



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA- UEFS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS
VEGETAIS



CARINE RAISA BARBOSA DE ANDRADE

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DAS FOLHAS E
AVALIAÇÃO *IN SILICO* DOS METABÓLITOS ISOLADOS DE
***Zanthoxylum caribaeum* LAM (RUTACEAE)**

Feira de Santana - BA
2018

CARINE RAISA BARBOSA DE ANDRADE

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DAS FOLHAS E
AVALIAÇÃO *IN SILICO* DOS METABÓLITOS ISOLADOS DE
Zanthoxylum caribaeum LAM (RUTACEAE)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Prof. Dr. Hugo Neves Brandão
Co-orientador: Prof. Dr. Clayton Queiroz Alves
Prof. Dr. Manoelito Coelho dos Santos Junior

Ficha Catalográfica - Biblioteca Central Julieta Carteado - UEFS

A566 Andrade, Carine Raisa Barbosa de

Caracterização química das folhas e avaliação in silico dos metabólitos isolados de *Zanthoxylum caribaeum* Lam (Rutaceae) / Carine Raisa Barbosa de Andrade. – 2018.

144 f.: il.

Orientador: Hugo Neves Brandão.

Coorientadores: Clayton Queiroz Alves, Manoelito Coelho dos Santos Junior.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais, 2018.

1. *Zanthoxylum caribaeum* Lam (Rutaceae). 2. Quimiotaxonomia. 3. Plantas medicinais. 4. Triagem virtual. 5. Acoplamento molecular. I. Brandão, Hugo Neves, orient. II. Alves, Clayton Queiroz, coorient. III. Santos Junior, Manoelito Coelho dos, coorient. IV. Universidade Estadual de Feira de Santana. V. Título.

CDU: 582.751.9

Luis Ricardo Andrade da Silva - Bibliotecário - CRB-5/1790

BANCA EXAMINADORA
DOUTORADO

Prof. (a). Dr (a).

Prof. (a). Dr (a).

Prof. (a). Dr (a).

Prof. (a). Dr (a).

Prof. (a). Dr (a).Orientador

Orientador e Presidente da Banca

Feira de Santana - BA
2018

Dedico este trabalho à Deus e minha família,
especialmente aos meus pais, Gilson B de Andrade e
M^a da Conceição S. B. de Andrade

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”. (Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

“...GRATIDÃO”

À Deus e a Nossa Senhora Aparecida, pela vida, por nunca me abandonar, pela coragem para acreditar, força para não desistir diante das dificuldades e proteção para me amparar e não deixar cair.

A minha família, em especial aos meus pais, pelo amor incondicional, incentivo, apoio, paciência, por acreditarem e por estarem sempre a minha espera nessas idas e vindas, sendo meu porto seguro e fortaleza.

Aos meus irmãos e sobrinhos pelo amor, companheirismo, paciência e a certeza que sempre estarão ali comigo.

Ao meu orientador Dr.Hugo Neves Brandão pelo ser de luz e bondade, que me acolheu em seu laboratório, por confiar e acreditar que eu seria capaz, pela paciência, compreensão, discernimento, humanidade, apoio e incentivo. Pelos momentos de choros e desabafos, pelos ensinamentos transmitidos. A ti gratidão!

Aos co-orientadores Dr.Clayton Queiroz Alvez e Dr. Manoelito Coelho Santos Junior pelos conhecimentos transmitidos, pelas orientações e ajuda durante toda a realização do trabalho. A vocês expresso minha eterna gratidão!

À Profa. Dra. Angélica Lucchese, por gentilmente me ceder espaço em seu laboratório (LAPRON), para a realização das extrações e análises do óleo e por todo conhecimento transmitido.

A todos os meus amigos que sempre me deram apoio e acreditaram em mim durante toda essa jornada. Aos amigos que a UEFS me proporcionou, seja do horto florestal, LABIV, LAEX e LMM por todos os momentos de descontração, alegrias, estresses, transmissão de conhecimentos.

As pessoas que direta ou indiretamente participaram deste projeto, seja ajudando ou dando apoio e incentivo

À CAPES e FAPESB pelo incentivo e suporte financeiro

A todos colegas e docentes do curso de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais da UEFS, pelo respeito, amizade e conhecimentos transmitidos.

RESUMO

Espécies do gênero *Zanthoxylum* (Rutaceae) apresentam composição química bastante diversificada e promissora, sendo muito utilizadas na medicina tradicional. A espécie *Zanthoxylum caribaeum* Lam. apresenta poucos estudos que relatem sua composição química e biológica o que torna a espécie como excelente candidata para pesquisas visando a identificação de moléculas com potencial biológico. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo realizar caracterização química de extratos e óleo das folhas de *Z. caribaeum* Lam. e prever *in silico* novas atividades biológicas das substâncias identificadas. Os extratos foram obtidos pela técnica de maceração utilizando metanol como solvente extrator. A caracterização química foi feita através de testes de triagem fitoquímica prévia e *fingerprint* por CLAE-DAD dos extratos, bem como, o isolamento, por meio de técnicas cromatográficas e identificação de metabólitos secundários através de técnicas espectroscópicas e espectrométricas como UV, EM e RMN de ^1H e ^{13}C . O óleo foi extraído por hidrodestilação a vapor e avaliado por CG - EM. A potencialidade biológica das moléculas isoladas nas folhas dessa espécie foi verificada por técnicas *in silico* empregando-se métodos baseado na similaridade de ligantes (ChemProt 2.0 e SEA) e baseados no alvo molecular (DRAR-CPI). A caracterização química mostrou que os extratos da espécie em estudo apresentaram uma variedade de metabólitos secundários, como compostos fenólicos, taninos, flavonoides, cumarinas, esteroides/triterpenos e alcaloides pelos testes fitoquímicos preliminares. Verificou-se através de CLAE-DAD que os extratos são ricos em compostos fenólicos, principalmente ácidos fenólicos e flavonoides, sendo possível a identificação e quantificação no extrato acetato de etila das substâncias rutina, ácido caféico e ácido *trans*-ferúlico. Nos extratos das folhas, foram isoladas e identificadas 5 substâncias tais como a cumarina aurapteno, a mistura de fitoesteróis como β -sitosterol e estigmasterol, lignana sesamina e a flavanona hesperidina. O óleo essencial forneceu um rendimento de 0,2%, com a presença de 20 componentes (91%), sendo o linalol (27,72%), germacreno D (19,85%) e *E*-cariofileno (14,45%) os componentes majoritários. Dentre os alvos moleculares selecionados destaca-se para a Aurapteno o alvo Beta secretase e o Receptor endotelial de proteína C; para a hesperidina o alvo Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPARG), para sesamina, a Proteína 1 da tríade de histidina de ligação do nucleotídeo, para o β -sitosterol os alvos Receptores de estrogênio e Proteína tirosina quinases (PTK) e para o estigmasterol os alvos Receptores de estrogênio e Arginino-succinato sintetase (ASS). A predição de atividades *in silico* realizadas com as substâncias isoladas e identificadas na espécie, permitiu levantar alvos potenciais para cada composto. Com isso, os resultados obtidos contribuíram para um melhor conhecimento da composição química de *Z. caribaeum*, além de fornecer resultados inéditos para a espécie, a presença de diferentes classes químicas e o isolamento das substâncias já relatadas na literatura com potencial atividade biológica, fornecem boas perspectivas de estudo com a espécie como fonte de substâncias bioativas que poderão dar origem ou servir de modelos protótipos no desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos.

Palavras-Chave: Plantas medicinais. *Zanthoxylum caribaeum* Lam. Quimiotaxonomia. Triagem Virtual. Acoplamento molecular.

ABSTRACT

Species of the genus *Zanthoxylum* (Rutaceae) present a very diversified and promising chemical composition, and it is frequently used in traditional medicine. The species *Zanthoxylum caribaeum* Lam. presents few studies that report its chemical and biological composition, which makes the species an excellent candidate for research aiming at the identification of molecules with biological potential. In this sense, the present work aimed to characterize the chemical composition of extracts and oil of the leaves of *Z. caribaeum* Lam. and to predict *in silico* new biological activities of the identified substances. The extracts were obtained by the maceration technique using methanol as solvent extractor. The chemical characterization was performed by previous phytochemical screening and fingerprint by HPLC-DAD of the extracts, as well as, the isolation, by means of chromatographic techniques and identification of secondary metabolites through spectroscopic and spectrometric techniques such as UV, MS and NMR of ¹H and ¹³C. The oil was extracted by steam hydrodistillation and evaluated by GC-EM. The biological potential of the isolated molecules in the leaves of this species was verified by *in silico* techniques using methods based on the similarity of ligands (ChemProt 2.0 and SEA) and based on molecular target (DRAR-CPI). The chemical characterization showed that the extracts of the species in study presented a variety of secondary metabolites, such as phenolic compounds, tannins, flavonoids, coumarins, steroids / triterpenes and alkaloids by preliminary phytochemical tests. It was found by HPLC-DAD that the extracts are rich in phenolic compounds, particularly phenolic acids and flavonoids, it is possible to identify and quantify in the ethyl acetate extract of the substances rutin, trans-ferulic acid and caffeic acid. In the leaf extracts, 5 substances such as auraptene coumarin, the mixture of phytosterols such as β -sitosterol and stigmasterol, sesamin lignan and hesperidin flavanone were isolated and identified. The essential oil gave a yield of 0.2%, with the presence of 20 components (91%), being linalool (27.72%), germacrene D (19.85%) and E-caryophyllene (14.45%) the major components. Among the selected molecular targets, auraptene targets the Beta secretase target and the endothelial protein C receptor; for the hesperidin the target Receptor activated by peroxisome proliferator gamma (PPARG), for sesamin, the nucleotide-binding histidine triad Protein 1, for the β -sitosterol targets the Estrogen Receptors and Protein tyrosine kinases (PTK) and for the stigmasterol the targets Estrogen Receptors and Arginine-Succinate Synthase (ASS). The prediction of *in silico* activities performed with the substances isolated and identified in the species allowed to raise potential targets for each compound. Thus, the results obtained contributed to a better knowledge of the chemical composition of *Z. caribaeum*, besides providing unprecedented results for the species, the presence of different chemical classes and the isolation of substances already reported in the literature with potential biological activity, provide good perspectives of study with the species as a source of bioactive substances that could give rise to or serve as prototype models in the development of new pharmaceutical products.

Keywords: Medicinal plants. *Zanthoxylum caribaeum* Lam. Chemotaxonomy. Virtual Screening. Molecular docking.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CC	Cromatografia em Coluna
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CG	Cromatografia Gasosa
CI ₅₀	Concentração inibitória média
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
EAZC	Extrato acetato de etila de <i>Zanthoxylum caribaeum</i>
EBZC	Extrato metanólico bruto de <i>Zanthoxylum caribaeum</i>
ECZC	Extrato clorofórmico de <i>Zanthoxylum caribaeum</i>
EHZC	Extrato hexânico de <i>Zanthoxylum caribaeum</i>
EM	Espectrometria de massa
HMQC/HMBC	Heteronuclear multiple-quantum correlation spectroscopy e heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy
HUEFS	Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana
ICH	International Conference of Harmonization
IV	Infravermelho
K _i	Constante de inibição
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear carbono 13
RMSD	Root Mean Square Flutuaction
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
UV	Ultravioleta
UV-VIS	Ultravioleta e Visível
TVI	Triagem Virtual Inversa
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
SEA	<i>Similarity Ensemble Approach</i>
LABAREMN	Laboratório Baiano de Ressonância Magnética Nuclear

LAEX	Laboratório de Extração
FC	Folin Ciocalteu
AGE	Ácido gálico equivalente
QE	Quercetina equivalente
SMILES	<i>Simplified Molecular-Input Line-Entry System</i>
CT	Coeficiente de Tanimoto
2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
TVBL	Triagem Virtual Baseada no Ligante
TVBR	Triagem Virtual Baseada no Receptor

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Dois novos sesquiterpenos isolados da casca do caule de <i>Zanthoxylum ailanthoides</i>	19
Figura 2 - Substâncias isoladas da raiz e folhas de <i>Zanthoxylum ekmanii</i>	20
Figura 3 - Alcaloide inédito isolado das cascas do caule de <i>Zanthoxylum buesgenii</i>	21
Figura 4 - Substâncias isoladas da casca da raiz de <i>Zanthoxylum rigidum</i>	22
Figura 5 - Alcaloides benzofenantridínicos isolados da espécie <i>Zanthoxylum rhoifolium</i>	23
Figura 6 - Substâncias isoladas de espécies do gênero <i>Zanthoxylum</i>	25
Figura 7 - Distribuição da espécie <i>Zanthoxylum caribaeum</i> Lam (Rutacea).....	26
Figura 8 - Espécie <i>Zanthoxylum caribaeum</i> Lam. 1. Hábito. 2, 3 Detalhe dos acúleos. 4, 5 Folículos evidenciando sementes. 6 Folhas.....	27
Figura 9 - Estágios envolvidos no processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos. A. Método convencional e B. Método utilizando ferramentas computacionais	29
Figura 10 - Etapas de preparo dos extratos de <i>Zanthoxylum caribaeum</i> Lam (a) material pulverizado, (b) solução metanólica e (c) concentração do EBZC em evaporador rotativo.....	36
Figura 11 - Partição líquido-líquido e separação provável dos principais metabólitos secundários presentes em plantas em ordem crescente de polaridade Hexano (a), clorofórmio (b) e acetato de etila (c).....	37
Figura 12 - Etapas de obtenção do óleo essencial de <i>Zanthoxylum caribaeum</i> por Hidrodestilação em aparelho de Clevenger. 1. Trituração do material vegetal no liquidificador industrial. 2 Aparelho de Clevenger. 3. Extração do óleo por hidrodestilação a vapor.....	38
Figura 13 - Estrutura do ácido gálico.....	43
Figura 14 - Amostras dos EBZC (a); EHZC (b); ECZC (c); EAZC (d) após reação.....	44
Figura 15 - Estrutura química da quercetina.....	45
Figura 16 -Espectrofotômetro Multiskan, aquisição da absorvância a 415 nm.....	45
Figura 17 - Coluna Cromatográfica do EHZC. a) visualização em UV a 365 nm, b) visualização em luz visível.....	46
Figura 18 - Coluna Cromatográfica do FH36. a) visualização em UV a 365 nm, b) visualização em luz visível e c) Cromatografia de Camada Delgada revelada em UV 365 nm após purificação dos cristais.....	48
Figura 19 - Cromatógrafo a Gás Varian®.....	55
Figura 20 - Cromatógrafo Shimadzu®.....	55
Figura 21 - Cromatograma em diferentes comprimentos de onda do EBZC.....	60
Figura 22 - Cromatograma em diferentes comprimentos de onda do EHZC.....	61
Figura 23 - Cromatograma em diferentes comprimentos de onda do ECZC.....	61
Figura 24 - Cromatograma em diferentes comprimentos de onda do EAZC.....	62
Figura 25 - Estruturas das substâncias identificadas por CLAE-DAD. a) ácido <i>trans</i> -fêrulico, b) ácido cafeico e c) rutina.....	63
Figura 26 - Cromatogramas a 280 nm das frações acetato de etila das folhas de <i>Zanthoxylum caribaeum</i> e dos padrões analisados por CLAE-DAD. Cromatograma I – FAC33; Cromatograma II – FAC21. A) ácido <i>trans</i> -fêrulico, B) ácido cafeico, C) rutina.....	64
Figura 27 - Comparação dos espectros de UV das amostras e dos padrões. Ia - pico A do extrato FAC21. Ib – pico padrão ácido transferulico. IIa – pico B do extrato FAC33. IIb - pico padrão	

ácido trans-férulico. IIIa – pico C do extrato FAC33; IIIb - pico padrão rutina.....	65
Figura 28 - Curvas de calibração das substâncias identificadas.....	66
Figura 29 - Curva-padrão Ácido gálico.....	70
Figura 30 - Curva-padrão Quercetina.....	70
Figura 31 - Estrutura da substância EHZC36 (Aurapteno).....	72
Figura 32 - Integração do espectro de RMN ¹ H de EHZC36 [500 MHz, MeOD, δ (ppm)]....	72
Figura 33 – Ampliação 1 do Espectro de RMN de ¹ H da EHZC36 [500 MHz, MeOD, δ (ppm)].....	73
Figura 34 - Ampliação 2 do Espectro de RMN de ¹ H da EHZC36 [500 MHz, MeOD, δ (ppm)].....	73
Figura 35 – Ampliação 3 do espectro de RMN ¹ H de EHZC36 [500 MHz, MeOD, δ (ppm)].....	73
Figura 36 - Ampliação do espectro de RMN ¹³ C da FHex36.6 [125 MHz, MeOD, δ (ppm)].....	75
Figura 37 - Ampliação do espectro RMN de ¹³ C da substância FH36.6 [CDCl ₃ , δ (ppm)].....	75
Figura 38 - Estrutura da substância EZH30.1 a. β-sitosterol. b. Estigmasterol.....	77
Figura 39 - Espectro de RMN ¹ H de EZH30.1 [500 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)].....	78
Figura 40 – Integração do espectro de RMN ¹ H de EZH30.1 [500 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)].....	78
Figura 41 - Estrutura da substância FCZC19 sesamina.....	79
Figura 42 - Espectro IV da substância FCZC19.....	80
Figura 43 - Ampliação 1 do espectro RMN de ¹ H da substância FCZC19 [CDCl ₃ , 500 HZ, δ (ppm)].....	82
Figura 44 - Ampliação 2 do espectro RMN de ¹ H da substância FCZC19 [CDCl ₃ , δ (ppm)].....	83
Figura 45 - Espectro RMN de ¹³ C da substância FCZC19 [CDCl ₃ , δ (ppm)].....	83
Figura 46 - Espectro DEPT 135° da substância FCZC19 [CDCl ₃ , δ (ppm)].....	83
Figura 47 - Espectro de HMQC de FCZC19.....	84
Figura 48 - Espectro de HMBC de FCZC19.....	84
Figura 49 - Estrutura da substância isolada do extrato acetato de etila FAZC37.....	86
Figura 50 - Ampliação do espectro RMN de ¹ H da substância FAZC37 [500 MHz, DMSO, δ (ppm)].....	88
Figura 51 - Ampliação 2 do espectro RMN de ¹ H da substância FAZC37 [DMSO, δ (ppm)]...88	88
Figura 52 - Ampliação 3 do espectro RMN de ¹ H da substância FAZC37 [DMSO, δ (ppm)]..89	89
Figura 53 - Espectro RMN de ¹³ C da substância FAZC37 [DMSOd, δ (ppm)].....89	89
Figura 54 - Integração do espectro RMN de ¹³ C da substância FAZC37 [DMSOd, δ (ppm)]...89	89
Figura 55 - Integração do espectro RMN de ¹³ C da substância FAZC37 [DMSOd, δ (ppm)]...90	90
Figura 56 - Integração do espectro RMN de ¹³ C da substância FAZC37 [DMSOd, δ (ppm)]..90	90
Figura 57 - Integração do espectro RMN de ¹³ C da substância FAZC37 [DMSOd, δ (ppm)]...91	91
Figura 58 - Compostos encontrados no óleo essencial das folhas de <i>Z. caribaeum</i> . 1.A monoterpenos. 1.B sesquiterpenos.....	94
Figura 59 - Valores de RMSD (Å) obtido para o programa DOCK, após o reacoplamento de cada alvo selecionado pelo ChemProt 2.0. Configuração cristalográfica em vermelho e reacoplamento em verde. Beta secretase 1 selecionado para a molécula aurapteno e Receptor de estrogênio selecionado para B-sitosterol e estigmasterol.....	103
Figura 60 - Perfil de interação intermoleculares do aurapteno com β-secretase..Resíduos:azul;ligante:amarelo;interações hidrofóbicas:linhas pontilhadas cinza; interações perpendicular: linhas tracejadas verdes.....	105

Figura 61 - Perfil de interação intermoleculares do β -sitosterol com receptor de estrogênio Resíduos: azul; ligante: amarelo; ligações hidrofóbicas: linha pontilhada cinza;interações de hidrogênio:linha azul	107
Figura 62 - Perfil de interação intermoleculares do estigmasterol com receptor de estrogênio. Resíduos: azul; ligante: amarelo; ligações hidrofóbicas:linha pontilhada cinza;interações de hidrogênio:linha azul	108
Figura 63 - Representação esquemática da pose do ligante cristalográfico (verde) e do reacoplamento molecular (Vermelho) com RMSD (Å), figura gerada no UCSF Chimera 1.9.....	111
Figura 64 - Perfil de interação intermoleculares do Aurapteno com Receptor de proteína C endotelial. Resíduo: azul; ligante:amarelo;ligações hidrofóbicas:linha pontilhada cinza; interações de hidrogênio: linha azul; interações π -paralelas: linhas tracejada verde; interações π cátion: linha tracejada laranja.....	112
Figura 65 - Perfil de interação intermoleculares da sesamina com Proteína 1 da triade de histidina de ligação do nucleotídeo. Resíduos: azul; ligante:amarelo; interações π paralelas:linhas tracejadas verde;interações π -cation.....	114
Figura 66 - Perfil de interação intermoleculares do ligante Hesperidina com Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPARG).....	116
Figura 67 - Perfil de interação intermoleculares do ligante Estigmasterol com alvo Arginino-succinato sintetase.....	118
Figura 68 - Perfil de interação intermoleculares de β -sitosterol com Proteína tirosina quinase.....	119

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Tipos de bancos de dados.....	32
Tabela 2 - Massas (g) e rendimentos (%) das frações resultantes da partição do extrato metanólico de folhas de <i>Z. caribaeum</i> Lam.....	37
Tabela 3 - Gradiente de eluição.....	42
Tabela 4 - Frações obtidas da CC principal do extrato hexânico.....	47
Tabela 5 - Subfrações obtidas da FH30 do extrato hexânico.....	48
Tabela 6 - Subfrações obtidas da CC de FH36.....	49
Tabela 7 - Frações obtidas da CC principal do extrato clorofórmico de <i>Z. caribaeum</i> (FCZC).....	50
Tabela 8 - Frações obtidas da CC principal do extrato acetato de etila <i>Z. caribaeum</i>	51
Tabela 9 - Triagem fitoquímica no extrato bruto de <i>Zanthoxylum caribaeum</i> Lam.....	59
Tabela 10 - Dados da regressão linear, limite de detecção e limite de quantificação das substâncias identificadas.....	66
Tabela 11 - Cálculo DPR para as amostras	67
Tabela 12 - Taxa de recuperação para determinação da exatidão.....	67
Tabela 13 - Conteúdo das substâncias em frações do extrato acetato de etila de <i>Z. caribaeum</i>	68
Tabela 14 - Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C da cumarina aurapteno em CDCl ₃ a 500 MHz e comparação com dados da literatura.....	76
Tabela 15 - Dados de RMN de ¹³ C e DEPT 138 de FC19 [CDCl ₃ , δ (ppm)] e dados da literatura.....	85
Tabela 16 - Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C de FAC37 [DmsO, δ (ppm)] e dados da literatura.....	92
Tabela 17 - Massas (g) e rendimentos (%) do óleo essencial extraído das folhas de <i>Z. caribaeum</i> Lam	93
Tabela 18 - Composição química do óleo essencial de folhas de <i>Z. caribaeum</i>	95
Tabela 19 - Quantidade de alvos moleculares encontrados por servidor.....	98
Tabela 20 - Alvos potenciais para aurapteno (1) sesamina (2) e hesperidina (3) obtidos pelos servidores ChemProt 2.0 e SEA.....	99
Tabela 21 - Potenciais alvos para o β-sitosterol e estigmasterol obtidos pelo servidor ChemProt 2.0.....	101
Tabela 22 - Exemplos de atividades encontradas de organismo humano para os ligantes avaliados.....	102
Tabela 23 - Identificação das proteínas selecionadas no PDB para as moléculas teste.....	102
Tabela 24 – Alvos com melhores pontuações obtidos no servidor DRAR-CPI para as moléculas Aurapteno, sesamina, hesperidina, estigmasterol e β-sitosterol.....	110

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
2.1 A família Rutaceae.....	17
2.1.1 Gênero <i>Zanthoxylum</i>	18
2.1.2 <i>Zanthoxylum caribaeum</i> Lam.....	26
2.2 Planejamento de fármacos por técnicas de simulações computacionais.....	27
2.2.1 Triagem Virtual Inversa.....	31
2.2.2 Métodos de similaridade molecular.....	33
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
3.1 Coleta e identificação botânica da espécie.....	35
3.2 Estudo químico.....	35
3.2.1 Preparo do material.....	35
3.2.2 Preparo do extrato.....	35
3.2.3 Obtenção dos óleos essenciais.....	37
3.3 Análise da composição química.....	38
3.3.1 Prospecção fitoquímica dos extratos das folhas de <i>Z. caribaeum</i>	38
3.3.2 Análise do perfil cromatográfico por CLAE-DAD dos extratos das folhas de <i>Z. caribaeum</i>	41
3.4 Determinação do teor de fenois totais e flavonoides.....	42
3.4.1 Teor de fenois totais.....	42
3.4.2 Determinação do teor de flavonoides totais.....	44
3.5 Isolamento e identificação dos constituintes químicos de <i>Zanthoxylum caribaeum</i> LAM.....	46
3.5.1 Análise química dos extratos.....	46
3.5.1.2 Fracionamento do extrato Hexânico (EHZC).....	46
3.5.1.3 Fracionamento do Extrato clorofórmico (ECZC).....	49
3.5.1.4 Fracionamento do extrato acetato de etila (EAZC).....	51
3.5.2 Análise da composição química dos óleos essenciais de <i>Zanthoxylum caribaeum</i>	61
3.6 Triagem Virtual Inversa (TVI).....	56
3.6.1 Identificação de alvos moleculares	57
3.6.2 Estudos de acoplamento molecular com os alvos biológicos identificados.....	57

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
4.1 Estudo químico.....	59
4.1.1 Triagem fitoquímica.....	59
4.1.2 Determinação do perfil químico por CLAE-DAD (<i>fingerprint</i>).....	60
4.1.3 Validação e quantificação dos compostos identificados por CLAE-DAD.....	62
4.1.4 Determinação do teor de fenóis e flavonoides dos extratos.....	69
4.2 Substância isolada e elucidação estrutural	71
4.2.1 Substância isolada EH3C36.6 de <i>Z caribaeum</i>	71
4.2.2 Substância isolada do extrato hexânico de <i>Z caribaeum</i> EZH30.1.....	76
4.2.3 Substância isolada do extrato clorofórmico FCZC19.....	79
4.2.4 Substância isolada do extrato de acetato de etila FAZC37.....	85
4.2.5 Análise, quantificação e identificação da composição química do óleo essencial de <i>Z. caribaeum</i> Lam.....	93
4.3 Triagem virtual.....	97
4.4.1 Seleção dos alvos.....	98
4.4.2 Seleção dos alvos baseado no ligante (Servidor ChemProt 2.0 e SEA).....	98
4.4.3.1 Acoplamento molecular (ChemProt e SEA)	102
4.4.3.2 Servidor ChemProt 2.0 e SEA.....	102
4.4.4 Avaliação das interações entre os alvos.....	104
4.4.4.1 Beta-secretase 1 (BACE-1).....	104
4.4.4.2 Receptor de estrogênio (ER).....	106
4.4.5 Seleção de alvos baseado no receptor (DRAR-CPI).....	109
4.4.5.1 Acoplamento molecular.....	110
4.4.5.2 Avaliação das interações das moléculas de consulta e os alvos selecionados.....	111
4.4.5.3 Receptor endotelial de proteína C (EPCR).....	111
4.4.5.5 Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPARG).....	115
4.4.5.6 Arginino-succinato sintetase (ASS).....	117
4.4.5.7 Proteína tirosina quinases (PTK).....	119
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	122
REFERÊNCIAS.....	124

APÊNDICE A

1 INTRODUÇÃO

A utilização das plantas para fins terapêuticos é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade, baseada na sabedoria do senso comum, transmitida entre gerações vincula cultura popular e saúde. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que cerca de 65% da população mundial, faz uso de plantas e/ou derivados de produtos naturais como medicamentos. Sendo que os produtos naturais são uma excelente fonte para obtenção de compostos bioativos para serem exploradas terapeuticamente, levando-se em conta também a biodiversidade mundial, em destaque o Brasil, que oferece uma potencial fonte de novos quimiotipos e farmacóforos, dos quais muitos ainda não foram estudados (FEITOSA, et al., 2015; FULAN et al., 2014; NEWMAN E CRAGG,2012).

A partir da medicina tradicional, muitas espécies foram alvos de investigações químicas e biológicas, que resultaram no isolamento de diversas substâncias de produtos naturais e no desenvolvimento de vários fármacos ao longo dos tempos. Esses esforços partiram tanto dos produtos naturais isolados, como também, a partir de seus análogos e outros derivados semissintéticos, tais como, por exemplo: morfina, quinina, artemisinina, pilocarpina, paclitaxel, lapachol dentre outros agentes medicinais (YUNES; CECHINEL FILHO, 2014).

Segundo Newman e Cragg (2016), cerca de 49% dos medicamentos disponíveis são de produtos naturais ou derivados dos mesmos, sendo que a maioria apresenta atividade biológica potencial como antimicrobiana e/ou anticancerígenas. Ainda hoje, muitos fármacos baseados em produtos naturais não são produzidos por métodos sintéticos, de forma que sejam economicamente viáveis. Na maioria das vezes, a alta complexidade estrutural destas substâncias inviabiliza a síntese dessas moléculas que apresentam potencial efeito terapêutico, podendo destacar os fitomedicamentos disponíveis no mercado, como a vimblastina e vincristina utilizadas como agentes antineoplásicos (SANGI, 2016; OLIVEIRA, 2014).

Ao longo das últimas décadas e com o grande avanço da ciência, a indústria farmacêutica, no processo de descobertas de novos medicamentos e redução de tempo e custos nas pesquisas, beneficiou-se de novas tecnologias, desde a fitoquímica clássica no isolamento e elucidação estrutural de novos compostos, até a química combinatória e medicinal como importante ferramenta para o planejamento, desenvolvimento e seleção de moléculas bioativas, candidatas a protótipos de novos fármacos (GUIDO et al., 2010; PUPO, GALLO, VIEIRA, 2007; VIEGAS Jr, et al., 2006).

Apesar dos progressos tecnológicos observados para a obtenção de novos compostos ativos, houve um declínio na quantidade de novos medicamentos lançados ao mercado. Em

revisão realizada entre 1981 a dezembro de 2014 por Newman e Cragg (2016), foram registrados apenas 175 novos fármacos aprovadas pela *Food and Drug Administration* (FDA), dos quais 85 são de produtos naturais ou derivados.

Nesta perspectiva, em busca de novas moléculas bioativas para o desenvolvimento de novos e eficientes fármacos, a indústria farmacêutica diante da diversidade estrutural e das variadas propriedades biológicas apresentadas pelos metabólitos secundários, superior aos de síntese química, utilizam de estratégias clássicas de química medicinal para a descoberta, o planejamento e a modificação molecular. Utilização também de metodologias computacionais de química, para gerar bibliotecas baseadas em produtos naturais e seus análogos estruturais, como também de alvos moleculares promissores (PUPO, et al., 2007; ABREU; BRANCO, 2003). As técnicas computacionais permitem ainda, prever a bioatividade de moléculas, possibilitando encontrar aplicações terapêuticas ainda não exploradas (BLONDEAU et al., 2010; CERETO-MASSAGUE et al, 2014).

Neste contexto, pesquisas apontam a importância dos estudos com produtos naturais, como plantas, organismos marinhos e microrganismos, devido à intensa síntese de metabólitos secundários de forma a possibilitar uma variedade de estruturas químicas com ações terapêuticas múltiplas, constituindo uma alternativa estratégica na busca de novos agentes terapêuticos (BALESTRIN, 2006).

Entre as espécies de plantas utilizadas com fins medicinais, estão as pertencentes da família Rutaceae, de ampla distribuição, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais. No Brasil, existem em torno de 200 espécies já catalogadas, que se destacam por apresentarem importância econômica, ecológica e medicinais, podendo ser relatados os frutos comestíveis do gênero *Citrus* (limão, laranja, tangerina), a madeira (*Flindersia*, *Zanthoxylum*, *Balfourodendron*, *Euxylophora*), os óleos aromáticos utilizados nos cosméticos e perfumaria (*Boronia* e *Ruta*) e os medicamentos, a exemplo dos “jaborandis”, do gênero *Pilocarpus*, que produzem substâncias ativas de grande interesse como o alcaloide pilocarpina, que são empregados no tratamento de glaucoma (PIRANI, 1999; SANTOS et al. 2009).

Espécies do gênero *Zanthoxylum* (Rutaceae), apresentam uma variedade de metabólitos secundários que podem ser encontrados nas raízes, caule, ramos e folhas. Dentre os compostos isolados e identificados na literatura destacam-se os alcaloides, lignanas, ligninas, flavonoides, taninos, cumarinas, esteroides, triterpenos, glicosídeos, saponinas e óleos essenciais, dos quais apresentam várias propriedades terapêuticas que podem estar relacionadas ao uso popular como

medicinais (TINE et al., 2017; NURAIN et al., 2016; ZHANG et al., 2016 a; TAVARES, et al., 2014).

Entre as atividades biológicas/farmacológicas descritas para as espécies deste gênero estão; antimicobateriana (BUNALEMA et al., 2017) antiviral (CHOI, 2016), anti-parasitária (NETO et al., 2016; PENELUC et al., 2009), antinociceptiva (PEREIRA et al., 2010), anti-inflamatória (SU et al., 2017), antitumoral, antimicrobiana (ZUO et al., 2016; WEBER, 2005; COSTA et al., 2010), antioxidante (ANDRADE 2014; ZANON, 2010) inseticida e antifúngica (NGASSOUM et al., 2003).

A espécie *Zanthoxylum caribaeum* Lam. é popularmente conhecida no nordeste como espinho-cheiroso, espinho-preto e espinho de barrão, e vem sendo utilizada pela população com propriedades anti-inflamatórias. Salienta-se que existem poucos estudos com essa espécie, principalmente relacionado com a composição química e biológica da mesma. Nesta perspectiva, destaca-se a importância de se estudar a espécie *Z. caribaeum* como fonte importante de moléculas uteis para a terapêutica, que podem ser base para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos ou servir como modelos moleculares para o planejamento e a síntese de novos fármacos

Com esta perspectiva, este estudo teve como objetivo verificar a composição química dos óleos e extratos das folhas da espécie *Zanthoxylum caribaeum* Lam. Para isto, buscou-se extrair os óleos essenciais por hidrodestilação a vapor e obter os extratos das folhas; isolar os compostos químicos através de métodos cromatográficos e identifica-los; determinar o perfil da composição química; predizer *in silico* possíveis atividades biológicas dos compostos isolados, e determinar a energia de afinidade frente aos alvos identificados. Desta forma, contribuir com a quimiotaxonomia do gênero *Zanthoxylum* e embasar trabalhos visando obtenção de novos protótipos de fármacos de espécies do gênero.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A família Rutaceae

A família Rutaceae é constituída de 150 gêneros e cerca de 1500-1900 espécies, representando o maior grupo de plantas da ordem Rurales. É amplamente distribuída nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, com maior frequência na América tropical, sul da África e Austrália. No Brasil, cerca de 200 espécies já foram identificadas, das quais 33 gêneros nativos, de ocorrência principalmente na Amazônia e Mata Atlântica. Na Região Nordeste, 21 gêneros e aproximadamente 90 espécies foram registradas (PIRANI & GROppo 2015; SOUZA & LORENZI 2012; GROppo, 2010).

Espécies desta família apresentam considerável importância econômica e medicinal, destacando os gêneros *Citrus*, *Pilocarpus*, *Ruta* e *Zanthoxylum*. A exemplo dos frutos comestíveis como o do limão, da laranja, tangerina e lima (Gênero *Citrus*), tornando o Brasil um dos maiores produtores de óleos aromáticos do mundo provenientes das cascas destes frutos. Diversos estudos demonstram efeitos biológicos e farmacológicos potenciais do gênero, como atividade antimicrobiana e antitumoral (GOMES, 2014; JOMAA et al., 2012; PATIL, et al., 2012; GROppo et al., 2008).

O gênero *Pilocarpus*, é conhecido como fonte de produção de alcaloides a exemplo da pilocarpina (alcaloide imidazólico), utilizado no tratamento do glaucoma e xerostomia, sintetizada pela espécie *Pilocarpus microphyllus* (conhecida popularmente como jaborandi). É uma planta nativa do Norte e Nordeste do Brasil de ocorrência no Estado do Pará, Maranhão e Piauí, sendo esta espécie a mais importante do ponto de vista econômico devido ao alto teor do alcaloide imidazólico em relação as outras espécies do gênero *Pilocarpus* de ocorrência nacional (LIMA, et al., 2017; LIMA, et al., 2015; GROppo et al., 2008; PINHEIRO, 2002)

Entre outros representantes, estão a *Ruta* (exemplo da *Ruta graveolens* Linnaeus conhecida por arruda) muito utilizada com fins medicinais devido as propriedades anti-inflamatórias, antioxidante, antitumoral e antimicrobiana dos óleos essenciais e extratos (AL-QURAINY et al., 2011; YAMASHITA et al., 2009), o gênero *Esenbeckia* com sua importância econômica, paisagística e ecológica; o gênero *Boronia* muito utilizada na extração de óleos essenciais. Além das espécies que apresentam madeira de boa qualidade utilizadas em

construções civis (*Flindersia, Zanthoxylum, Balfourodendron e Euxylophora*) (GROPPO et al, 2012; GROppo et al., 2008; LORENZI & SOUZA, 2005).

A família apresenta espécies lenhosas, de porte arbustivo ou arbóreo, perenes ou anuais, podendo apresentar acúleos ou espinhos, com folhas alternas, raramente opostas, simples ou compostas 1-3 foliadas, palmadas ou pinadas. Suas folhas podem apresentar pontuações translúcidas bem evidentes, capazes de desenvolverem glândulas produtoras de óleo essenciais aromáticos, com a finalidade de protegê-las contra ação de predadores (BURIL, THOMAS & ALVES, 2014; BRUNIERA, 2010; MELO; ZICKEL, 2004, PIRANI 2005).

Muitas espécies desta família são investigadas quanto a sua composição química e biológica e são caracterizadas pela presença de uma diversidade de compostos bioativos, o que lhes conferem uma variedade de atividades biológicas potenciais, como antimicrobiana, antitumoral, anti-inflamatória, antiulcerogênica, antihelmíntica, antioxidante entre outras, despertando desta forma, o interesse de pesquisadores na investigação química desta família (ROCHA et al., 2017; TUAN et al., 2017; MADEIRO et al., 2017; NARANG, JIRAUNGKOORSKUL, 2016; ISIDORO et al., 2012). Dentre os compostos que estão comumente presentes, é possível destacar os alcaloides, cumarinas, terpenos, fitosteroides, lignanas, flavonoides, taninos, dentre outros (TUAN, et al., 2017; ISIDORO et al., 2012; JANUARIO et al., 2009; ZANON, 2010).

2.1.1 O gênero *Zanthoxylum*

O gênero *Zanthoxylum* compreende aproximadamente 250 espécies distribuídas em todo o mundo, inclusive no Brasil. São espécies lenhosas com perianto mono ou diclamídeo, arbustivas ou arbóreas, podendo chegar de 15 a 20 metros de altura, apresentam troncos e ramos aculeados, ocasionalmente com acúleos que podem ser curtos ou longos, eretos ou recurvados na face inferior das folhas. Suas folhas geralmente são alternas, compostas, paripinadas ou imparipinadas, contendo até 15 pares de folíolos, raramente uni ou trifolioladas, margem variando em crenada até quase inteira, com glândulas oleíferas entre as crenas ou em toda a lâmina foliar. Apresentam flores com inflorescência terminais, axilares ou laterais, variando de tirsos, panículas piramidais, corimbos, racemos a espigas (PIRANI 2005; MELO; ZICKEL, 2004).

A madeira das árvores do gênero *Zanthoxylum* é empregada na região amazônica para instrumentos agrícolas, fabricação de remos, carrocerias e construção civil. É economicamente

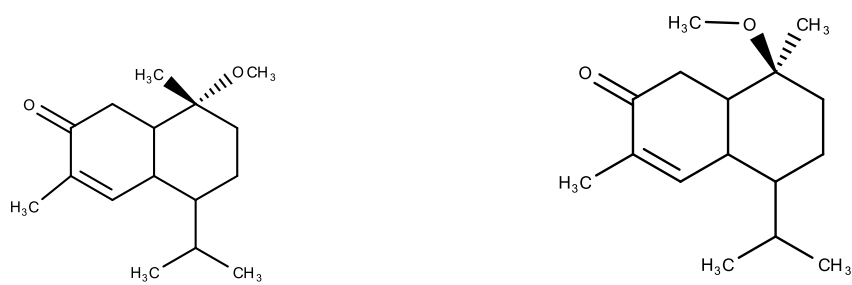
importante como fonte de frutos comestíveis, matéria-prima para indústrias de cosméticos e perfumes, bem como aplicações culinárias e medicinais (LORENZI, 1992; LOUREIRO & LISBOA, 1992).

No Nordeste brasileiro são encontradas diversas espécies de *Zanthoxylum*, sendo que muitas destas são comumente empregadas na medicina popular contra distúrbios inflamatórios ou infecções (HOHLEMWERGER, 2012; SILVA, et al., 2010; MELO; ZICKEL, 2004; OLIVEIRA, et al., 2002).

Espécies pertencentes ao gênero *Zanthoxylum* são caracterizadas pelas variedades de metabólitos secundários biologicamente ativos, dos quais são destacados os alcaloides, lignanas, terpenos, alquilamidas insaturadas, óleos essenciais, flavonoides e limonoides. Tais substâncias podem apresentar importantes propriedades farmacológicas como antitumorais, antibacterianas, antifúngicas, anti-inflamatórias, antinociceptiva, anti-helmínticas, analgésicas e antiagreganteplaquetária (OLIVEIRA *et al.*, 2002; CORTEZ *et al.*, 2006; VILLALBA *et al.*, 2007; ZANON, 2010).

Cheng e colaboradores (2005) isolaram da casca do caule de *Zanthoxylum ailanthoides* 14 compostos, sendo dois novos sesquiterpenos 10 β -metoximurolan-4-en-3-ona e 10 α -metoxicadinan-4-en-3-ona (Figura 1).

Figura 1 - Dois novos sesquiterpenos isolados da casca do caule de *Zanthoxylum ailanthoides*



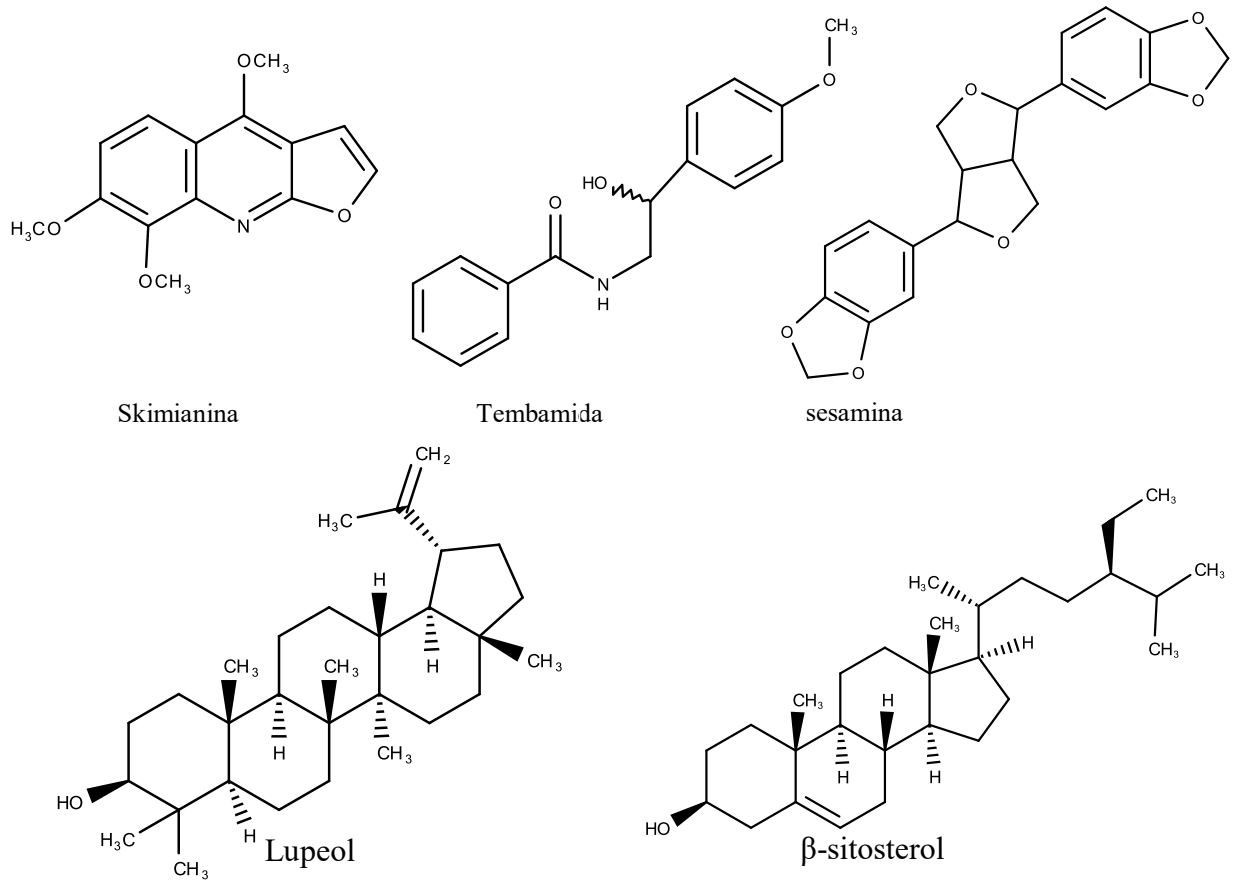
10 α -metoxicadinan-4-en-3-ona

10 β -metoximurolan-4-en-3-ona

Fonte: CHENG et al, (2005)

Facundo et al (2005) realizaram os primeiros estudos fitoquímicos da raiz e das folhas da *Zanthoxylum ekmanii*, resultando no isolamento dos alcaloides skimianina, lignana sesamina, e dos terpenoides lupeol e β -sitosterol (Figura 2).

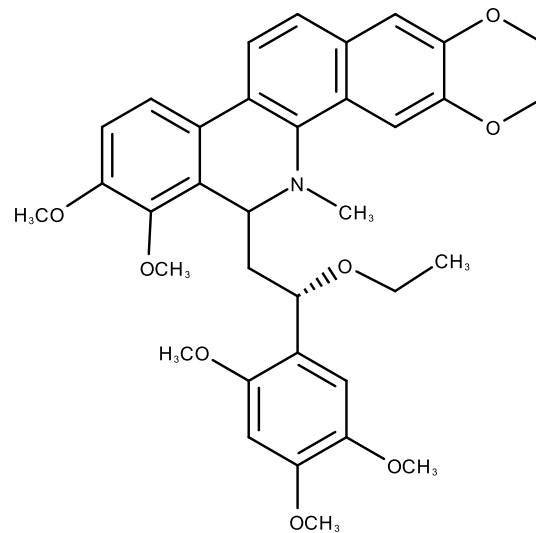
Figura 2 - Substâncias isoladas da raiz e folhas de *Zanthoxylum ekmanii*



Fonte: FACUNDO et al , (2005)

Em 2005, um novo alcaloide benzofenatridínico, denominado Buesgeniina (Figura 3), foi isolado das cascas do caule de *Zanthoxylum buesgenii* (TANE; WABO; CONNOLLY, 2005).

Figura 3 - Alcaloide inédito isolado das cascas do caule de *Zanthoxylum buesgenii*

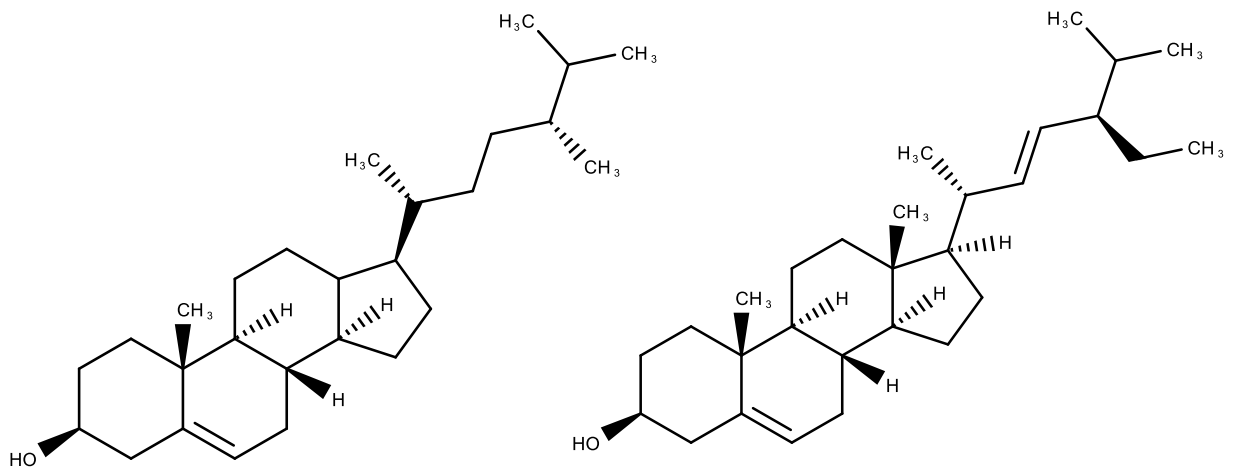


buesgeniina

Fonte: TANE;WABO; CONNOLLY, (2005).

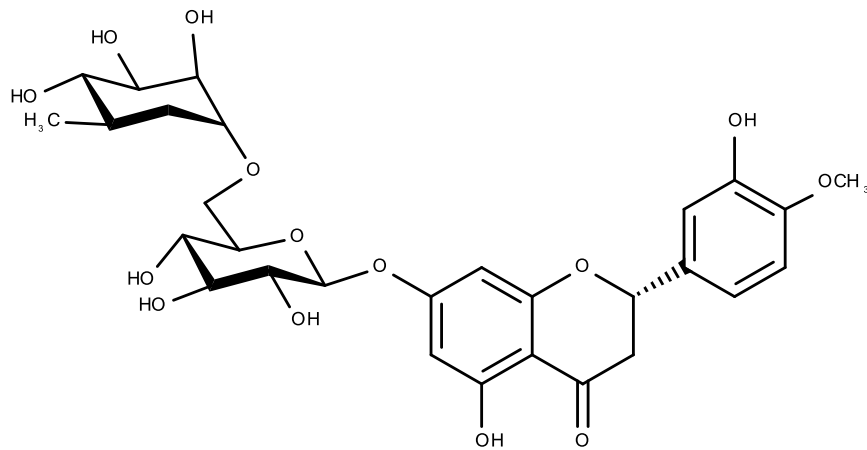
Moccelini e colaboradores (2009), isolaram nas cascas das raízes de *Zanthoxylum rigidum* Humb. & Bonpl. ex Willd o triterpeno lupeol, os esteroides campesterol, estigmasterol e sitosterol, o flavonoide hesperidina e os alcaloides *N*-metilatanina e 6-acetonildihidroqueleritrina (Figura 4).

