



**Universidade Estadual Paulista
“Júlio De Mesquita Filho”**

**Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Câmpus Araraquara**



**“Aplicação da espectrofotometria de fluorescência para identificação de
inibidores de proteases em plantas de Cerrado e Mata Atlântica: uma ferramenta
enzimática moderna para a busca de novos hits biologicamente ativos.”**

Barbara Marcondes Abissi

Araraquara-SP

2012

Barbara Marcondes Abissi

“Aplicação da espectrofotometria de fluorescência para identificação de inibidores de proteases em plantas de Cerrado e Mata Atlântica: uma ferramenta enzimática moderna para a busca de novos hits biologicamente ativos.”

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para obtenção do grau de Farmacêutica-Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro

Co-orientador: Dr. Otavio Flausino Jr

Araraquara – SP

2012

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	09
1.1 Proteases Como Modelo Farmacológico.....	09
1.2 Produtos Naturais Inibidores de Proteases.....	11
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
2.1 Amostras.....	17
2.1.1 Responsáveis pelas amostras.....	17
2.2 Reagentes.....	17
2.3 Ensaio Enzimático.....	18
2.4 Protocolos experimental e análise por espectrometria de fluorescência.....	18
2.4.1 – Forma de análise dos resultados.....	18
2.5 Espectrofotômetro.....	19
3. RESULTADOS.....	20
3.1 Ensaio de inibição de proteases por meio da espectrometria de fluorescência.....	20
3.1.1 Resultados com inibidores utilizados como padrão.....	20
4. DISCUSSÃO.....	40
5. CONCLUSÃO.....	45
REFERÊNCIAS	46
ANEXO.....	51

RESUMO

O presente trabalho de conclusão de curso reporta os resultados obtidos durante o estágio de Iniciação Científica realizado no Núcleo de Biossíntese, Bioensaios e Ecofisiologia de Produtos Naturais do Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química da UNESP-Araraquara. Foram realizados ensaios de triagem de substâncias naturais, semissintéticas e sintéticas com atividade inibitória sobre a protease aspártica pepsina e a protease serínica subtilisina. As amostras foram obtidas de extratos vegetais e de fungos endofíticos e foram testadas tanto substâncias puras naturais como diterpenos clerodânicos, cromenos, peptídeos e amidas bem como derivados sintéticos do ácido caféico, ferúlico, alcalóides piridínicos, entre outros resultantes das pesquisas realizadas por pesquisadores do NuBBE. Resultados mostraram que os ensaios de inibição da pepsina e da subtilisina apresentaram seletividade para os diferentes tipos de substâncias testadas. Ainda mais, foi possível observar diferenças nos resultados obtidos com os enantiômeros dos cromanos e dos cromenos. As substâncias que apresentaram maiores porcentagens de inibição foram os cromenos, os derivados do ácido cafeico, do ácido ferúlico e do ácido benzóico, as amidas, bem como os diterpenos clerodânicos. Alguns destes resultados foram publicados em revistas indexadas (Flausino *et al.*, 2009; López *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2011) e outros estão sendo preparados para publicação.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Superposição do sítio de ligação de proteases serínicas (mostrando a tríade catalítica serina (SER) – histidina (HIS) – aspartato (ASP) e seus respectivos inibidores. Subtilisina (branco) e proteinase A (laranja) em complexo com um inibidor sintético (amarelo) e com a quimostatina (vermelho).....	11
Figura 02	Estrutura molecular de derivados cumarínicos de ocorrência natural e do produto sintético Tipranavir (Aptivus®), produzido pela <i>Boehringer Ingelheim</i> , derivado da fenprocumona, um metabólito secundário acumulado em várias espécies de <i>Angiospermae</i>	13
Figura 03	Estrutura esquemática do sítio ativo da protease aspártica do vírus HIV mostrando os dois resíduos de Asp e os dois resíduos de Ile em complexo com o um inibidor benzopirano, a fenprocumona.....	14
Figura 04	Estrutura do ácido rododauricromânico A isolado de <i>Rhododendron dauricum</i> , um cromano natural com potente atividade sobre a protease aspártica do HIV.....	14
Figura 05	Mecanismo de ação postulado para a inativação da α -quimotripsina, uma protease serínica, por derivados cumarínicos.....	16
Figura 06	Estrutura dos cromanos isolados de <i>Peperomia obtusifolia</i> testados nos ensaios de inibição de proteases aspárticas e serínicas.....	21
Figura 07	Estrutura das substâncias isoladas de <i>Piper gaudichaudianum</i> testadas nos ensaios de inibição de proteases aspárticas e serínicas.....	23
Figura 08	Estrutura química geral das casearinas (10 – 12) e da caseargrewiina F (13) isoladas de <i>Casearia sylvestris</i>	25
Figura 09	Estrutura do diacetato do ácido caféico (14) e estrutura geral dos derivados ácido cafeico (15 – 22).....	27
Figura 10	Estrutura geral dos derivados sintéticos do ácido ferúlico testados nos ensaios de inibição de proteases.....	30

Figura 11	Estruturas químicas das amidas isoladas de <i>Piper tuberculatum</i> (32 – 47), testadas nos ensaios de inibição das proteases pepsina e subtilisina.....	33
Figura 12	Estrutura do ácido benzóico (49) e seus derivados biossintetizados (i.e. geranilização) (50 – 54) a partir de extratos enzimáticos de folhas de <i>Piper crassinervium</i> (López et al., 2010).....	36
Figura 13	Estruturas químicas dos derivados piridínicos sintéticos (55 – 59), testados nos ensaios de inibição de proteases.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Efeito inibitório (%) de benzopiranos utilizados como padrão sobre a atividade enzimática das proteases subtilisina e pepsina.....	20
Tabela 02	Resultados (% Inibição) obtidos no ensaio de inibição de proteases com os cromanos isolados de <i>Peperomia obtusifolia</i> (1 - 6).....	22
Tabela 03	Resultados (% Inibição) obtidos no ensaio de inibição de proteases com os cromenos isolados de <i>Piper gaudichadianum</i> (7 – 9).....	24
Tabela 04	Resultados (% Inibição) obtidos nos ensaios de inibição de proteases com os diterpenos clerodânicos (10 – 13) isolados de <i>Casearia sylvestris</i>	26
Tabela 05	Resultados (% Inibição) obtidos nos ensaios de inibição de proteases com o diacetato do ácido cafeico e com os derivados sintéticos do ácido cafeico.....	28
Tabela 06	Resultados (% Inibição) obtidos nos ensaios de inibição de proteases com os derivados sintéticos do ácido ferúlico.....	32
Tabela 07	Resultados (% Inibição) obtidos nos ensaios de inibição de proteases com as amidas isoladas de <i>Piper tuberculatum</i> (32 – 47).....	35
Tabela 08	Resultados (% Inibição) obtidos nos ensaios de inibição de proteases do ácido benzóico (49) e seus derivados biossintetizados (i.e. geranilização) (50 – 54) a partir de extratos enzimáticos de folhas de <i>Piper crassinervium</i>	37
Tabela 09	Resultados (% Inibição) obtidos nos ensaios de inibição de proteases com os derivados piridínicos sintéticos (55 – 59).	39

1. INTRODUÇÃO

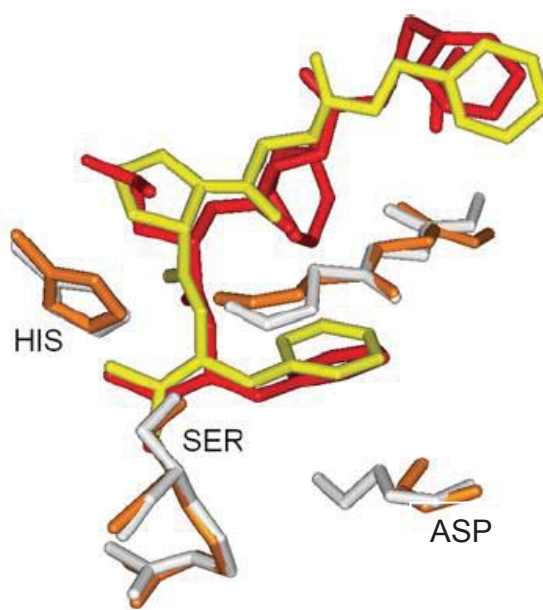
1.1. Proteases Como Modelo Farmacológico

A subtilisina Carlsberg (SUB), também conhecida como alcalase (Tovar-Pérez *et al.*, 2009), é uma protease serínica isolada de *Bacillus licheniforme* enquanto a pepsina (PEP) é uma protease aspártica que desempenha importante função no processo digestivo dos vertebrados. Ambas são objeto de várias pesquisas para seleção de novos inibidores de potencial terapêutico, estudos de mecanismo de ação, relação estrutura - atividade (REA) (Tovar-Pérez *et al.*, 2009; Micheelsen *et al.*, 2008; Takahashi *et al.*, 2008; Marcinkeviciene *et al.*, 2002) e para o desenvolvimento de novas técnicas analíticas para estudos de atividade enzimática (Hirata *et al.*, 2003; Gomes *et al.*, 2003). Em termos farmacológicos a SUB está relacionada a outras proteases serínicas como a do vírus do Hepatite C, a enzima conversora de angiotensina (ECA), a trombina e a elastase. A PEP, além de ser alvo de interesse farmacológico para o tratamento de doenças gástricas, pode também ser usada como ferramenta para o estudo de especificidade ligante/receptor para proteases aspárticas como a do HIV, a renina, a plasmepsina (de espécies de *Plasmodium*, parasita causador da malária) e a β -secretase (relacionada com o desenvolvimento da Doença de Alzheimer) (Babine e Bender, 1997).

A utilização da SUB e PEP como modelo farmacológico molecular para outras proteases da mesma família têm como objetivo a automatização e triagem farmacológico, facilitando a manipulação do ensaio enzimático. Adicionalmente, por serem mais estáveis podem eventualmente diminuir os custos do ensaio, pois substituem enzimas de difícil produção. Este modelo farmacológico está validado e tem

suporte científico na teoria da evolução convergente (Gold *et al.*, 2007; Marcinkeviciene *et al.*, 2002). De acordo com esta teoria, as proteases de uma mesma família (serínica ou aspártica, por exemplo) evoluem a partir de uma mesma enzima ancestral desenvolvendo suas características estruturais específicas, mas mantendo os mesmos resíduos de ácidos aminados em seu sítio catalítico (figura 1, p. 11). A partir daí as proteases podem ser divididas em subfamílias, como as “tipo-subtilisina” e “tipo-tripsina” que fazem parte da família das proteases serínicas. Além disso, estas duas famílias de proteases selecionadas para estudo no presente trabalho (serínica e aspártica) foram amplamente estudadas quanto ao mecanismo de ação de diferentes inibidores peptidomiméticos e os não-peptidomiméticos, como os derivados de benzopiranos (cromenos e cumarinas) e as piperidinas (Micheelsen *et al.*, 2008; Moose *et al.*, 2007; Wouters *et al.*, 2002; Pouchet *et al.* 2000; Thairisvong *et al.*, 1994). Desta forma, a relação estrutura atividade (REA) envolvendo estes dois sistemas é bastante estudada e muitos dados estão disponíveis na literatura científica.

