

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**DERIVADOS DOS ÁCIDOS CLOROGÊNICO,
CAFEICO E CINÂMICO: OBTENÇÃO, AVALIAÇÃO
DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E DE
INIBIÇÃO ENZIMÁTICA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Luciana de Oliveira Adolpho

Santa Maria, RS, Brasil.

2012

**DERIVADOS DOS ÁCIDOS CLOROGÊNICO, CAFEICO E
CINÂMICO: OBTENÇÃO, AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA E DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA**

Luciana de Oliveira Adolpho

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de Concentração em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Farmacologia.**

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ionara Irion Dalcol

Santa Maria, RS, Brasil.

2012

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Adolpho, Luciana de Oliveira

Derivados dos ácidos Clorogênico, Cafeico e Cinâmico: obtenção, avaliação da atividade antimicrobiana e de inibição enzimática / Luciana de Oliveira Adolpho.-2012.
145 p.; 30cm

Orientadora: Ionara Irion Dalcol

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, RS, 2012

1. Cafeoil. 2. Cinamoil. 3. Prolil Oligopeptidase. 4. Dipeptidil Peptidase IV. 5. Acetilcolinesterase. I. Dalcol, Ionara Irion II. Título.

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**DERIVADOS DOS ÁCIDOS CLOROGÊNICO, CAFEICO E
CINÂMICO: OBTENÇÃO, AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA E DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA**

elaborada por
Luciana de Oliveira Adolpho

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Farmacologia

COMISSÃO EXAMINADORA:

Ionara Irion Dalcol, Dr^a.
(Presidente/Orientadora)

Graciela Maldaner, Dr^a. (URCAMP-Bagé)

Bernardo Baldisserotto, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 27 de abril de 2012.

A Deus, por me dar forças para que eu lograsse
minhas vitórias, sem desistir de lutar.

A meus pais, Irion e Loris, por todo amor,
dedicação, confiança e pela pessoa que hoje sou.
E a meu irmão, Douglas, pela amizade,
companheirismo e amor.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela perseverança, força e fé, por nunca me deixar andar por caminhos escuros.

A meus pais, por tudo o que sou. Por poderem me dar a maior herança que um dia eu poderia receber que é o amor e a educação.

Ao meu irmão, que está sempre ao meu lado em todos os momentos da minha vida, sempre disposto para qualquer coisa.

À minha professora, orientadora e amiga, Ionara, pela confiança depositada em mim; pela compreensão, paciência e dedicação. Por ter investido em mim e ensinado tudo aquilo que estava ao seu alcance e um pouco mais, com carinho de mãe.

À minha “primana” Fabi pela amizade e carinho junto com a tia Baixinha e tio Zé, por estarem sempre na equipe de apoio, sendo minha segunda família.

Ao professor Ademir, pela amizade e dedicação. Por estar sempre disponível em suas colaborações.

Ao professor Ernest Giralt, pela colaboração em seus laboratórios em Barcelona; por ter confiado no nosso trabalho.

A minha “IC” Dani, por ter me agüentado, além de ajudar no desenvolvimento deste trabalho.

Às meninas do lab 2014, Ale, Jana, Maura e Nalin, pelo companheirismo e amizade.

Aos meninos do cafezinho, Marcelo, Vini e Alexandre, muito obrigada pelo “café com bobagem”.

Às colegas Caroline e Graciela pela amizade e ensinamentos desde 2004, quando iniciei minhas atividades no NPPN.

Aos demais colegas de laboratório, pelo convívio e companheirismo.

Ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia pela oportunidade de crescimento.

A CAPES pela bolsa concedida para execução deste trabalho.

“Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo o propósito debaixo do céu.

(Eclesiastes 3, 1)

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Universidade Federal de Santa Maria
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia
Universidade Federal de Santa Maria

DERIVADOS DOS ÁCIDOS CLOROGÊNICO, CAFEICO E CINÂMICO: OBTENÇÃO, AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA

AUTORA: LUCIANA DE OLIVEIRA ADOLPHO
ORIENTADORA: IONARA IRION DALCOL
Local e Data da Defesa: Santa Maria, 27 de abril de 2012.

Nos últimos anos observa-se uma intensificação nas pesquisas por novos inibidores enzimáticos produzidos por plantas medicinais usadas no tratamento de transtornos mentais, tais como esquizofrenia, ansiedade, amnésia, diferentes estágios de depressão e o transtorno afetivo bipolar. O estudo de inibidores das enzimas prolil oligopeptidase (POP) e acetilcolinesterase (AChE), estão diretamente relacionados ao tratamento de tais enfermidades do sistema nervoso central (SNC). Em um trabalho com a planta medicinal *Hypericum brasiliense*, nativa do Brasil, foi isolado como um dos principais metabólitos secundários o ácido clorogênico, que demonstrou ter capacidade de inibir a POP e a AChE. A partir desta observação, foram obtidas três séries de derivados do ácido clorogênico, do ácido cafeico e do ácido cinâmico através de técnicas simples de derivatização e acoplamento com a prolina metil éster. Os derivados foram obtidos através de técnicas usuais de acetilação, metilação e esterificação, com rendimentos satisfatórios de 50-90 %. Já os acoplamentos com a prolina metil éster foram realizados com hexafluorofosfato de *O*-(7-azabenzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio (HATU)/ diisopropiletilamina (DIEA) em dimetilformamida ou cloroformato de isobutila/ *N*-metilmorfolina em tetraidrofurano. Estes compostos foram avaliados quanto à capacidade inibitória das enzimas POP e AChE, bem como foram testados frente a enzima dipeptidil peptidase IV (DPP IV). Também foi realizado um estudo da atividade antimicrobiana dos derivados obtidos. Os resultados obtidos indicaram que, frente à DPP IV e AChE, os compostos avaliados não demonstraram significativa capacidade inibitória. Entretanto, o derivado metil éster e 1,7-acetonídeo obtidos a partir do ácido clorogênico, o cafeoato de metila e o próprio ácido cafeico mostraram capacidade inibitória seletiva para a POP, com valores de IC₅₀ entre 3 e 14 µM. Com relação à atividade antimicrobiana, os derivados apresentaram moderada ação bactericida, destacando-se os compostos derivados do ácido cinâmico por serem fungicidas.

Palavras-chave: Cafeoil. Cinamoil. Prolil Oligopeptidase. Dipeptidil Peptidase IV. Acetilcolinesterase.

ABSTRACT

Master's Degree Dissertation
Posgraduate Program in Pharmacology
Universidade Federal de Santa Maria

CHLOROGENIC, CAFEIC AND CINNAMIC ACIDS DERIVATIVES: OBTENTION, ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND ENZYMATIC INHIBITION EVALUATION

AUTHOR: LUCIANA DE OLIVEIRA ADOLPHO

ADVISOR: IONARA IRION DALCOL

Date and place of the defense: Santa Maria, APRIL 27th, 2012.

In recent years there has been an increase in researches for new enzyme inhibitors on medicinal plants used in the treatment of disorders such as schizophrenia, anxiety, amnesia, different stages of depression and bipolar affective disorder. The study of enzymatic inhibitors of prolyl oligopeptidase (POP) and acetylcholinesterase (AChE) are directly related to the treatment of central nervous system diseases. In a research with the species *Hypericum brasiliense*, native from Brazil, it was isolated as main secondary metabolite the chlorogenic acid, a compound able to inhibit POP and AChE. From this observation, three series of chlorogenic, caffeic and cinnamic acids derivatives were obtained through simple derivatization reactions and coupling with the amino acid proline. The derivatives were obtained by usual acetylation, methylation and esterification reactions with satisfactory yields of 50-90%. The couplings with the proline methyl ester were performed using either *O*-(7-azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HATU)/ diisopropylethylamine (DIEA) in dimethylformamide or isobutyl chloroformate/ *N*-methylmorpholine in tetrahydrofuran. The derivatives were tested against the enzymes POP, AChE and dipeptidyl oligopeptidase (DPP IV). Also, a study was conducted to determine the antibacterial and antifungal activities of all derivatives. The capacity of the tested compounds to inhibit DPP IV and AChE was not exceptional. In contrast, the derivatives methyl ester and 1,7-acetonide obtained from chlorogenic acid, and caffeic acid and its methyl ester derivative showed selectivity and satisfactory performance as POP inhibitors, with IC₅₀ values of 3 to 14 μM. All compounds showed moderate antimicrobial activity.

Keywords: Caffeoyl. Cinnamoyl. Prolyl Oligopeptidase. Dipeptidyl Peptidase. Acetylcholinesterase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	A) ácido quínico; B) ácido cafeico ; C) ácido clorogênico	37
Figura 2 –	Estrutura do ácido cafeico	38
Figura 3 –	Estrutura do ácido cafeico fenil-etil-éster (CAPE)	39
Figura 4 –	Estrutura química dos compostos ácido cinâmico e ácido <i>p</i> -metoxi-cinâmico.	39
Figura 5 –	Formação do ácido cinâmico a partir da Fenilalanina pela ação da PAL.	40
Figura 6 –	Ésteres derivados do ácido cinâmico com aplicação biológica.....	41
Figura 7 –	Síntese da prolina. http://www.icb.ufmg.br/lbcd/prodabi3/grupos/grupo4/links/prolina.html)	42
Figura 8 –	Estrutura tridimensional da Prolina.....	43
Figura 9 –	Estruturas químicas dos fármacos derivados da prolina. (A) Captopril® e (B) Enalapril®	43
Figura 10 –	Representação tridimensional da estrutura da POP. A estrutura está representada com cores que vão do azul ao vermelho conforme se vai do extremo <i>N</i> - para o extremo <i>C</i> -terminal	46
Figura 11 –	Representação tridimensional do sítio ativo da POP complexado com o Z-Pro-Prolinal. Os átomos de carbono da enzima e do inibidor estão representados com a cor cinzenta e verde respectivamente. As linhas a preto representam ligações de hidrogênio.	47
Figura 12 –	Z – L – Pro- Prolinal e P1, P2 e P3 sítios de ligação	47
Figura 13 –	Estrutura química de alguns inibidores sintéticos da POP.....	48
Figura 14 –	Estruturas de alguns inibidores naturais da POP. (A) baicalina; (B) berberina; (C) ácido rosmarínico.....	49
Figura 15 –	Mecanismo de ação dos inibidores da DPP IV	50
Figura 16 –	NVP-LAF237 (Vildagliptina), (c) Sitagliptina (d) BMS-477118 (Saxagliptina)	51
Figura 17 –	Visão esquemática da hipótese colinérgica e localização dos receptores muscarínicos. (Figura reproduzida de W. GREENLEE et al, 2001).....	52
Figura 18 –	Representação de alguns inibidores sintéticos da acetilcolinesterase: (a) tacrina, (b) rivastigmina, (c) donezepil.	53
Figura 19 –	Inibidores naturais da acetilcolinesterase: (a) Galantamina, (b) Huperizina-A, (c) Fisostigmina.....	54
Figura 20 –	Cromatograma analítico de CLAE do composto 2 em coluna C ₁₈ ; gradiente linear de 0- 100% B (A- H ₂ O com 0,045% TFA; B- ACN com 0,036% TFA) em 8 min, ϕ : 1 mL/min e λ = 315 nm.	89
Figura 21 –	E espectro de massas obtido por técnica de CLAE-EM gerado no modo positivo do composto 2.	89

Figura 22 – (a) Espectro de RMN ¹ H do composto 2 em CDCl ₃ a 400.13 MHz; (a) expansão de 5,00 a 6,50 ppm; (b) expansão de 7,00 a 7,70 ppm (d) Espectro de RMN ¹³ C de 2 em CDCl ₃ a 100,62 MHz.	91
Figura 23 – Cromatograma analítico de CLAE do composto 3 em coluna C ₁₈ ; gradiente linear de 0- 100% B (A- H ₂ O com 0,045% TFA; B- ACN com 0,036% TFA) em 8 min, φ: 1 mL/min e λ= 315 nm.	92
Figura 24 – Espectro de massas obtido por técnica de CLAE-EM gerado no modo positivo do composto 3.	92
Figura 25 – Espectro de RMN ¹³ C de 3 em CDCl ₃ a 100,62 MHz.	93
Figura 26 – Cromatograma analítico de CLAE do composto 4 em coluna C ₁₈ ; gradiente linear de 0- 100% B (A- H ₂ O com 0,045% TFA; B- ACN com 0,036% TFA) em 8 min, φ: 1 mL/min e λ= 315 nm.	94
Figura 27 – Espectro de massas obtido por técnica de CLAE-EM gerado no modo positivo do composto 4.	95
Figura 28 – (a) Espectro de RMN ¹ H do composto 4 em CDCl ₃ a 400.13 MHz; (b) Espectro de RMN ¹³ C de 4 em CDCl ₃ a 100,63 MHz.	96
Figura 29 – Cromatograma analítico de CLAE do composto 5 em coluna C ₁₈ ; gradiente linear de 0- 100% B (A- H ₂ O com 0,045% TFA; B- ACN com 0,036% TFA) em 8 min, φ: 1 mL/min e λ= 315 nm.	97
Figura 30 – Espectro de massas obtido por técnica de CLAE-EM gerado no modo positivo do composto 5.	98
Figura 31 – Espectro de RMN ¹³ C de 5 em CD ₃ OD a 100,63 MHz.	98
Figura 32 – Cromatograma analítico de CLAE em coluna C18 do composto 7; gradiente linear 0-100% B (A: H ₂ O; B: MeOH) em 15 minutos, fluxo: 1 ml/mim. λ= 314 nm.	100
Figura 33 – Espectro de massas obtido por técnica de CLAE-EM gerado no modo positivo do composto 7.	101
Figura 34 – (a) Espectro de RMN ¹ H do composto 7 em CDCl ₃ a 400,13 MHz; (b) Espectro de RMN ¹³ C de 7 em CDCl ₃ a 100,63 MHz.	102
Figura 35 – Cromatograma analítico de CLAE do composto 8 em coluna C ₁₈ ; gradiente linear de 0- 100% B (A- H ₂ O com 0,045% TFA; B- ACN com 0,036% TFA) em 8 min, φ: 1 mL/min e λ= 315 nm.	103
Figura 36 – (a) Espectro de RMN ¹ H do composto 8 em CDCl ₃ a 400.13 MHz; (b) Expansão da região de 6,70 a 7,10 ppm, (c) Espectro de RMN ¹³ C de 8 em CDCl ₃ a 100,63 MHz.	105
Figura 37 – Cromatograma analítico de CLAE do composto 9 em coluna C ₁₈ ; gradiente linear de 0- 100% B (A- H ₂ O com 0,045% TFA; B- ACN com 0,036% TFA) em 8 min, φ: 1 mL/min e λ= 315 nm.	106
Figura 38 – Espectro de massas obtido por técnica de CLAE-EM gerado no modo positivo do composto 9.	106

Figura 39 – (a) Espectro de RMN ¹ H do composto 9 em CDCl ₃ a 400.13 MHz; (b) Espectro de RMN ¹³ C de 9 em CDCl ₃ a 100,63 MHz.....	107
Figura 40 – Cromatograma analítico de CLAE do composto 10 em coluna C ₁₈ ; gradiente linear de 0- 100% B (A- H ₂ O com 0,045% TFA; B- ACN com 0,036% TFA) em 8 min, φ: 1 mL/min e λ= 315 nm.	109
Figura 41 – Espectro de massas obtido por técnica de CLAE-EM gerado no modo positivo do composto 10.	109
Figura 42 – (a) Espectro de RMN ¹ H do composto 10 em CDCl ₃ a 400.13 MHz; (b) Espectro de RMN ¹³ C de 10 em CDCl ₃ a 100.63MHz.....	110
Figura 43 – Cromatograma analítico de CLAE do composto 11 em coluna C ₁₈ ; gradiente linear de 0- 100% B (A- H ₂ O com 0,045% TFA; B- ACN com 0,036% TFA) em 8 min, φ: 1 mL/min e λ= 315 nm.	112
Figura 44 – Espectro de massas obtido por técnica de CLAE-EM gerado no modo positivo do composto 11.	112
Figura 45 – (a) Espectro de RMN ¹ H do composto 11 em CDCl ₃ a 400,13 MHz; (b) Espectro de RMN ¹³ C de 11 em CDCl ₃ a 100,63 MHz.....	113
Figura 46 – Cromatograma analítico de CLAE em coluna C ₁₈ do composto 13. Condições: 0-100% B (A: H ₂ O; B: MeOH) em 20 minutos. Fluxo: 1 ml/mim. λ= 314 nm	114
Figura 47 – (a) Espectro de RMN ¹ H do composto 13 em CDCl ₃ a 400,13 MHz; (b) Espectro de RMN ¹³ C de 13 em CDCl ₃ a 100,63 MHz.....	115
Figura 48 – Cromatograma analítico de CLAE em coluna C ₁₈ do composto 14. Condições: 0-100% B (A: H ₂ O; B: MeOH) em 20 min. Fluxo: 1 ml/mim. λ= 277,4 nm.....	116
Figura 49 – (a) Espectro de RMN ¹ H do composto 14 em CDCl ₃ a 400,13 MHz; (b) Espectro de RMN ¹³ C de 14 em CDCl ₃ a 100,63 MHz.....	117
Figura 50 – Cromatograma analítico de CLAE em coluna C ₁₈ do composto 15. Condições: 0-100% B (A: H ₂ O; B: MeOH) em 20 min. Fluxo: 1 ml/mim. λ= 314 nm.....	118
Figura 51 – (a) Espectro de RMN ¹ H do composto 15 em CDCl ₃ a 400,13 MHz; (b) Espectro de RMN ¹³ C de 15 em CDCl ₃ a 100,63 MHz.....	119
Figura 52 – Cromatograma analítico de CLAE em coluna C ₁₈ do composto 17. Condições: 0-100% B (A: H ₂ O; B: MeOH) em 20 min. Fluxo: 1 ml/mim. λ= 356 nm.....	120
Figura 53 – (a) Espectro de RMN ¹ H do composto 17 em CDCl ₃ a 400,13 MHz; (b) Espectro de RMN ¹³ C de 17 em CDCl ₃ a 100,63 MHz.....	121
Figura 54 – Cromatograma analítico de CLAE em coluna C ₁₈ do composto 18. Condições: 0-100% B (A: H ₂ O; B: MeOH) em 20 min. Fluxo: 1 ml/mim. λ= 356 nm.....	122
Figura 55 – (a) Espectro de RMN ¹ H do composto 18 em CDCl ₃ a 400,13 MHz; (b) Espectro de RMN ¹³ C de 18 em CDCl ₃ a 100,63 MHz.....	123

- Figura 56 – Cromatograma analítico de CLAE em coluna C₁₈ do composto 19. Condições: 0-100% B (A: H₂O; B: MeOH) em 20 min. Fluxo: 1 ml/min. λ = 356 nm124
- Figura 57 – (a) Espectro de RMN ¹H do composto 19 em CD₃OD a 400,13 MHz; (b) Espectro de RMN ¹³C de 19 em CD₃OD a 100,63 MHz.125
- Figura 58 – Ensaio de inibição da POP dos derivados do ácido clorogênico. Gráficos de IC₅₀ para os compostos ativos: (a) composto 1 (IC₅₀ = 109,8 μ M); (b) composto 2 (IC₅₀ = 98,88 μ M); (c) composto 3 (IC₅₀ = 3,0 μ M); (d) composto 4 (IC₅₀ = 14,3 μ M); (e) composto 5 (IC₅₀ = 210 μ M)129
- Figura 59 – Ensaio de inibição da POP dos derivados do ácido cafeico. Gráficos de IC₅₀ para os compostos ativos: a) composto 6 (IC₅₀ = 12,5 μ M); b) composto 7 (IC₅₀ = 198 μ M); c) composto 8 (IC₅₀ = 5 μ M); d) composto 9 (IC₅₀ = 28 μ M); e) composto 10 (IC₅₀ = 185 μ M); f) composto 11 (IC₅₀ = 120 μ M)130

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultados dos ensaios de inibição da POP e DPP IV de 1 – 21	127
Tabela 2 – Resultados dos ensaios de atividade inibitória da AChE pelos métodos da bioautografia e colorimétrico*	132
Tabela 3 – Concentração bactericida e fungicida (CIM) dos derivados do ácido cafeico expressa em $\mu\text{g/mL}^*$	134
Tabela 4 – Concentração bactericida e fungicida (CIM) dos derivados do ácido cinâmico expressa em $\mu\text{g/mL}^*$	135

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Derivados a partir do ácido clorogênico.	32
Esquema 2 – Derivados do ácido cafeico.	33
Esquema 3 – Derivados do ácido cinâmico.	34
Esquema 4 – Derivados do ácido <i>p</i> -metoxicinâmico.	34
Esquema 5 – Rota biossintética da formação de compostos fenólicos.	36
Esquema 6 – Obtenção dos compostos 2-5. Reagentes e condições: (a) Ac ₂ O, DMAP, piridina; (b) Amberlite IRA 120H, MeOH; (c) Acetona anidra, H ₂ SO ₄ ; (d) H-Pro-OMe.HCl, HATU, DIEA em DMF.	87
Esquema 7 – Obtenção dos compostos 7-9. Reagentes e condições: (a) Me ₂ SO ₄ / NaOH; (b) MeOH/ H ₂ SO ₄ ; (c) Ac ₂ O/ piridina/ DMAP.	99
Esquema 8 – Obtenção dos compostos 10-11. Reagentes e condições: (a) H-Pro-OMe.HCl, HATU/ DIEA em DMF.	108
Esquema 9 – Obtenção dos compostos 13-15. Reagentes e condições: (a) MeOH/ H ₂ SO ₄ ; (b) Pro-OMe.HCl, cloreto de isobutila, DMF/THF, <i>n</i> -metil-morfolina; (c) KOH.	114
Esquema 10 – Obtenção dos compostos 17-19. Reagentes e condições: (a) MeOH/ H ₂ SO ₄ ; (b) Pro-OMe.HCl, cloroformiato de isobutila, DMF/THF, <i>N</i> -metilmorfolina; (c) KOH.	120

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACH	Ácido clorogênico
AChE	Acetilcolinesterase
ACN	Acetonitrila
Asp	Aspergina
ATP	Trifosfato de adenosina
CAPE	Ácido cafeico fenil-etil-éster
CB	Controle branco
CBM	Concentração bactericida mínima
CCD	Cromatografia em camada delgada
CDCl₃	Clorofórmio deuterado
CFM	Concentração fungicida mínima
CI	Controle inóculo
CIM	Concentração inibitória mínima
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-EM	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas
COX-1	Enzima ciclooxigenase-1
COX-2	Enzima ciclooxigenase-2
DA	Doença de Alzheimer
DIEA	Diisopropiletilamina
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DMAP	Dimetilaminopiridina
DMF	Dimetilformamida
DPP IV	Dipeptidil peptidase
ECA	Enzima conversora da angiotensina
GLP-1	Peptídeo semelhante ao glucagón -1
HATU	Hexafluorofosfato de o-(azabenzotriazol-i-il)-1,1,3,3-tetrametil urânio hexafluorofosfato metanaminio
H-GP-AMC	H-Gly-Pro-metilcumarinil-7-amida
His	Histidina
HIV-1	Vírus da imunodeficiência humana tipo 1
H-Pro-OMe	Prolina metil éster

iAChE	Inibidores da enzima acetilcolinesterase
IC50	Capacidade inibitória de 50%
J	Constante de acoplamento
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
PAL	L-fenilalanina amônia-liase
pMIQ	Logaritmo negativo da concentração mínima inibitória em mol
POP	Prolil oligopeptidase
ppm	Partes por milhão
Pro	Prolina
RMN	Ressonância magnética nuclear
Ser	Serina
SNC	Sistema nervoso central tetrametilurônio
TFA	Ácido trifluoracético
TMS	Tetrametilsilano
UFC	Unidade formadora de colônia
ZGP-AMC	<i>N</i> - benziloxycarbonil-Gly-Pro-metilcumarinil-7-amida
δ	Deslocamento químico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	29
2 OBJETIVOS	32
2.1 Objetivos Gerais	32
2.2 Objetivos Específicos.....	32
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	35
3.1 Compostos fenólicos	35
3.1.1 Ácido Clorogênico.....	36
3.1.2 Ácido Cafeico	38
3.1.3 Ácidos Cinâmico e p-Metoxi-Cinâmico.....	39
3.2 Prolina	41
3.3 Ensaio de Avaliação Biológica	44
3.3.1 Avaliação da Atividade Inibitória Enzimática.....	44
3.3.1.1 Proli oligopeptidase (POP)	44
3.3.1.2 DPP IV.....	49
3.3.1.3 Acetilcolinesterase (AChE)	51
3.3.2 Avaliação da Atividade Antimicrobiana	54
4 MANUSCRITO	57
4.1 Evaluation of caffeoyl and cinnamoyl derivatives as potential prolyl oligopeptidase inhibitors	57
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	87
5.1 Obtenção dos compostos 2-21.....	87
5.1.1 Obtenção dos derivados do ácido clorogênico (compostos 2-5)	87
5.1.2 Obtenção dos derivados do ácido cafeico (compostos 7- 9)	99
5.1.3 Obtenção dos derivados do ácido cinâmico (compostos 13-15)	114
5.1.4 Obtenção dos derivados do ácido p-metoxicinâmico (compostos 17-19).....	120
5.2 Ensaio de inibição enzimática	126
5.2.1 Ensaio de Inibição das enzimas POP e da DPP IV	126
5.2.2 Ensaio de Inibição da enzima AChE.....	131
5.3 Determinação de Atividade Antimicrobiana	133
5.3.1 Determinação da CIM pelo método de microdiluição.....	133
6 CONCLUSÕES.....	137
REFERÊNCIAS	139

1 INTRODUÇÃO

Um dos mais importantes fatores para o sucesso no descobrimento de um novo fármaco é a diversidade química dos compostos a serem selecionados, cujas fontes podem ser: produtos naturais, compostos sintéticos ou química combinatória. Dentre estas possibilidades, os produtos naturais são considerados como uma das maiores fontes de diversidade química (TREVISAN *et al*, 2003).

