

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

**Busca de Inibidores da Catepsina K em Plantas Medicinais
Utilizadas no Tratamento de Doenças Osteoarticulares**

Jame's Almada da Silva

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Química, área de concentração Química Orgânica.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira

São Carlos – SP
2011

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

S586bi

Silva, Jame's Almada da.

Busca de inibidores da catepsina K em plantas medicinais utilizadas no tratamento de doenças osteoarticulares / Jame's Almada da Silva. -- São Carlos : UFSCar, 2011. 157 f.

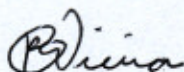
Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2011.

1. Produtos naturais. 2. Plantas medicinais. 3. *Zingiber officinale*. 4. Catepsina K. 5. Inibição enzimática. 6. Doenças osteoarticulares. I. Título.

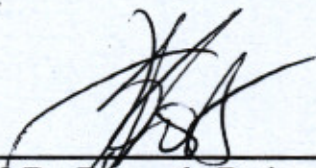
CDD: 547.3 (20^a)

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

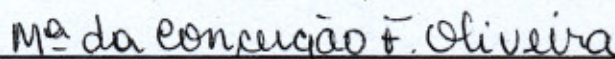
*Assinaturas dos membros da banca examinadora que avaliaram e aprovaram a defesa de tese de doutorado do candidato **Jame's Almada da Silva**, realizada em 26 de agosto de 2011:*



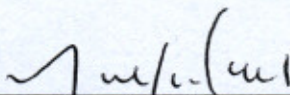
Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira



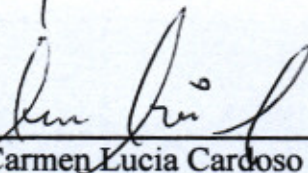
Prof. Dr. Fernando Batista da Costa



Profa. Dra. Maria da Conceição Ferreira de Oliveira



Profa. Dra. Quezia Bezerra Cass



Profa. Dra. Carmen Lucia Cardoso

Dedico

Aos meus pais

Antônio Luiz da Silva, e

Antônia Ivonete Almada da Silva

*Transforme as pedras que você tropeça
nas pedras de sua escada (Sócrates).*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira, por toda a confiança depositada em mim, pela liberdade dada no desenvolvimento deste projeto, e pelo conhecimento compartilhado, o que foi fundamental para o meu crescimento científico e profissional.

Aos professores do Departamento de Química da UFSCar, Antônio Gilberto Ferreira, Arlene Gonçalves Corrêa, Dulce Helena Ferreira de Souza, Edson Rodrigues Filho, João Batista Fernandes, Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva, Quezia Bezerra Cass, por todos os ensinamentos, essenciais para a minha formação, e contribuições que tornaram possível a realização deste trabalho.

A professora Dra. Heloisa Araujo do Departamento de Ciências Fisiológicas pela colaboração.

Aos funcionários e técnicos do DQ-UFSCar.

A todos os amigos do Laboratório de Produtos Naturais, Síntese de Produtos Naturais, Laboratório de Química Bio-orgânica, Síntese Orgânica e CLAE, Espectrometria de Massas e Ressonância Magnética Nuclear, que ajudaram em todos os sentidos, nestes quatro anos de doutorado, contribuindo para que tudo se tornasse mais fácil.

Aos alunos de Iniciação Científica Caio Yu e Poliana Villela pela contribuição e amizade.

Ao Prof. Gabriel Herrero-Beaumont Cuenca por ter aberto as portas do Laboratório de Reumatologia e Patologia Óssea Degenerativa da “Universidad Autónoma de Madrid” para a realização dos ensaios celulares.

Aos meus pais, Antônio Luiz e Ivonete, irmãos, Janderson, Joana Darc e Jonas Luiz, e a minha tia Ione, por estarem sempre ao meu lado, incentivando e dando forças em todos os momentos.

A Anayla, por estar sempre ao meu lado, apoiando, incentivando e alegrando em todas os momentos. Por ter sido minha família, e por tornar as coisas mais fáceis de serem superadas. Pelo amor e dedicação.

A CAPES pelo apoio financeiro.

E, a Deus, pois sem Ele nada disso teria sido possível.

LISTA DE ABREVIATURAS

$[\alpha]_D$	Rotação óptica específica
δ_H	Deslocamento químico do hidrogênio
δ_C	Deslocamento químico do carbono
$\alpha.K_i$	Constante de ionização do complexo ESI
AC	<i>Ageratum conyzoides</i>
AC ₂ O	Anidrido acético
ACOH	Ácido acético
AcOEt	Acetato de etila
CC	Cromatografia clássica de adsorção
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CD ₃ COCD ₃	Acetona deuterada
CG	Cromatografia gasosa
CL	<i>Curcuma longa</i>
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CSP	<i>Caryocar</i> sp
D	Diclorometano
2,4-DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina
DMSO	Dimetilsulfóxido
E64	[1-[N-[(L-3-trans-carboxyoxirane-2-carbonyl)-L-leucyl]amino]-4-guanidinobutane]
E	Enzima
EM	Espectrometria de massas
ES	Complexo binário enzima-substrato
ESI	Complexo ternário enzima-substrato-inibidor
EtOH	Etanol
H	<i>n</i> -hexano
HP	<i>Harpagophytum procumbens</i>
Hz	Hertz
I	Inibidor

IC ₅₀	Concentração que inibibe 50% da enzima
IE	Impacto eletrônico
J	Constante de acoplamento
K _i	Constante de dissociação do complexo binário EI
K _M	Constante de Michaelis-Menten
LA	<i>Laportea aestuans</i>
MeOD	Metanol deuterado
MeOH	Metanol
MO	<i>Moringa oleifera</i>
NO	Óxido nítrico
OP	<i>Orbygnia phalerata</i>
PhNHNH ₂	Fenilhidrazina
pTSA	Ácido <i>para</i> -toluenosulfônico
py	Piridina
RFU	Unidade de fluorescência relativa
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono
S	Substrato
CS	<i>Camellia sinensis</i>
UT	<i>Uncaria tomentosa</i>
UV	Ultravioleta
V _{max}	Velocidade máxima da reação enzimática
ZO	<i>Zingiber officinale</i>

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1 - Classificação taxonômica de <i>Zingiber officinale</i>	4
TABELA 1.2 - Papéis fisiológicos de algumas cisteíno proteases humanas	10
TABELA 4.1 - Nome popular, espécie, família e partes das plantas utilizadas pela medicina tradicional.....	54
TABELA 4.2 – Rotação óptica experimental e da literatura.....	77
TABELA 4.3 - Dados de RMN ¹³ C da galanolactona.....	97
TABELA 4.4 - Substâncias isoladas da fração diclorometano do extrato dos rizomas de <i>Z. officinale</i> , e suas atividades de inibição frente a catepsina K, a 125 µM.....	104
TABELA 4.5 - Substâncias mais ativas isoladas da fração de diclorometano do extrato de rizomas <i>Z. officinale</i> , com seus respectivos valores de IC ₅₀ frente a catepsina K.....	106
TABELA 4.6 - Índice de retenção dos compostos majoritários da fração <i>n</i> -hexânica obtida do extrato bruto dos rizomas de <i>Z. officinale</i>	108
TABELA 4.7 - Índice de retenção dos sesquiterpenos majoritários do óleo essencial obtido dos rizomas de <i>Z. officinale</i>	112
TABELA 4.8 - Substâncias semi-sintéticas obtidas a partir do 6-gingerol com suas respectivas atividades de inibição frente à catepsina K e os valores de IC ₅₀ dos mais ativos. A concentração inicial das substâncias ensaiadas foi 125 µM.....	129
TABELA 4.9 - Inibição de algumas substâncias frente às catepsinas K, L, S e V.....	131
TABELA 4.10 - IC ₅₀ e seletividade de algumas substâncias frente às catepsinas K, L, S e V.....	131
TABELA 4.11 - Constante de Michaelis-Menten (K _M) da catepsina K humana, com o substrato Z-Phe-Arg-MCA.	139
TABELA 4.12 - Parâmetros cinéticos de inibição do 6-shogaol, 10-gingerol e SSi6 frente à catepsina K.....	139

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 - Percentual da origem de fármacos baseados em pequenas moléculas, 1981-2006. N: produtos naturais, ND: derivados de produtos naturais, S*: sintéticos, porém obtidos baseados em grupo farmacofórico de substâncias de origem natural, S: sintéticos.	1
FIGURA 1.2 - Principais formas de consumo do gengibre (http://thinkfood.com.br ; http://www.canstockphoto.com.br).....	4
FIGURA 1.3 - Estruturas químicas dos gingeróis e shogaois isolados de <i>Z. officinale</i> . .	5
FIGURA 1.4 - Estrutura química da 6, 8 e 10-zingerina, isoladas de rizomas de <i>Z. officinale</i>	6
FIGURA 1.5 - Ilustração mostrando o envolvimento da catepsina K em doenças caracterizadas por perda de matriz extracelular.....	9
FIGURA 1.6 - Estrutura tridimensional da catepsina K (identificador do “Protein Data Bank”: 1ATK). Em azul está indicado o resíduo de aminoácido catalítico Cys25 . Em vermelho, pode-se observar o inibidor E64 ligado ao sítio ativo da enzima.	13
FIGURA 1.7 - Sobreposição estrutural das catepsinas K (amarelo), L (azul), S (vermelho), V (verde) e papaína (magenta). Um inibidor piperazínico ligado ao sítio ativo está representado em preto (SOMOZA et al., 2000).....	14
FIGURA 1.8 - Curva de Michaelis-Menten mostrando a velocidade máxima de uma reação enzimática e o K_M	17
FIGURA 1.9 - Gráficos obtidos com a linearização de Hanes-Woolf. O gráfico (A) representa uma inibição do tipo competitiva, (B) Inibição do tipo acompetitiva e o (C) Inibição do tipo não-competitiva.	26
FIGURA 1.10 - Gráficos obtidos com a linearização de Lineweaver-Burk. O gráfico (A) representa uma inibição do tipo acompetitiva, (B) Inibição do tipo competitiva e o (C) Inibição do tipo não-competitiva.	27
FIGURA 1.11: Representação esquemática de um substrato no sítio ativo da catepsina K com interações-chave.....	29

FIGURA 1.12 - Cicloaltilisina 6 (a), AC-5-1 (b) e cicloaltilisina 7 (c) isoladas de <i>A. altilis</i> e com alta atividade frente à catepsina K.....	30
FIGURA 1.13 - Haploscleramina (a) e triptamina (b), isoladas de uma esponja marinha da ordem Haplosclerida, e com moderada atividade frente à catepsina K.....	30
FIGURA 3.1: Fluxograma da partição líquido-líquido do extrato bruto de <i>Z. officinale</i> .	37
FIGURA 3.2 - Fracionamentos da fração diclorometano da espécie <i>Z. officinale</i> .	38
FIGURA 4.1 – Triagem de inibição frente à catepsina K dos extratos brutos das espécies vegetais. Concentração dos extratos: 0,5 mg/mL. Soluções preparada em DMSO.....	55
FIGURA 4.2 - Porcentagem de inibição frente à catepsina K das frações obtidas dos extratos brutos das espécies que apresentaram maior atividade de inibição enzimática. As frações <i>n</i> -hexano, diclorometano, acetato de etila e hidroalcoólica estão representadas em azul, vermelho, verde e roxo, respectivamente. Concentração das frações: 0,5 mg/mL. Soluções preparada em DMSO.	56
FIGURA 4.3 - Porcentagem de inibição frente à catepsina K com as subfrações obtidas da primeira coluna cromatográfica clássica (ZOD1). As concentrações dos ensaios foram 0,5 µg/mL (ZOD1-13), 0,25 µg/mL (ZOD14), 0,5 µg/mL (ZOD15-16), 2 µg/mL (ZOD17-19), 15 µg/mL (ZOD20-28), 7 µg/mL (ZOD29-32), 5 µg/mL (ZOD33-35), 12,5 µg/mL (ZOD36-39), 100 µg/mL (ZOD40-60), 21 µg/mL (ZOD61-89), 4 µg/mL (ZOD90-100), 9 µg/mL (ZOD101-123), 203 µg/mL (ZOD124).....	57
FIGURA 4.4 - Porcentagem de inibição frente à catepsina K com as subfrações obtidas da segunda coluna cromatográfica clássica (ZOD2). As concentrações dos ensaios foram 0,05 µg/mL (ZOD124A), 0,20 µg/mL (ZOD124BC), 0,15 µg/mL (ZOD124D), 0,15 µg/mL (ZOD124E), 0,10 µg/mL (ZOD124F), 0,10 µg/mL (ZOD124G), 0,15 µg/mL (ZOD124HI), 0,10 µg/mL (ZOD124J), 0,05 µg/mL (ZOD124K), 0,25 µg/mL (ZOD124L), 0,50 µg/mL (ZOD124M), 85 µg/mL (ZOD124N), 17,5 µg/mL (ZOD124O), 0,75 µg/mL (ZOD124P).....	58

FIGURA 4.5 - Porcentagem de inibição frente à catepsina K com as subfrações obtidas da terceira coluna cromatográfica clássica (ZOD3). As concentrações dos ensaios foram 0,02 µg/mL (ZOD124NO1), 0,03 µg/mL (ZODNO2), 0,03 µg/mL (ZOD124NO3), 0,03 µg/mL (ZOD124NO4), 0,20 µg/mL (ZOD124NO5), 0,20 µg/mL (ZOD124NO6), 0,67 µg/mL (ZOD124NO7), 0,06 µg/mL (ZOD124NO8), 0,18 µg/mL (ZOD124NO9), 0,10 µg/mL (ZOD124NO10), 0,10 µg/mL (ZOD124NO11), 0,10 µg/mL (ZOD124NO12), 0,80 µg/mL (ZOD124NO13).	59
FIGURA 4.6 - Cromatogramas de separação do 4-gingerol (1) e da zingerenona A (14) obtido por CLAE com as seguintes condições: escala analítica, coluna C18, 10 µ, 10 x 0,46 cm e vazão de 0,8 mL/min (A); escala preparativa, coluna C18, 10 µ, 30 x 1 cm e vazão de 10 mL/min (B). A detecção foi realizada por UV a 254 e 282 nm e a fase móvel MeOH/H ₂ O (65/35).	62
FIGURA 4.7 - Cromatogramas de separação da zingerona (13), 6-gingerol (2), metil-6-gingerol (9) e 8-gingerol (3) obtido por CLAE com as seguintes condições: escala analítica, coluna C18, 10 µ, 10 x 0,46 cm e vazão de 1 mL/min (A); escala preparativa, coluna C18, 10 µ, 30 x 1 cm e vazão de 12,5 mL/min (B). A detecção foi realizada por UV a 254 e 282 nm e a fase móvel MeOH/H ₂ O (60/40).	63
FIGURA 4.8 - Cromatograma de separação do 6-paradol (7), galanolactona (15), 8-shogaol (16) e diacetato de metil-6-gingerdioila (12), obtido por CLAE com as seguintes condições em escala analítica: coluna C18, 10 µ, 10 x 0,46 cm, vazão de 1 mL/min, detector UV a 254 e 282 nm e fase móvel MeOH/H ₂ O (65/35).	64
FIGURA 4.9 - Cromatograma de separação da diacetato de metil-6-gingerdioila (12) e do 8-shogaol (16) obtido por CLAE (reciclo) em escala analítica com as seguintes condições: coluna C18, 10 µ, 10 x 0,46 cm, vazão de 1 mL/min, detector UV a 254 e 282 nm e fase móvel MeOH/H ₂ O (65/35).	65
FIGURA 4.10 - Cromatograma de separação do metil-6-shogaol (10) obtido por CLAE com as seguintes condições em escala analítica: coluna C18, 10 µ, 10 x 0,46 cm e vazão de 0,8 mL/min, detector UV a 254 e 282 nm e fase móvel MeOH/H ₂ O (65/35).	65

- FIGURA 4.11 - Cromatograma de separação do 6-shogaol (**5**) e do diacetato de 6-gingerdioila (**11**) obtidos por CLAE com as seguintes condições em escala semi-preparativa: coluna C18, 10 μ , 30 x 1 cm, vazão de 10 mL/min, detector UV a 254 e 282 nm e fase móvel MeOH/H₂O (65/35)..... 66
- FIGURA 4.12 - Cromatograma da subfração ZOD124NO obtido por CLAE com as seguintes condições em escala analítica: coluna C18, 10 μ , 25 x 0,46 cm, vazão de 0,8 mL/min, detector UV a 254 nm e fase móvel ACN/MeOH/H₂O (13,75:48,75:37,5). 67
- FIGURA 4.13 - Cromatograma de purificação do 3-acetato de 5-hidroxi-1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-heptila (**17**) obtido por CLAE com as seguintes condições em escala preparativa: coluna C18, 10 μ , 30 x 1 cm, vazão de 6 mL/min, detector UV a 254 nm e fase móvel ACN/MeOH/H₂O (13,75:48,75:37,5). 68
- FIGURA 4.14 - Cromatograma de purificação da hexaidrocurcumina (**18**) obtido por CLAE com as seguintes condições em escala preparativa: coluna C18, 10 μ , 30 x 1 cm, vazão de 6 mL/min, detector UV a 254 nm e fase móvel ACN/MeOH/H₂O (13,75:48,75:37,5). 68
- FIGURA 4.15 - Cromatogramas da fração rica em gingeróis (bandas 1, 2 e 3: 6, 8 e 10-gingerol, respectivamente), obtido por CLAE em escala analítica. Condições cromatográficas: coluna C18, 10 μ , 25 x 0,46 cm, vazão de 1 mL/min, detector UV a 282 nm e fases móveis MeOH/H₂O, 70:30 (verde), 75:25 (vermelho) e 80:20 (preto) e acetonitrila/água, 67:33 (azul). 69
- FIGURA 4.16 - Cromatogramas da fração rica em gingeróis (bandas 1, 2 e 3: 6, 8 e 10-gingerol, respectivamente), obtida por CLAE em escala analítica. Condições cromatográficas: coluna C18, 10 μ , 25 x 0,46 cm, vazão de 1 mL/min, detector UV a 282 nm e fase móvel MeOH/H₂O (75:25). As massas injetadas foram: 0,019 mg (preto), 0,156 mg (vermelho), 0,312 (em verde), 1,25 mg (azul escuro) e 5 mg (azul claro)..... 70
- FIGURA 4.17 - Cromatogramas da fração rica em gingeróis (bandas 1, 2 e 3: 6, 8 e 10-gingerol, respectivamente), obtida por CLAE em escala analítica. Condições cromatográficas: coluna C18, 10 μ , 25 x 0,46 cm, vazão de 1 mL/min, detector UV a 282 nm e fase móvel MeOH/H₂O (75:25). As massas injetadas foram: 5,0 mg (preto), 7,5 mg (vermelho), 15,0 mg (verde) e 30 mg (azul)..... 71

FIGURA 4.18 - Cromatograma da fração rica nos gingeróis (bandas 1, 2 e 3: 6, 8 e 10-gingerol, respectivamente), obtida por CLAE em escala semi-preparativa. Condições cromatográficas: coluna C18, 10 μ , 30 x 1 cm, vazão de 6 mL/min, detector UV a 254 nm e fase móvel MeOH/H ₂ O (75:25). As massas injetadas foram 85,1 mg (preto) e 170,1 mg (vermelho).	72
FIGURA 4.19 Espectros de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz), com ampliação da região de aromáticos (A), e EM (IE: 70 eV) (B) do 4-gingerol (1).....	73
FIGURA 4.20 - Espectros de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz), com ampliação da região de aromáticos (A) e EM (IE: 70 eV) (B) do 6-gingerol (2).....	74
FIGURA 4.21 - Espectros de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz), com ampliação da região de aromáticos (A) e EM (IE: 70 eV) (B) do 8-gingerol (3).....	75
FIGURA 4.22 - Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz), com ampliação da região de aromáticos (A), e EM, com ionização por elétron-spray no modo positivo (B) do 10-gingerol (4).	76
FIGURA 4.23 - Espectros de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz) (A), e EM (IE: 70 eV) (B) do 6-shogaol (5).	78
FIGURA 4.24 - Espectros de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz), com ampliação da região de aromáticos (A), e EM (IE: 70 eV) (B) do 8-shogaol (16).....	79
FIGURA 4.25 - Espectros de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz), com ampliação da região de aromáticos (A), e EM (IE: 70 eV) (B) do 10-shogaol (6).....	80
FIGURA 4.26 - Íons-fragmento majoritários do EM das substâncias 1-6 e 16.	81
FIGURA 4.27 - Espectros de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz), com ampliação da região de aromáticos (A), e EM (IE: 70 eV) (B) do 6-paradol (7).....	82
FIGURA 4.28 - Íons-fragmento majoritários do EM da substância 7.	83
FIGURA 4.29 - Espectros de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz), com ampliação da região de aromáticos (A), e EM (IE: 70 eV) (B) do 6-gingerdiol (8).....	84
FIGURA 4.30 - Íons-fragmento majoritários do EM da substância 8.	85
FIGURA 4.31 - Espectros de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz), com ampliação da região de aromáticos (A), e EM (IE: 70 eV) (B) do Metil-6-gingerol (9)	86
FIGURA 4.32 - Espectro massas (IE: 70 eV) do metil-6-shogaol (10).....	87

FIGURA 4.33 - Íons-fragmento majoritários do EM das substâncias 9 e 10	87
FIGURA 4.34 - Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz), com ampliação da região de aromáticos (A), e EM (IE: 70 eV) (B) do diacetato de 6-gingerdioila (11).....	88
FIGURA 4.35 - Íons-fragmento majoritários do EM da substância 11	89
FIGURA 4.36 - Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz) (mistura: diacetato de metil-6-gingerdioila e 8-shogaol), e EM (IE: 70 eV) (B) do diacetato de metil-6-gingerdioila (12).....	90
FIGURA 4.37 - Íons-fragmento majoritários do EM da substância 12	91
FIGURA 4.38 - Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz), com ampliação da região de aromáticos (A), e EM (IE: 70 eV) (B) da zingerona (13).	92
FIGURA 4.39 - Íons-fragmento majoritários do EM da substância 13	93
FIGURA 4.40 - Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz), com ampliação da região de aromáticos (A), e EM (IE: 70 eV) (B) da gingerenona (1,7-bis-(4'-hidroxi-3'-metoxifenil)-4-hepten-3-ona) (14).	94
FIGURA 4.41 - Íons-fragmento majoritários do EM da substância 14	95
FIGURA 4.42 - Espectros de RMN ¹ H (A) e ¹³ C (B) (MeOD, 400 MHz) da galanolactona (15).	96
FIGURA 4.43 - Espectro de massas (IE: 70 eV) da galanolactona.	98
FIGURA 4.44 - Íon-fragmento majoritário do EM da substância 15	98
FIGURA 4.45 - Espectro de RMN ¹ H (CD ₃ COCD ₃ , 200 MHz), com ampliação da região de aromáticos (A) e de EM, com ionização por elétron-spray no modo positivo (B) do 3-acetato de 5-hidroxi-1,7-bis-(4'-hidroxi-3'-metoxifenil)-heptila (17).	99
FIGURA 4.46 - Espectro de RMN ¹ H (A), RMN ¹³ C, com ampliação da região de aromáticos (B) (CD ₃ COCD ₃ , 400 MHz) da hexaidrocurcumina (18).	101
FIGURA 4.47 - Espectro de massas da hexaidrocurcumina (18). Ionização por elétron-spray no modo positivo.....	102
FIGURA 4.48 - Cromatograma, obtido por CG, da mistura de sesquiterpenos isolada e identificada da fração <i>n</i> -hexânica. Rampa de aquecimento: 100-5/2-150-0.....	108
FIGURA 4.49 - Espectro de massas (IE: 70 eV) do α -curcumeno.....	109

FIGURA 4.50 - Espectro de massas (IE: 70 eV) do α -zingibereno.....	109
FIGURA 4.51 - Espectro de massas (IE: 70 eV) do (<i>E,E</i>)- α -farneseno.....	110
FIGURA 4.52 - Espectro de massas (IE: 70 eV) do β -bisaboleno.....	110
FIGURA 4.53 - Espectro de massas (IE: 70 eV) do β -sesquifelandreno.....	110
FIGURA 4.54 - Curva de inibição frente à catepsina K, da mistura de sesquiterpenos, utilizada para a determinação do valor de IC ₅₀	111
FIGURA 4.55 - Cromatograma completo (A) e ampliação da região dos constituintes majoritários(B), obtido por CG, do óleo essencial dos rizomas de <i>Z. officinale</i> . Rampa de aquecimento: 60-1/1,5-185-1/9-275-10.	113
FIGURA 4.56 - Espectro de massas (IE: 70 eV) do neral.....	113
FIGURA 4.57 - Espectro de massas (IE: 70 eV) do geranial.....	114
FIGURA 4.58 - Espectro de massas (IE: 70 eV) do α -curcumeno.....	114
FIGURA 4.59 - Espectro de massas (IE: 70 eV) do α -zingibereno.....	114
FIGURA 4.60 - Espectro de massas (IE: 70 eV) do (<i>E,E</i>)- α -farneseno.	115
FIGURA 4.61 - Espectro de massas (IE: 70 eV) do β -sesquifelandreno.....	115
FIGURA 4.62 - Curva de inibição frente à catepsina K, da mistura de sesquiterpenos, utilizada para a determinação do valor de IC ₅₀	116
FIGURA 4.63 - Espectro de RMN ¹ H (CD ₃ COCD ₃ , 400 MHz) (A) e de EM (B) da substância SSi1 . Ionização por impacto eletrônico: 70 eV.....	117
FIGURA 4.64 - Espectro de RMN ¹ H (CD ₃ Cl, 200 MHz) (A) e EM (B) da substância SSi2 . Ionização por impacto eletrônico: 70 eV.....	119
FIGURA 4.65 - Espectro de RMN ¹ H (CD ₃ COCD ₃ , 400 MHz) (A) e EM (B) da substância SSi3 . Ionização por elétron-spray no modo positivo.	120
FIGURA 4.66 - Espectro de RMN ¹ H (CD ₃ COCD ₃ , 400 MHz) (A) e EM (B) da substância SSi4 . Ionização por elétron-spray no modo positivo.	122
FIGURA 4.67 - Espectro de RMN ¹ H (200 MHz) (A) e EM (B) da substância SSi5 . Ionização por elétron-spray no modo positivo.	124

FIGURA 4.68 - Espectros de RMN ^1H (400 MHz) das substâncias SSi6 (A) e SSi6II (B).....	125
FIGURA 4.69 - Ampliações do espectro de RMN ^1H (400 MHz) da substância SSi6 (região aromática).	126
FIGURA 4.70 - Espectro de massas da substância SSi6 . Ionização por elétron-spray no modo positivo.	128
FIGURA 4.71 - Linearização de Lineweaver-Burk, com o inibidor 6-shogaol, nas respectivas concentrações: 250 μM (■), 225 μM (▲), 200 μM (×) e sem inibidor (—).133	133
FIGURA 4.72 - Linearização de Hanes-Woolf, mostrando ampliação da interceptação das retas, com o inibidor 6-shogaol, nas respectivas concentrações: 250 μM (■), 225 μM (▲), 200 μM (×) e sem inibidor (—).	133
FIGURA 4.73 - Ajuste dos dados utilizando o modelo de Dixon, com o inibidor 6-shogaol. As concentrações de substrato utilizadas foram as seguintes: 4,0 μM (■), 5,0 μM (▲), 7,5 μM (×) e 25,0 μM (—).	134
FIGURA 4.74 - Linearização de Hanes-Woolf, com o inibidor 10-gingerol nas respectivas concentrações: 125 (◆), 75 μM (■), 25 μM (▲), e sem inibidor (—).....	134
FIGURA 4.75 - Ajuste dos dados experimentais utilizando o modelo de Hanes-Woolf, com o inibidor 10-gingerol. O eixo da ordenada (y) representa os coeficientes lineares (◆), e angulares (■) das linearizações de Hanes-Woolf.....	135
FIGURA 4.76 - Linearização de Lineweaver-Burk, com o inibidor 10-gingerol nas respectivas concentrações: 75,0 μM (■), 12,5 μM (◆), e sem inibidor (—).....	135
FIGURA 4.77 - Ajuste dos dados experimentais utilizando o modelo de Dixon, com o inibidor 10-gingerol. As concentrações de substrato utilizadas foram as seguintes: 1,0 (◆), 2,0 μM (■), 4,0 μM (▲), e 20 μM (—).	136
FIGURA 4.78 - Linearização de Hanes-Woolf, mostrando ampliação da interceptação das retas, com o inibidor SSi6 , nas respectivas concentrações: 125 (◆), 31,25 μM (▲), 7,8 μM (■), 4,0 μM (●) e sem inibidor (—).....	137
FIGURA 4.79 - Ajuste dos dados experimentais utilizando o modelo de Hanes-Woolf, com o inibidor SSi6	137

FIGURA 4.80 – Linearização de Lineweaver-Burk, com o inibidor SSi6 nas respectivas concentrações: 125 (◆), 62,5 μM (◇), 7,8 μM (■), 4,0 μM (●) e sem inibidor (—).....	138
FIGURA 4.81 - Ajuste dos dados experimentais utilizando o modelo de Dixon, com o inibidor 6-shogaol. As concentrações de substrato utilizadas foram as seguintes: 1,0 μM (◆) 2,0 μM (■), 5,0 μM (×), 15 μM (+) e 20 μM (—).....	138
FIGURA 4.82 - Microfotografias dos condrócitos mostrando as células viáveis, (imagem esquerda), como controle, e células em apoptose, (imagem direita), representando a morte celular causada pelas substâncias teste na concentração de 50 μM.	140
FIGURA 4.83 - Citotoxicidade das substâncias (SSi6, 10-gingerol, 6-shogaol) frente a linhagem celular ATDC5.....	141
FIGURA 4.84 - Citotoxicidade das substâncias (SSi6, 10-gingerol, 6-shogaol) frente a sinoviócitos humanos.	141
FIGURA 4.85 - Inibição da atividade da catepsina K em condrócitos humanos com os inibidores reversíveis SSi6, 10-gingerol, 6-shogaol e o inibidor irreversível E64, como controle positivo. O controle negativo foi realizado nas mesmas condições reacionais, mas sem inibidor.	143
FIGURA 4.86 - Via de produção do NO com as enzimas envolvidas neste processo.	144

LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 1.1 - Mecanismo de hidrólise do substrato por uma cisteína protease (LECAILLE et al., 2002).....	12
ESQUEMA 1.2. - Equilíbrio de uma reação enzimática mono-substrato.....	16
ESQUEMA 1.3 - Equilíbrio da reação enzimática para a inibição do tipo competitiva..	18
ESQUEMA 1.4 - Equilíbrio da reação enzimática para a inibição do tipo acompetitiva.	19
ESQUEMA 1.5.- Equilíbrio da reação enzimática para a inibição do tipo não-competitiva.	20
ESQUEMA 1.6 - Equilíbrio da reação enzimática para a inibição do tipo competitiva parcial.	21
ESQUEMA 1.7 - Equilíbrio da reação enzimática para a inibição acompetitiva parcial.	22
ESQUEMA 1.8 - Equilíbrio da reação enzimática para a inibição do tipo não-competitiva parcial.....	23
ESQUEMA 3.1 - Reação de acetilação do 6-gingerol.	45
ESQUEMA 3.2 - Reação de desidratação do 6-gingerol.....	46
ESQUEMA 3.3 - Formação de hidrazona obtida da reação do 6-gingerol com fenilhidrazina.	46
ESQUEMA 3.4 - Formação de hidrazona obtida da reação do 6-gingerol com hidrazina.....	47
ESQUEMA 3.5 - Formação de hidrazona obtida da reação do 6-gingerol com 2,4-dinitrofenilhidrazina.....	48
ESQUEMA 3.6 - Formação de oxima obtida da reação do 6-gingerol com cloridrato de hidroxilamina.	49

RESUMO

BUSCA DE INIBIDORES DA CATEPSINA K EM PLANTAS MEDICINAIS UTILIZADAS NO TRATAMENTO DE DOENÇAS OSTEOARTICULARES.

Dez plantas utilizadas pela medicina tradicional com indicativos na literatura de suas eficácias frente a doenças osteoarticulares foram selecionadas para a realização de uma triagem de atividade inibitória frente à catepsina K, uma importante enzima responsável pela clivagem do colágeno, principal constituinte da matriz extracelular da cartilagem e ossos. Das dez plantas selecionadas (gingibre, açafão, camélia, unha-de-gato, mentrasto, moringa, babaçu, garra-do-diabo, urtigão e pequi), uma, gengibre (*Zingiber officinale*), merece destaque pela alta inibição de seu extrato e frações frente à catepsina K e por seu uso milenar como agente terapêutico. Da fração de diclorometano obtida do extrato bruto dos rizomas de *Z. officinale* isolou-se e identificou-se 18 substâncias (4-gingerol, 6-gingerol, 8-gingerol, 6-shogaol, 8-shogaol, 10-shogaol, 6-paradol, 6-gingerdiol, metil-6-gingerol, metil-6-shogaol, diacetato de 6-gingerdioila, diacetato de metil-6-gingerdioila, zingerona, gingerenona A, galanolactona, 3-acetato de 5-hidroxi-1,7-bis(4'-hidroxi-3'-metoxifenil)-heptila e hexaidrocurcumina). Da fração de *n*-hexano e do óleo essencial, foram identificados 2 monoterpenos e 4 sesquiterpenos. As substâncias mais ativas frente à catepsina K foram os gingeróis e shogaois de maior cadeia alquílica. Otimização da separação das substâncias majoritárias (6, 8 e 10-gingerol) e um estudo de sobrecarga de uma coluna C18 por CLAE, foram realizados, obtendo-se como resultado o isolamento de dezenas a centenas de miligramas de cada gingerol com considerável grau de pureza. Modificações estruturais do 6-gingerol foram realizadas e, das sete substâncias obtidas, 4 tiveram um aumento considerável do poder inibitório. Das substâncias obtidas, três, SSi6, 10-gingerol, 6-shogaol, foram selecionadas para ensaios posteriores: determinação do tipo de inibição frente à catepsina K, inibição da catepsina K e inibição da produção de óxido nítrico (NO), em meio celular. As inibições determinadas foram não-competitiva parcial, incompetitiva parcial e incompetitiva completa, para o SSi6, 10-gingerol e 6-shogaol, respectivamente. Excelentes atividades de inibição frente à catepsina K, em meio celular, puderam ser observadas para o SSi6 e 6-shogaol. No ensaio de inibição da produção de NO, o 6-shogaol foi a única substância que se apresentou como efetivo.

ABSTRACT

SEARCH OF CATHEPSIN K INHIBITORS IN MEDICINAL PLANTS USED IN THE TREATMENT OF DISEASES OSTEOARTHRITIS.

Ten herbs used in traditional medicine supported by literature for its effectiveness to osteoarticular diseases were selected to conduct a screening of inhibition activity against the cathepsin K, an important enzyme responsible for cleavage of collagen, the main constituent of extracellular matrix of cartilage and bone. Out of the ten herbs selected (ginger, saffron, camellia, cat's claw, "mentrasto", "moringa", "babaçu", devil's claw, urtica e "pequi"), one, gengibre (*Z. officinale*), should be highlighted by a high inhibitory activity of its extracts and fractions against cathepsin K and due to its ancient use as a therapeutic agent. From the dichloromethane fraction obtained of the crude extract of the rhizome of *Z. officinale* were isolated and identified 18 compounds (4-gingerol, 6-gingerol, 8-gingerol, 6-shogaol, 8-shogaol, 10-shogaol, 6-paradol, 6-gingerdiol, methyl 6-gingerol, methyl 6-shogaol, diacetoxy-6-gingerdiol, methyl diacetoxy-6-gingerdiol, zingerone, gingerenone A, galanolactone, 3-acetoxy-5-hydroxy-1,7-bis(4'-hydroxy-3'-methoxyphenyl)-heptane and hexahydrocurcumin). From the hexane fraction and essential oil were identified two monoterpenes and four sesquiterpenes. The most active compounds against cathepsin K were gingerols and shogaols with longer alkyl chain. Optimization of the separation of major compounds (6, 8 and 10-gingerol) and an overload study of C18 column was performed using HPLC, obtained as result dozens to hundreds of milligrams of each gingerol with high purity. Structural modifications of 6-gingerol were carried out and of the seven derivatives obtained 4 presented significant increase in inhibition of cathepsin K. Of all the compounds, three, SSi6, 10-gingerol, 6-shogaol, were selected for later tests: determining of the mode the inhibition against cathepsin K, inhibition against cathepsin K and inhibition of nitric oxide (NO) production, in cellular culture. The inhibitions determined were: partially noncompetitive, partially uncompetitive and complete uncompetitive for the SSi6, 10-gingerol and 6-shogaol, respectively. Excellent inhibition activity against the cathepsin K, in cellular culture, can be observed for SSi6 and 6-shogaol. In the inhibition assay of NO production, the 6-shogaol was the only compound that appeared as effective.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	vii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE ESQUEMAS	xix
RESUMO.....	xx
ABSTRACT	xxi
1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 - <i>ZINGIBER OFFICINALE</i>	3
1.1.1 - Perfil químico da espécie.....	4
1.1.2 - Utilização da espécie na medicina tradicional	6
1.2 - DOENÇAS OSTEOARTICULARES.....	7
1.2.1 - Artrite e artrose	7
1.3 - OSTEOPOROSE	8
1.4 - CISTEÍNO PROTEASES (E.C.3.4.22).....	9
1.5 - CATEPSINA K.....	12
1.6 - MECANISMO DE CATÁLISE ENZIMÁTICA.....	16
1.6.1 - Inibição enzimática	17
1.6.1.1 - Competitiva	18
1.6.1.2 - Acompetitiva.....	19
1.6.1.3 - Não-competitiva	20
1.6.1.4 - Competitiva parcial.....	21
1.6.1.5 - Acompetitiva parcial	22
1.6.1.6 - Não-competitiva parcial.....	23
1.6.2 - Determinação dos parâmetros cinéticos.....	24
1.7 - INIBIDORES DA CATEPSINA K.....	28

2 - OBJETIVOS	32
3 - MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 - MATERIAL	33
3.2 - EQUIPAMENTOS	34
3.3 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	36
3.3.1 - Triagem das plantas selecionadas e preparação dos extratos vegetais.....	36
3.3.2 - Fracionamento do extrato dos rizomas de <i>Z. officinale</i>	37
3.3.2.1 - Isolamento dos metabólitos.....	39
3.3.2.2 - Otimização de separação do 6, 8 e 10-gingerol.....	43
3.3.2.3 - Identificação das substâncias	44
3.3.2.4 - Determinação do índice de retenção de Kovats para a identificação de constituintes voláteis	45
3.3.3 - Modificação estrutural do 6-gingerol.....	45
3.3.3.1 - Reação de acetilação.....	45
3.3.3.2 - Reação de desidratação	46
3.3.3.3 - Reações de formação de hidrazona (MARCH, 1992).	46
3.3.3.3.1 - Reação de 6-gingerol com fenilidrazina.....	46
3.3.3.3.1 - Reação de 6-gingerol com hidrazina	47
3.3.3.3.1 - Reação de 6-gingerol com 2,4-dinitrofenilidrazina.....	48
3.3.3.4 - Reação de formação de oxima (MARCH, 1992).....	49
3.3.4 - Ensaio de atividade enzimática frente à catepsina K.....	49
3.3.5 - Ensaio biológico	50
3.3.5.1 - Cultivo de condrócitos.....	50
3.3.5.2 - Cultivo de sinoviócitos.....	51
3.3.5.3 - Ensaio de viabilidade celular com as substâncias teste.....	51
3.3.5.4 - Determinação da atividade da catepsina K em cultivo celular	52
3.3.5.5 - Determinação de nitritos em cultivo celular.....	53
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54

4.1 - ENSAIOS DE INIBIÇÃO FRENTE À CATEPSINA K DOS EXTRATOS DE PLANTAS MEDICINAIS USADAS NO TRATAMENTO DE DOENÇAS OSTEOARTICULARES.....	54
4.1.1 - <i>Zingiber officinale</i>	57
4.1.1.1 - Estudo biomonitorado da fração diclorometano dos rizomas de <i>Z. officinale</i>	57
4.1.1.1.1 - Isolamento das substâncias da fração diclorometano	60
4.1.1.1.2 - Otimização de separação do 6, 8 e 10-gingerol	69
4.1.1.1.3 - Identificação estrutural das substâncias isoladas.....	72
4.1.1.1.4 - Determinação dos valores de IC ₅₀ de algumas substâncias isoladas.....	103
4.1.1.2 - Estudo biomonitorado da fração hexânica dos rizomas de <i>Z. officinale</i>	107
4.1.1.2.1 - Identificação estrutural dos componentes majoritários da partição de hexano de <i>Z. officinale</i>	108
4.1.1.2.2 - Determinação do IC ₅₀ da mistura de sesquiterpenos	111
4.1.1.3 - Obtenção do óleo essencial dos rizomas de <i>Z. officinale</i>	111
4.1.1.3.1 - Identificação estrutural dos componentes majoritários do óleo essencial dos rizomas de <i>Z. officinale</i>	111
4.1.1.3.1 - Determinação do IC ₅₀ do óleo essencial.....	115
4.2 - MODIFICAÇÃO QUÍMICA DO 6-GINGEROL	116
4.2.1 - Determinação estrutural dos produtos das reações.....	116
4.2.1.1 - Substância semi-sintética 1 (SSi1).....	117
4.2.1.2 - Substância semi-sintética 2 (SSi2).....	119
4.2.1.3 - Substância semi-sintética 3 (SSi3).....	120
4.2.1.4 - Substância semi-sintética 4 (SSi4).....	122
4.2.1.5 - Substância semi-sintética 5 (SSi5).....	124
4.2.1.6 - Substância semi-sintética 6 (SSi6).....	125
4.2.2 - Determinação dos IC ₅₀ das substâncias semi-sintéticas	128
4.3 - DETERMINAÇÃO DA SELETIVIDADE (CATEPSINAS K, V, L E S) E DO MODO DE INIBIÇÃO DE ALGUNS SUBSTÂNCIAS MAIS PROMISSORES.....	130
4.4 - ENSAIOS EM CULTURAS DE CÉLULAS	140

4.4.1 - Ensaio de viabilidade celular frente a células ATDC5, condrócitos e sinoviócitos humanos.....	140
4.4.2 - Ensaio de inibição da catepsina K em condrócitos humanos.....	142
4.4.3 - Ensaio de inibição da produção de óxido nítrico em células ATDC5 e condrócitos humanos.....	144
5. Conclusão.....	147
6. Referências Bibliográficas	150

1 - INTRODUÇÃO

A medicina tradicional, no que diz respeito ao uso de plantas, apresenta uma respeitável posição nos dias atuais, especialmente nos países em desenvolvimento, onde o acesso a serviços de saúde modernos é limitado. Segurança, efetividade e baixo custo de remédios utilizados pelos povos antigos ganharam popularidade entre as pessoas de áreas urbanas e rurais. Informações sobre a medicina tradicional desses povos têm um papel vital na descoberta de novos produtos naturais como agentes terapêuticos (AGRA et al., 2007). Apesar do grande desenvolvimento da síntese orgânica e de novos processos biotecnológicos, os produtos naturais estão envolvidos, em mais de 50%, no desenvolvimento de todos os novos medicamentos baseados em pequenas moléculas, como pode ser observado através da FIGURA 1.1. (NEWMAN, 2008).

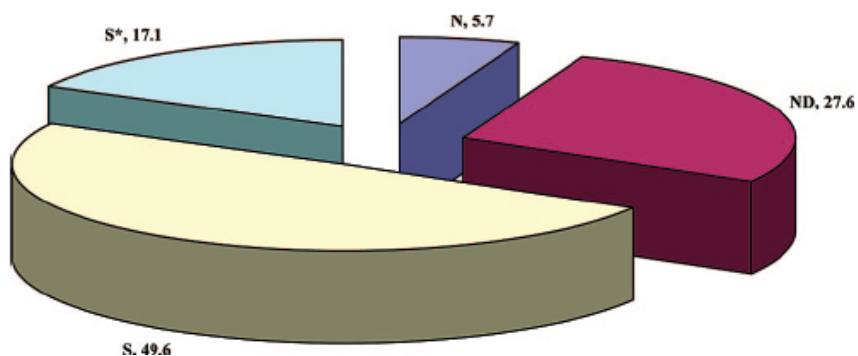


FIGURA 1.1 - Percentual da origem de fármacos baseados em pequenas moléculas, 1981-2006. N: produtos naturais, ND: derivados de produtos naturais, S*: sintéticos, porém obtidos baseados em grupo farmacofórico de substâncias de origem natural, S: sintéticos.

Existem diversas espécies vegetais conhecidas por suas propriedades medicinais que podem ser exploradas para se descobrir as substâncias que são responsáveis por suas atividades biológicas. Duas espécies da família Zingiberaceae, *Zingiber officinale* (gengibre) e *Curcuma longa* (açafrão) são promissoras no tratamento da artrose e artrite, o que foi comprovado em resultados descritos recentemente (FUNK et al., 2009; HENROTIN et al., 2010), além de serem conhecidas por suas atividades anti-inflamatórias há milhares de anos pela medicina tradicional. Outras espécies, como *Orbignya phalerata* (babaçu), Arecaceae,

Laportea aestuans (urtigão), Urticaceae, *Ageratum conyzoides* (mentrasto), Asteraceae, *Uncaria tomentosa* (unha-de-gato), Rubiaceae, *Harpagophytum procumbens* (garra-do-diabo), Pedaliaceae, e *Camellia sinensis* (chá verde), Theaceae, também são relatadas na literatura através de estudos etnofarmacológicos, onde se obteve resultados positivos no tratamento de artrose e/ou artrite reumatóide (AGRA et al., 2007; AHMED et al., 2005; BRIEN et al., 2006; CHANTRE et al., 2000; CHRUBASIK et al., 2002; KOOPMAN et al., 2004; MATOS et al., 2000). Há também relatos na literatura de que *Moringa oleifera* (moringa), Moringaceae, e *Caryocar* sp. (pequi), Cariocaraceae, são utilizados pela medicina tradicional para doenças inflamatórias que acometem as articulações (AHMED et al., 2005).

A cisteino protease, catepsina K, é uma enzima que está diretamente envolvida em doenças onde há destruição da cartilagem e do tecido ósseo, e por isso, é um excelente alvo molecular na busca de agentes terapêuticos, que sejam efetivos na diminuição da patologia destes tecidos, evitando também a inflamação articular, que pode ser ocasionada por essa destruição. Esta cisteino protease está distribuída principalmente nos tecidos que envolvem o desenvolvimento esquelético. É encontrada no tecido ósseo, em células como osteoclastos e osteoblastos, na cartilagem articular (condrócitos), cartilagem da placa de crescimento (condrócitos hiperplásicos) e no tecido sinovial (fibroblastos sinoviais e macrófagos) (SALMINEN-MANKONEN et al., 2007).

Há várias evidências da participação da catepsina K na degradação de proteínas da matriz óssea, e isso a tem tornado um alvo bastante atrativo para o desenvolvimento de novos fármacos anti-absortivos (ALTMANN et al., 2007). A catepsina K é a enzima que possui maior atividade no processo de reabsorção óssea, hidrolisando rapidamente o maior componente orgânico da matriz óssea, o colágeno tipo I. Desta forma, inibidores da catepsina K promovem a diminuição da taxa de perda óssea, e tem se mostrado como atenuadores da reabsorção óssea em modelos animais com osteoporose (ADKISON et al., 2006). Esta enzima também está envolvida na degradação do colágeno tipo II, que vem a ser o principal componente orgânico presente na cartilagem, portanto ela está diretamente envolvida na destruição da cartilagem em pacientes portadores de artrite reumatóide (HOU et al., 2001). Outras doenças que também se caracterizam por destruição de cartilagem como a artrose, também terão a catepsina K como o principal agente

agravador do processo de erosão do tecido cartilaginoso. Uma maior expressão da catepsina K pode ser evidenciada através de um estudo com um modelo artrósico de camundongo, onde o aumento da destruição da cartilagem foi acompanhado por um aumento de expressão da catepsina K (MORKO et al., 2004).

O interesse em aprofundar a investigação das proteases evoluiu a partir do conhecimento de que, além das ações digestivas, elas estão envolvidas na regulação de muitos processos fisiológicos, como por exemplo a remodelagem óssea (SILVA-JUNIOR e DE SIMONE, 2001). As enzimas são alvos bastante atrativos, considerando o fato de que em torno de 47% de todos os medicamentos existentes no mercado tem ação nestes alvos moleculares (COPELAND, 2005).

Doenças debilitantes como osteoporose, artrite e artrose, são consideradas problemas de saúde pública, e acometem uma grande parcela da população no mundo. Frente a isso e à necessidade de se descobrir novos fármacos eficazes e mais seguros, torna-se interessante o estudo de plantas utilizadas pela medicina popular.

1.1 - *Zingiber officinale*

Conhecida popularmente por gengibre, é uma erva rizomática originária de países do sudoeste asiático e arquipélago malaio. É de fácil cultivo em países de clima tropical e sub-tropical, sendo encontrada no Brasil principalmente na faixa litorânea que vai do Espírito Santo a Santa Catarina, em razão das condições de clima e solo mais adequados (DEBIASI et al., 2004; NEGRELLE et al., 2005).

O gênero *Zingiber* possui cerca de 200 espécies em todo o mundo, sendo que no Brasil são encontradas principalmente as espécies: *Z. zerumbet* e *Z. officinale*. Sua classificação taxonômica, retirada do Centro de Referência em Informação Ambiental (CRIA), Programa BIOTA, está apresentada na TABELA 1.1 (www.cria.org.br).

Existem diversas formas de consumo dos rizomas de *Z. officinale*. No Brasil é consumido, sobretudo, nas formas: seca, fresca, ou em conserva, como está ilustrado na FIGURA 1.2. Encontra-se também como um fitoterápico nas diferentes formas farmacêuticas: cristalizada, pastilha, xarope ou em cápsula.



FIGURA 1.2 - Principais formas de consumo do gengibre (<http://thinkfood.com.br>; <http://www.canstockphoto.com.br>).

TABELA 1.1 - Classificação taxonômica de *Zingiber officinale*.

Taxonomia de <i>Zingiber officinale</i>	
Reino	Plantae
Filo	Magnoliophyta
Classe	Liliopsida
Ordem	Zingiberales
Família	Zingiberaceae
Gênero	<i>Zingiber</i>

1.1.1 - Perfil químico da espécie

Diversas substâncias já foram isoladas e identificadas dos rizomas de *Z. officinale* (JOLAD et al.; 2004). Os compostos majoritários são os monoterpenos e os sesquiterpenos, encontrados no óleo essencial (1-3 %), e os derivados fenólicos encontrados na sua oleoresina (4,5-7 %) (PUENGPHEAN e SIRICHOTE, 2008).

Os derivados fenólicos, principalmente os gíngerois e shogaois, são os responsáveis por seu sabor pungente. Os gíngerois mais abundantes nesta espécie, 6, 8 e 10-gíngerois, constituem uma série homóloga, diferindo-se apenas no tamanho de sua cadeia hidrocarbônica por dois carbonos (HE et al., 1998). Alguns produtos de degradação (desidratação) dos gíngerois, os shogaois, podem ser encontrados em maior quantidade nos rizomas do gengibre seco, devido ao processamento térmico ao qual os rizomas do gengibre são submetidos. Estes, por sua vez, são mais pungentes que os gíngerois. Dentre os shogaois, o 6-shogaol é o mais

abundante, gerado pela desidratação do 6-gingerol, o principal gingerol encontrado no vegetal. As estruturas químicas dos diversos gingeróis e shogaois podem ser observadas na FIGURA 1.3 (ALI et al., 2008; PARK et al., 2008).

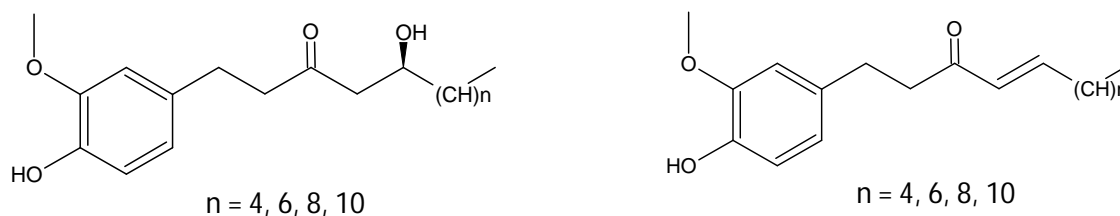


FIGURA 1.3 - Estruturas químicas dos gingeróis e shogaois isolados de *Z. officinale*.

Outras substâncias foram isoladas da oleoresina obtida por extração dos rizomas de *Z. officinale*, utilizando solventes tais como metanol, etanol e diclorometano. Entre eles, 6-gingerdiol, 6-paradol, 6-gingerdiona e seus derivados, alguns diarileptanoides, o diterpeno galanolactona, e os esteróides β -sitosterol e β -6-hidroxi-estigmastenona (JOLAD et al.; 2005; MA et al., 2004).

Recentemente substâncias contendo um anel de purina, embora raro em plantas superiores, foram isolados dos rizomas de *Z. officinale*. Este é o primeiro relato da literatura de substâncias nitrogenadas isoladas desta espécie (ARRAYA et al., 2011).

Com base na detecção direta destes compostos em extratos originais por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, descartou-se a possibilidade de serem artefatos. Eles apresentavam-se como misturas racêmicas, dado comprovado através da atividade óptica nula e análise por CLAE quiral (ARAYA et al., 2011).

Suas estruturas químicas podem ser observadas na FIGURA 1.4.

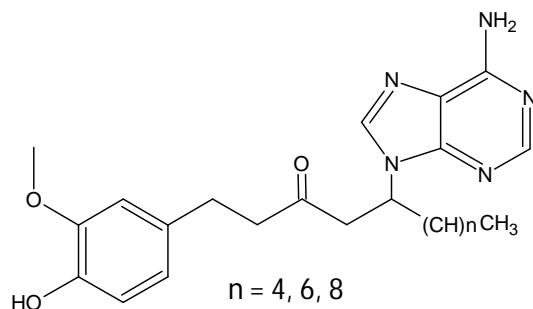


FIGURA 1.4 - Estrutura química da 6, 8 e 10-zingerina, isoladas de rizomas de *Z. officinale*.

Do óleo essencial dos rizomas de *Z. officinale*, obtido por destilação por arraste a vapor ou por extração em fluido supercrítico, foram identificados diversos monoterpenos e sesquiterpenos. Os majoritários são os monoterpenos geranial e neral, e os sesquiterpenos α -curcumeno, α -zingibereno, α -farneseno, β -bisaboleno e β -sesquifelandreno (SINGH et al., 2008; ZANCAN et al., 2002).

1.1.2 - Utilização da espécie na medicina tradicional

A utilização do gengibre como agente terapêutico é relatada desde milhares de anos, em diversos países asiáticos, revelados por documentos encontrados, escritos em sânscrito, e em chinês, tão bem como pela literatura romana, grega e arábica (ZICK et al., 2008). Existe um grande número de enfermidades que são tratadas utilizando o gengibre, principalmente em países asiáticos, como: artrite, reumatismo, cãimbra, distensões e dores musculares, problemas de garganta, constipação, indigestão, vômito, hipertensão, demência, febre, doenças infecciosas e verminoses (ALI et al., 2008).

Dentre as principais ações farmacológicas comprovadas cientificamente, está a anti-inflamatória (FUNK et al., 2009; HENROTIN et al., 2010; DUGASANI et al., 2010), a qual pode ter sua comprovação validada com a descoberta das substâncias bioativas e seu mecanismo de ação. Assim é possível evoluir para uma provável cura ou tratamento preventivo destes tipos de doenças.

1.2 - Doenças osteoarticulares

1.2.1 - Artrite e artrose

Artrite reumatóide, a forma mais comum das doenças inflamatórias das articulações, afeta aproximadamente 1% da população mundial. É caracterizada pela destruição progressiva da cartilagem e do osso subcondral levando a perda da função articular (AHMED et al., 2005).

A artrose é uma doença debilitante caracterizada pela destruição da cartilagem das articulações, formação de tecido fibroso e inflamação. Ela afeta, principalmente, o joelho e o quadril, com uma prevalência que aumenta com a idade, de 7% entre pessoas de 65-70 anos a 11,2% entre aqueles com 80 anos ou mais, variando um pouco entre os estudos existentes. Um estudo recente da Organização Mundial da Saúde (OMS) indica que a artrose seria a quarta causa mais importante de incapacidade entre mulheres e a oitava entre homens (MARX et al., 2006; VASILJEVA et al., 2007).

Tratamentos utilizados atualmente para artrite e artrose são todos sintomáticos, ou seja, atuam aliviando os sintomas como dor e inflamação, mas não diminuem a destruição da cartilagem, que é a causa principal desses sintomas. Os medicamentos mais utilizados hoje são os antiinflamatórios não-esteroidais (AINES), porém eles apresentam grandes reações adversas tais como a propensão a causar ulcera gástrica, perfurações e hemorragias gastrointestinais. Uma nova classe de AINES, inibidores específicos da COX-2, foi desenvolvida com eficácias similares, e com maior segurança em relação à toxicidade gastrointestinal, porém alguns desses inibidores foram retirados do mercado pela “Food and Drug Administration” (FDA), por apresentarem risco de derrame e ataque cardíaco com o uso prolongado. Recentemente, tem sido sugerido o uso de fármacos anti-reumáticos modificadores da doença (DMARDS: “disease-modifying antirheumatic drugs”), porém eles também apresentam limitações devido às suas reações adversas e pelo elevado custo em comparação aos AINES (AHMED et al., 2005).

Existem diversas proteases que estão diretamente envolvidas com estas enfermidades, destruindo proteínas da matriz extracelular. Elas, portanto, são bons alvos moleculares, pois através de sua modulação pode-se reduzir a

destruição da cartilagem nestas doenças e, desta forma, amenizar os efeitos deletérios causados por essa destruição (MORKO et al., 2004).

Alguns mediadores importantes envolvidos nestes processos inflamatórios são as espécies reativas de oxigênio (ROS: “reactive oxygen species”) e de nitrogênio (RNS: “nitrogen reactive species”). Eles podem causar danos ao ácido desoxirribonucleico (ADN), lipídios, proteínas e carboidratos presentes nas células, levando a um desequilíbrio metabólico e aumento das reações inflamatórias. Um deles é o óxido nítrico (NO), que pode ser diretamente citotóxico ou interagir com ânions superóxido, presentes no organismo, resultando na formação de peroxinitrito, a espécie de nitrogênio mais reativa. Portanto, a diminuição da produção de NO é importante nestes processos patológicos como forma de reduzir a inflamação, e conseqüentemente, os danos causados em decorrência deste processo inflamatório (DUGASANI et al.; 2010).

1.3 - Osteoporose

A osteoporose, uma doença óssea caracterizada por baixa massa óssea e deterioração estrutural do tecido ósseo, é considerada o segundo maior problema de saúde do século XXI. Ela afeta mais de 25 milhões de mulheres na pós-menopausa, em todo o mundo, e vem se tornando um problema crescente para homens e adolescentes (WANG et al., 2004; www.bmgrp.com). Terapia de reposição de estrógeno, tratamentos com moduladores de receptores seletivos de estrógenos, calcitonina, vitamina D, suplementos de cálcio, PTH e seus análogos, e bifosfonatos são também eficazes, mas apresentam vários problemas como o aumento da incidência de câncer, no caso da terapia de reposição de estrógeno, e sérios sintomas gastrointestinais, no caso dos bifosfonatos (LECAILLE et al., 2002). A terapia de reposição hormonal, indicada somente para mulheres que estão com osteoporose em alto nível, parece ser o método mais efetivo para reduzir a taxa de perda óssea, contudo várias reações adversas, descritas acima, podem estar acompanhadas ao seu uso (KANG et al., 2006).

Conforme mencionado anteriormente, proteases, neste caso, presentes principalmente em osteoclastos, são bons alvos moleculares, pois através de sua modulação pode-se reduzir a destruição óssea, e até mesmo auxiliar na reconstrução do tecido ósseo (TOLAR et al., 2004).

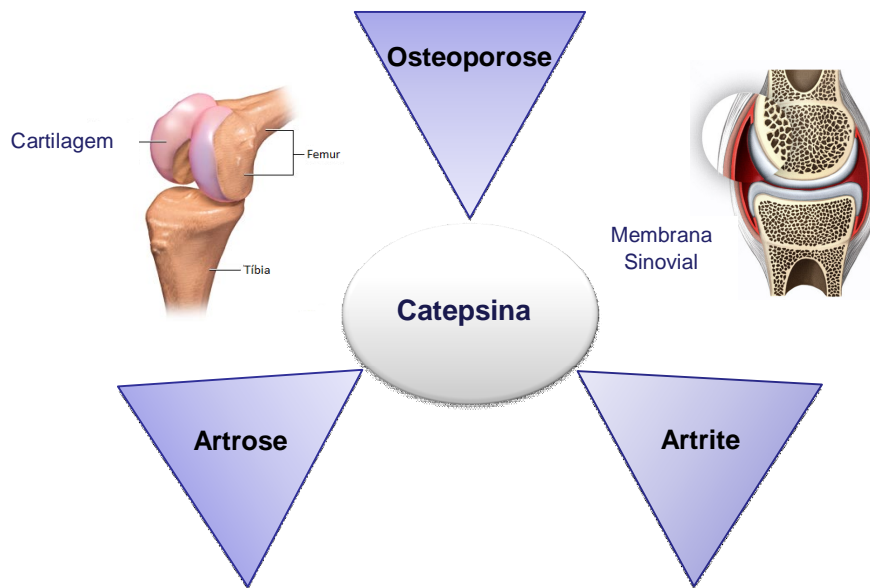


FIGURA 1.5 - Ilustração mostrando o envolvimento da catepsina K em doenças caracterizadas por perda de matriz extracelular.

Uma importante protease que pode ser utilizada como alvo molecular na busca de fármacos contra artrite, artrose e osteoporose, é a catepsina K, uma cisteíno protease que está envolvido nestas três patologias (FIGURA 1.5).

1.4 - Cisteíno proteases (E.C.3.4.22)

As cisteíno proteases podem ser agrupadas em duas superfamílias: a família das enzimas relacionadas à conversão enzimática de 1- β -interleucina e a superfamília papaína de cisteíno proteases. Embora cada superfamília empregue um sítio ativo, o qual contém o resíduo de aminoácido cisteína para o ataque nucleofílico, importantes diferenças estruturais e evolucionárias as distinguem (CHAPMAN et al., 1997). A superfamília papaína de cisteíno proteases é composta de calpaínas, bleomicinas hidrolases e o grupo das papaínas. Este último grupo é o mais numeroso e complexo e estão incluídas nele as enzimas lisossomais de mamíferos (MCGRATH, 1999). Elas são encontradas em diversas formas de vida, como vírus, bactérias, protozoários, fungos, plantas e mamíferos (OTTO e SCHIRMEISTER, 1997).

Todas as cisteíno proteases lisossomais de mamíferos são conhecidas como catepsinas, embora o contrário não seja verdadeiro. O termo foi primeiramente usado por WILLSTÄTTER e BAMANN há 70 anos para descrever uma protease não-pepsina ativa em pH ácido e evoluiu para descrever proteases ácidas intracelulares (MCGRATH, 1999).

Na base de dados do projeto genoma humano existem 11 cisteíno proteases (B, H, L, S, C, K, O, F, V, X, W). Todas elas foram clonadas e caracterizadas parcialmente antes da conclusão do seqüenciamento do genoma humano. A TABELA 1.2 resume as funções fisiológicas das cisteíno proteases humana mais estudadas (LECAILLE et al., 2002).

