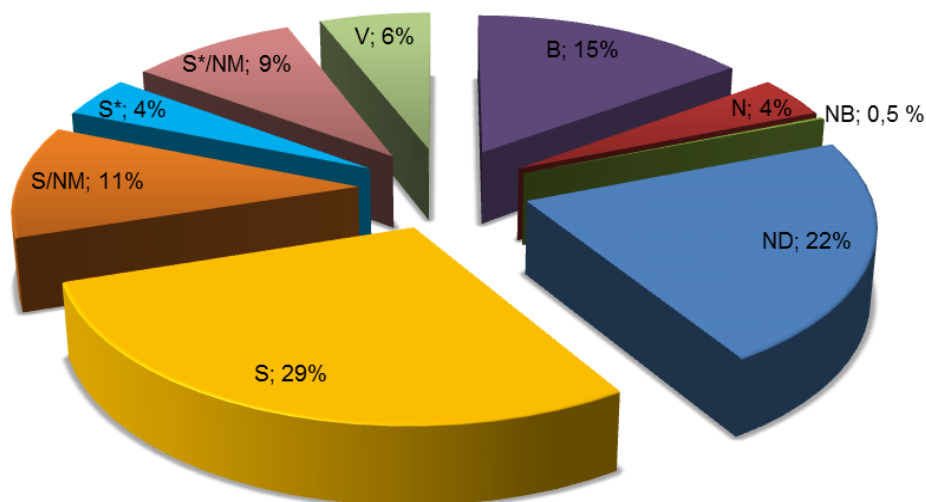
### 1.1 – OS PRODUTOS NATURAIS E O DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS

Ao longo dos séculos, os seres humanos têm contado com a natureza para produção de alimentos, roupas, fertilizantes, aromas e fragrâncias, medicamentos, entre outros. As plantas constituíram a base da medicina tradicional, uma vez que existem há milhares de anos e continuam a proporcionar a humanidade novas fontes de medicamentos. A terapia com plantas medicinais é baseada nos resultados empíricos de centenas e milhares de anos. Os primeiros registros, escritos em tábuas de argila com escrita cuneiforme, são da Mesopotâmia e datam de cerca de 2600 a.C. (GURIB-FAKIM, 2006).

Apesar da ampla utilização de plantas medicinais pela população mundial, a identidade específica dos produtos químicos que possuíam efeitos terapêuticos desejados permaneceu praticamente desconhecida até os séculos XVIII e XIX. A química moderna deu início a uma nova era para o estudo e uso de produtos naturais. A química analítica e estrutural forneceu ferramentas para purificar vários compostos e para determinar suas estruturas, o que por sua vez, forneceu informações sobre a ação destes compostos no corpo humano. Em 1805, o farmacêutico alemão Friedrich Wilhelm Sertürner (1783-1841) isolou do ópio a morfina, que tornou-se o primeiro medicamento puro de origem natural e foi comercializado pela Merck em 1826. Assim, a elucidação estrutural de diversos produtos químicos naturais permitiu sua síntese, em substituição ao isolamento a partir de fontes naturais, diminuindo significativamente o custo de produção do medicamento (JI, LI, ZHANG, 2009).

Os produtos naturais têm sido utilizados como fonte e inspiração para uma grande fração da farmacopeia atual. Embora as estimativas sejam variáveis, dependendo da definição do que é considerado um fármaco derivado de produto natural, entre 25% e 50% dos medicamentos comercializados atualmente são originários de produtos naturais (KINGSTON, 2011). Segundo NEWMAN & CRAGG (2012) dos 1355 fármacos aprovados em todo mundo (até dezembro de 2010), mais de 50% são derivados direta ou indiretamente de produtos naturais (Figura 1.1, p. 02) e se considerados apenas os agentes anticancerígenos o percentual sobe para mais de 60%.

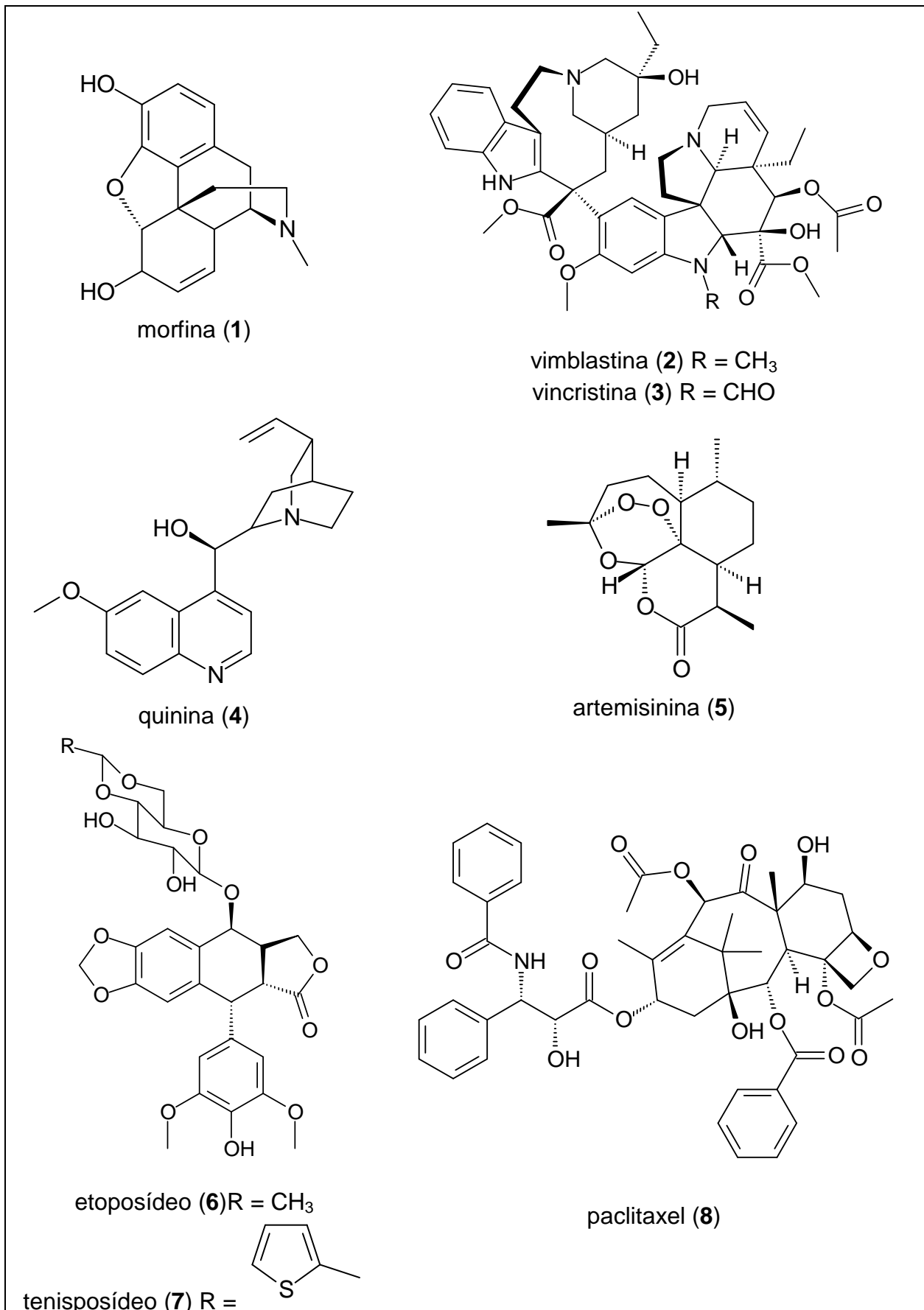
**FIGURA 1.1 – Fontes de drogas aprovadas até 2010.**



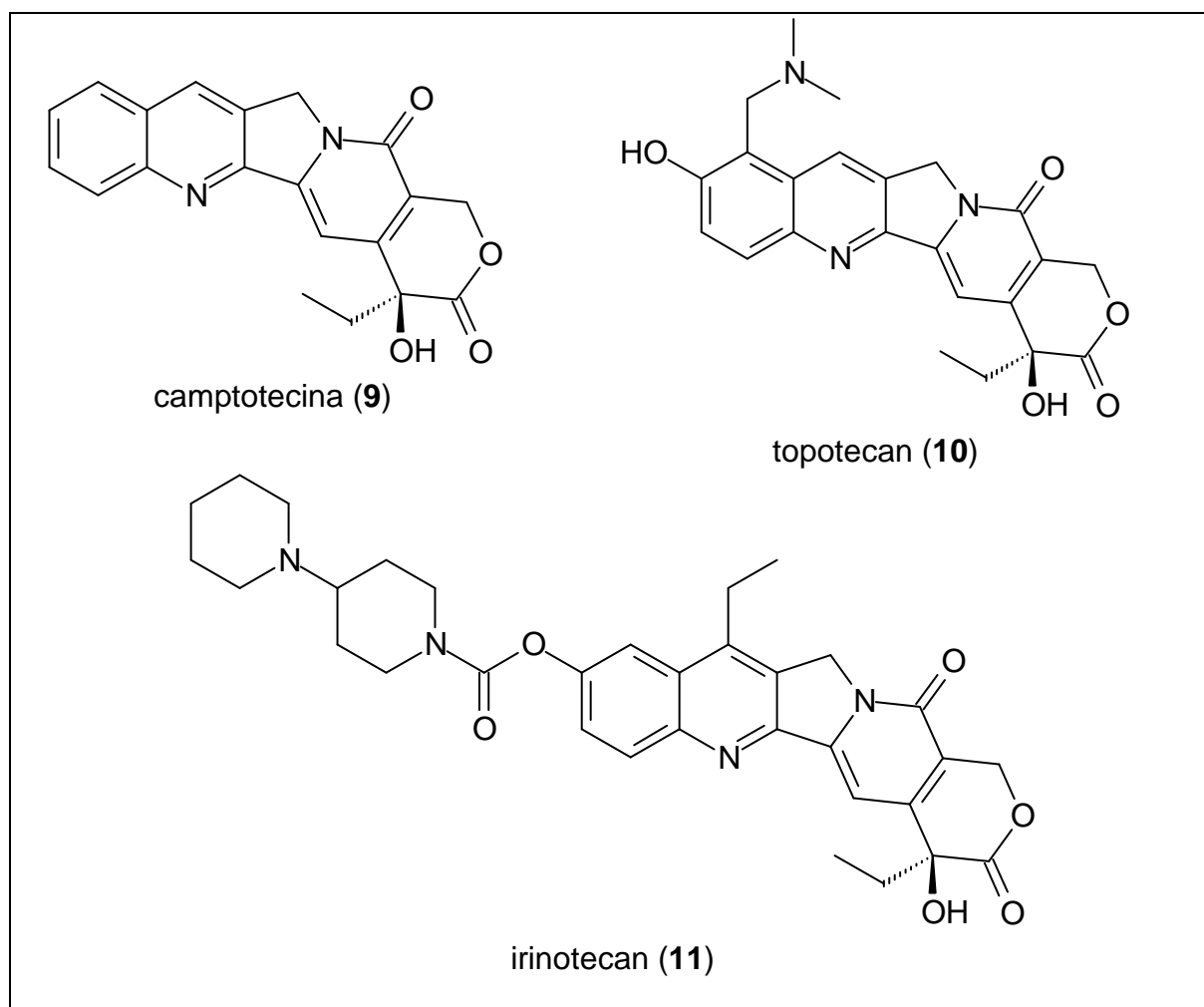
B: agente biológico; N: produto natural; NB: produto natural “botânico”; ND: derivado de produto natural; S: totalmente sintético; S/NM: sintético que imita produto natural; S\*: síntese total, mas o farmacóforo é derivado de produto natural; S\*/NM: síntese total, mas o farmacóforo imita produto natural; V: vacina.

Diversos fármacos clinicamente utilizados são derivados de produtos naturais provenientes de plantas, dentre eles destaca-se a morfina (1), vimblastina (2), vincristina (3), quinina (4), artemisinina (5), etoposídeo (6), teniposídeo (7), paclitaxel (8), e os derivados de camptotecina (9), topotecano (10) e irinotecano (11) (Figura 1.2, p. 03 e 04). Fármacos de origem marinha também estão contribuindo cada vez mais, como o Yondelis<sup>®</sup> (trabectedina) um exemplo de um anticancerígeno de origem marinha (KINGSTON, 2011).

**FIGURA 1.2** – Fármacos derivados de plantas usados na terapia do câncer.



**FIGURA 1.2** – Fármacos derivados de plantas usados na terapia do câncer (continuação).



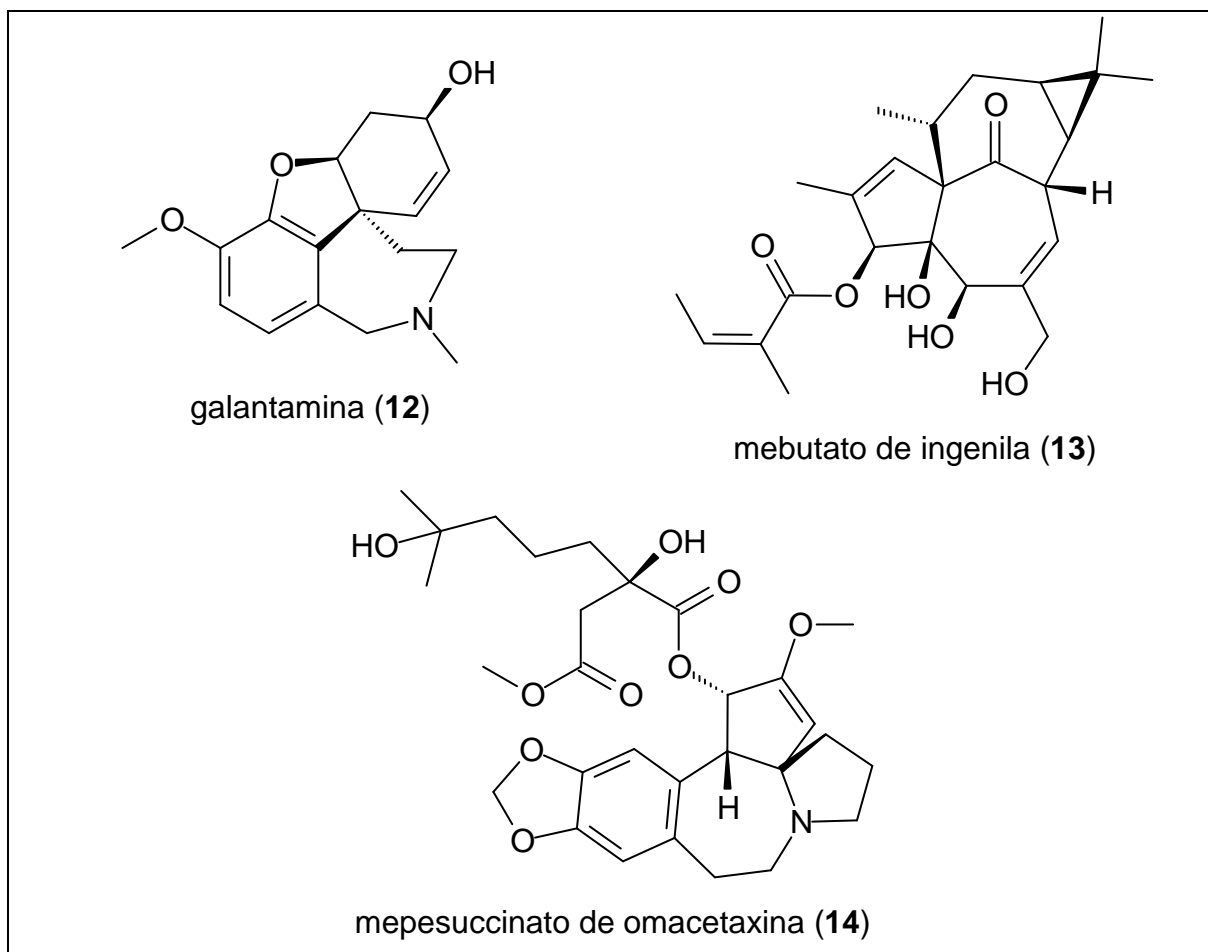
O interesse na natureza como uma fonte de potenciais agentes quimioterapêuticos continua a existir. Um total de 38 medicamentos baseados em produtos naturais foram aprovados e lançados no mercado durante o período de 2000-2010. Um exemplo é galantamina (**12**) (Figura 1.3, p. 05), princípio ativo presente no medicamento Reminyl<sup>®</sup> (2002) utilizado para o tratamento da doença de Alzheimer e várias outras deficiências de memória. Galantamina é um alcaloide obtido a partir da planta *Galanthus nivalis* (Amaryllidaceae) que tem sido usada tradicionalmente na Bulgária e Turquia para tratamento de doenças neurológicas (BRAHMACHARI, 2011).

Segundo BUTLER, ROBERTSON, COOPER (2014), de janeiro de 2008 a dezembro de 2013 um total de 25 medicamentos derivados de produtos naturais foram aprovados para comercialização pela FDA (*Food Drug*

*Administration*). Dentre estes o Picato<sup>®</sup> (2012), mebutato de ingenila (**13**) (Figura 1.3), foi aprovado para tratamento tópico de ceratose actínica, uma lesão pré-maligna que pode se transformar em câncer de pele. Mebutato de ingenol foi isolado pela primeira vez em 1980 a partir da planta egípcia *Euphorbia paralias* (Euphorbiaceae) e mais tarde foi identificado como um dos princípios ativos do *E. peplus* (Euphorbiaceae), utilizada como remédio caseiro na Austrália para o tratamento de câncer de pele e ceratoses solares.

Synribo<sup>®</sup> (2012), mepesuccinato de omacetaxina (**14**) (Figura 1.3), foi aprovado para o tratamento de leucemia mieloide crônica e também está sendo avaliado para o tratamento de tumores sólidos e para a leucemia mieloide aguda. Mepesuccinato de omacetaxina foi isolado a partir das folhas de *Cephalotaxus harringtonia* (Cephalotaxaceae) que é utilizada na China desde 1970 para o tratamento de leucemia mieloide aguda (BUTLER, ROBERTSON, COOPER, 2014).

**FIGURA 1.3** – Fármacos derivados de plantas aprovados de 2000-2013.



A química de produtos naturais tem aplicação em diversas áreas, dentre elas produtos farmacêuticos, agrotóxicos, cosméticos, nutracêuticos, entre outros (MCCHESENEY, VENKATARAMAN, HENRI, 2007). O desenvolvimento de um novo fármaco é um processo complexo, demorado e dispendioso, sendo necessário aproximadamente 12 anos desde a descoberta de um novo medicamento até seu uso clínico. Essencialmente, a descoberta de novos fármacos envolve a identificação de novas entidades químicas (NCE – *New Chemical Entity*), podendo estas serem obtidas através de síntese química ou do isolamento de produtos naturais. Em geral, existem seis classes de fontes para NCEs, sendo estas fontes botânicas, marinhas, fungos e bactérias. Além dessas quatro classes, a química moderna acrescentou duas categorias de substâncias artificiais: a química sintética e a química combinatória (HARVEY, 2008; KATIYAR et al., 2012).

A importância dos produtos naturais no desenvolvimento de medicamentos está centrada na complexidade e diversidade molecular que estes apresentam. No entanto, a diversidade estrutural 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 seletivas baseadas em mecanismos de ação específicos (CRAGG & NEWMAN, 2013).

## 1.2 – A RIQUEZA DA FLORA BRASILEIRA E O BIOMA CERRADO

O Brasil é um país com área colossal que possui diversos tipos de solo e uma grande variedade de climas fornecendo condições únicas de pressão seletiva às adaptações da vida. Neste ambiente de intensa competição as plantas, vivendo sob estresse, desenvolvem mecanismos químicos para adaptação. Entre os mecanismos de defesa química está a síntese de moléculas antivirais, antifúngicas e inseticidas. A extraordinária diversidade química encontrada em espécies tropicais transforma os biomas brasileiros em reservatórios potenciais de novos princípios ativos (QUEIROZ, FARO, MELO, 2009).

Dentre os biomas brasileiros, encontra-se o Cerrado que é fonte de moléculas químicas com grande potencial medicamentoso e está localizado

principalmente no Planalto Central do Brasil. Este bioma ocupa 24% do território nacional, aproximadamente 2 milhões de km<sup>2</sup>, sendo a segunda maior formação vegetal brasileira depois da Amazônia, e é também considerado a savana tropical mais rica do mundo em biodiversidade. No Cerrado concentra-se um terço da biodiversidade nacional e 5% da flora e da fauna mundiais (EMBRAPA, 2007; ESPINDOLA-DARVENE, 2007). No entanto, mesmo com rica biodiversidade, o Cerrado teve sua cobertura vegetal original reduzida em cerca de 50% até 2010 (MMA/IBAMA, 2011).

A área contínua do Cerrado incide sobre os estados de Goiás, Tocantins, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Bahia, Maranhão, Piauí, Rondônia, Paraná, São Paulo e Distrito Federal (Figura 1.4). Além disso, existem encraves de vegetação de Cerrado em outros domínios de vegetação, no estado de Roraima, Amapá, Amazonas (Campos de Humaitá), Rondônia (Serra dos Pacaás Novos), Pará (Serra do Cachimbo), Bahia (Chapada Diamantina) e no o sul do estado de São Paulo e Paraná (MEDEIROS, 2011; MMA, 2015).

**FIGURA 1.4 – Localização do Cerrado no Brasil.**



Fonte: CERRATINGA, 2014

O Cerrado abriga mais de 11.000 espécies vegetais, das quais 4.400 são endêmicas, além de uma grande variedade de vertebrados terrestres e aquáticos e elevado número de invertebrados. A típica vegetação do Cerrado

se caracteriza pelos troncos tortuosos, baixo porte, ramos retorcidos, cascas espessas e folhas grossas. É importante ressaltar que a vegetação não apresenta essa característica em decorrência da escassez de água, já que o Cerrado abriga densa rede hídrica, mas devido principalmente ao desequilíbrio no teor de micronutrientes do solo (MEDEIROS, 2011).

As condições ambientais do Cerrado, que sofre seis meses ou mais de seca com solo pobre em nutrientes e rico em alumínio, estimulam a produção dos metabólitos secundários elevando assim sua diversidade química. Considerando essa riqueza química é que se buscam novas opções terapêuticas que possam permitir chegar a medicamentos inovadores para tratar uma diversidade de patologias, tais como: doenças infecciosas, câncer, auxiliar no tratamento do *diabetes mellitus* e da obesidade, dentre outras (ESPINDOLA-DARVENE, 2007).

Além dos aspectos ambientais, o Cerrado tem grande importância social, sendo mais de 200 espécies usadas na medicina popular e mais de 400 utilizadas na recuperação de solos degradados. Além disso, diversos tipos de frutos comestíveis são regularmente consumidos pela população local, tais como os frutos do pequi (*Caryocar brasiliense*), buriti (*Mauritia flexuosa*), mangaba (*Hancornia speciosa*), cagaita (*Eugenia dysenterica*), bacupari (*Salacia crassifolia*), cajuzinho do cerrado (*Anacardium humile*), araticum (*Annona crassifolia*) e as sementes do barú (*Dipteryx alata*). Contudo, inúmeras espécies de plantas e animais correm risco de extinção (MMA, 2015).

O Cerrado é uma das 25 áreas do mundo consideradas críticas para a conservação, devido à riqueza biológica e à alta pressão antrópica a qual vem sendo submetido. Devido a esta excepcional riqueza biológica, o Cerrado, ao lado da Mata Atlântica, é considerado um dos *hotspots* mundiais, isto é, um dos biomas mais ricos e ameaçados do Planeta. A extensa transformação antrópica do Cerrado tem resultado em grandes perdas de biodiversidade (MMA, 2002). Apesar do reconhecimento de sua importância biológica, de todos os *hotspots* mundiais, o Cerrado é o que possui a menor porcentagem de áreas sobre proteção integral, tendo somente 8,21% de seu território legalmente protegido por unidades de conservação (MMA, 2015).

### 1.3 – A FAMÍLIA MALVACEAE

Na diversidade de espécies da flora do Cerrado encontram-se espécies da família Malvaceae que possui aproximadamente 250 gêneros e 4.200 espécies, sendo abundante na região tropical da América do Sul. No Brasil ocorrem cerca de 80 gêneros e 400 espécies (CARVALHO & GAIAD, 2014; STEVENS, 2012). Espécies pertencentes à família Malvaceae são conhecidas por serem importantes fontes de fibras naturais, fornecendo plantas com finalidade têxtil, tendo destaque o algodão obtido de diferentes espécies do gênero *Gossypium*. Além disso, espécies desta família também são fontes de alimentos, bebidas, madeira, e são também utilizadas na medicina popular e na horticultura (HINSLEY, 2008).

Produtos naturais extraídos de plantas que pertencem à família Malvaceae são utilizados no tratamento de muitas doenças, entre elas picadas de cobra, asma, distúrbios gastrointestinais e reumatismo, como diurético, entre outros (GOMES et al., 2011; MAGANHA et al., 2010). Estudo químico realizado com espécies pertencentes a esta família descreve o isolamento de ácidos graxos, óleos essenciais, sesquiterpenoides do tipo cadineno (para as quais tem sido atribuída atividade inseticida), lactonas sesquiterpênicas, triterpenoides, flavonoides, entre outros compostos (Tabela 1.1, p. 11 e Figura 1.5, p. 12 e 13) (COSTA et al., 2009).

OLIVEIRA et al. (2012) realizaram estudo de atividade antioxidante e determinação do teor de compostos fenólicos presentes na fração acetato de etila proveniente de extração líquido-líquido de extrato etanólico de quatro espécies de plantas da família Malvaceae (*Sidastrum micranthum*, *Wissadula periplocifolia*, *Sida rhombifolia* e *Herissantia crispa*). Os resultados obtidos demonstraram que espécies desta família possuem alto teor de compostos fenólicos e boa atividade antioxidante e conseqüentemente podem ser utilizadas no tratamento de doenças relacionadas ao aumento na produção de radicais livres.

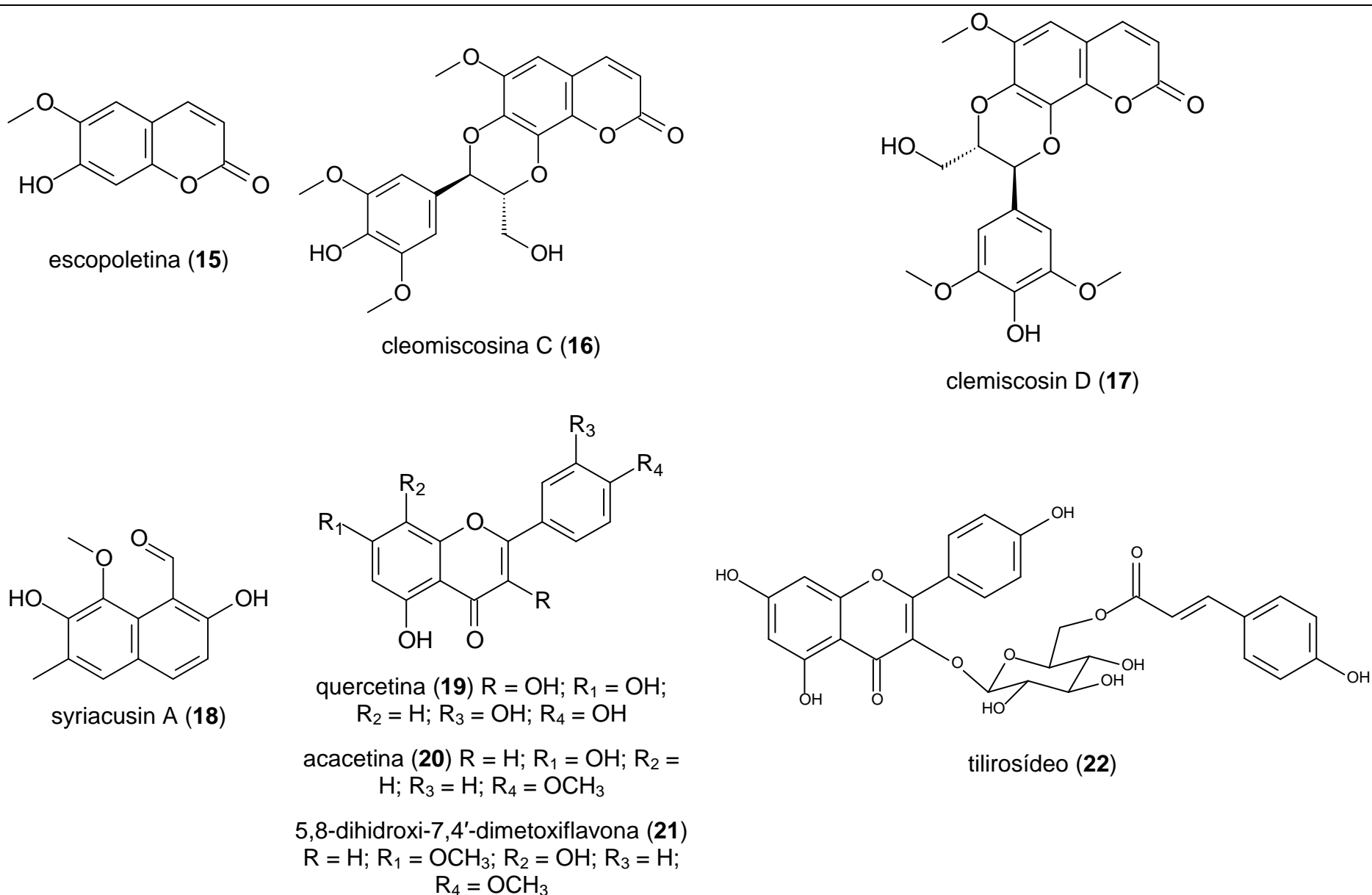
PIEME et al. (2010) realizaram estudo de atividades antiproliferativa e antioxidante com extrato metanólico de cinco espécies de plantas medicinais da família Malvaceae, sendo os testes realizados *in vitro* em células de hepatoma humano (HepG-2). Os resultados obtidos demonstraram

que os extratos de duas espécies, *Sida acuta* e *Urena lobata*, apresentaram atividades antiproliferativa e antioxidante significativas. Estes potenciais efeitos encontrados podem ser atribuídos a compostos presentes nos extratos de *S. acuta* e *U. lobata*, tais como os flavonoides kaempferol e quercetina.

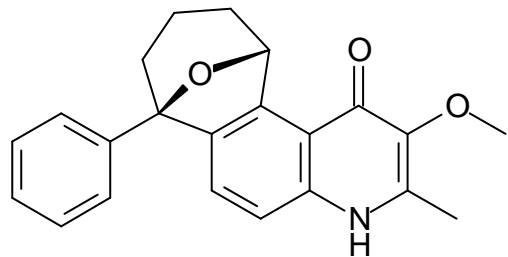
**TABELA 1.1** – Metabólitos secundários isolados de espécies pertencentes à família Malvaceae.

<b>Espécie</b>	<b>Nome popular</b>	<b>Metabólitos secundários</b>	<b>Uso terapêutico</b>	<b>Atividade Biológica</b>	<b>Referência</b>
<i>Hibiscus syriacus</i>	rosa de sharon	escopoletina (15) cleomiscosina C (16) cleomiscosina D (17) syriacusin A (18)	antipirético, anti-helmíntico, e antifúngica	antioxidante	(MAGANHA et al., 2010)
<i>Sidastrum micranthum</i>	malva preta	quercetina (19) acacetina (20) 5,8-dihidroxi-7,4'-dimetoxiflavona (21) tilirosídeo (22)	bronquite, tosse e asma	-	(GOMES et al., 2011)
<i>Melochia umbellata</i>	-	walteriona C (23) cleomiscosina A (24)	hepatite, hipercolesterolemia, diabetes e hipertensão	anti-HIV, antileucêmica	(ERWIN et al., 2014)
<i>Sida rhombifolia</i>	guanxuma	sitosterol (25) estigmasterol (26) sitosterol-3-O-β-D-glucopiranosídeo (27) estigmasterol-3-O-β-D-glucopiranosídeo (28) criptolepinona (29) criptolepina (30)	hipertensão, diabetes e gota	vasorelaxante	(CHAVES et al., 2013)

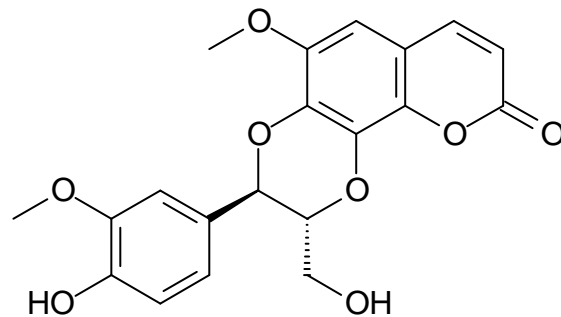
**FIGURA 1.5** – Estruturas de alguns produtos naturais isolados de espécies da família Malvaceae.



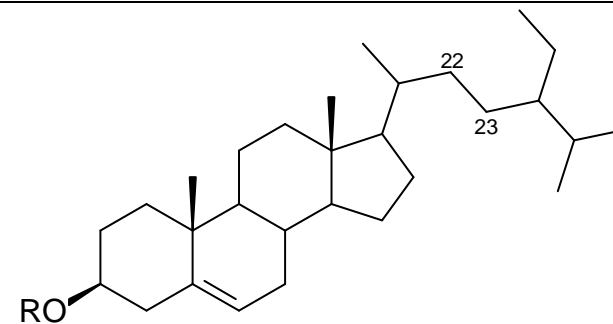
**FIGURA 1.5** – Estruturas de alguns produtos naturais isolados de espécies da família Malvaceae (continuação).



walteriona C (**23**)



cleomiscosina A (**24**)



sitosterol (**25**) R = H

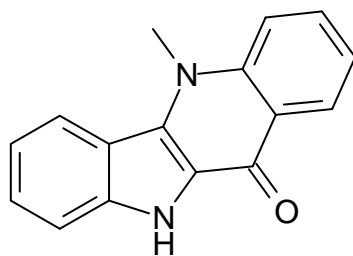
estigmasterol (**26**) R = H e  $\Delta^{22-23}$

sitosterol-3-O- $\beta$ -D-glucopiranosídeo (**27**)

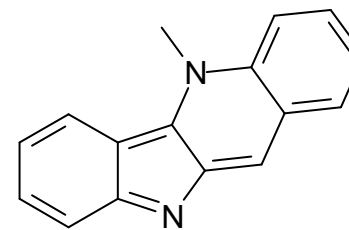
R = glucose

estigmasterol-3-O- $\beta$ -D-glucopiranosídeo (**28**) R =

glucose e  $\Delta^{22-23}$



criptolepinona (**29**)



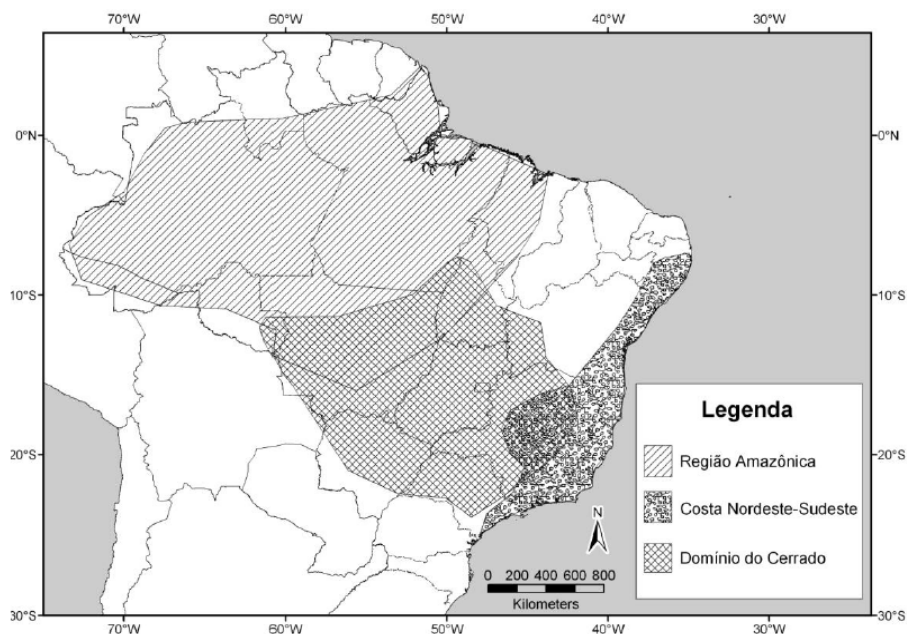
criptolepina (**30**)

#### 1.4 – O GÊNERO *Eriotheca*

*Eriotheca* Schott & Endl é um gênero de árvores neotropicais da família Malvaceae, com centro de diversidade na floresta tropical amazônica, e com duas espécies comuns no Cerrado, *Eriotheca pubescens* e *Eriotheca gracilipes* (MARINHO et al., 2013; OLIVEIRA et al., 1992).