Entre os produtos naturais de origem vegetal, observa-se ampla e diversa arquitetura molecular, como ilustram os terpenos, bioformados por rota biossintética geral comum, apresentando diversos centros esterogênicos e arranjos moleculares, possuindo apenas átomos de *C*, *H* e *O*. A espetacular diversidade molecular de padrões estruturais que se encontram nas distintas classes de produtos naturais, como flavonóides, isoflavonóides, alcalóides, entre outras, representam fonte inesgotável de modelos originais de arquitetura molecular enantiomericamente pura, como mencionou Pasteur em 1860: “*todos os produtos de laboratório tem imagem sobreponível...ao contrário todos os produtos essenciais à vida são dissimétricos...*” (BARREIRO, FRAGA, 2009).

Ainda hoje, no século da química combinatória, metabólitos secundários de plantas, fungos, organismos marinhos e microorganismos são importantes fontes para o desenvolvimento de novos fármacos, seja de uso direto da substância de origem natural ou a partir dela. Muitos compostos de origem natural são usados na indústria de medicamentos como protótipos de fármacos, devido a suas características próprias, como biodisponibilidade e eficácia não serem adequadas para o uso direto como fármaco, sendo então, necessárias algumas modificações estruturais a fim de melhorar as características farmacocinéticas e farmacodinâmicas, e assim se ter um fármaco eficaz.

A eficácia de produtos naturais para tratar e curar doenças humanas é bem conhecida, como se evidencia em relação a doenças tais como a Doença de Alzheimer (DA) (BREWER, 2000). Nos últimos anos destaca-se a busca de novos inibidores em espécies usadas no tratamento de transtornos mentais, tais como esquizofrenia, ansiedade, amnésia, diferentes estágios da depressão, transtorno afetivo bipolar e para DA.

Em vista disso, pesquisadores buscam, a partir destas moléculas potenciais, fazer algumas modificações estruturais a fim de melhorar os aspectos farmacológicos destas. Simples modificações estruturais são capazes de alterar significativamente as propriedades físico-

químicas de determinados grupamentos funcionais, sendo de fundamental importância na fase farmacodinâmica da ação de um fármaco, uma vez que a afinidade deste pelo seu biorreceptor é dependente do somatório das forças de interação de grupamentos farmacofóricos com sítios complementares da biomolécula (BARREIRO et al., 2009).

As enzimas da classe das prolil oligopeptidases (POPs) são proteínas terapêuticamente de enorme relevância, especialmente a POP do cérebro humano. As POPs pertencem à família das serina peptidases, sendo enzimas que, diferentemente de outras enzimas desta mesma família, caracterizam-se pela capacidade de hidrolisar somente substratos peptídicos relativamente pequenos (menos de 30 resíduos de aminoácidos) (RACYS et al., 2010). Uma propriedade específica das POPs é a capacidade de clivar seqüências peptídicas no extremo carboxila de resíduos de prolina (ligações *Pro-Xaa*), por isto são conhecidas também como “Post-Proline Cleaving Enzyme” (GARCÍA-HORSMAN et al., 2007). Atualmente muitas enzimas da família das POP são alvos da grande indústria farmacêutica, pois degradam muitos neuropeptídeos envolvidos em funções neurológicas como aprendizagem e memória. As pesquisas indicam que a POP do cérebro humano está envolvida em uma variedade de transtornos e patologias do sistema nervoso central (SNC) tais como amnésia, diferentes estágios da depressão e o transtorno afetivo bipolar (WILLIAMS, 2004; VENÄLÄINEN et al., 2004). Em pacientes afetados, observou-se que o nível desta enzima no soro é maior que os níveis encontrados em pacientes não afetados. Assim, o desenvolvimento de inibidores da POP tornou-se um desafio importante, visto ainda serem prementes mais estudos sobre inibidores específicos disponíveis para uso clínico. Muitos neuropeptídeos envolvidos em transtornos da depressão tais como a substância P, a β -endorfina e a arginina-vasopressina são substratos da POP (JALKAMEN et al., 2006; WALLÉN et al., 2002).

Assim como a POP, a enzima dipeptidil peptidase-4 (DPP IV) pertence também ao grupo das serina proteases. Esta enzima, porém, apresenta baixa homologia de seqüência com a POP, estando relacionada com a mesma devido às similaridades apresentadas quanto à estrutura tridimensional. A DPP IV é uma enzima de membrana que cliva dipeptídeos no extremo *N*-terminal de oligopeptídeos quando o penúltimo aminoácido é prolina. Ao contrário da POP, a DPP IV está envolvida na inativação de peptídeos como glucagon, que estimulam a secreção de insulina, através da inativação do GLP-1 (MAES et al., 1999; VENÄLÄINEN et al., 2004; McINTOSH et al., 2006; APARICIO et al., 2006).

A enzima acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima que possui papel regulatório na neurotransmissão colinérgica, controlando os níveis do neurotransmissor acetilcolina. Ela catalisa a hidrólise da acetilcolina restante no espaço sináptico em colina e acetato. Esta reação

é necessária para possibilitar que o neurônio colinérgico retorne a seu estado de repouso após a ativação, evitando assim uma transmissão excessiva de acetilcolina, que produziria uma sobre-estimulação do músculo e, como consequência, debilidade e cansaço. A AChE está amplamente distribuída no sistema nervoso central sendo também encontrada em eritrócitos, linfócitos e plaquetas de mamíferos (KATZUNG, 2005). Os bio-ensaios que permitem avaliar a capacidade de produtos naturais em inibir a AChE são importantes pelo fato que níveis aumentados desta enzima estão diretamente relacionados com doenças como a doença de Alzheimer (GREENLEE et al., 2001; FILHO et al., 2006). Em nível celular, esta doença está associada à redução de taxas de acetilcolina no processo sináptico, diminuindo a neurotransmissão colinérgica cortical, além de outras substâncias como noradrenalina, dopamina, serotonina, entre outros. Um dos principais medicamentos utilizados para tratar a DA, baseado na hipótese colinérgica, é a galantamina, um alcalóide isolado de várias espécies da família *Amaryllidaceae*. A galantamina é um inibidor da AChE de ação longa, seletivo, reversível e competitivo, cujos efeitos permanecem mesmo após o término do tratamento (MRO CZCK, 2009).

O presente estudo tem como meta principal a obtenção de derivados dos compostos de origem natural ácido clorogênico, ácido cafeico e ácido cinâmico, bem como a realização de um estudo de avaliação de suas atividades de inibição das enzimas POP, DPP IV e AChE, almejando a identificação de candidatos a agentes terapêuticos com perfil de inibidor enzimático. Também é de interesse o estudo da atividade antimicrobiana dos compostos obtidos, em vista da incessante busca por novos fármacos antibióticos.

A escolha do ácido clorogênico (ACH) como composto de partida deste estudo deve-se ao fato deste ter sido isolado como um dos principais metabólitos secundários presentes na espécie *Hypericum brasiliense* em um trabalho anterior desenvolvido por nosso grupo de pesquisa (DALCOL et al., 2007). A espécie em estudo foi selecionada juntamente com outras, por pertencerem à mesma família do *Hypericum perforatum*, um dos mais antigos remédios da medicina popular em Europa, usado no tratamento de doenças do sistema nervoso central, como ansiolítico e no alívio dos sintomas de depressão (LORENZI, 2002). Em uma análise do extrato de *Hypericum brasiliense* rico em ácido clorogênico, foi observada considerável atividade inibitória da POP e da AChE (DALCOL et al., 2007). Em virtude disso, escolheu-se este metabólito natural como principal material de partida para obtenção de novos inibidores enzimáticos. Também se utilizou como materiais de partida neste trabalho os compostos naturais ácido cafeico e ácido cinâmico por terem em comum em sua estrutura o grupamento cinamoil e cafeoil.

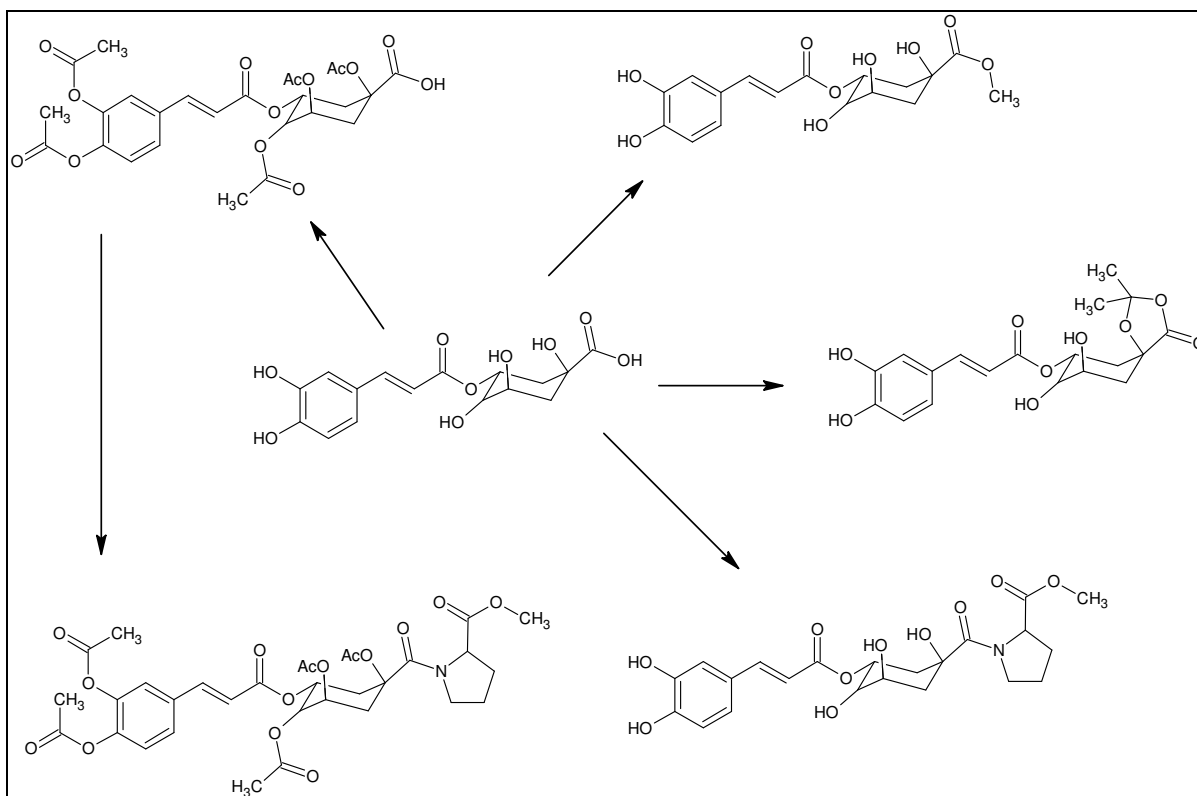
2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Este trabalho tem como objetivo geral a pesquisa por novos inibidores enzimáticos a partir de derivados dos compostos naturais ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido cinâmico e o ácido *p*-metoxi-cinâmico como possíveis candidatos a inibidores das enzimas-alvo POP, AChE e DPP IV.

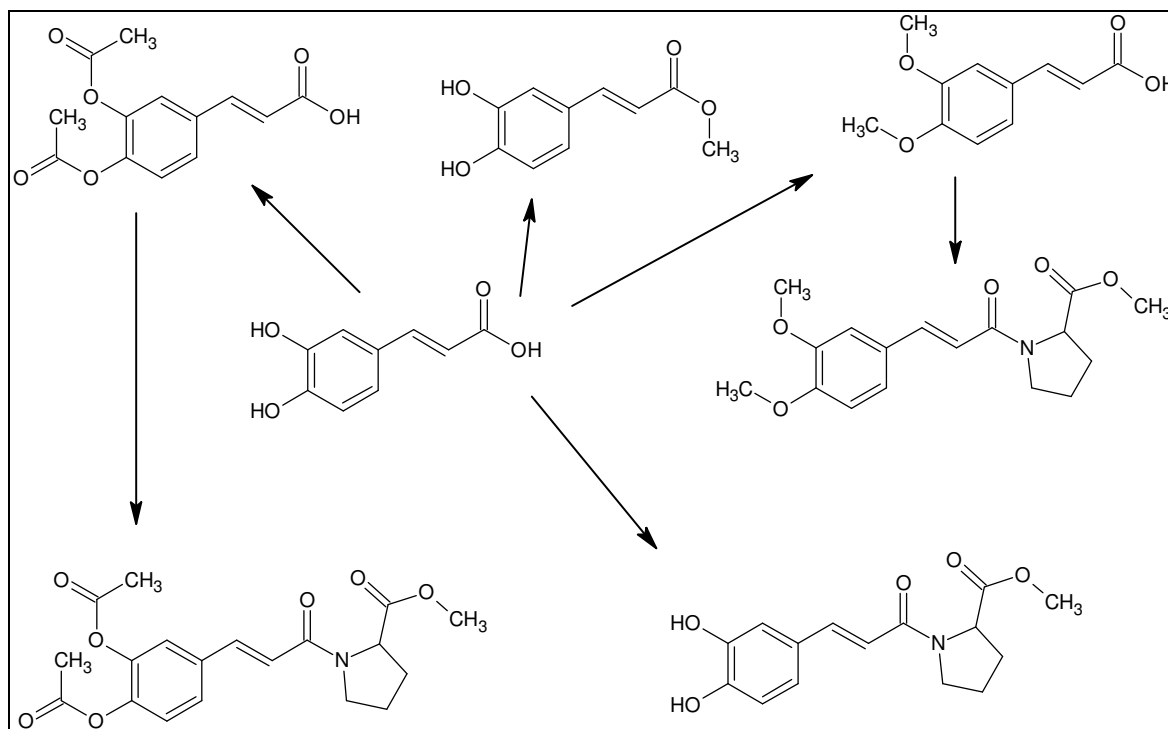
2.2 Objetivos Específicos

a) Utilizar o composto natural ácido clorogênico como precursor da série de derivados (Esquema 1), utilizando-se reações tradicionais de derivatização e reações de acoplamento com o aminoácido prolina protegido na forma de H-Pro-OMe:



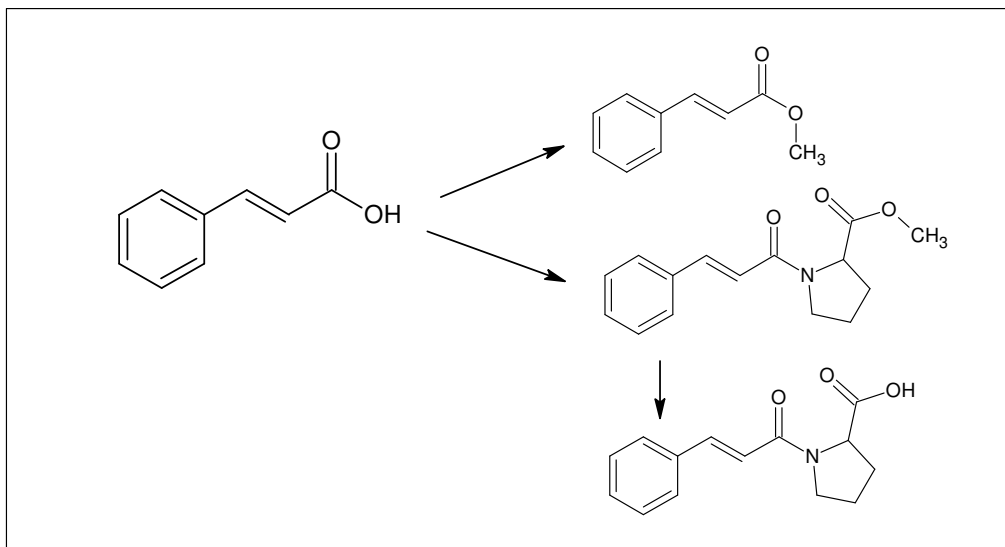
Esquema 1 – Derivados a partir do ácido clorogênico.

b) Obter, através do precursor ácido cafeico, a série de derivados (Esquema 2), a partir de reações tradicionais de derivatização e acoplamento com o aminoácido prolina protegido na forma de H-Pro-OMe.



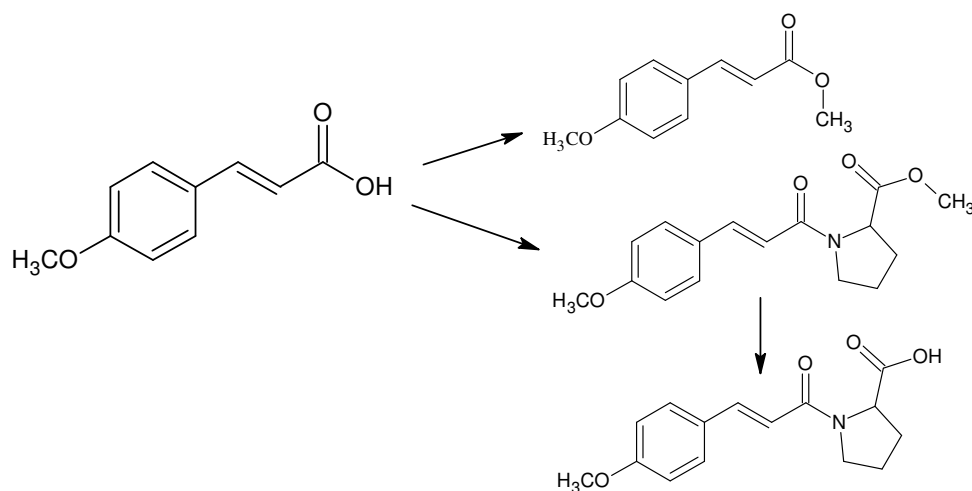
Esquema 2 – Derivados do ácido cafeico.

c) A partir do composto natural ácido cinâmico, obter a série de derivados apresentada no Esquema 3:



Esquema 3 – Derivados do ácido cinâmico

d) A partir do precursor natural ácido *para*-metoxicinâmico, obter a série de derivados, segundo o Esquema 4:

Esquema 4 – Derivados do ácido *p*-metoxicinâmico

e) A avaliação da atividade inibidora dos inibidores sintéticos obtidos frente às enzimas-alvo deste estudo: POP, DPP IV e AChE.

f) A avaliação da atividade antimicrobiana dos compostos obtidos

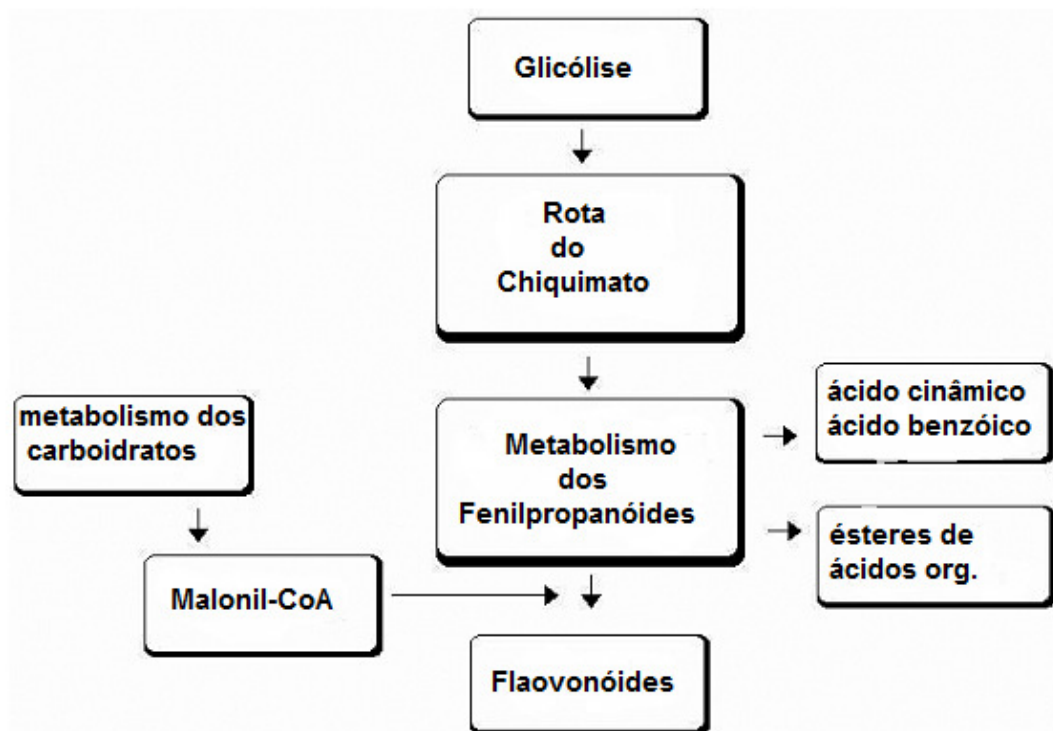
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Compostos fenólicos

Todas as plantas produzem uma grande quantidade e diversidade de metabólitos secundários. Dentre as substâncias de origem natural, destacam-se os compostos fenólicos, um dos grupos de metabólitos mais importantes produzidos por plantas. Os compostos fenólicos são caracterizados por terem pelo menos um anel aromático (C6) tendo um ou mais grupos hidroxila (MICHALAK, 2006).

Nas plantas, eles são sintetizados em resposta a condições de estresse. São importantes como proteção contra herbívoros e patógenos, agindo como pesticidas por sua ação alelopática; agem como atrativos para animais polinizadores, por contribuírem para a pigmentação do vegetal, da mesma forma que protegem a planta contra os raios ultravioletas; constituem materiais para fazer a parede celular impermeável ao gás e água e como material estrutural para dar estabilidade à planta. Uma grande variedade de compostos fenólicos são essenciais para o crescimento e reprodução das plantas. Em alimentos, são responsáveis pelo sabor, adstringência, amargor, pigmentação, odor e estabilidade oxidativa dos produtos (SHAHIDI et al., 2004).

Os compostos fenólicos são sintetizados a partir de duas vias metabólicas, sendo a via do chiquimato a principal (Esquema 5) e a via do ácido mevalônico a menos significativa. A via do ácido chiquímico está presente em plantas, fungos e bactérias, mas não em animais. No processo metabólico o ácido chiquímico é responsável pela formação de aminoácidos aromáticos como a fenilalanina. Pela ação da enzima L-fenilalanina amônia-liase (PAL), ocorre a perda de amônia da fenilalanina formando o ácido cinâmico. A PAL é regulada por fatores ambientais como o nível nutricional, a luz (pelo efeito do fitocromo) e infecção por fungos (PERES, 2012).



Esquema 5 – Rota biossintética da formação de compostos fenólicos

3.1.1 Ácido Clorogênico

Ácidos clorogênicos são uma família de ésteres formados por certos ácidos hidroxinâmicos e o ácido quínico (Figura 1 A). Este último, junto ao ácido cafeico (Figura 1 B), forma um éster chamado ácido clorogênico ou ácido 3-cafeoilquínico (Figura 1 C).

O termo *ácido clorogênico* parece ter sido introduzido em 1846 por Payen para designar um composto fenólico com função ácida de estrutura ainda desconhecida, que conferia coloração verde ao meio aquoso quando em meio levemente alcalino e exposto ao ar. No entanto, a estrutura química do ácido clorogênico foi estabelecida por Fischer como ácido 3-cafeoilquínico (de MARIA et al., 2004; dos SANTOS et al., 2006).

Segundo Clifford (CLIFFORD, 2000), o ácido clorogênico comercialmente disponível é denominado pelas regras IUPAC tradicionalmente definidas em 1976 como ácido 5-*O*-cafeoilquinico. Porém, segundo Ma e colaboradores, (MA et al. 2011) na nomenclatura IUPAC atualizada ele é denominado ácido 3-*O*-cafeoilquinico (CAS 327-97-9). Assim, ambas nomenclaturas são atualmente utilizadas na literatura, sendo o ácido clorogênico comercial empregado no trabalho o de CAS 327-97-9 (CLIFFOR, et al. 2008).