Figura 1 – Superposição do sítio de ligação de proteases serínicas (mostrando a tríade catalítica serina (SER) – histidina (HIS) – aspartato (ASP) e seus respectivos inibidores. Subtilisina (branco) e proteinase A (laranja) em complexo com um inibidor sintético (amarelo) e com a quimostatina (vermelho). Retirado de Gold *et al.*, 2002.



1.2. Produtos Naturais Inibidores de Proteases

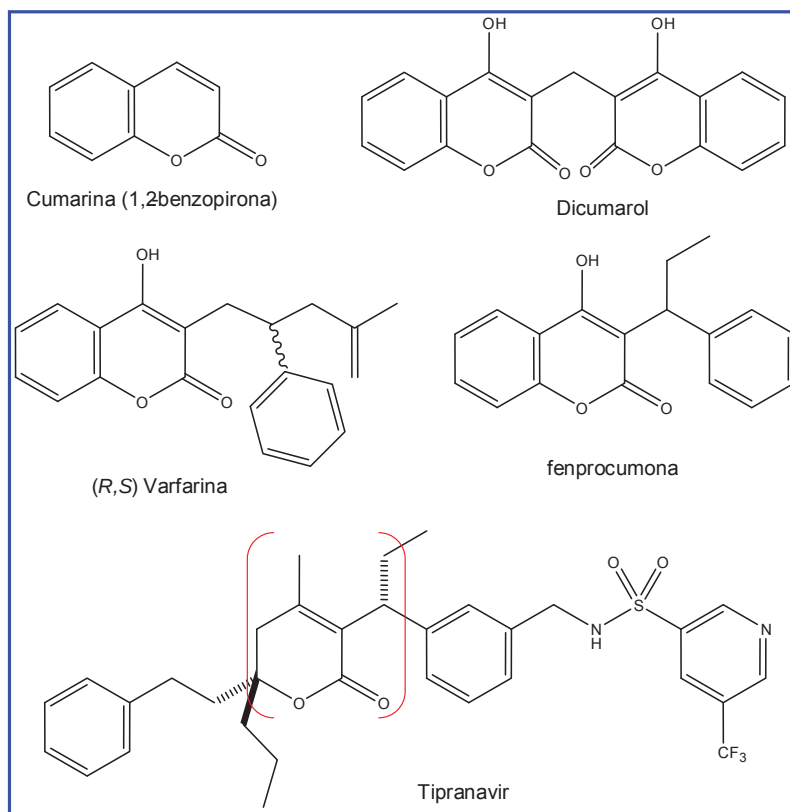
Entre os 877 novos protótipos (New Chemical Entities – NCE) de baixo peso molecular introduzidos no mundo como fármacos durante o período de 1981-2002, 61% são substâncias derivadas ou tendo sua estrutura baseada em produtos naturais (Newman e Cragg, 2007). Muitos estudos com substâncias extraídas de plantas apresentam atividade inibitória sobre vários tipos de proteases: as cumarinas, os terpenóides, as xantonas, os alcalóides e os flavonóides possuem ação sobre a HIV-1 PR (Whang *et al.*, 2004; Notka *et al.*, 2004; Yust *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005); os derivados de catequinas, as flavonas, os flavonóis e os estilbenóides (Shimmyo *et al.*, 2008; Jeon *et al.*, 2007; Jeon *et al.*, 2003) sobre a β -secretase, as lactonas-terpenoídicas, as catequinas (Siedle, *et al.*, 2002; Demeule *et al.*, 2000) e os peptídeos

cíclicos (Matthew *et al.*, 2008) sobre a elastase, entre muitas outras substâncias naturais com atividade inibitória sobre diferentes proteases.

Apesar de um número expressivo de inibidores peptidomiméticos existentes no mercado farmacêutico com relativa eficácia, o interesse por novos inibidores de baixo peso molecular é grande, pois os fármacos disponíveis no mercado apresentam alta hidrolifidade e baixa biodisponibilidade (Martins *et al.*, 2009).

A descoberta de inibidores de proteases a partir de substâncias naturais tem se mostrado um importante recurso na produção de substâncias com eficácia terapêutica. O exemplo mais citado é o desenvolvimento dos fármacos inibidores da protease do vírus HIV a partir da fenprocumona (figura 2, p. 13). Os trabalhos de REA (figura 3, p. 14) levaram o grupo de Thairisvongs a desenvolver o primeiro inibidor não-peptidomimético com atividade anti-HIV, o tipranavir (Aptivus® - Boehringer Ingelheim) (Thairisvongs *et al.*, 1994; Tuner *et al.*, 1998).

Figura 2. Estrutura de derivados cumarínicos de ocorrência natural e do produto sintético tipranavir (Aptivus®), produzido pela *Boehringer Ingelheim*, derivado da fenprocumona, um metabólito secundário acumulado em várias espécies de angiosperma.



A partir destes trabalhos iniciais que estabeleceram o mecanismo de ação dos benzopiranos sobre as proteases aspárticas, muitos outros estudos foram realizados com a intenção de se descobrir novos inibidores deste tipo de enzimas. Kashiwada e colaboradores (2001) demonstraram que os cromanos prenilados (figura 4, p. 14) isolados de *Rhododendron dauricum* também apresentam potente atividade inibitória sobre proteases aspárticas e que seus isômeros exibem diferente perfil de inibição de acordo com sua conformação estrutural.

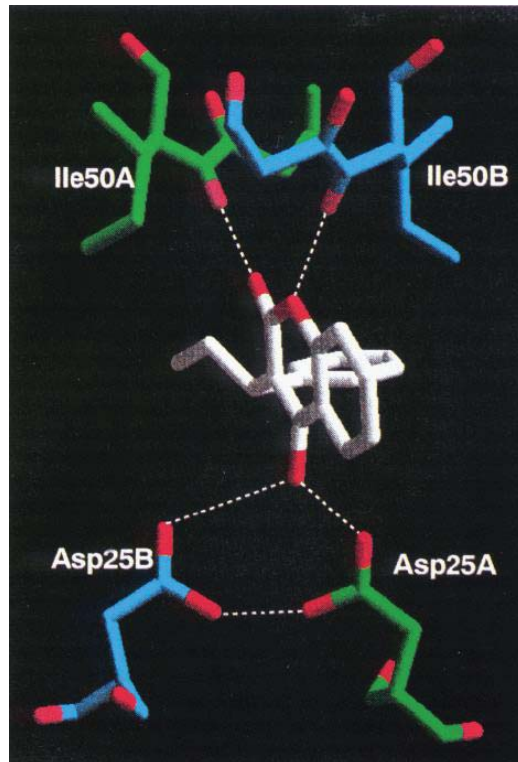


Figura 3 – Estrutura esquemática do sítio ativo da protease aspártica do vírus HIV mostrando os dois resíduos de Asp e os dois resíduos de Ile em complexo com o um inibidor benzopirano, a fenprocumona. Retirado de Thaisrivongs *et al.*, 1994.

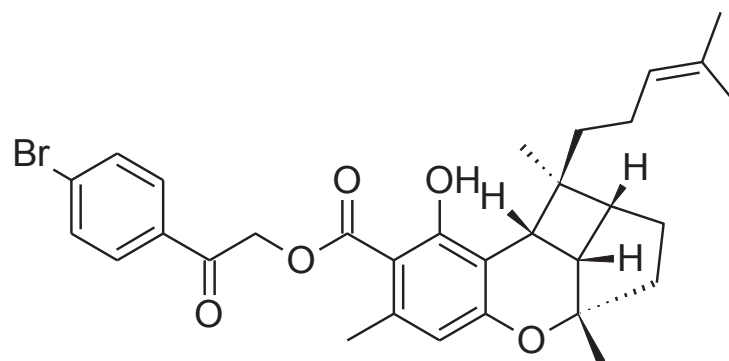


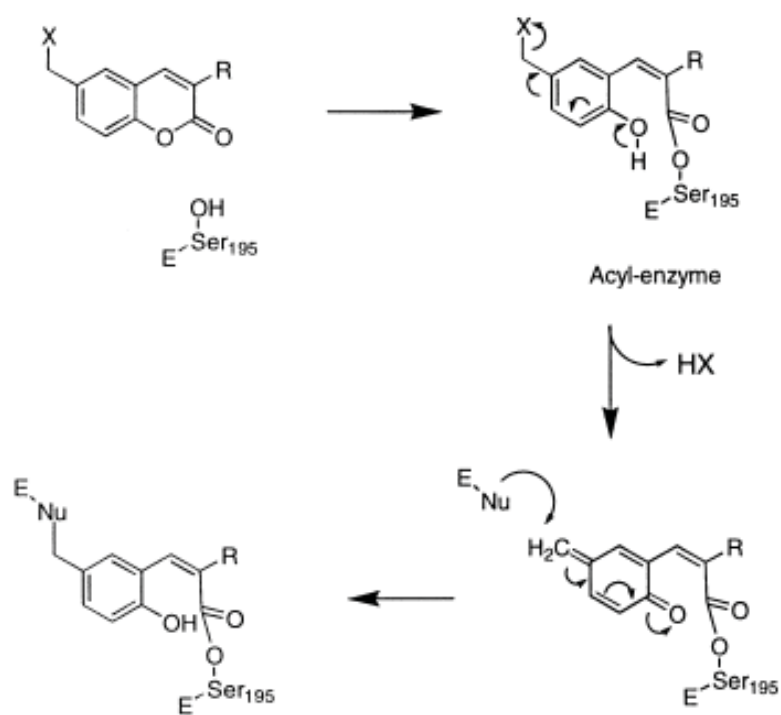
Figura 4 – Estrutura do ácido rododauricromânico A isolado de *Rhododendron dauricum*, um cromano natural com potente atividade sobre a protease aspártica do HIV (Kashiwada *et al.* 2001).

O aumento da atividade biológica devido à presença de substituintes prenilados tem se mostrado evidente também para outros tipos de substâncias naturais como os flavonóides, benzofenonas e polifenóis (Poerwono *et al*, in press; Martins *et al.*, 2009; Yasaki *et al*, 2009). Cheenpracha e colaboradores (2006) demonstraram que a prenilação da hidroxipanduratina A, uma dihidrochalcona, é essencial para a sua atividade inibitória de protease.