O gênero *Eriotheca* compreende 24 espécies distribuídas na América do Sul, sendo no Brasil representado por 16 espécies distribuídas da região norte até o estado de São Paulo. Esse gênero ocorre na Mata Atlântica, na floresta Amazônica e no Cerrado (Figura 1.6) (DUARTE & ESTEVES, 2012). Das 16 espécies de *Eriotheca* ocorrentes no Brasil, 7 espécies possuem distribuição extra brasileira. As demais espécies ocorrem exclusivamente no Brasil, e dentre estas, somente *E. candolleana* e *E. macrophylla* estão amplamente distribuídas no país, ocorrendo em vários estados, enquanto as outras espécies têm distribuição restrita (em poucos estados) ou muito restrita (poucas localidades de um estado) (DUARTE, 2010).

**FIGURA 1.6** – Mapa da área de concentração de espécies de *Eriotheca* no Brasil.



Fonte: DUARTE, 2010

## 1.5 – A ESPÉCIE *Eriotheca pubescens*

A espécie *Eriotheca pubescens* (Mart. Ex. Zucc.) Schott & Endler., de nomes populares paineira do cerrado (DF) ou colher de vaqueiro (SP) (Figura 1.7), pertence à família Malvaceae e ocorre em áreas do cerrado sentido restrito, cerradão e nas bordas das matas de galeria, sendo uma espécie nativa e não endêmica do Brasil (BARBOSA, 2008).

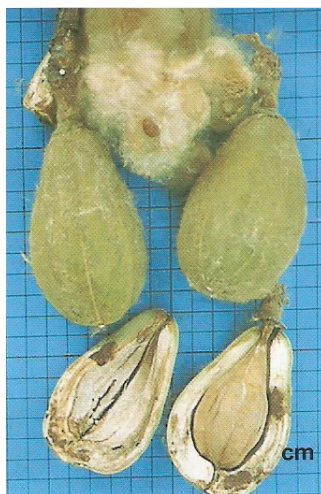
**FIGURA 1.7 – A)** Foto de *E. pubescens*; **B)** Flores e folhas e **C)** Frutos.



**(A)**



**(B)**



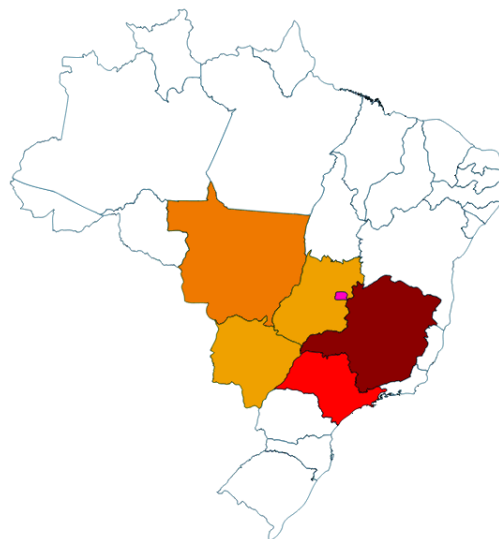
**(C)**

Fonte: LORENZI, 2002

*E. pubescens* está presente nas regiões Centro-Oeste e Sudeste, nos estados de Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, São Paulo e no Distrito Federal (Figura 1.8). É caracterizada como árvore melífera, semidecídua que possui período de floração de julho a setembro e suas flores hermafroditas são polinizadas por abelhas. Possui período de frutificação de agosto a novembro e os frutos produzem uma paina usada para confecção de tecidos e preenchimento de travesseiros (JBRJ, 2015; LORENZI, 2002).

As árvores desta espécie podem atingir de 6 a 10 metros de altura, possuindo tronco retilíneo a tortuoso com 20-30 cm de diâmetro e ramos espessos (DUARTE, 2010). A madeira é leve e pouco durável, tem uso regional, sendo considerada de boa qualidade para a produção de papel. Possui potencial para o paisagismo, pela floração e folhagem, e é utilizada para a recuperação de áreas degradadas, por atrair aves e outros animais que se alimentam de suas sementes (SILVA JÚNIOR, 2006).

**FIGURA 1.8** – Mapa de distribuição geográfica de *E. pubescens* no Brasil.



Fonte: JBRJ, 2015

## 1.6 – ENSAIO ANTIOXIDANTE

A origem de antioxidantes remonta à antiguidade. Os antigos egípcios demonstraram um conhecimento técnico notável, preservando cadáveres com plantas cujos extratos são ricos em compostos fenólicos. Por volta de 1940, as reações de oxidação de radicais livres foram elucidadas e

vários antioxidantes foram identificados. No final dos anos 1950, foi demonstrado que as reações de oxidação estão envolvidas no envelhecimento e na progressão de várias doenças e foi proposto que as moléculas antioxidantes podem retardar o processo de envelhecimento, a progressão de doenças e prolongar o tempo de vida (NDHLALA, MOYO, VAN STADEN, 2010).

Os radicais livres são conhecidos também por participarem da peroxidação lipídica em alimentos, a qual é responsável por odores e sabores rançosos, que diminuem a qualidade nutricional. Os antioxidantes sintéticos tais como 2-*terc*-butil-4-hidroxianisol (BHA), 2,6-di-*terc*-butil-4-hidroxitolueno (BHT) e *terc*-butil-hidroquinona (TBHQ) são amplamente utilizados na indústria alimentar como potenciais inibidores da peroxidação lipídica. No entanto, o BHA e BHT podem acumular-se no corpo e resultar em danos no fígado e carcinogênese. O interesse em fontes naturais de moléculas antioxidantes para uso em alimentos, bebidas e cosméticos resultou em crescente número de investigação nos últimos anos. É bem conhecido que os antioxidantes naturais extraídos de ervas e especiarias têm uma elevada atividade antioxidante e são usados em muitas aplicações alimentares (SCHERER & GODOY, 2009).

O uso de plantas como alimentos e remédios medicinais desde tempos antigos é parcialmente atribuída à eficaz atividade antioxidante de metabólitos secundários, tais como os compostos fenólicos, as vitaminas C e E, e os carotenoides (NDHLALA, MOYO, VAN STADEN, 2010). Os compostos fenólicos estão presentes em diversas classes de vegetais e são metabólitos secundários caracterizados por um anel aromático e um ou mais grupos hidroxila, possuindo a capacidade de sequestrar os radicais livres por transferência de um elétron (DAI & MUMPER, 2010; SCHERER & GODOY, 2009).

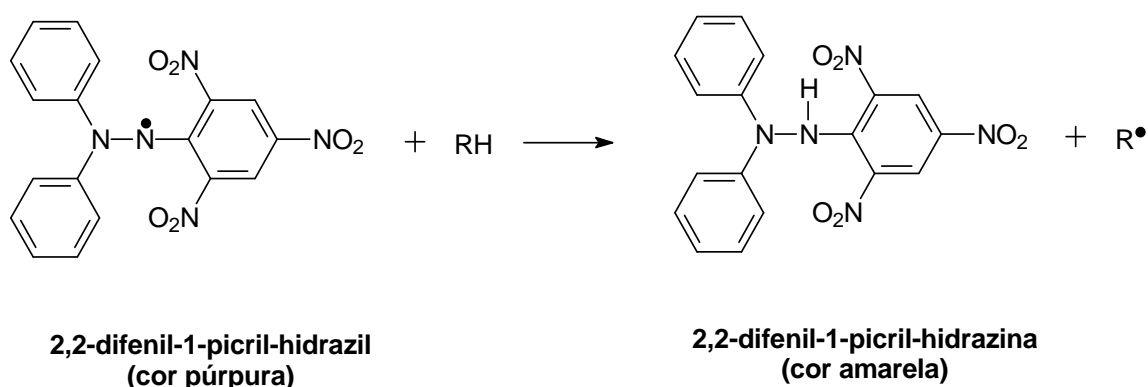
Os compostos fenólicos possuem estrutura química ideal para atuarem como redutores de radicais livres, por possuírem: (1) grupos hidroxila fenólicos que são propensos a doar um radical hidrogênio ou um elétron para um radical livre; (2) sistema aromático conjugado que permite a deslocalização de um elétron não emparelhado (DAI & MUMPER, 2010).

Existem vários métodos para a avaliação de eficiência antioxidante de compostos puros e extratos vegetais, tais como Capacidade de

Absorção dos Radicais de Oxigênio - *ORAC* (*oxygen radical absorbance capacity*), Poder Antioxidante Redutor do Ferro - *FRAP* (*ferric reducing antioxidante power*), Capacidade Antioxidante Redutora do Cobre - *CUPRAC* (*cupric reducing antioxidant capacity*), o ensaio com cátion radicalar 2,2-azino-bis(3-etil-benzotiazolona-6-sulfonato) (*ABTS<sup>+</sup>*) e o ensaio com o radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (*DPPH<sup>•</sup>*). Os ensaios mais comuns são aqueles que envolvem os compostos cromogênicos de natureza radicalar, que desaparecem na presença de um antioxidante. Esta reação pode ser facilmente monitorada por detecção espectrofotométrica comum (PYRZYNSKA & PEKAL, 2013).

O método de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) é um dos métodos mais populares e frequentemente utilizados para testar a capacidade de compostos atuarem como captadores de radicais livres ou doadores de hidrogênio. O radical DPPH<sup>•</sup> é um composto orgânico estável com nitrogênio radicalar e cor púrpura. Encontra-se disponível comercialmente, não necessitando ser gerado antes do ensaio como em outros ensaios de eliminação. Quando uma solução de DPPH<sup>•</sup> radical é misturada com um composto antioxidante/redutor, sua cor muda de púrpura para amarelo da hidrazina correspondente (Figura 1.9). A capacidade de reduzir antioxidantes frente ao DPPH<sup>•</sup> pode ser avaliada pela observação da diminuição de sua absorbância a 517 nm, uma vez que a hidrazina formada (DPPH<sub>2</sub>) produz uma solução amarela (PYRZYNSKA & PEKAL, 2013).

**FIGURA 1.9** – Estrutura química do radical DPPH<sup>•</sup> e sua reação com um antioxidante indicado por RH.



Fonte: PYRZYNSKA & PEKAL, 2013

## 1.7 – ENSAIO ENZIMÁTICO

As proteases são um grande grupo de enzimas que catalisam a clivagem de ligações peptídicas em proteínas (LANKELMA et al., 2010) e nos seres humanos, representam mais de 10% de todas as enzimas conhecidas. Com 11 membros, as cisteíno proteases são semelhantes à papaína (*papain-like*) e são responsáveis por apenas uma pequena fração do total de proteases humanas (NOVINEC & LENARČIČ, 2013).

O interesse no estudo envolvendo proteases está aumentando devido a uma melhor compreensão de seu papel em vários processos fisiológicos e patológicos. Um desequilíbrio na regulação da atividade proteolítica pode levar a uma ampla gama de doenças humanas, incluindo câncer, artrite reumatoide, osteoartrite, osteoporose, periodontite, aterosclerose, transtornos neurológicos, dentre outros. Além disso, mutações nos genes de catepsinas podem resultar em doenças hereditárias humanas, tais como picnodistose, no caso de mutações na catepsina K, e síndromes de Papillon-Lefevre e Hain-Munk, causadas por mutações na catepsina C (TURK & TURK, 2008).

Grande progresso tem sido observado no conhecimento do papel das cisteíno proteases em patologias. No entanto, apenas as catepsinas K e S foram claramente validadas como alvos terapêuticos no tratamento da osteoporose (catepsina K) e doenças do sistema imunológico (catepsina S no tratamento de asma brônquica, artrite reumatoide, psoríase, entre outras). Além disso, a catepsina K também demonstrou ser um alvo apropriado para o tratamento de artrite reumatoide e osteoartrite (VASILJEVA et al., 2007).

O nome catepsina deriva do grego *kathepsin* que significa digerir (TURK et al., 2012). Mais de 20 enzimas têm sido denominadas catepsinas, independente da sua classificação. Todas as cisteíno proteases lisossomais são conhecidas como catepsinas, mas nem todas as catepsinas são cisteíno proteases lisossomais (LECAILLE, BRÖMME, LALMANACH, 2008). O nome catepsina é aplicado para serino proteases, catepsinas A e G; aspartil proteases, catepsina D e E; e cisteíno proteases lisossomais, catepsinas B, C, F, H, K, L, O, S, V, X e W. A maioria das catepsinas está expressa em tecidos humanos, tais como as catepsinas B, H, L, C, X, F, S e V. O perfil de expressão

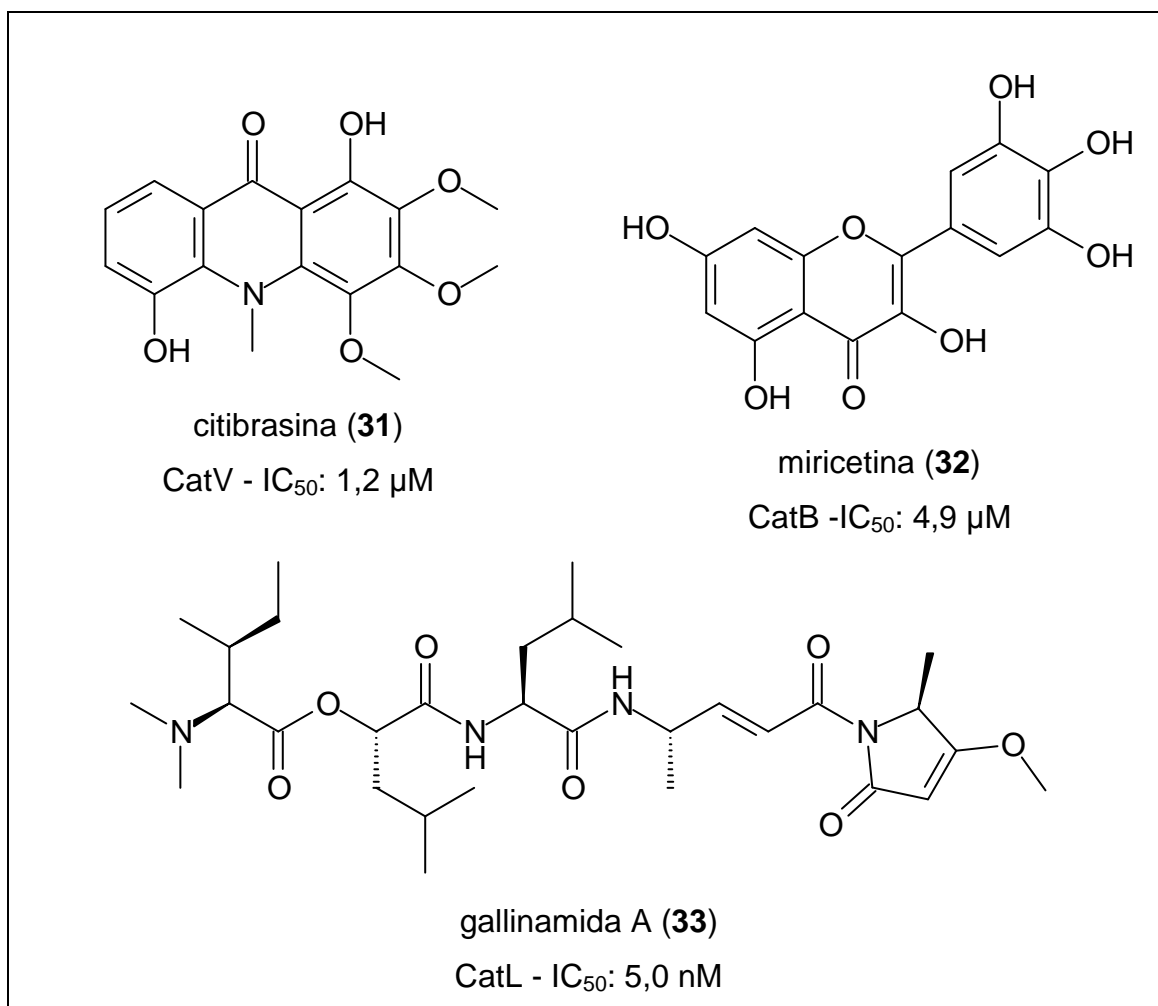
indica que estas enzimas estão envolvidas na degradação das proteínas celulares. Por outro lado, as catepsinas K, W e S são expressas em células restritas ou em tecidos específicos, indicando papéis mais específicos (TURK et al., 2012).

O desenvolvimento de inibidores de catepsinas seguiu o processo tradicional normalmente utilizado para os inibidores de proteases: isto é, grandes bibliotecas de produtos naturais ou compostos sintéticos são rastreadas quanto à inibição da atividade das catepsinas *in vitro*; estes rastreios iniciais podem ser seguidos por alteração da estrutura química para conseguir melhor inibição do alvo (PALERMO & JOYCE, 2007).

Um dos primeiros inibidores de amplo espectro de catepsina a ser estudado foi o inibidor irreversível e de ligação covalente E-64, originalmente isolado a partir de *Aspergillus japonicus*. Experimentos demonstraram que o E-64 pode inibir eficazmente as catepsinas, sendo um inibidor não-seletivo de todas as catepsinas, com a exceção de catepsina C, que é apenas fracamente inibida. Um éster etílico de E-64 foi testado em ensaios clínicos em indivíduos japoneses com distrofia muscular, mas os ensaios pararam na fase III de desenvolvimento devido ao desempenho abaixo do ideal (PALERMO & JOYCE, 2007; TURK et al., 2012).

Estudos realizados nos últimos anos demonstram que diferentes classes de produtos naturais podem atuar como inibidores de cisteíno proteases. Alguns exemplos de inibidores de catepsinas são o alcaloide citibrasina (**31**) (Figura 1.10, p. 21), isolado de *Swinglea glutinosa* (Bl.) Merr. (Rutaceae); o flavonoide miricetina (**32**) (Figura 1.10, p. 21), isolado de *Myrcia lingua* Berg. (Myrtaceae); gallinamida A (**33**) (Figura 1.10, p. 21), isolada de cianobactéria marinha *Schizothrix* sp. (MILLER et al., 2014; RAMALHO et al., 2015; SEVERINO et al., 2011).

**FIGURA 1.10** – Estruturas de alguns produtos naturais inibidores de catepsinas.



Catepsina K está presente predominantemente em osteoclastos, mas também é expressa em níveis mais baixos, no ovário humano, coração, músculo esquelético, pulmão, placenta, testículo, intestino delgado e cólon (YASUDA, KALETA, BRÖMME, 2005). As empresas farmacêuticas começaram a se interessar em estudos com catepsina K, devido ao fato de que sua inibição seletiva pode ser a chave para um tratamento eficaz de doenças relacionadas à reabsorção óssea, como a osteoporose. Vários indícios apontam que a catepsina K também está relacionada à doença de Paget, uma vez que os osteoclastos, em locais de grande perda de osso, continuam concentrações elevadas de catepsina K. Estudos indicam que a catepsina K humana está associada também a progressão de câncer de próstata, carcinoma de tireoide, adenocarcinoma de pulmão, carcinoma de mama, e várias linhagens celulares de câncer de mama (LECAILLE, BRÖMME, LALMANACH, 2008).

Catepsina L é uma cisteíno protease lisossomal ubiquamente expressa e a principal responsável pela degradação de proteína intracelular. Além de seu papel tradicional na degradação de proteínas, também é responsável por muitas funções específicas que fazem dela um alvo interessante para a descoberta de fármacos. Estudos têm demonstrado que a catepsina L desempenha um papel importante na formação do cabelo e da pele, bem como na seleção de células T (MILLER et al., 2014; TANG et al., 2009). Esta catepsina é regulada em vários tipos de células de câncer e estudos demonstraram redução significativa na capacidade de invasão e metástase tumoral pelo tratamento com inibidores seletivos da catepsina L (LANKELMA et al., 2010).

Catepsina V (também conhecida como catepsina L2) possui semelhança estrutural de 80% com a catepsina L, porém sua expressão é limitada ao timo, testículos e epitélio da córnea (YASUDA et al., 2004). Em condições patológicas, catepsina V tem sido considerada um marcador potencial no diagnóstico de tumores de cólon. Esta enzima também é expressa em carcinomas da mama, mas não em cólon ou tecido mamário normais. Além disso, a catepsina V em conjunto com as catepsinas lisossomais L, K e S, tem sido associada à aterosclerose (SEVERINO et al., 2011).

## 2 – OBJETIVOS

### 2.1 – OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo geral realizar o estudo químico das folhas e do caule da espécie *E. pubescens* (Malvaceae), bem como avaliar o potencial biológico dos extratos, frações e substâncias isoladas.

### 2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar o estudo químico, por meio de técnicas cromatográficas, do extrato etanólico do caule e das folhas de *E. pubescens*, a fim de isolar, purificar e caracterizar os metabólitos secundários;
- Investigar, por meio de teste *in vitro*, a capacidade antioxidante de substâncias isoladas, através do método de captura dos radicais livres com DPPH;
- Avaliar, por meio de teste *in vitro*, a atividade dos extratos, frações e, quando possível, das substâncias isoladas, em busca de inibidores seletivos das catepsinas K, L e V.

### 3 – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

#### 3.1 – MATERIAIS E MÉTODOS

##### 3.1.1 – Reagentes

- Reveladores

- solução de vanilina (3,0 g de vanilina, 135 mL de água destilada, 135 mL de metanol e 30 mL de ácido sulfúrico concentrado).

- solução de *Dragendorff* (1 mL de solução estoque do reagente, 2 mL de ácido acético glacial e 10 mL de água destilada).

- Reagentes utilizados nos ensaios antioxidante:

- DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) adquirido da empresa Sigma-Aldrich.

- quercetina padrão adquirido da empresa Sigma-Aldrich.

- Reagentes utilizados nos ensaios enzimáticos:

- Inibidor irreversível específico de cisteína protease E-64 [L-3-carboxi-*trans*-2,3-epoxipropionil-leucilamido(4-guanino)butano] e DTE (ditioeritritol) obtidos da Sigma-Aldrich.

- Substrato fluorogênico Z-FR-MCA (Cbz-Phe-Arg-MCA ou carbobenzoxifenilalanina-arginina-7-amino-4-metilcumarina ou benziloxicarbonil-fenilalanina-arginina-4-metil-7-coumarilamida) adquiridos das empresas Bachem Inc e Sigma-Aldrich.

- Enzimas estudadas (recombinantes humanas):

- As catepsinas K e V foram cedidas pelo Prof. Dr. Dieter Brömme, da *University of British Columbia*, Vancouver, Canadá, e a catepsina L pelo Dr. Marcio Fernando Madureira Alves, da Universidade Federal de São Paulo, São Paulo – SP.

### 3.1.2 – Solventes

- Solventes grau P.A.: hexano, diclorometano, acetato de etila, acetona, e metanol, de diversas marcas.
- Solventes grau CLAE: isopropanol, metanol e acetonitrila, marcas Panreac, Tedia J.T.Baker.
- Solventes deuterados para RMN: clorofórmio e metanol, marcas Sigma-Aldrich e Merck.

### 3.1.3 – Fases Estacionárias

- Cromatografia de adsorção em coluna aberta (CC):
  - Sílica gel (70-230 *mesh*) e sílica gel (230-400 *mesh*), ambas Macherey-Nagel.
- Cromatografia de exclusão em coluna aberta (CE):
  - *Sephadex* LH-20, Sigma-Aldrich.
- Cromatografia em camada delgada (CCD):
  - Fase estacionária: sílica gel 60 com F254 ( $\varphi = 0,2$  mm), em folhas de alumínio, Fluka.
- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE):
  - Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 (5  $\mu\text{m}$ , 150 x 4,6 mm).

### 3.1.4 – Equipamentos

- Evaporador Rotativo marca IKA, modelo RV 05 Basic, com banho de aquecimento IKA HB 05.06 CN e bomba de hidrovácuo da marca Quimis®.
- Agitador Vórtex marca IKA, modelo Genius 3.

- Câmara de luz ultravioleta com irradiação de luz nos comprimentos de onda 254 e 365 nm, marca Espectroline, modelo CM-26 UV.
- Cromatógrafo Gasoso acoplado ao Espectrômetro de Massas (CG-EM) da marca Agilent, modelo 7820 A – Series MSD 5975, equipado com coluna HP- 5 MS (30 m x 250 µm e filme 0,25 µm).
- Espectrofotômetro UV-Vis marca Varian, modelo Cary 50 CONC.
- Espectrofluorímetro com leitor de placa de ELISA Molecular Devices, modelo SpectraMax M3. Experimentos realizados em colaboração com o Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira, Departamento de Química, UFSCar, São Carlos – SP.
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE) - Sistema Analítico: Equipamento da marca Agilent, modelo 1260 *Infinity*, bomba quaternária, com detector de arranjo de diodos (DAD), injetor manual e software *EZChrom Edition*.
- Ressonância Magnética Nuclear (RMN):
  - Equipamento da marca Bruker, modelo Avance III – 9,4 Tesla (400 MHz para  $^1\text{H}$  e 100 MHz para  $^{13}\text{C}$ ). Experimentos realizados em colaboração com o Prof. Dr. Antônio Gilberto Ferreira, Departamento de Química, UFSCar, São Carlos – SP.
  - Equipamento da marca Bruker, modelo Avance III - 11,7 Tesla (500 MHz para  $^1\text{H}$  e 125 MHz para  $^{13}\text{C}$ ). Experimentos realizados em colaboração com o Prof. Dr. Luciano Morais Lião, Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Goiânia – GO.

## 3.2 – METODOLOGIA

### 3.2.1 – Coleta do material vegetal

A espécie *E. pubescens* foi coletada aleatoriamente nas dependências da Universidade Federal de Goiás – Regional Catalão (UFG/RC), no município de Catalão - GO em 20 de maio de 2010. Os dados e as coordenadas do GPS (S18°09'16.4"; W47°55'43.2") foram armazenados para coletas futuras. Esta parte do trabalho foi auxiliada pelo Prof. Dr. Hélder Nagai Consolaro (Departamento de Ciências Biológicas – UFG/RC), o qual realizou a identificação do material vegetal. O material coletado para identificação se encontra no Laboratório Integrado de Zoologia, Ecologia e Botânica (LIZEB) da Universidade Federal de Goiás – Regional Catalão (UFG/RC), no qual se encontra em processo de envio para incorporação no herbário do Instituto de Ciências Biológicas da UFG (Goiânia).

### 3.2.2 – Obtenção dos extratos etanólicos de *E. pubescens* e extração líquido-líquido

O material vegetal (caule e folhas) foi seco à temperatura ambiente e moído em moinho de facas. Posteriormente, foi submetido à maceração com etanol a temperatura ambiente, sendo realizadas três extrações de sete dias cada. Após cada extração, o material foi filtrado e o solvente evaporado em evaporador rotativo à baixa pressão, obtendo-se os extratos etanólicos do caule e das folhas de *E. pubescens* que foram denominados EPC e EPF, respectivamente. Alíquotas dos extratos foram enviadas para avaliação biológica em enzimas (cisteíno proteases).

Para avaliação de atividade enzimática das frações, 1,12 g do extrato do caule (EPC) foi solubilizado em 100 mL de MeOH/H<sub>2</sub>O (3:7) e submetido à extração líquido-líquido com hexano (30 mL) e acetato de etila (30 mL), sendo cada uma das extrações realizada em triplicata. Os solventes foram evaporados, obtendo-se as frações hexano (H), acetato de etila (A) e hidroalcolólica (W). O extrato etanólico das folhas (50,49 g) também foi submetido à extração líquido-líquido seguindo o mesmo procedimento. As massas das partes vegetais, dos extratos e das frações estão descritas na Tabela 3.1 (p. 28).

**TABELA 3.1** – Massa do material vegetal seco, dos extratos e frações obtidas após extração líquido-líquido.

Parte vegetal	Material seco (g)	Extrato etanólico (g)	Rendimento (%)	Fração obtida (g)		
				H	A	W
caule	308,20	54,90	17,81	0,02*	0,43*	0,69*
folha	1400,0	55,38	3,96	22,31	3,60	5,04**

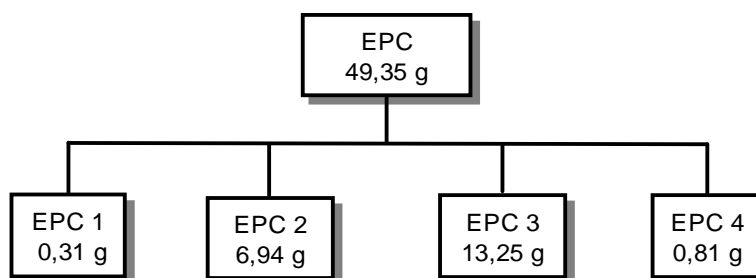
**H:** hexano; **A:** acetato de etila; **W:** metanol:água

\*extração líquido-líquido realizada com 1,12 g do extrato etanólico do caule \*\*massa obtida a partir da secagem de parte da fração metanol:água do extrato etanólico das folhas.

### 3.2.3 – Fracionamento cromatográfico do extrato etanólico do caule de *E. pubescens* (EPC)

O extrato EPC (49,35 g) foi fracionado por cromatografia em coluna (CC) ( $\varphi \times h = 5,0 \times 10,0$  cm), utilizando-se sílica gel (70-230 *mesh*) como fase estacionária e eluição em ordem crescente de polaridade com os seguintes solventes: Hex, Dic, AcOEt e MeOH (Tabela 3.2, p. 29). Após fracionamento, as amostras foram analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando três diferentes sistemas de eluente: a) Hex/AcOEt (9:1); b) Hex/AcOEt (3:2); c) AcOEt 100%, e reveladas com solução ácida de vanilina e reagente de *Dragendorff*. O resultado do fracionamento está representado no Fluxograma 3.1.

**FLUXOGRAMA 3.1** – Fracionamento cromatográfico do extrato etanólico do caule (EPC).



**TABELA 3.2** – Sistemas de eluentes utilizados no fracionamento do extrato EPC.

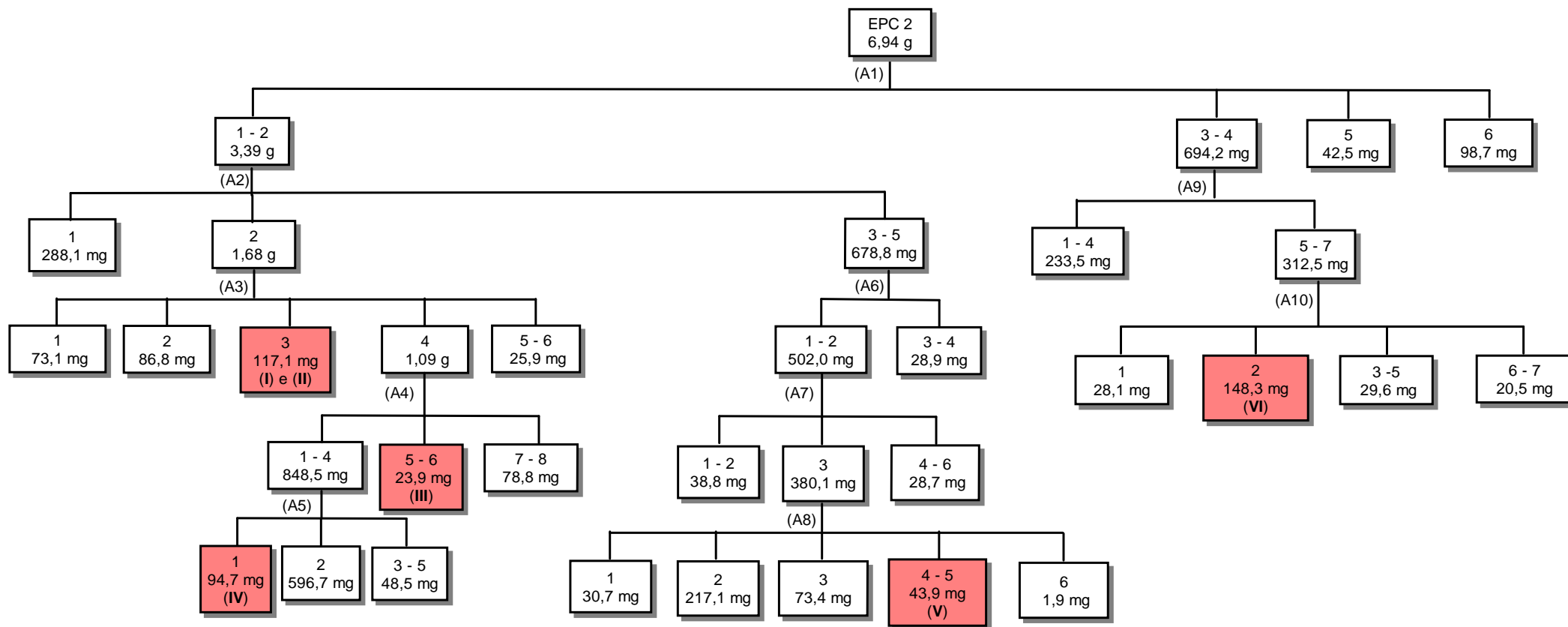
Frações	Sistema de eluente	Proporção
<b>EPC 1</b>	Hex/Dic	(1:1)
<b>EPC 2</b>	Dic/AcOEt	(1:1)
<b>EPC 3</b>	AcOEt/MeOH	(1:1)
<b>EPC 4</b>	MeOH	100%

Selecionou-se a fração 2 para ser estudada baseado nos valores de *R<sub>f</sub>* observados por CCD das frações resultantes do fracionamento de EPC. A fração EPC 2 (6,94 g) foi fracionada utilizando cromatografia em coluna com diferentes condições cromatográficas, representadas na Tabela 3.3 (p. 31). As frações obtidas em cada fracionamento foram reunidas de acordo com os valores de *R<sub>f</sub>* observados nas placas de CCD. Os sucessivos fracionamentos desta fração resultaram no isolamento das substâncias **I** e **II** (em mistura), **III**, **IV**, **V** e **VI** (Fluxograma 3.2, p. 30).

A fração EPC 3 (13,25 g) foi fracionada utilizando diversas técnicas e condições cromatográficas, representadas na Tabela 3.4 (p. 33). As frações obtidas em cada fracionamento foram reunidas de acordo com os valores de *R<sub>f</sub>* observados nas placas de CCD. Os sucessivos fracionamentos desta fração resultaram no isolamento das substâncias **VII**, **VIII** e **IX** (Fluxograma 3.3, p. 32).

Para confirmar a identificação estrutural da substância **IX**, a amostra e um padrão foram submetidos à CLAE, sistema analítico nas seguintes condições: coluna Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 (5 µm, 150 x 4,6 mm). *Loop*: 20 µL. Vazão constante: 1,0 mL/min. Fase móvel: H<sub>2</sub>O (Solvente A) e CH<sub>3</sub>CN (Solvente B). Gradiente: 0 min - 10% de B; 3 min - 10% de B; 10 min - 30% de B; 15 min - 50% de B; 20 min - 80% de B; 25 min - 100% de B; 30 min - 100% de B.