TABELA 1.2 - Papéis fisiológicos de algumas cisteíno proteases humanas

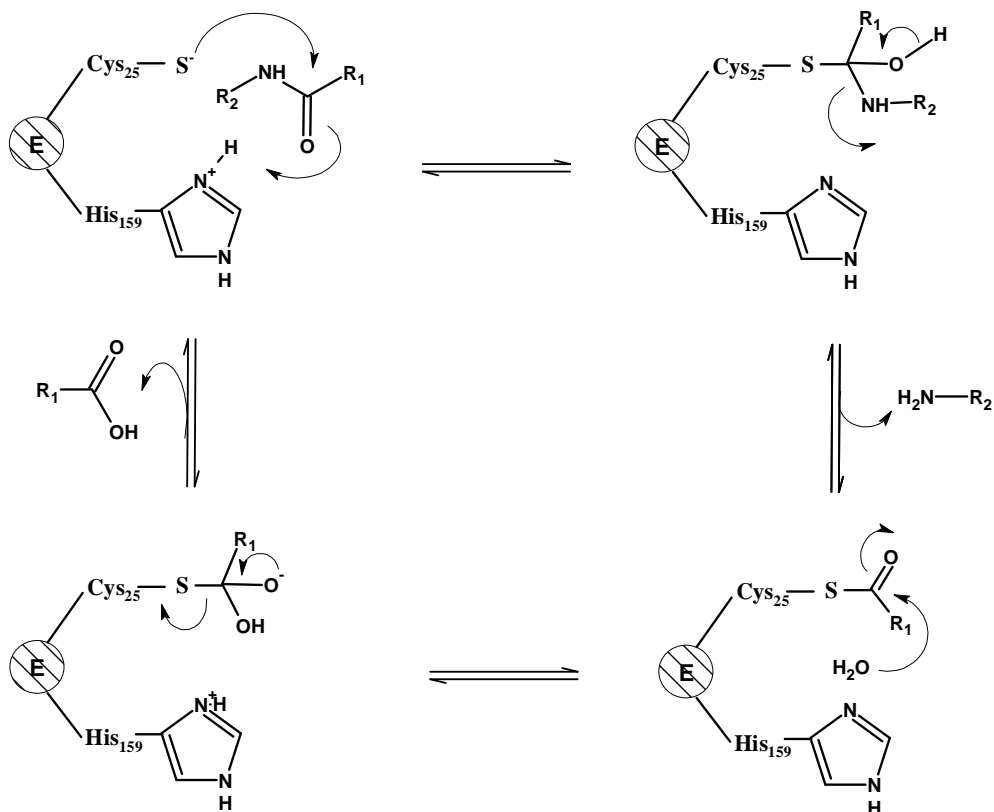
Cisteíno Protease	Papel Fisiológico
Catepsina B	Maturação de hormônios, ativação de pro-enzimas, degradação de proteínas,
Catepsina L	Maturação de hormônios, homeostase epidermal, degradação de proteínas e processamento e apresentação de antígeno
Catepsina H	Degradação de proteínas
Catepsina K	Reabsorção óssea
Catepsina C	Ativação de pro-enzimas
Catepsina V	Processamento e apresentação de antígeno
Catepsina F	Processamento e apresentação de antígeno
Catepsina S	Processamento e apresentação de antígeno

Fonte: LECAILLE et al., 2002

As cisteíno proteases são proteínas monoméricas com peso molecular entre 22 e 28 kDa, exceto a catepsina C, que é tetramérica e com peso molecular de

200 kDa (TURK et al., 2003). A maquinaria proteolítica dessas enzimas apresenta uma fenda catalítica com um domínio esquerdo e um domínio direito. O domínio esquerdo contém os resíduos de aminoácidos Cys 25 e Gln 19, e o domínio direito contém os resíduos de aminoácidos His 159 e Asn 175, porém a tríade catalítica é representada por Cys 25, His 159 e Asn 175 (MCGRATH, 1999). Cys 25 e His 159 formam um par iônico (FIGURA 1.6) o qual é estabilizado pelo resíduo Asn 175 através de uma ligação de hidrogênio. Essa tríade tem similaridade com o sítio ativo presente na serino protease (Ser, His, Asp), no entanto, em contraste com a serino protease, o resíduo de cisteína nucleofílico da cisteíno protease já encontra-se ionizado, permitindo a ligação mais rápida com o substrato, e desta maneira apresenta-se como uma enzima previamente ativada (LECAILLE et al., 2002), ESQUEMA 1.1.

A forma ativa da cisteíno protease forma um intermediário tetraédrico após o ataque nucleofílico do resíduo de cisteína à carbonila do substrato. O par de elétrons do oxigênio do substrato retorna para que seja formada a ligação dupla original, ocasionando a saída subsequente do primeiro produto reacional, uma amina. Um novo intermediário tetraédrico é formado após o ataque nucleofílico de uma molécula de água à carbonila. Subsequentemente, o segundo produto é eliminado, na forma de ácido carboxílico, e a enzima regenerada (LECAILLE et al., 2002), ESQUEMA 1.1.



ESQUEMA 1.1 - Mecanismo de hidrólise do substrato por uma cisteíno protease (LECAILLE et al., 2002).

1.5 - Catepsina K

A catepsina K é uma proteína monomérica com peso molecular 24 kDa, e 215 resíduos de aminoácidos, que foi descoberta e caracterizada em 1994. Apresenta 8 α -hélices, onde se encontram 60 resíduos de aminoácidos, e 17 folhas beta, onde participam 48 resíduos de aminoácidos. Os outros aminoácidos estão localizados nos “loops” da proteína (www.pdb.org/pdb/home/home.do)

A FIGURA 1.6 apresenta a estrutura tridimensional da catepsina K complexada com o inibidor irreversível E64, obtida do “Protein Data Bank” (www.pdb.org/pdb/home/home.do) e modificado através do programa de edição de macromoléculas, JMOL.

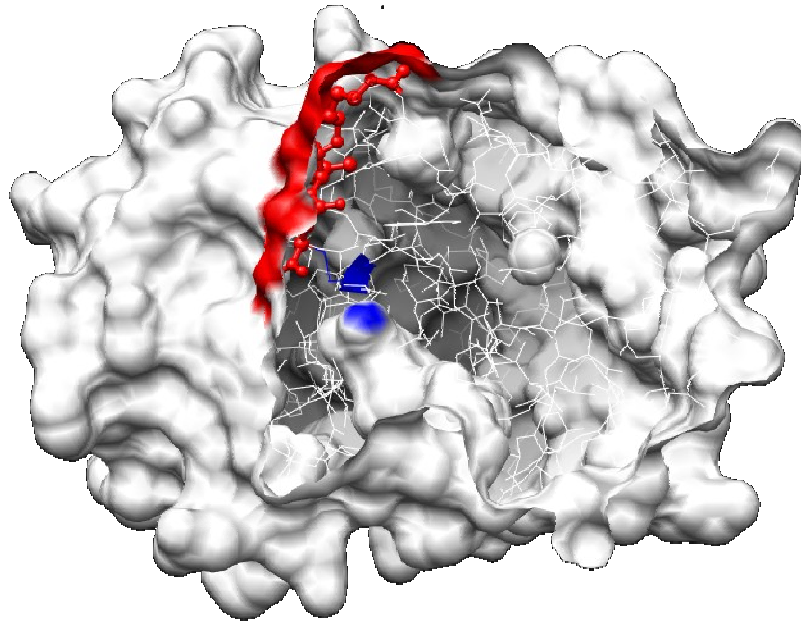


FIGURA 1.6 - Estrutura tridimensional da catepsina K (identificador do “Protein Data Bank”: 1ATK), com visualização da superfície molecular e um corte transversal. Em azul está indicado o resíduo de aminoácido catalítico Cys25 . Em vermelho, pode-se observar o inibidor irreversível E64 ligado ao sítio ativo da enzima.

As cisteino proteases que apresentam maior identidade com relação à sua sequência de aminoácidos são as catepsinas L, S e V (em torno de 60%). São também topograficamente similares, sendo muito difícil sua discriminação *in vivo*, devido à sua quase completa sobreposição, como pode ser observado na FIGURA 1.7 (SOMOZA et al., 2000).

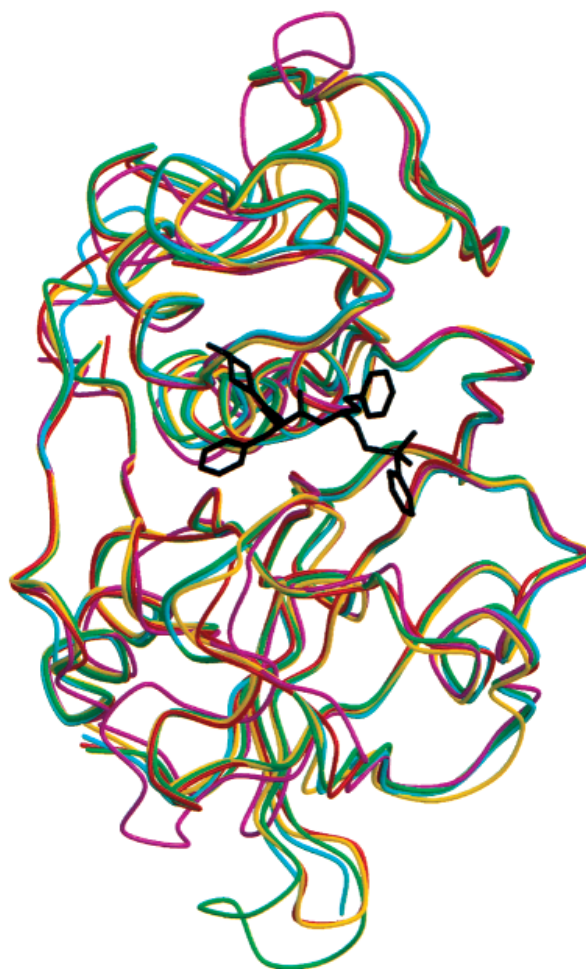


FIGURA 1.7 - Sobreposição estrutural das catepsinas K (amarelo), L (azul), S (vermelho), V (verde) e papaína (magenta). Um inibidor piperazínico ligado ao sítio ativo está representado em preto (SOMOZA et al., 2000).

Algumas dessas enzimas têm uma larga distribuição tecidual (catepsinas L e B) enquanto outras possuem uma distribuição bem mais seletiva (catepsinas K, S e W) (ROBICHAUD et al., 2003).

A catepsina K é encontrada abundantemente em osteoclastos, estando localizada em seus lisossomos e na lacuna reabsortiva da superfície óssea. Encontra-se também em células gigantes multinucleadas, fibroblastos sinoviais, condrocitos e células epiteliais. A grande capacidade da catepsina K em degradar o colágeno tipo I e tipo II, em qualquer região da molécula e sua atuação em pHs ácido e neutro, fazem com que essa enzima tenha um papel importante na degradação de ossos e cartilagem. A alta homologia da catepsina K com várias espécies (camundongo 86%, rato 88%, porco 97% e coelho 96%) permite ensaios

em modelos animais com certo grau de confiança (Biomedica Gruppe; LECAILLE et al., 2002).

Inicialmente, as catepsinas B e L têm sido detectadas em tecido ósseo e relacionadas com a degradação de moléculas de colágeno e gelatina, apresentando por isso atividade pro-colagenolítica. Contudo, a descoberta da catepsina K em osteoclastos e na lacuna de reabsorção, sugere-a como uma enzima-chave na degradação dos componentes orgânicos da matriz óssea. Noventa por cento da matriz óssea é formada por compostos orgânicos, consistindo principalmente de colágeno tipo I, o qual tem uma conformação em sua maior parte em tripla-hélice, com exceção apenas da cadeia final singular, denominada telopeptídeo. Proteases não-específicas como as catepsinas L, B e S clivam as moléculas de colágeno, porém de forma ineficiente, pois clivam apenas a região telopeptídica gerando monômeros de colágeno tipo I. Em contraste, a catepsina K cliva moléculas de colágeno tipo I na região telopeptídica e nos múltiplos sítios da tripla-hélice (VASILJEVA et al., 2007).

Todo o estudo com a catepsina K foi iniciado após a descoberta de que sua forma inativa está associada com uma desordem genética óssea, denominada picnodisostose. Esta evidência validou a catepsina K como um alvo terapêutico em doenças caracterizadas por reabsorção óssea (MCGRATH, 1999).

Portanto, a catepsina K é a protease com maior atividade colagenolítica, pois hidrolisa de forma eficiente o maior componente orgânico da matriz óssea e do tecido cartilaginoso articular, o colágeno tipo I e o colágeno tipo II, respectivamente (ADKISON et al., 2006).

Sua alta atividade colagenolítica *in vivo* é devido à formação de um complexo com o glicosaminoglicano, 4-sulfato de condroitina. Este complexo é formado com a catepsina K por interações eletrostáticas devido à alta densidade de cargas positivas, localizada no lado oposto ao sítio ativo da enzima, com as cargas negativas do 4-sulfato de condroitina (LI et al., 2008).

Além da ação direta dos inibidores da catepsina K sobre a destruição óssea e da cartilagem, eles podem ter efeito também na inflamação, em pacientes com artrite. Um inibidor específico da catepsina K (NC-2300), comprovado em experimentos realizados em artrite experimental, reduziu tanto a erosão óssea quanto a inflamação da articulação, mostrando sua atividade como antirreabsortivo e anti-inflamatório. Embora não esteja suficientemente claro o modo de ação dos

inibidores da catepsina K frente ao processo inflamatório, análises revelaram que a catepsina K está envolvida na resposta imune inata de indivíduos (BEYER et al., 2010).

1.6 - Mecanismo de catálise enzimática

Reações enzimáticas são reações que têm as enzimas como catalisador e, portanto, permitem que uma reação ocorra numa velocidade muito maior quando comparada com a reação na ausência deste catalisador. As enzimas se destacam por sua alta especificidade, além de seu alto poder catalítico (LEHNINGER et al., 2006).

Reações mono-substrato podem ser compreendidas através do modelo de Michaelis-Menten. Nesta reação há a participação de apenas um substrato, podendo ser representada como se observa no ESQUEMA 1.2. Através deste equilíbrio pode-se determinar a velocidade da reação (LEHNINGER et al., 2006).



ESQUEMA 1.2. - Equilíbrio de uma reação enzimática mono-substrato.

Do ESQUEMA 1.2 tem-se que: E representa a enzima, S, o substrato, ES, o complexo enzima-substrato e P o produto da reação. K_M e K_{cat} são constantes de dissociação da primeira e segunda etapa da reação, respectivamente. O K_M define o grau de afinidade da enzima com o substrato.

Quando a enzima encontra-se saturada com o substrato, ou seja, quando toda enzima do meio está na forma complexada (ES), a velocidade da reação pode ser determinada pela Equação 1.1 (LEHNINGER et al., 2006).

$$v = K_{cat} \cdot [ES] \quad \text{Equação 1.1}$$

Após várias transformações matemáticas chega-se à equação de Michaelis-Menten, representada pela Equação 1.2.

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

Equação 1.2

Equação na qual, v é a velocidade da reação enzimática, V_{\max} é a velocidade máxima da reação e $[S]$ é a concentração do substrato.

A concentração em que a reação atinge metade de sua velocidade máxima (V_{\max}) corresponde ao valor de K_M , o que pode ser observado pelo gráfico apresentado na FIGURA 1.8. Visualiza-se neste gráfico que a velocidade da reação aumenta à medida que a concentração de substrato é aumentada. No entanto, há uma concentração máxima de substrato a qual acima desta não há mais variação da velocidade da reação, pois todas as enzimas presentes no meio estão ligadas ao substrato (complexo ES) (LEHNINGER et al., 2006).

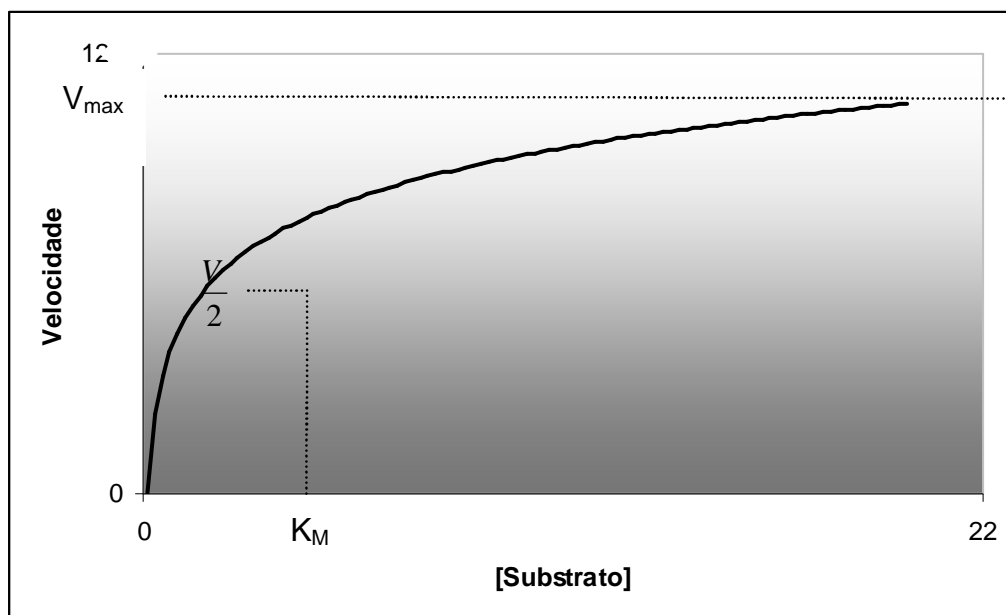


FIGURA 1.8 - Curva de Michaelis-Menten mostrando a velocidade máxima de uma reação enzimática e o K_M .

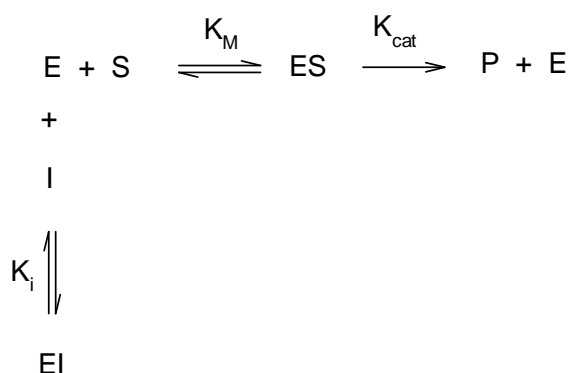
1.6.1 - Inibição enzimática

A inibição enzimática pode ser classificada como reversível (competitiva, incompetitiva, não-competitiva, competitiva parcial, incompetitiva parcial e não-competitiva parcial) e irreversível. No caso da inibição irreversível, como o próprio nome já diz, ocorre quando o inibidor se liga a enzima de forma que a

atividade enzimática é perdida, ou seja, a enzima não volta a ter sua atividade catalítica original (COPELAND et al., 2005).

1.6.1.1 - Competitiva

Na inibição enzimática reversível do tipo competitiva, o inibidor compete com o substrato pelo mesmo sítio de ligação, formando um complexo binário EI, conforme ilustrado no ESQUEMA 1.2 (COPELAND et al., 2005).



ESQUEMA 1.3 - Equilíbrio da reação enzimática para a inibição do tipo competitiva.

Avaliando o ESQUEMA 1.3 tem-se que a velocidade da reação é diminuída na presença deste inibidor, pois haverá a formação do complexo EI, diminuindo a concentração do complexo ES, o que resulta na diminuição da quantidade de produto (P). A equação de dissociação do complexo EI pode ser observada pela Equação 1.3.

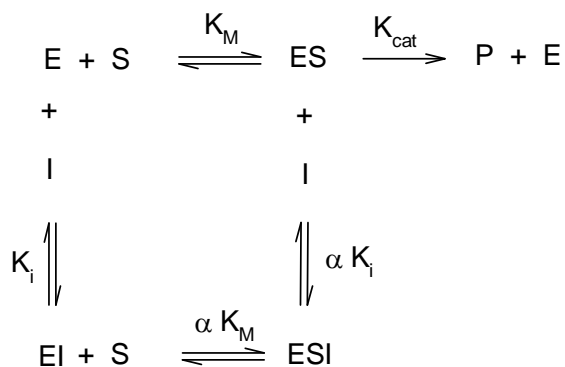
$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]} \quad \text{Equação 1.3}$$

A equação da velocidade enzimática na presença de um inibidor competitivo pode ser dada pela Equação 1.4 (COPELAND et al., 2005).

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{[S] + K_M \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \quad \text{Equação 1.4}$$

1.6.1.3 - Não-competitiva

A inibição enzimática reversível do tipo não-competitiva é um tipo de inibição mista, onde o inibidor poderá se ligar tanto a enzima livre como ao complexo ES, conforme se observa no ESQUEMA 1.5 (COPELAND et al., 2005).



ESQUEMA 1.5.- Equilíbrio da reação enzimática para a inibição do tipo não-competitiva.

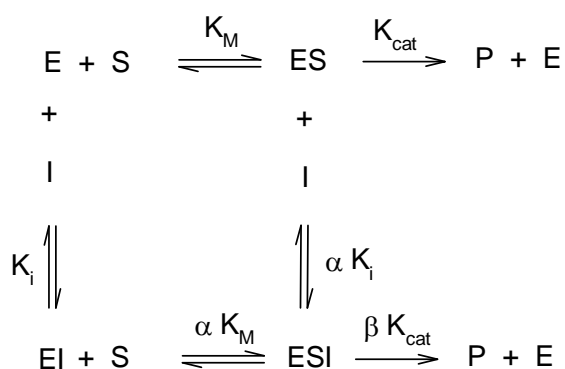
Neste caso, ilustrado no ESQUEMA 1.5, o α define tanto o grau pelo qual o substrato ligado à enzima afeta a afinidade desta pelo inibidor, como o grau pelo qual o inibidor ligado a enzima afeta a afinidade da mesma pelo substrato. A equação da velocidade enzimática na presença de um inibidor não-competitivo é dada pela Equação 1.6 (COPELAND et al., 2005).

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{[S] \cdot \left(1 + \frac{[I]}{\alpha \cdot K_i}\right) + K_M \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \qquad \text{Equação 1.6}$$

Equação na qual, v é a velocidade da reação enzimática, V_{max} é a velocidade máxima da reação, $[S]$ é a concentração do substrato, K_M é a constante de Michaelis-Menten, K_i a constante de dissociação do complexo EI e o produto $\alpha \cdot K_i$ a constante de dissociação do complexo ESI.

1.6.1.4 - Competitiva parcial

A inibição enzimática reversível do tipo competitiva parcial, diferente da inibição do tipo competitiva completa, é caracterizada pela formação do complexo ESI, que ainda se apresenta ativo para a geração do produto, conforme ilustrado no ESQUEMA 1.6. O referido complexo ESI pode ser originado por duas diferentes rotas, a rota competitiva ou a rota incompetitiva parcial, sendo, desta forma, semelhante à inibição do tipo não-competitiva parcial. A diferença para a inibição do tipo não-competitiva parcial é que o termo β , no caso da inibição do tipo competitiva parcial observada no ESQUEMA 1.6, é igual a 1, ou seja, o valor da constante de equilíbrio para a formação do produto tanto passando pelo complexo binário como pelo complexo ternário é tem a mesma magnitude (LESKOVAC, 2004).



ESQUEMA 1.6 - Equilíbrio da reação enzimática para a inibição do tipo competitiva parcial.

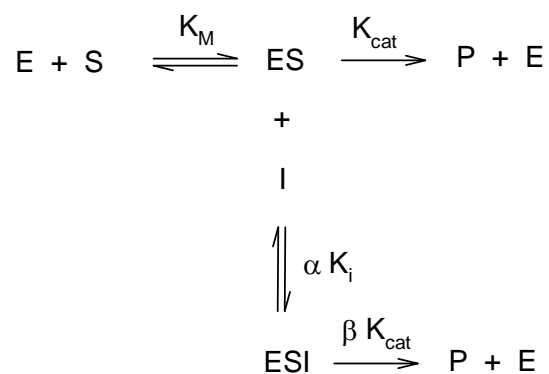
A equação da velocidade enzimática na presença de um inibidor é dada pela Equação 1.7 (LESKOVAC, 2004; BISSWANGER, 2008).

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_M \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]} \qquad \text{Equação 1.7}$$

Equação na qual, v é a velocidade da reação enzimática, V_{\max} é a velocidade máxima da reação, $[S]$ é a concentração do substrato, K_M é a constante de Michaelis-Menten, K_i a constante de dissociação do complexo EI e $\alpha.K_i$ a constante de dissociação do complexo ESI.

1.6.1.5 - Acompetitiva parcial

A inibição enzimática reversível do tipo incompetitiva parcial caracteriza-se pelo fato do complexo ESI também apresentar-se ativo, gerando desta forma o produto da reação, conforme se observa no ESQUEMA 1.7 (LESKOVAC, 2004).



ESQUEMA 1.7 - Equilíbrio da reação enzimática para a inibição incompetitiva parcial.

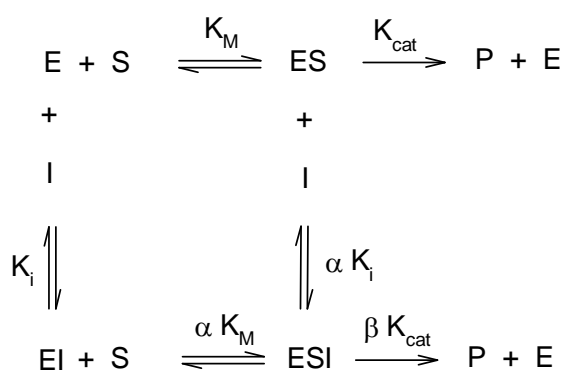
A equação da velocidade enzimática na presença desse tipo inibidor é dada pela Equação 1.8 (LESKOVAC, 2004; BISSWANGER, 2008).

$$v = \frac{\left(V_{\max} + \frac{\beta \cdot V_{\max} \cdot [I]}{\alpha \cdot K_i} \right) \cdot [S]}{K_M + \left(1 + \frac{[I]}{\alpha \cdot K_i} \right) [S]} \quad \text{Equação 1.8}$$

Equação na qual, v é a velocidade da reação enzimática, V_{\max} é a velocidade máxima da reação, $[S]$ é a concentração do substrato, K_M é a constante de Michaelis-Menten, K_i a constante de dissociação do complexo EI, $\alpha.K_i$ a constante de dissociação do complexo ESI e β que define o grau pelo qual o complexo está ativo ESI para a formação do produto.

1.6.1.6 - Não-competitiva parcial

A inibição enzimática reversível do tipo não-competitiva parcial é caracterizada pelo fato do complexo formado também apresentar-se ativo, conforme ilustra o ESQUEMA 1.7. No entanto, este tipo de inibição diferencia-se da inibição do tipo competitiva parcial, pois o termo β , observado no ESQUEMA 1.8, é diferente de 1, ou seja, os valores das constantes de equilíbrio para a formação do produto passando pelos complexos, binário e ternário, apresentam magnitudes diferentes (LESKOVAC, V., 2004).



ESQUEMA 1.8 - Equilíbrio da reação enzimática para a inibição do tipo não-competitiva parcial.

A equação da velocidade enzimática na presença desse tipo inibidor é dada pela Equação 1.9 (LESKOVAC, 2004; BISSWANGER, 2008).

$$v = \frac{\left(V_{max} + \frac{\beta \cdot V_{max} \cdot [I]}{\alpha \cdot K_i} \right) \cdot [A]}{K_M \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) + \left(1 + \frac{[I]}{\alpha \cdot K_i} \right) [S]} \qquad \text{Equação 1.9}$$

Equação na qual, v é a velocidade da reação enzimática, V_{max} é a velocidade máxima da reação, $[S]$ é a concentração do substrato, K_M é a constante de Michaelis-Menten, K_i a constante de dissociação do complexo EI, $\alpha \cdot K_i$ a constante de dissociação do complexo ESI e β que define o grau pelo qual o complexo está ativo ESI para a formação do produto.

1.6.2 - Determinação dos parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos de uma reação enzimática tais como: K_M , V_{max} , K_i podem ser determinados através das linearizações dos dados experimentais com base nas equações de Michaelis-Menten. Existem vários e diferentes modelos que podem ser empregados. O mais utilizado é o modelo de Lineweaver-Burk, em que a relação entre $1/V$ e $1/[S]$ é linear e, desta forma, de posse dos dados de coeficiente angular, da interseção com o eixo $1/V$ e da interseção com o eixo $1/[S]$ torna-se possível a determinação dos parâmetros cinéticos. Apesar de ser o modelo mais utilizado, ele apresenta a desvantagem de ter uma não homogeneidade dos pontos experimentais dispostos no gráfico comparando-se com outros modelos estudados, como o de Hanes-Woolf, gerando incertezas e diminuição da capacidade de detecção dos desvios da linearidade (BRACHT e ISHII-IWAMOTO, 2003; BISSWANGER, 2008).

A maior homogeneidade dos pontos experimentais obtidos quando se utiliza a linearização de Hanes-Woolf, minimiza a incerteza e os possíveis erros que podem existir na linha de tendência gerada após a construção do gráfico. A equação geral linearizada de Hanes-Woolf na presença de um inibidor pode ser vista pela Equação 1.10. Neste caso, a relação $[S]/v$ e $[S]$ é linear, e por meio do coeficiente linear e do coeficiente angular é possível determinar os parâmetros cinéticos da reação de inibição enzimática (LESKOVAC, 2004; BISSWANGER, 2008).

$$\frac{[S]}{v} = \frac{K_m \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}{V_{max} + \frac{\beta \cdot V_{max} [I]}{\alpha \cdot K_i}} + \frac{\left(1 + \frac{[I]}{\alpha \cdot K_i}\right)}{V_{max} + \frac{\beta \cdot V_{max} [I]}{\alpha \cdot K_i}} \cdot [S] \quad \text{Equação 1.10}$$

A Equação 1.10 representa a equação da inibição do tipo não-competitiva parcial. No entanto, em condições específicas de cada tipo de inibição, a mesma pode transformar-se em equações que representarão a inibição do tipo competitiva e incompetitiva parcial. E estas equações representativas das inibições parciais podem transformar-se nas equações dos tipos de inibições completas, se considerarmos que o complexo ESI apresenta-se inativo, ou seja, o termo β é zero.

Com a informação de que o termo β é nulo nas inibições completas, para o tipo de inibição não-competitiva completa, a Equação 1.10 tornar-se-ia como representado pela Equação 1.1.

$$\frac{[S]}{v} = \frac{K_m \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}{V_{\max}} + \frac{\left(1 + \frac{[I]}{\alpha \cdot K_i}\right)}{V_{\max}} \cdot [S] \quad \text{Equação 1.11}$$

Na inibição do tipo incompetitiva parcial, o K_i tende ao infinito e, portanto, $[I]/K_i$ tenderá a zero. Nestas condições, a equação da inibição do tipo incompetitiva parcial tornar-se-á como representada pela Equação 1.12. (LESKOVAC, 2004; BISSWANGER, 2008).

$$\frac{[S]}{v} = \frac{K_m}{V_{\max} + \frac{\beta \cdot V_{\max} \cdot [I]}{\alpha \cdot K_i}} + \frac{\left(1 + \frac{[I]}{\alpha \cdot K_i}\right)}{V_{\max} + \frac{\beta \cdot V_{\max} \cdot [I]}{\alpha \cdot K_i}} \cdot [S] \quad \text{Equação 1.12}$$

Na inibição do tipo incompetitiva completa como o complexo ESI está inativo o termo β é zero e, portanto, a Equação 1.12, tornar-se-á como representada pela Equação 1.13 (LESKOVAC, 2004; BISSWANGER, 2008)

$$\frac{[S]}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} + \frac{\left(1 + \frac{[I]}{\alpha \cdot K_i}\right)}{V_{\max}} \cdot [S] \quad \text{Equação 1.13}$$

Na inibição do tipo competitiva parcial o termo β é igual a 1, ou seja, a velocidade de formação do produto passando pelo complexo binário ES é igual a velocidade obtida ao passar pelo complexo ternário ESI e, portanto, fazendo-se as substituições de β por 1 na Equação 1.10, obtem-se a Equação 1.14 (LESKOVAC, 2004; BISSWANGER, 2008).

$$\frac{[S]}{v} = \frac{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)}{V_{\max} \left(1 + \frac{[I]}{\alpha \cdot K_i} \right)} + \frac{1}{V_{\max}} \cdot [S] \quad \text{Equação 1.14}$$

Na inibição do tipo competitiva completa, o $\alpha \cdot K_i$ tende ao infinito e, portanto, $[I]/\alpha \cdot K_i$ tenderá a zero, logo a Equação 1.14, tornar-se-á como representada pela Equação 1.15 (LESKOVAC, 2004; BISSWANGER, 2008).

$$\frac{[S]}{v} = \frac{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)}{V_{\max}} + \frac{1}{V_{\max}} \cdot [S] \quad \text{Equação 1.15}$$

Dependendo do comportamento assumido pelas retas, interceptando-se ou mostrando-se paralelas, tem-se um tipo de inibição diferente. Para inibições do tipo completa pode-se dizer que: caso as retas apresentem-se paralelas, trata-se de uma inibição do tipo competitiva; caso as retas interceptarem-se no eixo $[S]/V$ (y) com valor positivo, trata-se de uma inibição do tipo incompetitiva; e caso as retas interceptarem-se no eixo $[S]$ (x) com valor negativo, trata-se de uma inibição do tipo não-competitiva, conforme representado pela FIGURA 1.9. O coeficiente angular nestas retas é $1/V_{\max}$, o coeficiente linear K_m/V_{\max} e o ponto que intercepta o eixo x é $-K_m$ (BISSWANGER, 2008).

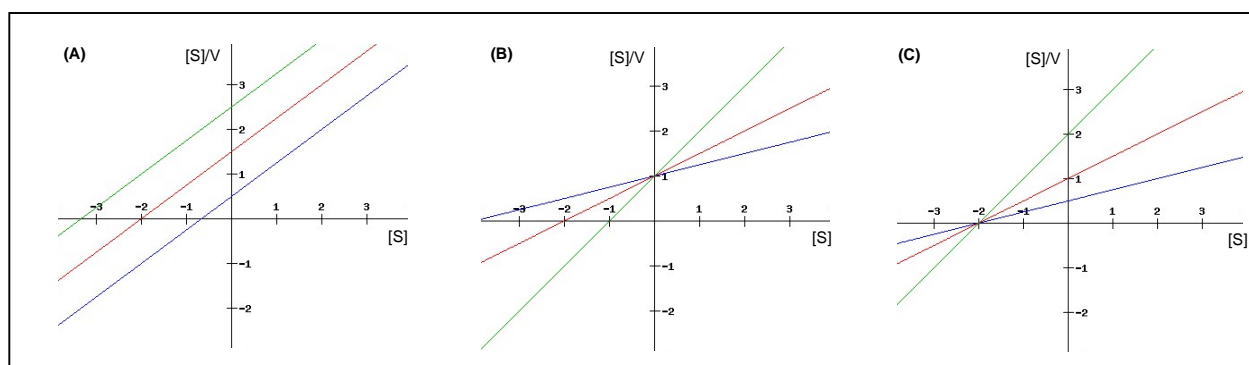


FIGURA 1.9 - Gráficos obtidos com a linearização de Hanes-Woolf. O gráfico (A) representa uma inibição do tipo competitiva, (B) Inibição do tipo incompetitiva e o (C) Inibição do tipo não-competitiva.

Da mesma forma que foi realizada para o modelo de Hanes-Woolf, a análise do gráfico gerado com a linearização de Lineweaver-Burk, pode-se determinar o tipo de inibidor enzimático. No entanto, o gráfico para um inibidor do tipo competitivo, neste caso, apresentará as retas interceptando-se no eixo y com valor positivo, e para um inibidor do tipo acompetitivo as retas apresentar-se-ão paralelas.

O gráfico obtido para o inibidor do tipo não-competitivo com a linearização de Lineweaver-Burk, ilustrado na FIGURA 1.10, será semelhante ao obtido para a linearização de Hanes-Woolf, conforme observado na FIGURA 1.9 (BISSWANGER, 2008).

Observando a FIGURA 1.10 tem-se que o coeficiente angular destas retas é $[S]/V_{max}$, que corresponde a K_m/V_{max} , o coeficiente linear é igual a $1/V_{max}$ e o ponto que intercepta o eixo x é $-1/[S]$, que corresponde a $-1/K_m$. Outra forma de analisar o tipo de inibição é observando os valores do V_{max} , K_m e da razão K_m/V_{max} .

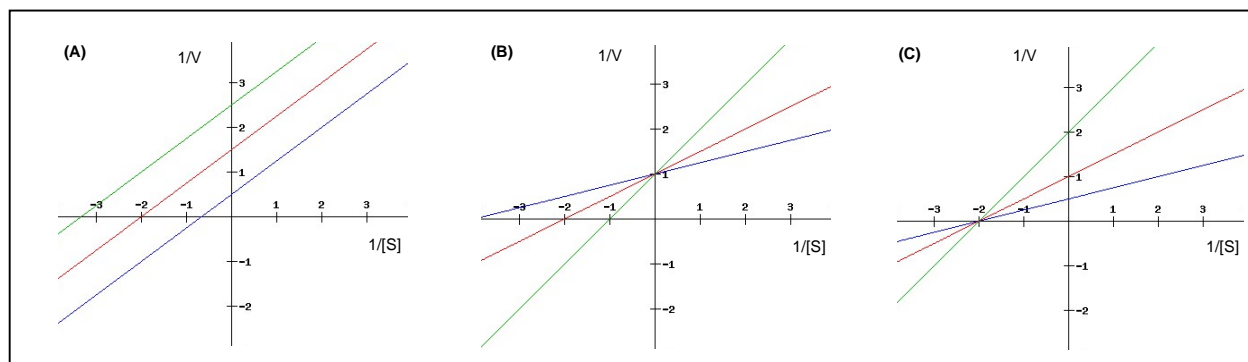


FIGURA 1.10 - Gráficos obtidos com a linearização de Lineweaver-Burk. O gráfico (A) representa uma inibição do tipo acompetitiva, (B) Inibição do tipo competitiva e o (C) Inibição do tipo não-competitiva.

De posse dos gráficos gerados através da linearização desses dois modelos, torna-se mais confiável a determinação do tipo de inibidor enzimático. Como o modelo de Lineweaver-Burk apresenta maiores desvios de linearidade, a análise deste modelo isoladamente poderia nos levar a erros na determinação do tipo de inibição.

Independente do modelo de linearização utilizado, quando se observa que o valor de V_{max} não varia com a concentração do inibidor, conclui-se que o tipo de inibição será competitivo; quando o valor de K_M não variar, a inibição será do tipo

não-competitivo; e quando a razão K_M/V_{max} não variar, tem-se a inibição do tipo incompetitiva (BISSWANGER, 2008).

Um gráfico gerado com os valores dos coeficientes angulares e coeficientes lineares obtidos através dos modelos de Hanes-Woolf ou Lineweaver-Burk *versus* a concentração de inibidor evidenciará o tipo de inibição parcial de que se trata (LESCOVAK, 2004). De posse deste gráfico e das curvas geradas pelo modelo de Dixon, obtém-se o tipo de inibidor envolvido (BISSWANGER, 2008).

O modelo de Dixon é interessante, pois o gráfico gerado com $1/V$ *versus* $[I]$ indicará se a inibição é parcial ou completa, e ainda dará uma idéia do tipo de inibição parcial que se trata. Caso os pontos experimentais em questão ajustarem-se a uma hipérbole, isto indica que se trata de uma inibição do tipo parcial; e caso o ajuste apresente-se linear, trata-se de uma inibição do tipo completa (BISSWANGER, 2008).

1.7 - Inibidores da catepsina K

Em particular, as interações que são importantes para uma inibição potente e seletiva da catepsina K já foram identificadas e constam na literatura. Estas interações podem ser observadas através de diversos complexos catepsina K-ligante, obtidos por cristalografia de raio X, depositados no “Protein Data Bank” (PDB). Estes complexos podem ser localizados no PDB através dos códigos identificadores: 1au0, 1au2, 1au3, 1au4, 1atk, 1mem, 1bgo, 1ayw, 1ayu, 1nl6, 1nlj.

A maquinaria proteolítica está localizada numa fenda de 15 Å com afinidade e especificidade baseada em interações com seis sub-sítios dentro do sítio ativo (FIGURA 1.11) (CAI et al., 2005).

O bolso S3, formado predominantemente por Asp61 e Tyr67, é relativamente superficial e facilmente acessível ao solvente. Um número limitado de inibidores da catepsina K é conhecido por ter nitrogênio básico na região P3, o qual forma uma ponte salina com Asp61. Inibidores com um grupo aromático P3 podem se prender através de uma interação π - π com Tyr67. O sub-sítio S2 é um bolso com maior profundidade e altamente lipofílico compreendido por Met68, Ala133, Leu157, Ala160, Leu205 e Tyr67 (compartilhado com S3). Ele é o único bolso de ligação verdadeiro do sítio ativo da catepsina K. A interação P2/S2 tem uma contribuição

significativa na energia de ligação de moléculas-inibidoras pequenas e pode também conferir seletividade com outras cisteíno proteases (CAI et al., 2005).

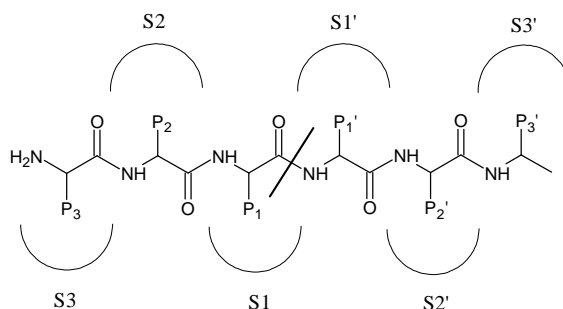


FIGURA 1.11: Representação esquemática de um substrato no sítio ativo da catepsina K com interações-chave.

O sítio de ligação S1 é frequentemente descrito como uma parede mais do que um bolso, e por isso, está mais exposto às moléculas de solvente. É formado por Gly23, Ser24, Gly64 e Gly65, próximos ao resíduo catalítico Cys25, e tem preferência por cadeias laterais lineares hidrofóbicas, como descrito recentemente por cientistas da GlaxoSmithKline (CATALANO et al., 2004). O sítio de ligação S1' compreende um grupo carbonila e uma cadeia lateral de Asn158 de um lado, e Trp177 altamente conservada do outro, próximos aos resíduos Ala136 e His159 catalítico imidazólico, formando a base do sítio. A possibilidade de interações com os sub-sítios S2' e S3', como inibidores seletivos para as cisteíno proteases, ainda não tem sido estudadas tão detalhadamente como as interações com sítios de ligação S3-S1' (CAI et al., 2005).

Diversos tipos de inibidores da catepsina K têm sido desenvolvidos, os quais incluem compostos bis-aril não-peptídicos, aldeídos e seus derivados, cetonas cíclicas e acíclicas, nitrilas não-peptídicas, análogos de epóxi-succinil, β -lactamas, vinil-sulfonas, dentre outros (PAN et al., 2006).

PATIL et al. (2002a, 2002b) em dois trabalhos publicados, observaram a atividade inibitória frente à catepsina K de extratos metanólicos da espécie vegetal *Artocarpus altilis* (Moraceae) e de uma esponja marinha não identificada, porém apresentando mesmas características estruturais dos gêneros *Pellina*, *Biminia* e *Petrosia*, da ordem Haplosclerida. Após observação dos efeitos inibitórios dos extratos, partiu-se para o fracionamento e identificação das substâncias com tais atividades. Para *A. altilis*, três das substâncias isoladas apresentaram uma potente atividade de inibição frente à catepsina K. As substâncias isoladas foram:

cicloaltilisina 6, AC-5-1 e cicloaltilisina 7 (FIGURA 1.12). Já para esponja eles observaram uma atividade moderada de duas substâncias: um alcaloide derivado da triptamina, haploscleridamina, e o aminoácido triptamina (FIGURA 1.13).

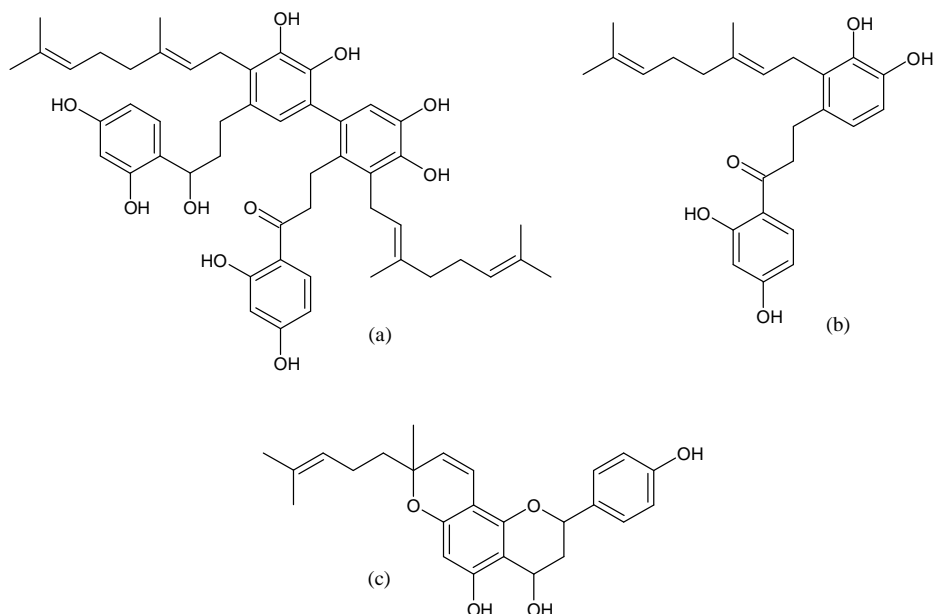


FIGURA 1.12 - Cicloaltilisina 6 (a), AC-5-1 (b) e cicloaltilisina 7 (c) isoladas de *A. atilis* e com alta atividade frente à catepsina K.

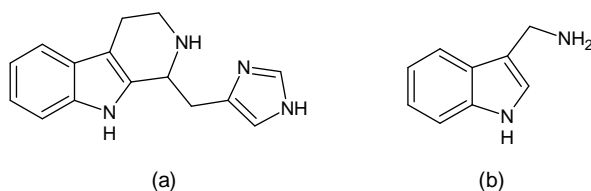


FIGURA 1.13 - Haploscleramina (a) e triptamina (b), isoladas de uma esponja marinha da ordem Haplosclerida, e com moderada atividade frente à catepsina K.

ZENG et al. (2006) isolaram e identificaram seis biflavonas com moderada atividade de inibição frente à catepsina K. Três dessas substâncias foram isoladas e identificadas do extrato acetônico das folhas e ramos de *Taxodium mucronatum* (Taxodiaceae). As outras três substâncias foram isoladas e identificadas do extrato metanólico das folhas de *Cycas guizhouensis* (Cicadaceae).

JEONG et al. (2003) também estudaram um extrato vegetal com o intuito de se obter uma resposta positiva na inibição da catepsina K. Eles estudaram a espécie *Drynaria fortunei* (Polypodiaceae), uma erva medicinal tradicional da Coreia. Os rizomas desta planta são bastante utilizados pela medicina popular

oriental para problemas de saúde relacionados à problemas osteoarticulares e tem sido reafirmado quanto ao uso em terapias para recuperação óssea. O tratamento *in vitro* de células ósseas com o extrato feito com os rizomas dessa espécie preveniu a maturação intracelular da catepsina K, sugerindo que a *Drinaria fortunei* pode interromper o tráfico intracelular dessa cisteína protease.

Existe uma grande quantidade de inibidores da catepsina K obtidos sinteticamente (CRANE et al., 2006; PALMER et al., 2006; ROY et al., 2006; SETTI et al., 2006; YAMASHITA, 2000), no entanto, inibidores oriundos de fontes naturais ainda são bastante escassos. Conforme citado anteriormente, existem na literatura apenas onze inibidores que foram isolados de fontes naturais, os quais apresentaram atividade, cuja intensidade variou de moderada à alta frente à catepsina K (PATIL et al., 2002a; PATIL et al., 2002b).

Dentre os diversos problemas de saúde pública que acometem uma grande parcela da população mundial, estão presentes as doenças osteoarticulares que evoluem muitas vezes para quadros debilitantes. Diante disso e da necessidade de se descobrir novos fármacos eficazes e mais seguros, é interessante o estudo de plantas utilizadas pela medicina popular para este propósito.

2 - OBJETIVOS

O objetivo geral deste projeto foi realizar, após triagem com extratos de plantas conhecidas popularmente por sua atividade em doenças que envolvem os tecidos ósseo, cartilaginoso e sinovial, a busca de inibidores específicos da catepsina K, por biomonitoramento das frações da espécie selecionada.

Os objetivos específicos foram:

- a) Ensaiar os extratos de diferentes espécies frente à catepsina K, e selecionar a espécie mais promissora;
- b) Isolar e identificar os metabólitos responsáveis pela inibição frente a catepsina K;
- c) Modificar estruturalmente o metabólito majoritário da espécie selecionada a fim de aumentar seu poder inibitório;
- d) Determinar o IC_{50} , seletividade, e o tipo de inibição enzimática das substâncias mais ativas/promissoras;
- e) Ensaiar as substâncias mais promissoras em células humanas.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Material

Suportes para cromatografia de adsorção em coluna

- Sílica gel 60 comum (70-230 mesh), Sigma.
- Sílica gel 60 do tipo “flash” (230-400 mesh), Sigma.

Solventes e reagentes

- Foram utilizados solventes (*n*-hexano, *n*-pentano, diclorometano, acetato de etila, acetona e água) comerciais destilados no DQ-UFSCar e solventes deuterados (clorofórmio, metanol, acetona e DMSO), obtidos da Merck e Aldrich, para a obtenção dos espectros de RMN.
- Inibidor irreversível de cisteino peptidases E-64 (*L*-3-carboxi-*trans*-2,3-epoxipropionil-leucilamido(4-guanino)butano, DTE (ditioleritritol) e 5-nitrosalicilaldeido foram obtidos da Sigma.
- Substrato Z-Phe-Arg-MCA (Cbz-Phe-Arg-MCA ou carbobenzoxi-fenilalanina-arginina-7-amino-4-metilcumarina ou benziloxicarbonil- fenilalanina-arginina-4-metil-7-coumarilamida) e Z-Gly-Pro-Arg-4MβNA, da Sigma e Bachem, respectivamente.
- Para o preparo do reagente de Griess utilizou-se: sulfanilamida e *N*-1-naftiletilenodiamina, da Sigma. Para o ensaio de viabilidade celular foi utilizado o sal de tetrazólio MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), da Sigma.
- Meios de cultivo: DMEM (“Dulbeco Modified Eagle’s Medium) e RPMI (Roswell Park Memorial Institute”), da BioWhittaker.

Enzima

- A catepsina K recombinante humana expressa em *Pichia pastoris* foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Dieter Bromme, da University of British Columbia, Vancouver, Canadá. A enzima foi estocada em uma solução contendo 0,01% de tween 20 (v/v).

Células

- Linhagem celular pré-condrocitária de ratos (ATDC5) de RIKEN Cell Bank, Japão.
- Células humanas: condrócitos e sinoviócitos, obtidas de pacientes com artrose através de artroplastia total de joelho.

Cromatografia em camada delgada analítica

- Utilizaram-se folhas de alumínio com sílica 60 F₂₅₄, (φ = 0,2 mm) da Merck.

Cromatografia em camada delgada preparativa

- Foram utilizadas placas preparativas de sílica gel 60 F₂₅₄, (5 x 20 cm) da Merck.

Reveladores

- Câmara de radiação ultravioleta, nos comprimentos de onda 254 nm e 365 nm.
- Solução de vanilina: a vanilina (3,0 g) foi dissolvida em uma solução contendo 135 mL de água destilada, 135 mL de MeOH e 30 mL de H₂SO₄ concentrado.

3.2 - Equipamentos

Evaporadores rotativos

- Büchi, rotaevaporador R-114 equipado com banho Büchi B-480 e recirculador refrigerado NESLAB, modelo CFT-25 mantido a 5°C;
- Büchi, rotavapor R-200 equipado com banho Büchi 490 e recirculador refrigerado NESLAB, modelo CFT-25 mantido a 5°C.

Equipamentos de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

- Shimadzu LC-8 com sistema de reciclo;
- Shimadzu SCL-10AVP com sistema de reciclo, válvula Rheodyne 7725i, bomba Shimadzu LC-6AD.
- Colunas: C18, 10 μ , 25 x 0,46 cm e C18, 10 μ , 30 x 1,0 cm, LUNA. Propildiol 10 μ , 25 x 0,46 cm e Propildiol, 10 μ , 30 x 0,78 cm, Merck.

Balança analítica

- Mettler modelo AE240

Câmara de análise de fluorescência por luz ultravioleta

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

Espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

- Bruker DRX 4,9 T (400 MHz para espectros de RMN ^1H e 100 MHz para espectros de RMN ^{13}C);
- Bruker DRX 9,8 T (200 MHz para espectros de RMN ^1H e 50 MHz para espectros de RMN ^{13}C).

Espectrômetro de Massa (EM)

- CG-EM da Shimadzu modelo QP 5000, ionização por impacto eletrônico
- “ESI-MS-MS” Bruker, modelo ESQUIRE 6000.
- “ESI-MS-MS” Applied Biosystems, modelo API 2000

Analisador elementar

- CHNS-O (Fisons), modelo EA 1108,

Espectrômetro de infravermelho

- Bomem modelo M102 com transformada de Fourier e calibração interna. As amostras foram preparadas sobre pastilhas de KBr.

Polarímetro

- Perkin Elmer modelo 241.

Espectrofluorímetro

- Leitor de placa de ELISA: Molecular Devices Corporation – Spetra MAX GEMINI XS.

Espectrofotômetro

- Leitor de placa de ELISA: Dynex Technologies Opsys MR.

Microscópio de Fluorescência

- Microscópio confocal de Fluorescência Leyca, modelo SP5.

Centrifuga

- Centrifuga Hettich Mikro 22R, com controle de temperatura.

3.3 - Procedimento Experimental

3.3.1 - Triagem das plantas selecionadas e preparação dos extratos vegetais

Gengibre (*Z. officinale*) fresco e cúrcuma (*Curcuma longa*), também chamada de açafrão no Brasil, em pó da marca Okta[®], foram adquiridos em um supermercado da cidade de São Carlos. A garra-do-diabo foi adquirida no mercado municipal de São Carlos. Camélia (*C. sinensis*), planta utilizada no preparo do chá verde e unha-de-gato (*U. tomentosa*) foram adquiridas através do site de vendas de chás e ervas medicinais, www.ervadobem.com, de Belém-PA. O babaçu (*Orbignya phalerata*) (mesocarpo do fruto seco) foi gentilmente doado pela empresa Esmeraldo Produtos Naturais, Fortaleza, Ceará. Mentrasto (*Ageratum conyzoides*), moringa (*Moringa oleifera*) e urtiga (*Laportea aestuans*) foram coletadas na Universidade Federal do Ceará (UFC) em Fortaleza, e identificadas pelo Engenheiro Agrônomo Luiz Wilson Lima-Verde, da Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Biologia. O pequi foi coletado em Anápolis, Goiás.

As diversas espécies foram secas, pulverizadas e extraídas por maceração com álcool etílico 99,5 %. O álcool etílico foi evaporado, obtendo-se, desta forma, um extrato livre de solventes (extrato bruto).

Todos os extratos foram ensaiados frente à catepsina K e o mais ativo foi selecionado para realizar um estudo com maior profundidade, a fim de se isolar os metabólitos responsáveis pela atividade inibitória.

Extração de óleo essencial da espécie selecionada também foi realizada utilizando a técnica por arraste a vapor, que consiste basicamente em arrastar os componentes orgânicos voláteis do material a ser extraído através do vapor de água. O óleo obtido foi separado da fase aquosa utilizando um funil de separação, e imediatamente armazenado à -20°C, até a realização das análises posteriores. Foi utilizado nesta extração 1,0 kg de rizomas frescos de *Z. officinale*

cortado em pequenos pedaços, o qual foi mantido sob aquecimento, a 70°C, no balão de extração com água, por 4 horas.

3.3.2 - Fracionamento do extrato dos rizomas de *Z. officinale*

Partindo-se de 0,8 kg de rizomas secos de *Z. officinale*, após maceração com etanol, obteve-se aproximadamente 34 g (4,2 %) de extrato bruto. Este extrato bruto foi particionado, por partição líquido-líquido, utilizando como solventes, *n*-hexano, diclorometano e acetato de etila, a partir de uma solução etanol/água, 70:30 (v/v), contendo o extrato. Um fluxograma desta partição pode ser observado na FIGURA 3.1, abaixo.

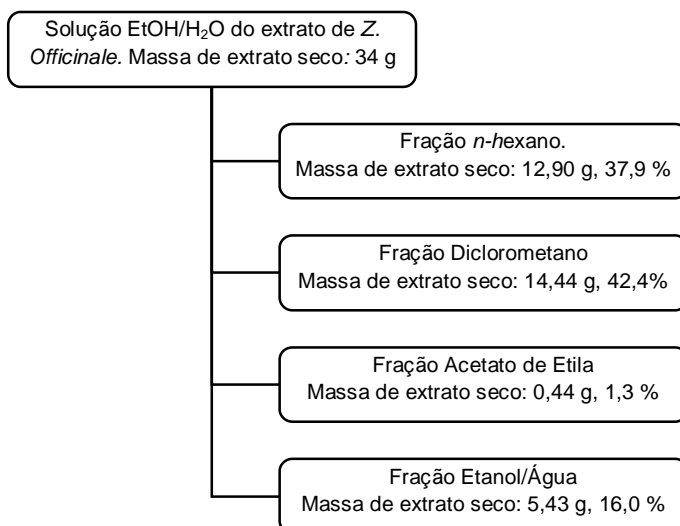


FIGURA 3.1: Fluxograma da partição líquido-líquido do extrato bruto de *Z. officinale*.

A fração de diclorometano foi fracionada como está apresentado na FIGURA 3.2 e dela isolaram-se 18 substâncias. Os sub-fracionamentos da fração de diclorometano posteriores foram realizados utilizando colunas de vidro abertas empacotadas com sílica gel 60 (70-230 mesh) ou sílica do tipo “flash” (230-400 mesh), com monitoramento das frações coletadas por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA).

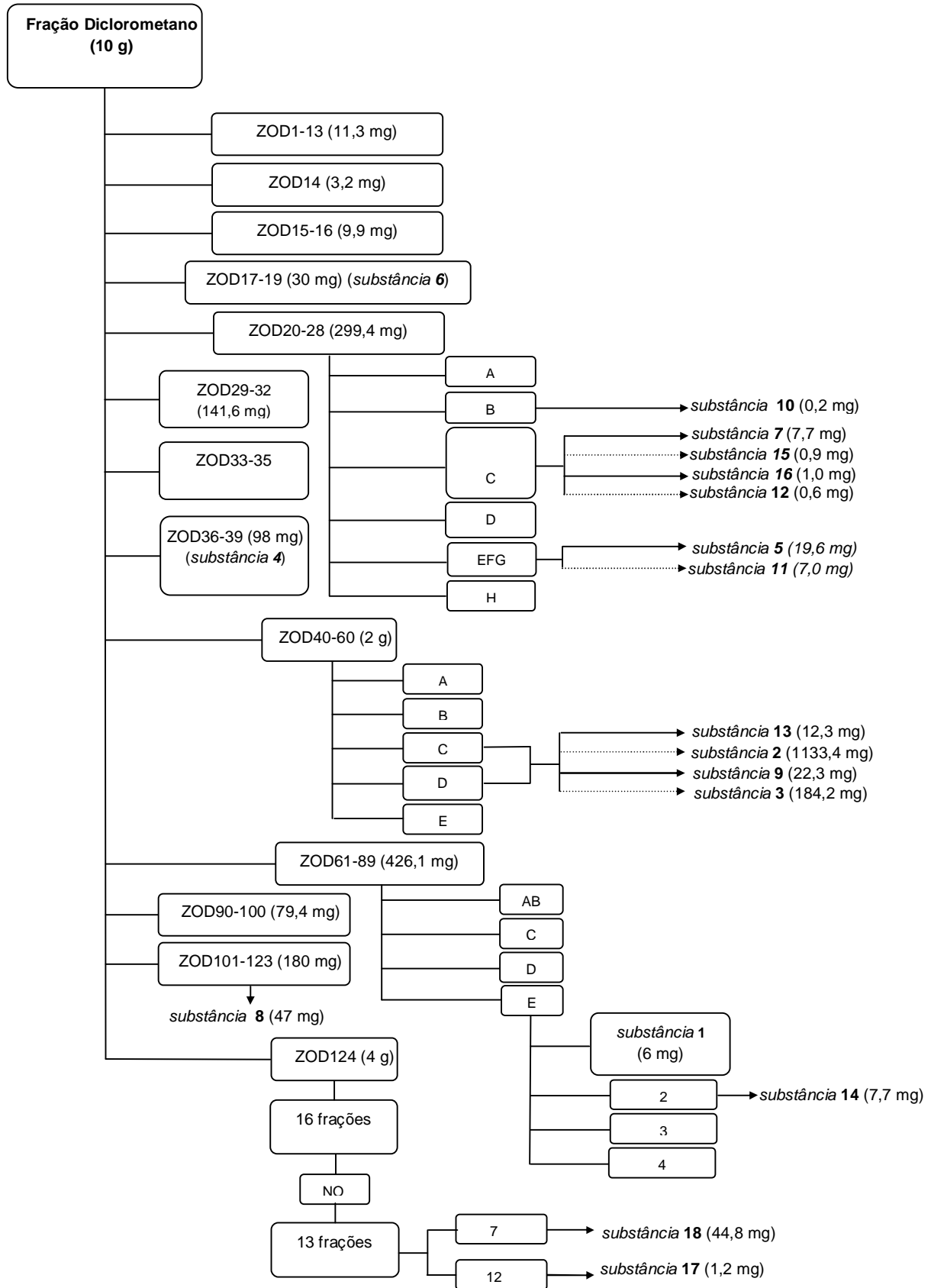


FIGURA 3.2 - Fracionamentos da fração diclorometano da espécie *Z. officinale*.

3.3.2.1 - Isolamento dos metabólitos

Neste e nos próximos itens os quais foram utilizadas misturas de solventes como fase móvel, a proporção das misturas foi dada na forma de razão volumétrica (v/v). A concentração das frações injetadas em escala analítica foi 1,0 mg/mL. A concentração mínima das frações injetadas nas colunas semi-preparativas para todas as separações foi 5 mg/mL, sendo aumentadas gradativamente de acordo com a intensidade, detectada por UV, e separação das bandas cromatográficas.

Uma massa de dez gramas da fração diclorometano foi submetida ao fracionamento via CC com sílica gel 70-230 mesh (coluna ZOD1, 37,0 x 5,0 cm, eluição isocrática com *n*-hexano/acetato de etila, 3:2). Foram coletadas 124 subfrações (20 mL cada) e, após análise por CCDA, algumas foram reunidas, obtendo-se 13 subfrações. A subfração ZOD17-19 (30 mg), foi caracterizada como 10-shogaol (**6**) e a fração ZOD36-39 (98 mg), como 10-gingerol (**4**).

A subfração ZOD20-28 (299,4 mg) foi submetida ao fracionamento por CC com sílica gel 70-230 mesh (coluna 16,0 x 3,0 cm, eluição isocrática com *n*-hexano/acetona, 4:1). Foram coletadas 8 subfrações (ZOD20-28A-ZOD20-28H). As subfrações ZOD20-28B, ZOD20-28C e a reunião das subfrações ZOD20-28E, ZOD20-28F e ZOD20-28G foram submetidas a fracionamento por CLAE, utilizando as seguintes condições:

Escala analítica

Coluna C18, 10 μ , 10 x 0,46 cm
Fase móvel: Metanol/Água (65:35)
Vazão: 0,8 mL/min
 $\lambda = 254, 280$ nm
 $V_{inj} = 10$ μ L

Escala semi-preparativa

Coluna C18, 10 μ , 30 x 1,0 cm
Fase móvel: Metanol/Água (65:35)
Vazão: 10,0 mL/min
 $\lambda = 254, 280$ nm
 $V_{inj} = 150$ μ L

O fator de escalonamento para obtenção da vazão a ser utilizada em escala semi-preparativa foi calculado utilizando a Equação 3.1 (CASS e DEGANI, 2001):

$$S = \frac{R_P^2 \cdot L_P}{R_A^2 \cdot L_A} \quad \text{Equação 3.1}$$

Onde R_P e R_A são os raios da coluna preparativa e analítica, respectivamente, e L_P e L_A , são os comprimentos das colunas preparativa e analítica, respectivamente.

Da subfração ZOD20-28B (1,5 mg), isolou-se 0,2 mg de uma substância que foi caracterizada como metil-6-shogaol (**10**). Da subfração ZOD20-28C (12,7 mg), foram isoladas 4 substâncias, que foram caracterizadas como: 6-paradol (**7**), 7,7 mg; galanolactona (**15**), 0,9 mg; 8-shogaol (**16**), 1,0 mg; diacetato de metil-6-gingerdioila (**12**), 0,6 mg. As substâncias **16** e **12** se apresentavam como uma mistura em uma das frações coletadas, e por isso prosseguiu-se com o isolamento. O isolamento destas duas substâncias foi realizado por CLAE no modo reverso usando reciclo, com as seguintes condições:

Escala analítica

Coluna C18, 10 μ , 25 x 0,46 cm

Fase móvel: Acetonitrila/Metanol/Água (40:40:20)

Números de reciclos: 5

Vazão: 0,8 mL/min

$\lambda = 254, 280$ nm

$V_{inj} = 50$ μ L

Da subfração ZOD20-28EFG (75,2 mg) isolaram-se 2 substâncias, que foram caracterizadas como: 6-shogaol (**5**), 19,6 mg; diacetato de 6-gingerdioila (**11**), 7,0 mg.