Adicionalmente, um grande número de inibidores de algumas proteases serínicas como a quimotripsina e a elastase foram publicados, a saber: as enol-lactonas, β -lactanas, isocumarinas substituídas, metilídrocumarinas, entre outras (Pochet *et al.*, 2000). Uma proposta para a atividade dos derivados benzopiranos é a presença do grupo lactônico, o qual pode reagir com o resíduo ativo da serina (figura 5, p. 16). Após a abertura do anel e a eliminação de HX, a metil-quinona eletrofílica resultante pode formar ligação covalente com os resíduos nucleofílicos como Histidina 57 (His-57) e Metionina-192 (Met-192), localizadas no sítio ativo da protease. Pochet e colaboradores (2000) discutem que a natureza do substituinte na posição 3 influencia a potência inibitória dos benzopiranos sobre as proteases serínicas.

Estes resultados reportados na literatura demonstram que a postulação teórica do mecanismo de ação de algumas substâncias sobre as proteases, é de grande utilidade nos estudos de REA e “*drug based design*”.

Figura 5 – Mecanismo de ação postulado para a inativação da α -quimotripsina, uma protease serínica, por derivados cumarínicos (retirado de Pochet *et al.*, 2000).



2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Substâncias

Foram testadas substâncias de outros projetos desenvolvidos no NuBBE, do departamento de Química Orgânica do Instituto de Química de Araraquara (UNESP). Algumas substâncias já foram caracterizadas quimicamente e outras ainda estão em fase de identificação. As amostras foram testadas em diferentes concentrações (0,0001 a 50 μ M). É importante ressaltar que algumas substâncias apresentam fluorescência quando excitadas, dificultando a análise dos resultados, desta forma, as concentrações testadas variam de acordo com as necessidades.

2.1.1 Responsáveis pelas amostras:

1-9: Dr. João Marcos Bastista Junior

10-13: Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos

14-31: Dr. Luís Octávio Regasini

32-47: Dr. Fernando Cotinguiba

49-54: Dra. Sílvia Noeli Lopêz

55-59: Msc. Marília Valli

2.2 Reagentes

Substrato fluorogênico Arg-Glu-(EDANS)-Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Ile-Val-Gln-Lys-(DALBCYL)-Arg (EDANS-DABCYL), subtilisina Carlsberg, pepsina, cumarina, dicumarol, varfarina e DMSO grau espectrofotométrico (Sigma-Aldrich Inc, St. Louis, MO, EUA).

2.3 Ensaio Enzimático

Enzimas, substratos, inibidores padrão e solução tampão:

- pepsina (1,7 nM), substrato fluorogênico EDANS-DABCYL (2 μ M), , tampão acetato 0,1 M (pH 4,4).
- subtilisina Carlsberg (37 nM), substrato fluorogênico EDANS-DABCYL (2 μ M), tampão fosfato 0,1 M (pH 7,5).

As soluções enzimáticas foram preparadas no dia do experimento e armazenadas a -80°C . As soluções tampão foram armazenadas a 8°C .

2.4 Protocolo experimental e análise por espectrometria de fluorescência

Foi utilizado o mesmo procedimento para todos os ensaios com as diferentes proteases. Inicialmente a enzima foi incubada com a amostra a ser testada por uma hora em solução tampão. Em seguida 20 μL desta mistura foi transferida para as microplacas pretas opacas e 80 μL do substrato foi adicionado para dar início à reação enzimática por um período de cinco minutos (volume final 100 μL). O intervalo entre as leituras dependeu da quantidade de amostras testadas e foi no máximo de um minuto. A intensidade de fluorescência foi medida em um comprimento de onda de 360 nm de excitação e de 460 nm de filtro de emissão. A temperatura foi controlada em 37°C .

2.4.1 – Forma de análise dos resultados

Foram comparados os resultados obtidos com o ensaio padrão (enzima + tampão + substrato) e com as amostras experimentais (enzima + amostra + substrato). Para todas as amostras testadas foram realizados ensaios “branco” (10 μL amostra +

90 µL tampão) para medida da fluorescência basal, detecção de autofluorescência das substâncias e determinação da sensibilidade de operação do espectrofotômetro.

Todos os ensaios foram feitos em triplicata e a partir dos valores de intensidade de fluorescência foram calculados a média das triplicatas, o desvio padrão (DV) e o desvio padrão relativo (DVR) ($DV \times 100 / \text{média}$) para cada leitura (ver exemplo em anexo 1, p. 52 - 55). Foram considerados válidos os resultados com DVR abaixo de 10 %.

O cálculo da porcentagem de inibição foi realizado de acordo com a fórmula abaixo:

$$\%I = 100 - \left(\frac{MA}{MP} \times 100 \right)$$

Onde:

%I = porcentagem de inibição

MA = média das leituras no ensaio feito com a amostra

MP = média das leituras no ensaio padrão

2.5 Espectrofotômetro

As medidas de atividade inibitória sobre as proteases por meio da espectrometria de fluorescência foram realizadas em um leitor de microplacas com multidetecção SynergyTM HT (Bio-Tek® Instruments, Inc. Winooski, Vermont, USA). As intensidades de fluorescência medidas foram analisadas por meio do software de análise de dados KC4TM (Bio-Tek® Instruments, Inc. Winooski, Vermont, USA) e com o auxílio de um Microsoft Windows XP.

3. RESULTADOS

3.1 Ensaio de inibição de proteases por meio da espectrometria de fluorescência

3.1.1 Resultados com inibidores utilizados como controle positivo

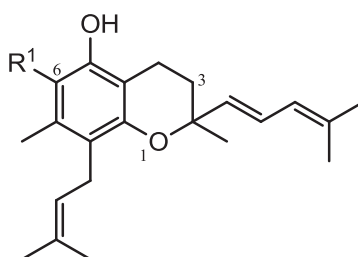
Como pode ser observado na tabela 1 (p. 20), as benzopironas testadas aqui como inibidores padrão apresentaram significativa atividade inibitória sobre as proteases quando testadas na concentração de 1 µg/mL, corroborando os dados da literatura (Pochet *et al.*, 2000; Thairisvong *et al.*, 1994). A varfarina e o dicumarol (66 e 64 % inibição, respectivamente) mostraram-se mais potentes do que a cumarina (52 % inibição) no teste com a subtilisina. Por outro lado, no teste com a pepsina, a cumarina apresentou acentuada atividade inibitória (78 %), enquanto o dicumarol e a varfarina apresentaram atividade moderada (60 e 48 % inibição). Estes resultados corroboram os dados da literatura (Thairisvong *et al.*, 1994).

Tabela 1 – Efeito inibitório (%) de benzopiranos utilizados como padrão sobre a atividade enzimática das proteases subtilisina e pepsina.

Inibidor padrão	Subtilisina	Pepsina
(concentração = 1 µg/mL)		
	% Inibição	
cumarina	52	78
varfarina	66	48
dicumarol	64	60

Na tabela 2 (p. 22) estão representados os resultados obtidos com a mistura racêmica dos cromanos isolados de *Peperomia obtusifolia* e seus enantiômeros puros **1 – 3** (figura 6, p.21). A mistura racêmica (**1**) apresentou atividade inibitória de 32,60 % com a concentração de 10 µg/mL. Quanto testados isoladamente nesta mesma concentração, os enantiômeros mostraram diferente perfil de inibição. O enantiômero S (**2**) apresentou perfil semelhante ao observado para a mistura racêmica com 31,55 % de inibição, enquanto que o enantiômero **3** apresentou inibição de 14,14 %. Os cromanos **4 – 6** não apresentaram atividade inibitória, mesmo quando testados na maior concentração (10 µg/mL) com nenhuma das amostras testadas, ou seja, mistura racêmica e enantiômeros purificados (tabela 2, p. 22).

Figura 6 - Estrutura dos cromanos isolados de *Peperomia obtusifolia* testados nos ensaios de inibição de proteases aspárticas e serínicas



Cromanos	R ¹	Descrição da substância
1	COOH	Mistura racêmica
2	COOH	Enantiômero S
3	COOH	Enantiômero R
4	H	Mistura racêmica
5	H	Enantiômero S
6	H	Enantiômero R

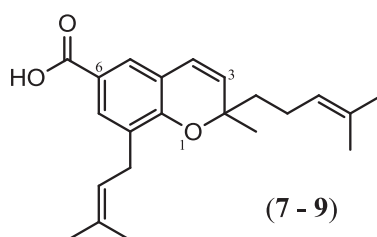
Tabela 2 – Resultados (% Inibição) obtidos no ensaio de inibição de proteases com os cromanos isolados de *Peperomia obtusifolia* (**1 - 6**) em diferentes concentrações (µg/mL).

Pepsina								
Substância	50	25	10	1	1.10^{-1}	1.10^{-2}	1.10^{-3}	1.10^{-4}
1	nd	nd	32,60	29,90	21,07	15,53	6,12	5,90
2	nd	nd	31,55	15,07	13,28	4,53	0	4,78
3	nd	nd	14,14	7,92	6,23	5,77	2,47	Nd
4	nd	nd	0	1,82	0	0	0	Nd
5	nd	nd	22,83	19,65	8,30	0	3,66	2,62
6	nd	nd	nd	3,56	10,65	2,49	2,32	3,25
Subtilisina								
1	86,71	51,65	34,32	13,42	0,45	0	nd	Nd
2	54,12	46,90	35,45	31,64	26,82	19,64	nd	Nd
3	0	0	0	0	0	0	0	0
4	24,40	15,24	16,49	17,13	16,32	4,40	nd	Nd
5	nd	nd	nd	52,31	28,77	3,70	nd	Nd
6	nd	nd	16,74	28,34	4,79	4,82	nd	Nd

nd = não determinado

Os ensaios de inibição da pepsina com a mistura racêmica isolada de *Piper gaudichandianum* e seus cromenos prenilados (**7 – 9**) (figura 7, p. 23) apresentaram resultados diferentes (tabela 3, p. 24) dos observados com os cromanos. Somente a mistura racêmica (**7**) apresentou moderada atividade de 29,04 % com a concentração de 10 µg/mL. Os enantiômeros isolados, (**8**) e (**9**), não apresentaram atividade como pode ser observado na tabela 3 (p. 24).

Figura 7 – Estrutura das substâncias isoladas de *Piper gaudichandianum* testadas nos ensaios de inibição de proteases aspárticas e serínicas.