Figura 4 - Substâncias isoladas da casca da raiz de *Zanthoxylum rigidum*

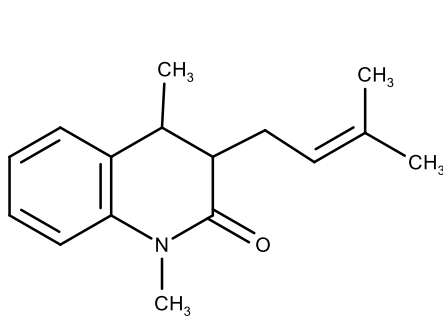


Campesterol

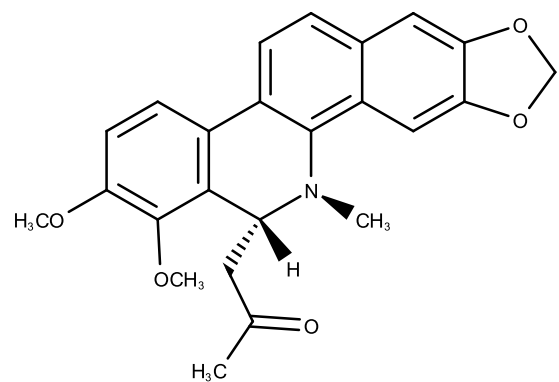
Estigmasterol



Hesperidina



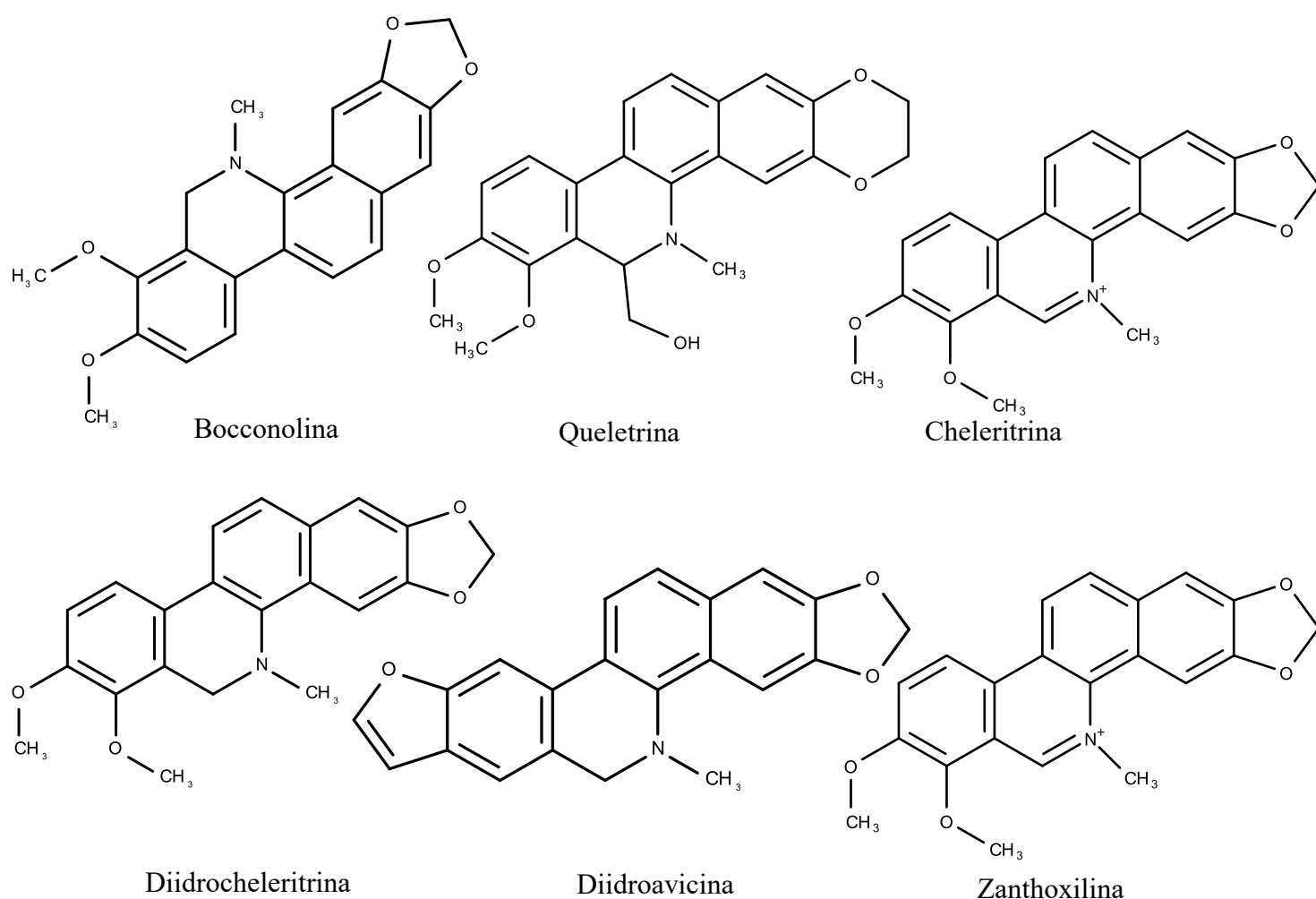
N-metilatanina

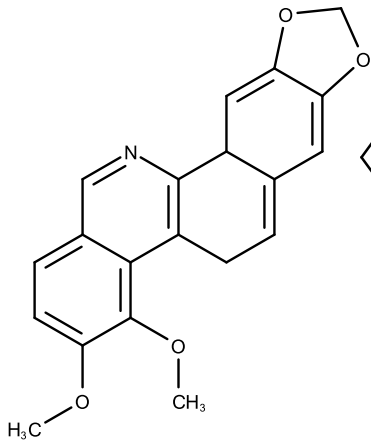


6-acetonildihidroqueleritrina

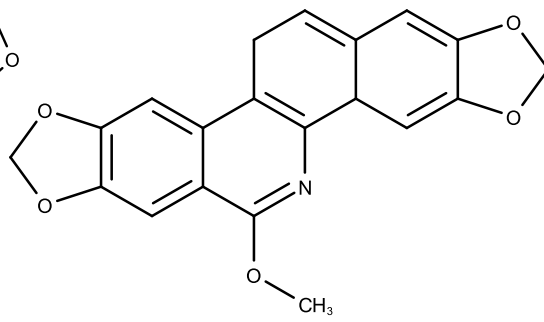
Estudos realizados em *Zanthoxylum rhoifolium*, permitiram o isolamento de alcaloides benzofenantridínicos (Figura 5) extraídos das cascas de raízes, frutos, folhas e caules, tais como Bocconolina, Queleritrina, Cheleritrina, Diidrocheleritrina, Diidroavicina, 6-acetonildihidroqueleritrina, Zantoxilina, Zantoxilina A, Roifolina A, Roifolina B, Fagaridina, Avicina, Oxiavicina, Nitidina, Oxinitidina e Kaerofilina (GONZAGA et al.,2003; WEBER, 2005; ZANON, 2010).

Figura 5 – Alcaloides benzofenantridínicos isolados da espécie *Zanthoxylum rhoifolium*

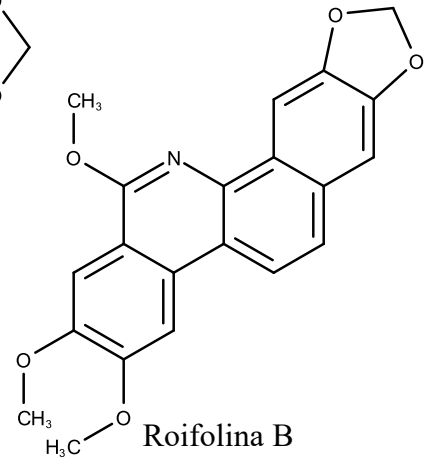




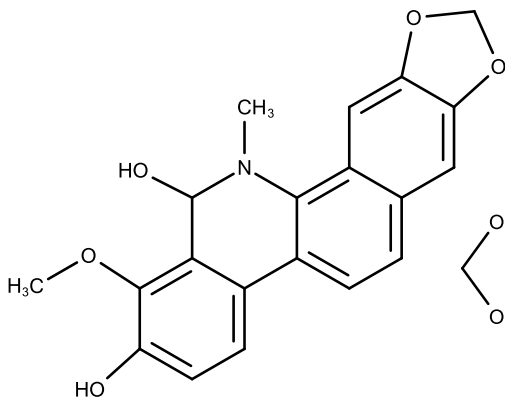
Zanthoxilina A



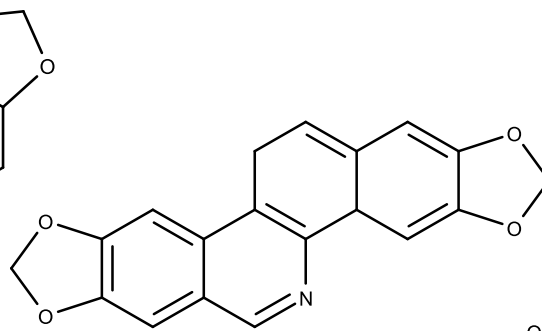
Roifolina A



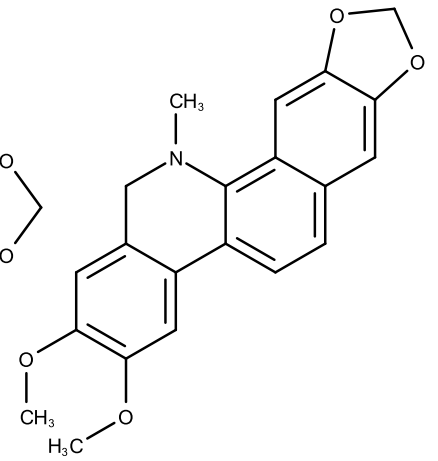
Roifolina B



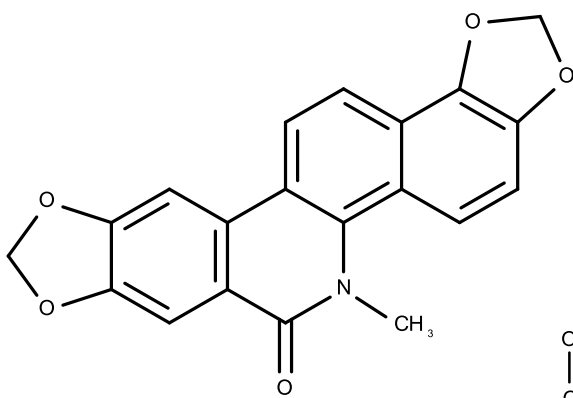
Fagaridina



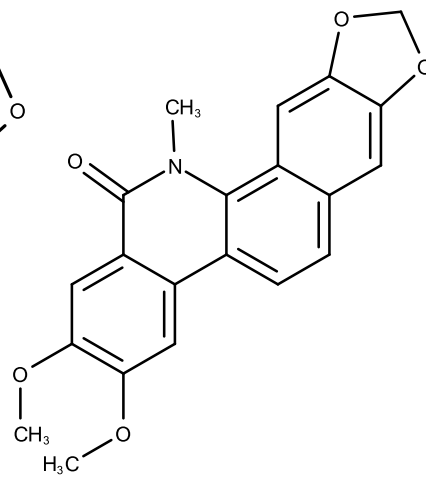
Avicina



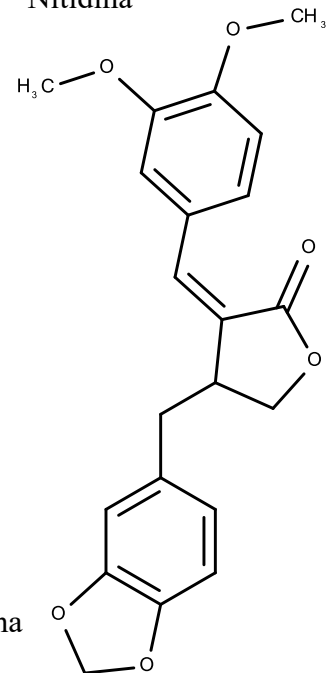
Nitidina



Oxiavicina



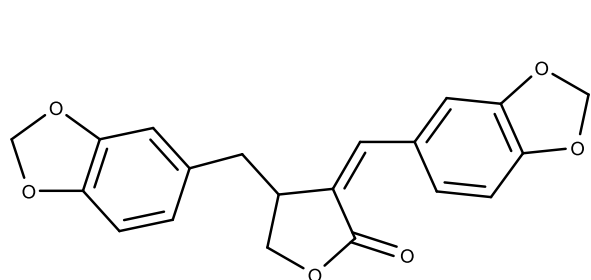
Oxinitidina



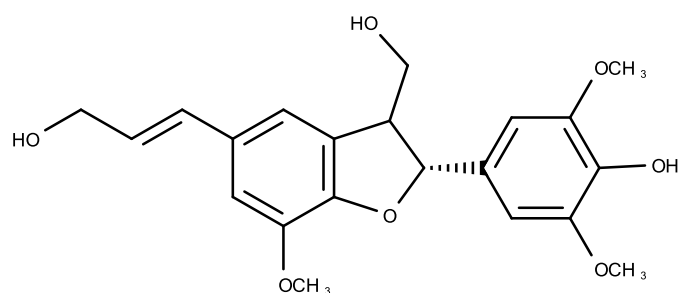
Kaerofilina

Além dos alcaloides benzofenantridínicos e furoquinolinícos, frequentemente encontrados no gênero *Zanthoxylum*, foram identificadas outras classes de metabólitos secundários (Figura 6) em espécies deste gênero, incluindo as lignanas como gadaina e simulanol, o alcaloide aporfínico Magnoflorina, as cumarinas Rutacultina e Suberosina. O isolamento de diferentes classes de metabólitos secundários relatados em estudos científicos, comprova a diversidade química que podem ser encontradas em espécies pertencentes ao gênero *Zanthoxylum* (WEBER, 2005; ZANON, 2010).

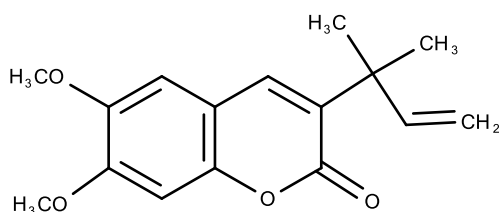
Figura 6 - Substâncias isoladas de espécies do gênero *Zanthoxylum*



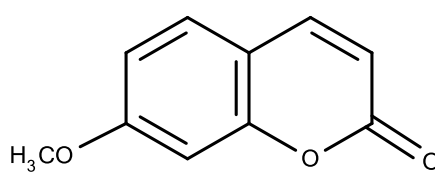
Gadaina



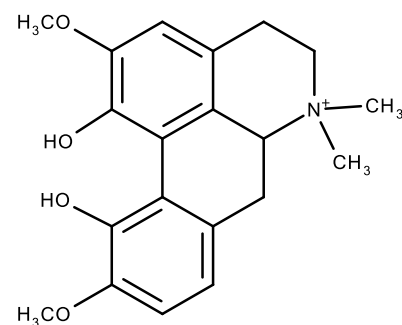
Simulanol



Rutacultina



Suberosina



Magnoflorina

Fonte: WEBER, 2005; ZANON, 2010

2.1.2 *Zanthoxylum caribaeum* Lam

A espécie *Zanthoxylum caribaeum* Lam, é uma espécie amplamente encontrada nas Antilhas, Barbados, Costa Rica, Guadalupe, Martinica, Panamá, Porto Rico e Nordeste da América do Sul, além da Argentina e Paraguai (Figura 7). É de ocorrência em todo o Brasil, conhecida popularmente como espinho-cheiroso, espinheiro-preto e espinho-de-barrão, sendo identificadas em florestas úmidas a mesófilas e semiáridas, podendo ser encontrada em vegetação menos densa, em campos abertos e/ou no interior de matas (PIRANI 2015; MELO; ZICKEL, 2004).

Figura 7 - Distribuição da espécie *Zanthoxylum caribaeum* Lam (Rutacea)



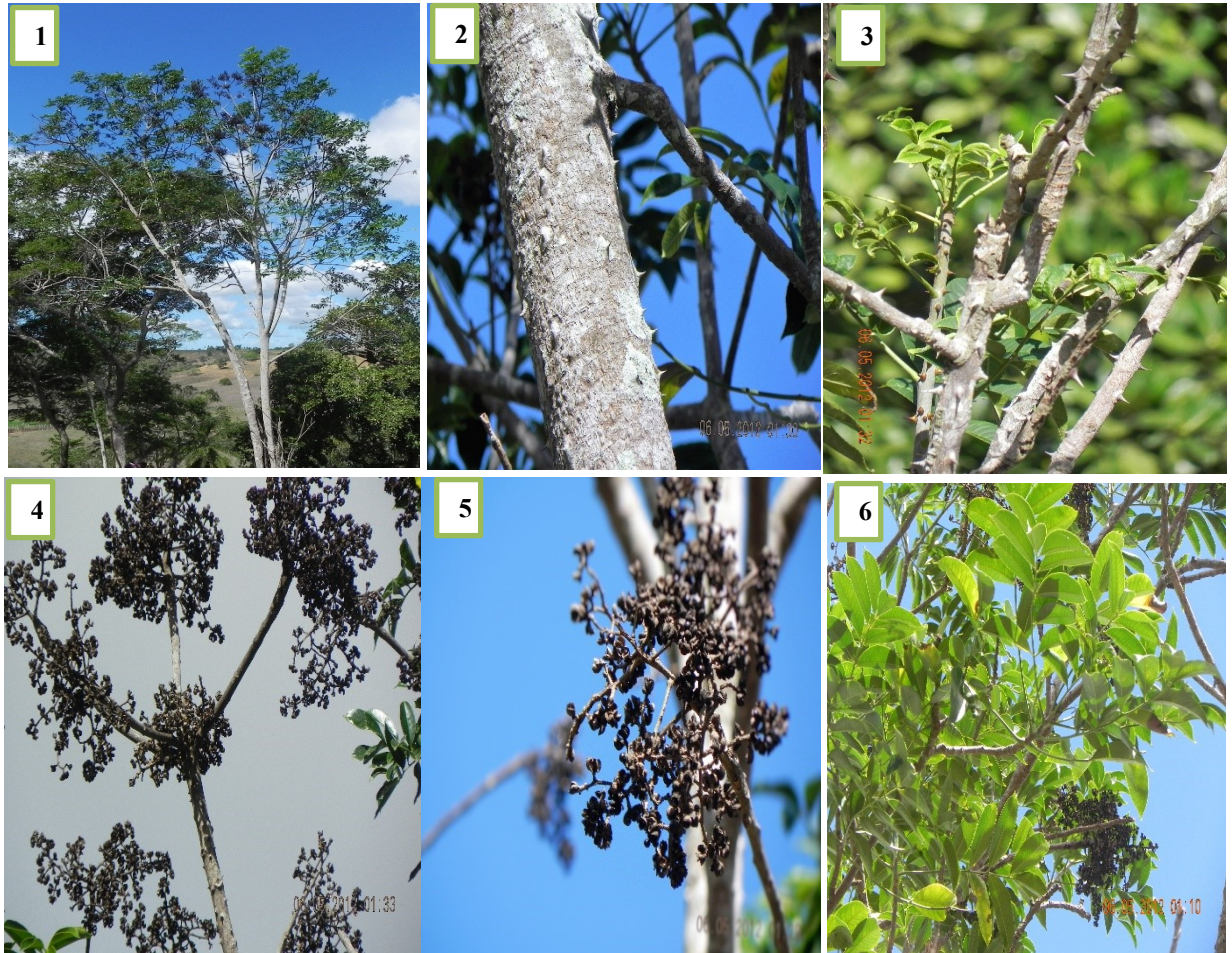
Fonte: <http://www.discoverlife.org/mp/20m?kind=Zanthoxylum+caribaeum>. Acessado em 11/01/18

É uma árvore, com folhas opostas a subpostas, compostas imparipinadas e paripinadas, podendo apresentar acúleos na face abaxial, com contorno elíptico, ápice e base obtusa, margem crenada, raques com 3-8 pares de folíolos (Figura 8) (ANDRADE, 2014; MELO; ZICKEL, 2004). Quanto à estrutura anatômica da lâmina foliar da espécie, observam-se estômatos do tipo actinocíticos, e a presença de uma variedade de estruturas secretoras, como nectários extraflorais, tricomas glandulares penduculados, cavidades secretoras e também idioblastos e ductos, que podem conter ou produzir óleos essenciais, comumente encontrado em espécies da família Rutácea (ANDRADE, 2014).

Em 1967, Deanna Della Casa e Maria Sojo, identificaram o alcaloide metóxi-cantin-5-6-ona extraído das cascas do caule de *Zanthoxylum caribaeum* Lam. Outro estudo da espécie foi

em 2007 por Villamizar e Suarez que, a partir do extrato etanólico da madeira, foram isolado alguns fitoesteróis como estigmasterol e sitosterol.

Figura 8 - Espécie *Zanthoxylum caribaeum* Lam. 1. Hábito. 2, 3 Detalhe dos acúleos. 4, 5 Folículos evidenciando sementes. 6 Folhas



Fonte: Autor (2012)

2.2 Planejamento de fármacos por técnicas de simulações computacionais

A busca por novos fármacos tem sido um grande desafio para pesquisadores e inclusive para as indústrias farmacêuticas, visto que, este processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos é complexo, demanda tempo e apresenta alto custo (JACOB, 2018; FOTIS et al., 2018).

O processo de desenvolvimento de novos fármacos é dividido em duas etapas distintas: As etapas pré-clínicas e clínicas. Nas fases iniciais (pré-clínica), as pesquisas estão relacionadas com a identificação e otimização de micromoléculas que apresentem potencial biológico em testes *in vitro*. Nesta fase, são avaliados os parâmetros farmacodinâmicos, que determinam a

eficácia, efetividade e o mecanismo de ação, os estudos farmacocinéticos que avaliam a absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME), assim como, os estudos toxicológicos, visando determinar a segurança do uso realizado através de testes biológicos realizadas *in vitro* e/ou *in vivo*, em animais em experimentação (BRAGA, RATES E SIMOES, 2017).

Após comprovada eficácia e segurança do composto em estudo durante a fase pré-clínica, estes são conduzidos para a etapa clínica, que se dividem em 4 fases, sendo realizados com seres humanos. A fase clínica I, são efetuados testes farmacológicos a fim de verificar a dosagem e a toxicidade em um grupo pequeno de indivíduos voluntários saudáveis (20-100 indivíduos). Na fase clínica II, são avaliados a eficácia e segurança em indivíduos que apresentam a doença (100-500 indivíduos). Na fase III são realizados em um número maior de voluntários (1.000-5000 indivíduos), com amostras randomizadas e em duplo-cego, com intuito de verificar a eficácia e segurança do fármaco. Após dados clínicos obtidos com sucesso, os mesmos são submetidos aos órgãos reguladores para aprovação do novo fármaco. Na última etapa (fase IV), é realizado estudos observacionais para o monitoramento após a comercialização do novo fármaco (BRAGA, RATES E SIMOES, 2017).

Estima-se que o investimento em pesquisa e desenvolvimento (P&D) para obtenção de um novo medicamento, seja na ordem de US\$ 800 milhões ou aproximadamente 30% do custo total deste, sendo necessário cerca de 12-15 anos para que um novo medicamento seja lançado no mercado (MULLIN, 2014; HUGHES, et al., 2011; GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010; SILVA M. L. A et al., 2010).

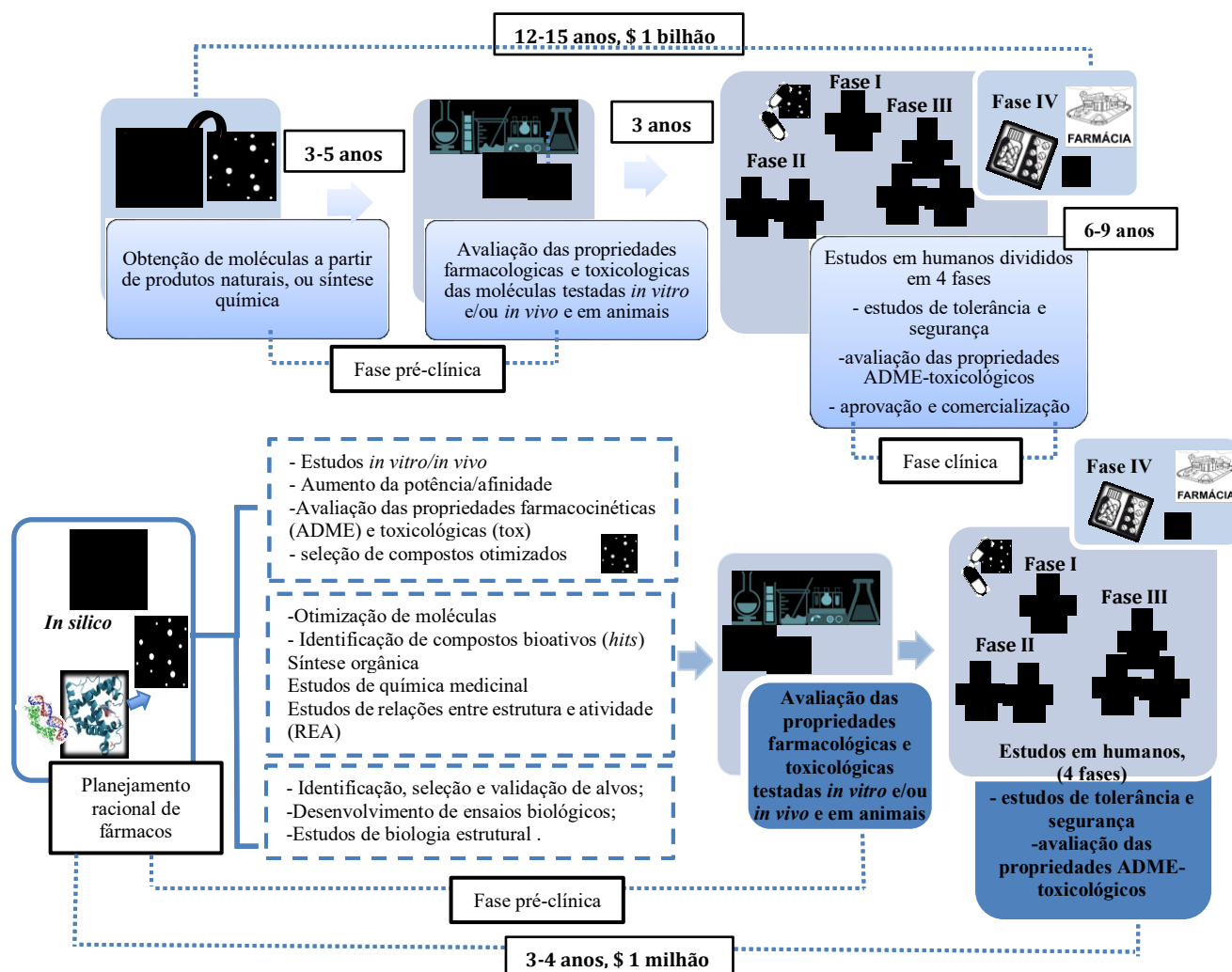
Apesar do grande investimento em (P&D) e testes clínicos, diminuiu o número de fármacos lançados no mercado nos últimos anos, visto o pequeno número de compostos potenciais que passavam com sucesso as etapas pré-clínicas e clínicas (NEWMAN & CRAGG, 2016). Estima-se que apenas 0,02% dos compostos realizam os testes iniciais clínicos, e 10,4% das que atingem a fase I da etapa clínica são aprovados pela FDA. Dentre os fatores contribuintes para a taxa de insucesso no desenvolvimento de novos fármacos estão os efeitos adversos e a ineficácia terapêutica destes compostos (BRAGA, RATES E SIMOES, 2017).

Diante deste cenário, se vê a necessidade de adotar novas estratégias a fim de aumentar a eficiência da P&D para obtenção de novos fármacos, tendo como base as inovações científicas, tecnológicas e empresariais (FERREIRA RS et al., 2011). Neste sentido, o desenvolvimento de novos fármacos utilizando técnicas de simulações computacionais (*in silico*), tem sido de grande relevância, pois permite ao pesquisador verificar a eficácia, atividade, toxicidade e

bioavaliabilidade, antes mesmo do composto ser submetido aos ensaios *in vitro*, proporcionando desta forma, melhor planejamento e direcionamento que pode diminuir custos e tempo empregado na pesquisa de novos fármacos (Figura 9) (ZHENG; THORNE; MCKEW 2013; YOUNG, 2009).

Programas de química computacionais e os bancos de dados em rede, são ferramentas essenciais para a descoberta e planejamento de fármacos. Estas informações possibilitam a partir de uma série de moléculas de interesse, uma breve análise da atividade biológica em relação às propriedades físico-químicas. Assim, novos agentes terapêuticos podem ser desenvolvidos a partir da análise de dados teóricos de estrutura-atividade de forma tridimensional (REA), obtidos por técnicas computacionais atuais (GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010; CARVALHO et al., 2003).

Figura 9 - Estágios envolvidos no processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos. **A.** Método convencional e **B.** Método utilizando ferramentas computacionais



Fonte: adaptado (ZHENG; THORNE; MCKEW 2013) (autor)

Desta forma, as técnicas computacionais são ferramentas amplamente utilizadas na indústria farmacêutica e que demonstram serem eficazes no manuseio de dados e mapeamento de estrutura 3D de alvos moleculares (que podem ser receptores, proteínas, DNA e RNA) e ligantes (a exemplos de compostos orgânicos sintéticos ou micromoléculas oriundas de produtos naturais), possibilitando a identificação e otimização de pequenas moléculas capazes de interagir com alta afinidade e seletividade com o alvo selecionado (RODRIGUES et al., 2012).

Sendo os produtos naturais fonte extensiva de pequenas moléculas, muitas das quais apresentam variadas estruturas químicas e conseqüentemente atividades biológicas potenciais, tem sido considerado excelentes para estudos *in silico*, a fim de avaliar possíveis efeitos farmacológicos e auxiliar na descoberta de novos fármacos (BERLINCK et al., 2017; CARREGAL et al., 2011).

Da mesma forma, a disponibilidade de alvos biológicos potenciais para o planejamento de fármacos requer o uso de métodos rápidos e precisos capazes de identificar novas substâncias bioativas, que mostram potencial atividade biológica quanto a um alvo molecular de interesse. Neste sentido, informações de bioatividade e estrutura dos alvos terapêuticos, possibilitam a simulação de muitos processos químicos e facilitam no processo de descoberta de novos medicamentos. Estas informações podem ser utilizadas através de métodos *in silico*, os quais têm sido bastante empregadas nas indústrias farmacêuticas como forma de otimizar custos e tempo na pesquisa de novos compostos (RODRIGUES et al., 2012; OHLSTEIN et al, 2006).

A disponibilidade de amplo banco de dados virtuais públicos e privados de micromoléculas e de proteínas, favoreceu o desenvolvimento de softwares para triagem *in silico*, essenciais para o planejamento de fármacos. Muitos desses bancos podem fornecer milhares de compostos com diversidade molecular e de atividades biológicas e terapêuticas (RODRIGUES et al., 2012). A exemplo de banco de dados de acesso público, é o ZINC, em que dispõe de mais de 20 milhões de compostos que podem ser adquiridos comercialmente (IRWIN et al., 2012)

Nesta vertente, existem várias estratégias que podem ser adotadas para o planejamento e desenvolvimento racional de novos fármacos, tais como: organização de bancos de dados, a utilização de filtros de descritores moleculares, a utilização de triagens automatizadas em alta escala (HTS, do inglês *high-throughput screening*), modelagem de farmacoforos, relação quantitativa estrutura-atividade (QSAR), Estudos de relações entre estrutura e atividade (REA)

e o emprego de técnicas de triagem virtual (VS, do inglês *virtual screening*) (GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010).

2.2.1 Triagem Virtual Inversa

A Triagem virtual (VS) é um método *in silico*, muito utilizado em pesquisas com o objetivo de identificar em banco de dados químicos, moléculas promissoras e com elevada capacidade de interagirem com afinidade e seletividade com o sítio ativo das proteínas alvo, para posterior análise bioquímica (DOMINGUES 2013; CARREGAL et al., 2011). Em contraposição, a Triagem Virtual Inversa (TVI), consiste na busca de estruturas proteicas em banco de dados virtuais disponíveis, que apresentam relevância farmacológica de forma a demonstrar por simulações computacionais, os alvos terapêuticos promissores para interagirem com determinado ligante de interesse (CARREGAL et al., 2011; ROGNAN, 2006).

Geralmente esta abordagem inicia-se com apenas um ligante e segue com um ou vários alvos biológicos. Estas técnicas permitem prever a bioatividade da molécula de consulta ou o seu mecanismo de ação, possibilita o reposicionamento de moléculas e a partir disto, encontrar aplicações terapêuticas ainda não conhecidas para as moléculas em estudo, assim como, podem ser empregadas para presumir reações adversas dos compostos e identificar polifarmacologia do fármaco (BLONDEAU et al., 2010; CERETO-MASSAGUE et al, 2014). A aplicação dessa técnica permite muitos tipos de análise e tomada de decisão e auxilia desde a seleção de moléculas bioativas até a otimização das propriedades físico-químicas de compostos promissores (KITCHEN et al., 2004).

Portanto, para a execução do procedimento de triagem é essencial a utilização de bases de dados de compostos químicos, pois os bancos de dados são de compostos com atividade já conhecida para um alvo farmacológico definido. E tendo em vista que a riqueza de informações de bioatividade de pequenas moléculas disponíveis em bases de dados privados e de acesso livre, permite prever alvos moleculares de pequenas moléculas, bem como, obter compostos com maior probabilidade de apresentar um perfil de atividades biológicas desejadas, além de prever propriedades biológicas secundárias (GAULTON et al., 2012).

Para tanto, a Tabela 1 destaca alguns bancos de dados que expõem as bioatividades de milhões de micromoléculas ou as atividades de fármacos conhecidos, que podem ser empregados nas técnicas de triagem (CERETO-MASSAGUE et al, 2014; KOUTSOUKAS et al, 2011).

Tabela 1 - Tipos de bancos de dados

Bancos de dados	Informações	Link
BindingDB	Contém 1,433,947 dados de afinidades de ligação para 7,041 alvos de proteínas e 642,391 micromoléculas.	http://www.bindingdb.org/bin/d/
CheMBL	Um banco de dados aberto de bioatividade em larga escala. São 14 milhões de informações de Bioatividade e 1,2 milhões de ensaios	http://www.ebi.ac.uk/chembl
ChemBank	Informações sobre centenas de milhares de moléculas pequenas e centenas de ensaios biomédicos	chembank.broadinstitute.org/
Drugbank	Contém informação sobre drogas e alvos de drogas. Mais de 4800 informações de fármacos	http://www.drugbank.ca/
DrugPort	Fornecer uma análise das informações estruturais disponíveis no PDB relativas à moléculas e seus alvos proteicos	http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/drugport/
Human Metabolome Database	Contém informações detalhadas sobre metabolitos de pequenas moléculas encontrados no corpo humano. A base de dados contém 114,100 entradas de metabólitos	http://www.hmdb.ca/
PubChem	Repositório aberto para dados experimentais que identificam as atividades biológicas de pequenas moléculas	http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/

Fonte: CERETO-MASSAGUE et al., (2014) adaptada

Com base nisto, a busca por estruturas químicas pode ser realizada conforme duas abordagens: A triagem virtual baseada em informações da estrutura do alvo molecular - **TVBR** (*Target-Based Virtual Screening* - TBVS), e a triagem virtual baseada em ligantes - **TVBL** (*Ligand-Based Virtual Screening* -). Dessa forma, milhares de compostos depositados nos bancos de dados podem ser analisadas através do acoplamento a sítios de ligação específicos de determinado alvo (TBVS), como também com base na similaridade de ligantes conhecidos (LBVS) (LAVECCHIA; DI GIOVANNI, 2013). Estas ferramentas podem ser classificadas de acordo a categorias: a TVBL podem ser categorizadas em similaridade química, Relação estrutura-atividade quantitativa e na busca por farmacóforo. No entanto, a TVBR destaca o acoplamento molecular, predição de afinidade de ligação e por estrutura baseada em farmacóforos (DOMINGUES, 2013; CORTE'S-CABRERA; GAGO; MORREALE, 2012; FERREIRA R S et al., 2011).

A triagem baseada em ligantes é uma estratégia que utiliza compostos orgânicos com propriedades biológicas conhecidas, funcionando como modelo para a triagem em bancos de dados de novos compostos químicos que apresentem algum nível de similaridade. Esta

abordagem visa a identificação de moléculas com certa semelhança estrutural e que possam compartilhar também atividade biológica. Neste sentido, os compostos são selecionados conforme os métodos de similaridade molecular e farmacofórica atribuídas por relações entre propriedades estruturais e atividade biológica (RODRIGUES et al., 2012).

Das técnicas de TBVS destaca-se o "Docking Molecular" ou acoplamento Molecular, que consiste em uma ferramenta computacional, que permite predizer o modo de interação de um ligante em pesquisa, frente a um determinado alvo macromolecular de interesse, assim, prever se ligantes ainda não explorados experimentalmente podem interagir com a macromolécula, além de estimar a afinidade energética de ligação entre o receptor e o ligante, através de cálculos de energia potencial obtidos por funções de pontuações, dos quais correspondem às interações intermoleculares (KITCHEN, DECORNEZ et al. 2004).

A metodologia de acoplamento molecular pode ser utilizada para sugerir modificações estruturais com o objetivo de gerar compostos protótipos que tenha maior interação com o receptor, possibilitando obter novos candidatos a fármacos, sendo que, este método possui grande importância no planejamento racional de fármacos dirigidos a alvos específicos (CARREGAL et al., 2011; PACHECO, 2009).

O *docking*, através do uso de duas diferentes funções, como o algoritmo de procura e a função de *scoring*, prevê a conformação e orientação de um ligante num sítio ativo do alvo molecular (CRUZ, 2012). Vários programas são utilizados como FlexX, Dock, GOLD, GLIDE e AutoDock, alguns com vantagens por serem gratuitos, favorecendo o acesso a pesquisa pelas instituições acadêmicas, a exemplo do Dock e Autodock e conseqüentemente em estudos na obtenção de novos fármacos (RODRIGUES et al., 2012).

2.2.2 Método de similaridade molecular

Dentre as técnicas comumente aplicada em triagem, tem-se a busca por similaridade, sendo como uma das estratégias mais simples e de menor custo operacional, que tem como ponto de partida a seleção de uma ou mais moléculas (estruturas-alvo ou de referência), que apresentem propriedades biológicas conhecidas (CERETO-MASSAGUE et al., 2014).

Por meio da triagem em bancos de dados virtuais de moléculas, é possível filtrar os compostos que apresentem estruturas mais similares que as de referências. Esta técnica preconiza que, compostos que possuem estruturas similares tendem a apresentar propriedades físico-químicas e atividades biológicas semelhantes. Uma das vantagens desta técnica é que

exigem o cálculo da similaridade entre os compostos (CERETO-MASSAGUÉ, et al., 2014; RODRIGUES et al., 2012).

A similaridade pode ser quantificada através de um coeficiente calculado para os compostos encontrados em base de dados que são utilizados na busca. Existem inúmeros coeficiente de medidas, sendo o mais utilizado em técnicas de triagens virtuais o coeficiente de Tanimoto (CT), que fornece valores de comparação entre 0 (zero) a 1. Quanto mais próximo de zero, significa que não existe similaridade entre as moléculas comparadas. No entanto, valores iguais a 1 (um) indicam que a molécula possui 100 % de similaridade entre os compostos, sendo que, valores máximos garantem a comparação de uma molécula a ela mesma ou a seu enantiômetro (CERETO-MASSAGUE et al., 2014).

Através deste método, uma pequena molécula é representada como uma característica estrutural específica, conhecida como impressão digital química (*fingerprints*). As impressões digitais identificam uma molécula por meio de suas características especiais ou pela forma da estrutura de uma molécula (RODRIGUES et al., 2012). Dentre outras formas amplamente utilizada na pesquisa de similaridade em triagem inversa tem-se *fingerprints* 2D e 3D, embora a triagem por similaridade baseada em *fingerprint* 2D são mais utilizadas devido ao seu baixo custo computacional e alta velocidade na obtenção de resultados para previsões correta do alvo. No entanto, acredita-se que *fingerprints* 3D funcionam melhor em casos de baixa similaridade estrutural (CERETO MASSAGUE et al., 2014).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta e identificação botânica da espécie

A coleta da espécie em estudo foi realizada no município de Cruz das Almas - Bahia, localizada entre as coordenadas 12 42' 20.3'' S e 39 06' 24.1'' W em março de 2015. A exsicata foi depositada sob registro HUEFS 178575 no Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana Bahia (HUEFS) e identificada pelo especialista na família Dr. Milton Groppo Junior.

3.2 Estudo químico

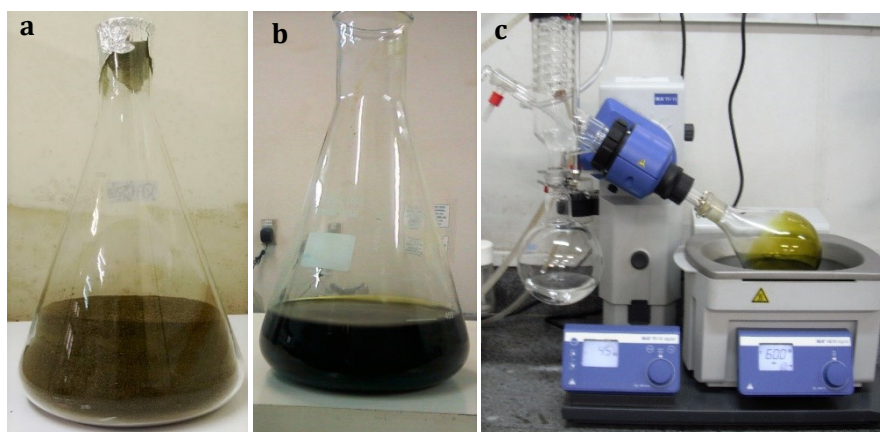
3.2.1 Preparo do material

As folhas de *Zanthoxylum caribaeum* Lam. foram submetidas à secagem em estufa com circulação de ar por um período de 10 dias à temperatura de 40°C até obter peso constante. Após a secagem, estas foram trituradas em macromoinho no Laboratório de Extração de Produtos Naturais – LAEX, localizado na Unidade Experimental Horto Florestal (UEHF) – UEFS para obtenção dos extratos.

3.2.2 Preparo do extrato

A obtenção do extrato bruto foi realizada no LAEX, sendo que inicialmente, o pó das folhas foi pesado em balança semi-analítica obtendo-se uma massa de 5.700 g, registrada para o cálculo de rendimento. O extrato bruto foi preparado através da técnica de maceração utilizando metanol como solvente extrator. Foram realizadas cinco extrações consecutivas, por 72 horas cada, à temperatura ambiente (25°C). A cada extração houve agitação ocasional e renovação do líquido extrator. As amostras foram mantidas ao abrigo da luz durante todo o período de maceração. Em seguida, a solução obtida foi concentrada em evaporador rotatório sob pressão reduzida, com banho em temperatura à 60 °C, originando o extrato bruto metanólico (EBZC) (Figura 10).

Figura 10 - Etapas de preparo dos extratos de *Zanthoxylum caribaeum* Lam (a) material pulverizado, (b) solução metanólica e (c) concentração do EBZC em evaporador rotativo



Fonte: dados experimentais (Autor, 2015)

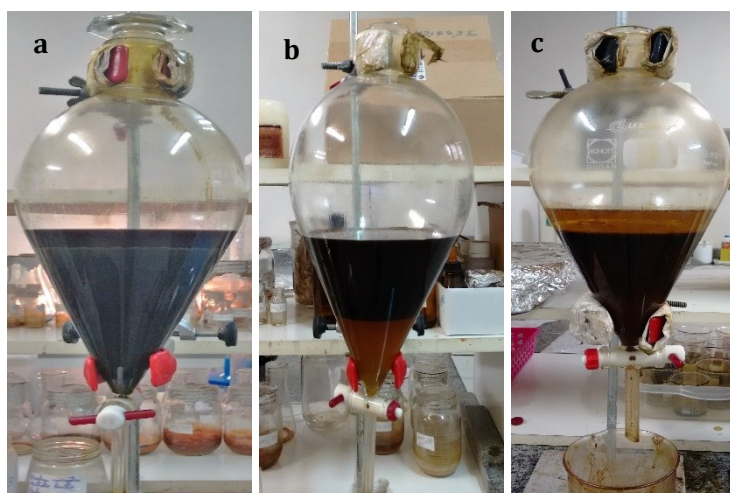
O EBZC (308,21 g) foi submetido a processo de partição líquido-líquido com solventes em ordem crescente de polaridade, hexano, clorofórmio e acetato de etila, visando uma semi-purificação das substâncias através de suas polaridades, obtendo dessa forma 3 extratos semi-purificados (Figura 11) (CECHINEL FILHO, YUNES, 1998).

Para a partição, o EBZC foi solubilizado em solução hidroalcoólica de metanol:água na proporção (9:1). Em seguida, colocou-se a solução em funil de separação com hexano, sendo o volume de hexano utilizado equivalente a 1/3 do volume total da solução hidroalcoólica. A fase hexânica foi coletada em um recipiente de vidro, previamente pesado, e a fase aquosa submetida mais duas vezes à partição com hexano, utilizando o mesmo volume de solvente em cada etapa.

Ao fim da extração com hexano, a fase hidroalcoólica foi diluída, para obtenção da solução metanol:água na proporção (6:4). Essa solução foi submetida ao mesmo procedimento utilizando o clorofórmio. A fase clorofórmica foi coletada e seca em evaporador rotativo.

A fase hidroalcoólica foi concentrada em evaporador rotatório para eliminação do metanol. Em seguida, a mesma foi novamente colocada em funil de separação, para partição com acetato de etila. A fase acetato de etila foi coletada separadamente e submetida ao processo de secagem para obtenção do extrato seco (EAZC). Não foi possível obter o extrato seco da fração aquosa, por falta de um liofilizador, a solução foi contaminada por fungos, posteriormente descartada. As frações obtidas foram concentradas e pesadas para cálculo do rendimento, conforme demonstrada na tabela 3.

Figura 11 - Partição líquido-líquido e separação provável dos principais metabólitos secundários presentes em plantas em ordem crescente de polaridade Hexano (a), clorofórmio (b) e acetato de etila (c)



Fonte: Autor, 2015

Tabela 2 - Massas (g) e rendimentos (%) das frações resultantes da partição do extrato metanólico de folhas de *Z. caribaeum* Lam.

Extratos	Massa (g)	Rendimento %
Metanólico Bruto	318,21	5,58*
Hexânico	94,67	30,71
Clorofórmico	64,27	20,85
Acetato de etila	7,49	2,43

* Relativo a massa seca

3.2.3 Obtenção dos óleos essenciais

A obtenção e análise do óleo essencial das folhas de *Z. caribaeum* foi realizado no Laboratório de Química de Produtos Naturais e Bioativos - LAPRON localizado na UEFS e coordenado pela Dr. Angélica Maria Lucchese. Os óleos essenciais foram obtidos das folhas secas da espécie *Z. caribaeum*. O material foi pesado (697,71 g) em seguida triturado em liquidificador industrial e adicionado água destilada para facilitar o processo. Após trituração, a biomassa foi transferida para um balão de destilação com capacidade para 5 L, sendo submetida à hidrodestilação por arraste a vapor, em um aparelho de Clevenger (Figura 12), por um período de três horas, contadas a partir do início do refluxo da água condensada, do tubo separador para

o balão de destilação (ADAMS, 2007). Após período de extração, foi realizada a leitura do volume de óleo extraído no tubo graduado do próprio aparelho e o rendimento, em porcentagem, calculado em relação à quantidade. Os óleos obtidos foram recolhidos do tubo separador com o auxílio de uma micropipeta do tipo Pasteur. Os óleos foram desidratados pela adição de sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), filtrados e conservados em frascos de vidro selados e protegidos pela luz com folha de alumínio e armazenados sob baixa temperatura ($-5\text{ }^\circ\text{C}$), até a realização da análise química. O rendimento do óleo foi calculado com base nos volumes de óleo obtido e do peso do material vegetal fresco.

Figura 12 - Etapas de obtenção do óleo essencial de *Zanthoxylum caribaeum* por Hidrodestilação em aparelho de Clevenger. 1. Trituração do material vegetal no liquidificador industrial. 2 Aparelho de Clevenger. 3. Extração do óleo por hidrodestilação por arraste a vapor



Fonte: Autor (2015)

3.3 Análise da composição química

3.3.1 Prospecção fitoquímica dos extratos das folhas de *Z. caribaeum*

Testes de triagem fitoquímica preliminar fornecem informações sobre as classes metabólicas que compõem os extratos vegetais. Os extratos brutos vegetais, são misturas complexas constituídas na maioria das vezes por diversas classes de metabolitos secundários. A presença de alguns compostos químicos em extratos de plantas, podem estar relacionados a propriedades biológicas e farmacológicas potenciais. Neste sentido, muitas técnicas têm sido utilizadas afim de fornecer informações sobre os compostos biologicamente ativos, presentes

nos extratos vegetais (BESSA et al., 2013; MATOS, 1997; 2009). Foi realizada a triagem fitoquímica nos extratos EBZC, EHZC, ECZC e EAZC através de testes qualitativos para detecção das principais classes de metabolitos secundários tais como: Compostos fenólicos, taninos, flavonoides, antraquinonas, cumarina, alcaloides, esteroides/triterpenos e saponinas.

Os testes foram realizados seguindo a metodologia descrita por Matos (2009), através de reações colorimétricas e/ou formação de precipitados e permanência de espuma, utilizando reagentes para cada classe química. A presença ou ausência dos grupos de metabólitos secundários e de alguns constituintes da espécie estudada foi verificada a partir da observação da reação característica esperada ou não, indicando a presença de resultado positivo ou negativo para cada grupo e constituinte analisado:

a) **Compostos fenólicos:** Reação com cloreto férrico a 2% (FeCl_3)

Foram solubilizadas 0,5g de cada extrato (EBZC, EHZC, ECZC e EAZC) em 15 mL de etanol, posteriormente filtrado e distribuídos em tubos de ensaios (2 mL). Em tubos contendo 2 mL do extrato aquoso foram adicionadas 3 gotas de solução alcoólica de FeCl_3 2%. Foi comparado com o branco contendo água destilada e FeCl_3 2%. A mudança de coloração entre azul e o vermelho é indicativo da presença de fenóis.

b) **Taninos:** Reação com solução aquosa de FeCl_3 2%, acetato de chumbo a 3% e acetato de cobre a 3%

Foram solubilizadas 0,5g de cada extrato (EBZC, EHZC, ECZC e EAZC) em 25 mL de água destilada, posteriormente filtrado e distribuídos em tubos de ensaios. Em cada tubo de ensaio contendo 2 ml da solução aquosa de cada extrato, foi adicionado 3 gotas de solução de FeCl_3 2%, 3 gotas de solução acetato de cobre a 3% e 3 gotas de solução acetato de chumbo a 3%. Cada reação foi analisada separadamente utilizando os extratos da espécie. A presença de compostos tanóides é identificada pela mudança de coloração do verde a marrom ou aparecimento de precipitado.

c) **Flavonoides:** Reação de Shinoda (HCl concentrado e magnésio) e reação com hidróxidos alcalinos

Foram dissolvidos 0,5g de cada extrato em 15 mL de etanol 70%. Após ser filtrado, o extrato etanólico foi adicionado em tubos de ensaio para a realização da reação com hidróxidos alcalinos e reação de Shinoda.