A subfração ZOD40-60 (2 g) foi submetida ao fracionamento por CC com sílica gel 70-230 mesh (coluna 14,0 x 5,0 cm, eluição isocrática com diclorometano/acetato de etila, 4,5:0,5). Foram coletadas 5 subfrações (ZOD40-60A à ZOD40-60E). A reunião das subfrações ZOD40-60C e ZOD40-60D, renomeada como ZOD40-60CD (1,6 g), foi submetida ao fracionamento por CLAE, utilizando as condições descritas na página seguinte.

Escala analítica

Coluna C18, 10 μ , 10 x 0,46 cm
Fase móvel: Metanol/Água (60:40)
Vazão: 1,0 mL/min
 λ = 254, 280 nm
 V_{inj} = 10 μ L

Escala semi-preparativa

Coluna C18, 10 μ , 30 x 1,0 cm
Fase móvel: Metanol/Água (65:35)
Vazão: 12,5 mL/min
 λ = 254, 280 nm
 V_{inj} = 150 μ L

Desta subfração (ZOD40-60CD), foram isolados 4 substâncias caracterizadas como: zingerona (**13**), 12,3 mg; 6-gingerol (**2**), 1133,4 mg; metil-6-gingerol (**9**), 22,3 mg; 8-gingerol (**3**), 184,2 mg.

A subfração ZOD61-89 (426,1 mg) foi submetida ao fracionamento por CC com sílica gel 70-230 mesh (coluna 15,0 x 3,0 cm, eluição isocrática com *n*-hexano/acetato de etila, 6:3). Foram coletadas 5 subfrações (ZOD61-89A à ZOD61-89E). A subfração ZOD61-89E (55 mg) foi submetida ao fracionamento via CLAE, utilizando as seguintes condições:

Escala analítica

Coluna C18, 10 μ , 10 x 0,46 cm
Fase móvel: Metanol/Água (65:35)
Vazão: 0,8 mL/min
 λ = 254, 280 nm
 V_{inj} = 10 μ L

Escala semi-preparativa

Coluna C18, 10 μ , 30 x 1,0 cm
Fase móvel: Metanol/Água (65:35)
Vazão: 10,0 mL/min
 λ = 254, 280 nm
 V_{inj} = 150 μ L

Desta subfração (ZOD61-89E), coletaram-se 4 subfrações (ZOD61-89E1- ZOD61-89E4) sendo a subfração ZOD61-89E1 (6 mg) identificada como, 4-gingerol (**1**) e a subfração 61-89E2 (7,7 mg) como gingerenona A (**14**).

A subfração ZOD101-123 (180 mg) foi submetida ao fracionamento por CC com sílica gel 70-230 mesh (coluna 14,5 x 3,0 cm, eluição isocrática com diclorometano/acetato de etila, 3:1). Foram coletadas 4 subfrações (ZOD101-123A- ZOD101-123D). A subfração ZOD101-123C (47,0 mg) foi caracterizada como, 6-gingerdiol (**8**).

A subfração ZOD124 (4 g) foi submetida ao fracionamento por CC com sílica gel 70-230 mesh (coluna, ZOD2, 13,0 x 5,0 cm, eluição isocrática com diclorometano/metanol, 5:0,1). Foram coletadas 16 subfrações (ZOD124A à

ZOD124P). Após análise por CCDA reuniu-se as subfrações ZOD124N e ZOD124O. Esta nova subfração (ZOD124NO, 1,4 g) foi submetida a mais um fracionamento por CC com sílica gel do tipo “flash” (coluna ZOD3, 32,0 x 3,5 cm, eluição isocrática com *n*-hexano/acetato de etila/metanol, 2:2:0,1). Coletaram-se, portanto, 13 subfrações, sendo a subfração ZOD124NO7 (106,1 mg) e a subfração 124NO12 (15 mg) submetidas ao fracionamento por CLAE, utilizando as seguintes condições:

Escala analítica

Coluna C18, 10 μ , 25 x 0,46 cm

Fase móvel: Acetonitrila/Metanol/Água (13,75:48,75:37,5)

Vazão: 0,8 mL/min

λ = 254 nm

V_{inj} = 10 μ L

Escala semi-preparativa

Coluna C18, 10 μ , 30 x 1,0 cm

Fase móvel: Acetonitrila/Metanol/Água (13,75:48,75:37,5)

Vazão: 6,0 mL/min

λ = 254 nm

V_{inj} = 150 μ L

Da subfração ZOD124NO7 (106,1 mg) foi isolado 44,8 mg de um composto que foi caracterizado como, hexaidrocurcumina (**18**), e da subfração ZOD124NO12 (15 mg), 1,2 mg de um composto caracterizado como, 3-acetato de 5-hidroxi-1,7-*bis*(4'-hidroxi-3'-metoxifenil)-heptila (**17**).

Da fração *n*-hexânica obtida do extrato bruto dos rizomas de *Z. officinale*, isolou-se uma mistura de sesquiterpenos, por CC, utilizando como fase estacionária sílica gel 70-230 mesh (coluna 7,0 x 3,0 cm, eluição isocrática: *n*-pentano 100%). Foram coletadas 3 subfrações (20 mL cada), e destas, a mistura de sesquiterpenos foi detectada na fração 2 e na fração 3.

3.3.2.2 - Otimização de separação do 6, 8 e 10-gingerol

Foi realizada uma otimização em CLAE para a separação dos compostos majoritários (6, 8 e 10-gingerol) da oleoresina dos rizomas de *Z. officinale*.

Inicialmente, o extrato bruto dos rizomas de *Z. officinale* passou por um fracionamento utilizando cromatografia a vácuo, onde se utilizou uma coluna de vidro (20 x 8 cm) preenchida com sílica gel 60 (70-230 mesh). Vinte e um gramas de extrato bruto dos rizomas de *Z. officinale* foram aplicados na coluna, sendo em seguida eluída com 1 litro de *n*-hexano. Em seguida, uma mistura de *n*-hexano/acetato de etila (1:1) (2,5 L) foi eluída obtendo-se desta forma uma fração rica em gingeróis e shogaois, que logo foi concentrada em rotaevaporador. Esta fração rica em gingeróis e shogaois foi submetida ao fracionamento por CC com sílica gel do tipo “flash” (coluna 28,0 x 5,0 cm, eluição isocrática com *n*-hexano/acetato de etila, 3:2). Foram obtidas 6 frações. A primeira fração foi coletada desde a aplicação da amostra até o surgimento de uma coloração amarela no frasco coletor. Os volumes das frações seguintes foram 400 mL (fração 2), 150 mL (fração 3), 800 mL (fração 4), 200 mL (fração 5) e 600 mL (fração 6) respectivamente. Os gingeróis estavam concentrados na fração 4. Para a otimização da separação dos gingeróis por CLAE as condições utilizadas foram as descritas na página seguinte.

Condição 1

Coluna C18, 10 μ , 25 x 0,46 cm
Fase móvel: Metanol/Água (70:30)
Vazão: 1,0 mL/min
 λ = 282 nm
 V_{inj} = 25 μ L

Condição 3

Coluna C18, 10 μ , 25 x 0,46 cm
Fase móvel: Metanol/Água (75:25)
Vazão: 1,0 mL/min
 λ = 282 nm
 V_{inj} = 25 μ L

Condição 2

Coluna C18, 10 μ , 25 x 1,0 cm
Fase móvel: Metanol/Água (80:20)
Vazão: 1,0 mL/min
 λ = 282 nm
 V_{inj} = 25 μ L

Condição 4

Coluna C18, 10 μ , 25 x 1,0 cm
Fase móvel: Acetonitrila/Água (77:23)
Vazão: 1,0 mL/min
 λ = 282 nm
 V_{inj} = 25 μ L

A condição selecionada para o escalonamento foi a condição 3. Portanto, após os cálculos de escalonamento, obteve-se para o modo semi-preparativo:

Escala semi-preparativa

Coluna C18, 10 μ , 30 x 1,0 cm
Fase móvel: Metanol/Água (75:25)
Vazão: 6,0 mL/min
 λ = 282 nm
 V_{inj} = 400 μ L

O fator de escalonamento foi calculado com através da Equação 3.2, citada no item 3.3.2.1 (CASS e DEGANI, 2001):

3.3.2.3 - Identificação das substâncias

As substâncias foram identificadas por técnicas espectroscópicas como: ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN 1 H) e de carbono-13 (RMN 13 C), utilizando técnicas bidimensionais quando necessário, ultravioleta (UV) e espectrometria de massas (EM), além de comparação com os dados da literatura.

3.3.2.4 - Determinação do índice de retenção de Kovats para a identificação de constituintes voláteis

Para a determinação do índice de retenção dos constituintes voláteis do extrato *n*-hexânico e do óleo essencial, utilizou-se como padrão uma mistura de hidrocarbonetos (C₁₁-C₁₆) padrão, e a Equação 3.2, recomendada pela IUPAC (“International Union of Pure and Applied Chemistry”).

$$IR = \left(\frac{100 \cdot N \cdot (t_x - t_{n-1})}{(t_n - t_{n-1})} \right) + 100 \cdot C_{n-1} \quad \text{Equação 3.2}$$

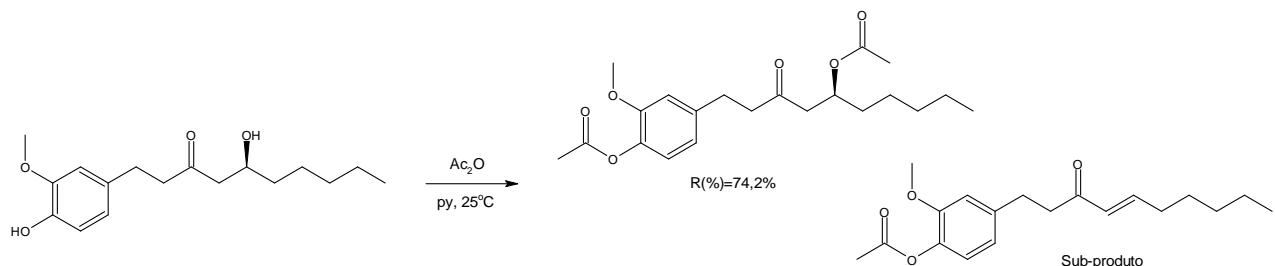
Equação na qual, *IR* é o índice de retenção de Kovats, *N* é (*C_n*-*C_{n-1}*), *C_n* o número de carbonos do *n*-alcano que elui após a substância analisada, *C_{n-1}* o número de carbonos do *n*-alcano que elui antes da substância analisada, *t_x* o tempo de retenção da substância analisada, *t_n* o tempo de retenção do *n*-alcano que elui após a substância analisada e *t_{n-1}* o tempo de retenção do *n*-alcano que elui antes da substância analisada.

3.3.3 - Modificação estrutural do 6-gingerol

3.3.3.1 - Reação de acetilação

A 60 mg (0,204 mmol) de 6-gingerol, foram adicionados 0,3 mL de piridina e 2 mL de anidrido acético. A mistura reacional foi mantida em repouso por 10 horas a temperatura ambiente (ESQUEMA 3.1). A extração dos produtos foi feita com diclorometano, após adição de água gelada (MARCH, 1992).

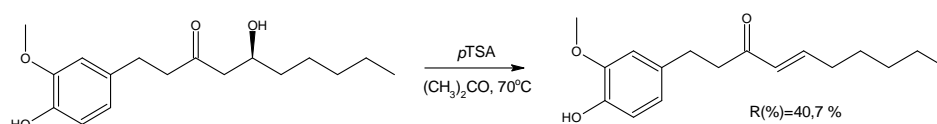
O isolamento dos produtos foi realizado por CCDP (20,0 x 5,0 cm) e usando como eluente a mistura de solventes, *n*-hexano/acetato de etila, 3:1.



ESQUEMA 3.1 - Reação de acetilação do 6-gingerol.

3.3.3.2 - Reação de desidratação

Cem miligramas (0,340 mmol) de 6-gingerol foram solubilizadas em 3 mL de acetona, mantendo-se sob refluxo por 4 horas, a 70°C e peneira molecular 3A. Ácido *para*-toluenosulfônico foi usado como catalisador (ESQUEMA 3.2). A extração do produto foi realizada com diclorometano, após adição de água gelada (MARCH, 1992).



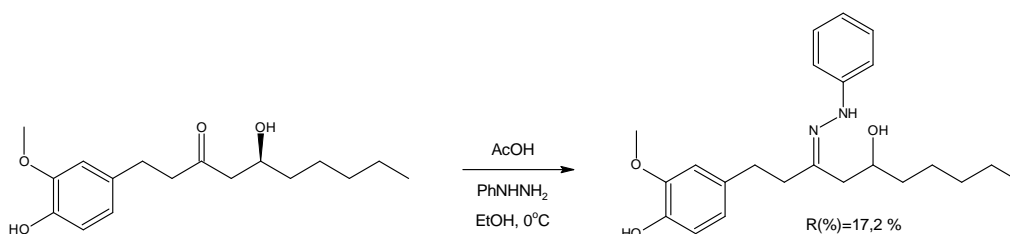
ESQUEMA 3.2 - Reação de desidratação do 6-gingerol.

O isolamento foi realizado utilizando por CC sílica do tipo “flash” (4,0 x 1,6 cm). O eluente utilizado foi *n*-hexano/acetato de etila, 3:1. Três frações de 30 mL foram coletadas, sendo o produto da reação identificado na fração 1.

3.3.3.3 - Reações de formação de hidrazona (MARCH, 1992).

3.3.3.3.1 - Reação de 6-gingerol com fenilhidrazina

A um balão reacional foram adicionados 12 mg (0,042 mmol) de 6-gingerol, 4,19 μL (0,042 mmol) de fenilhidrazina a 0°C, usando etanol anidro (0,1 mL) como solvente, peneira molecular 3A e ácido acético como catalisador. A mistura reacional foi mantida sob agitação por 30 minutos. A extração do produto foi realizada com diclorometano, após adição de água gelada.



ESQUEMA 3.3 - Formação de hidrazona obtida da reação do 6-gingerol com fenilhidrazina.

O isolamento do produto foi realizado por CCDP (20,0 x 5,0 cm) usando como eluente *n*-hexano/acetona, 3:1,5 e posterior purificação por CLAE. As condições foram as seguintes:

Modo analítico

Coluna DIOL, 10 μ , 25 x 0,46 cm

Fase móvel: *n*-hexano/etanol (80:20)

Vazão: 0,8 mL/min

λ = 254 nm

V_{inj} = 5 μ L

Modo semi-preparativo

Coluna DIOL, 10 μ , 30 x 0,78 cm

Fase móvel: *n*-hexano/etanol (80:20)

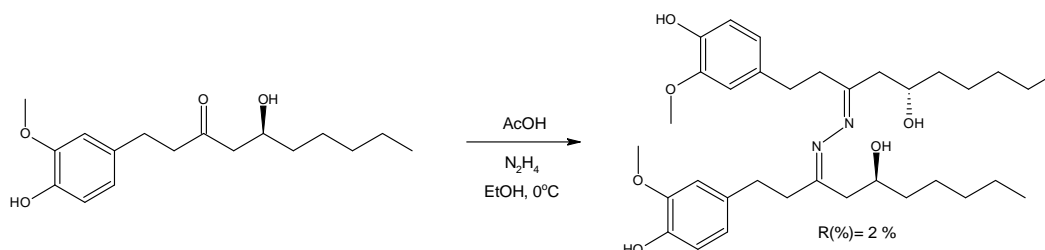
Vazão: 2,8 mL/min

λ = 254 nm

V_{inj} = 150 μ L

3.3.3.3.1 - Reação de 6-gingerol com hidrazina

A um balão reacional foram adicionados 27 mg (0,092 mmol) de 6-gingerol, 59,2 μ L (1,850 mmol) de hidrazina a 0°C, usando etanol anidro (1,0 mL) como solvente, peneira molecular 3A e ácido acético como catalisador (ESQUEMA 3.4). A mistura reacional foi mantida sob agitação por 40 minutos. A extração do produto foi realizada com diclorometano, após adição de água gelada.



ESQUEMA 3.4 - Formação de hidrazona obtida da reação do 6-gingerol com hidrazina.

O isolamento do produto foi realizado utilizando CLAE. As condições foram as seguintes:

Modo analítico

Coluna DIOL, 10 μ , 25 x 0,46 cm

Fase móvel: *n*-hexano/isopropanol (80:20)

Vazão: 1,0 mL/min

λ = 254 nm

V_{inj} = 5 μ L

Modo semi-preparativo

Coluna DIOL, 10 μ , 30 x 0,78 cm

Fase móvel: *n*-hexano/isopropanol (80:20)

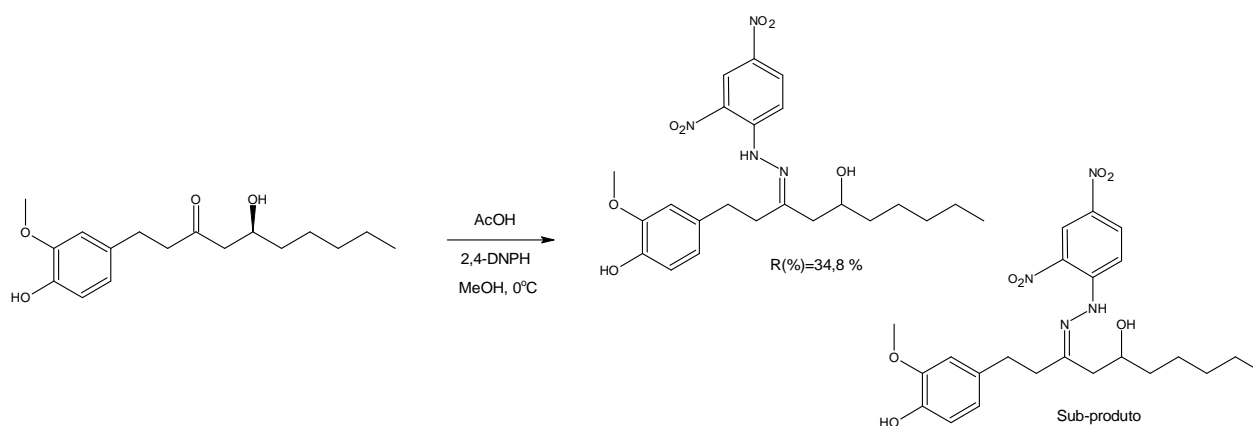
Vazão: 3,0 mL/min

λ = 254 nm

V_{inj} = 150 μ L

3.3.3.3.1 - Reação de 6-gingerol com 2,4-dinitrofenilidrazina

A um balão reacional foram adicionados 200 mg (0,680 mmol) de 6-gingerol, 140 mg (0,295 mmol) de 2,4-dinitrofenilidrazina a 0°C, usando metanol anidro (20 mL) como solvente, peneira molecular 3A e ácido clorídrico como catalisador. A mistura reacional foi mantida sob agitação por 60 minutos. A extração dos produtos foi realizada com diclorometano, após adição de água gelada.

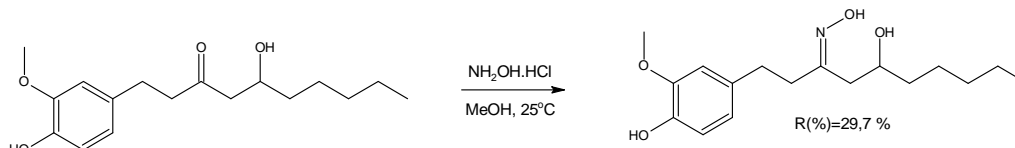


ESQUEMA 3.5 - Formação de hidrazona obtida da reação do 6-gingerol com 2,4-dinitrofenilhidrazina.

O isolamento dos produtos foi realizado utilizando por CC sílica do tipo “flash” (15 x 3,4 cm). O eluente utilizado foi *n*-hexano/acetato de etila, 3:2. Foram coletadas 20 frações de 20 mL cada. Os produtos foram identificados nas frações 10-16 e 19-20.

3.3.3.4 - Reação de formação de oxima (MARCH, 1992).

A um balão reacional foram adicionados 48 mg (0,163 mmol) de 6-gingerol, 108 mg (0,116 mmol) de cloridrato de hidroxilamina a 25°C, usando metanol anidro (3,0 mL) como solvente e peneira molecular 3A. A mistura reacional foi mantida sob agitação por 6 horas (ESQUEMA 3.6). A extração dos produtos foi feita com acetato de etila, após adição de água gelada.



ESQUEMA 3.6 - Formação de oxima obtida da reação do 6-gingerol com cloridrato de hidroxilamina.

O isolamento do produto foi realizado utilizando por CC, sílica do tipo “flash” (5,0 x 1,8 cm) usando como eluente *n*-hexano/acetato de etila, 3:2. Foram coletadas 6 frações de 8 mL cada. O produto da reação foi identificado nas frações 4-6.

3.3.4 - Ensaios de atividade enzimática frente à catepsina K

A atividade enzimática foi determinada através da observação do aumento de fluorescência devido à hidrólise do substrato Z-Phe-Arg-MCA.

A medida de atividade enzimática foi monitorada através de um fluorímetro de placa, com uma fenda de excitação-emissão ajustada para λ_{ex} 380 nm e λ_{em} 460 nm, respectivamente. Nas determinações, as placas são mantidas em compartimento termostatizado a 27 °C com a catepsina K (concentração na ordem de nanomolar), previamente ativada com ditioneitol (DTT) (2,5 mM) por 5 min. Em seguida adicionaram-se 5 μ L da solução a ser testada (extrato, 0,5 mg/mL, ou substância pura, 125 μ M, dissolvida em DMSO), incubando-se por 5 min e em seguida o substrato Z-Phe-Arg-MCA (10 μ M), fazendo-se a leitura em tempo real. DMSO foi utilizado com controle negativo e o inibidor irreversível E64 como controle positivo de inibição enzimática. A concentração final de DMSO nos ensaios foi 2,5 % (SEVERINO, 2008).

Os ensaios bioquímicos com a catepsina K foram realizados em fluorímetro Gemini – XS, com placa de ELISA preta de 96 poços e com volume final de 200 µL. Os parâmetros cinéticos foram calculados usando equações de Hanes-Woolf e o programa para construção de gráficos Microcal Origin 6.0.

Para o cálculo da inibição enzimática a Equação 3.1 foi utilizada.

$$Inibição(\%) = 100 \cdot \left(1 - \frac{V_i}{V_0} \right) \quad \text{Equação 3.3}$$

Equação na qual, V_i e V_0 são as velocidades na presença e ausência de inibidor, respectivamente.

3.3.5 - Ensaios biológicos

Ensaios em células humanas foram realizados no Laboratório de Reumatología y Patología ósea degenerativa da “Fundación Jiménez Díaz”, Madrid, Espanha, sob a orientação do professor Gabriel Herrero-Beaumont Cuenca através de um doutorado sanduíche. As substâncias selecionadas para a realização dos ensaios foram: 6-shogaol, 10-gingerol, e SSi6, um produto natural modificado quimicamente a partir do 6-gingerol.

3.3.5.1 - Cultivo de condrócitos

Os condrócitos foram obtidos de pacientes com artrose através de artroplastia total de joelho por cirurgia convencional. Os condrócitos foram obtidos depois de digestão com pronasa (Roche, 10 g/L) por 30 minutos e colagenase tipo IV (Sigma, 1 g/L) durante 6 horas. A reação foi interrompida adicionando-se meio DMEM (“Dulbecco Modified Eagle’s Medium”, BioWhittaker) suplementado com 10% de FBS (“Fetal serum bovin”, BioWhittaker), 60 U/mL de penicilina, 60 µg/mL de estreptomicina e 2 mmol/L de glutamina (BioWhittaker). O mesmo meio foi utilizado para ressuspender as células e cultivá-las em placas de petri 100 x 20 mm, incubando-as a 37°C em uma estufa umidificada com 5% de CO₂. Os experimentos de determinação de nitritos foram realizados com as células depois de dois passes, em placas com 6 poços, e deplecionadas (DMEM sem FBS) durante 48 horas antes da incubação das substâncias com as células por 24 horas (ROMAN-BLAS et al.,

2009). Esta é uma metodologia padrão usada pelo Laboratório de Reumatologia e Patologia Óssea Degenerativa da Faculdade de Medicina, “Fundación Jimenez Díaz” da “Universidad Autónoma de Madrid”

A linhagem celular de rato ATDC5 foi cultivada utilizando o mesmo meio de cultivo utilizado para os condrócitos humanos (IACONO et al., 2010).

3.3.5.2 - Cultivo de sinoviócitos

As amostras de membranas sinoviais foram obtidas de pacientes com artrose através de artroplastia total de joelho por cirurgia convencional. As membranas foram mantidas por 1 hora em soro salino com gentamicina (0,4 U/mL) em um banho a 37°C. Depois de três digestões seqüenciais de 15 minutos com tripsina (Roche, 1,25 mg/mL, pH 8,0) a 37°C em banho sob agitação, adicionou-se o meio RPMI 1640 (“Roswell Park Memorial Institute”, BioWhittaker) suplementado com 20% de FBS (“Fetal serum bovin”, BioWhittaker), 60 U/mL de penicilina, 60 µg/mL de estreptomicina, 2 mmol/L de glutamina (BioWhittaker) e 1% de ITS (Insulin-Transferin Sodium-selenite, Sigma). A reação com a tripsina foi interrompida, obtendo-se após este procedimento, as células sinoviais. Após centrifugação e ressuspensão das células em meio RPMI a 20% de BSA, os sinoviócitos foram transferidos à placas de petri 100 x 20 mm, incubando-as a 37°C em uma estufa umidificada com 5% de CO₂. Os experimentos de viabilidade celular foram realizados com as células depois de dois passes, em placas com 6 poços, e deplecionadas (RPMI sem FBS) durante 48 horas antes da incubação das substâncias com as células por 24 horas (ROMAN-BLAS et al., 2009). Esta é uma metodologia padrão usada pelo Laboratório de Reumatologia e Patologia Óssea Degenerativa da Faculdade de Medicina, “Fundación Jimenez Díaz” da “Universidad Autónoma de Madrid”.

3.3.5.3 - Ensaios de viabilidade celular com as substâncias teste

Para os ensaios de citotoxicidade, células ATDC5, condrócitos e sinoviócitos humanos foram utilizadas, a fim de se determinar a concentração ideal para os ensaios subseqüentes.

Para o cultivo de condrócitos, semeadas em placas com 6 poços e incubados a 37°C em uma estufa umidificada com 5% de CO₂, o ensaio de

viabilidade celular foi realizado de maneira que a análise da morte celular pode ser observada visualmente, utilizando microscopia óptica. As concentrações testadas das substâncias neste caso foram: 0,5; 5; 50 e 500 μM .

Em placas com 96 poços, os cultivos celulares ATDC5 (4×10^3 células/poço) e de sinoviócitos (6×10^3 células/poço), densidades determinadas em câmara de Neubauer, foram incubados por 20 horas, a 37°C em uma estufa umidificada com 5% de CO_2 , com as substâncias teste em quatro concentrações diferentes (0,5; 1; 2,5 e 5,0 μM). Em seguida o sal de tetrazólio (brometo de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio, MTT) foi adicionado ao cultivo celular, mantendo-o por 4 horas. Este sal de tetrazólio que apresenta coloração amarela, é reduzido pelas desidrogenases celulares, formando um produto de coloração púrpura. Depois do período de 4 horas, um agente solubilizante (dodecilsulfato de sódio, 10% em solução de HCl, 0,01 M), foi adicionado e mantido por aproximadamente 14 horas. Finalmente foi feita a leitura em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 570 nm (IACONO et al., 2010).

3.3.5.4 - Determinação da atividade da catepsina K em cultivo celular

Uma suspensão celular (8×10^4 células/poço) foi adicionada em placas especiais com 8 poços, onde depois de sua adesão ao fundo da placa, incubaram-se as substâncias teste ou E64, a 37°C em uma estufa umidificada com 5% de CO_2 , com meio de cultivo DMEM sem FBS e fenol por 18 horas. Depois desse período de tempo, trocou-se o meio de cultivo por solução tampão acetato pH 5,5, com 5-nitrosalicilaldeído (500 μM), DTT (1 mM), L-cisteína (0,25 mM) e o substrato fluorogênico Z-Gly-Pro-Arg-4M β NA, mantendo-se por 45 minutos. Finalmente, os poços são lavados com tampão fosfato pH 7,0 por 3 vezes, e a placa é preparada com uma solução de glicerol 10 %, sendo o produto fluorescente visualizado utilizando um microscópio de fluorescência, com fenda de excitação ajustada para 488 nm e emissão para 520-530 nm (WANG et al., 2002; RUTTGER et al., 2006, com modificações).

3.3.5.5 - Determinação de nitritos em cultivo celular

Para a determinação dos níveis de nitrito, o sobrenadante (meio de cultivo) das placas de 6 poços com as células que foram incubadas por 24 horas com IL-1 β e as substâncias teste, quando indicado, foram coletados, liofilizados e ressuspensos em água destilada.

A quantificação de nitritos no meio de cultivo foi feita pelo método de Griess. Cinquenta microlitros do sobrenadante ressuspendido foram incubados com 50 μ L de reagente de Griess (sulfanilamida, 1%, e *N*-1-naftiletilenodiamina, 0,1%, em 5% de ácido fosfórico) durante 10 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Decorrido esse tempo, mediu-se a absorbância a um comprimento de onda de 540 nm em espectrofotômetro, calculando em seguida a concentração de nitritos presentes em cada amostra (OTERO et al., 2007).

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Ensaio de inibição frente à catepsina K dos extratos de plantas medicinais usadas no tratamento de doenças osteoarticulares

As plantas que são utilizadas pela medicina tradicional para o tratamento de doenças osteoarticulares e que foram empregadas na triagem através da inibição da catepsina K, está apresentada na TABELA 4.1.

TABELA 4.1 - Nome popular, espécie, família e partes das plantas utilizadas pela medicina tradicional.

Nome popular	Espécie	Família	Parte da planta
Gengibre	<i>Zingiber officinale</i>	Zingiberaceae	Rizomas
Açafrão	<i>Curcuma longa</i>	Zingiberaceae	Rizomas
Chá verde	<i>Camellia sinensis</i>	Theaceae	Folhas
Unha de gato	<i>Uncaria tomentosa</i>	Rubiaceae	Galhos
Mentraso	<i>Ageratum conyzoides</i>	Asteraceae	Parte superior
Moringa	<i>Moringa oleifera</i>	Moringaceae	Folhas
Babaçu	<i>Orbygnia phalerata</i>	Arecaceae	Mesocarpo do fruto
Garra do diabo	<i>Harpagophytum procumbens</i>	Pedaliaceae	Tubérculo
Urtiga	<i>Laportea aestuans</i>	Urticaceae	Folhas
Pequi	<i>Caryocar sp.</i>	Caryocaraceae	Fruto

Fonte: AGRA et al., 2007; AHMED et al., 2005; BRIEN et al., 2006; CHANTRE et al., 2000; CHRUBASIK et al., 2002; KOOPMAN et al., 2004; MATOS et al., 2000.

Para os ensaios preliminares de inibição enzimática dos extratos brutos, utilizaram-se três concentrações (0,125; 0,25 e 0,5 mg/mL) que já vinham sendo utilizadas pelo grupo. As atividades inibitórias aumentaram à medida que a concentração dos extratos/frações foi aumentada, mostrando um efeito dose-dependente. Os melhores resultados de inibição enzimática foram obtidos quando se utilizou a maior concentração e por isso todos os ensaios enzimáticos posteriores com extratos brutos e frações, foram realizados na concentração de 0,5 mg/mL.

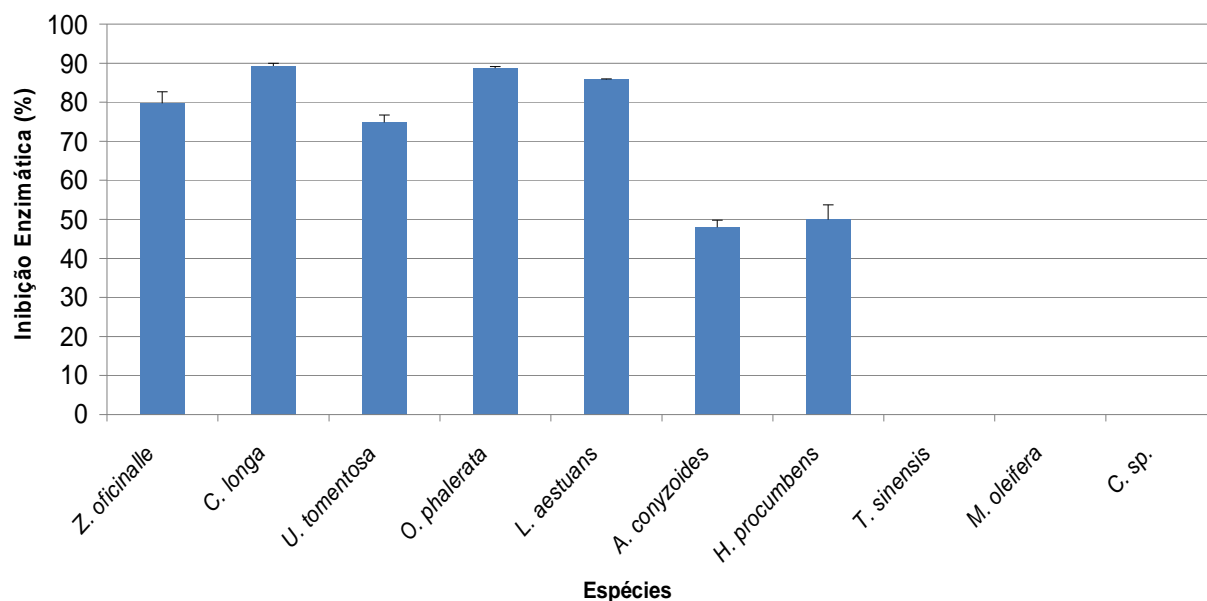


FIGURA 4.1 – Triagem de inibição frente à catepsina K dos extratos brutos das espécies vegetais. Concentração dos extratos: 0,5 mg/mL. Soluções preparada em DMSO.

Pode-se observar através da FIGURA 4.1 que as espécies mais ativas foram: *Z. officinale*, *C. longa*, *O. phalerata*, *L. aestuans* e *U. tomentosa* com inibição da catepsina K acima de 70%. Após a obtenção destes resultados, foi realizada através da literatura a busca de informações sobre a composição química de cada uma destas espécies, e encontrou-se que, a espécie *U. tomentosa* apresenta uma grande quantidade de taninos, e que esta classe de substâncias é responsável por inibir irreversivelmente as enzimas de maneira inespecífica (GONÇALVES et al., 2005; SCHOFIELD et al., 2001). Por esse motivo e pela menor atividade inibitória, das cinco espécies mais ativas, esta não foi selecionada para estudos posteriores. Portanto, as espécies selecionadas para a realização de fracionamentos e biomonitoramento através de ensaios de inibição enzimática foram: *Z. officinale*, *C. longa*, *O. phalerata* e *L. aestuans*, por serem as mais ativas frente a catepsina K.

Na FIGURA 4.2 estão apresentados os resultados de inibição enzimática das frações obtidas por partição líquido-líquido.

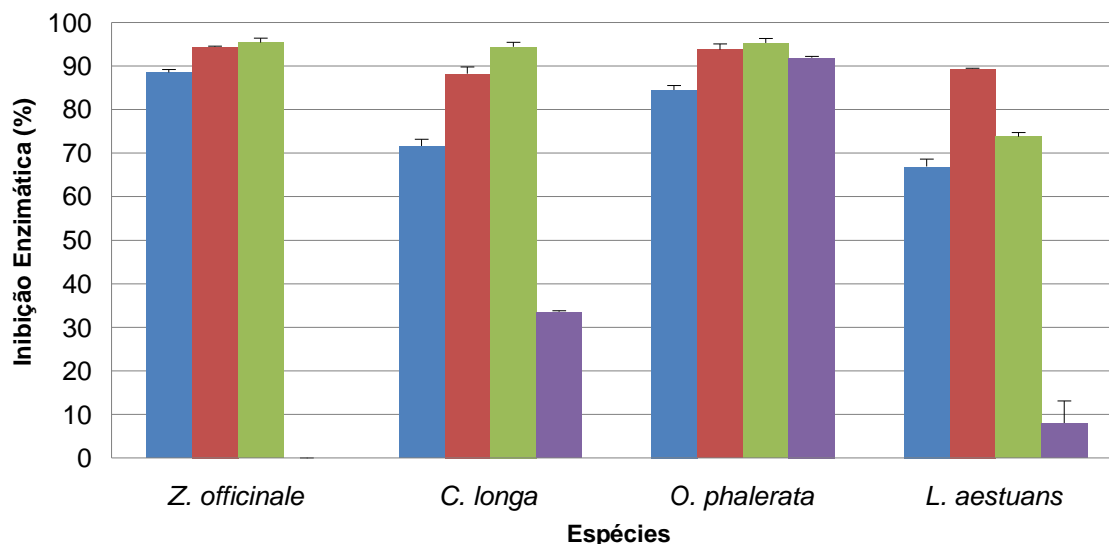


FIGURA 4.2 - Porcentagem de inibição frente à catepsina K das frações obtidas dos extratos brutos das espécies que apresentaram maior atividade de inibição enzimática. As frações *n*-hexano, diclorometano, acetato de etila e hidroalcoólica estão representadas em azul, vermelho, verde e roxo, respectivamente. Concentração das frações: 0,5 mg/mL. Soluções preparada em DMSO.

Para as espécies *Z. officinale*, *C. longa*, e *L. aestuans* a única fração obtida após as partições, que apresentou baixa ou nenhuma atividade de inibição frente à catepsina K foi a hidroalcoólica. De forma geral as espécies mais ativas, com inibição em cerca de 90 %, foram a *Z. officinale* para as frações *n*-hexano, diclorometano e acetato de etila e a *O. phalerata* para as frações diclorometano, acetato de etila e hidroalcoólica. Apesar do uso medicinal do babaçu em diversas enfermidades (SOUSA et al., 2011), pouco se sabe a respeito dos metabólitos secundários presentes nesta espécie. Fato este, suportado pela ausência de trabalhos relevantes na área de fitoquímica. Por outro lado, a espécie *Z. officinale* apresenta numerosos relatos na literatura, enfatizando a relação substâncias majoritárias presentes na planta *versus* atividade biológica (ALI et al., 2008).

Baseado nas informações coletadas na literatura e na análise dos espectros de RMN ¹H destas duas espécies, selecionou-se a *Z. officinale* para os estudos posteriores mais detalhados. Observou-se nos espectros desta espécie a presença de sinais de substâncias funcionalizadas e com cadeia alquílica relativamente longa, característica importante quando se busca bioatividade, por sua maior facilidade em atravessar barreiras biológicas.

Com o intuito de se chegar as substâncias responsáveis por tal inibição, purificação e novos ensaios de inibição enzimática foram realizados.

4.1.1 - *Zingiber officinale*

4.1.1.1 - Estudo biomonitorado da fração diclorometano dos rizomas de *Z. officinale*

Todas as subfrações obtidas a partir da fração diclorometano foram acompanhadas por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), e as que apresentavam características semelhantes foram reunidas, totalizando trinta e oito frações. Todas estas frações foram ensaiadas frente à catepsina K. As concentrações utilizadas nos ensaios de inibição enzimática, das frações obtidas após a cromatografia clássica (CC), foram calculadas proporcionalmente à quantidade em massa obtida de cada subfração, considerando que a concentração utilizada antes do fracionamento foi 0,5 mg/mL.

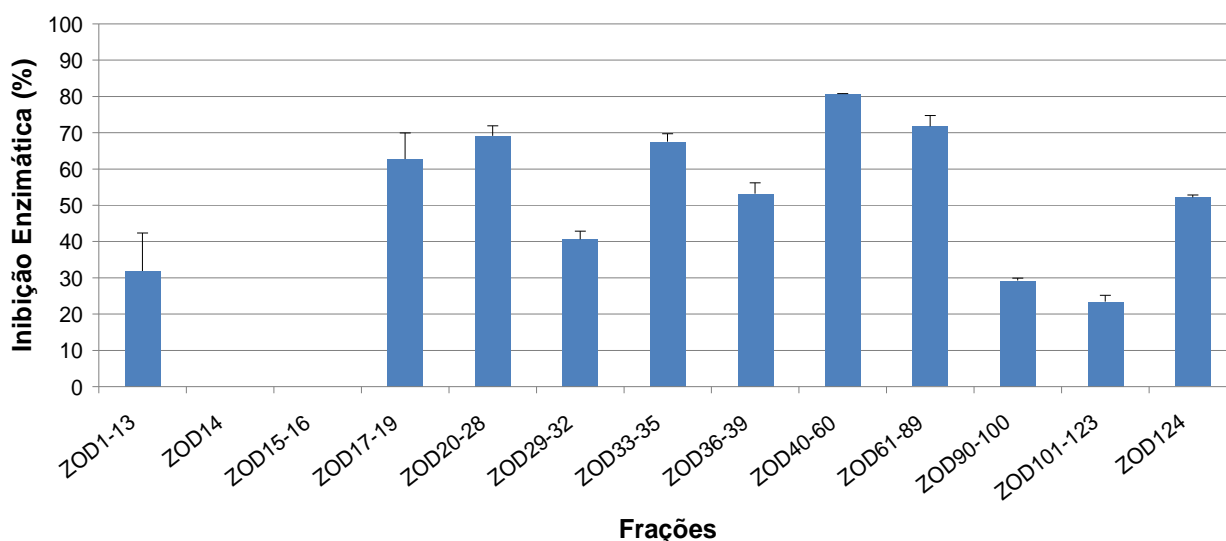


FIGURA 4.3 - Porcentagem de inibição frente à catepsina K com as subfrações obtidas da primeira coluna cromatográfica clássica (ZOD1). As concentrações dos ensaios foram 0,5 µg/mL (ZOD1-13), 0,25 µg/mL (ZOD14), 0,5 µg/mL (ZOD15-16), 2 µg/mL (ZOD17-19), 15 µg/mL (ZOD20-28), 7 µg/mL (ZOD29-32), 5 µg/mL (ZOD33-35), 12,5 µg/mL (ZOD36-39), 100 µg/mL (ZOD40-60), 21 µg/mL (ZOD61-89), 4 µg/mL (ZOD90-100), 9 µg/mL (ZOD101-123), 203 µg/mL (ZOD124).

Após o primeiro fracionamento (coluna ZOD1) foram obtidas 13 subfrações (FIGURA 4.3). Destas, 6 subfrações mais ativas (ZOD17-19, ZOD20-28, ZOD36-39, ZOD40-60, ZOD61-89 e ZOD124) foram selecionadas para a realização de purificações posteriores, no entanto a identificação prévia das substâncias **4** (ZOD17-19) e **6** (ZOD36-39) foram realizadas. Para estes fracionamentos utilizaram-se como técnicas cromatográficas: cromatografia clássica, cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) e ou CLAE, como está descrito em Material e Métodos no Item 3.3.2.1, e que será discutido no proximo item (Item 4.1.1.1.1).

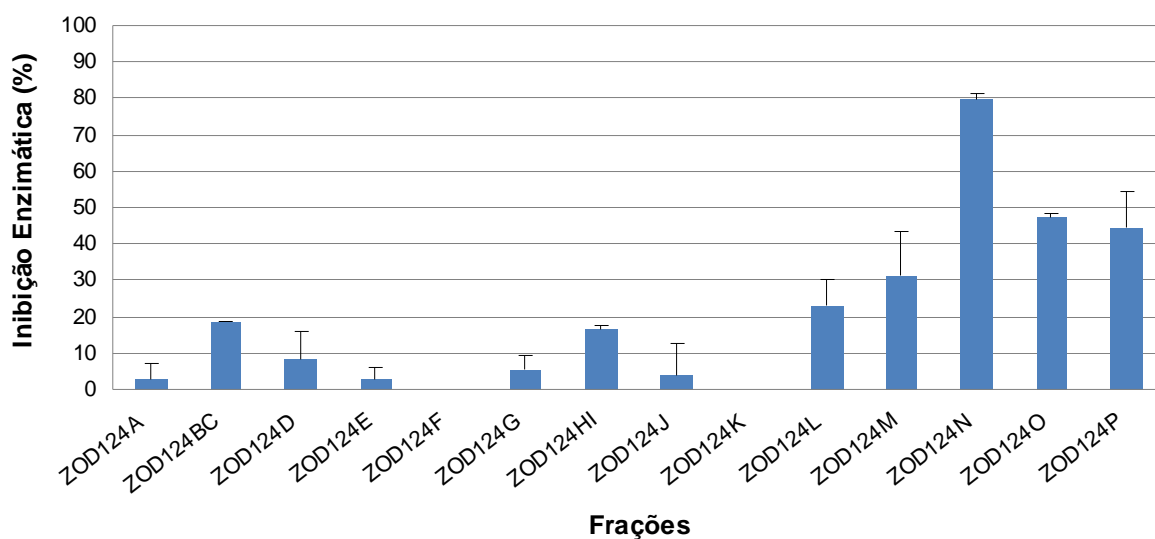


FIGURA 4.4 - Porcentagem de inibição frente à catepsina K com as subfrações obtidas da segunda coluna cromatográfica clássica (ZOD2). As concentrações dos ensaios foram 0,05 µg/mL (ZOD124A), 0,20 µg/mL (ZOD124BC), 0,15 µg/mL (ZOD124D), 0,15 µg/mL (ZOD124E), 0,10 µg/mL (ZOD124F), 0,10 µg/mL (ZOD124G), 0,15 µg/mL (ZOD124HI), 0,10 µg/mL (ZOD124J), 0,05 µg/mL (ZOD124K), 0,25 µg/mL (ZOD124L), 0,50 µg/mL (ZOD124M), 85 µg/mL (ZOD124N), 17,5 µg/mL (ZOD124O), 0,75 µg/mL (ZOD124P).

A subfração ZOD124 (4 g) obtida da coluna ZOD1, foi re-fracionada, sendo suas frações ensaiadas frente à catepsina K, como pode ser observado na FIGURA 4.4. Após análise por CCDA, reuniu-se a subfração 124N e 124O (mais ativas). A subfração, denominada agora ZOD124NO (1,4 g), foi re-fracionada e suas subfrações também ensaiadas frente à catepsina K como estão representadas na FIGURA 4.5.

Da subfração ZOD124NO7 (106,1 mg) e subfração ZOD124NO12 (15 mg) obtidas da coluna ZOD3, identificou-se as substâncias **18** e **17**, respectivamente.

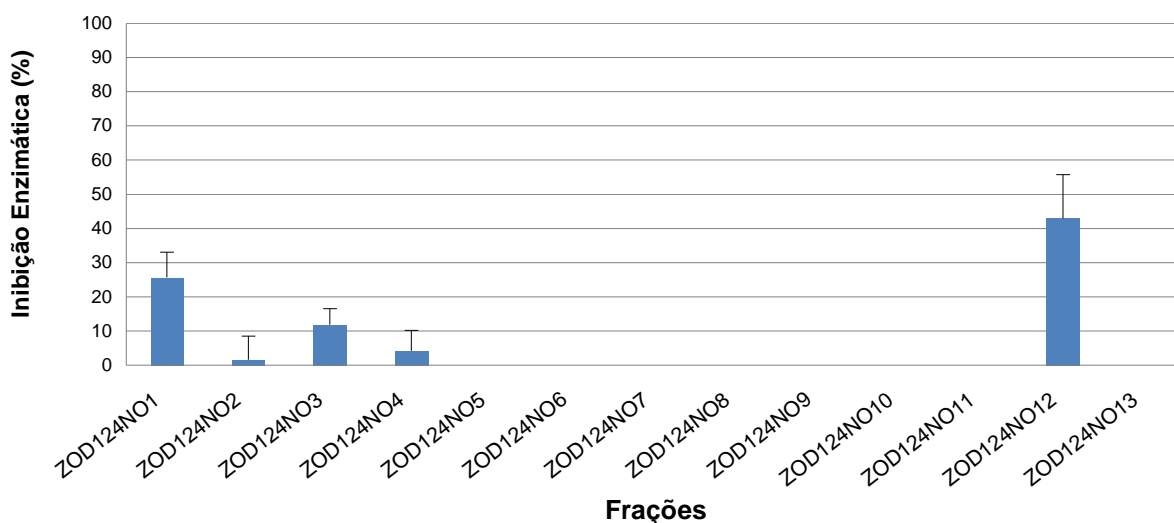


FIGURA 4.5 - Porcentagem de inibição frente à catepsina K com as subfrações obtidas da terceira coluna cromatográfica clássica (ZOD3). As concentrações dos ensaios foram 0,02 µg/mL (ZOD124NO1), 0,03 µg/mL (ZODNO2), 0,03 µg/mL (ZOD124NO3), 0,03 µg/mL (ZOD124NO4), 0,20 µg/mL (ZOD124NO5), 0,20 µg/mL (ZOD124NO6), 0,67 µg/mL (ZOD124NO7), 0,06 µg/mL (ZOD124NO8), 0,18 µg/mL (ZOD124NO9), 0,10 µg/mL (ZOD124NO10), 0,10 µg/mL (ZOD124NO11), 0,10 µg/mL (ZOD124NO12), 0,80 µg/mL (ZOD124NO13).

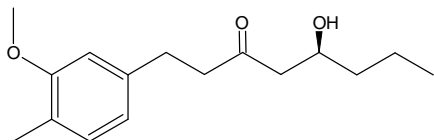
No final de todos os fracionamentos foram isoladas 18 substâncias, sendo 4 isoladas e identificadas previamente (substâncias **4**, **6**, **17** e **18**). Os isolamentos das 14 substâncias remanecentes estão discutidos no Item 4.1.1.1.1. A purificação das substâncias **17** e **18** se fez necessária, e portanto também estão discutidas no Item 4.1.1.1.1.

Posteriormente, as 18 substâncias isoladas foram ensaiadas frente à catepsina K, na concentração de 125 µM, e as que apresentaram uma inibição enzimática apreciável (acima de 60%) foram selecionadas para a determinação do IC₅₀ (concentração inibitória onde há 50% de inibição enzimática).

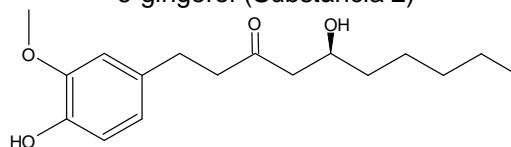
4.1.1.1.1 - Isolamento das substâncias da fração diclorometano

Substâncias Isoladas dos rizomas da espécie *Z officinale*

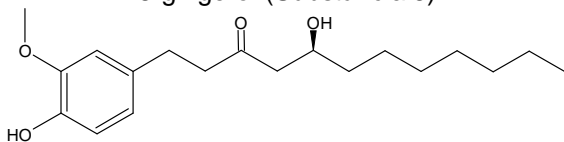
4-gingerol (Substância 1)



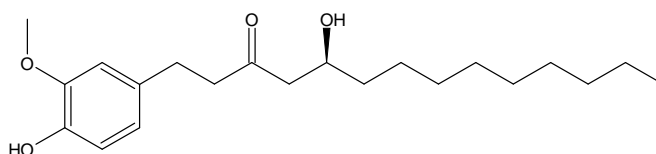
6-gingerol (Substância 2)



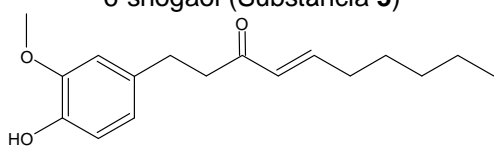
8-gingerol (Substância 3)



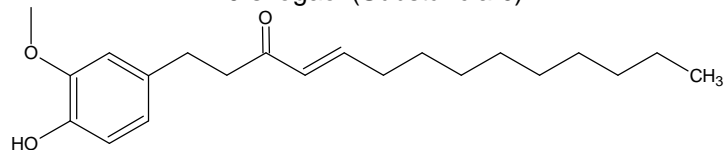
10-gingerol (Substância 4)



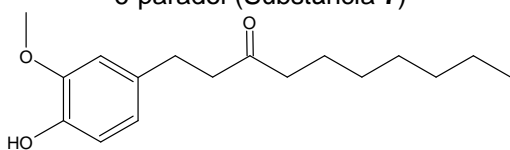
6-shogaol (Substância 5)



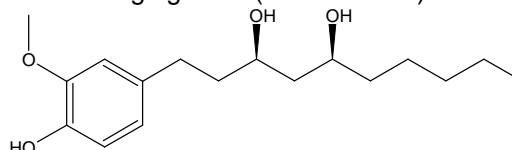
10-shogaol (Substância 6)



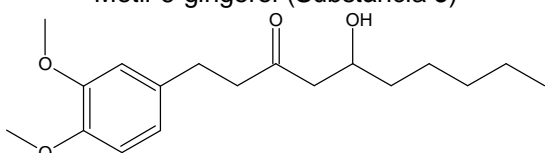
6-paradol (Substância 7)



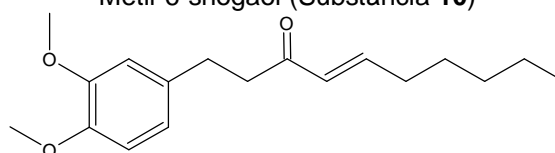
6-gingerdiol (Substância 8)



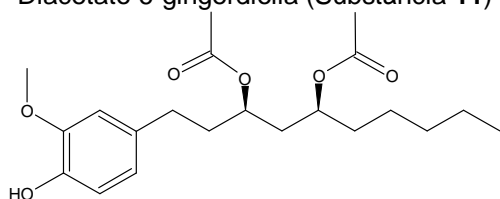
Metil-6-gingerol (Substância 9)



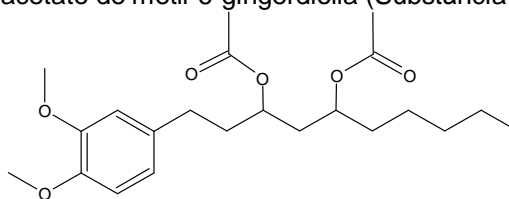
Metil-6-shogaol (Substância 10)



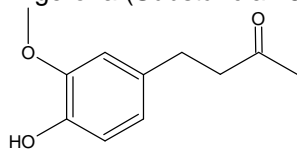
Diacetato 6-gingerdioila (Substância 11)



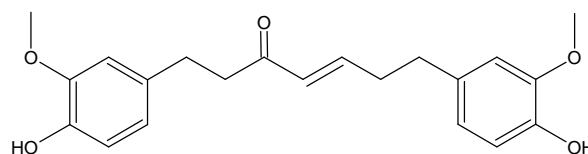
Diacetato de metil-6-gingerdioila (Substância 12)



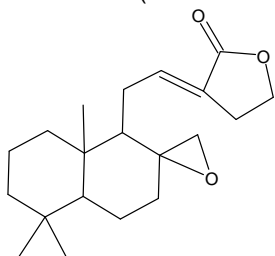
Zingerona (Substância 13)



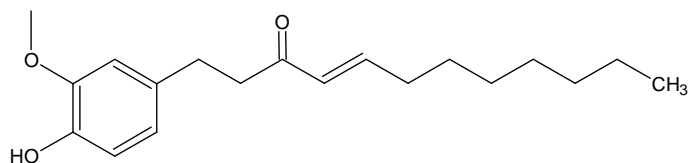
Gingerenona A (Substância 14)



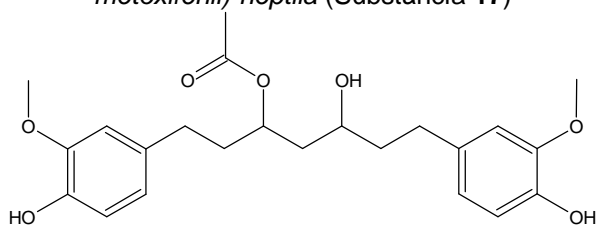
Galanolactona (Substância 15)



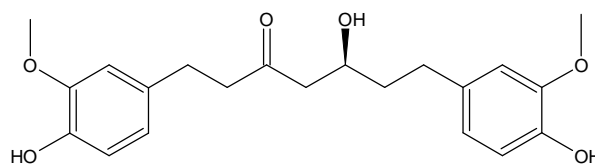
8-shogaol (Substância 16)



3-acetato de 5-hidroxi-1,7-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-heptila (Substância 17)



Hexaidrocurcumina (Substância 18)



Subfração ZOD121-123 (180 mg)

Submeteu-se a subfração ZOD121-123 ao fracionamento por CC, como descrito em Material e Métodos no Item 3.3.2.1, obtendo-se 4 subfrações (ZOD121-123A, ZOD121-123B, ZOD121-123C, ZOD121-123D). A subfração ZOD121-123C (47 mg) foi identificada como, 6-gingerdiol (**8**).

SubFração ZOD61-89E (55 mg)

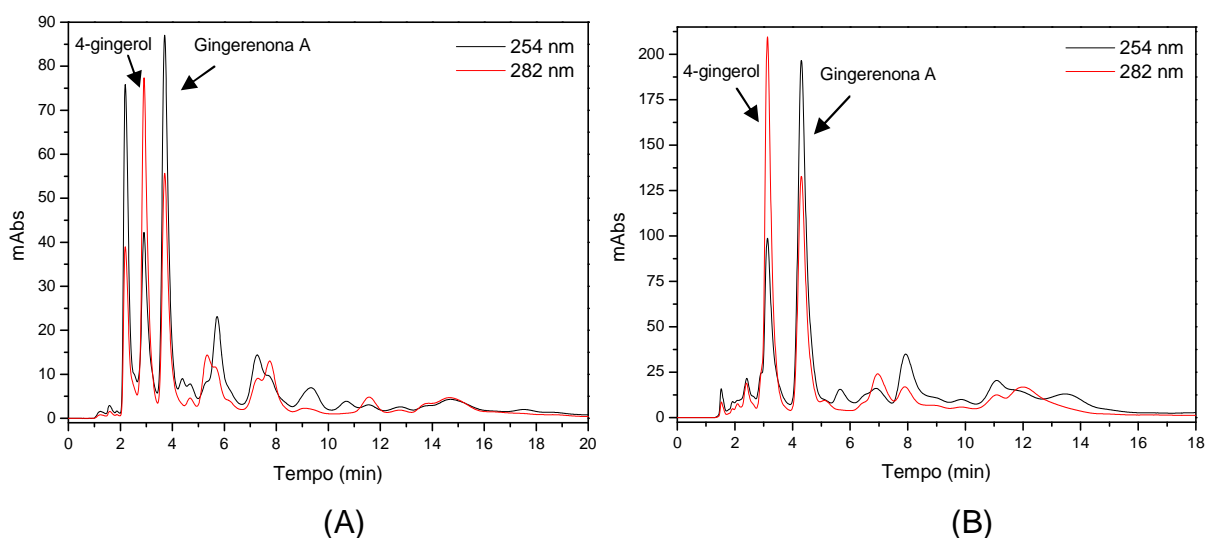


FIGURA 4.6 - Cromatogramas de separação do 4-gingerol (**1**) e da zingerenona A (**14**) obtido por CLAE com as seguintes condições: escala analítica, coluna C18, 10 µ, 10 x 0,46 cm e vazão de 0,8 mL/min (A); escala preparativa, coluna C18, 10 µ, 30 x 1 cm e vazão de 10 mL/min (B). A detecção foi realizada por UV a 254 e 282 nm e a fase móvel MeOH/H₂O (65/35).

Com o cromatograma (FIGURA 4.6A) da subfração ZOD61-89E, observa-se 3 bandas bem definidas, sendo a primeira referente, provavelmente a deflexão do solvente, pois não se observa a mesma no cromatograma em escala semi-preparativa (FIGURA 4.6B), e as duas consecutivas referentes a substância **1** (6 mg) e substância **14** (2,8 mg), respectivamente. Com essas condições cromatográficas conseguiu-se uma razoável resolução, o que permitiu o isolamento das substâncias satisfatoriamente após o escalonamento à cromatografia semi-preparativa.

Subfração ZOD40-60 (2 g)

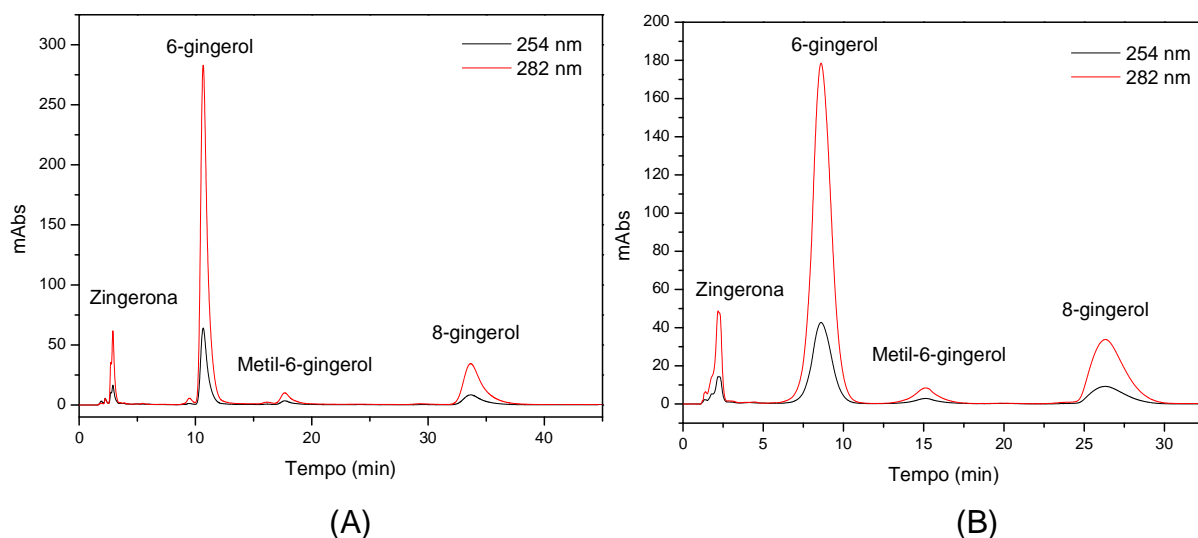


FIGURA 4.7 - Cromatogramas de separação da zingerona (**13**), 6-gingerol (**2**), metil-6-gingerol (**9**) e 8-gingerol (**3**) obtido por CLAE com as seguintes condições: escala analítica, coluna C18, 10 μ , 10 x 0,46 cm e vazão de 1 mL/min (A); escala preparativa, coluna C18, 10 μ , 30 x 1 cm e vazão de 12,5 mL/min (B). A detecção foi realizada por UV a 254 e 282 nm e a fase móvel MeOH/H₂O (60/40).

Nos cromatogramas da FIGURA 4.7 observa-se 4 bandas em ordem de eluição, referentes as substâncias **13** (12,3 mg), **2** (1133,4 mg), **9** (22,3 mg) e **3** (184,2 mg), respectivamente. Também se manteve a resolução após o escalonamento à cromatografia semi-preparativa, com uma excelente separação dessas substâncias.

Subfração ZOD20-28C (12,7 mg)

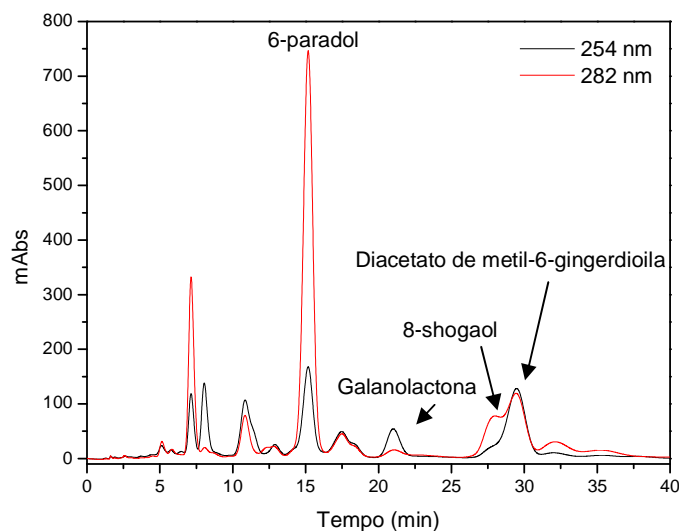


FIGURA 4.8 - Cromatograma de separação do 6-paradol (**7**), galanolactona (**15**), 8-shogaol (**16**) e diacetato de metil-6-gingerdioila (**12**), obtido por CLAE com as seguintes condições em escala analítica: coluna C18, 10 μ , 10 x 0,46 cm, vazão de 1 mL/min, detector UV a 254 e 282 nm e fase móvel MeOH/H₂O (65/35).