Substância	Descrição da substância
7	Mistura racêmica
8	Enantiômero puro <i>S</i>
9	Enantiômero puro <i>R</i>

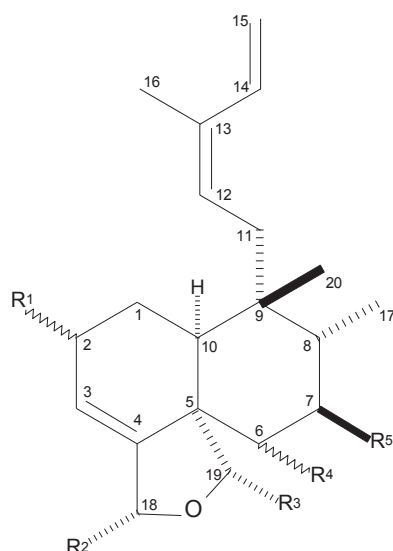
Tabela 3 – Resultados (% Inibição) obtidos no ensaio de inibição de proteases com os cromenos isolados de *Piper gaudichaudianum* (**7 – 9**) em diferentes concentrações (µg/mL)

Pepsina								
Substância	50	25	10	1	1.10 ⁻¹	1.10 ⁻²	1.10 ⁻³	1.10 ⁻⁴
7	nd	Nd	29,04	29,49	9,80	0,74	9,86	8,71
8	nd	Nd	0,92	1,61	0	0	0	0
9	nd	26,86	0,97	3,21	2,44	0	0	0
Subtilisina								
7	37,88	31,86	26,21	11,70	9,70	7,31	nd	nd
8	0	0	nd	0,64	0	5,70	nd	nd
9	0	0	8,10	0	10,48	0	nd	nd

nd = não determinado

Comparativamente, os resultados obtidos no ensaio com a protease serínica subtilisina mostraram que os cromanos e cromenos também apresentaram atividade inibitória sobre esta enzima (tabelas 2 e 3, respectivamente). A mistura racêmica (**1**) e o enantiômero puro *S*, (**2**), inibiram a atividade da subtilisina em 86 e 54 % com a maior concentração testada (50 µg/mL). O enantiômero *R* (**3**) não alterou a atividade enzimática da subtilisina (tabela 2, p. 22). Os resultados obtidos com o cromenos (**7 – 9**) (tabela 3, p. 24) foram diferentes dos observados nos ensaios com a pepsina. Mesmo com a concentração de 50 µg/mL estes compostos não inibiram a atividade da subtilisina. Os resultados obtidos com os cromanos e cromenos nos ensaios de inibição das proteases pepsina e subtilisina corroboram trabalhos da literatura (Garino *et al.*, 2005; Pochet *et al.*, 2000) que mostram a interação do núcleo benzopirano destas substâncias e o sítio ativo das proteases aspárticas e serínicas.

Figura 8 – Estrutura química geral das casearinas (**10 – 12**) e da caseargrewiina F (**13**) isoladas de *Casearia sylvestris*.



Substância	Nome da substância	Substituintes				
		R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵
10	Casearina B	OCH ₃ (α)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂ (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂
11	Casearina D	OH (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂	CH ₃ CO ₂	OH (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂
12	Casearina X	n-C ₃ H ₇ CO ₂ (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂	CH ₃ CO ₂	OH (α)	H
13	Caseargrewiina F	n-C ₃ H ₇ CO ₂ (α)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	OH (α)	H

Na figura 8 (p. 25) está representada a estrutura geral dos diterpenos clerodânicos isolados de *Casearia sylvestris* e os resultados obtidos nos ensaios de inibição de proteases estão mostrados na tabela 4 (p. 26). Os valores de % de inibição mostraram que a substância (**10**) em 10 µg/mL apresentou potente atividade inibitória (65,48 %) sobre a pepsina. Os compostos (**11 – 13**) tiveram efeito inibitório de moderado a fraco, ou seja, 27,45%; 14,26% e 32,48%, respectivamente, também em 10 µg/mL. Os resultados obtidos nos ensaios realizados com a subtilisina mostraram que

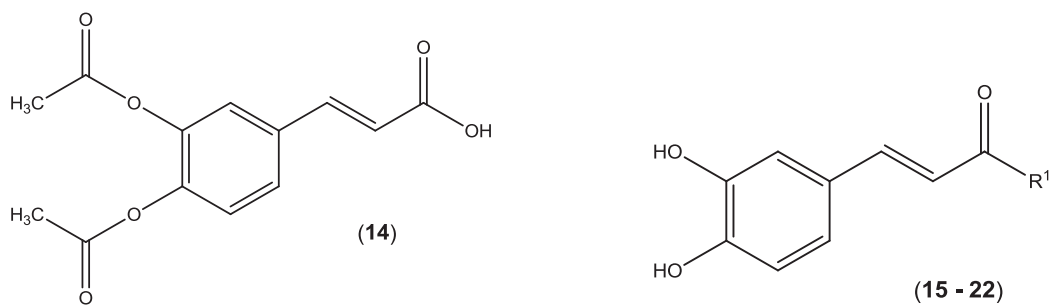
os diterpenos clerodânicos isolados de *C. sylvestris* não apresentaram atividade inibitória sobre esta enzima em nenhuma das concentrações testadas (tabela 4, p. 26).

Tabela 4 – Resultados (% Inibição) obtidos nos ensaios de inibição de proteases com os diterpenos clerodânicos (**10 – 13**) isolados de *Casearia sylvestris* em diferentes concentrações (µg/mL)

Pepsina								
Substância	50	25	10	1	1.10^{-1}	1.10^{-2}	1.10^{-3}	1.10^{-4}
10	nd	nd	65,48	45,06	31,79	0,00	nd	Nd
11	nd	nd	27,45	21,47	7,49	7,92	nd	Nd
12	nd	nd	14,26	5,38	5,29	0,00	nd	Nd
13	nd	nd	32,48	22,38	18,91	4,96	nd	Nd
Subtilisina								
10	7,54	1,98	0,50	0,00	0,00	nd	nd	Nd
11	8,27	6,59	6,82	0,00	0,00	nd	nd	Nd
12	0,56	0,00	0,23	0,006	0,00	nd	nd	Nd
13	2,06	0,52	0,00	0,00	nd	nd	nd	Nd

nd = não determinado

Figura 9 – Estrutura do diacetato do ácido caféico (**14**) e estrutura geral dos derivados ácido caféico (**15 – 22**)



Substância	Nome da substância
14	Diacetato do ácido caféico
15	Ácido caféico
16	Cafeato de etila
17	Cafeato de propila
18	Cafeato de isopropila
19	Cafeato de butila
20	Cafeato de pentila
21	Cafeato de hexila
22	Cafeato de octila

Tabela 5 - Resultados (% Inibição) obtidos nos ensaios de inibição de proteases com o diacetato do ácido caféico e com os derivados sintéticos do ácido cafeico em diferentes concentrações (µg/mL)

Pepsina						
Substância	50	25	10	1	1.10^{-1}	1.10^{-2}
14	2,61	0	2,74	0	0	0
15	17,65	13,03	4,29	0	0	0
16	33,33	16,41	25,14	5,56	0,10	0
17	41,52	nd	20,55	7,20	0	0
18	39,57	27,31	17,94	1,71	1,68	0
19	27,80	21,53	17,84	0,78	0	0
20	16,57	0	19,36	13,35	9,79	10,67
Subtilisina						
14	0	0				
15	18,63	6,86				
16	25,35	27,64				
17	33,48	0,93				
18	49,29	28,14				
19	nd	nd				
20	41,15	32,34				
21	37,75	6,76				
22	32,31	25,37				

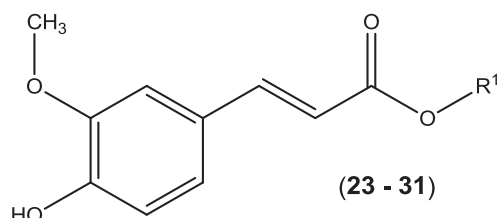
nd = não determinado

Obs. Nos ensaios com a subtilisina não foram testadas concentrações menores que 25 µg/mL.

Na tabela 5 (p. 28) estão representados os resultados (% de inibição) do diacetato do ácido cafeico e dos derivados sintéticos do ácido cafeico. Como pode ser observado, o cafeato de propila (**17**) apresentou moderada atividade inibitória de 41,52 % com a concentração de 50 µg/mL sobre a atividade enzimática da pepsina. Interessantemente, o cafeato de isopropila (**18**) também inibiu a atividade da pepsina (39,57 %) de forma semelhante ao cafeato de propila (**17**) e com a mesma concentração. Os outros derivados testados, o cafeato de etila (**16**), o cafeato de butila (**19**) e o cafeato de pentila (**20**) apresentaram fraca atividade inibitória sobre a protease aspártica pepsina, 33,33 %; 27,80 % e 16,57 %, respectivamente, mesmo com a maior concentração utilizada.

O pré-screening com as concentrações de 25 e 50 µg/mL demonstrou que os derivados do ácido cafeico inibiram a atividade enzimática da subtilisina. O cafeato de isopropila (**18**), de pentila (**20**) e de hexila (**21**) apresentaram os maiores valores de % de inibição, 49,29 %; 41,15 % e 37,75 %, respectivamente, quando testado em 50 µg/mL. As outras substâncias apresentaram atividade de moderada a fraca (tabela 5, p. 28).

Figura 10 - Estrutura geral dos derivados sintéticos do ácido ferúlico testados nos ensaios de inibição de proteases.



Substância	Nome da substância
23	Ácido Ferúlico
24	Ferulato de butila
25	Ferulato de etila
26	Ferulato de metila
27	Ferulato de heptila
28	Ferulato de hexila
29	Ferulato de isopropila
30	Ferulato de pentila
31	Ferulato de propila

Na figura 10 (p. 30) está representada a estrutura geral dos derivados sintéticos do ácido ferúlico e os resultados dos ensaios de inibição de proteases estão mostrados na tabela 6 (p. 32). Os ensaios realizados com a pepsina mostraram que com a concentração de 50 µg/mL o ácido ferúlico (**23**), o ferulato de butila (**24**) e o ferulato de etila (**25**) apresentaram potente efeito inibitório da atividade enzimática (96,27 %; 63,67 % e 76,70%, respectivamente). O ferulato de metila (**26**), nesta mesma concentração, apresentou fraca atividade inibitória (20,12 %). Os outros derivados de cadeia longa do ácido ferúlico não puderam ser testados nas concentrações de 25 e 50 µg/mL, pois

apresentaram altos valores de intensidade de fluorescência, sobrepondo-se à fluorescência do substrato EDANS-DABCYL. Desta forma, foram testadas concentrações no intervalo entre 0,001 – 10 µg/mL. Como podem ser observados na tabela 6 (p. 32), os derivados de cadeia longa do ácido ferúlico não apresentaram atividade inibitória significativa sobre a pepsina.