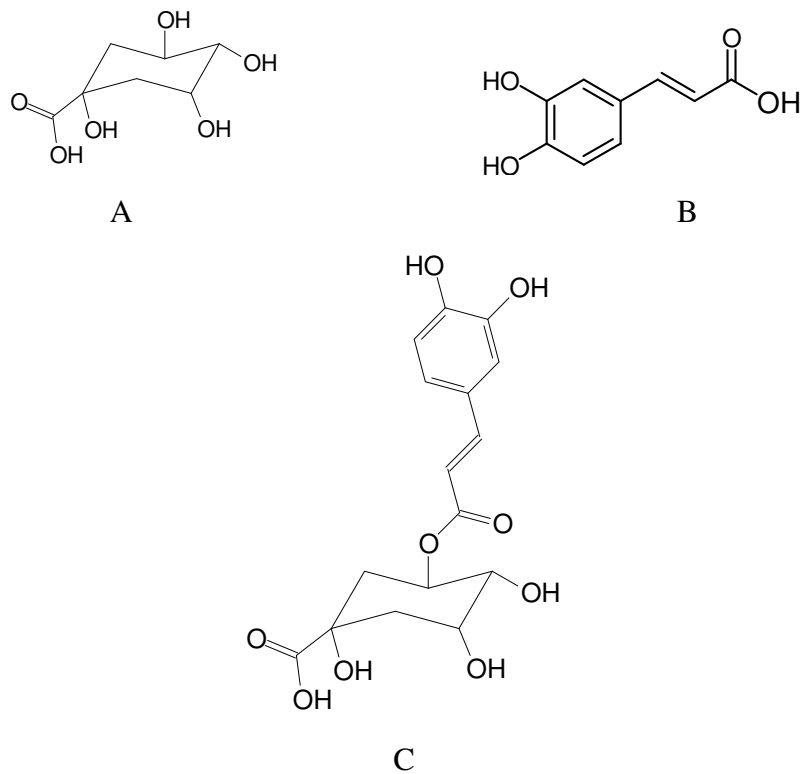


Figura 1 – A) ácido quínico; B) ácido cafeico ; C) ácido clorogênico

O ácido clorogênico é o representante mais importante e mais abundante da série dos ácidos clorogênicos, sendo o mais conhecido dos fenóis dietéticos biologicamente ativos (GARAMBONE et al., 2007). É encontrado em grande concentração em muitos vegetais, frutas, batatas, erva mate e, principalmente no café. Estima-se que uma pessoa consome em média 1g de ácido clorogênico por dia, uma vez que se encontra presente em chás, bebidas e em vários alimentos (SEFKOW, 2001).

Apresenta um amplo espectro de atividades biológicas, tais como: antioxidante, antimicrobiano, capacidade para aumentar a utilização da glicose hepática, inibição específica da glicose 6-fosfato, inibição da HIV-1 integrase, atividades anti-espasmódica, antipirética, antiinflamatória, inibição da mutagenicidade de compostos cancerígenos e da POP (SCHWAB et al., 2001; FARAH et al., 2005; dos SANTOS et al., 2006; GIRALDO et al., 2007; DALCOL et al., 2007; LOU et al., 2011).

3.1.2 Ácido Cafeico

O ácido cafeico, também conhecido como ácido 3,4-diidroxicinâmico (Figura 2), é dos hidroxicinamatos e fenilpropanóides um dos metabólitos mais amplamente distribuído em tecidos vegetais. Ele é normalmente encontrado como uma variedade de derivados incluindo amidas simples, ésteres, ésteres de açúcar e glicosídeos (AYTEKIN, MORIMURA and KIDA 2011; FU, et al. 2010).

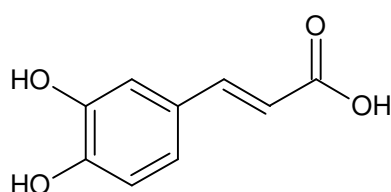


Figura 2 – Estrutura do ácido cafeico

Os derivados de na forma de ésteres e amidas possuem um amplo espectro de atividades biológicas, incluindo propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e de proteção contra danos no fígado induzidos por Ni. Alguns derivados do cafeato têm demonstrado capacidade para inibir as enzimas ciclooxigenase 1 e 2 (COX-1 e COX-2), assim como apresentam efeitos anti-inflamatórios (BUZZI et al. 2009).

A atividade antimicrobiana destes derivados tem atraído muita atenção e tem sido muito estudada por diversos grupos de pesquisa nos últimos anos. O ácido cafeico é usado em alimentos para inibir o crescimento de *Clostridium botulinum*. O conjugado cafeico-lisozima possui efeito bactericida para *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Os ácidos dicafeoilquínico e dicafeoiltartárico são potentes inibidores seletivos do gene integrase do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (FU et al. 2010).

Um derivado do ácido cafeico que tem sido amplamente estudado é o ácido cafeico fenil-etil-éster (CAPE) (Figura 3), o qual é encontrado na própolis e possui um amplo espectro de atividades biológicas. Dentre as atividades já descritas, destaca-se o efeito inibitório sobre o HIV-1 integrase, ciclooxigenase e lipoxigenase, além de atividade antimicrobiana, antiinflamatória, antioxidante e antitumoral (KURATA et al. 2011).

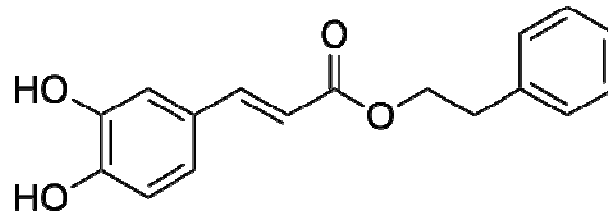


Figura 3 – Estrutura do ácido cafeico fenil-etil-éster (CAPE)

3.1.3 Ácidos Cinâmico e *p*-Metoxi-Cinâmico

O ácido cinâmico, também chamado de ácido 3- fenil-2-propenóico (Figura 4) é um composto fenólico natural que ocorre em alimentos e vegetais. É um produto de eliminação de amônia da fenilalanina no tecido vegetal pela enzima fenilalanina amônia-liase (PAL), principal enzima da via do ácido chiquímico (Figura 5) (PERES, 2012). Dentro da família do ácido cinâmico, encontra-se o ácido *p*-metóxi-cinâmico (Figura 4), com características muito semelhantes às do ácido cinâmico.

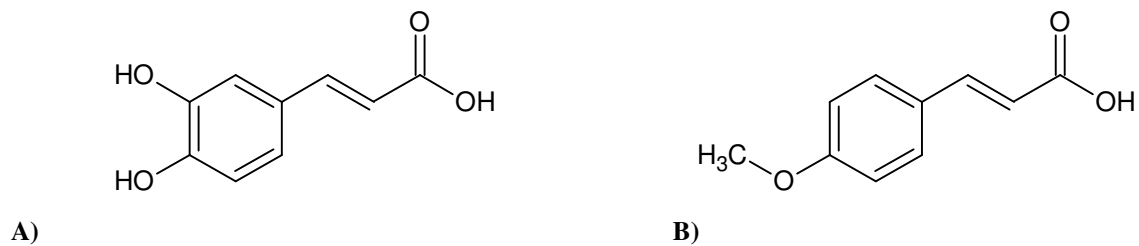


Figura 4 – Estrutura química dos compostos ácido cinâmico e ácido *p*-metoxi-cinâmico.

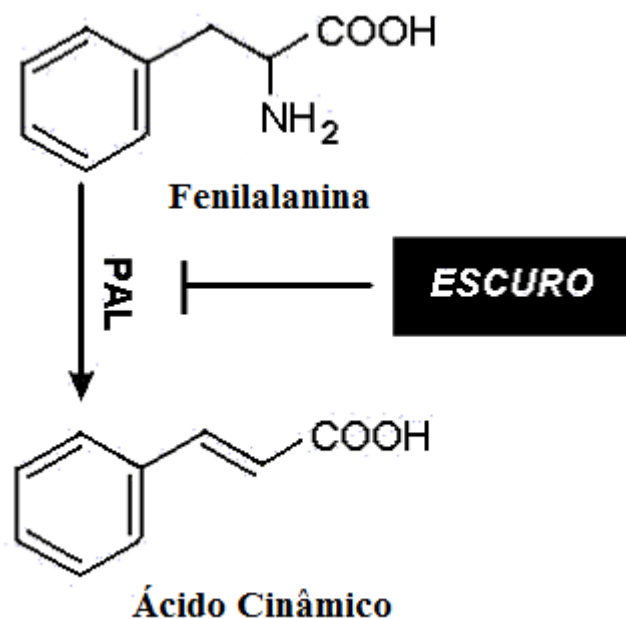


Figura 5 – Formação do ácido cinâmico a partir da Fenilalanina pela ação da PAL.

Os derivados do ácido cinâmico são muito comuns em plantas e a maioria deles ocorre na forma de ésteres de açúcares e ácido quínico ou como glicosídeos (a partir da hidroxila fenólica) (GEISSMAN et al., 1968). O ácido cinâmico e seus derivados se ligam ao complexo lignina-polímero, à hemicelulose e à celulose na parede celular das plantas, conferindo, desta forma, resistência mecânica (rigidez), química e biológica (contra fungos e bactérias) às plantas (GALLÃO, 2012).

O ácido cinâmico tem sido utilizado como precursor na síntese comercial de ésteres cinâmicos para a aplicação em perfumaria, cosmética e na produção de medicamentos. Por exemplo, foi observado que o cafeato de metila (Figura 6) possui atividade antitumoral contra o sarcoma, bem como atividade antimicrobiana. Da mesma forma, os metoxicinamatos substituídos, como o 3,4,5-trimetoxicinamato de etila (Figura 6), possuem importante papel no controle de doenças inflamatórias. Na indústria de cosméticos, pode-se citar o uso de ésteres do ácido cinâmico de cadeia longa, como o metoxicinamato de octila (Figura 6), o qual é bem conhecido como agente de proteção solar e por proporcionar lubricidade para pele, evitando o ressecamento pela ação do vento (SHARMA, 2011).

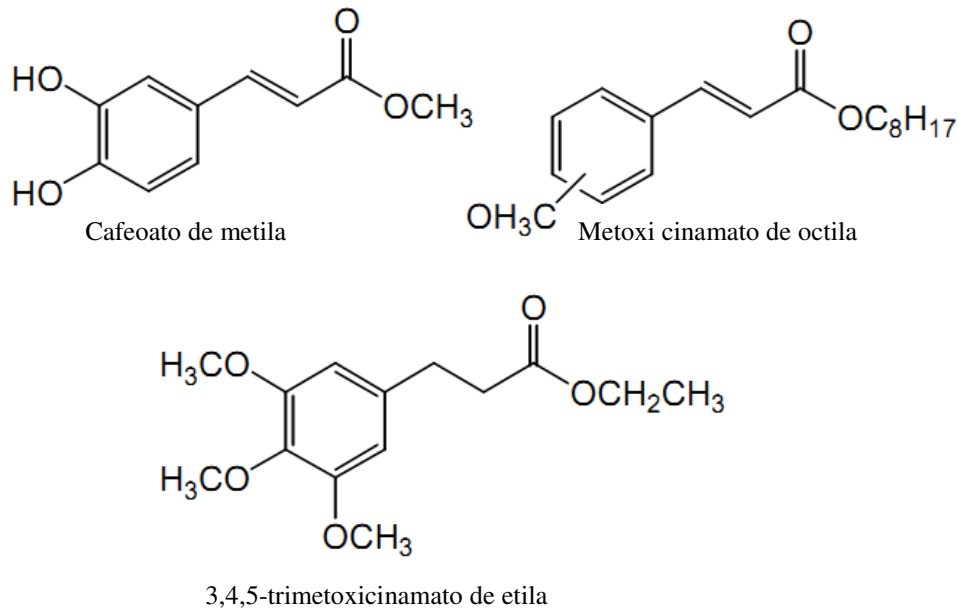


Figura 6 – Ésteres derivados do ácido cinâmico com aplicação biológica.

O ácido cinâmico e seus derivados têm uma ampla gama de aplicação terapêutica, além de baixa toxicidade. O ácido cinâmico possui comprovada atividade antimicrobiana e antifúngica, atividade anti-tumoral contra tumores humanos malignos, incluindo melanoma glioblastoma e adenocarcinoma de próstata e pulmão (EKMEKCIOGLU et al., 1998). Também possui ação antiinflamatória, antidiabética, antihiperlicêmica, atividade antioxidante e antibacteriana, entre outras (TAWATA et al., 1996; NAM et al. 2001; SHARMA, 2011).

3.2 Prolina

Os aminoácidos naturais são conhecidos como α -aminoácidos porque possuem em sua estrutura química um grupo amino primário ($-\text{NH}_2$) e um grupo carboxílico (COOH) ligados a um mesmo átomo de carbono (o carbono α). O carbono α apresenta um centro estereogênico (exceto para a glicina), fazendo com que cada aminoácido possua as características de compostos quirais com atividade óptica com configuração *L* do C α (LIST, 2002).

Os aminoácidos diferem uns dos outros através de suas cadeias laterais, que variam quanto à estrutura, tamanho e carga elétrica (LENHINGER, 2002). Existem 20 aminoácidos proteinogênicos que, quando unidos seqüencialmente, constituem polímeros de pesos moleculares variados. Eles são denominados essenciais, uma vez que não temos a capacidade

de produzi-los. Além dos aminoácidos essenciais, existem outros tipos de aminoácidos, porém não entram como constituintes da cadeia de proteínas, sendo considerados não proteinogênicos, possuindo funções específicas ao metabolismo. São exemplos a ornitina, citrulina, *L*-dopa e selenocisteína (Del CISTIA, 2011).

A prolina é o único aminoácido proteinogênico secundário, devido ao seu nitrogênio α -amino estar contido dentro de um anel pirrolidina. Devido a esta estrutura particular, a prolina possui funções biológicas diferenciadas. Seu exclusivo papel em proteínas é bem reconhecido, fornecendo não só a estabilidade física das proteínas, como por exemplo, no colágeno, também serve como base para o reconhecimento molecular e de sinalização. Alguns autores sugerem que toda a interação proteína-proteína está baseada no reconhecimento molecular prolina-dependente (PHANG et al., 2010).

A *L*-prolina é um aminoácido não essencial em crianças e adultos, e condicionalmente essencial em prematuros. A concentração normal de prolina no plasma humano é de 100 a 450 μ M, sendo estes valores menores em crianças. No líquor os valores são ainda mais baixos (1 a 4 μ M) (PHANG et al., 2010). Esse aminoácido é formado pela reação entre a carboxila em posição γ do glutamato e o ATP resultando num composto denominado glutamato-5-fosfato. A enzima que atua nesta reação é a glutamil quinase. O glutamato-5-fosfato é reduzido por NADPH a glutamato-5-semialdeído (semialdeído glutâmico) que se torna cíclico espontaneamente formando o pirrolino-5-carboxilato, este sofre uma redução final catalizada pela pirrolino-5-carboxilato redutase, uma enzima que requer NADPH. Esta última redução resulta na formação da prolina (Figura 7).

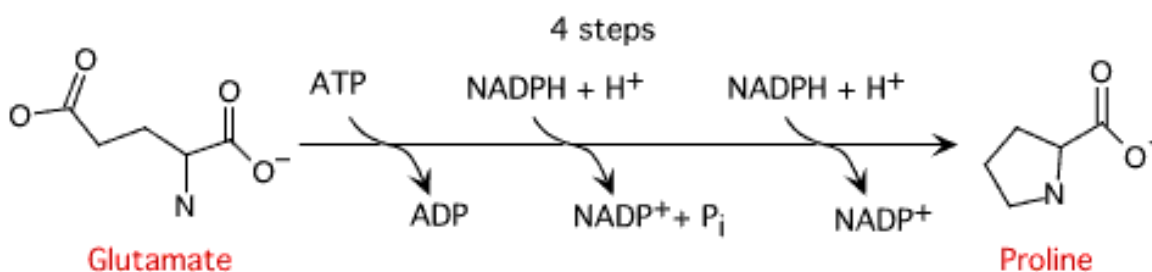


Figura 7 – Síntese da prolina. <http://www.icb.ufmg.br/lbcd/prodabi3/grupos/grupo4/links/prolina.html>

Na prolina (Figura 8), o átomo de nitrogênio faz parte de um anel rígido, o que limita a rotação em torno da ligação N-C α . Assim, um resíduo de Pro introduz uma dobra desestabilizadora em uma α -hélice. Além disso, o átomo de nitrogênio em um resíduo Pro em uma ligação peptídica não possui nenhum hidrogênio substituinte que possa participar de ligações de hidrogênio com outros resíduos (LENHINGER, 2002). Este aminoácido está ganhando crescente importância como componente central em produtos farmacêuticos e produtos químicos. Alguns derivados da L-prolina são potenciais inibidores da ECA como, por exemplo, o Captopril® e seu análogo Enalapril® (Figura 9). Outros derivados da L-prolina tem aplicação como fungicidas como, por exemplo, algumas hidantoínas bicíclicas (DRAUZ et al., 1986).

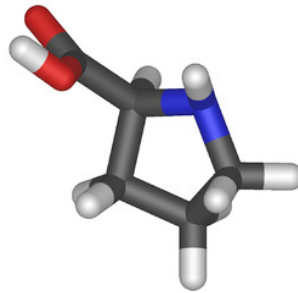


Figura 8 – Estrutura tridimensional da Prolina

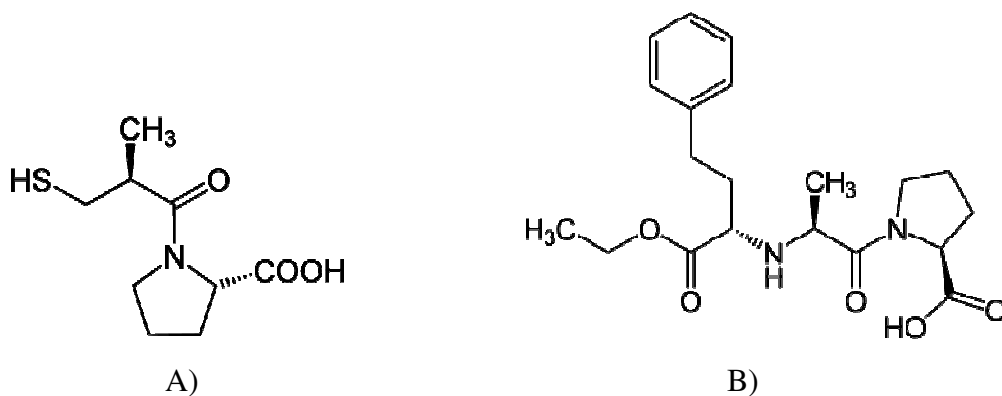


Figura 9 – Estruturas químicas dos fármacos derivados da prolina. (A) Captopril® e (B) Enalapril®

3.3 Ensaio de Avaliação Biológica

A introdução de ensaios de avaliação biológica *in vitro* foi uma das mais significativas mudanças na área de produtos naturais nos últimos anos. O entendimento dos mecanismos fisiológicos e bioquímicos, acompanhado do aumento de testes com receptores e enzimas, permitiu o desenvolvimento de sistemas eficientes e rápidos de bioensaios (BREWER, 2000).

Os ensaios *in vitro* são experiências biomédicas muito úteis e importantes. Eles têm o potencial pra produzir dados de grande relevância sobre o mecanismo molecular de ação de todos os compostos biologicamente ativos, embora ainda seja um grande desafio extrapolar as respostas de tais experimentos *in vitro* para *in vivo* (BARNARD et al., 2005).

Dentre a vasta variedade de ensaios biológicos *in vitro* hoje disponíveis para aplicação e estudo de moléculas em laboratório, os mais usuais são os ensaios de atividade antioxidante, atividade antimicrobiana, atividade anti-inflamatória, analgesia; atividade antiviral, atividade antitumoral, toxicidade e ensaios de inibição enzimática para diversas enzimas, dentre outros.

3.3.1 Avaliação da Atividade Inibitória Enzimática

3.3.1.1 Prolil oligopeptidase (POP)

As prolil-oligopeptidases (POP) formam um grupo de enzimas citolíticas (80 kDa) dentro da família das peptidases serina. Pertencem a este grupo enzimas como a própria prolil oligopeptidase (POP, EC 3.4.21.26), dipeptidil peptidase IV (DPP IV, EC 3.4.14.5), a oligopeptidase B (OB, EC 3.4.21.83) e a acilaminoacil peptidase (ACPH, EC 3.4.19.1). (GARCÍA-HORSMAN et al., 2007) As enzimas desta família, especialmente a POP, são descritas por hidrolizar oligopeptídeos com menos de 30 aminoácidos (VENÄLÄINEN et al., 2004; TARRAGÓ et al., 2005).

A POP foi encontrada no útero humano, onde degrada a oxitocina. A enzima também é conhecida por prolil endopeptidase e “post-proline cleaving enzyme” (FALCÃO, 2004). O último nome é devido ao fato da enzima hidrolisar preferencialmente as ligações peptídicas no extremo carboxila dos resíduos de prolina. Esta preferência pela prolina está envolvida na

maturação e degradação de hormônios peptídicos e neuropeptídeos (MAES et al., 1999; JALKANEN et al., 2011). A POP está bastante distribuída nos diferentes tecidos, embora se encontre mais concentrada no cérebro. No sistema nervoso central, esta enzima degrada neuropeptídios envolvidos no processo de aprendizado e memória (WALLÉN et al., 2002; TARRAGÓ et al., 2005; KLIMAVICIUSA et al., 2012).

A enzima POP está implicada em algumas doenças do sistema nervoso central, sendo que concentrações elevadas de POP no plasma são observadas em estados de depressão, transtorno afetivo bipolar, esquizofrenia, casos de mania e ansiedade induzidas por estresse, esquizofrenia e estresse pós-traumático (FALCÃO, 2004; TARRAGÓ, et al., 2005). Tanto o anti-depressivo fluoxetina quanto o fármaco antimania valproato restauram a atividade da prolil oligopeptidase a níveis normais. Algumas evidências indicam que a POP pode contribuir para a sintomatologia da doença de Alzheimer, em particular no que toca à perda de memória (FALCÃO, 2004; VENÄLÄINEN, et al., 2004; TARRAGÓ, et al., 2005; JALKANEN, et al., 2011).

A estrutura cristalina da POP foi determinada por Fulöp et al em 1998 (FULÖP et al., 1998). A estrutura tridimensional da enzima foi determinada por cristalografia de raio-X a partir da molécula nativa e do complexo com o inibidor Z-Pro-Prolinal. A molécula tem uma forma cilíndrica, com uma altura aproximada de 60 Å e um diâmetro de 50 Å (Figura 10). Apresenta dois domínios, o catalítico e o da hélice ψ , estando os dois covalentemente ligados entre si (FULÖP et al., 1998; FALCÃO, 2004).



Figura 10 – Representação tridimensional da estrutura da POP. A estrutura está representada com cores que vão do azul ao vermelho conforme se vai do extremo *N*- para o extremo *C*-terminal

O sítio ativo da enzima é formado por três resíduos de aminoácidos, a Ser⁵⁵⁴, o Asp⁶⁴¹ e a His⁶⁸⁰. Localiza-se numa grande cavidade situada na interface dos dois domínios (Figura 11). O mecanismo de ligação do substrato ao sítio ativo foi elucidado através do estudo do complexo formado entre a POP e o seu inibidor Z-Pro-Prolinal (Figura 12). Assim, constatou-se que ocorre um ataque do nucleófilo das cadeias laterais da Ser⁵⁵⁴ ao átomo de carbono do aldeído, resultando na formação de um aducto hemiacetal em uma reação reversível (WALLÉN et al., 2002; FALCÃO, 2004; RACYS et al., 2010).

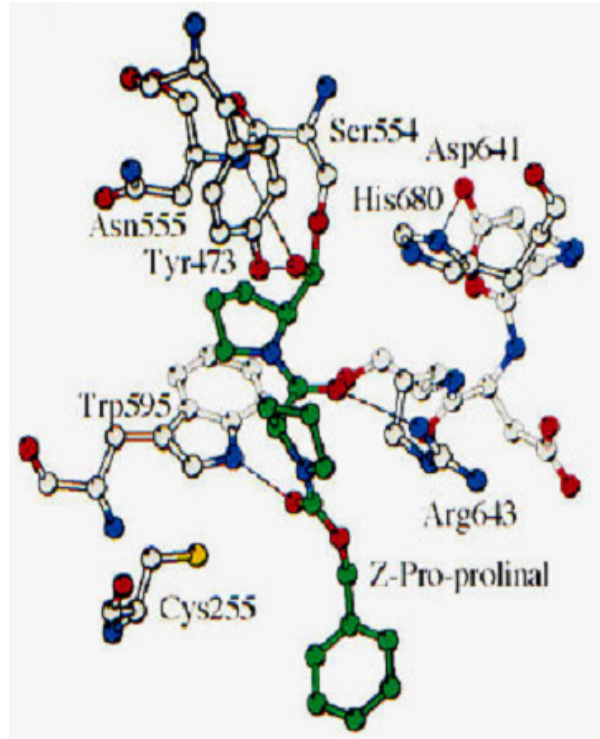


Figura 11 – Representação tridimensional do sítio ativo da POP complexado com o Z-Pro-Prolinal. Os átomos de carbono da enzima e do inibidor estão representados com a cor cinzenta e verde respectivamente. As linhas a preto representam ligações de hidrogênio.

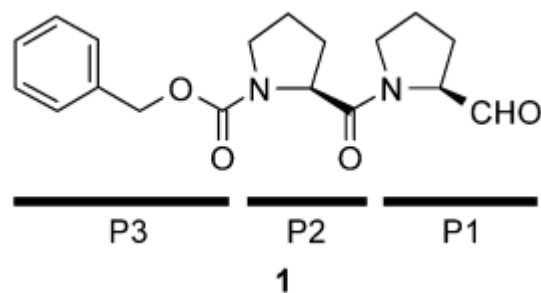


Figura 12 – Z – L – Pro- Prolinal e P1, P2 e P3 sítios de ligação

Baseando-se na estrutura do inibidor Z-Pro-Prolinal, muitos pesquisadores já desenvolveram uma série de inibidores da POP (Figura 13). (LAWANDI et al., 2010).