Neste cromatograma (FIGURA 4.8) pode-se observar pelo menos 10 bandas, no entanto foi possível o isolamento e identificação prévia de apenas das substâncias **7** (7,7 mg) e **15** (0,9 mg). Estas substâncias estão indicadas no cromatograma da FIGURA 4.8, acima.

O isolamento foi realizado utilizando uma coluna C18, 10 μ , 10 x 0,46 cm, devido a baixíssima quantidade de amostra disponível. Colunas com essas dimensões, ditas analíticas, não são usadas comumente no isolamento de compostos, no entanto aqui se fez necessário o uso da mesma, devido a baixa quantidade de amostra disponível. A injeção de uma pequena quantidade de amostra em uma coluna semi-preparativa está sujeita a uma baixa detecção dos compostos devido ao maior volume da cela semi-preparativa/preparativa do detector.

As bandas que se encontravam coeluídas referentes as substâncias 8-shogaol e diacetato de metil-6-gingerdioila foram coletadas juntas e recromatografadas, utilizando o sistema de reciclo, para a obtenção das substâncias puras, como pode ser observado na FIGURA 4.9. Uma excelente separação foi obtida após 5 reciclos.

Subfração ZOD20-28C6 (2,7 mg)

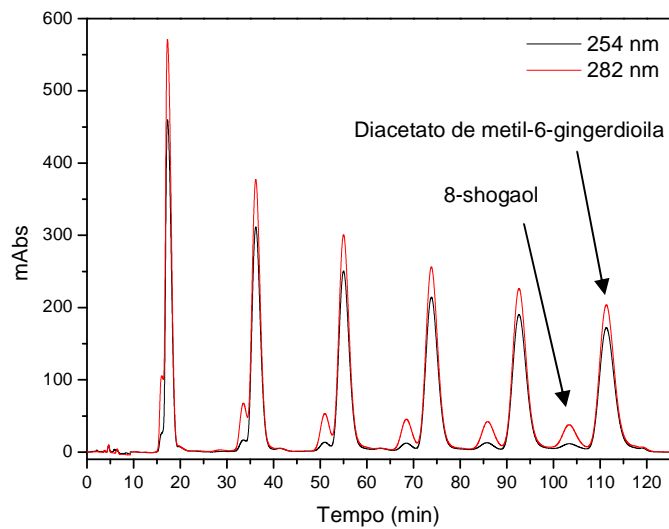


FIGURA 4.9 - Cromatograma de separação da diacetato de metil-6-gingerdioila (**12**) e do 8-shogaol (**16**) obtido por CLAE (reciclo) em escala analítica com as seguintes condições: coluna C18, 10 μ , 10 x 0,46 cm, vazão de 1 mL/min, detector UV a 254 e 282 nm e fase móvel MeOH/H₂O (65/35).

Conseqüentemente, o isolamento das substâncias **12** e **16** também foi realizado utilizando uma coluna C18, 10 μ , 10 x 0,46 cm, devido a baixíssima quantidade de amostra disponível.

Subfração ZOD20-28B (1,5 mg)

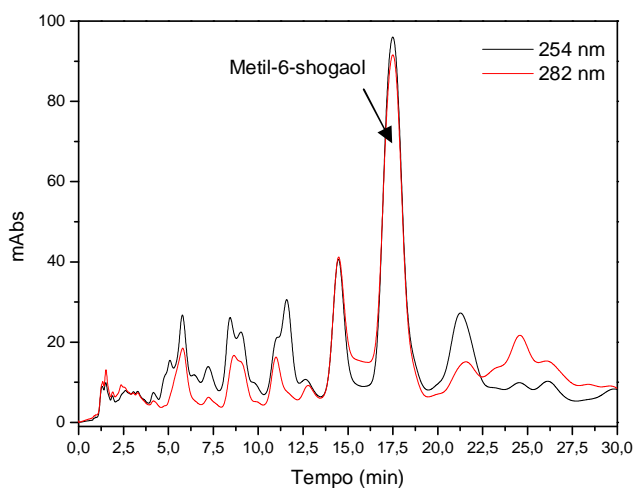


FIGURA 4.10 - Cromatograma de separação do metil-6-shogaol (**10**) obtido por CLAE com as seguintes condições em escala analítica: coluna C18, 10 μ , 10 x 0,46 cm e vazão de 0,8 mL/min, detector UV a 254 e 282 nm e fase móvel MeOH/H₂O (65/35).

Observa-se na FIGURA 4.10 um número razoável de bandas cromatográficas, no entanto foi possível a identificação de apenas uma substância (**10**) desta subfração, com uma massa de 0,2 mg. Também se manteve a resolução após o escalonamento à cromatografia semi-preparativa, com uma boa separação cromatográfica.

Da mesma forma que para a subfração 20-28C, o isolamento foi realizado utilizando uma coluna C18, 10 μ , 10 x 0,46 cm, devido a baixíssima quantidade de amostra disponível.

Subfração ZOD20-28EFG (75,2 mg)

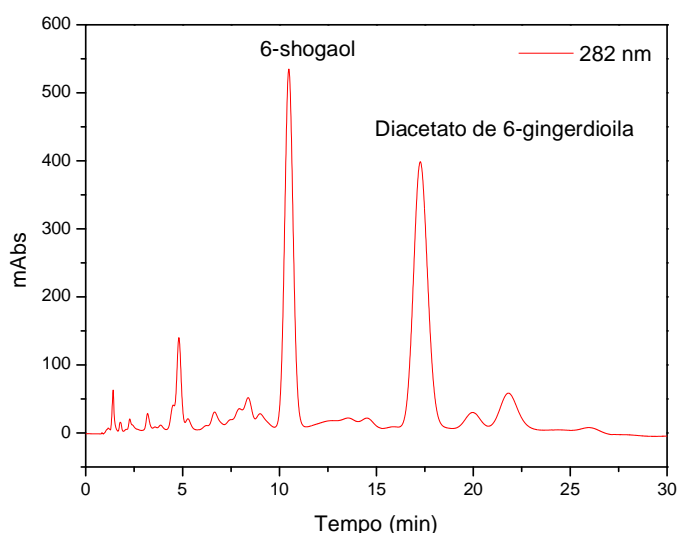


FIGURA 4.11 - Cromatograma de separação do 6-shogaol (**5**) e do diacetato de 6-gingerdioila (**11**) obtidos por CLAE com as seguintes condições em escala semi-preparativa: coluna C18, 10 μ , 30 x 1 cm, vazão de 10 mL/min, detector UV a 254 e 282 nm e fase móvel MeOH/H₂O (65/35).

Utilizando as mesmas condições cromatográficas utilizadas para a subfração ZOD20-28B, injetou-se a subfração ZOD20-28EFG diretamente em escala semi-preparativa. Pode ser observado na FIGURA 4.11 duas bandas intensas bem separadas, referentes as substâncias **5** (19,6 mg) e **11** (7 mg).

Subfração ZOD124NO (1,4 g)

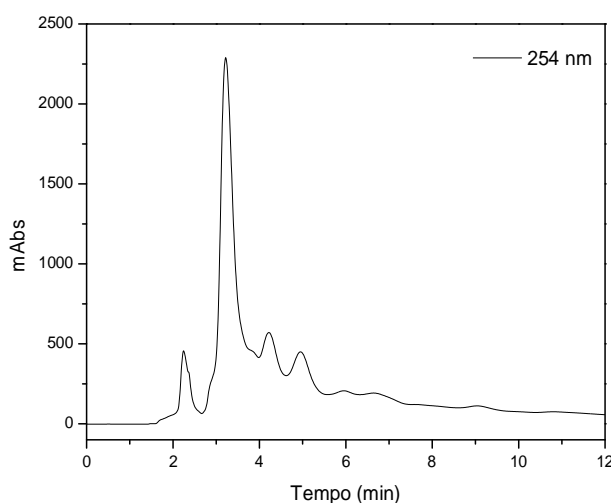


FIGURA 4.12 - Cromatograma da subfração ZOD124NO obtido por CLAE com as seguintes condições em escala analítica: coluna C18, 10 μ , 25 x 0,46 cm, vazão de 0,8 mL/min, detector UV a 254 nm e fase móvel ACN/MeOH/H₂O (13,75:48,75:37,5).

Após otimização das condições cromatográficas para a purificação dos compostos **17** (ZOD124NO12) e **18** (ZOD124NO7), utilizando a subfração ZOD124NO chegou-se a mistura de solventes ACN/MeOH/H₂O (13,75:48,75:37,5), como a melhor fase móvel testada, apesar de não ter obtido uma separação completa dos constituintes. Em seguida para a separação de substâncias das subfrações e, utilizou-se esta condição no modo semi-preparativo de eluição.

Subfração 124NO12 (15 mg)

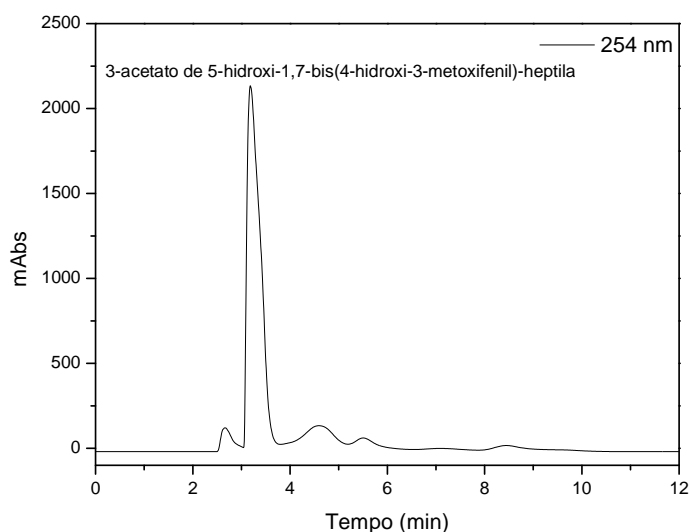


FIGURA 4.13 - Cromatograma de purificação do 3-acetato de 5-hidroxi-1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-heptila (**17**) obtido por CLAE com as seguintes condições em escala preparativa: coluna C18, 10 μ , 30 x 1 cm, vazão de 6 mL/min, detector UV a 254 nm e fase móvel ACN/MeOH/H₂O (13,75:48,75:37,5).

Subfração 124NO7 (106,1 mg)

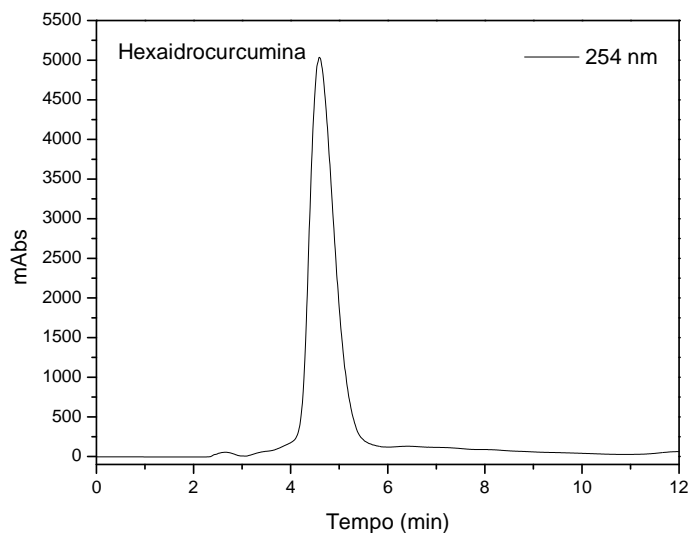


FIGURA 4.14 - Cromatograma de purificação da hexaidrocurcumina (**18**) obtido por CLAE com as seguintes condições em escala preparativa: coluna C18, 10 μ , 30 x 1 cm, vazão de 6 mL/min, detector UV a 254 nm e fase móvel ACN/MeOH/H₂O (13,75:48,75:37,5).

Pode-se observar nos cromatogramas das FIGURAS 4.13 e 4.14 que a purificação das substâncias **17** (1,2 mg) e **18** (44,8 mg) foi bem sucedida já que se observa uma boa resolução cromatográfica das bandas.

4.1.1.1.2 - Otimização de separação do 6, 8 e 10-gingerol

Antes da injeção da amostra em CLAE a fração obtida do extrato bruto dos rizomas de *Z. officinale*, foi submetida a um “clean-up” para a eliminação da parte lipídica da amostra, seguida de cromatografia clássica, como descrito em Material e Métodos, no Item 3.3.2.2.

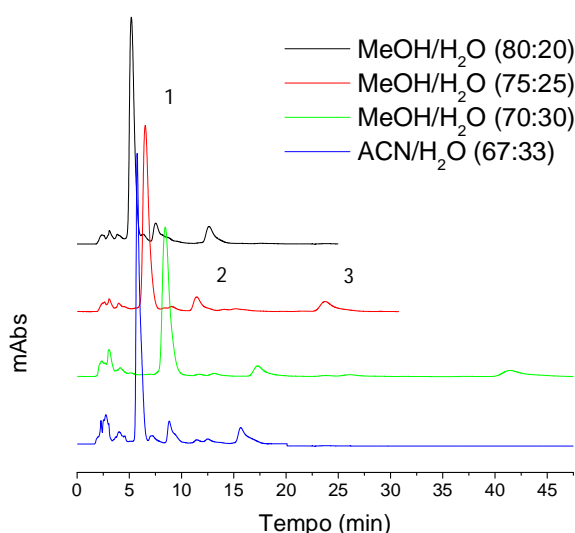


FIGURA 4.15 - Cromatogramas da fração rica em gingeróis (bandas 1, 2 e 3: 6, 8 e 10-gingerol, respectivamente), obtido por CLAE em escala analítica. Condições cromatográficas: coluna C18, 10 μ , 25 x 0,46 cm, vazão de 1 mL/min, detector UV a 282 nm e fases móveis MeOH/H₂O, 70:30 (verde), 75:25 (vermelho) e 80:20 (preto) e acetonitrila/água, 67:33 (azul).

Baseado nas fases móveis metanol/água que já vinham sendo utilizadas nas separações anteriores, testou-se três proporções diferente da mistura metanol/água e uma da mistura acetonitrila/água, como forma de otimizar a separação dos gingeróis. As fases móveis testadas foram metanol/água, 70:30, 75:25 e 80:20, e acetonitrila/água (67:33). Chegou-se na fase móvel acetonitrila/água nesta proporção (67:33) através do nomógrafo (CASS e DEGANI,

2001), tomando-se como base a melhor fase móvel utilizada, metanol/água (75:25). No entanto, quando se utilizou acetonitrila/água (67:33), as bandas cromatográficas de interesse tiveram uma redução no fator de separação. Esta fase foi descartada, pois existiria o risco de perda de resolução, quando o aumento de escala fosse realizado (FIGURA 4.15).

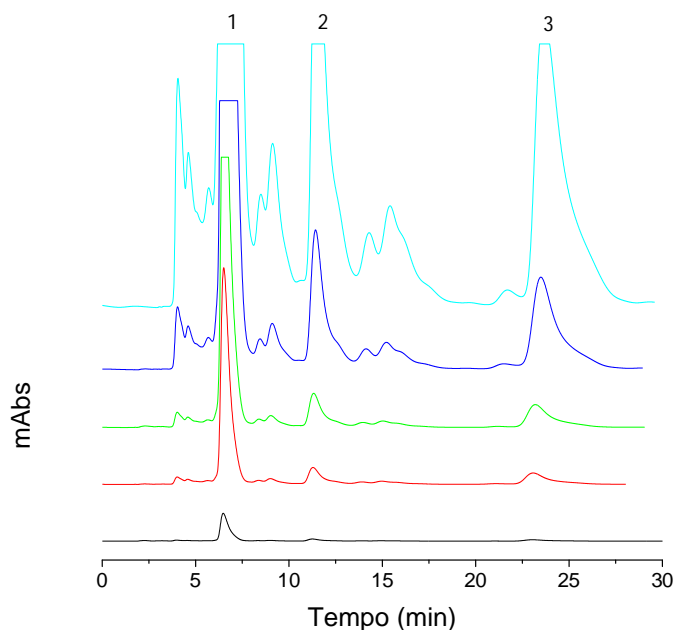


FIGURA 4.16 - Cromatogramas da fração rica em gingeróis (bandas 1, 2 e 3: 6, 8 e 10-gingerol, respectivamente), obtida por CLAE em escala analítica. Condições cromatográficas: coluna C18, 10 μ , 25 x 0,46 cm, vazão de 1 mL/min, detector UV a 282 nm e fase móvel MeOH/H₂O (75:25). As massas injetadas foram: 0,019 mg (preto), 0,156 mg (vermelho), 0,312 (em verde), 1,25 mg (azul escuro) e 5 mg (azul claro).

Nas FIGURAS 4.16 e 4.17 pode-se observar os cromatogramas obtidos com o estudo de sobrecarga da coluna. Quantidades cada vez maiores de amostra foram injetadas a fim de se chegar ao máximo em massa que poderia ser injetado nesta coluna, sem que houvesse perda de resolução das bandas cromatográficas. A quantidade máxima injetada na coluna C18, 10 μ , 25 x 0,46 cm, utilizando detector UV a 282 nm e fase móvel MeOH/H₂O (75:25) foi 30 mg. Com essa quantidade de amostra injetada pode-se perceber que houve apenas uma discreta perda de resolução, e quase que nulo alargamento das bandas cromatográficas de interesse. Esses resultados nos dizem que a sobrecarga da coluna pode não ter sido atingida, e que a saturação eletrônica do detector dificultou

o estudo de sobrecarga por não permitir o aumento da massa de amostra injetada de forma que pudéssemos visualizar esta sobrecarga.

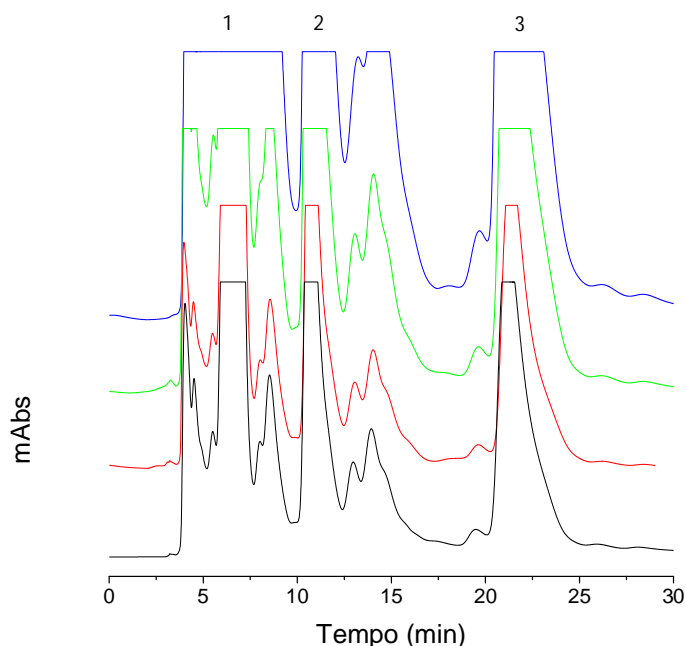


FIGURA 4.17 - Cromatogramas da fração rica em gingeróis (bandas 1, 2 e 3: 6, 8 e 10-gingerol, respectivamente), obtida por CLAE em escala analítica. Condições cromatográficas: coluna C18, 10 μ , 25 x 0,46 cm, vazão de 1 mL/min, detector UV a 282 nm e fase móvel MeOH/H₂O (75:25). As massas injetadas foram: 5,0 mg (preto), 7,5 mg (vermelho), 15,0 mg (verde) e 30 mg (azul).

Na FIGURA 4.18 pode-se observar o cromatograma obtido em escala semi-preparativa. Utilizando um comprimento de onda de menor absorção pelos gingeróis, 254 nm, percebe-se que não há perda de resolução e alargamento das bandas cromatográficas de interesse, o que nos diz que massas maiores de amostra podem ser injetadas, chegando mais próximo da sobrecarga da coluna cromatográfica. De todas as formas conseguiu-se com esta separação isolar os gingeróis com um considerável grau de pureza (acima de 96 %), como pode ser comprovado através do percentual de cada elemento presente na amostra obtido pela análise elementar de cada gingerol.

De aproximadamente 170 mg de amostra injetada em escala semi-preparativa, para o isolamento dos gingeróis, obteve-se 94 mg do 6-gingerol, 22 mg do 8-gingerol e 17 mg do 10-gingerol, em apenas 30 minutos de corrida. Foi um bom rendimento de isolamento obtido, se for considerado o grau de pureza das substâncias (>96 %), e a presença de outros componentes na amostra.

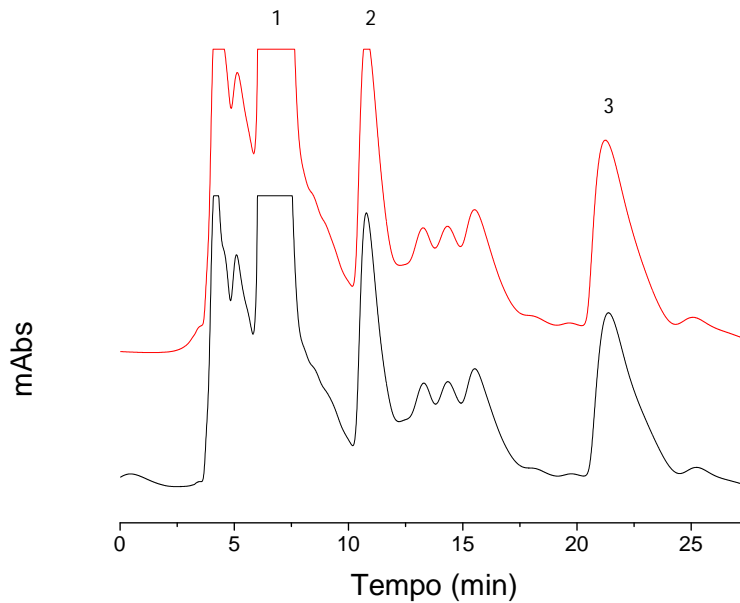


FIGURA 4.18 - Cromatograma da fração rica nos gingeróis (bandas 1, 2 e 3: 6, 8 e 10-gingerol, respectivamente), obtida por CLAE em escala semi-preparativa. Condições cromatográficas: coluna C18, 10 μ , 30 x 1 cm, vazão de 6 mL/min, detector UV a 254 nm e fase móvel MeOH/H₂O (75:25). As massas injetadas foram 85,1 mg (preto) e 170,1 mg (vermelho).

Hiserodt et al. (1998) isolaram estas substâncias dos rizomas de *Z. officinale* utilizando CLAE no modo normal de eluição, no entanto, com baixo grau de pureza para o 8-gingerol (86 %) e o 10-gingerol (84 %), obtido através da área percentual das bandas cromatográficas, detectadas por UV (282 nm). Já para o 6-gingerol a área percentual deste composto no cromatograma foi de 99 %.

A pureza obtida e apresentada acima para cada um destes compostos pode não ser a pureza real, pois a análise por CLAE utilizando detector de ultravioleta não garante a ausência de outros componentes na amostra pela não absorção da luz UV neste comprimento de onda.

4.1.1.1.3 - Identificação estrutural das substâncias isoladas

As substâncias foram identificadas por CG-EM, com ionização por Impacto Eletrônico (IE), Espectrômetro de Massas com ionização por elétron-spray (IES), RMN ¹H e ¹³C e comparação com dados da literatura. Seus espectros e estruturas químicas das substâncias podem ser observados nas FIGURAS 4.19-4.45.

Nas FIGURAS 4.19, 4.20, 4.21 e 4.22, podem ser observados os espectros de RMN ^1H e de massas dos quatro gingeróis isolados da espécie *Z. officinale*. Estes espectros são similares, pois se trata de uma série homóloga, com diferença apenas no comprimento da cadeia alifática por dois carbonos. Por isso será feita a análise espectral detalhada somente do 6-gingerol.

a) Gingeróis e shogaóis

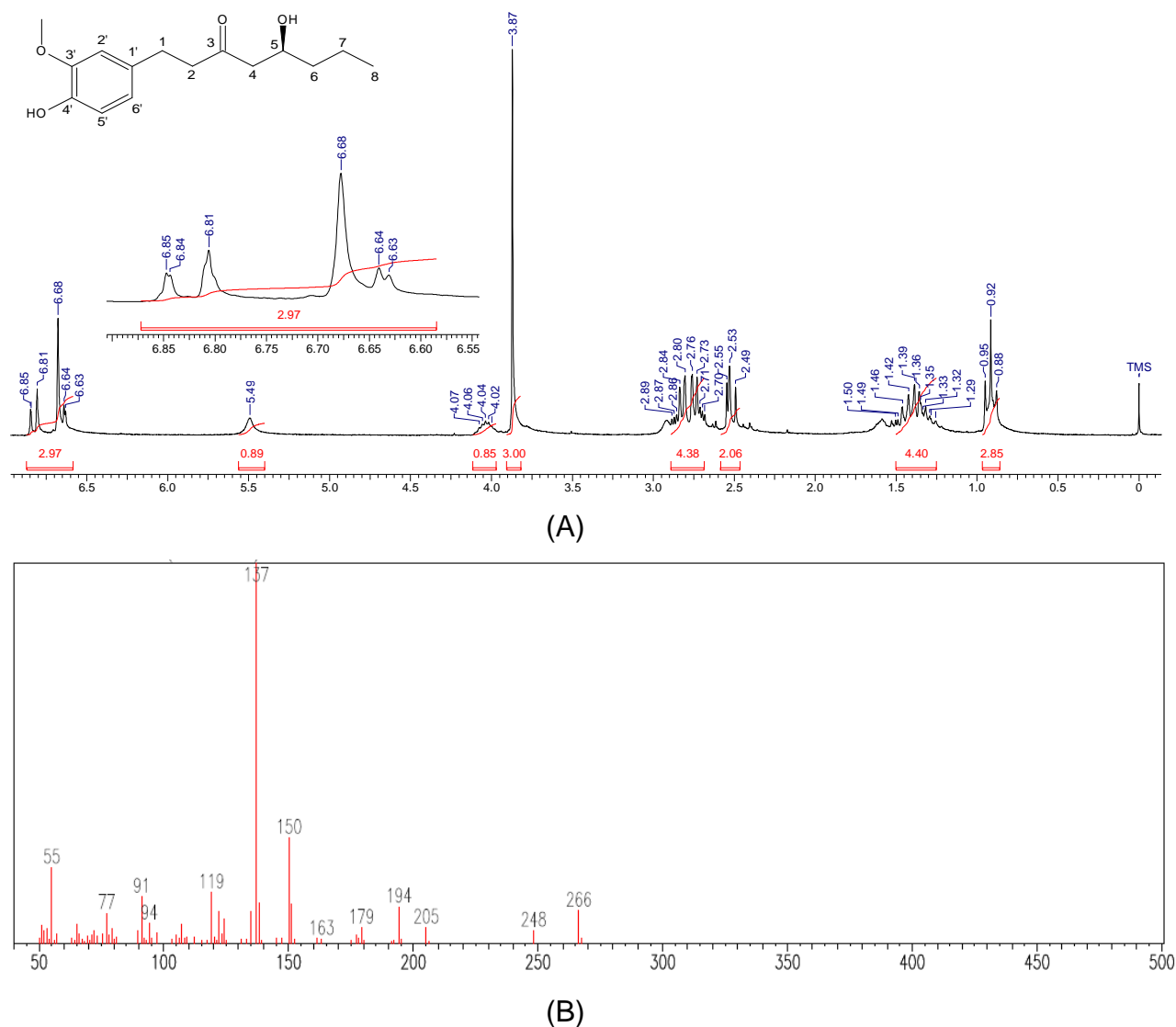


FIGURA 4.19 Espectros de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz), com ampliação da região de aromáticos (A), e EM (IE: 70 eV) (B) do 4-gingerol (1).

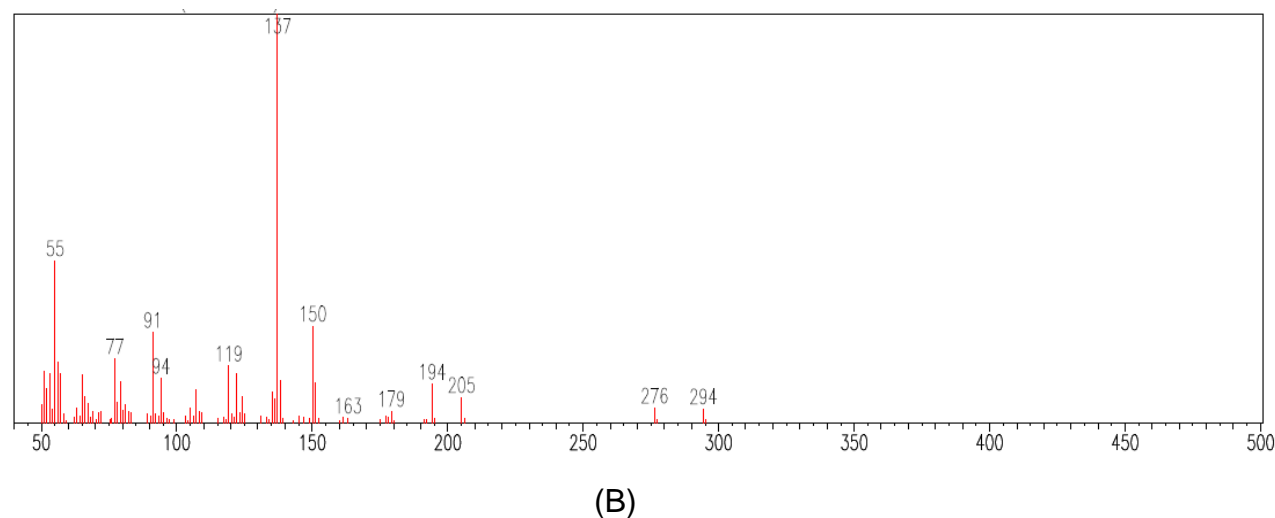
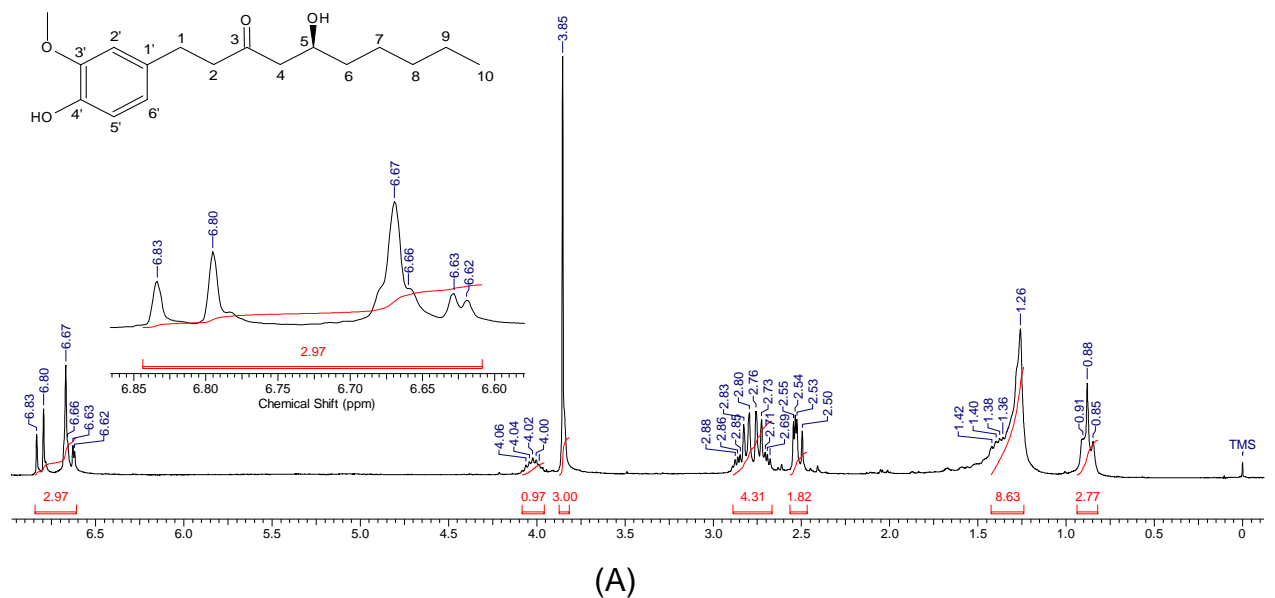


FIGURA 4.20 - Espectros de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz), com ampliação da região de aromáticos (A) e EM (IE: 70 eV) (B) do 6-gingerol (2).

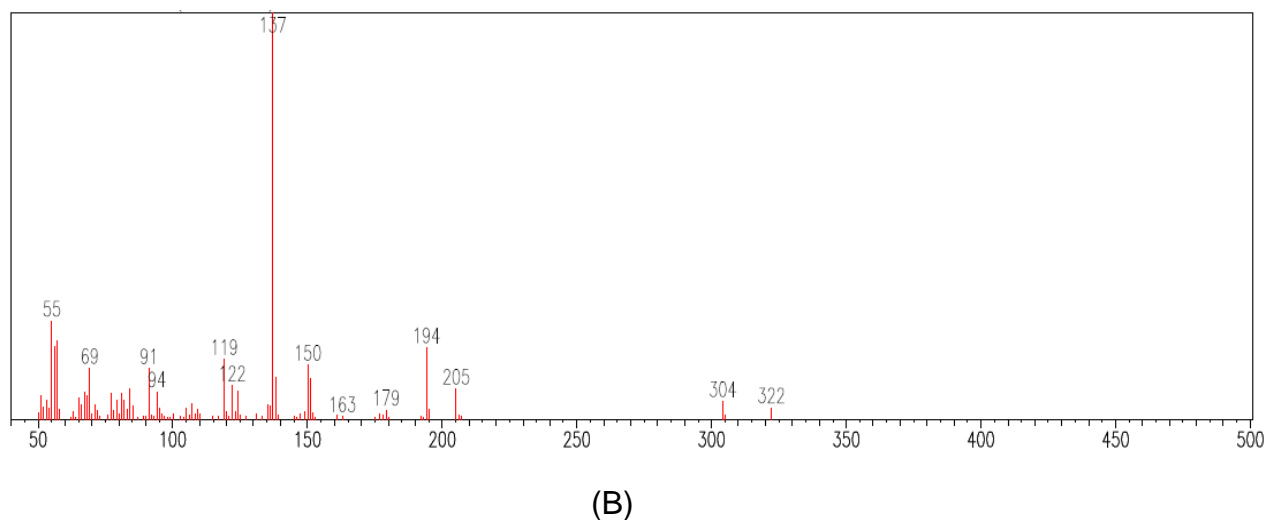
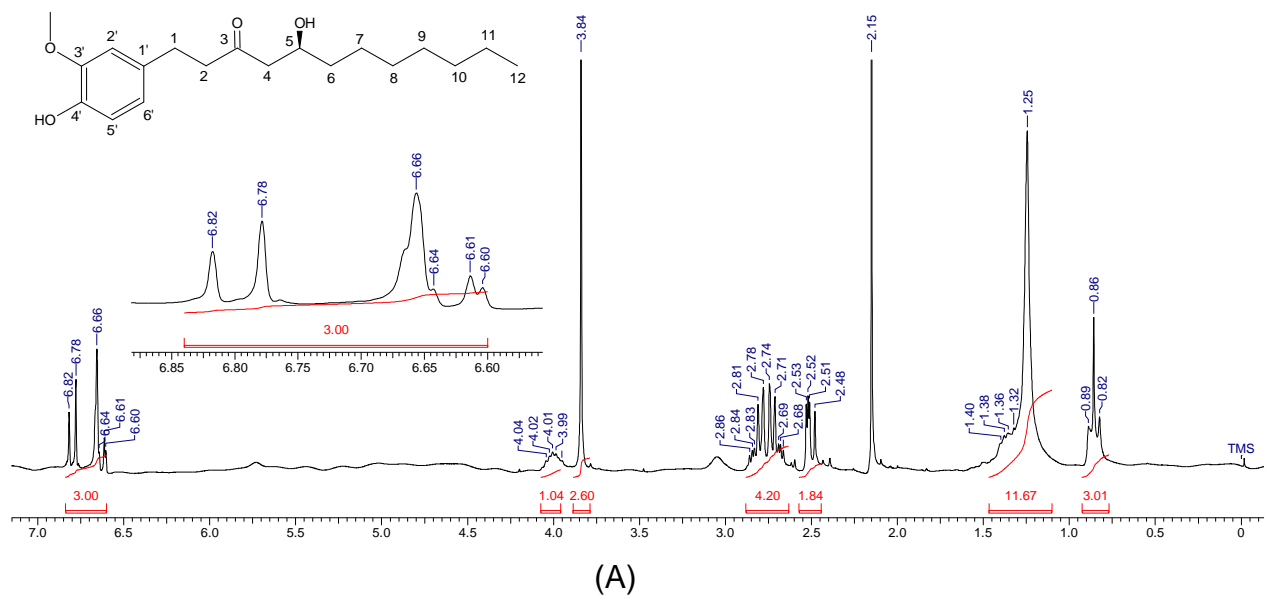


FIGURA 4.21 - Espectros de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz), com ampliação da região de aromáticos (A) e EM (IE: 70 eV) (B) do 8-gingerol (**3**).

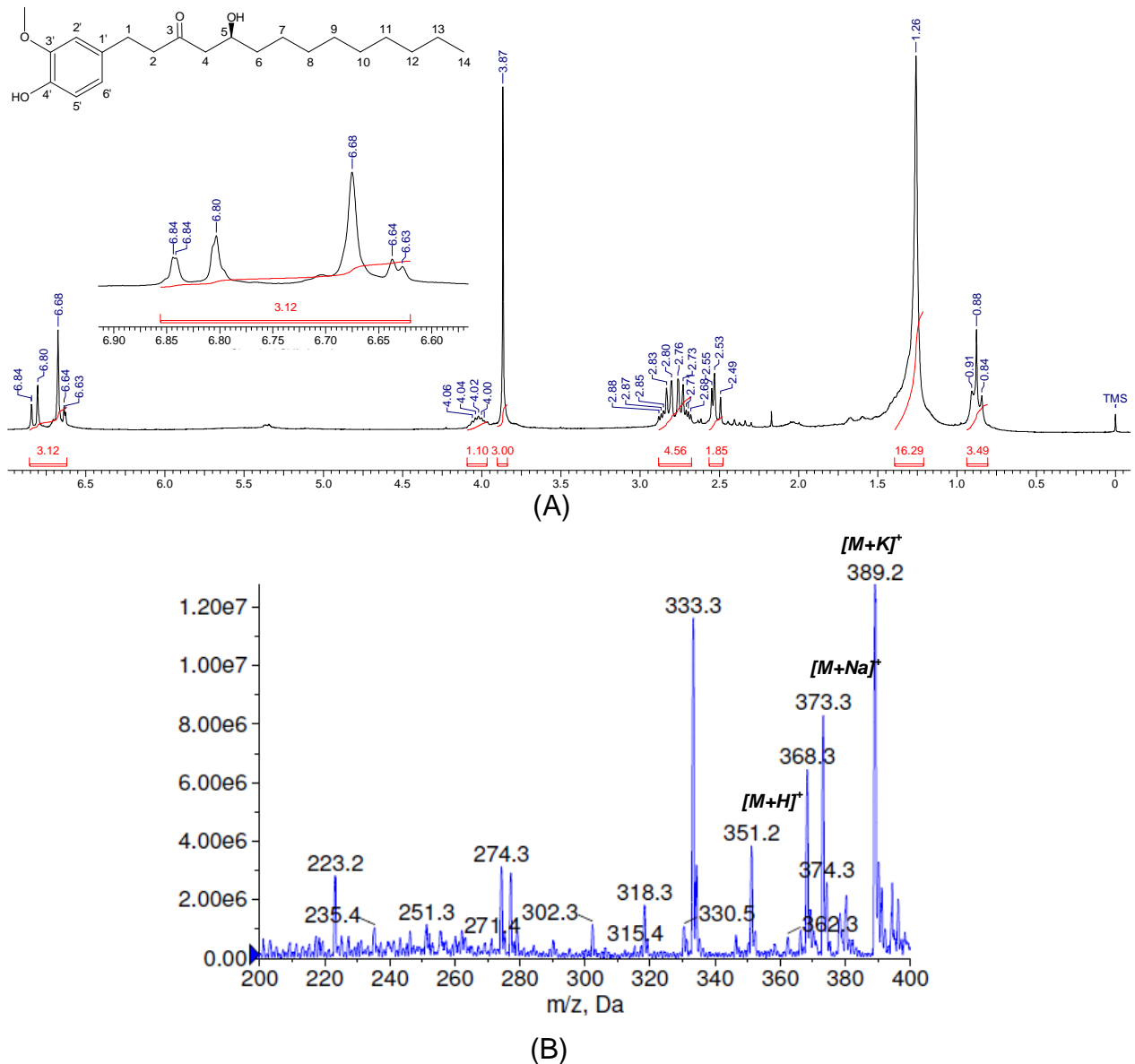


FIGURA 4.22 - Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz), com ampliação da região de aromáticos (A), e EM, com ionização por elétron-spray no modo positivo (B) do 10-gingerol (**4**).

O tripleto em δ_{H} 0,88 integrando para três hidrogênios é referente aos hidrogênios da metila terminal da cadeia alifática (H-10). Um sinal largo em δ_{H} 1,28 integrando para oito hidrogênios é referente aos hidrogênios metilênicos H-6, H-7, H-8 e H-9. Sinais em δ_{H} 2,4-2,6 integrando para dois hidrogênios são referentes aos hidrogênios metilênicos (H-4) ligados ao carbono α -carbonílico. Sinais em δ_{H} 2,6-3,1 integrando para quatro hidrogênios são referentes aos hidrogênios metilênicos benzílicos (H-1) e homobenzílicos (H-2). Um singlete intenso em δ_{H} 3,85 integrando para três hidrogênios é característico de hidrogênios de metoxila ($-\text{OCH}_3$). O

quintupeto em δ_H 4,02 integrando para um hidrogênio é referente ao hidrogênio oximetínico (H-5).

Na região de hidrogênios aromáticos há um conjunto de sinais (δ_H 6,6-6,9) integrando para três hidrogênios. Esses sinais apresentam um padrão típico de anel aromático 1,3,4-trissubstituído. Um duplo dubleto em δ_H 6,64 ($J=2,0$ Hz e $J=8,0$ Hz), sobreposto pelo dubleto em δ_H 6,67, é referente ao hidrogênio 6'. O dubleto em δ_H 6,67 ($J=2,0$ Hz) foi atribuído ao hidrogênio 2', e o dubleto em δ_H 6,81 ($J=8,0$ Hz) é referente ao hidrogênio 5' (FIGURA 4.20A).

A maior diferença nos espectros de RMN 1H dos gingeróis está nas integrais dos sinais em δ_H 1,5-1,9, referente aos hidrogênios metilênicos. No 4, 8 e 10-gingerol esses sinais integram para quatro, doze e dezesseis hidrogênios, respectivamente.

Como pode ser observado através dos espectros de massas do 4, 6, 8 e 10-gingerol, a diferença entre as massas moleculares é de 28 Da, referente a dois $-CH_2-$, comprovando a série homóloga, 4-gingerol, 6-gingerol, 8-gingerol e 10-gingerol (FIGURA 4.19B-4.21B).

Na FIGURA 4.22B pode ser observado o espectro de massas do 10-gingerol, onde os principais picos são: o íon *quasi*-molecular $[M+1]^+$ m/z 351,2, o aduto de sódio $[M+23]^+$ m/z 373,3, e o aduto de potássio $[M+39]^+$ m/z 389,2.

SOLLADIÉ et al. (1993) determinaram a configuração absoluta para os gingeróis como S, através de síntese assimétrica, partindo de um epóxi opticamente ativo e de estereoquímica conhecida. As rotações ópticas para o 6, 8 e 10-gingerol foram determinadas como podem ser observadas na TABELA 4.2. Com estes dados pode-se confirmar a estereoquímica do 6, 8 e 10-gingeróis isolados neste trabalho.

TABELA 4.2 – Rotação óptica experimental e da literatura

Substâncias	$[\alpha]_D^{25}$ experimental	$[\alpha]_D^{20}$ literatura*
4-gingerol	+7,9 (MeOH, c 5,2)	-
6-gingerol	+27,3 (CHCl ₃ , c 9,0)	+25,3 (CHCl ₃ , c 0,16)
8-gingerol	+23,6 (CHCl ₃ , c 7,5)	+26 (CHCl ₃ , c 0,9)
10-gingerol	+21,4 (CHCl ₃ , c 7,0)	+22,7 (CHCl ₃ , c 1,0)

*SOLLADIÉ e ZIANI-CHÉRIF, 1993

A partir dos dados obtidos e de sua comparação com dados da literatura, foi confirmada as estruturas das substâncias (LEE et al., 2011; JOLAD et al., 2005).

Nas FIGURAS 4.23, 4.24 e 4.25, podem ser observados os espectros de RMN ^1H e de massas dos três shogaios isolados da espécie *Z. officinale*. Os espectros são semelhantes, pois, da mesma forma que para os gingeróis, trata-se de uma série homóloga, com diferença apenas no comprimento da cadeia alifática, por dois carbonos. Portanto, a análise dos espectros de RMN ^1H dos shogaios serão similares. Por isso, será feita a análise espectral detalhada somente de um do 6-shogaol.

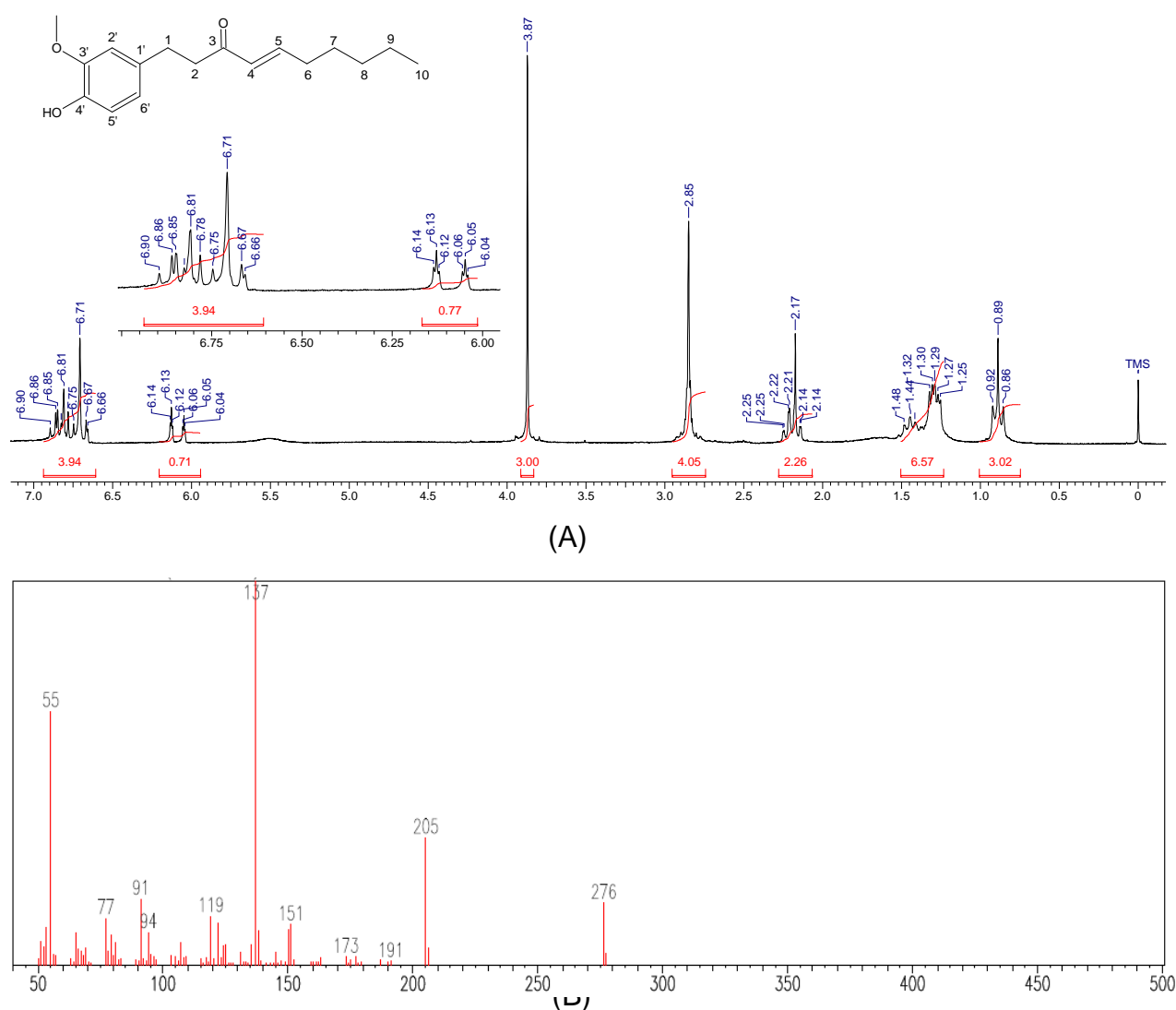


FIGURA 4.23 - Espectros de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) (A), e EM (IE: 70 eV) (B) do 6-shogaol (5).

Resultados e Discussão

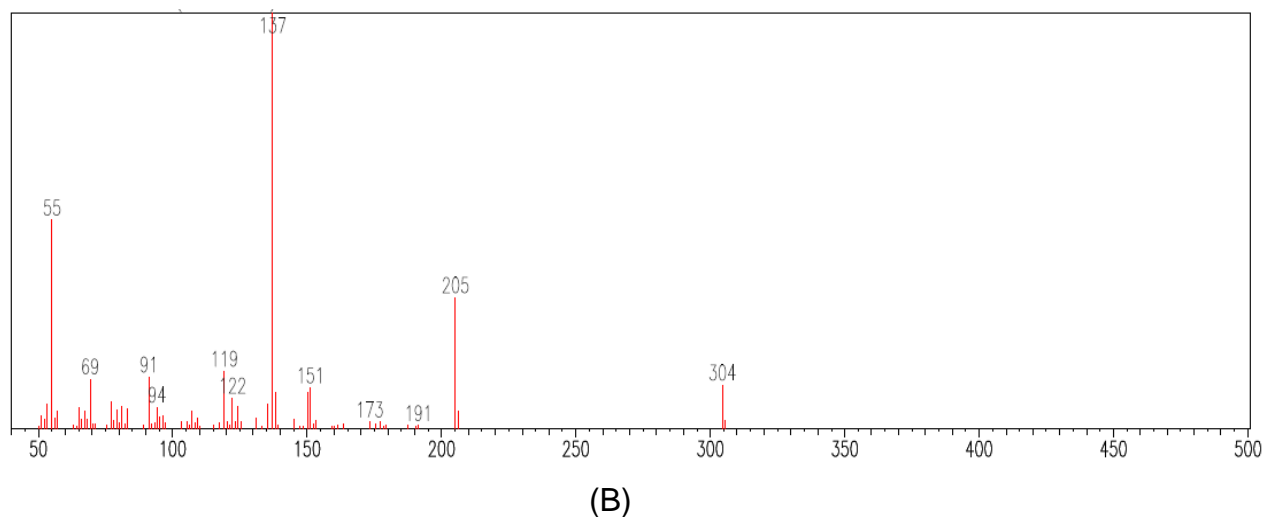
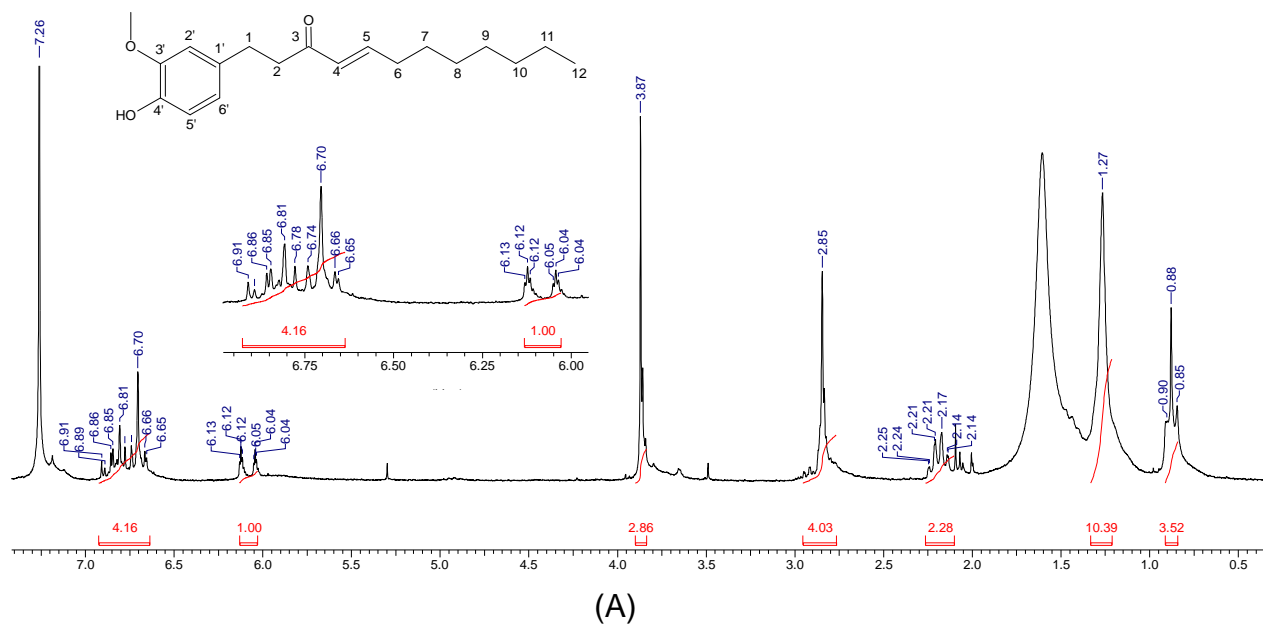


FIGURA 4.24 - Espectros de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz), com ampliação da região de aromáticos (A), e EM (IE: 70 eV) (B) do 8-shogaol (**16**).

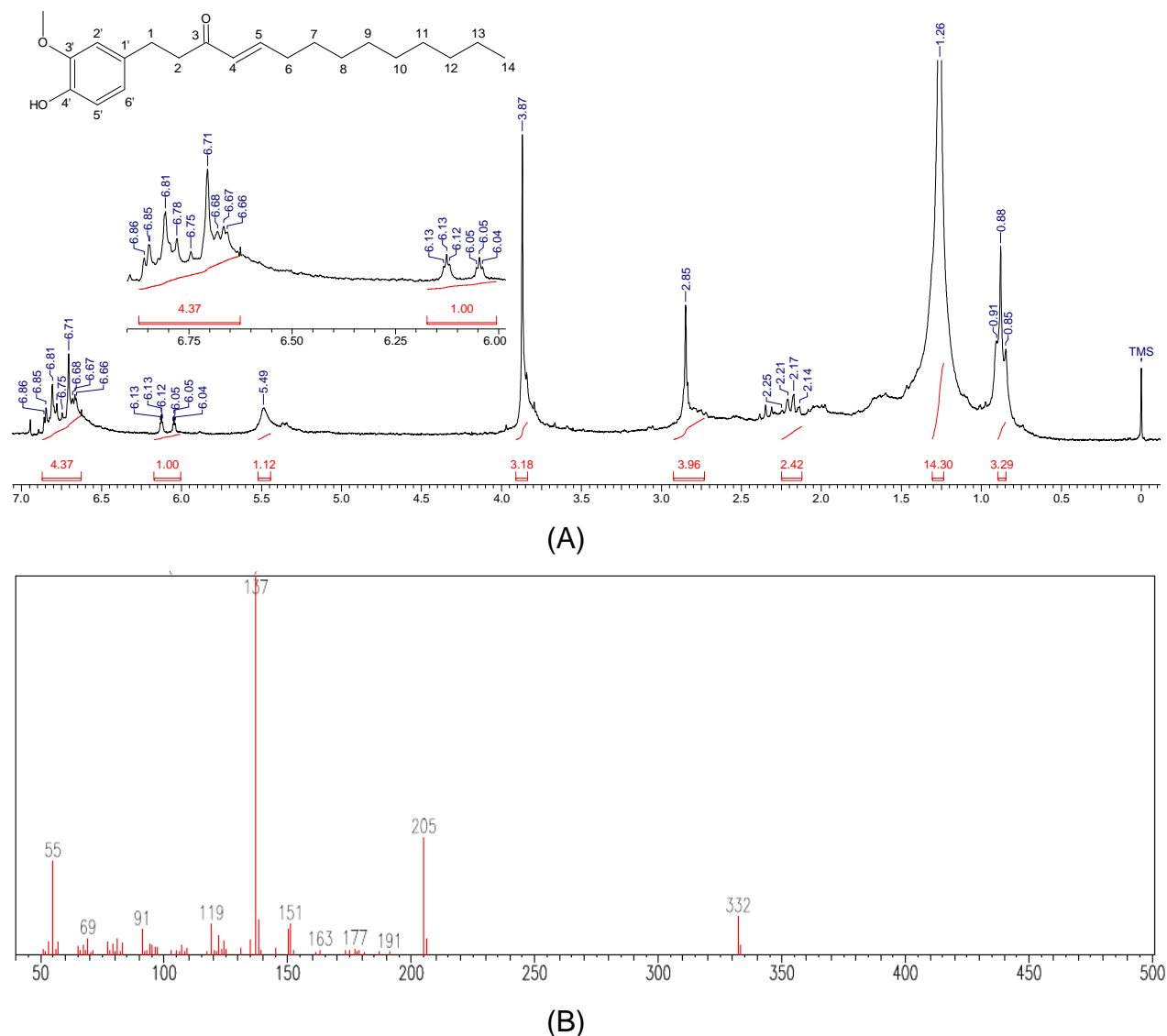


FIGURA 4.25 - Espectros de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz), com ampliação da região de aromáticos (A), e EM (IE: 70 eV) (B) do 10-shogaol (**6**).

O tripleto em δ_{H} 0,89 integrando para três hidrogênios é referente aos hidrogênios da metila terminal da cadeia alifática (H-10). Um conjunto de sinais em δ_{H} 1,2-1,5 integrando para seis hidrogênios é referente aos hidrogênios metilênicos H-7, H-8 e H-9. Um conjunto de sinais em δ_{H} 2,1-2,5, integrando para dois hidrogênios é referente aos hidrogênios alílicos (H-6), e um sinal (δ_{H} 2,85) integrando para quatro hidrogênios, referente aos hidrogênios metilênicos benzílicos (H-1) e homobenzílicos (H-2). Um singlete intenso em δ_{H} 3,87 integrando para três hidrogênios é característico de hidrogênios de metoxila ($-\text{OCH}_3$). O duplo tripleto em δ_{H} 6,10, integrando para um hidrogênio é referente ao hidrogênio olefínico α -carbonílico (H-4), que acopla com H-5 ($J = 16$ Hz) e os dois H-6 ($J = 2$ Hz). A

constante de acoplamento de 16 Hz é característica de hidrogênios em configuração *trans*.

Na região de hidrogênios aromáticos há um conjunto de sinais (δ_H 6,6-6,9) integrando para quatro hidrogênios. O duplo tripleto em δ_H 6,82 ($J = 16$ Hz) é referente ao hidrogênio olefínico β -carbonílico (H-5). Os sinais dos outros três hidrogênio apresentam o mesmo padrão típico de anel aromático 1,3,4-trissubstituído, dos gingeróis (FIGURA 4.25A).

A maior diferença entre os espectros de RMN 1H dos shogaols está nas integrais dos sinais em δ_H 1,2-1,5, referente aos hidrogênios metilênicos. No 8 e 10-shogaol esses sinais integram para dez e quatorze, respectivamente.

Como pode ser observado através dos espectros de massa dos shogaols, a diferença entre a massa molecular deles é de 28 Da, referentes a dois $-CH_2-$, comprovando a série homóloga, 6-shogaol, 8-shogaol e 10-shogaol (FIGURAS 4.23B, 4.24B e 4.25B).

A partir dos dados obtidos e de sua comparação com dados da literatura, foi confirmada as estruturas das substâncias (LEE et al., 2011; JOLAD et al., 2005).

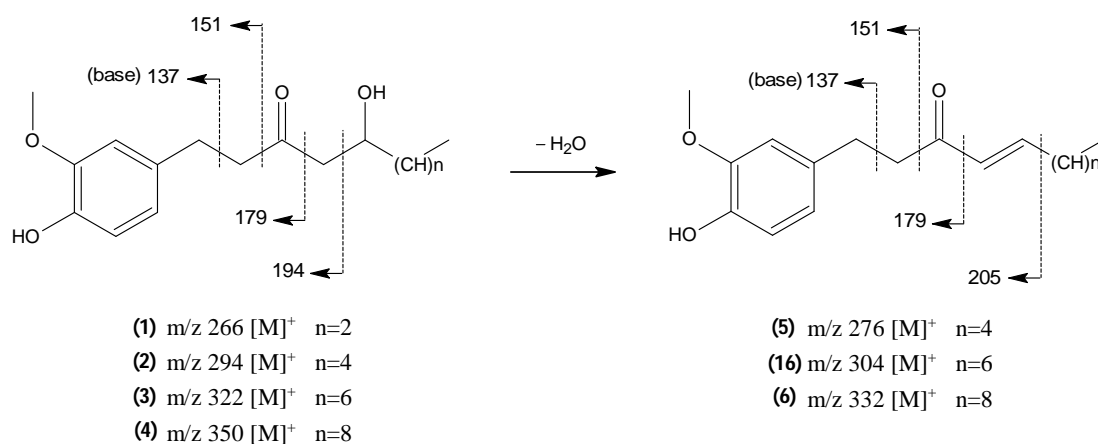


FIGURA 4.26 - Íons-fragmento majoritários do EM das substâncias **1-6** e **16**.

Os principais íons-fragmento das substâncias **1-6** e **16**, podem ser observados na FIGURA 4.26. Os picos m/z 137, m/z 151 e m/z 179 estão presentes em todos os gingeróis e shogaols. A estabilidade do pico-base m/z 137 pode ser justificada pelo número de estruturas de ressonância existentes para o cátion benzílico. Este pico é característico desses derivados fenólicos (FIGURA 4.25B).