O ácido ferúlico (**23**) e seus derivados (**24 – 31**) não apresentaram atividade inibitória sobre a subtilisina (tabela 6, p. 32).

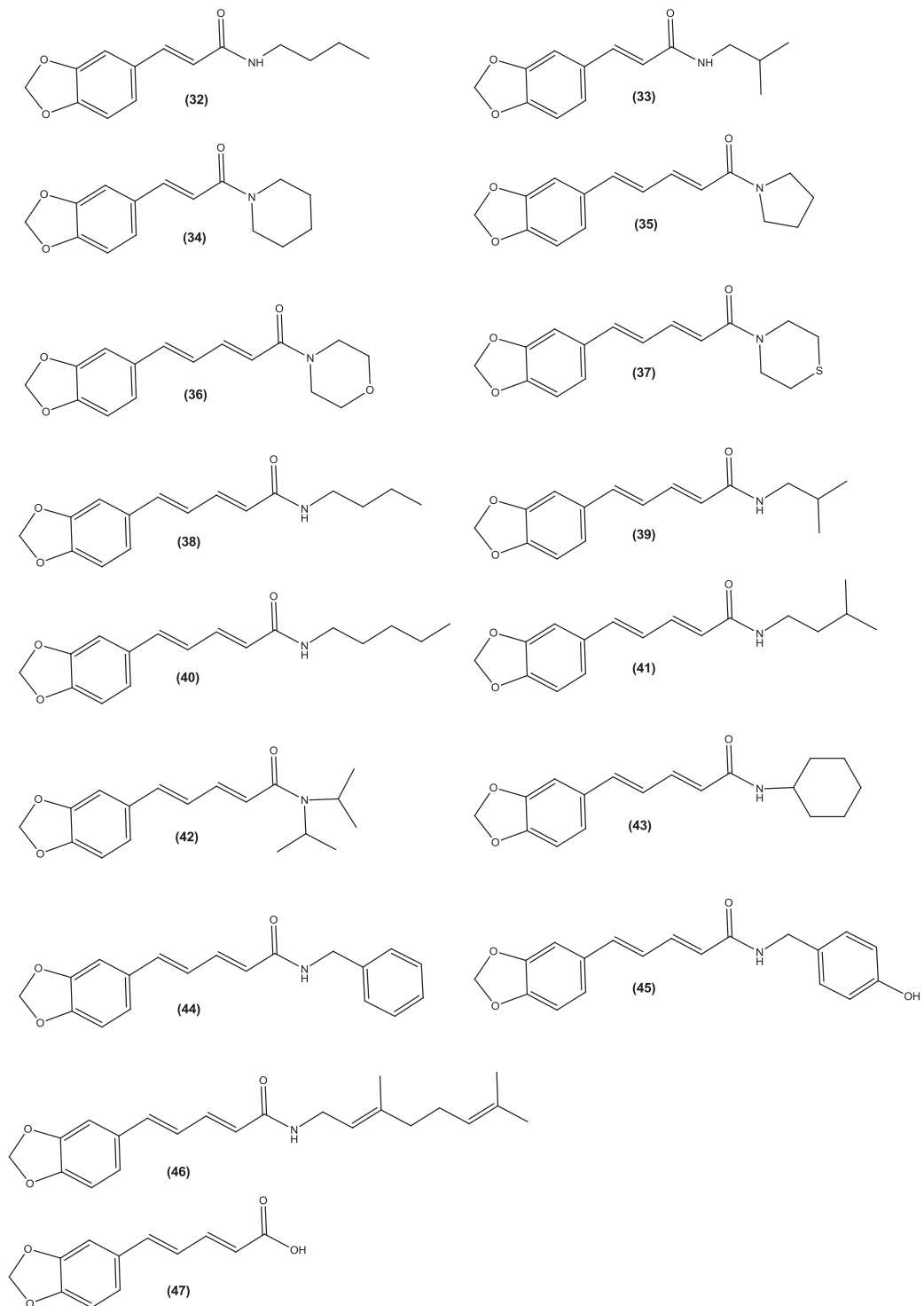
Tabela 6 - Resultados (% Inibição) obtidos nos ensaios de inibição de proteases com os derivados sintéticos do ácido ferúlico em diferentes concentrações (µg/mL)

Pepsina						
Substância	50	25	10	1	1.10^{-1}	1.10^{-2}
23	96,27	32,55	24,09	10,50	7,95	7,20
24	63,67	7,25	8,27	0	0	0
25	76,70	35,32	23,11	0	0	1,03
26	20,12	7,86	11,82	0	0	0
27	Nd	Nd	0	3,07	0	0
28	Nd	Nd	2,88	0,85	6,33	0
29	Nd	Nd	13,28	6,30	1,07	3,61
30	Nd	Nd	12,86	0,64	3,65	0
31	Nd	14,04	7,64	1,22	4,48	0
Subtilisina						
23	17,90	12,00				
24	15,49	15,22				
25	37,04	22,51				
26	Nd	4,26				
27	0	0				
28	1,07	0				
29	0	8,03				
30	25,19	0,39				
31	0	0				

nd = não determinado

Obs. Nos ensaios com a Subtilisina não foram testadas concentrações menores que 25 µg/mL.

Figura 11 - Estruturas das amidas isoladas de *Piper tuberculatum* (32 – 47), testadas nos ensaios de inibição das proteases pepsina e subtilisina.



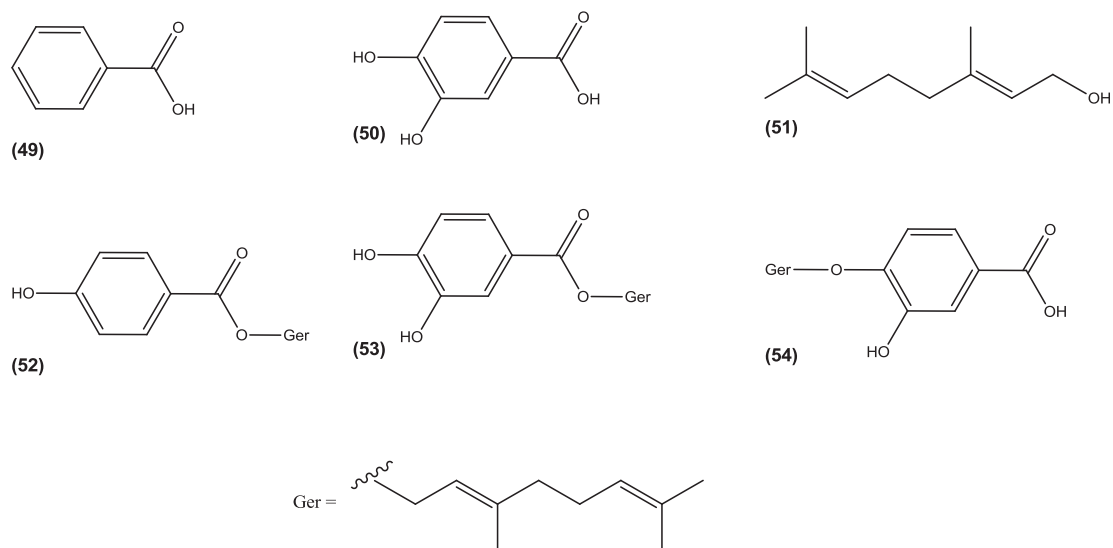
Na figura 11 (p. 33) estão representadas as estruturas das amidas isoladas de *Piper tuberculatum* (**32** – **47**) e testadas nos ensaios de inibição de proteases. Os resultados estão apresentados na tabela 7 (p. 35). A substância **47** apresentou potente inibição sobre a atividade da pepsina tanto com a concentração de 10 µg/mL (65,03 %) e 1 µg/mL (54,12 %). Nestas mesmas concentrações, a amida **38** inibiu esta protease em 52,89 % e 37,98 %, respectivamente, e a amida **37** apresentou atividade inibitória de 65,47 % e 33,30 %, respectivamente. A substância **39** apresentou potente atividade de 62,84 % de inibição sobre a pepsina somente com a concentração mais alta (10 µg/mL). As substâncias **35** e **42** apresentaram moderada atividade inibitória, respectivamente, de 32,41 % e 32,55 % com 1 µg/mL. Algumas amidas não puderam ser testadas com a concentração de 10 µg/mL, pois apresentaram altos valores de intensidade de fluorescência interferindo na análise dos resultados. As outras amidas isoladas de *Piper tuberculatum* não apresentaram atividade inibitória significativa sobre a pepsina como pode ser observado na tabela 7 (p. 35). Nos ensaios de inibição da subtilisina somente as substâncias **33** e **38** apresentaram atividade inibitória significativa de 46,59 % e 50,71 % com a concentração de 10 µg/mL.

Tabela 7 - Resultados (% Inibição) obtidos nos ensaios de inibição de proteases com as amidas isoladas de *Piper tuberculatum* (**32 – 47**) em diferentes concentrações (µg/mL)

Pepsina				
Substância	10	1	1.10^{-1}	1.10^{-3}
32	nd	nd	nd	nd
33	2,25	8,89	2,67	5,29
34	53,44	16,04	0	0
35	nd	32,41	11,47	4,31
36	nd	8,95	0	0,70
37	65,47	33,30	5,47	5,90
38	52,89	37,98	14,37	16,02
39	62,84	11,38	25,56	1,73
42	nd	32,55	14,47	14,75
43	30,42	1,99	0	0
44	11,38	0,69	4,73	1,77
46	nd	3,09	0	0
47	65,03	54,12	16,54	11,95
Subtilisina				
32	12,16	0	0	0
33	46,59	10,22	0	0
35	38,61	0	0	0
36	20,70	1,45	1,52	4,82
37	0,00	0,00	0,68	2,76
38	50,71	32,28	nd	18,00
39	0	0	0	1,06
41	0	0	0	0
43	10,17	11,81	nd	6,36
44	19,53	7,05	0	0
45	nd	0	0	0
46	24,60	19,93	17,69	12,52
47	nd	nd	nd	nd

nd = não determinado

Figura 12 – Estrutura do ácido benzóico (**49**) e seus derivados biossintetizados (i.e. geranilação) (**50 – 54**) a partir de extratos enzimáticos de folhas de *Piper crassinervium* (López *et al.*, 2010).