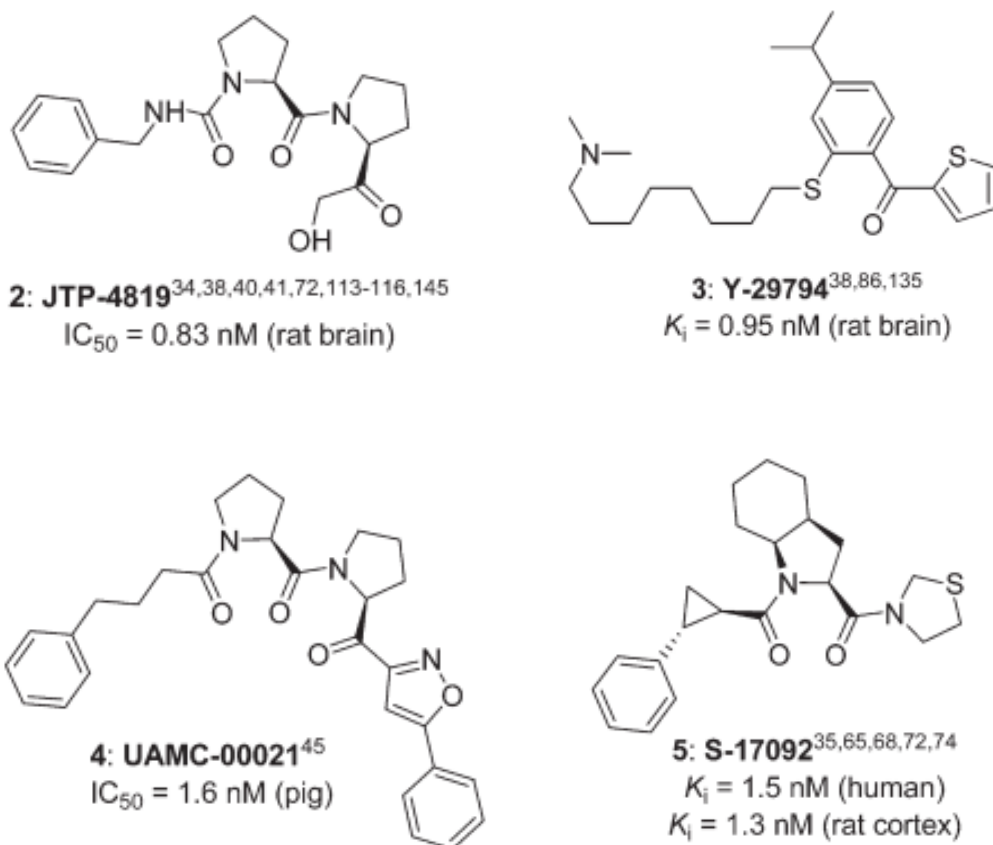


Figura 13 – Estrutura química de alguns inibidores sintéticos da POP

Além dos inibidores sintéticos, foram descritos alguns inibidores naturais da prolil oligopeptidase, tais como a baicalina (TARRAGÓ et al., 2008), o próprio ácido clorogênico (TEIXIDÓ et al., 2010), ácido rosmarínico e berberina (PARKA et al., 2010) (Figura 14).

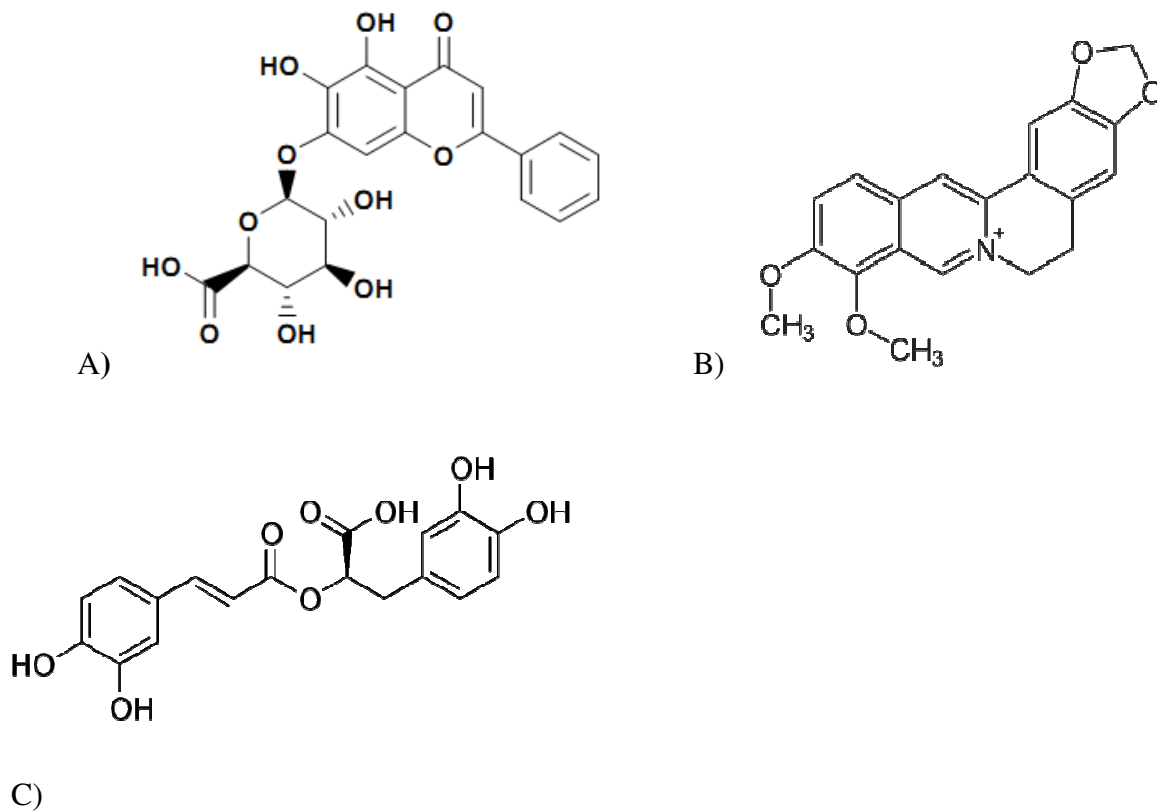


Figura 14 – Estruturas de alguns inibidores naturais da POP. (A) baicalina; (B) berberina; (C) ácido rosmarínico

3.1.1.2 DPP IV

Dipeptidil peptidase IV (DPP IV CE 3.4.14.5) é uma prolil peptidase que cliva preferencialmente proteínas e peptídeos após um resíduo do aminoácido prolina. A DPP IV é caracterizada pela capacidade de clivar dipeptídeos Xaa Xaa-Pro-Ala ou preferencialmente a partir do *N*-terminal do polipeptídeos onde Xaa é qualquer aminoácido menos Pro (GREEN et al., 2006). A DPP IV foi descrita pela primeira vez em 1966 como glicil-prolina-naftilamidase e foi subsequentemente caracterizada como uma glicoproteína de membrana plasmática ectopeptidase de 110 kDa (McINTOSH et al., 2006). DPP IV está associada com a membrana plasmática de uma variedade de células, incluindo a porção venosa de células endoteliais capilares, hepatócitos, enterócitos e células dos glomérulos renais e túbulos proximais (HILDEBRANDT et al., 2000).

Esta enzima está envolvida na degradação do hormônio peptídico semelhante ao glucagon, o GLP-1. Este hormônio é um potente estimulador da liberação endógena de

insulina, sendo considerado um dos principais responsáveis pelo efeito incretina, denominação que se aplica ao fato de que a glicose, quando administrada por via oral, tem um poder 60% maior de estimular a secreção de insulina que quando aplicada por via endovenosa. O efeito incretina ocorre porque o GLP-1 estimula a secreção de insulina e, além disso, o GLP-1 inibe a secreção de glucagon. Estas ações são glicose-dependentes e apenas observadas em condições de hiperglicemia. Os efeitos fisiológicos do GLP-1 contribuem de modo importante para o controle da glicemia tanto no período pós-prandial quanto em jejum e estão diminuídos nos portadores de diabetes do tipo 2 (DM₂) (KIM et al., 2008; KURUKULASURIYA et al., 2006).

O que inviabiliza o uso terapêutico do GLP-1 para corrigir a hiperglicemia em pacientes com DM₂ é sua vida média plasmática extremamente curta, devido a sua rápida degradação pela enzima dipeptidil peptidase IV (DPP IV), o que conduziu ao aumento nas pesquisas para o desenvolvimento de inibidores da DPP IV a fim de aumentar a meia-vida do GLP-1 e normalizar a homeostase da glicose (KURUKULASURIYA et al., 2006). Dentre as estratégias de contornar essa situação e aumentar o tempo de vida plasmática do GLP-1, cita-se o desenvolvimento de agonistas do receptor GLP-1, a síntese de análogos do GLP-1 resistentes à inativação da DPP IV e a descoberta de agentes inibidores da DPP IV que, desta forma, possibilitariam o uso deste hormônio no tratamento da diabetes tipo 2 (Figura 15) (AHREN, 2008).



Figura 15 – Mecanismo de ação dos inibidores da DPP IV

Vários inibidores da DPP IV foram descobertos, sendo que alguns deles se encontram em fase clínica de desenvolvimento. Estes incluem NVP-DPP728 (Figura 16 a), NVP-LAF237 (Vildagliptina, 16 b), Sitagliptina da Merck, que já foi aprovado pelo FDA (Figura 16 c) e BMS-477118 (Saxagliptina, Figura 16 d) (SINGH et al., 2008).

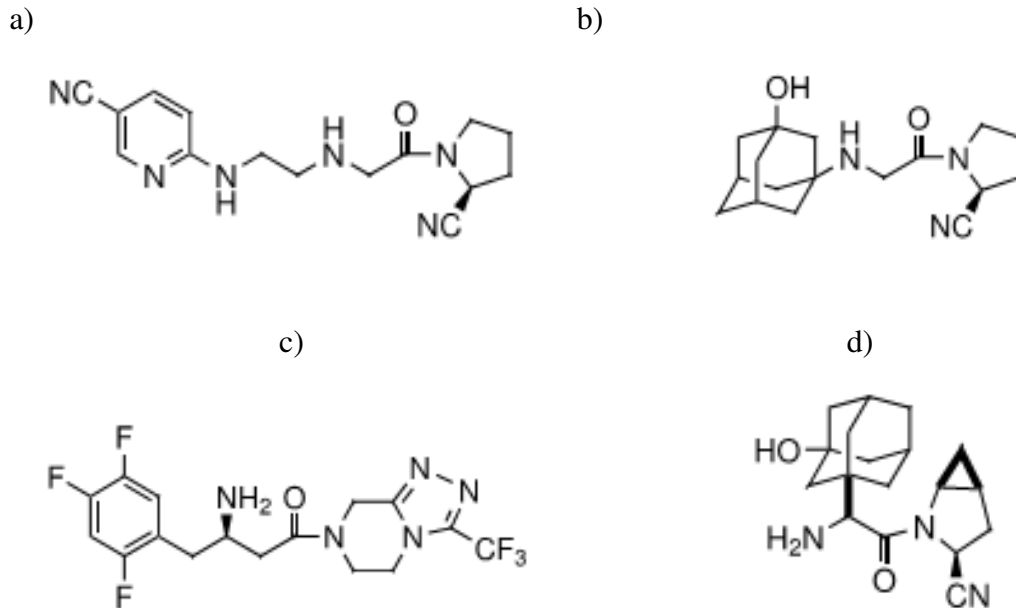


Figura 16 – Derivados da DPP IV que se encontram em fase clínica. (a) NVP-DPP728, (b) NVP-LAF237 (Vildagliptina), (c) Sitagliptina (d) BMS-477118 (Saxagliptina)

Dentre os compostos de origem natural com atividade inibitória da DPP IV, destaca-se a berberina, já apresentada na Figura 14 b, a qual inibe também a POP (CHAKRABARTI et al., 2011).

3.1.1.3 Acetilcolinesterase (AChE)

A acetilcolinesterase (AChE) possui papel regulatório na neurotransmissão colinérgica, controlando os níveis do neurotransmissor acetilcolina. Ela catalisa a hidrólise da acetilcolina restante no espaço sináptico em colina e acetato (Figura 17). Esta reação é necessária para possibilitar que o neurônio colinérgico retorne a seu estado de repouso após a ativação,

evitando assim uma transmissão excessiva de acetilcolina, que produziria uma sobre-estimulação do músculo e, como consequência, debilidade e cansaço. A AChE está amplamente distribuída no sistema nervoso central sendo também encontrada em eritrócitos, linfócitos e plaquetas de mamíferos e músculo. (KATZUNG, 2005).

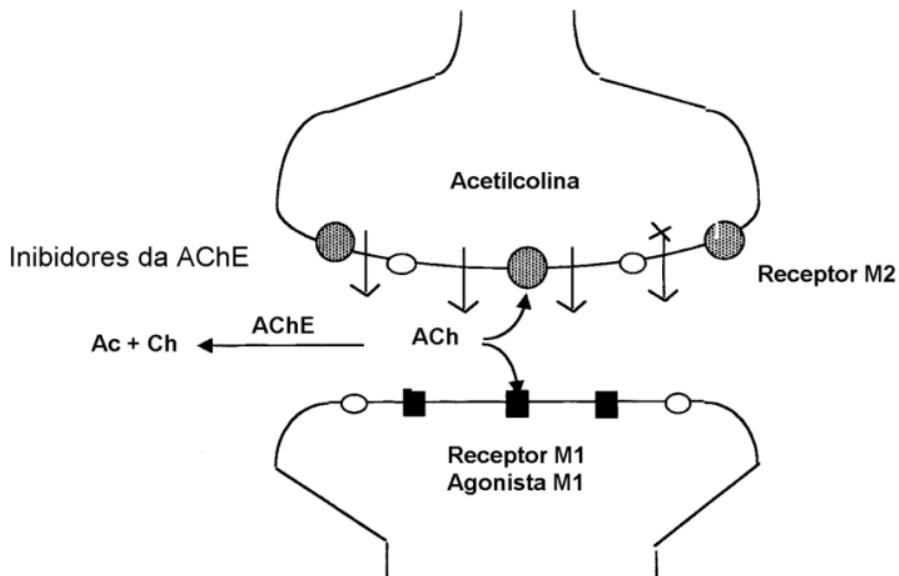


Figura 17 – Visão esquemática da hipótese colinérgica e localização dos receptores muscarínicos. (Figura reproduzida de W. GREENLEE et al, 2001)

A doença de Alzheimer (DA) caracteriza-se pelo comprometimento progressivo da memória, desordem neurodegenerativa crônica caracterizada pela perda de habilidade cognitiva, graves distúrbios comportamentais, e finalmente a morte. A maior parte das estratégias de tratamento tem se baseado na hipótese colinérgica, a qual postula que as deficiências de memória em pessoas que sofrem desta doença é resultado de um déficit da função colinérgica no cérebro. Contudo, uma das mais promissoras abordagens para o tratamento da DA é aumentar os níveis de acetilcolina no cérebro usando inibidores da acetilcolinesterase (PERRY et al, 1999).

Até o momento, a hipótese colinérgica é ainda a abordagem prática para o tratamento da doença de Alzheimer (DA). Desta forma, o uso clínico dos inibidores da acetilcolinesterase (iAChE) ainda é amplo no sentido de evitar os sintomas da DA moderada. Vários inibidores sintéticos da AChE, como a tacrina, a rivastigmina e o donezepil (Figura 18) foram aprovados

pelo FDA para o tratamento da DA. No entanto, o uso clínico dos inibidores da AChE ainda é limitado, principalmente devido a seus efeitos adversos e aos moderados benefícios para os pacientes. Portanto, novas terapias eficazes incluindo os iAChE precisam ser desenvolvidas (HE, 2007).

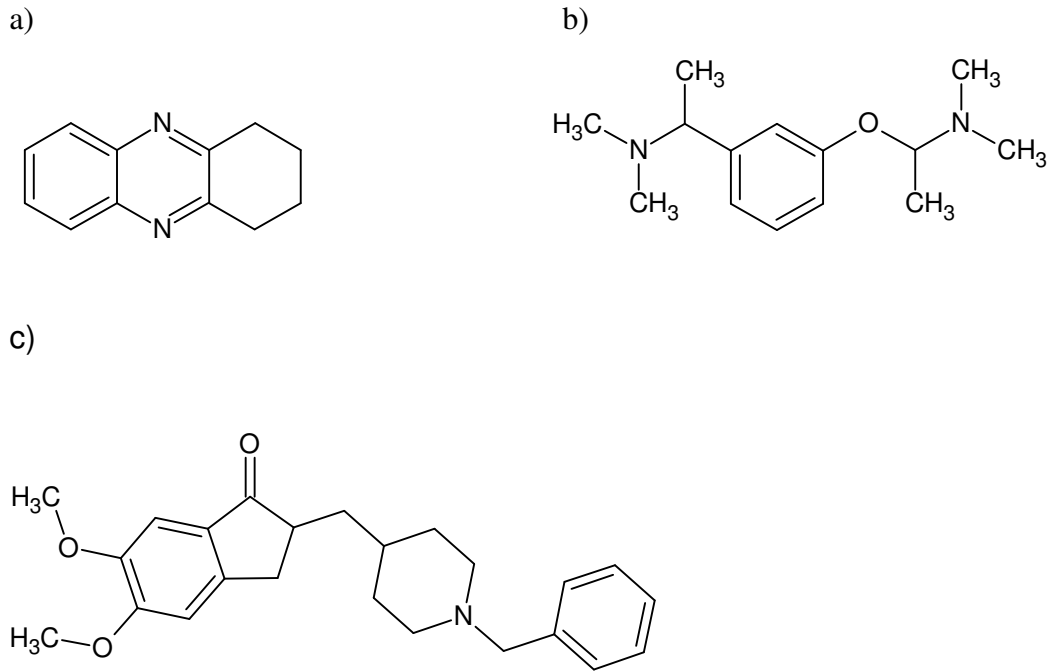


Figura 18 – Representação de alguns inibidores sintéticos da acetilcolinesterase: (a) tacrina, (b) rivastigmina, (c) donepezil.

Dentre os inibidores da AChE naturais destaca-se a galantamina (Figura 19 a), que é um inibidor seletivo reversível e competitivo da enzima, considerado como um dos medicamentos de escolha para o tratamento da DA por possuir poucos efeitos colaterais e poucas limitações (RHEE et al., 2001). Outro composto de origem natural que é um potente, seletivo e reversível inibidor da AChE é a huperizina-A (Fig. 19 b), um composto natural isolado da planta chinesa *Huperzia serrata* (Thumb) em 1986 (FILHO et al., 2006). Vale lembrar que os inibidores da acetilcolinesterase não são usados somente para o tratamento da DA, mas também para o tratamento do glaucoma, da miastenia gravis, paralisia muscular por curare e algumas arritmias atriais. O alcalóide obtido a partir das sementes de *Physostigma venenosum*, fisostigmina (Fig. 19 c), é usado como um tóxico ocular para o tratamento de glaucoma.

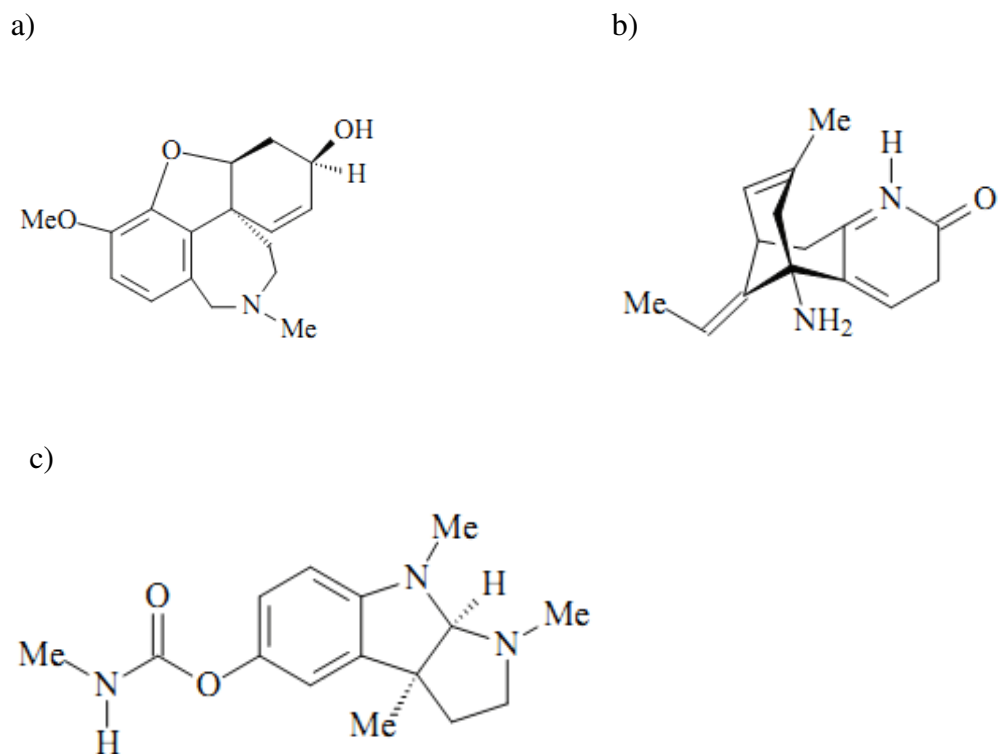


Figura 19 – Inibidores naturais da acetilcolinesterase: (a) Galantamina, (b) Huperizina-A, (c) Fisostigmina

3.3.2 Avaliação da Atividade Antimicrobiana

O aumento da resistência de microorganismos contra agentes antimicrobianos disponíveis é um problema de saúde pública que muitos cientistas vêm pesquisando a fim de encontrar um novo fármaco capaz de acabar com este problema. Os produtos naturais e derivados são o grande alvo destas pesquisas, onde vários alcalóides, triterpenoides e compostos fenólicos derivados de plantas, têm mostrado uma gama de atividades, incluindo a atividade antimicrobiana.

Os testes de avaliação da atividade antimicrobiana estão padronizados pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2000) e foram desenvolvidos para analisar agentes antimicrobianos convencionais como antibióticos. A concentração inibitória mínima (CIM) é citada como sendo um dos principais métodos de diluição para determinação da atividade antimicrobiana de óleos essenciais e produtos sintéticos puros, juntamente com a

determinação da concentração bactericida/fungicida mínima (CBM/CFM) (HAMMER et al., 1999).

Ensaio *in vitro* determinam a menor concentração capaz de causar a morte ou inibição do crescimento do microorganismo testado. O método CIM é considerado um ensaio quantitativo usado tanto para avaliação da potência da atividade antimicrobiana de misturas ou substâncias puras. A CIM é a menor concentração do composto capaz de inibir o crescimento de um dado microorganismo e é determinada visualmente (aparecimento ou não de turvação). Dos poços que não apresentaram crescimento são retiradas alíquotas que serão inoculadas em meio sólido para determinação da concentração bactericida ou fungicida mínima (CBM/CFM), a menor concentração de substância capaz de matar 99,9% das unidades formadoras de colônia (UFC).

Os processos infecciosos causados por agentes microbianos preocupam a classe médica, tendo destaque no panorama das doenças oportunistas. Como exemplo, cita-se a bactéria *Staphylococcus aureus*, patógeno responsável pelas infecções em ferimentos, que representam a terceira causa mais comum de infecção hospitalar (ARAÚJO, 2004). Dentre os microrganismos utilizados neste estudo, os de maior interesse estão abaixo especificados:

Staphylococcus aureus é uma das causas mais comuns de infecções que acometem o homem. É muito comum estar presente no quadro infeccioso de pacientes que sofrem cirurgias. Após o sucesso inicial do tratamento das infecções por *S. aureus* com penicilina, ocorreu o aumento da resistência a esta droga e a busca por novos fármacos capazes de tratar este tipo de infecção (SMITH, 1999).

Staphylococcus epidermidis é um microorganismo patogênico oportunista que acomete endocardites de válvulas cardíacas naturais e protéticas, infecções causadas por cateteres endovenosos e dispositivos ortopédicos. A causa mais aceita para a infecção por *S. epidermidis* instalar-se no organismo humano é a aderência desta bactéria ao corpo (CHRISTENSEN, 1982).

Bacillus sp vive no solo, proliferando-se para plantas, alimentos e animais sempre que houver condições favoráveis. Somente algumas espécies deste gênero são patogênicas aos humanos, entre elas a mais conhecida é o *B. subtilis* (STEIN, 2005).

Escherichia coli é um anaeróbio facultativo comum na flora intestinal humana. Quando o organismo torna-se debilitado ou imunossuprimido, as barreiras gastrintestinais são violadas e a *E.coli* pode causar infecção, principalmente no aparelho urinário, aparelho digestivo e meninges (NATARO et al., 1998).

Pseudomonas auruginosa é um dos microorganismos patogênicos oportunistas mais conhecidos atualmente. Encontra-se no solo, em humanos, animais e no ambiente hospitalar. Pode causar infecções em imunodeprimidos, sendo o principal fator de morbidade e mortalidade em pacientes com fibrose cística (ALONSO et al., 1999).