Na FIGURA 4.27 pode ser observado o espectro de RMN ^1H e de massas do 6-paradol isolado da espécie *Z. officinale*.

b) Paradol

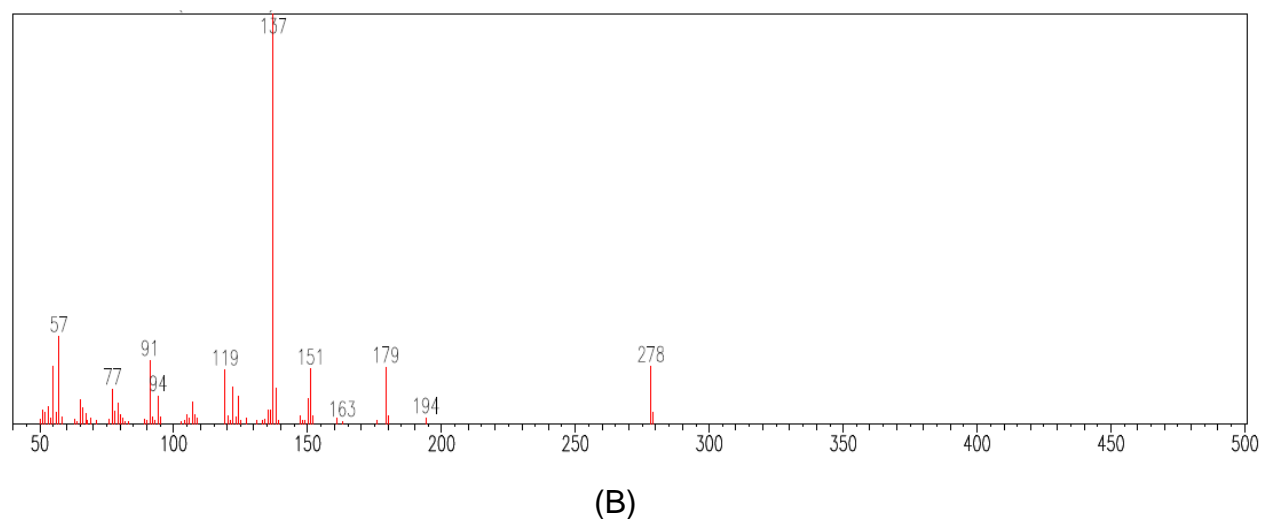
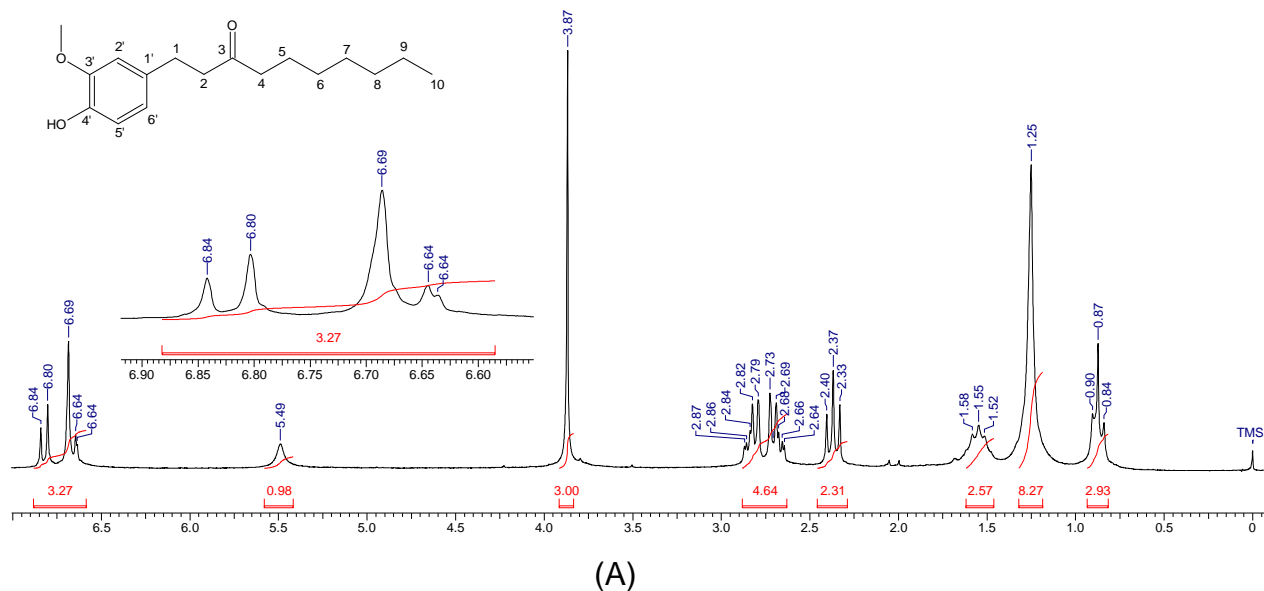


FIGURA 4.27 - Espectros de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz), com ampliação da região de aromáticos (A), e EM (IE: 70 eV) (B) do 6-paradol (7).

A análise do espectro de RMN ^1H para o 6-paradol é similar a análise dos gingeróis. O tripleto em δ_{H} 0,87, integrando para três hidrogênios é referente aos hidrogênios da metila terminal da cadeia alifática (H-10). Um sinal largo em δ_{H} 1,25 integrando para oito hidrogênios (H-6, H-7, H-8 e H-9), e um quintupeto em δ_{H} 1,55 integrando para dois hidrogênios (H-5) são referentes aos hidrogênios metilênicos da cadeia alifática. O tripleto em δ_{H} 2,37 integrando para dois hidrogênios, é referente aos hidrogênios α -carbonílico (H-4). Sinais em δ_{H} 2,6-2,9 integrando para

quatro hidrogênios são referentes aos hidrogênios metilênicos benzílicos (H-1) e homobenzílicos (H-2). Um singlete intenso (δ_H 3,87) integrando para três hidrogênios é característico de hidrogênios de metoxila (-OCH₃). Na região de hidrogênios aromáticos há um conjunto de sinais (δ_H 6,6-6,9) integrando para três hidrogênios. Esses sinais apresentam um padrão típico de anel aromático 1,3,4-trissubstituído, como no 6-gingerol (FIGURA 4.27A).

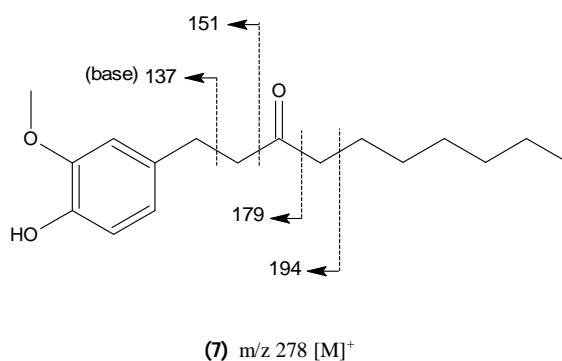


FIGURA 4.28 - Íons-fragmento majoritários do EM da substância 7.

Os principais íons-fragmento da substância 7, podem ser observados na FIGURA 4.28. Esta substância apresenta os picos m/z 137, m/z 151 e m/z 179 em comum com os gíngerois e shogaóis. O pico-base, m/z 137, característico dessas substâncias também pode ser observado (FIGURA 4.27B).

A partir dos dados obtidos e de sua comparação com dados da literatura, foi confirmada a estrutura da substância (LEE et al., 2011; JOLAD et al., 2005)

Na FIGURA 4.29 pode ser observado o espectro de RMN ¹H e de massas do 6-gingerdiol isolado da espécie *Z. officinale*.

c) 6-gingerdiol

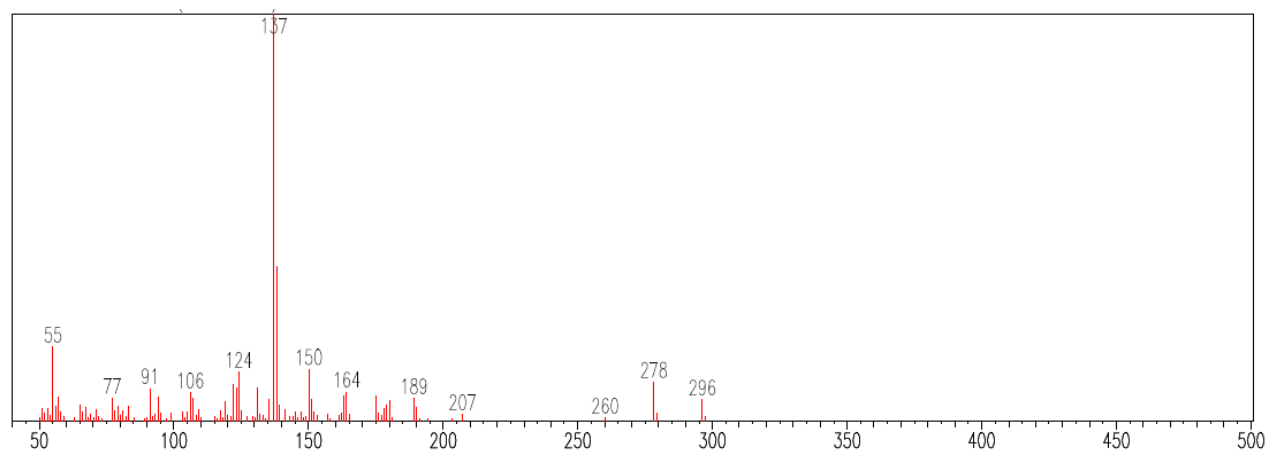
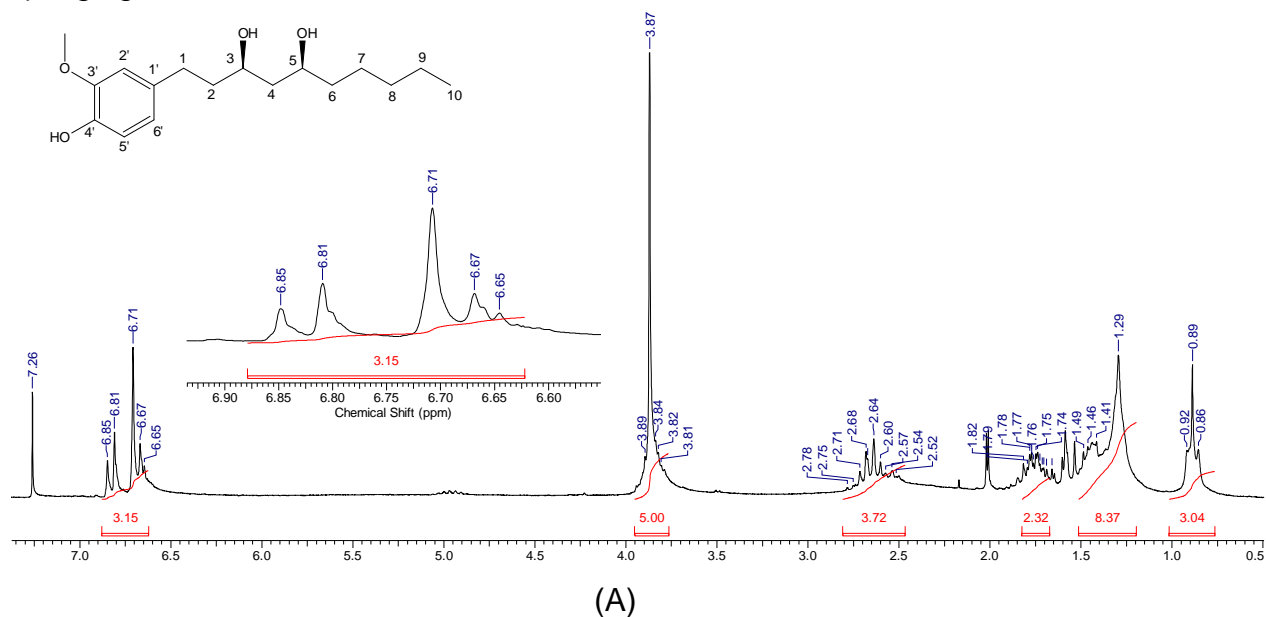


FIGURA 4.29 - Espectros de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz), com ampliação da região de aromáticos (A), e EM (IE: 70 eV) (B) do 6-gingerdiol (**8**).

O 6-gingerdiol apresenta também características espectrais similares aos gingeróis. O tripleto em δ_{H} 0,89 integrando para três hidrogênios é referente aos hidrogênios da metila terminal da cadeia alifática (H-10). Um conjunto de sinais em δ_{H} 1,2-1,5 integrando para oito hidrogênios é referente aos hidrogênios metilênicos H-6, H-7, H-8 e H-9. O multiplete em δ_{H} 1,77 integrando para dois hidrogênios é referente aos hidrogênios metilênicos (H-4) ligados ao carbono α -carbonílico. Sinais em δ_{H} 2,5-2,7 integrando para quatro hidrogênios são referentes aos hidrogênios metilênicos benzílicos (H-1) e homobenzílicos (H-2). Um singlete intenso em δ_{H} 3,87 integrando para três hidrogênios é característico de hidrogênios de metoxila(-OCH₃).

Os sinais referentes aos dois hidrogênios oximetínicos (H-3 e H-5) em δ_H 3,89 se encontram sobrepostos pelo singlete dos hidrogênios da metoxila. Na região de hidrogênios aromáticos há um conjunto de sinais (δ_H 6,6-6,9) integrando para três hidrogênios. Esses sinais apresentam o padrão típico de anel aromático 1,3,4-trissubstituído, como no 6-gingerol (FIGURA 4.29A).

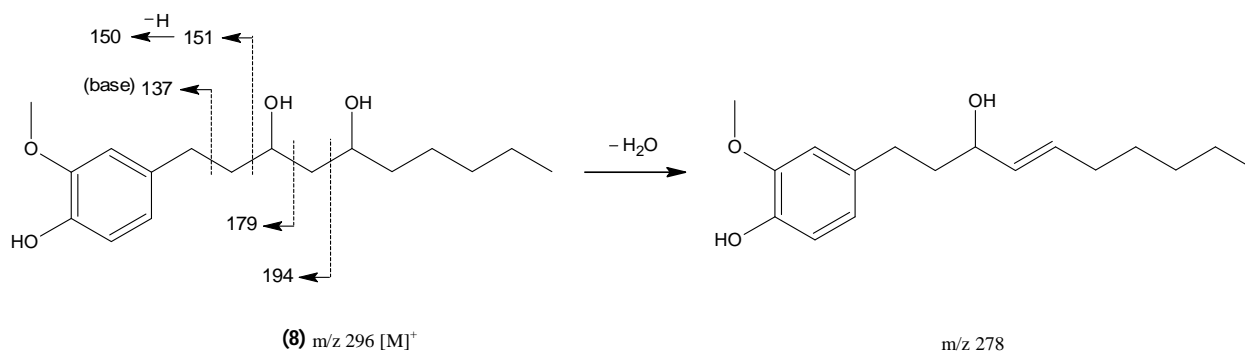


FIGURA 4.30 - Íons-fragmento majoritários do EM da substância **8**.

Os principais íons-fragmento da substância **8**, podem ser observados na FIGURA 4.30. A substituição da carbonila, observada nos gingeróis, shogaois e no paradol, por uma hidroxila levou a uma diferença mais acentuada no EM. Somente o pico-base, m/z 137, passa a ser comum à série anterior (FIGURA 4.29B).

A rotação óptica desta substância foi determinada, e por comparação com dados da literatura, considerando que o efeito dos solventes MeOH e $CHCl_3$ sobre o $[\alpha]_D$, não seja suficiente para mudar a direção da rotação, a configuração dos centros estereogênicos da substância **8** será *3R,5S*. Segundo KUMATA et al. (1970) a mudança na direção da rotação óptica de substâncias só ocorre em pouquíssimos casos. Vale ressaltar que a comparação ideal entre os valores de $[\alpha]_D$ ocorre quando as análises são realizadas com a mesma concentração de substância e mesmo solvente, no entanto sabendo que não existe relato na literatura do enantiômero (*3S,5R*)-6-gingerdiol como produto natural, muito provavelmente a configuração será a mencionada acima. O $[\alpha]_D^{24}$ (MeOH, *c* 6,3) do 6-gingerdiol foi $+8,1^\circ$, enquanto que na literatura o $[\alpha]_D^{20}$ é $+7,5^\circ$ ($CHCl_3$, *c* 1,5) (KIKUZAKI et al., 1992). KIKUZAKI et al. (1992) determinaram a configuração absoluta do 6-gingerdiol através de reações químicas, como a redução da carbonila do 6-gingerol (configuração *5S*), conversão dos gingerdiois obtidos em acetônidas e, análises por RMN 1H e ^{13}C .

A partir dos dados obtidos e de sua comparação com dados da literatura, foi confirmada a estrutura da substância (KIKUZAKI et al., 1992; JOLAD et al., 2005).

Na FIGURA 4.31 pode ser observado o espectro de RMN ^1H e de massas do metil-6-gingerol isolado da espécie *Z. officinale*.

d) Metil-6-gingerol

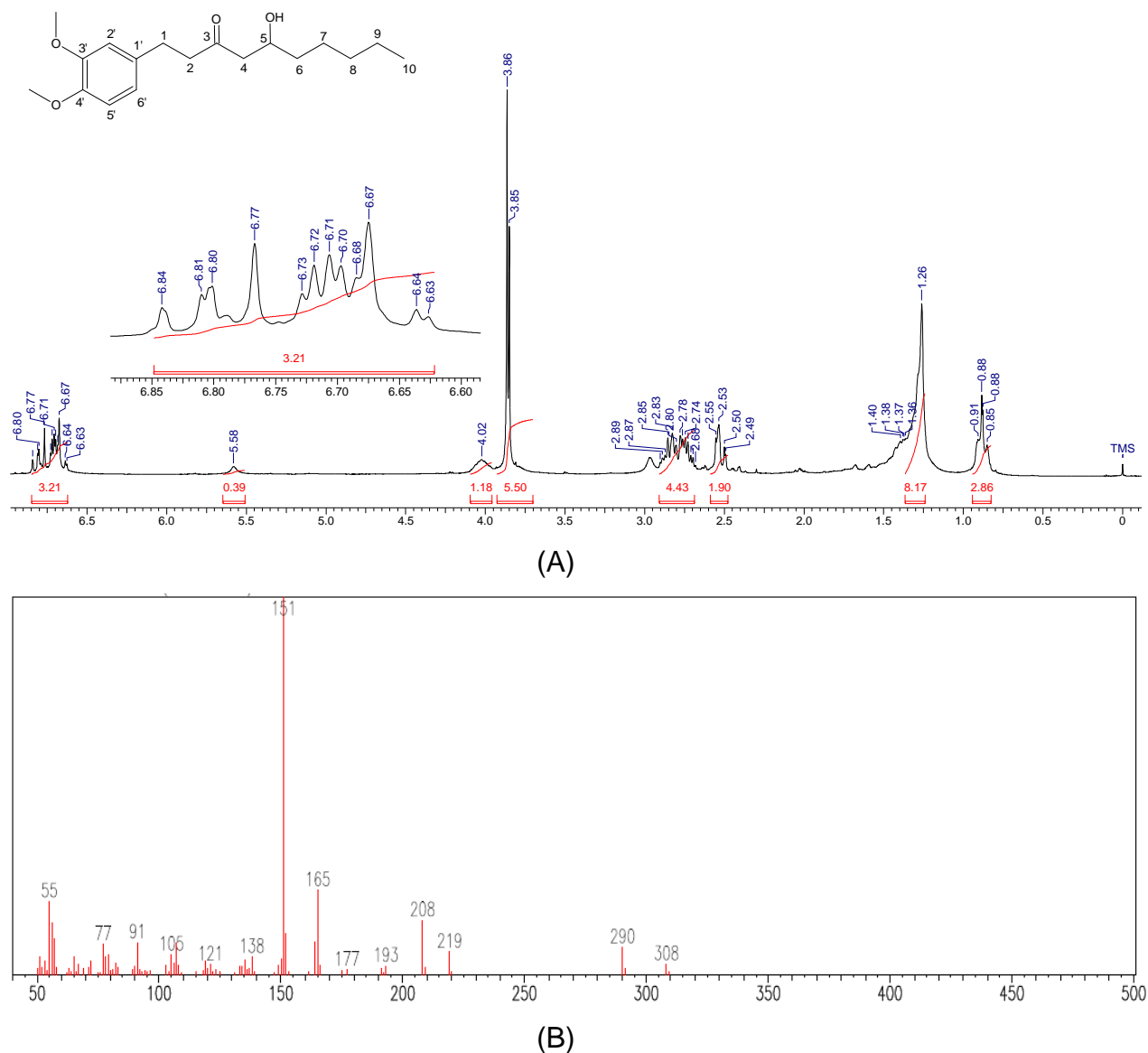


FIGURA 4.31 - Espectros de RMN ^1H (CDCl₃, 200 MHz), com ampliação da região de aromáticos (A), e EM (IE: 70 eV) (B) do Metil-6-gingerol (9)

O espectro de RMN ^1H do metil-6-gingerol é similar ao espectro de RMN ^1H do 6-gingerol, exceto pela presença de mais um grupo metoxila (δ_{H} 3,85), ligado ao anel aromático (FIGURA 4.31A). Isso é confirmado também pelo espectro

de massas dessa substância, através do íon-molecular m/z 308, que apresenta um acréscimo em massa de 14 Da em relação ao íon-molecular do 6-gingerol (m/z 294) (FIGURA 4.31B).

A partir dos dados obtidos e de sua comparação com dados da literatura, foi confirmada estrutura do metil-6-gingerol (CONNEL e SUTHERLAND, 1969; JOLAD et al., 2005).

Na FIGURA 4.32 pode ser observado o espectro de massas do metil-6-shogaol isolado da espécie *Z. officinale*.

e) Metil-6-shogaol

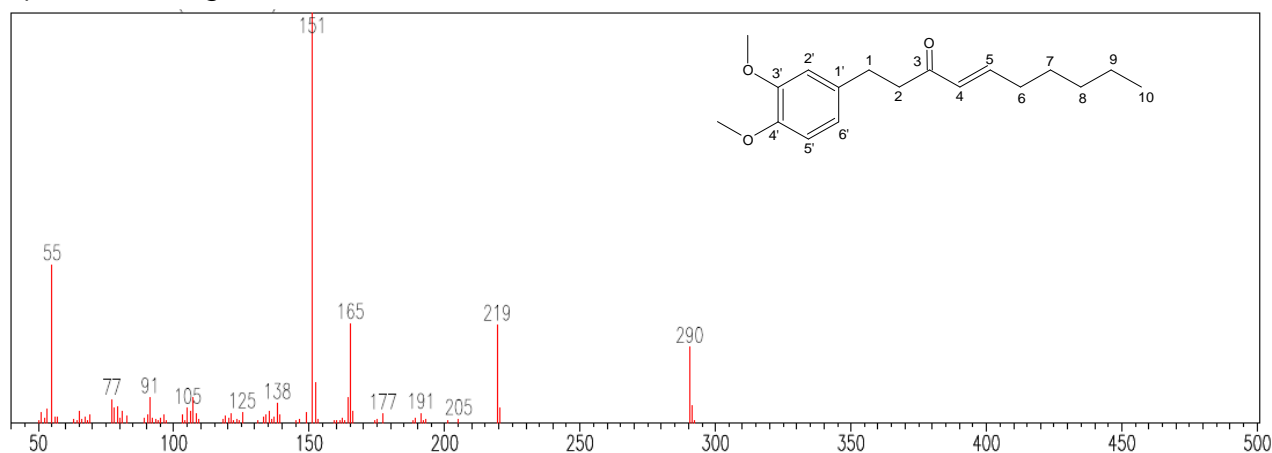


FIGURA 4.32 - Espectro massas (IE: 70 eV) do metil-6-shogaol (10).

Com a análise do espectro de massas dessa substância, através do íon-molecular m/z 290, e de seu padrão de fragmentação, chega-se a estrutura apresentada na FIGURA 4.32.

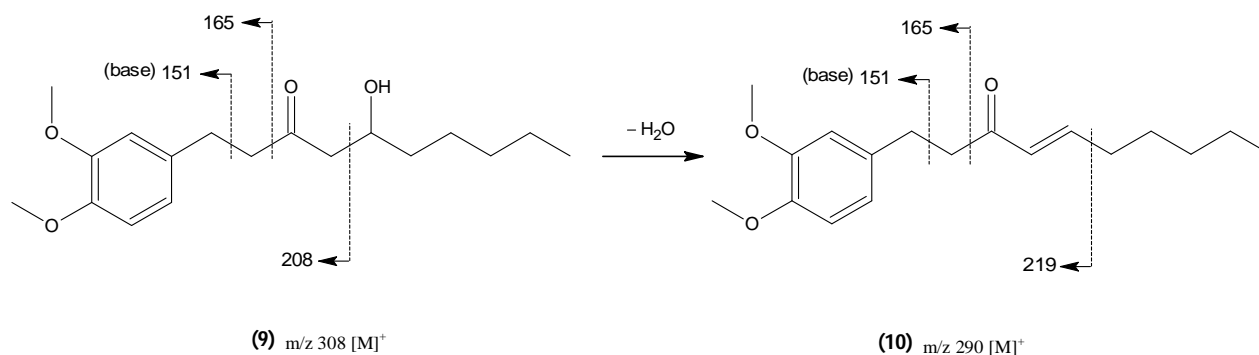


FIGURA 4.33 - Íons-fragmento majoritários do EM das substâncias 9 e 10.

Os principais íons-fragmento das substâncias **9** e **10**, podem ser observados na FIGURA 4.33. O pico-base, m/z 151, confirma a presença de duas metoxilas ligadas ao anel aromático dessas duas substâncias (FIGURA 4.31B e 4.32).

Dados espectrais da literatura indicam que a substância seja o metil-6-shogaol (JOLAD et al., 2005).

Na FIGURA 4.34 pode ser observado o espectro de RMN ^1H e de massas do diacetato de 6-gingerdioila isolado da espécie *Z. officinale*.

f) Diacetato de 6-gingerdioila

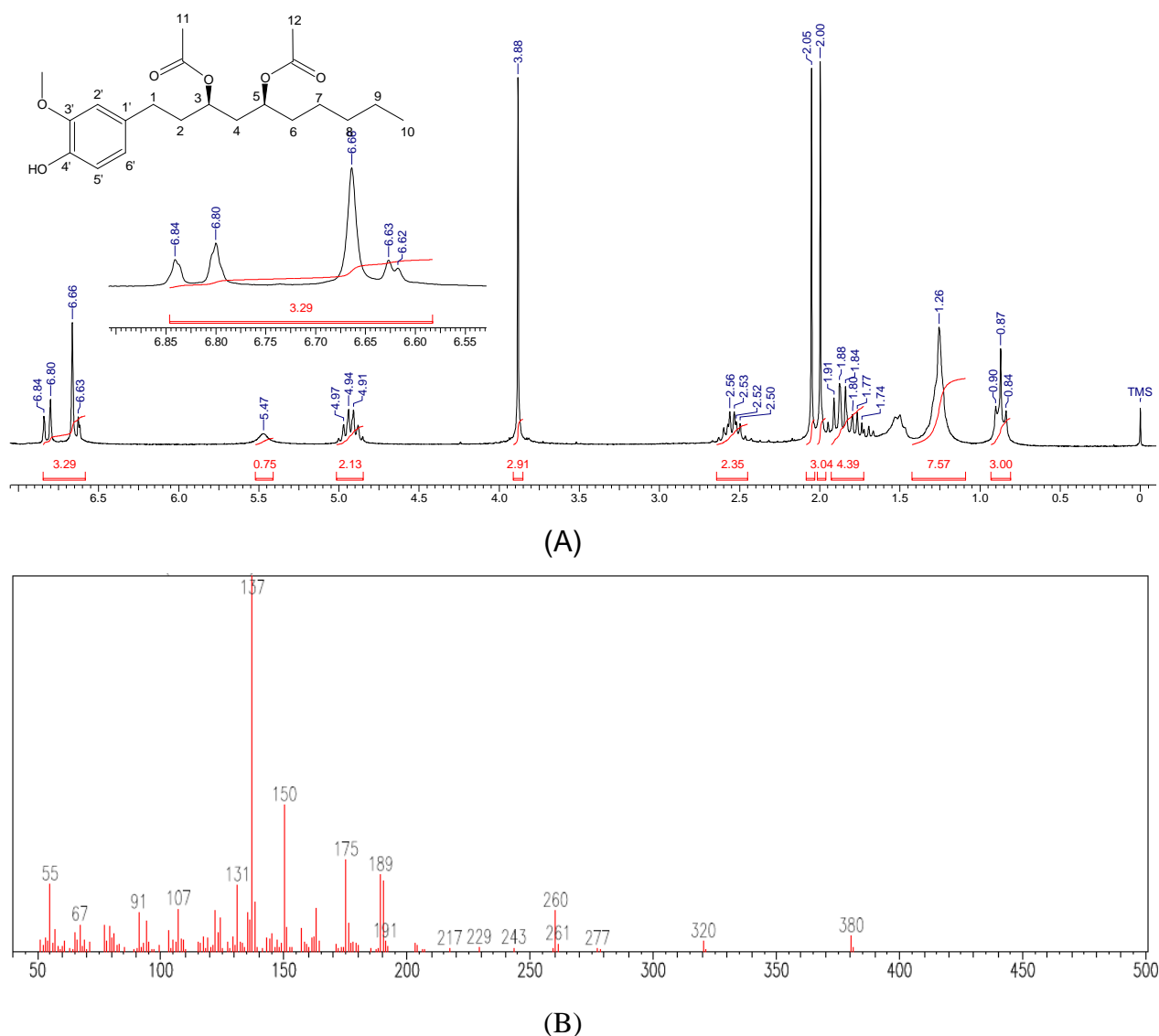


FIGURA 4.34 - Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz), com ampliação da região de aromáticos (A), e EM (IE: 70 eV) (B) do diacetato de 6-gingerdioila (**11**).

O espectro de RMN ^1H do diacetato de 6-gingerdioila é similar ao espectro de RMN ^1H do 6-gingerdiol, exceto pela presença de dois singletos referentes aos hidrogênios metílicos dos grupos acetatos (δ_{H} 2,00, H-12 e δ_{H} 2,05, H-11) e pelo deslocamento dos sinais dos hidrogênios oximetínicos (H-3 e H-5) de δ_{H} 3,89 para δ_{H} 4,94 (FIGURA 4.34A). Isso também é confirmado pelo espectro de massas dessa substância, através do íon-molecular m/z 380, que apresenta um acréscimo em massa de 84 Da em relação ao íon-molecular do 6-gingerdiol (m/z 296) (FIGURA 4.34B).

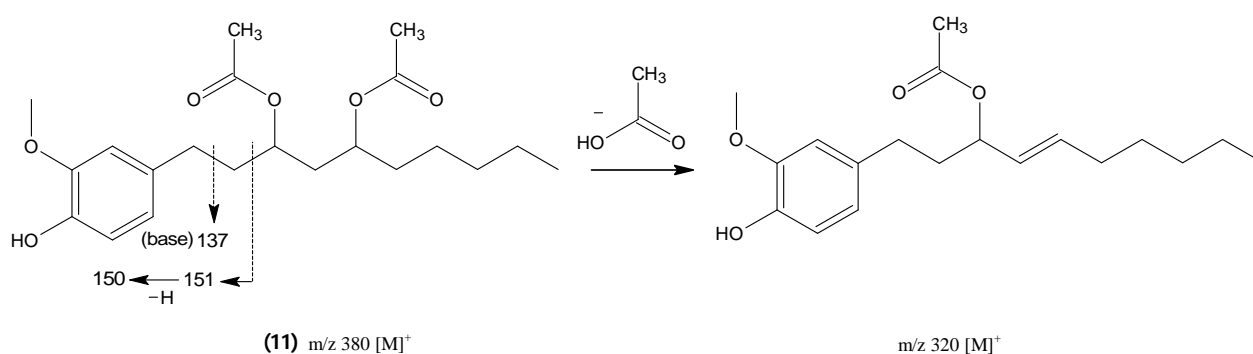


FIGURA 4.35 - Íons-fragmento majoritários do EM da substância **11**.

Os principais íons-fragmento da substância **11**, podem ser observados na FIGURA 4.35. O pico-base, m/z 137, característico dessa classe de substâncias também pode ser observado (FIGURA 4.34B).

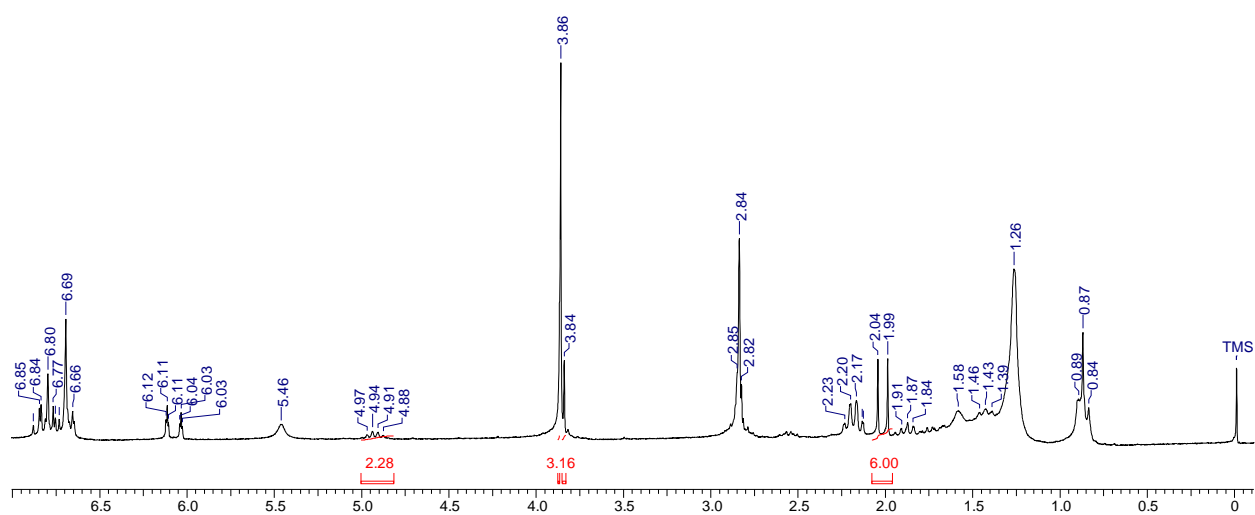
A rotação óptica desta substância foi determinada, e por comparação com dados da literatura, considerando que o efeito dos solventes MeOH e CHCl_3 sobre o $[\alpha]_{\text{D}}$ não seja suficiente para mudar a direção da rotação, a configuração dos centros estereogênicos da substância **11**, será $3R,5S$. Segundo KUMATA et al. (1970) a mudança na direção da rotação óptica de substâncias só ocorre em pouquíssimos casos. Vale ressaltar que a comparação ideal entre os valores de $[\alpha]_{\text{D}}$ ocorre quando as análises são realizadas com a mesma concentração de substância e mesmo solvente, no entanto sabendo que não existe relato na literatura do enantiômero ($3S,5R$)-diacetato de 6-gingerdioila como produto natural, muito provavelmente a configuração será a mencionada acima. O $[\alpha]_{\text{D}}^{24}$ (MeOH, c 6,0) do diacetato de 6-gingerdioila foi $-3,3^\circ$, enquanto que na literatura o $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ é $-3,8^\circ$ (CHCl_3 , c 0,5) (KIKUZAKI et al., 1992). KIKUZAKI et al. (1992) determinaram a configuração absoluta do diacetato de 6-gingerdioila a partir da redução da carbonila

do 6-gingerol (configuração 5S), acetilação dos gingerdióis obtidos e, análises por RMN ^1H e ^{13}C .

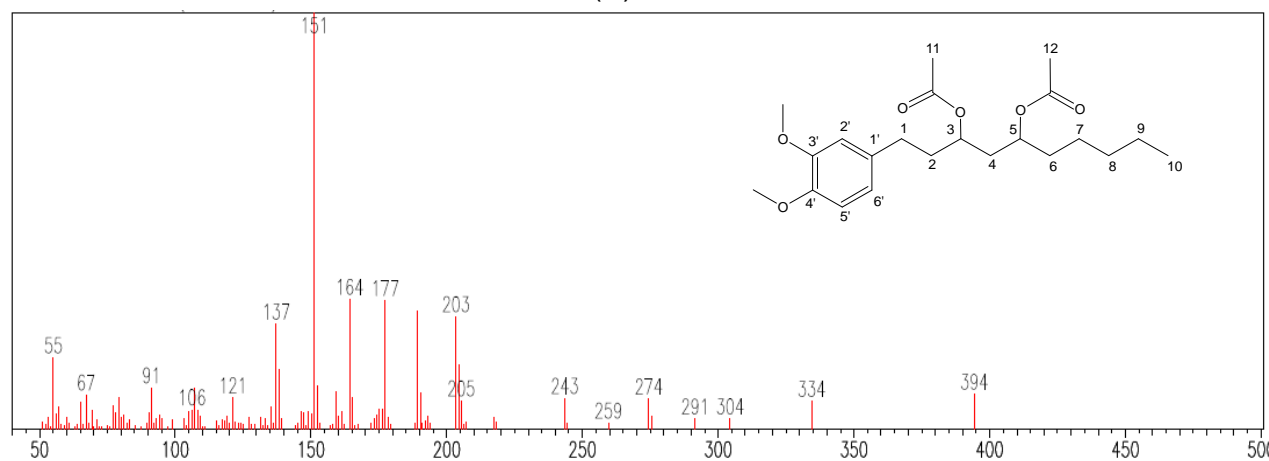
A partir dos dados obtidos e de sua comparação com dados da literatura, foi confirmada a estruturas da substância (KIKUZAKI et al., 1992; JOLAD et al., 2005).

Na FIGURA 4.36 pode ser observado o espectro de RMN ^1H e de massas do diacetato de metil-6-gingerdiola isolado da espécie *Z. officinale*.

g) Diacetato de metil-6-gingerdiola



(A)



(B)

FIGURA 4.36 - Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) (mistura: diacetato de metil-6-gingerdiola e 8-shogaol), e EM (IE: 70 eV) (B) do diacetato de metil-6-gingerdiola (12).

Na FIGURA 4.36 pode ser observado o espectro de RMN ^1H da mistura 8-shogaol, diacetato de metil-6-gingerdioila. Apesar de não ter sido apresentado o espectro do diacetato de metil-6-gingerdioila puro, pois a quantidade obtida, isolado por CLAE, foi suficiente apenas para a realização do ensaio enzimático, sua determinação estrutural foi feita por espectroscopia de RMN ^1H em mistura e por espectrometria de massas.

O espectro de RMN ^1H do diacetato de metil-6-gingerdioila é similar ao espectro de RMN ^1H do diacetato de 6-gingerdioila, exceto pela presença de mais um grupo metoxila (δ_{H} 3,84), ligado ao anel aromático (FIGURA 4.36A). Isso é suportado também pelo espectro de massas dessa substância, através do íon-molecular com m/z 394, que é exatamente 14 Da a mais que o íon-molecular do diacetato de 6-gingerdioila (m/z 380) (FIGURA 4.36B).

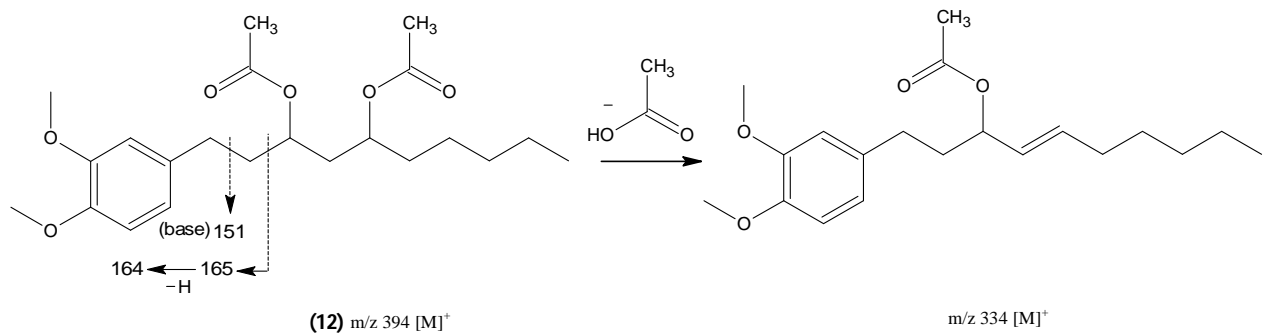


FIGURA 4.37 - Íons-fragmento majoritários do EM da substância **12**.

Os principais íons-fragmento da substância **12**, podem ser observados na FIGURA 4.37. O pico-base, m/z 151, confirma a presença de duas metoxilas ligadas ao anel aromático dessa substância (FIGURA 4.36B).

A partir dos dados obtidos e de sua comparação com dados da literatura, foi confirmada estrutura da substância (KIKUZAKI et al., 1992; JOLAD et al., 2005)

Na FIGURA 4.38 pode ser observado o espectro de RMN ^1H e de massas da zingerona isolada da espécie *Z. officinale*.

h) Zingerona

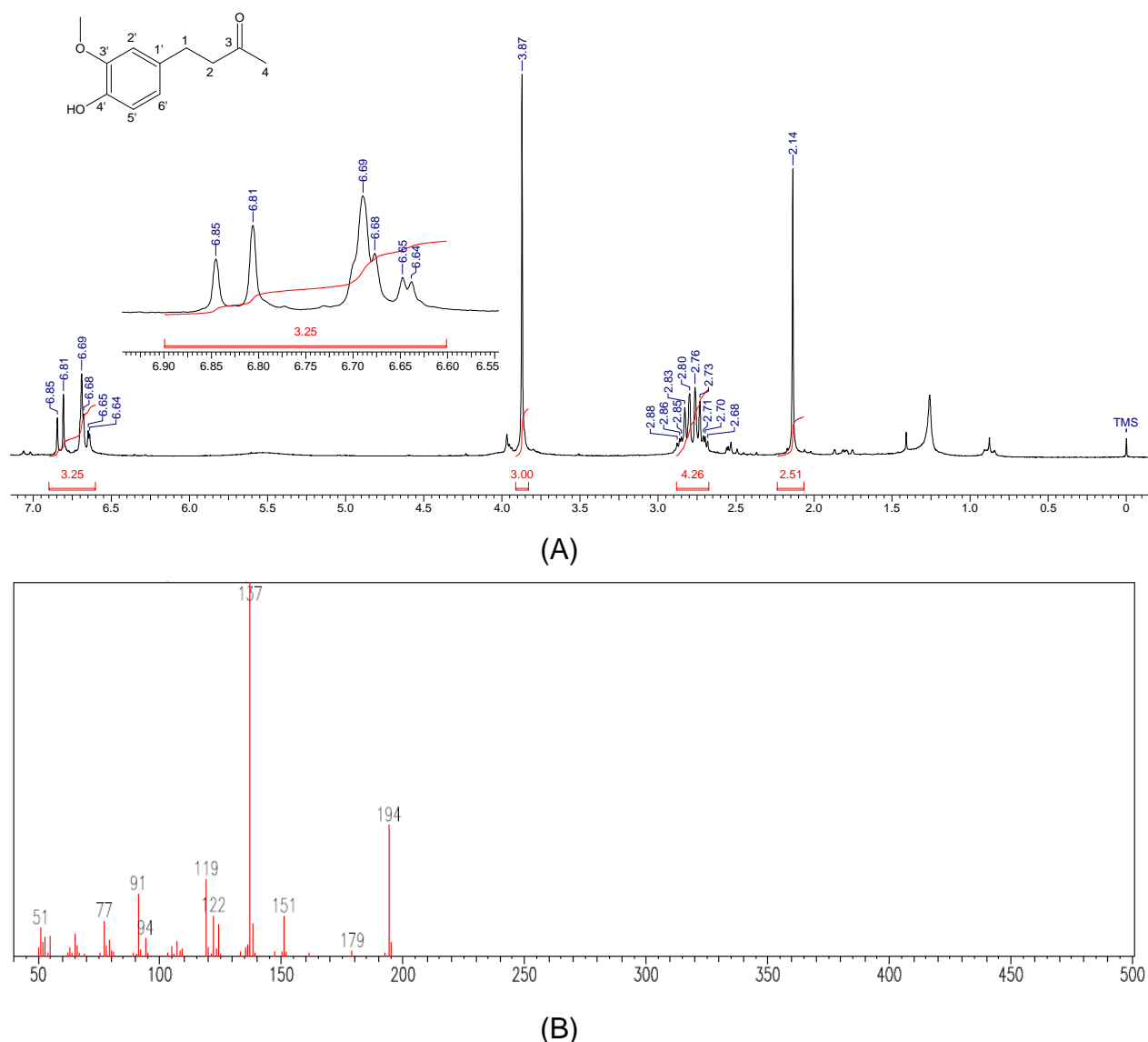


FIGURA 4.38 - Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz), com ampliação da região de aromáticos (A), e EM (IE: 70 eV) (B) da zingerona (**13**).

O espectro de RMN ^1H apresenta um singlete em δ_{H} 2,14 integrando para três hidrogênios, referente aos hidrogênios metílicos (H-4) ligados ao carbono α -carbonílico. Sinais em δ_{H} 2,6-2,9 integrando para quatro hidrogênios são referentes aos hidrogênios benzílicos (H-1) e homobenzílicos (H-2). Um singlete intenso em δ_{H} 3,87 integrando para três hidrogênios é característico de hidrogênios de metoxila ($-\text{OCH}_3$). Na região de hidrogênios aromáticos há um conjunto de sinais (δ_{H} 6,6-6,9) integrando para três hidrogênios. Esses sinais apresentam o padrão típico de anel aromático 1,3,4-trisubstituído, como no 6-gingerol (FIGURA 4.38A).

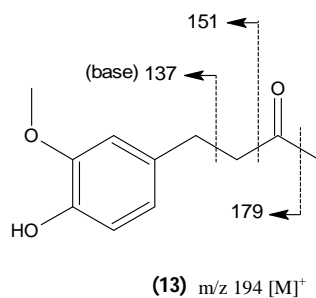


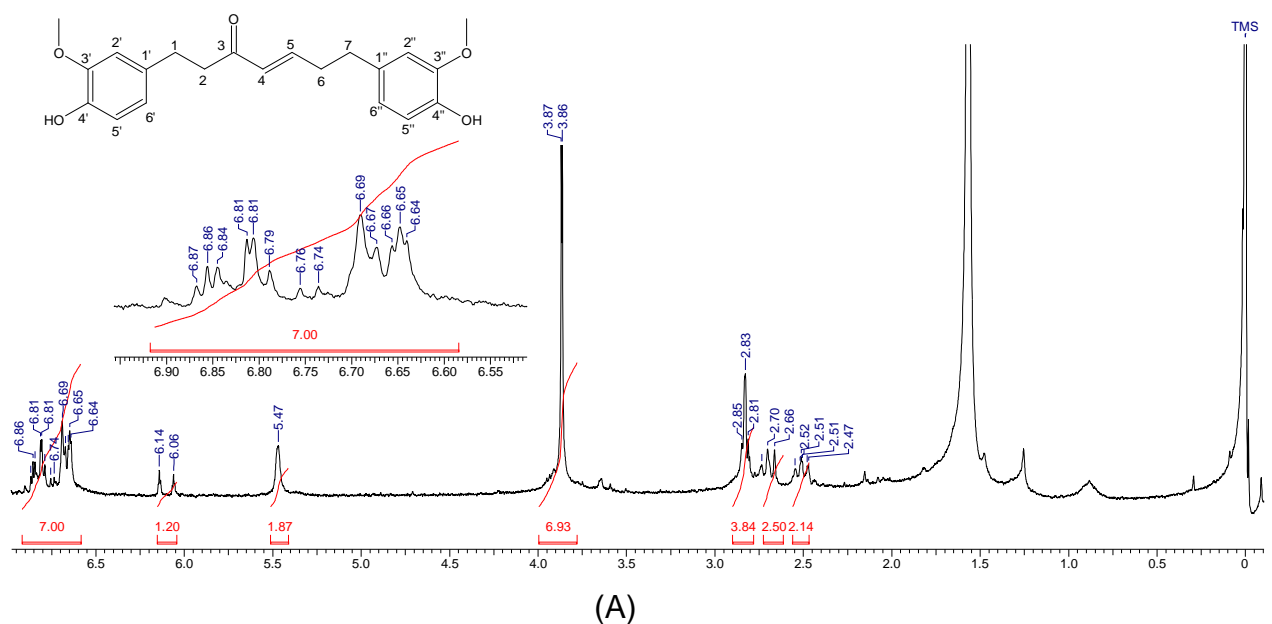
FIGURA 4.39 - Íons-fragmento majoritários do EM da substância **13**.

Os principais íons-fragmento da substância **13**, podem ser observados na FIGURA 4.39. O pico-base, m/z 137, característico dessa classe de substâncias também pode ser observado (FIGURA 4.38B).

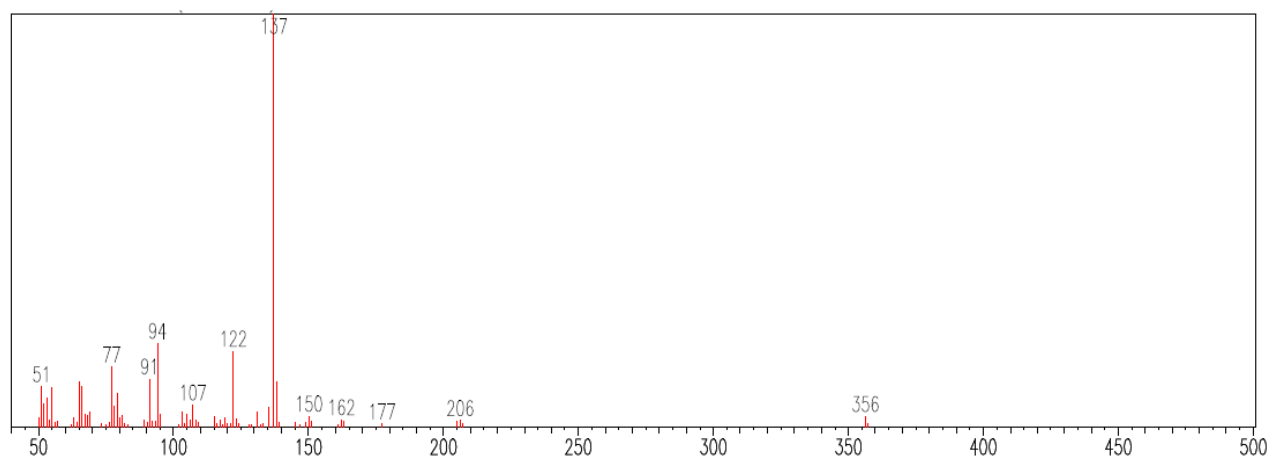
A partir dos dados obtidos e de sua comparação com dados da literatura, foi confirmada a estrutura da substância (CONNEL e SUTHERLAND, 1969; JOLAD et al., 2005).

Na FIGURA 4.40 pode ser observado o espectro de RMN 1H e de massas da gingerona A isolada da espécie *Z. officinale*.

i) Gingerenona A



(A)



(B)

FIGURA 4.40 - Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz), com ampliação da região de aromáticos (A), e EM (IE: 70 eV) (B) da gingerenona (1,7-bis-(4'-hidroxi-3'-metoxifenil)-4-hepten-3-ona) (**14**).

Do espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.40A), um conjunto de sinais em δ_{H} 2,4-2,9 integrando para oito hidrogênios, é referente aos hidrogênios metilênicos H-1, H-2, H-6 e H-7. Dois singletos bastante intensos em δ_{H} 3,86 e δ_{H} 3,87, integrando para seis hidrogênios, são referentes aos hidrogênios de duas metoxilas ($-\text{OCH}_3$) ligadas cada uma a um anel aromático. A proximidade dos deslocamentos químicos das metoxilas indica que elas estão ligadas na mesma posição de cada anel aromático. O duplo tripleto em δ_{H} 6,10 ($J = 2 \text{ Hz}$ e $J = 16 \text{ Hz}$), que integrou para um hidrogênio, é referente ao hidrogênio olefínico α -carbonílico, o qual acopla com H-5

e com os hidrogênios H-6. A constante de acoplamento de 16 Hz é característica de hidrogênios em configuração *trans*. Na região de hidrogênios aromáticos há um conjunto de sinais (δ_H 6,6-6,9) integrando para sete hidrogênios. Um dos hidrogênios desse conjunto de sinais é referente ao hidrogênio olefínico β -carbonílico (H-5). Esses sinais são característicos de dois anéis aromáticos 1,3,4-trissubstituído e tem o mesmo padrão de sinais como discutido para o 6-shogaol (FIGURA 4.40A).

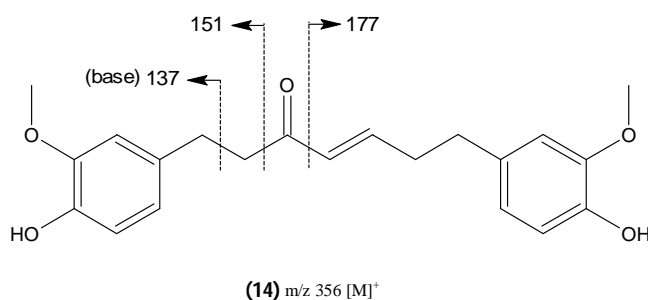


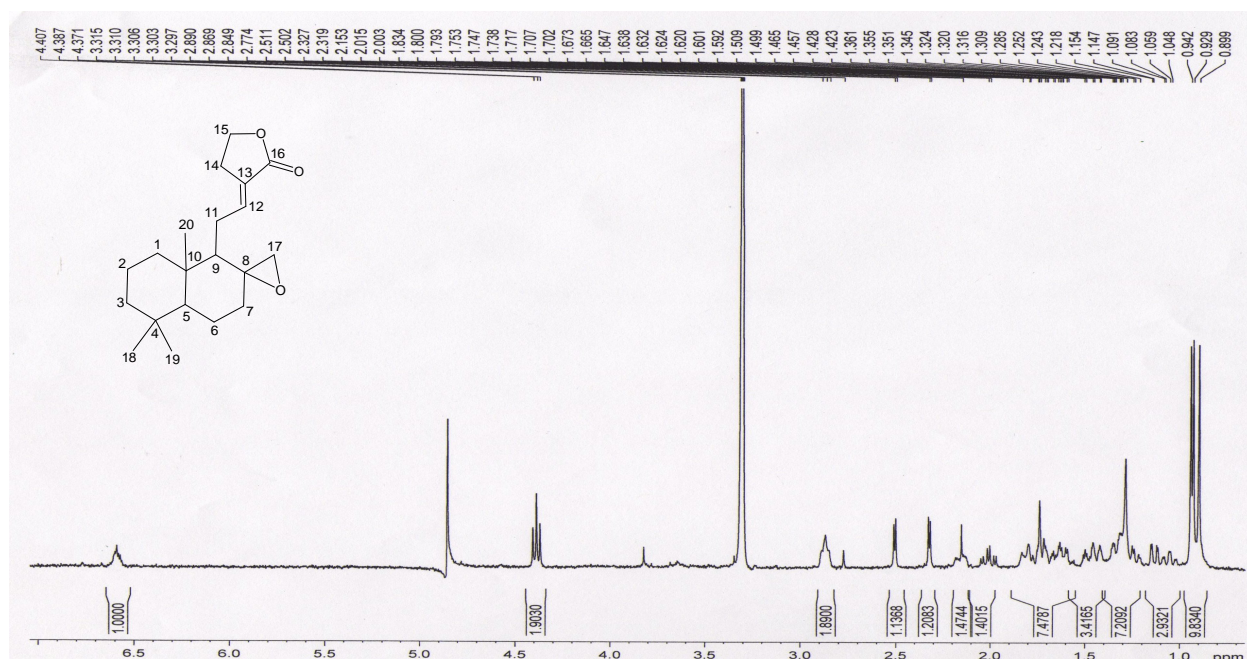
FIGURA 4.41 - Íons-fragmento majoritários do EM da substância **14**.

Os principais íons-fragmento da substância **14**, podem ser observados na FIGURA 4.41. O pico-base, m/z 137, característico dessa classe de substâncias também pode ser observado (FIGURA 4.40B).

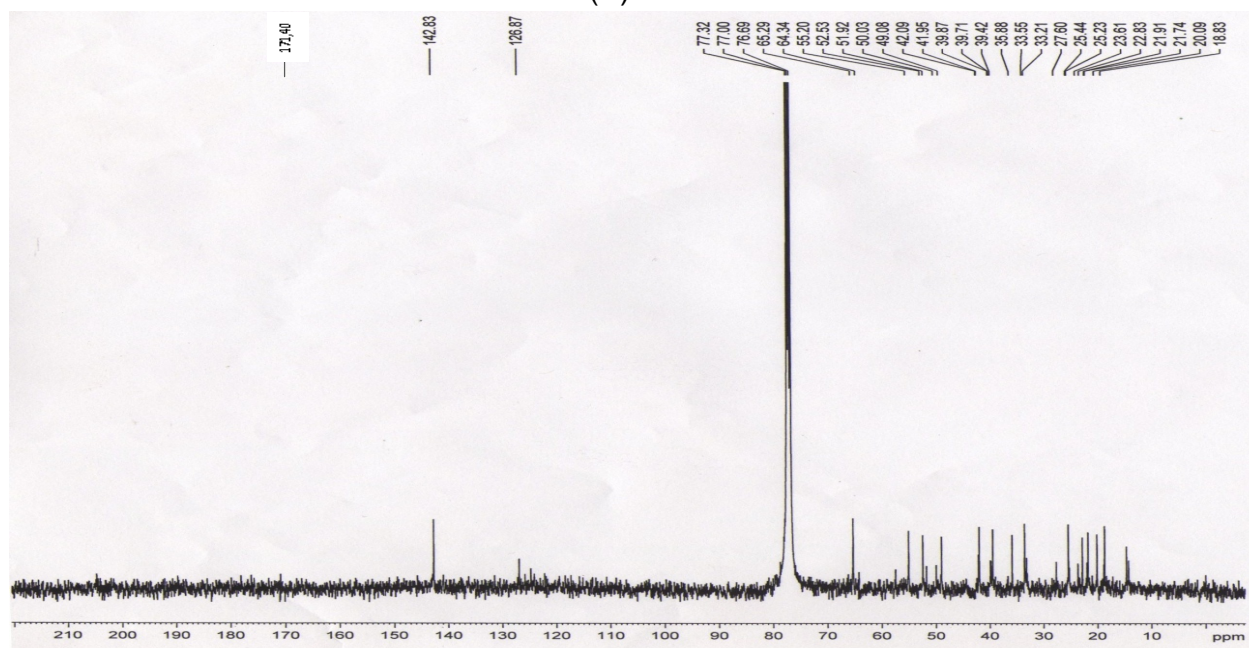
A partir dos dados obtidos e de sua comparação com dados da literatura, foi confirmada a estrutura da substância (MA et al., 2004; JOLAD et al., 2005).

Na FIGURA 4.42 pode ser observado o espectro de RMN 1H e de massas da galanolactona isolada da espécie *Z. officinale*.

j) Galanolactona



(A)



(B)

FIGURA 4.42 - Espectros de RMN ^1H (A) e ^{13}C (B) (MeOD, 400 MHz) da galanolactona (**15**).

O espectro de RMN ^1H apresenta três singletos intensos em δ_{H} 0,90, δ_{H} 0,93 e δ_{H} 0,94 integrando para nove hidrogênios (H-18, H-20 e H-19), referentes às metilas. Sinais congestionados na região de δ_{H} 1,0-1,9, integrando para doze hidrogênios são referentes aos hidrogênios H-1, H-2, H-3, H-5, H-6, H-7 e H-9. Dois

duplos dubletos coalescidos em δ_H 2,10 ($J = 5,2$ Hz e $J = 14$ Hz) integrando para um hidrogênio é referente a um dos hidrogênios metilênicos diastereotópicos γ -carboxílico (H-11a) e, um duplo dubleto coalescido em δ_H 2,15 integrando para um hidrogênio é referente ao hidrogênio metilênico diastereotópico (H-11b) geminal a este. Dois dubletos, um em δ_H 2,32 ($J = 3,6$ Hz) e outro em δ_H 2,51 ($J = 3,6$ Hz), integrando para um hidrogênio cada um, são referentes aos hidrogênios metilênicos (H-17a e H-17b) diastereotópicos do grupo epóxi. Dois tripletos, um em δ_H 2,87 (H-14) e outro em δ_H 4,39 (H-15) integrando para dois hidrogênios cada um, são referentes aos hidrogênios metilênicos do anel lactônico. Por fim, o tripleto distorcido em δ_H 6,58 integrando para um hidrogênio (H-12) é referente ao hidrogênio β -carboxílico (FIGURA 4.42A).

A comparação dos dados de RMN ^{13}C da literatura (NGO e BRONW, 1998) com os dados experimentais (FIGURA 4.42B) confirmam a identificação da galanolactona, como pode ser observado pela TABELA 4.3.

TABELA 4.3 - Dados de RMN ^{13}C da galanolactona.

C	$\delta_C^{(a)}$	δ_C (lit.) ^(b)	C	$\delta_C^{(a)}$	δ_C (lit.) ^(b)
1	39,4	39,3	11	22,8	22,8
2	18,6	18,6	12	142,8	142,9
3	42,0	41,9	13	126,8	124,8
4	33,5	33,5	14	25,4	25,4
5	55,2	54,9	15	65,3	65,4
6	20,1	20,0	16	171,4	171,4
7	35,9	35,8	17	49,1	49,1
8	57,5	57,6	18	33,5	33,5
9	52,5	52,4	19	21,7	21,8
10	39,7	39,6	20	14,6	14,6

(a) CDCl_3 , 400 MHz; (b) CDCl_3 , 300 MHz

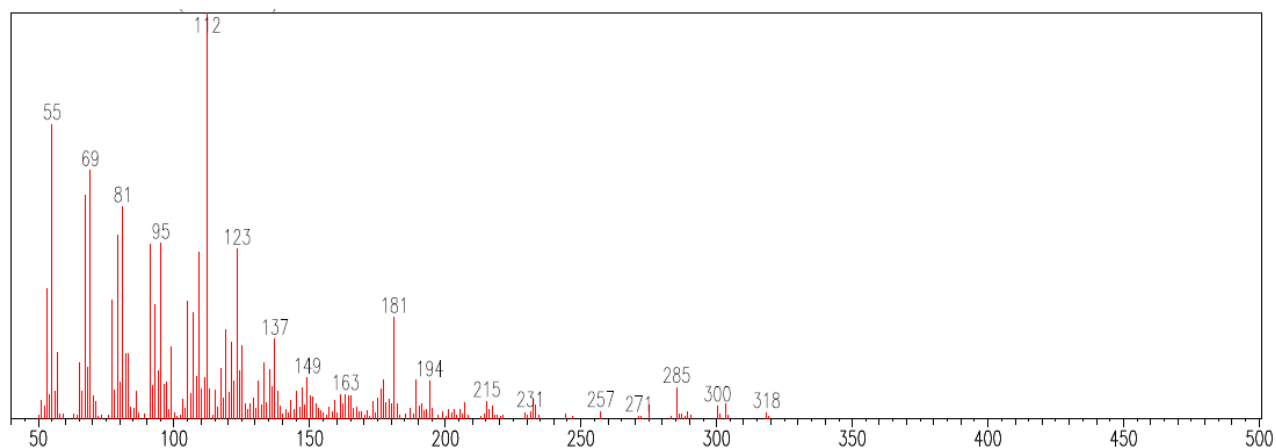


FIGURA 4.43 - Espectro de massas (IE: 70 eV) da galanolactona.

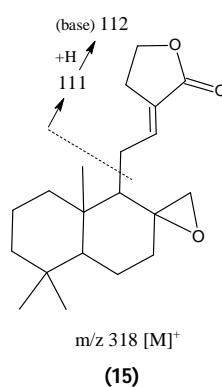
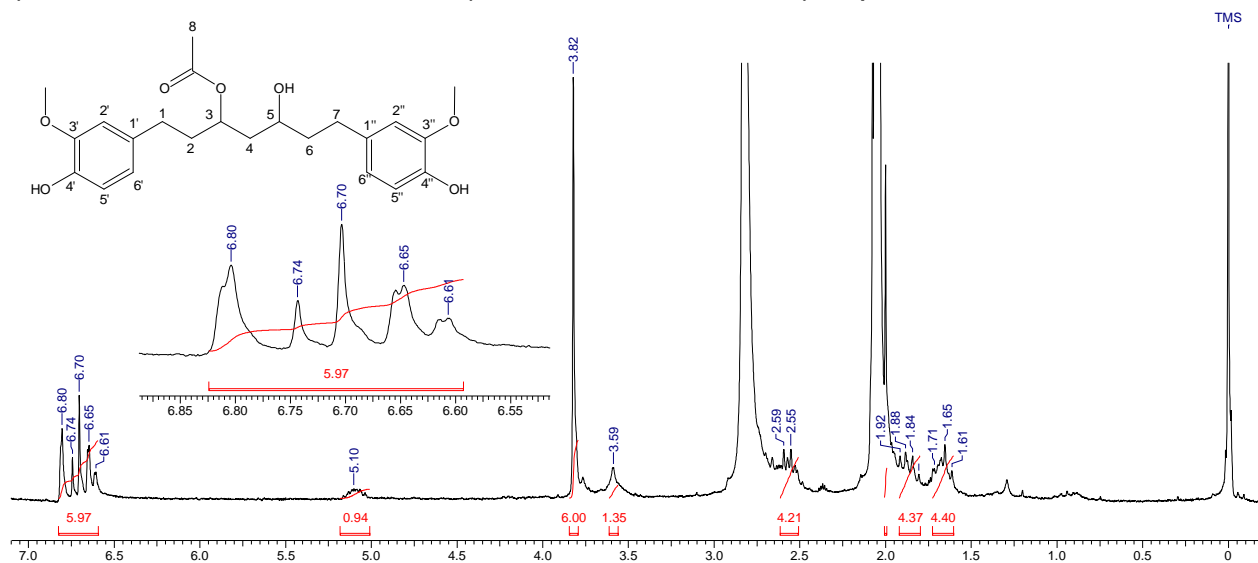


FIGURA 4.44 - Íon-fragmento majoritário do EM da substância **15**.