Reação com hidróxidos alcalinos: Foram adicionados 2mL de cada extrato em tubos de ensaio e acrescentado 0,5 mL de solução de NaOH. A intensificação da coloração amarelada na reação com o hidróxido alcalino é indicativo da presença de flavonoides no extrato.

Reação de shinoda: Foram colocados 3 mL do extrato etanólico e alguns fragmentos de magnésio, adicionando-se lentamente 0,5 mL de ácido clorídrico concentrado (HCl). O término da reação é indicado pelo fim da efervescência. A reação é positiva, indicando a presença de flavonoides quando ocorre a mudança de coloração variando de rósea a vermelha.

d) **Esteroides e triterpenoides:** Reação de Lieberman-Burchard (anidrido acético mais ácido sulfúrico concentrado)

Cada extrato seco foi extraído com 2 mL de clorofórmio, por três vezes. A solução foi filtrada em um funil fechado com algodão coberto com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) e passada para um tubo de ensaio. Em seguida, foi adicionado 1 mL de anidrido acético e 3 gotas de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado, agitando-se suavemente. O aparecimento da coloração azul seguida de verde permanente é indicativo da presença de esteroides livres, enquanto que o aparecimento da coloração entre parda a vermelha indica a presença de triterpenoides livres.

e) **Saponinas:**

Os extratos foram redissolvidos utilizando-se 5 mL de água destilada, e logo após, foi filtrado para um tubo de ensaio. A solução foi agitada por 2 minutos, observando-se a formação de espuma. A presença de espuma persistente e abundante indica a presença de saponinas.

f) **Cumarinas:**

Pesou-se uma pequena quantidade dos extratos dissolvendo-se em etanol. A partir desse extrato etanólico pingou-se uma gota em dois locais em um pedaço de papel filtro não fluorescente, e em seguida, aplicou-se uma gota de KOH 10% sobre uma mancha. Os mesmos foram colocados em uma câmara com incidência de luz ultravioleta por cerca de 2 minutos e observados se houve o aparecimento de uma mancha fluorescente. O desenvolvimento de fluorescência azulada bem visível indica a presença da cumarina.

g) **Alcaloides:** Reativo de Mayer e Dragendorff

Foram dissolvidos os extratos em 5 mL de solução de ácido clorídrico a 5 % e aqueceu-se por 10 minutos em banho maria (60° C), em seguida foi alcalinizado com NH₄OH a 10% e adicionado 10 mL de clorofórmio em um funil de separação e agitou-se a solução. Posteriormente a fase clorofórmica foi retirada e colocada em banho maria até total evaporação do solvente restando apenas resíduos. Foram adicionados 5 mL de HCl 5% e a solução foi distribuídas em tubos de ensaios. Em cada um dos tubos, foram adicionados 3 gotas dos reagentes de Dragendorff e Mayer. A presença de precipitados floculosos vermelho tijolo e branco respectivamente para cada reagente, indica a presença de alcaloides.

h) **Quinonas:** Reação de Borntraeger

Foram dissolvidos 0,2 g dos extratos em 5 mL de éter etílico. Deixou-se decantar o solvente, transferindo-o para um tubo de ensaio, em seguida foi adicionado à solução 1 mL de NH₄OH concentrado. Agitou-se a solução e deixou separar as duas fases. O aparecimento da coloração rósea ou vermelha da camada aquosa indica a presença de compostos antraquinônicos livres.

3.3.2 Análise do perfil cromatográfico por CLAE-DAD dos extratos das folhas de *Z. caribaeum*

Através de análises cromatográficas é possível determinar o perfil químico em determinados extratos, e caracteriza-los em um único cromatograma. Para isto, são utilizadas diversas técnicas de análise para obtenção do perfil químico, altamente recomendadas e embasadas na literatura, tais como: a CCD, CLAE, CG, Cromatografia em Contra Corrente. Destas, a CLAE é a mais utilizada para este tipo de caracterização (HONG-LAN et al., 2010; TANG et al., 2010).

As amostras dos extratos EBZC, EHZC, ECZC e EAZC foram submetidos à técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) para traçar o perfil cromatográfico dos extratos da espécie. Com este procedimento, foram analisados e identificados os compostos por CLAE-DAD, comparando-os com padrões comerciais tais como: rutina, ácido *trans*-ferúlico, ácido caféico e ácido gálico da Vetec.[®]

O método utilizado foi adaptado de Cíchová e colaboradores (2008). Os extratos da espécie em estudo foram analisados em cromatógrafo Varian e detector de arranjo de diodo VarianProStar. Foram utilizadas para as separações cromatográficas coluna LiChroCARTPurospherStaR[®] 100 RP8-e (250 mm x 4,0 mm i.d.) (5µm) (Merck, Darmstadt,

Germany) acoplado a uma pré-coluna RP 8-e da Merck. Os reagentes utilizados foram de grau cromatográfico de pureza (Merck® e Vetec®) como acetonitrila, ácido acético e água ultra-pura obtida pelo sistema Direct-Q UV 3 Milli-Q® (Merck Millipore, Milford, MA, EUA). Através do gradiente de eluição de Cíková, várias proporções da fase móvel foram testadas afim de obter o gradiente com melhor definição dos picos tanto da mistura de padrões quanto das amostras testadas. O melhor gradiente de eluição obtido foi a solução de ácido acético 0,7% (Fase A) e acetonitrila (MeCN): ácido acético 0,7% (8:2) (Fase B) mostrado na Tabela 3. As fases móveis foram filtradas sob vácuo, através de uma membrana microporosa de 0,22 µm (Millipore)

Os extratos EBZC; EHZC; ECZC; EAZC foram dissolvidos com a fase móvel orgânica (acetonitrila-MeCN: ácido acético 0,7% (8:2) -Fase B). A solução foi homogeneizada e filtrada sob pressão em cartucho de extração em fase sólida (SPE-C18 200mg/3ml - Cleanert®), sendo acondicionado com a mesma fase móvel orgânica. As condições cromatográficas incluíram: fluxo de 1,0 mL/min, faixa de comprimento de onda de 220-600 nm. A injeção da amostra no sistema foi manual com volume de injeção de 20 µL. Os cromatogramas foram comparados em diferentes comprimentos de onda, quanto ao número de picos e a qualidade dos mesmos.

Tabela 3 - Gradiente de eluição

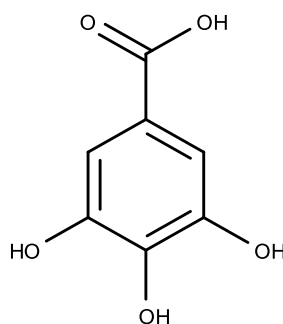
Tempo (min)	Fluxo (ml/min)	Ácido Acético % (Fase A)	Ácido Acético + MeCN % (Fase B)
0:00	1,0	95	5
1:00	1,0	95	5
5:00	1,0	90	10
12:00	1,0	83	17
30:00	1,0	20	80
41:00	1,0	5	95

3.4 Determinação do teor de fenólicos totais e flavonoides

3.4.1 Teor de fenóis totais

A determinação do teor de fenóis totais presentes nos extratos EBZC; EHZC; ECZC; EAZC da espécie estudada, foi feita por meio de espectroscopia na região do visível a 760 nm utilizando o método colorimétrico de FolinCiocalteau (FC) com modificações (GEORGÉ et al, 2005). Foi utilizado padrão de ácido gálico (Figura 13) para a construção da curva analítica e os resultados foram expressos em mg de ácido gálico equivalente (AGE) / 100 gramas de extrato.

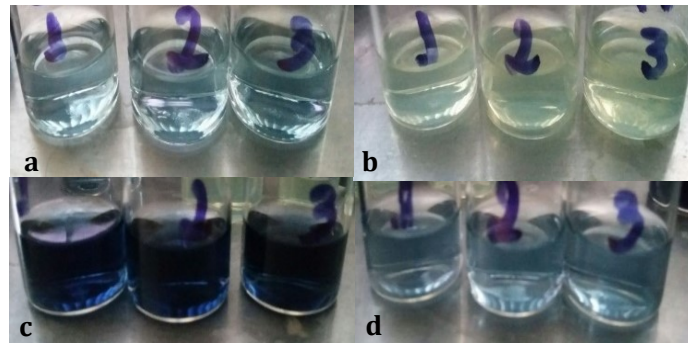
Figura 13 - Estrutura do ácido gálico



Preparou-se a solução aquosa do reagente Folin-Ciocalteau (1/10), de carbonato de sódio (Na_2CO_3) a 7,5% e solução aquosa (matriz) do padrão ácido gálico ($100 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$). Posteriormente, foram preparadas soluções de ácido gálico em diferentes concentrações, variando de $10\text{-}60 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, a partir da solução matriz.

Foram dissolvidos 10 mg de cada extrato (amostra) em 10 mL de água destilada. Em seguida, foi adicionado 0,5 mL dos extratos e das diferentes concentrações de ácido gálico em tubos de ensaios. Em cada tubo, incluindo o branco, adicionou-se 2,5 mL do reagente FC agitando-se, em seguida, para proporcionar mistura de reagente com amostra. Após 3 minutos, foi adicionado 2 mL da solução de carbonato de sódio 7,5% em cada tubo, e em seguida, agitou-os. Manteve-se os tubos contendo a mistura em um banho-maria a uma temperatura de $50,0^\circ\text{C}$ por 5 minutos. Após 15 minutos de repouso, os tubos foram colocados em banho de gelo por 3 minutos e submetidos à leitura em espectrofotômetro a $\lambda=760 \text{ nm}$ utilizando-se cubetas de vidro, tendo como "branco" água destilada. As leituras foram realizadas em triplicata (Figura 14).

Figura 14 - Amostras dos EBZC (a); EHZC (b); ECZC (c); EAZC (d) após reação.



O teor de fenóis totais foi determinado por interpolação da absorvância das amostras contra uma curva de calibração construída com padrões de ácido gálico (10 a 60 $\mu\text{g/mL}$), a partir da equação da curva padrão do ácido gálico obtida através de regressão linear:

Equação 6. Equação da curva padrão do ácido gálico

$$Y = aX + b$$

Sendo que:

- Y = é a absorvância da amostra,
- X = concentração.

Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico em 100g de extrato, utilizando-se a fórmula

$$\%(\text{g}/100\text{g}) = (C \times D) / (10.000 \times (M/V))$$

Em que;

C = concentração obtida através da curva padrão;

D = diluição da amostra;

M = massa necessária para fazer o extrato;

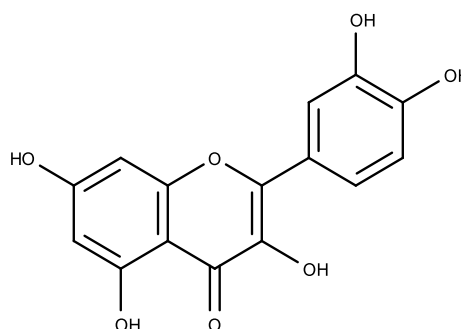
V = volume de solução extratora.

3.4.2 Determinação do teor de flavonoides totais

A quantificação de flavonoides totais nos extratos EBZC; EHZC; ECZC; EAZC foi realizada por método espectrofotométrico de acordo com Pothitirat e colaboradores (2009), utilizando como reagente cloreto de alumínio (AlCl_3). A técnica baseia-se na medida da absorvância, a 415 nm, do complexo formado entre o flavonoide e o alumínio, formando compostos de coloração amarelada.

As soluções do padrão quercetina (Figura 15) foram preparadas em diferentes concentrações que variaram de 2 a 20 $\mu\text{g/mL}^{-1}$ para realização da curva analítica. As amostras foram preparadas utilizando 10mg dos extratos EBZC; EHZC; ECZC; EAZC, dissolvidos em 20 mL de metanol cada. Foi preparada uma solução metanólica de cloreto de alumínio a 2%. Para a realização do teste foi adicionado 1,5 mL da amostra ou padrão de quercetina a 1,5 mL da solução metanólica de AlCl_3 . Após 10 minutos de reação, as amostras foram submetidas à leitura em espectrofotômetro em $\lambda = 415$ nm. Para a análise do branco, realizou-se o mesmo procedimento que as demais amostras, no entanto foi adicionado metanol no lugar da amostra.

Figura 15 - Estrutura química da quercetina



A aquisição da absorvância foi realizada em espectrofotômetro Multiskan GO 3.2 a 415 nm (Figura 16), e a partir dos resultados obtidos foi construída a curva de calibração com o padrão quercetina, cuja equação foi utilizada para o cálculo dos teores de flavonoides totais. O conteúdo de flavonoides foi expresso em gramas de quercetina equivalentes (QE) / 100g do extrato.

Figura 16 –Espectrofotômetro Multiskan, aquisição da absorvância a 415 nm



3.5 Isolamento e identificação dos constituintes químicos de *Zanthoxylum caribaeum* lam.

3.5.1 Análise química dos extratos

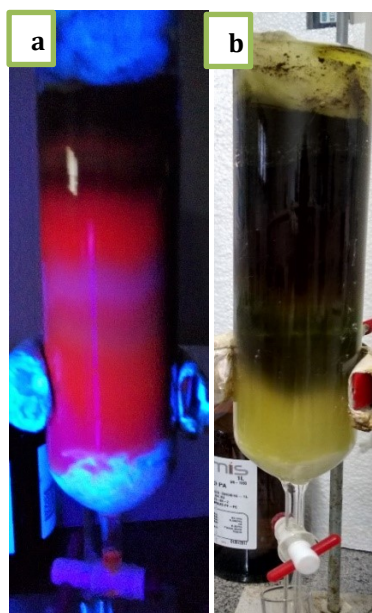
Os extratos foram submetidos a análise dos seus perfis cromatográficos por Cromatografia em Camada Delgada (CCD). Para realização do método CCD, foram utilizadas placas de vidro recobertas com uma suspensão de sílica gel Kieselgel 60 PF254 em água destilada, ativadas a 60 °C em estufa por 60 minutos. As amostras (EHZC, ECZC e EAZC) foram dissolvidas em acetona e aplicadas com auxílio do capilar na base da placa cromatográfica. Após secagem do ponto de aplicação, a placa foi colocada em uma cuba saturada com a fase móvel hexano/acetato de etila ou clorofórmio/metanol, testadas em diferentes proporções. Após eluição, as placas foram secas e reveladas em câmara com lâmpada UV com comprimentos de onda de 254 e 365 nm e/ou vapor de iodo.

Após realização da CCD com as frações utilizando as fases móvel hexano/acetato de etila (AcOEt) ou clorofórmio/metanol, foram observados os sistemas de solventes que obtiveram melhor separação, prosseguindo com a realização das Cromatografias em Coluna (CC).

3.5.1.2 Fracionamento do extrato Hexânico de *Zanthoxylum caribaeum* (EHZC)

O extrato hexânico (20 g) foi submetido à cromatografia em coluna (CC) empregando-se gel de sílica 60H (0,063–0,200 mm)/(70-230 mesh) como suporte e como fase móvel uma mistura de hexano:AcOEt em grau crescente de polaridade (Figura 17).

Figura 17 - Coluna Cromatográfica do EHZC. a) visualização em UV a 365 nm, b) visualização em luz visível



Desta coluna principal foram recolhidas 175 frações hexânicas (EHZC), que foram reunidas posteriormente em 22 subfrações de acordo com perfil cromatográfico, após análise em cromatografia de camada delgada (CCD) reveladas em luz UV (254 e 365 nm) e iodo (Tabela 4). As frações dos extratos hexânico foram codificadas com as iniciais ZCH (fração hexânica).

Tabela 4 - Frações obtidas da CC principal do extrato hexânico

Código das frações	Frações reunidas	Massa (g)	
EHZC 1	1-2	0,149	
EHZC 3	3	0,028	
EHZC 4	4	-	
EHZC 5	5-7	0,151	
EHZC 8	8-11	0,162	
EHZC 12	12	-	
EHZC 13	13-23	0,002	
EHZC 24	24	2,004	
EHZC 30	30-34	0,511	Cristais
EHZC 35	35	0,599	
EHZC 36	36	0,483	Cristais
EHZC 37	37-38	0,085	
EHZC 39	39	0,192	
EHZC 40	40	0,125	
EHZC 41	41-70	0,452	
EHZC 71	71-74	-	
EHZC 75	75-100	0,021	
EHZC 101	101-109	0,136	
EHZC 110	110-160	-	
EHZC 161	161-165	0,002	
EHZC 167	167-168	0,014	
EHZC 169	169-175	0,252	

Após concentração das frações foi observado o aparecimento de cristais em EHZC30 e EHZC36. As frações foram submetidas separadamente a novos fracionamentos em CC, tendo como fase estacionária gel de sílica gel de sílica 60H (0,063–0,200 mm)/(70-230 mesh) e como fase móvel uma mistura de hexano:AcOEt em grau crescente de polaridade. Da fração EHZC30 foram obtidas 15 subfrações (FH30), que foram agrupadas em 6 subfrações após análise em

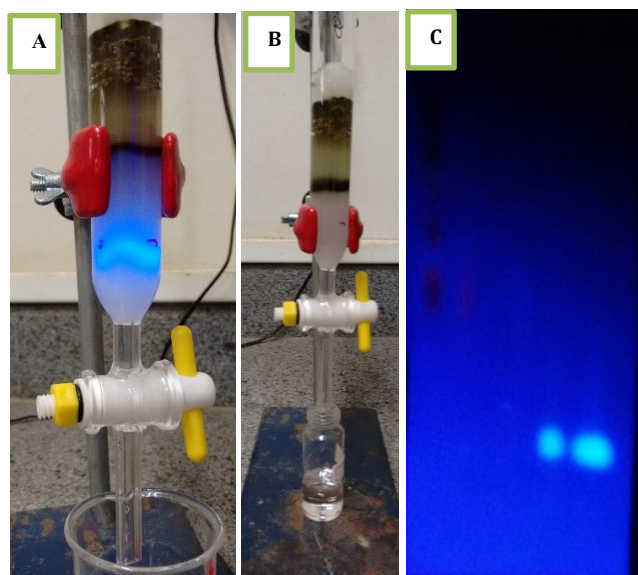
CCD reveladas em iodo (Tabela 5). A subfração FH30.1 apresentou precipitados em forma de cristais puros (6 mg).

Tabela 5 - Subfrações obtidas da CC de FH30 do extrato hexânico

Código das frações	Frações reunidas	Substância isolada	Massa (Mg)	Substância identificada
FH30.1	1-8	F30.1	6 mg	B sitosterol e estigmasterol
FH30.2	9	-		
FH30.3	10-12	-		
FH30.4	13	-		
FH30.5	14	-		
FH30.6	15	-		

Da fração EZCH36 foram recolhidas 28 subfrações que foram agrupadas em 13 subfrações (FH36) (Tabela 6) após análise em CCD reveladas em UV (254 e 365 nm) e iodo. A FH36.6 foi submetida a processo de purificação por recristalização, utilizando o solvente hexano a temperatura ambiente, retirando dessa forma as impurezas. As frações coletadas foram secas e analisadas por CCD utilizando o sistema de solventes, que incluíam misturas de hexano/acetato de etila. A revelação foi feita em câmara de UV (254 e 365 nm), além de vapor de iodo (Figura 18).

Figura 18 - Coluna Cromatográfica do FH36. a) visualização em UV a 365 nm, b) visualização em luz visível e c) Cromatografia de Camada Delgada revelada em UV 365 nm após purificação dos cristais



A fração FH36.6 foi encaminhada para o Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear – da Universidade Federal de Goiás para auxiliar na identificação da substância, através da obtenção dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e posterior análise. Os espectros de RMN foram obtidos em um espectrômetro BRUKER, modelo Avance III de 11,75 Tesla, (500 MHz para frequência do hidrogênio, utilizando o clorofórmio deuterado (CDCl₃)) como solventes para a FH36.6 e Tetrametilsilano (TMS) adicionado a amostra como referencial interno.

Tabela 6 - Subfrações obtidas da CC de FH36

Código das frações	Frações reunidas	Substância isolada	Massa Mg	Substância identificada
FH36.1	1-4			
FH36.2	5			
FH36.3	6			
FH36.4	7			
FH36.5	8-12			
FH36.6	13-15	FH36.6	15 mg*	Aurapteno
FH36.7	16-17			
FH36.8	18-19			
FH36.9	20			
FH36.10	21			
FH36.11	22-23			
FH36.12	24			
FH36.13	25-29			

*substância purificada

3.5.1.3 Fracionamento do Extrato clorofórmico de *Zantoxylum caribaeum* (ECZC)

O extrato clorofórmico (25g) foi submetido à cromatografia em coluna (CC) empregando-se gel de sílica 60H (0,063–0,200 mm) / (70-230 mesh) como suporte e como fase móvel uma mistura de Hexano:AcOEt e/ou AcOEt:metanol em combinações e com o aumento gradual da proporção do componente mais polar. Desta coluna principal foram recolhidas 165 frações, que foram reunidas posteriormente em 20 subfrações de acordo com perfil cromatográfico, após análise em cromatografia em camada delgada (CCD) reveladas em UV

(254 e 365 nm) e iodo (Tabela 7). As frações do extrato clorofórmico foram codificadas pelas iniciais FCZC (fração clorofórmio *Zanthoxylum caribaeum*).

Após concentração das frações foi observado o aparecimento de cristais em FCZC3 e FCZC19. Estes cristais foram submetidos a processo de purificação utilizando o solvente Hexano para retirada das impurezas. Posteriormente, a FCZC19 através do processo de recristalização foi dissolvida em metanol a quente e em seguida resfriado lentamente, obtendo de forma lenta a formação dos cristais agulhas e as impurezas retiradas na solução. As recristalizações foram sucessivas para obtenção de maior grau de pureza. A fração FCZC19 foi encaminhada para o laboratório Baiano de Ressonância Magnética Nuclear – LABAREMN obtendo os espectros de RMN ^1H e ^{13}C e correlações. Os espectros foram obtidos em um espectrômetro marca Varian, modelo Inova, operando a 500 MHz para frequência do ^1H e 125 MHz para ^{13}C , utilizando o clorofórmio deuterado (CDCl_3) e TMS adicionado a amostra como referencial interno. A fração após análises por comparação CCD e dos espectros tratava-se da mesma substância isolada da fração hexânica (FH36.6).

Tabela 7 - Frações obtidas da CC principal do extrato clorofórmico de *Zanthoxylum caribaeum* (FCZC)

Código das frações	Frações reunidas	Substância isolada	Massa Mg	Substância identificada
FCZC 1	1			
FCZC 2	2-7			
FCZC 8	8-9			
FCZC 10	10-13			
FCZC 14	14-18			
FCZC 19	19-30	FCZC19	30 mg	Sesamina
FCZC 31	31-35			
FCZC 36	36-39			
FCZC 40	40			
FCZC 41	41-48			
FCZC 49	49-56			
FCZC 57	57-75			
FCZC 76	76			
FCZC 81	81-87			
FCZC 88	88-96			
FCZC 118	118-129			
FCZC 130	130-132			
FCZC 133	133-148			
FCZC 149	149-160			
FCZC 161	161-166			

3.5.1.4 Fracionamento do extrato acetato de etila de *Z caribaeum* (EAZC)

O EAZC (5 g) foi submetido à cromatografia em coluna aberta (CC) empregando-se gel de sílica 60H (0,063–0,200 mm)/(70-230 mesh) como suporte e como fase móvel uma mistura de hexano:AcOEt em em combinações e com o aumento gradual da proporção do componente mais polar.

Desta coluna principal foram recolhidas 40 frações, que foram reunidas posteriormente em 13 subfrações de acordo com perfil cromatográfico, após análise em CCD, reveladas em UV (254 e 365 nm) e vapor de iodo (Tabela 8). As frações acetato de etila foram codificadas com as iniciais FAZC.

Esta fração foi submetida a CC utilizando solvente Hex/Acetato obtendo-se 16 subfrações. A fração FAZC37 apresentou precipitados em formatos de pó, e foram purificadas utilizando metanol. A fração FAZC37 foi encaminhada para o Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal de Goiás para obtenção dos espectros de RMN ¹H e ¹³C e correlações.

Tabela 8 - Frações obtidas da CC principal do extrato acetato de etila de *Z. caribaeum* (FAZC)

Código das frações	Frações reunidas	Massa (g)*	Substância isolada (mg)	Substância identificada
FAZC 4	1-4	0,065		
FAZC 5	5	0,144		
FAZC 6	6	0,110		
FAZC 11	7-11	0,079		
FAZC 14	12-14	0,147		
FAZC 18	15-18	0,333		
FAZC 20	19-20	0,307		
FAZC 21	21	0,398		
FAZC 26	22-26	1,309		
FAZC 33	27-33	4,584		
FAZC 37	34-37	2,624	FAZC37 (10 mg)	Hesperidina
FAZC 40	38-40	0,112		

*Massa obtida após coluna do extrato acetato de etila

As subfrações FAZC 21 e FAZC 33 foram submetidas a CLAE-DAD para quantificação e identificação das substâncias. A quantificação dos compostos identificados foi realizada por correlações com curvas de calibração com padrão externo. As curvas de calibração foram

construídas pela injeção em triplicata de soluções-padrão em cinco concentrações diferentes, cobrindo a faixa de concentração esperada nas amostras. Foram utilizadas as mesmas condições cromatográficas utilizadas anteriormente para determinação do perfil químico. No entanto, para a quantificação dos compostos identificados, foi definida as áreas dos picos no comprimento de onda em 280nm.

Para obtenção das amostras padrões, foram preparadas soluções estoques ($1,0 \text{ mg/mL}^{-1}$) dos compostos identificados. A partir dessa, foram obtidas 5 soluções em diferentes concentrações para construção da curva de calibração. A solução foi homogeneizada e filtrada em membrana de $0,45 \mu\text{m}$ (Millipore).

As soluções amostras de cada extrato (EAZC) foram preparadas na concentração de $5,0 \text{ mg/mL}^{-1}$ e dissolvidos na fase móvel orgânica. A solução da amostra foi filtrada através de cartucho de extração em fase sólida (SPE-C18 200mg/3ml - CleanertR) e posteriormente filtrada em filtro de $0,45 \mu\text{m}$ antes da injeção.

Contudo, os métodos analíticos desenvolvidos de separação, identificação e quantificação devem ser submetidos a validação no sentido de garantir a confiabilidade dos resultados. Para tanto, além de serem fundamentais para garantir a confiabilidade dos resultados na implementação do sistema de qualidade, a validação de métodos analíticos, é fundamentado por razões legais, técnicas e comerciais. Os órgãos como International Conference on Harmonization (ICH), International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), International Standard Organization (ISO), Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) dentre outros, exigem o item validação de métodos analíticos como um requisito fundamental no credenciamento para qualidade assegurada e demonstração de competência técnica (RIBANI, 2004).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) considera que a validação deve garantir, por meio de ensaios experimentais, que determinado método siga às exigências das aplicações analíticas de forma a assegurar a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2017). Portanto, são determinados alguns parâmetros de desempenho analítico na validação de métodos cromatográficos como: seletividade; linearidade; precisão; exatidão; faixa linear; robustez; limite de detecção e limite de quantificação. Estes parâmetros devem ser baseados na intenção do uso do método (RIBANI et al., 2004).

Neste sentido, o método analítico foi validado de acordo os guias da International Conference on Harmonization (ICH) (ICH, 1995A; ICH, 1995B). Dos quais foram utilizados

os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação.

- Seletividade

A seletividade do método foi determinada através da comparação dos cromatogramas dos padrões e das amostras, levando-se em consideração o tempo de retenção e pureza do pico em três diferentes pontos.

- Linearidade

A linearidade foi avaliada através do coeficiente de correlação (R^2) da curva analítica. As curvas de calibração foram construídas por injeções em triplicata de cinco soluções de diferentes concentrações dos padrões externos, que variaram entre 20 a 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ plotando-se os valores médios das áreas dos picos cromatográficos em função das concentrações. As soluções dos padrões foram dissolvidas na fase móvel orgânica.

- Precisão ou repetibilidade

A precisão foi determinada pelo ensaio de repetibilidade injetando 3 concentrações (baixa, média e alta) de soluções padrões em triplicata (foram fortificadas), contemplando a faixa linear do método, registrando-se os valores das áreas dos picos cromatográficos (SHEKARCHI et al, 2010). Sendo o resultado expresso como estimativa do desvio padrão relativo (DPR), apresentado na seguinte equação (RAI; PATIL; RAJPUT, 2009):

Equação 03: Cálculo do desvio padrão relativo

$$\text{DPR} = \frac{\text{DP}}{\text{CMD}} \times 100$$

Sendo que:

DP = desvio padrão;

CMD = concentração média determinada

- Exatidão

A exatidão foi determinada a partir de ensaio de recuperação do analito. Amostras da matriz isenta foram fortificadas por meio da adição de três concentrações conhecidas (alta, média e baixa) de cada solução padrão. As amostras fortificadas, juntamente com amostra de matriz isenta (branco), foram submetidas à injeção em CLAE-DAD em triplicata. A exatidão foi avaliada através de valores de concentração, determinados experimentalmente comparados à concentração teórica, como pode ser verificado na equação abaixo:

Equação 04: Equação para obtenção da exatidão

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100$$

- Limite de detecção e limite de quantificação

O Limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram calculados baseadas no desvio padrão e da inclinação da curva de calibração.

Equação 05: Equação para obtenção do Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

$$\text{LD} = \frac{\text{DPa} \times 3}{\text{IC}} \qquad \text{LQ} = \frac{\text{DPa} \times 10}{\text{IC}}$$

Sendo que:

DPa = desvio padrão obtido a partir da curva de calibração

IC = inclinação da curva de calibração.

3.5.2 Análise da composição química dos óleos essenciais de *Zanthoxylum caribaeum*

Os óleos essenciais (25 mg) foram previamente diluídos em 1 mL de diclorometano e um volume de 0,5 uL foi injetado. Todas as análises foram realizadas em triplicatas. A quantificação foi realizada por Cromatografia de Fase Gasosa acoplada a um Detector de Ionização em Chama (CG/DIC). Para a identificação dos constituintes foi utilizada a Cromatografia de Fase Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM).

Na análise por CG/DIC foi utilizado um Cromatógrafo Varian® CP-3380, equipado com DIC (Figura 19) e coluna capilar Chrompack CP-SIL 5 (30 m x 0.5 mm), espessura do filme 0.25 µm, temperatura do injetor 220 °C e do detector 240 °C, hélio como gás de arraste (1 mL.min⁻¹), split 1:50, com programa de temperatura do forno de: 60 a 240 °C (3 °C.min⁻¹), e isoterma de 240 °C por 20 min. Todas as análises foram realizadas em triplicata

Figura 19 - Cromatógrafo a Gás Varian®



FONTE: Autor (2017)

As análises por CG/EM (Figura 20) foram realizadas em Cromatógrafo Shimadzu® CG-2010 acoplado a Espectrômetro de Massas CG/MS-QP 2010 Shimadzu®, coluna capilar DB-5ms (30 m x 0.25 mm), espessura do filme 0.25 μm , temperatura do injetor 220 $^{\circ}\text{C}$, gás de arraste hélio (1 mL.min⁻¹), split 1:100, temperatura da interface e da fonte de ionização 240 $^{\circ}\text{C}$, energia de ionização 70 eV, corrente de ionização 0.7 kV e programa de temperatura semelhante à descrita acima.

Figura 20 - Cromatógrafo Shimadzu®



Fonte: Autor (2017).

A identificação dos constituintes foi realizada através do cálculo dos índices de Kovats, obtidos pela co-injeção da amostra com uma série homóloga de n-alcanos (C₈ a C₂₄), da

comparação dos espectros de massas com a biblioteca do equipamento e da consulta à literatura especializada (ADAMS, 2007). Já a quantificação do percentual relativo dos constituintes identificados foi obtida com base nas áreas dos picos cromatográficos correspondentes, pelo método da normalização.

3.6 Triagem virtual inversa (TVI)

3.6.1 Identificação de alvos moleculares

A triagem virtual foi realizada através de métodos baseados em ligantes e no alvo molecular. Desta forma, foram utilizados distintos servidores de predição das atividades biológicas, com intuito de classificar através de métodos diferentes de busca, as moléculas com melhor aproximação na predição de suas possíveis atividades. Os servidores utilizados para os métodos baseados em ligantes foram: ChemProt 2.0 (KJARULFF et al., 2013) e SEA (KEISER et al., 2007). Para o método baseado no receptor foi utilizado o servidor DRAR-CPI (LUO et al., 2011; YANG et al., 2009). As estruturas químicas das substâncias identificadas na triagem fitoquímica foram construídas no programa Marvin Sketch versão 16.8.15 (MARVIN v.16.8.15, ChemAxon; <https://www.chemaxon.com>).

Através do servidor ChemProt 2.0 foram utilizados os bancos de dados ChEMBL (versão 14) (GAULTON et al, 2012), BindingDB (LIU et al, 2007) e PubChem Bioassay (2012), DrugBank (versao 3.0) (KNOX et al, 2011), PharmGKB (McDONAGH et al, 2011), apenas compostos bioativos a partir de ensaios biológicos, visando proteínas humanas, e os bancos de dados de estruturas químicas: CTD (DAVIS et al, 2011) e do STITCH (KUHN et al, 2012).

O SEA utiliza o banco de dados *MDL Drug Data Report* (MDDR) composto por cerca de 65.000 ligantes complexados com alvos moleculares com atividade biológica comprovada. Os resultados foram ordenados de acordo com o grau de similaridade (*Similarity Ensemble Approach*) entre o composto avaliado e aqueles depositados no SEA, através da análise do coeficiente de Tanimoto (KEISER et al. 2007).

Para os servidores baseados em ligantes, as estruturas foram selecionadas levando-se em consideração uma medida de similaridade (Coeficiente de Tanimoto - CT), sendo selecionados ligantes com $0,99 > CT \geq 0,70$. Com o objetivo de identificar novos alvos moleculares para os compostos avaliados, os resultados que apresentaram CT=1 foram descartados, pois esse valor

indica que a molécula de consulta foi testada para aquele alvo. Para a seleção dos alvos potenciais nos servidores ChemProt 2.0 e SEA, também foi considerada a bioatividade de cada molécula similar. Dessa forma, foram selecionados compostos bioativos que apresentam similaridade aos metabólitos identificados e cujo valores de K_i e IC_{50} sejam inferiores a 1000 μM .

O servidor DRAR-CPI apresenta 385 modelos estruturais de proteínas humanas e 254 descrições de formas ativas de micromoléculas, indicações e reações adversas a medicamentos. Este servidor utiliza função de transformação para converter a pontuação de acoplamento molecular em Z' -scores, aumentando desta forma a precisão. Portanto, se Z' -score for inferior a -0,5 a molécula tende a interagir com a proteína (WISHART et al, 2008; YANG et al, 2011). Neste sentido, para o servidor DRAR-CPI foi selecionado apenas um alvo com melhor resultado de Z' -score para cada molécula obtida. Pontuações de acoplamento ≥ 0 foram tratados com valores perdidos.

3.6.2 Estudos de acoplamento molecular com os alvos biológicos identificados

Com o objetivo de avaliar a energia de afinidade entre os compostos e os alvos moleculares, bem como identificar as interações intermoleculares formadas.

A obtenção da estrutura 3D dos alvos biológicos selecionados foi através do *Protein Data Bank* (PDB) (BERMAN et al., 2000). A seleção dos alvos disponíveis no PDB foi realizada com base nos seguintes parâmetros: a) melhor valor de resolução (Å), b) organismo de origem humana e c) presença de um ligante co-cristalizado. O acoplamento molecular foi realizado no programa DOCK6.8 e acessórios (ALLEN et al., 2017).

O alvo molecular foi preparado no programa UCSF Chimera 1.9.8 (PETTERSEN et al., 2004), retirando-se as moléculas de águas e outros artefatos de cristalização, assim como, foram adicionados hidrogênios polares e carga Gasteiger (campo de força Amberff12SB). Os ligantes submetidos ao acoplamento molecular foram preparados através da mesma rotina.

A delimitação do espaço de acoplamento molecular foi realizada inicialmente através do cálculo da superfície molecular de acesso ao solvente do receptor pelo programa DMS (FERRIN et al., 1988) na interface do Chimera 1.9.8. A imagem negativa da superfície molecular do sítio ortostérico foi calculada pelo programa SPHGEN, o arquivo resultado foi editado no programa SPHERE_SELECTOR, com o intuito de gerar um cluster de esferas a 8 Å do ligante cristalográfico (KUNTZ et al., 1982). O Docking Grid foi calculado em duas

etapas. Inicialmente uma caixa foi construída ao redor do sítio ortostérico com o programa SHOWBOX, seguindo um protocolo margem dependente. Por fim, o grid foi calculado com o programa acessório GRID utilizando Grid Spacing 0.4 Å, 9.9 Å de distância de cutoff e expoente de van der Waals 6-12. Para a pontuação das moléculas foi utilizada a função padrão do DOCK 6.8 (Grid Score) (MENG; SHOICHET; KUNTZ, 1992).

Para validação da rotina de acoplamento molecular, foi empregado a avaliação do reposicionamento espacial do ligante cristalográfico após o acoplamento molecular. Espera-se sucesso no re-acoplamento molecular quando o *root-mean-square deviation* (desvio médio quadrático- RMSD) for inferior a 2,0 Å (WONG, 2008).

A análise do perfil de interação intermoleculares foi realizado por meio da submissão do arquivo de acoplamento da molécula de consulta e seu correspondente alvo no servidor *Protein-Ligand Interaction Profiler* (PLIP). O serviço web PLIP é uma ferramenta que possibilita a detecção de padrões de interação proteína-ligante por meio de estruturas 3D, seja diretamente através do PDB ou em estruturas disponibilizadas pelo usuário. Para cada sítio de ligação os resultados são fornecidos como diagramas de interação em 3D (*on-line* em JSmol e *offline* com PyMOL), como também, arquivos XML são gerados para posterior processamento (SALENTIN et al, 2015).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudo químico

4.1.1 Triagem fitoquímica

A análise das reações de caracterização fitoquímica dos extratos EBZC, EHZC, ECZC e EAZC ocorreu pelas reações colorimétricas, formação de precipitados e espuma persistente. Desta forma, a triagem fitoquímica sugeriu a presença de diferentes grupos de metabólitos secundários presentes nos extratos como fenóis, taninos, flavonoides, cumarinas, alcaloides, esteroides/triterpenos, e indícios de saponinas, assim como, sugeriu a ausência de antraquinonas podendo ser observado na Tabela 9. A reação negativa para as antraquinonas são indicativos da ausência ou baixo teor desses metabólitos nos extratos avaliados.

Tabela 9 – Triagem fitoquímica no extrato bruto de *Zanthoxylum caribaeum* Lam

CLASSES DE METABOLITOS	REAGENTES	EBZC	EHZC	ECZC	EAZC	REAÇÃO OBSERVADA
Alcaloides	Dragendorff	+	-	+	+	Formação de precipitados
	Mayer	+	-	+	+	
Taninos	Cloreto Férrico	+	-	+	+	Coloração verde intensa
	Acetato de chumbo	+	+	+	+	Formação de precipitados
	Acetato de cobre		+	+	+	
Saponinas	Índice de espuma	-	-	-	+	Formação de espuma persistente
Cumarinas	KOH	+	+	+	+	Fluorescência azul
Flavonoides	Reação Shinoda	+	+	+	+	Mudança de coloração avermelhada
Esteroides/ Triterpenos	Lieberman-Buchard	+	+	+	+	Formação do anel e mudança de coloração para verde
Antraquinonas	Borntraeger	-	-	-	-	Não houve mudança de coloração avermelhada

Presença/ausência das classes de metabólitos secundários: (-) reação negativa; (+) reação positiva

4.1.2 Determinação do perfil químico por CLAE-DAD (*fingerprint*)

Através de análises cromatográficas é possível determinar o perfil químico (*fingerprint*) em determinados extratos, e caracterizá-los em um único cromatograma. Para isto, são utilizadas diversas técnicas de análise para obtenção de *fingerprint*, altamente recomendadas e embasadas na literatura, tais como: a CCD, CLAE, CG, Cromatografia em Contra Corrente e Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (RMN de ^1H), dentre outras. Destas a CLAE é a mais utilizada para este tipo de caracterização (HONG-LAN et al.,2010; TANG et al., 2010).

Para a determinação do perfil cromatográfico de cada extrato, a aquisição dos cromatogramas foi realizada em diferentes comprimentos de onda entre 220-600 nm, obtendo-se desta forma, o melhor comprimento de onda levando-se em consideração o melhor sinal e número de picos avaliados em cada extrato. Através das análises dos cromatogramas os extratos EBZC, ECZC e EAZC apresentaram melhor resolução em 280 nm, entretanto o EHZC apresentou melhor resolução no comprimento de onda em 250 nm. Os cromatogramas nos diferentes comprimentos de onda podem ser observados nas Figuras 21,22,23 e 24.

Figura 21 - Cromatograma em diferentes comprimentos de onda do EBZC

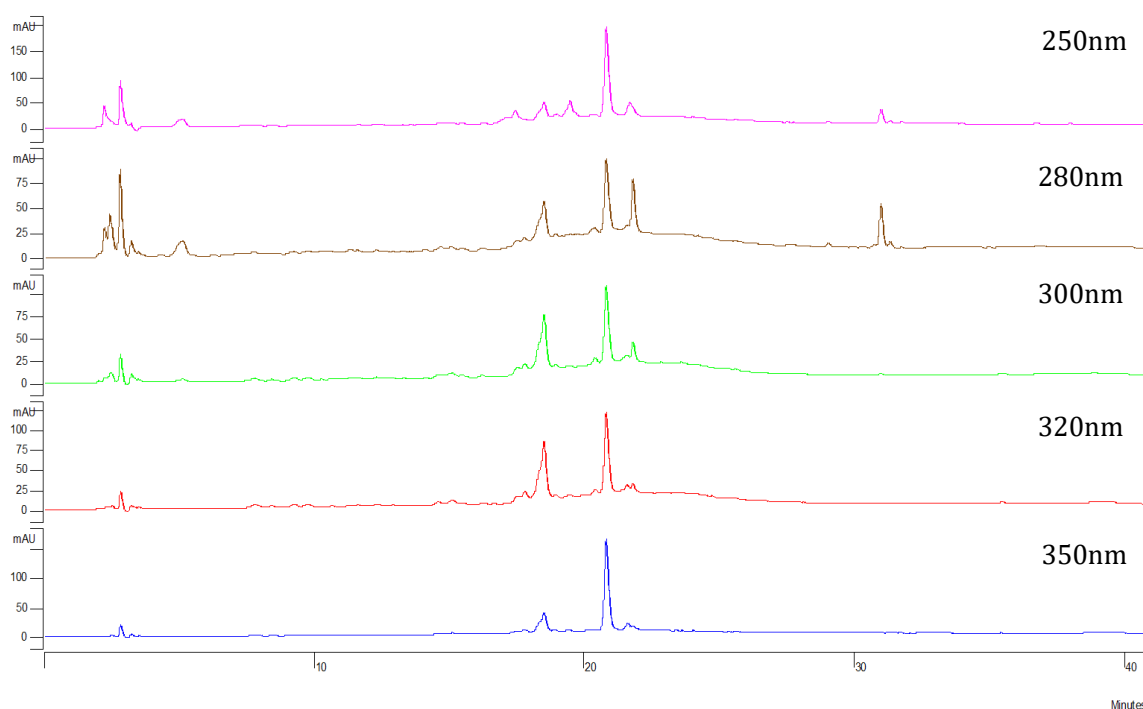


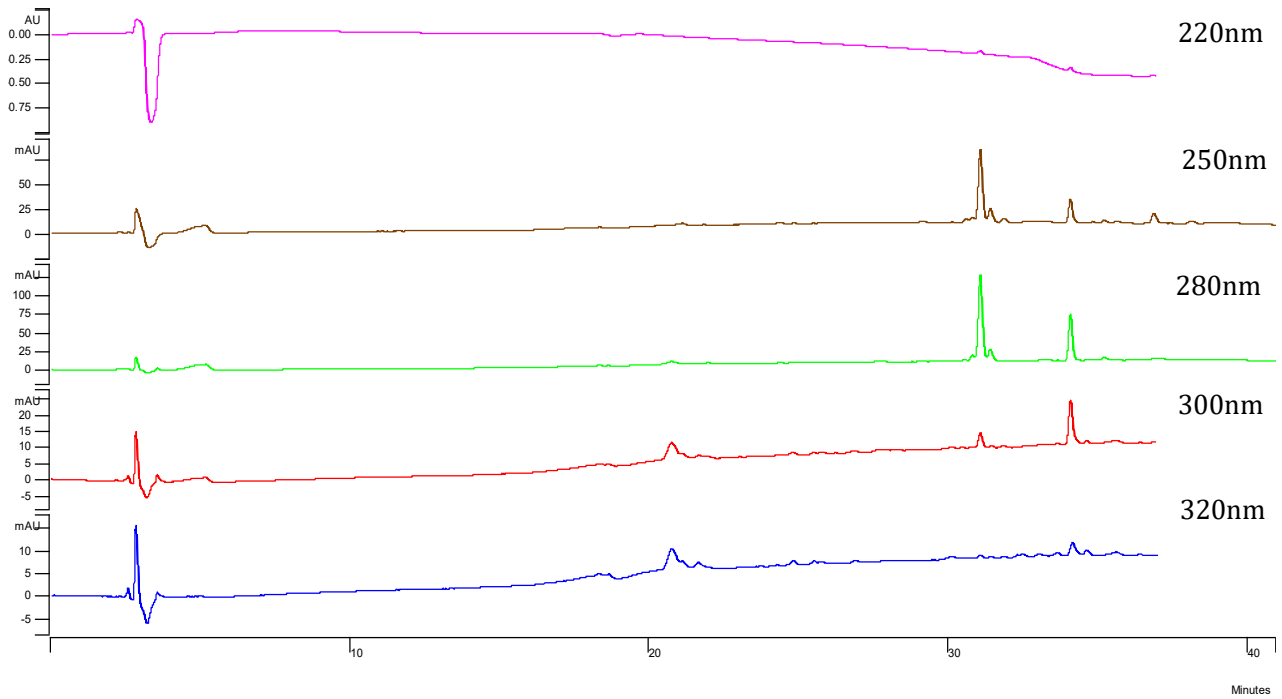
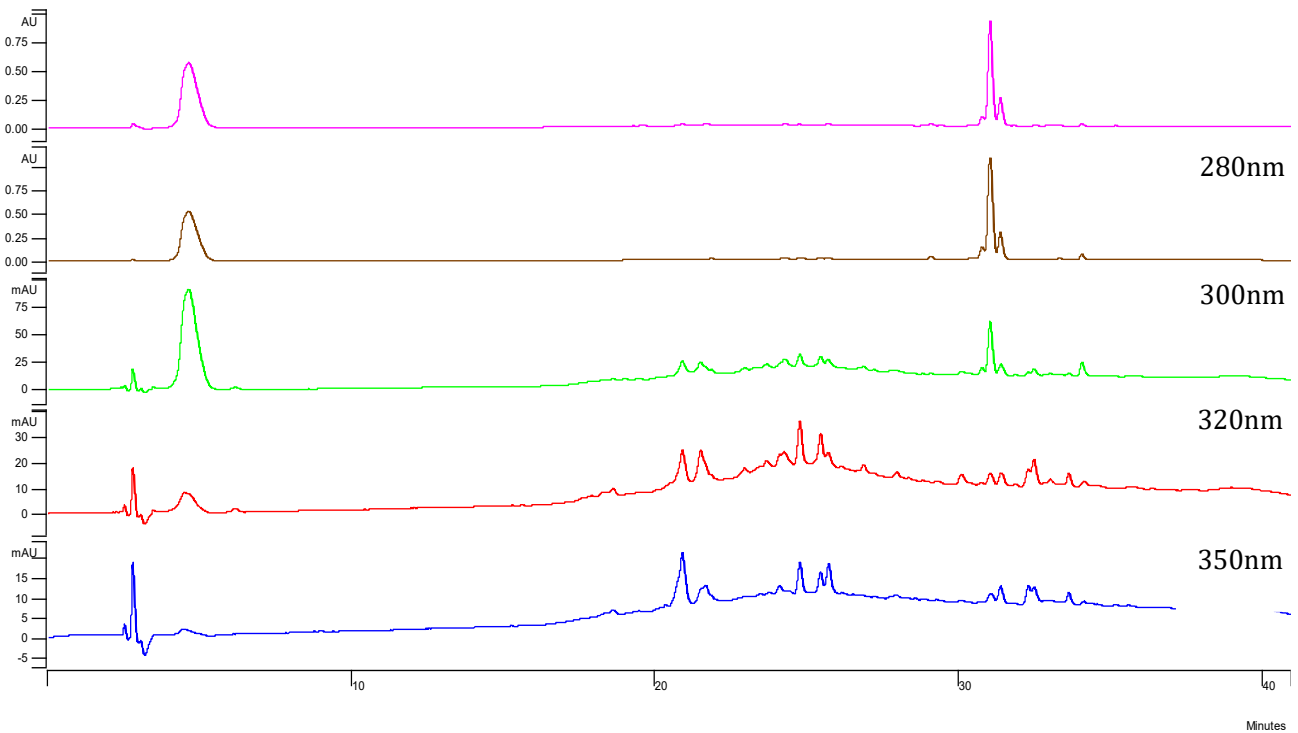
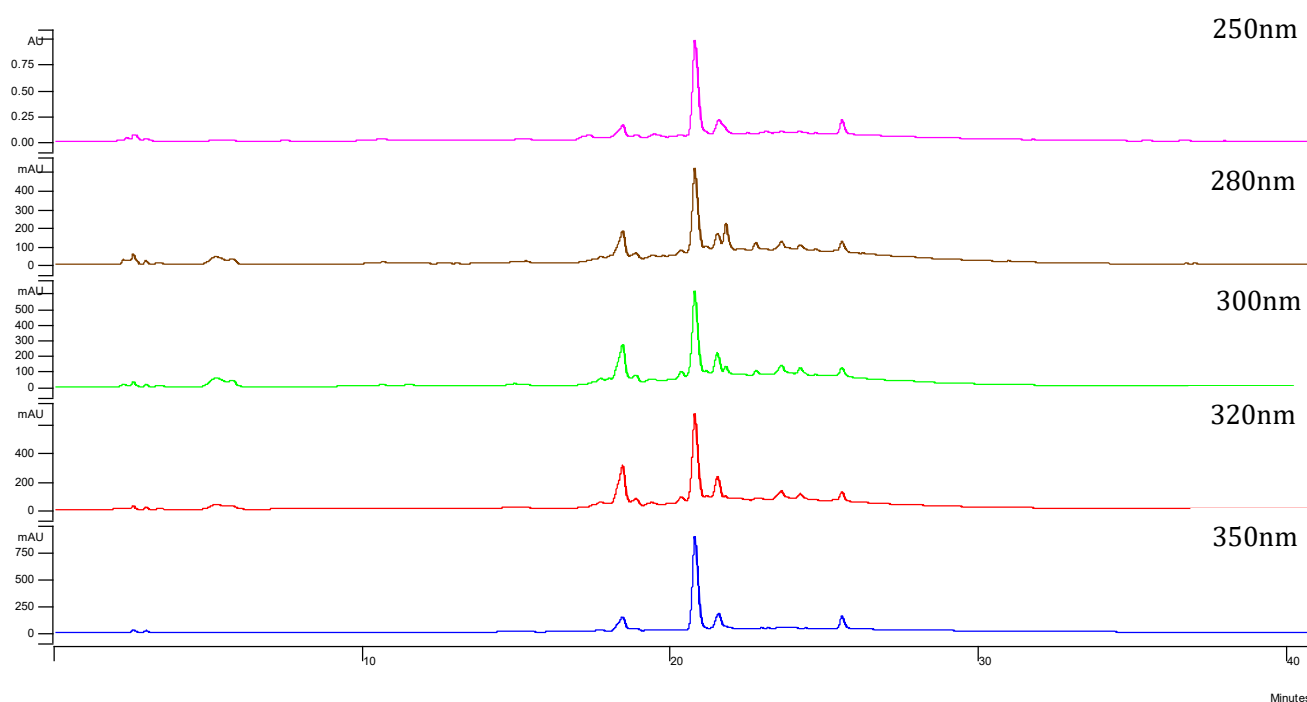
Figura 22 - Cromatograma em diferentes comprimentos de onda do EHZC**Figura 23** - Cromatograma em diferentes comprimentos de onda do ECZC

Figura 24 - Cromatograma em diferentes comprimentos de onda do EAZC



4.1.3 Validação e quantificação dos compostos identificados por CLAE-DAD

O método de análise foi baseado no procedimento descrito por Cichová et al., (2008), tendo em conta o objetivo proposto e os resultados obtidos durante a otimização das condições cromatográficas. O método foi otimizado envolvendo vários estágios, como preparo da amostra, separação cromatográfica e quantificação. Neste sentido, parâmetros foram estabelecidos como os sistemas de eluição, verificando a condição gradiente mais adequada, a coluna cromatográfica e o comprimento de onda, de forma a obter melhor resolução dos picos das amostras e padrões utilizados.