Dentre as leveduras, destaca-se o gênero *Candida*, patógenos oportunistas responsáveis por infecções em indivíduos imunocomprometidos. *Candida albicans*, apesar de fazer parte da microbiota normal do trato intestinal, pode se constituir em patógeno oportunista das regiões mucocutâneas, trato digestivo e genital, além de envolver pele, unhas e trato respiratório como riscos de desencadear fungemias. A candidose como doença primária é extremamente rara, e via de regra, está associada a neoplasias, doenças imunomediadas e ao uso prolongado de corticosteróides, antimicrobianos ou citostáticos. Os estados de imunodeficiência induzida por infecções podem se constituir em causas predisponentes às infecções fúngicas como a candidose (FERREIRO, 2002).

Saccharomyces cerevisiae é comumente utilizada na fermentação alcoólica, apresenta bons níveis de produção de etanol durante a fermentação e pode ser modificado por engenharia genética para a produção de enzimas hidrolíticas necessárias para a conversão de celulose em glicose. Também pode ser utilizada para a produção de vários tipos de proteínas, incluindo a vacina contra a hepatite B (SIQUEIRA, 2006).

4 MANUSCRITO

4.1 Evaluation of caffeoyl and cinnamoyl derivatives as potential prolyl oligopeptidase inhibitors

Manuscrito 1

Evaluation of caffeoyl and cinnamoyl derivatives as potential prolyl oligopeptidase inhibitors

Luciana de Oliveira Adolpho, Ionara Irion Dalcol, Daniele Fernanda Marin, Albert Puigpinos, Laura Mendieta, Teresa Tarragó, Ademir F. Morel, Ernest Giralt.

(Submetido a Journal of Medicinal Chemistry)

Evaluation of caffeoyl and cinnamoyl derivatives as potential prolyl oligopeptidase inhibitors

Luciana O. Adolpho[§], Daniele F. Marin[§], Albert Puigpinos[‡], Laura Mendieta[‡], Teresa Tarragó[‡], Ademir F. Morel[§], Ernest Giralt^{‡,}, Ionara I. Dalcol^{§,*}*

[§]Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais (NPPN), Chemistry Department, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900. Santa Maria – RS, Brazil,

[‡]Institute for Research in Biomedicine. Barcelona Science Park. E-08028. Barcelona, Spain.

ABSTRACT: A bioassay-guided study of the inhibitory capacity of the natural products chlorogenic acid, caffeic acid, cinnamic acid and *p*-methoxycinnamic acid, and of caffeoylquinic, caffeoyl and cinnamoyl derivatives against the enzymes prolyl oligopeptidase (POP), acetylcholinesterase (AChE) and dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) was carried out. Caffeoylquinic, caffeoyl and cinnamoyl derivatives were prepared using simple derivatization procedures and through coupling reactions with the amino acid proline. The capacity of the compounds to inhibit DPP IV and AChE was not exceptional. In contrast, the derivatives methyl ester and 1,7-acetonide obtained from chlorogenic acid, and caffeic acid and its methyl ester derivative showed selectivity and satisfactory performance as POP inhibitors, with IC₅₀ values of 3 to 14 μM.

INTRODUCTION

Prolyl oligopeptidase (POP, prolyl endopeptidase or post-proline cleaving enzyme, EC 3.4.21.26) is a large intracellular serine protease (80 kDa) found in over 20 human tissue types. This enzyme was first isolated from human uterus as an oxytocin-cleaving enzyme.¹ Initially, POP was named post-proline cleaving enzyme (PP CE), since it cleaves short peptides (up to 30 amino acid residues) at the carboxyl side of an internal proline (-Pro-Xaa-; where Xaa is different from Pro).^{2,3} The greatest POP activity in humans was found in the brain cortex, while moderate activity was detected in the striatum, hypothalamus, hippocampus and amygdala.^{4,5}

Previous studies indicate that POP activity is involved in key physiological functions, such as learning and memory, cell division and differentiation, and signal transduction, and also in some psychiatric disorders.⁶⁻⁸ This activity is directly related to the fact that several neuropeptides, such as angiotensin I and II, vasopressin, bradykinin, thyroid-releasing hormone and substance P, are potential substrates for POP.⁹⁻¹⁰ Thus, the activity of this enzyme in the central nervous system (CNS) can decrease the concentrations of neuropeptides related to psychiatric and neurodegenerative disorders, such as schizophrenia, bipolar disorder and Alzheimer's disease.¹¹

Alzheimer's disease (AD) is the most common form of dementia and it affects memory and other cognitive functions. This degenerative disease is characterized by a defect in cholinergic activity, which results in memory loss, confusion, progressive behavioral deficits and impaired judgment. Among the strategies available for treating this disease, one of the most important is the maintenance of acetylcholine levels through the inhibition of acetylcholinesterase (AChE, EC 3.1.1.7).^{12,13} A significant number of synthetic and natural molecules inhibit enzymes related to several diseases as inhibitors function by forming an enzyme-inhibitor complex, which prevents the enzyme from converting substrate into product. Following this principle, studies on the inhibition of the enzymes POP and AChE by natural products isolated from

medicinal plants or their derivatives may allow the discovery of novel drugs with potential for the treatment of neurodegenerative and neuropsychiatric diseases, such as AD and bipolar disorder.¹⁴⁻¹⁶

The specificity of an inhibitor against POP can be examined by assaying in parallel the inhibitory capacity of candidate molecules against the enzyme dipeptidyl peptidase IV (DPP IV; EC 3.4.14.5).^{17,18} This serine protease cleaves peptides and proteins that hold a proline or alanine in the penultimate position of the N-terminus, these being relevant targets in the treatment of type 2 diabetes mellitus (T2DM).¹⁹ Although POP and DPP IV are related to a number of pathologies and present low amino acid sequence homology, the similarity of their three-dimensional structures causes many compounds to indiscriminately inhibit both enzymes.

We identified the natural product 3-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid, **1**), isolated from the Brazilian medicinal plant *Hypericum brasiliensis*, as a new POP inhibitor.²⁰ Based on the structure of **1**, we prepared three series of caffeoylquinic, caffeoyl and cinnamoyl analogs by simple derivatization reactions and coupling with the amino acid proline. To identify selective enzymatic inhibitors, we tested the capacity of the derivatives obtained to inhibit the enzymes POP, AChE and DPP-IV.

RESULTS AND DISCUSSION

Using the commercial compounds chlorogenic acid **1**, caffeic acid **6**, *trans*-cinnamic acid **12**, and *p*-methoxycinnamic acid **13** as starting materials, we synthesized the derivatives series **2-5**, **7-11** and **16-19** as depicted in Schemes 1-3. Briefly, compound **1** was esterified following the procedure described by Giraldo *et. al.*²¹ using methanol and Amberlite IR120 H resin to yield the methyl chlorogenate **2**, while the methyl esters **8**, **14** and **15** were prepared by the Fischer method. Acetylation of **1** and **6** with acetic anhydride and pyridine/4-(dimethylamino)pyridine^{22,23} yielded the derivatives pentaacetylchlorogenic acid **3** and diacetylcaffeic acid **10**, respectively. To obtain the 1,7-acetonide **4**, chlorogenic acid **1** was allowed to react with anhydrous acetone and concentrated H₂SO₄.²⁴ Dimethylcaffeic acid **7** was prepared from **6** in reaction with Me₂SO₄ in NaOH.²⁵ Compounds **5**, **9**, **11**, **16** and **17** were synthesized by reacting the appropriate natural acid with proline methyl ester hydrochloride, using either *O*-(7-azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HATU)/ diisopropylethylamine (DIEA) in dimethylformamide or *isobutyl chloroformate*/ N-methylmorpholine in tetrahydrofuran.^{26,27} Alkaline hydrolysis of **16** and **17** yielded the corresponding derivatives **18** and **19**, respectively. The structures of the synthesized compounds were confirmed by MS, NMR spectra and data from the literature.

Fluorimetric assays were used to estimate POP and DPP IV inhibition.^{7,17,18,28} To screen the derivative series for AChE inhibitors, two colorimetric assays were applied, namely a TLC bioautographic assay²⁹ and a microplate assay based on Ellman's method.³⁰ POP was obtained by expression in *E. coli* following a procedure described in the literature.³¹ Porcine DPP IV and AChE were from commercial sources.

Initially, we screened 500 μ M of all the derivatives obtained and the natural acids **1**, **6**, **12** and **13** as inhibitors of POP and DPP IV (Table 1). From these results, we selected the active compounds to be tested in an IC₅₀ assay. At 500 μ M, all the derivatives of the cinnamoyl and *p*-

methoxycinnamoyl series (compounds **12-19**) showed inhibitory activity below 50% against POP and DPP IV. Also, the DPP IV inhibition preliminary assay at 500 μM displayed only moderate inhibitory activity for caffeoylquinic derivatives **1-5**, caffeic acid **6** and its methyl ester **8**, in the range of 57-73 % while **7, 9, 10** and **11** registered low activity (< 50 %), so the IC_{50} for these compounds was not determined. In contrast, all derivatives from the caffeoylquinic and caffeoyl series, except **5** and **7**, showed promising results regarding POP inhibition, so we proceeded to determine their IC_{50} against this enzyme (Table 2). Among the caffeoylquinic series, **2** and **4** showed the most potent POP inhibition with IC_{50} values of 3.0 and 14.3 μM , respectively, while from the caffeoyl series, ester **8** ($\text{IC}_{50}= 5 \mu\text{M}$) and caffeic acid **6** ($\text{IC}_{50}= 12.5 \mu\text{M}$) showed the highest inhibitory capacity. Liposoluble compounds are of interest for biological applications because they can easily pass through biological barriers such as the blood-brain barrier. Unfortunately, the results obtained for derivatives **3** ($\text{IC}_{50}= 99 \mu\text{M}$) and **10** ($\text{IC}_{50}= 28 \mu\text{M}$) indicated that, in comparison with the starting natural products, derivatization with acetyl groups did not improve inhibitory capacity against the enzymes.

Given that POP and DPP IV have high affinity for substrates containing proline, it was expected that the presence of a proline residue in the derivatives (compounds **5, 9, 11** and **16-19**) would enhance their performance as inhibitors. However, none of these derivatives displayed high inhibitory capacity. Compounds **5** and **11** showed IC_{50} values of 210.0 μM and 120.0 μM , respectively. The DPP IV inhibitory capacity of all derivatives and natural acids **1-11** at high concentration (500 μM) was not exceptional. We therefore determined the IC_{50} values of only natural compounds **1** and **6**, which were found to be 128.0 μM and >200 μM , respectively.

In view of the growing interest in identifying natural compounds with inhibitory activity against AChE^{16,29}, we also analyzed the capacity of the derivatives obtained and the natural acids **1-19** to inhibit this enzyme. For this purpose, we used the TLC

bioautography method and the 96-well microplate assay. In the TLC assay, the results are expressed as pMIQ (negative logarithm of the minimal inhibitory amount in moles that produces the spot with the least observable whiteness), and it is estimated that compounds with a MIQ above 10.5 are active.^{32,33} None of the derivatives showed significant inhibitory effect. The results obtained in the colorimetric assay confirmed those obtained by bioautography, since although a high concentration (500 μ M) was used, all compounds showed inhibitory activity below 40% for AChE (Table 3).

These general results are significant and demonstrate that simple structural modifications of natural products can to improve their performance as enzymatic inhibitors, making them potential candidates for the development of new drugs. None of the compounds tested were DPP IV or AChE inhibitors; however, methyl ester **2** and 1,7-acetonide **4** derived from chlorogenic acid, methyl ester **8** and caffeic acid **6** proved to be strong and selective POP inhibitors. These observations indicate the relevance of the free 4,5-dihydroxyl groups in the caffeoyl moiety for the activity of these compounds.

CONCLUSIONS

Many natural products are known POP inhibitors in the micromolar range, such as the flavonoids oroxylin³⁴ and baicalin¹⁷, the alkaloid berberin³⁵, and 6-(8'*Z*-pentadecenyl)salicylic acid.³⁶ In addition, some naturally occurring compounds containing one or more caffeoyl groups have also been reported to exert POP inhibitory activity: the phenylpropanoid verbascoside¹⁸, isolated as the main constituent of the crude extract of *Buddleja brasiliensis* Jacq.; rosmarinic acid³⁷, a polyphenol found in various species of the Boraginaceae; the pentacyclic triterpenoid 3 α -(3'',4''-dehydroxy-*trans*-cinnamoyloxy)-D-friedoolean-14-en-28-

oic acid¹⁵, present in leaves *Tamarix hispida* Willd; and also chlorogenic acid, isolated by our group from *Hypericum brasiliensis*. In this study, we synthesized three series of caffeoyl and cinnamoyl derivatives in order to study their inhibitory capacity against the enzymes POP, DPP IV and AChE. Derivatives presenting the 4,5-dihydroxyl groups in the free caffeoyl moiety, such as the methyl ester **2** and 1,7-acetonide **4** derived from chlorogenic acid, the methyl ester **8** and the caffeic acid **6**, were the most active POP inhibitors, showing selective inhibition in a dose-dependent manner, with IC₅₀ values in the low micromolar range (3.0-14.3 μM). Although the mechanism of the *POP inhibition* by these derivatives has not been elucidated, the findings of this study indicate the high potential of the molecules as POP inhibitors. Thus, these compounds are of relevant interest since they can be used as leads in the development of new potent therapeutic drugs to treat neuropsychiatric disorders.

EXPERIMENTAL

General Procedures. All solvents were purified by distillation over sodium wire or CaH₂ before use. DMSO for molecular biology was purchased from Merck and was used without further purification. Chlorogenic, caffeic, *trans*-cinnamic and *p*-methoxycinnamic acids, used as starting materials, were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Co. (Brazil). ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded on a Bruker DPX 400 spectrometer at 400.11/100.6 MHz and a Varian 400 NMR spectrometer operating at 400.12/100.61 MHz using acetone-*d*₆, CDCl₃ or CD₃OD as solvent and TMS as an internal standard. Column chromatography (CC) was carried out on silica gel 60 230-400 mesh (Merck). Preparative thin layer chromatography (PTLC) was carried out on silica gel PF254 (Merck) in glass plates. Thin layer chromatography was performed on a pre-coated TLC plates (Merck, silica 60F-254). Visualization was done using

UV light and by spraying with 1% ferric (III) chloride in *ethanol*, 5% potassium permanganate in water and anisaldehyde in ethanol and sulfuric acid. Melting points were determined on an MQAPF-301 Digital (Micro-Química, Florianópolis, Brazil) apparatus and are uncorrected. Purities of final compounds were established by analytical HPLC, which was carried out on a Waters Alliance 2695 (Waters, Massachusetts, USA) chromatography system with a PDA 995 detector, a reverse-phase Symmetry C-18 (4.6x100 mm, 3.5 μm column), and mobile phases of H_2O with TFA (0.045%), and MeCN with TFA (0.036%), at a flow rate of mL min^{-1} . All synthetic compounds were of $\geq 95\%$ purity as determined by the method described above. HPLC-MS analyses were performed with a Waters 2998 Photodiode Array Detector, a Waters 2695 Separations Module, and a Waters Micromass ZQ ESCi Multimode ionization Enabled. Fluorescence was measured using a Bio-Tek FL600 fluorescence plate reader (Bio-Tek Instruments, Vermont, USA). POP (EC 3.4.21.26) was obtained by expression in *E.coli* and affinity purification using a His tail fusion following a procedure described in the literature. Porcine DPP IV (EC 3.4.14.5) and AChE (EC 3.1.1.7) were purchased from Sigma-Aldrich. ZGP-AMC (*N*-benzyloxycarbonyl-Gly-Pro-methylcoumarinyl-7-amide) and GP-AMC (H-Gly-Pro-methylcoumarinyl-7-amide) were from Bachem (Bubendorf, Switzerland).

General synthesis of the derivatives 2-4, 7-8, 10 and 14-15.

Chlorogenic acid **1** was esterified by the method described by Lopez-Giraldo *et. al.*²¹, using methanol and Amberlite IR120 H resin to obtain **2** as a white solid in 97% yield. Esterification of the corresponding caffeic acid **6**, cinnamic acid **12** and *p*-methoxycinnamic acid **13** were conveniently carried out using the Fischer method, resulting in the derivatives **8**, **14** and **15**, respectively, in satisfactory yields (60- 90%). Acetylation reactions of **1** and **6** were performed following the method described by Selfkow²² and Kim²³, obtaining derivatives **3** and **10** in 85 and 74 % yield, respectively. 3,4-Dimethylcaffeic acid **7** was prepared with Me_2SO_4 in NaOH as described by Li and Xu.²⁵ Compound **4**, the 1,7-monoketal of chlorogenic acid, was obtained

in 40% yield by reaction of **1** with acetone followed by selective hydrolysis of 3,4-ketal following the method described by Chao-Mei Ma *et al.*²⁴ All crude derivatives were purified by crystallization or column chromatography over silica gel. The structural characterization of these compounds was performed using spectrometric and spectroscopic data (MS, ¹H NMR and ¹³C NMR) and compared directly with data found in the literature.²¹⁻²⁵

Synthesis of (E)-methyl 1-(3-(3-(3,4-dihydroxyphenyl)acryloyloxy)-1,4,5-trihydroxycyclohexanecarbonyl)pyrrolidine-2-carboxylate (5). Compound **5** was synthesized using the coupling method described by Salmi *et. al.*²⁶ with slight modifications. Chlorogenic acid **1** (1.10 mmol) and L-proline methyl ester hydrochloride (1.10 mmol) were dissolved in DMF (3 mL). Next, DIEA (1,10 mmol) was added to the mixed solution at 0°C. After 15 min, the coupling reagent HATU (1.10 mmol) was added at 0°C and the resulting mixture was stirred for 72 h at room temperature. The reaction mixture was then poured into chloroform and extracted with a saturated solution of HCl 1N, NaHCO₃ and water. The organic phase was dried with MgSO₄ and evaporated to dryness, resulting in an oil, which was purified by recrystallization with CHCl₃. Yield 40%. ¹H NMR (CD₃CO₂D, δ [ppm], J [Hz]): 7.64 (d, J=15.9, 1H), 7.11 (d, J=1.3, 1H), 7.01 (dd, J=1.2, J=8.2, 1H), 6.84 (d, 1H, J=8.1, 1H), 6.35 (d, J=15.9, 1H), 5.44 (s, 1H), 4.57 (m, 4H), 4.25 (m, 2H) ppm 3.97 (d, 1H, J=5.9) ppm 3.77 (m, 1H) ppm 3.71 (s, 1H) ppm 2.71 (d, 2H, J=52.9) ppm 2.34 (m, 2H). ¹³C NMR (CD₃CO₂D, δ [ppm]): 169.7, 168.9, 152.0, 147.0, 146.8, 141.0, 129.9, 122.9, 122.1, 116.5, 115.4, 115.2, 86.5, 74.0, 71.0, 70.5, 58.8, 47.0, 37.3, 37.0, 30.4, 23.2.

Synthesis of (E)-methyl 1-(3-(3,4-dihydroxyphenyl)acryloyl)pyrrolidine-2-carboxylate (9). Compound **9** was prepared as described for **5** using caffeic acid **6** and L-proline methyl ester hydrochloride. The oily product obtained was purified by chromatography on silica gel, eluting with dichloromethane. Yield: 40%. ¹H NMR (DMSO- *d*₆, δ [ppm], J [Hz]): 7.31 (d, J=15.4, 1H), 7.06 (s, 1H), 6.97 (d, J=8.6, 1H), 6.76 (d, J=8.0, 1H), 6.66 (d, J=15.4, 1H), 4.40

(dd, $J=4.2$, $J=8.5$, 1H), 3.72 (dd, $J=6.3$, $J=10.0$, 1H), 3.68 (s, 3H), 3.50 (m, 1H), 2.19 (td, $J=7.9$, $J=20.1$, 1H), 1.96 (m, 2H), 1.86 (td, $J=5.4$, $J=11.6$, 1H). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ [ppm]): 172.4, 164.1, 147.4, 145.3, 141.7, 126.3, 120.6, 115.5, 115.2, 114.6, 58.4, 51.4, 46.3, 28.5, 24.2.

Synthesis of (E)-4-(3-(2-(methoxycarbonyl)pyrrolidin-1-yl)-3-oxoprop-1-enyl)-1,2-phenylene-diacetate (11). Diacetylcaffeic acid **10** and L-proline methyl ester hydrochloride were coupled as described for **5** and **9**. Yield 49%. ^1H NMR (CDCl_3 , δ [ppm], J [Hz]): 7.64 (d, $J=15.4$, 1H), 7.38 (dd, $J=2.0$, $J=8.3$, 1H), 7.34 (d, $J=1.8$, 1H), 7.19 (d, $J=8.3$, 1H), 6.67 (d, $J=15.5$, 1H), 4.59 (m, 1H), 3.83 (m, 1H), 3.74 (s, 3H), 2.29 (d, $J=2.3$, 6H), 2.16 (s, 1H), 2.05 (ddd, $J=2.0$, $J=5.1$, $J=7.3$, 2H), 1.75 (m, 1H), 1.25 (tc, $J=3.5$, 2H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , δ [ppm]): 172.6, 168.0, 167.9, 164.4, 143.0, 142.3, 141.0, 134.0, 126.3, 123.7, 122.3, 119.1, 59.0, 52.2, 46.9, 29.1, 22.6, 20.5, 20.5.

Synthesis of Methyl 1-cinnamoylpyrrolidine-2-carboxylate (16). Isobutyl chloroformate (2.7 mmol) was added to a cooled (-15°C) solution of the cinnamic acid **12** (2.7 mmol) and NMM (2.7 mmol) in THF (14 mL) and stirred at -15°C for 15 min. A solution of L-proline methyl ester hydrochloride (2.7 mmol) and NMM (2.7 mmol) in DMF (5 mL) was then added and the reaction mixture was stirred for 24 h, allowing it to warm up to r.t. slowly.²⁷ The reaction mixture was evaporated, then poured into chloroform and extracted with a saturated solution of HCl 1N, NaHCO_3 and water. The organic phase was dried with MgSO_4 and evaporated to dryness, resulting in an oil which was purified by recrystallization using hexane/ethyl acetate to give **16** as a white solid (m.p. $85.3\text{--}88.3^\circ\text{C}$). Yield 81%. ^1H NMR (CDCl_3 , δ [ppm], J [Hz]): 7.61 (d, $J=15.5$, 1H), 7.39 (m, 2H), 7.24 (d, $J=2.2$, 3H), 6.63 (d, $J=15.5$, 1H), 4.49 (m, 1H), 3.75 (m, 1H), 3.64 (s, 3H), 3.59 (d, $J=19.6$, 1H), 1.97 (m, 5H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , δ [ppm]): 172.7, 164.8, 142.8, 142.6, 135.0, 129.6, 128.7, 127.8, 117.8, 58.9, 52.1, 46.8, 29.0, 24.7.

Synthesis of (E)-methyl 1-(3-(4-methoxyphenyl)acryloyl)pyrrolidine-2-carboxylate (17).

Compound **17** was prepared as described for **16** using *p*-methoxycinnamic acid **13** and L-proline methyl ester hydrochloride. The oily product obtained was purified by chromatography on silica gel, eluting with chloroform. Yield: 50 %. ^1H NMR (CDCl_3 , δ [ppm], J [Hz]): 7.67 (d, $J=15.4$, 1H), 7.44 (dd, $J=8.4$, $J=16.0$, 2H), 6.88 (d, $J=8.5$, 2H), 6.60 (d, $J=15.4$, 1H), 4.61 (dd, $J=3.9$, $J=8.2$, 1H), 3.85 (m, 1H), 3.82 (s, 3H), 3.74 (s, 3H), 3.69 (m, 1H), 2.11 (m, 4H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , δ [ppm]): 172.9, 160.9, 142.5, 142.4, 129.4, 129.4, 127.8, 115.4, 114.1, 58.9, 55.3, 52.1, 46.8, 29.1, 24.8.

Synthesis of 1-cinnamoylpyrrolidine-2-carboxylic acid (18). Compound **18** was obtained as described previously.³⁸ 1 mL of 1 M NaOH was added to a methanol solution (1 mL) of compound **16** (0.4 mmol). The mixture was stirred at r.t. for 2 h, neutralized with 1 M HCl and the methanol was evaporated under reduced pressure. The aqueous solution was cooled in an ice bath and acidified at pH 2 with 1 M HCl. The solid obtained was separated by filtration and washed with water. Yield: 87 %. RMN ^1H (CD_3OD , δ [ppm], J [Hz]): 7.55 (dd, $J=3.1$, $J=6.5$, 3H), 7.48 (s, 1H), 7.33 (d, $J=1.4$, 1H), 7.30 (d, $J=2.3$, 1H), 7.29 (d, $J=2.6$, 1H), 6.89 (d, $J=15.6$, 1H), 4.46 (dd, $J=3.5$, $J=8.1\text{Hz}$, 1H), 3.76 (dd, $J=6.3$, $J=13.1$, 2H), 2.22 (m, 1H), 2.00 (m, 3H). ^{13}C NMR (CD_3OD δ [ppm]): 173.0, 165.7, 142.8, 134.8, 129.7, 128.5, 127.8, 117.8, 117.6, 59.2, 30.6, 28.7, 24.3, 22.1.

Synthesis of (E)-1-(3-(4-methoxyphenyl)acryloyl)pyrrolidine-2-carboxylic acid (19).

This compound was obtained as described for **18**, by alkaline hydrolysis with methanol and 1 M NaOH. Yield: 87 %. ^1H -NMR (CD_3OD , δ [ppm], J [Hz]): 7.55 (d, $J=15.6$, 1H), 7.35 (m, 2H), 7.19 (dd, $J=1.7$, $J=4.9$, 1H), 6.57 (d, $J=15.5$, 2H), 4.44 (m, 1H) 3,71 (m, 2H), 3.59 (s, 3H), 1.97 (m, 2H), 1.56 (d, $J=0.5$, 2H).