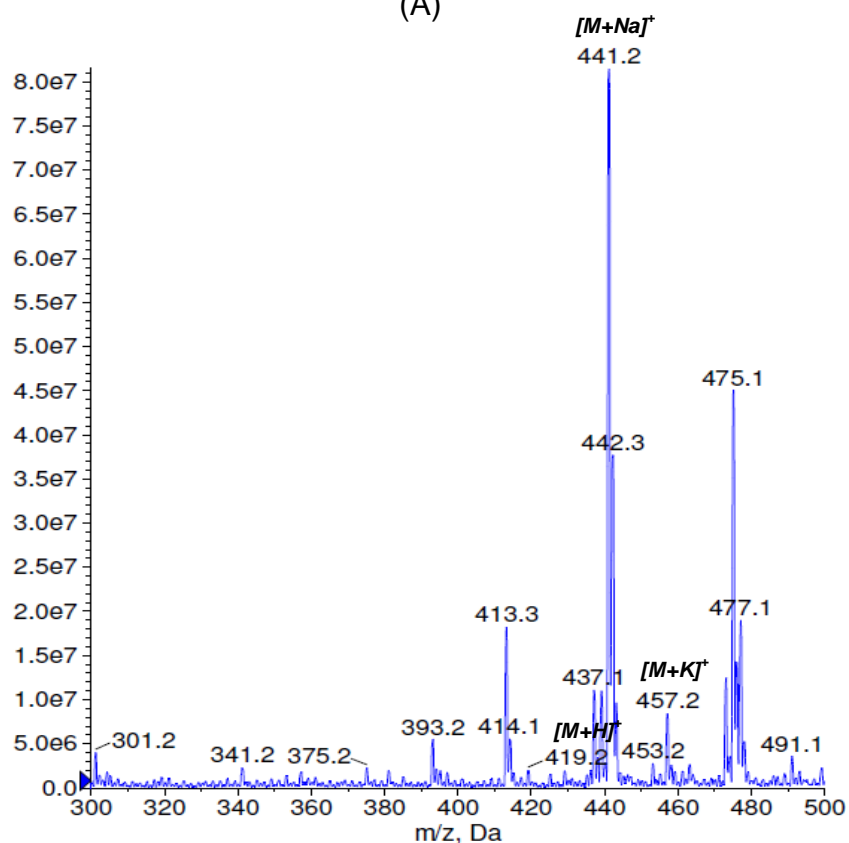
O pico-base (m/z 112) e picos referentes aos fragmentos da substância **15** podem ser observados pelo espectro de massas na FIGURA 4.43. A FIGURA 4.44 ilustra a estrutura química da substância **15** e a representação do fragmento mais intenso, m/z 112.

Na FIGURA 4.45 pode ser observado o espectro de RMN ^1H e de massas do 3-acetato de 5-hidroxi-1,7-bis-(4'-hidroxi-3'-metoxifenil)-heptila isolado da espécie *Z. officinale*.

l) 3-acetato de 5-hidroxi-1,7-bis-(4'-hidroxi-3'-metoxifenil)-heptila



(A)



(B)

FIGURA 4.45 - Espectro de RMN ^1H (CD_3COCD_3 , 200 MHz), com ampliação da região de aromáticos (A) e de EM, com ionização por elétron-spray no modo positivo (B) do 3-acetato de 5-hidroxi-1,7-bis-(4'-hidroxi-3'-metoxifenil)-heptila (17).

No espectro de RMN ^1H um conjunto de sinais em δ_{H} 1,6-1,8 (H-4, H-6), δ_{H} 1,8-1,95 (H-2), δ_{H} 2,5-2,9 (H-1, H-7) integrando para quatro, dois e quatro

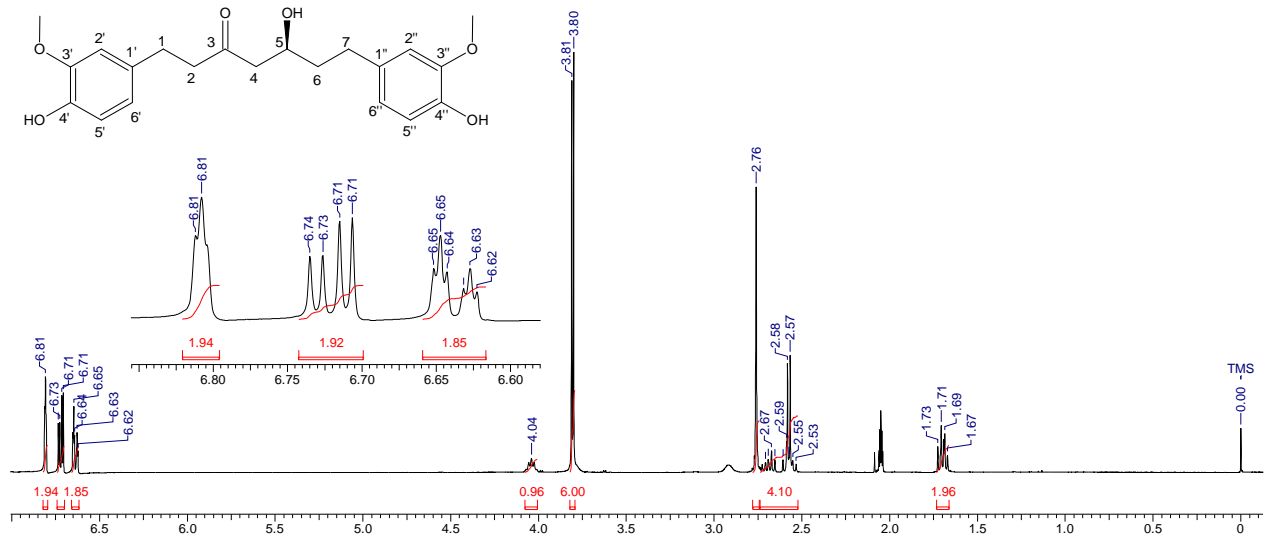
hidrogênios, respectivamente são referentes aos hidrogênios metilênicos. Um singlete intenso em δ_H 2,00 integrando para três hidrogênios é referente aos hidrogênios metílicos (H-8) do grupo acetato. Outro singlete intenso em δ_H 3,82 integrando para seis hidrogênios é referente aos hidrogênios de duas metoxilas (-OCH₃) ligadas cada uma a um anel aromático. O mesmo deslocamento químico das metoxilas indica que elas têm o mesmo ambiente químico, ou seja, estão ligadas em posições semelhantes em cada anel aromático. Os sinais em δ_H 3,59 e δ_H 5,10 integrando para um hidrogênio cada, são referentes aos hidrogênios oximetínicos (H-5 e H-3). Na região de hidrogênios aromáticos há um conjunto de sinais (δ_H 6,6-6,9) integrando para seis hidrogênios característicos de dois anéis aromáticos 1,3,4-trissubstituído. O duplo dubleto em δ_H 6,63 ($J=8,0$ Hz) integrando para dois hidrogênios é referente aos hidrogênios 6' e 6''. O dubleto (δ_H 6,72, $J=7,8$ Hz) integrando para dois hidrogênios, são referentes aos hidrogênios 5' e 5''. O dubleto distorcido (δ_H 6,81, $J=1,4$ Hz) integrando para dois hidrogênios é referente aos hidrogênio 2' e 2'' (FIGURA 4.45A).

Analisando o espectro de massas do 3-acetato de 5-hidroxi-1,7-bis-(4'-hidroxi-3'-metoxifenil)-heptila (FIGURA 4.45B), observa-se o pico do íon *quasi*-molecular $[M+1]^+$ m/z 419,2, o pico do aduto de potássio $[M+39]^+$ m/z 457,2, e o pico do aduto de sódio $[M+23]^+$ m/z 441,2, como pico-base.

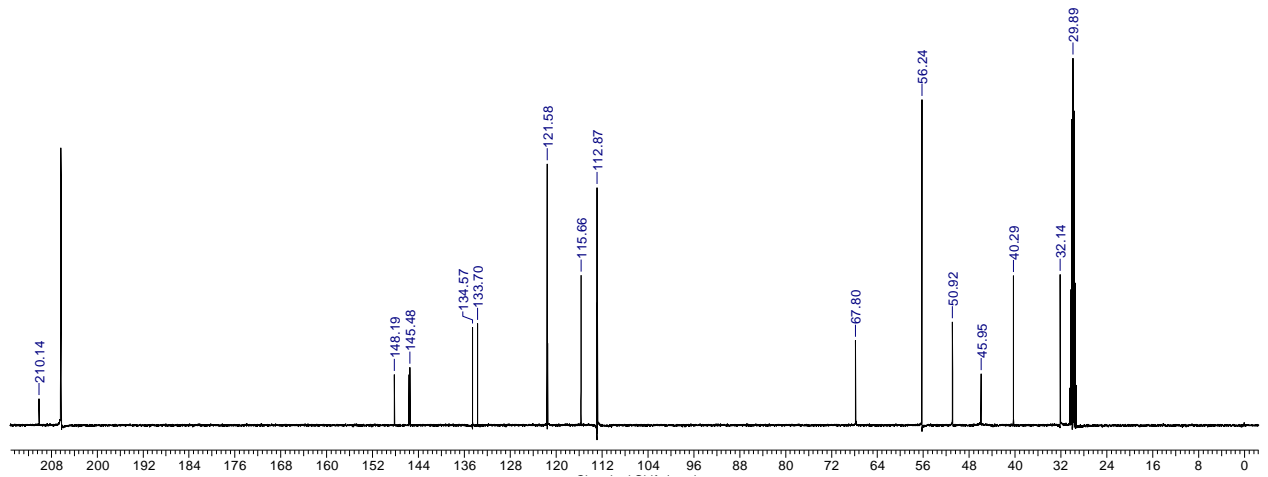
A partir dos dados obtidos e de sua comparação com dados da literatura, foi confirmada a estrutura da substância (MA et al., 2004; JOLAD et al., 2005).

Na FIGURA 4.46 pode ser observado o espectro de RMN ¹H e ¹³C da *hexaidrocurcumina* isolada da espécie *Z. officinale*.

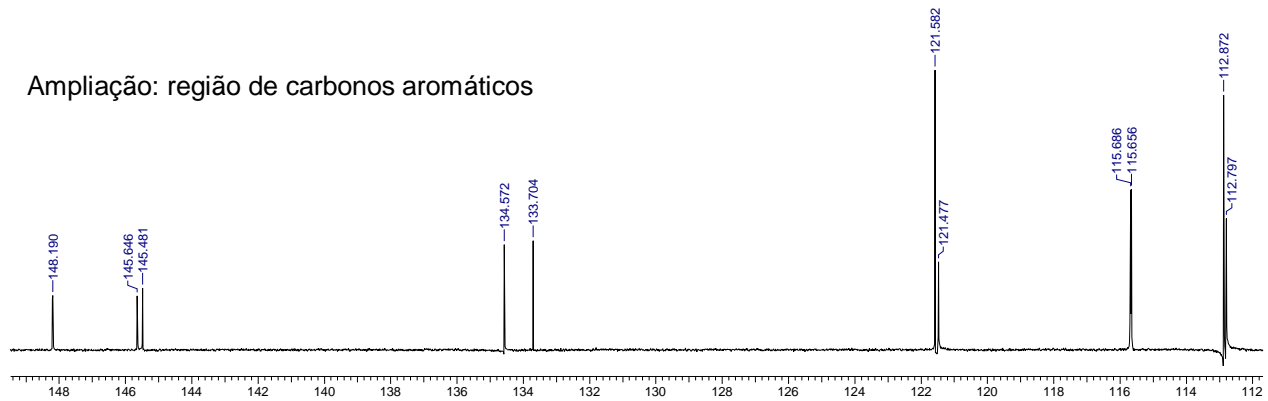
m) Hexaidrocurcumina



(A)



Ampliação: região de carbonos aromáticos



(B)

FIGURA 4.46 - Espectro de RMN ^1H (A), RMN ^{13}C , com ampliação da região de aromáticos (B) (CD_3COCD_3 , 400 MHz) da hexaidrocurcumina (**18**).

O espectro de RMN ^1H apresenta um conjunto de sinais integrando para dois hidrogênios em δ_{H} 1,6-1,8 (H-6) e para quatro hidrogênios em δ_{H} 2,5-2,6

(H-2, H-4) e δ_H 2,6-2,8 (H-1, H-7), referentes aos hidrogênios metilênicos dessa substância. Dois singletos intensos (δ_H 3,80 e δ_H 3,81), integrando para seis hidrogênios, são referentes aos hidrogênios de duas metoxilas (-OCH₃) ligadas cada uma a um anel aromático. A proximidade dos deslocamentos químicos das metoxilas indica que elas estão ligadas em posições semelhantes em cada anel aromático. Um quintupeto em δ_H 4,04 integrando para um hidrogênio é referente ao hidrogênio oximetínico (H-5). Na região de hidrogênios aromáticos há um conjunto de sinais em δ_H 6,6-6,9, integrando para seis hidrogênios, que são característicos de dois anéis aromáticos 1,3,4-trissubstituído. Dois duplos dubletos fundidos em δ_H 6,64 ($J=2,0$ Hz, $J=8,0$ Hz) integrando para dois hidrogênios, é referente aos hidrogênios 6' e 6''. Dois dubletos (δ_H 6,72, $J=8,0$ Hz e δ_H 6,72, $J=8,0$) integrando para dois hidrogênios, são referentes aos hidrogênios 5' e 5''. O dubleto distorcido (δ_H 6,81, $J=3,2$ Hz) integrando para dois hidrogênios é referente aos hidrogênios 2' e 2'' (FIGURA 4.46A).

Os sinais referentes aos carbonos metilênicos são: δ_C 29,8; 32,14; 40,29; 45,95; 50,92 e 56,24. O sinal referente ao carbono oximetínico é δ_C 67,80. Os sinais dos carbonos na região de aromáticos se apresentaram com uma pequena diferença de deslocamento entre os dois anéis: δ_C 112,80 e 112,87 (C-2' e C-2''), δ_C 115,66 e 115,69 (C-5' e C-5''), δ_C 121,48 e 121,58 (C-6' e C-6''), δ_C 133,70 e 134,57 (C-1' e C-1''), δ_C 145,48 e 145,65 (C-4' e C-4''), δ_C 148,19 (C-3' e C-3''). O sinal da carbonila tem deslocamento químico característico em δ_C 210,14 (FIGURA 4.46B).

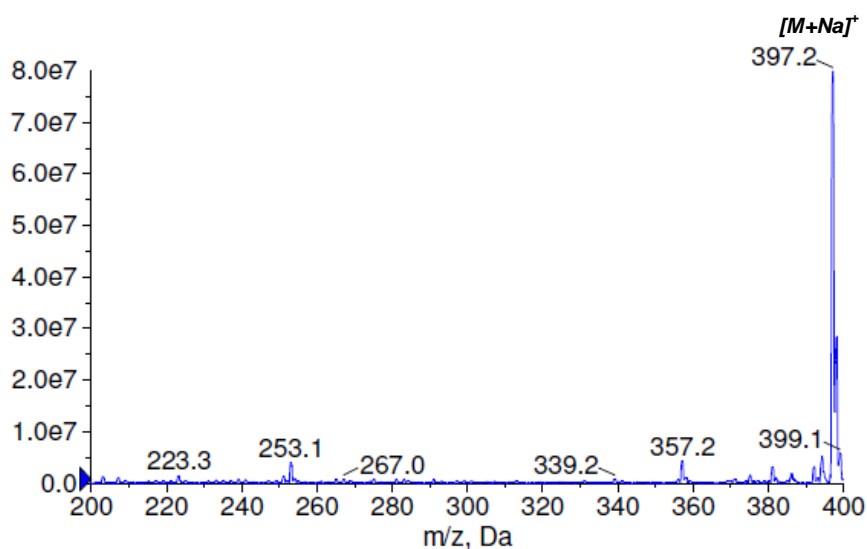


FIGURA 4.47 - Espectro de massas da hexaidrocurcumina (**18**). Ionização por elétron-spray no modo positivo.

Pode ser observado na FIGURA 4.47 o espectro de massas da hexaidrocurcumina, apresentando como pico-base o aduto de sódio $[M+23]^+$ m/z 397,2, indicando que a massa molar da substância (374 g/mol) está de acordo com a substância identificada.

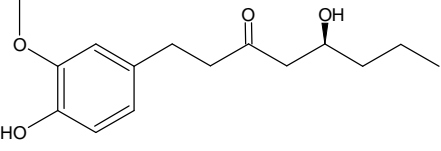
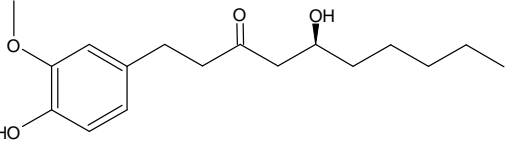
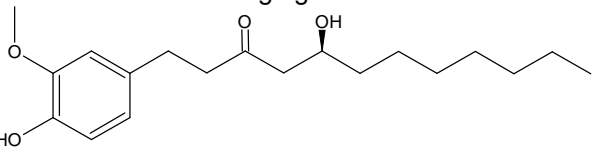
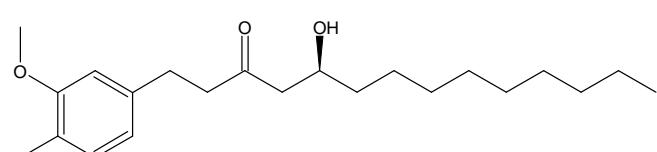
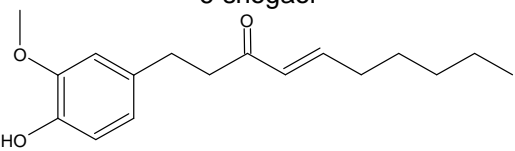
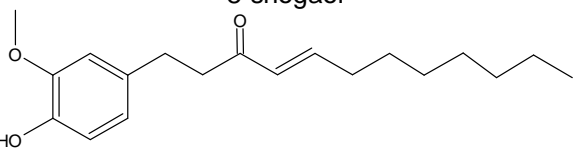
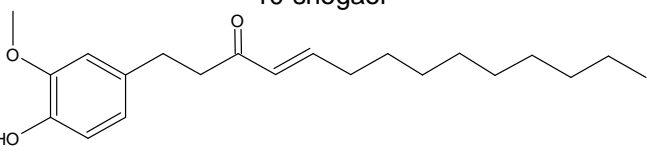
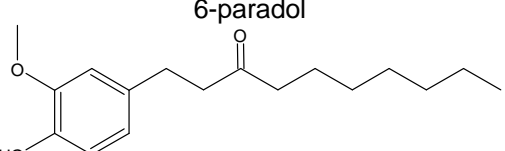
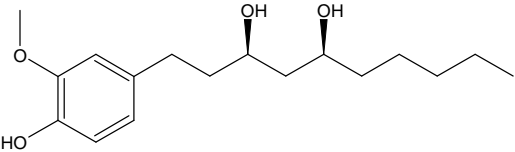
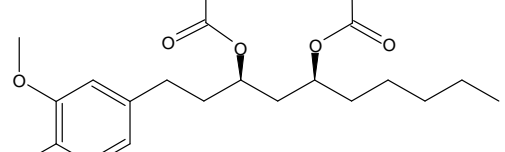
A rotação óptica desta substância foi determinada, e por comparação com dados da literatura, conclui-se que a substância é (S)-hexaidrocurcumina. O $[\alpha]_D^{24}$ (CHCl_3 , c 1,7) desta substância foi +11,7, enquanto que, segundo KIKUZAKI et al. (1991) o $[\alpha]_D^{20}$ da (S)-hexaidrocurcumina autêntica é +9,0° (CHCl_3 , c 1,68). Já UEHARA et al. (1987), isolaram esta substância como uma mistura racêmica. KIKUZAKI et al. (1991) determinaram a configuração absoluta da hexaidrocurcumina através de comparações com dados espectrais da curcumina isolada de *Curcuma longa* e de alguns de seus derivados obtidos por derivatização.

A partir dos dados obtidos e de sua comparação com dados da literatura, foi confirmada a estrutura da substância (KIKUZAKI et al., 1991; JOLAD et al., 2005).

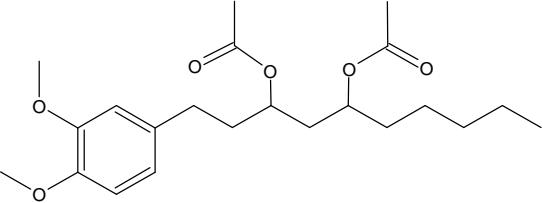
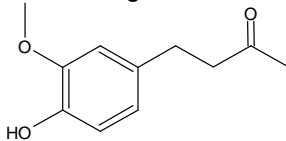
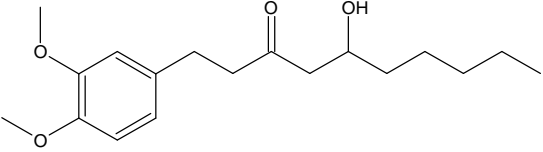
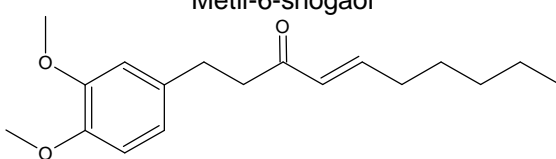
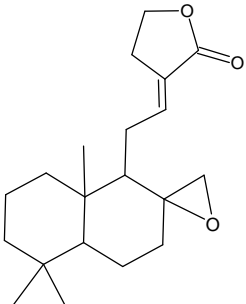
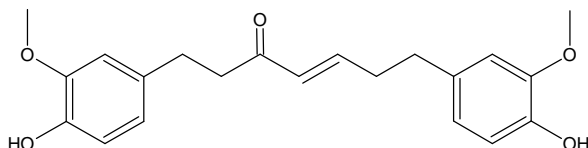
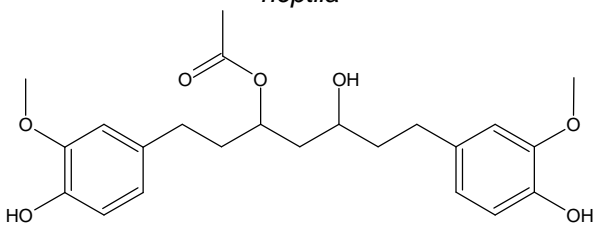
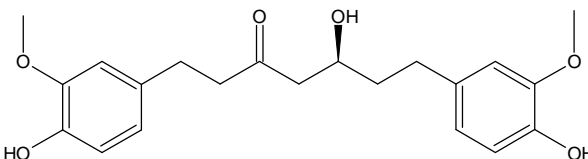
4.1.1.1.4 - Determinação dos valores de IC_{50} de algumas substâncias isoladas

Como pode ser observado na TABELA 4.4, as dezoito substâncias isoladas da espécie *Z. officinale* foram ensaiadas quanto ao seu poder inibitório frente a catepsina K, e aquelas que apresentaram inibição maior que 60%, selecionadas para a determinação de seus valores de IC_{50} , que foram determinados através de uma equação parabólica quadrada, utilizando o “software” Microcal Origin 6.

TABELA 4.4 - Substâncias isoladas da fração diclorometano do extrato dos rizomas de *Z. officinale*, e suas atividades de inibição frente a catepsina K, a 125 μ M.

<p style="text-align: center;">4-gingerol</p>  <p style="text-align: center;">Inibição (%)= 7,76 \pm 1,15</p>	<p style="text-align: center;">6-gingerol</p>  <p style="text-align: center;">Inibição (%)= 5,95 \pm 1,96</p>
<p style="text-align: center;">8-gingerol</p>  <p style="text-align: center;">Inibição (%)= 25,31 \pm 0,98</p>	<p style="text-align: center;">10-gingerol</p>  <p style="text-align: center;">Inibição (%)= 75,52 \pm 0,13</p>
<p style="text-align: center;">6-shogaol</p>  <p style="text-align: center;">Inibição (%)= 26,78 \pm 0,22</p>	<p style="text-align: center;">8-shogaol</p>  <p style="text-align: center;">Inibição (%)= 67,86 \pm 1,50</p>
<p style="text-align: center;">10-shogaol</p>  <p style="text-align: center;">Inibição (%)= 86,31 \pm 0,08</p>	<p style="text-align: center;">6-paradol</p>  <p style="text-align: center;">Inibição (%)= 0</p>
<p style="text-align: center;">6-gingerdiol</p>  <p style="text-align: center;">Inibição (%)= 65,97 \pm 0,76</p>	<p style="text-align: center;">Diacetato de 6-gingerdiola</p>  <p style="text-align: center;">Inibição (%)= 86,75 \pm 0,06</p>

Continuação da TABELA 4.4.

<p>Diacetato de metil-6-gingerdioila</p>  <p>Inibição (%)= 0</p>	<p>Zingerona</p>  <p>Inibição (%)= 2,90 ± 4,02</p>
<p>Metil-6-gingerol</p>  <p>Inibição (%)= 49,76 ± 2,52</p>	<p>Metil-6-shogaol</p>  <p>Inibição (%)= 47,55 ± 0,98</p>
<p>Galanolactona</p>  <p>Inibição (%)= 13,54 ± 2,43</p>	<p>Gingerenona A</p>  <p>Inibição (%)= 17,00 ± 0,38</p>
<p>3-acetato de 5-hidroxi-1,7-bis-(4'-hidroxi-3'-metoxifenil)-heptila</p>  <p>Inibição (%)= 51,72 ± 0,60</p>	<p>Hexaidrocurcumina</p>  <p>Inibição (%)= 7,19 ± 16,94</p>

Como pode ser observada na TABELA 4.4 a série homóloga dos gingeróis (4, 6, 8 e 10-gingerol) apresentaram atividades de inibição cada vez maiores, com o aumento da cadeia alquílica lateral, mostrando a importância do comprimento da cadeia lateral para a atividade de inibição frente à catepsina K. Da mesma forma para a série homóloga dos shogaios (6, 8 e 10-shogaol), quanto maior a cadeia lateral, maior é atividade destas substâncias.

Comparando agora as substâncias com o mesmo tamanho de cadeia lateral, pode-se observar a importância da ligação α,β -carbonila no 6-shogaol,

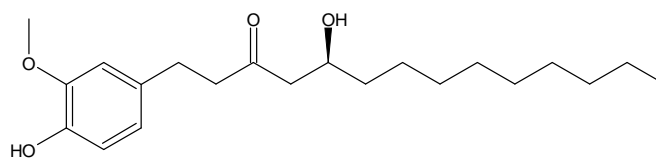
quando comparado ao 6-gingerol. Esta insaturação contribui positivamente para o aumento da atividade de inibição enzimática. Já para o 6-paradol, a ausência da hidroxila na posição 5, faz que com a atividade frente à catepsina K seja perdida.

A presença da metoxila adicional no metil-6-gingerol e no metil-6-shogaol comparando com o 6-gingerol e 6-shogaol, respectivamente, faz com que a atividade de inibição enzimática seja aumentada, mostrando a importância dessas metoxilas nestas duas substâncias. Já para o diacetato de metil-6-gingerdioila o grupo metoxila adicional, comparando-o com o acetato de 6-gingerdioila, reduziu significativamente sua atividade frente à catepsina K.

Dentre os diarileptanoides, o 3-acetato de 5-hidroxi-1,7-bis-(4'-hidroxi-3'-metoxifenil)-heptano, foi o que apresentou maior atividade, provavelmente por um efeito adicional de interação com a catepsina K, exercido pelo grupo acetato.

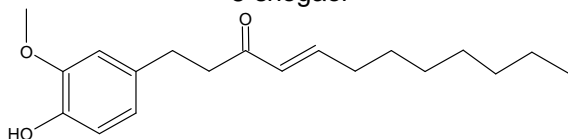
TABELA 4.5 - Substâncias mais ativas isoladas da fração de diclorometano do extrato de rizomas *Z. officinale*, com seus respectivos valores de IC_{50} frente a catepsina K.

10-gingerol



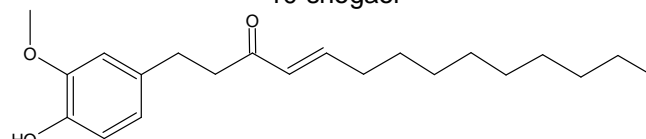
$IC_{50}=10,38 \pm 0,18 \mu M$

8-shogaol



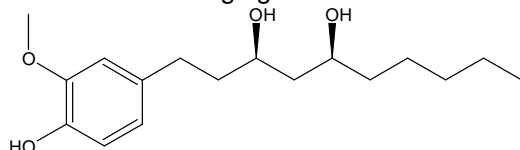
$IC_{50}=21,07 \pm 2,39 \mu M$

10-shogaol



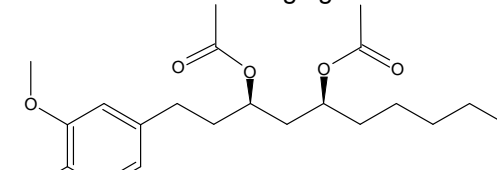
$IC_{50}=5,84 \pm 0,35 \mu M$

6-gingerdiol



$IC_{50}=54,40 \pm 2,41 \mu M$

Diacetato de 6-gingerdioila



$IC_{50}=55,34 \pm 3,85 \mu M$

Podem ser observadas na TABELA 4.5, as substâncias que apresentaram maior atividade de inibição frente à catepsina K com seus respectivos valores de IC_{50} . Mais uma vez observa-se a importância da ligação α,β -carbonila e do maior comprimento da cadeia lateral para a atividade frente à catepsina K. Entre o 6-gingerdiol e o diacetato de 6-gingerdioila, não houve diferença em suas atividades, indicando a não influência dos grupos acetatos para a atividade de inibição enzimática, nestas moléculas. As substâncias mais ativas foram: 10-gingerol e 10-shogaol.

Vale ressaltar a importância da pureza enantiomérica em ensaios biológicos, pois enzimas, receptores de membrana, ADN e transportadores de fármacos dentre outras macromoléculas existentes em sistemas *in vivo* são capazes de discriminar substâncias que apresentam quiralidades diferentes, fazendo com que estes estereoisômeros possam apresentar atividades completamente distintas, pois suas propriedades bioquímicas e biofísicas podem diferir significativamente (SMITH, 2009).

O 10-gingerol e o 6-shogaol foram as substâncias isoladas de *Z. officinale* selecionadas para os estudos mais aprofundados, que consistiu em: determinar os parâmetros cinéticos de inibição frente à catepsina K, determinar a concentração da substância menos tóxica para as células, determinar a inibição frente à catepsina K e inibição da produção de um importante mediador inflamatório (óxido nítrico), em células.

Apesar do 6-shogaol ter apresentado baixa atividade de inibição enzimática ($IC_{50}=154,94 \pm 1,71 \mu\text{M}$), ele foi selecionado por sua facilidade de obtenção e por sua boa atividade anti-inflamatória, em comparação aos outros gingeróis (DUGASANI et al., 2010).

4.1.1.2 - Estudo biomonitorado da fração *n*-hexânica dos rizomas de *Z. officinale*

A fração *n*-hexânica teve uma excelente atividade de inibição (acima de 80%) frente à catepsina K, e por isso, um fracionamento desta fração foi realizado a fim de se descobrir as substâncias responsáveis por tal atividade inibitória. Após este fracionamento, uma mistura de sesquiterpenos foi obtida. Esta mistura foi ensaiada frente à catepsina K, resultando em uma excelente atividade de inibição enzimática.

4.1.1.2.1 - Identificação estrutural dos componentes majoritários da fração *n*-hexano de *Z. officinale*

Na FIGURA 4.48 pode ser observado o cromatograma obtido por CG da mistura de sesquiterpenos oriunda da partição *n*-hexano. A mistura é constituída de quatro isômeros com massa molecular de 204 g/mol e um composto com massa molecular 202 g/mol. A identificação foi realizada por comparação dos espectros de massa utilizando bancos de dados, e através do índice de retenção tabelados (TABELA 4.6) (ADAMS, 2007).

TABELA 4.6 - Índice de retenção dos compostos majoritários da fração *n*-hexânica obtida do extrato bruto dos rizomas de *Z. officinale*.

Composto	Índice de retenção (experimental)	Índice de retenção (literatura*)
α -curcumeno	1456	1479
α -Zingibereno	1470	1493
α -Farneseno	1487	1505
β -Bisaboleno	1496	1505
β -Sesquifelandreno	1522	1521

*ADAMS, 2007.

O composto majoritário foi identificado como, α -zingibereno. Os espectros de massas e suas estruturas podem ser observados nas FIGURAS 4.49, 4.50, 4.51, 4.52 e 4.53.

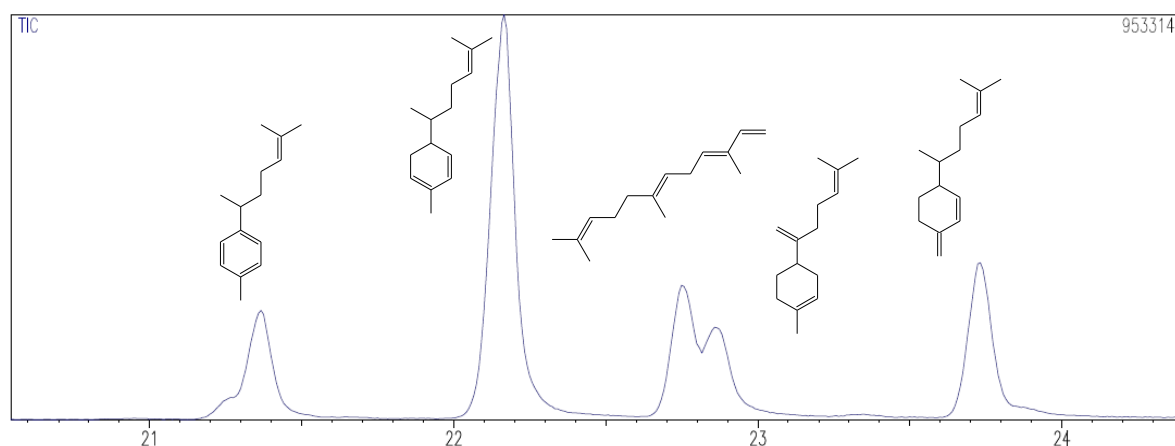


FIGURA 4.48 - Cromatograma, obtido por CG, da mistura de sesquiterpenos isolada e identificada da fração *n*-hexânica. Rampa de aquecimento: 100-5/2-150-0.

Os tempos de retenções (t_R) do α -curcumeno, α -zingibereno, α -farneseno, β -bisaboleno, β -sesquifelandreno foram: 21,3; 22,2; 22,8; 22,9; 23,7 minutos.

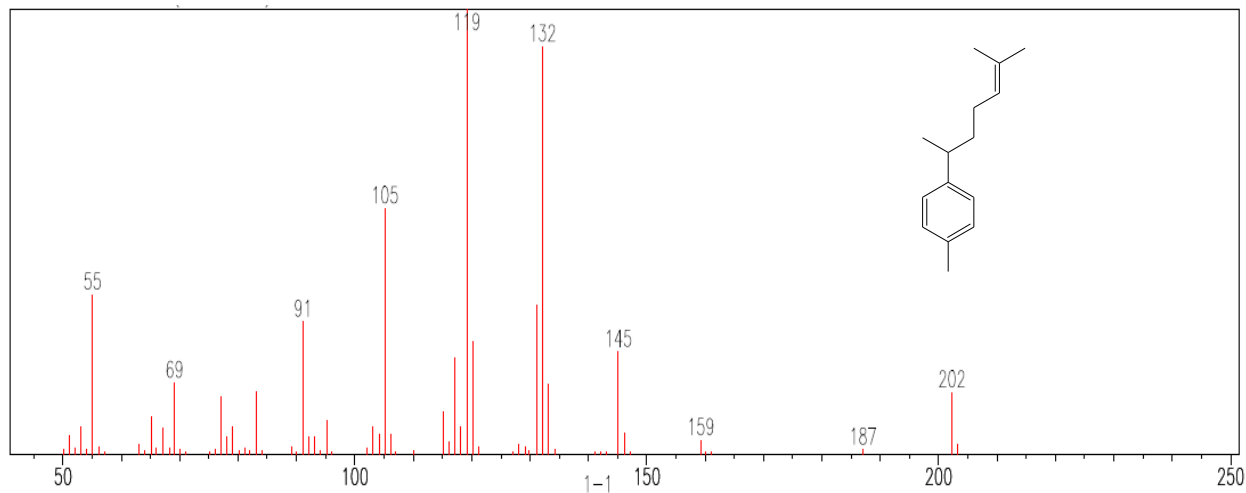


FIGURA 4.49 - Espectro de massas (IE: 70 eV) do α -curcumeno.

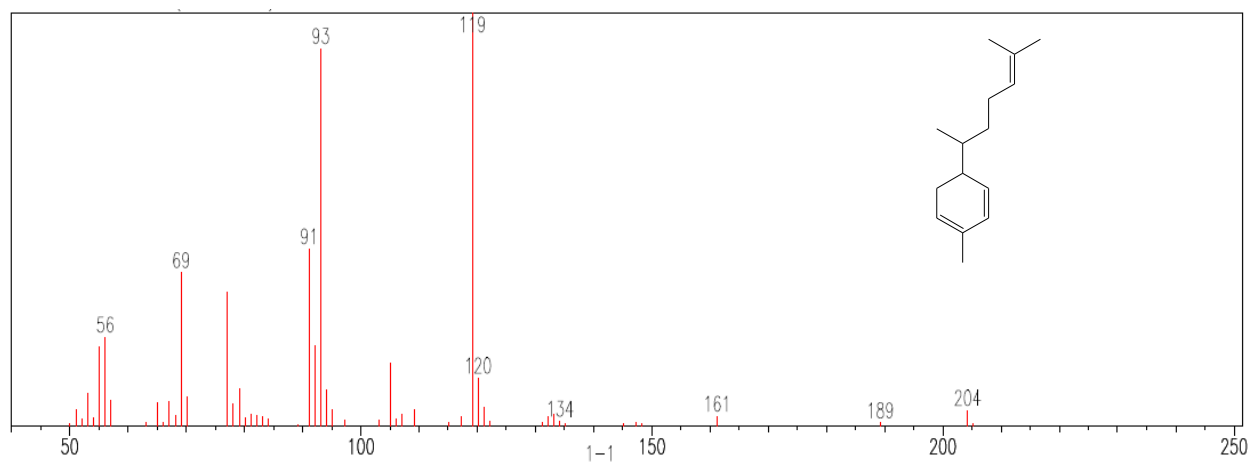


FIGURA 4.50 - Espectro de massas (IE: 70 eV) do α -zingibereno.

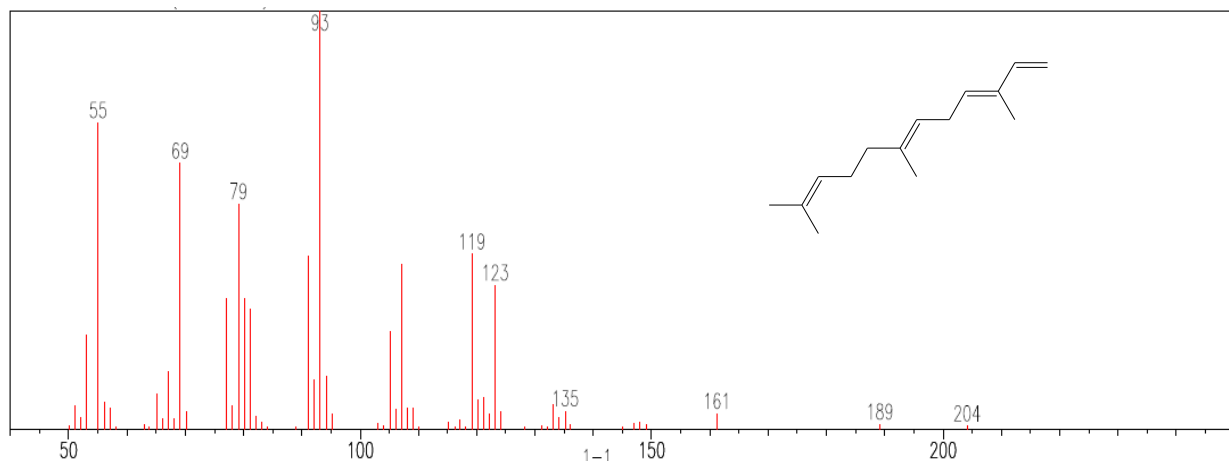


FIGURA 4.51 - Espectro de massas (IE: 70 eV) do (E,E)- α -farneseno.

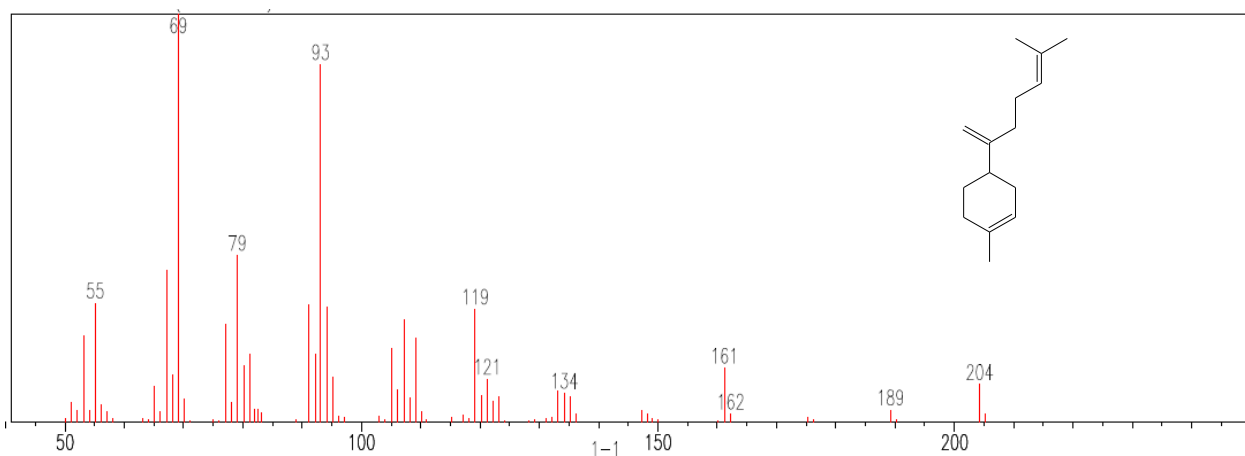


FIGURA 4.52 - Espectro de massas (IE: 70 eV) do β -bisaboleno.

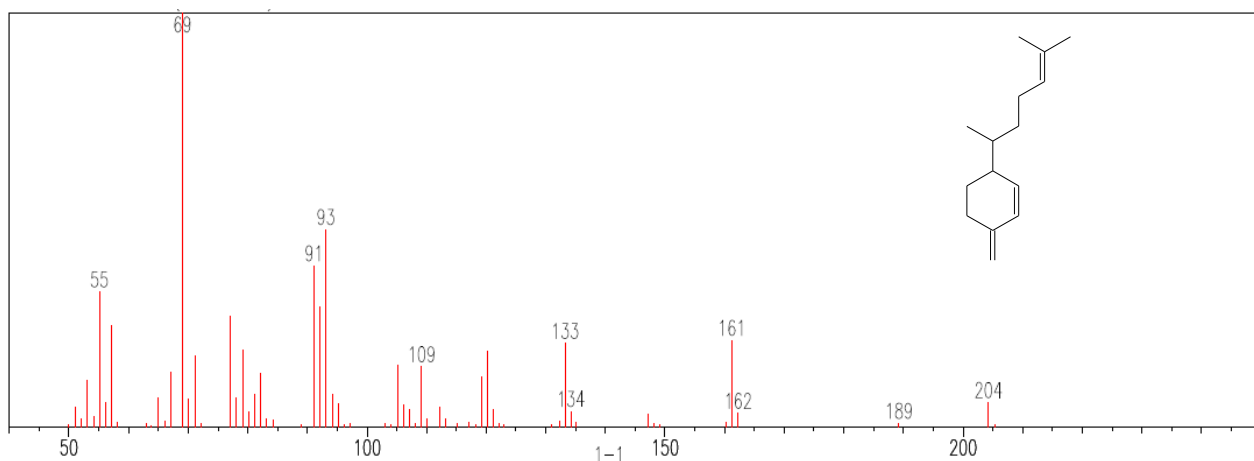


FIGURA 4.53 - Espectro de massas (IE: 70 eV) do β -sesquifelandreno.

4.1.1.2.2 - Determinação do IC₅₀ da mistura de sesquiterpenos

Ensaio de inibição frente à catepsina K foram realizados com a mistura de sesquiterpenos (FIGURA 4.54).

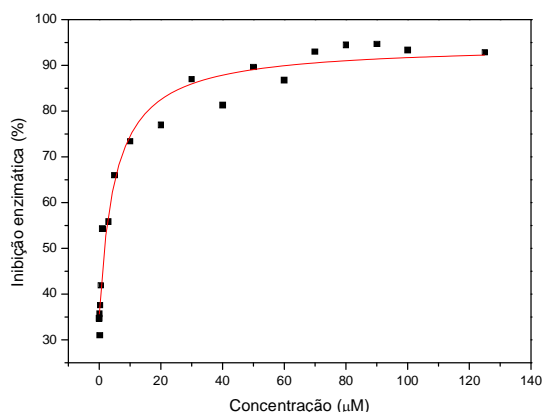


FIGURA 4.54 - Curva de inibição frente à catepsina K, da mistura de sesquiterpenos, utilizada para a determinação do valor de IC₅₀.

Como a mistura de sesquiterpenos obtida a partir da fração *n*-hexânica apresentou uma boa atividade de inibição enzimática (IC₅₀ = 1,61 ± 0,23 µg/mL), achou-se conveniente fazer uma extração do óleo essencial do gengibre e ensaiá-lo frente à catepsina K, esperando-se que ele tivesse uma potência inibitória similar, já que estes sesquiterpenos são encontrados em abundância no óleo essencial (SINGH et al., 2008; ZANCAN et al., 2002).

4.1.1.3 - Obtenção do óleo essencial dos rizomas de *Z. officinale*

Extração do óleo essencial dos rizomas de *Z. officinale* foi realizada utilizando um aparato de destilação simples como descrito no Item 3.3.1, em Material e Métodos.

4.1.1.3.1 - Identificação estrutural dos componentes majoritários do óleo essencial dos rizomas de *Z. officinale*

A identificação dos compostos foi realizada por comparação dos espectros de massa (FIGURAS 4.56, 4.57, 4.58, 4.59, 4.60 e 4.61) utilizando bancos

de dados, e através do índice de retenção tabelados (ADAMS, 2007) como pode ser observado na TABELA 4.7.

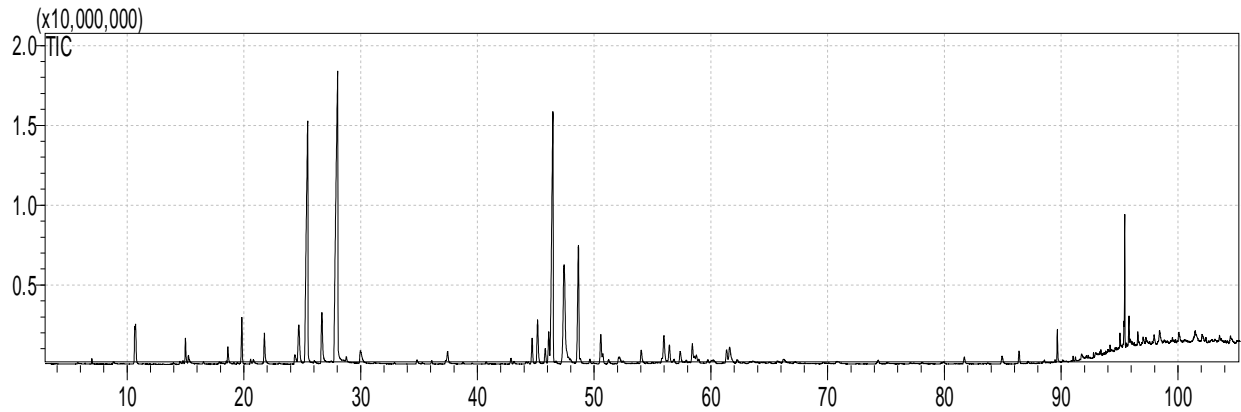
TABELA 4.7 - Índice de retenção dos sesquiterpenos majoritários do óleo essencial obtido dos rizomas de *Z. officinale*.

Composto	Índice de retenção (experimental)	Índice de retenção (literatura*)
α -curcumeno	1483	1479
α -Zingibereno	1487	1493
α -Farneseno	1499	1505
β -Sesquifelandreno	1514	1521
<i>Neral</i>	1229	1235
<i>Geranial</i>	1260	1264

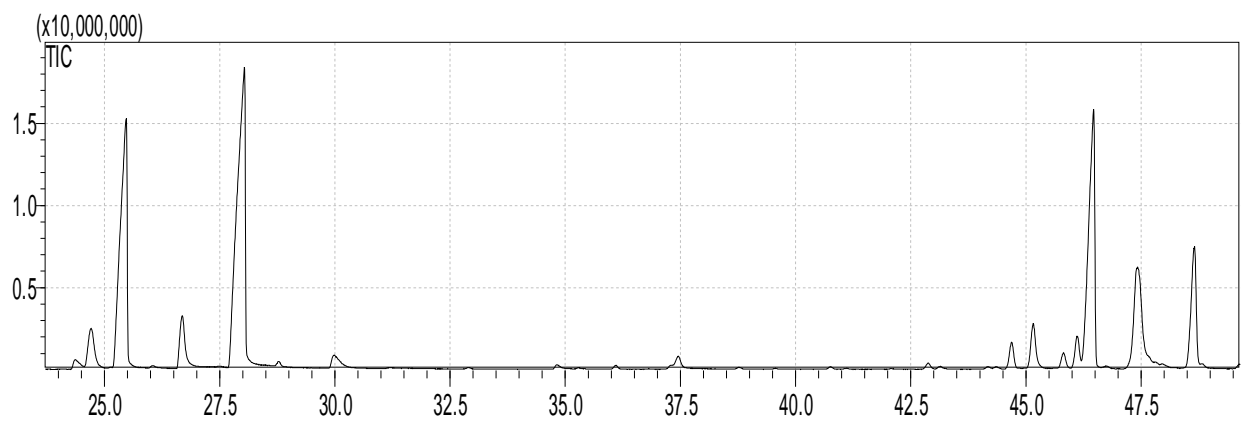
*ADAMS, 2007

Além dos sesquiterpenos: α -curcumeno, α -zingibereno, α -farneseno e β -sesquifelandreno, identificados na fração *n*-hexânica do extrato bruto de *Z. officinale*, identificaram-se os monoterpenos neral e geranial.

Os tempos de retenções (t_R) do neral, geranial, α -curcumeno, α -zingibereno, (*E,E*)- α -farneseno, β -sesquifelandreno foram: 25,4; 28,0; 45,3; 46,5; 47,5 e 48,6 minutos (FIGURA 4.55).



(A)



(B)

FIGURA 4.55 - Cromatograma completo (A) e ampliação da região dos constituintes majoritários(B), obtido por CG, do óleo essencial dos rizomas de *Z. officinale*. Rampa de aquecimento: 60-1/1,5-185-1/9-275-10.

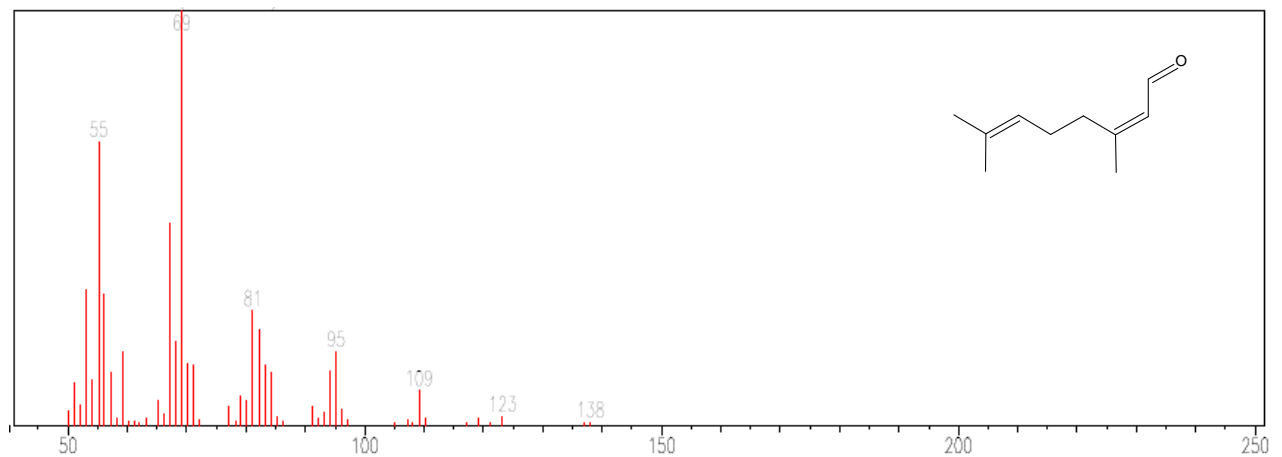


FIGURA 4.56 - Espectro de massas (IE: 70 eV) do neral.

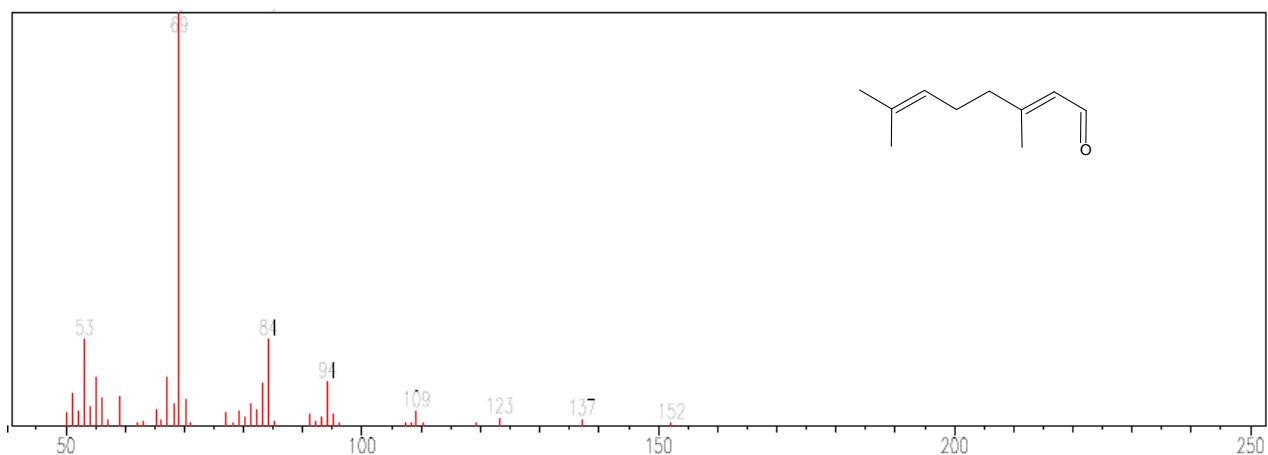


FIGURA 4.57 - Espectro de massas (IE: 70 eV) do geranial.

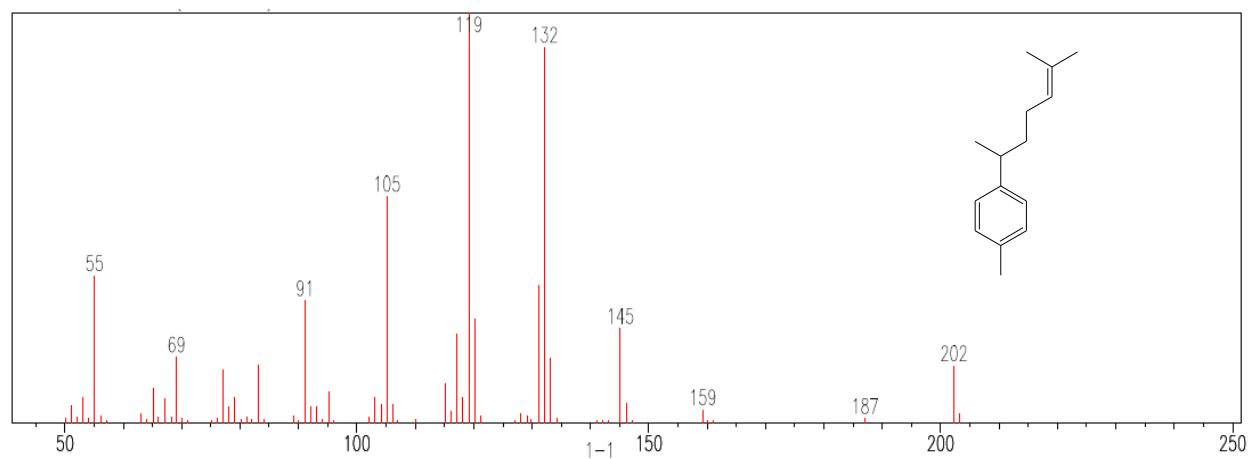


FIGURA 4.58 - Espectro de massas (IE: 70 eV) do α -curcumenol.

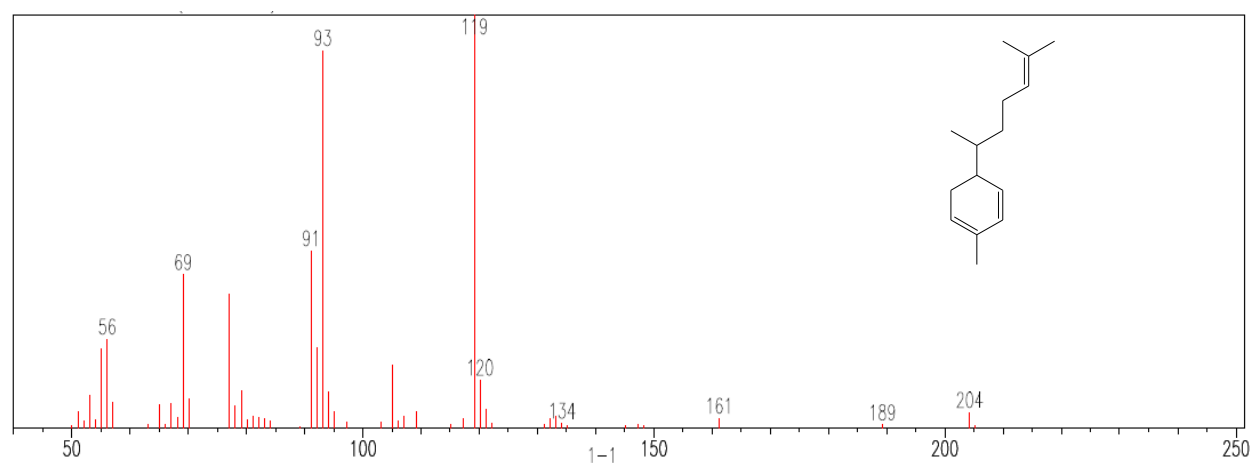


FIGURA 4.59 - Espectro de massas (IE: 70 eV) do α -zingibereno.

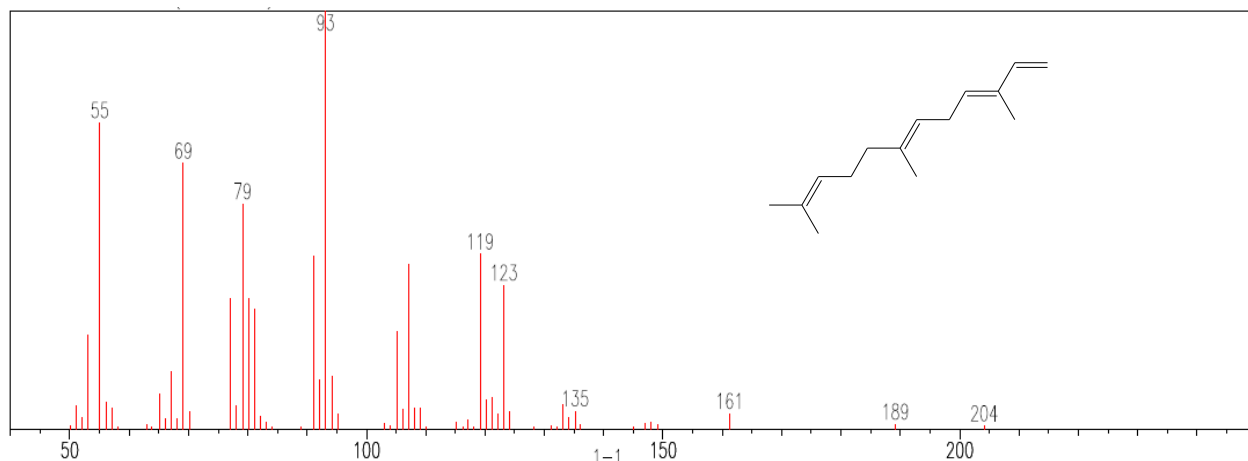


FIGURA 4.60 - Espectro de massas (IE: 70 eV) do (*E,E*)- α -farneseno.

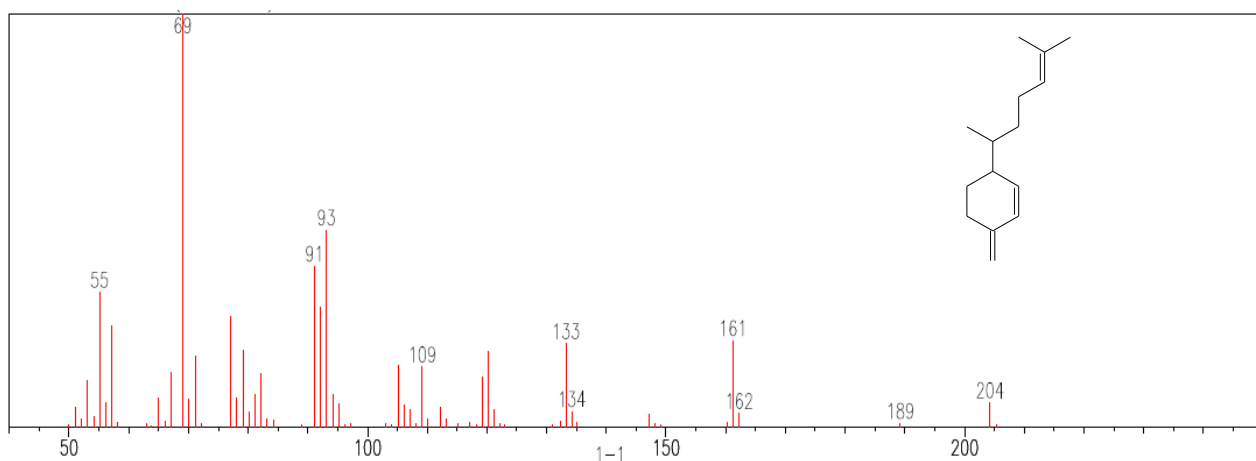


FIGURA 4.61 - Espectro de massas (IE: 70 eV) do β -sesquifelandreno.

4.1.1.3.1 - Determinação do IC₅₀ do óleo essencial

Ensaio de inibição frente à catepsina K do óleo essencial dos rizomas de *Z. officinale* também foram realizados. Como esperado, o valor de IC₅₀ do óleo essencial ($6,07 \pm 0,98 \mu\text{g/mL}$), não ficou tão distante do valor encontrado para a mistura de sesquiterpenos ($1,61 \pm 0,23 \mu\text{g/mL}$). Uma vez que, a concentração dos sesquiterpenos presentes na fração *n*-hexânica enriquecida é maior do que no óleo essencial, é plausível que a atividade inibitória do óleo essencial tenha um decréscimo, se considerarmos que os sesquiterpenos aqui identificados são os principais constituintes responsáveis pela atividade de inibição frente à catepsina K.

Na FIGURA 4.62 pode ser observado o gráfico com a curva hiperbólica quadrada, utilizada na determinação do valor de IC₅₀.

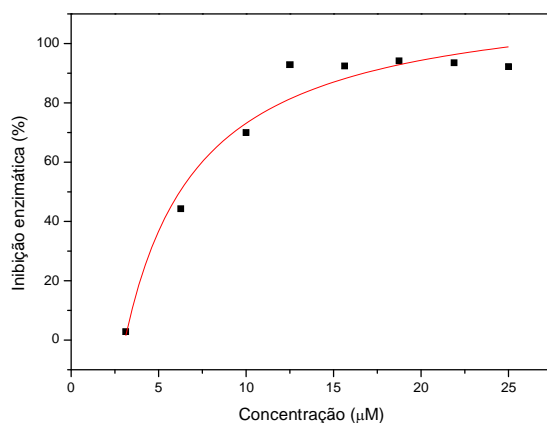


FIGURA 4.62 - Curva de inibição frente à catepsina K, da mistura de sesquiterpenos, utilizada para a determinação do valor de IC₅₀.