**FLUXOGRAMA 3.2 – Fracionamento da fração EPC 2.**

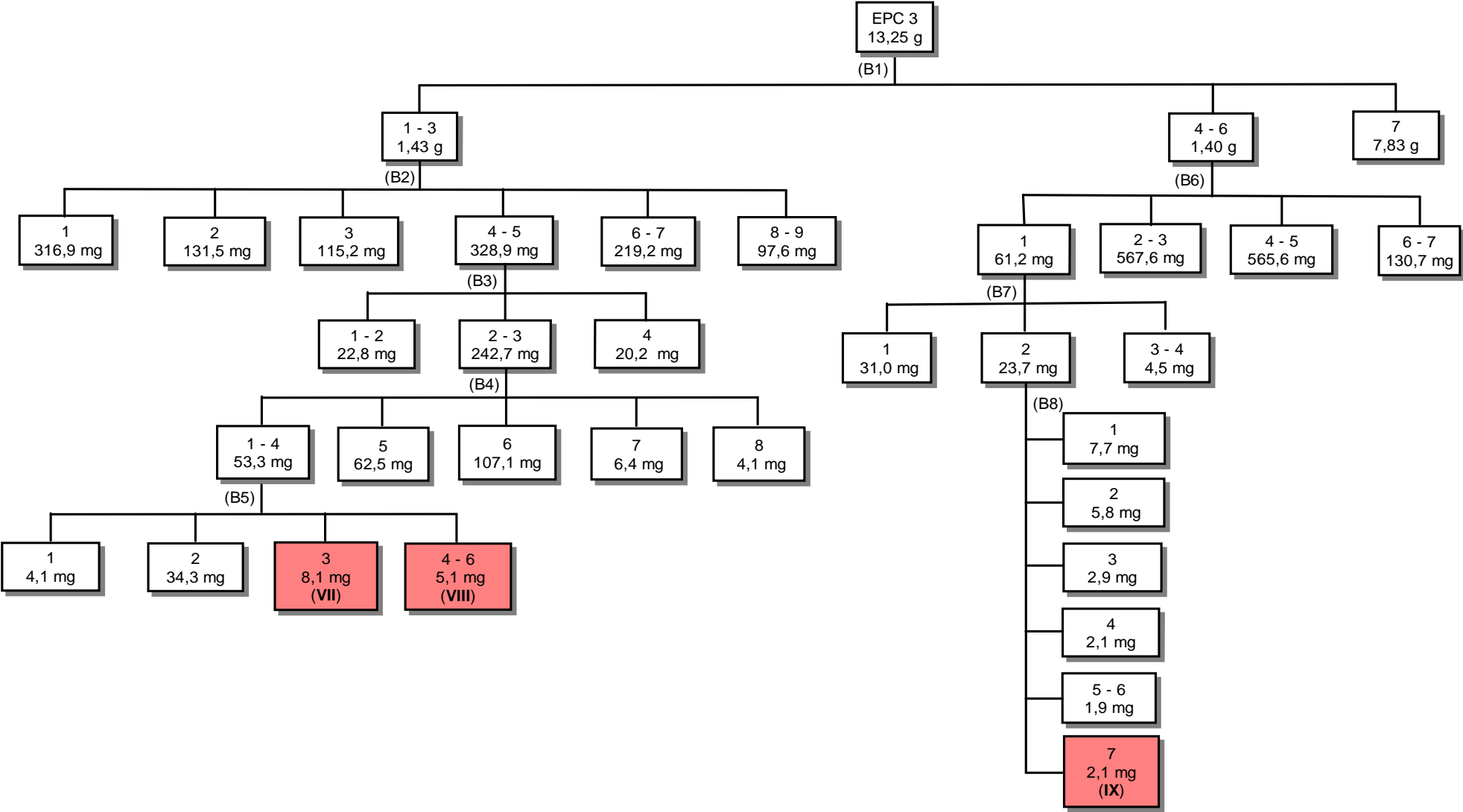


**TABELA 3.3 – Condições cromatográficas utilizadas no fracionamento da fração EPC 2 descritas no FLUXOGRAMA 3.2.**

Condição	F. E.	h (cm)	φ (cm)	Sistema Eluente
A1	Sílica gel (70-230 mesh)	14,0	5,5	Gradiente: Hex 100%; Hex/AcOEt (9,5:0,5), (8,5:1,5), (7:3), (1:1), (3:7), (1,5:8,5); AcOEt/MeOH (9,5:0,5), (1:1); MeOH 100%
A2	Sílica gel (70-230 mesh)	15,0	3,0	Gradiente: Hex 100%; Hex/AcOEt (7:3), (1:1); AcOEt 100%; AcOEt/MeOH (7:3), (1:1); MeOH 100%
A3	Sílica gel (230-400 mesh)	17,0	3,0	Gradiente: Hex 100%; Hex/AcOEt (8,5:1,5), (7:3), (1:1), (3:7); AcOEt 100%; AcOEt/MeOH (7:3), (1:1), (3:7); MeOH 100%
A4	Sílica gel (230-400 mesh)	22,0	3,0	Gradiente: Hex 100%; Hex/AcOEt (8,5:1,5), (7:3), (1:1), (3:7); AcOEt 100%; AcOEt/MeOH (7:3), (1:1), (3:7); MeOH 100%
A5	Sílica gel (230-400 mesh)	18,5	3,0	Gradiente: Hex 100%; Hex/AcOEt (9:1), (8:2), (7:3), (6:4), (1:1), (4:6), (3:7); AcOEt 100%; AcOEt/MeOH (8:2), (6:4), (1:1), (3:7); MeOH 100%
A6	Sílica gel (230-400 mesh)	18,5	2,5	Gradiente: Hex 100%; Hex/AcOEt (7:3), (1:1), (3:7); AcOEt 100%; AcOEt/MeOH (7:3), (1:1), (3:7); MeOH 100%
A7	Sílica gel (230-400 mesh)	18,5	2,5	Gradiente: Hex 100%; Hex/AcOEt (8,5:1,5), (7:3), (1:1), (3:7); AcOEt 100%; AcOEt/MeOH (7:3), (1:1), (3:7); MeOH 100%
A8	Sephadex LH-20	36,0	2,5	Isocrática: MeOH 100%
A9	Sílica gel (70-230 mesh)	14,0	3,0	Gradiente: Hex 100%; Hex/AcOEt (8,5:1,5), (7:3), (1:1), (1,5:8,5), (3:7); AcOEt 100%; AcOEt/MeOH (7:3), (1:1); MeOH 100%
A10	Sílica gel (230-400 mesh)	20,0	2,5	Gradiente: Hex 100%; Hex/AcOEt (8,5:1,5), (7:3), (1:1), (3:7); AcOEt 100%; AcOEt/MeOH (7:3), (1:1), (3:7); MeOH 100%

F.E. = fase estacionária; h = altura da F.E.; φ = diâmetro da coluna cromatográfica.

**FLUXOGRAMA 3.3 – Fracionamento da fração EPC 3.**



**TABELA 3.4 – Condições cromatográficas utilizadas no fracionamento da fração EPC 3 descritas no FLUXOGRAMA 3.3.**

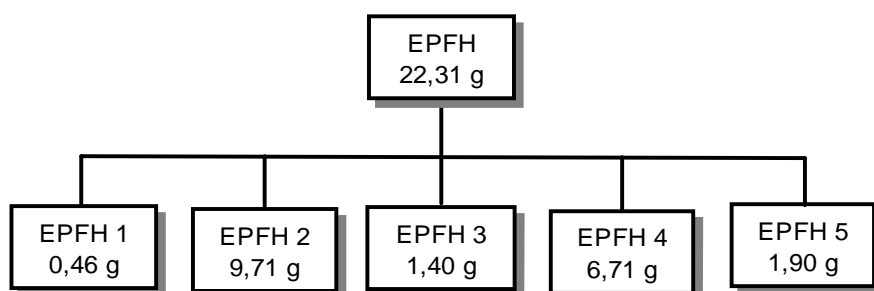
Condição	F. E.	h (cm)	φ (cm)	Sistema Eluente
B1	Sílica gel (70-230 mesh)	13,5	5,5	Gradiente: Hex 100%; Hex/AcOEt (9,5:0,5), (8,5:1,5), (7:3), (1:1), (3:7), (1,5:8,5); AcOEt/MeOH (9,5:0,5), (1:1), (3:7); MeOH 100%
B2	Sílica gel (230-400 mesh)	21,0	3,0	Gradiente: Hex 100%; Hex/AcOEt (8,5:1,5), (7:3), (1:1), (3:7); AcOEt 100%; AcOEt/MeOH (7:3), (1:1), (3:7); MeOH 100%
B3	Sílica gel (230-400 mesh)	21,0	2,5	Gradiente: Hex 100%; Hex/AcOEt (8,5:1,5), (7:3), (1:1), (3:7); AcOEt 100%; AcOEt/MeOH (7:3), (1:1), (3:7); MeOH 100%
B4	Sephadex LH-20	36,0	2,5	Isocrática: MeOH 100%
B5	Sephadex LH-20	31,0	0,9	Isocrática: MeOH 100%
B6	Sílica gel (230-400 mesh)	21,0	3,0	Gradiente: Hex 100%; Hex/AcOEt (8,5:1,5), (7:3), (1:1), (3:7); AcOEt 100%; AcOEt/MeOH (7:3), (1:1), (3:7); MeOH 100%
B7	Sílica gel (230-400 mesh)	26,5	1,7	Gradiente: Hex 100%; Hex/AcOEt (8,5:1,5), (7:3), (1:1), (3:7); AcOEt 100%; AcOEt/MeOH (7:3), (1:1), (3:7); MeOH 100%
B8	Sephadex LH-20	57,0	1,7	Isocrática: MeOH 100%

F.E. = fase estacionária; h = altura da F.E.; φ = diâmetro da coluna cromatográfica.

### 3.2.4 – Fracionamento Cromatográfico da fração EPFH

Após extração líquido-líquido do extrato etanólico das folhas (EPF), a fração hexano EPFH (22,31 g), foi fracionada por CC ( $\varphi \times h = 5,0 \times 13,5$  cm), utilizando-se sílica gel (70-230 *mesh*) como fase estacionária e eluentes em ordem crescente de polaridade: Hex, AcOEt e MeOH (Tabela 3.5). Após fracionamento, as amostras foram analisadas por CCD, utilizando quatro diferentes sistemas de eluente: a) Hex/AcOEt (4:1); b) Hex/AcOEt (1:4); c) AcOEt/MeOH (7:3) e d) AcOEt/MeOH (3:7) sendo reveladas com solução ácida de vanilina e sob radiação UV nos comprimentos de onda 254 e 365 nm. O resultado do fracionamento está representado no Fluxograma 3.4.

**FLUXOGRAMA 3.4** – Fracionamento da fração EPFH.



**TABELA 3.5** – Sistemas de eluentes utilizadas no fracionamento da fração EPFH.

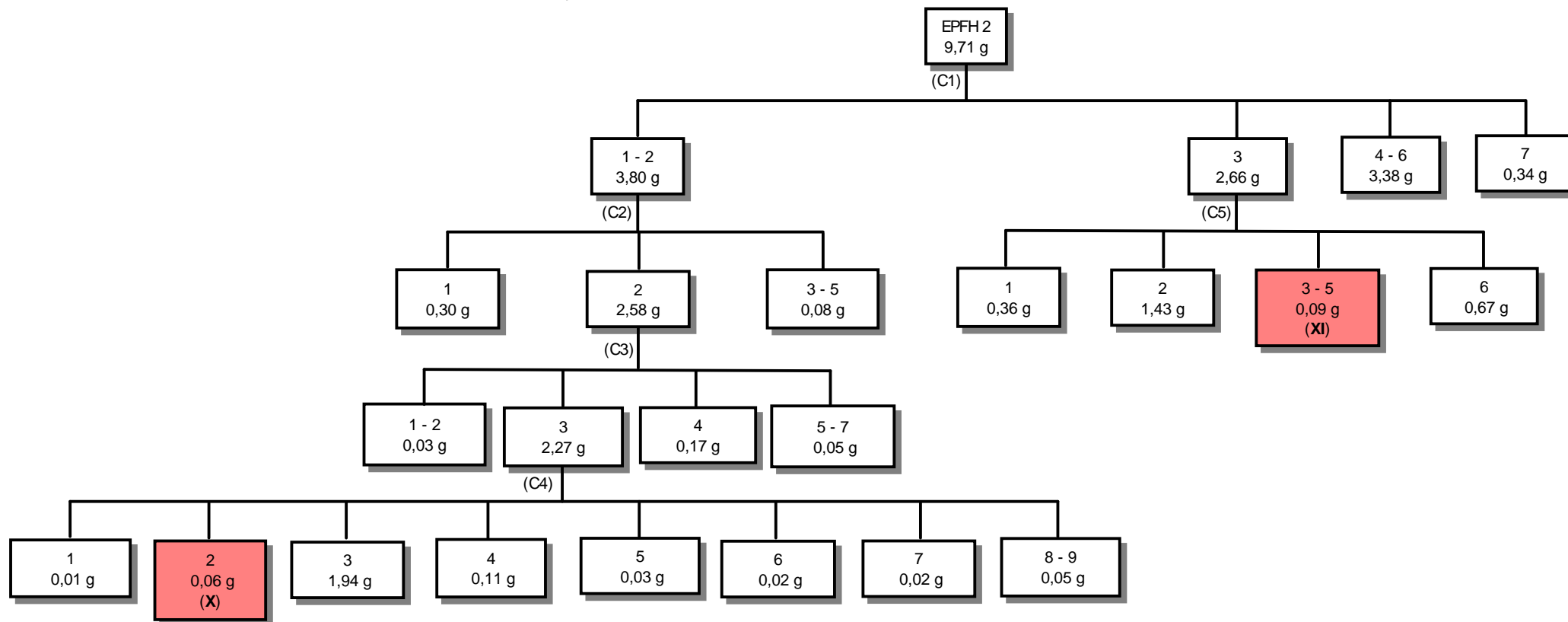
Frações	Sistema de eluente	Proporção
EPFH 1	Hex	100%
EPFH 2	Hex/AcOEt	(1:1)
EPFH 3	AcOEt	100%
EPFH 4	AcOEt/MeOH	(1:1)
EPFH 5	MeOH	100%

De acordo com os valores de *R<sub>f</sub>* observados por CCD das frações resultantes do fracionamento de EPFH, selecionou-se a fração 2 para ser fracionada. A fração EPFH 2 (9,71 g) foi fracionada utilizando cromatografia em coluna com diferentes condições cromatográficas, representadas na Tabela 3.6 (p. 37). As frações obtidas em cada fracionamento foram reunidas de acordo com os

valores de *Rf* observados nas placas de CCD. Os sucessivos fracionamentos desta fração resultaram no isolamento das substâncias **X** e **XI** (Fluxograma 3.5, p. 36).

Para confirmar a identificação estrutural, as substâncias **X** e **XI** foram analisadas via CG-EM com sistema operando em impacto eletrônico (70 eV) equipado com injetor *split*. Foi utilizada coluna capilar cromatográfica de sílica fundida HP-5MS (5% fenil e 95% de metilsiloxano) e hélio como gás de arraste. A vazão foi constante de 1 mL/min, sendo realizado aquecimento com programação de temperatura de 150 °C por 1 min, 150 a 250 °C (10 °C/min); 250 °C por 4 min; 250 a 280 °C (10 °C/min); 280 °C por 20 min.

### FLUXOGRAMA 3.5 – Fracionamento da fração EPFH 2.



**TABELA 3.6** – Condições cromatográficas utilizadas no fracionamento da fração EPFH 2 descritas no FLUXOGRAMA 3.5.

Condição	F. E.	h (cm)	φ (cm)	Sistema Eluente
C1	Sílica gel (70-230 mesh)	13,5	5,0	Gradiente: Hex 100%; Hex/AcOEt (9:1), (8:2), (7:3), (6:4), (1:1), (3:7); AcOEt 100%; AcOEt/MeOH (7:3), (3:7); MeOH 100%
C2	Sílica gel (70-230 mesh)	13,5	5,0	Gradiente: Hex 100%; Hex/AcOEt (9,5:0,5), (9:1), (8,5:1,5), (8:2), (7:3), (1:1), (3:7); AcOEt 100%; AcOEt/MeOH (1:1); MeOH 100%
C3	Sílica gel (230-400 mesh)	11,0	5,0	Gradiente: Hex 100%; Hex/AcOEt (9,5:0,5), (9:1), (7:3), (1:1), (3:7); AcOEt 100%
C4	Sílica gel (230-400 mesh)	6,0	5,0	Gradiente: Hex 100%; Hex/AcOEt (9,5:0,5), (9:1), (8:2), (7:3), (1:1), (3:7); AcOEt 100%; AcOEt/MeOH (1:1); MeOH 100%
C5	Sílica gel (70-230 mesh)	12,5	4,5	Gradiente: Hex 100%; Hex/AcOEt (9:1), (8:2), (7:3), (6:4), (1:1), (3:7); AcOEt 100%; AcOEt/MeOH (1:1); MeOH 100%

F.E. = fase estacionária; h = altura da F.E.; φ = diâmetro da coluna cromatográfica.

### 3.2.5 – Metodologia do Ensaio Antioxidante

Este ensaio baseia-se na redução do radical DPPH<sup>•</sup>, de coloração violeta e máximo de absorvância a 517 nm, que ao aceitar um elétron ou um H<sup>•</sup> torna-se uma molécula estável de coloração amarela consequentemente diminuindo a absorvância. Para a determinação da atividade antioxidante, as amostras foram solubilizadas em metanol na concentração de 1 mg/mL e a partir da solução inicial foram realizadas sucessivas diluições de concentrações (500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,63 e 7,81 µg/mL). Como controle positivo foi utilizada solução de quercetina padrão (LU et al., 2014) nas mesmas concentrações. Os ensaios foram realizados em tubos de ensaio, onde adicionou-se 150 µL da solução de amostra em diferentes concentrações e 2850 µL da solução metanólica 0,1 mM de DPPH. Em seguida, os tubos de ensaio foram agitados em agitador vórtex para homogeneização e incubados ao abrigo de luz por 30 minutos à temperatura ambiente. Após incubação, foram realizadas leituras em espectrofotômetro de UV-Vis a 517 nm. Todas as determinações foram realizadas em triplicata e acompanhadas da leitura do controle negativo. A porcentagem de redução do radical DPPH<sup>•</sup> foi calculada segundo a Equação 3.1:

$$\% \text{ redução do DPPH}^{\bullet} = [(Abs_{\text{controle}} - Abs_{\text{amostra}}) / Abs_{\text{controle}}] \times 100 \quad (\text{Equação } 3.1)$$

Onde:

$Abs_{\text{amostra}}$  = absorvância da amostra com a solução de DPPH

$Abs_{\text{controle}}$  = absorvância da solução metanólica de DPPH (controle negativo)

A atividade sequestrante do radical DPPH<sup>•</sup> foi expressa em termos de EC<sub>50</sub> (concentração mínima necessária para o antioxidante reduzir em 50% a concentração inicial do DPPH), sendo esta determinada através do cálculo da atividade antioxidante em diferentes concentrações de forma a traçar uma curva entre a capacidade antioxidante da amostra e sua concentração (MISHRA, OJHA, CHAUDHURY, 2012).

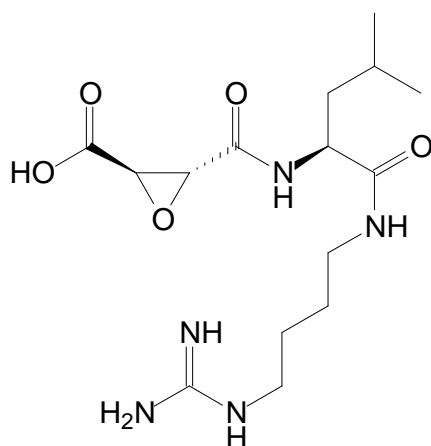
### 3.2.6 – Metodologia dos Ensaio Enzimáticos

Os ensaios de inibição enzimática frente às catepsinas K, V e L foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira, na Universidade Federal de São Carlos, São Carlos – SP.

O procedimento realizado, descrito por SEVERINO et al., 2011, consiste na determinação da inibição enzimática através da detecção do aumento da fluorescência que ocorre com a hidrólise do substrato fluorogênico Z-FR-MCA, o qual foi detectado em espectrofluorímetro com fenda de excitação ajustada para  $\lambda_{ex}= 380$  nm e emissão  $\lambda_{em}= 460$  nm. Os ensaios foram realizados em triplicatas, nos quais as amostras foram diluídas em DMSO, obtendo-se concentração final dos extratos e frações de 125 e 50  $\mu\text{g/mL}$ .

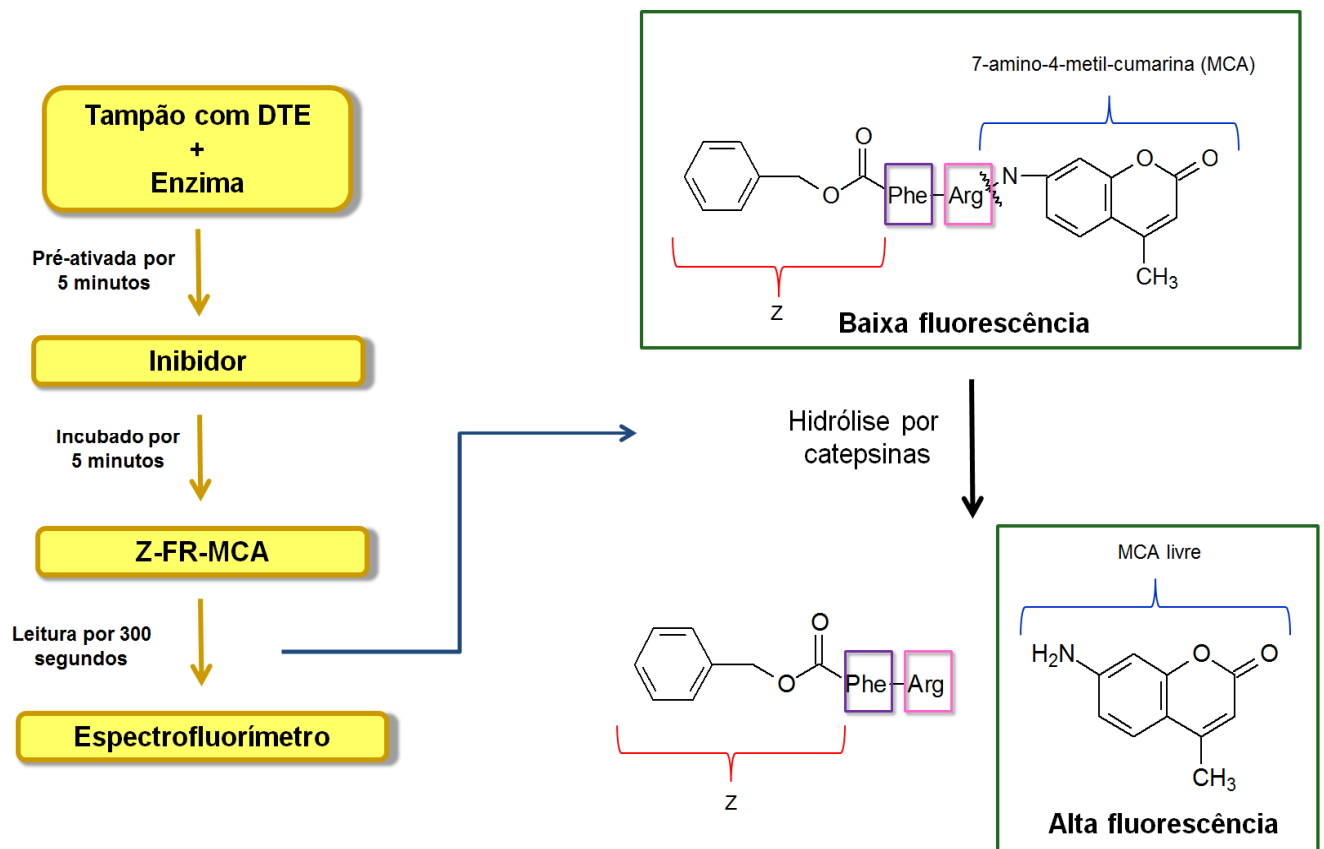
Um volume de 5  $\mu\text{L}$  dos possíveis inibidores foi adicionado em cada poço das placas de ELISA (96 poços) e posteriormente adicionou-se as enzimas (1-5 nM) em tampão (acetato de sódio 100 mM com 5 mM de EDTA e pH de 5,5) pré-ativadas com ditioeritritol DTE (5,0 mM) a 27 °C por 5 minutos. As enzimas foram incubadas por 5 minutos com os analitos e posteriormente foram adicionados 10  $\mu\text{M}$  de substrato fluorogênico Z-FR-MCA. Imediatamente iniciou-se a leitura da hidrólise do substrato que foi monitorada por 300 segundos. Como controle negativo utilizou-se DMSO e como controle positivo o inibidor E-64 (Figura 3.1) dissolvido em DMSO (10  $\mu\text{M}$ ). A metodologia utilizada no ensaio está representada na Figura 3.2 (p.40).

**FIGURA 3.1** – Estrutura do [L-3-carboxi-*trans*-2,3-epoxipropionil-leucilamido(4-guanino)butano] (E-64).



Fonte: BARRETT et al., 1982

**FIGURA 3.2** – Esquema geral dos ensaios enzimáticos com o substrato fluorogênico Z-FR-MCA.

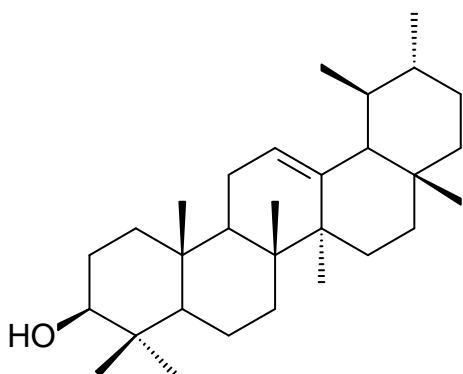


Fonte: SEVERINO, 2008

## 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente estudo resultou no isolamento de dez metabólitos secundários de *E. pubescens*, sendo quatro triterpenoides (substâncias **I**, **II**, **X** e **XI**), dois diterpenoides (substância **III** e **IV**), quatro ácidos carboxílicos aromáticos (substâncias **V**, **VI**, **VII** e **VIII**) e um flavonoide (substância **IX**).

### 4.1 – SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

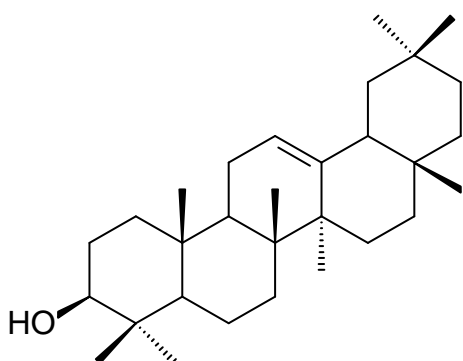


#### $\alpha$ -amirina (I)

Origem: extrato etanólico do caule (EPC)

Isolamento: p. 28-31

Identificação estrutural: p. 44-46

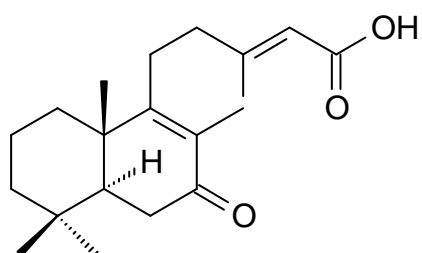


#### $\beta$ -amirina (II)

Origem: extrato etanólico do caule (EPC)

Isolamento: p. 28-31

Identificação estrutural: p. 44-46

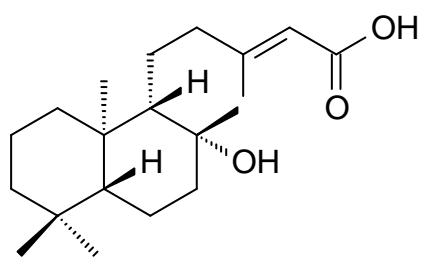


#### ácido 7-oxo-labda-8,13-dien-15-oico (III)

Origem: extrato etanólico do caule (EPC)

Isolamento: p. 28-31

Identificação estrutural: p. 47-53

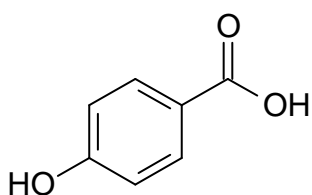


**ácido  $\Delta^{13,14}$ -ent-labd-8 $\beta$ -ol-15-oico (IV)**

Origem: extrato etanólico do caule (EPC)

Isolamento: p. 28-31

Identificação estrutural: p. 54-60

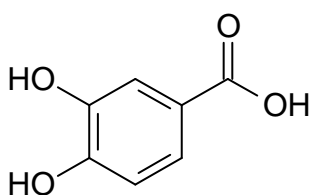


**ácido *p*-hidroxibenzoico (V)**

Origem: extrato etanólico do caule (EPC)

Isolamento: p. 28-31

Identificação estrutural: p. 61-65

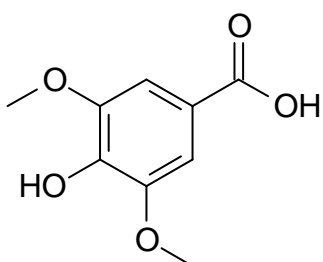


**ácido 3,4-diidroxi benzoico (VI)**

Origem: extrato etanólico do caule (EPC)

Isolamento: p. 28-31

Identificação estrutural: p. 66-70

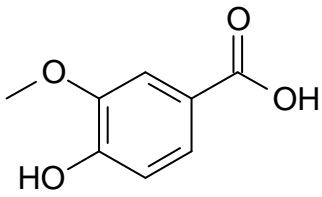


**ácido 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoico (VII)**

Origem: extrato etanólico do caule (EPC)

Isolamento: p. 28 e 29, 32 e 33

Identificação estrutural: p. 71-74

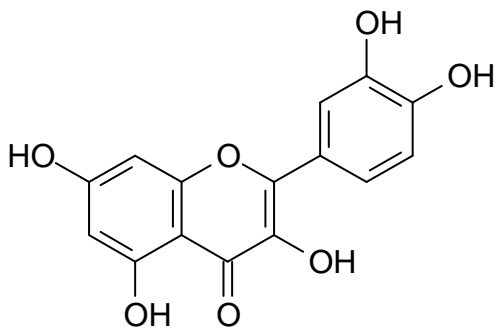


**ácido 3-metoxi-4-hidroxibenzoico (VIII)**

Origem: extrato etanólico do caule (EPC)

Isolamento: p. 28 e 29, 32 e 33

Identificação estrutural: p. 75-78

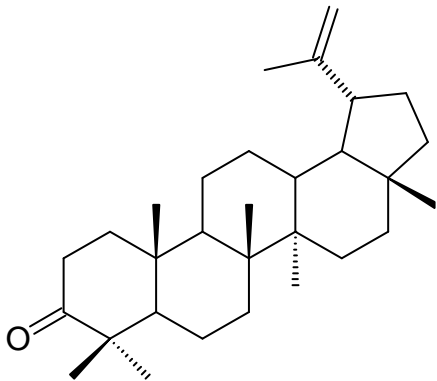


**quercetina (IX)**

Origem: extrato etanólico do caule (EPC)

Isolamento: p. 28 e 29, 32 e 33

Identificação estrutural: p. 79-82

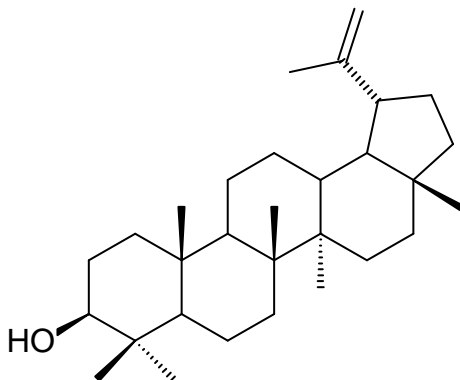


**lupenona (X)**

Origem: extrato etanólico das folhas (EPF)

Isolamento: p. 34-37

Identificação estrutural: p. 83-87



**lupeol (XI)**

Origem: extrato etanólico das folhas (EPF)

Isolamento: p. 34-37

Identificação estrutural: p. 87-92

## 4.2 – IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBTÂNCIAS ISOLADAS DE *E. pubescens*

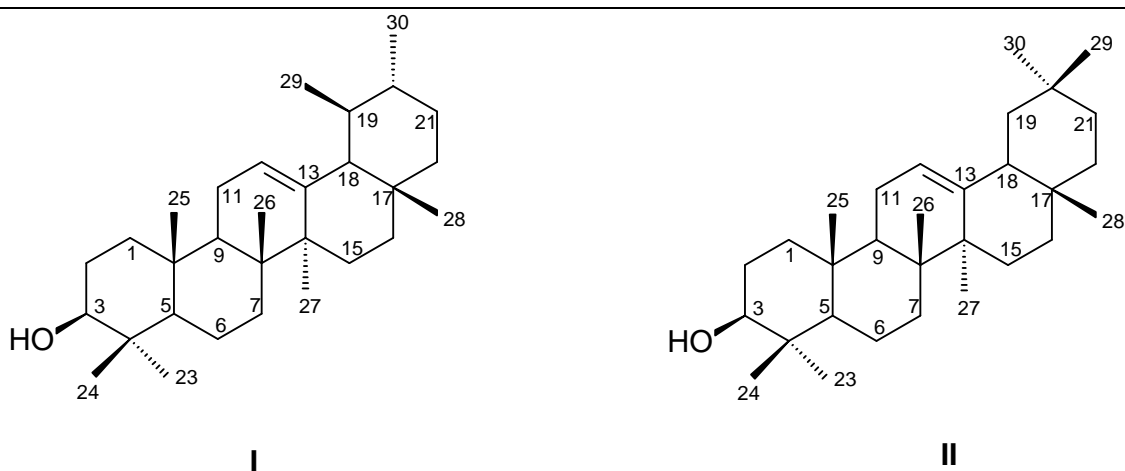
### 4.2.1 – Identificação estrutural das substâncias I e II

A mistura das substâncias I e II foi obtida na forma de um sólido amarelado (117,1 mg), a partir de cromatografia em coluna da fração EPC 2, resultante do fracionamento do extrato etanólico do caule de *E. pubescens*. A amostra, quando analisada por CCD e revelada com solução ácida de vanilina apresentou-se como uma mancha de coloração violeta. A identificação estrutural foi feita utilizando a técnica espectroscópica de RMN de  $^1\text{H}$ , em comparação com dados da literatura (MAGINA, 2008; MATOS, 2006).

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 4.1, p. 46) da mistura de I e II verificou-se a presença de singletos entre  $\delta_{\text{H}}$  0,7 a 1,5 típicos de hidrogênios metílicos de triterpenoides pentacíclicos. Também verificou-se um duplo dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  3,23 ( $J = 10,5$  e  $4,3$  Hz, 1H), que corresponde a um CH oxigenado, atribuído ao H-3. A constante de acoplamento de 10,5 Hz indicou que H-3 está em axial e acopla com H-2 $\beta$ . Na região próxima de 5 ppm, observou-se a presença de dois tripletos em  $\delta_{\text{H}}$  5,26 ( $J = 7,1$  Hz, 1H) e 5,30 ( $J = 7,7$  Hz, 1H) característicos de hidrogênios olefínicos, mais desblindados por estarem fora da região de blindagem da ligação dupla, que podem ser atribuídos a H-12. A comparação destes dados com os da literatura (Tabela 4.1, p. 45) permitiu identificar a amostra como sendo uma mistura de triterpenoides denominados urs-12-en-3 $\beta$ -ol e olean-12-en-3 $\beta$ -ol, mais conhecidos como  $\alpha$ -amirina (I) e  $\beta$ -amirina (II), respectivamente.

As substâncias  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina são triterpenoides pentacíclicos que ocorrem naturalmente numa variedade de plantas medicinais e também em vegetais como a ervilha e a couve. Diversas atividades biológicas têm sido relatadas para as amirinas, tais como: ansiolítica, antidepressiva, antinociceptiva, hepatoprotetora, gastroprotetora e anti-inflamatória. Por apresentarem uma vasta gama de atividades biológicas, as amirinas podem ser consideradas compostos promissores para desenvolvimento farmacêutico (CHING et al., 2011).

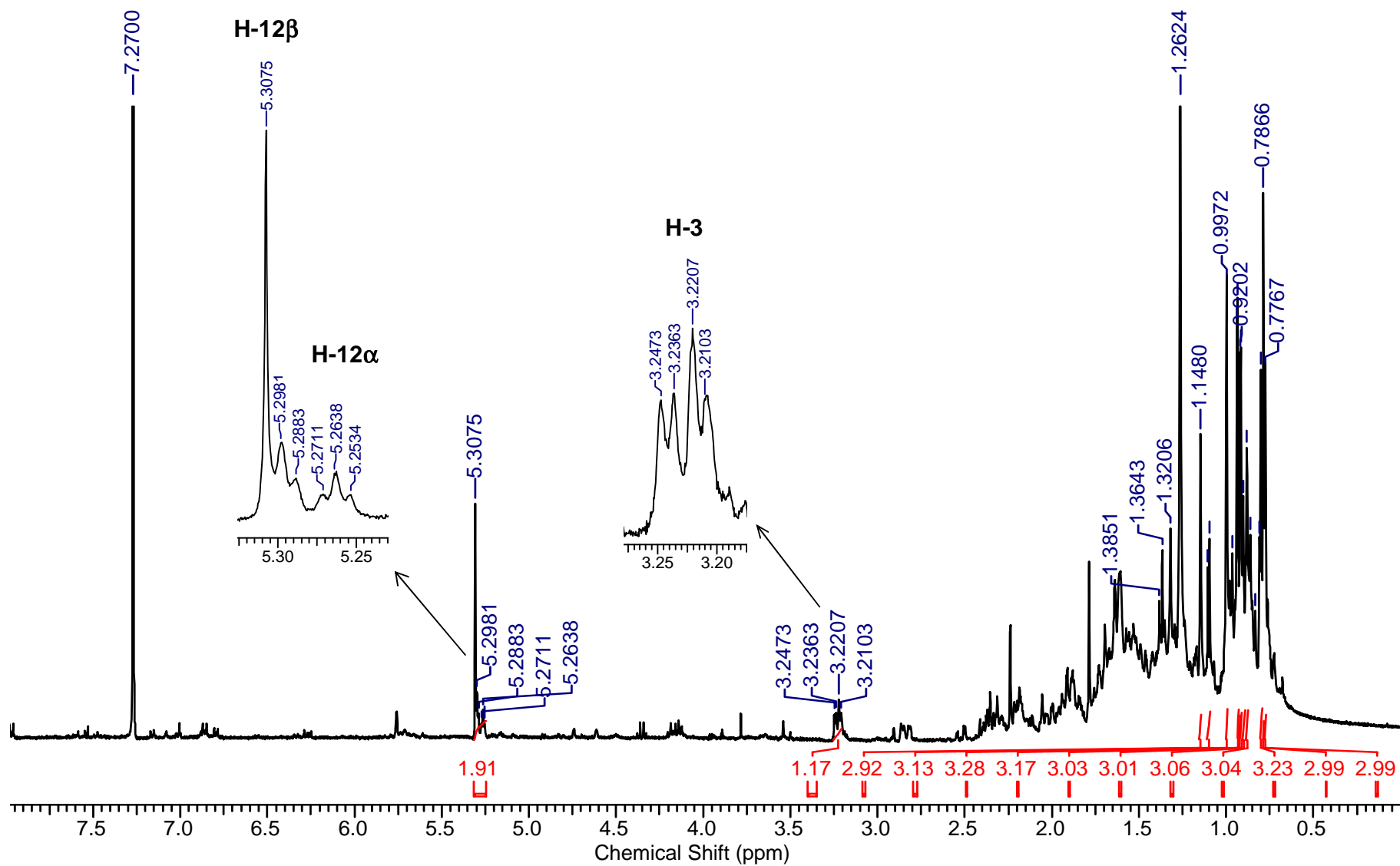
**TABELA 4.1** – Dados espectroscópicos de RMN de  $^1\text{H}$  obtidos para as substâncias **I** e **II**.