In vitro measurement of enzyme inhibition.

POP activity assay. POP activity was determined following the method described by Toide *et al.*⁷ The reactions were performed in 96-well microplates, thereby allowing the simultaneous monitoring of multiple reactions. For each reaction, activity buffer (131 μ l, 100 mM of Na/K phosphate buffer, pH 8.0) was pre-incubated for 15 min at 37 °C with POP (7 nM) and with the corresponding inhibitor solution (3 μ l). Stock solutions of inhibitors were prepared in DMSO (100 mM), and dilutions were prepared from this stock solution with the activity buffer. After pre-incubation, ZGP-AMC (10 μ l, 3 mM in 40 % of 1, 4-dioxane) was added and the reaction was incubated for 1 h at 37 °C. The formation of AMC was measured fluorometrically. Positive and negative controls containing 3 μ l of the sample in DMSO, 10 μ l of ZGP-AMC solution and 131 μ l of the activity buffer, with and without 7 nM of POP solution respectively, were performed. The excitation and emission wavelengths were 360/40 and 485/20 nm, respectively. The IC₅₀ value was defined as the concentration of fraction required to inhibit 50 % of POP activity. The assay was performed in triplicate and with a blank for each sample without enzyme. Verbascoside, which was previously reported as POP inhibitor¹⁸, was evaluated as a positive control in the same experimental conditions, and the percentage of inhibition was calculated by comparing the absorbance of the sample to the blank.

DPP IV activity assay. DPP IV activity was determined following the method described by Checler *et al.*²⁸ The reactions were performed in a 96-well microplate. For each well, the reaction mixture contained activity buffer (131 μ l, 100 mM Na/K phosphate buffer, pH 8.0), 0.7 nM DPP IV, and 3 μ l of the corresponding solution (in DMSO). After pre-incubation (15 min at 37 °C), GP-AMC (10 μ l, 3 mM in 40 % 1, 4-dioxane) was added, and the reaction was incubated for 1 h at 37°C. The formation of AMC was measured fluorimetrically. Positive and negative controls containing 3 μ l of the sample in DMSO, 10 μ l of GP-AMC solution and 131

μl of the activity buffer, with and without 0.7 nM of DPP IV solution respectively, were performed. The excitation and emission wavelengths were 360/40 and 485/20 nm, respectively. The IC_{50} value was defined as the concentration of compound required to inhibit 50 % of DPP IV activity. The assay was performed in triplicate and with a blank for each sample without enzyme, and the percentage of inhibition was calculated by comparing the absorbance of the sample to the blank.

AChE bioautographic assay. The bioautographic assay in TLC plates was adapted from Marston and Hostettmann.²⁹ A stock solution of AChE (250 U) dissolved in 37.5 mL of Tris-hydrochloric acid buffer at pH 7.8 with 37.5 mg of bovine serum albumin acetylated (BSA) was kept at 4°C. Prior to sample applications, chromatographic plates were eluted with acetone and thoroughly dried before use. Samples of derivatives and the controls galanthamine and physostigmine at concentrations of 10 μg to 0.6 ng were applied as spots onto the plates. Migrations were conducted with appropriate solvent systems. The plates were then sprayed with an enzyme stock solution (concentration 6.67 U/mL), pre-incubated at 37 °C for 20 min in a humid atmosphere, and revealed with a fresh solution of 12.5 mg of 1-naphthyl acetate in 5 mL of ethanol and 50 mg of Fast Blue B salt in 20 mL of water. After 1-2 min a purple stain appeared in the plates and AChE-inhibiting compounds showed white spots. AChE inhibitory activity was expressed as pMIQ (negative logarithm of the minimal inhibitory amount in moles that produced the spot with the least observable whiteness). To measure these pMIQ values, serial 2-fold dilutions of each test compound were assayed bioautographically.

AChE microplate assay. The AChE inhibitory activity of the derivatives was measured by a quantitative colorimetric assay based on Ellman's method.³⁰ In a 96-well plate, 25 μL of 15 mM ACTI, 125 μL of 3 mM DTNB in buffer B (50 mM Tris-HCl, pH 7.9 containing 0.1 M NaCl and 0.02 M $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 50 μL of buffer A (50 mM Tris-HCl, pH 7.9 containing 0.1% acetylated BSA) and 25 μL of sample (20 mM in DMSO diluted with water to a concentrations

of 5, 2, 0.2 and 0.02 mM) were mixed and incubated at 25°C for 5 min. Then 25 µL of AChE (0.22 U/mL in buffer A) was added, and the absorbance was measured sixty times every 60 seconds at 25°C. The assay was performed in triplicate and with a blank for each sample without enzyme. Physostigmine was used as a positive control and the percentage of inhibition was calculated by comparing the absorbance of the sample to the blank.

ABBREVIATIONS USED

Ac₂O, acetic anhydride; AChE, acetylcholinesterase; ACTI, acetylthiocholine; AD, Alzheimer's disease; AMC, 7-Amino-4-methylcoumarin; BSA, bovine serum albumin; CC, Column chromatography; DIEA, diisopropylethylamine; DMAP, 4-Dimethylaminopyridine; DMF, dimethylformamide; DMSO, dimethyl sulfoxide; DPP IV, dipeptidyl peptidase IV; DTNB, 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid); GP-AMC, H-Gly-Pro-methylcoumarinyl-7-amide; HATU, *O*-(7-azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium hexafluorophosphate; HPLC, high-performance liquid chromatography; MS, mass spectrometry; NCS, central nervous system; NMM, *N*-methylmorpholine; POP, prolyl oligopeptidase; Pro-OMe, L-proline methyl ester; PTLC, Preparative thin layer; T2DM, type 2 diabetes mellitus; TFA, trifluoroacetic acid; THF, tetrahydrofuran; TLC, thin layer chromatography; TMS, tetramethylsilane; ZGP-AMC, *N*-benzyloxycarbonyl-Gly-Pro-methylcoumarinyl-7-amide.

ACKNOWLEDGMENTS

The study was supported by *CAPES-Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (Ministério da Educação- Brazil), the MECD (*Ministerio de Educación, Cultura y Deporte de España*), MCI-FEDER (BIO2008-00799), the *Fundació la Marató de TV3* and the *Generalitat de Catalunya* (CeRBa and 2005SGR-00663).

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

*For I.I.D.: phone, +55-55-3220-8798; fax, +55-55-3220-8030; E-mail: iidalcol@gmail.com

* For E. G.: phone, +34 934037125; fax, +34 934037126; E-mail: egiralt@pcb.ub.es

Notes

The authors declare no competing financial interest

SCHEME TITLES

Scheme 1. Synthesis of the caffeoylquinic derivatives.

Scheme 2. Synthesis of the caffeoyl derivatives.

Scheme 3. Structures of the cinnamoyl derivatives.

TABLES

Table 1. Percentages of POP and DPP IV inhibition achieved by **1-19***

Table 2. IC₅₀ values of caffeoylquinic and caffeoyl derivatives on POP activity

Table 3. *In vitro* AChE inhibition assays data for compounds **1-19** as determined by TLC Bioautography and Microplate Assays*

REFERENCES

1. Walter, R.; Shlank, H.; Glass, J. D.; Schwartz, I. L.; Kerenyi, T. D. Leucylglycinamide Released from Oxytocin by Human Uterine Enzyme. *Science*. **1971**, *173*, 827–829.
2. Garcia-Horsman, J. A.; Männistö, P. T.; Venäläinen, J. I. On the Role of Prolyl Oligopeptidase in Health and Disease. *Neuropeptides*. **2007**, *41*, 1–24.
3. Polgar, L. Prolyl Oligopeptidases. *Method Enzymol*, **1994**, *244*, 188–200.
4. Kato, T.; Okada, M.; Nagatsu, T. Distribution of Post-proline Cleaving Enzyme in Human Brain and the Peripheral Tissues. *Mol. Cell. Biochem.*, **1980**, *32*, 117-121.
5. Irazusta, J.; Larrinaga, G.; Gonzalez-Maeso, J.; Gil, J.; Meana, J. J.; Casis, L. Distribution of Prolyl Endopeptidase Activities in Rat and Human Brain. *Neurochem. Int*, **2002**, *40*, 337-345.

6. Yoshimoto, T.; Kado, K.; Matsubara, F.; Koriyama, N.; Kaneto, H.; Tsuru, D. Specific Inhibitors for Prolyl Endopeptidase and their Anti-Amnesic Effect. *J. Pharmacobiodyn.*, **1987**, *10*, 730–735.
7. Toide, K.; Iwamoto, Y.; Fujiwara, T.; Abe, H. JTP-4819: a novel prolyl endopeptidase inhibitor with potential as a cognitive enhancer. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1995**, *274*, 1370-1378.
8. Shinoda, M.; Toide, K.; Ohsawa, I.; Kohsaka, S. Specific Inhibitor for Prolyl Endopeptidase Suppresses the Generation of Amyloid Beta Protein in NG108-15 Cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **1997**, *235*, 641–645.
9. Toide, K.; Okamiya, K.; Iwamoto, Y.; Kato, T. Effect of a Novel Prolyl Endopeptidase Inhibitor, JTP-4819, on Prolyl Endopeptidase Activity and Substance P- and Arginine-Vasopressin-Like Immunoreactivity in the Brains of Aged Rats. *J. Neurochem.* **1995**, *65*, 234–240.
10. Männistö, P. T.; Venäläinen, J. I.; Jalkanen, A. J.; Garcia-Horsman, J. A. Prolyl Oligopeptidase: A Potential Target for the Treatment of Cognitive Disorders. *Drugs News Persp.* **2007**, *20*, 293-305.
11. Roßner, S., Schulz, I., Zeitschel, U., Schliebs, R., Bigl, V., Demuth, H. U. Brain prolyl endopeptidase expression in aging, APP transgenic mice and Alzheimer's disease. *Neurochem. Res.*, **2005**, *30*, 695–702.
12. Silman, I.; Sussman, J. L. Acetylcholinesterase: 'Classical' and 'Non-classical' Functions and Pharmacology. *Curr. Opin. Pharmacol.*, **2005**, *5*, 293-302.
13. Rosini, M.; Simoni, E.; Bartolini, M.; Cavalli, A.; Ceccarini, L.; Pascu, N.; McClymont D. W.; Tarozzi, A.; Bolognesi, M. L.; Minarini, A. Inhibition of Acetylcholinesterase, β -Amyloid Aggregation, and NMDA Receptors in Alzheimer's Disease: A Promising

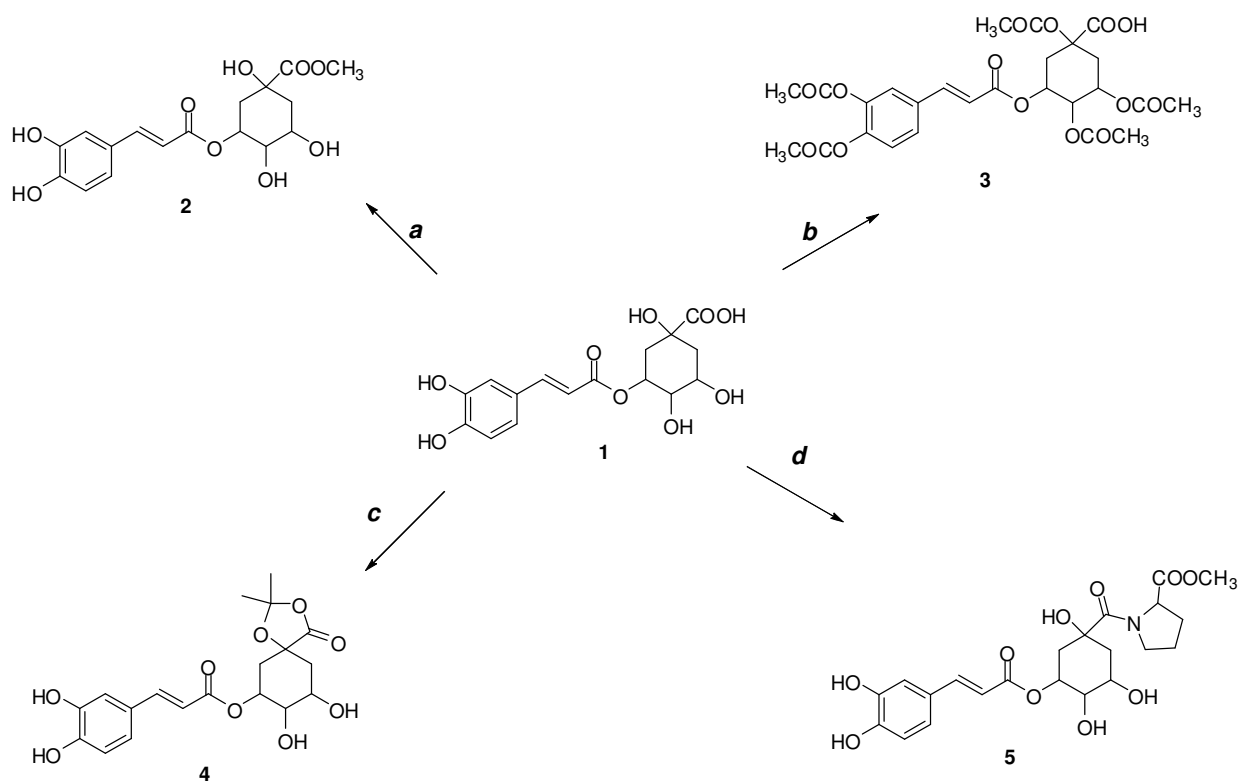
- Direction for the Multi-target-Directed Ligands Gold Rush. *J. Med. Chem.*, **2008**, *51*, 4381-4384.
14. Tarragó, T.; Frutos, S.; Rodriguez-Mias, R. A.; Giralt, E. Identification by F-19 NMR of Traditional Chinese Medicinal Plants Possessing Prolyl Oligopeptidase Inhibitory Activity. *Chembiochem.*, **2006**, *7*, 827–833.
 15. Sultanova, N., Makhmoo, T., Yasin, A., Abilov, Z. A., Omurkamzinova, V. B. Isotamarixen- A new antioxidant and prolyl endopeptidase-inhibiting triterpenoid from *Tamarix hispida*. *Planta Med.*, **2004**, *70*, 65-67.
 16. Barbosa Filho, J. M. Medeiros K. C., Diniz, M. F., Batista, L. M., Athayde-Filho, P.F., Silva, M.S., da-Cunha, E.V., Almeida, J.R., Quintans-Júnior, L.J. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. *Braz. J. Pharmacogn.*, **2006**, *2*, 258-285.
 17. Tarragó, T., Kichik, N., Claasen, B., Prades, R., Teixidó, M., Giralt, E. Baicalin, a prodrug able to reach the CNS, is a prolyl oligopeptidase inhibitor. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 7516-7524.
 18. Filho, A. G.; Morel, A. F.; Adolpho, L.; Ilha, V.; Giralt, E.; Tarragó, T.; Dalcol, I. Inhibitory Effect of Verbascoside Isolated from *Buddleja brasiliensis* Jacq. ex Spreng on Prolyl Oligopeptidase Activity. *Phytother. Res.* [Online early access] Wiley Online Library DOI: 10.1002/ptr.459. Published Online: January 12, **2012**.
 19. Green, B. D.; Flatt, P. R.; Bailey, C. J. Dipeptidyl Peptidase IV (DPP IV) Inhibitors: a Newly Emerging Drug Class for the Treatment of Type 2 Diabetes. *Diab. Vasc. Dis. Res.* **2006**, *3*, 159-65.
 20. Dalcol, I. I.; Adolpho, L.; Tarragó, T.; Kichik, N.; Morel, A. F.; Giralt, E. Unpublished results.

21. Lopez Giraldo, L. J.; Laguerre, M.; Lecomte, J.; Figueroa-Espinoza, M. C.; Barouh, N.; Baréa, B.; Villeneuve, P. Lipase-catalyzed Synthesis of Chlorogenate Fatty Esters in Solvent-free Medium. *Enzyme Microb. Tech.*, **2007**, *41*, 721-726.
22. Selfkow, M. First Efficient Synthesis of 1-, 4- and 5-caffeoylquinic acid. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 2735-2742.
23. Kim, S. S., Lee, C. K., Kang, S. S., Jung, H., Choi, J. S. Chlorogenic acid, an antioxidant principle from the aerial parts of *Artemisia iwayomogi* that acts on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Arch. Pharm. Res.* **1997**, *20*, 148-154.
24. Ma, C-M.; Kully, M.; Khan, J. K.; Hattori, M.; Daneshtalab, M. Synthesis of Chlorogenic Acid Derivatives with Promising Antifungal Activity. *Bioorgan. Med. Chem.*, **2007**, 6830-6833.
25. Li, Y. L., Xu, W. F. Design, synthesis, and activity of caffeoyl pyrrolidine derivatives as potential gelatinase inhibitors. *Bioorgan. Med. Chem.*, **2004**, *12*, 5171-5180.
26. Salmi, C.; Brunel, J.; Vidal, N.; Letourneux, Y. Scope and Limitations of an Efficient Peptide Coupling Method. *Lett. Org. Chem.*, **2005**, *2*, 628-633.
27. Bodanszky, M.; Bodanszky, A. The Practice of Peptide Synthesis. Springer-Verlag, Berlin ; New York , **1984**, 284 pp.
28. Checler, F.; Vicent, J. P.; Kitabgi, P. Inactivation of Neurotensin by Rat Brain Synaptic Membranes Partly Occurs Though cleavage at the Arg8-Arg9 Peptide bond by Metalloendopeptidase. *J. Neurochem.*, **1985**, *45*, 1509-1513.
29. Marston, A.; Kissking, J.; Hostettmann, K. A Rapid TLC Bioautographic Method for the Detection of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Inhibitors in Plants. *Phytochem. Anal.*, **2002**, *14*, 51-54.

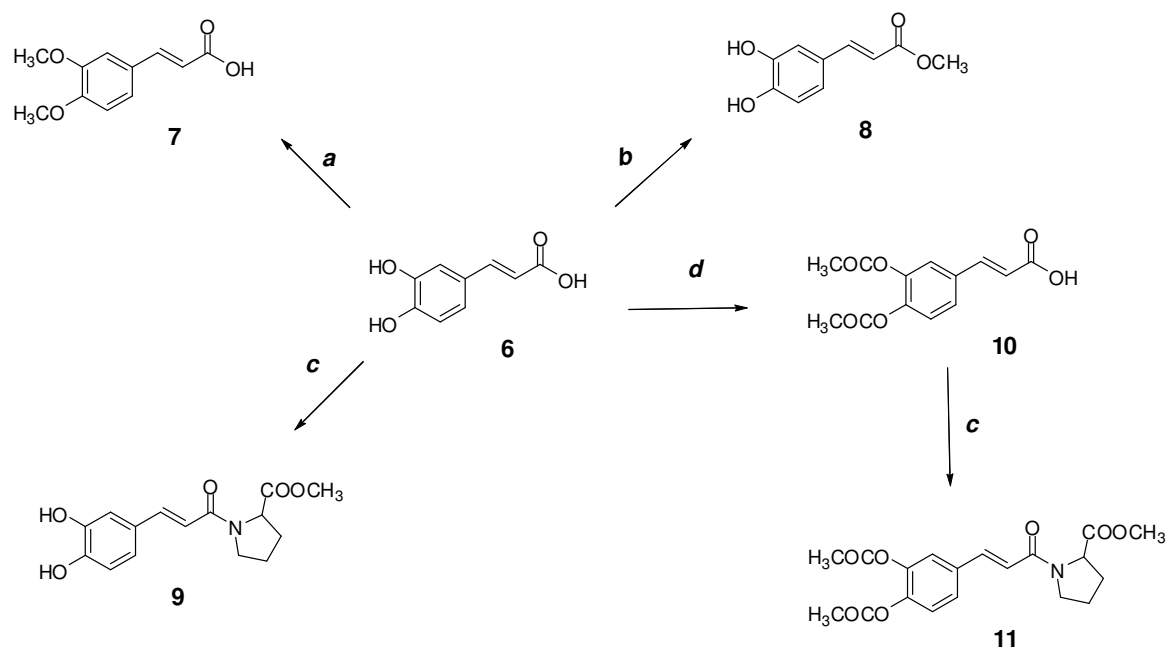
30. Ellman, G. L.; Courtney, K. D.; Andress, V.; Featherstone, R. M. A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. *Biochem. Pharmacol.*, **1961**, *7*, 88-95.
31. Tarragó, T.; Sabido, E.; Kigan, M. J.; de Oliveira, E.; Giralt, E. Primary Structure, Recombinant Expression and Homology Modelling of Human Brain Prolyl Oligopeptidase, an Important Therapeutic Target in the Treatment of Neuropsychiatric Diseases. *J. Pept. Sci.*, **2005**, *11*, 283-287.
32. Di Giovanni, S.; Borloz, A.; Urbain, A.; Marston, A.; Hostettmann, K.; Carrupt, P-A.; Reist, M. In Vitro Screening Assays to Identify Natural or Synthetic Acetylcholinesterase Inhibitors: Thin Layer Chromatography Versus Microplate Methods. *Eur. J. Pharmac. Sci.*, **2008**, *33*, 109-119.
33. Mroczek, T. Highly Efficient, Selective and Sensitive Molecular Screening of Acetylcholinesterase Inhibitors of Natural Origin by Solid-phase Extraction-liquid Chromatography/Electrospray Ionisation-octopole-orthogonal Acceleration Time-of-flight-mass Spectrometry and Novel Thin-layer Chromatography-based Bioautography. *J. Chromatogr. A*, **2009**, *1216*, 2519–2528.
34. Marques M.R., Stuker, C., Kichik, N., Tarragó, T., Giralt, E., Morel, A.F., Dalcol, I.I. Flavonoids with prolyl oligopeptidase inhibitory activity isolated from *Scutellaria racemosa* Pers. *Fitoterapia*, **2010**, *81*, 552-556.
35. Tarragó, T., Kichik, N., Segui, J., Giralt, E. The natural product berberine is a human prolyl oligopeptidase inhibitor. *ChemMedChem*. **2007**, *2*, 354-359.
36. Lee, J., Lee, S., Lee, K., Jang, H., Lee, K., Hahn, T., Paik, Y. Prolyl Endopeptidase Inhibitors from the Leaves of *Ginkgo biloba*. *Planta Med.* **2004**, *70*, 1228-1230.

37. Park, D. H., Park, S. J., Kim, J. M., Jung, W. Y., Ryu, J. H. Subchronic administration of rosmarinic acid, a natural prolyl oligopeptidase inhibitor, enhances cognitive performances. *Fitoterapia*, **2010**, *81*, 644-648.
38. Ma, C-M.; Hattori, M., Daneshtalab, M., Wang, L. Chlorogenic acid derivatives with alkyl chains of different lengths and orientations: potent α -glucosidase inhibitors. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 6188-6194.

Scheme 1. Synthesis of the caffeoylquinic derivatives.

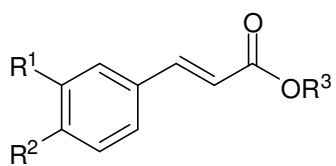


^a Reagents and conditions: (a) MeOH, Amberlite IRA 120H; (b) Ac₂O, DMAP, pyridine; (c) acetone, H₂SO₄; (d) Pro-OMe.HCl, HATU, DIEA in DMF

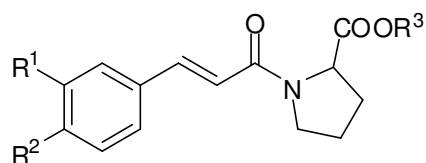
Scheme 2. Synthesis of the caffeoyl derivatives.

^a Reagents and conditions: (a) Me_2SO_4 , NaOH; (b) MeOH, H_2SO_4 ; (c) Pro-OMe.HCl, HATU, DIEA in DMF; (d) Ac_2O , DMAP, pyridine.

Scheme 3. Structures of the cinnamoyl derivatives.



- 12**, $R^1=R^2=R^3=H$
13, $R^1=R^3=H$, $R^2=OCH_3$
14, $R^1=R^2=H$, $R^3=CH_3$
15, $R^1=H$, $R^2=OCH_3$, $R^3=CH_3$



- 16**, $R^1=R^2=H$, $R^3=CH_3$
17, $R^1=H$, $R^2=OCH_3$, $R^3=CH_3$
18, $R^1=R^2=R^3=H$
19, $R^1=H$, $R^2=OCH_3$, $R^3=H$

Table 1. Percentages of POP and DPP IV inhibition achieved by **1-19**.*

Compound (500 μM)	POP Inhibition (%)**	DPP IV Inhibition (%)***
Caffeoylquinic derivatives		
1	86.61	73.37
2	92.87	72.70
3	88.10	63.62
4	81.52	57.60
5	80.43	63.80
Caffeoyl derivatives		
6	94.35	63.25
7	29.57	45.03
8	90.16	69.40
9	94.69	48.83
10	72.89	28.18
11	90.28	43.50
Cinnamoyl derivatives		
12	15.85	4.66
13	5.49	12.26
14	20.39	9.18
15	24.25	17.74
16	17.34	4.56
17	44.86	20.94
18	16.75	28.07
19	7.00	14.97

* Data are presented as the mean of 3 independent experiments.