A validação do método analítico é essencial, pois tem como objetivo demonstrar que o método é adequado para a finalidade pretendida e assegurar que sejam exatos, precisos e específicos os resultados. Para isto, é necessário que o método atenda as exigências das aplicações analíticas preconizada pelos órgãos nacionais e internacionais e da literatura especializada como o ICH - Q2 (R1), Farmacopeia Americana (USP 35), Anvisa, por meio da RDC N° 166, DE 24 DE JULHO DE 2017 (BRASIL, 2017), o INMETRO (2016) dentre outros (RIBANI, 2004).

Sendo assim, os parâmetros de desempenho analítico utilizados para validação do método utilizado neste estudo incluem: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação.

A análise qualitativa das frações acetato de etila (FAZC21; FAZC33) possibilitou a identificação de compostos fenólicos por meio da comparação dos tempos de retenção (TR) e dos espectros de absorvância dos picos obtidos da amostra com os dos padrões. Foram identificadas as substâncias; ácido *trans*-ferúlico, ácido caféico e rutina (Figura 25). Portanto, foi realizada a validação da metodologia para as substâncias identificadas. Os cromatogramas dos padrões e extratos analisados podem ser vistos na Figura 26.

Figura 25 - Substâncias identificadas por CLAE-DAD nas frações FAZC21; FAZC33. a) ácido *trans*-ferúlico, b) ácido caféico e c) rutina

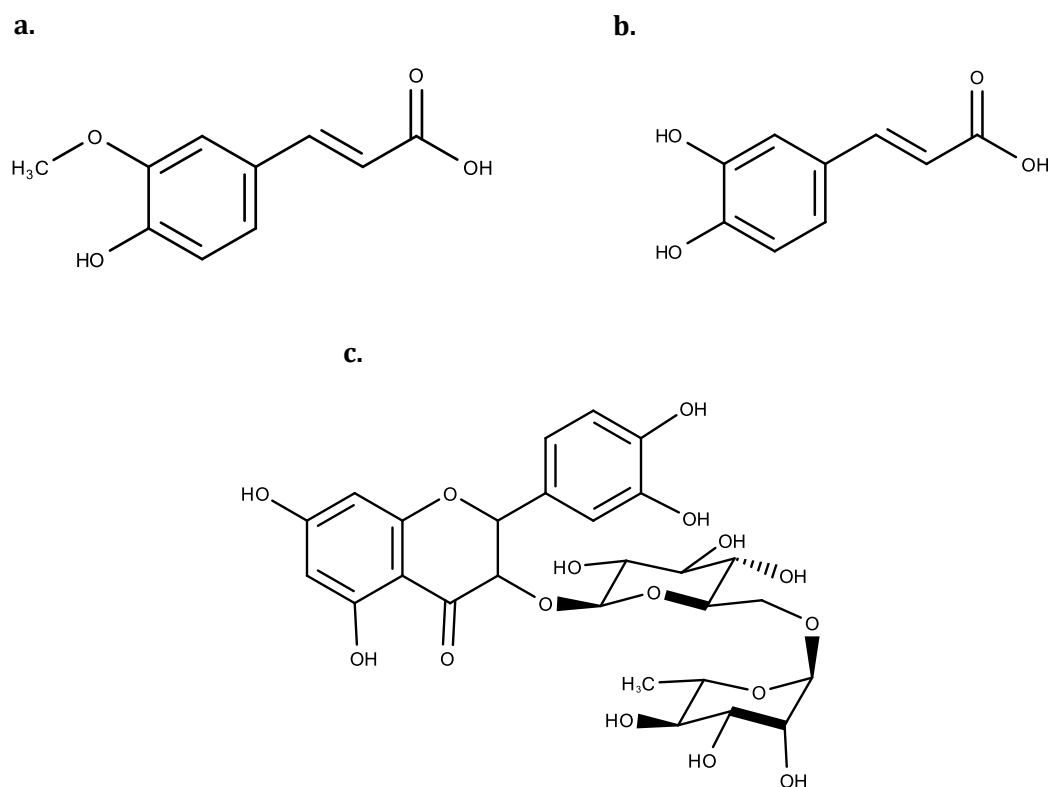
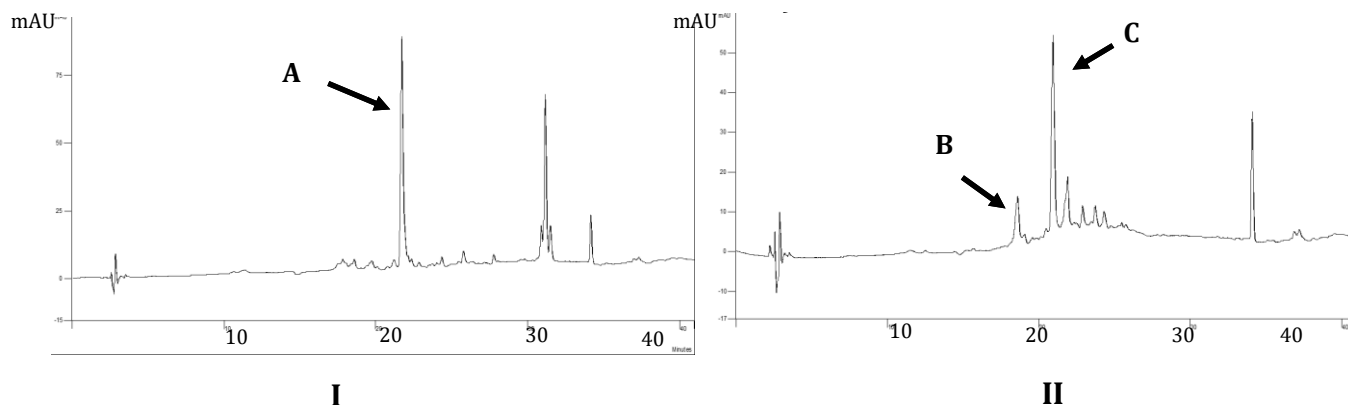


Figura 26 - Cromatogramas a 280 nm das frações do extrato acetato de etila das folhas de *Zanthoxylum caribaeum* e dos padrões analisados por CLAE-DAD. Cromatograma I – FAZC33; Cromatograma II – FAZC21. A) ácido trans-ferulico, B) ácido cafeico, C) rutina



A seletividade do método foi avaliada através da comparação dos espectros do pico obtido na separação da amostra com o do padrão. Os espectros de UV das amostras e padrões podem ser vistos na Figura 27.

A linearidade do método foi determinada por meio da construção de curvas analítica de ácido cafeico, rutina e ácido trans-férulico (concentração *versus* área do pico) (figura 27). O método mostrou ser linear com concentrações na faixa de 20 a 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sendo que a equação e o coeficiente de correlação (r^2) obtidos podem ser verificados na Figura 24. Os dados das curvas analíticas estão representados na Tabela 11. De acordo a Anvisa, (2017) o coeficiente de correlação linear deve ser igual ou superior a 0,99. Portanto, os valores de r^2 obtido na análise das substâncias pelo método CLAE-UV desenvolvido, estão de acordo aos limites estabelecidos, o que permite uma estimativa da qualidade da curva obtida.

Figura 27 - Comparação dos espectros de UV das amostras e dos padrões. **Ia** - pico A da fração FAC21. **Ib** – pico padrão ácido cafeico. **IIa** – pico B da fração FAC33. **IIb** - pico padrão ácido trans-ferulico. **IIIa** – pico C da fração FAC33; **IIIb** - pico padrão rutina

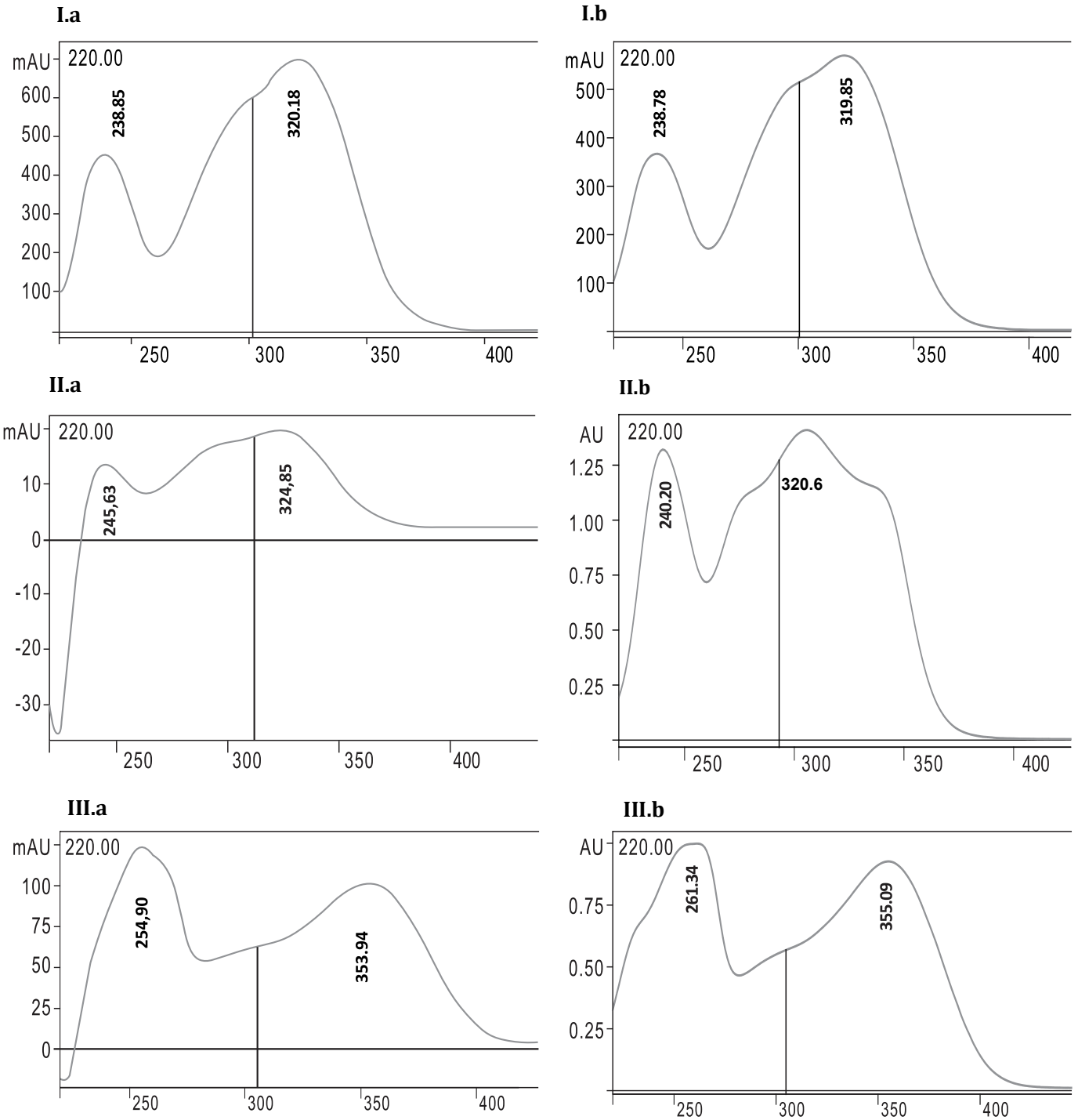
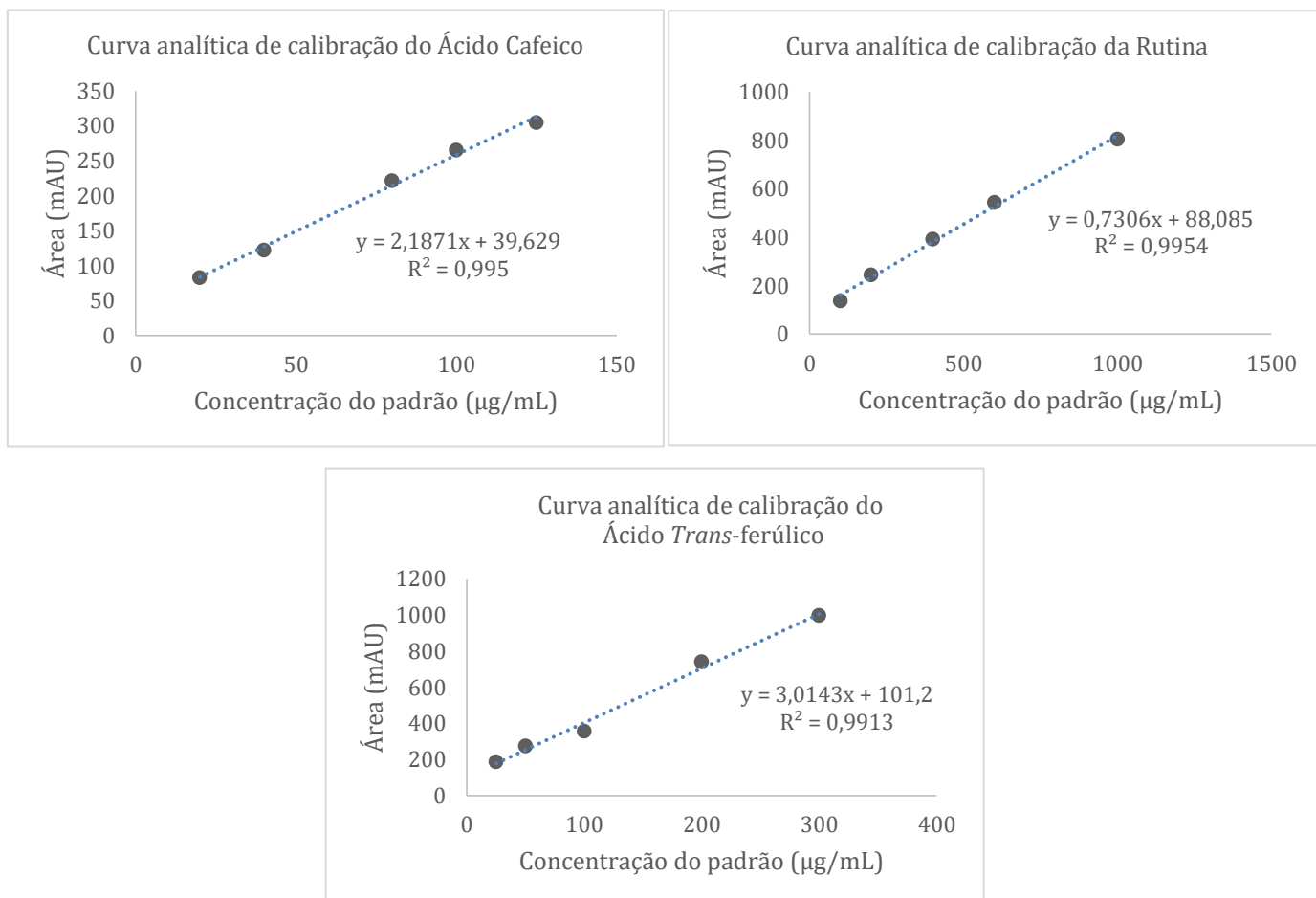


Figura 28 - Curvas de calibração dos padrões das substâncias identificadas

Na determinação do limite de quantificação (LQ) os resultados encontrados variaram entre 1,77 a 4,83 $\mu\text{g mL}^{-1}$ entre as substâncias. Para o limite de detecção (LD) o valor encontrado variou entre de 0,54 a 1,45 $\mu\text{g mL}^{-1}$, mostrando desta forma que os resultados obtidos apresentam boa sensibilidade do método proposto (Tabela 10).

Tabela 10 - Dados da regressão linear, limite de detecção e limite de quantificação das substâncias identificadas

Substâncias	Equação da reta	r (n=5)	LD ($\mu\text{g/mL}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g/mL}^{-1}$)
Ácido cafeico	$y = 2,1871x + 39,62$	0,995	0,54	1,77
Rutina	$y = 0,7306x + 88,08$	0,9954	1,45	4,83
Ácido trans-férulico	$y = 3,0143x + 101,2$	0,9913	0,57	1,91

*y= área do pico. x= concentração injetada

Os resultados da precisão, obtidos para o método proposto, foram determinados pelo Desvio Padrão relativo (DPR) e podem ser visualizados na tabela 11. Observa-se com os valores de DPR, que o método, além de apresentar resultados de acordo aos limites preconizados pela legislação vigente, também apresentou baixos DPR (inferiores a 5%), indicando o elevado nível de precisão do método (BRASIL, 2017).

Tabela 11 – Cálculo DPR para as amostras

Substância	Concentração ($\mu\text{g/mL}^{-1}$)	Média \pm DPa * (mAU)	DPR%
Ácido cafeico	80	221,33 \pm 1,15	0,52
	40	122,33 \pm 2,51	2,05
	20	84,76 \pm 0,40	0,48
Ácido trans-férulico	200	738,66 \pm 2,08	0,28
	50	270,33 \pm 0,57	0,20
	25	183,33 \pm 4,16	2,27
Rutina	600	543 \pm 8,48	1,56
	400	392 \pm 4,24	1,08
	200	243,5 \pm 0,35	0,14

*Os valores foram a média \pm desvio padrão de 3 injeções

O teste de exatidão avaliou a porcentagem de recuperação obtida em 3 concentrações diferentes das substâncias identificadas. A recuperação variou entre 80,85 a 112,79%, como pode ser observado na Tabela 12, os valores encontram-se dentro da faixa preconizada na literatura (70 a 120%) segundo Ribani et al., (2004).

Tabela 12 - Taxa de recuperação para determinação da exatidão

Substância	Concentração ($\mu\text{g/mL}^{-1}$)	Recuperação (n=3) %	Média %
Ácido cafeico	125	112,79	96,48
	40	94,35	
	20	82,31	
Ácido trans-ferulico	200	87,88	90,93
	100	95,47	
	50	89,44	
Rutina	800	94,59	91,65
	600	80,85	
	200	99,51	

As concentrações das substâncias identificadas foram calculadas a partir da curva de calibração. Os resultados encontram-se apresentados na Tabela 13, mostrando variação das substâncias encontradas.

Tabela 13 - Conteúdo das substâncias em frações do extrato acetato de etila de *Z caribaeum*

Substâncias	Concentração ($\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$)	
	FAZC21	FAZC33
Ácido cafeico	28,82 \pm 0,69	-
Ácido trans-férulico	-	140,92 \pm 1,32
Rutina	-	566,54 \pm 1,58

Os resultados obtidos através das análises dos extratos por CLAE- DAD corroboram a triagem fitoquímica, na qual foi possível observar a presença de uma variedade de compostos fenólicos. Entretanto, não foi possível evidenciar todas as classes de metabólitos indicados nos testes de prospecção fitoquímica devido as limitações do método utilizado. Sendo que, a utilização de detectores de DAD permite a detecção de compostos que apresentem grupos cromóforos sendo este, muito utilizado na determinação de compostos fenólicos.

Em estudos de triagem fitoquímica realizados com extrato metanólico das folhas de *Zanthoxylum caribaeum* revelaram a presença de esteroides livres, triterpenoides pentacíclicos, flavonoides, flavonas, flavanois e xantonas (SOUZA et al., 2017), corroborando parcialmente com os resultados encontrados neste estudo, como foi verificado também a presença de taninos, cumarinas e alcaloides nos extratos de *Z. caribaeum*. Assim como, outros estudos determina a composição química do óleo das folhas desta espécie (NOGUEIRA et al., 2014) e ainda estudos realizados por Pichardo e colaboradores (2014), verificaram a presença de metabólitos primários tais como aminoácidos e ácidos graxos, bem como os metabólitos secundários como alcaloides e compostos fenólicos em extratos aquosos das raízes, cascas e caules de *Z. caribaeum*.

Entretanto, vale ressaltar que variações no perfil dos metabólitos secundários podem estar relacionados a diversos fatores, como desenvolvimento, sazonalidade; índice pluviométrico; temperatura, altitude, presença de nutrientes, incidência da luz solar, ataques de patógenos, dentre outros (GOBBO NETO; LOPEZ, 2007).

A determinação do teor de compostos fenólicos e flavonoides e identificação das análises dos espectros de UV no método de CLAE- DAD de *Z. caribaeum* corroboram aos

estudos realizados na espécie *Zanthoxylum bungeanum*, onde foram identificados diversos ácidos fenólicos, e flavonoides, tais como; xantiletina, sesamina, quercetrina, quercetina, rutina, kaempferol-3-ramnosídeo, ácido clorogênico e hiperosídeo (ZHANG et al., 2014), demonstrando a variedade de compostos fenólicos presentes em extratos de folhas de espécies do gênero *Zanthoxylum*.

Diversos estudos têm associado a presença de compostos fenólicos a efeitos biológicos potenciais, tais como atividades antioxidantes, anti-inflamatório, antibacteriano dentre outros (TUKUN et al., 2014).

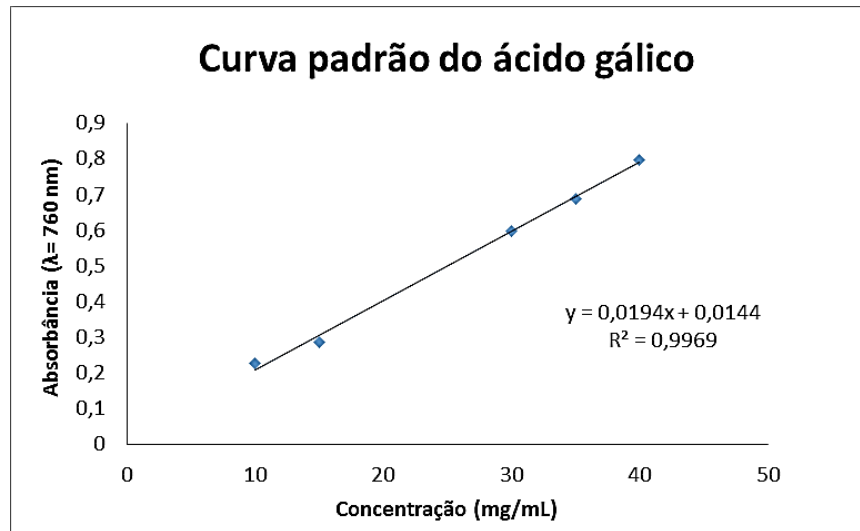
Em estudo realizado com a espécie *Zanthoxylum caribaeum* Lam observou-se que os extratos das folhas desta espécie apresentam atividades antioxidante e citotóxica frente ao teste de letalidade contra *Artemia salina* Leach. Sendo que, a atividade antioxidante pode estar correlacionada a presença dos componentes encontrados no perfil fitoquímico realizado neste estudo (ANDRADE, 2014).

Em outros estudos com espécies do gênero *Zanthoxylum* foram determinados a presença de uma variedade de compostos químicos nos extratos das raízes, caules e folhas; como fenóis, flavonoides, cumarinas, taninos, cumarinas, lignanas, ligninas, alcaloides, esteroides e triterpenos (MOCELLINE et al., 2009; ZANON, 2010; GONZAGA et al., 2003; WEBER, 2005; FACUNDO et al, 2005), o que pode ser observado também neste estudo, a variedade de metabólitos presentes no extrato da espécie *Zanthoxylum caribaeum*

4.1.4 Determinação do teor de fenóis e flavonoides dos extratos

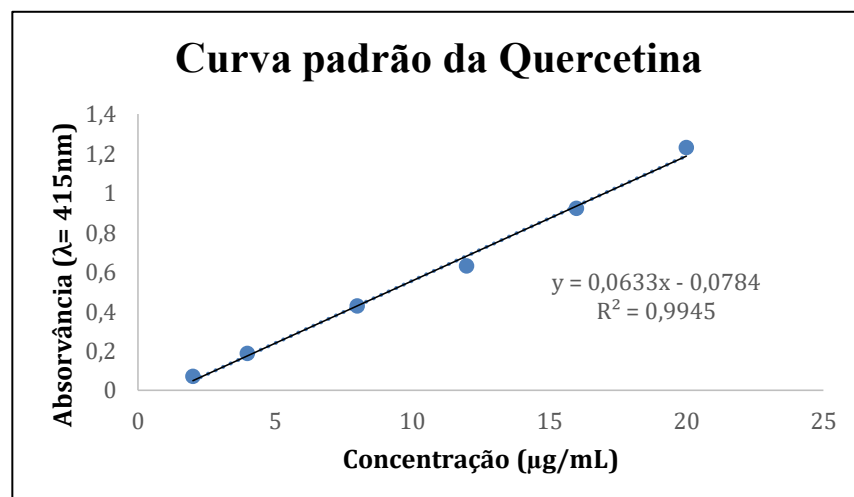
O teor de fenólicos totais foi calculado com base na equação obtida através da curva padrão de ácido gálico (Figura 29). O conteúdo de fenólicos totais obtidos pelo método de Folin Ciocalteu, expressos em g de AGE/100g de extrato, foi de $31,99 \pm 0,03$ g/100g de EBZC. Já para os extratos EHZC, ECZC e EAZC os valores obtidos foram $16,18 \pm 0,04$ g/100g, $45,06 \pm 0,04$ g/100g e $35,08 \pm 0,03$ g/100g, respectivamente. Observa-se que o teor de fenólicos no extrato clorofórmico apresentou maior concentração, seguido do extrato acetato de etila e extrato bruto.

Figura 29 - Curva-padrão Ácido gálico



O teor de flavonoides totais, por sua vez, foi calculado com base na equação obtida através da curva padrão da quercetina (Figura 30). Na quantificação de flavonoides totais, foram obtidos os valores, expressos em g de QE/100g de extrato, para EBZC e EAZC, os extratos EHZC e ECZC não apresentaram quantidades suficientes para serem detectados pela técnica utilizada. Desta forma, os resultados obtidos foram $0,99 \pm 0,03$ g/100g de extrato no EAZC e $0,34 \pm 0,02$ /100g de EBZC ($340 \text{ g} \pm 0,02$ / g do extrato)

Figura 30 - Curva-padrão Quercetina



O teor de fenólicos totais apresentaram resultados superiores aos encontrados com outras espécies da família. O extrato bruto de *Z. syncarpum* Tull., apresentou como teor de fenóis totais, 166,74 mg de ácido gálico/g de extrato, demonstrando baixo teor de fenóis totais comparando com os obtidos para o EBZC (319,9 mg de ácido gálico/ g de extrato) (SILVA et al., 2014), assim como, estudos realizados com as espécie *Zanthoxylum rhetsa* DC (6,01 ± 0,04 mg/g) (TUKUN et al., 2014), *Zanthoxylum alatum* (Extrato clorofórmio 0,74 mg/g, acetato de etila 4,36; extrato metanólico 1,64 mg/g e Extrato éter de petróleo 5,12 mg/g) (MUKHIJA & KALIA, 2014) apresentaram baixo teor de fenóis totais. Contudo, em estudos realizados por HWANG; PAK, (2009), com a espécie *Z. planispinum* (391 mg ácido gálico/g de extrato bruto) apresentou valores maiores que o encontrado neste estudo.

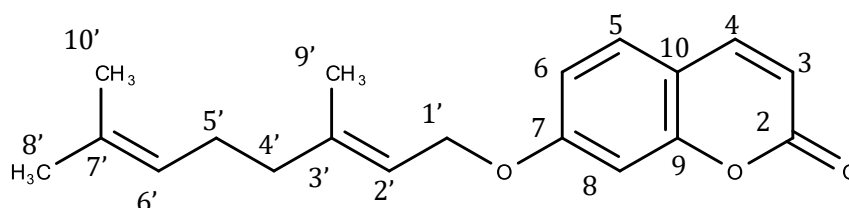
Quanto à avaliação do teor de flavonoides totais o extrato bruto de *Z. planispinum* apresentou resultado maior que o extrato bruto de *Z. caribaeum* (187 mg QE/g de extrato) (HWANG; PAK, 2009). Os resultados obtidos com esses testes complementam os resultados do perfil fitoquímico obtido com CLAE-DAD, onde foi possível observar a presença de vários compostos fenólicos e flavonoídicos nos extratos. No entanto, não foi possível determinar o teor de flavonoides totais nos extratos hexânico e clorofórmico, o que pode estar relacionado à ausência dessa classe química nos extratos ou devido a presença de flavonoides não hidroxilados. Isso demonstra a limitação do método de flavonoides totais, por ser baseado na complexação dos íons alumínio, que ocorre em locais específicos como na presença de hidroxilas.

4.2 Substâncias isoladas e elucidação estrutural

4.2.1 Substância isolada do extrato hexânico de *Z caribaeum* (EHZC36)

A fração hexânica após processo de separação fitoquímica por cromatografia em coluna (CC) possibilitou o isolamento da substância FH36.6 como sólido cristalino em forma de agulhas. A substância foi identificada através da análise dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C e comparação com dados em literatura (SILVA, DETONI, VELOZO, 2008; FELICIANO et al., 2008).

Avaliando os dados espectrais, juntamente com os dados em literatura foi possível concluir que a substância trata-se do aurapteno (7-geraniloxicumarina), um composto cumarínico de fórmula molecular $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_3$, e massa molecular (MM) de 298 Da (Figura 31).

Figura 31 - Estrutura da substância EHZC36 (aurapteno)

A análise de seus espectros de RMN de ^1H permitiu inferir tratar-se de um anel cumarinico C-7 substituído (Figuras 32 e 33) dado a observação do conjunto de sinais com deslocamento químico entre 6,00 - 8,00 ppm. Os sinais em $\delta_{\text{H-3}}$ 6,23 ppm (1H, *d*, $J=9,5$ Hz) e $\delta_{\text{H-4}}$ 7,62 ppm (1H, *d*, $J=9,5$ Hz) referentes aos hidrogênios da ligação dupla endocíclica e a presença de três sinais característicos do anel aromático em $\delta_{\text{H-5}}$ 7,35 (1H, *d*, $J=9$ Hz), $\delta_{\text{H-6}}$ 6,86 (1H, *dd*, $J=9$ e 2,5 Hz) e $\delta_{\text{H-8}}$ 6,81 (1H, *d*, $J=2,5$ Hz). Os demais sinais de hidrogênio correspondem à unidade prenilada (Figuras 34 e 35), apresentando o dubleto em δ 4,60 (2H, *d*, $J=6,5$ Hz), referente ao H-1' do carbono metilênico ligado ao oxigênio em C-7, além de sinais de H-2' δ 5,45 (1H, *t*, $J=6,5$ Hz) correspondente a hidrogênio metínico, olefínico adjacente e sinais em H-9' δ 1,75 (3H, *s*) a hidrogênios metílicos. Os sinais em δ 2,13 (4H, *m*) correspondem aos H-4' e H-5'. O $\delta_{\text{H-6'}}$ 5,08 (1H, *m*) a hidrogênio metínico, olefínico adjacente, enquanto que o $\delta_{\text{H-8'}}$ 1,60 (3H, *s*) e $\delta_{\text{H-10'}}$ 1,66 (3H, *s*) foram atribuídos a hidrogênios metílicos geminais.

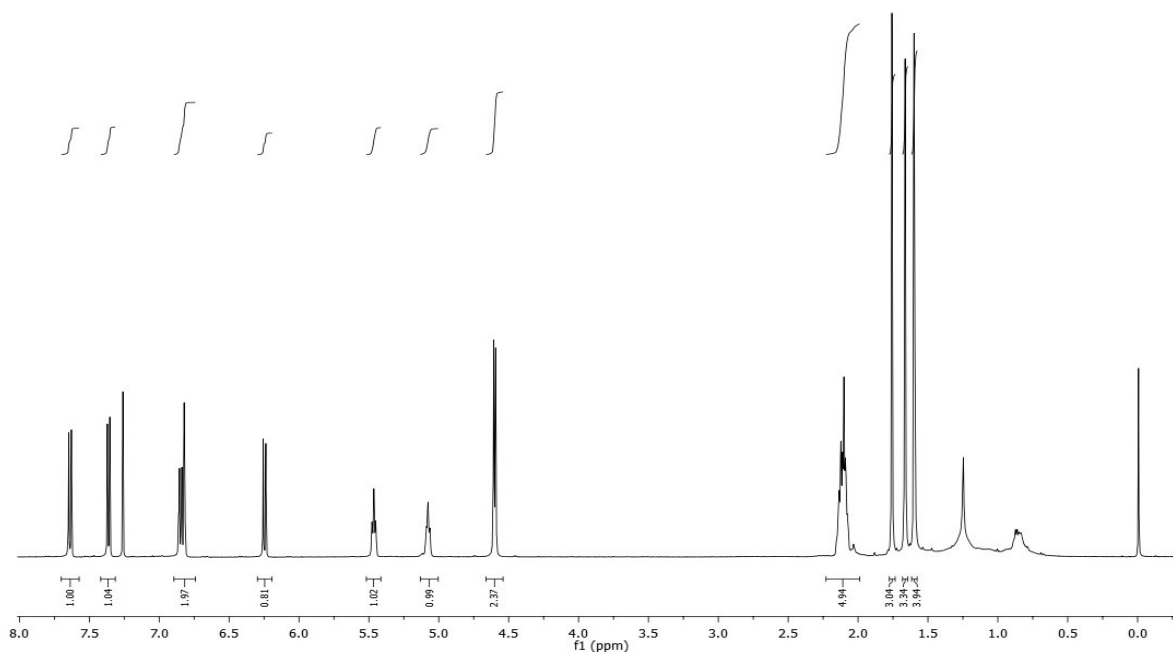
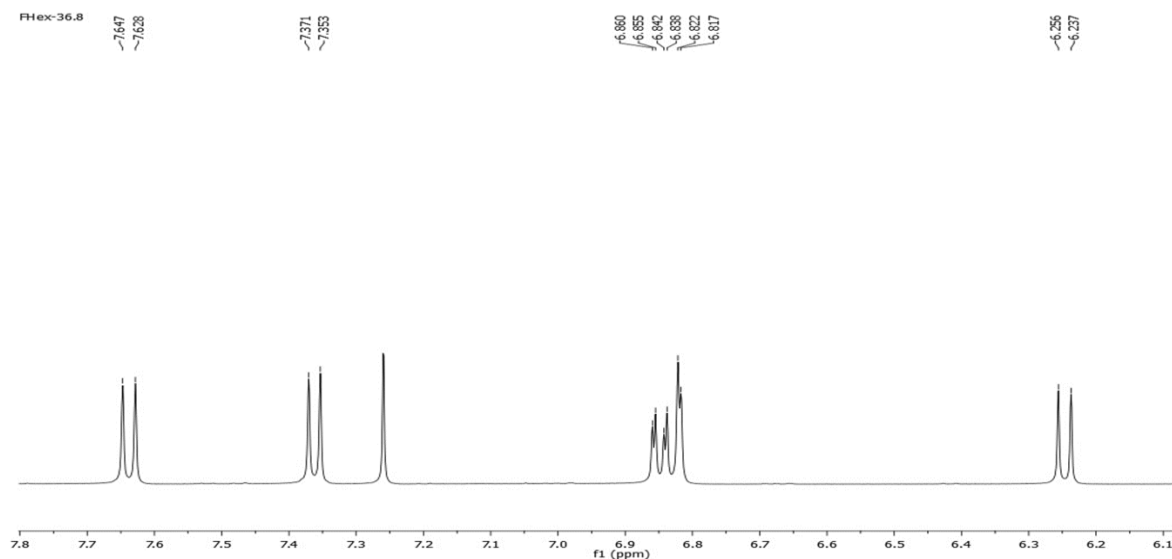
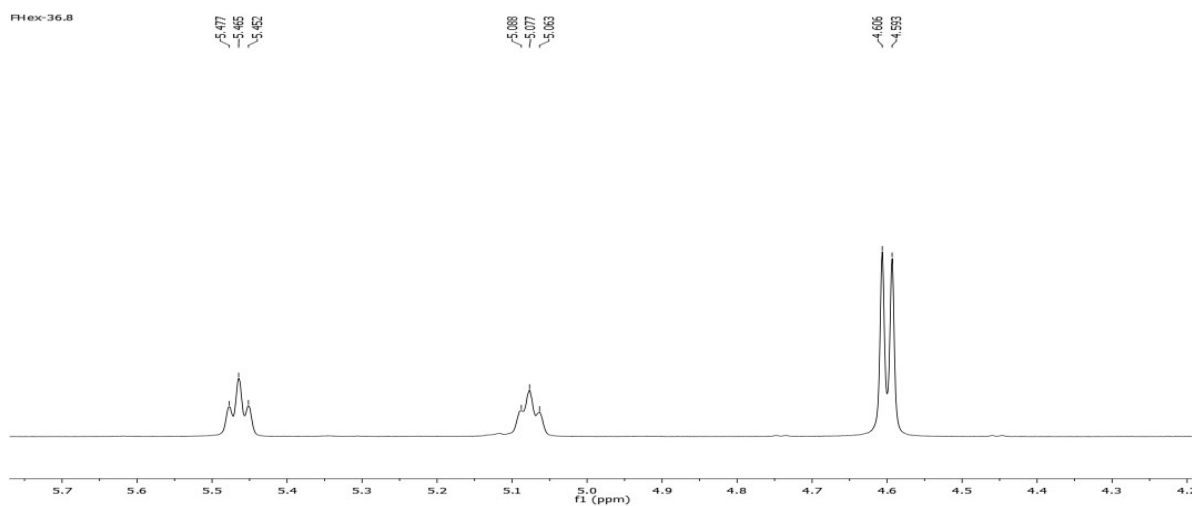
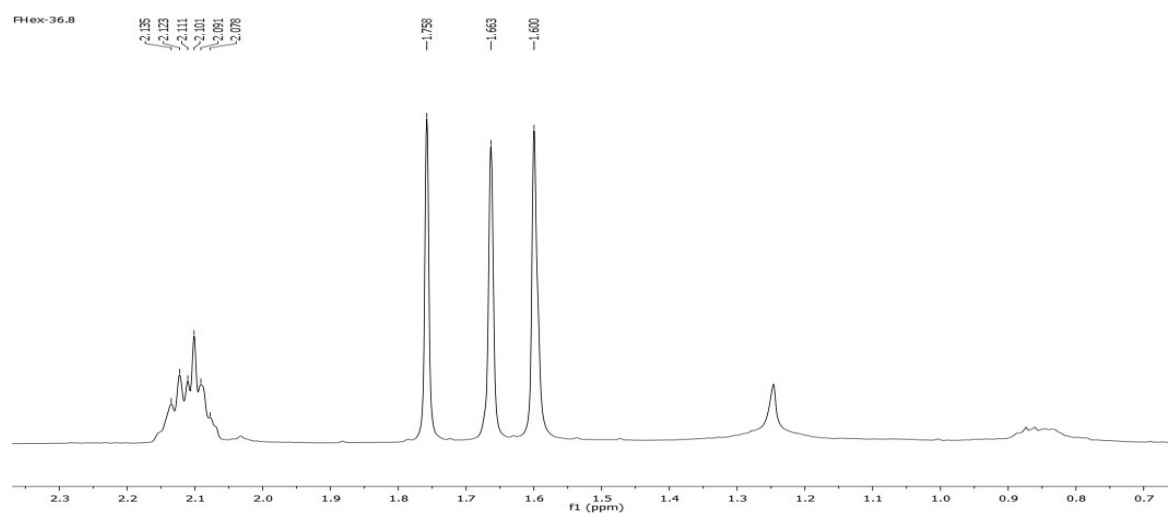
Figura 32-Integração do espectro de RMN ^1H de EHZC36 [500 MHz, MeOD, δ (ppm)]

Figura 33 – Ampliação 1 do Espectro de RMN de ^1H da EHZC36 [500 MHz, MeOD, δ (ppm)]**Figura 34** – Ampliação 2 do Espectro de RMN de ^1H da EHZC36 [500 MHz, MeOD, δ (ppm)]**Figura 35** – Ampliação 3 do Espectro de RMN de ^1H da EHZC36 [500 MHz, MeOD, δ (ppm)]

A análise do espectro de RMN de ^{13}C permitiu identificar a presença de 19 sinais de carbono (Figura 36). Destes, destacam-se três sinais entre δ 150-162 referentes a carbonos quaternários ligados a oxigênio, como os sinais em δ 161,48 (C-2) característico de carbonila cumarínica, sinais em δ 162,25 (C-7) e δ 155,97 (C-9) de carbono aromático ligado a oxigênio; já os sinais em δ 101,68 (C-8), δ 112,54 (C-3), δ 113,08 (C-10) δ 113,39 (C-6), δ 128,81 (C-5) e δ 143,62 (C-4) também foram atribuídos aos carbonos aromáticos característico de sistemas cumarínicos e em δ 118,48 (C-2') e δ 123,72 (C-6') a carbonos olefínicos. Já os sinais em δ 142,55 (C-3') e δ 132,12 (C-7') foram atribuídos aos carbonos olefínicos não hidrogenados da porção prenilada. Outros cinco sinais na região entre δ 16 - 30 (Figura 37) são característicos de carbonos sp^3 . Sendo que os sinais em δ 16,92 (C-9'), δ 17,86 (C-10') e δ 25,82 (C-8') foram atribuídos aos carbonos metílicos. Sinais em δ 26,35 (C-4'), δ 39,65 (C-5') e δ 65,60 (C-1'), característicos a carbonos metilênicos. A confirmação destes resultados deu-se através da comparação dos deslocamentos químicos obtidos no espectro de RMN ^{13}C com os dados da literatura (Tabela 14). (SILVA, DETONI, VELOZO, 2008; FELICIANO et al., 2008). Sendo desta forma identificada a cumarina aurapteno. Cumarinas são compostos orgânicos naturais que possuem aplicações diversas, seja na indústria alimentícia, de cosméticos e medicamentos.

Diversos estudos com essa classe de produtos naturais têm atribuído atividades antibacterianas (DOMINGO; LÓPEZ-BREA, 2003), antiviral (MAO, 2002), anti-influenza (H1N1) (KHOMENKO et al., 2017), antifúngicas, antitumoral (MONTAGNER, 2007; ZHANG et al., 2003), anti-inflamatória (MURAKAMI, et al. 2000), antiparasitária (WANG et al., 2000), antioxidante (ZHANG; WANG, 2004), anticoagulante (BOOTH et al., 2004), vasodilatadora (CHEN et al. 2005), antimelanogênica (LEI et al., 2002), dentre outros.

A cumarina aurapteno, comumente encontrada em espécies da família Rutaceae, já foi relatada em outras espécies do gênero como em *Z. schinifolium* (NGUYEN et al., 2016; DY et al., 2007) e *Z. tingoassuiba* (SILVA et al., 2008), porém é a primeira vez que tem sido relatada na espécie *Z. caribaeum*. Vários trabalhos já foram realizados evidenciando as importantes atividades biológicas, seja atuando como agentes neuroprotetores para pacientes com doença de Parkinson (OKUYAMA et al., 2016), como também apresentando atividades antibacteriana, antitumoral e anticolinesterásico (DO et al., 2007; ZHE FANG et al, 2010; SANTOS et al., 2008). Além disto, estudos têm verificado a eficácia do aurapteno para melhorar resultados das opções atuais de quimiorradioterapia (MOUSSAVI et al., 2017).

Figura 36 – Ampliação do Espectro de RMN ^{13}C da EHZC36 [125 MHz, MeOD, δ (ppm)]

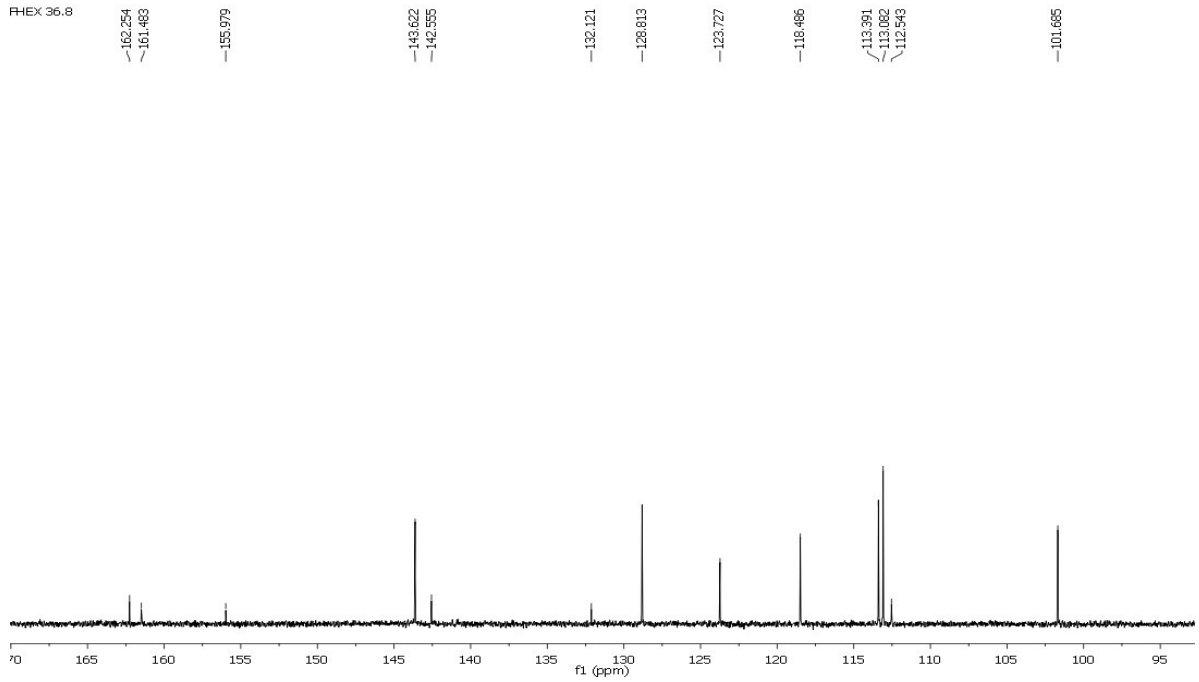


Figura 37- Ampliação 2 do Espectro RMN de ^{13}C da substância EHZC36 [MeOD δ (ppm)]

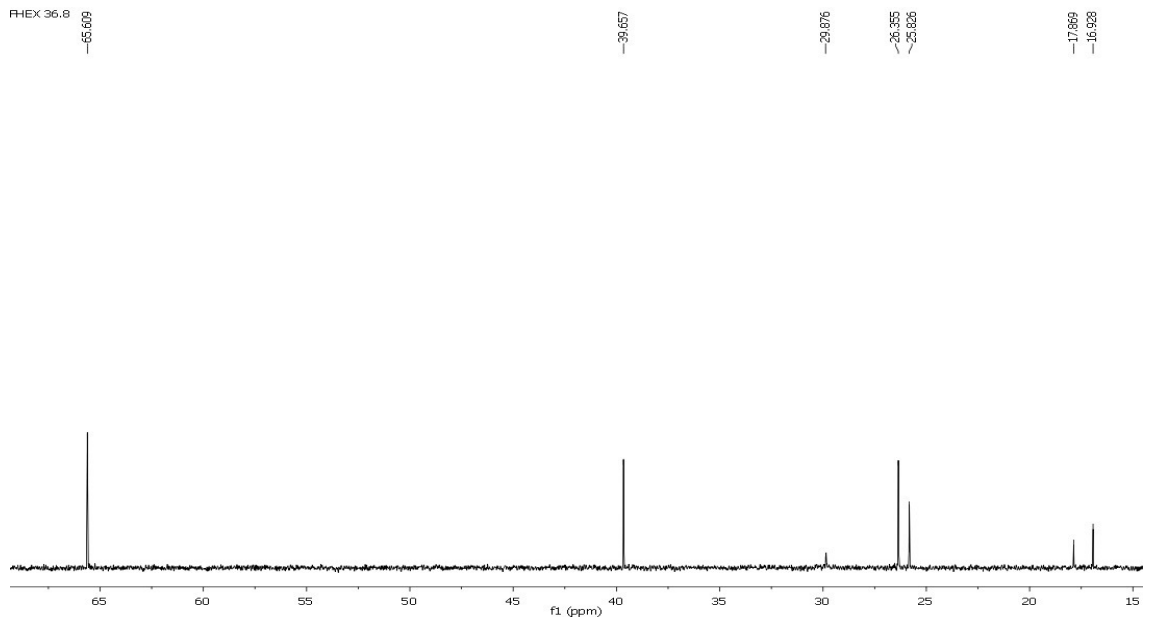


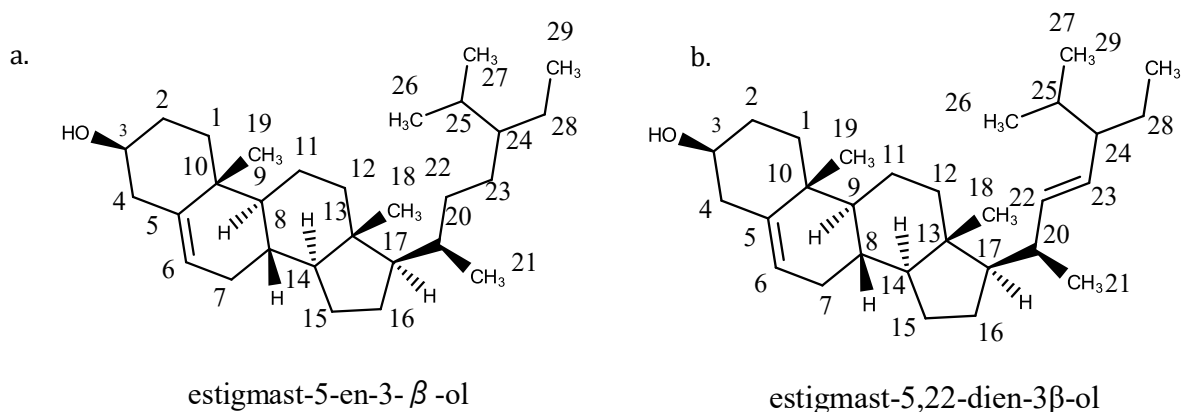
Tabela 14 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da cumarina aurapteno em MeOD a 500 MHz e comparação com dados da literatura

C	$\delta\ ^1\text{H}$ (J, Hz)	$\delta\ ^{13}\text{C}$ (ppm)	(SANTOS, 2007)	
			$\delta\ ^1\text{H}$ (J, Hz)	$\delta\ ^{13}\text{C}$
2	-	161,48	-	161,4
3	6,23 (d, 9,5)	112,54	6,20 (d, 9,4)	112,9
4	7,62 (d, 9,5)	143,62	7,60 (d, 9,4)	143,5
5	7,35 (d, 9)	128,81	7,32 (d, 8,6)	128,7
6	6,86 (dd, 9,5 e 2,5)	113,39	6,80(dd, 8,5 e 2,4)	113,3
7	-	162,25	-	162,2
8	6,81 (d, 2,5)	101,68	6,78 (d,2,4)	101,6
9	-	155,97	-	155,9
10	-	113,08	-	-
1'	4,69 (d, 6,5)	65,60	4,57(d, 6,5)	65,5
2'	5,45(t, 6,5)	118,48	5,44 (dt,1,0 e 6,5)	118,4
3'	-	142,55	-	142,4
4'	2,13 (m)	26,35	2,08 (m)	26,3
5'	2,13 (m)	39,65	2,08 (m)	39,5
6'	5,08 (m)	123,72	5,06(m)	123,6
7'	-	132,12	-	132,0
8'	1,60 (s)	25,82	1,64 (s)	25,7
9'	1,75 (s)	16,92	1,73 (s)	16,8
10'	1,66 (s)	17,86	1,57 (s)	17,7

4.2.2 Substância isolada do extrato hexânico de *Z. caribaeum* (EZH30.1)

A fração hexânica após processo de separação fitoquímica por cromatografia em coluna (CC) possibilitou o isolamento da substância FH30.1 como sólido cristalino incolor, solúvel em clorofórmio. As substâncias foram identificadas através da análise dos dados de RMN de ^1H quando comparados com aqueles em literatura. O composto apresentou resultado positivo para o teste qualitativo utilizando o reagente de Liebermann-Burchard. Avaliando os dados espectrais, juntamente com os dados em literatura foi possível concluir que a substância trata-se de uma mistura de fitoesteróis como o estigmast-5-en-3- β -ol ou β -sitosterol e estigmast-5,22-dien-3 β -ol ou estigmasterol (Figura 38).