H	Substâncias I e II	MATOS, 2006	MAGINA, 2008
	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)
3	3,23 ( <i>dd</i> , $J = 10,5$ e $4,3$ Hz)	3,22 ( <i>dd</i> , $J = 10,7$ e $4,7$ Hz)	3,21 ( <i>dd</i> , $J = 12,0$ e $4,4$ Hz)
12 $\alpha$	5,26* ( <i>t</i> , $J = 7,1$ Hz)	5,12 ( <i>t</i> , $J = 7,2$ Hz)	5,12 ( <i>m</i> )
12 $\beta$	5,30* ( <i>t</i> , $J = 7,7$ Hz)	5,18 ( <i>t</i> , $J = 6,9$ Hz)	5,18 ( <i>m</i> )
23			
24	0,78 (s)* 0,79 (s)*		
25	0,80 (s)* 0,88 (s)*		0,78 (s) 0,82 (s)
26	0,90 (s)* 0,91 (s)*	0,79 - 1,13 (s)	0,86 (s) 0,93 (s)
27	0,92 (s)* 0,94 (s)*		0,96 (s) 0,99 (s)
28	1,00 (s)* 1,09 (s)*		1,13 (s)
29	1,11 (s)* 1,15 (s)*		
30			

\*Valores intercambiáveis.

FIGURA 4.1 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) da mistura das substâncias I e II.



#### 4.2.2 – Identificação estrutural da substância III

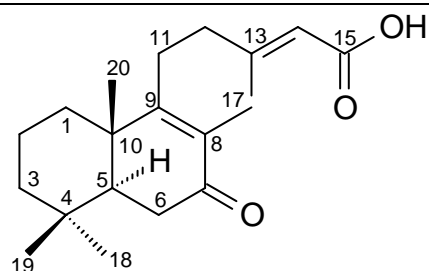
A substância III foi obtida na forma de sólido amarelado (23,9 mg), a partir de cromatografia em coluna da fração EPC 2, resultante do fracionamento do extrato etanólico do caule de *E. pubescens*. A amostra, quando analisada por CCD e revelada com solução ácida de vanilina apresentou-se como uma mancha roxa e quando submetida à radiação UV em comprimento de onda 254 nm uma mancha verde. A identificação estrutural foi feita utilizando as técnicas espectroscópicas uni e bidimensional de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , em comparação com dados da literatura (DEKKER et al., 1988; RIJO, 2010).

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 4.2, p. 50) da substância III verificou-se a presença de cinco singletos entre  $\delta_{\text{H}}$  0,8 a 2,3 que correspondem aos hidrogênios de metilas, além de outros sinais nesta região correspondente aos demais hidrogênios metínicos e metilênicos. Foi observado um singlete largo em  $\delta_{\text{H}}$  5,75 (1H) que corresponde a um hidrogênio olefínico, atribuído ao H-14. No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 4.3, p. 51) da substância III foram observados vinte sinais de carbono entre  $\delta_{\text{C}}$  10 e 200. Sendo os sinais na região mais blindada do espectro de  $^{13}\text{C}$  em  $\delta_{\text{C}}$  11,4; 18,2; 19,1; 21,3; 32,5 atribuídos aos carbonos metílicos C-17, C-20; C-16, C-19, C-18, respectivamente.

Foram observados ainda sinais na região mais desblindada do espectro de  $^{13}\text{C}$  em  $\delta_{\text{C}}$  115,3; 130,6; 161,6 e 166,3 atribuídos aos carbonos de ligação dupla C-14, C-8, C-13 e C-9, respectivamente. Os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  171,3 e 200,1 foram atribuídos ao carbono da carboxila e da carbonila C-15 e C-7, respectivamente. Na análise do mapa de contorno de HSQC (Figuras 4.4 e 4.5, p. 52 e 53) da substância III foram observadas as correlações de hidrogênios e carbonos diretamente ligados. Os dados de correlação estão apresentados na Tabela 4.3 (p. 49). A comparação destes dados com a literatura (Tabela 4.2, p. 48) permitiu identificar a estrutura como sendo o ácido 7-oxo-labda-8,13-dien-15-oico ou ácido rinocerotinoico.

O ácido rinocerotinoico é um diterpenoide labdano que possui atividade anti-inflamatória, tendo sido isolado de espécies vegetais como: *Plectranthus ornatus* (Lamiaceae) e *Elytropappus rhinocerotis* (Asteraceae) (RIJO et al., 2007).

**TABELA 4.2** – Dados espectroscópicos de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  obtidos para a substância **III**.



**III**

H/C	Substância III		DEKKER et al., 1988	
	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm) ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm) ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz)
1a	1,37 ( <i>m</i> )	35,9	1,35	36,0
1b	1,91 ( <i>m</i> )		1,90	
2a	1,70 ( <i>m</i> )	18,6	1,68	18,6
2b	1,61 ( <i>m</i> )		1,58	
3a	1,21 ( <i>m</i> )	41,3	1,20	41,3
3b	1,48 ( <i>m</i> )		1,47	
4	-	33,1	-	33,1
5	1,72 ( <i>m</i> )	50,3	1,68	50,3
6a	2,51 ( <i>dd</i> , $J = 17,52$ e $3,47$ Hz)	35,2	2,49	35,2
6b			2,36 ( <i>m</i> )	
7	-	200,1	-	200,1
8	-	130,6	-	130,6
9	-	166,3	-	166,2
10	-	41,0	-	41,0
11	2,34 ( <i>m</i> )	27,7	2,35	27,7
12	2,28 ( <i>m</i> )	39,8	2,28	39,8
13	-	161,6	-	161,5
14	5,75 ( <i>s</i> )	115,3	5,73	115,4
15	-	171,3	-	171,6
16	2,23 ( <i>s</i> )	19,1	2,20	19,1
17	1,78 ( <i>s</i> )	11,4	1,75	11,4
18	0,89 ( <i>s</i> )	32,5	0,86	32,5
19	0,92 ( <i>s</i> )	21,3	0,90	21,3
20	1,10 ( <i>s</i> )	18,2	1,07	18,2

**TABELA 4.3** – Correlações observadas no experimento de HSQC para a substância  
**III.**

Posição	$\delta_H$ (ppm) (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz)	$\delta_C$ (ppm) (CDCl <sub>3</sub> , 100 MHz)
1	1,37 ( <i>m</i> ) e 1,91 ( <i>m</i> )	35,9
2	1,70 ( <i>m</i> ) e 1,61 ( <i>m</i> )	18,6
3	1,21 ( <i>m</i> ) e 1,48 ( <i>m</i> )	41,3
5	1,72 ( <i>m</i> )	50,3
6	2,51 ( <i>dd</i> ) e 2,36 ( <i>m</i> )	35,2
11	2,34 ( <i>m</i> )	27,7
12	2,28 ( <i>m</i> )	39,8
14	5,75 ( <i>sl</i> )	115,3
16	2,23 ( <i>s</i> )	19,1
17	1,78 ( <i>s</i> )	11,4
18	0,89 ( <i>s</i> )	32,5
19	0,92 ( <i>s</i> )	21,3
20	1,10 ( <i>s</i> )	18,2

FIGURA 4.2 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) da substância III.

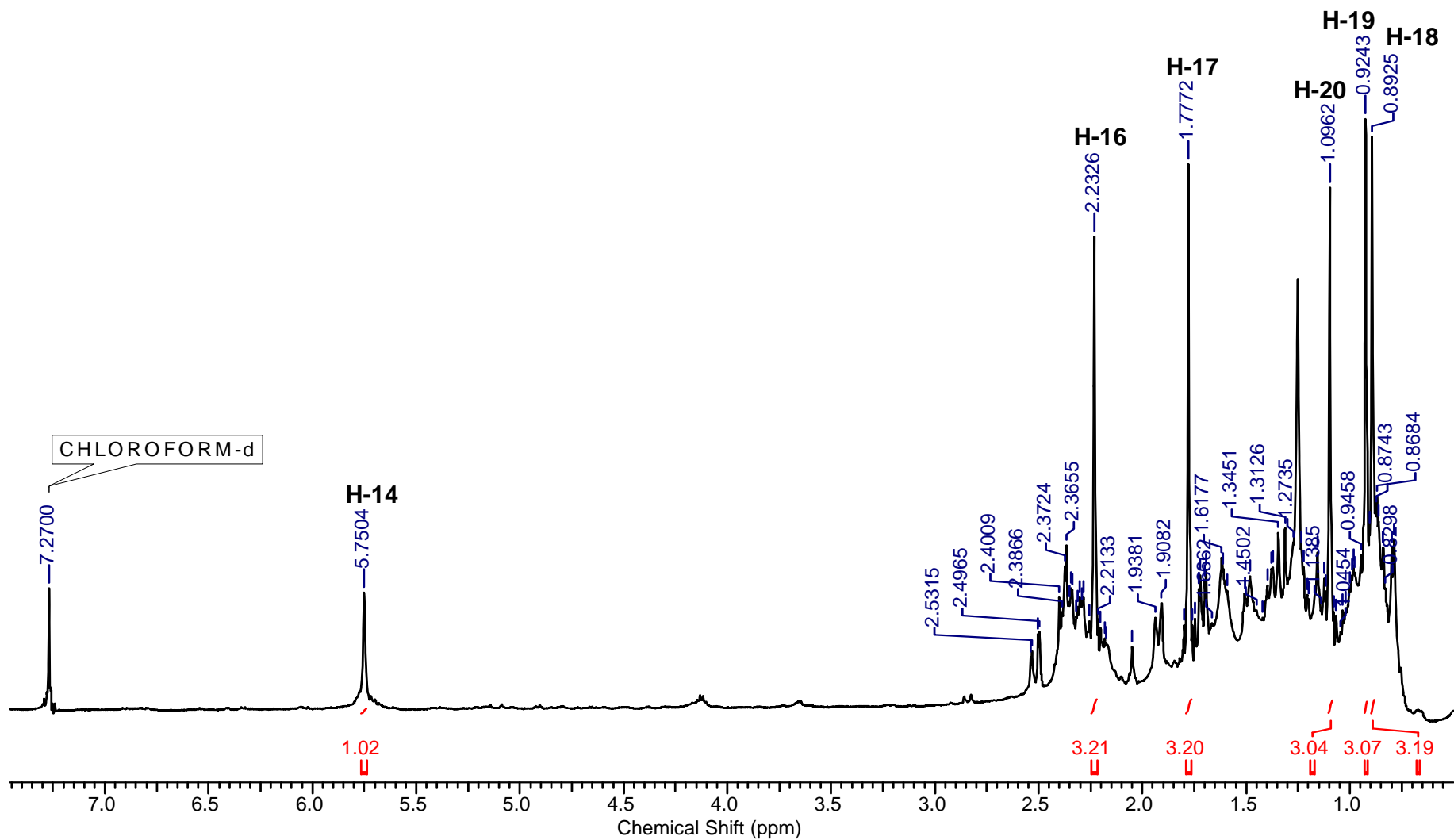


FIGURA 4.3 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) da substância III.

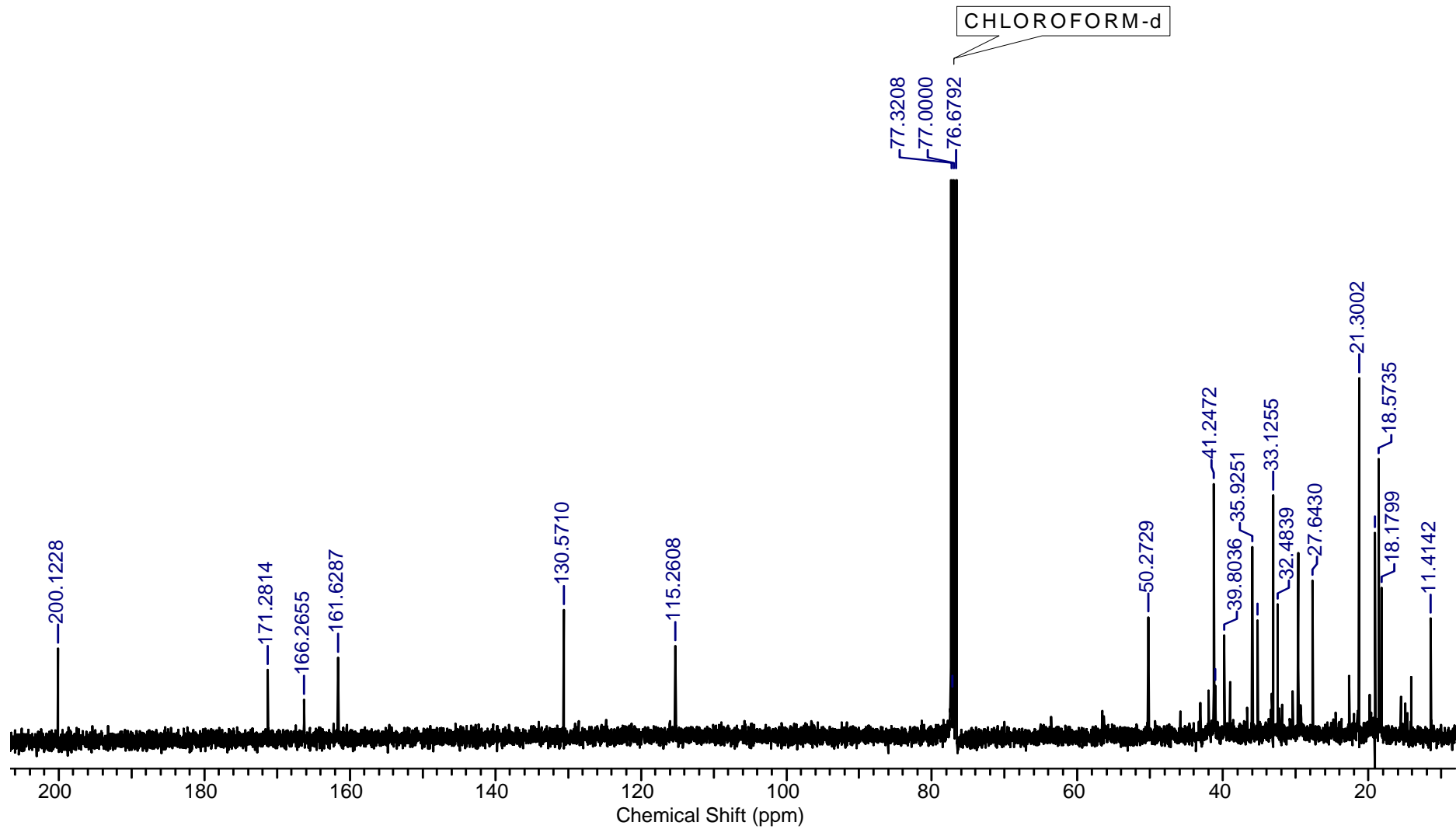


FIGURA 4.4 – Mapa de contorno HSQC da substância III (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz).

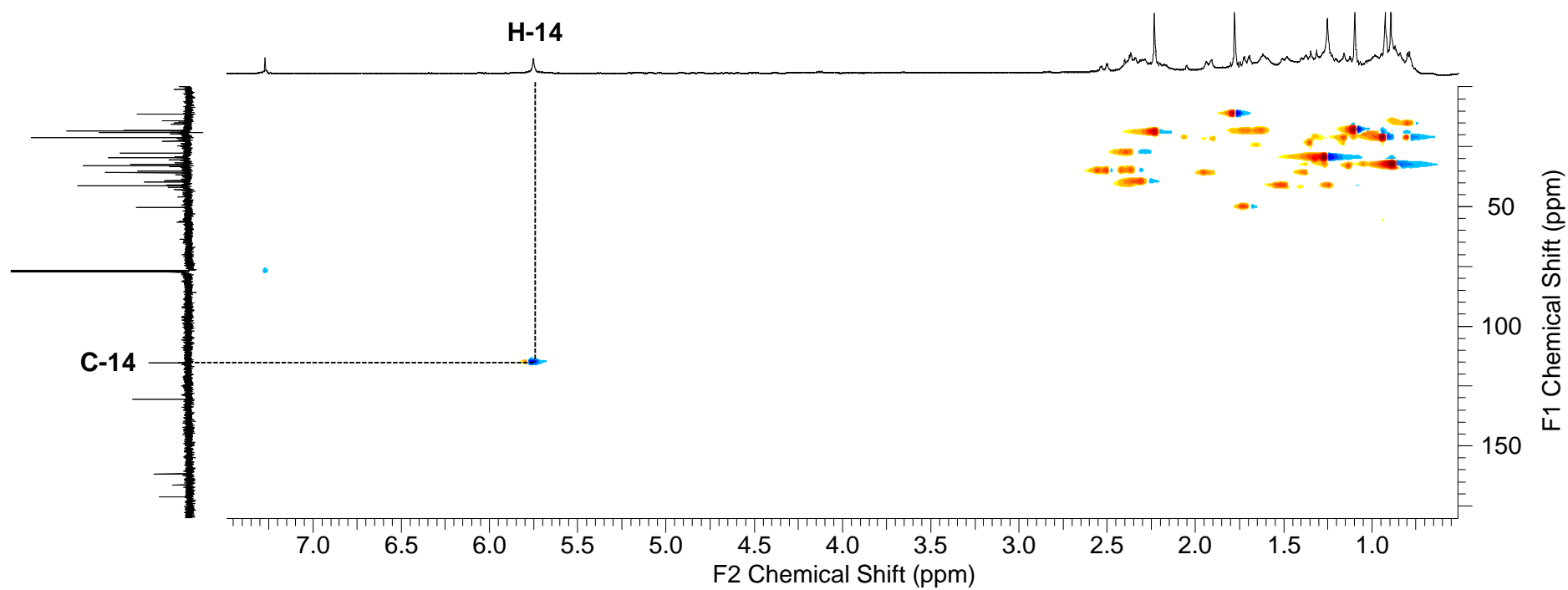
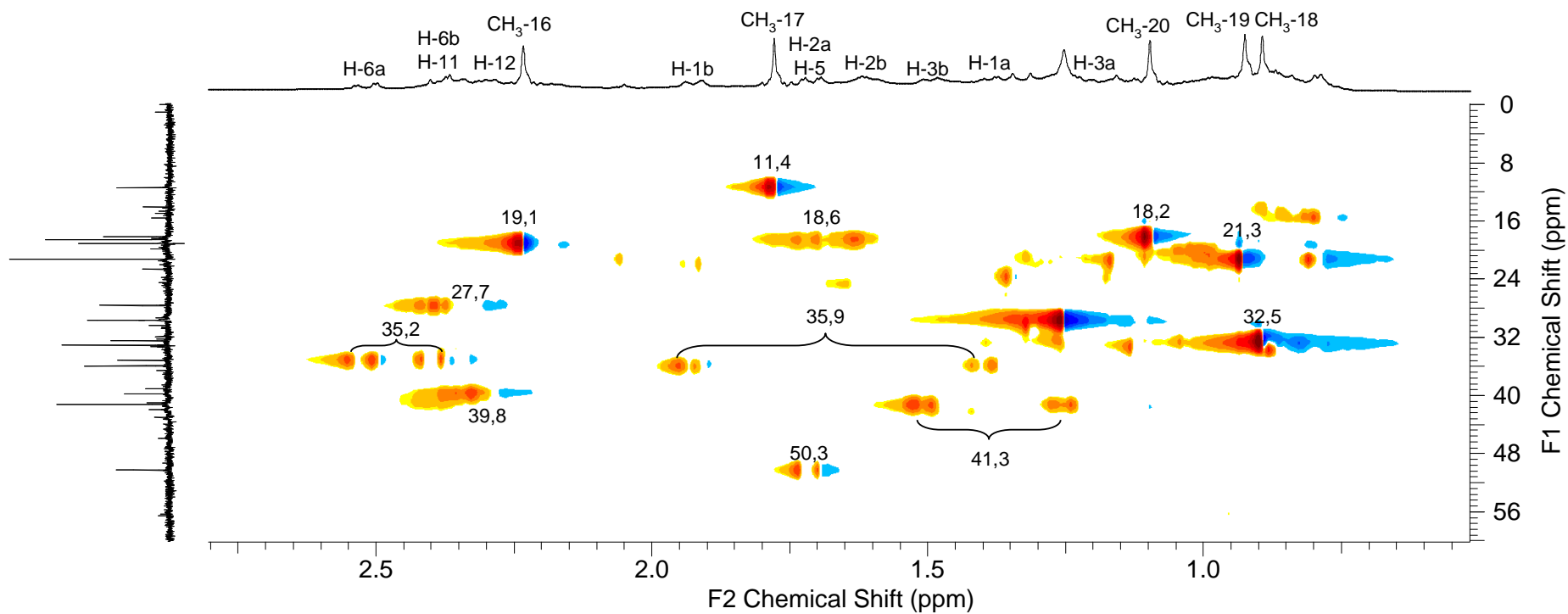


FIGURA 4.5 – Expansão do mapa de contorno HSQC da substância III (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz).



#### 4.2.3 – Identificação estrutural da substância **IV**

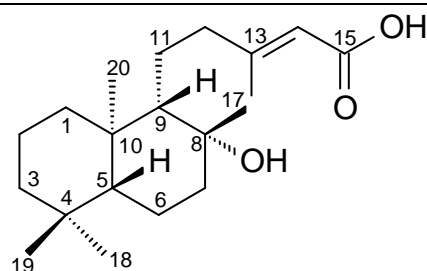
A substância **IV** foi obtida na forma de cristais brancos (94,7 mg), a partir de cromatografia em coluna da fração EPC 2, resultante do fracionamento do extrato etanólico do caule de *E. pubescens*. A amostra, quando analisada por CCD e revelada com solução ácida de vanilina apresentou-se como uma mancha roxa e quando submetida à radiação UV em comprimento de onda 254 nm uma mancha verde. A identificação estrutural foi feita utilizando as técnicas espectroscópicas uni e bidimensional de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , em comparação com dados da literatura (BARATTA, RUBERTO, TRINGALI, 1999; IMAMURA et al., 1977; MARSAIOLI, LEITÃO FILHO, CAMPELLO, 1975; PACHECO et al., 2009).

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 4.6, p. 57) da substância **IV** verificou-se a presença de cinco singletos entre  $\delta_{\text{H}}$  0,7 a 2,2 que correspondem aos hidrogênios metílicos, além de outros sinais nesta região correspondentes aos demais hidrogênios metínicos e metilênicos. Também verificou-se um singlete largo em  $\delta_{\text{H}}$  5,71 (1H) que corresponde a um hidrogênio metínico da ligação dupla, atribuído ao H-14. No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 4.7, p. 58) da substância **IV** foram observados vinte sinais de carbono entre  $\delta_{\text{C}}$  15 e 172. Os sinais na região mais blindada do espectro de  $^{13}\text{C}$  em  $\delta_{\text{C}}$  15,4; 19,4; 21,5; 23,9; 33,3 foram atribuídos aos carbonos de metilas C-20, C-16, C-18, C-17, C-19, respectivamente. Foram observados ainda sinais na região mais desblindada do espectro de  $^{13}\text{C}$  em  $\delta_{\text{C}}$  114,6 e 163,9 atribuídos aos carbonos olefínicos C-14 e C-13, respectivamente. O sinal em  $\delta_{\text{C}}$  171,6 foi atribuído ao carbono da carboxila, C-15.

Na análise do mapa de contorno de HSQC (Figuras 4.8 e 4.9, p. 59 e 60) da substância **IV** foram observadas as correlações de hidrogênios e carbonos diretamente ligados e os dados de correlação estão apresentados na Tabela 4.5 (p. 56). A comparação destes dados com os da literatura (Tabela 4.4, p. 55) permitiu identificar a estrutura como sendo o ácido  $\Delta^{13,14}$ -*ent*-labd-8 $\beta$ -ol-15-oico.

De um modo geral, diterpenoides do tipo labdano como o ácido  $\Delta^{13,14}$ -*ent*-labd-8 $\beta$ -ol-15-oico apresentam alta atividade antibacteriana. E com relação à importância comercial, diterpenoides labdanos são usados em loções na perfumaria e como um agente aromatizante na indústria de tabaco (PACHECO et al., 2009).

**TABELA 4.4** – Dados espectroscópicos de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  obtidos para a substância **IV**.



**IV**

H/C	Substância IV		BARATTA, RUBERTO, TRINGALI, 1999	
	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm) ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) ( $\text{CDCl}_3$ , 250 MHz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm) ( $\text{CDCl}_3$ , 62,5 MHz)
1a	1,62 ( <i>m</i> )	39,7	1,61 ( <i>m</i> )	39,8
1b	0,94 ( <i>m</i> )			
2a	1,64 ( <i>m</i> )	18,4	1,62 ( <i>m</i> )	-
2b	1,36 ( <i>m</i> )			
3a	1,37 ( <i>m</i> )	41,9	1,24 ( <i>m</i> )	41,9
3b	1,12 ( <i>m</i> )			
4	-	33,2	-	-
5	0,91 ( <i>m</i> )	56,0	0,89 ( <i>m</i> )	56,1
6a	1,62 ( <i>m</i> )	23,4	1,60 ( <i>m</i> )	23,5
6b	1,45 ( <i>m</i> )			
7a	1,82 ( <i>m</i> )	44,6	1,82 ( <i>m</i> )	44,7
7b	1,37 ( <i>m</i> )			
8	-	74,6	-	74,4
9	1,07 ( <i>m</i> )	61,3	1,06 ( <i>m</i> )	61,3
10	-	39,2	-	39,2
11a	1,64 ( <i>m</i> )	20,5	1,62 ( <i>m</i> )	20,5
11b	1,26 ( <i>m</i> )			
12	2,31 ( <i>m</i> )	44,5	2,30 ( <i>m</i> )	44,5
13	-	163,9	-	163,9
14	5,71 ( <i>sl</i> )	114,6	5,70 ( <i>sl</i> )	114,7
15	-	171,5	-	171,5
16	2,17 ( <i>s</i> )	19,4	2,17 ( <i>s</i> )	19,4
17	1,17 ( <i>s</i> )	23,9	1,15 ( <i>s</i> )	24,0
18	0,80 ( <i>s</i> )	21,5	0,78 ( <i>s</i> )	21,5
19	0,87 ( <i>s</i> )	33,3	0,86 ( <i>s</i> )	33,4
20	0,79 ( <i>s</i> )	15,4	0,79 ( <i>s</i> )	15,4

**TABELA 4.5** – Correlações observadas no experimento de HSQC para a substância IV.

Posição	$\delta_H$ (ppm) (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz)	$\delta_C$ (ppm) (CDCl <sub>3</sub> , 100 MHz)
1	1,62 ( <i>m</i> ) e 0,94 ( <i>m</i> )	39,7
2	1,64 ( <i>m</i> ) e 1,36 ( <i>m</i> )	18,4
3	1,37 ( <i>m</i> ) e 1,12 ( <i>m</i> )	41,9
5	0,91 ( <i>m</i> )	56,0
6	1,62 ( <i>m</i> ) e 1,45 ( <i>m</i> )	23,4
7	1,82 ( <i>m</i> ) e 1,37 ( <i>m</i> )	44,6
9	1,07 ( <i>m</i> )	61,3
11	1,64 ( <i>m</i> ) e 1,26 ( <i>m</i> )	20,5
12	2,31 ( <i>m</i> )	44,5
14	5,71 ( <i>s</i> )	114,6
16	2,17 ( <i>s</i> )	19,4
17	1,17 ( <i>s</i> )	23,9
18	0,80 ( <i>s</i> )	21,5
19	0,87 ( <i>s</i> )	33,3
20	0,79 ( <i>s</i> )	15,4

FIGURA 4.6 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) da substância IV.

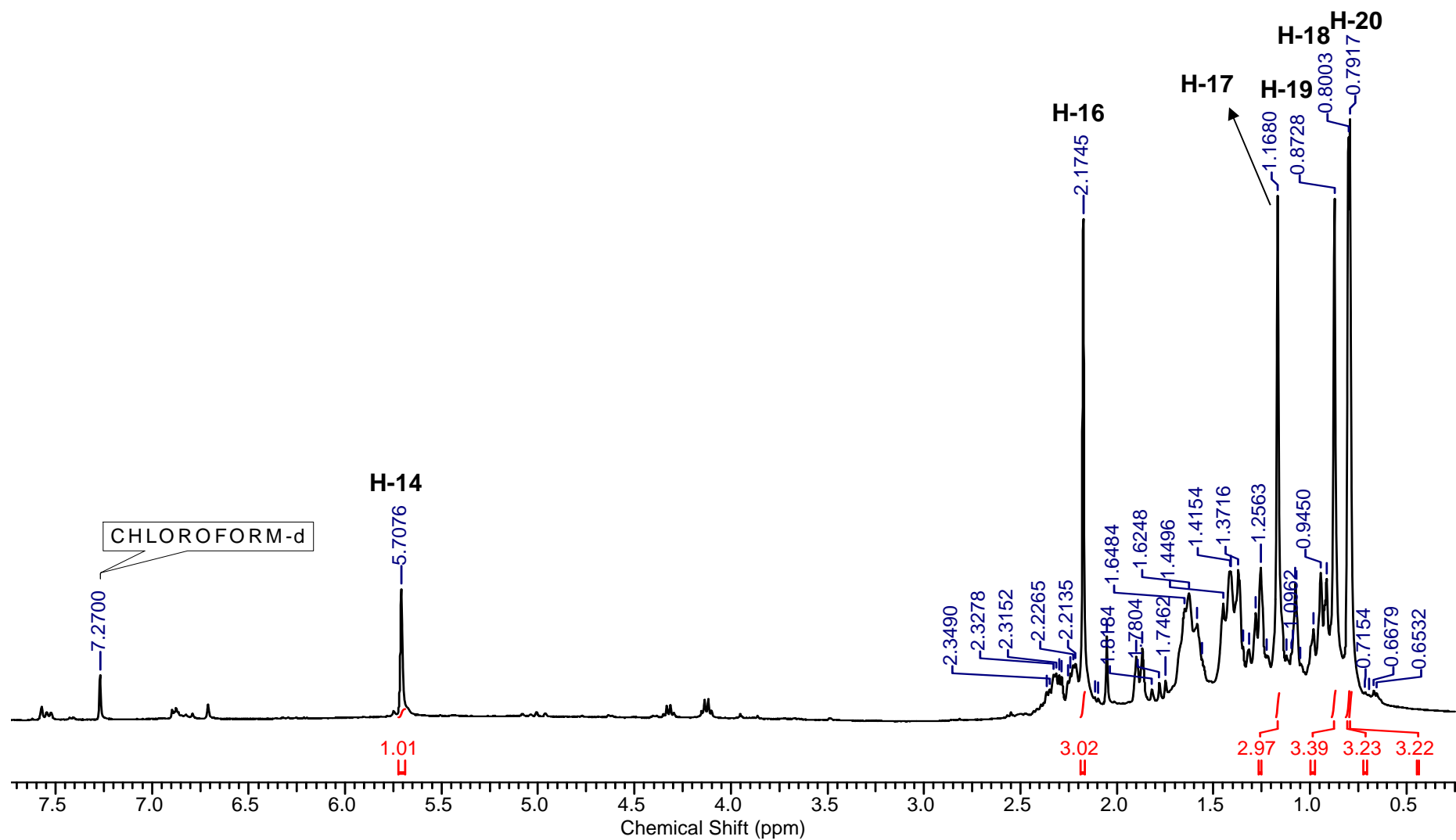
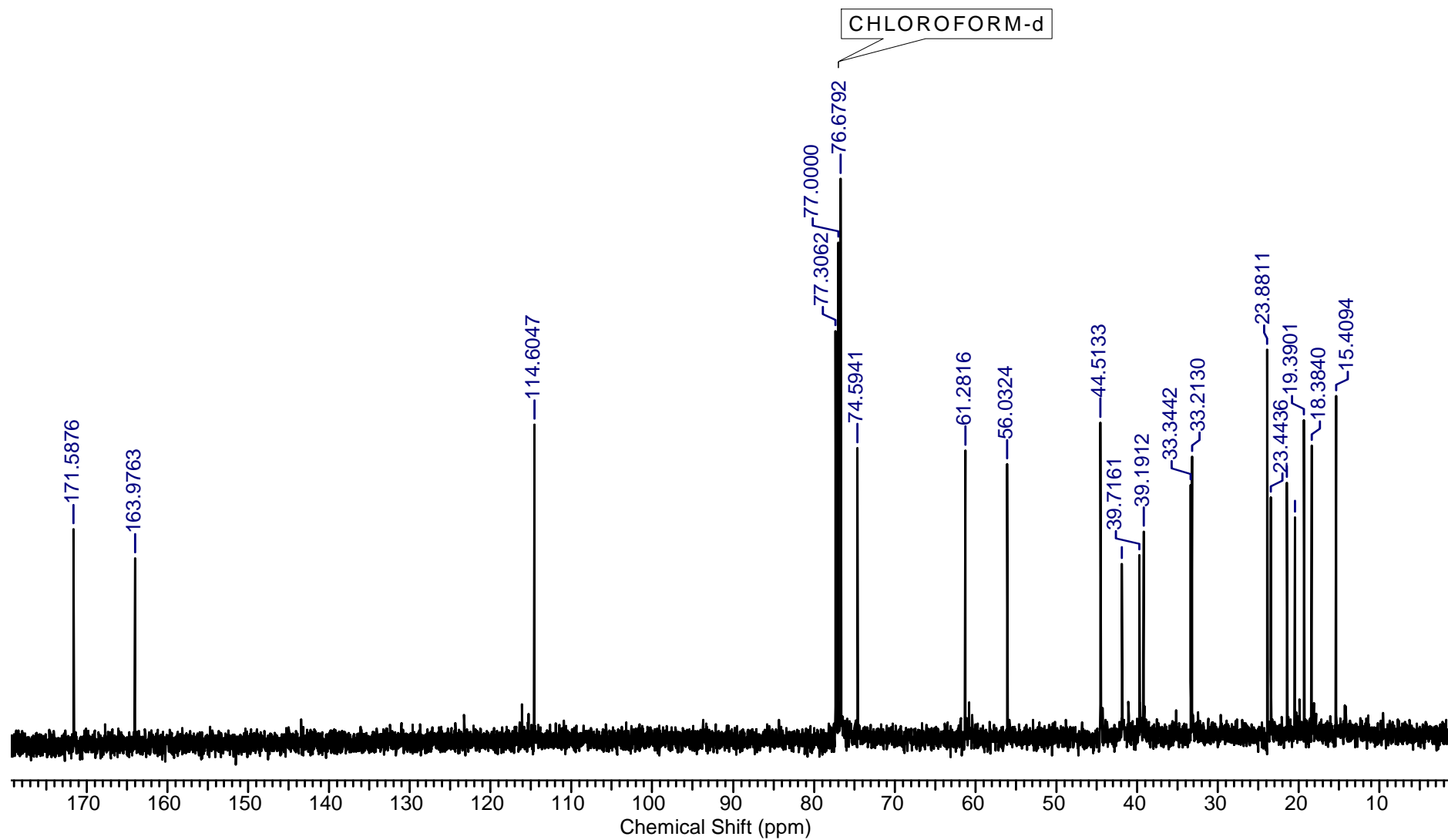


FIGURA 4.7 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) da substância IV.