4.2 - Modificação química do 6-gingerol

Foram realizadas algumas modificações químicas, baseadas em algumas metodologias reacionais simples e na disponibilidade de reagentes do laboratório, com o objetivo de se investigar a atividade de inibição dos derivados do 6-gingerol frente à catepsina K. Além da simplicidade da derivatização do 6-gingerol com hidroxilamina e hidrazinas, as preparações da oxima e algumas hidrazonas foram fundamentada em relatos da literatura de atividades biológicas que estas duas classes de compostos possuem (SHROT et al., 2009; ROLLAS e KÜÇUKGÜZEL, 2007). A oxima e as hidrazonas obtidas neste trabalho estão sendo relatadas pela primeira vez na literatura e, portanto são substâncias inéditas.

As reações apresentaram baixo rendimento (em torno de 40%), no entanto, a quantidade das substâncias obtida foi suficiente para a realização da sua determinação estrutural e realização dos ensaios de inibição frente à catepsina K. A reação onde se conseguiu um maior rendimento (45 %) foi a que teve como produto uma das hidrazonas (substância SSi6).

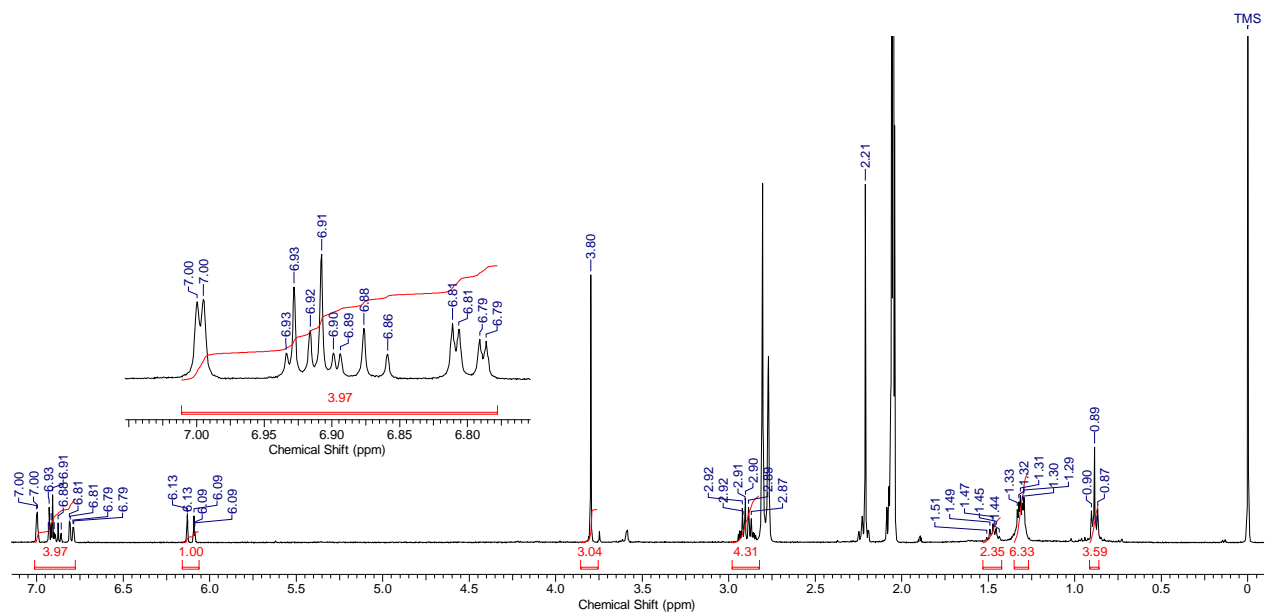
4.2.1 - Determinação estrutural dos produtos das reações

Todas as modificações estruturais do 6-gingerol foram realizadas em pontos da molécula passíveis de reação em uma etapa reacional. Dessas reações

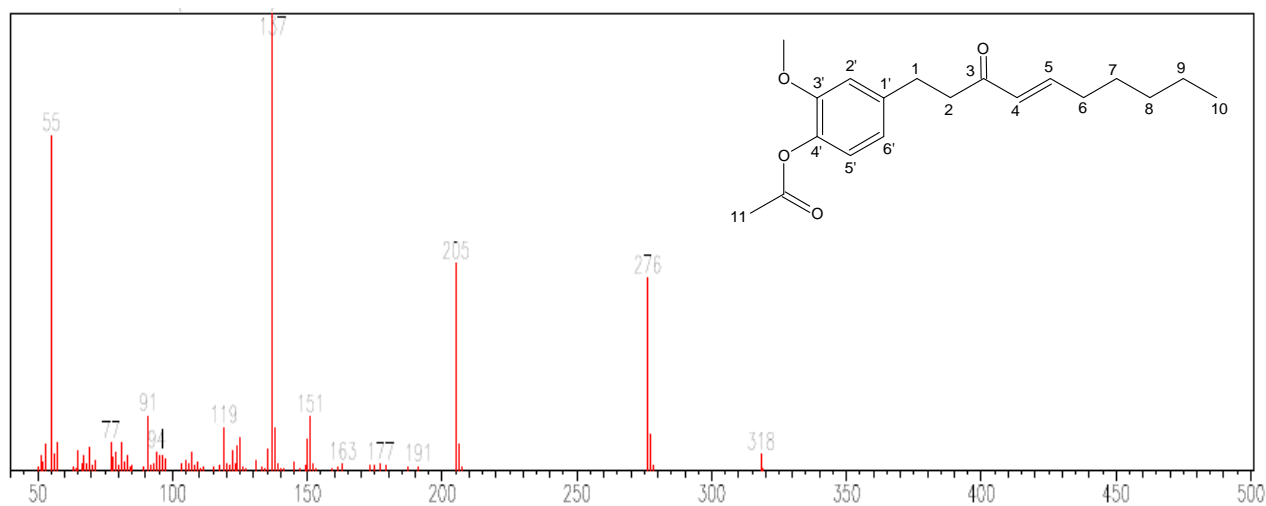
obtiveram-se sete substâncias, as quais foram identificadas por técnicas espectroscópicas e espectrométricas, e ensaiadas frente à catepsina K.

Nas FIGURAS 4.63, 4.64, 4.65, 4.66, 4.67, 4.68, 4.69 e 4.70 estão ilustrados os espectros de RMN ^1H e de massas para cada um dos produtos (SSi1, SSi2, SSi3, SSi4, SSi5, SSi6 e SSi6II) obtidos nas reações químicas.

4.2.1.1 - Substância semi-sintética 1 (SSi1)



(A)



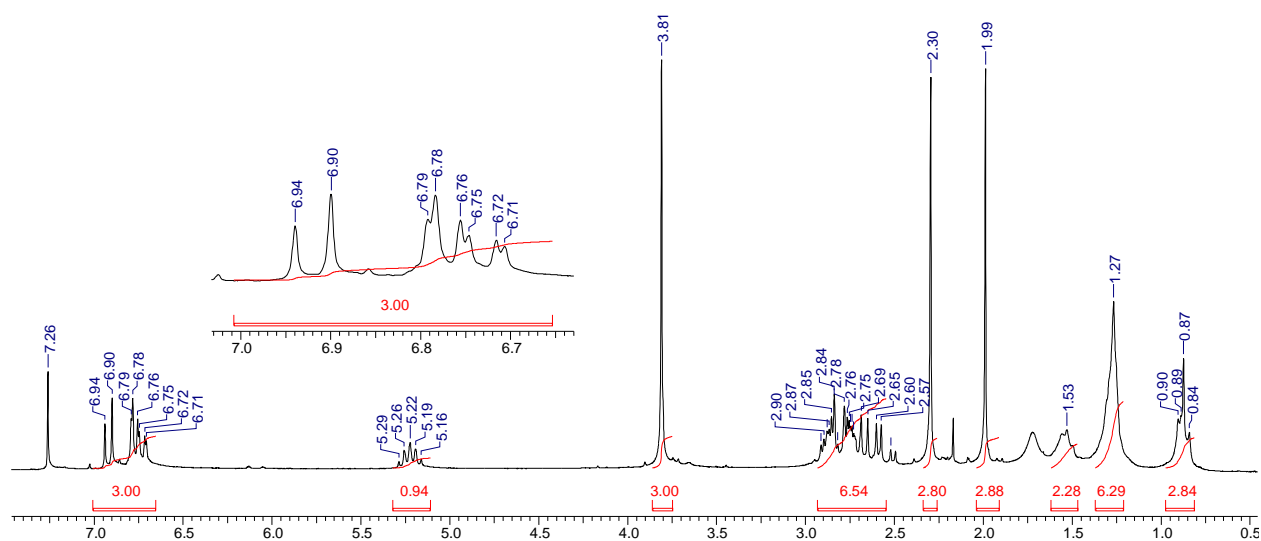
(B)

FIGURA 4.63 - Espectro de RMN ^1H (CD_3COCD_3 , 400 MHz) (A) e de EM (B) da substância **SSi1**. Ionização por impacto eletrônico: 70 eV.

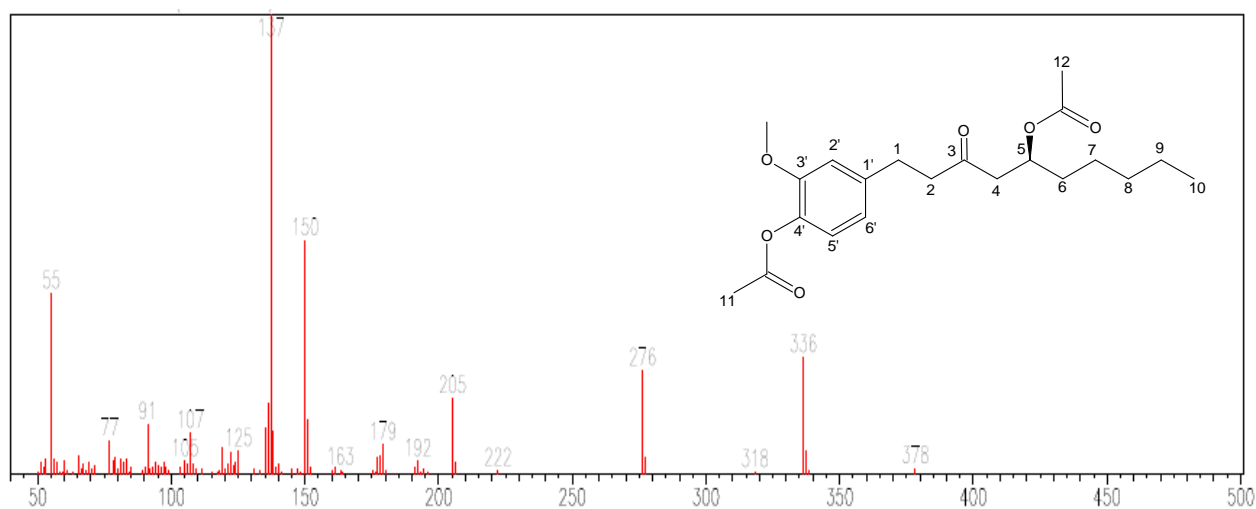
O espectro de RMN ^1H apresenta um tripleto em δ_{H} 0,89 integrando para três hidrogênios referentes aos hidrogênios da metila terminal da cadeia alifática (H-10). Os sinais em δ_{H} 1,2-1,6 integrando para oito hidrogênios são referentes aos hidrogênios metilênicos H-6, H-7, H-8 e H-9. Um singlete intenso em δ_{H} 2,21 integrando para três hidrogênios é referente aos hidrogênios metílicos (H-11) do grupo acetato. Um multipeto (δ_{H} 2,8-3,0), integrando para quatro hidrogênios, são referentes aos hidrogênios metilênicos benzílicos (H-1) e homobenzílicos (H-2). Um singlete intenso em δ_{H} 3,80 integrando para três hidrogênios é característico de hidrogênios de metoxila ($-\text{OCH}_3$). O duplo tripleto em δ_{H} 6,11 ($J= 1,6$ Hz e $J= 16$ Hz), que integrou para um hidrogênio, é referente ao hidrogênio olefínico (H-4) α -carbonílico. Na região de hidrogênios aromáticos há um conjunto de sinais (δ_{H} 6,7-7,1) integrando para quatro hidrogênios, típico de anel aromático 1,3,4-trissubstituído, dos shogaois. O duplo dubleto em δ_{H} 6,80 ($J= 2,0$ Hz e $J= 8$ Hz) é referente ao hidrogênio 6'. O dubleto em δ_{H} 6,92 ($J= 8$ Hz) é referente ao hidrogênio 5'. O dubleto em δ_{H} 7,0 ($J= 2,0$ Hz) é referente ao hidrogênio 2'. O duplo tripleto em δ_{H} 6,90 ($J= 7,2$ Hz e $J= 16$ Hz) é referente ao hidrogênio olefínico β -carbonílico.

O pico do íon-molecular (m/z 318) e o padrão de fragmentação observados no espectro de massas confirmam a estrutura da substância, como a apresentada na FIGURA 4.63B.

4.2.1.2 - Substância semi-sintética 2 (SSi2)



(A)



(B)

FIGURA 4.64 - Espectro de RMN ^1H (CD_3Cl , 200 MHz) (A) e EM (B) da substância **SSi2**. Ionização por impacto eletrônico: 70 eV.

Como observado no espectro de RMN ^1H , na FIGURA 4.64A, o tripleto em δ_{H} 0,87 integrando para três hidrogênios é referente aos hidrogênios da metila terminal da cadeia alifática (H-10). Os sinais em δ_{H} 1,2-1,6 integrando para oito hidrogênios são referentes aos hidrogênios metilênicos H-6, H-7, H-8 e H-9. Dois singletos intensos (δ_{H} 1,99 e δ_{H} 2,30), integrando para três hidrogênios cada um, são referentes aos hidrogênios metílicos dos grupos acetatos (H-12 e H-11). Um conjunto de sinais em δ_{H} 2,5-3,0 integrando para seis hidrogênios são referentes aos quatro hidrogênios metilênicos benzílicos (H-1) e homobenzílicos (H-2) e aos dois

hidrogênios metilênicos α -carbonílicos (H-4). Um singlete intenso em δ_H 3,81 integrando para três hidrogênios é característico de hidrogênios de metoxila (-OCH₃). O quintuplete em δ_H 5,22 integrando para um hidrogênio é referente ao hidrogênio oximetínico (H-5). Na região de hidrogênios aromáticos há um conjunto de sinais (δ_H 6,7-7,1) integrando para três hidrogênios, típico de anel aromático 1,3,4-trissubstituído, dos gingeróis. O duplo dubleto em δ_H 6,74 ($J= 2,0$ Hz e $J= 8$ Hz), é referente ao hidrogênio 6'. O dubleto em δ_H 6,78 ($J= 2,0$ Hz) é referente ao hidrogênio 2'. O dubleto em δ_H 6,92 ($J= 8$ Hz) é referente ao hidrogênio 5'.

O pico do íon-molecular (m/z 378) e o padrão de fragmentação observados no espectro de massas confirmam a estrutura da substância, como a apresentada na FIGURA 4.64B.

4.2.1.3 - Substância semi-sintética 3 (SSi3)

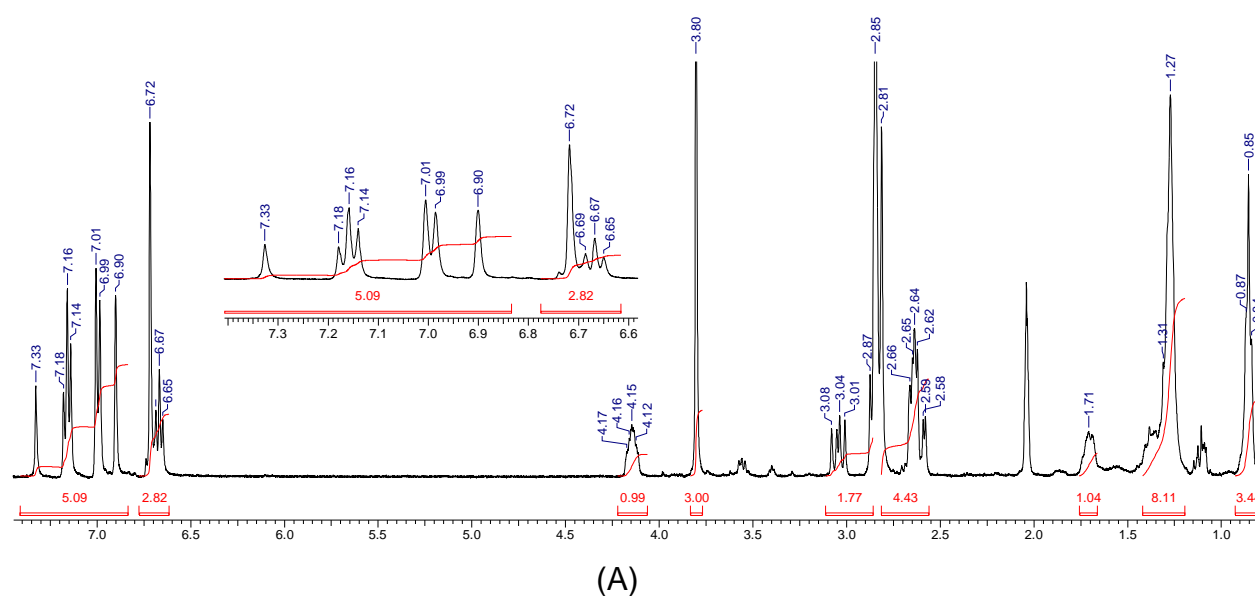
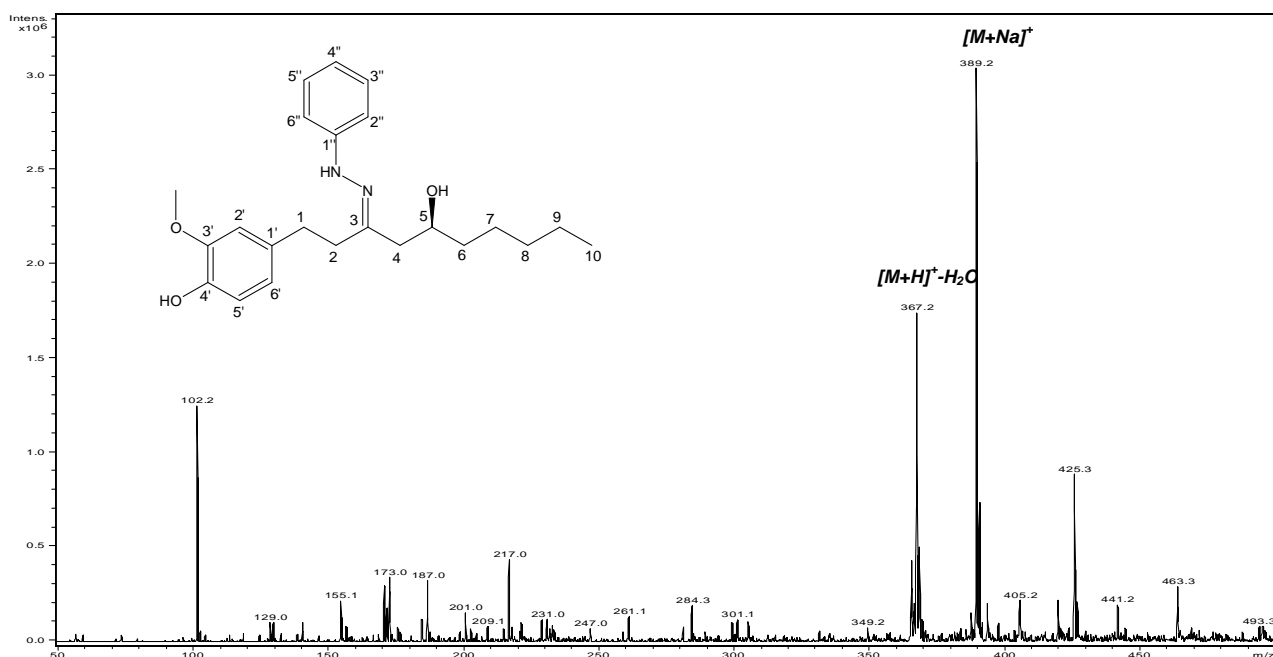


FIGURA 4.65 - Espectro de RMN ¹H (CD₃COCD₃, 400 MHz) (A) e EM (B) da substância **SSi3**. Ionização por elétron-spray no modo positivo.



(B)

FIGURA 4.65 (continuação) - Espectro de RMN ^1H (CD_3COCD_3 , 400 MHz) (A) e EM (B) da substância **SSI3**. Ionização por elétron-spray no modo positivo.

O espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.65A) apresenta um tripleto em δ_{H} 0,85 integrando para três hidrogênios referente aos hidrogênios da metila terminal da cadeia alifática (H-10). Os sinais em δ_{H} 1,2-1,5 integrando para oito hidrogênios são referentes aos hidrogênios metilênicos H-6, H-7, H-8 e H-9. O sinal em δ_{H} 1,71 é referente ao hidrogênio da hidroxila que forma uma ligação de hidrogênio intramolecular com o átomo de nitrogênio hidrazônico, indicando que a configuração desta hidrazona é *trans*. Um conjunto de sinais em δ_{H} 2,5-3,1, integrando para seis hidrogênios, são referentes aos quatro hidrogênios metilênicos benzílicos (H-1) e homobenzílicos (H-2) e aos dois hidrogênios metilênicos (H-4) α -hidrazônicos. Um singlete intenso em δ_{H} 3,80 integrando para três hidrogênios é característico de hidrogênios de metoxila ($-\text{OCH}_3$) ligada ao anel aromático. O quintuplete em δ_{H} 4,15 integrando para um hidrogênio é referente ao hidrogênio oximetínico (H-5). O conjunto de sinais (δ_{H} 6,6-7,4) com integral total para oito hidrogênios são referentes aos hidrogênios dos anéis aromáticos. O tripleto em δ_{H} 6,67 integrando para um hidrogênio é referente ao hidrogênio 4''. O dubleto em δ_{H} 7,16 ($J = 8,0$ Hz) integrando para dois hidrogênios é referente aos hidrogênios 3''. Os outros sinais não atribuídos devido à sobreposição de sinais, são referentes aos hidrogênios 2'', 2', 5' e 6'.

Com a análise do espectro de massas pode-se confirmar a estrutura da substância, como a ilustrada na FIGURA 4.65B. Os principais picos são: íon-fragmento m/z 367,2 que representa a perda de 18 Da (H_2O) do íon *quasi*-molecular (m/z 385) que não aparece no espectro, e do pico m/z 389,2, como sendo o aduto de sódio do íon-fragmento m/z 367,2.

4.2.1.4 - Substância semi-sintética 4 (SSi4)

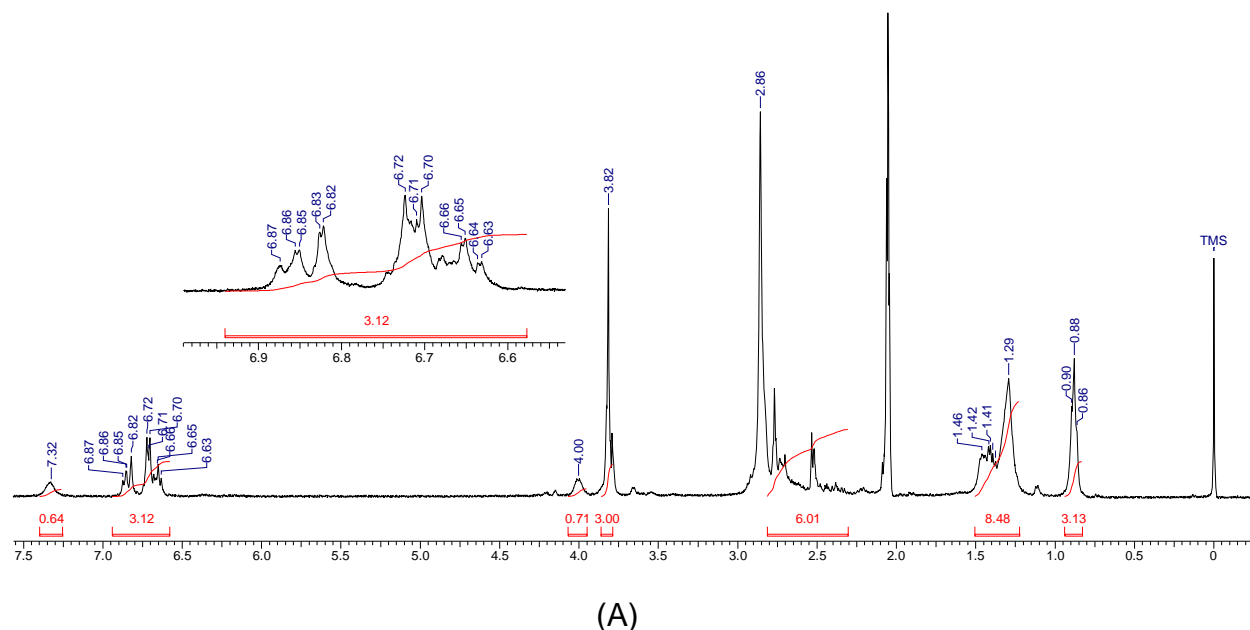


FIGURA 4.66 - Espectro de RMN 1H (CD_3COCD_3 , 400 MHz) (A) e EM (B) da substância **SSi4**. Ionização por elétron-spray no modo positivo.

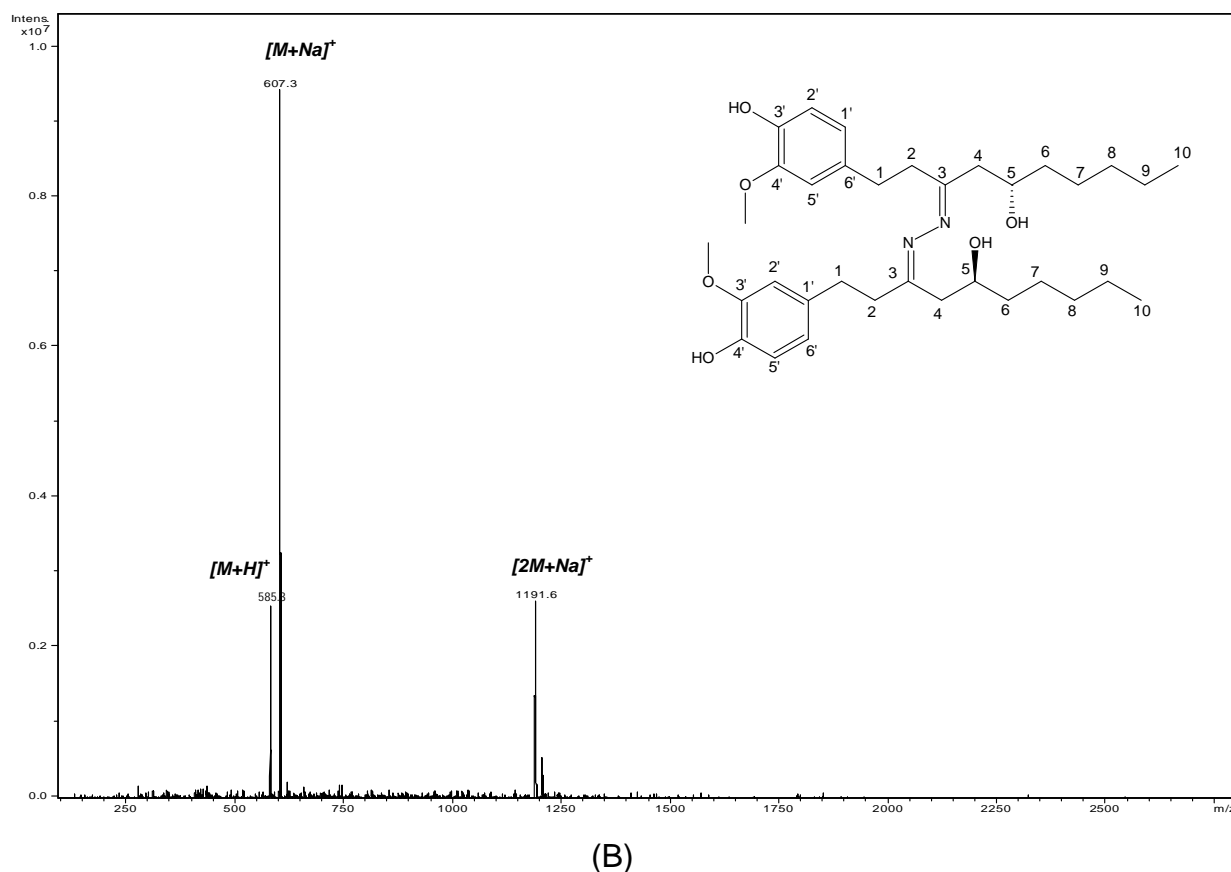
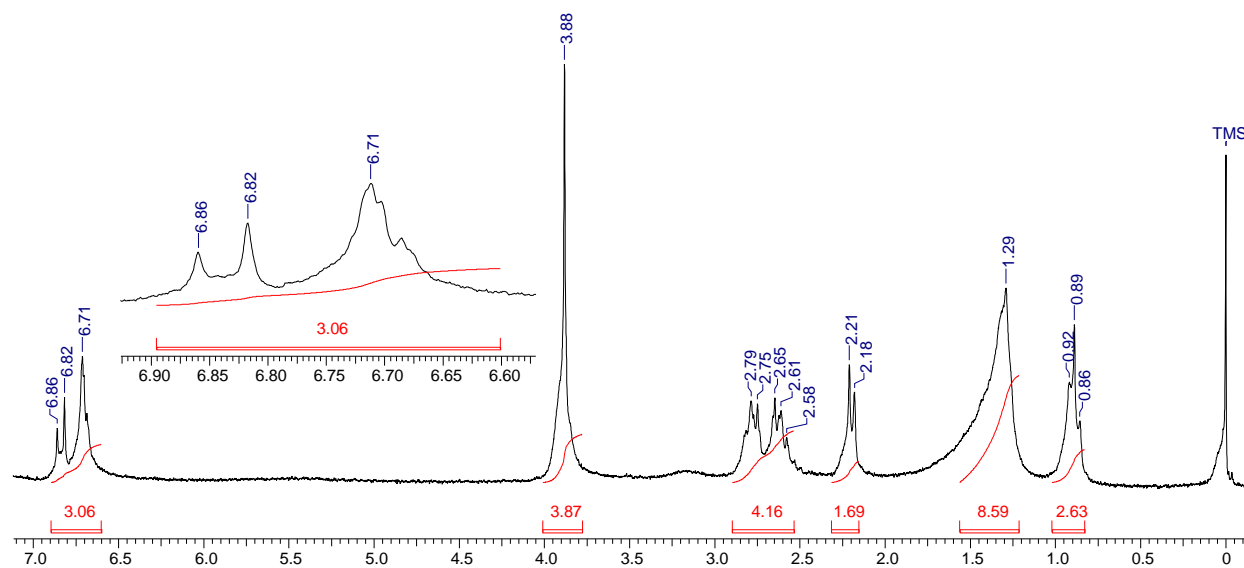


FIGURA 4.66 (continuação) - Espectro de RMN ^1H (CD_3COCD_3 , 400 MHz) (A) e EM (B) da substância **SSi4**. Ionização por elétron-spray no modo positivo.

O espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.67A) da substância semi-sintética SSi4, é similar ao espectro do 6-gingerol, pois como pode ser observado, a estrutura química o produto da reação consiste de duas moléculas de 6-gingerol interligadas por uma molécula de hidrazina.

Com a análise do espectro de massas pode-se confirmar a estrutura da substância como a ilustrada na FIGURA 4.67B. O íon *quasi*-molecular gerado $[\text{M}+1]^+$ é o m/z 585,3. Um aduto de sódio $[\text{M}+23]^+$ m/z 607,3 foi gerado, como sendo o íon mais estável. Um dímero da substância, como aduto de sódio (m/z 1191,6), também pode ser observado no espectro de massas (FIGURA 4.66B)

4.2.1.5 - Substância semi-sintética 5 (SSi5)



(A)



(B)

FIGURA 4.67 - Espectro de RMN ^1H (CD_3Cl , 200 MHz) (A) e EM (B) da substância **SSi5**. Ionização por elétron-spray no modo positivo.

O espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.67A) do SSi5 é similar ao espectro do 6-gingerol. A única diferença é o sinal referente ao hidrogênio oximetínico (H-5) que aqui se encontra sobreposto pelo singlete em δ_{H} 3,88, enquanto que na molécula de gingerol o deslocamento químico deste hidrogênio é δ_{H} 4,02.

Com a análise do espectro de massas pode-se confirmar a estrutura da substância como a ilustrada na FIGURA 4.67B. O íon *quasi*-molecular $[\text{M}+1]^+$ é m/z 310,1. O aduto de sódio (m/z 332,1) foi gerado, como sendo o íon mais estável (FIGURA 4.68B).

4.2.1.6 - Substância semi-sintética 6 (SSi6)

A análise dos espectros de RMN ^1H dos isômeros SSi6 e SSi6II é muito similar, portanto será discutido apenas o espectro do isômero SSi6.

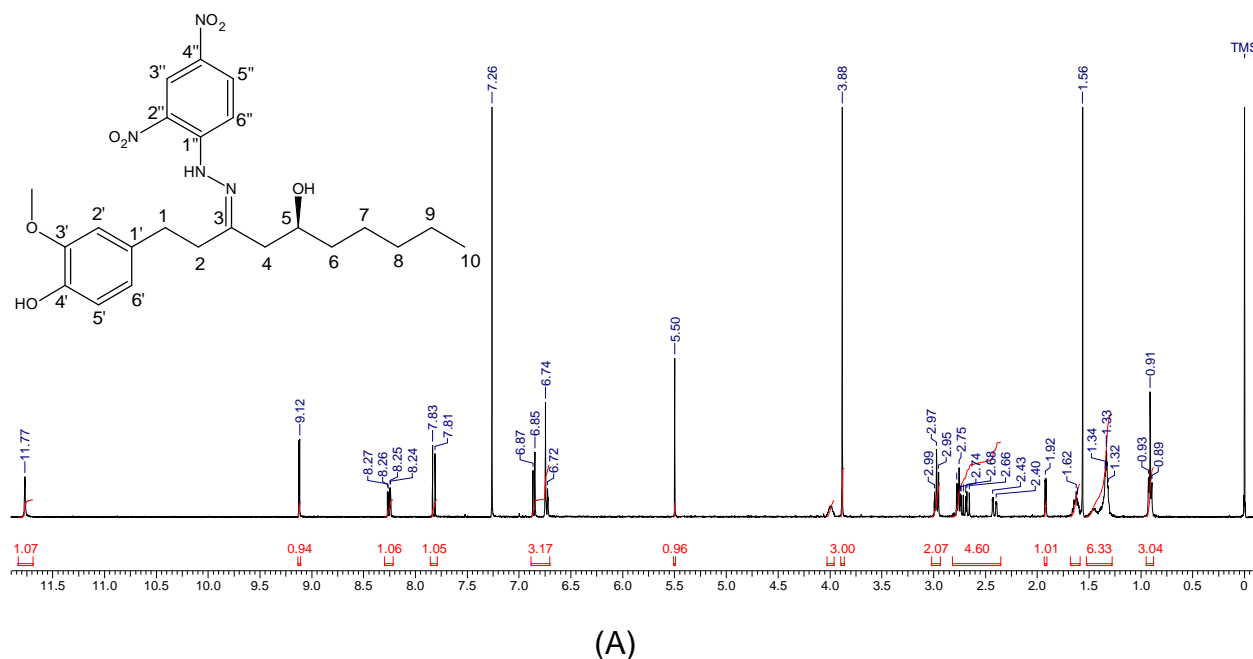
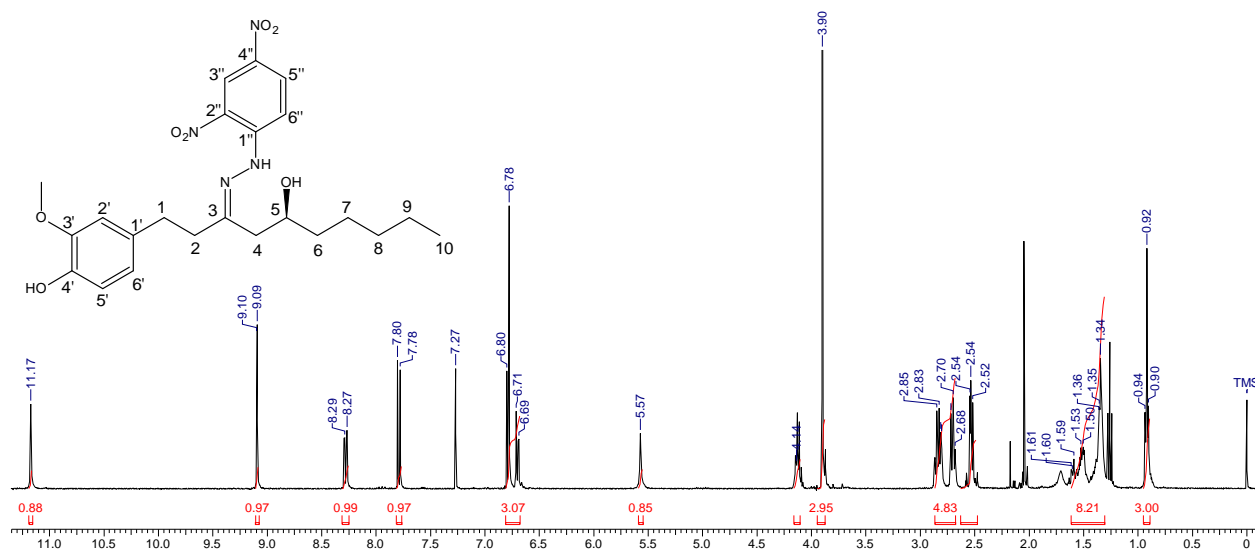


FIGURA 4.68 - Espectros de RMN ^1H (CD_3Cl , 400 MHz) das substâncias **SSi6** (A) e **SSi6II** (B).



(B)

FIGURA 4.68 (continuação) - Espectros de RMN ^1H (CD_3Cl , 400 MHz) das substâncias **SSI6** (A) e **SSI6II** (B).

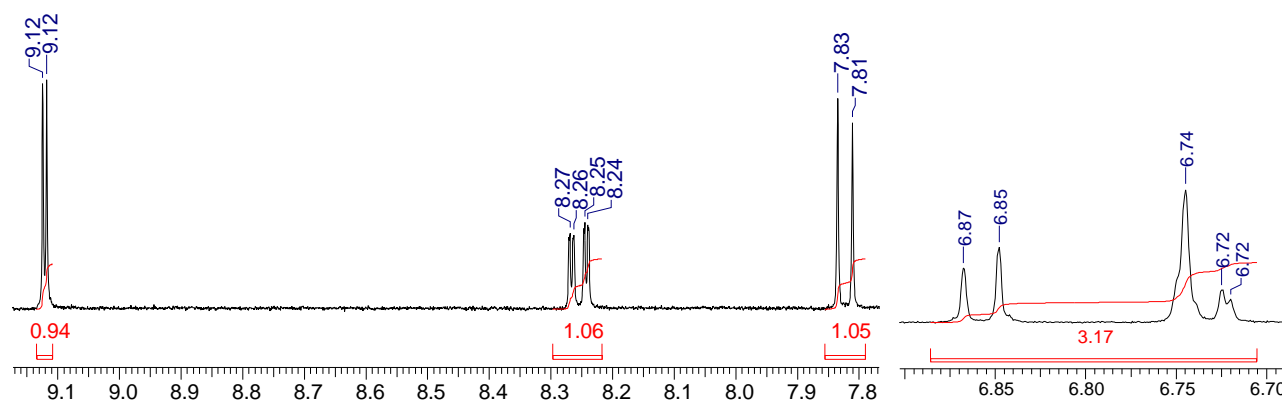


FIGURA 4.69 - Ampliações do espectro de RMN ^1H (CD_3Cl , 400 MHz) da substância **SSI6** (região aromática).

O tripleto em δ_{H} 0,91 integrando para três hidrogênios é referente aos hidrogênios da metila terminal da cadeia alifática (H-10). Os sinais em δ_{H} 1,3-1,6 integrando para oito hidrogênios são referentes aos hidrogênios metilênicos H-6, H-7, H-8 e H-9. O dubleto em δ_{H} 1,92 ($J = 3$ Hz) é referente ao hidrogênio da hidroxila que está formando uma ligação de hidrogênio intramolecular com o átomo de nitrogênio hidrazônico. Esta ligação de hidrogênio indica que a configuração desta hidrazona é *trans*. Um conjunto de sinais em δ_{H} 2,5-2,9 integrando para seis hidrogênios são referentes aos quatro hidrogênios metilênicos benzílicos (H-1) e

homobenzílicos (H-2), e aos dois hidrogênios metilênicos (H-4) α -hidrazônicos. Um singlete intenso em δ_H 3,90 integrando para três hidrogênios é característico de hidrogênios de metoxila (-OCH₃). O quintupletto em δ_H 3,99 integrando para um hidrogênio é referente ao hidrogênio oximetínico (H-5). Na região de hidrogênios aromáticos há um conjunto de sinais (δ_H 6,7-6,9) integrando para três hidrogênios. Esses sinais apresentam o padrão típico de anel aromático 1,3,4-trisubstituído. Um duplo dubleto (δ_H 6,73, $J=2,0$ Hz), sobreposto pelo singlete em δ_H 6,74, é referente ao hidrogênio 6'. O singlete em δ_H 6,74 pode ser atribuído ao hidrogênio 2'. O dubleto em δ_H 6,85 ($J=8,0$ Hz) é referente ao hidrogênio 5'. O dubleto em δ_H 7,82 ($J=9,6$ Hz) que integra para um hidrogênio é referente ao hidrogênio 6''. O duplo dupleto em δ_H 8,25 ($J=2,4$ Hz, $J=9,6$ Hz) que integra para um hidrogênio é referente ao hidrogênio 5''. O dubleto em δ_H 9,12 ($J=2,4$ Hz) integrando também para um hidrogênio é referente ao hidrogênio 3'' (FIGURA 4.68A e FIGURA 4.69).

O espectro de RMN ¹H do isômero SSi6 (FIGURA 4.68A) e o espectro de RMN ¹H do isômero SSi6II (FIGURA 4.68B) apresentam sinais de hidrogênios amínicos quelados em δ_H 11,77 e δ_H 11,17. O hidrogênio mais desblindado apresenta-se mais fortemente quelado com um oxigênio do grupo 2-nitro favorecido pela configuração *trans* da hidrazona.

Com a análise do espectro de massas pode-se confirmar a estrutura da substância como a ilustrada na FIGURA 4.70, através do íon-molecular [M+1]⁺ *m/z* 475.

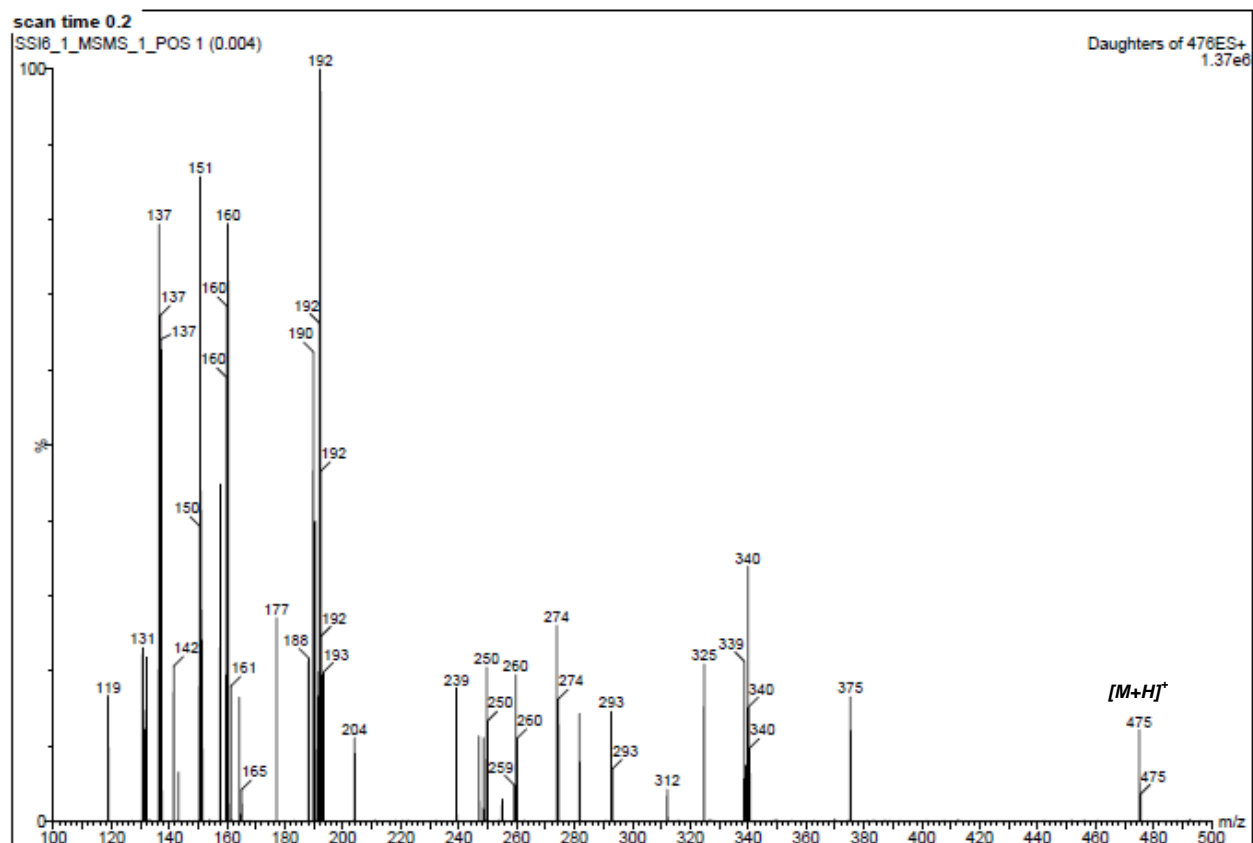
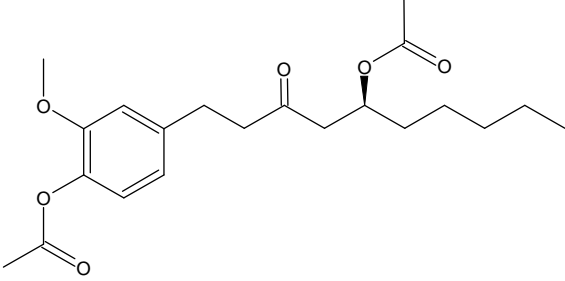
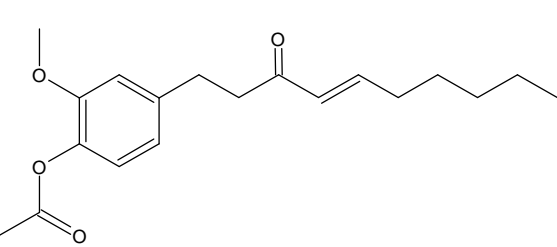
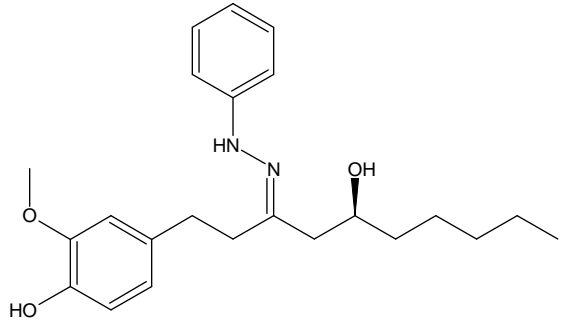
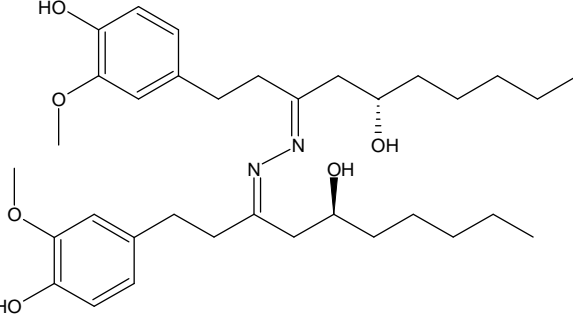
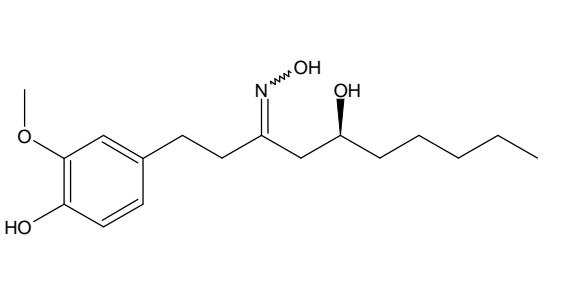
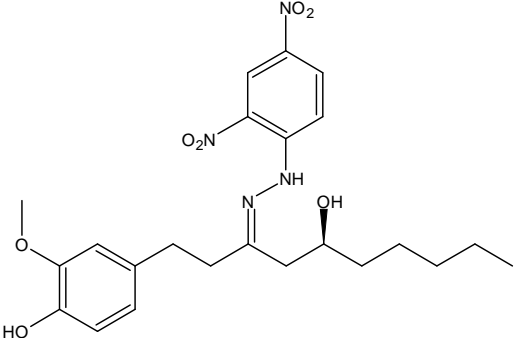
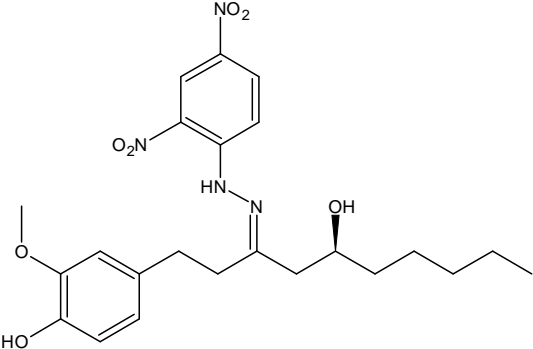


FIGURA 4.70 - Espectro de massas da substância **SSI6**. Ionização por elétron-spray no modo positivo.

4.2.2 - Determinação dos IC_{50} das substâncias semi-sintéticas

Na TABELA 4.8 observam-se os valores de inibição das substâncias obtidas após as transformações realizadas com o 6-gingerol.

TABELA 4.8 - Substâncias semi-sintéticas obtidas a partir do 6-gingerol com suas respectivas atividades de inibição frente à catepsina K e os valores de IC_{50} dos mais ativos. A concentração inicial das substâncias ensaiadas foi 125 μM .

 <p>Inibição (%) = $13,23 \pm 2,33$</p>	 <p>Inibição (%) = $51,74 \pm 2,47$</p>
 <p>Inibição (%) = 73,11 $IC_{50} = 11,88 \pm 0,54 \mu M$</p>	 <p>Inibição (%) = $98,55 \pm 0,14$ $IC_{50} = 6,22 \pm 0,15 \mu M$</p>
 <p>Inibição (%) = 0</p>	 <p>Inibição (%) = $72,79 \pm 1,60$ $IC_{50} = 23,86 \pm 0,30 \mu M$</p>
 <p>Inibição (%) = $71,69 \pm 0,64$ $IC_{50} = 17,01 \pm 1,95 \mu M$</p>	

Observando a TABELA 4.8, dos sete produtos obtidos após as modificações químicas, apenas um não apresentou atividade de inibição frente à catepsina K na concentração do ensaio (a oxima SSi5). Este resultado indica a contribuição negativa na atividade de inibição enzimática desta oxima. Os outros produtos apresentaram atividade de inibição maior que o 6-gingerol (Inibição (%) = $5,95 \pm 1,96$), como foi o nosso objetivo. No entanto, desses seis, os mais ativos foram selecionados para a determinação do IC₅₀. Foram eles: SSi3 (IC₅₀ = $11,88 \pm 0,54 \mu\text{M}$), SSi4 (IC₅₀ = $6,22 \pm 0,15 \mu\text{M}$), SSi6 (IC₅₀ = $17,01 \pm 1,95 \mu\text{M}$) e SSi6II (IC₅₀ = $23,86 \pm 0,30 \mu\text{M}$).

Analisando as hidrazonas nota-se que o anel aromático contribui positivamente para o aumento de atividade frente à catepsina K, no entanto quando neste anel estão presentes dois grupos nitros nas posições 2 e 4, esta atividade sofre uma redução. Quando, o grupo adicionado à molécula de 6-gingerol foi outra molécula de 6-gingerol, através de uma ligação cruzada com a hidrazina, houve um grande aumento em atividade quando comparado ao composto de partida.

4.3 - Determinação da seletividade (catepsinas K, V, L e S) e do modo de inibição de alguns substâncias mais promissores

Visto que as catepsinas V, L e S apresentam 60% de identidade com a catepsina K e que são perfeitamente sobreponíveis, determinou-se a atividade de inibição de algumas das substâncias mais ativas frente a estas enzimas, para avaliar a seletividade destas, frente à catepsina K (TABELA 4.9).

Baseado nos resultados obtidos de inibição frente às catepsinas K, L, S e V, determinaram-se os valores de IC₅₀ de algumas das substâncias, e sua respectiva seletividade com relação à catepsina K. Apenas as substâncias com inibição maior que 60% foram selecionadas para a determinação do IC₅₀. Uma exceção a essa regra foi dada ao 6-shogaol, molécula selecionada para ensaios posteriores devido a sua importante atividade anti-inflamatória. Para determinar seu modo de inibição frente à catepsina K foi necessário saber as concentrações de inibição mais altas e, utilizando-se destes dados calculou-se o IC₅₀ desta substância.

TABELA 4.9 - Inibição de algumas substâncias frente às catepsinas K, L, S e V

Substâncias	Inibição enzimática (%), 125 µM			
	CatK	CatV	CatL	CatS
10-gingerol	75,5	48,1	88,6	26
6-shogaol	26,8	6,80	0	24,2
8-shogaol	67,9	64,0	91,2	40,2
10-shogaol	86,3	83,0	95	59,9
6-gingerdiol	66	38,1	0	27
Diacetato de 6-gingerdioila	86,8	53,2	92,5	31,7
SSi6	71,7	97,9	100	94,7

Todas as substâncias naturais apresentaram uma maior seletividade para a catepsina K. A substância semi-sintética SSi6 foi pouco seletiva com relação a todas as catepsinas ensaiadas, no entanto foi mais seletiva para as catepsinas V, L e S do que para a catepsina K (TABELAS 4.9 e 4.10).

TABELA 4.10 - IC₅₀ e seletividade de algumas substâncias frente às catepsinas K, L, S e V

Substâncias	IC ₅₀ (µM)				Seletividade		
	CatK	CatV	CatL	CatS	CatV/CatK	CatL/CatK	CatS/CatK
10-gingerol	10,4	nd	46,9	nd	nd	4,5	nd
6-shogaol	154,9	239,1	217,7	185,5	1,5	1,4	1,2
8-shogaol	21,1	nd	103,8	nd	nd	4,9	nd
10-shogaol	5,8	96,5	9,7	nd	16,6	1,7	nd
6-gingerdiol	54,4	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Diacetato de 6-gingerdioila	55,3	nd	118,8	nd	nd	2,1	nd
SSi6	17	11,2	7	10,7	0,7	0,4	0,6

nd = não determinado

Com relação a catepsina V, as substâncias naturais apresentaram um alto grau de seletividade, com exceção do 6-shogaol, que foi apenas 1,5 vezes mais seletivo. Com relação a catepsina L, houve uma maior seletividade para a catepsina K, no entanto, com baixo grau de seletividade. A maioria das substâncias naturais foi

bastante seletiva à catepsina K, quando comparado com a catepsina S, com a menor seletividade para o 6-shogaol (1,2 vezes). Enquanto que, o 6-shogaol apresentou uma atividade de inibição frente às catepsinas com potência semelhante, porém ainda seletivo à catepsina K, o 6-gingerdiol foi o mais seletivo à catepsina K sobre as outras catepsinas (TABELAS 4.9 e 4.10).

Como mencionado anteriormente, as três substâncias selecionadas para a determinação do modo de inibição frente à catepsina K foram: o 10-gingerol, o 6-shogaol e o SSi6.

Para a determinação do mecanismo de inibição, foram construídos gráficos utilizando os modelos de Lineweaver-Burk, Hanes-Woolf e Dixon. Analisando esses gráficos conjuntamente foi possível determinar o tipo de inibidor enzimático de maneira mais confiável. Poderia ter sido utilizado apenas um modelo, no entanto, para evitar erros na determinação gráfica dos modos de inibição, devido a desvios de linearidade intrínsecos de alguns modelos, achou-se mais conveniente utilizar mais de um modelo. Outra razão em se utilizar modelos como Hanes-Woolf e Dixon foi demonstrar a vantagem em se trabalhar com estes dois modelos. Por exemplo, a equação de linearização de Hanes-Woolf se ajusta melhor aos dados experimentais do que no modelo de Lineweaver-Burk, apesar de este modelo ser pouco relatado na literatura, quando comparado ao de Lineweaver-Burk. Para o modelo de Dixon, a vantagem é obter de maneira mais prática se a inibição é do tipo completa ou parcial, através dos gráficos gerados com os dados experimentais (LESKOVAC, 2004; BISSWANGER et al., 2008).

Nas FIGURAS 4.71, 4.72 e 4.73 podem-se observar os gráficos gerados com os dados experimentais obtidos com o inibidor 6-shogaol.

A linearização de Lineweaver-Burk (FIGURA 4.71) gerou retas paralelas, o que nos dá a informação de que o inibidor é do tipo incompetitivo completo.

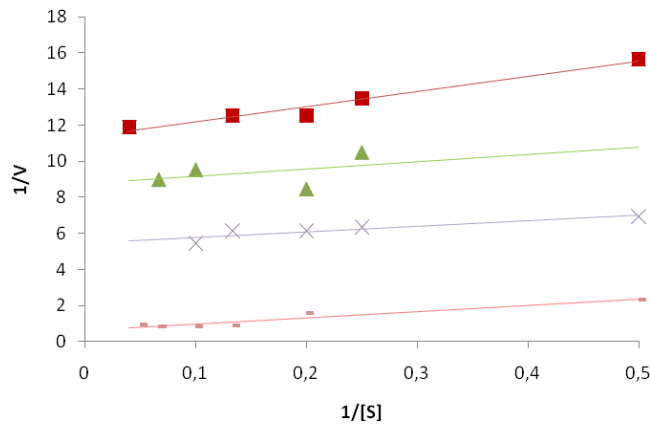


FIGURA 4.71 - Linearização de Lineweaver-Burk, com o inibidor 6-shogaol, nas respectivas concentrações: 250 μM (■), 225 μM (▲), 200 μM (×) e sem inibidor (—).

Analisando o gráfico gerado com a linearização de Hanes-Woolf (FIGURA 4.72), tem-se a confirmação de que o inibidor é do tipo incompetitivo completo, pois as retas interceptaram-se no eixo das ordenadas, uma característica típica para este tipo de inibidor.

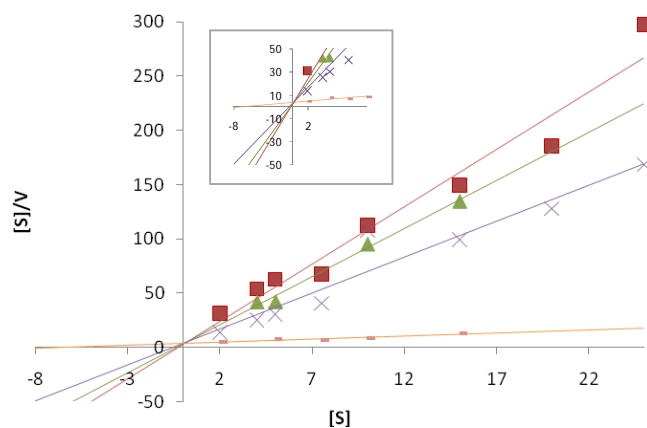


FIGURA 4.72 - Linearização de Hanes-Woolf, mostrando ampliação da interceptação das retas, com o inibidor 6-shogaol, nas respectivas concentrações: 250 μM (■), 225 μM (▲), 200 μM (×) e sem inibidor (—).

O paralelismo das retas, observado quando o gráfico de Dixon foi gerado (FIGURA 4.73), indica também que o inibidor é do tipo incompetitivo completo (BISSWANGER et al., 2008).

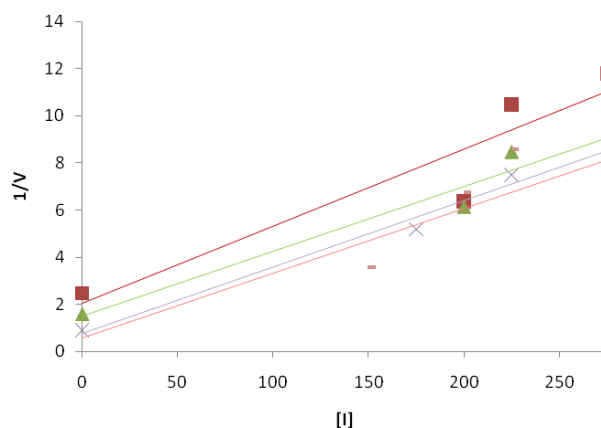


FIGURA 4.73 - Ajuste dos dados utilizando o modelo de Dixon, com o inibidor 6-shogaol. As concentrações de substrato utilizadas foram as seguintes: 4,0 μM (■), 5,0 μM (▲), 7,5 μM (×) e 25,0 μM (—).

Portanto, a análise dos resultados obtidos graficamente com os três modelos utilizados (Lineweaver-Burk, Hanes-Woolf e Dixon), assegura que o 6-shogaol é um inibidor do tipo incompetitivo completo.

Para o 10-gingerol, iniciando com a análise do gráfico de Hanes-Woolf, pode-se observar pela FIGURA 4.74, que as retas interceptaram antes do eixo das ordenadas. Este tipo de gráfico indica que a inibição é do modo incompetitiva parcial (KIM et al., 2006).

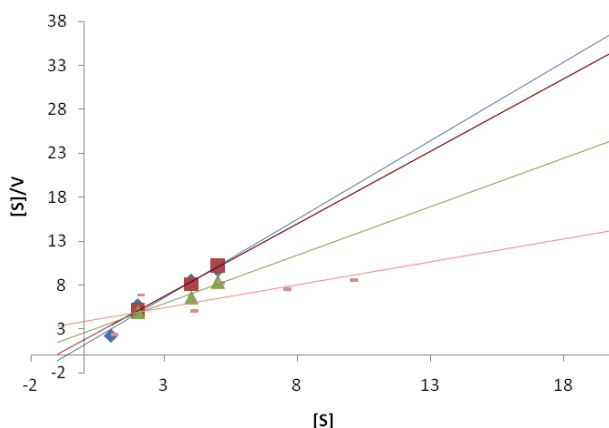


FIGURA 4.74 - Linearização de Hanes-Woolf, com o inibidor 10-gingerol nas respectivas concentrações: 125 (\blacklozenge), 75 μM (■), 25 μM (▲), e sem inibidor (—).

Um gráfico gerado com os coeficientes angulares e coeficientes lineares dessas retas *versus* concentração de inibidor (FIGURA 4.75) indicará se o

modo de inibição é parcial ou completa. Como ocorreu neste caso, quando os pontos experimentais se ajustarem a uma hipérbole, o tipo de inibidor é dito parcial (LESKOVAC, 2004). Pelo perfil dessas curvas também se tem a informação de que se trata de uma inibição do tipo incompetitivo parcial (BISSWANGER et al., 2008).

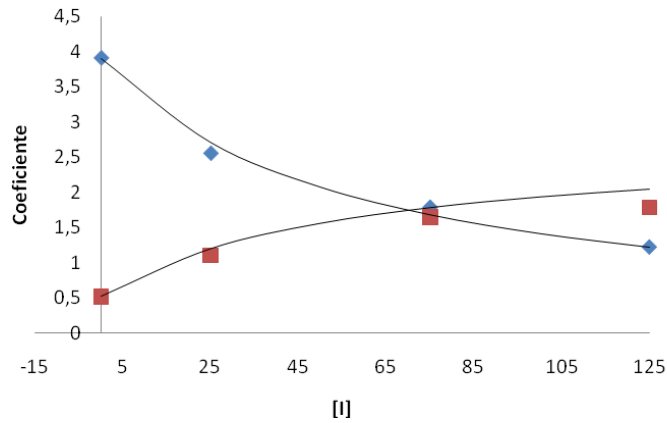


FIGURA 4.75 - Ajuste dos dados experimentais utilizando o modelo de Hanes-Woolf, com o inibidor 10-gingerol. O eixo da ordenada (y) representa os coeficientes lineares (\blacklozenge), e angulares (\blacksquare) das linearizações de Hanes-Woolf.