Na figura 12 (p. 36) estão representadas as estruturas do ácido benzóico (**49**) e de seus derivados geranilados (**50 – 54**). Nos ensaios realizados com a pepsina o ácido benzóico (**49**) mostrou potente atividade inibitória de 69,15 % e 61,47 % mesmo em baixas concentrações (0,1 e 0,01 µg/mL, respectivamente) (tabela 8, p. 37). No entanto, os derivados geranilados do ácido benzóico (**50 – 54**) não mostraram efeito inibitório sobre a atividade enzimática da pepsina como pode ser observado na tabela 8. Concentrações muito altas destes compostos apresentaram altos valores de intensidade de fluorescência e não puderam ser testadas neste ensaio.

Por outro lado, no ensaio de inibição da subtilisina os derivados geranilados (**50 – 54**) apresentaram moderado efeito inibitório. As substâncias (**52**) e (**53**) inibiram a atividade desta protease serínica em 34,49 % e 38,68 %, respectivamente, na concentração de 1 µg/mL. Os outros compostos desta série de derivados do ácido

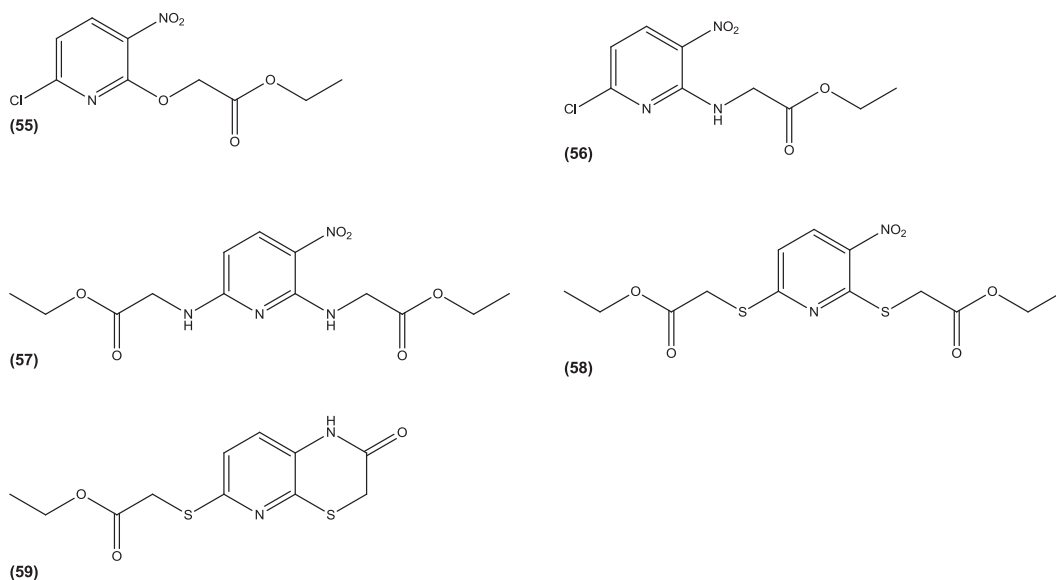
benzóico não apresentaram atividade inibitória significativa (tabela 8, p. 37). Estes resultados foram publicados na revista *Biotechnology Resource* (López *et al.*, 2010).

Tabela 8 – Resultados (% Inibição) obtidos nos ensaios de inibição de proteases do ácido benzóico (**49**) e seus derivados biossintetizados (i.e. geranilização) (**50 – 54**) a partir de extratos enzimáticos de folhas de *Piper crassinervium* (López *et al.*, 2010) em diferentes concentrações ($\mu\text{g/mL}$)

Pepsina					
Substância	1	1.10^{-1}	1.10^{-2}	1.10^{-3}	1.10^{-4}
49	nd	69,15	61,47	35,62	9,03
50	18,78	17,37	12,47	nd	9,42
51	11,58	11,47	nd	7,43	5,16
52	4,47	0	1,36	0	0
53	15,25	12,92	10,11	7,64	3,77
54	5,00	0	0	0	0
Subtilisina					
% Inibição					
49	25,15	26,25	15,04	0	
50	27,65	25,07	22,01	19,76	
51	28,35	24,32	23,25	17,31	
52	34,49	29,30	23,55	18,87	
53	38,68	28,74	17,73	19,51	
54	26,10	23,00	16,96	19,20	

nd = não determinado

Figura 13 – Estruturas químicas dos derivados piridínicos sintéticos (**55** – **59**), testados nos ensaios de inibição de proteases.



Os resultados obtidos com os derivados piridínicos sintéticos (**55** – **59**) (figura 13, p. 38) mostraram seletiva atividade inibitória sobre as proteases aspártica e serínica testadas (tabela 9, p. 39). Nos ensaios com a pepsina somente o derivado piridínico (**56**) apresentou potente atividade inibitória com as concentrações de 0,1 µg/mL (41,36 %) e 0,01 µg/mL (32,11 %). As outras substâncias não inibiram a atividade da pepsina. Por outro lado, nos ensaios com a subtilisina os derivados piridínicos (**55** – **59**) apresentaram potente efeito inibitório. A substância (**56**) também apresentou atividade inibitória sobre esta protease serínica de forma semelhante aos resultados obtidos com a pepsina, ou seja, com as mesmas concentrações, em 44,04 % e 36,10 % inibição. As substâncias (**55**, **58** e **59**) também tiveram efeito inibitório sobre a subtilisina de 43,68 %; 45,41 % e 39,41 %, na concentração de 0,1 µg/mL.

Tabela 9 - Resultados (% Inibição) obtidos nos ensaios de inibição de proteases com os derivados piridínicos sintéticos (**55 – 59**) em diferentes concentrações ($\mu\text{g/mL}$)

Pepsina				
Substância	1.10^{-1}	1.10^{-2}	1.10^{-3}	1.10^{-4}
55	23,81	14,30	5,86	8,59
56	41,36	32,11	29,89	15,82
57	17,91	17,40	3,34	0
58	28,26	10,22	19,59	17,49
59	23,49	7,26	0,85	2,00
Subtilisina				
55	43,68	34,95	25,43	0
56	nd	44,04	36,10	33,17
57	30,45	25,42	12,14	22,29
58	45,41	29,90	21,73	8,47
59	39,41	34,64	16,14	14,17

nd = não determinado

4. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho reforçaram os dados obtidos anteriormente e reportados na literatura.

Os cromanos isolados de *Peperomia obtusifolia* mostraram moderada atividade inibitória tanto sobre a protease aspártica pepsina como sobre a protease serínica subtilisina. É interessante notar que os enantiômeros puros isolados apresentaram diferente perfil de atividade como pode ser observado na tabela 2 (p. 22). Somente o enantiômero *S* (**2**), apresentou atividade inibitória sobre as proteases testadas. A ausência de atividade do enantiômero *R* sugere que a estereoquímica da cadeia lateral dos cromanos **2** e **3** é essencial para a atividade inibitória. Ainda mais, considerando que as substâncias **4** – **6** não apresentaram efeito sobre as proteases, pode-se dizer que a carbonila na posição 6 participa da interação ligante-enzima, tanto nos ensaios com a pepsina como com a subtilisina. A mistura racêmica do cromeno **7**, isolada de *Piper gaudichandianum* também apresentou efeito inibitório nos ensaios realizados (tabela 3, p. 24). Interessantemente, somente no ensaio de inibição da subtilisina pode-se observar efeito do enantiômero *S* (**8**). Por outro lado, observou-se um fraco efeito inibitório da mistura racêmica (**7**) e do enantiômero *R* (**9**) com a concentração de 25 µg/mL nos experimentos com a pepsina. Um estudo de REA é necessário para explicar como a estereoquímica destas substâncias interfere na interação ligante-enzima. Tem sido proposto que a prenilação de substâncias aumenta a potência da atividade biológica (Martins *et al.*, 2009; Yasaki *et al.*, 2009). Ainda mais, a interação de benzopiranos como cromenos, cromanos e cumarinas já está bem estudada quanto à

REA (figuras 1 e 2, p. 11 e 13) (Pochet *et al.*, 2000; Thairisvong *et al.*, 1999) o que poderá auxiliar em estudos futuros.

Os resultados obtidos com o ácido benzóico (**49**) (tabela 8, p. 37) mostraram que a geranilização (inserção de unidades de isoprenos) desta substância por meio de extratos enzimáticos feitos a partir das folhas de *Piper crassinervium* melhoraram a atividade da substância **49** sobre a subtilisina (Lopes *et al.*, 2010). Os derivados geranilados **53** e **52** apresentaram moderado efeito inibitório de 34,49 % e 38,68 % com a concentração de 1 µg/mL. Por outro lado, a inibição de 69% da atividade da pepsina observada com a substância **49** perdeu-se após a inserção da geranila. Isto pode estar relacionado com a atividade seletiva de inibição destas substâncias sobre proteases serínicas. Um estudo de modelização computacional poderá futuramente sugerir como se dá a interação destas substâncias geraniladas com a protease subtilisina. Estes resultados foram publicados na revista Biotechnology Resource (Lopes *et al.*, 2010).

Ainda discutindo os resultados obtidos com substâncias isoladas de espécies de *Piper*, os dados obtidos com as amidas isoladas de *Piper tuberculatum* mostraram potente atividade inibitória das substâncias **38**, **39** e **47** sobre a protease aspártica pepsina (tabela 7, p. 35). Para as substâncias de cadeia lateral curta, pode-se dizer que a ciclização observada na substância **34** melhorou significativamente a atividade desta série. Para as substâncias com o grupo ciclo-hexânico substituído observou-se atividade inibitória somente para a substância **37**. Em relação às substâncias **38** e **39** pode-se dizer que o aumento da cadeia lateral pela inserção de um grupo diênico melhorou a atividade desta série de substâncias. As substâncias **40** e **41** apresentaram problemas durante a realização dos ensaios e uma comparação mais detalhada não foi possível. Muitos trabalhos tem mostrado que as ligações amídicas desempenham

importante papel na interação entre alguns inibidores não-peptidomiméticos sobre proteases aspárticas e serínicas (Takeuchi *et al.*, 2008; Buisson *et al.*, 2006; Bowman e Chmielewski, 2004; De Clerq, 2004). Interessantemente, as amidas naturais não inibiram a atividade da subtilisina com as concentrações testadas. Alguns trabalhos mostraram que as amidas podem aumentar a atividade de proteases serínicas (Hiwasa *et al.*, 1996), o que pode estar relacionado com os altos valores de fluorescência observados quando concentrações maiores foram testadas, o que dificultou a análise destes resultados.