Figura 38 - Estrutura da substância EZH30.1 a. β -sitosterol. b. Estigmasterol



No espectro de RMN de ^1H [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] (Figura. 39 e 40), foi observado a presença de um multiplete em $\delta_{\text{H-3}}$ 3,53 ppm (1H; *m*) característicos de hidrogênio carbinólico e a presença de um dubleto em $\delta_{\text{H-6}}$ 5,38 (1H; *d*) referente ao hidrogênio olefínico na posição H-6, característicos do β -sitosterol. Pôde-se observar também a presença de dois duplos dubletos em δ 5,04 (1H; dd) e δ 5,15 (1H; dd) que caracterizam os hidrogênios ligados a carbonos olefínicos do estigmasterol nas posições H-22 e H-23, indicando a presença do estigmasterol. Os sinais entre δ 2,4 e δ 0,68 podem ser atribuídos aos hidrogênios de grupos alifáticos da estrutura esteroidal tipo β -sitosterol (ABREU, 2009; ZANON et al., 2008). A presença dos fitoesteroides β -sitosterol e estigmasterol foi relatado pela primeira vez nesta espécie, no entanto, outros autores descreveram a presença destes compostos em espécies do gênero como em *Z. Rigidum* (MOCCELINI et al., 2009), *Z. nitidum* (YANG C H et al., 2009), *Z. tingoassuiba* (SILVA, DETONI, VELOZO 2008) e *Z. quinduense* (LADINO; SUÁREZ, 2010).

Figura 39 - Espectro de RMN ^1H de EZH30.1 [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]

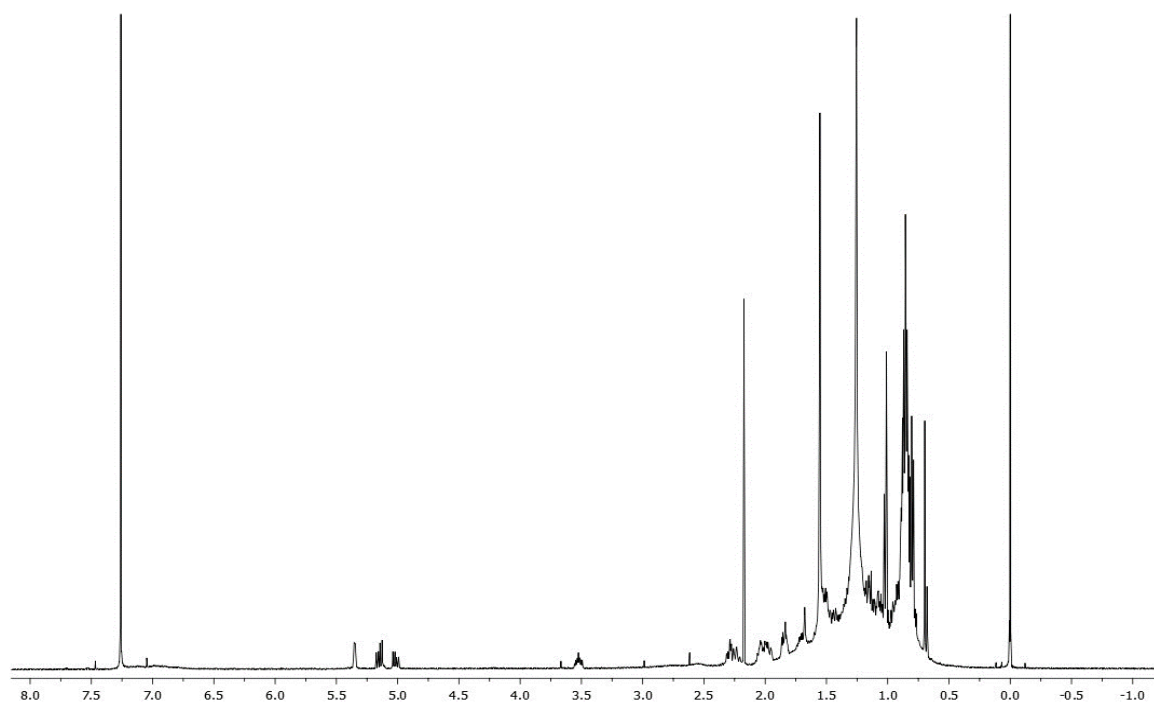
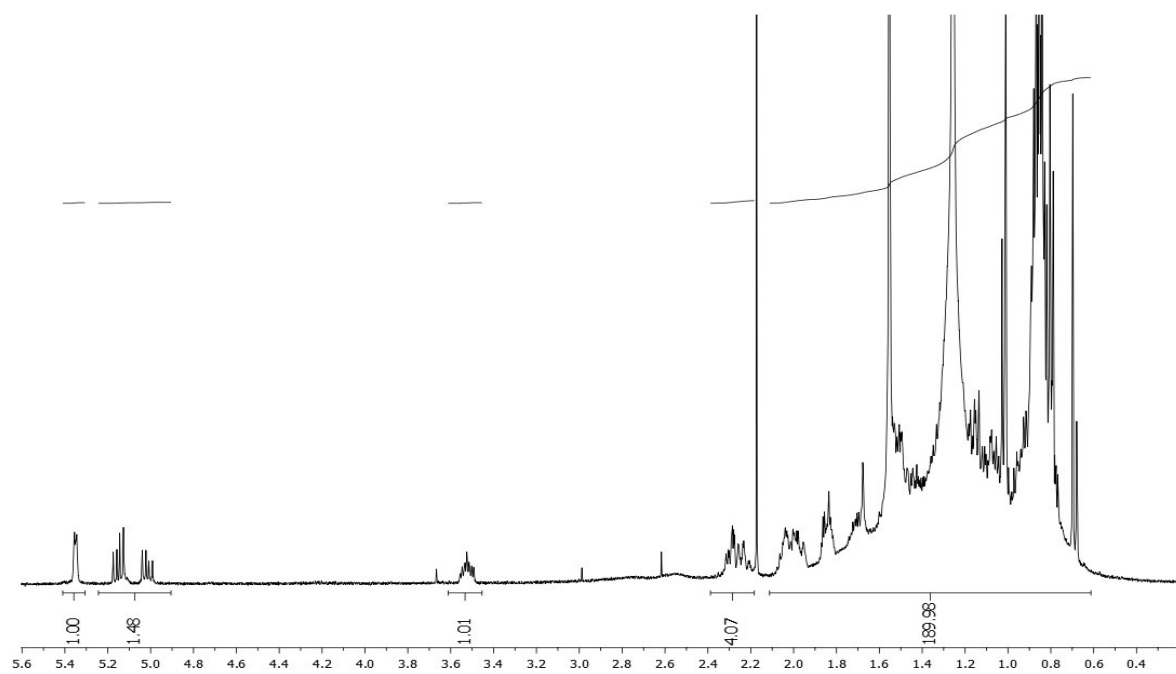


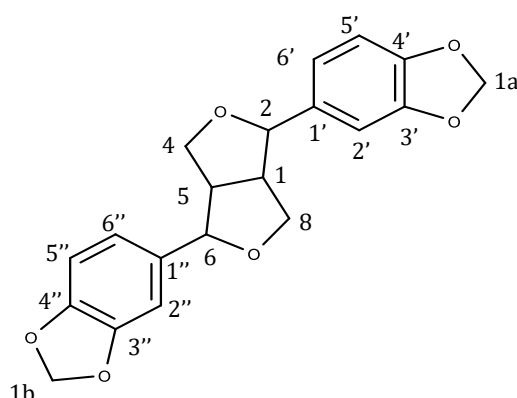
Figura 40 – Integração do espectro de RMN ^1H de EZH30.1 [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]



4.2.3 Substância isolada extrato clorofórmico de *Z. caribaeum* (FCZC19)

Do extrato clorofórmico submetido à cromatografia em coluna aberta de sílica gel, foi obtida a substância FCZC19 (Figura 41), isolada como sólido cristalino, apresentando ponto de fusão em 120 - 121,9 °C. Através da análise dos dados de Infravermelho, RMN de ^1H e de ^{13}C , aliados aos dados de DEPT 135°, HMQC, HMBC e comparação com dados de RMN de ^1H e de ^{13}C descritos na literatura, foi possível concluir que a substância em questão consiste na sesamina, uma lignana furofurânica de fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_6$.

Figura 41 - Estrutura da substância FCZC19 (sesamina)

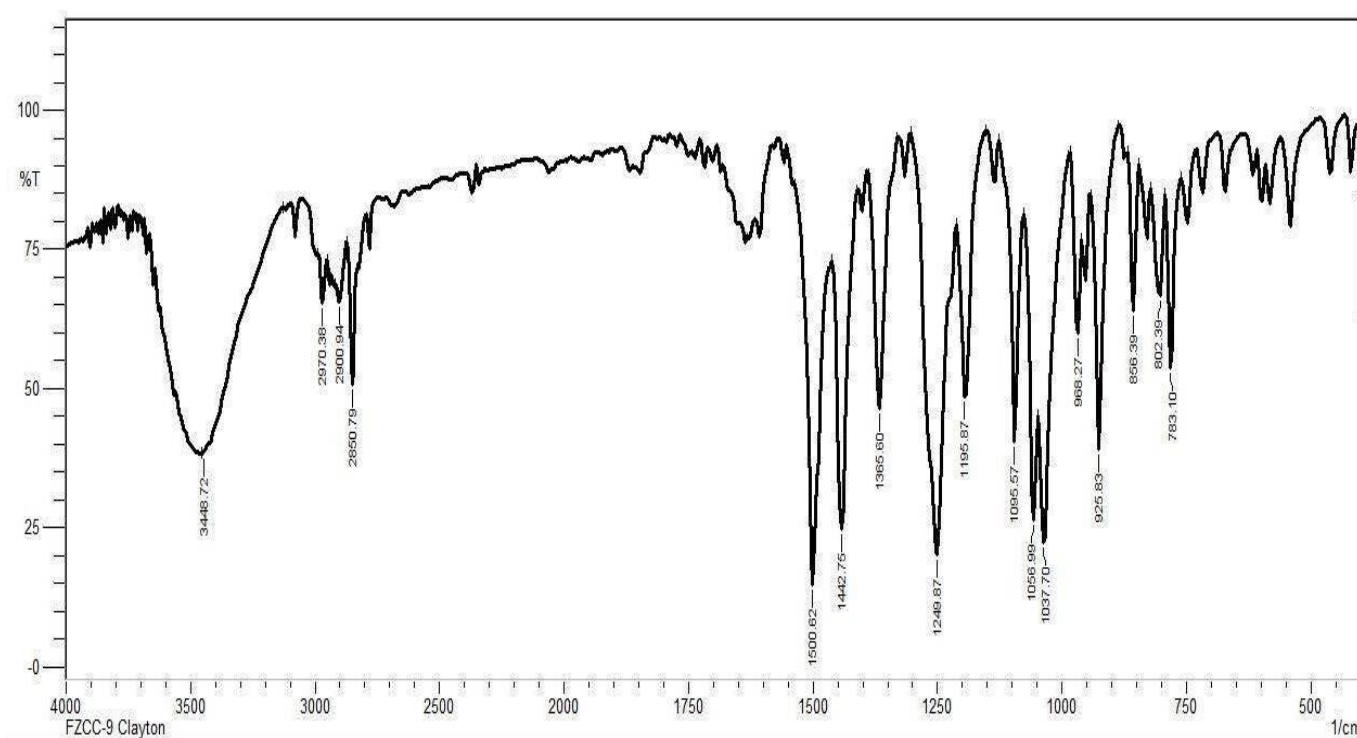


A espectroscopia na região do infravermelho (IV) é uma técnica de fundamental importância para análise orgânica qualitativa, sendo amplamente empregada nas áreas de química de produtos naturais, síntese e transformações orgânicas. As informações dos espectros de RMN somado aos dados obtidos pelo infravermelho contribuem consideravelmente para a determinação da estrutura molecular investigada.

O espectro no infravermelho (Figura 42) demonstrou a existência de anel aromático observada pela presença de bandas de absorção em 1500 cm^{-1} , referentes à deformação axial de $\text{C}=\text{C}$ aromático (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE 2012). A presença de bandas de absorção entre $988\text{-}783\text{ cm}^{-1}$ indica a presença de anel aromático com deformação angular de 3H (1,2,3 – trissubstituído). A presença de bandas de absorção entre $2960\text{-}2850\text{ cm}^{-1}$ corresponde à deformação axial de C-H, (CH_3 , CH_2), a ausência de absorção entre 1820 e 1630 cm^{-1} exclui todas as funções carboniladas ($\text{C}=\text{O}$), assim como a ausência de absorção em $\sim 1375\text{ cm}^{-1}$

cm^{-1} ($\delta\text{C-H}$) indica que a substância não possui grupo metila. Pode-se observar uma banda em 1442 cm^{-1} , que se relaciona à deformação angular simétrica no plano para $\text{CH}_2 - \delta_s (\text{CH}_2)$ (ALMEIDA, et al., 2012). A formação de bandas de absorção em 1058 cm^{-1} pode ser indicativa de deformação axial simétrica C-O-C (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE 2012). O IV apesar de apresentar uma banda larga em 3448 cm^{-1} característica das vibrações de deformação axial do grupamento OH, tal grupo funcional não foi confirmado na estrutura da sesamina, como pôde ser visto nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C . Porém esta banda larga pode estar relacionada ao grupamento OH de água adsorvida na pastilha (PAIVA; LAMPMAN; KRIZ, 2010).

Figura 42- Espectro IV da substância FZC19



Através da análise do espectro de RMN de ^1H (Figuras 43 e 44) pode ser observada a presença de sinais na região de aromáticos em δ 6,87 H-2' e H-2'' (1H; *d*) e δ 6,79 H-6', H-6'' e H-5' e H-5'' (2H; *m*), bem como, sinais referentes aos hidrogênios ligados a carbonos oxigenados (carbono oximetilênicos), como o singlete em δ 5,96 H-1a e H-1b (2H; *s*). Os sinais em δ 4,74 H-2 e H-4 (1H; *m*, $J=2,4 \text{ Hz}$) e δ 3,06 H-1 e H-5 (1H; *m*, $J=1,5 \text{ Hz}$) são característicos das lignanas furofurânicas, os quais podem ser atribuídos aos hidrogênios oxibenzílicos e os hidrogênios da junção dos anéis furânicos, respectivamente, fundamentais para a proposta

estrutural da substância FCZC19. Sinais em δ 4,23 H-6 e H-8 (2H; *m*), 3,87 H-6 e H-8 (2H; *dd*, $J= 3,5$ e $9,0$ Hz) são condizentes com os deslocamentos dos hidrogênios metilênicos do anel heterocíclico em equatorial e axial e caracterizam uma lignana furofurânica com plano de simetria (JAYASINGHE et al., 2003; ARRUDA et al., 1992). Ressalta-se que os valores das integrais devem ser multiplicados por dois para que o número de hidrogênios corresponda com a estrutura proposta, a exemplo das lignanas simétricas.

Na análise do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 45), foi verificado a presença de 10 sinais entre δ 54,4 – 148,0. Tais espectros aliado aos dados observados no espectro de DEPT 135° (Figura 46), permitiu verificar a presença de sinais em δ 148,2 (C-4', C-4''), δ 147,2 (C-3', C-3''), δ 135,2 (C-1', C-1''), δ 119,5 (C-6', C-6''), δ 108,4 (C-5', C-5'') e δ 106,7 (C-2', C-2''), referentes a carbonos de anel aromático trissubstituído, e um sinal em δ 101,2 (1a e 1b), típico de carbono metilenodioxí (-O-CH₂-O), e sinais em δ 85,89 (C-2, C-6), δ 71,9 (C-4, C-8) e δ 54,4 (C-1, C-5). Assim, no espectro de DEPT 135° (Figura 46) apresentou sinais referentes a carbonos metínicos (CH) registrados na fase positiva, e dois sinais na fase negativa correspondendo a dois carbonos metilênicos (CH₂) presentes na estrutura da sesamina, considerando que nos espectros de DEPT 135° não aparecem sinais referentes a carbonos não hidrogenados (sp).

No espectro de HMQC (Figura 47) foi possível correlacionar os hidrogênios com seus respectivos carbonos. As correlações observadas no espectro de HMBC (Figura 48) entre o hidrogênio em δ 4,71 e os carbonos em δ 54,5, δ 71,9, δ 106,6, δ 119,4, δ 135,2 bem como, entre o hidrogênio em δ 4,23 e os carbonos em δ 54,5 e δ 85,89 permitiu propor a estrutura. O grupo oximetilênico (-O-CH₂-O) foi confirmado através do espectro de RMN de ^1H , no qual indicou um singlete em 5,96 ppm e pelo espectro de HMQC que mostrou este sinal associado ao sinal de carbono em 101,3 ppm referentes a carbonos ligados a oxigênio, desta forma, tais análises permitiram propor a estrutura para a substância FCZC19. Na tabela 15, encontra-se dados de RMN de ^{13}C e de ^1H e DEPT 135 de FCZC19 comparados com os dados da literatura.

O composto isolado e identificado na espécie estudada, são condizentes com os já encontrados no gênero *Zanthoxylum*. Hohlemwenger e colaboradores (2012), isolaram a lignana sesamina no extrato hexânico da casca das raízes de *Z. rhoifolium*, como também em extratos metanólico das folhas e extratos etanólicos das cascas nas espécies *Z. naranjillo* e *Z. tingoassuiba* respectivamente (HENRIQUE et al., 2016) Assim como, também foi determinado em *Z. heitzii* bark (MOUSSAVI et al., 2015) *Z. armatum* (BHATT et al., 2017), *Z. Piperitum* (KIM, AHN, 2017) e *Z capense* (BODEDE et al., 2017).

A sesamina, é uma importante lignana muito utilizada em suplementação dietética, conferindo efeitos antioxidantes, anti-inflamatório e anticancerígeno (DOU et al., 2018; SHAHI et al., 2016), podendo também ser utilizado como anti-hiperlipêmicos auxiliando na prevenção da aterosclerose, doenças cardiovasculares, dislipidemia dentre outras (THUY et al., 2017; ZHANG et al., 2016).

Figura 43 - Ampliação 1 do espectro RMNde¹H da substância FCZC19 [CDCl₃ 500 HZ, δ (ppm)]

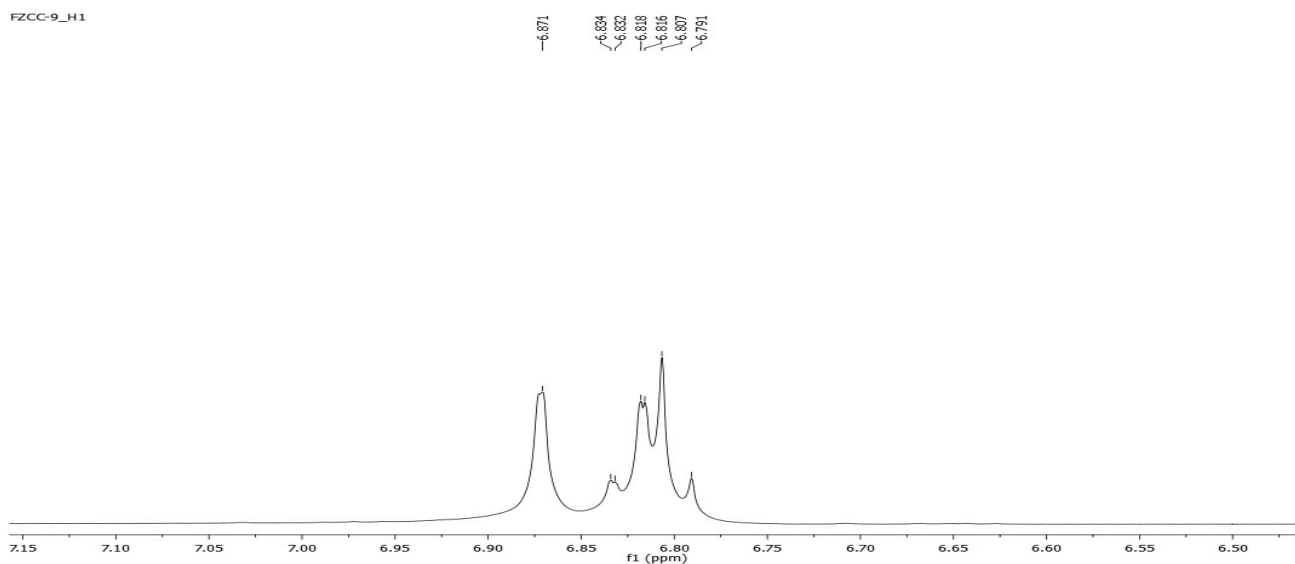


Figura 44 - Ampliação do espectro RMNde¹H da substância FCZC19 [500 MHz CDCl₃, δ (ppm)]

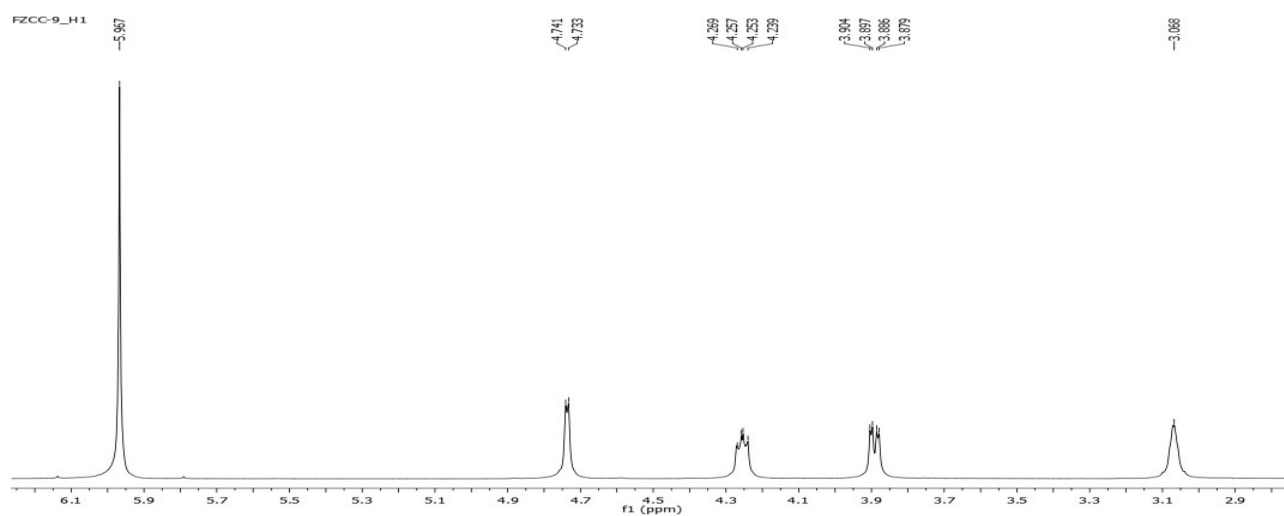


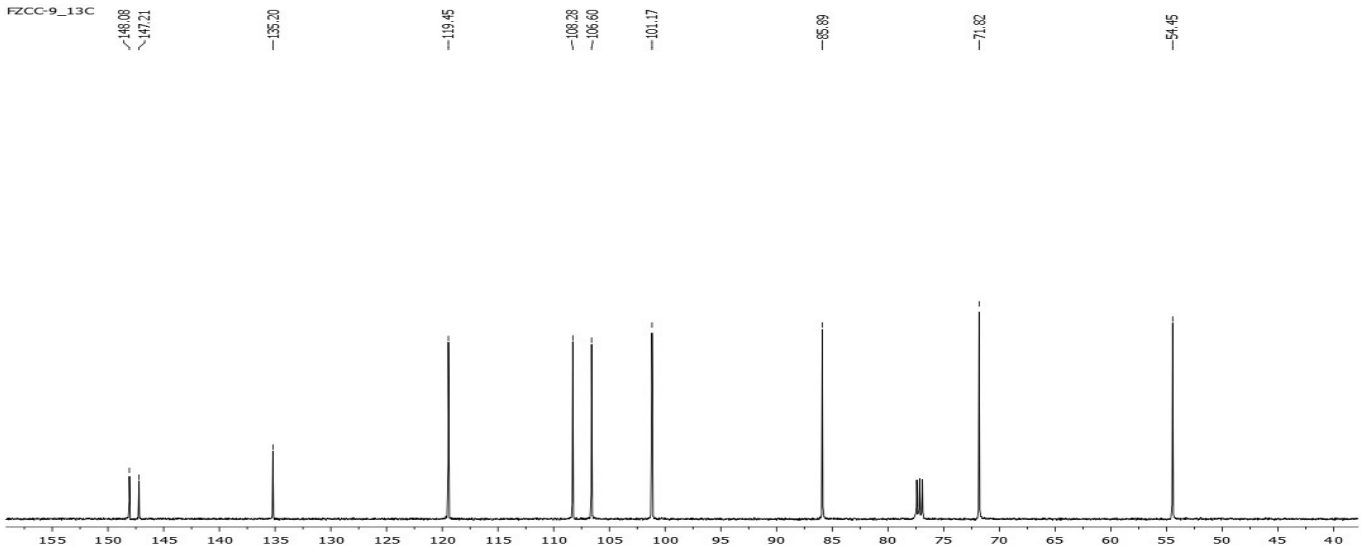
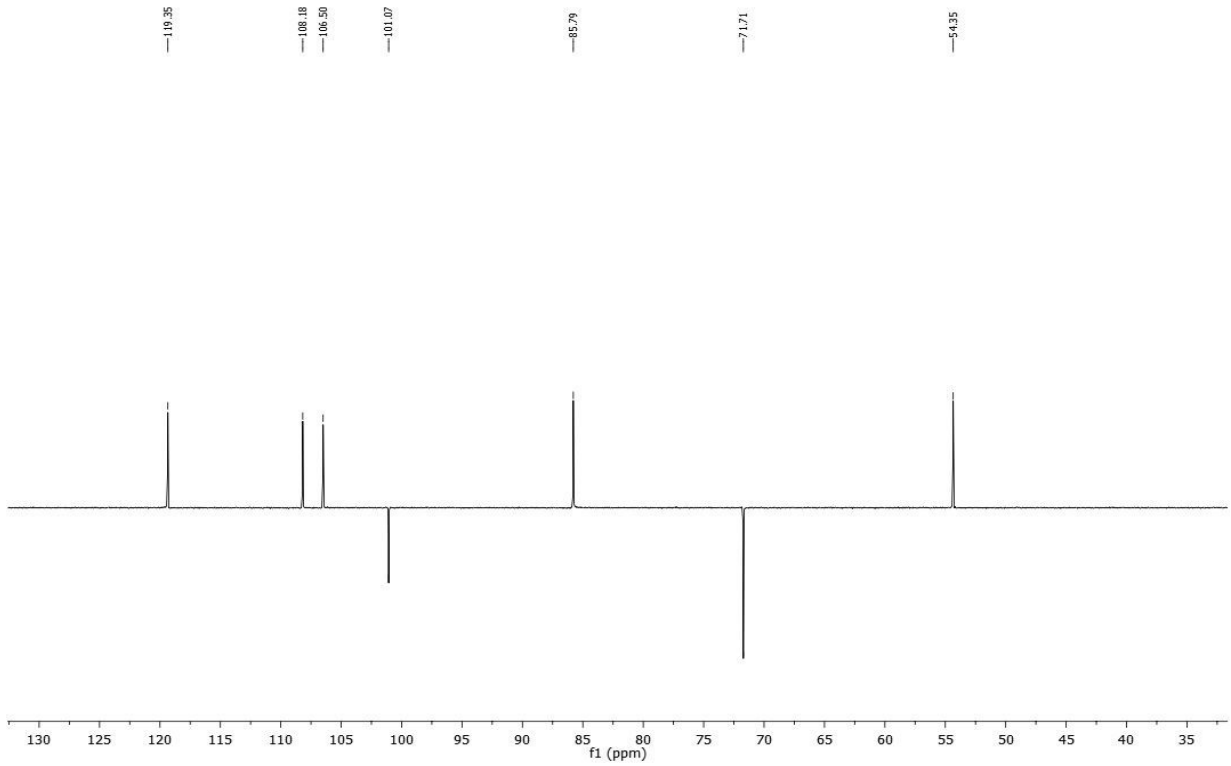
Figura 45 - Espectro RMN de ^{13}C da substância FCZC19 [125 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]**Figura 46** - Espectro de DEPT 135° de FCZC19

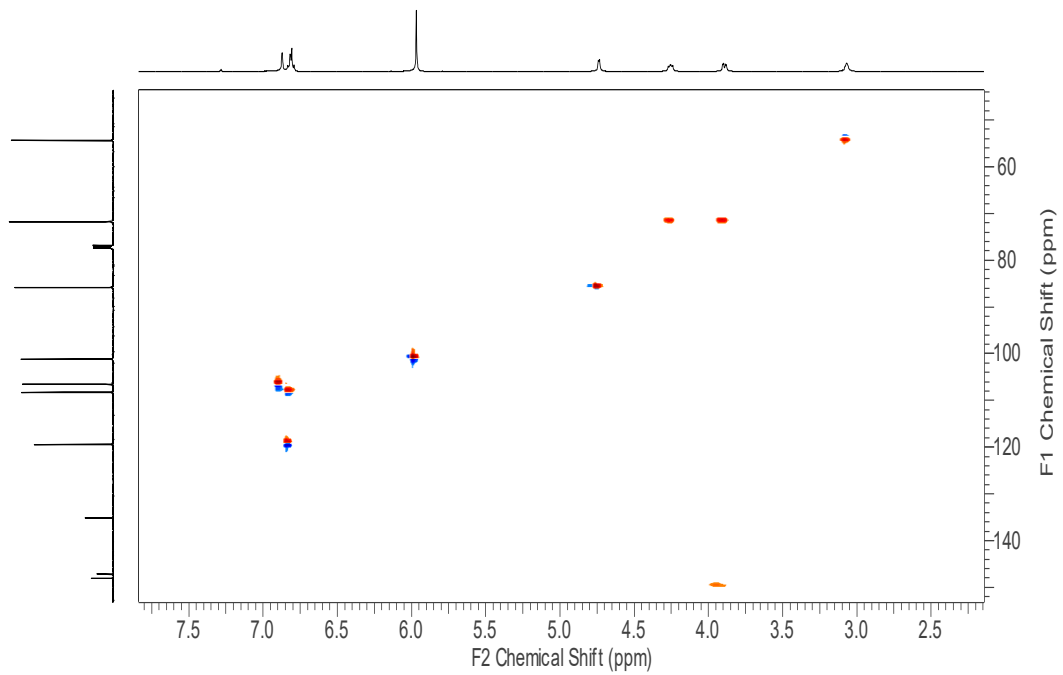
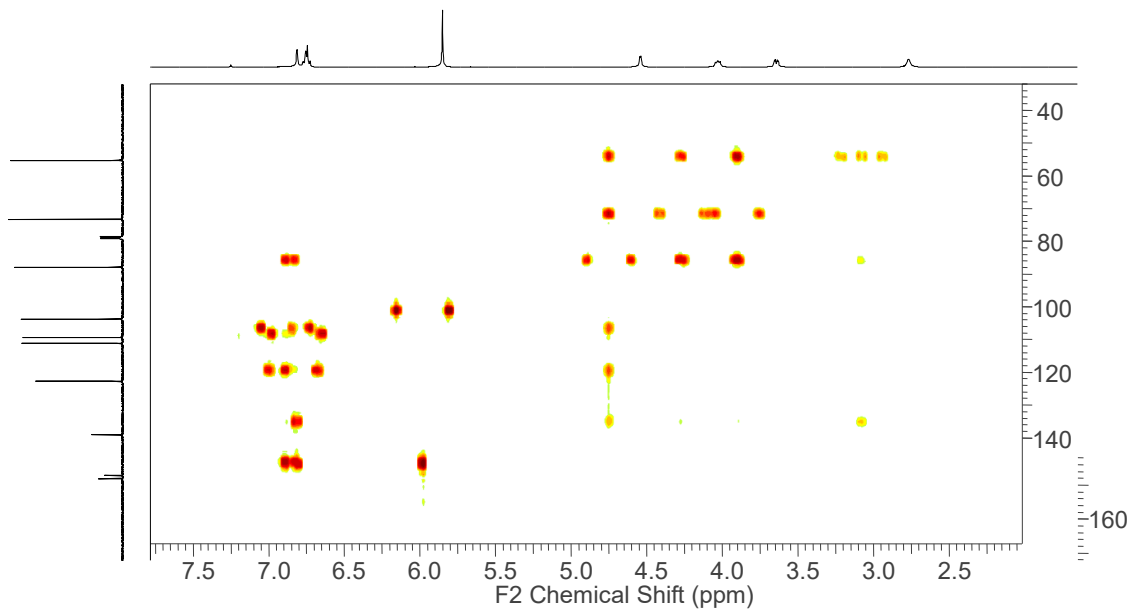
Figura 47 - Espectro de HMQC de FCZC19**Figura 48-** Espectro de HMBC de FCZC19

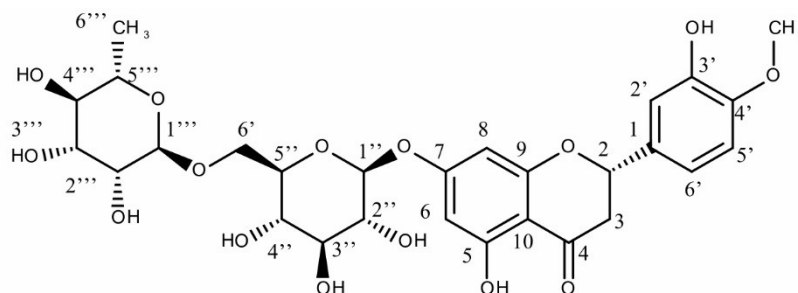
Tabela 15 - Dados de RMN de ^{13}C e DEPT 135 de FCZC19 [125 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] e dados da literatura

C	δ ^1H (J, Hz)	δ ^{13}C (ppm)	DEPT 135	JAYASINGHE et al. (2003)	
				δ ^1H (J, Hz)	$\delta^{13}\text{C}$
1 e 5	3,06 (2 H, <i>m</i> , <i>j</i> = 1,5Hz)	54,5	CH	3,00 (2H, <i>m</i> , 4,4)	54,5
2 e 4	4,74 (2H, <i>d</i>)	71,9	CH	4,71 (2H, <i>d</i> , 4,4)	71,7
6 e 8	4,23 (2 H, <i>dd</i>) 3,87 (2H; <i>dd</i> , 3,5 e 9,0)	85,89	-	3,87 (2H, <i>dd</i> , 9,3; 3,7) 4,23 (2H, <i>dd</i> , 9,3; 6,8)	85,6
1' e 1''	-	135,0	-	-	135,0
2' e 2''	6,85 (<i>dd</i> , 9,5 e 2,5)	119,4	CH	6,80 (2H, <i>dd</i> , 7,9; 1,5)	119,6
3' e 3''	-	147,9	-	-	147,3
4' e 4''	-	148,2	-	-	148
5' e 5''	6,85 (<i>d</i> , 2,5)	108,4	CH	6,77 (2H, <i>d</i> , 7,9 Hz)	108,4
6' e 6''	6,85 (<i>d</i> , 2,5)	119,5	CH	6,80 (2H, <i>dd</i> , 7,9; 1,5)	119,6
-OCH₂O-	5,96	101,2	CH ₂	5,96	101,1

4.2.4 Substância isolada do extrato de acetato de etila de *Z caribaeum* (FAZC37)

Do extrato acetato de etila submetido à cromatografia em coluna (CC) empregando como adsorvente sílica gel, foi obtida a substância FAZC37, isolada como sólido amorfo, solúvel em DMSO. A substância apresentou coloração escura quando eluída em CCD e borrifada com cloreto férrico, indicando tratar-se de uma substância fenólica. Através da análise dos dados de RMN de ^1H e de ^{13}C e comparação com dados descritos na literatura, foi possível concluir que a substância trata-se da flavanona 7-*O*- β -D-rutinosil-3',5-diidroxil-4'-metoxiflavanona ou hesperidina, apresentando a fórmula molecular $\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{O}_{15}$ (Figura 49).

Figura 49 - Estrutura da substância isolada do extrato acetato de etila FAC37



7-*O*- β -D-rutinosil-3',5'-diidroxil-4'-metoxiflavanona

A análise do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO d_6) mostrou sinais na região de hidrogênios aromáticos. Sinais referentes a dois singletos em $\delta_{\text{H-6}}$ 6,13 (sl, 1H) e $\delta_{\text{H-8}}$ 6,11 (1H, sl) foram atribuídos aos hidrogênios do anel A do flavonoide, sugerindo que o anel A seja 5,7-dissubstituído. Além de sinais na forma de singletos referente a hidroxila fenólica em $\delta_{\text{H-9}}$ 9,11 (s, HO-3') e em $\delta_{\text{H-5}}$ 12,02 (1H; s, OH-5) indicando uma hidroxila quelada (Figura 50). Sinais em δ_{H} 3,77 (s, 4'-OCH $_3$) característicos dos hidrogênios de grupamento metoxílico. Sinais referente a um multipletto em δ 6,94 (m, 3H, H-2', H-5' e H-6') atribuídos aos hidrogênios H-2', H-5' e H-6' do anel B, sugerindo que o composto apresente estrutura do tipo 3'-hidroxil-4'-metoxi (MOCELLINI et al., 2009). Foram observados também, sinais na região de hidrogênios alifáticos, em que dois pares de duplo dupletos em δ 5,48 (1H, dd, $J=3,0$ Hz, H-2), δ 2,78 (1H, dd, H-3eq) são atribuídos aos hidrogênios alifáticos H-2 e H-3, característicos do esqueleto da flavanona. Adicionalmente, neste espectro foram observados dubletos em δ_{H} 5,39 (1H, d, $J=5,0$ Hz, H-1'') e δ 4,96 (d, $J = 7,5$ Hz, H-1''') correspondentes aos hidrogênios anoméricos de unidades osídicas, bem como sinais na região entre δ 2,69 e δ 4,46, relativos aos hidrogênios dos fragmentos moleculares advindos da glicose e ramnose, respectivamente. Observou-se ainda, o deslocamento químico em δ 1,07 (3H, d, $J = 6$ Hz, H-6''') relativos aos hidrogênios do grupo metila da ramnose.

Os sinais observados no espectro de RMN de ^{13}C (Figura 51) corroboraram com a proposta estrutural. Foram observados sinais em δ 78,42 (C-2) referente a carbono metínico e sinais em δ 42,04 (C-3) a carbono metilênico, atribuídos aos carbonos do anel C da flavonona. Os sinais em δ 96,37 (C-6) e 95,53 (C-8) foram atribuídos aos carbonos metínicos não oxigenados $-\text{sp}^2$ do anel C e sinais em δ 196,98 (C-4) C=O, δ 163,02 (C-5), δ 165,13 (C-7), δ 162,48 (C-9) δ 146,46 (C-3') δ 147,95 (C-4'), referentes aos carbonos quaternários oxigenados da unidade aglicona. Os sinais em δ 117,91 (C-6'), δ 114,14 (C-2'), δ 112,06 (C-5') referente

ao carbono sp^2 , do anel B. E os sinais em δ 103,31 (C-10), δ 130,90 (C-1') referente aos carbonos quaternários da flavonona.

A atribuição de todos esses valores foi compatível ao esqueleto de uma flavanona 7-O-glicosil substituída (Figura 52). O espectro de RMN ^{13}C mostra sinais que confirmam a presença de duas unidades osídicas ao apresentar sinais para dois carbonos anoméricos em δ 66,02 (C-6''), e δ 100,59 (C-1''), como também, foram observados sinais referentes as unidades osídicas em δ 99,45 (C-1'''), δ 72,98 (C-2''), δ 76,26 (C-3''), δ 70,25 (C-2'''), δ 71,87 (C-3'''), δ 72,06 (C-4'''), δ 54,86 (4'-OCH₃) (Figura 53). Sinais para carbono metínico em δ 68,29 (C-5''') e um carbono metílico em δ 17,84 (C-6''') da ramnose (Figura 54). A comparação dos valores dos δ dos carbonos C-1', CH-2', C-3', C-4', CH-5' e CH-6' permite assegurar a distinção entre os dois padrões de substituição 3'-hidroxi-4'-metoxi- e 4'-hidroxi-3'-metoxido anel B. Os dados de RMN de H e C e da literatura possibilitou chegar à conclusão que a substância se trata da flavanona glicolisada, hesperidina (Tabela 16).

A hesperidina é uma flavanona glicosídica que tem apresentado importância econômica e medicinal, resultado de suas diferentes propriedades biológicas, comumente encontrada em espécies da família Rutaceae destacando o gênero citrus. No entanto, outras espécies do gênero *Zanthoxylum* também tem sido relatado a presença de hesperidina, destacando a *Z. armatum* (BHATT et al., 2017), *Z. rhetsa* (SANTHANAM et al., 2018), *Z. scandens* (NGUYEN et al., 2002) *Z. Nitidum* (LU et al., 2006), *Z. sprucei* (BINUTU, CORDELL 2000). Contudo, esta foi o primeiro relato da presença desta flavanona na espécie em estudo.

A hesperidina tem sido muito utilizado como ativo de medicamentos, associado a outro flavonoide diosmina, no tratamento de doenças venosas crônicas, reduzindo a permeabilidade capilar, varises, hemorroidas, trombose, úlceras varicosas e etc (GIANNINI et al., 2015; LYSENG-WILLIAMSON, PERRY, 2003). Além dessas propriedades farmacológicas, vários estudos determinam efeitos antioxidante, anti-inflamatória, anti-hipertensivas (HOMAYOUNI et al., 2018), anticarcinogênico (ZHAO et al., 2017); antinociceptiva (MARTÍNEZ et al., 2011), efeito anti-adipogênico e deslipidante (GÓMEZ-ZORITA et al., 2017), na prevenção da deficiência visual causada pela retinopatia diabética (LIU et al., 2018), também como ativos em formulações de filtro solar e fotoprotetores (SANTHANAM et al., 2018).