Na FIGURA 4.76 pode-se observar o gráfico de Lineweaver-Burk. Estas retas com pequenas diferenças em seus coeficientes angulares e que se cruzarão em um ponto distante, a direita do eixo das ordenadas é característico de inibidores do tipo incompetitivo parcial (BISSWANGER et al., 2008).

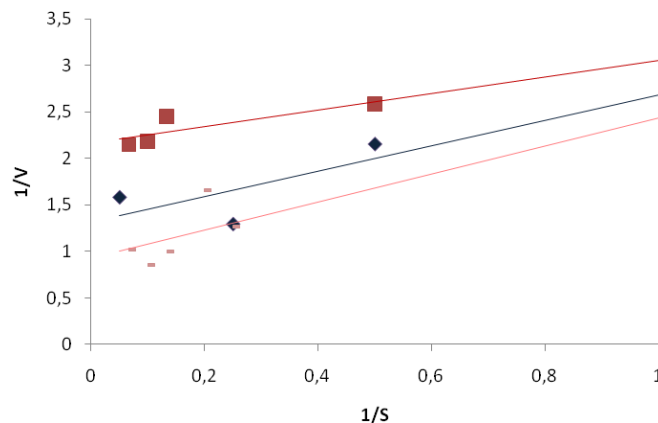


FIGURA 4.76 - Linearização de Lineweaver-Burk, com o inibidor 10-gingerol nas respectivas concentrações: 75,0 μM (\blacksquare), 12,5 μM (\blacklozenge), e sem inibidor (---).

Através das curvas geradas pelo modelo de Dixon (FIGURA 4.77) se confirma que o 10-gingerol é um inibidor do tipo incompetitivo parcial (BISSWANGER et al., 2008).

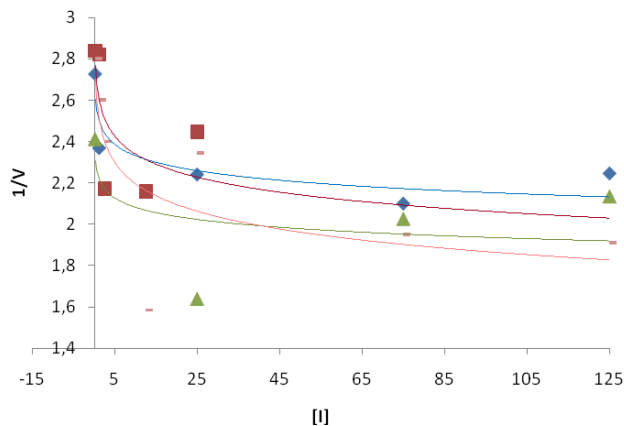


FIGURA 4.77 - Ajuste dos dados experimentais utilizando o modelo de Dixon, com o inibidor 10-gingerol. As concentrações de substrato utilizadas foram as seguintes: 1,0 (♦), 2,0 μM (■), 4,0 μM (▲), e 20 μM (—).

Portanto, a análise dos resultados obtidos graficamente com os três modelos utilizados (Lineweaver-Burk, Hanes-Woolf e Dixon), assegura que o 10-gingerol é um inibidor do tipo incompetitivo parcial.

Para a substância SSi6, pode ser observado pelo gráfico de Hanes-Woolf (FIGURA 4.78), que as retas interceptaram depois do eixo das ordenadas, sendo esse tipo de gráfico característico de uma inibição do tipo mista.

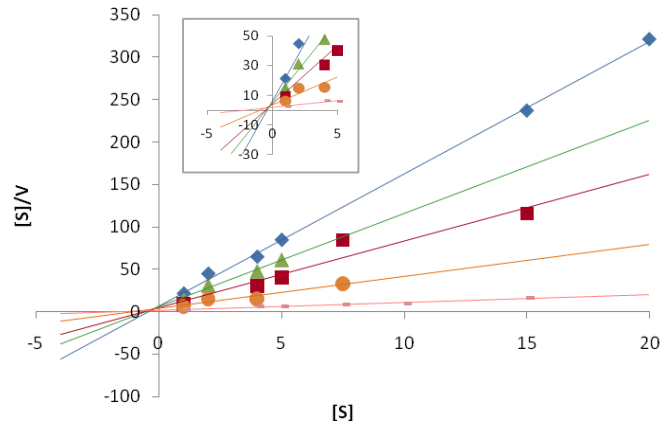


FIGURA 4.78 - Linearização de Hanes-Woolf, mostrando ampliação da interceptação das retas, com o inibidor SSi6, nas respectivas concentrações: 125 (♦), 31,25 µM (▲), 7,8 µM (■), 4,0 µM (●) e sem inibidor (—).

Um gráfico gerado com os coeficientes angulares e coeficientes lineares dessas retas *versus* concentração de inibidor (FIGURA 4.79) indicará se o modo de inibição é parcial ou completa. Como ocorreu neste caso, quando os pontos experimentais se ajustarem a uma hipérbole, o tipo de inibidor é dito parcial (LESKOVAC, 2004). Pelo perfil dessas curvas também se tem a informação de que se trata de uma inibição do tipo não-competitiva parcial (BISSWANGER et al., 2008).

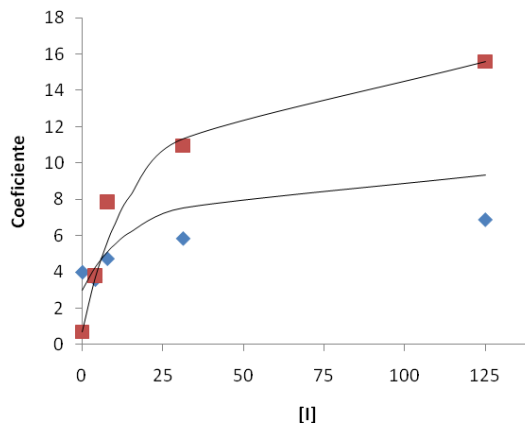


FIGURA 4.79 - Ajuste dos dados experimentais utilizando o modelo de Hanes-Woolf, com o inibidor SSi6.

Na FIGURA 4.80 pode-se observar o gráfico de Lineweaver-Burk. Estas retas com pequenas diferenças em seus coeficientes angulares e que se

cruzarão em um ponto distante, a esquerda do eixo das ordenadas é característico de inibidores do tipo não-competitivo parcial (BISSWANGER et al., 2008).

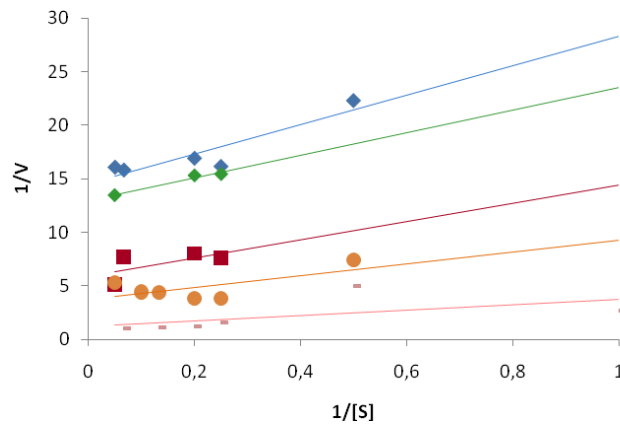


FIGURA 4.80 – Linearização de Lineweaver-Burk, com o inibidor SSi6 nas respectivas concentrações: 125 (◆), 62,5 μM (◇), 7,8 μM (■), 4,0 μM (●) e sem inibidor (—).

O gráfico de Dixon (FIGURA 4.81) vem a confirmar que o SSi6 é um inibidor do tipo não-competitivo parcial (BISSWANGER et al., 2008).

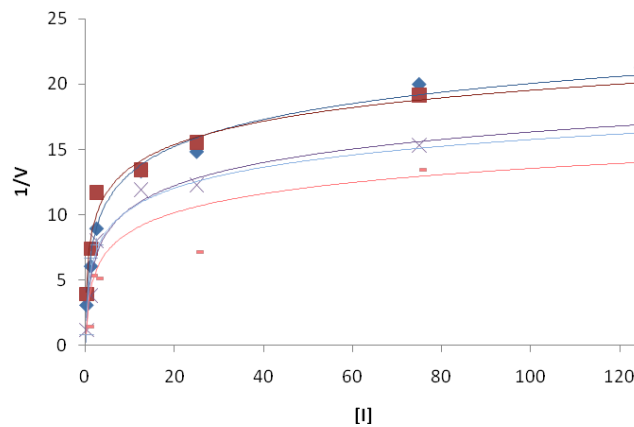


FIGURA 4.81 - Ajuste dos dados experimentais utilizando o modelo de Dixon, com o inibidor 6-shogaol. As concentrações de substrato utilizadas foram as seguintes: 1,0 μM (◆) 2,0 μM (■), 5,0 μM (×), 15 μM (+) e 20 μM (—).

Portanto, a análise dos resultados obtidos graficamente, com os três modelos utilizados (Lineweaver-Burk, Hanes-Woolf e Dixon) assegura que o SSi6 é um inibidor do tipo não-competitivo parcial.

Através dos coeficientes angulares e lineares obtidos com a linearização de Hanes-Woolf, a constante de Michaelis-Menten para a catepsina K pode ser determinada, como se observa na TABELA 4.11. A reação de hidrólise do substrato Z-Phe-Arg-MCA teve como V_{max} $1,70 \pm 0,25$ RFU/min.

TABELA 4.11 - Constante de Michaelis-Menten (K_M) da catepsina K humana, com o substrato Z-Phe-Arg-MCA.

Enzima	K_M (μ M) exp	K_M (μ M) literatura ¹	K_M (μ M) literatura ²
Catepsina K	6,5	8,2	7,5

¹SEVERINO, R. P., 2008; ²BROMME et al., 1996

Com os valores de K_M e V_{max} , e as equações de Hanes-Woolf para cada tipo de inibição enzimática determinada, foram obtidos os parâmetros cinéticos para as três substâncias, como pode ser observado na TABELA 4.12.

TABELA 4.12 - Parâmetros cinéticos de inibição do 6-shogaol, 10-gingerol e SSi6 frente à catepsina K

Substâncias	Modo de inibição	$\alpha.K_i$ (μ M)	K_i (μ M)
6-shogaol	Acompetitiva completa	16,65	-
10-gingerol	Acompetitiva parcial	10,77	-
SSi6	Não-competitiva parcial	0,75	10,47

Estes resultados reforçam a moderada atividade inibitória desses inibidores frente à catepsina K, por apresentarem valores baixos de constante de inibição (K_i , $\alpha.K_i$) na ordem de micromolar.

Como a substância SSi6 é um inibidor do tipo não-competitivo, existem duas rotas para a formação do complexo ternário ESI, e por isso ele apresenta dois valores de constante de inibição enzimática ($\alpha.K_i$ e K_i), como ilustrado na FIGURA 1.12, Item 1.6.1.6. da Introdução. Como o $\alpha.K_i$ (K_i') tem um valor mais baixo que o K_i , a velocidade da reação é maior na rota em que o inibidor se liga ao complexo ES ($ES+I \rightarrow ESI$) do que na rota em que o inibidor se liga a enzima livre ($E+I \rightarrow EI$) formando em seguida o complexo ESI. Isso indica que o inibidor tem uma maior afinidade pelo complexo ES do que pela enzima livre.

4.4 - Ensaios em culturas de células

4.4.1 - Ensaios de viabilidade celular frente a células ATDC5, condrócitos e sinoviócitos humanos

Os próximos ensaios com as substâncias, 6-shogaol, 10-gingerol e SSi6, serão os realizados em meio celular, que são ensaios que apresentam uma maior complexidade, pois, cada vez mais se aproxima do sistema *in vivo*. Inicialmente, ensaios de citotoxicidade foram realizados para determinar as concentrações ideais das substâncias que serão utilizadas nos ensaios posteriores.

Um ensaio inicial de viabilidade celular foi realizado de modo que a morte celular pode ser visualizada por microscopia (FIGURA 4.82).

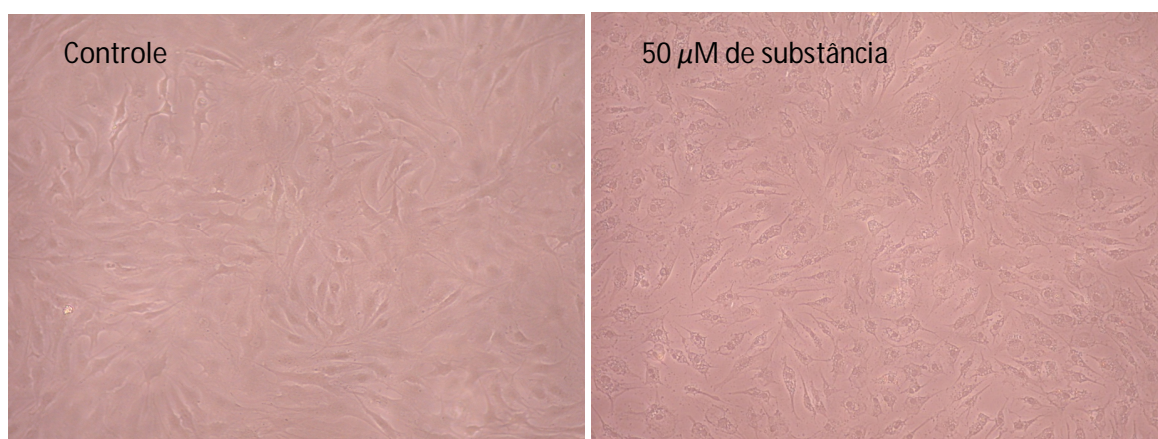


FIGURA 4.82 - Microfotografias dos condrócitos mostrando as células viáveis, (imagem esquerda), como controle, e células em apoptose, (imagem direita), representando a morte celular causada pelas substâncias teste na concentração de 50 µM.

As células utilizadas foram os condrócitos humanos, e as concentrações de cada substância foram: 0,5; 5,0; 50 e 500 µM. A partir da concentração de 50 µM, as três substâncias foram tóxicas, como pode ser observado pela microfotografia das células na FIGURA 4.82. Uma perda da forma e de aderência das células observadas na placa caracteriza a morte celular.

A partir dos resultados iniciais de viabilidade celular, outras concentrações de cada composto foram preparadas para realizar o ensaio de

citotoxicidade utilizando o método do MTT, como descrito em Material e Métodos no Item 3.3.6.3. Estes resultados estão ilustrados através dos gráficos nas FIGURAS 4.83 e 4.84.

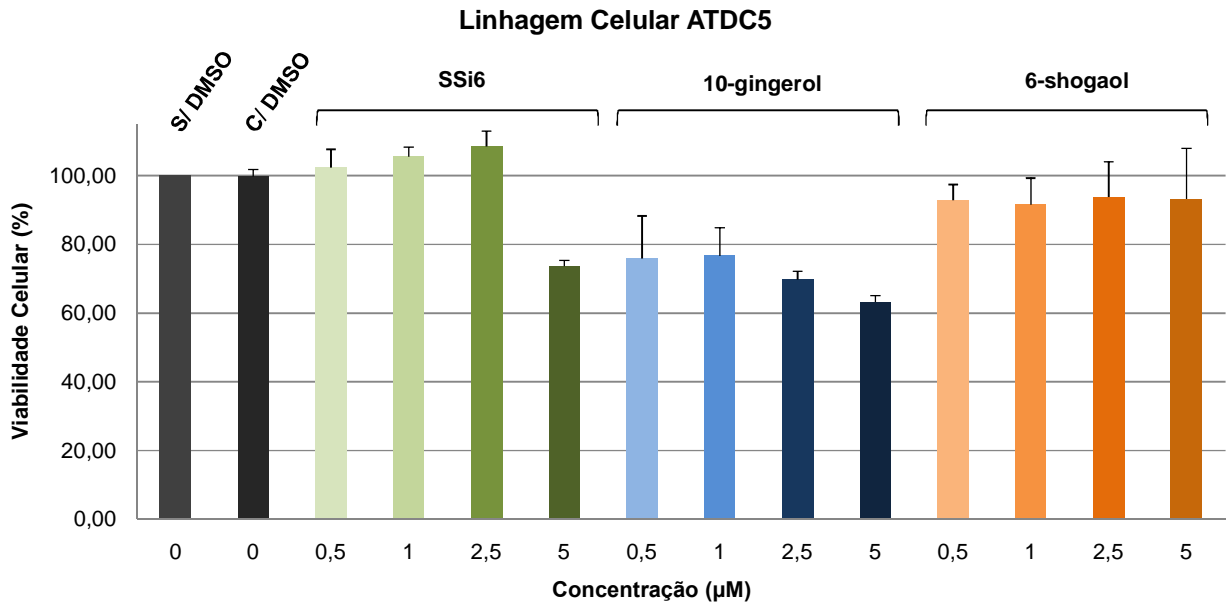


FIGURA 4.83 - Citotoxicidade das substâncias (SSi6, 10-gingerol, 6-shogaol) frente a linhagem celular ATDC5.

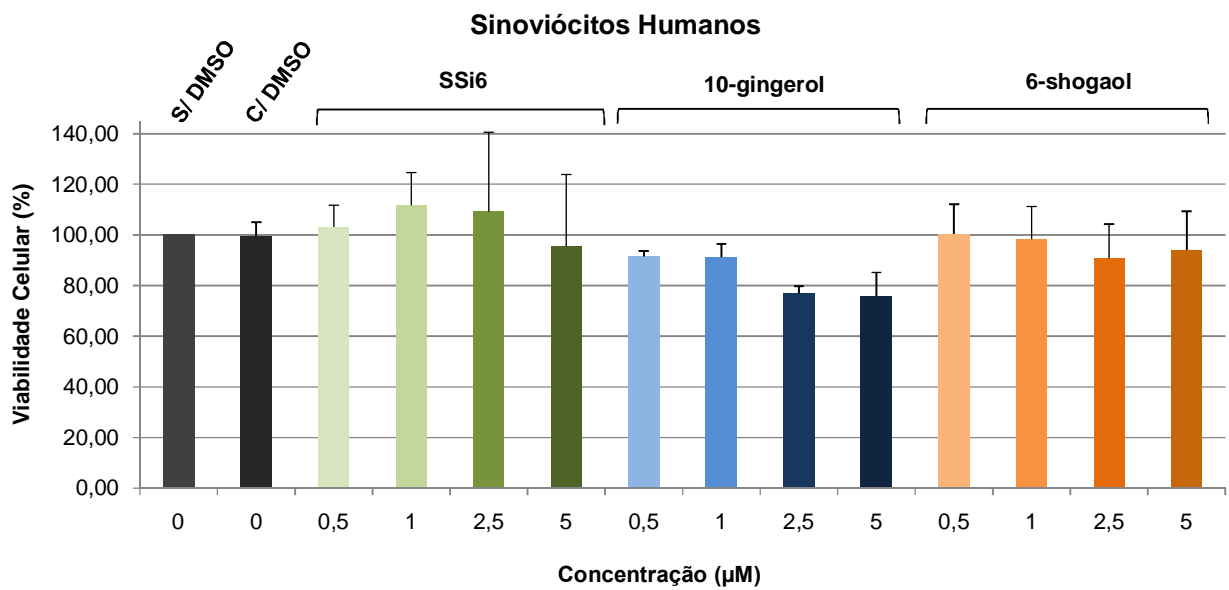


FIGURA 4.84 - Citotoxicidade das substâncias (SSi6, 10-gingerol, 6-shogaol) frente a sinoviócitos humanos.

Como pode ser observado nas FIGURAS 4.83 e 4.84, com o ensaio do MTT, em linhagem celular de rato pré-condrocitária (ATDC5), e em sinoviócitos humanos, o composto que apresentou maior toxicidade celular foi o 10-gingerol, tendo menor toxicidade nas concentrações de 1,0 e 0,5 μM . No caso do composto SSi6, a concentração mais tóxica foi 5,0 μM , com uma toxicidade maior para as células ATDC5 do que para os sinoviócitos humanos. Portanto, a concentração mais alta que poderia ser selecionada para o SSi6 seria 2,5 μM . Para o 6-shogaol todas as concentrações utilizadas não causaram morte celular considerável, portanto as maiores concentrações neste caso poderiam ser utilizadas (2,5 μM e 5,0 μM).

4.4.2 - Ensaio de inibição da catepsina K em condrócitos humanos

Condrócitos são células do tecido cartilaginoso, que produzem enzimas proteolíticas, como a catepsina K, capazes de causar erosão da cartilagem de pacientes com doenças osteoarticulares (VINARDELL et al., 2009)

Em cultivos celulares, a atividade da catepsina K pode ser visualizada por microscopia de fluorescência utilizando-se o substrato fluorogênico Z-Gly-Pro-Arg-4M β NA, e nitrosalicilaldeído (NSA), como está descrito em Material e Métodos, no item 3.3.6.4. O resultado final é a formação de um precipitado fluorescente localizado no interior das células (FIGURA 4.85). Quanto menor a fluorescência gerada pela reação enzimática, mais ativo será o inibidor.

Uma excelente atividade de inibição, para as três substâncias testadas, frente à catepsina K pode ser observada pela diminuição quase total da fluorescência (FIGURA 4.85). Tomando como base a relação segurança/efetividade, as substâncias que se apresentaram com resultados melhores foram: SSi6 e 6-shogaol. A menor atividade do 10-gingerol provavelmente foi obtida devido à menor concentração ensaiada (1 μM) para esta substância, limitada pelo maior citotoxicidade da mesma sobre células humanas e de ratos, em concentrações maiores.

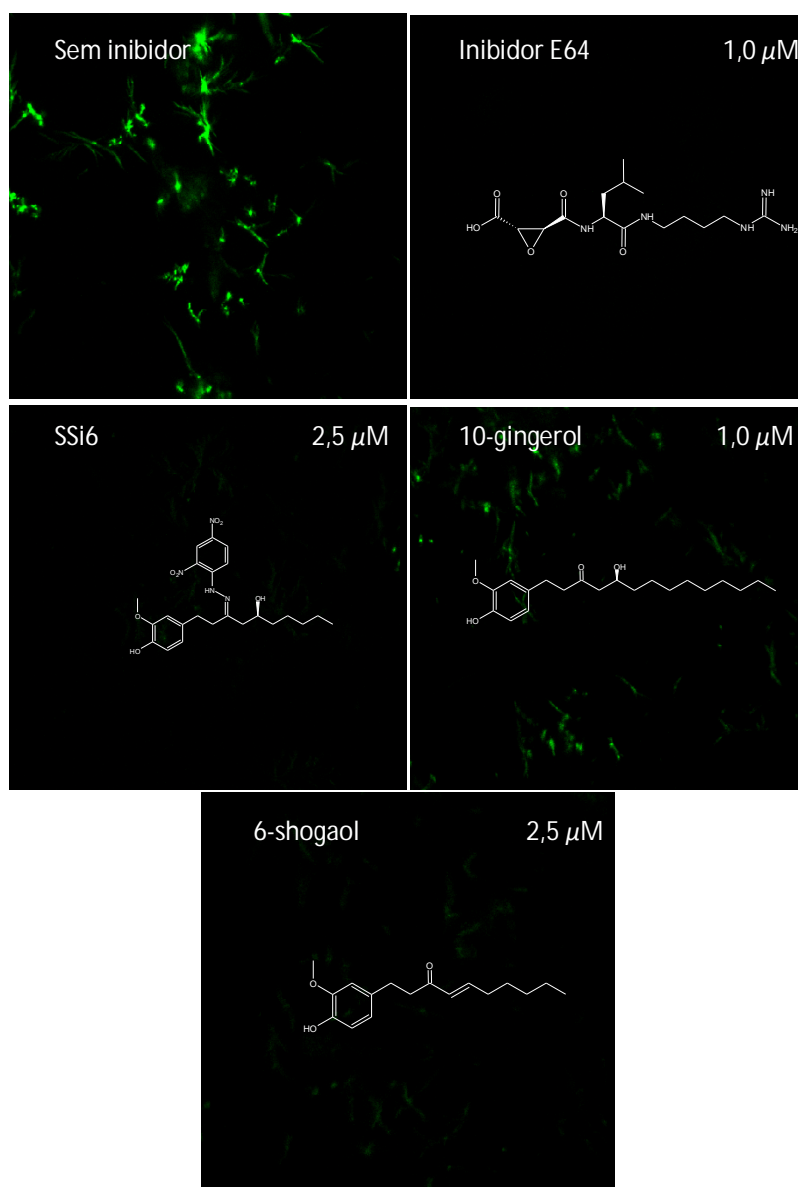


FIGURA 4.85 - Inibição da atividade da catepsina K em condrócitos humanos com os inibidores reversíveis SSi6, 10-gingerol, 6-shogaol e o inibidor irreversível E64, como controle positivo. O controle negativo foi realizado nas mesmas condições reacionais, mas sem inibidor.

Mesmo apresentando valores de IC_{50} (10-gingerol: 10,38 μ M, 6-shogaol: 154,9 μ M; SSi6: 17,0 μ M) acima das concentrações testadas nos ensaios em células, obtiveram-se ótimos resultados de inibição enzimática. Isso pode ser explicado, pois, as condições nas quais a catepsina K se encontra no ensaio bioquímico (enzima isolada) e no ensaio biológico (enzima dentro da célula) são diferentes. Mudanças conformacionais da enzima existem, dependendo do meio em que ela se encontra e, portanto, a afinidade da mesma com um determinado ligante (inibidor ou substrato) poderá mudar. O meio celular, está mais próximo das

condições *in vivo*, e isso vem a comprovar o efeito real desses inibidores frente à catepsina K, como bons protótipos a fármacos.

4.4.3 - Ensaios de inibição da produção de óxido nítrico em células ATDC5 e condrócitos humanos

O óxido nítrico é um importante mediador da inflamação e, a sua determinação em meios biológicos pode ser utilizada para a busca de inibidores de enzimas que participam da sua biossíntese, principalmente a óxido nítrico sintase induzível (iNOS), como está ilustrada na FIGURA 4.86.

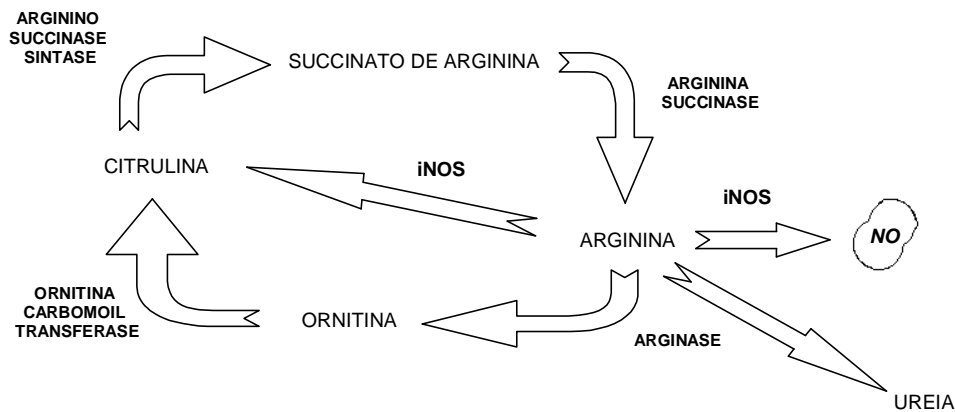


FIGURA 4.86 - Via de produção do NO com as enzimas envolvidas neste processo.

Os resultados da inibição da produção de óxido nítrico celular podem ser determinados pela medida de nitritos do sobrenadante (meio de cultura) do cultivo celular.

Existem vários agentes pró-inflamatórios que podem induzir a produção de NO em meio celular, como: lipopolissacarídeo bacteriano, IL1, fator de necrose tumoral e interferon- γ (SOUTHAN e SZABÓ, 1996). Neste trabalho para estimular a produção de óxido nítrico pelas células, foi utilizado IL1. Houve um estímulo de cerca de 80% na produção de óxido nítrico. O efeito das substâncias teste na produção de óxido nítrico pelas células pode ser observado nos gráficos das FIGURAS 4.87 e 4.88.

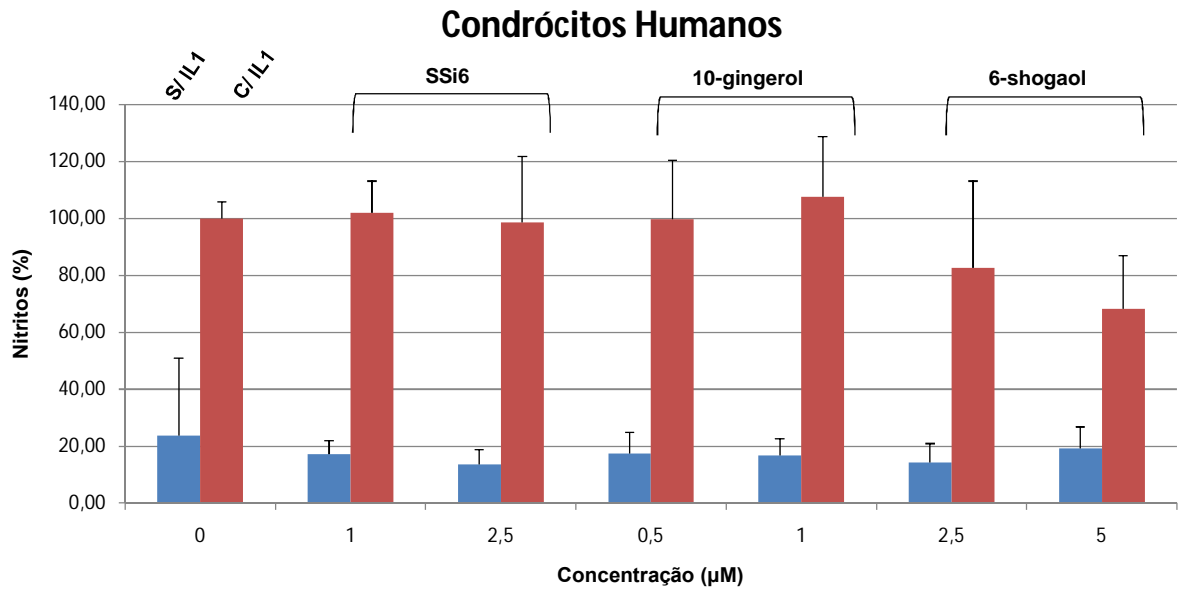


FIGURA 4.87 - Inibição da produção de nitritos em condrócitos humanos, com as substâncias SSi6, 10-gingerol e 6-shogaol.

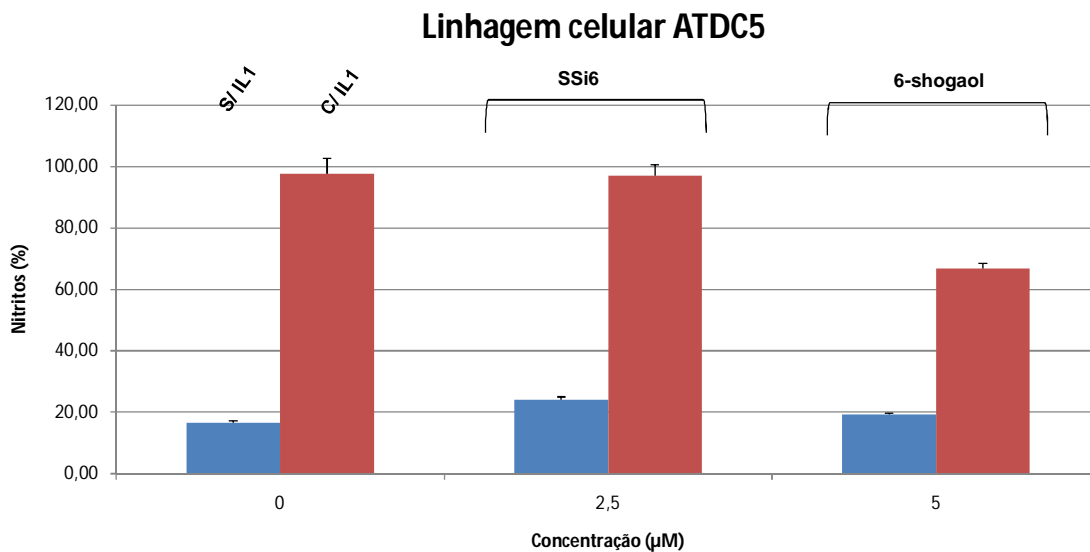


FIGURA 4.88 - Inibição da produção de nitritos em células ATDC5, com as substâncias SSi6 e 6-shogaol.

O 10-gingerol não apresentou efeito sob a produção de óxido nítrico, em condrócitos humanos, e o SSi6 em ambas as células (ATDC5 e condrócitos humanos), no entanto, o 6-shogaol inibiu a produção de óxido nítrico em torno de 30%, na concentração de 5 µM, para os dois tipos celulares. Na concentração de 2,5 µM houve uma inibição de 20% em condrócitos humanos, indicando um efeito dose-

dependente, sobre essas células (FIGURA 4.87 e 4.88). Os resultados positivos com o 6-shogaol já eram esperados, pois ele já havia apresentado um bom efeito inibitório na produção de NO em macrófagos, estimuladas com lipopolissacarídeo bacteriano, na concentração de 6 μ M (DUGASANI et al., 2010).

5. Conclusão

A seleção da espécie *Z. officinale*, dentre dez plantas utilizadas no tratamento de doenças osteoarticulares permitiu a descoberta de algumas substâncias com moderada potência de inibição frente à catepsina K. A metodologia empregada, isolamento de substâncias através de biomonitoramento, facilitou a busca das substâncias responsáveis pela atividade enzimática presentes nos extratos vegetais.

Das dezoito substâncias isoladas, cinco apresentaram considerável efeito inibitório frente à catepsina K. Foram elas: 10-gingerol ($10,38 \pm 0,18 \mu\text{M}$), 8-shogaol ($21,07 \pm 2,39 \mu\text{M}$), 10-shogaol ($5,84 \pm 0,35 \mu\text{M}$), 6-gingerdiol ($54,40 \pm 2,41 \mu\text{M}$) e diacetato de 6-gingerdiol ($55,34 \pm 3,85 \mu\text{M}$). Vale ressaltar que algumas características estruturais foram importantes para a maior atividade apresentada, como a ligação α,β -insaturada na cadeia lateral presente nos shogaios, e o maior comprimento desta cadeia alquílica. Ensaio inibitórios de seletividade frente às catepsinas L, S e V, foram realizados, obtendo-se em geral, uma maior seletividade dessas substâncias à catepsina K, com o 6-gingerdiol sendo a substância mais seletiva.

Pela grande quantidade dos gingeróis, uma classe de substâncias com diversas atividades biológicas, que esta espécie produz, realizou-se um estudo de sobrecarga de coluna cromatográfica em CLAE, com o intuito de se isolar grandes quantidades dos principais gingeróis. Em uma injeção cromatográfica no modo semi-preparativo, a partir de 170 mg de amostra, e 30 min de tempo de corrida, isolou-se 93 mg de 6-gingerol, 22 mg de 8-gingerol e 17 mg de 10-gingerol, com grau de pureza considerável (>96 %), obtido através da análise elementar, de cada um deles. Este resultado tem caráter inovador já que é o primeiro relato na literatura (até a publicação desta tese, em 2011) de isolamento em escala semi-preparativa do 6, 8 e 10-gingerol por CLAE, no modo reverso de eluição.

Com as modificações químicas do o 6-gingerol, obtiveram-se sete substâncias, das quais quatro apresentaram boas atividades de inibição frente a catepsina K. Foram elas: SSi3 ($\text{IC}_{50} = 11,88 \pm 0,54 \mu\text{M}$), SSi4 ($6,22 \pm 0,15 \mu\text{M}$), SSi6 ($\text{IC}_{50} = 17,01 \pm 1,95 \mu\text{M}$), SSi6I ($23,86 \pm 0,30 \mu\text{M}$). O maior rendimento reacional (45%) foi obtido para o SSi6, embora experimentos de otimização não tenham sido realizados. As substâncias SSi3, SSi4, SSi5, SSi6 e SSi6II são inéditas e, agregado

a isto, suas boas atividades de inibição frente à catepsina K as tornam muito importantes para a química medicinal, promovendo um avanço em termo de estrutura/atividade para esta classe de compostos. A partir do 6-gingerol também foi obtido de maneira simples o 6-shogaol. Este, por apresentar um efeito anti-inflamatório frente a células, agregado a uma atividade de inibição da catepsina K, foi utilizado para ensaios posteriores.

Uma análise mais detalhada dos efeitos bioquímicos/biológicos de três substâncias selecionadas foi realizada. Iniciou-se com a determinação dos modos de inibição frente à catepsina K para o 6-shogaol ($K_i' = 16,65$), 10-gingerol ($K_i' = 10,77 \mu\text{M}$) e SSi6 ($K_i' = 0,75$ e $K_i = 10,47$). Foram eles: incompetitiva, incompetitiva parcial e não-competitiva parcial, respectivamente. Esta é a primeira vez que inibidores incompetitivos e não-competitivos da catepsina K são identificados. Este resultado vem a contribuir para o progresso na área de inibição enzimática em bioquímica, já que pouco se conhece sobre os mecanismos de inibição incompetitiva e não-competitiva, quando comparados ao mecanismo de inibição competitivo.

A inibição da catepsina K em meio celular foi visualmente maior (por redução da fluorescência), comparado aos resultados obtidos com a catepsina K isolada, pois se utilizando concentrações menores (6-shogaol: $2,5 \mu\text{M}$; 10-gingerol: $1,0 \mu\text{M}$ e SSi6: $2,5 \mu\text{M}$) que seus valores de IC_{50} (6-shogaol: $154,9 \mu\text{M}$, 10-gingerol: $10,4 \mu\text{M}$, SSi6: $17,0 \mu\text{M}$) podem-se observar seu excelente resultado sobre a atividade enzimática. Estes resultados demonstram o real efeito destes inibidores frente à catepsina K, já que ensaios celulares estão bem mais próximos do ambiente *in vivo* do que ensaios realizados com a enzima isolada.

Os ensaios de citotoxicidade para as três substâncias selecionadas foram realizados em sinoviócitos humanos, e pode-se observar uma baixa toxicidade tanto para o 6-shogaol quanto para o SSi6 em todas as concentrações testadas (0,5; 1,0; 2,5 e $5,0 \mu\text{M}$). Felizmente, as melhores atividades de inibição frente à catepsina K foram observadas para as substâncias menos tóxicas (6-shogaol e SSi6). Na inibição da produção de óxido nítrico em condrócitos humanos observou-se uma eficácia em torno de 30% para o 6-shogaol, na concentração de $5,0 \mu\text{M}$. Um excelente resultado, visto que a concentração de 6-shogaol no ensaio celular foi baixa. Concentrações maiores que $5 \mu\text{M}$ poderia apresentar inibições na produção de NO maiores, já que se observa um efeito dose-dependente para esta substância.

Por ter apresentado uma boa atividade de inibição frente à catepsina K, e inibição da produção de NO em condrócitos humanos, o 6-shogaol se apresenta como uma substância com grande potencial a se tornar um agente terapêutico eficaz no tratamento de doenças que se caracterizam por perda de matriz extracelular e inflamação, como a artrose, e a artrite.

Com base nos resultados obtidos neste trabalho pode-se concluir que, a espécie *Z. officinale*, utilizada há milhares de anos no tratamento da artrose e artrite, apresentou fortes indícios de atividade terapêutica, observado através da inibição da atividade da catepsina K, enzima diretamente envolvida na destruição de tecido ósseo e cartilaginoso, e da inibição, pelo 6-shogaol, da produção de NO, um importante mediador da inflamação em articulações. Este resultado vem a contribuir para o seu uso como agente terapêutico, no entanto, ensaios *in vivo* ainda devem ser realizados a fim de se aumentar a segurança de seu uso.

6. Referências Bibliográficas

- ADAMS, R. P. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*, 4^a edição, Allured Publishing Comporation, 2007. 804 p.
- ADKISON, K. K.; BARRETT, D. G.; DEATON, D. N.; GAMPE, R. T.; HASSEL, A. M.; LONG, S. T.; MCFADYEN, R. B.; MILLER, A. B.; MILLER, L. R.; PAYNE, J. A.; SHEWCHUK, L. M.; WELLS-KNECHT, K. J.; WILLARD-JR, D. H.; WRIGHT, L. L. "Semicarbazone-based inhibitors of cathepsin K, are they prodrugs for aldehyde inhibitors?". *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **16**, 978–983, 2006.
- AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. "Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil". *Rev. Bras. Farmacogn.*, **17**, (1), 114, 2007.
- AHMED, S.; ANUNTIYO, J.; MALEMUD, C. J.; HAQQI, T. M. "Biological basis for the use of botanicals in osteoarthritis and rheumatoid arthritis: a review". *eCAM*, **2**, (3): 301-308, 2005.
- ALI, B. H.; BLUNDEN, G.; TANIRA, M; O.; NEMMAR, A. "Some phytochemical, pharmacological and toxicological properties of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe): A review of recent research". *Food Chem. Toxicol.*, **46**, 409-420, 2008.
- ALTMANN, E.; AICHHOLZ, R.; BETSCHART, C.; BUHL, T.; GREEN, J.; IRIE, O.; TENO, N.; LATTMANN, R.; TINTELNOT-BLOMLEY, M.; MISSBACH, M. "2-Cyano-pyrimidines: A New Chemotype for Inhibitors of the Cysteine Protease Cathepsin K". *J. Med. Chem.*, **50**, (4): 591-594, 2007.
- ARAYA, J. J.; ZHANG, H.; PRISINZANO, T. E.; MITSCHER, L. A.; TIMMERMANN, B. N. "Identification of unprecedented purine-containing compounds, the zingerines, from ginger rhizomes (*Zingiber officinale* Roscoe) using a phase-trafficking approach". *Phytochemistry*, **72** (9): 935-941. 2011.
- BEYER, C.; SCHETT, G. "Novel targets in bone and cartilage". *Best Pract. Res. Cl. Rh.* **24**, 489-496, 2010.
- BISSWANGER, H. *Enzyme Kinetics: Principals and Methods*, 2^a edição, Editora Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2008. 301 p.
- BRACHT, A. & ISHIIWAMOTO, E. M. *Métodos de Laboratório em Bioquímica*, 1^a edição, Editora Manole Ltda, São Paulo, 2003. 439 p.
- BRIEN, S.; LEWITH, G. T.; MCGREGOR, G. "Devil's claw (*Harpagophytum procumbens*) as a treatment for osteoarthritis: a review of efficacy and safety". *J. Altern. Compl. Med.*, **12**, (10), 981-993, 2006.

- BRÖME, D.; OKAMOTO, K.; WANG, B. B.; BIROC, S. "Human cathepsin O2, a matrix protein-degrading cysteine protease expressed in osteoclasts". *J. Biol. Chem.*, **271** (4): 2126-2132, 1996.
- CAI, J.; JAMIESON, C.; MOIR, J.; RANKOVIC, Z. "Cathepsin K inhibitors, 2000-2004". *Expert. Opin. Ther. Pat.*, **15** (1): 33-48, 2005.
- CASS, Q. B. E DEGANI, A. L. G. *Desenvolvimento de Métodos por HPLC: Fundamentos, Estratégias e Validação*, EdUFSCar, São Carlos, 2001.
- CATALANO, J. G.; DEATON, D. N.; FURFINE, E. S.; HASSEL, A. M.; MCFADYEN, R. B.; MILLER, A. B.; MILLER, L. R.; SHEWCHUK, L. M.; WILLARD-JR, D. H.; WRIGHT, L. L. "Exploration of the P₁ SAR of aldehyde cathepsin K inhibitors". *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **14** (1): 275-278, 2004.
- CHANTRE, P.; CAPPELAERE, A.; LEBLAN, D.; GUEDON, D.; VANDERMANDER, J.; FOURNIER, B. "Efficacy and tolerance of Harpagophytum procumbens versus diacerhein in treatment of osteoarthritis". *Phytomedicine*, **7**, (3), 177–183, 2000.
- CHAPMAN, H. A.; RIESE, R. J.; SHI, G. P. "Emerging roles for cysteine proteases in human biology". *Annu. Rev. Physiol.*, **59**, 63-88, 1997.
- CHRUBASIK, S.; POLLAK, S.; BLACK, A. "Effectiveness of devil's claw for osteoarthritis". *Rheumatol.*, **41**, 1332–1333, 2002.
- CONNEL D. W. E SUTHERLAND, M. D. A Re-Examination of gingerol, shogaol, and zingerone, the pungent principles of ginger (*Zingiber Officinale* Roscoe). *Aust. J. Chem.*, **22**, 1033-1043, 1969.
- COPELAND, A. R. *Evaluation of enzyme inhibition in drug discovery: a guide for medicinal and pharmacologist*. Editora Jonh Wiley & Sons, NJ 07030 USA, 2005. 272 p.
- CRANE, S. N.; BLACK, W. C.; PALMER, J. T.; DAVIS, D. E.; SETTI, E.; ROBICHAUD, J.; PAQUET, J.; OBALLA, R. M.; BAYLY, C. I.; MACKAY, D. J.; SOMOZA, J. R.; CHAURET, N.; SETO, C.; SCHEIGETZ, J.; WESOLOWSKI, G.; MASSÉ, F.; DESMARAIS, S.; OUELLET, M. "β-Substituted cyclohexanecarboxamide: a nonpeptidic framework for the design of potent inhibitors of cathepsin K". *J. Med. Chem.* **49**, 1066-1079, 2006.
- DEBIASI, C.; FELTRIN, F.; MICHELUZZI, F. C. "Micropropagação de gengibre (*Zingiber officinale*)". *R. Bras. Agrocência*, **10** (1): 61-65, 2004.
- DUGASANI, S.; PICHKA, M. R.; NADARAJAH, V. D.; BALIJEPALLI, M. K.; TANDRA, S.; KORLAKUNTA, J. N. "Comparative antioxidant and anti-inflammatory effects of [6]-gingerol, [8]-gingerol, [10]-gingerol and [6]-shogaol". *J. Ethnopharm.*, **127**, 515-520, 2010.
- FUNK, J. L.; FRYE, J. B.; OYARZO, J. N.; TIMMERMANN, B. N. "Comparative effects of two gingerol-containing *Zingiber officinale* extracts on experimental rheumatoid Arthritis". *J. Nat. Prod.*, **72** (2): 403-407, 2009.

- GONÇALVES, C.; DINIS, T.; BATISTA, M. T. "Antioxidant properties of proanthocyanidins of *Uncaria tomentosa* bark decoction: a mechanism for anti-inflammatory activity". *Phytochemistry*, **66**, 89-98, 2005.
- HE, X-G.; BERNART, M. W.; LIAN, L-Z.; LIN, L-Z. "High-performance liquid chromatography–electrospray mass spectrometric analysis of pungent constituents of ginger". *J. Chromatogr. A.*, **796**, 327-334, 1998.
- HENROTIN, Y.; CLUTTERBUCK, A. L.; ALLAWAY, D.; LODWIG, E. M.; HARRIS, P.; MATHY-HARTERT, M.; SHAKIBAEI, M.; MOBASHERI, A. "Biological actions of curcumin on articular chondrocytes". *Osteoarthritis Cartilage*, **18**, 141-149, 2010.
- HISERODT, R. D.; FRANZBLAU, S. G.; ROSEN, R. T. "Isolation of 6-, 8-, and 10-gingerol from ginger rhizome by HPLC and preliminary evaluation of inhibition of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium tuberculosis*". *J. Agric. Food. Chem.*, **46**, 2504-2508, 1998.
- HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E.F.; VIEIRA, P.C. *Princípios Ativos de Plantas Superiores*. Editora da UFSCar, 2003. 152 p.
- HOU, W-S.; CHAN, K.; KLEIN, M. J.; LEVY, R.; KEYSSER, M.; KEYSZER, G.; BROMME, D. "Cathepsin K is a critical protease in synovial fibroblast-mediated collagen degradation". *Am. J. Path.* **159**, 2167-2177, 2001.
- IACONO, A.; GÓMEZ, R.; SPERRY, J.; CONDE, J.; BIANCO, G.; MELI, R.; GÓMEZ-REINO, J. J.; SMITH, A. B. 3rd.; GUALILO, O. "Effect of oleocanthal and its derivatives on inflammatory response induced by lipopolysaccharide in a murine chondrocyte cell line". *Arthritis Rheum.*, **62** (6): 1675-1682, 2010.
- JEONG, J. C.; KANG, S.K.; YOUN, C. H.; JEONG, C. W.; KIM, H. M.; LEE, Y. C.; CHANG, Y. C.; KIM, C. H. "Inhibition of *Drynariae Rhizoma* extracts on bone resorption mediated by processing of cathepsin K in cultured mouse osteoclasts". *Intern. Immunopharmacol.* **3**, 1685-1697, 2003.
- JOLAD, S. D.; LANTZ, R. C.; CHEN, G. J.; BATES, R. B.; TIMMERMANN, B. N. "Commercially processed dry ginger (*Zingiber officinale*): Composition and effects on LPS-stimulated PGE2 production". *Phytochemistry*, **66**, 1614-1635, 2005.
- JOLAD, S. D.; LANTZ, R. C.; SOLYOM, A. M.; CHEN, G. J.; BATES, R. B.; TIMMERMANN, B. N. "Fresh organically grown ginger (*Zingiber officinale*): composition and effects on LPS-induced PGE2 production". *Phytochemistry*, **65**, 1937-1954, 2004.
- KANG, S. K.; KIM, K. S.; BYUN, Y. S.; SUH, S. J.; JIM, U. H.; KIM, K. H.; LEE, I. S.; KIM, C. H. "Effects of *Umus davidiana* planch on mineralization, bone morphogenetic protein-2, alkaline phosphatase, type I collagen, and collagenase in bone cells". *In Vitro Cel. Dev. Biol. Anim.*, **42**, 225-229, 2006.
- KIKUZAKI, H.; TSAI, S. M.; NAKATANI, M. "Gingerdiol related compounds from the rhizomes of *Z. officinale*". *Phytochemistry*, **31** (5): 1783-1786, 1992.

- KIKUZAKI, H.; USUGUCHI, J.; NAKATANI, M. "Constituents of Zingiberaceae. I. Diarylheptanoids from the Rhizomes of Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe)". *Chem. Pharm. Bull.*, **39** (1): 120-122, 1991.
- KOOPMAN, W. J.; MORELAND, L. W. "Arthritis and allied conditions: a textbook of rheumatology". v. 1, 15^o edição, Editora Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA 19106 USA, 2004. 2600 p.
- KUKAMATA, Y.; FURUKAWA, J.; FUENO, T. "The effect of solvents on the optical rotation of propylene oxide", *Bull. Chem. Soc. Jpn*, **43**, 3920-3921, 1970.
- LECAILLE, F.; KALETA, J.; BRÖMME, D. "Human and parasitic papain-like cysteine proteases: their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design". *Chem. Rev.*, **12**, 4459-4488, 2002.
- LEE, S. W.; LIM, J-H.; KIM, M. S.; JEONG, J-H.; SONG, G-Y.; LEE, W-S.; RHO, M-C. "Phenolic compounds isolated from *Zingiber officinale* roots inhibit cell adhesion". *Food Chem.*, **128**, 778-782, 2011.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de Bioquímica*, 4^a edição, Editora Artmed, 2006. 1274 p.
- LESKOVAC, V. *Comprehensive Enzyme Kinetics*, Kluwer Academic Publishers, NY, Boston, Dordrecht, London, Moscow, 2004. 438 p.
- LI, Z.; KIENETZ, M.; CHERNEY, M. M.; JAMES, M. N. G.; BRÖMME, D. "The Crystal and Molecular Structures of a Cathepsin K:Chondroitin Sulfate Complex". *J. Mol. Biol.*, **383**, 78-91, 2008.
- MA, J.; JIN, X.; YANG, L.; LIU, J-L. "Diarylheptanoids from the rhizomes of *Zingiber officinale*". *Phytochemistry*, **65**, 1137-1143, 2004.
- MARCH, J. *Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanism and Structure*, 4^a edição, John Wiley and Sons, New York, 1992. 1495 p.
- MARX, F. C.; OLIVEIRA, L. M.; BELLINI, C. G.; RIBEIRO, M. C. C. "Tradução e validação cultural do questionário algofuncional de Lequesne para osteoartrite de joelhos e quadris para a língua portuguesa". *Rev. Bras. Reumatol.*, **46** (4): 253-260, 2006.
- MATOS, F. J. A. *Plantas Medicinais: guia de seleções e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil*. 2^a edição. Edições UFC, Ceará, 2000. 344 p.
- MCGRATH, M.E. "The lysosomal cysteine proteases". *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **28**, 181-204, 1999.
- MORKO, J. P.; SÖDERSTRÖN, M.; SÄÄMÄNEN, A-M. K.; SALMINEN, H. J.; VUORIO, E. I. "Up regulation of cathepsin K expression in articular chondrocytes in a transgenic mouse model for osteoarthritis". *Ann. Rheum. Dis.*, **63**, 649-655, 2004.

- NEGRELLE, R.R.B.; ELPO, E.R.S.; RÜCKER, N.G.A. "Análise prospectiva do agronegócio gengibre no estado do Paraná". *Hortic. Bras.*, **23** (4): 1022-1028, 2005.
- NEWMAN, D. J. "Natural products as leads to potential drugs: an old process or the new hope for drug discovery?". *J. Med. Chem.*, **51**, 2589-2599, 2008.
- NGO, K-S. E BROWN, G. D. "Stilbenes, monoterpenes, diarylheptanoids, labdanes and chalcones from *Alpinia katsumada*". *Phytochemistry*, **47** (6): 1117-1123, 1998.
- NOVINEC, M.; KOVACIC, L.; LENARCIC, B.; BAICI, A. "Conformational flexibility and allosteric regulation of cathepsin K". *Biochem. J.*, **429**, 379-389, 2010.
- OTERO, M.; LAGO, R.; GÓMEZ, R.; LAGO, F.; GOMEZ-REINO, J. J.; GUALILLO, O. "Phosphatidylinositol 3-kinase, MEK-1 and p38 mediate leptin/interferon-gamma synergistic NOS type II induction in chondrocytes". *Life Sci.* **81**, 1452-1460, 2007.
- OTTO, H. H.; SCHIRMEISTER, T. "Cysteine proteases and their inhibitors". *Chem. Rev.*, **97**, 133-171, 1997.
- PALMER, J. T.; HIRSCHBEIN, B. L. CHEUNG, H.; MCCARTER, J.; JANC, J. W.; YU, Z. W.; YU, W.; WESOLOWSKI, G. "Keto-1,3,4-oxadiazoles as cathepsin K inhibitors". *Bioorg. Med. Lett.* **16**, 2909-2914, 2006.
- PAN, X.; TAN, N.; ZENG, G.; HAN, H.; HUANG, H. "3D-QSAR and docking studies of aldehyde inhibitors of human cathepsin K". *Bioorg. Med. Chem.*, **14**, 2771-2778, 2006.
- PARK, M.; BAE, J.; LEE, D. S. "Antibacterial activity of [10]-gingerol and [12]-gingerol isolated from ginger rhizome against periodontal bacteria". *Phytother. Res.*, **22**, 1446-1449, 2008.
- PATIL, A. D.; FREYER, A. J.; CARTE, B.; TAYLOR, P. B.; JOHNSON, R. K.; FAULKNER, D. J. "Haploscleridamine, a novel tryptamine-derived alkaloid from a sponge of the order haplosclerida: an inhibitor of cathepsin K". *J. Nat. Prod.*, **65**, 628-629, 2002a.
- PATIL, A. D.; FREYER, A. J.; KILLMER, L.; OFFEN, P.; TAYLOR, P. B.; VOTTA, B. J.; JOHNSON, R. K. "A new dimeric dihydrochalcone and a new prenylated flavone from the bud covers of *Artocarpus altilis*: potent inhibitors of cathepsin K". *J. Nat. Prod.*, **65**, 624-627, 2002b.
- PUENGPHIAN, C.; SIRICHOTE, A. "[6]-gingerol content and bioactive properties of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) extracts from supercritical CO₂ extraction". *As. J. Food Ag-Ind.*, **1** (1): 29-36, 2008.
- ROBICHAUD, J.; OBALLA, R.; PRASIT, P.; FALGUEYRET, J. P.; PERCIVAL, M. D.; WESOLOWSKI, G.; RODAN, S. B.; KIMMEL, D.; JOHNSON, C.; BRYANT, C.; VENKATRAMAN, S.; SETTI, E.; MENDONCA, R.; PALMER, J. T. "A Novel Class of Nonpeptidic Biaryl Inhibitors of Human Cathepsin K". *J. Med. Chem.*, **46**, 3709-3727, 2003.

- ROLLAS, S.; KÜÇUKGÜZEL, Ş. G. "Biological activities of derivatives hydrazones". *Molecules*, **12**, 1910-1939, 2007.
- ROMAN-BLAS, J. A.; CONTRERAS-BLASCO, M. A.; LARGO, R.; ÁLVAREZ-SORIA, M. A.; CASTAÑEDA, S.; HERRERO-BEAUMONT, G. "Differential effects of the antioxidant n-acetylcysteine on the production of catabolic mediators in IL-1 β -stimulated human osteoarthritic synoviocytes and chondrocytes". *Eur. J. Pharmacol.*, **623**, 125-131, 2009.
- ROY, A.; GOSSELIN, F.; O'SHEA, P. D.; CHEN, C.; "Diastereoselective aryllithium addition to an α -trifluoromethyl imine. Practical synthesis of a potent cathepsin K inhibitor". *J. Org. Chem.* **71**, 4320-4323, 2006.
- RUTTGER, A.; MOLLENHAUER, J.; LÖSER, R.; GÜTSCHOW, M.; WIEDERENDRES, B. "Microplate assay for quantitative determination of cathepsin activities in viable cells using derivatives of 4-methoxy- β -naphthylamide". *Biotechniques*, **41**, 469-473, 2006.
- SALMINEN-MANKONEN, H. J.; MORKO, J.; VUORIO, E. "Role of cathepsin K in normal joints and in the development of arthritis". *Curr. Drug Target*, **8** (2): 1-9, 2009.
- SCHOFIELD, P.; MBUGUA, D. M.; PELL, A. N. "Analysis of condensed tannins: a review". *Anim. Feed Sci. Technol.* **91**, 21-40, 2001.
- SETTI, E. L.; VENKATRAMAN, S.; PALMER, J. T.; XIE, X.; CHEUNG, H. YU, W.; WESOLOWSKI, G.; ROBICHAUD, J. "Design and synthesis of tetracyclic nonpeptidic biaryl nitrile inhibitors of cathepsin K". *Bioorg. Med. Lett.* **16**, 4296-4299, 2006.
- SEVERINO, R. P. *Busca de Produtos Naturais como Inibidores Específico de Enzimas*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2008. Tese de Doutorado, 244 p.
- SHROT, S.; MARKEL, G.; DUSHNITSKY, T.; KRIVOY, A. "The possible use of oximes as antidotal therapy in organophosphate-induced brain damage". *NeuroToxicol.*, **30**, 167-173, 2009.
- SILVA-JR, F. P. e DE SIMONE, S.G. "S1 subsite in snake venom thrombin-like enzymes: can S1 subsite lipophilicity be used to sort binding affinities of trypsinlike enzymes to small-molecule inhibitors". *Bioorg. Med. Chem.*, **12**, 2571-2487, 2004.
- SINGH, G.; KAPOOR, I. P. S.; SINGH, P.; HELUANI, C. S.; LAMPASONA, M. P.; CATALAN, C. A. N. "Chemistry, antioxidant and antimicrobial investigations on essential oil and oleoresins of *Zingiber officinale*". *Food Chem. Toxicol.*, **46**, 3295-3302, 2008.
- SMITH, S. W. "Chiral toxicology: it's the same thing...only different". *Toxicol. Sci.*, 110 (1): 4-30, 2009.

- SOLLADIÉ, G. E ZIANI-CHÉRIF, C. "Total synthesis of natural gingerols, the three active principles of ginger". *J. Org. Chem.*, **58**, 2181-2185, 1993.
- SOMOZA, J. R.; ZHAN, H.; BOWMAN, K. K.; YU, L.; MORTARA, K. D.; PALMER, J. T.; CLARK, J. M.; MCGRATH, M. E. "Crystal structure of human cathepsin V". *Biochem.*, **39**, 12543-12551, 2000.
- SOUSA, M. H. L. S.; MONTEIRO, C. A.; FIGUEREDO, P. M. S.; NASCIMENTO, F. R. F.; GUERRA, R. N. M. "Ethnopharmacological use of babassu (*Orbignya phalerata* Mart) in communities of babassu nut breakers in Maranhão, Brazil". *J. Ethnopharmacol.*, **133**, 1-5, 2011.
- SOUTHAN, G. J.; SZABÓ, C. "Selective pharmacological inhibition of distinct nitric oxide synthase isoforms". *Biochem. Pharmacol.*, **51**, 383-394, 1996.
- TOLAR, J.; TEITELBAUM, S. L.; ORCHARD, P. J. "Mechanisms of Disease: Osteopetrosis". *N. Engl. J. Med.*, **351**, 2839-2849, 2004.
- TURK, D. & GUNCAR, G. Lysosomal cysteine protease (cathepsins): promising drug targets, *Acta Crystallogr. Sect. D: Biol. Crystallogr.*, **59**, 203-213, 2003.
- UEHARA, S-I, YASUDA, I.; AKIYAMA, K.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H. "Diarylheptanoids from the rhizomes of *Curcuma xanthorrhiza* and *Alpinia officinarum*". *Chem. Pharm. Bull.*, **35** (8): 3298-3304, 1987.
- 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**, 385-401, 2007.
- VINARDELL, T.; DEJICA, V.; POOLE, A. R.; MORT, J. S.; RICHARD, H.; LAVERTY, S. "Evidence to suggest that cathepsin K degrades articular cartilage in naturally occurring equine osteoarthritis". *Osteoarthritis Cartilage*, **17** (3): 375-383, 2008.
- WANG, D.; LI, W.; PECHAR, M.; KOPECKOVÁ, P.; BRÖMME, D.; KOPECEK, J. "Cathepsin K inhibitor-polymer conjugates: potential drugs for the treatment of osteoporosis and rheumatoid arthritis". *Int. J. Pharm.* **277**, 73-79, 2004.
- WANG, D.; PECHAR, M.; LI, W.; KOPECKOVÁ, P.; BRÖMME, D.; KOPECEK, J. "Inhibition of cathepsin K with lysosomotropic macromolecular inhibitors". *Biochem.* **41**, 8849-8859, 2002.
- XIA, L.; KILB, J.; WEX, H.; LI, Z.; LIPYANSKY, A.; BREUIL, V.; STEIN, L.; PALMER, J. T.; DEMPSTER, D. W.; BRÖMME, D. Localization of rat cathepsin K in osteoclast and resorption: inhibition of bone resorption and cathepsin K-activity by peptidyl vinyl sulfones. *Biol. Chem.* v. 380, p. 679-687, 1999.
- YAMASHITA, D. S.; DODDS, R. A. "Cathepsin K and the design of inhibitors of cathepsin K". *Curr. Pharm. Des.* **6**, 1-24, 2000.
- ZANCAN, K. C.; MARQUES, M. O. M.; PETENATE, A. J.; MEIRELES, M. A. A. "Extraction of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) oleoresin with CO₂ and co-

solvents: a study of the antioxidant action of the extracts". *J. Supercrit. Fluids*, **24**, 57-76, 2002.

ZENG, G.-Z.; PAN, X.-L.; TAN, N.-H.; XIONG, J.; ZHANG, Y.-M. "Natural biflavones as novel inhibitors of cathepsin B e K". *Eur. J. Med. Chem.* **41**, 1247-1252, 2006.

ZICK, S. M.; DJURIC, Z.; RUFFIN, M. T.; LITZINGER, A. J.; NORMOLLE, D. P.; ALRAWI, S.; FENG, M. R.; BRENNER, D. E. "Pharmacokinetics of 6-Gingerol, 8-gingerol, 10-gingerol, and 6-shogaol and conjugate metabolites in healthy human subjects". *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **17**, (8): 1930-1936, 2008.

<http://thinkfood.com.br>, acessado em 07 de setembro de 2011.

<http://www.canstockphoto.com.br>, acessado em 07 de setembro de 2011.

<http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>, acessado em 28 de junho de 2011.

<http://www.fda.gov/>, "Food Drug Administration" (FDA), acessado em 21 de junho de 2011.

<http://www.who.int/en/>. Organização Mundial de Saúde (OMS), acessado em 21 de junho de 2011.

<http://www.cria.org.br>, acessado em 20 de junho de 2011.

<http://goldbook.iupac.org/R05360.html>. "International Union of Pure and Applied Chemistry" (IUPAC), acessado em 10 de junho de 2011.

<http://www.bmgrp.com>. Biomedica Gruppe. Handout: Cathepsin K, acessado em 10 de janeiro de 2011.