Na tabela 4 (p. 26) estão listados os dados com os diterpenos clerodânicos **10 – 13**, chamados de casearinas, que corroboram nossos resultados anteriores, publicados na revista Brazilian Journal of Pharmacognosy (Flausino *et al.*, 2009). Nestes resultados, tanto o extrato bruto de *Casearia sylvestris* como uma fração enriquecida de casearinas inibiram a atividade da pepsina de forma seletiva (Flausino *et al.*, 2009). Os resultados obtidos com as substâncias isoladas mostraram que a casearina B (**10**) (figura 8, p. 25) apresentou potente efeito inibitório seletivo sobre esta protease aspártica, mas não sobre a subtilisina. Tobey e colaboradores sugerem que a pepsina pode ser considerado um alvo farmacológico para o tratamento de doenças gástricas, como refluxo esofágico e gastrite (Tobey *et al.*, 2001). Os resultados do presente estudo sugerem que as casearinas **10 – 13** podem estar relacionadas com o efeito observado com o extrato bruto de *Casearia sylvestris*, o que pode justificar seu uso popular para o tratamento de distúrbios gástricos. Algumas estruturas químicas dos diterpenos isolados de *C. rupestris* ainda precisam ser definidas para posterior publicação dos resultados.

Os derivados sintéticos do ácido cafeico (figura 9, p. 27), o cafeato de propila (**17**) e o cafeato de isopropila (**18**), apresentaram atividade inibitória moderada e seletiva sobre a pepsina (tabela 5, p. 28). A triagem realizada mostrou que nenhum dos derivados sintéticos do ácido cafeico **14 – 22** inibiram a atividade da subtilisina. São poucos os trabalhos publicados na literatura reportando atividade inibitória do ácido cafeico e derivados naturais ou sintéticos. Park e colaboradores (2005) detectaram atividade inibitória do ácido cafeico sobre metaloproteases com concentrações próximas às utilizadas no presente trabalho (10 – 50 µg/mL).

Os derivados sintéticos do ácido ferúlico (figura 10, p. 30) também apresentaram potente atividade inibitória sobre a pepsina, mas não sobre a subtilisina (tabela 6, p. 32). O ácido ferúlico (**23**), o ferulato de etila (**25**) e o ferulato de butila (**24**) apresentaram potente atividade inibitória sobre a pepsina, a qual se perdeu com o aumento da cadeia alquila. Não foram observados resultados significativos sobre a protease serínica subtilisina. Interessantemente, alguns trabalhos tem mostrado que o ácido ferúlico (**23**) inibiu a atividade de algumas proteases serínicas como a trombina e a tripsina (Monien *et al.*, 2006; Lee e Lin, 1998).

Os ensaios realizados com os derivados piridínicos sintéticos (**55 – 59**) (tabela 9, p. 39) mostraram potente atividade inibitória destas substâncias (em escala de nanomolares) o que corrobora os dados da literatura que demonstraram atividade de piperidinas substituídas, tanto em diferentes proteases aspárticas como serínicas (Ismail *et al.*, 2008; Iserloh *et al.*, 2008; Marcinkeviciene *et al.*, 2002; Oefener *et al.*, 1998). Nos ensaios com a pepsina a substância (**56**) inibiu potentemente a atividade enzimática com as concentrações de 0,1 µg/mL (41,36%) e 0,01 µg/mL (32,11%). Esta mesma substância apresentou também atividade inibitória sobre a atividade da

subtilisina, também com as mesmas concentrações, e com mesma potência, ou seja, 44,04 % (com 0,1 µg/mL) e 36,10 % (com 0,01 µg/mL). As substâncias **55**, **58** e **59** mostraram efeito inibitório sobre a protease serínica subtilisina de 43,68 %, 45,41 %; e 39,41 %, respectivamente. Outras substâncias desta série de derivados piperidínicos sintéticos serão testados para posterior análise da REA utilizando-se os dados já existentes na literatura (Ismail *et al.*, 2008; Iserloh *et al.*; 2008; Marcinkeviciene *et al.*, 2002; Oefener *et al.*, 1998) bem como em análises experimentais de “Docking”.

5. CONCLUSÃO

Em conclusão, os resultados obtidos com os ensaios de inibição de proteases aspárticas e serínicas utilizando-se a pepsina e a subtilisina como modelos farmacológicos moleculares:

- corroboram dados da literatura;
- mostram que o presente trabalho apresenta predictibilidade de constructo (por homologia) e farmacológica; e
- pode ser utilizada como triagem de substâncias naturais e sintéticas, e ainda utilizado para o desenvolvimento de novas substâncias mais potentes.

REFERÊNCIAS

- Babine, R.E., Bender, S.L. Molecular recognition of protein-ligand complexes: application to drug design. **Chem. Rev.** 1997, **97**: 1359-1472.
- Bowman, M.J.; Chmielewski, J. Crucial amides for dimerization inhibitors of HIV-1 protease. **Bioorg. Med. Chem. Let.** 2004. **14**: 1395 – 1398.
- Buisson, M.; Rivail, L.; Hernandez, J.F.; Jamin, M.; Martinez, J. ; Ruigrok, R.W.H. Burmeister, W.P. Kinetics, inhibition and oligomerization of Epstein-Barr virus protease. **FEB Letters**. 2006. **580**: 6570 – 6578.
- Cheenpracha, S.; Karalai, C.; Ponglimanont, C.; Subhadhirasakul, S.; Tewtrakul, S. Anti-HIV protease activity of compounds from *Boesenbergia pandurata*. **Bioorg. Med. Chem.** 2006, **14**: 1710 – 1714.
- Flausino Jr., O ; Abissi, BM ; Vieira Jr, G ; Santos, AG ; Silva, DH ; Cavaleiro, A ; Bolzani, VS. Protease Inhibition Activity of Extracts from Salicaceae Species from Brazilian Cerrado and Atlantic Rain Forest and of an Enriched Fraction of Clerodanic Diterpenes (Casearins). **Brazilian Journal Pharmacognosy**. 2009; **19** (3): 755 – 758.
- Garino, C.; Bihel, F.; Pientrancosta, N.; et al. New 2-bromomethyl-8-substituted-benzo[c]chromen-6-ones. Synthesis and biological properties. **Bioorg. & Med. Chem. Let.** 2005, **15**: 135-138.
- Gold, N.D.; Deville, K.; Jackson, R.M. New opportunities for protease ligand-binding site comparisons using SitesBase. **Biochemical Society Transactions**. 2007. **35**: 561-565.

- Gomes, R.A.S.; Batista, R.P.; Almeida, A.C.; Fonseca, D.N.; Juliano, L.; Hial, V. A Fluorometric Method for the Determination of Pepsin Activity. **Anal. Biochem.** 2003. **316**: 11-14.
- Hiwasa, T.; Ogawa, S.; Kobayashi, H.; Ike, Y. Enhancement of catalytic activities of serine proteases by tripeptides compounds. **FEBS Letters.** 1999. **386**: 47 – 50.
- Iserloh, U.; Wu, Y.; Cumming, J.N.; Pan, J.; Wang, L.Y.; Stamford, A.W.; Kennedy, M.E.; Kuvelkar, R.; Chen, X.; Parker, E.M.; Strickland, C.; Voigt, J. Potente pyrrolidine- and piperidine-based BACE-1 inhibitor. **Bioorg. Med. Chem.** 2008. **18**: 414 – 417.
- Ismail, N.S.M.; Dine, R.S.E.; Hattori, M.; Takahashi, K.; Ihara, M. Computer based desing, synthesis and biologicala evaluation of novel indole derivatives as HCV NS3-4A serine protease inhibitors. **Bioorg. Med. Chem.** 2008. **16**: 7877 – 7887.
- Kashiwada, Y.; Yamazaki, K.; Ikeshiro, Y.; et al. Isolation of rhododaurichromanolic acid B and the anti-HIV principles rhododaurichromanolic acid A and rhododaurichromenic acid from *Rhododendron dauricum*. **Tetrahedon.** 2001, **57**: 1559-1563.
- Lee, T.M.; Lin, Y.H. Trypsin inhibitor and trypsin-like protease activity in air- or submergence-grown rice (*Oryza sativa* L.) coleoptiles. **Plant Science.** 1995. **106**: 43 – 54.
- López, S.N.; Lopes, A.A.; Batista Jr., J.M.; Flausino Jr., O.; Bolzani, V.S.; Kato, M.J.; Furlan, M. Geranylation of Benzoic Acid Derivatives by Enzymatic Extracts from *Piper crassinervium*. **Bioresource Technology.** 2010. No prelo.
- Marcinkeviciene, J.; Kopcho, L.M.; Yang, T.; Copeland, R.A.; Glass, B.M.; Combs, A.P.; Falahatpisheh, N.; Thompson, L. Novel inhibition of Porcine Pepsin by a Substitute Peperidine. **J. Biol. Chem.** 2002. 277, n 32 (9): 28677-28682.

- Martins, F.T.; Assins, D.M.; Santos, M. H.; Camps, I.; Veloso, M.P.; Juliano, A.; Alves, L.C.; Dorigueto, A.C. Natural polyprenylated benzophenones inhibition cysteine and serine proteases. **Eur. J. Med. Chem.** 2009, **44**: 1230 – 1239.
- Micheelsen, P.O.; Vévodová, J.; De Maria, L.; Ostergaard, P.R.; Friis, E.P.; Wilson, K.; Skjot, M. Structural and mutational analyses of the interaction between the Barley α -Amylase/Subtilisin Inhibitor and the Subtilisin Savinase Reveal a Novel Mode of Inhibition. **J. Mol. Biol.** 2008. **380**: 681-690.
- Monien, B.; Henry, B.L.; Raghuraman, A.; Hindle, M.; Desai, U.R. Novel chemo-enzymatic oligomers of cinnamic acids as direct and indirect inhibitors of coagulation proteinases. **Bioorg. Med. Chem.** 2006. **14**: 7988 – 7998.
- Moose, R.; Clemente, J.C.; Jackson, L.R.; Ngo, M.; Wooten, K.; et al. Analysis of Binding Interaction of Pepsin Inhibitor-3 to Mamallian and Malarial Aspartic Proteases. **Biochemistry**. 2007. **46** (49): 14198-14205.
- Oefner, C.; Binggeli, A.; Breu, V. et al. Renin inhibition by substituted piperidines : a novel paradigm for the inhibition of monomeric aspartic proteinases? **Chemistry & Biology**. 1999. **6** (3): 127 – 131.
- Oliveira, C. M.; Silva, G. H.; Regasini, L. O.; Flausino Jr., O.; Lopez, S. N.; Abissi, B. M.; Berlink, R. G. S.; Sette, L. D.; Bognugli-Santos, R. C.; Rodrigues, A.; Bolzani, V. S.; Araujo, A. R. Xylarenones C-E from an endophytic fungus isolated from, *Alibertia macrophylla*. **J. Nat. Prod.** 2011. **74**: 1353-1357.
- Park, W.H.; Kim, S.H.; Kim, C.H. A new matrix metalloproteinase-9 inhibitor 3,4-dihydroxycinnamic acid (caffeic acid) from methanol extract of *Euonymus alatus*: isolation and structure determination. **Toxicology**. 2007. **207**: 383 – 390.