Figura 50 - Ampliação do espectro RMN de ^1H da substância FAZC37 [500 MHz, DMSO, δ (ppm)]

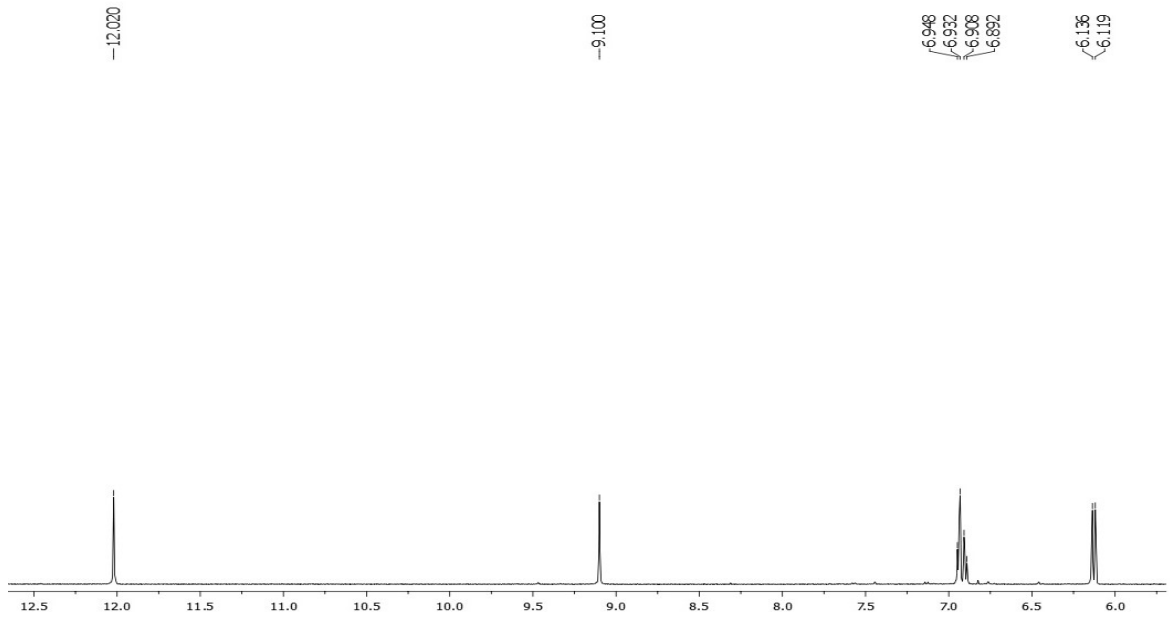


Figura 51 - Ampliação 2 do espectro RMN de ^1H da substância FAZC37 [500 MHz, DMSO, δ (ppm)]

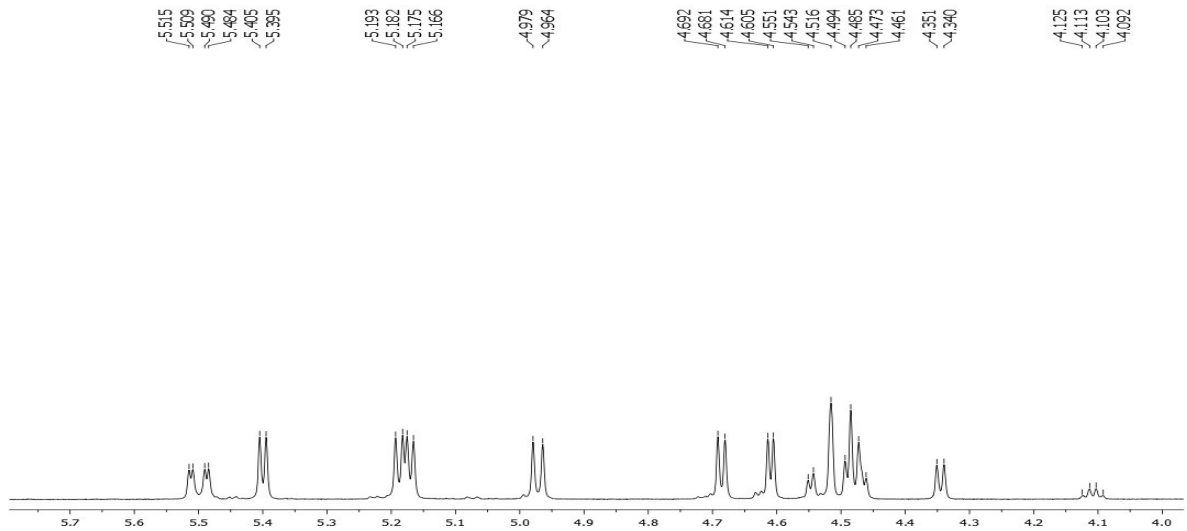


Figura 52 - Ampliação do espectro RMN de ^1H da substância FAZC37 [500 MHz, DMSO, δ (ppm)]

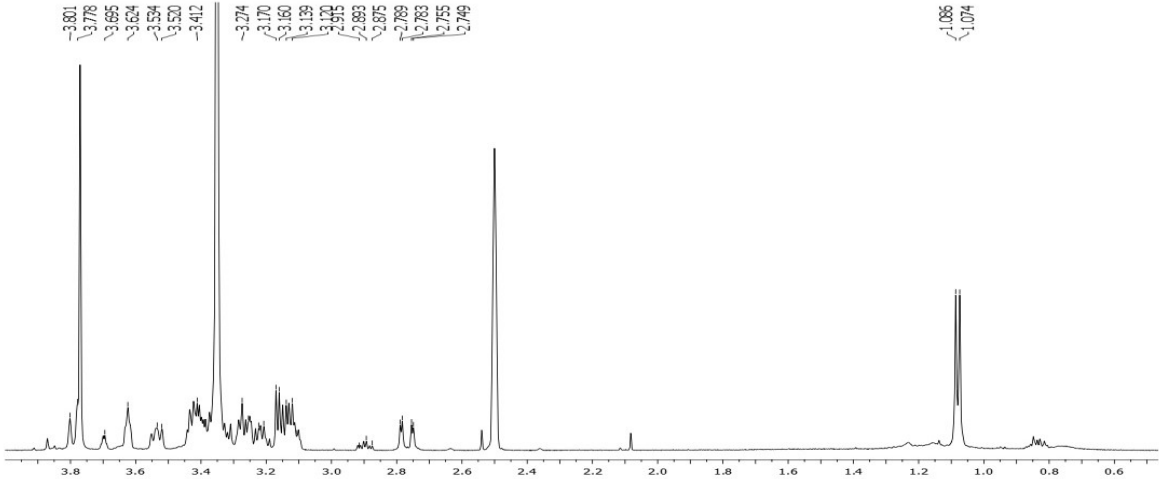


Figura 53 - Espectro RMN de ^{13}C da substância FAZC37 [125 MHz, DMSO, δ (ppm)]

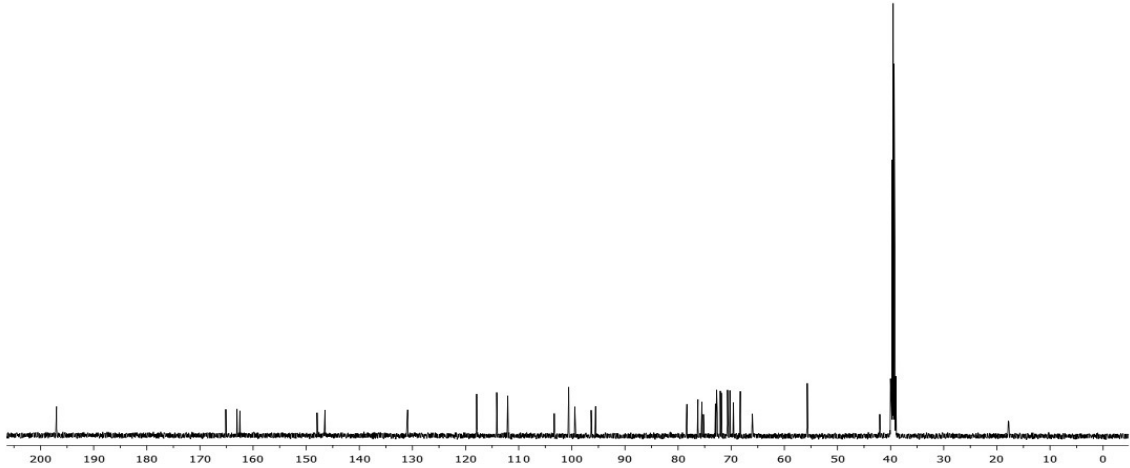


Figura 54 - Integração do espectro RMN de ^{13}C da substância FAZC37 [125 MHz, DMSO, δ (ppm)]

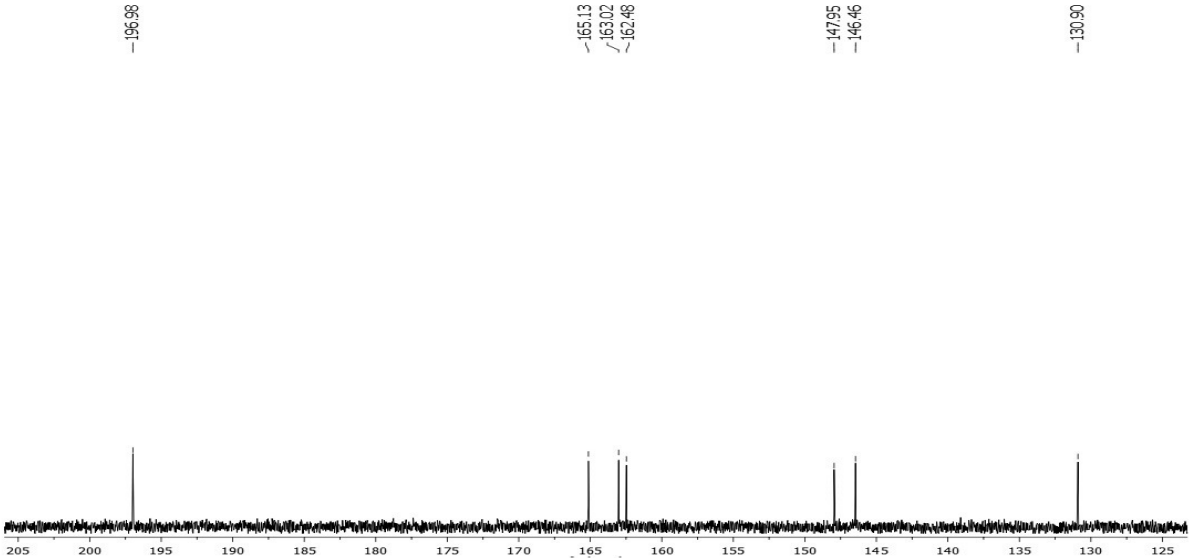


Figura 55 - Integração do espectro RMN de ^{13}C da substância FAZC37 [125 MHz, DMSO d_6 , δ (ppm)]

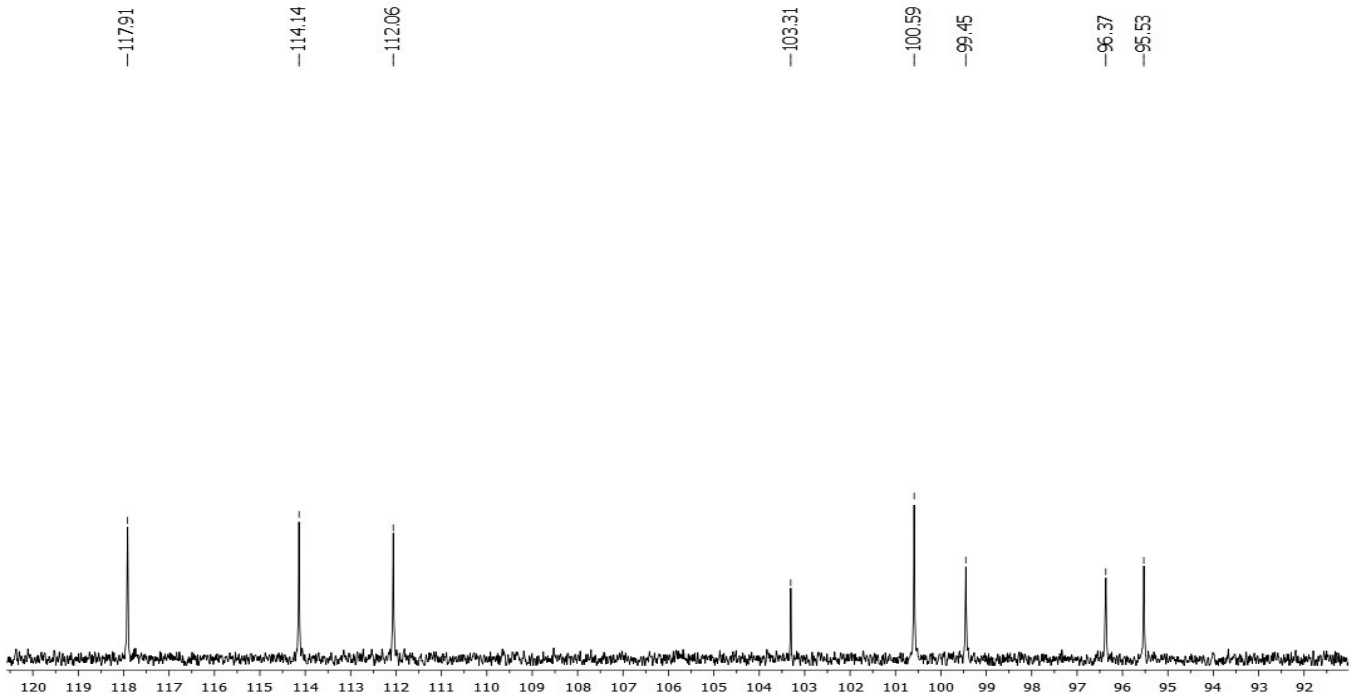


Figura 56 - Integração do espectro RMN de ^{13}C da substância FAZC37 [125 MHz, DMSO d_6 , δ (ppm)]

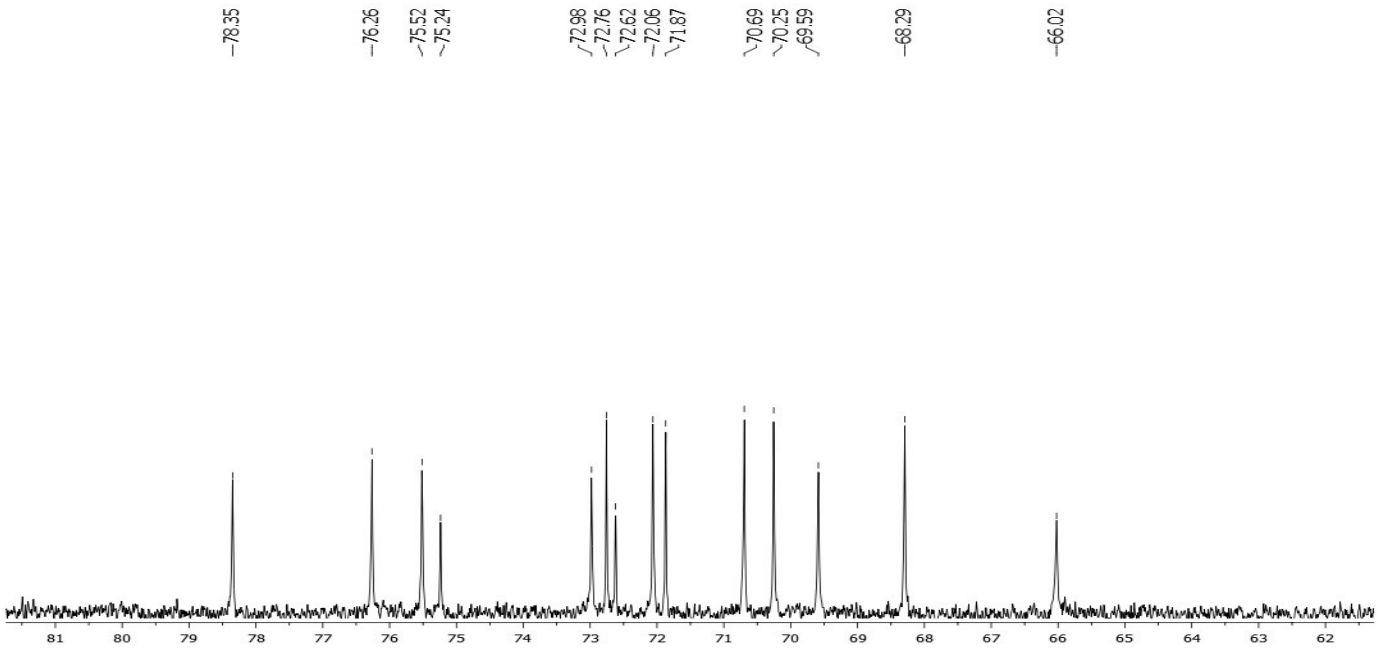


Figura 57 - Integração do espectro RMN de ^{13}C da substância FAZC37 [125 MHz, DMSO-d₆, δ]

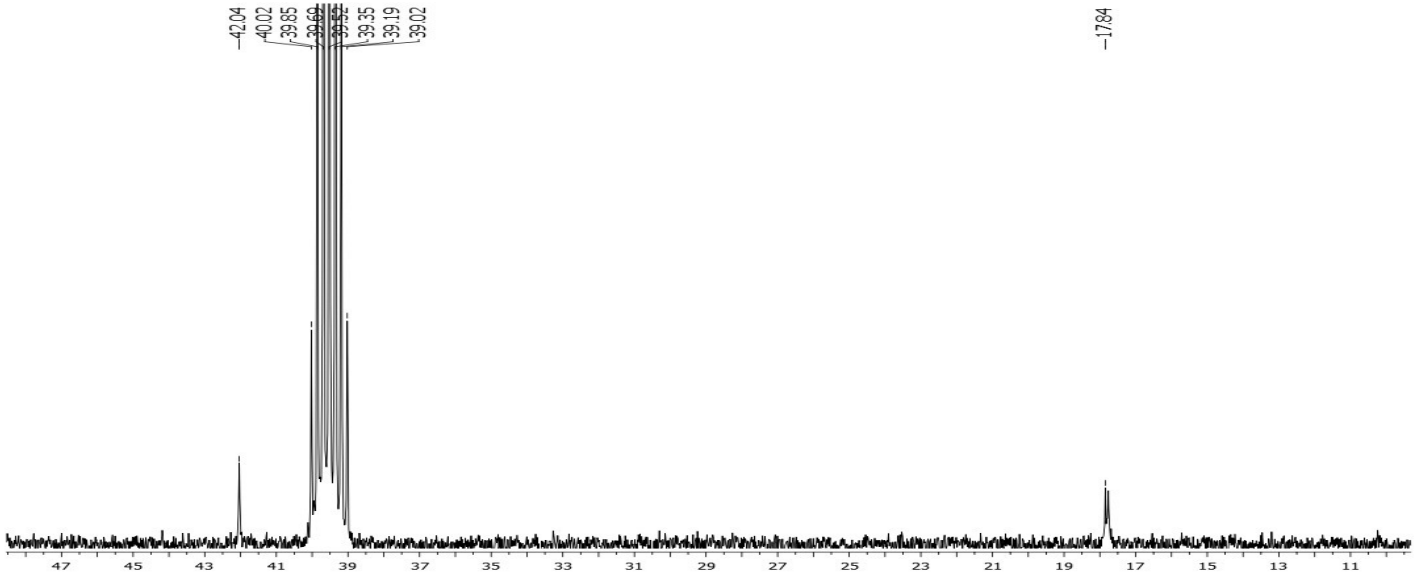


Tabela 16 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de FAC37 [500 MHz Dmso, δ (ppm)] e dados da literatura

Nº C	δ 1H (J, Hz)	δ 13C (ppm)	SILVA (2009)	
			δ 1H (J, Hz)	$\delta^{13}\text{C}$
1	-	-	-	54,5
2	5,48 (d)	78,42	5,50 (d, J=9,0 Hz)	78,6
3 eq	2,78	42,04	2,50-2,90 (m)	42,1
4	-	196,00	-	197,1
5	-	163,42	-	163,1
6	6,13 (sl)	96,68	6,50 (s)	96,3
7	-	165,43	-	165,2
8	6,11 (sl)	95,39	6,91 (s)	95,5
9	-	162,48	-	162,5
10	-	103,31	-	103,1
1'	-	130,90	-	131,0
2'	6,94 (m)	114,14	6,75-6,95(m)	114,2
3'	-	146,46	-	146,5
4'	-	147,95	-	148,0
5'	6,94 (m)	112,06	6,75-6,95(m)	112,0
6'	6,94 (m)	117,05	6,75-6,95(m)	118,0
-OCH3-	3,80 (s)	54,86	3,85 (s)	-
OH -5	12,02 (s)		12,00 (s)	-
OH-3'	9,10 (s)	101,2	9,10 (s)	55,7
1''	4,97 (d, J=7,5)	100,59	4,98 (d, J=8,0Hz)	100,7
2''	3,12-3,77 (m)	72,98	3,20-3,90 (m)	73,1
3''	3,12-3,77 (m)	76,26	3,20-3,90 (m)	76,4
4''	3,12-3,77 (m)	69,59	3,20-3,90 (m)	69,7
5''	3,12-3,77 (m)	75,52	3,20-3,90 (m)	75,6
6''	3,12-3,77 (m)	66,02	3,20-3,90 (m)	66,1
1'''		99,45	4,50 (s)	99,5
2'''	3,12-3,77 (m)	70,25	3,20-3,90 (m)	70,4
3'''	3,12-3,77 (m)	70,69	3,20-3,90 (m)	70,8
4'''	3,12-3,77 (m)	72,06	3,20-3,90 (m)	72,2
5'''	3,12-3,77 (m)	68,29	3,20-3,90 (m)	68,4
6'''	1,07 (d, 6,0)	17,84	1,10 (d, J=6,8Hz)	17,9

Multiplicidade dos sinais: s=singlete, d=dublete, dd=dublete de dublete, m =multiplete; Solvente DMSO, dimetilsulfóxido deuterado; TMS padrão interno, J = constante em *Hertz*.

Apesar de nenhuma das substâncias isoladas serem inéditas, o presente estudo possibilitou a identificação de metabólitos secundários relatados pela primeira vez na espécie *Zanthoxylum caribaeum* Lam, contribuindo desta forma com a quimiotaxonomia da família.

4.2 Análise, quantificação e identificação da composição química do óleo essencial de *Z. caribaeum* Lam

A hidrodestilação de folhas secas de *Z. caribaeum* forneceu um óleo essencial com odor forte, apresentando coloração amarelo claro, com 0,2% de rendimento (Tabela 17). Os óleos essenciais são produtos voláteis, constituídos principalmente de misturas de fenilpropanoides e terpenoides, especificamente monoterpenos e sesquiterpenos. Além destes, também podem ser encontrados uma variedade de hidrocarbonetos alifáticos, ácidos, álcoois, aldeídos, ésteres acíclicos ou lactonas (YUNES, CECHINEL FILHO, 2014).

Tabela 17 - Massas (g) e rendimentos (%) do óleo essencial extraído das folhas de *Z. caribaeum* Lam.

Massa de folhas frescas (g)	Volume de óleo obtido (mL)	Rendimento %
697,70	1,4	0,20

Os componentes do óleo essencial das folhas de *Zanthoxylum caribaeum* foram identificados através da comparação de seus espectros de massas (Apêndice A), com espectros existentes na literatura especializada (ADAMS, 2007) e os espectros do banco de dados do equipamento, e ainda pela comparação dos índices de retenção com aqueles da literatura. Desta forma, foi possível a identificação de 20 compostos no total (Figura 58), representando 91,25% dos constituintes deste óleo. Portanto, foi observado que o referido óleo é constituído por uma mistura complexa principalmente de sesquiterpenos (56,34%), e monoterpenos (34,91%), sendo o linalol (27,72%), germacreno D (19,85%), *E*-cariofileno (14,45%) e biciclogermacreno (5,47%) os constituintes majoritários, as quantidades dos constituintes restantes podem ser vistos na Tabela 18.

Figura 58 - Compostos encontrados no óleo essencial das folhas de *Z. caribaeum*. 1.A monoterpenos. 1.B sesquiterpenos

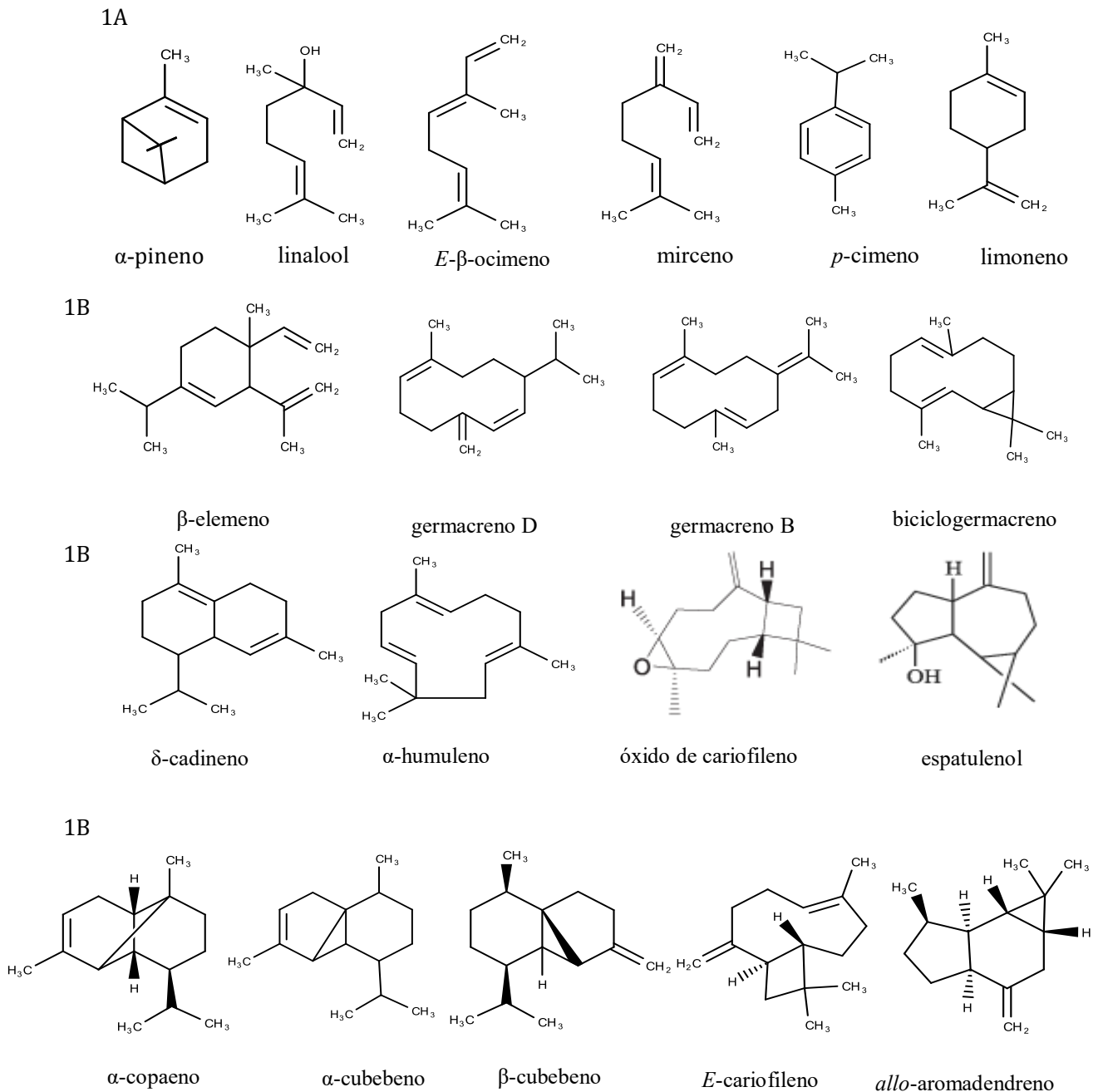


Tabela 18. Composição química do óleo essencial de folhas de *Z. caribaeum*

	Composto	IK _{lit} ¹	IK _{calc} ²	01 (%)	02 (%)	03 (%)	Média ± DP ³
1	α -pineno	939	934	0,73	0,70	0,53	0,65±0,10
2	Mirceno	990	987	0,48	0,48	0,40	0,45±0,04
3	<i>p</i> -cimeno	1026	1023	1,54	1,66	1,49	1,56±0,08
4	Limoneno	1029	1029	3,80	3,75	2,84	3,46±0,54
5	<i>E</i> - β -ocimeno	1050	1046	1,18	0,81	1,18	1,05±0,21
6	Linalol	1096	1099	16,73	28,13	38,32	27,72±10,8
7	δ -elemeno	1338	1338	0,85	0,73	0,52	0,7±0,16
8	α -cubebeno	1348	1350	0,53	0,46	0,49	0,49±0,03
9	α -copaeno	1376	1377	3,57	3,03	3,88	3,49±0,43
10	β -cubebeno	1388	1389	0,78	0,58	0,86	0,74±0,14
11	β -elemeno	1390	1391	1,89	1,63	1,20	1,57±0,34
12	<i>E</i> -cariofileno	1419	1422	16,46	13,20	13,69	14,45±1,75
13	α -humuleno	1454	1455	1,62	1,27	1,16	1,35±0,24
14	<i>allo</i> -aromadendreno	1460	1462	0,42	0,41	0,33	0,38±0,04
15	germacreno D	1485	1484	24,19	19,41	15,95	19,85±4,13
16	Biciclogermacreno	1500	1496	6,80	5,75	3,86	5,47±1,48
17	δ -cadineno	1523	1523	2,82	2,48	1,14	2,14±0,88
18	germacreno B	1561	1559	2,37	2,18	1,48	2,01±0,46
19	Espatulenol	1578	1578	2,45	2,53	1,75	2,24±0,42
20	óxido de cariofileno	1583	1584	1,44	1,32	1,54	1,43±0,11
	Monoterpenos						34,91
	Seaquiterpenos						56,34
	Total de compostos identificados (%)			90,65	90,51	92,61	91,25

¹IK_{lit}= índice de Kovat's da literatura; ²IK_{calc}= índice de Kovat's calculado, ³DP = desvio padrão

Em estudo realizado por Souza e colaboradores (2017), verificaram a composição química do óleo essencial das folhas de *Z caribaeum* coletados na cidade de Cascavel no oeste do estado do Paraná, Brasil. As folhas coletadas forneceram um óleo com rendimento de 1,24%, superior ao encontrado neste estudo. Foram identificados 15 compostos, sendo 60,92 % sesquiterpenos e 2,96% monoterpenos, representando um total de 63,88% dos constituintes identificados, dos quais, os compostos majoritários foram Germacreno D (20,77%), também encontrado no óleo essencial da espécie neste estudo (19,85%), e α -Panasinseno (14,40%) e β -Selineno (11,68%), ausentes. Assim como, estudo realizado por Nogueira et al., (2014), com óleo essencial das

folhas desta espécie, coletadas em Restinga de Jurubatiba, Parque Nacional Rio de Janeiro, Brasil, no período de maio, apresentou boa atividade inseticida frente ao inseto *Rhodnius prolixus*, um dos vetores da doença de Chagas e bioacaricida contra o carrapato-de-boi (*Rhipicephalus microplus*). Foram identificados 90,4% dos compostos, destes correspondendo a 47,3% sesquiterpenos e 41,2% monoterpênicos. No entanto, os constituintes majoritários identificados pelos autores diferiram dos encontrados na composição do óleo essencial de *Z. caribaeum* avaliada no presente trabalho, sendo observados a presença de silvestreno (11,3%), muurola-4 (14%), 5-trans-dieno (8,4%), isodauceno (8,3%) ausentes neste estudo, e α -Pineno (7,6%) que foi encontrado em baixas concentrações (0,65%).

Entretanto, os resultados deste estudo são coerentes aos encontrados para outras espécies do gênero *Zanthoxylum*, que frequentemente são identificados os constituintes majoritários nos óleos essenciais como linalol, limoneno, germacreno D, α -pineno e β -cariofileno, destacando os sesquiterpenos como compostos majoritários para o gênero (ZHANG et al., 2016; PRAKASH et al. 2012; PATIÑO 2012; VIEIRA; 2009; BOEHME et al., 2008; MOURA, STRAPAZZON; LORO, 2006).

Estudos realizados com a espécie *Z. alatum* por Guleria e colaboradores (2013), observaram que os constituintes químicos majoritários do óleo essencial foram o linalol (30,58%) também presente entre os majoritários do óleo essencial de *Z. caribaeum* (27,72%) avaliada no presente trabalho, além de outros componentes não determinados como 2-decanona (20,85%) e β -phenchol (9,43%). Entretanto, diferentes compostos que não foram encontrados no presente trabalho ou que apresentaram em baixas concentrações, têm sido identificados como majoritários nos óleos essenciais em outras espécies do gênero, a exemplo da *Zanthoxylum armatum* apresentando como principais constituintes E-anetol (20,5%), 1,8-cineol (14,0%), 2-tridecanona (12,5%), limoneno (9,0%) e piperitona (8,0%) (WANG et al., 2015), a espécie *Z. Chiloperone* apresentando cis-nerolidol (71,0%), espatulenol (3,5%), óxido de carofileno (2,0%) e b-elemeno (1,9%), e *Z. Riedelianum* sendo o espatulenol (65,2%) como composto principal, além de outros sesquiterpenos presentes, como aromadendreno (4,7%), óxido de carofileno (3,7%) encontrados em baixas concentrações neste estudo (GUY et al., 2001),

Essa variação quantitativa e qualitativa entre a composição dos óleos das folhas de *Z. caribaeum* observados, pode estar associado a vários fatores que influenciam sua composição, tais como, fatores geográficos, ecológicos, estágio de desenvolvimento da planta, fisiologia, idade das folhas, ataque de patógenos dentre outros (GOBBO, NETO 2007).

Muitas espécies deste gênero são reconhecidas pelos seus óleos essenciais apresentarem potencial atividades biológicas, como antimicrobiana e antitumoral de *Zanthoxylum bungeanum* (HONG et al., 2017; LI et al., 2013) antimicrobiano e antioxidante de *Z. alatum*, (GULERIA et al., 2013; PRAKASH et al., 2012), atividade inseticida de *Z. armatum* e *Z. piperitum* (WANG et al., 2015; HIEU, KIM, AHN, 2012), ovicidas e larvicidas de *Z. simulans* (QI et al., 2015), efeito antinociceptivo de *Z. piperitum* (DONALD, FERNANDES, BOYLAN; 2016) e etc.

Portanto, as variedades da composição química nos óleos essenciais constituem objeto de extensivos estudos com espécies desta família, visando a investigação de atividades biológicas que representam um potencial terapêutico importante, tornando produtos essenciais para o desenvolvimento de produtos farmacêuticos.

4.3 Triagem virtual

As substâncias isoladas e identificadas dos extratos de *Zanthoxylum caribaeum* (aurapteno-Figura 31 pag.72, β -sitosterol e estigmasterol - Figura 38 pag 77, sesamina- Figura 41 pag. 79, hesperidina - Figura 49 pág. 84) foram submetidas aos servidores de triagem virtual (TV) para seleção dos alvos biológicos baseado na sua similaridade química a compostos com atividade biológica já conhecida.. Tendo em vista que, compostos similares, química e estruturalmente podem apresentar atividades farmacológicas semelhantes frente ao alvo selecionado (GARETH, 2012; RODRIGUES et al., 2012).

Em estudo realizado por Rocha (2016) foram identificados cinco compostos fenólicos (rutina, luteolina-7-*O*-glicosídeo, ácido cafeico e ácido *p*-cumárico) por CLAE-DAD em extratos da espécie *Asemeia ovata* (Polygalaceae) das quais, foram submetidas a técnicas de triagem virtual baseadas no ligante e receptor e selecionados potenciais alvos moleculares utilizando os servidores ChemProt 2.0 e DRAR-CPI. Anidrase carbônica e receptor de fator de crescimento epidérmico foram identificados como potenciais alvos moleculares para a rutina e para os ácidos cafeico (*p*-cumárico e *trans*-ferulico), enquanto que o receptor de fator de crescimento epidérmico foi sugerido como alvo molecular para luteolina-7-*O*-glicosídeo.

A análise dos servidores ChemProt 2.0, SEA e DRAR-CPI demonstraram quantitativos diferentes para os alvos moleculares encontrados para cada molécula teste (Tabela 19), o que

pode estar relacionado aos servidores que apresentam diferentes métodos de busca, como também a interface dos bancos de dados de alvos moleculares (ROCHA, 2016).

Tabela 19 - Quantidade de alvos moleculares encontrados por servidor

Molécula avaliada	ChemProt 2.0	SEA	DRAR-CPI
Aurapteno	202	5	319
Sesamina	60	-	327
Hesperidina	193	-	115
β-sitosterol	1755	6	145
Estigmasterol	1755	2	74

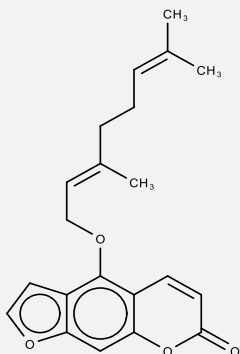
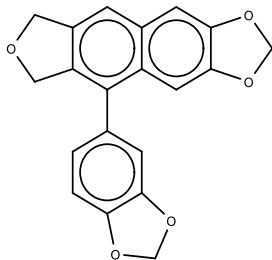
4.3.1 Seleção dos alvos

4.3.1.2 Seleção dos alvos baseado no ligante (Servidor ChemProt 2.0 e SEA)

Esse resultado bruto representa o quantitativo de moléculas com similaridade estrutural aos compostos estudados, no entanto, destaca-se que alguns resultados podem representar

estruturas que apresentam pouca atividade biológica frente a um determinado alvo molecular. Diante desse aspecto, há necessidade de filtrar os resultados da triagem virtual, retirando-se os estudos que já foram realizados com as moléculas em avaliação (CT=1), manter estruturas com similaridade estrutural (CT > 0,7), e por fim, garantir que as moléculas avaliadas foram comparadas com estruturas com bom valor de atividade biológica (K_i ou $IC_{50} < 1000 \mu M$). Após refinamento, os alvos selecionados para as moléculas aurapteno, sesamina e hesperidina foram dispostos na Tabela 20.

Tabela 20 – Alvos potenciais para aurapteno (1) sesamina (2) e hesperidina (3) obtidos pelos servidores ChemProt 2.0 e SEA

Substância	Estrutura de referência	Alvo Molecular	CT	Bioatividade (nM)	Servidor
Aurapteno	 <p>Bergamotina</p>	Beta-secretase	0,90	Ki=700	ChemProt 2.0
Sesamina	 <p>5-Benzo [1,3] dioxol-5-il-6,8-di-hidro-furo [3',4': 6,7] - nafto [2,3-d] [1,3] dioxole</p>	Araquidonato 15-lipoxigenase	0,90	IC ₅₀ =230	ChemProt 2.0
Hesperidina	-	-	-	-	ChemProt 2.0

-, não foi selecionado alvo pelo servidor

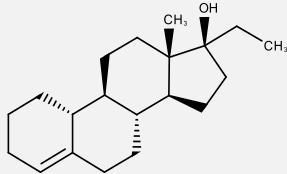
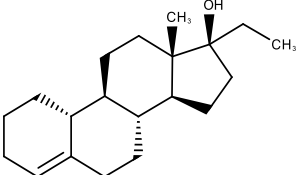
Diante dos resultados, foi possível observar que para a molécula de estudo hesperidina, mesmo encontrado 193 alvos pelo servidor ChemProt 2.0 que apresentassem similaridade estrutural com os ligantes (CT > 0,7), nenhum alvo foi identificado com melhor valor de bioatividade (<1000 nM). Dentre os alvos identificados para a hesperidina, pode-se destacar a Fosfodiesterase cíclica específica 3',5'GMPc (PDE5), no qual a molécula avaliada apresenta CT=0,90 frente ao inibidor da PDE5, no entanto o IC₅₀ encontrado nesse ensaio foi de =5,9 nM, como a molécula avaliada frente ao alvo possui um potencial inibitório fraco, espera-se que, por sua alta similaridade com a mesma, a hesperidina possua o mesmo comportamento frente a PDE5. Esse tipo de avaliação reforça a necessidade de filtrar os resultados encontrados pelos

servidores de triagem virtual, garantindo que as moléculas avaliadas sejam comparadas com estruturas com boa atividade biológica.

A Tabela 21 mostra os resultados obtidos para o β -sitosterol e estigmasterol, dos quais verificou-se que ambas moléculas teste apresentaram os mesmos alvos moleculares pelo ChemProt 2.0. Desta forma, os resultados obtidos permitiram observar que os ligantes selecionados e as moléculas de consulta, fazem parte do mesmo grupo de substâncias naturais os esteroides, sugerindo que ambas moléculas apresentem potencial atividade frente aos alvos selecionados, além do mais, a seleção do mesmo alvo pode estar associado a alta similaridade estrutural química entre os fitoesteroides estigmasterol e β -sitosterol, apresentando $CT=0,98$, calculado através da plataforma SYBYL®-X 2.0 (TRIPOS, 2010). Isto se explica pelo fato de ambas apresentarem o mesmo núcleo fundamental esteroidal (constituído pelo anel ciclopentanoperidrofenantênico ligado a dois grupamentos metila nas posições C-10 e C-13, e a cadeia lateral na posição C-17) e cuja única diferença estrutural é a ausência da ligação dupla entre os átomos de carbono 22 e 23 (ALVES, 2012).

Para o SEA nenhum alvo foi selecionado que apresentasse melhor valor de bioatividade a exemplo do receptor X Hepático α de oxisterois (LXR-alpha) com $IC_{50} = 2800$ nM. Os LXR-alpha são ativados por oxisterois endógenos e fazem parte da superfamília de receptores hormonais nucleares e expressam predominantemente em tecidos adiposo, intestino, fígado e macrófagos, sendo responsáveis pelo metabolismo e transporte de colesterol, homeostase da glicose e modulação da resposta inflamatória e imune. Estudos relatam que as LXR estão relacionadas a diversas doenças como diabetes, Alzheimer, aterosclerose e câncer (JU et al., 2017; CHA, REPA, 2007).

Tabela 21 - Potenciais alvos para o β -sistosterol e estigmasterol obtidos pelo servidor ChemProt 2.0

Substância	Estrutura de referência	Alvo Molecular	CT	Bioatividade (nM)	Servidor
β -sistosterol	 <p>(1S, 2R, 10R, 11S, 14S, 15S) -14-etil-15-metiltetraciclo [8.7.0.0², 7.0¹¹, 15] heptadec-6-en-14-ol</p>	Receptor de estrogênio	0,92	Ki=320	ChemProt 2.0
Estigmasterol	 <p>(1S, 2R, 10R, 11S, 14S, 15S) -14-etil-15-metiltetraciclo [8.7.0.0², 7.0¹¹, 15] heptadec-6-en-14-ol</p>	Receptor de estrogênio	0,92	Ki=320	ChemProt 2.0

Fonte: Dados experimentais (2017)

As estruturas de referência dos ligantes selecionados apresentam pelo menos um núcleo fundamental em comum com a correspondente molécula de consulta (Tabela 20 e 21), o que possibilita apresentarem similaridade química entre elas, e desta forma selecionadas pelos servidores ChemProt 2.0 e SEA. Além do mais, essa semelhança química permite que as moléculas teste podem apresentar potencial atividade biológica frente aos alvos selecionados.

A tabela 22 traz resultados encontrados pelo ChemProt 2.0 para alvos identificados com CT = 1,0. Os alvos encontrados pelos servidores que apresentaram CT=1,0, pode-se inferir que os compostos em estudo apresentam alto grau de similaridade com os fornecidos pelo servidor, ou ainda, que trata-se da mesma molécula de consulta e já foi testada em tais alvos.

Tabela 22 - Exemplos de atividades encontradas de organismo humano para os ligantes avaliados

Substância	Alvo	Bioatividade (nM)	Servidor
Aurapteno	Beta-secretase 1	IC ₅₀ =345.100	ChemProt 2.0
Sesamina	-	-	
Hesperidina	-	-	
β-sitosterol	DNA polymerase beta	IC ₅₀ =26.300	ChemProt 2.0
Estigmasterol	DNA polymerase beta	IC ₅₀ =43.400	ChemProt 2.0

(-) não houve seleção de alvos com CT=1 para as moléculas teste.

4.4.3.1 Acoplamento molecular

4.4.3.2 Servidor ChemProt 2.0 e SEA

Após a filtragem dos alvos pelo ChemProt 2.0 e SEA, as proteínas foram identificadas e posteriormente selecionadas no banco de dados *Protein Data Bank* (PDB), seguindo os parâmetros descritos na metodologia. A Tabela 23 mostra os resultados para as proteínas selecionadas no PDB.

Tabela 23 - Identificação das proteínas selecionadas no PDB para as moléculas teste

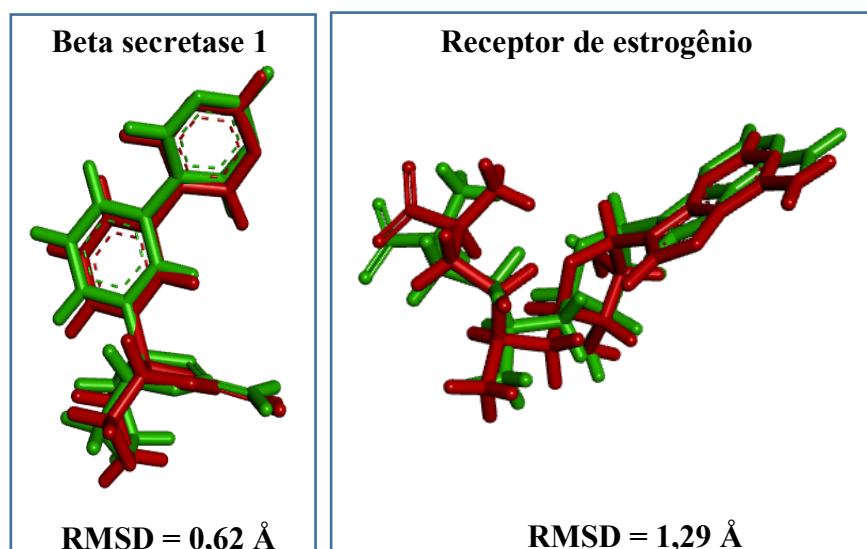
Molécula de consulta	Alvo Molecular	Código PDB	Resolução (Å)	Ligante	Referências
Aurapteno	Beta-secretase 1	4L7G	1,38	1w0 ^{*1}	<u>HUESTIS</u> et al., 2013
Sesamina	Araquidonato 15-lipoxigenase	3V99	2,25	ACD ^{*2}	<u>GILBERT</u> , et al., 2012
Estigmasterol	Receptor de estrogênio	3CBP	1,42	SFG ^{*3}	<u>SUBRAMANIAN</u> et al., 2008
β-sitosterol	Receptor de estrogênio	3CBP	1,42	SFG ^{*3}	<u>SUBRAMANIAN</u> et al., 2008

*1(3aS, 7aR) -7a- [3- (pirimidin-5-il) fenil] -3a, 6,7,7a-tetra-hidro-4H- pirano [4,3-d] [1,3] oxazol-2- amina,*2 Ácido araquidônico, *3 Sinefugina

Uma forma de avaliar a eficiência do acoplamento é através do reacoplamento, com o objetivo de medir através do RMSD a capacidade do algoritmo de busca/função de pontuação, identificar uma pose com as coordenadas próximas/idênticas à do ligante cristalográfico. Resultados de RMSD ≤ 2 Å são considerados aceitáveis na avaliação de um método de acoplamento (BROZELL et al., 2012). Portanto, os valores de RMSD foram utilizados para avaliar as poses obtidas pela rotina de acoplamento molecular através do DOCK 6.8 para os

sistemas em estudo, desta forma pode-se observar os valores de RMSD para cada alvo selecionado na figura 58.

Figura 59 - Valores de RMSD (Å) obtido para o programa DOCK, após o reacoplamento de cada alvo selecionado pelo ChemProt 2.0. Configuração cristalográfica em vermelho e reacoplamento em verde. Beta secretase 1 selecionado para a molécula aurapteno e Receptor de estrogênio selecionado para β -sitosterol e estigmasterol



Observa-se que os reacoplamentos foram realizados de forma adequada para Beta secretase 1 e Receptor de estrogênio, como pode ser verificado pelos valores de RMSD obtidos, com isso a pose gerada pelo DOCK 6.8 não se distanciou ($\text{RMSD} > 2 \text{ \AA}$) da pose cristalográfica, uma vez que o valor de RMSD obtido para Beta secretase 1 e Receptor de estrogênio foi de 0,62 e 1,29 Å, respectivamente. Entretanto, para o Araquidonato 15-lipoxigenase alvo selecionado no PDB para a molécula teste sesamina o programa não foi capaz de reproduzir a pose dentro dos limites de RMSD aceitáveis, obtendo-se o menor valor de 8,05 Å, o que indica que o método de acoplamento realizado não foi considerado confiável para o acoplamento desta molécula. O que pode-se inferir, que a dificuldade na reprodução da pose pelo programa pode estar relacionado a alta flexibilidade estrutural do ligante Ácido araquidônico, em que apresenta em sua estrutura uma longa cadeia alquímica e vários ângulos torcionais o que dificulta a atuação do programa. Desta forma, não foi possível dar continuidade as análises deste alvo frente a molécula teste sesamina através do acoplamento molecular.

4.4.4 Avaliação das interações entre os alvos

4.4.4.1 Beta-secretase 1 (BACE-1)

A Beta-Secretase (*Beta site APP Cleaving Enzyme*), ou BACE-1 é uma proteína transmembrana do tipo 1, pertencente à família aspartil protease, expressa na maioria das células e tecidos, e desenvolve atividade principalmente nos tecidos nervoso e em células neuronais. Tem a capacidade de clivar a proteína precursora de amiloide (APP), produtora do peptídeo A β (peptídeo neurotóxico no cérebro), através da via amiloidogénica da célula. É considerada um dos principais alvos terapêuticos promissores para o tratamento da doença de Alzheimer (DA), visto que possui atividade elevada no cérebro de pacientes com DA, induzindo a uma produção excessiva de A β no cérebro. Desta forma, ao ser inibida (BACE-1), é interrompida a produção de A β e modificada a forma patogénica da doença. Portanto, cada vez mais tem-se intensificado pesquisas no planeamento de novos fármacos, principalmente em busca por inibidores efetivos da BACE-1 no tratamento e prevenção da DA (VASSAR; KANDALEPAS, 2011; MANCINI, SIMONE, ANDRISANO, 2011).

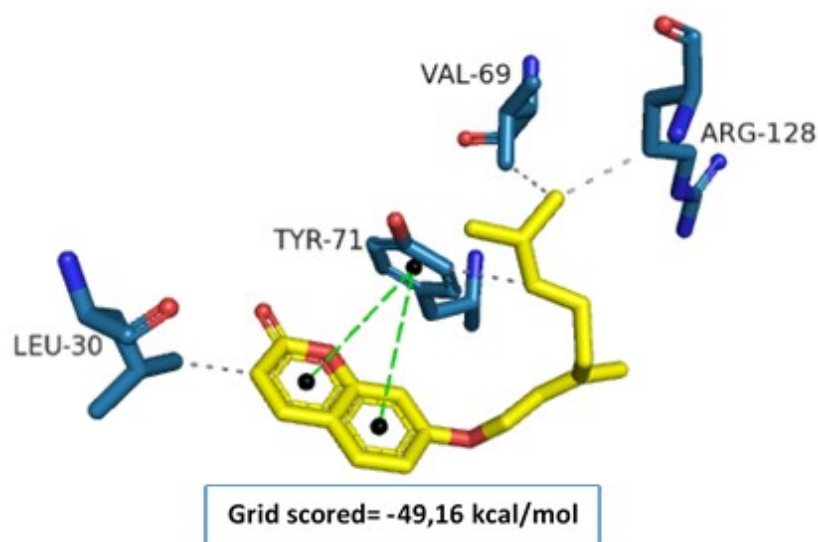
Tendo em vista que dados em literatura relatam que as classes estruturais de dihidrotiazina e dihidropirimidinona apresentam potenciais inibidores da BACE-1, Huestis e colaboradores (2013) obtiveram por síntese, compostos bicíclicos de amino oxazolina, sendo que, os compostos obtidos com sistemas de anel condensado ciclohexil e tetrahidropiranyl apresentaram melhores afinidades de ligação para BACE-1 e constataram que os mesmos exibiram inibição micromolar ($IC_{50} < 100 \mu M$) frente ao alvo BACE-1. Os autores, determinaram a estrutura cristalográfica dos complexos amino oxazolina obtidos e o alvo BACE-1, com à resolução de 1,38 e 1,7 Å e forneceram informações sobre seu modo de ligação, assegurando que o grupo funcional amino oxazolina seria capaz de interagir com os ácidos aspárticos catalíticos no local do sítio ativo de BACE-1.

Em estudos realizados por Jung e colaboradores (2015), avaliaram a capacidade de 118 compostos em controlar a produção de A β no cérebro, dentre eles se destaca apenas a cumarina aurapteno, que apresentou a capacidade de aumentar a produção de A β e a relação A β 42/40, mas não altera a expressão e atividade de BACE -1. Assim como, tendo em vista a citotoxicidade do aurapteno relatada na literatura frente a células tumorais, os autores verificaram diante dos resultados apresentados, que a citotoxicidade do aurapteno não desempenha papel na indução da produção de A β . Contudo, ainda neste estudo observou que a ativação mediada por aurapteno

de quinase c-Jun N-terminal (JNK) pode contribuir para a produção de A β , promovendo a atividade da γ -secretase. Neste sentido, os autores concluíram que os resultados confirmam a probabilidade de que o JNK possa ser um alvo terapêutico importante para a DA.

No acoplamento molecular da cumarina aurapteno com a BACE-1 observa-se a formação de interações hidrofóbicas com os resíduos Leu30, Arg128, Val69 e Tyr71. A primeira interação hidrofóbica ocorre entre o anel pirano da molécula e a metila da cadeia lateral da Leu30. Além disso, duas interações hidrofóbicas ocorrem com a metila terminal da cadeia carbônica da cumarina com a metila da cadeia lateral da Val69, e com a cadeia lateral de Arg128. Duas interações π -perpendicular são observadas entre o anel aromático de Tyr71 e os anéis cumarínicos (Figura 60).

Figura 60 - Perfil de interação intermoleculares do aurapteno com β -secretase. Resíduos: azul; ligante: amarelo; interações hidrofóbicas: linhas pontilhadas cinza; interações π -perpendicular: linhas tracejadas verdes



A proteína BACE-1 é caracterizada por apresentar dois ácidos aspárticos (Asp) próximos um do outro, Asp32 e Asp228 que são responsáveis pela ação catalítica desta enzima. Seu sítio ativo possui zonas hidrofílicas com pequenas zonas hidrofóbicas (COELHO 2013; PAKER, LEE, 2003). Apesar da cumarina não apresentar interações importantes com os resíduos Asp32 e Asp228, o mesmo apresentou interações hidrofóbicas no sítio ativo da BACE-1. Sendo que duas interações hidrofóbicas com os resíduos Tyr71, Leu30 foram semelhantes ao ligante cristalográfico. Assim como, o cálculo do acoplamento molecular corrobora aos resultados obtidos dos perfis de interação, em que o aurapteno apresentou valor de energia de

afinidade (Grid scored =-49,16 kcal/mol) próxima ao demonstrado pelo ligante cristalográfico (Grid scored =-46,72 kcal/mol).

4.4.4.2 Receptor de estrogênio (ER)

Os receptores de estrogênio (RE) são proteínas de transcrição que fazem parte da classe dos receptores de hormônios esteroidais (glicocorticoides, mineralocorticoides, progesterona, estrogênio e androgênios), que regula a reprodução e desempenha um papel regulador na função do sistema nervoso central, bem como, na manutenção da densidade óssea e imunidade, dentre outros. Existem dois subtipos do RE em humanos, hER α (expresso no útero, ovários, mamas e fígado) e hER β (o único receptor encontrado no trato gastrointestinal) e são membros da superfamília de receptores nucleares hormonais ligantes dependentes, da qual fazem parte outros receptores hormonais tais como; os receptores tireoideanos (TH), do ácido retinóico (RAR) e Vitamina D (VDR) (PHILLIPS et al, 2011).

Alguns exemplos de estrogênios naturais que atuam em RE como estrona, estriol e em destaque o 17 β -estradiol, tem sido utilizado na terapia de reposição hormonal em mulheres pós menopausicas para o tratamento da osteoporose. Apesar de ser efetivo a terapia com reposição hormonal, estudos tem associado a risco aumentado de doenças cardiovasculares e de câncer de mama e endometrial. Portanto, com o objetivo de apresentar os efeitos positivos dos estrogênios nos tecidos-alvo e diminuir os potenciais efeitos colaterais gerados pelo seu uso prolongado, vários moduladores seletivos dos receptores estrogênicos (MSREs) tem sido desenvolvidos e utilizados (PARDINI, 2014; FANG et al, 2008).