**Percentages of POP inhibition calculated using ZGP-AMC as substrate.

*** Percentages of DPP IV inhibition calculated using GP-AMC as substrate

Table 2. IC₅₀ values of caffeoylquinic and caffeoyl derivatives on POP activity.

Compound	IC₅₀ (μM)	R²
Caffeoylquinic derivatives		
1	109.8	0.98
2	3.0	0.99
3	98.9	0.99
4	14.3	0.97
5	210.0	0.99
Caffeoyl derivatives		
6	12.5	0.95
7	198.0	0.95
8	5.0	0.98
9	105.7	0.99
10	28.0	0.99
11	161.2	0.99

Table 3. *In vitro* AChE inhibition assays data for compounds **1-19** as determined by TLC Bioautography and Microplate Assays*.

Compound	Bioautography (pMIQ)**	Microplate % Inhibition***
1	5.85	28.4
2	N.A.	27.7
3	N.A.	N.T.
4	5.05	17.4
5	N.A.	N.T.
6	6.03	29.2
7	N.A.	20.5
8	N.A.	25.9
9	N.A.	39.0
10	7.72	<10
11	N.A.	<10
12	4.47	15.6
13	N.A.	15.7
14	N.A.	21.6
15	N.A.	30.1
16	4.71	21.8
17	N.A.	11.0
18	N.A.	18.3
19	N.A.	<10

*N.A.: not active; N.T.: not tested

** *TLC bioautographic method using Fast Blue B salt*

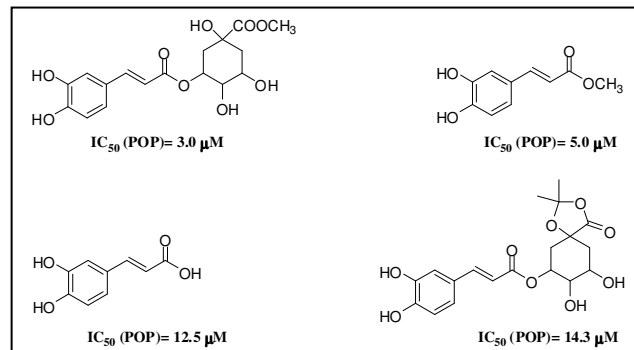
****Microplate method using Ellman's reagent. All compounds were assayed at 500*

μM .

Table of Contents Graphic.

Evaluation of caffeoyl and cinnamoyl derivatives as potential prolyl oligopeptidase inhibitors.

Luciana O. Adolpho, Daniele F. Marin, Albert Puigpinos, Laura Mendieta, Teresa Tarragó, Ademir F. Morel, Ernest Giralt, Ionara I. Dalcol

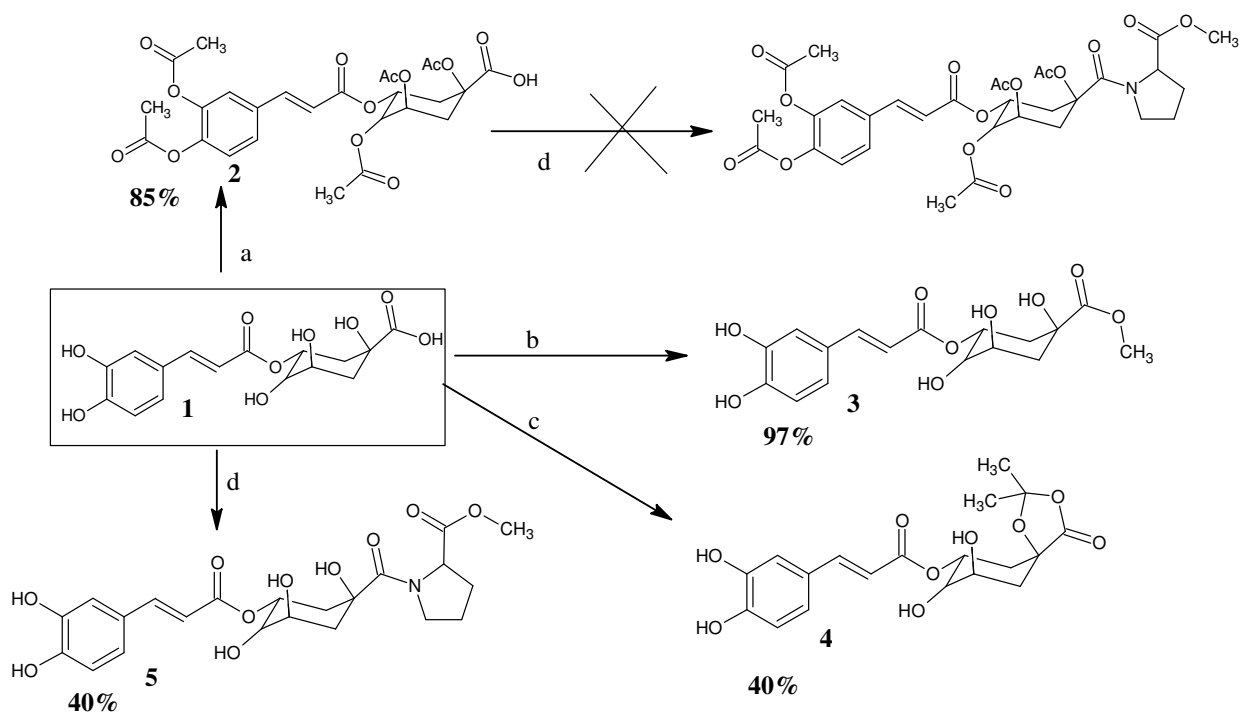


5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos em relação à preparação de uma série de derivados dos ácidos clorogênico, cafeico, cinâmico e *p*-metoxicinâmico, bem como a discussão dos principais resultados dos ensaios de atividade inibitória enzimática da POP, DPP IV e AChE e de atividade antimicrobiana realizados com os mesmos.

5.1 Obtenção dos compostos 2-21

5.1.1 Obtenção dos derivados do ácido clorogênico (compostos 2-5)



Esquema 6 - Obtenção dos compostos 2-5. Reagentes e condições: (a) Ac_2O , DMAP, piridina; (b) Amberlite IRA 120H, MeOH; (c) Acetona anidra, H_2SO_4 ; (d) H-Pro-OMe.HCl, HATU, DIEA em DMF.

O ACH acetilado **2** (Esquema 6) foi obtido a partir da acetilação direta do composto comercial ACH **1** seguindo-se a metodologia descrita por Kang *et al* (1997) (KANG, et al., 1997), obtendo-se o produto penta-acetilado na forma de um sólido branco com 85% de rendimento.

A Figura 20 apresenta o cromatograma analítico de CLAE do composto **2** obtido neste trabalho, enquanto que a Figura 20 mostra seu espectro de massas CLAE-EM. O cromatograma da Figura 21 foi obtido em coluna C₁₈, utilizando gradiente de fase móvel de 0 a 100% B (A- H₂O com 0,045% TFA; B- ACN com 0,036% TFA) em 8 minutos, com fluxo de 1 mL/min e $\lambda = 315$ nm . No espectro de massas CLAE-EM gerado no modo positivo pode-se observar a presença de um pico referente à molécula protonada $[M+H]^+$ em m/z 565,09, confirmando a obtenção de **2**. Na literatura está bem documentado que ácidos carboxílicos podem facilmente dimerizar através da formação de clusters envolvendo os grupamentos carboxila (YAMAMOTO, et al., 1990; FRAUENDORF, et al., 1998). Esta formação de íons diméricos é encontrada em vários trabalhos de caracterização de compostos fenólicos de origem natural por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (THEERASIN, et al., 2009; ZENG, et al., 2006). No espectro de massas do composto **2** também é observada esta formação de um íon dimérico $[2M+H]^+$ a m/z 1129,06, enquanto que o pico com relação m/z 582,16 é relativo a $[M+H_2O]$. Alguns outros picos referentes a íons fragmentários estão indicados no espectro da Figura 21.

O derivado pentaacetilado-ACH **2** foi também caracterizado por espectroscopia de RMN de ¹H e ¹³C (Figura 22 a e 22 d), mostrando os sinais do ácido cafeoilquínico na região entre 6,33 e 7,60 ppm e os hidrogênios referentes às cinco metilas dos grupos acetil (15 H) na região de 2,30 a 2,00 ppm, sendo os sinais identificados a partir da comparação com dados de RMN existentes na literatura (KANG, et al., 1997).

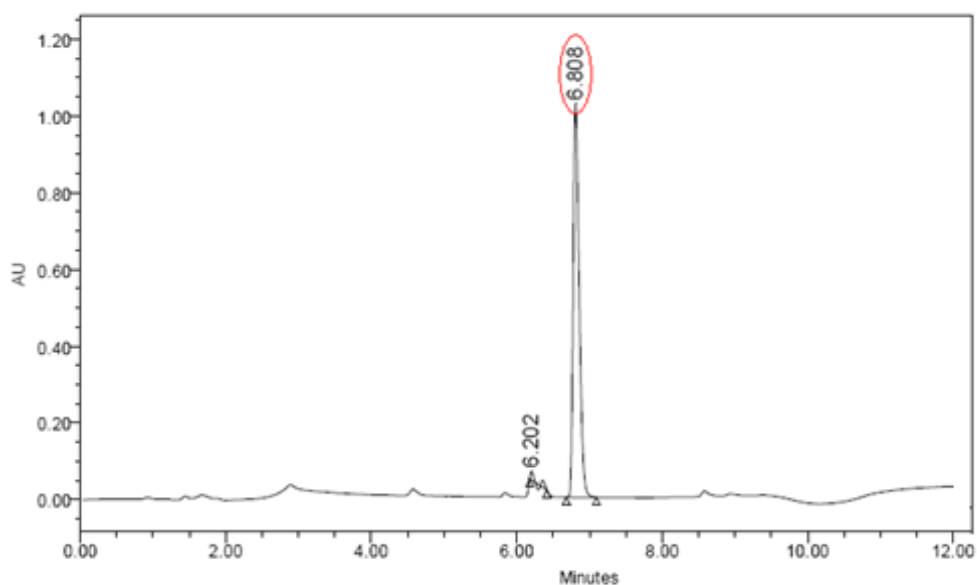


Figura 20 – Cromatograma analítico de CLAE do composto **2** em coluna C_{18} ; gradiente linear de 0- 100% B (A- H_2O com 0,045% TFA; B- ACN com 0,036% TFA) em 8 min, ϕ : 1 mL/min e $\lambda = 315$ nm.

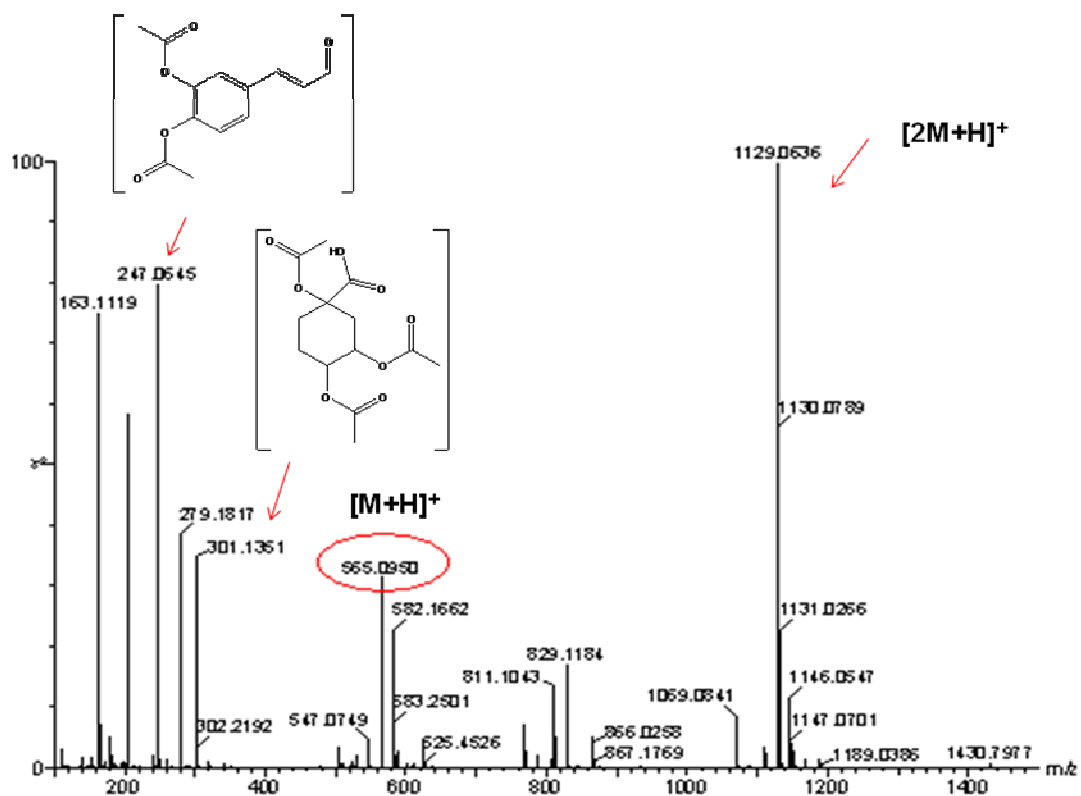
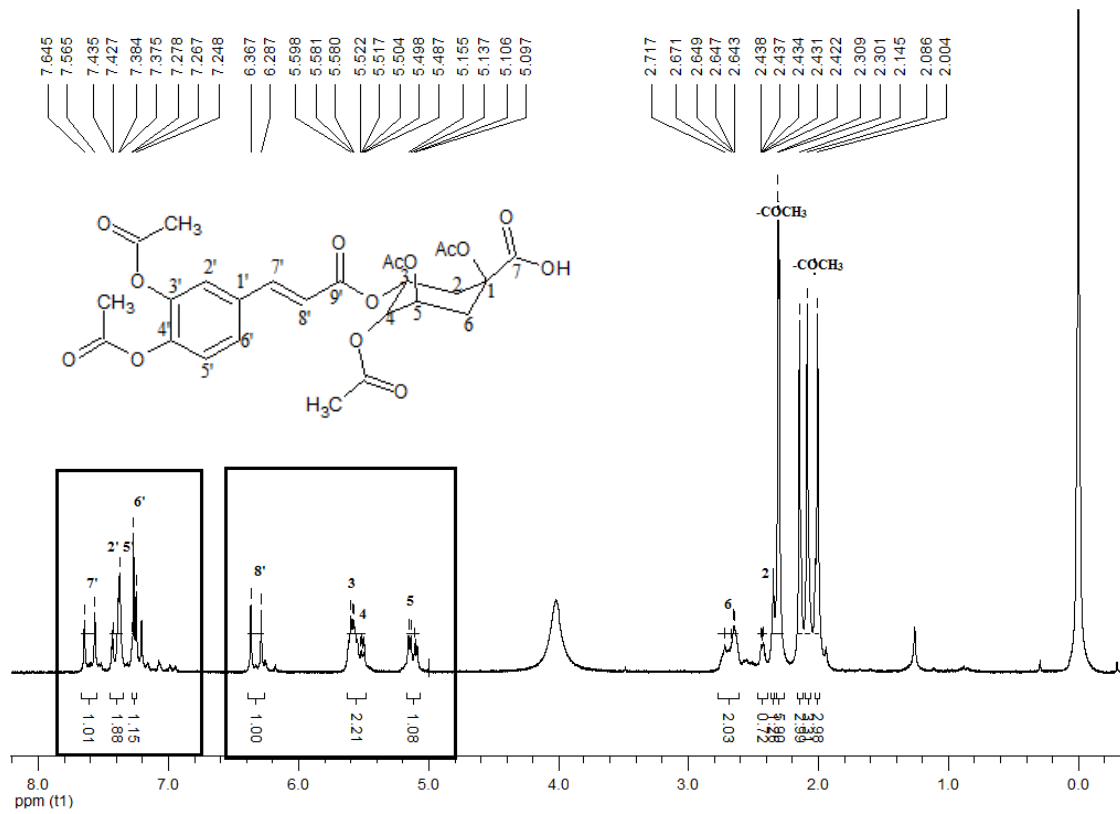
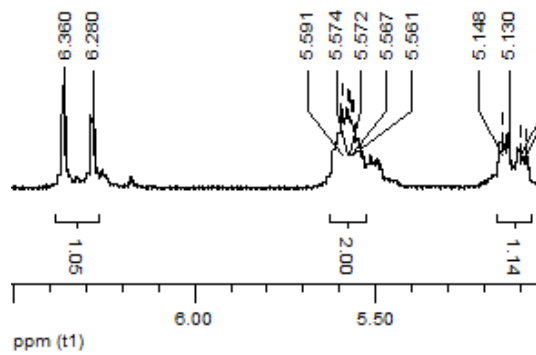


Figura 21 – E espectro de massas obtido por técnica de CLAE-EM gerado no modo positivo do composto **2**.

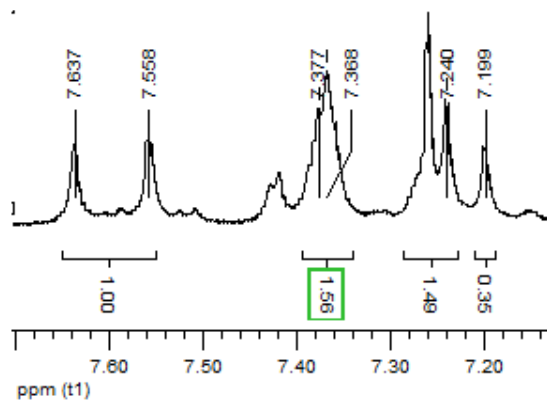
a)



b)



c)



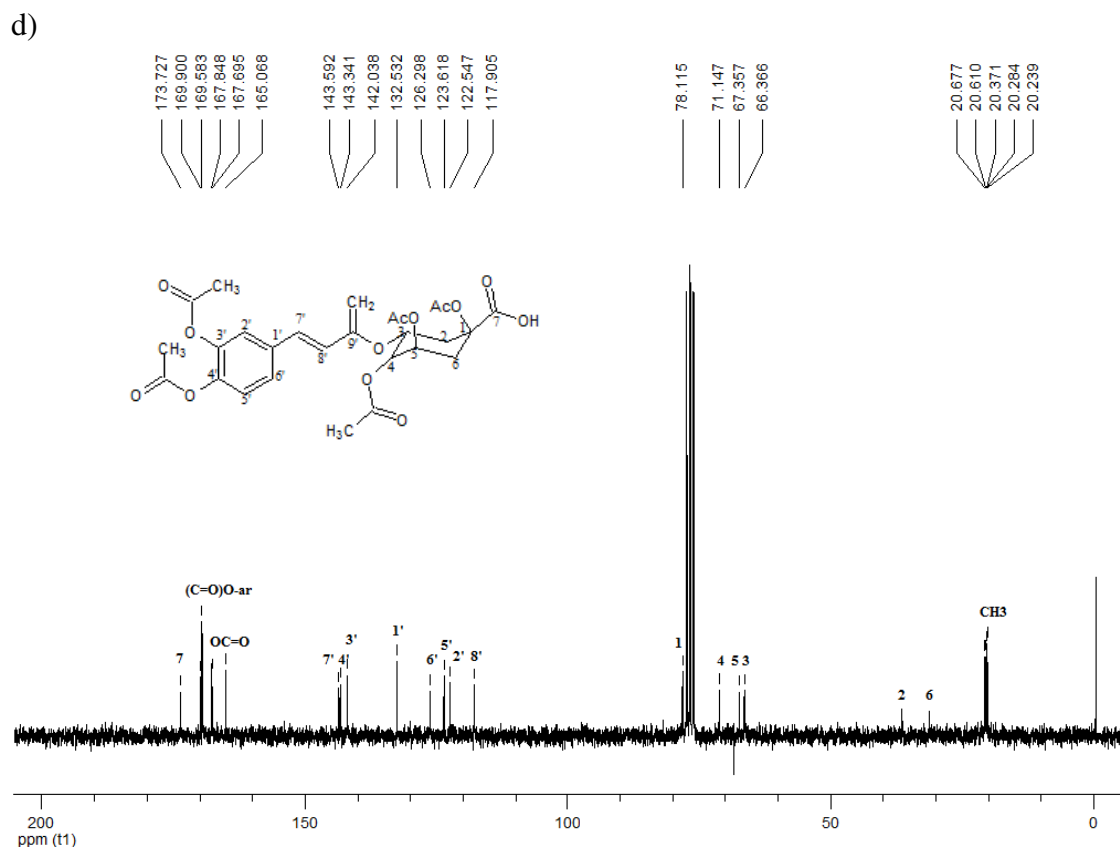


Figura 22 - (a) Espectro de RMN ^1H do composto **2** em CDCl_3 a 400,13 MHz; (a) expansão de 5,00 a 6,50 ppm; (b) expansão de 7,00 a 7,70 ppm (d) Espectro de RMN ^{13}C de **2** em CDCl_3 a 100,62 MHz.

Para a obtenção de **3**, o ácido clorogênico comercial foi esterificado segundo metodologia descrita por López *et al*, 2007, usando metanol absoluto e Amberlite IRA 120H (Esquema 6). O rendimento de **3** nesta reação foi de 97%. Na Figura 23 observa-se o cromatograma obtido por CLAE deste derivado esterificado. O espectro de massas CLAE-EM (Figura 24) apresenta picos referentes ao íon $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ de m/z 370 e ao dímero $[2\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ de m/z 738, além de um pico base em m/z 163 correspondente a porção cafeoil de **3**. No espectro de RMN de ^1H da Figura 25 a pode-se verificar a presença dos três hidrogênios da metila do éster a 3,78 ppm, confirmando a esterificação de **1**. Da mesma forma, observa-se no espectro de RMN de ^{13}C (Figura 25 b) a presença do carbono da metoxila a 53,00 ppm, além dos demais picos característicos da porção cafeoilquínico.

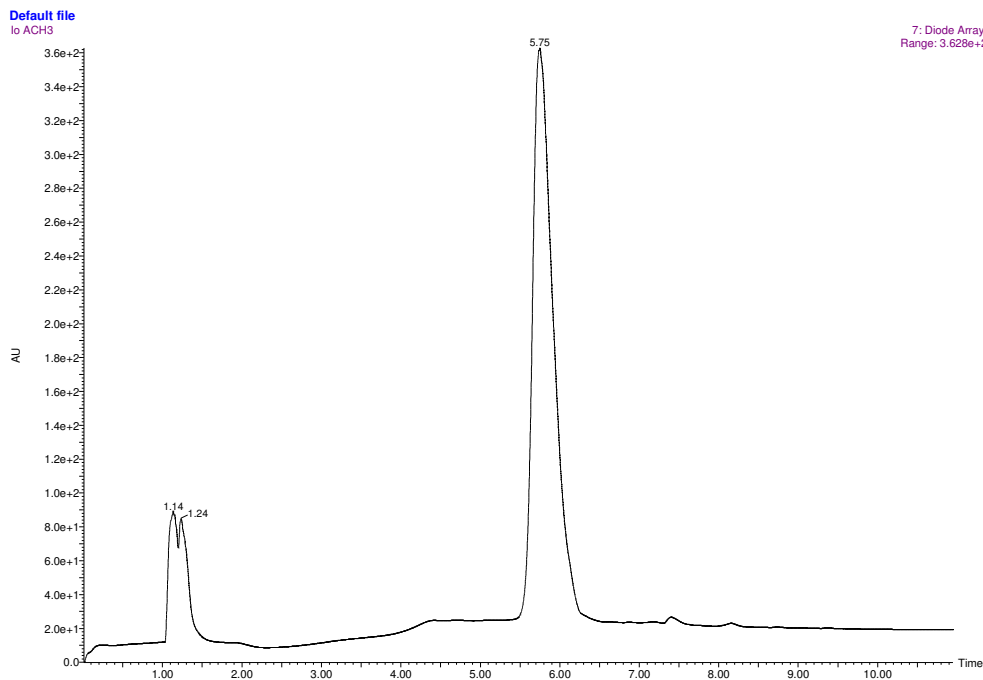


Figura 23 – Cromatograma analítico de CLAE do composto **3** em coluna C_{18} ; gradiente linear de 0- 100% B (A- H_2O com 0,045% TFA; B- ACN com 0,036% TFA) em 8 min, ϕ : 1 mL/min e $\lambda= 315$ nm.