**FIGURA 4.8** – Mapa de contorno HSQC da substância **IV** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz).

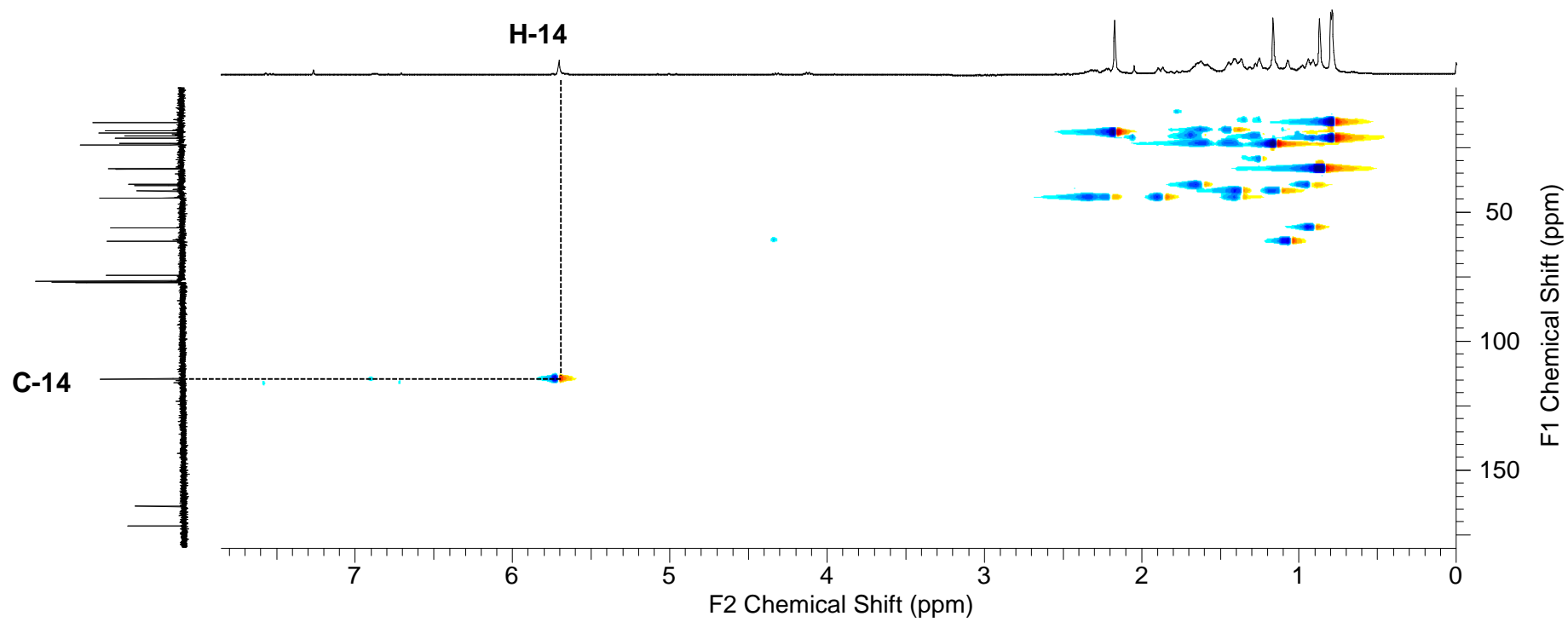
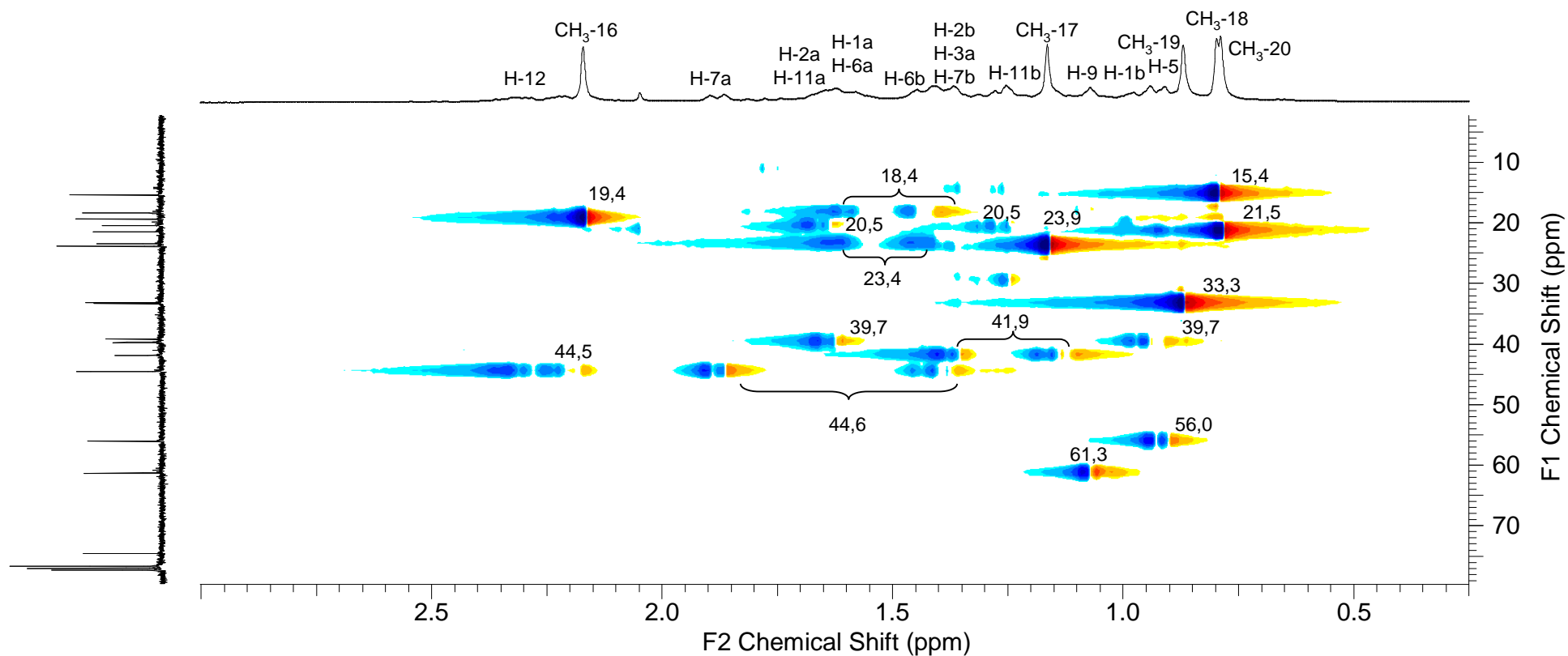


FIGURA 4.9 – Expansão do mapa de contorno HSQC da substância IV (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz).



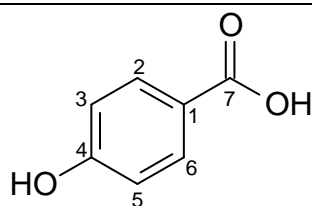
#### 4.2.4 – Identificação estrutural da substância **V**

A substância **V** foi obtida na forma de um sólido marrom (43,9 mg), a partir de cromatografia em coluna da fração EPC 2, resultante do fracionamento do extrato etanólico do caule de *E. pubescens*. A amostra foi analisada por CCD e apresentou-se como uma mancha cinza-azulada quando revelada com solução ácida de vanilina, uma mancha verde e azul quando submetida à radiação UV em comprimento de onda 254 nm e 365 nm, respectivamente. A identificação estrutural foi realizada utilizando as técnicas espectroscópicas uni e bidimensional de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , em comparação com dados da literatura (CHEN et al., 2010; DHAKAL et al., 2009; ZHANG et al., 2012).

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 4.10, p.63) da substância **V** verificou-se a presença de sinais na região de hidrogênios aromáticos, sendo um dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  6,81 ( $J = 8,8$  Hz, 2H) e um dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  7,87 ( $J = 8,9$  Hz, 2H) atribuídos aos hidrogênios H-3 e H-5; H-2 e H-6, respectivamente. No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 4.11, p. 64) da substância **V** foram observados cinco sinais de carbono entre  $\delta_{\text{C}}$  115 e 171, sendo os sinais mais desblindados  $\delta_{\text{C}}$  163,3 e 170,5 atribuídos aos carbonos carbinólico (C-4) e carboxílico (C-7). Na análise do mapa de contorno de HSQC (Figura 4.12, p. 65) da substância **V** foram observadas as correlações de hidrogênios e carbonos diretamente ligados (Tabela 4.7, p. 62). A comparação destes dados com os da literatura (Tabela 4.6, p. 62) permitiu identificar a estrutura como sendo o ácido *p*-hidroxibenzoico ou ácido 4-hidroxibenzoico.

O ácido *p*-hidroxibenzoico ocorre naturalmente em diversas espécies vegetais, dentre elas: cenoura, uva, ameixa amarela, entre outras. Estudos demonstram que o ácido *p*-hidroxibenzoico possui atividade antimicrobiana, antimutagênica, hipoglicemiante, anti-inflamatória, antiviral, antioxidante, entre outras. Além disso, também é utilizado como conservante em muitos produtos cosméticos, farmacêuticos, alimentícios e bebidas (MANUJA et al., 2013).

**TABELA 4.6** – Dados espectroscópicos de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  obtidos para a substância **V**.



**V**

H/C	Substância V		DHAKAL et al., 2009	
	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm) ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm) ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz)
1	-	123,2	-	122,6
2 e 6	7,87 ( <i>d</i> , $J = 8,8$ Hz)	133,1	7,87 ( <i>d</i> , $J = 8,80$ Hz)	132,9
3 e 5	6,81 ( <i>d</i> , $J = 8,9$ Hz)	116,1	6,81 ( <i>d</i> , $J = 8,76$ Hz)	116,0
4	-	163,3	-	163,3
7	-	170,5	-	170,1

**TABELA 4.7** – Correlações observadas no experimento de HSQC para a substância **V**.

Posição	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm) ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz)
2 e 6	7,87	133,1
3 e 5	6,81	116,1

FIGURA 4.10 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) da substância V.

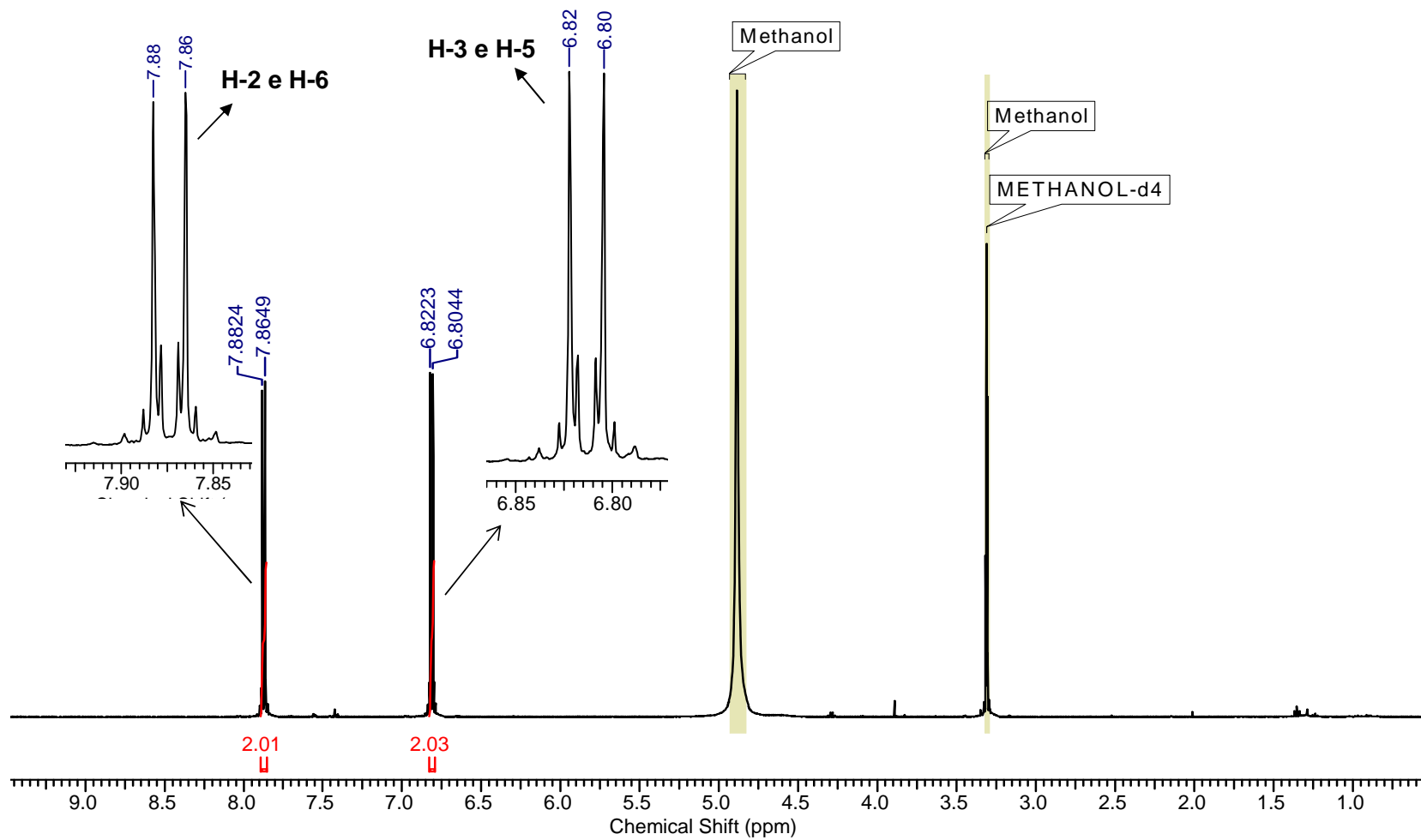
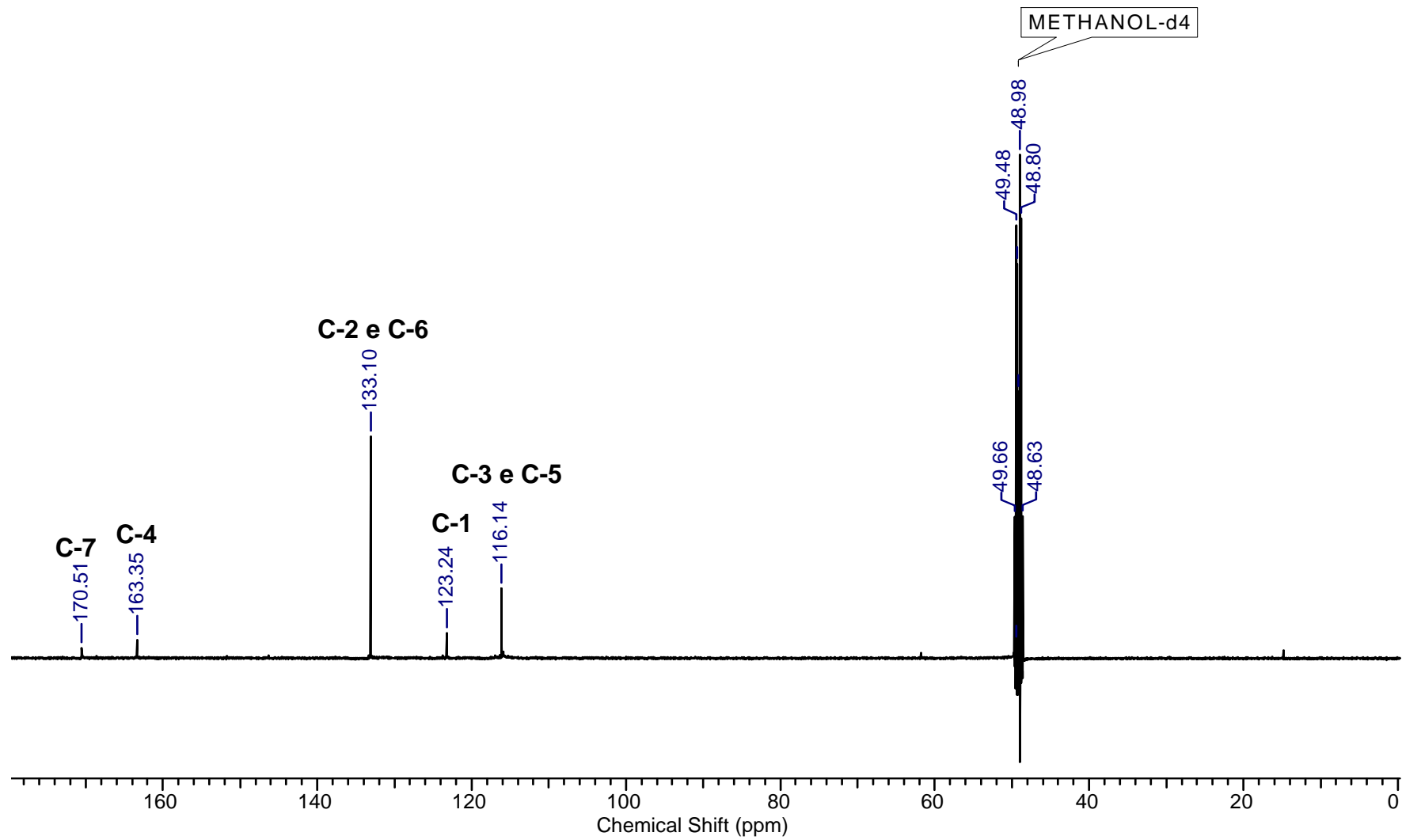
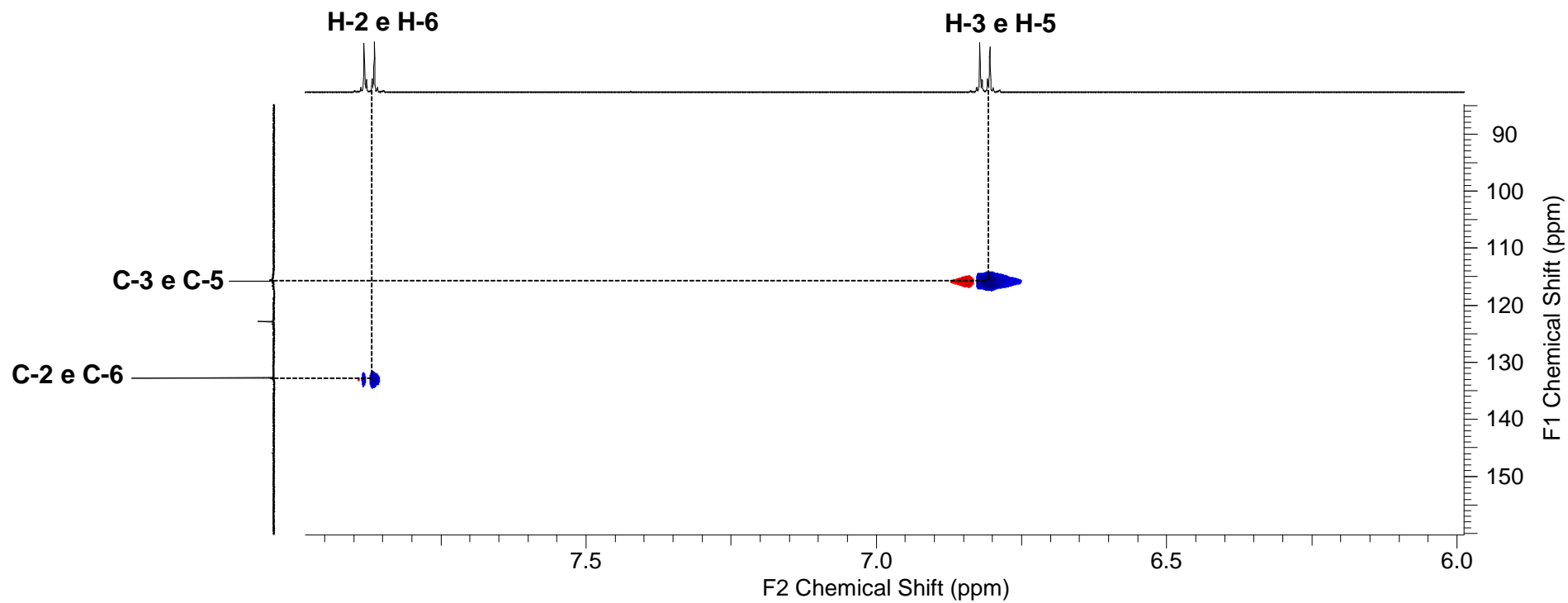


FIGURA 4.11 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz) da substância V.



**FIGURA 4.12** – Mapa de contorno HSQC da substância **V** (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz).



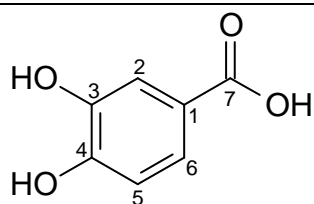
#### 4.2.5 – Identificação estrutural da substância VI

A substância VI foi obtida na forma de um sólido amarelo (148,3 mg), a partir de cromatografia em coluna da fração EPC 2, resultante do fracionamento do extrato etanólico do caule de *E. pubescens*. A amostra, quando analisada por CCD e revelada com solução ácida de vanilina, apresentou-se como uma mancha cinza. Manchas verde e azul foram observadas quando submetidas à radiação UV em comprimento de onda 254 nm e 365 nm, respectivamente. A identificação estrutural foi feita utilizando as técnicas espectroscópicas uni e bidimensional de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , em comparação com dados da literatura (HE et al., 2009; LEE et al., 2011; SOUZA FILHO et al., 2006).

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 4.13, p. 68) da substância VI verificou-se a presença de sinais na região de hidrogênios aromáticos, sendo um dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  6,79 ( $J = 7,8$  Hz, 1H), um dubleto largo em  $\delta_{\text{H}}$  7,41 ( $J = 2,0$  Hz, 1H) e um singlete largo em  $\delta_{\text{H}}$  7,44 (1H) atribuídos aos hidrogênios H-5, H-6 e H-2, respectivamente. No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 4.14, p. 69) da substância VI foram observados sete sinais de carbono entre  $\delta_{\text{C}}$  115 e 171, sendo os sinais mais desblindados  $\delta_{\text{C}}$  146,2; 151,6 e 170,4 atribuídos aos carbonos carbinólicos (C-3 e C-4) e carboxílico (C-7). Na análise do mapa de contorno de HSQC (Figura 4.15, 70) da substância VI foram observadas as correlações de hidrogênios e carbonos diretamente ligados. Sendo observada também correlação não direta, em *meta*, do H-2 com o C-6 (Tabela 4.9, p. 67). A comparação destes dados com os da literatura (Tabela 4.8, p. 67) permitiu identificar a estrutura como sendo o ácido 3,4-diidroxibenzoico ou ácido protocatecuico.

O ácido 3,4-diidroxibenzoico está presente em muitas plantas comestíveis e medicinais, tais como cebola, ameixa, malva, erva de São João, entre outras. Pesquisas realizadas nos últimos anos indicam que esta substância pode ser utilizada na medicina convencional para a prevenção de câncer e doenças cardiovasculares. O mecanismo da ação preventiva do ácido 3,4-diidroxibenzoico está baseado em suas propriedades antioxidantes e na sua capacidade de aumentar a atividade catalítica de enzimas envolvidas na neutralização de radicais livres. Além disso, o ácido 3,4-diidroxibenzoico possui atividade antibacteriana, anticancerígena, antiúlcera, antidiabética, antiviral, anti-inflamatória, analgésica, hepatoprotetora e neuroprotetora (KAKKAR & BAIS, 2014; TANAKA, TANAKA, TANAKA, 2011).

**TABELA 4.8** – Dados espectroscópicos de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  obtidos para a substância **VI**.



**VI**

H/C	Substância VI		LEE et al., 2011	
	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm) ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 100 MHz)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 MHz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm) ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 150 MHz)
1	-	123,3	-	123,8
2	7,44 ( <i>sl</i> )	117,8	7,43 ( <i>d</i> , $J = 1,8$ Hz)	117,7
3	-	146,2	-	146,3
4	-	151,6	-	151,4
5	6,79 ( <i>d</i> , $J = 7,8$ Hz)	115,9	6,78 ( <i>d</i> , $J = 7,8$ Hz)	115,7
6	7,41 ( <i>dl</i> , $J = 2,0$ Hz)	124,0	7,40 ( <i>dd</i> , $J = 7,8$ e $1,8$ Hz)	123,5
7	-	170,4		170,5

**TABELA 4.9** – Correlações observadas no experimento de HSQC para a substância **VI**.

Posição	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm) ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 100 MHz)
2	7,44	117,8
5	6,79	115,9
2 e 6	7,41; 7,44	124,0

FIGURA 4.13 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz) da substância VI.

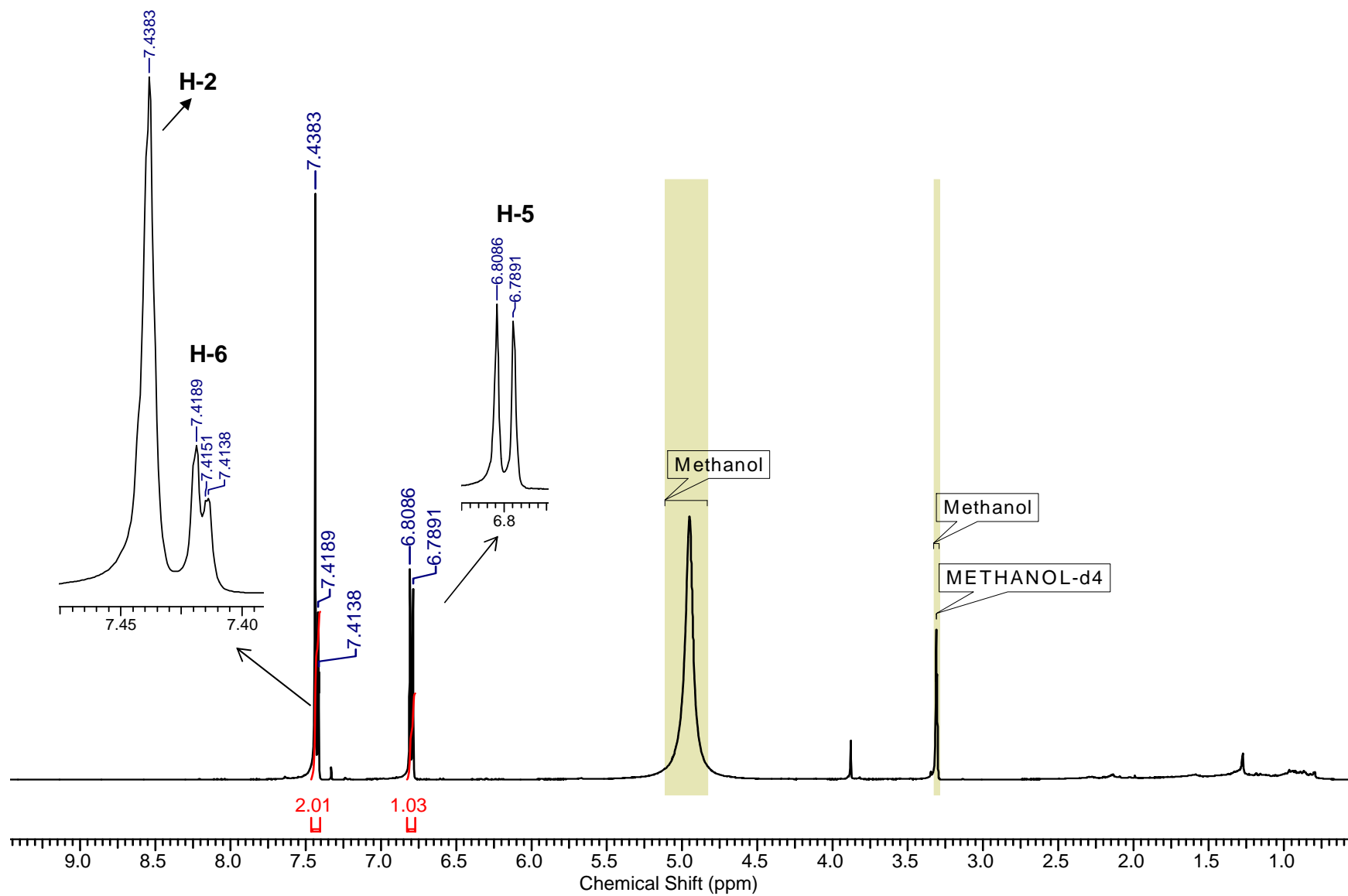


FIGURA 4.14 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 100 MHz) da substância VI.

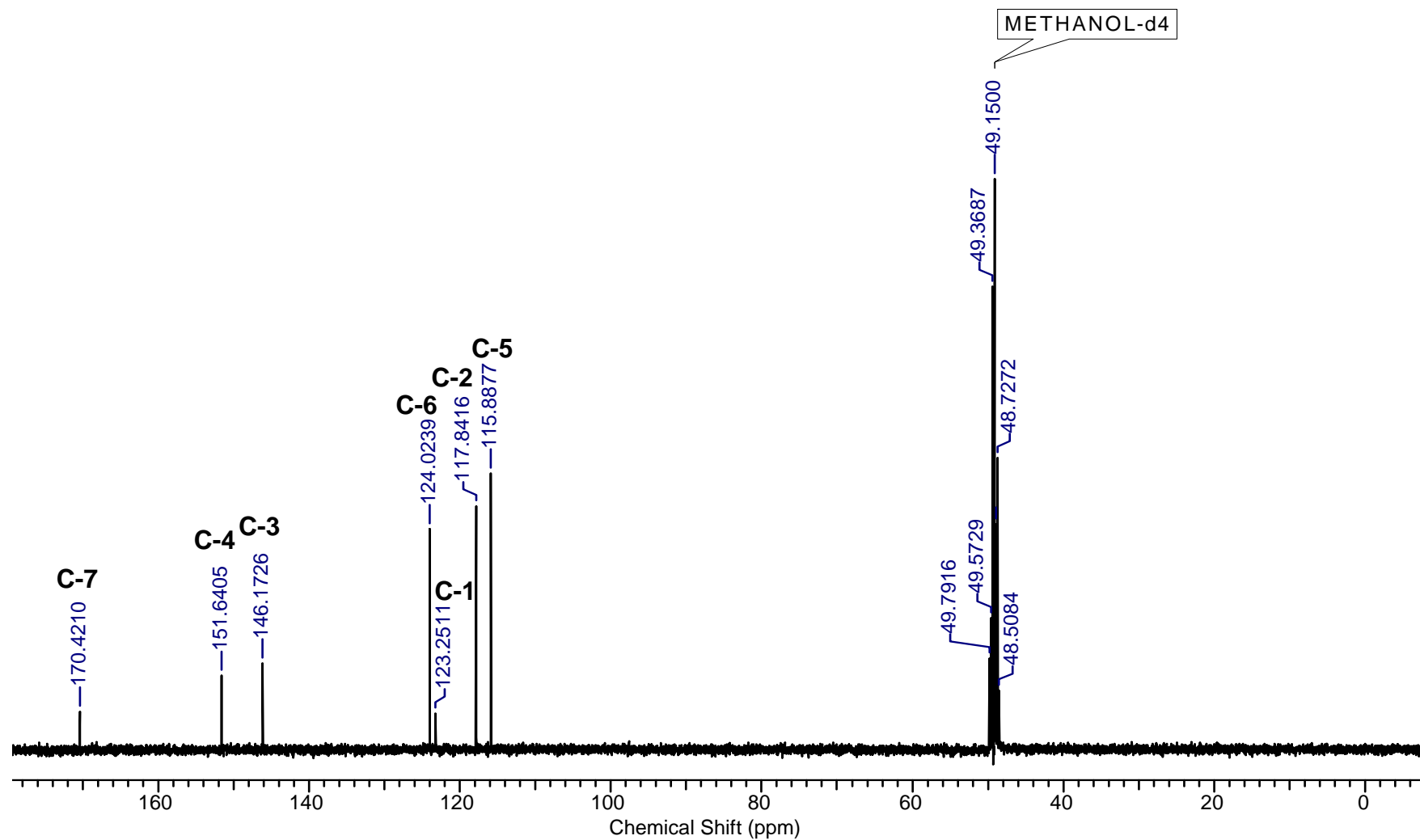
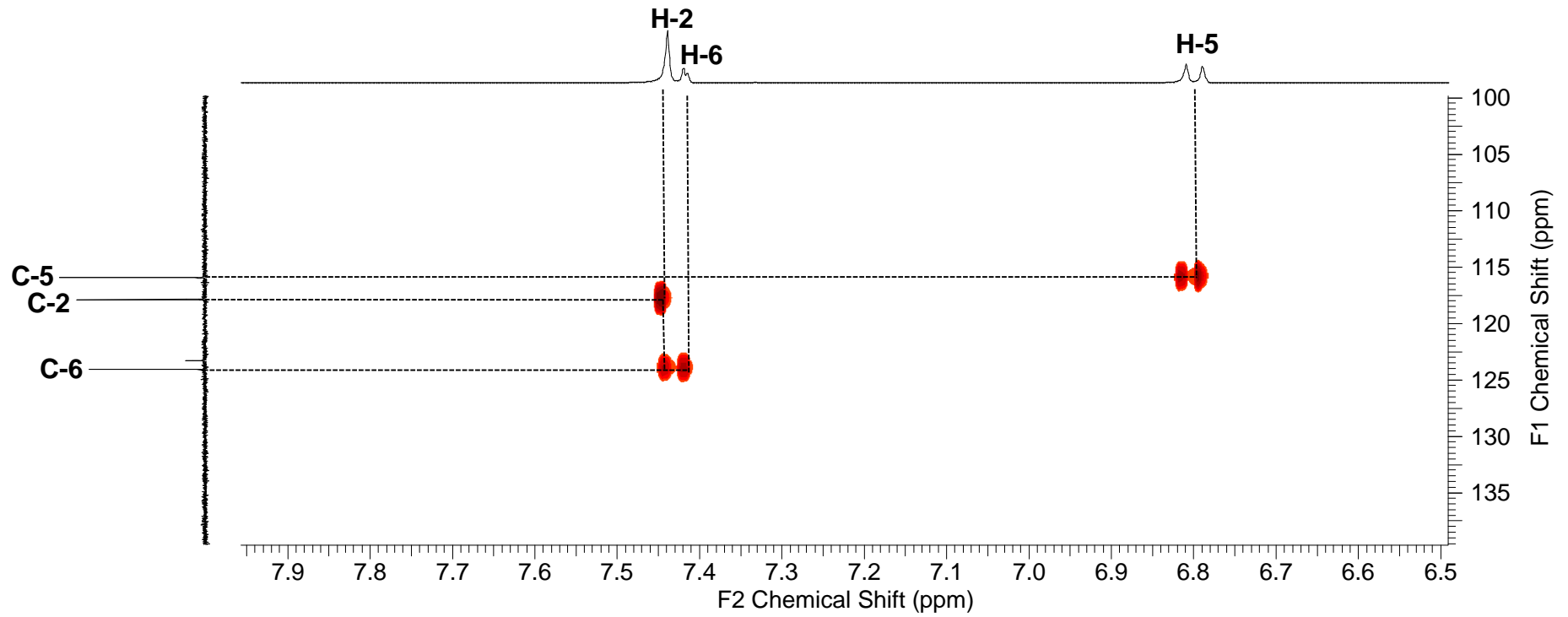


FIGURA 4.15 – Mapa de contorno HSQC da substância VI (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz).



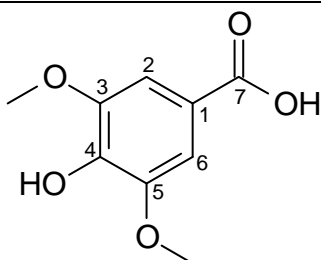
#### 4.2.6 – Identificação estrutural da substância **VII**

A substância **VII** foi obtida na forma de um sólido marrom (8,1 mg), a partir de cromatografia em coluna da fração EPC 3, resultante do fracionamento do extrato etanólico do caule de *E. pubescens*. A amostra quando analisada por CCD, apresentou uma mancha cinza quando revelada com solução ácida de vanilina, mancha verde e azul quando submetida à radiação UV em comprimento de onda 254 nm e 365 nm, respectivamente. A identificação estrutural foi feita utilizando as técnicas espectroscópicas uni e bidimensional de RMN de  $^1\text{H}$  e HSQC, em comparação com dados da literatura (ABBAS et al., 2007; ORABI et al., 2013; ŚWISŁOCKA et al., 2013).