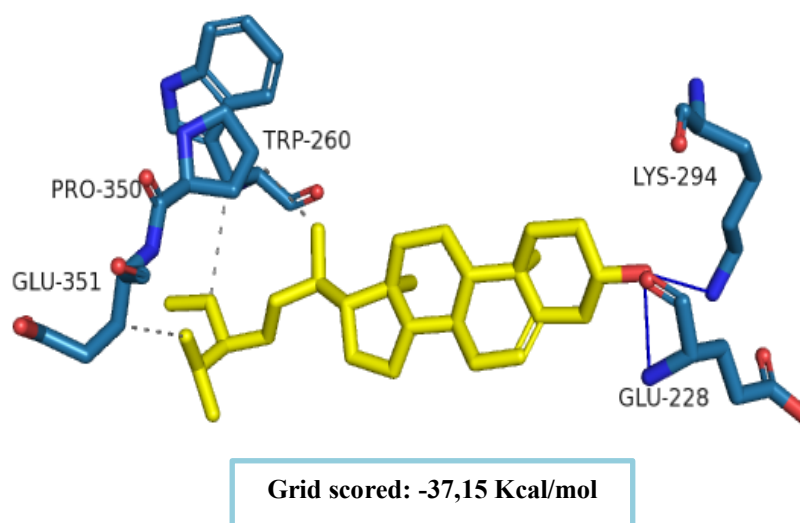
Os MSREs são fármacos que agem seletivamente aos RE e atuam como agonistas em determinados tecidos (ex tecido ósseo) e como antagonistas do estrógeno em outros (útero e mamas). Pelo fato de atuarem como antagonistas estrogênicos na mama, a exemplo do Tamoxifeno e raloxifeno (indicado no tratamento da osteoporose em mulheres na pós-menopausa), têm se mostrado eficaz na redução do risco de câncer de mama positivo para receptores de estrógeno (SILVA et al., 2016; FERREIRA et al, 2011).

Estudos realizados por Awad e colaboradores (2008) investigaram os efeitos do β -sitosterol (fitoesterol) e do tamoxifeno no crescimento celular e no metabolismo de ceramida nas células de câncer de mama humano MCF7 e MDA-MB-231, e constataram que o β -sitosterol aumenta a eficácia do tamoxifeno em células de câncer de mama afetando o

metabolismo da ceramida, sugerindo assim, que o regime combinado de β -sitosterol dietética e quimioterapia com o tamoxifeno pode ser benéfico no tratamento de pacientes com câncer de mama.

As interações do β -sitosterol com o RE ocorrem através de interações hidrofóbicas com a cadeia lateral alifática do grupo metil do β -sitosterol e a cadeia lateral dos resíduos Trp260, Pro350 e Glu351. Além disso, há também um número de ligações de hidrogênio específicas, pois, resíduos polares na proximidade do ligante desempenham um papel importante na ligação da molécula β -sitosterol, através de ligações de Hidrogênio (SUDHAMALLA et al., 2010). No complexo descrito, tais interações ocorreram entre o grupo hidroxila (-OH) do C-3 de β -sitosterol e Glu228 e Lys294 do RE, sendo duas com o oxigênio carbonílico do resíduo de Glu228 e uma com o nitrogênio da amina da cadeia lateral de Lys294 (Figura 61).

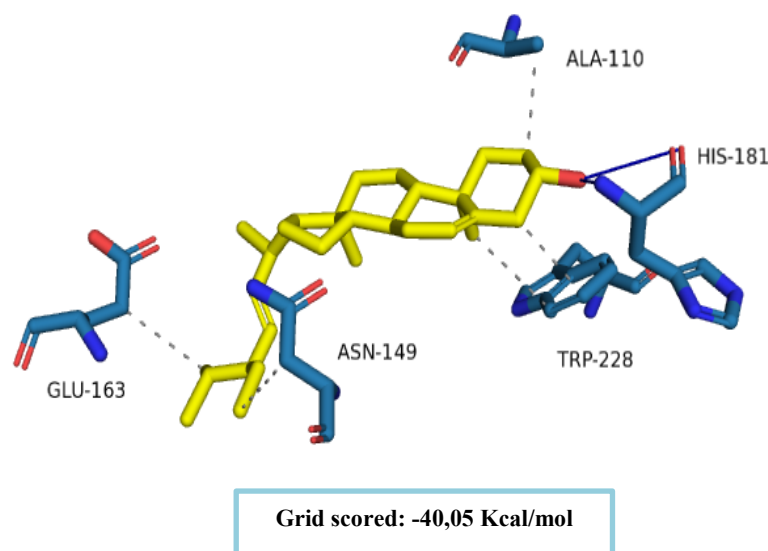
Figura 61 - Perfil de interação intermoleculares do β -sitosterol com receptor de estrogênio Resíduos: azul; ligante: amarelo; ligações hidrofóbicas: linha pontilhada cinza; interações de hidrogênio: linha azul



O fitoesterol estigmasterol acoplado com o mesmo alvo (RE) apresentou perfil de interação similar ao β -sitosterol, porém com resíduos diferentes. O acoplamento do estigmasterol com o RE apresentou principalmente interações hidrofóbicas com os resíduos Glu163, Asn149, Trp228 e Ala110 e uma ligação de hidrogênio His181. Interações hidrofóbicas ocorrem com o grupo metil da cadeia lateral alifática de estigmasterol e a cadeia lateral dos resíduos Glu163 e Asn149. Além disso, ligações hidrofóbicas ocorrem entre o anel D do núcleo esteroidal de estigmasterol e a o anel aromático da cadeia lateral do Trp228. Assim como, uma ligação de hidrogênio também ocorreu entre o grupo hidroxila (-OH) do C-3 de estigmasterol e o ácido carboxílico da cadeia lateral de His181 do RE (Figura 62)

No estudo realizado por Subramanian et al (2008), foi acoplado o hRE α (PDB: 3CBP) com a molécula de Sinefugina (SGU) apresentando resolução de 1,42 Å. A SGU isolado a partir de culturas de nucleósidos naturais de *Streptomyces incarnatus* e *S. griseolus*, é estruturalmente relacionada com a S-adenosil e S-adenosilmetionina. Esse estudo demonstra a regulação do receptor de hormônio nuclear pela metilação da lisina. No acoplamento do complexo SGU com hRE α , os autores observaram que a molécula está acoplada na unidade de aminoácidos através de pontes salinas e ligações de hidrogênio. Além disto, enfatizam a importância destas interações, com a presença da Lys302 inserida no canal estreito em que o átomo de nitrogênio está próximo ao doador de metil.

Figura 62 - Perfil de interação intermoleculares do estigmasterol com receptor de estrogênio. Resíduos: azul; ligante: amarelo; ligações hidrofóbicas: linha pontilhada cinza; interações de hidrogênio: linha azul



O perfil de interação obtido pela submissão do complexo (PDB 3CBP) no servidor PLIP apresentou predominância de interações de ligações de hidrogênio com os resíduos Glu228, His293, Asn296, His297, Lys302 e Glu356 e ponte salina com resíduo Lys294. Apenas uma interação hidrofóbica ocorre com resíduo Tyr335. No entanto, observa-se que as moléculas teste (β -sitosterol e estigmasterol) apresentaram interações intermoleculares com resíduos parecidos, porém com ligações diferentes aos observados do complexo cristalográfico, tendo a predominância de ligações hidrofóbicas. Como também não foram observadas ligações de ponte salinas no acoplamento destas moléculas com o RE.

Estudos que relatam sobre a cristalografia de RE demonstram que a cavidade de interação com ligantes situa-se em uma das extremidades da estrutura e é praticamente idêntica nos dois subtipos do RE, composto por α – hélice. Além disto, a alta flexibilidade da cavidade de interação do RE possibilita a interação com moléculas estruturalmente diversas. Além da afinidade pela cavidade, esses compostos podem apresentar diferentes atuações para produzir a alteração conformacional adequada do domínio de ligação do ligante (LBD) e consequentemente o efeito biológico. Assim, alterações conformacionais na cavidade do sítio e principalmente na posição N-terminal da hélice 12, são maiores determinantes das propriedades agonistas e antagonistas das substâncias capazes de modular os RE (SALUM, OLIKARPOV, ANDRICOPULO, 2007).

A energia de acoplamento mostra que há diferença entre as interações obtidas pelo ligante SGU do complexo e as moléculas teste. O complexo apresentou o maior valor de energia de afinidade (Grid scored = -67,98 Kcal/mol) já as moléculas de consultas β -sitosterol (Grid scored = -37,15) e estigmasterol (Grid scored = -40,05 Kcal/mol) apresentaram valores próximos entre elas. Contudo, não descarta a ideia destas moléculas testes apresentarem potencial ação biológica frente aos REs, tendo em vista que os fitoesteroides apresentam afinidades na cavidade ativa dos RE e a depender dos tipos de RE, bem como, características dos ligantes podem apresentar diferentes efeitos biológicos.

4.4.5 Seleção de alvos baseado no receptor (DRAR-CPI)

Na tabela 24 são apresentados os potenciais alvos indicados no servidor DRAR-CPI. A função de pontuação do servidor preconiza afinidade quando o Z'-score foi inferior a -0,5, como também avalia a potencial afinidade considerando que menores valores de Z'-score apresentam maior potencial afinidade para o alvo molecular, neste sentido foram selecionados um alvo para cada molécula de consulta. Os códigos em PDB são fornecidos pelo servidor.

Tabela 24 – Alvos com melhores pontuações obtidos no servidor DRAR-CPI para as moléculas Aurapteno, sesamina, hesperidina, estigmasterol e β -sitosterol

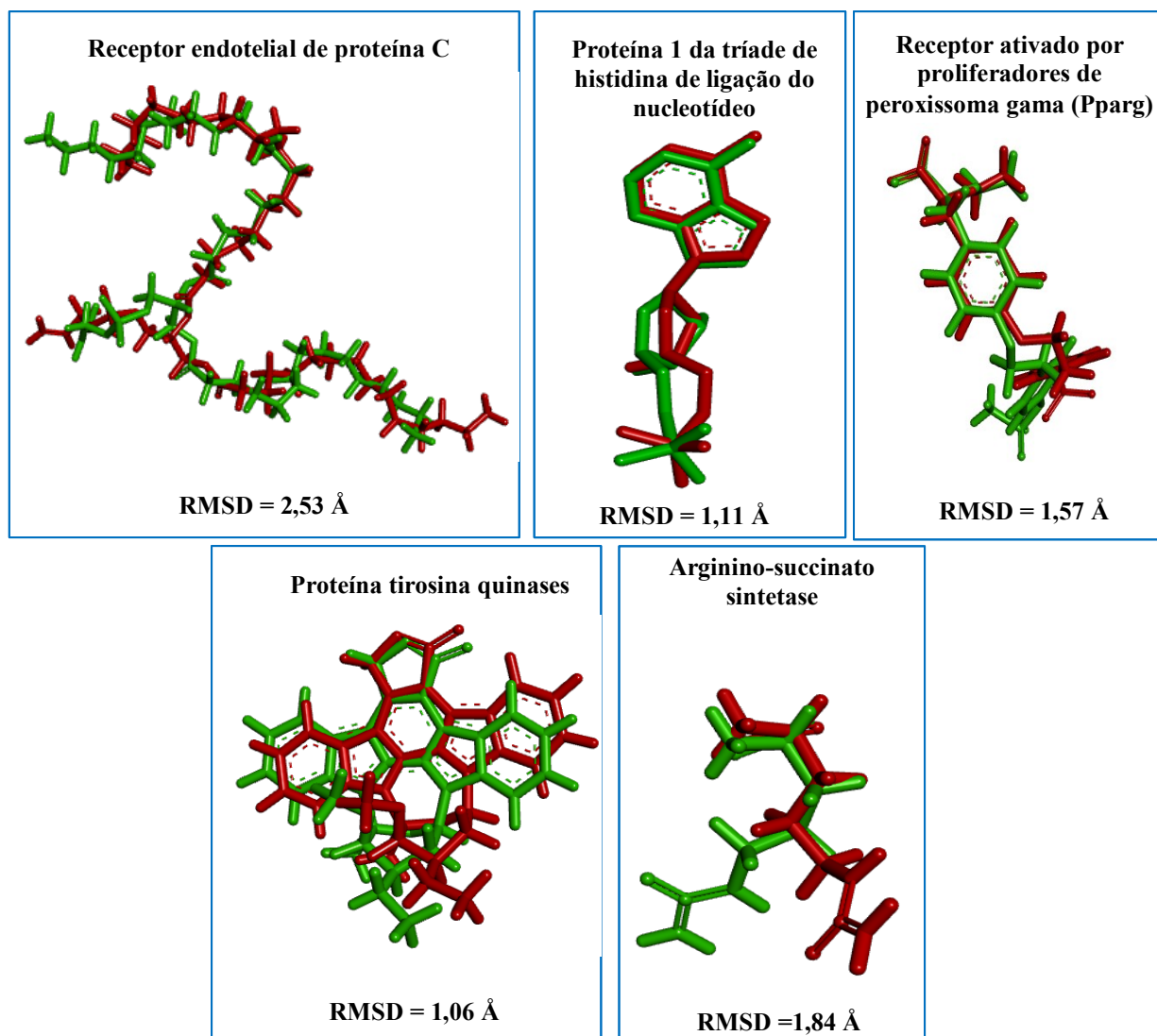
Molécula de consulta	Alvo molecular	Código PDB	Pontuações de acoplamento	Z'-score
Aurapteno	Receptor endotelial de proteína C	1LQV	-515.264	-224,769
Sesamina	Proteína 1 da tríade de histidina de ligação do nucleotídeo	1KPF	-404.133	-283,364
Hesperidina	Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (Pparg)	1I7I	-75.362	-283.407
Estigmasterol	Arginino-succinato sintetase	2NZ2	-581.055	-273.581
β-sitosterol	Proteína tirosina quinases	1BYG	-526.366	-263.903

4.4.5.1 Acoplamento molecular (DRAR-CPI)

Após seleção dos alvos indicados pelo servidor DRAR-CPI, as moléculas de consulta e os respectivos ligantes obtidos pelo PDB também foram submetidos ao acoplamento molecular utilizando o programa DOCK 6.8, com o objetivo de avaliar os perfis de interação das moléculas em estudo com os alvos selecionados, assim como, os valores de Grid Score.

Desta forma, pode-se observar na figura 63 que a partir dos valores de RMSD dos alvos selecionados, o programa obteve eficiência em reposicionar a molécula no sítio ortostérico da proteína na mesma região e com a configuração espacial semelhante, com exceção para o Receptor de proteína C endotelial que não teve a capacidade de reproduzir a orientação experimental do ligante em relação aos observado no complexo, apresentando o valor de RMSD relativamente baixo (RMSD = 2,53 Å), o que esta associado a alta flexibilidade desta estrutura (Figura 63).

Figura 63 - Representação esquemática da pose do ligante cristalográfico (verde) e do reacoplamento molecular (Vermelho) com RMSD (Å), figura gerada no UCSF Chimera 1.9



4.4.5.2 Avaliação das interações das moléculas de consulta e os alvos selecionados

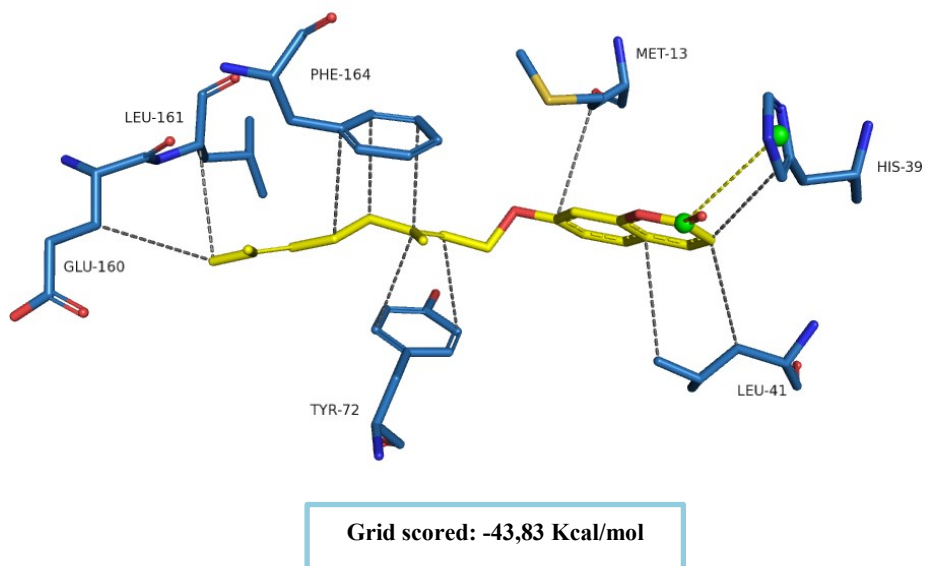
4.4.5.3 Receptor endotelial de proteína C (EPCR)

Os receptores endoteliais de proteína C (EPCR) desempenham papel essencial como um regulador da via anticoagulante através do sistema proteína C ativada (aPC). Neste sentido, a Proteína C localizada na superfície das células endoteliais é ativada através do complexo trombomodulina-trombina e potencializada através da ligação com seu receptor específico no endotélio (EPCR). A aPC tem ação antitrombótica, anti-inflamatória e pró fibrinolítica.

Contudo, deficiências de PC, ou algum tipo de resistência a APC podem desencadear em vários estados patológicos como lesões ateroscleróticas, acidente vascular cerebral, sepse e coagulação disseminada, sendo estes um dos grandes problemas de saúde pública atualmente (BARRANCO-MEDINA et al., 2017);

O acoplamento intermolecular do aurapteno com o Receptor de proteína C endotelial apresentou principalmente interações hidrofóbicas e uma ponte salina. Interações hidrofóbicas ocorrem com a cadeia prenilada da molécula e a cadeia lateral dos resíduos Glu160 e Leu161, além disso três ligações com o anel aromático de Phe164 e duas com Tyr72 podem ser observadas. Ligações hidrofóbicas também ocorrem com o átomo de C-7 substituído do anel cumarínico e o Carbono central do grupo amino básico do resíduo Met13 além de duas interações hidrofóbicas com o anel cumarínico (anel pirano) da molécula e a cadeia lateral de Leu41. Duas interações ocorrem com o anel aromático do resíduo His39, sendo uma ligação hidrofóbica com átomo de Oxigênio carbonílico (C=O) do anel cumarínico (C2) e interações ponte salina com o anel pirano da molécula (Figura 64).

Figura 64 - Perfil de interação intermoleculares do Aurapteno com Receptor de proteína C endotelial. Resíduo: azul; ligante: amarelo; ligações hidrofóbicas: linha pontilhada cinza; ponte salina: linha tracejada amarela



Estudos realizados por Oganessian e colaboradores (2002), avaliaram as estruturas cristalográficas do EPCR na forma APO e também em complexo com o domínio de ligação fosfolipídica da proteína C, dos quais apresentaram resolução de 2,0 Å e 1,55 Å respectivamente. Neste estudo, permitiram identificar o fosfolípido ligado, como a fosfatidiletanolamina (PTY), onde as cadeias laterais de ácido graxo do lípido interagem com

os resíduos hidrofóbicos dentro da cavidade ativa. Interações hidrofóbicas envolvem os resíduos Leu82, Tyr154, Thr157, Leu82 e Leu8, como também ligações de hidrogênio entre EPCR e a proteína C incluem os resíduos Gln150, Arg87 e Tyr154. A ligação da proteína C ao EPCR é dependente do Ca^{2+} que podem auxiliar nas interações de ligação de hidrogênio com EPCR e estabilizar a alça hidrofóbica da proteína C, dos quais os resíduos Phe4 e Leu8 dentro dessa alça contribuem com a maioria das interações com o EPCR.

O perfil de interação obtido pela submissão no servidor PLIP do complexo, tendo o alvo EPCR acoplado ao ligante PTY (PDB 1LQV), apresentou maior número de interações do que os apresentados pelos autores supracitados, visto que estes não trazem as interações de ponte salina formadas pelos resíduos Arg156, como também não apresentou ligação de hidrogênio com o resíduo Glu163. Ligações hidrofóbicas também ocorreram, dentre elas destaca-se as ligações com os resíduos Leu161, Leu41, Phe164, Tyr72, Met13 também apresentada pela molécula de consulta aurapteno.

Os resultados encontrados no cálculo de energia de acoplamento mostram que o ligante PTY apresenta resultado significativamente maior (Grid score = -107,20 Kcal/mol) que o obtido pela molécula de consulta (Grid score = -43,83 Kcal/mol), sugerindo que a cumarina aurapteno tenha atividade inferior ao ligante PTY sobre o alvo em questão.

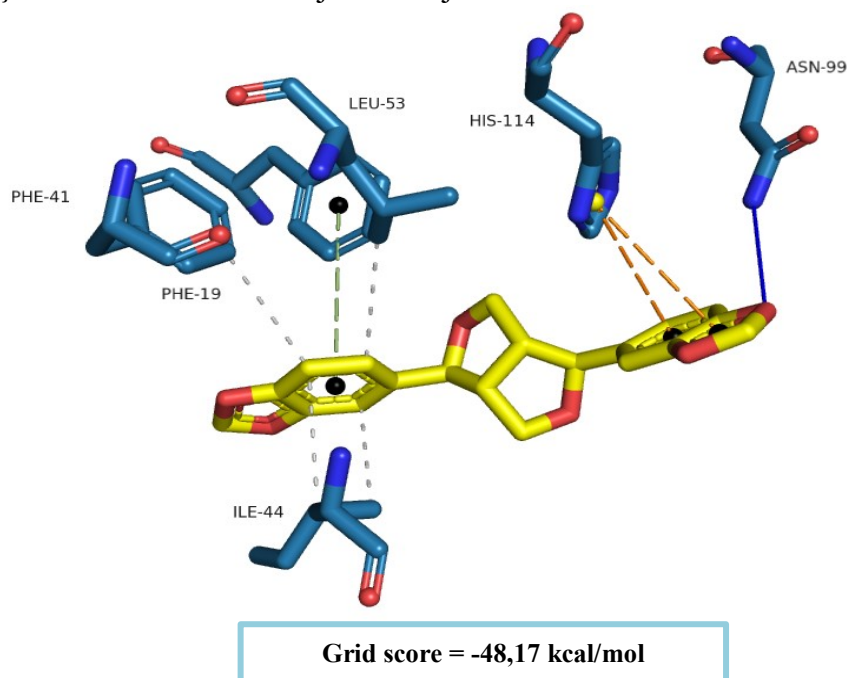
4.4.5.4 Proteína 1 da tríade de histidina de ligação do nucleotídeo

A proteína 1 da tríade de histidina de ligação do nucleotídeo (HINT1), pertencente à superfamília enzimática da tríade de histidina, desempenha suas atividades enzimáticas como hidrolase ou transferase. No entanto, suas funções fisiológicas ainda não foram totalmente esclarecidas. Além das funções enzimáticas, a HINT1 tem atuado em humanos como gene supressor de tumores, principalmente em células de melanoma (LI et al., 2005). Bem como, estudos indicam que a HINT1 pode estar relacionada a várias doenças do sistema nervoso central e periférico, implicando em algumas doenças neuropsiquiátricas, em destaque a esquizofrenia, transtorno de humor, neuropatias periféricas hereditárias, dependência de drogas e síndrome de Down (DANG, et al., 2017; LINDE et al, 2013).

O acoplamento da lignana sesamina com o alvo HINT1, apresenta interações hidrofóbicas entre o anel aromático da sesamina e os resíduos Phe19, Phe41 e Ile44. Uma interação π -paralela pode ser observada entre o anel aromático da sesamina e o anel de Phe19. Apenas uma ligação de hidrogênio foi observada entre o átomo de Oxigênio do anel heterocíclico (no grupo

metilenodioxí) da molécula e a amina de Asn99. Duas ligações π -cátion ocorreram entre o anel imidazólico da His114 e o anel aromático e heterocíclica de sesamina (Figura 65).

Figura 65 - Perfil de interação intermoleculares da sesamina com Proteína 1 da tríade de histidina de ligação do nucleotídeo. Resíduo: azul, ligante: amarelo; ligações hidrofóbicas: linha pontilhada cinza; interações de hidrogênio: linha azul; interações π -paralelas: linha tracejada verde; interações π -cátion: linha tracejada laranja



Estudos realizados por Lima, Klein e Hendrickson (1997), observaram o perfil de interação intermoleculares do HINT1 (PDB ID: 1KPF) acoplado com o ligante Adenosina monofosfato (AMP). Sendo possível observar que o AMP apresenta ligações de hidrogênio com os resíduos His51, His112, Asp43, His114 e Asn99 da HINT1. Assim como, a submissão do complexo (PDB 1KPF) no servidor PLIP apresentou além das interações de hidrogênio relatadas pelos autores supracitados, outras interações do tipo π -paralelas com resíduo Phe19 e ponte salina com His112 e His114 foram observadas.

Como pôde ser visto, o perfil de interações apresentado pela lignana sesamina demonstrou semelhanças com o do ligante do complexo nos resíduos Phe19, Ile44, His114 e Asn99, porém com tipo de ligações diferentes. Apenas uma ligação de hidrogênio com a molécula teste e o HINT1 foi observada. Como também, nenhuma interação π -cátion foi observada no acoplamento do complexo. Contudo, o valor de energia de acoplamento molecular corrobora com os resultados obtidos dos perfis de interação, mostrando que a sesamina apresentou valores de energia (Grid score = -48,17 kcal/mol) semelhante ao ligante do

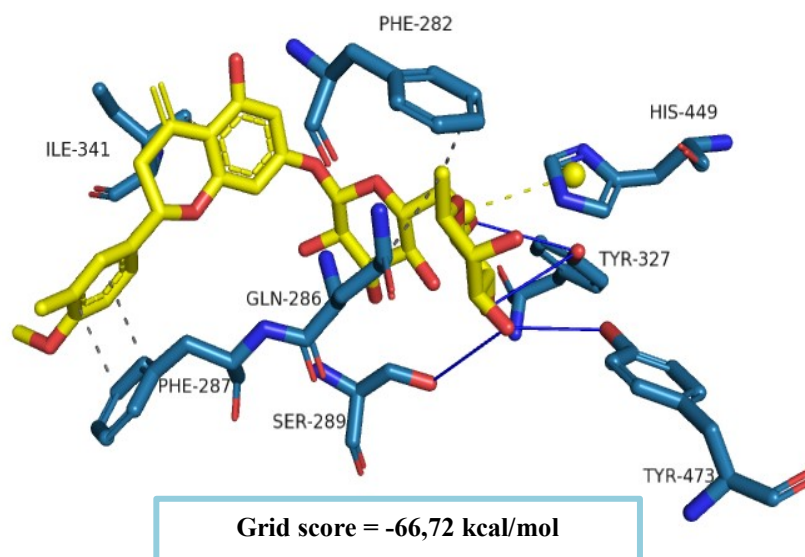
complexo cristalográfico (Grid score = -48,74 kcal/mol), dessa forma, sugere-se que a sesamina apresenta potencial ação frente ao alvo HINT1.

4.4.5.5 Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPARG)

Os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs) são fatores de transcrição ligantes dependentes que fazem parte da super-família de receptores nucleares hormonais. Os receptores nucleares PPARs incluem 3 membros, PPAR alfa, beta e gama, que são codificados por distintos genes (CRONET et al., 2001; SEKULIC-JABLANOVIC et al., 2017). A Pparg é expressa com frequência em tecido adiposo e em menor quantidade no coração, cólon, fígado, baço, intestino, músculo esquelético, rins e macrófagos e apresenta papel essencial na adipogênese e homeostase metabólica em humanos (QUEIROZ, 2009; ESCHER et al., 2001). Atua em diversas funções fisiológicas, como diferenciação e proliferação, reparo tecidual, função vascular, inflamatória, além de estar envolvida em estados patológicos, entre elas a dislipidemias, hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus tipo 2, inflamações crônicas, arteriosclerose e câncer (ICRE, WAHLI, MICHALIK et al, 2006).

No acoplamento da flavonona hesperidina com a PPARG foi possível observar que ocorre interações hidrofóbicas com os resíduos Ile341, Ile326, Phe282, Arg288. Na porção flavonoídica são observadas apenas as interações hidrofóbicas com os resíduos Phe287 e Ile341, sendo que a primeira ocorre no anel aromático B do núcleo flavonoídico e o anel aromático da cadeia lateral do resíduo Phe287, e a segunda com o átomo de C central de Ile341. Demais interações hidrofóbicas ocorrem na porção glicosídica da molécula. Assim como, ligações de hidrogênio também foram observadas na porção glicosídica, essas interações ocorrem com os resíduos Tyr327, Tyr473, Ser287. Interações ponte salina ocorrem com o anel imidazólico da cadeia lateral do resíduo His449 e a porção glicosídica da molécula (Figura 66).

Figura 66 - Perfil de interação intermoleculares do ligante Hesperidina com Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPARG). Resíduos: azul; ligante: amarelo; ligações de hidrogênio: linha azul; interações hidrofóbicas: linha tracejada cinza; pontes salinas: linha pontilhada amarela



Estudos realizados por Cronet e colaboradores (2001) determinaram a estrutura cristalográfica do domínio de ligação do ligante de PPAR α em complexo com AZ242, um novo composto com atividade agonista em PPAR α e PPAR γ . Os autores verificaram que o ligante AZ242 acoplado a PPAR apresentaram em sua maioria interações hidrofóbicas, embora ligações de hidrogênio ao redor do grupo hidrofílico do agonista parece ser importante para a atividade e especificidade do ligante, podendo destacar o resíduo Tyr314 que participa do padrão de ligação de hidrogênio, sendo de fundamental importância para atuação do ligante frente ao alvo. Como também ligações de hidrogênio ocorrem entre o grupo carboxilato de AZ242 e o resíduo Tyr464.

O perfil de interação obtido pela submissão do complexo (PDB 1I7I) no servidor PLIP mostrou resultado semelhante ao acoplamento da molécula teste e o alvo PPAR. Podendo destacar as interações hidrofóbicas com os resíduos Phe282 e Ile341 e ligações de hidrogênio com o resíduo Tyr473. Além disto, pôde-se observar ligações ponte salina com os resíduos His323 e His449, sendo este último semelhante a molécula teste. Esse perfil de interação é refletido pelo resultado obtido no cálculo de energia de acoplamento, onde a lignana hesperidina apresentou resultado próximo (Grid score = -66,72 kcal/mol) ao ligante AZ242 do complexo (Grid score = -69,29 kcal/mol), demonstrando que a molécula teste apresente potencial atuação agonista frente ao alvo PPAR.

Estudos tem relatado sobre diversas atuações que a flavonona hesperidina podem desencadear em relação ao receptor PPAR γ . Atividade agonista parcial em relação ao receptor (PPAR γ) foi relatado para hesperitina-7-O- β -D-glucuronido e hesperitina-3-O- β -D-glucuronido, que são compostos metabolizados a partir da hesperidina (GAMO et al., 2014). Evidências para o envolvimento de mecanismos PPARc-dependente e independente de PPARc nas habilidades pro-apoptóticas e antiproliferativas da hesperidina foi apresentado, sugerindo que a molécula pode ser desenvolvida como agente contra malignidades hematopoiéticas (GHORBANI et al., 2012; NAZARI et al., 2011). Assim como, Akiyuama e colaboradores (2009) demonstram o potencial efeito hipoglicemiante e hipolipidécicos da hesperidina em ratos diabéticos tipo 2, alterando em partes a expressão dos genes que codificam o PPARs, HMG-CoA redutase e o receptor LDL. Além disto, Agrawal et al., (2014) sugere que a hesperidina reduz o estresse oxidativo, a apoptose e melhora a função cardíaca através da via do PPAR-c. Como também, estudo realizado por Mahmoud, (2014) determina o efeito protetor contra a hepatotoxicidade induzida por ciclofosfamida (CYP), através da regulação da expressão do PPAR γ hepático e da anulação da inflamação e do stress oxidativo.

4.4.5.6 Arginino-succinato sintetase (ASS)

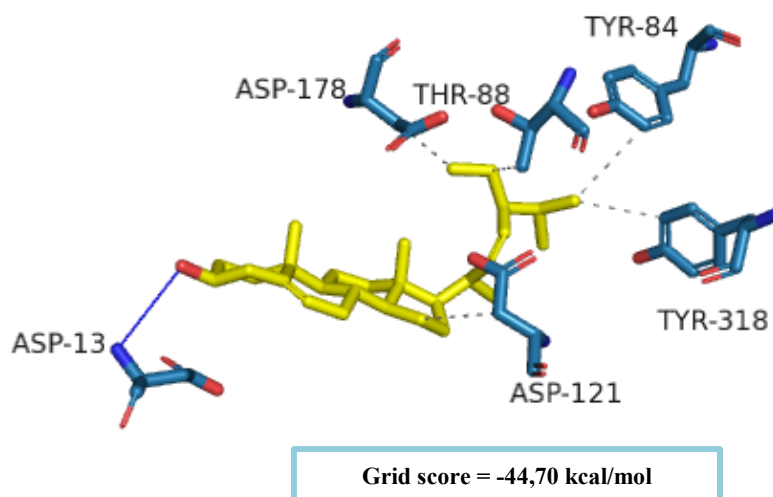
A argininosuccinato sintetase é uma enzima essencial limitante de taxa na síntese do aminoácido arginina. As etapas finais da síntese de arginina fazem parte do ciclo da ureia, responsável pelo mecanismo de eliminação da amônia (conversão da amônia em uréia). Essa enzima catalisa a transformação de citrulina e aspartato em argininosuccinato e pirofosfato usando a hidrólise de ATP em AMP e pirofosfato. Este processo enzimático constitui o passo limitante da velocidade nos ciclos de uréia e arginina-citrulina (KARLBERG et al., 2007). Contudo, alterações nessas enzimas podem causar um aumento dos níveis de amônio circulante (hiperamonemia) e conseqüentemente, no desenvolvimento de doenças a exemplo da citrulinemia do tipo I, uma doença autossômica recessiva rara caracterizada por hiperamonemia neonatal, níveis elevados de citrulina e morte neonatal precoce. O tratamento para esta doença está atualmente limitado ao transplante hepático (HERRERA et al., 2017).

Kalberg e colaboradores (2008) determinaram a estrutura cristalográfica da argininosuccinato sintetase humana (hASS) e verificaram que a estrutura geral do hASS é altamente similar às estruturas bacterianas. A semelhança de sequência entre as enzimas

bacterianas e humanas tem sido utilizada para fornecer informações sobre os efeitos estruturais e funcionais das mutações clínicas observadas (LEMKE, HOWELL, 2001).

O fitoesterol estigmasterol acoplado com o alvo Arginino-succinato sintetase apresentou interações hidrofóbicas com os resíduos Asp178, Asp121, Thr88, Tyr84 e Tyr318. Interações hidrofóbicas ocorre com a cadeia lateral alifática do grupo metil de estigmasterol e o anel aromático da cadeia lateral dos resíduos Tyr84 e Tyr318. Além disso, interações hidrofóbicas ocorrem entre o anel D do núcleo esteroidal de estigmasterol e a cadeia lateral do Asp121. Apenas uma ligação de hidrogênio ocorreu entre o grupo hidroxila (-OH) do C-3 de estigmasterol e o nitrogênio da cadeia lateral de Asp13 (Figura 67).

Figura 67 - Perfil de interação intermoleculares do ligante Estigmasterol com alvo Arginino-succinato sintetase. Resíduos: azul; ligante: amarelo; ligações de hidrogênio: linha azul; interações hidrofóbicas: linha tracejada cinza



No estudo realizado por Kalberg et al (2007), foi acoplado a hASS (PDB: 2NZ2) com a molécula de citrulina (CIR) e aspartato (ASP) e verificaram que a molécula de citrulina está fortemente acoplada na unidade de aminoácido através de pontes salinas e ligações de hidrogênio às cadeias laterais de Glu270, Tyr282, Arg127, Asn123 e Tyr87. Ambos os átomos de N do grupo ureido (carbonila) são ligados ao hidrogênio ao grupo hidroxilo de Ser189. O estigmasterol, por sua vez, apresentou interações intermoleculares com resíduos diferentes aos observados da interação do ligante CIR e o alvo. Nenhuma interação com ponte salina foi observada, bem como ocorreu apenas uma ligação hidrofóbica. Com os resultados do cálculo de energia de acoplamento pode-se observar que o ligante CIR apresentou energia de

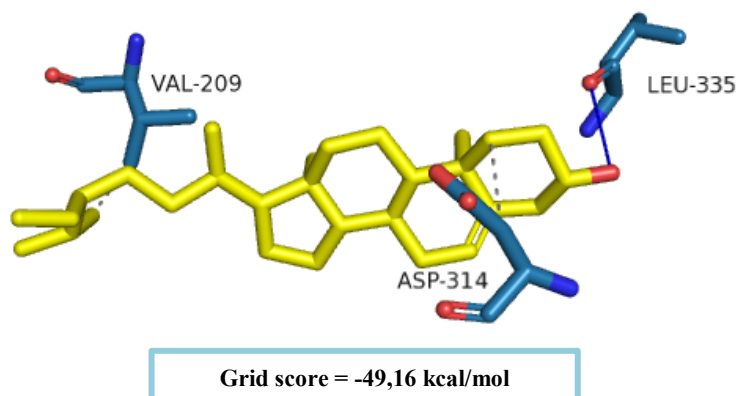
acoplamento próximo (Grid score = -46,96 kcal/mol) ao estigmasterol, portanto, mesmo ocorrendo interações com resíduos diferentes ao ligante do complexo, não se descarta a ideia de que o fitoesterol estigmasterol apresente potencial atuação ao alvo em questão.

4.4.5.7 Proteína tirosina quinases (PTK)

A proteína tirosina quinase (PTKs) é um grupo de enzimas de sinalização no processo de transdução de sinal celular que catalisa a transferência de um grupo fosfato da molécula de ATP (ATP- γ -fosfato) para os resíduos de tirosina presente num substrato proteico. A fosforilação de resíduos de tirosina tem a capacidade de modular a atividade enzimática e atuam regulando o crescimento celular, na diferenciação e morte, como também, em uma série de processos bioquímicos e fisiológicos. Portanto, a desregulação das vias de sinalização celular, causada geralmente por aumento e/ou diminuição da atividade ou expressão anormal de PTK, conduz a distúrbios de proliferação celular, no qual está relacionada à invasão tumoral, metástase e angiogênese tumoral. Em função do seu envolvimento nos processos celulares, as PTKs são consideradas importantes alvos terapêuticos para a prevenção do câncer, sendo muito utilizados como alvos na triagem de drogas antitumorais. Vários inibidores de PTKs apresentam potencial atividade antitumoral como a Estaurosporina, imatinibe, nilotinibe dentre outros (JIAO et al., 2018; KIM, BAEK, KIM, 2017).

Na Figura 68, pode-se observar o resultado do acoplamento desse alvo com a molécula de consulta β -sitosterol. Em que são observadas interações hidrofóbicas entre a molécula e os resíduos Val209 e Asp314. A primeira interação ocorre entre a cadeia lateral alifática do grupo metil C-27 de β -sitosterol e a cadeia ramificada do resíduo Val209, assim como, interação hidrofóbica ocorre entre o anel D do núcleo esteroidal de β -sitosterol e o carbono carboxílico de Asp314. Além disso, apenas uma ligação de hidrogênio ocorre entre a hidroxila do C-3 de β -sitosterol e o oxigênio da carbonila de Leu335.

Figura 68 - Perfil de interação intermoleculares de β -sitosterol com Proteína tirosina quinase. Resíduos: azul; ligante: amarelo; ligações hidrofóbicas: linhas pontilhadas cinzas; interações de hidrogênio: linhas azuis



Lamers e colaboradores (1999), determinaram a estrutura cristalográfica da PTK complexada ao seu inibidor, a estaurosporina (STU), possibilitando compreender os mecanismos catalíticos das proteínas tirosina quinases e consequentemente fornecer informações de fundamental importância para o desenvolvimento racional de potenciais inibidores da PTK. A estrutura consiste em um pequeno lobo N-terminal composto basicamente de uma folha beta e um lobo C-terminal maior, composto principalmente de uma hélice. A estrutura revela detalhes atômicos de interações com estaurosporina, que se liga em uma fenda catalítica profunda entre os lóbulos. A molécula de estaurosporina liga-se entre os lóbulos N-terminal e C-terminal, de uma fenda hidrofóbica pelos resíduos Val249, Leu321, Met269, Phe333, Ala220, Ile201, Gly202, Val209, Gly204 e Gly272. Assim como, ocorrem ligações de hidrogênio entre Met269, Glu267 e Arg318 e interações hidrofóbicas com as cadeias laterais de fendas menores. As interações entre o lobo N e C-terminal são mediadas pela molécula de estaurosporina e pelas ligações de hidrogênio. Além disso, apresentam várias moléculas de água que formam ligações de hidrogênio, que podem ser importantes para manter a integridade catalítica da quinase.

O fitoesteroide β -sitosterol, avaliado no presente estudo, apresentou apenas uma interação semelhante dos resíduos citados pelos autores em questão, a exemplo da interação hidrofóbica com o resíduo Val209. Por outro lado, o β -sitosterol também apresentou interações hidrofóbicas com Asp314 e de hidrogênio com Leu335 não apresentadas pelo ligante.

Os resultados encontrados no cálculo de energia de acoplamento mostram que a estaurosporina apresenta resultado próximo (Grid score = -54,36 kcal/mol) que o obtido pela

molécula de consulta (-49,16 kcal/mol). Porém o resultado obtido para o β -sitosterol não permite descartar a potencialidade da mesma como inibidor desta proteína. Além disto, estudo realizado por Zhang e colaboradores (2000), tem demonstrado efeitos inibitórios de β -sitosterol em PTK. Neste estudo os autores realizaram uma triagem de agentes anti-hipoxia / reoxigenação por um método *in vitro* e verificaram efeitos inibitórios de alguns compostos naturais na ativação de PTK, na prevenção de lesões induzida por hipoxia / reoxigenação na comunicação intercelular da junção endotelial, entre os compostos analisados, o β -sitosterol se destacou por apresentar efeitos inibitórios fortes na ativação de PTK

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho contribuiu para o conhecimento da composição química da espécie *Zanthoxylum caribaeum*, e conseqüentemente com a quimiotaxonomia do gênero *Zanthoxylum* e da família Rutaceae. Os resultados evidenciaram a presença de diferentes classes químicas nos extratos das folhas da espécie, como a presença de compostos fenólicos, taninos, flavonoides, cumarinas, alcaloides, saponinas, esteroides e triterpenos. Além disso, o estudo fitoquímico levou ao isolamento por técnicas cromatográficas e identificação por RMN ^1H , ^{13}C e IV de compostos fenólicos como o flavonoide hesperidina, a cumarina aurapteno e a lignana sesamina, os fitoesteroides β -sitosterol e estigmasterol, bem como, foram determinadas a presença de rutina, ácido trans-férulico e ácido cafeico por CLAE-DAD. Tais substâncias apesar de serem de ocorrência comum para espécies da família, foram relatadas pela primeira vez para a espécie.

A composição química do óleo essencial também apresentou uma mistura complexa principalmente de sesquiterpenos e monoterpenos, sendo os compostos em maiores concentrações o linalol (27,72%), germacreno D (19,85%), *E*-cariofileno (14,45%) e biciclogermacreno (5,47%). Essa variedade química encontrada nos extratos e óleo essencial da espécie em estudo, pode estar relacionada a potencial atividades biológicas da espécie. Sendo que as substâncias identificadas apresentam potencial efeitos biológicas relatadas em literatura, em destaque a hesperidina (diosmina + hesperidina) considerada medicamento eficaz que exerce ações sobre o sistema vascular, auxiliando na melhora da velocidade de circulação do sangue nas veias, dentre outras atividades relatadas.

A predição de atividades *in silico* realizadas com as substâncias isoladas e identificadas na espécie, permitiu levantar alvos potenciais para cada composto. Dentre eles destaca-se para a Aurapteno o alvo molecular Beta secretase e o Receptor endotelial de proteína C; para a hesperidina o alvo Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPARG), a sesamina Proteína 1 da tríade de histidina de ligação do nucleotídeo, para o β -sitosterol os alvos Receptores de estrogênio e Proteína tirosina quinases (PTK) e para o estigmasterol os alvos Receptores de estrogênio e Arginino-succinato sintetase (ASS). Tais resultados trazem informações preliminares sobre a atuação das moléculas teste e os alvos identificados, que possibilitam a realização de outros estudos a fim de avaliar essas atividades tanto *in silico* quanto *in vivo*.

Contudo, a espécie *Zanthoxylum caribaeum* apresenta poucos estudos sob o ponto de vista químico e biológico. Apresentando apenas estudos do óleo essencial das folhas, demonstrando atividade bioacaricida. Assim, esse trabalho fornece resultados inéditos acerca desta espécie, servindo de suporte para o desenvolvimento de novas pesquisas nesta temática, que possam aprofundar e complementar os resultados encontrados, bem como, a presença de diferentes classes químicas. Além disso, o isolamento das substâncias já relatadas na literatura com potencial atividade biológica, indicam a espécie *Z. caribaeum* como fonte de substâncias bioativas, que poderão dar origem ou servir de modelos protótipos no desenvolvimento de novos fármacos.

REFERÊNCIAS

- ABREU, P. M.; BRANCO, P. S.. Natural product-like combinatorial libraries. **Braz. J. Med. Biol. Res**, v. 14, n. 5, p. 675-712, 2003.
- ABREU, V. G. C.. **Estudo fitoquímico e biológico das folhas, caule e flores de *Lychnophora pinaster* Mart.**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2009, 111 p.
- ADAMS, R P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. 2007. Carol Stream, Illinois-USA: Allured Publishing Corporation©, 4. ed, 804p.
- AGRAWAL, Y. O. et al. Hesperidin blunts streptozotocin-isoproterenol induced myocardial toxicity in rats by altering of PPAR-c receptor. **Chem.-Biol. Interact.** v. 219, p. 211–220, 2014.
- AKIYAMA, S. et al., Hypoglycemic and Hypolipidemic Effects of hesperidin and cyclodextrin-clathrated Hesperetin in Goto-Kakizaki Rats with Type 2 Diabetes. **Biosci Biotechnol Biochem.**, v. 73, n. 12, p. 2779-2782. 2009.
- ALMEIDA, E W. C. et al. Estudo teórico e experimental de espectros infravermelho de ésteres de ácido graxo presentes na composição do biodiesel de soja. **Quim. Nova**, v. 35, n. 9, p. 1752-1757, 2012
- ALVES, C. Q. Estudo químico e avaliação biológica de duas espécies de leguminosae: *Dioclea virgata* e *Cenostigma macrophyllum*. 2012. p 227. Tese. Química Orgânica. Universidade Federal da Bahia. Programa de Pós-Graduação em Química da UFBA. Salvador
- AL-QURAINY, A. et al. Authentication of *Rutagraveolens* and its adulterant using internal transcribed spacer (ITS) sequences of nuclear ribosomal DNA. **Pak. J. Bot.**, v. 43, n.3, p. 1613-1620, 2011.
- ALLEN, W. J.; et al. DOCK 6: Impact of new features and current docking performance. **J. Comput. Chem** , v. 36, n. 15, 2015.
- AMARAL, P. A. et al. Química combinatória: moderna ferramenta para a obtenção de candidatos a protótipos de novos fármacos. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v.39, n. 4, p. 351-363, 2003.
- ANDRADE, C.R.B. **Estudo Botânico e fitoquímico das Folhas de *Zanthoxylum caribaeum* Lam. (RUTACEAE)**. 2014. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Estadual De Feira de Santana, Feira de Santana, 2014.
- ARRUDA, M. S. P. et al. Chemistry of *Zanthoxylum rhoifolium*: A new secofuroquinoline alkaloid. **Biochem Syst Ecol**, v. 20, n. 2, p. 173-178, 1992.

AWAD, A. B.; et al., *b*-Sitosterol enhances tamoxifen effectiveness on breast cancer cells by affecting ceramide metabolism. **Mol Nutr Food Res** v. 52, p. 419–426, 2008.

BALESTRIN, L. **Estudo fitoquímico e avaliação das atividades alelopática, antibacteriana e antioxidante de *Dorsteniamultiformis* Miq., moraceae.** 2006. 107f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

BARRANCO-MEDINA, S.; et al., Rational Design of Protein C Activators. **Sci. Rep.** v. 7, 2017.

BERMAN, H. M. et al. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, n. 28, p. 235-242, 2000.

BERLINCK, R. G. S. et al., The chemistry of natural products in Brazil in the XXI century. **Quím. Nova.**, v.40, n.6, p.706-710, 2017

BESSA, N. G. F. et al. Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento Vale Verde – Tocantins. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v. 15, n. 4, p. 692-707, 2013.

BEZERRA, A. M. Neolignans from *Licaria chrysophylla* and *Licaria aurea* with DNA topoisomerase II-inhibitory activity. **Quím. Nova**, v. 35, n. 11, p. 2226-2228, 2012.

BEZERRA, D. A. C. **Estudo fitoquímico, bromatológico e microbiológico de *Mimosa tenuiflora* (Wild) Poiret e *Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke.** 2008. p. 62. Dissertação (Mestrado). Pós-Graduação em Zootecnia – Sistemas Agro-silvopastoris. Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande. Patos – PB.

BHATT, V.; et al. Simultaneous quantification and identification of flavonoids, lignans, coumarin and amides in leaves of *Zanthoxylum armatum* using UPLC-DAD-ESI-QTOF-MS/MS. **J Pharm Biomed Anal**, v. 132, p.46-55, 2017.

BLONDEAU, S.; et al. Reverse Pharmacognosy: Another Way to Harness the Generosity of Nature. **Curr Pharm Des**, v. 16, n. 15, p. 1682-1696, 2010.

BODEDE, O. et al., Phytochemical Analysis with Antioxidant and Cytotoxicity Studies of the Bioactive Principles from *Zanthoxylum capense* (Small Knobwood). *Anticancer Agents Med Chem*, v. 17, n. 4, p. 627-634, 2017.

BOEHME, A. K.; et al., Bioactivity and chemical composition of the leaf essential oils of *Zanthoxylum rhoifolium* and *Zanthoxylum setulosum* from Monteverde, Costa Rica. **Nat Prod Res**, v. 22, n. 1, p. 31-36, 2008.

BOOTH, N. L.; et al., Confusion regarding anticoagulant coumarins in dietary supplements. **Clin. Pharmacol. Ther.** v.76, n.6, p.511-516, 2004.

BRACCIO, M. et al. Synthesis and in vitro inhibitory activity on human platelet aggregation of novel properly substituted 4-(1-piperazinyl) coumarins. **Eur. J. Med. Chem**, v. 39, p. 397-409, 2004.

BRAGA, F. C.; RATES, S. M. K.; SIMOES, C. M. O.. Avaliação da eficácia e segurança de produtos naturais candidatos a fármacos e medicamentos. In: **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. CLAUDIA MARIA O SIMOES, C, M.; SCHENKEL, E. P.; MENTZ, L. A.. Editora: Artmed, 2017, 502 p..

BRASIL ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 24 de julho de 2017.