- Pochet, L.; Doucet, C.; Dive, G.; Wouters, J.; Masereel, B.; Reboud-Ravaux, M.; Pirotte, B.; Coumarinic Derivatives as Mechanism-Based Inhibitors of α -Chymotrypsin and Human Leukocyte Elastase. **Bioorg. Med. Chem.** 2000. **8**: 1489-1501.
- Takahashi, S.; Hori, K.; Shinbo, M.; Hiwatashi, K.; Gotoh, T.; Yamada, S. Isolation of Human Renin Inhibitor from Soybean: Soyasaponin I Is the Novel Human Renin Inhibitor in Soybean. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 2008. **72**: 3232-3236.
- Takeuchi, Y.; Fujiwara, T.; Shimone, Y.; Miyataka, H.; Satoh, T.; Kirk, K.L.; Hori, H. Possible involvement of radical intermediates in the inhibition of cysteine proteases by allenyl esters and amides. **Bioorg. Med. Chem.** 2008. **18**: 6202 – 6205.
- Thaisrivongs, S., Tomich, P.K., Watenpaugh, K.D., et al. Structure-based design of HIV protease inhibitors: 4-hydroxycoumarins and 4-hydroxy-2-pyrones as non-peptidic inhibitors. **J. Med. Chem.** 1994. **37**: 3200-3204.
- Tobey, N.A.; Hosseine, S.S.; Caymaz-Bor, C.; Wyant, M.S.P.H.; Orlando, G.S.; Orlando, R.C. The Role of Pepsin in Acid Injury to Esophageal Epithelium. **Am. J. Gastroenterol.** 2001. **96**: 3062 – 3070.
- Tovar-Pérez, E.G.; Guerrero-Legarreta, I.; Farrés-Gonzales, A.; Soriano-Santos, J. Angiotensin I-Converting Enzyme-Inhibitory Peptide Fractions from Albumin and Globulin as Obtained of Amaranth Grain. **Food Chemistry.** 2009. **116**: 437-444.
- Tuner, S.R., Strohbach, J.W., Tomassi, R.A., Aristoff, P.A. et al. Tipranavir (PNU-140690): A potent, orally bioavailable nonpeptidic HIV protease inhibitor of the 5,6-dihydro-4-hydroxy-2-pyrone sulfonamide class. **J. Med. Chem.** 1998, **41**: 3467 – 3476.

- Wouters, J., Huygens, M., Pochet, L., Pirotte, B., Durant, F., Masereel, B. Structural approach of the mechanism of inhibition of α -chymotripsin by coumarins. **Bioorg. Med. Chem. Let.** 2002, **12**: 1109 – 1112.
- Yazaki, K.; Sasaki, K.; Tsurumaru, Y. Prenylation of aromatic compounds, a key diversification of plant secondaries metabolites. **Phytochem.** 2009, 70: 1739 – 1745.

ANEXO

Anexo 1. Planilha de exemplo da análise dos resultados [média + desvio padrão (DP) + desvio padrão relativo (DPR)] obtidos com a substância (1) no ensaio de inibição da pepsina.

Padrão					
1 ^a	2 ^a	3 ^a	Média	DP	DPR
3508	2668	2635	2937	494,7	16,8
4218	3434	3297	3649,7	496,9	13,6
4723	4003	3928	4218	438,9	10,4
5417	4560	4456	4811	527,4	10,9
5948	4942	4909	5266,3	590,6	11,2
6188	5419	5311	5639,3	478,2	8,5
6559	5701	5663	5974,3	506,7	8,5
6763	6114	5879	6252	457,9	7,3
7052	6382	6136	6523,3	474,1	7,3
7214	6618	6508	6780	379,8	5,6
7336	6723	6728	6929	352,5	5,1
7463	6959	7016	7146	276	3,9
7449	7241	7058	7249,3	195,6	2,7
7661	7361	7324	7448,7	184,8	2,5
7880	7596	7520	7665,3	189,7	2,5
8011	7758	7641	7803,3	189,1	2,4
7997	7742	7805	7848	132,8	1,7
média total = 4911					

Continuação anexo 1

Substância 1 - 10 µg/mL					
1 ^a	2 ^a	3 ^a	Média	DP	DPR
1941	2913	2292	2382	492,2	20,7
1994	2976	2412	2460,7	492,8	20
2033	3149	2476	2552,7	561,9	22
2196	3238	2572	2668,7	527,7	19,8
2169	2987	2706	2620,7	415,6	15,8
2121	3033	2832	2662	479,2	18
2222	3003	2903	2709,3	424,9	15,7
2280	2918	2811	2669,7	341,7	12,8
2326	2820	2820	2655,3	285,2	10,7
2363	2888	2885	2712	302,2	11,1
2436	2946	2771	2717,7	259,1	9,5
2502	2770	2857	2709,7	185	6,8
2688	2865	2941	2831,3	129,8	4,6
2703	2921	2978	2867,3	145,1	5,1
2718	2993	3021	2910,7	167,4	5,7
2813	3011	3035	2953	121,8	4,1
2877	3086	3140	3034,3	138,9	4,6
média total = 652,3					
% I = 86,72					
Substância 1 - 1 µg/mL					
1 ^a	2 ^a	3 ^a	Média	DP	DPR
2264	2302	2370	2312	53,7	2,3
2544	2603	2757	2634,7	109,9	4,2
2723	2782	2684	2729,7	49,3	1,8
2875	3057	2945	2959	91,8	3,1
3359	3258	3273	3296,7	54,5	1,6
3577	3495	3351	3474,3	114,4	3,3
3758	3686	3209	3551	298,4	8,4
3922	3793	3235	3650	365,1	10
4053	3805	3366	3741,3	347,9	9,3
4264	3893	3605	3920,7	330,4	8,4
4412	3959	3765	4045,3	332	8,2
4512	4051	3819	4127,3	352,7	8,5
4581	4210	3981	4257,3	302,8	7,1
4808	4387	4045	4413,3	382,1	8,6
4737	4373	4191	4433,7	278	6,3
4890	4399	4330	4539,7	305,3	6,7
5090	4562	4406	4686	358,5	7,6
média total = 2374					
% I = 51,66					

Continuação anexo 1

Substância 1 - 0,1 µg/mL					
1 ^a	2 ^a	3 ^a	Média	DP	DPR
2305	1975	2205	2161,7	169,2	7,8
2674	2301	2721	2565,3	230,1	8,9
3062	3008	3180	3083,3	87,9	2,8
3344	3289	3518	3383,7	119,5	3,5
3660	3625	3778	3687,7	80,2	2,2
3814	3949	4155	3972,7	171,7	4,3
4065	4117	4282	4154,7	113,3	2,7
4235	4322	4610	4389	196,3	4,5
4435	4456	4737	4542,7	168,6	3,7
4612	4620	4892	4708	159,4	3,4
4679	4610	5036	4775	228,6	4,8
4783	4785	5175	4914,3	225,7	4,6
4816	4984	5317	5039	254,9	5,1
4996	4964	5416	5125,3	252,2	4,9
5054	4974	5415	5147,7	234,9	4,6
5177	5207	5530	5304,7	195,7	3,7
5211	5272	5678	5387	253,8	4,7

média total = 3225,3

% I = 34,32

Substância 1 - 0,01 µg/mL					
1 ^a	2 ^a	3 ^a	Média	DP	DPR
2846	2659	2519	2674,7	164,1	6,1
3428	3174	3137	3246,3	158,4	4,9
3946	3709	3761	3805,3	124,6	3,3
4467	4186	4221	4291,3	153,1	3,6
4733	4574	4612	4639,7	83	1,8
5106	4972	5087	5055	72,5	1,4
5395	5200	5373	5322,7	106,8	2
5589	5586	5567	5580,7	11,9	0,2
5954	5722	5780	5818,7	120,7	2,1
6061	5987	5968	6005,3	49,1	0,8
6216	6119	6199	6178	51,8	0,8
6348	6217	6374	6313	84,1	1,3
6447	6339	6555	6447	108	1,7
6544	6420	6566	6510	78,7	1,2
6528	6485	6740	6584,3	136,5	2,1
6682	6659	6774	6705	60,8	0,9
6860	6896	7023	6926,3	85,6	1,2

média total = 4251,7

% I = 13,42

Continuação anexo 1

Substância 1 - 0,001 µg/mL					
1 ^a	2 ^a	3 ^a	Média	DP	DPR
2633	2431	2594	2552,7	107,1	4,2
3180	3154	3294	3209,3	74,5	2,3
3687	3616	3923	3742	160,7	4,3
4116	4220	4324	4220	104	2,5
4496	4614	4828	4646	168,3	3,6
4747	5049	5247	5014,3	251,8	5
5213	5471	5584	5422,7	190,2	3,5
5473	5707	5906	5695,3	216,7	3,8
5675	6033	6236	5981,3	284	4,7
5985	6249	6533	6255,7	274	4,4
6273	6568	6733	6524,7	233	3,6
6358	6796	6931	6695	299,5	4,5
6560	6906	7189	6885	315	4,6
6635	7089	7205	6976,3	301,2	4,3
6851	7224	7400	7158,3	280,3	3,9
6996	7371	7504	7290,3	263,4	3,6
6978	7570	7776	7441,3	414,3	5,6

média total = 4888,7

% I = 0,45

Substância 1 - 0,0001 µg/mL					
1 ^a	2 ^a	3 ^a	Média	DP	DPR
3327	2530	2998	2951,7	400,5	13,6
4073	3202	3646	3640,3	435,5	11,9
4456	3889	4277	4207,3	289,8	6,9
5313	4427	4854	4864,7	443,1	9,1
5459	4886	5342	5229	302,7	5,8
5770	5275	5778	5607,7	288,1	5,1
5782	5674	6295	5917	331,8	5,6
6765	5943	6499	6402,3	419,4	6,5
6807	6211	6834	6617,3	352,1	5,3
7399	6537	7077	7004,3	435,6	6,2
7299	6662	7258	7073	356,5	5
7776	7022	7371	7389,7	377,3	5,1
7699	7188	7659	7515,3	284,2	3,8
8000	7436	7980	7805,3	320	4,1
8081	7540	8070	7897	309,2	3,9
7994	7788	8197	7993	204,5	2,5
7892	7840	8261	7997,7	229,5	2,9

média total = 5046

% I = -2,74