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 4.16, p. 73) da substância **VII** verificou-se a presença de um singlete em  $\delta_{\text{H}}$  7,33 (2H), atribuído aos hidrogênios aromáticos H-2 e H-6. Foi observado ainda um singlete em  $\delta_{\text{H}}$  3,88 (6H) atribuído aos hidrogênios das metoxilas (3-OCH<sub>3</sub> e 5-OCH<sub>3</sub>). Na análise do mapa de contorno de HSQC (Figura 4.17, p. 74) da substância **VII** foram observadas as correlações de hidrogênios e carbonos diretamente ligados (Tabela 4.11, p. 72). A comparação destes dados com os da literatura (Tabela 4.10, p. 72) permitiu identificar a estrutura como sendo o ácido 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoico ou ácido siríngico.

O ácido siríngico é um composto fenólico de ocorrência natural, abundantemente presente em cereais como cevada, milho, painço, aveia, arroz, centeio, sorgo e trigo, além de encontrado em vegetais como rabanete. O ácido siríngico possui diversas atividades biológicas, tais como: atividade antioxidante, antiproliferativa, antisséptica, anticancerígena e hepatoprotetora (KARTHIK et al., 2014; SRINIVASAN et al., 2014).

**TABELA 4.10** – Dados espectroscópicos de RMN de  $^1\text{H}$  obtidos para a substância **VII**.



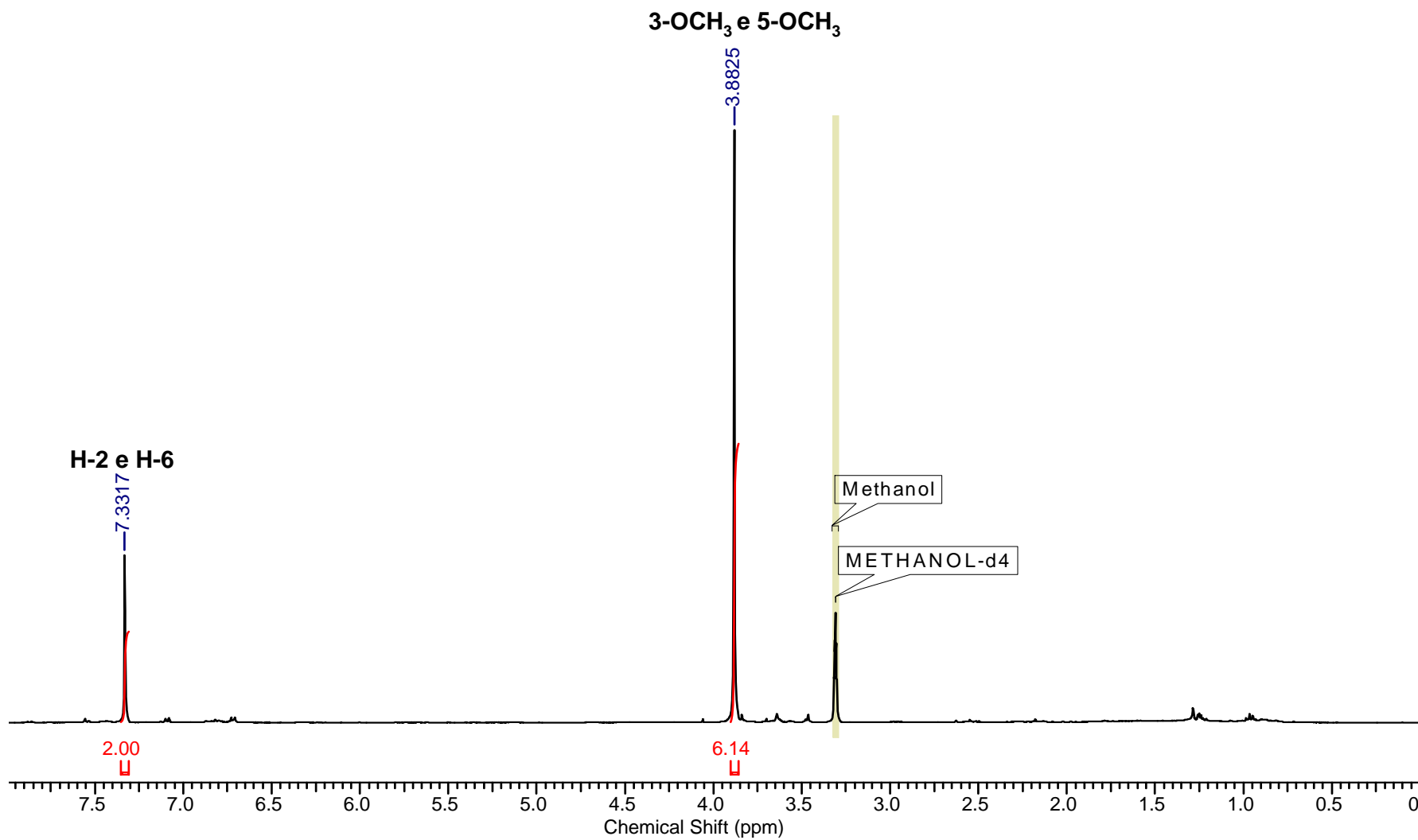
**VII**

H	Substância VII	ABBAS et al., 2007
	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz)
2 e 6	7,33 (s)	7,35 (s)
3-OCH <sub>3</sub> e 5-OCH <sub>3</sub>	3,88 (s)	3,90 (s)

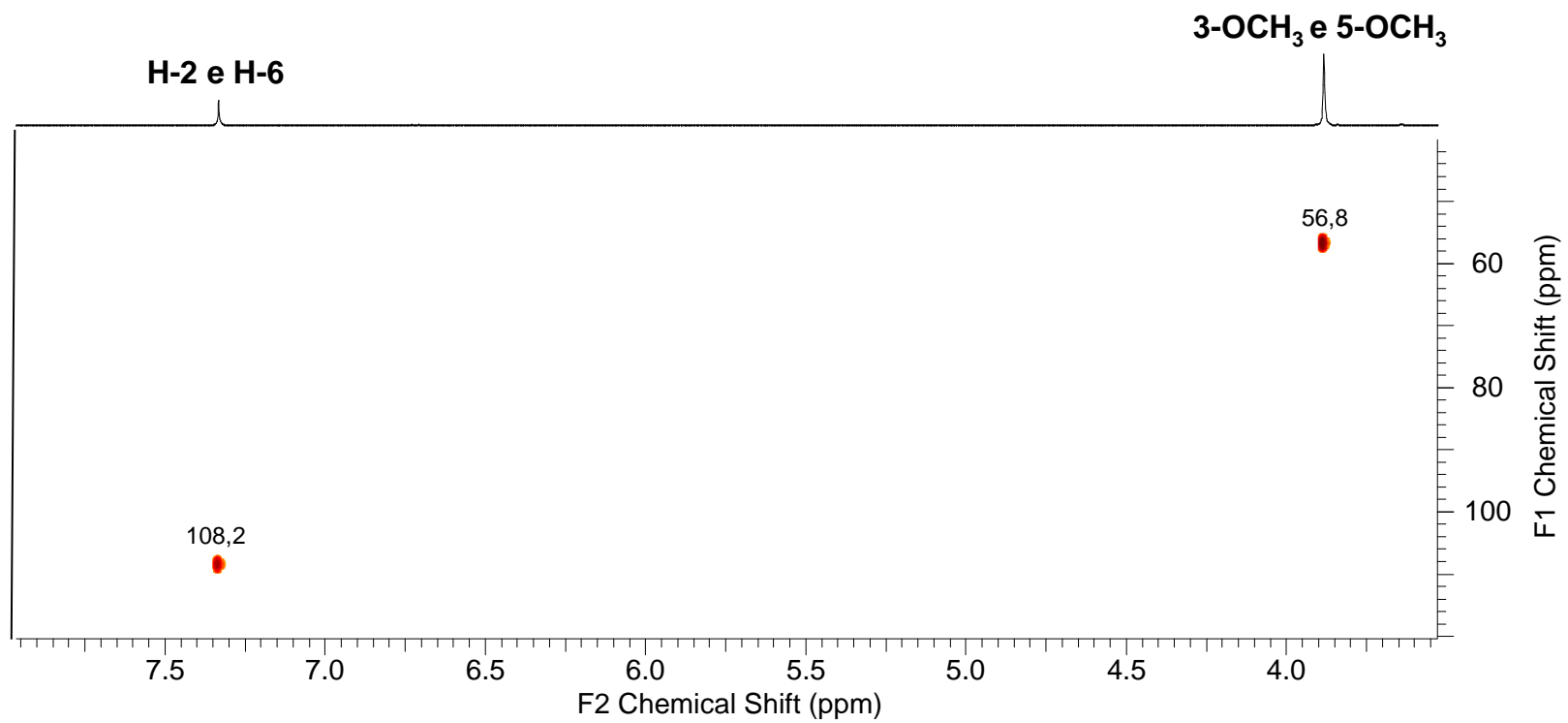
**TABELA 4.11** – Correlações observadas no experimento de HSQC para a substância **VII**.

Posição	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm) ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 100 MHz)
2 e 6	7,33	108,2
3-OCH <sub>3</sub> e 5-OCH <sub>3</sub>	3,88	56,8

FIGURA 4.16 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz) da substância VII.



**FIGURA 4.17** – Mapa de contorno HSQC da substância **VII** (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz).



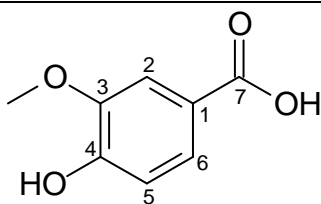
#### 4.2.7 – Identificação estrutural da substância **VIII**

A substância **VIII** foi obtida na forma de um sólido marrom (5,1 mg), a partir de cromatografia em coluna da fração EPC 3, resultante do fracionamento do extrato etanólico do caule de *E. pubescens*. A amostra, quando analisada por CCD e revelada com solução ácida de vanilina, apresentou uma mancha cinza. Quando submetida à radiação UV em comprimento de onda 254 nm e 365 nm, apresentou respectivamente uma mancha verde e azul. A identificação estrutural foi feita utilizando as técnicas espectroscópicas uni e bidimensional de RMN de  $^1\text{H}$  e HSQC, em comparação com dados da literatura (RAJENDIRAN & JENITA, 2015; ŚWISŁOCKA et al., 2013; ZHANG et al., 2009).

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 4.18, p. 77) da substância **VIII** verificou-se a presença de vários sinais na região de hidrogênios aromáticos. Dois dubletos em  $\delta_{\text{H}}$  6,76 ( $J = 8,3$  Hz, 1H) e  $\delta_{\text{H}}$  7,43 ( $J = 1,8$  Hz, 1H) foram atribuídos aos hidrogênios H-5 e H-2, respectivamente. Observou-se ainda um duplo dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  7,39 ( $J = 1,8$  e 8,3 Hz, 1H) que indica o acoplamento *meta* entre H-2 e H-6, e acoplamento *orto* entre H-5 e H-6. Foi observado ainda um singlete em  $\delta_{\text{H}}$  3,88 (3H) atribuído aos hidrogênios da metoxila (3-OCH<sub>3</sub>). Na análise do mapa de contorno de HSQC (Figura 4.19, p. 78) da substância **VIII** foram observadas as correlações de hidrogênios e carbonos diretamente ligados (Tabela 4.13, p. 76). A comparação destes dados com os da literatura (Tabelas 4.12, p. 76) permitiu identificar a estrutura como sendo o ácido 3-metoxi-4-hidroxibenzoico ou ácido vanílico.

O ácido vanílico é um derivado de ácido benzoico utilizado como agente aromatizante. A maior quantidade de ácido vanílico, em plantas, foi encontrada nas raízes de *Angelica sinensis* (Apiaceae), que é utilizada na medicina tradicional chinesa. Vários estudos têm evidenciado a eficácia do ácido vanílico no tratamento de doenças imunes ou inflamatórias e também seu efeito hepatoprotetor. Além disso, o ácido vanílico possui efeito benéfico na colite ulcerativa, indicando assim a sua utilidade na regulação de inflamação intestinal crônica (KIM et al., 2010).

**TABELA 4.12** – Dados espectroscópicos de RMN de  $^1\text{H}$  obtidos para a substância **VIII**.



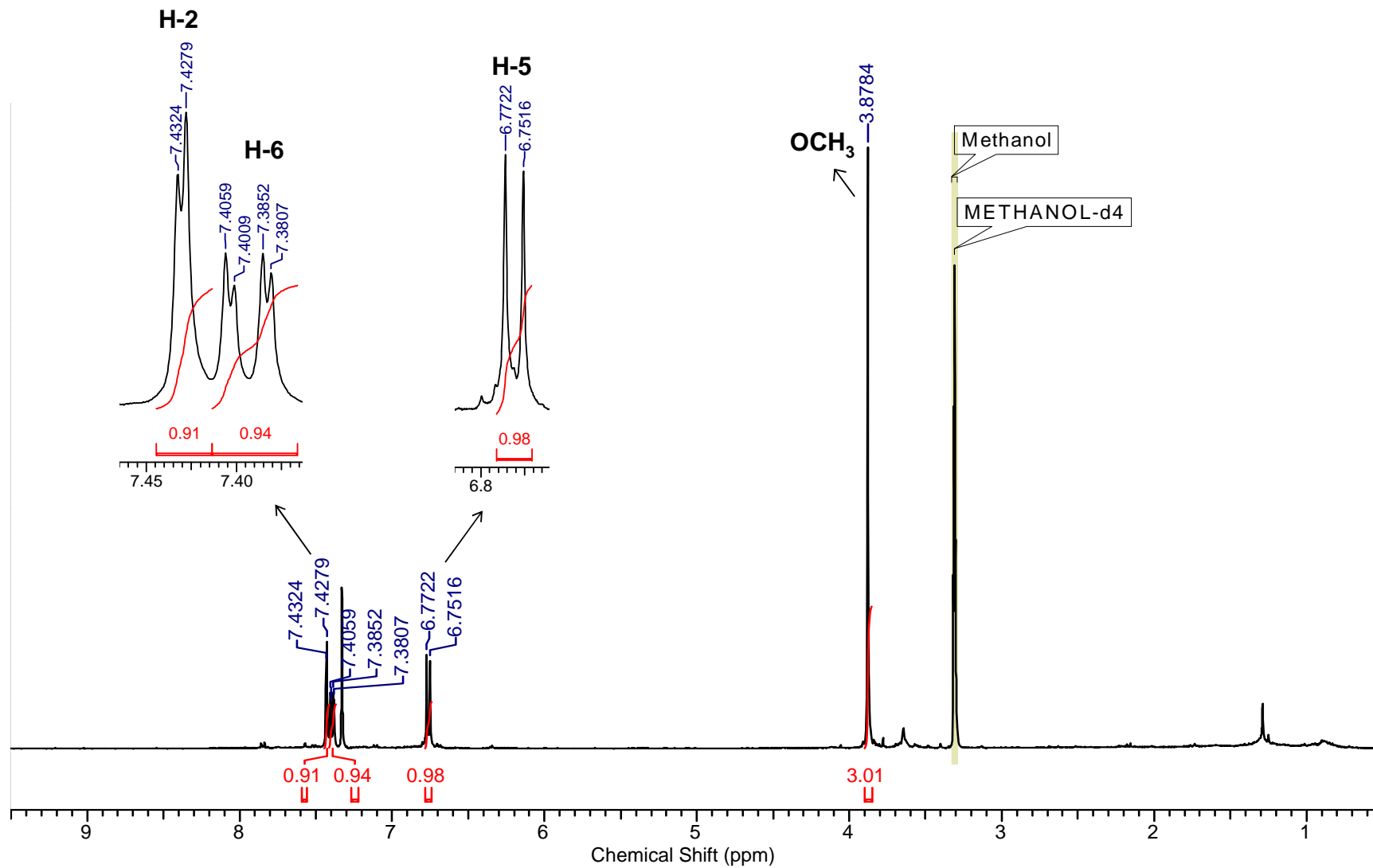
**VIII**

H	Substância VIII	ZHANG et al., 2009
	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz)
2	7,43 ( <i>d</i> , $J = 1,8$ Hz)	7,43 ( <i>d</i> , $J = 1,8$ Hz)
5	6,76 ( <i>d</i> , $J = 8,3$ Hz)	6,78 ( <i>d</i> , $J = 8,2$ Hz)
6	7,39 ( <i>dd</i> , $J = 8,3$ e $1,8$ Hz)	7,46 ( <i>dd</i> , $J = 8,2$ e $1,8$ Hz)
$\text{OCH}_3$	3,88 (s)	3,77 (s)

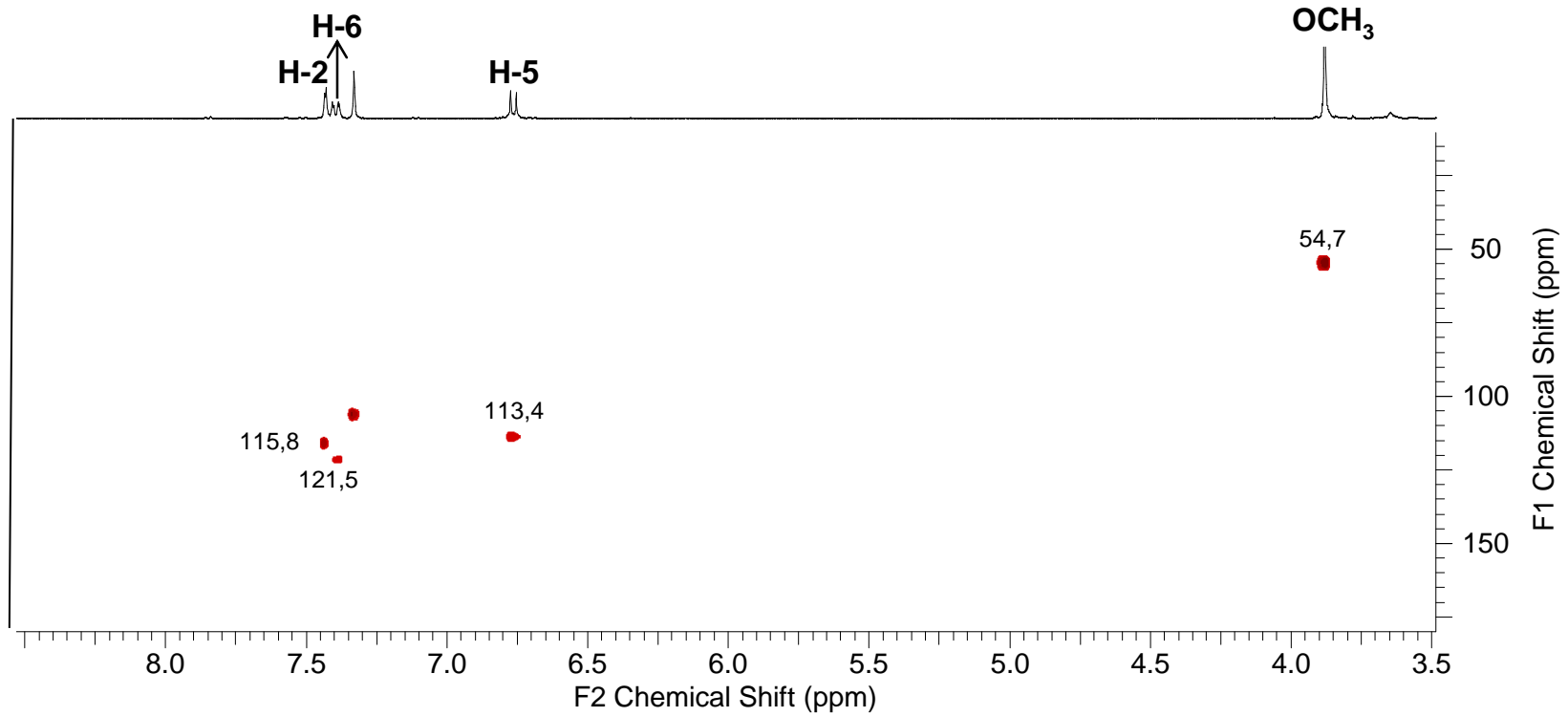
**TABELA 4.13** – Correlações observadas no experimento de HSQC para a substância **VIII**.

Posição	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm) ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 100 MHz)
2	7,43	115,8
5	6,76	113,4
6	7,39	121,5
$\text{OCH}_3$	3,88	54,7

FIGURA 4.18 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz) da substância VIII.



**FIGURA 4.19** – Mapa de contorno HSQC da substância **VIII** (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz).



#### 4.2.8 – Identificação estrutural da substância **IX**

A substância **IX** foi obtida na forma de um sólido amarelo (2,1 mg), a partir de cromatografia em coluna da fração EPC 3, resultante do fracionamento do extrato etanólico do caule de *E. pubescens*. A amostra, quando analisada por CCD e revelada com solução ácida de vanilina, apresentou-se como uma mancha amarela, uma mancha cinza e outra amarela quando submetida à radiação UV em comprimento de onda 254 nm e 365 nm, respectivamente. A identificação estrutural foi feita utilizando a técnica espectroscópica de RMN de  $^1\text{H}$ , em comparação com dados da literatura (ADEROGBA et al., 2013; KOOLEN et al., 2012).

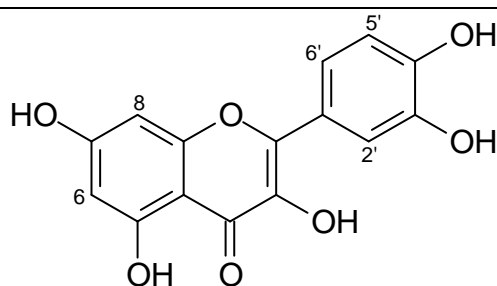
No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 4.20, p. 81) da substância **IX** verificou-se a presença de sinais na região de hidrogênios aromáticos, sendo dois dubletos em  $\delta_{\text{H}}$  6,19 ( $J = 1,8$  Hz, 1H) e  $\delta_{\text{H}}$  6,40 ( $J = 1,8$  Hz, 1H), correspondentes a H-6 e H-8, respectivamente. Este conjunto de sinais é característico de acoplamento *meta* de anel aromático, sendo atribuído ao anel A de um flavonoide substituído em C-5 e C-7. Ainda nesta mesma região foram observados dois dubletos em  $\delta_{\text{H}}$  6,90 ( $J = 8,5$  Hz, 1H) e  $\delta_{\text{H}}$  7,74 ( $J = 2,0$  Hz, 1H), atribuídos respectivamente aos hidrogênios H-5' e H-2', e um duplo dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  7,63 ( $J = 8,5$  e 2,0 Hz, 1H) atribuído a H-6'. Este conjunto de sinais indica acoplamento *meta* entre H-2' e H-6', e acoplamento *orto* entre H-5' e H-6', caracterizando assim que o anel B do flavonoide é substituído em C-3' e C-4'. A comparação destes dados com os da literatura (Tabelas 4.14, p. 80) permitiu identificar a estrutura como sendo o flavonoide quercetina.

Também foi possível confirmar a identidade da substância **IX** através do cromatograma obtidos por CLAE com detecção no comprimento de onda 360 nm (Figura 4.21, p. 82). Onde observou-se um único pico de alta intensidade com tempo de retenção de 14,07 minutos, sendo este o mesmo tempo de retenção obtido para a quercetina padrão quando analisada nas mesmas condições cromatográficas.

A quercetina é um flavonoide amplamente encontrado em frutas, vegetais e nozes, tais como: alface, pimenta, cebola, tomate, brócolis, maçã, entre outros. Esse flavonoide possui diversas aplicações terapêuticas atribuídas principalmente a sua alta atividade antioxidante. Estudos têm

demonstrado que a quercetina exerce efeito neuroprotetor e aumenta a resistência dos neurônios ao estresse oxidativo. Além disso, possui atividade anti-inflamatória, anticancerígena, hepatoprotetora, atuando também como agente no controle da ansiedade e como auxiliar na melhora cognitiva (SABOGAL-GUÁQUETA et al., 2015; WU et al., 2008).

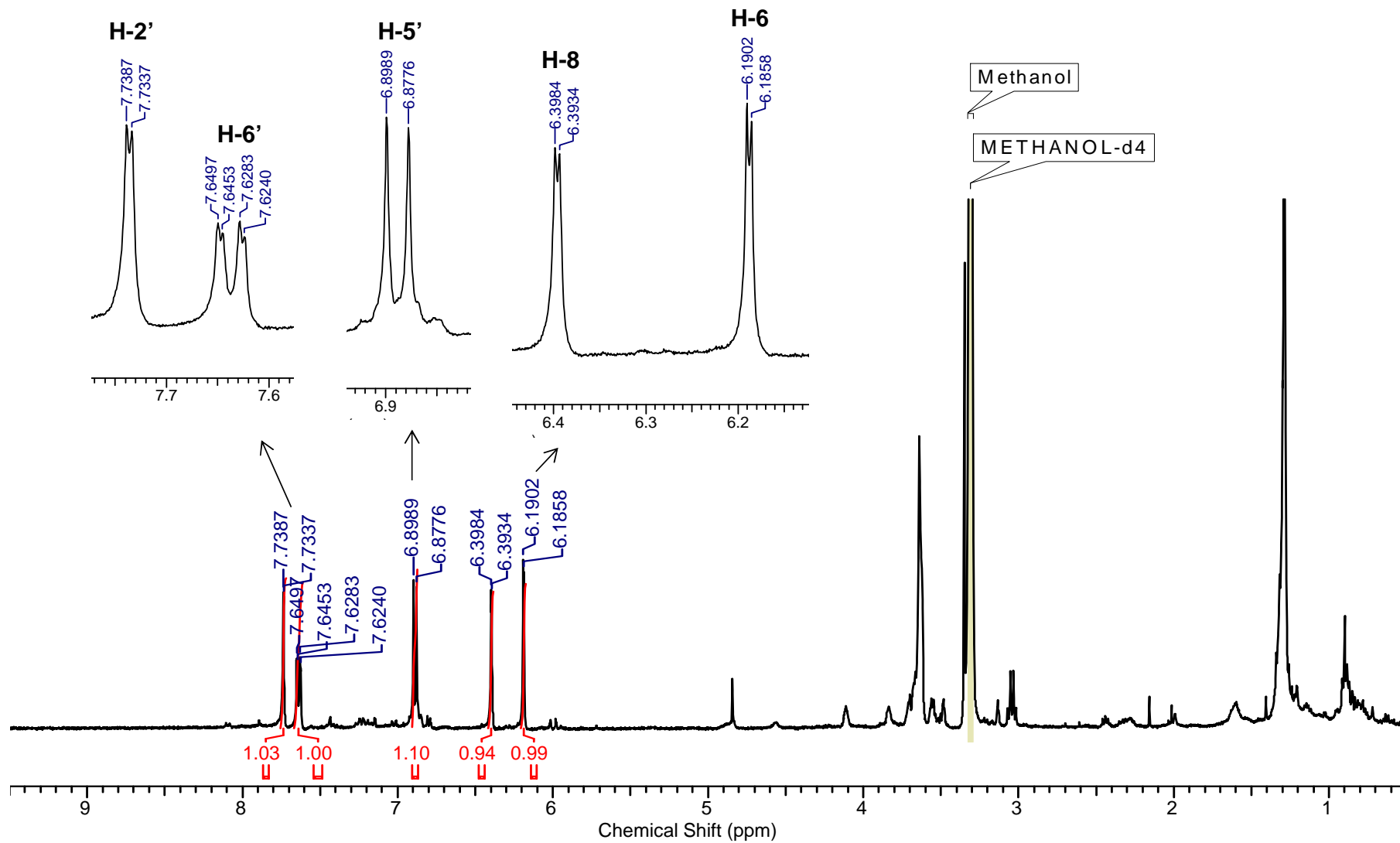
**TABELA 4.14** – Dados espectroscópicos de RMN de  $^1\text{H}$  obtidos para a substância **IX**.



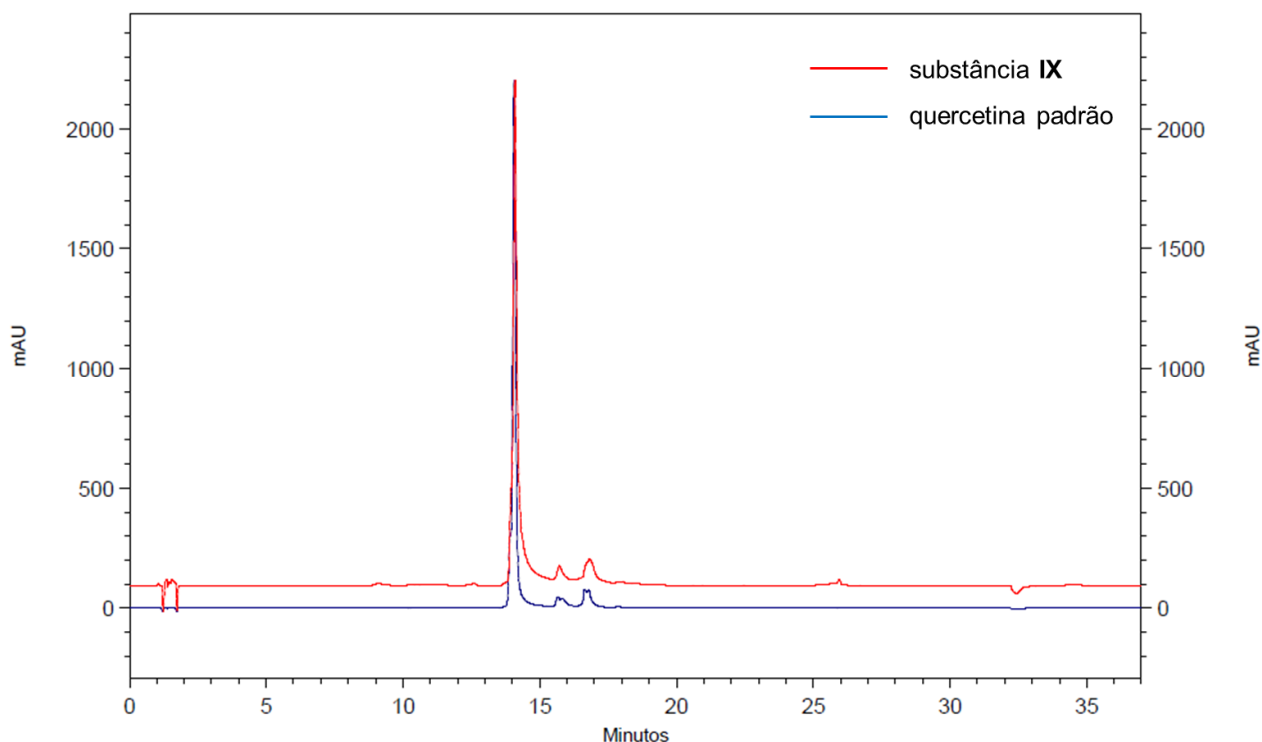
**IX**

H	Substância IX	KOOLEN et al., 2012
	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz)
6	6,19 ( <i>d</i> , $J = 1,8$ Hz)	6,20 ( <i>d</i> , $J = 1,8$ Hz)
8	6,40 ( <i>d</i> , $J = 1,8$ Hz)	6,42 ( <i>d</i> , $J = 1,8$ Hz)
2'	7,74 ( <i>d</i> , $J = 2,0$ Hz)	7,68 ( <i>d</i> , $J = 2,1$ Hz)
5'	6,90 ( <i>d</i> , $J = 8,5$ Hz)	6,81 ( <i>d</i> , $J = 8,2$ Hz)
6'	7,63 ( <i>dd</i> , $J = 8,5$ e $2,0$ Hz)	7,55 ( <i>dd</i> , $J = 8,5$ e $2,1$ Hz)

FIGURA 4.20 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz) da substância IX.



**FIGURA 4.21** – Cromatograma da substância **IX** obtido durante análise por CLAE com detecção em 360 nm.



#### 4.2.9 – Identificação estrutural da substância **X**

A substância **X** foi obtida na forma de cristais brancos (62,5 mg), a partir de cromatografia em coluna da fração EPFH 2, resultante do fracionamento do extrato etanólico das folhas de *E. pubescens*. A amostra, quando analisada por CCD e revelada com solução ácida de vanilina, apresentou-se como uma mancha de coloração violeta. A identificação estrutural foi feita utilizando técnicas de espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  e espectrometria de massa (CG-EM), em comparação com dados da literatura (AMBROZIN, 2004; KIM, JUNG, MIN, 2001; PRACHAYASITTIKUL et al., 2010) e da biblioteca *NIST/EPA/NHI* contida no software do equipamento de CG-EM.

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 4.22, p. 85) da substância **X** verificou-se a presença de cinco singletos na região entre  $\delta_{\text{H}}$  0,7 a 1,1 que foram atribuídos a hidrogênios de grupos metila ligados a átomos de carbono saturados e não hidrogenados e ainda, um singlete em  $\delta_{\text{H}}$  1,69 (3H) característico de hidrogênios metílicos ligados a carbono de ligação dupla ( $\text{sp}^2$ ). Também verificou-se a presença de um duplo dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  4,58 ( $J = 2,6$  e 1,5

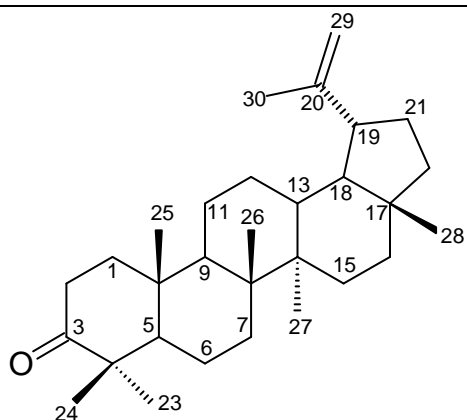
Hz, 1H) e um dubleto em  $\delta_H$  4,70 ( $J = 2,4$  Hz, 1H), atribuídos a átomos de hidrogênio olefínicos (H-29a e H-29b). As presenças desses sinais sugeriram que a substância **X** tratava-se de um triterpenoide com esqueleto lupânico.

Na análise por cromatografia gasosa foi possível observar no cromatograma um único pico com tempo de retenção de 28,96 minutos (Figura 4.23, p. 86). O espectro de massas (Figura 4.24, p. 86) obtido para a substância **X** apresentou um pico em  $m/z$  424, que corresponde ao pico do íon molecular do triterpenoide lupenona. O pico base com  $m/z$  205 é oriundo da fragmentação do anel C. O esquema de fragmentação da substância **X** está mostrado na Figura 4.25 (p. 87) (adaptado de CARVALHO et al., 2010).

Foi realizada comparação do espectro de massa obtido para substância **X** com os dados da biblioteca *NIST (National Institute of Standards and Technology)* apresentando alta similaridade para lupenona. Após a análise dos dados pode-se determinar a substância **X** como sendo o triterpenoide lupenona, com fórmula molecular  $C_{30}H_{48}O$ . Os dados obtidos em comparação com a literatura confirmaram a estrutura proposta (Tabela 4.15, p. 84).

Estudos realizados *in vivo* (em ratos) demonstraram que o triterpenoide lupenona possui atividade anticarcinogênica. Além disso, testes realizados *in vitro* demonstraram que este triterpenoide possui atividade antimicrobiana e atua como inibidor da proteína tirosina fosfatase, sendo alvo para o desenvolvimento de novos fármacos para a diabetes tipo 2 e obesidade (POLANCO-HERNÁNDEZ et al., 2013; TSAI et al., 2012).