BRUNIERA, C. P. **Estudos filogenéticos e sistemáticos em Rutaceae: análise cladística e posicionamento de Almeidaa A. St.-Hil. Entre as Galipeinae (Galipeae, Rutoideae) com o uso de dados morfológicos e moleculares**. São Paulo, 2010. 144f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociência, Universidade de São Paulo.

BRITO, N. M.; et al., Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: Rev. Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v.13, p. 129-146, 2003.

BROZELL, S. R.; et al., Evaluation of DOCK 6 as a pose generation and database enrichment tool. **J Comput Aided Mol Des**, v. 26, n. 6, p. 749–773, 2012.

BUNALEMA, L.; et al., Potential of *Zanthoxylum leprieurii* as a source of active compounds against drug resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **BMC Complement Altern Med**, v.2 n 17, 2017.

BURIL, M. T.; THOMAS, W. W.; ALVES, M.. Flora da Usina São José, Igarassu-PE: Rutaceae, Simaroubaceae e Picramniaceae. **Rodriguésia**, v. 65, n. 3, p. 701-710, 2014.

CARVALHO, I. et al. Introdução a modelagem molecular de fármacos no curso experimental de química farmacêutica. **Quim. Nova**, v. 26, n.3, p. 428-438, 2003.

CARREGAL, A. P. et al. Triagem virtual inversa como ferramenta para química de produtos naturais. **Rev eletrônica de farmácia**, v. 8, p. 71-82, 2011.

CASA, D. D.; C, M S C. Alkaloids of *Zanthoxylum caribaeum* Lam **J. Chem. Soc. C**, , 2155-2156. 1967

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. conceitos sobre modificação estrutural para otimizaçãoda atividade. **Quim. Nova**, v.2, n. 1, p. 99-105, 1998.

CERETO-MASSAGUÉ, A. A.; et al. Tools for *in silico* target fishing. **Methods**, v. 71, n, 1, p, 98-103, 2014

CHEN, Y. et al. Synthesis, antiproliferative, and vasorelaxing evaluations of coumarin α -methylene- γ -butyrolactones. **Bioorganic Med. Chem**, v. 13, p. 5710-5716, 2005.

CHENG, J. F. et al. Discovery and structure-activity relationship of coumarin derivatives as TNF- α inhibitors. **Bioorganic Med. Chem Letters**, v. 14, p.2411-2415, 2004.

CHENG, M. J. et al. Two new sesquiterpenoids and anti-HIV principles from the root bark of *Zanthoxylum ailanthoides*. **Bioorg Med Chem.**, v 1;13 n. 21:p 5915-20, 2005.

CHA, J. Y.; REPA, J.. The liver X receptor (LXR) and hepatic lipogenesis. The carbohydrate-response element-binding protein is a target gene of LXR. **J Biol Chem**, v. 282, n. 1, p. 743-51, 2007.

CHEN, Y. L.; et al., Synthesis, antiproliferative, and vasorelaxing evaluations of coumarin α -methylene- γ -butyrolactones. **Bioorg Med Chem Lett.** v. 13, n. 20, p. 5710-5716, 2005.

CHOI, H. J. Evaluation of Antiviral Activity of *Zanthoxylum Species* Against Picornaviruses. **Osong Public Health Res Perspect**, v. 7, n. 6, p. 400 – 403, 2016.

CICHOVA, M. et al. Influence of tannin addition on the content and composition of polyphenolic compounds in wines. **Czech J. Food Sci.**, Praga, v. 26, p S33–S38, 2008.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas, SP: editora Unicamp, 2006. Reimpressão 2014.

COELHO, H. M. N.. **Avaliação *in vitro* de inibidores peptídicos da β -secretase 1 para o tratamento da Doença de Alzheimer**. Dissertação de Mestrado. 2013. Universidade nova de Lisboa. Lisboa, 2013, 122 p..

CORTÉS-CABRERA, A.; et al., AtlasCBS: a web server to map and explore chemico-biological space. **J Comput Aided Mol Des.** v. 26, n. 9, p. 995-1003, 2012.

COSTA, J. G.; et al. Biological screening of araripe basin medicinal plants using *Artemia salina* Leach and pathogenic bacteria. **Pharmacogn. Mag.** v. 6, n. 24, p. 331-334, 2010.

CORTÉS-CABRERA, Á.; GAGO, F.; MORREALE, A. A reverse combination of structure-based and ligand-based strategies for virtual screening. **J Comput Aided Mol Des**, v. 26, p. 319–327. 2012.

CORTEZ, L. E. R. et al. Atividades Biológicas de Extratos obtidos das Partes Aéreas de *Almeida acoerulea* (Nees& Mart.) A.St.-Hil.e *Conchocarpus gaudichaudianus* subsp. *Bahiensis* Kallunki (Rutaceae). **Acta Farm. Bonaerense**, v. 25, n. 1, p. 50 – 4, 2006.

CRAGG, G M. NEWMAN, D. J. Biodiversidade: um componente essencial na descoberta de fármacos.In: YUNES, R. A; CECHINEL FILHO, V. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. 4ª ed, Itajai, Univali, 2014.Cap 3, pág. 55-84

CRUZ, D. R.. **Desenvolvimento e validação de metodologias computacionais de desenho de fármacos baseado em fragmentos químicos**. 2012. Dissertação de Mestrado. Universidade do Minho Escola de Ciências. Braga, 2012. 103 p..

CRONET, P.; et al.,Structure of the PPAR α and β Ligand Binding Domain in Complex with AZ 242; Ligand Selectivity and Agonist Activation in the PPAR Family. **Structure**. v. 9, p. 699–706, 2001.

- DAVIS, A. P. et al. The comparative Toxicogenomics database: update 2011. **Nucleic Acids Research**, v. 39, p. 1067–1072, 2011.
- DO Y. J. et al., Cytotoxic Constituents from the Leaves of *Zanthoxylum schinifolium* Bull. **Chem. Soc.**, v. 31, n. 4 p. 1081, 2010
- DOMINGO, D.; LÓPEZ-BREA, M.. Plantas com ação antimicrobiana. **Rev Esp Quimioter.** v. 16, n. 4, p. 385-393, 2003.
- DONALD, G. R.; FERNANDES, P. D.; BOYLAN, F.. Antinociceptive Activity of *Zanthoxylum piperitum* DC. Essential Oil. In: **J Evid Based Complementary Altern Med.** v. 2016, p.1-8, 2016.
- DOU, H.; et al., Sesamin induces ER stress-mediated apoptosis and activates autophagy in cervical cancer cells. **Life Sci**, v. 200, p.87-93. 2018.
- ENGELKE, F. Fitoterápicos e Legislação. **Jornal Brasileiro de Fitomedicina.** v 1 n 1: p. 10-15. 2003.
- ESCHER, P. et al., PPARs: Quantitative Analysis in Adult Rat Tissues and Regulation in Fasting and Refeeding. **Endocrinology**, v. 142, n. 10, p. 4195–4202, 2001.
- FACUNDO, V. A. Constituintes químicos de *Zanthoxylum ekmanii* (URB.) ALAIN. **Quim. Nova**, v. 28, n. 2, p. 224-225, 2005.
- FANG, J.; et al., Synthesis of 3-alkyl naphthalenes as novel estrogen receptor ligands. **Bioorg Med Chem Lett.**v. 18, p. 5075-5077, 2008.
- FANG, ZHE.; et al., Cytotoxic Constituents from the Leaves of *Zanthoxylum schinifolium*. **Bull. Korean Chem. Soc.** v. 31, n. 4, p.1081-1084, 2010.
- FEITOSA, M. H. A.; et al., Plantas medicinais como recurso terapêutico entre funcionários do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Unimontes. **Rev. Montes Claros** v. 17, n.1, 2015.
- FERRIN, T. E. et al. The MIDAS display system. **J Mol Graph Model.**, v. 6, p. 13 - 27, 1988.
- FERREIRA, M. C. F.; et al., Moduladores seletivos do receptor estrogênico: novas moléculas e aplicações práticas. **Femina**, v. 39, p. 433–441, 2011.
- FERREIRA, R. S.; et al., *In silico* screening strategies for novel inhibitors of parasitic diseases. **Expert Opin. Drug Discov.** v. 6, n. 5, p. 481-490, 2011.
- FOTIS, C.; et al., Network-based technologies for early drug Discovery. **Drug Discov Today.** v. 23, n. 3, p. 626-635, 2018.
- FURLAN, M.; et al., Biossíntese de produtos naturais: atualidades e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. In: YUNES, R. A.; CECHINEL-FILHO, V.. **Química**

de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia. 4ª Edição, Itajaí: UNIVALI. 2014, 492 p..

GAMO, K.; et al., Mechanism of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (PPAR γ) Transactivation by Hesperetin Glucuronides Is Distinct from That by a Thiazolidine-2,4-dione Agent. **Chem. Pharm. Bull.** v. 62, n. 5, p. 491–493, 2014.

GAULTON, A. et al. ChEMBL: a large-scale bioactivity database for drug discovery. **Nucleic Acids Res.**, v. 40, p. 1100–1107, 2012.

GEORGÉ, S. et al. Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. **J Agric Food Chem**, n.53, p.1370-1373, 2005.

GHORBANI, A.; et al., The citrus flavonoid hesperidin induces p53 and inhibits NF- κ B activation in order to trigger apoptosis in NALM-6 cells: involvement of PPAR α -dependent mechanism. **Eur J Nutr**, v. 51, p. 39–46, 2012.

GILBERT, N.C. et al. Conversion of human 5-lipoxygenase to a 15-lipoxygenase by a point mutation to mimic phosphorylation at Serine-663. **Faseb J.** v 26: p. 3222-3229, 2012.

GOBBO NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quim. Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GONZAGA, W.A. et al. Composition and antibacterial activity of the essential oils from *Zanthoxylum rhoifolium*. **Planta Med.**, v 8: p. 773-775, 2003.

GROPPO, M. et al. Pollen morphology of species of *Hortia* (Rutaceae). **Bras. Bot.** v. 33, n.1, 2010.

GROPPO, M.. New synonyms in *Hortia* and *Dictyoloma* (Rutaceae), with validation of the name *Hortia badinii*. **Novon: A Journal for Botanical Nomenclature**, v. 20, n. 2, p. 163–165, 2010.

GROPPO, M.; et al., Chilean *Pitavia* more closely related to Oceania and Old World Rutaceae than to Neotropical groups: evidence from two cpDNA non-coding regions, with a new subfamilial classification of the family **PhytoKeys**, v. 19, p. 9–29, 2012.

GROPPO, M.; et al., Phylogeny of Rutaceae based on two non-coding regions from cpDNA. **Am J Bot.**, v. 95, n. 8, p. 985-1005, 2008.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A D; OLIVA G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estud. av.**, v. 24, n. 70, p. 81-98, 2010.

GULERIA, S.; et al. Antioxidant and antimicrobial properties of the essential oil and extracts of *Zanthoxylum alatum* grown in north-western Himalaya. **Sci. World J.** v. 28, 2013.

GUY, I.; et al. Essential Oils from *Zanthoxylum chiloperone* and *Z. riedelianum* Growing in Paraguay. **Pharm. Biol.**, v. 39, n. 2, p.152-154, 2001.

HENRIQUE, C. Y. et al. RP-HPLC method for estimation of sesamin in two *Zanthoxylum* species. **J Liq Chromatogr Relat Technol.** v 39, n 2.p 65-69.2016

HIEU, T. T.; KIM, S.; AHN, Y. J.. Toxicity of *Zanthoxylum piperitum* and *Zanthoxylum armatum* Oil Constituents and Related Compounds to *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae). **J Med Entomol**, v. 49, n. 5, p. 1084-1091, 2012.

HOHLEMWERGER, S. V. A. et al. ALCALOIDES DAS CASCAS DAS RAÍZES DE *Zanthoxylum* spp..**Quim. Nova**, v. 35, n. 11, p. 2173-2176, 2012.

HONG-LAN, W.; et al., Chemical Fingerprinting by HPLC-DAD-ELSD and Principal Component Analysis of *Polygala japonica* from Different Locations in China. **Chin J Nat Med.**, v.8, n.5, p.343-348, 2010.

HONG, L.; et al., Inhibitory effect of *Zanthoxylum bungeanum* essential oil (ZBEO) on *Escherichia coli* and intestinal dysfunction. **Food Funct.**, v. 8, p. 1569-1576, 2017.

HUANG, N.; SHOICHET, B. K.; IRWIN, J. Benchmarking Sets for Molecular Docking. **J. Med. Chem.** n.XX, p. 1-13, 2006.

HUESTIS, M.P. et al. DiethylaminosulfurTrifluoride-Mediated Intramolecular Cyclization of 2-hydroxy-benzylureas to Fused Bicyclic Aminooxazoline Compounds and Evaluation of Their Biochemical Activity Against Beta-Secretase-1 (BACE1). **Tetrahedron Lett.** v 54, p 5802–5807.2013

HWANG S. J.; SC PAK. In vitro evaluation of antioxidant, antibacterial, anti-tyrosinase activities of *Zanthoxylum planispinum*. **Planta Med**; v75 – p 36. 2009

HUGHES, J. P.; et al. Principles of early drug discovery. **Br J Pharmacol**, v. 162, n. 6, p. 1239–1249, 2011.

IRWIN, J. J. et al. ZINC – A free tool to discover chemistry for biology. **J. Chem. Inf. Model** n. 1, p. 1-40, 2012.

ISIDORO, M. M. **Estudo fitoquímico de *Euxylophoraparaensis* e avaliação das substâncias isoladas frente à enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Trypanosoma cruzi*.** 2008. 162 f. Dissertação (Mestrado) - Centro de ciência exatas e de tecnologia, departamento de química, Universidade Federal de São Carlos. São Paulo.

ISIDORO, M. M. et al. Fitoquímica e quimiosistemática de *Euxylophora paraensis* (Rutaceae) **Quim. Nova**, v. 35, n. 11, p. 2119-2124, 2012.

ICRE, G.; WAHLI, W.; MICHALIK, L.. Functions of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and beta in skin homeostasis, epithelial repair, and morphogenesis. **J Investig Dermatol Symp**, v. 11, n. 1, p. 30-35, 2006.

INMETRO. **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos.** DOQ-CGCRE-008, Revisão 5. 2016.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH). **Validation of Analytical Procedures: Definitions and Terminology, Q2A (CPMP/ICH/381/95)**, 1995. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/RegulatoryInformation/Guidances/>

JACOB N. T.. Drug promotion practices: A review. **Br J Clin Pharmacol** 2018.

JANUÁRIO, A. H. et al. Indolopyridoquinazoline alkaloids from *Esenbeckia grandiflora* mart. (Rutaceae). **Quím. Nova**, v.32, n.8. 2009.

JU, X.; et al. Liver X receptors as potential targets for cancer therapeutics (Review). **Oncol Lett**, v. 14, n. 6, p. 7676-7680, 2017.

JUN, D. Y.; et al., Apoptogenic activity of auraptene of *Zanthoxylum schinifolium* toward human acute leukemia Jurkat T cells is associated with ER stress-mediated caspase-8 activation that stimulates mitochondria-dependent independent caspase cascade. **Carcinogenesis**, v. 28, n. 6, p. 1303-1313, 2007.

JUNG, C. G.; et al., Auraptene increases the production of amyloid- β via c-Jun N-terminal kinase-dependent activation of γ -secretase. **J Alzheimers Dis** v. 43, n. 4, p. 1215–1228, 2015.

KARLBERG, T.; et al. Structure of human argininosuccinate synthetase. **Acta Crystallogr. A**, v. 64, p. 279–286, 2008.

KEISER, M. J. et al. Relating protein pharmacology by ligand chemistry. **Nat. Biotechnol**, v. 25, p. 197-206, 2007.

KERRIGAN, J. E. Amber 9.0 Drug/DNA complex. **Piscataway**, New Jersey, p. 17, 2009.

KHOMENKO, T. M.; et al., Anti-influenza activity of monoterpene-containing substituted coumarins. **Bioorg Med Chem Lett.**, v. 27, n. 13, p. 2920–2925, 2017.

KIM, S-II.; AHN, Y-J.. Larvicidal activity of lignans and alkaloid identified in *Zanthoxylum piperitum* bark toward insecticide-susceptible and wild *Culex pipiens pallens* and *Aedes aegypti*. **Parasit Vectors.**, v. 10, 2017.

KITCHEN et al. Docking and Scoring in Virtual Screening for Drug Discovery: Methods and applications. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 3, p. 935-949, 2004.

KJARULFF, S. K. et al. ChemProt-2.0: visual navigation in a disease chemical biology database. **Nucleic Acids Res.**, v. 41, p. 464-469, 2013.

KNOX, C. et al. DrugBank 3.0: a comprehensive resource for ‘omics’ research on drugs. **Nucleic Acids Research**, v. 39, p. 1035–1041, 2011

KOUTSOUKAS, A. et al. From in silico target prediction to multi-target drug design: Current databases, methods and applications. **J. Proteom**, v. 74, p. 2554-2574, 2011.

KRUMRINE, J. et al. Principles and methods of docking and ligand design. In: BOURNE, P.E.; HELGE, W. **Structural Bioinformatics**. New Jersey. Wiley,. p. 443-476, 2003.

- KUHN, M. et al. STITCH 3: zooming in on protein–chemical interactions. **Nucl. Acids Res**, v. 40, p. 876-880, 2012.
- KUNTZ, I. D. et al. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. **J. Mol. Biol.** v.161, p. 269-288, 1982.
- LAMERS, M. B.; et al. Structure of the Protein Tyrosine Kinase Domain of C-terminal Src Kinase (CSK) in Complex with Staurosporine. **J. Mol. Biol.** v. 285, n. 5, p. 713-725, 1999.
- LANG, P.T.et al. DOCK 6.7 Users Manual. **Regents of the University of California**, 2015.
- LAVECHIA, A; DI GIOVANNI, C. Virtual screening strategies in drug discovery: A critical review. **Curr. Med. Chem**, v. 20, n. 23, p. 2839–2860, 2013.
- LEI, T. C. et al. STIMULATION OF Melanoblast Pigmentation by 8- Methoxypsoralen: 68 The Involvement of Microphthalmia-Associated Transcription Factor, the Protein Kinase A Signal Pathway, and Proteasome-Mediated Degradation. **J Invest Dermatol.**, v. 119, n. 6, p. 1341-1349, 2002.
- LEMKE, C. T.; HOWELL, P. L.. The 1.6 Å Crystal Structure of *E. coli* Argininosuccinate Synthetase Suggests a Conformational Change during Catalysis. **Structure**, v. 9, p. 1153–1164, 2001.
- LI, H.; et al.. Hint1 is a haplo-insufficient tumor suppressor in mice. **Oncogene**, v. 25, p. 713–721, 2006.
- LIMA, C. D.; KLEIN, M. G.; HENDRICKSON, W, A.. Structure-Based Analysis of Catalysis and Substrate Definition in the HIT Protein Family. **Science, New Series**, v. 278, n. 5336, p. 286-290, 1997.
- LIMA, D. F. et al. Seasonal change in main alkaloids of jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardleworth), an economically important species from the Brazilian flora. **PLoS One**. 2, n. 12, 2017.
- LIMA, D. F. et al. Technological forecasting of jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*): economically important specie in the north and northeast of Brazil. **GEINTEC**, v. 5, n. 1, p.1626-1638, 2015.
- LIU, T. et al. Binding DB: a web-accessible database of experimentally determined protein–ligand binding affinities. **Nucl. Acids Res**, v. 35, p. 198–201, 2007.
- LI ZI-DAN,. Antitumor Compound Identification from *Zanthoxylum bungeanum* Essential Oil Based on Composition-activity Relationship. **Chem. Res. Chin. Univ.** v 29, n 6, p.1068—1071. 2013
- LOPES, W. A.; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Quím. Nova**, v. 7, n. 4, p. 670-673. 2004.

LORENZI, H. Árvores Brasileiras – Manual de identificação ecultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Plantarum. Nova Odessa, p. 360-361. 1992

LOUREIRO, A. A.; LISBOA, P.L.B. Madeiras do município de Aripuanã e suas utilidades (Mato Grosso). **Acta Amazonica**, v. 9, p. 88-93. 1992.

LUO, H. et al. DRAR-CPI: a server for identifying drug repositioning potential and adverse drug reactions via the chemical–protein interactome. **Nucl. Acids Res**, v. 39, p. 492-498, 2011.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JUNIOR. V. F. Plantas Medicinais: A Necessidade de Estudos Multidisciplinares. **Quím. Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MADEIRO, S. A. et al. Modulation of the antibiotic activity against multidrug resistant strains of coumarins isolated from Rutaceae species. **MicrobPathog**, p. 104:151-154, 2017.

MAHMOUD, A. M.. Hesperidin protects against cyclophosphamide-induced hepatotoxicity by upregulation of PPAR γ and abrogation of oxidative stress and inflammation. **Can J Physiol Pharmacol**. v. 92, n. 9, p. 717-24, 2014.

MANCINI, F.; SIMONE, A.; ANDRISANO, V.. Beta-secretase as a target for Alzheimer's disease drug discovery: an overview of in vitro methods for characterization of inhibitors. **Anal. Bioanal. Chem**, v. 400, n. 7, p. 1979–1996, 2011.

MAO, P. C. M.; et al., Chemical Modification of Coumarin Dimer and HIV-1 Integrase Inhibitory Activity. **Chem. Pharm. Bull**, v. 50, n. 12, p. 1634-1637, 2002.

MATOS, F. J. A. Introdução a fitoquímica experimental. Fortaleza: Edições UFC, p. 45-64, 1997.

MATOS, F. J. A. Introdução a fitoquímica experimental. 3 ed. Fortaleza: Edicoes UFC, p. 150, 2009.

MATSUDA, H. et al. Medicinal foodstuffs. XX. Vasorelaxant active constituents from the roots of *Angelica furcijuga* Kitagawa: structures of hyuganins A, B, C, and D. **Chem Pharm Bull (Tokyo)**. v. 48, p. 1429-1435, 2000.

MATSUNAGA, K. A novel lignan with vasodilative activity from *Imperata cylindrical*. **J Nat Prod**, v. 57, p. 1734-1736, 1994.

McDONAGH, E. M. et al. From pharmacogenomic knowledge acquisition to clinical applications: the PharmGKB as a clinical pharmacogenomic biomarker resource. **Biomark Med** v. 5, p. 795–806, 2011.

MELO NETO, B.; et al., Inhibitory effects of *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. (Rutaceae) against the infection and infectivity of macrophages by *Leishmania amazonenses*. **An. Acad. brasil.**, v. 88, n. 3, 2016.

MELO, M. F. F.; ZICKEL, C. S. O gênero *Zanthoxylum* L. e *Esenbeckia* Kunth (Rutaceae) no estado de Pernambuco, Brasil. **Acta Bot. Bras.**, v. 18, n. 1, p. 73-90, 2004.

- MENG, E. C.; SHOICHET, B. K.; KUNTZ, I. D. Automated docking with grid-based energy evaluation. **J. Comput. Chem**, v. 13, p. 505-524, 1992.
- MENG, X. et al. Molecular Docking: A Powerful Approach for Structure-Based Drug Discovery. **Current Computer-Aided Drug Design**. n. 7, p. 146-157, 2011.
- MIYAWAKI, T. et al. Antihypertensive effects of sesamin in humans. **J NutrSciVitaminol**. v. 55, p. 87- 91, 2009.
- MOCCELINI, S. K. et al. Estudo fitoquímico das cascas das raízes de *Zanthoxylum rigidum* Humb. & Bonpl. Ex Willd (Rutaceae). **Quim. Nova**, v. 32, n. 1, p.131-133, 2009.
- MOHAMMAD S., M.; et al., Effect of Sesamin Supplementation on Glycemic Status, Inflammatory Markers, and Adiponectin Levels in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. **J. Diet. Suppl**. v. 14, n. 1, p.65-75, 2016.
- MONGAN, J. et al. **Generalized Born with a simple, robust molecular volume correction**, 2006.
- MONTAGNER, C.. **Atividades antifúngica, citotóxicas (células tumorais humanas) e hemolítica de cumarinas naturais e semi-sintéticas**. 2007. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2007. 127 p..
- MONTEIRO, E. G. **Estudo comparativo entre metodologias de cromatografia planar para controle radioquímico de radiofármacos de tecnécio -99m**. 2012. 99 p.. Dissertação (Mestrado). Instituto de pesquisas Energéticas e Nucleares – Universidade São Paulo. São Paulo
- MOUSSAVI, N. et al. Identification of chemical constituents of *Zanthoxylum heitziis* tem bark and their insecticidal activity against the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. **Parasites & Vectors**. **8**:503. 2015.
- MOUSSAVI, M.; et al. Synergy between Auraptene, Ionizing Radiation, and Anticancer Drugs in Colon Adenocarcinoma Cells. **Phytother Res**, v. 31, n. 9, p. 1369-1375, 2017.
- MOURA, N. F.; STRAPAZZON, J. O.; LORO, F.. Composition of the Leaf Oils of Rutaceae: *Zanthoxylum hyemale* A. St. Hill, *Z. rhoifolium* Lam. and *Z. rugosum* A. St. Hill et. Tul. **J ESSENT OIL RES**, v. 18, p. 627-628, 2011.
- MUKHIJA , MINKY; KALIA , A N. Antioxidant potential and total phenolic content of *Zanthoxylum alatum*stem. **J App Pharm**, v. 6; 4: p. 388-397, October 2014.
- MURAKAMI, A. et al. Suppression by citrus auraptene of phorbol ester and endotoxin-induced inflammatory responses: role of attenuation of leukocyte activation. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 10, p. 1843-1850, 2000.
- MULLIN, R.. Cost to Develop New Pharmaceutical Drug Now Exceeds \$2.5B. **Chemical and Engineering News**, 2014.

NAKANO, D. et al. Effects of sesamin on aortic oxidative stress and endothelial dysfunction in deoxycorticosterone acetate salt hypertensive rats. **Biol Pharm Bull.** v. 26, p. 1701-1705, 2003.

NAKANO, D. et al. Sesamin metabolites induce an endothelial nitric oxide-dependent vasorelaxation through their antioxidative property independent mechanisms: possible involvement of the metabolites in the antihypertensive effect of sesamin. **J PharmacolExpTher**, v. 318, p. 328-335, 2006.

NARANG.N.;JIRAUNGKOORSKUL, W. Anticancer Activity of Key Lime, *Citrus aurantifolia*. **Pharmacogn Rev.** v. 10 n 20. p118-122. 2016;

NAZARI, M.; et al., Inactivation of Nuclear Factor- κ B by citrus flavanone hesperidin contributes to apoptosis and chemo-sensitizing effect in Ramos cells. **Eur. J. Pharmacol.** v. 650, p. 526–533, 2011.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **J. Nat. Prod.**, v. 75, n. 3, p. 311- 35, 2012.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **J. Nat. Prod.**, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.

NGASSOUM, M. B.; et al. Antimicrobial study of essential oils of *Ocimum gratissimum* leaves and *Zanthoxylum xanthoxyloides* fruits from Cameroon. **Fitoterapia**, v. 74, n. 3, 2003.

NGUYEN, P. H.; et al., Anti-inflammatory terpenylated coumarins from the leaves of *Zanthoxylum schinifolium* with α -glucosidase inhibitory activity. **J Nat Med.** v. 70, n. 2, p. 276-281, 2016.

NGUYEN, P. H. et al. Anti-inflammatory terpenylated coumarins from the leaves of *Zanthoxylum schinifolium* with α -glucosidase inhibitory activity. **J Nat Med.**, v. 70, p. 2:276-81. 2016.

NOGUEIRA. J. et al. *Zanthoxylum caribaeum* (Rutaceae) essential oil: chemical. **Parasitol Res** 113:4271–4279. 2014.

NOLDIN, V. F. **Estudo fitoquímico das folhas e rizomas de simabaferruginea ST. Hill. E avaliação da atividade antiulcera e antinoceptiva dos extratos compostos e isolados.** 2005. 82f. Dissertação (Mestrado). Universidade do Vale do Itajaí. Itajaí.

NURAIN, I. O. et al., Potential of Three Ethnomedicinal Plants as Antisickling Agents. **Mol. Pharm.**, v. 14, n. 1, p. 172-182, 2017.

OHLSTEIN EH et al., New strategies in drug discovery. **Methods Mol Biol.**;v 316:p 1-11. 2006

OH K-S et al., Cardiovascular effects of lignans isolated from *Saururus chinensis*. **Planta Med.**, v. 74, p. 233-238, 2008.

OGANESYAN, V.; et al. The crystal structure of the endothelial protein C receptor and a bound phospholipid. **J Biol Chem**, v. 277, n. 28, 2002.

OKUYAMA, S.; et al. Auraptene and Other Prenyloxyphenylpropanoids Suppress Microglial Activation and Dopaminergic Neuronal Cell Death in a Lipopolysaccharide-Induced Model of Parkinson's Disease. **Int J Mol Sci.** v. 17, 2016.

OLIVEIRA, E. L. et al. Estudo fitoquímico de *Zanthoxylum stelligerum* (Turcz). **Rev. bras. farmacogn.**, v.12, suppl.1, p. 29-30, 2002.

OLIVEIRA, M. L. G.. **Avaliação *in silico* do potencial farmacológico e toxicológico de friedelanos, lupanos e derivados**. 2014. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

PACHECO, A. G. M. **Modelagem molecular comparativa e estudos de acoplamento molecular da enzima Lanosterol 14 α -desmetilase do moniliophthora Perniciosa**. Feira de Santana. 2009. 91 f. Dissertação (Mestrado). Pós graduação em Biotecnologia, 2009.

PAIVA, D. L.; et al. **Introdução à Espectroscopia**. Tradução da 4ª edição norte-americana. Cengage Learning, 2010.

PARDINI, D. Terapia de reposição hormonal na menopausa. **Arq Bras Endocrinol**, v. 58, n. 2, p.172-181, 2014.

PARK, J. B.; VELASQUEZ, M. T. Potential effects of lignan-enriched flaxseed powder on bodyweight, visceral fat, lipid profile, and blood pressure in rats. **Fitoterapia**. 83(5):941-6. Jul, 2012.

PARK, H.; LEE, S.. Determination of the active site protonation state of beta-secretase from molecular dynamics simulation and docking experiment: implications for structure-based inhibitor design. **J. Am. Chem. Soc**, v.125, n. 52, p. 16416-16422, 2003

PATIL, R. A.; et al. Antinociceptive activity of acute and chronic administration of *Murraya koenigii* L. leaves in experimental animal models. **Indian J Pharmacol.**, v. 44, n. 1, p.15-9, 2012.

PATIÑO O J L. PRIETO, J A; CUCA S. L. E *Zanthoxylum* Genus as Potential Source of Bioactive Compounds . In: Rasooli I., editor. **Curr Bioact Compd**; p 185-218, 2012.

PATINO L. O. J.; CUCA SUAREZ, L. E.. Chemical constituents of the wood from *Zanthoxylum quinduense* Tul. (Rutaceae). **Quím. Nova**, v. 33, n. 5, p. 1019-1021, 2010.

PENELUC, T.; et al. Atividade anti-helmíntica do extrato aquoso das folhas de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. (Rutaceae). **Rev Bras Parasitol Vet.** v. 18, n. 1, p. 43-48, 2009.

PEREIRA A, S. S.; et al. Antinociceptive effect of *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. (Rutaceae) in models of acute pain in rodents. **J. Ethnopharmacol.** v. 129, n. 2, p227–31, 2010.

PETTERSEN, E. F., et al. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis, **J. Comput. Chem.** v. 25 p. 1605–1612, 2004.

PHILLIPS, C.; et al. Design and Structure of Stapled Peptides Binding to Estrogen Receptors. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 133, n. 25, p. 9696-9699, 2011.

PICCINELLI, A. L. et al. New lignans from the roots of Valerianaprionophylla with antioxidative and vasorelaxant activities. **J Nat Prod.** v. 67, p. 1135-1140, 2004.

PINHEIRO, C.U.B. Extrativismo, cultivo e privatização do jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Holm., Rutaceae) no Maranhão, Brasil. **Acta Bot. Bras.** São Paulo, v. 16, n.2, abril 2002.

PIRANI, J. R. FLORA DA RESERVA DUCKE, AMAZONAS, BRASIL: RUTACEAE. **Rodriguésia**, v. 56, n. 86, p. 189-204, 2005.

PIRANI, J.R.A. **Ordem Rutales na Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil.** 1982. 120 f. Dissertação (Mestrado). Programa de pós graduação em Biologia – USP, São Paulo, 1982.

PIRANI, J. R.. Flora da Reserva Duke, Manaus, Brasil: Rutaceae. 191. **Rodriguésia**, v. 56, n. 86, p. 189-204, 2005.

PIRANI, J.R.; GROppo, M.. **Rutaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015. Disponível em:
<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB212>>. Acesso em: 12 abr. 2017.

PIRANI, J. R. **Revisão de *Helietta* e *Balfourodendron* (Pteleinae). Análise cladística de Pteleinae. Sinopse de Rutaceae do Brasil.** 1999. Tese de Livre Docência. Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

POSER, G. L. V.; MENTZ, L. A. Diversidade biológica e sistemas de classificação. In: SIMÕES, C. M. O et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento.** 5º Ed. Porto Alegre: UFRGS, p. 75-87, 2004.

POTHITIRAT, W. et al. Comparison of bioactive compounds content, free radical scavenging and anti-acne inducing bacteria activities of extracts from the mangosteen fruit rind at two stages of maturity. **Fitoterapia**, v. 80, n.7, p. 442–447, 2009.

PRASAD, K. Antihypertensive activity of secoisolariciresinoldiglucoside (SDG) isolated from flaxseed: role of guanylate cyclase. **Int J Angiol**, v 13, p. 7–14, 2004.

PRASAD, K. Hypocholesterolemic and antiatherosclerotic effect of flax lignan complex isolated from flaxseed. **Atherosclerosis**, 179, p. 269–275, 2005.

PRAKASH, B.; et al. Safety assessment of *Zanthoxylum alatum* Roxb. essential oil, its antifungal, antiaflatoxin, antioxidant activity and efficacy as antimicrobial in preservation of *Piper nigrum* L. fruits. **Int J Food Microbiol**, v. 153, n. 1-2, p.183-191, 2012.

PUPO, M. T.; GALLO, M. B. C.. Biologia química: uma estratégia moderna para pesquisa em produtos naturais. **Quím. Nova**, v. 30, n.6, p. 1446-1455, 2007.

QI, H.; et al. *In vitro* anthelmintic activity of *Zanthoxylum simulans* essential oil against *Haemonchus contortus*. **Vet Parasitol**, v. 211, n. 3-4, p. 223–227, 2015.

RAI, P.; PATIL, P.; RAJPUT, S. J. Simultaneous determination of phyllanthin and hypophyllanthin in herbal formulation by derivative spectrophotometry and liquid chromatography. **Pharmacogn. Mag**, v. 18, p. 151-158, 2009.

RAIMUNDO, J. M. The lignaneudesmin extracted from *Piper truncatum* induced vascular relaxation via activation of endothelial histamine H1 receptors. **Eur J Pharmacol**, v. 606, p. 150-154, 2009.

RIBANI, M.; et al., Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quím. Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

ROCHA, J. A. et al. Anthelmintic, Antibacterial and Cytotoxicity Activity of Imidazole Alkaloids from *Pilocarpusmicrophyllus* Leaves. **Phytother Res**, 2017.

ROCHA, J. L. C.. **Caracterizacão química e atividades biológicas *in vitro* e *in silico* de *Asemeia ovata* (Polygalaceae)**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Feira de Santana. Feira de Santana, 2016, 268 p.

RODRIGUES, R. P. et al. Estratégias de Triagem Virtual no Planejamento de Fármacos. **Rev. Virtual Quim.**, v. 4, n. 6, p. 739–776, 2012.

ROGNAN, D. Development and virtual screening of target libraries. **J. Physiol**, v. 99, p. 232-244, 2006.

SALUM, L. B.; POLIKARPOV, I.; ANDRICOPULO, A. D.. Structural and chemical basis for enhanced affinity and potency for a large series of estrogen receptor ligands: 2D and 3D QSAR studies. **J Mol Graph Model**, v. 26, n. 2, p. 434-442, 2007.

SALENTIN, S. et al. PLIP: fully automated protein–ligand interaction profiler. **Nucleic Acids Res**, v. 43, p. 443-447, 2015.

SAMER J. et al. The Cytotoxic Effect of Essential Oil of Syrian *Citrus limon* Peel on Human Colorectal Carcinoma Cell Line (Lim1863). **Middle East J Cancer**.. v. 3, n. 1, p. 15-21, 2012.

SANT'ANNA, C.M.R. Glossário de termos usados no planejamento de fármacos (recomendações da IUPAC para 1997). **Quím. Nova**, v. 25, n. 3, p. 505-512, 2002.

SANT'ANNA, C. M. R. Métodos de modelagem molecular para estudo e planejamento de compostos bioativos: Uma introdução. **Rev. Virtual Quim**. v. 1, n. 1, p. 49-57. Fev 2009.

SANTI, M.M. Determinação do perfil fitoquímico de extrato com atividade antioxidante da espécie medicinal *Cordiaverbenacea* DC. por HPLC-DAD. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.16, n.2, p.256-261, 2014.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5º Ed. Porto Alegre: UFRGS, p. 403-434, 2004.

SANTOS, R. P. et al. Composição química e atividade biológica das folhas e frutos de *Triphasia trifolia*. **Quim. Nova**, v. 31, n. 1, p. 53-58, 2008.

SANTOS, R. P.; et al. Composição química e atividade biológica das folhas e frutos de *Triphasia trifolia*. **Quím. Nova**, v. 31, n. 1, p. 53-58, 2008.

SEKULIC-JABLANOVIC, M.; et al. Effects of peroxisome proliferator activated receptors (PPAR)- γ and - α agonists on cochlear protection from oxidative stress. **PLOS ONE**, v. 12, n. 11, 2017.

SILVA, C. V.; DETONI, C. B.; VELOZO, E. S.. Alcalóides e outros metabólitos do caule e frutos de *Zanthoxylum tingoassuiba* A. St. Hil. **Quím. Nova**, v. 31, n. 8, p. 2052-2055, 2008.

SILVA, F. R.; et al. Tratamento da atrofia vaginal da mulher na pós-menopausa. **Reprod. Climat.**, v. 32, n. 1, p. 43-47, 2017.

SHEKARCHI, M. et al. A validated method for analysis of Swerchirin in *Swertialongifolia* Boiss. by high performance liquid chromatography. **Pharmacogn. Mag**, v. 21, p. 13-18, 2010.

SHOICHET, B.K. Directory of Use ful Decoys, Enhanced (DUD-E): Better Ligand sand Decoys for Better Benchmarking. **J. Med. Chem**, n. 55, p. 6582-6594, 2012.

SILVA, A. A. S. S. et al. Estudo fitoquímico e atividades biológicas do limãozinho (*Zanthoxylum syncarpum* Tull.) **Rev. bras. hig. sanit.**, v.8, n.1, p. 37 – 53, jan – març 2014.

SILVA, B. A. V.G. **Aplicação de metodologias do CADD (Computer – Aided Drug Design) a um conjunto de pirrolidinacarboxamidas: mapeamento do farmacoforo e planejamento de novos protótipos tuberculostáticos potenciais**. São Paulo. 185 f. Dissertação (Mestrado). Programa de pós Graduação em Fármaco e Medicamentos. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. 2012.

SILVA, C. V. DETONI, C B; VELOZO E S. Alcalóides e outros metabólitos do caule e frutos de *Zanthoxylum tingoassuiba* A. St.-Hil. **Quim Nova**, 31: 2052-2055, 2008.

SILVA, C. V. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de duas espécies de Rutaceae do Nordeste Brasileiro. **Rev. bras. farmacogn**, Salvador, v. 20, n. 3, p. 355-360, jun/jul, 2010.

SILVA, N. L. A.; MIRANDA, F. A. A.; CONCEIÇÃO, G. M. Triagem Fitoquímica de Plantas de Cerrado, da Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão. **Scientia Plena**, v. 6, n. 2, 2010.

SILVA, M. L. A.; BRITTO, A. C. M.; ANTUNES, A. M. S. Controvérsias sobre a proteção patentária de segundo uso médico de compostos químicos conhecidos. **Quim. Nova**, v. 33, n. 8, p. 1821-1826, 2010.

SILVERSTEIN, M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos - RIO DE JANEIRO. LTC, 2012.

SOUZA, J. G. L.; et al. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil and leaf extracts of *Zanthoxylum caribaeum* Lam. against serotypes of Salmonella. **RBSPA**, v. 18, n. 3, p. 446-453, 2017.

a SOUZA, V.C.; LORENZI, H.. **Botânica Sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III. 3ª ed. Instituto Plantarum, Nova Odessa, São Paulo, 2012, 768 p..

SOUZA, V.C.; LORENZI, H.. **Botânica sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005, 640p..

SOUZA, J. G. L. et al. Potencial antimicrobiano do extrato etanólico de *Zanthoxylum caribaeum* l. frente à diferentes sorovares de *Salmonellade* origem avícola. II Congresso Paranaense Microbiologica. **ANAIS**: Paraná. 2016. Acesso em 20 de outubro.2016. Disponível em: www.uel.br/eventos/cpm/pages/arquivos/II_CPM/IICPM_Sessao_3.pdf

SU, G. Y.; et al., An unusual tetrahydrofuran lignan from the roots of *Zanthoxylum planispinum* and the potential anti-inflammatory effects. **Chem Biodivers**, v. 14, n. 17, 2017.

SUBRAMANIAN, K.; et al. Regulation of Estrogen Receptor α by the SET7 Lysine Methyltransferase. **Mol. Cell.**, v. 30, p. 336–347, 2008.

SUDHAMALLA, B.; et al. Molecular Dynamics Simulation and Binding Studies of β -Sitosterol with Human Serum Albumin and Its Biological Relevance. **J. Phys. Chem.** v. 114, p. 9054–9062, 2010.

SUÁREZ, L. C.; VILLAMIZAR, V. M. Mezcla de esterole saisladade extracto etanolico de *Zanthoxylum caribaeum*; y actividad anti-tuberculosis y anti-malariade extracto etanolico. **Scientia**, v 13. 2007.

TANE, P.; WABO, H. K.; CONNOLLY, J. D. A new benzophenanthridine alkaloid from *Zanthoxylum buesgenii*. **Fitoterapia**, 6 (7-8): p. 656-660, 2005.

TANG, D. et al. Simultaneous chemical fingerprint and quantitative analysis of Ginkgo biloba extract by HPLC-DAD. **Anal Bioanal Chem**, 396(8):3087-95. Apr;2010.

TAVARES, L. D. C. et al. Structure-Activity Relationship of Benzophenanthridine Alkaloids from *Zanthoxylum rhoifolium* Having Antimicrobial Activity. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, 2014.

THUY, T. D.; et al. Novel therapeutic effects of sesamin on diabetes-induced cardiac dysfunction. **Mol Med Rep**, v. 15, n. 5, p. 2949-2956, 2017

- TINE, Y. et al. A Method for LC-MS/MS Profiling of Coumarins in *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) B. Zepernich and Timler Extracts and Essential Oils. **Molecules**, v 22, p 174. 2016.
- TRESVENZOL, L. M. et al. Estudo sobre o comércio informal de plantas Medicinais em goiânia e cidades vizinhas Study about informal trade of medicinal plants in goiânia and Neighboring cities, Brazil. **Rev. eletrônica farm.** v. 3 n 1, p. 23-28, 2006.
- TRIPOS, Inc. 2012. SYBYL-x 2.0. **Discovery Software for Computational Chemistry and Molecular Modelling**. 2012. Disponível em: < http://5univsrv.toyaku.ac.jp/wp/3dpsd/wp-content/uploads/2014/03/SYBYL-X2.1.1_install_booklet_mac.pdf>. Acesso em: 22 Jan. 2015.
- TUAN ANH HL et al., Anti-inflammatory coumarins from *Paramignya trimera*. **Pharm Biol.** Vol 55 n 1 p 1195-1201. 2017
- TUKUN, A. B. Antioxidant capacity and total phenolic contents in hydrophilic extracts of selected Bangladeshi medicinal plants. **Asian Pac J Trop Med.** 2014.
- TULP, M.; BOHLIN, L. Functional versus chemical diversity: is biodiversity important for drug Discovery. **Trend pharmacol. Sci.**, v. 23, n. 5, 2002.
- VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Quím. Nova**, São Paulo, v. 28, n. 3, Maio/Junho 2005.
- VILLALBA, M. A. et al. Atividades farmacológicas dos extratos de *Zanthoxylum chiloperone* (Rutaceae). **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 17, n. 2, p. 236-241, 2007.
- VILLAR, H.O.; KOEHLER, R.T. Comments on the design of chemical libraries for screening. **Mol. Diversity**, Arizona, v. 5, n. 1, p. 13-24, 2000.
- VALENTINI, S. R.; SOMMER, W. A.; MATIOLI, G.. Validação de métodos analíticos. **Arquivos do Mudi**, v.11, p. 26-31, 2007.
- VASSAR, R.; KANDALEPAS, P. C.. The β -secretase enzyme BACE1 as a therapeutic target for Alzheimer's disease. **Alzheimers Res Ther**, v. 31, n. 3, 2011.
- VIEGAS, J. R. C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J.. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Quím. Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.
- VIEIRA, M. G. S. et al. Volatile chemical constituents of the leaves and twigs from *Zanthoxylum syncarpum* Tull.. **Quím. Nova**, v. 32, n. 2, p. 391-393, 2009.
- VILLAMIZAR, V. M.; SUAREZ, L. C.. Mezcla de esteroides aislada del extracto etanólico de *Zanthoxylum caribaeum*; y actividad anti-tuberculosis y anti-malaria del extracto etanólico. **Sci. Technica**, v. 1, n. 33, 2007.

- WALLACE, A. C.; LASKOWSKI, R. A.; THORNTON, J. M. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. **Protein Eng.**, 8, p. 127-134. 1996.
- WANG, B. et al. Fingerprint Chromatogram Analysis of Radix Glehniae by LC Coupled with Hierarchical Clustering Analysis. **Chromatographia**, v. 70, p.811-816, 2009.
- WANG, C. F.; et al. Insecticidal constituents of Essential Oil Derived from *Zanthoxylum armatum* against Two Stored-Product Insects. **J Oleo Sci** v. 64, n. 8, p. 861-868, 2015.
- WANG, Q. M.; et al. The Schizontocidal activity of Daphnetin against Malaria Parasites *In Vitro* and *In Vivo*. **Chinese Journal of Parasitology Disease**, v. 18, p. 204-206, 2000.
- WEBER, A. D. **Estudo fitoquímico e da atividade biológica de *Zanthoxylum rhoifolium***. 2005. 138 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Setor de Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.
- WISHART, D. S. et al. DrugBank: a knowledgebase for drugs, drug actions and drug targets. **Nucleic Acids Res.** v. 36, p. 901–906, 2008.
- WONG, C. F. Flexible ligand flexible protein docking in protein kinases systems. **Biochim. Biophys. Acta**, n. 1784, p. 244251, 2008.
- YAMASHITA, O. M. et al. Fatores que afetam a germinação de sementes e emergência de plântulas de arruda (*Ruta graveolens* L.). **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 11, n. 2, p. 202-208, 2009.
- YANG, L. et al. Exploring off-targets and off-systems for adverse drug reactions via chemical-protein interactome—clozapine-induced agranulocytosis as a case study. **PLOS Comput. Biol.** v. 7, p. 1002-1016, 2011.
- YANG, L.; XU, L.; HE, L. A CitationRank algorithm inheriting Google technology designed to highlight genes responsible for serious adverse drug reaction. **Bioinformatics**, v. 25, p. 2244-2250, 2009.
- YANG, C. H.; et al. Secondary metabolites and cytotoxic activities from the stem bark of *Zanthoxylum nitidum*. **Chem Biodivers**, v. 6, n. 6, p. 846-857, 2009.
- YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. 2ª Edição. Editora: Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2014. 281 p..
- YOUNG, D. The drug design process. **Computational drug design**. New Jersey. J. Wiley & Sons, 2009, p. 7-40.
- ZANON, G. **Análise fitoquímica e estudo das atividades antimicrobiana, antioxidante e de inibição da enzima acetilcolinesterase das espécies *Zanthoxylum rhoifolium* e *Zanthoxylum hyemale***. 2010. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Centro de Ciências Químicas naturais e Exatas - Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), Santa Maria, RS.

ZANON, R. B.; et al. Fitoconstituintes isolados da fração em diclorometano das folhas de *Vernonia tweediana* Baker. **Rev. Bras. Farmacologia**, v. 18, n. 2, p. 226-229, 2008.

ZHANG, H.; WANG, L.. Theoretical elucidation of structure-activity relationship for coumarins to scavenge peroxy radical. **J Mol Struct.**, v. 673, n. 1-3, p. 199-202, 2004.

ZHANG, J.; et al. Pyranocoumarins isolated from *Peucedanum praeruptorum* as differentiation inducers in human leukemic HL-60 cells.. **Planta Med.**, v. 69, n. 3, p. 223-229, 2003.

ZHANG, J.; et al. Effect of zanthoxylum bungeanum maxim on the lipid oxidation and fatty acid composition of dry-cured fish during processing. **J. Food Process. Preserv.** v. 41, n. 3, 2016.

ZHANG, R.; et al. Sesamin Ameliorates High-Fat Diet-Induced Dyslipidemia and Kidney Injury by Reducing Oxidative Stress. **Nutrients**, v. 9, n. 8, 2016.

ZHANG, W. J.; et al. Chemical Composition of Essential Oils from *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. and Their Bioactivities against *Lasioderma serricorne*. **J Oleo Sci.** v. 65, n. 10, p. 871-879, 2016.

ZHANG, Y. et al. Purification and characterization of flavonoids from the leaves of *Zanthoxylum bungeanum* and correlation between their structure and antioxidant activity. **PLoS One.** v. 26 n 9 (8) p. 105725. 2014.

ZHANG, Y. W.; et al. Screening of anti-hypoxia/reoxygenation agents by an in vitro model. Part 1: Natural inhibitors for protein tyrosine kinase activated by hypoxia/reoxygenation in cultured human umbilical vein endothelial cells. **Planta Med.**, 66. n. 2, p. 114-118, 2000.

ZHENG, W.; THORNE, N.; MCKEW, J. C.. Phenotypic screens as a renewed approach for drug discovery. **Drug Discov Today**, v. 18, n. 21-22, p. 1067-1073, 2013.

ZHE FANG et al. Apoptogenic activity of auraptene of *Zanthoxylum schinifolium* toward human acute leukemia Jurkat T cells is associated with ER stress-mediated caspase-8 activation that stimulates mitochondria-dependent or -independent caspase cascade. **Carcinogenesis**, 28 (6): p. 1303-1313, 2007.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonoides. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento** (Org.). Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, cap. 23, 2010.

ZUO GY et al., Synergism of coumarins from the Chinese drug *Zanthoxylum nitidum* with antibacterial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Phytomedicine**, 15;23(14) p. 1814-1820, 2016.

ZUO, G. Y.; et al. Synergism of coumarins from the Chinese drug *Zanthoxylum nitidum* with antibacterial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Phytomedicine**, v. 23, n. 14, p. 1814-1820, 2016.