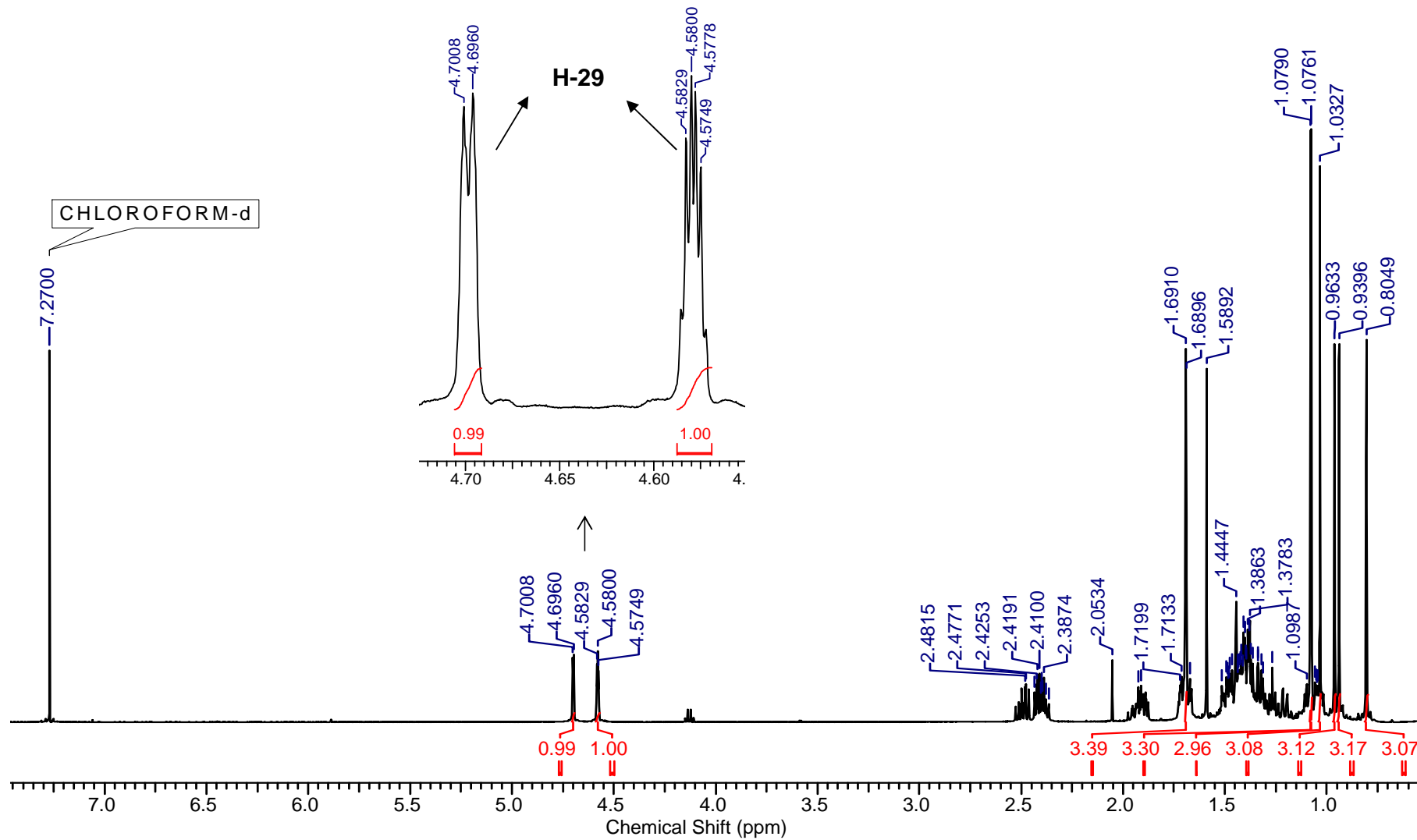
**TABELA 4.15** – Dados espectroscópicos de RMN de  $^1\text{H}$  obtidos para a substância **X**.



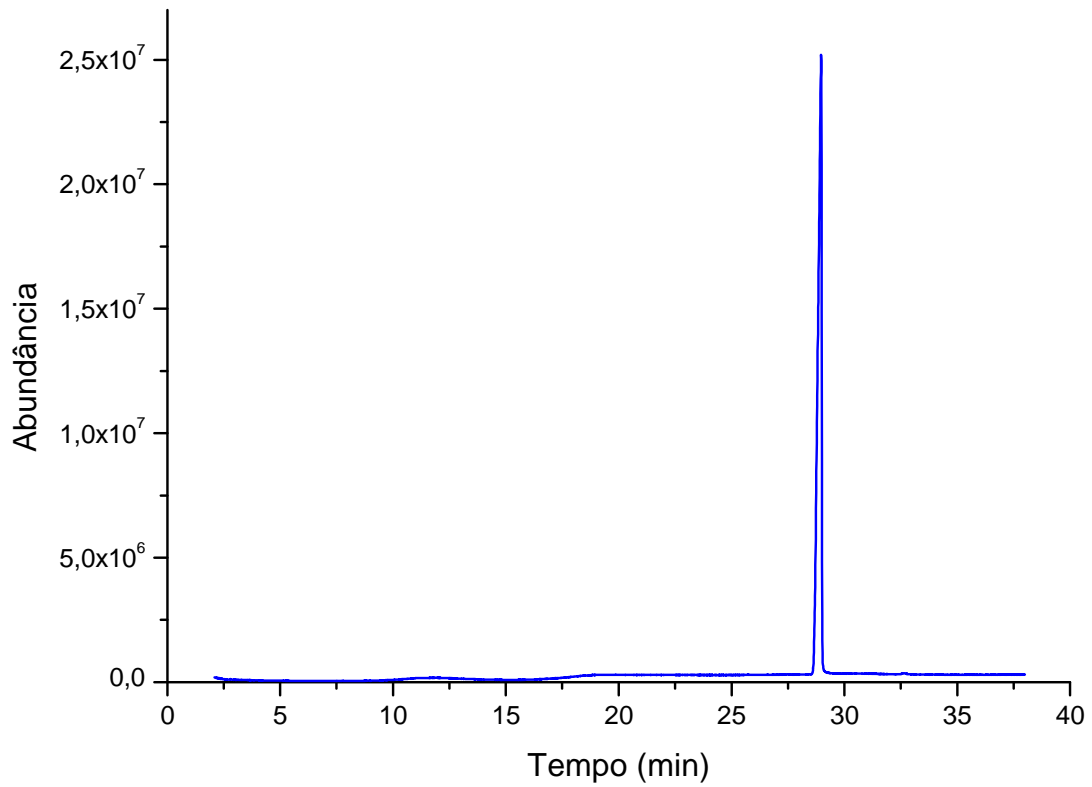
**X**

H	Substância X	KIM, JUNG, MIN, 2001	AMBROZIN, 2004
	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz)
19	2,39 (m)	2,41 (m)	-
23	1,08 (s)	1,06 (s)	1,07 (s)
24	0,94 (s)	0,93 (s)	0,93 (s)
25	0,94 (s)	0,93 (s)	-
26	0,96 (s)	0,95 (s)	0,95 (s)
27	1,03 (s)	1,02 (s)	1,03 (s)
28	0,80 (s)	0,79 (s)	0,80 (s)
29	4,58 (dd, $J = 2,6$ e $1,5$ Hz) e 4,70 (d, $J = 2,4$ Hz)	4,57 (d, $J = 2,0$ Hz) e 4,69 (d, $J = 2,0$ Hz)	4,57 (dd, $J = 2,4$ e $1,0$ Hz) e 4,69 (d, $J = 2,4$ Hz)
30	1,69 (s)	1,68 (s)	1,68 (s)

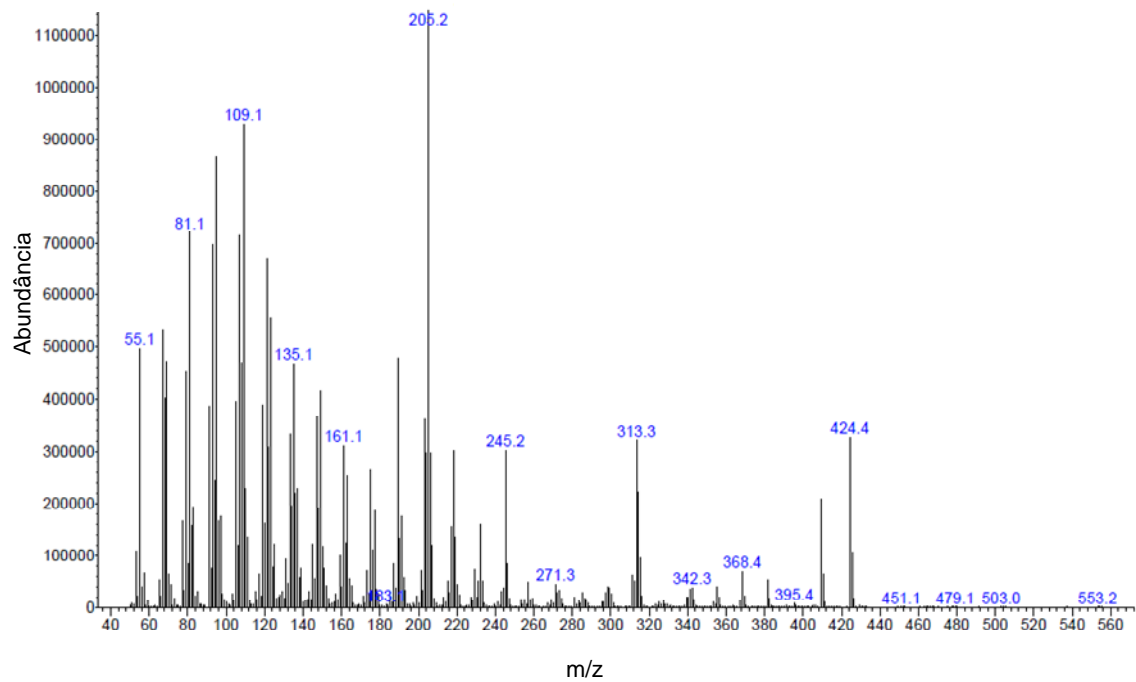
FIGURA 4.22 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) da substância X.



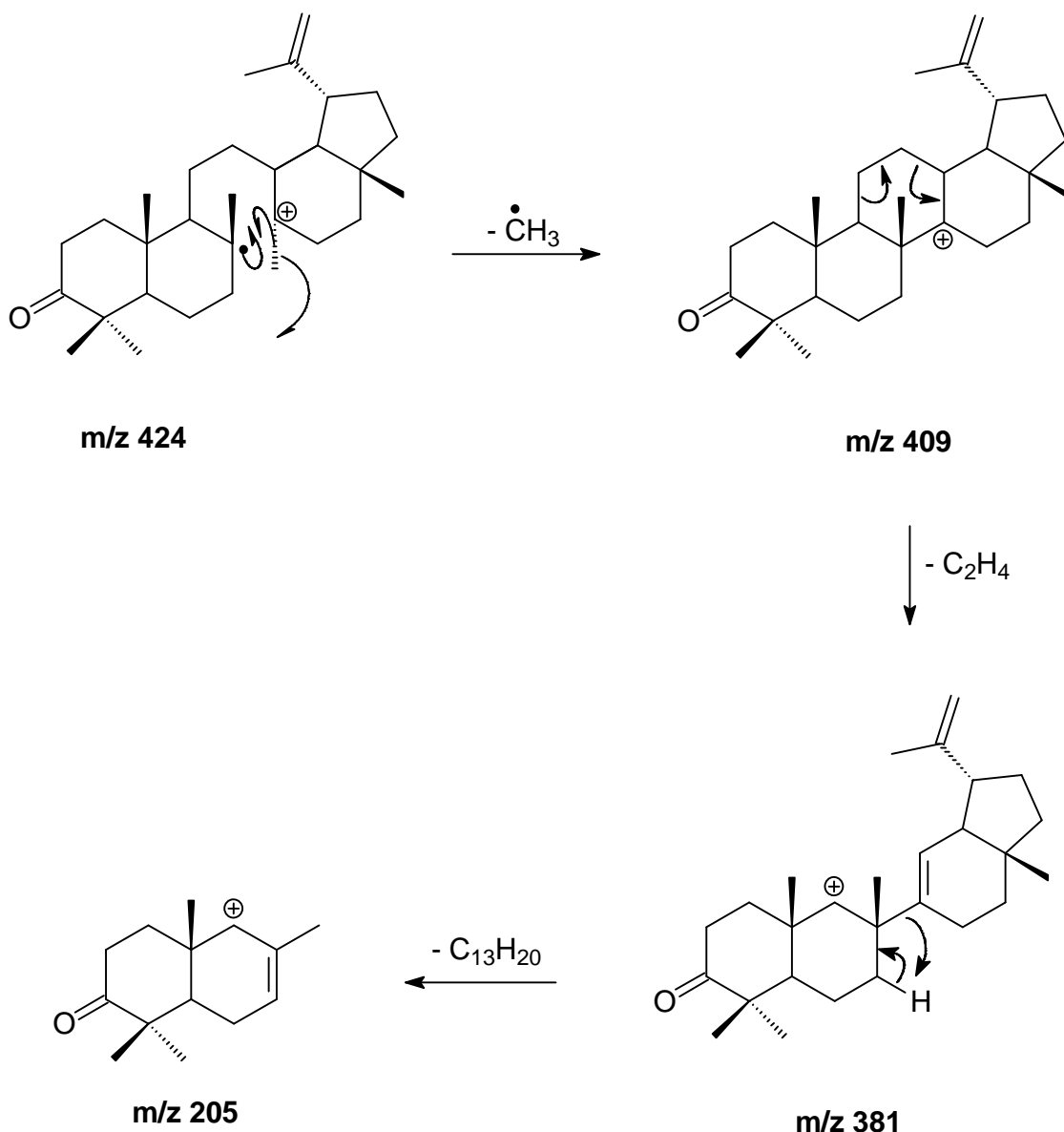
**FIGURA 4.23** – Cromatograma da substância **X** obtido durante análise por CG-EM.



**FIGURA 4.24** – Espectro de massas da substância **X** (IE 70 eV).



**FIGURA 4.25** – Proposta de fragmentação para a substância **X**.



#### 4.2.10 – Identificação estrutural da substância **XI**

A substância **XI** foi obtida na forma de um sólido branco (91,9 mg), a partir de cromatografia em coluna da fração EPFH 2, resultante do fracionamento do extrato etanólico das folhas de *E. pubescens*. A amostra, quando analisada por CCD e revelada com solução ácida de vanilina, apresentou-se como uma mancha de coloração violeta. A identificação estrutural foi feita utilizando técnicas de espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  e espectrometria de massa (CG-EM), em comparação com dados da literatura

(FIGUEIREDO, 2009; GOIS, 2010; MARQUES, 2011; MARTINS, 2009) e da biblioteca *NIST/EPA/NHI* contida no software do equipamento de CG-EM.

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 4.26, p. 90) da substância **XI** verificou-se a presença de seis singletos na região entre  $\delta_{\text{H}}$  0,7 a 1,1 que foram atribuídos a hidrogênios de grupos metila ligados a átomos de carbono saturados e não hidrogenados e ainda, um singlete em  $\delta_{\text{H}}$  1,69 (3H), atribuído aos hidrogênios  $\text{CH}_3$ -30. Também verificou-se a presença de um duplo dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  3,19 ( $J = 11,3$  e  $5,0$  Hz, 1H) sugerindo a presença de um grupo hidroxila no C-3. A constante de acoplamento sugeriu a configuração  $\beta$  para o grupo hidroxila. Neste espectro foi observado ainda um duplo dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  4,57 ( $J = 2,5$  e  $1,2$  Hz, 1H) e um dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  4,69 ( $J = 2,5$  Hz, 1H), atribuídos a átomos de hidrogênio olefínicos (H-29a e H-29b). As presenças desses sinais sugeriram que a substância **XI** tratava-se do triterpenoide lupeol.

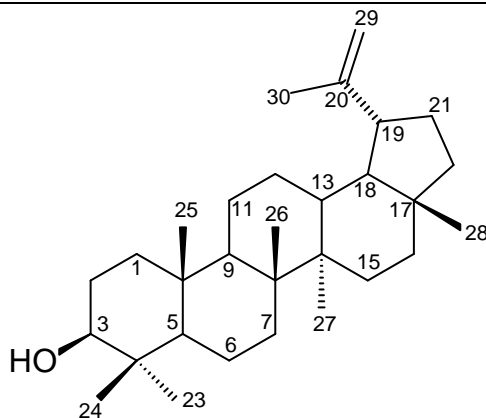
Na análise por cromatografia gasosa foi possível observar no cromatograma um único pico com tempo de retenção de 27,79 minutos (Figura 4.27, p. 91). O espectro de massas (Figura 4.28, p. 91) obtido para a substância **XI** apresentou um pico em  $m/z$  426, que corresponde ao pico do íon molecular do triterpenoide lupeol. Outros picos oriundos da fragmentação do anel C são típicos de triterpenoides pentacíclicos, principalmente os de maiores intensidades como  $m/z$  189 e 207, que são característicos de fragmentações de compostos do tipo lupeno. O esquema de fragmentação da substância **XI** está mostrado na Figura 4.29 (p. 92) (adaptado de CARVALHO et al., 2010).

Foi realizada comparação do espectro de massas obtido para substância **XI** com os dados da biblioteca *NIST* apresentando alta similaridade para o lupeol. Após a análise dos dados pode-se determinar a substância **XI** como sendo o triterpenoide lupeol, com fórmula molecular  $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$ . Os resultados obtidos em comparação com a literatura confirmaram a estrutura proposta (Tabela 4.16, p. 89).

O triterpenoide lupeol é amplamente encontrado em frutas e vegetais comestíveis. Pesquisas realizadas nos últimos trinta anos demonstraram importantes atividades farmacológicas do lupeol. Vários estudos realizados *in vitro* e *in vivo* (em animais) sugeriram que este triterpenoide tem potencial para atuar como agente anti-inflamatório, antimicrobiano,

antiprotozoário, antiproliferativo e na redução do colesterol. Lupeol também demonstrou eficácia no tratamento de doenças cardiovasculares, doenças renais e artrite (SIDDIQUE & SALEEM, 2011).

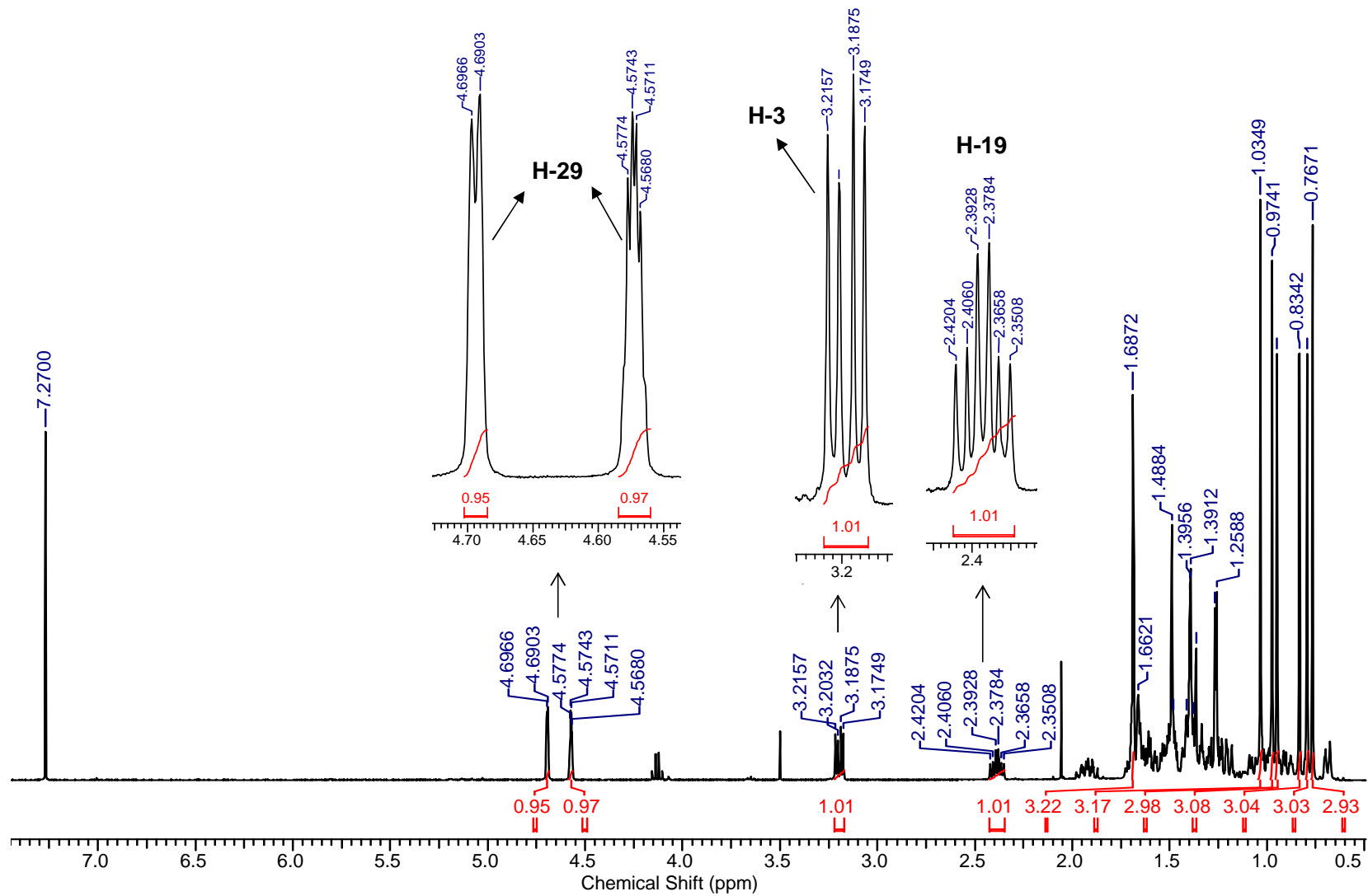
**TABELA 4.16** – Dados espectroscópicos de RMN de  $^1\text{H}$  obtidos para a substância **XI**.



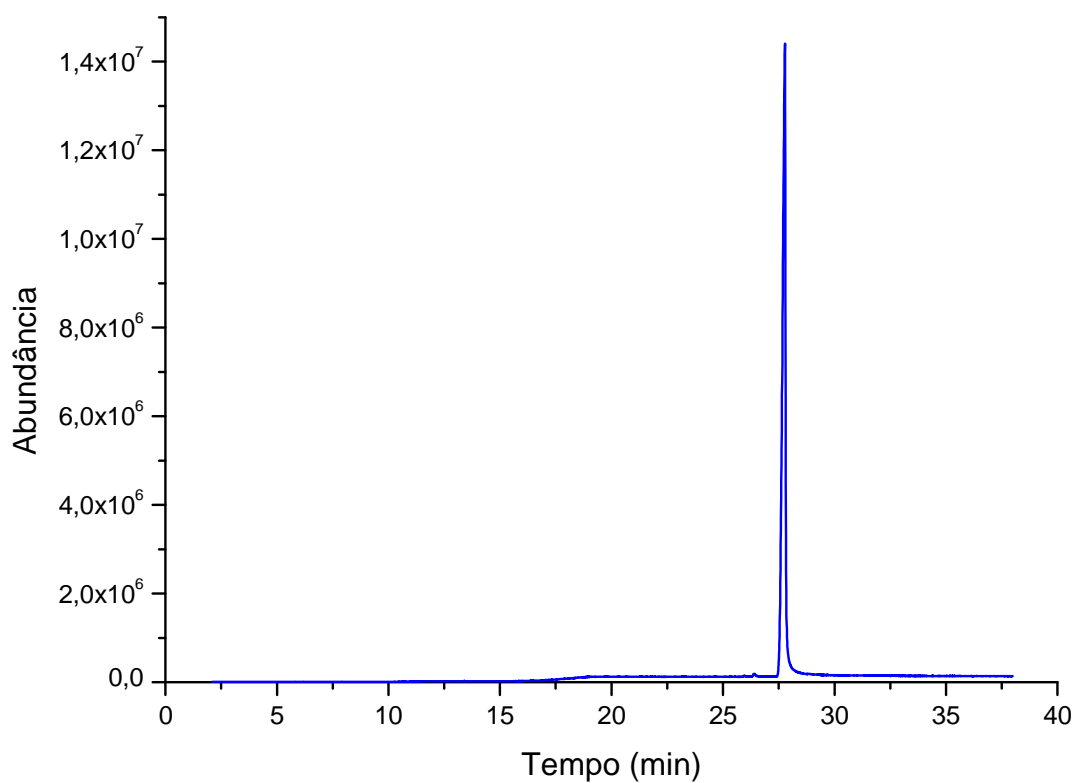
**XI**

H	Substância XI	FIGUEIREDO, 2009	GOIS, 2010
	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)
3	3,19 (dd, $J = 11,3$ e $5,0$ Hz)	3,21 (dd, $J = 10,0$ e $5,4$ Hz)	3,19 (dd, $J = 11,3$ e $5,0$ Hz)
19	2,39 (ddd, $J = 5,8; 10,9; 11,0$ Hz)	-	2,38 (dt, $J = 5,5; 11,0; 11,0$ Hz)
23	0,97 (s)	0,97 (s)	0,97 (s)
24	0,77 (s)	0,76 (s)	0,77 (s)
25	0,83 (s)	0,83 (s)	0,83 (s)
26	1,03 (s)	1,03 (s)	1,03 (s)
27	0,95 (s)	0,95 (s)	0,95 (s)
28	0,79 (s)	0,79 (s)	0,79 (s)
29	4,57 (dd, $J = 2,5$ e $1,2$ Hz) e 4,69 (d, $J = 2,5$ Hz)	4,57 (dd, $J = 2,4$ e $1,4$ Hz) e 4,69 (d, $J = 2,4$ Hz)	4,57 (sl) e 4,69 (sl)
30	1,69 (s)	1,61 (s)	1,68 (s)

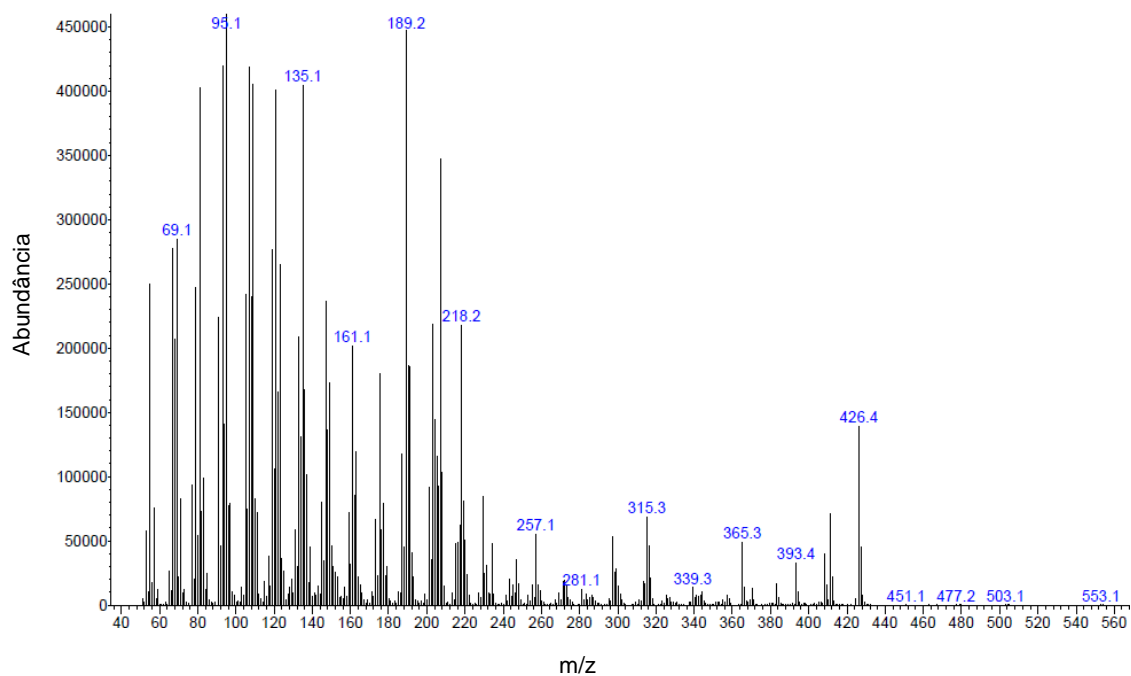
FIGURA 4.26 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) da substância XI.



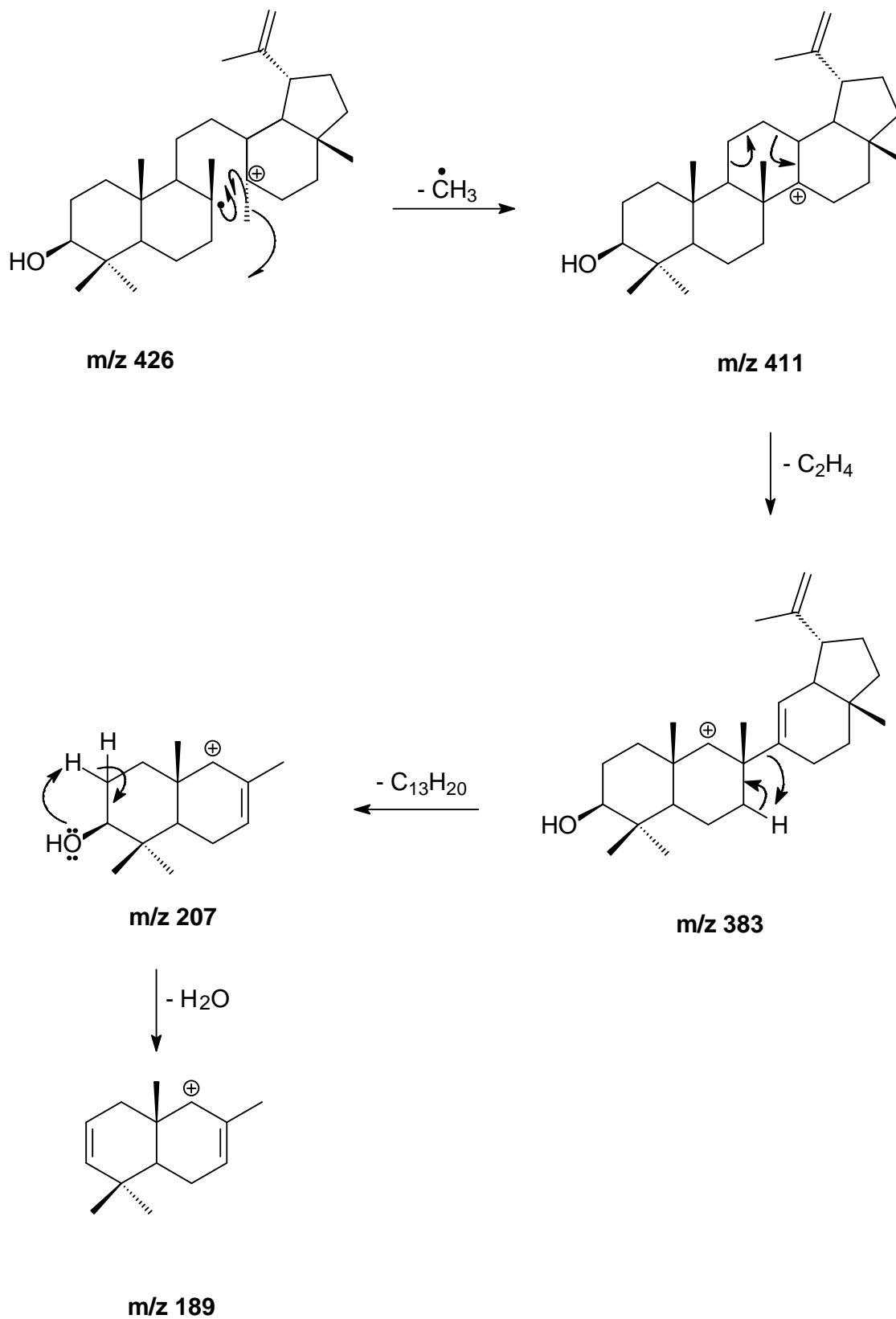
**FIGURA 4.27** – Cromatograma da substância **XI** obtido durante análise por CG-EM.



**FIGURA 4.28** – Espectro de massas da substância **XI** (IE 70 eV).



**FIGURA 4.29** – Proposta de fragmentação para a substância **XI**.



#### 4.3 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE CAPTURA DOS RADICAIS LIVRES COM DPPH

As plantas sintetizam compostos antioxidantes, principalmente compostos fenólicos, que auxiliam em seus mecanismos de defesa através da neutralização de espécies reativas de oxigênio (ERO), a fim de evitar danos oxidativos. A atividade antioxidante de plantas geralmente é bem correlacionada com o teor de seus compostos fenólicos. Há um crescente interesse em estudos com extratos de plantas e óleos essenciais, com finalidade de selecionar substâncias que possam ser utilizadas como fármacos (NIĆIFOROVIĆ et al., 2010).

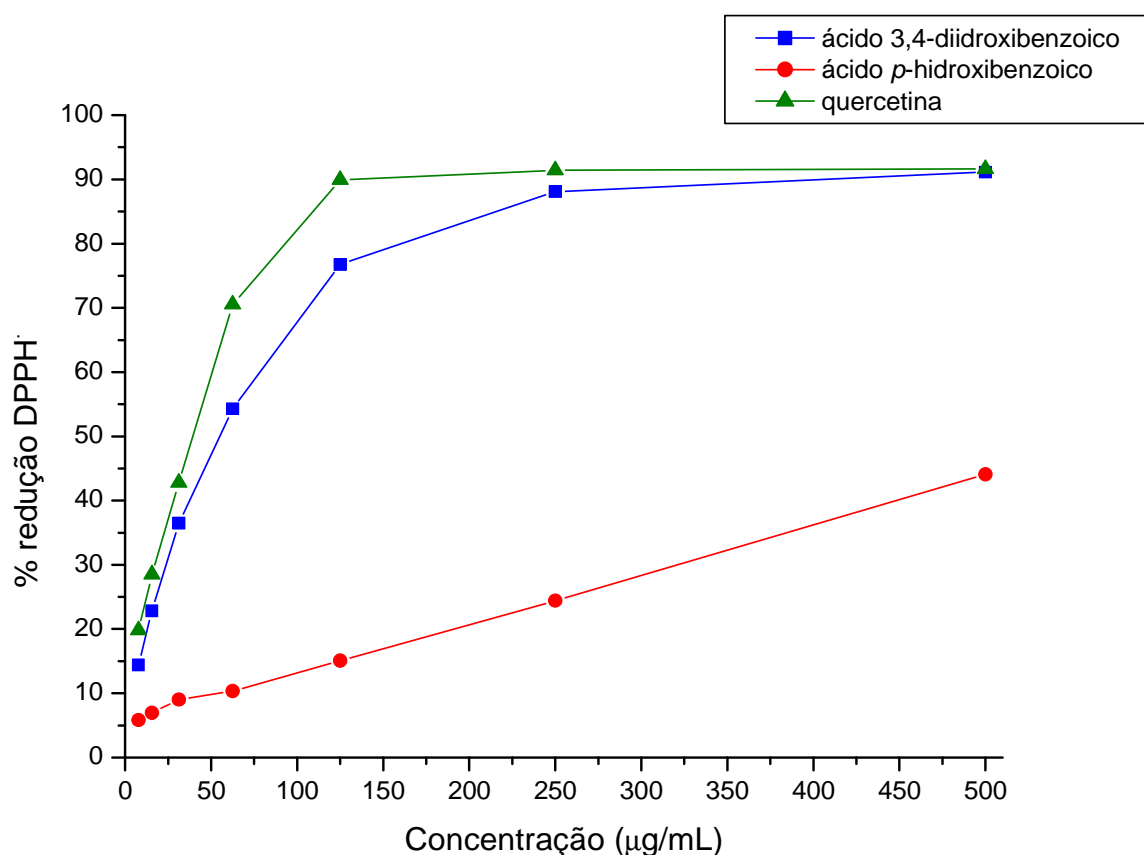
Neste contexto, a atividade antioxidante de dois compostos fenólicos isolados de *E. pubescens* foi determinada pelo método de captura dos radicais livres com DPPH. O radical livre DPPH• é estável, solúvel em metanol ou etanol, possui coloração púrpura e máximo de absorção em 517 nm. Quando um antioxidante elimina este radical através da doação de hidrogênio, a cor da solução torna-se amarela diminuindo sua absorbância. Os valores de EC<sub>50</sub> calculados para o ácido *p*-hidroxibenzoico (V), ácido 3,4-diidroxibenzoico (VI) e para o controle positivo quercetina estão apresentados na Tabela 4.17 e o efeito de diferentes concentrações de ácido *p*-hidroxibenzoico e ácido 3,4-diidroxibenzoico no teste de atividade antioxidante com DPPH está apresentado na Figura 4.30 (p. 94).

**TABELA 4.17** – Valores de EC<sub>50</sub> para ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido 3,4-diidroxibenzoico e para o controle positivo quercetina.

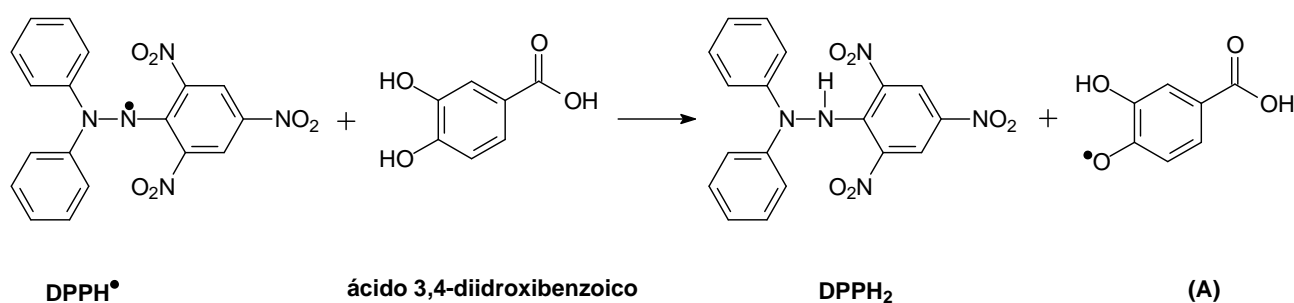
Amostra	EC <sub>50</sub> (mM)				
	1ª réplica	2ª réplica	3ª réplica	Média ± DP	CV (%)
ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico (V)	4,31	4,20	4,10	4,20 ± 0,1034	2,4614
ácido 3,4-diidroxibenzoico (VI)	0,35	0,35	0,33	0,34 ± 0,0083	2,4337
quercetina	0,11	0,11	0,12	0,11 ± 0,0057	4,9489

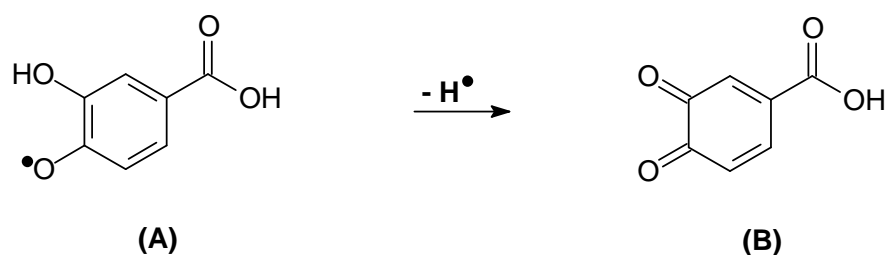
DP: desvio padrão; CV: coeficiente de variação

**FIGURA 4.30** – Efeito de diferentes concentrações de ácido *p*-hidroxibenzoico e ácido 3,4-diidroxibenzoico no teste de atividade antioxidante com DPPH.



Os dados obtidos demonstram que o ácido *p*-hidroxibenzoico (**V**) apresentou capacidade de supressão do DPPH<sup>•</sup> distante dos valores referentes à quercetina padrão, com EC<sub>50</sub> de 4,20 ± 0,1034 mM. Por outro lado, o ácido 3,4-diidroxibenzoico (**VI**) apresentou valores próximos ao da quercetina padrão, tendo EC<sub>50</sub> de 0,34 ± 0,0083 mM. A reação entre o DPPH<sup>•</sup> e ácido 3,4-diidroxibenzoico (**VI**) pode ser explicada pela seguinte equação química (SAITO & KAWABATA, 2005):



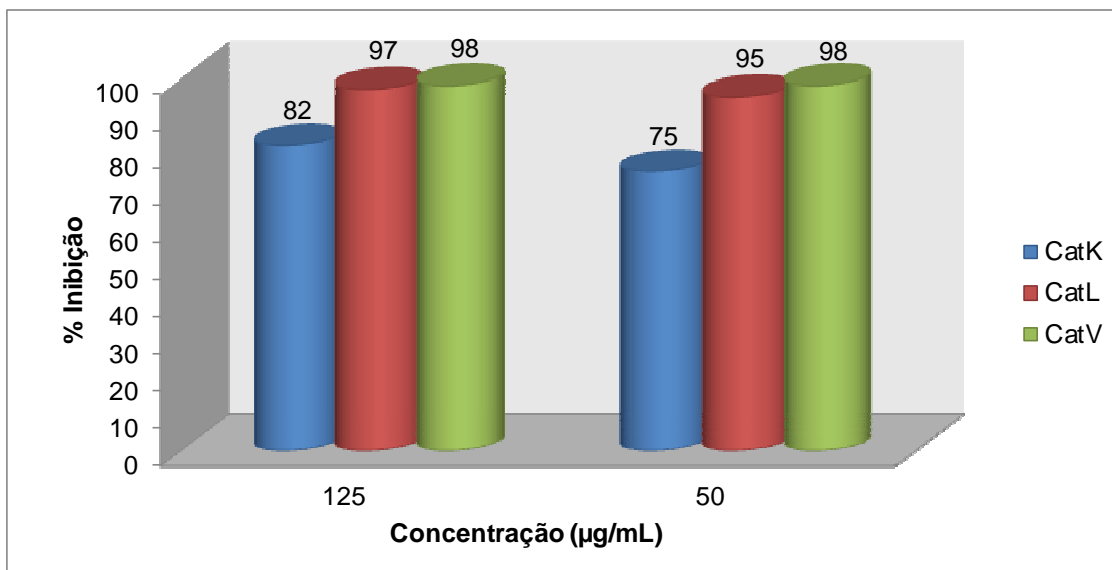


Por possuir dois grupos hidroxila o ácido 3,4-diidroxibenzoico (**VI**) permite a remoção de dois hidrogênios na forma radicalar e conseqüentemente leva a formação de uma quinona estável. Isso não ocorre para o ácido *p*-hidroxibenzoico (**V**) que possui somente um grupo hidroxila, justificando assim seus maiores valores de  $EC_{50}$ .

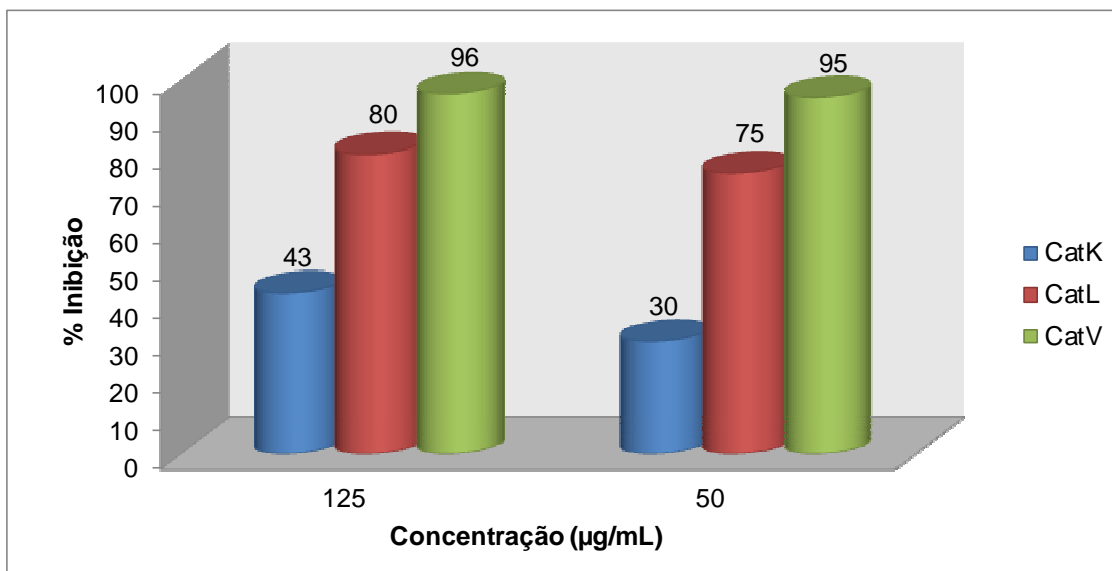
#### 4.4 – ATIVIDADE ENZIMÁTICA FRENTE ÀS CATEPSINAS K, L e V

Os produtos naturais representam uma rica fonte de diversidade estrutural e atividades biológicas, proporcionando compostos importantes para o tratamento de uma variedade de doenças humanas em muitas áreas terapêuticas. Diferentes classes de produtos naturais têm sido investigadas quanto aos seus efeitos inibidores sobre a atividade catalítica de catepsinas (SEVERINO et al., 2011). Diante deste contexto, os extratos etanólicos de *E. pubescens* foram avaliados *in vitro* frente às catepsinas K, L e V, nas concentrações de 125 e 50  $\mu\text{g/mL}$ . O extrato etanólico do caule apresentou inibição superior a 70% frente às catepsinas K, L e V (Figura 4.31, p. 96) e o extrato etanólico das folhas apresentou inibição superior a 70% frente às catepsinas L e V (Figura 4.32, p. 96).

**FIGURA 4.31** – Gráfico da porcentagem de inibição enzimática do extrato etanólico do caule de *E. pubescens*.



**FIGURA 4.32** – Gráfico da porcentagem de inibição enzimática do extrato etanólico das folhas de *E. pubescens*.



Em relação às frações de *E. pubescens*, obtidas através extração líquido-líquido, somente três apresentaram porcentagem de inibição superior a 70% na concentração de 100 µg/mL. Sendo estas, a fração EPCA que apresentou 73% de inibição para CatK, a fração EPFH que apresentou 95% de inibição para CatV e a fração EPFA que apresentou 91% e 94% de inibição para CatL e CatV, respectivamente (Tabela 4.18).

**TABELA 4.18** – Porcentagem de inibição enzimática das frações de *E. pubescens*.

Amostra	% de inibição (100 µg/mL)		
	CatK	CatL	CatV
EPCH	*	*	*
EPCA	73	53	58
EPCW	40	46	50
EPFH	53	68	95
EPFA	58	91	94
EPFW	0	50	69

\*Não testado. **EPC**: extrato etanólico do caule; **EPF**: extrato etanólico das folhas; **H**: fração hexano; **A**: fração acetato de etila; **W**: fração metanol/água.

Das onze substâncias isoladas de *E. pubescens*, apenas cinco foram testadas frente as catepsinas. O ácido *p*-hidroxibenzoico (**V**) apresentou inibição moderada com valor de IC<sub>50</sub> de 135,81 ± 17,07 µM, enquanto a quercetina (**IX**) apresentou potente inibição com valor de IC<sub>50</sub> de 2,2 ± 0,2 µM, ambos frente à catepsina V. Para as catepsinas K e L essas substâncias não apresentaram nenhuma inibição mesmo quando testadas a 100 µM. As demais substâncias testadas, o ácido Δ<sup>13,14</sup>-*ent*-labd-8β-ol-15-oico (**IV**), o ácido 3,4-diidroxibenzoico (**VI**), a lupenona (**X**) e o lupeol (**XI**) apresentaram porcentagem de inibição inferior a 50% para todas as catepsinas testadas.

## 5 – CONCLUSÕES

O estudo químico de *E. pubescens* levou ao isolamento e identificação estrutural de onze metabólitos secundários. Do extrato etanólico do caule de *E. pubescens* foi possível isolar os triterpenoides  $\alpha$ -amirina (I) e  $\beta$ -amirina (II); dois diterpenoides, ácido 7-oxo-labda-8,13-dien-15-oico (III) e o ácido  $\Delta^{13,14}$ -*ent*-labd-8 $\beta$ -ol-15-oico (IV); quatro derivados do ácido benzoico, o ácido *p*-hidroxibenzoico (V), o ácido 3,4-diidroxibenzoico (VI), o ácido 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoico (VII), o ácido 3-metoxi-4-hidroxibenzoico (VIII) e o flavonol quercetina (IX). Já do extrato etanólico das folhas de *E. pubescens* foram isolados e identificados dois triterpenoides, sendo estes a lupenona (X) e o lupeol (XI).

Os resultados de atividade antioxidante pelo método de captura dos radicais livres com DPPH demonstraram que *E. pubescens* é uma espécie promissora, uma vez que o ácido 3,4-diidroxibenzoico (VI) e a quercetina (IX) apresentam elevados potenciais antioxidante e foram isolados desta espécie. Os extratos e a maioria das frações de *E. pubescens* apresentaram expressiva atividade (superior a 50%) inibitória frente as catepsinas K, L e V. Das substâncias isoladas e avaliadas o ácido *p*-hidroxibenzoico (V) mostrou-se um moderado inibidor e a quercetina (IX) um potente e seletivo inibidor, ambos para catepsina V.

Dessa forma, os resultados obtidos através do estudo químico e de atividades antioxidante e enzimática da espécie *E. pubescens* permitem contribuir para o conhecimento químico e biológico desta espécie e conseqüentemente do gênero, que até o momento não possui relatos de estudos químicos e biológicos.

## REFERÊNCIAS

ABBAS, F. A.; AL-MASSARANY, S. M.; KHAN, S.; AL-HOWIRINY, T. A.; MOSSA, J. S.; ABOURASHED, E. A. "Phytochemical and biological studies on Saudi *Commiphora opobalsamum* L." *Nat. Prod. Res.*, 21: 383–391, **2007**.

ADEROGBA, M. A.; NDHLALA, A. R.; RENGASAMY, K. R. R.; VAN STADEN, J. "Antimicrobial and selected *in vitro* enzyme inhibitory effects of leaf extracts, flavonols and indole alkaloids isolated from *Croton menyharthii*." *Molecules*, 18: 12633–12644, **2013**.

AMBROZIN, A. R. P. Estudo Fitoquímico de Plantas das Famílias Rutaceae e Meliaceae Visando o Isolamento de Substâncias Protótipos para o Desenvolvimento de Novos Fármacos Antichagásicos e Antileishmanioses. São Carlos, Programa de Pós-graduação em Química - Universidade Federal de São Carlos, 2004. Tese de Doutorado, 241 p.

BARATTA, M. T.; RUBERTO, G.; TRINGALI, C. "Constituents of the pods of *Piliostigma thonningii*." *Fitoterapia*, 70: 205–208, **1999**.

BARBOSA, A. C. C. Recuperação de área degradada por mineração através da utilização de sementes e mudas de três espécies arbóreas do Cerrado, no Distrito Federal. Brasília, Departamento de Engenharia Florestal - Universidade de Brasília, 2008. Dissertação de Mestrado, 88 p.

BARRETT, A. J.; KEMBHAVI, A. A.; BROWN, M. A.; KIRSCHKE, H.; KNIGHT, C. G.; TAMAI, M.; HANADA, K. "L-*trans*-Epoxy succinyl-leucylamido(4-guanidino)butane (E-64) and its analogues as inhibitors of cysteine proteinases including cathepsins B, H and L." *Biochem. J.*, 201: 189–198, **1982**.

BRAHMACHARI, G. Bioactive Natural Products: Opportunities and Challenges in Medicinal Chemistry. 1a ed. World Scientific. Singapura. 2011. 696 p.

BUTLER, M. S.; ROBERTSON, A. A. B.; COOPER, M. A. "Natural product and natural product derived drugs in clinical trials." *Nat. Prod. Rep.*, 31: 1612–1661, **2014**.

CARVALHO, P. E. R.; GAIAD, S. EMBRAPA – Agência de Informação. Espécies Arbóreas Brasileiras. Malvaceae, 2014. <[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/especies\\_arboreas\\_brasileiras/arvore/CONT000fu1ekyj602wyiv807nyi6s9rqihfq.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/especies_arboreas_brasileiras/arvore/CONT000fu1ekyj602wyiv807nyi6s9rqihfq.html)>. Acesso em: 30 de dezembro 2014.

CARVALHO, T. C.; POLIZELI, A. M.; TURATTI, I. C. C.; SEVERIANO, M. E.; CARVALHO, C. E.; AMBRÓSIO, S. R.; CROTTI, A. E. M.; FIGUEIREDO, U. S.; VIEIRA, P. C.; FURTADO, N. A. J. C. "Screening of filamentous fungi to identify biocatalysts for lupeol biotransformation." *Molecules*, 15: 6140–6151, **2010**.

CERRATINGA – Produção Sustentável e Consumo Consciente. Cerrado, 2014. <<http://www.cerratinga.org.br/cerrado/>>. Acesso em: 23 de dezembro 2014.

CHAVES, O. S.; GOMES, R. A.; TOMAZ, A. C. A.; FERNANDES, M. G.; MENDES JR, L. G.; AGRA, M. F.; BRAGA, V. A.; SOUZA, M. F. V. "Secondary metabolites from *Sida rhombifolia* L. (Malvaceae) and the vasorelaxant activity of cryptolepinone." *Molecules*, 18: 2769–2777, **2013**.

CHEN, G. Y.; DAI, C. Y.; WANG, T. S.; JIANG, C. W.; HAN, C. R.; SONG, X. P. "A new flavonol from the stem-bark of *Premna fulva*." *Arch. Org. Chem.*, 11: 179–185, **2010**.

CHING, J.; LIN, H. S.; TAN, C. H.; KOH, H. L. "Quantification of  $\alpha$ - and  $\beta$ -amyrin in rat plasma by gas chromatography-mass spectrometry: application to preclinical pharmacokinetic study." *J. Mass Spectrom.*, 46: 457–464, **2011**.

COSTA, D. A.; MATIAS, W. N.; LIMA, I. O.; XAVIER, A. L.; COSTA, V. B. M.; DINIZ, M. F. F. M.; AGRA, M. F.; BATISTA, L. M.; SOUZA, M. F. V. "First secondary metabolites from *Herissantia crispera* L (Brizicky) and the toxicity activity against *Artemia salina* Leach." *Quim. Nova*, 32: 48–50, **2009**.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. "Natural products: a continuing source of novel drug leads." *Biochim. Biophys. Acta*, 1830: 3670–3695, **2013**.

DAI, J.; MUMPER, R. J. "Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties." *Molecules*, 15: 7313–7352, **2010**.

DEKKER, T. G.; FOURIE, T. G.; MATTHEE, E.; SNYCKERS, F. O.; VAN DER SCHYF, C. J. "Studies of South African medicinal plants. Part 7. Rhinocerotoic acid: a labdane diterpene with anti-inflammatory properties from *Elytropappus rhinocerotis*." *South African J. Chem.*, 41: 33–35, **1988**.

DHAKAL, R. C.; RAJBHANDARI, M.; KALAUNI, S. K.; AWALE, S.; GEWALI, M. B. "Phytochemical Constituents of the Bark of *Vitex negundo* L." *J. Nepal Chem. Soc.*, 23: 89–92, **2009**.

DUARTE, M. C. Análise filogenética de *Eriotheca* Schott & Endl. e gêneros afins (Bombacoideae, Malvaceae) e estudo taxonômico de *Eriotheca* no Brasil. São Paulo, Instituto de Botânica – Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2010. Tese de Doutorado, 190 p.

DUARTE, M. C.; ESTEVES, G. L. "Nomenclatural Notes on *Eriotheca* (Bombacoideae, Malvaceae)." *Novon: A J. Bot. Nomencl.*, 22: 152–154, **2012**.

EMBRAPA – Agência de Informação. Bioma Cerrado, 2007. <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia16/AG01/Abertura.html>>. Acesso em: 20 de dezembro 2014.

ERWIN; NOOR, A.; SOEKAMTO, N. H.; VAN ALTENA, I.; SYAH, Y. M. "Waltherione C and cleomiscosin from *Melochia umbellata* var. *Degrabrata* K. (Malvaceae), biosynthetic and chemotaxonomic significance." *Biochem. Syst. Ecol.*, 55: 358–361, **2014**.

ESPINDOLA-DARVENE, L. S. "Cerrado: Fonte de Descoberta de Novos Medicamentos." *Brasília Médica*, 44: 193–198, **2007**.

FIGUEIREDO, U. S. Química de *Acosmium dasycarpum*: identificação de alcalóides quinolizidínicos por CG-EM. São Carlos, Programa de Pós-graduação em Química - Universidade Federal de São Carlos, 2009. Tese de Doutorado, 208 p.

GOIS, R. W. S. Estudo fitoquímico e biológico de *Bauhinia acuruana* Moric. Fortaleza, Curso de Pós-graduação em Química - Universidade Federal do Ceará, 2010. Dissertação de Mestrado, 128 p.

GOMES, R. A.; RAMIREZ, R. R. A.; MACIEL, J. K. S.; AGRA, M. F.; SOUZA, M. F. V. "Phenolic compounds from *Sidastrum micranthum* (A. St.-Hil.) fryxell and evaluation of acacetin and 7,4'-di-o-methylisoscutearein as modulator of bacterial drug resistance." *Quim. Nova*, 34: 1385–1388, **2011**.

GURIB-FAKIM, A. "Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow." *Mol. Aspects Med.*, 27: 1–93, **2006**.

HARVEY, A. L. "Natural products in drug discovery." *Drug Discov. Today*, 13: 894–901, **2008**.

HE, D.; GU, D.; HUANG, Y.; AYUPBEK, A.; YANG, Y.; AISA, H. A.; ITO, Y. "Separation and Purification of Phenolic Acids and Myricetin from Black Currant by High Speed Countercurrent Chromatography." *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 32: 3077–3088, **2009**.

HINSLEY, S. R. Economic Uses of Malvaceae – Overview, 2008. <<http://www.malvaceae.info/Economic/Overview.html>>. Acesso em: 07 de janeiro 2015.

IMAMURA, P. M.; MARSAIOLI, A. J.; BARATA, L. E. S.; RÚVEDA, E. A. "<sup>13</sup>C NMR Spectral Analysis of Eperuane Diterpenes." *Phytochemistry*, 16: 1842–1844, **1977**.

JBRJ – Jardim Botânico do Rio de Janeiro. *Eriotheca* in Lista de Espécies da Flora do Brasil, 2015. <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB027559>>. Acesso em: 03 de janeiro 2015.

JI, H.; LI, X.; ZHANG, H. "Natural products and drug discovery." *Eur. Mol. Biol. Organ. Reports*, 10: 194–199, **2009**.

KAKKAR, S.; BAIS, S. "A review on protocatechuic acid and its pharmacological potential." *ISRN Pharmacol.*, 1–9, **2014**.

KARTHIK, G.; ANGAPPAN, M.; VIJAYAKUMAR, A.; NATARAJAPILLAI, S. "Syringic acid exerts antiangiogenic activity by downregulation of VEGF in zebrafish embryos." *Biomed. Prev. Nutr.*, 4: 203–208, **2014**.

KATIYAR, C.; GUPTA, A.; KANJILAL, S.; KATIYAR, S. "Drug discovery from plant sources : An integrated approach." *Int. Q. J. Res. Ayurveda*, 33: 10–19, **2012**.

KIM, E. M.; JUNG, H. R.; MIN, T. J. "Purification, structure determination and biological activities of 20(29)-lupen-3-one from *Daedaleopsis tricolor* (Bull. ex Fr.) Bond. et Sing." *Bull. Korean Chem. Soc.*, 22: 59–62, **2001**.

KIM, S. J.; KIM, M. C.; UM, J. Y.; HONG, S. H. "The beneficial effect of vanillic acid on ulcerative colitis." *Molecules*, 15: 7208–7217, **2010**.

KINGSTON, D. G. I. "Modern natural products drug discovery and its relevance to biodiversity conservation." *J. Nat. Prod.*, 74: 496–511, **2011**.

KOOLEN, H. H. F.; SOARES, E. R.; SILVA, F. M. A; SOUZA, A. Q. L.; FILHO, E. R.; SOUZA, A. D. L. "Triterpenes and flavonoids from the roots of *Mauritia flexuosa*." *Rev. Bras. Farmacogn.*, 22: 189–192, **2012**.

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

LECAILLE, F.; BRÖMME, D.; LALMANACH, G. "Biochemical properties and regulation of cathepsin K activity." *Biochimie*, 90: 208–226, **2008**.

LEE, I. C.; BAE, J. S.; KIM, T.; KWON, O. J.; KIM, T. H. "Polyphenolic constituents from the aerial parts of *Thymus quinquecostatus* var. *japonica* collected on ulleung island." *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.*, 54: 811–816, **2011**.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 4a. ed. Instituto Plantarum. Nova Odessa. 2002. 80 p.

LU, Y.; SHIPTON, F. N.; KHOO, T. J.; WIART, C. "Antioxidant Activity Determination of Citronellal and Crude Extracts of *Cymbopogon citratus* by 3 Different Methods." *Pharmacol. Pharm.*, 5: 395–400, **2014**.

MAGANHA, E. G.; HALMENSCHLAGER, R. D. C.; ROSA, R. M.; HENRIQUES, J. A. P.; RAMOS, A. L. L. P.; SAFFI, J. "Pharmacological evidences for the extracts and secondary metabolites from plants of the genus *Hibiscus*." *Food Chem.*, 118: 1–10, **2010**.

MAGINA, M. D. A. Estudo fitoquímico e biológico de espécies do gênero *Eugenia*. Florianópolis, Programa de Pós-graduação em Química - Universidade Federal de Santa Catarina, 2008. Tese de Doutorado, 178 p.

MANUJA, R.; SACHDEVA, S.; JAIN, A.; CHAUDHARY, J. "A Comprehensive Review on Biological Activities of *p*-Hydroxy benzoic acid and Its Derivatives." *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, 22: 109–115, **2013**.

MARINHO, R. C.; MENDES-RODRIGUES, C.; BONETTI, A M.; OLIVEIRA, P. E. "Pollen and stomata morphometrics and polyploidy in *Eriotheca* (Malvaceae-Bombacoideae)." *Plant Biol.*, 16: 508–11, **2013**.

MARQUES, E. F. Estudo de produtos naturais e derivados sintéticos buscando inibidores seletivos das catepsinas L e V. São Carlos, Programa de Pós-graduação em Química - Universidade Federal de São Carlos, 2011. Dissertação de Mestrado, 135 p.

MARSAIOLI, A. J.; LEITÃO FILHO, H. F.; CAMPELLO, J. P. "Diterpenes in the bark of *Hymeneae coubaril*." *Phytochemistry*, 14: 1882–1883, **1975**.

MARTINS, L. R. Avaliação do potencial biotecnológico de fungos brasileiros em reações de biotransformação e biorremediação. Belo Horizonte, Departamento de Química - Universidade Federal de Minas Gerais, 2009. Tese de Doutorado, 203 p.

MATOS, A. P. Busca de compostos inseticidas: estudo de espécies do gênero *Trichilia* (Meliaceae). São Carlos, Programa de Pós-graduação em Química - Universidade Federal de São Carlos, 2006. Tese de Doutorado, 170 p.

MCCHESENEY, J. D.; VENKATARAMAN, S. K.; HENRI, J. T. "Plant natural products: back to the future or into extinction?" *Phytochemistry*, 68: 2015–2022, **2007**.

MEDEIROS, J. D. Guia de Campo: Vegetação do Cerrado 500 espécies. MMA/SBF. Brasília. 2011. 532 p.

MILLER, B.; FRIEDMAN, A. J.; CHOI, H.; HOGAN, J.; MCCAMMON, J. A.; HOOK, V.; GERWICK, W. H. "The marine cyanobacterial metabolite gallinamide A is a potent and selective inhibitor of human cathepsin L." *J. Nat. Prod.*, 77: 92–99, **2014**.

MISHRA, K.; OJHA, H.; CHAUDHURY, N. K. "Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results." *Food Chem.*, 130: 1036–1043, **2012**.

MMA – Ministério do Meio Ambiente. Biodiversidade brasileira: Avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros. MMA/SBF. Brasília. 2002. 404 p.

MMA – Ministério do Meio Ambiente. O Bioma Cerrado, 2015. <<http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>>. Acesso em: 05 de janeiro 2015.

MMA/IBAMA – Ministério do Meio Ambiente/Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Programa de Monitoramento do desmatamento nos Biomas brasileiros por satélite, 2011. <[http://www.mma.gov.br/estruturas/sbf\\_chm\\_rbbio/\\_arquivos/relatoriofinal\\_cerrado\\_2010\\_final\\_72\\_1.pdf](http://www.mma.gov.br/estruturas/sbf_chm_rbbio/_arquivos/relatoriofinal_cerrado_2010_final_72_1.pdf)>. Acesso em: 04 de janeiro 2015.

NDHLALA, A. R.; MOYO, M.; VAN STADEN, J. "Natural antioxidants: fascinating or mythical biomolecules?" *Molecules*, 15: 6905–6930, **2010**.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. "Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010." *J. Nat. Prod.*, 75: 311–335, **2012**.

NIĆIFOROVIĆ, N.; MIHAILOVIĆ, V.; MAŠKOVIĆ, P.; SOLUJIĆ, S.; STOJKOVIĆ, A.; MURATSPAHIĆ, D. P. "Antioxidant activity of selected plant species; potential new sources of natural antioxidants." *Food Chem. Toxicol.*, 48: 3125–3130, **2010**.

NOVINEC, M.; LENARČIČ, B. "Papain-like peptidases: structure, function, and evolution." *Biomol. Concepts*, 4: 287–308, **2013**.

OLIVEIRA, A. M. F.; PINHEIRO, L. S.; PEREIRA, C. K. S.; MATIAS, W. N.; GOMES, R. A.; CHAVES, O. S.; SOUZA, M. F. V.; ALMEIDA, R. N.; ASSIS, T. S. "Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of Some Malvaceae Family Species." *Antioxidants*, 1: 33–43, **2012**.

OLIVEIRA, P. E.; GIBBS, P. E.; BARBOSA, A. A.; TALAVERA, S. "Contrasting breeding systems in two *Eriotheca* (Bombacaceae) species of the Brazilian cerrados." *Plant Syst. Evol.*, 179: 207–219, **1992**.

ORABI, K. Y.; ABAZA, M. S.; EL SAYED, K. A.; ELNAGAR, A. Y.; AL-ATTIYAH, R.; GULERI, R. P. "Selective growth inhibition of human malignant melanoma cells by syringic acid-derived proteasome inhibitors." *Cancer Cell Int.*, 13: 1–15, **2013**.

PACHECO, A. G.; OLIVEIRA, P. M.; PILÓ-VELOSO, D.; ALCÂNTARA, A. F. C. "<sup>13</sup>C-NMR Data of Diterpenes Isolated from *Aristolochia* Species." *Molecules*, 14: 1245–1262, **2009**.

PALERMO, C.; JOYCE, J. A. "Cysteine cathepsin proteases as pharmacological targets in cancer." *Trends Pharmacol. Sci.*, 29: 22–28, **2007**.

PIEME, C. A.; PENLAP, V. N.; NGOGANG, J.; COSTACHE, M. "In vitro cytotoxicity and antioxidant activities of five medicinal plants of Malvaceae family from Cameroon." *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 29: 223–228, **2010**.

POLANCO-HERNÁNDEZ, G.; ESCALANTE-EROSA, F.; GARCÍA-SOSA, K.; ROSADO, M. E.; GUZMÁN-MARÍN, E.; ACOSTA-VIANA, K. Y.; GIMÉNEZ-TURBA, A.; SALAMANCA, E.; PEÑA-RODRÍGUEZ, L. M. "Synergistic effect of lupenone and caryophyllene oxide against *Trypanosoma cruzi*." *Evidence-Based Complement. Altern. Med.*, 1–6, **2013**.

PRACHAYASITTIKUL, S.; SARABAN, P.; CHERDTRAKULKIAT, R.; RUCHIRAWAT, S.; PRACHAYASITTIKUL, V. "New bioactive triterpenoids and antimalarial activity of *Diospyros rubra* Lec." *Exp. Clin. Sci. Int. J.*, 9: 1–10, **2010**.

PYRZYNSKA, K.; PEKAL, A. "Application of free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) to estimate the antioxidant capacity of food samples." *Anal. Methods*, 5: 4288–4295, **2013**.

QUEIROZ, E. F.; FARO, R. R. A.; MELO, C. A. "A biodiversidade brasileira como fonte de novas drogas: passado, presente e futuro." *Rev. Fitoter.*, 9: 31–35, **2009**.

RAJENDIRAN, N.; JENITA, M. J. "Encapsulation of 4-hydroxy-3-methoxy benzoic acid and 4-hydroxy-3,5-dimethoxy benzoic acid with native and modified

cyclodextrins." *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 136: 1349–1357, **2015**.

RAMALHO, S. D.; SOUSA, L. R. F.; BURGER, M. C. M.; LIMA, M. I. S.; SILVA, M. F. G. S.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C. "Evaluation of flavonols and derivatives as human cathepsin B inhibitor." *Nat. Prod. Res.*, 1-3, **2015**.

RIJO, P. D. M. Phytochemical study and biological activities of diterpenes and derivatives from *Plectranthus* species. Portugal, Faculdade de Farmácia - Universidade de Lisboa, 2010. Tese de Doutorado, 282 p.

RIJO, P.; GASPAR-MARQUES, C.; SIMÕES, M. F.; JIMENO, M. L.; RODRÍGUEZ, B. "Further diterpenoids from *Plectranthus ornatus* and *P. grandidentatus*." *Biochem. Syst. Ecol.*, 35: 215–221, **2007**.

SABOGAL-GUÁQUETA, A. M.; MUÑOZ-MANCO, J. I.; RAMÍREZ-PINEDA, J. R.; LAMPREA-RODRIGUEZ, M.; OSORIO, E.; CARDONA-GÓMEZ, G. P. "The flavonoid quercetin ameliorates Alzheimer's disease pathology and protects cognitive and emotional function in aged triple transgenic Alzheimer's disease model mice." *Neuropharmacology*, 93: 134–145, **2015**.

SAITO, S.; KAWABATA, J. "Effects of electron-withdrawing substituents on DPPH radical scavenging reactions of protocatechuic acid and its analogues in alcoholic solvents." *Tetrahedron*, 61: 8101–8108, **2005**.

SCHERER, R.; GODOY, H. T. "Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method." *Food Chem.*, 112: 654–658, **2009**.

SEVERINO, R. P. Busca de Produtos Naturais como Inibidores Específicos de Enzimas. São Carlos, Programa de Pós-graduação em Química - Universidade Federal de São Carlos, 2008. Tese de Doutorado, 244 p.

SEVERINO, R. P.; GUIDO, R. V. C.; MARQUES, E. F.; BRÖMME, D.; SILVA, M. F. G. F.; FERNANDES, J. B.; ANDRICOPULO, A. D.; VIEIRA, P. C. "Acridone alkaloids as potent inhibitors of cathepsin V." *Bioorg. Med. Chem.*, 19: 1477–1481, **2011**.

SIDDIQUE, H. R.; SALEEM, M. "Beneficial health effects of lupeol triterpene: A review of preclinical studies." *Life Sci.*, 88: 285–293, **2011**.

SILVA JR, M. C. 100 Árvores do Cerrado - Guia de Campo. 1a. ed. Rede de Sementes do Cerrado. 2006. 278 p.

SOUZA FILHO, A. P. S.; SANTOS, R. A.; SANTOS, L. S.; GUILHON, G. M. P.; SANTOS, A. S.; ARRUDA, M. S. P.; MULLER, A. H.; ARRUDA, A. C. "Potencial alelopático de *Myrcia guianensis*." *Rev. Planta Daninha*, 24: 649–656, **2006**.

SRINIVASAN, S.; MUTHUKUMARAN, J.; MURUGANATHAN, U.; VENKATESAN, R. S.; JALALUDEEN, A. M. "Antihyperglycemic effect of syringic acid on attenuating the key enzymes of carbohydrate metabolism in experimental diabetic rats." *Biomed. Prev. Nutr.*, 4: 595–602, **2014**.

STEVENS, P. F. Angiosperm Phylogeny Website, 2012. <  
<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>>. Acesso em: 07 de janeiro 2015.

ŚWISŁOCKA, R.; REGULSKA, E.; SAMSONOWICZ, M.; LEWANDOWSKI, W. "Experimental and theoretical study on benzoic acid derivatives." *J. Mol. Struct.*, 1044: 181–187, **2013**.

TANAKA, T.; TANAKA, T.; TANAKA, M. "Potential Cancer Chemopreventive Activity of Protocatechuic Acid." *J. Exp. Clin. Med.*, 3: 27–33, **2011**.

TANG, Q.; CAI, J.; SHEN, D.; BIAN, Z.; YAN, L.; WANG, Y. X.; LAN, J.; ZHUANG, G. Q.; MA, W. Z.; WANG, W. "Lysosomal cysteine peptidase cathepsin L protects against cardiac hypertrophy through blocking AKT/GSK3 $\beta$  signaling." *J. Mol. Med.*, 87: 249–260, **2009**.

TSAI, P.; CASTRO-CRUZ, K. A.; SHEN, C. C.; RAGASA, C. Y. "Chemical constituents of *Broussonetia luzonicus*." *Pharmacogn. J.*, 4: 1–4, **2012**.

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: 68–88, **2012**.

TURK, V.; TURK, B. "Lysosomal Cysteine Proteases and Their Protein Inhibitors : Recent Developments," *Acta Chim. Slov.*, 55: 727–738, **2008**.

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

WU, T. H.; YEN, F. L.; LIN, L. T.; TSAI, T. R.; LIN, C. C.; CHAM, T. M. "Preparation, physicochemical characterization, and antioxidant effects of quercetin nanoparticles." *Int. J. Pharm.*, 346: 160–168, **2008**.

YASUDA, Y.; KALETA, J.; BRÖMME, D. "The role of cathepsins in osteoporosis and arthritis: Rationale for the design of new therapeutics." *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 57: 973–993, **2005**.

YASUDA, Y.; LI, Z.; GREENBAUM, D.; BOGYO, M.; WEBER, E.; BRÖMME, D. "Cathepsin V, a novel and potent elastolytic activity expressed in activated macrophages." *J. Biol. Chem.*, 279: 36761–36770, **2004**.

ZHANG, H.; CONTE, M. M.; HUANG, X. C.; KHALIL, Z.; CAPON, R. J. "A search for BACE inhibitors reveals new biosynthetically related pyrrolidones, furanones and pyrroles from a southern Australian marine sponge, *Ianthella* sp." *Org. Biomol. Chem.*, 10: 2656–2663, **2012**.

ZHANG, Z.; LIAO, L.; MOORE, J.; WU, T.; WANG, Z. "Antioxidant phenolic compounds from walnut kernels (*Juglans regia* L.)." *Food Chem.*, 113: 160–165, **2009**.