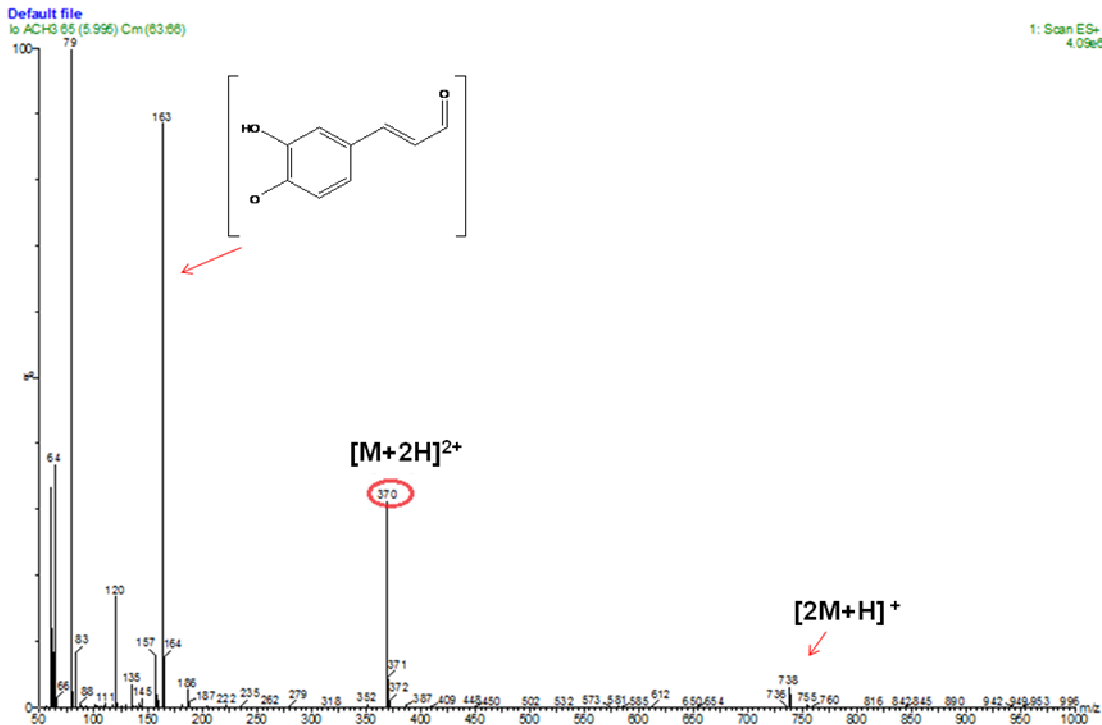


Figura 24 – Espectro de massas obtido por técnica de CLAE-EM gerado no modo positivo do composto **3**.

O acetnídeo **4** foi obtido mediante reação do ácido clorogênico com acetona anidra em meio ácido sulfúrico concentrado, conforme o Esquema 6, com rendimento de 40%. (MA, et al., 2007) O cromatograma de CLAE em coluna de fase reversa (Figura 26) mostra o pico com tempo de retenção 6,88 min referente a **4**. No espectro de massas (Figura 27) pode-se verificar a presença de um pico com m/z 395 referente à $[M+1]$, que confirma a obtenção de **4**. No espectro de RMN de ^1H da Figura 28 a verifica-se a presença de um singleto em 1,61 ppm com integração para 6 hidrogênios dos carbonos alifáticos da porção acetal, assim como dos outros hidrogênios característicos da porção cafeoilquínico. Da mesma forma, observa-se no espectro de RMN de ^{13}C (Figura 28 b) a presença de sinais dos dois carbonos alifáticos em 29,60 e 29,73 ppm da porção acetal, bem como um sinal a 112,09 ppm correspondente ao C1'', caracterizando a obtenção de **4**, juntamente com os demais sinais característicos do grupamento cafeoilquínico.

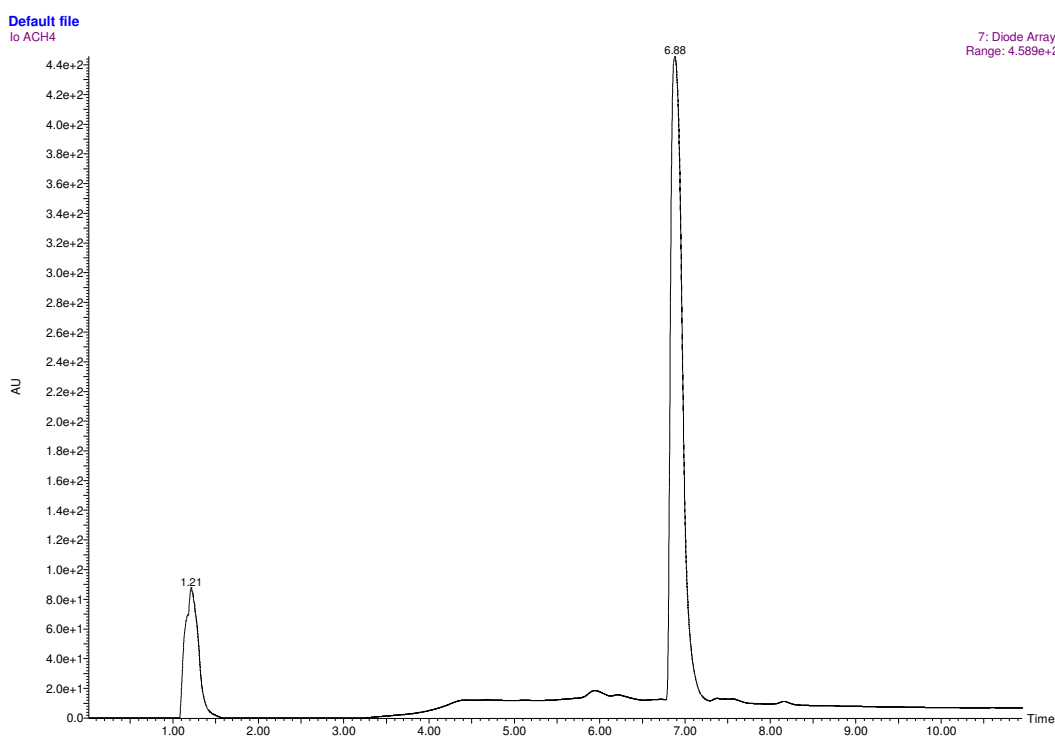


Figura 26 – Cromatograma analítico de CLAE do composto **4** em coluna C_{18} ; gradiente linear de 0- 100% B (A- H_2O com 0,045% TFA; B- ACN com 0,036% TFA) em 8 min, ϕ : 1 mL/min e $\lambda= 315$ nm.

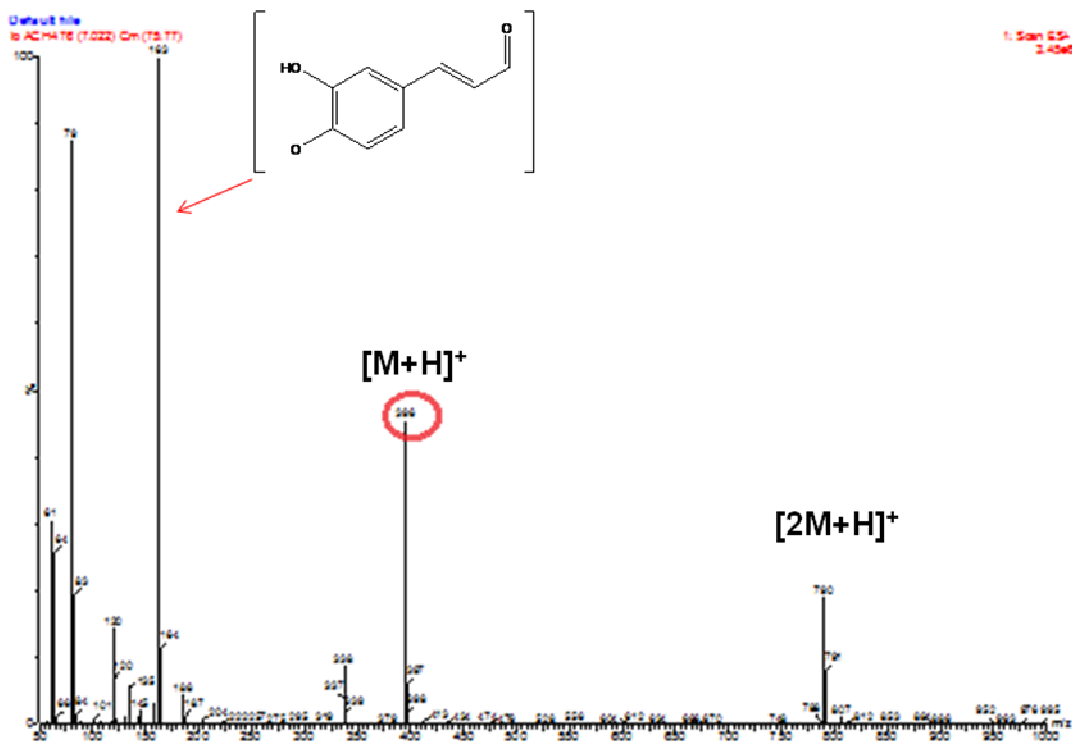
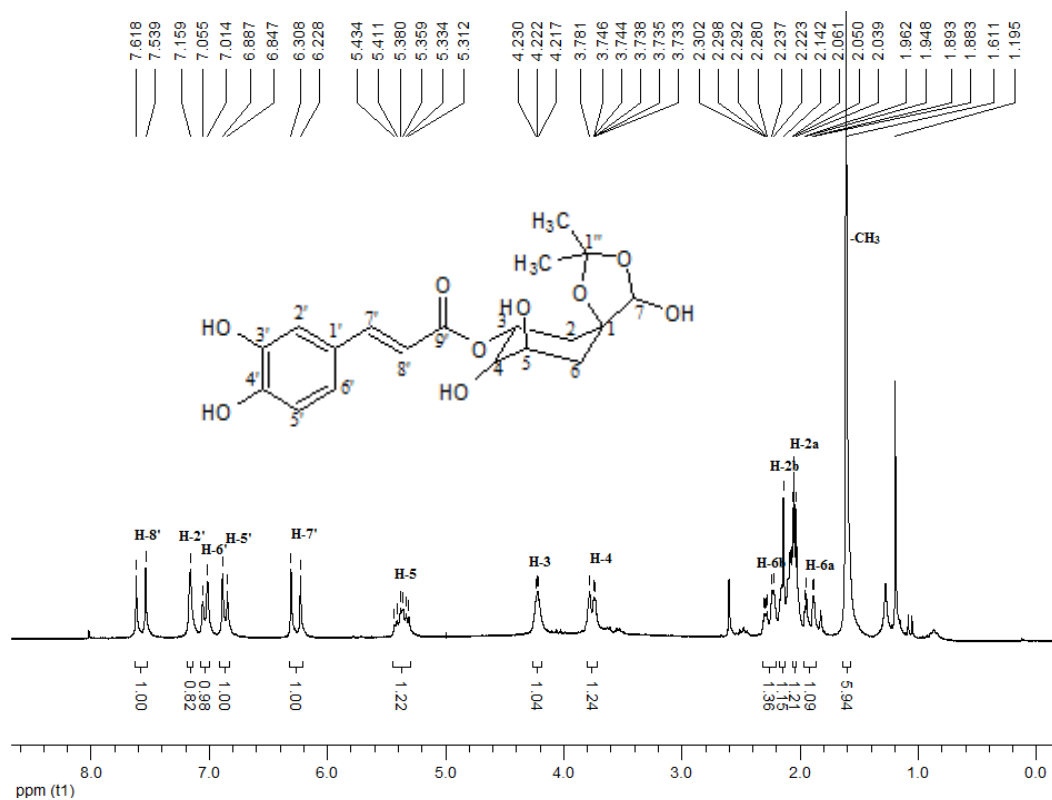


Figura 27 – Espectro de massas obtido por técnica de CLAE-EM gerado no modo positivo do composto 4.

a)



b)

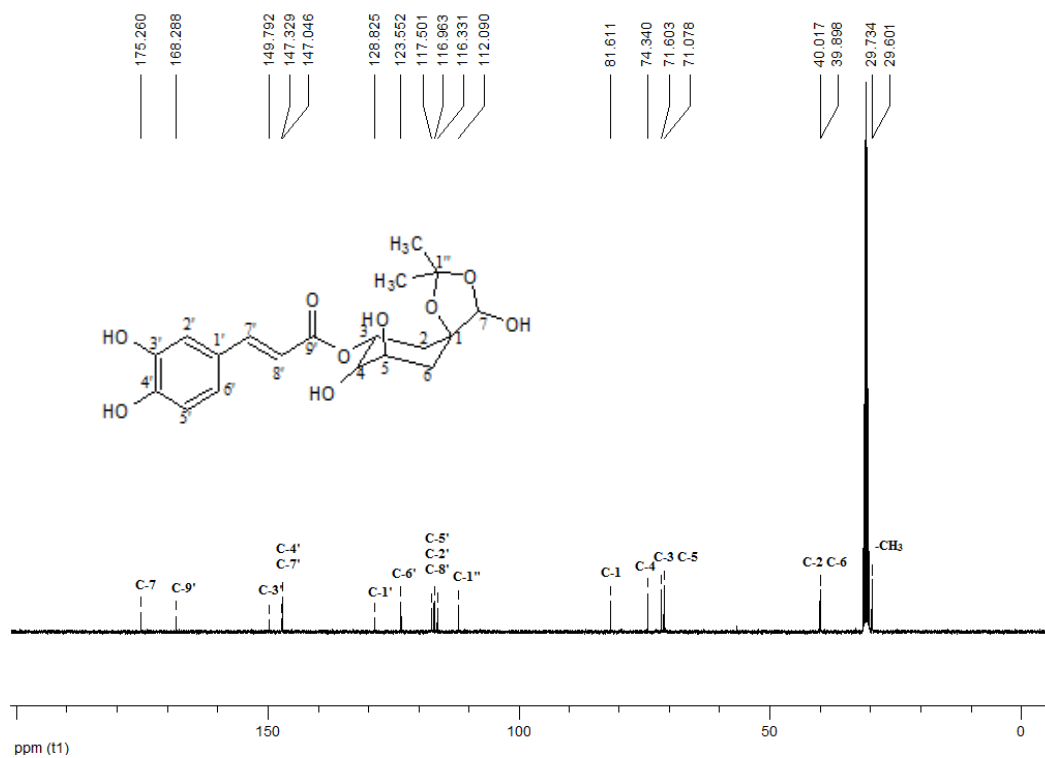


Figura 28 – (a) Espectro de RMN ¹H do composto 4 em CDCl₃ a 400.13 MHz; (b) Espectro de RMN ¹³C de 4 em CDCl₃ a 100,63 MHz.

O derivado **5** foi obtido mediante o acoplamento de **1** com a prolina metil éster (H-Pro-OMe.HCl), utilizando HATU como reagente de acoplamento e DIEA em THF/DMF, conforme o Esquema 6. (SALMI et al., 2005). A formação de **5** foi monitorada por CCD e análise por CLAE analítica, sendo o produto confirmado por espectrometria de massas CLAE-EM e RMN. O perfil de CLAE da Figura 29 mostra um pico a 6,14 min referente a **5**, e picos minoritários referentes a presença de resíduos dos reagentes de acoplamento e material de partida na amostra analisada, uma vez que este produto não passou por nenhum tipo de purificação antes de sua análise. No espectro de massas de **5** foi possível a visualização de um pico a m/z 435 indicando a formação do íon $[M-OCH_3]^+$, além de dois picos a m/z 273 e 163 referentes a fragmentação de **5** (íons mostrados na Figura 30). Os espectros de RMN de 1H e de ^{13}C confirmaram o produto obtido. No espectro de RMN de ^{13}C observa-se a presença de 21 sinais que se encontram atribuídos na Figura 31.

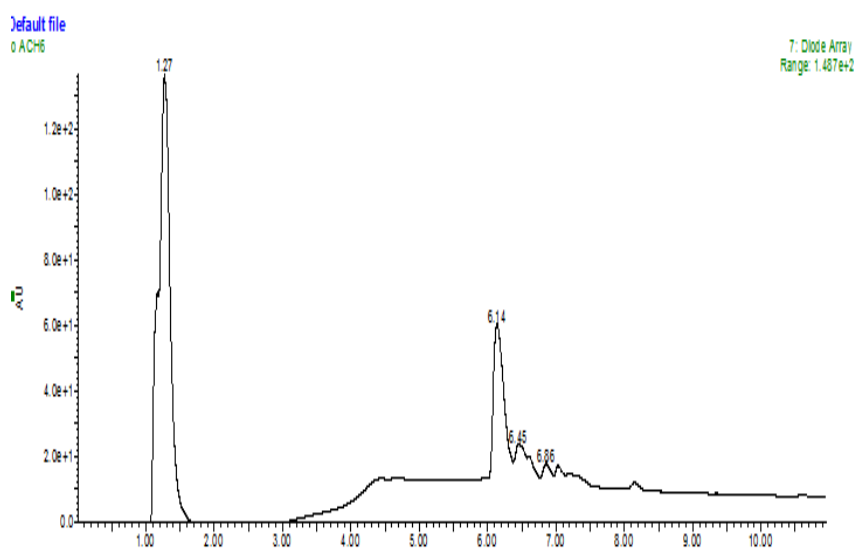


Figura 29 – Cromatograma analítico de CLAE do composto **5** em coluna C_{18} ; gradiente linear de 0- 100% B (A- H_2O com 0,045% TFA; B- ACN com 0,036% TFA) em 8 min, ϕ : 1 mL/min e $\lambda= 315$ nm.

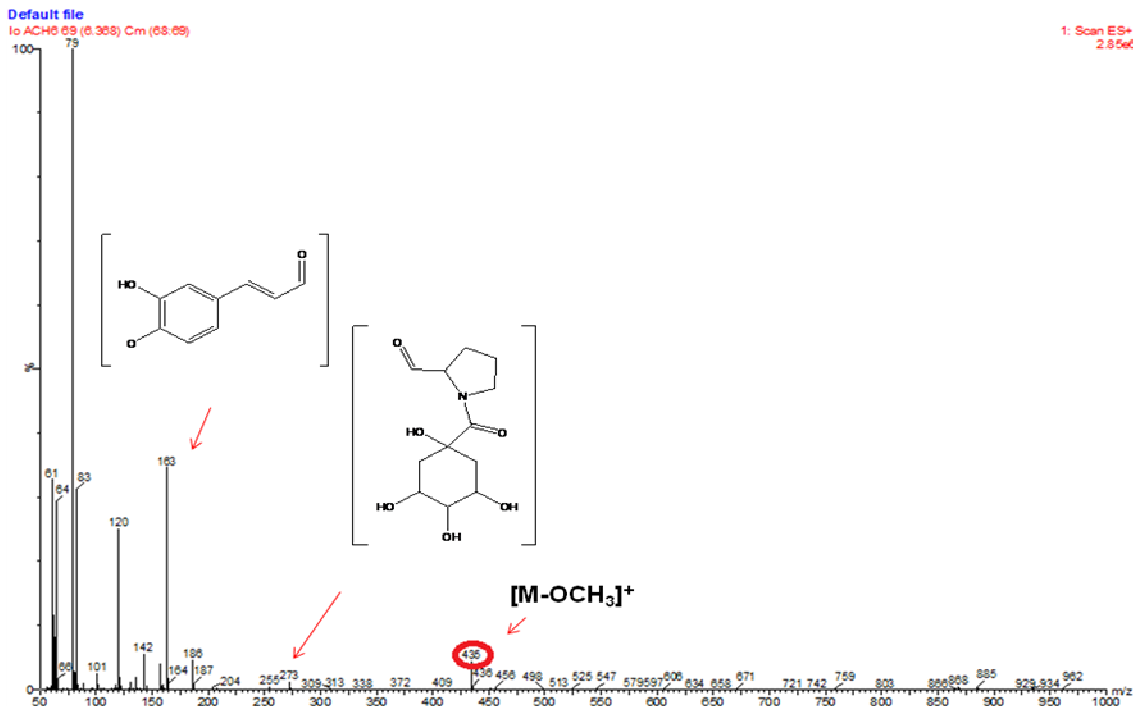


Figura 30 – Espectro de massas obtido por técnica de CLAE-EM gerado no modo positivo do composto **5**.

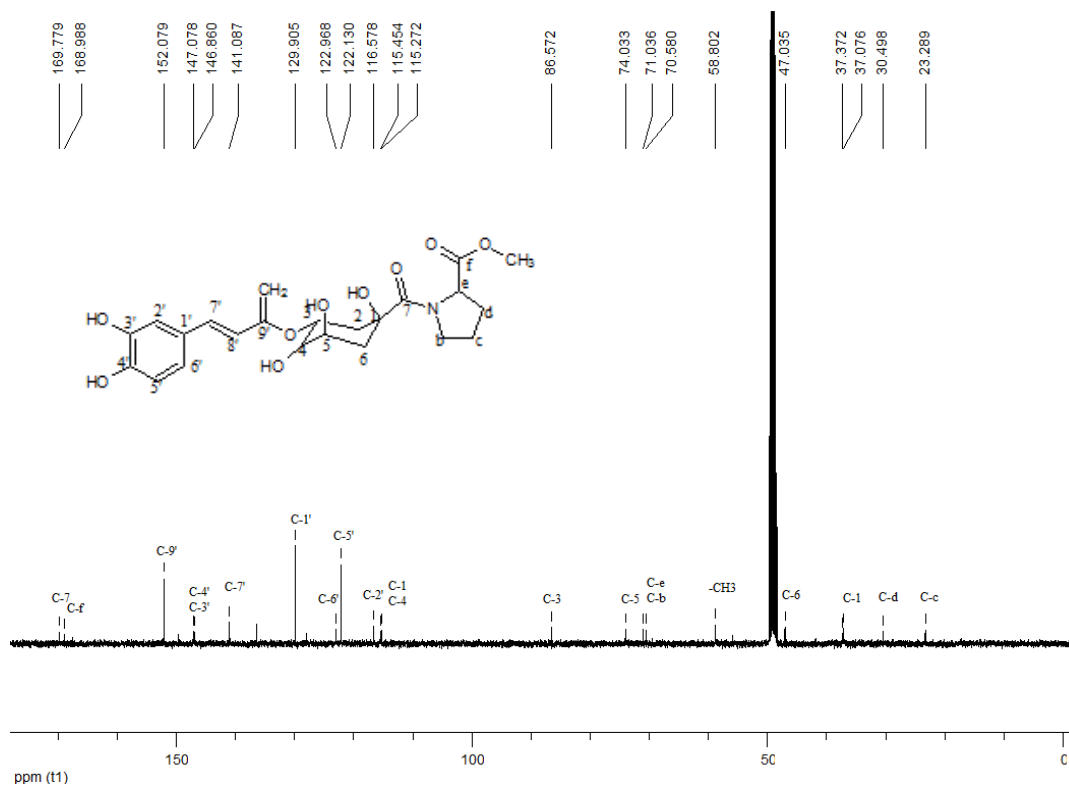
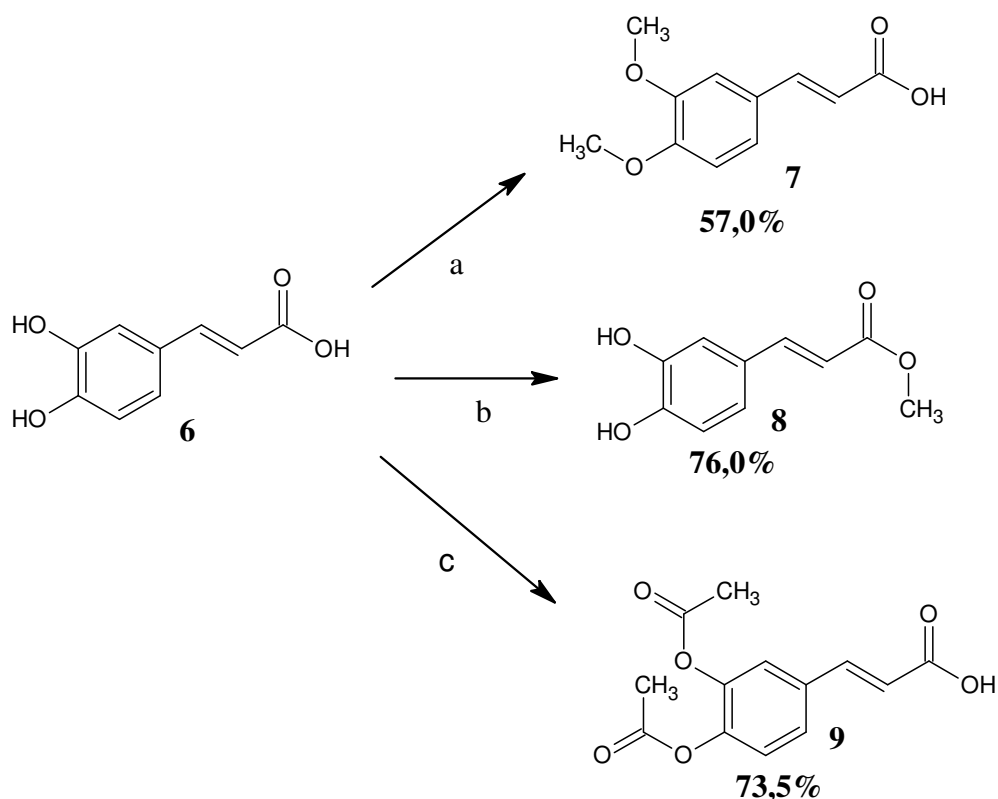


Figura 31 – Espectro de RMN ¹³C de **5** em CD₃OD a 100,63 MHz.

O acoplamento de **2** com a prolina metil éster (Esquema 6), foi realizado com a mesma metodologia descrita para **5** (SALMI et al., 2005), no entanto, não foi observada a formação do produto. Desta forma, optou-se por utilizar outras metodologias de acoplamento, como a do anidrido misto, utilizando cloroformiato de isobutila; a de acoplamento com carbodiimida, utilizando DCC, ambas descritas por Bodansky (BODANSZKY; BODANSZKY, 1984) utilizando PyBOP como reagente de acoplamento, no entanto, com nenhum destes métodos observou-se a formação do produto desejado.

5.1.2 Obtenção dos derivados do ácido cafeico (compostos **7-9**)



Esquema 7 – Obtenção dos compostos **7-9**. Reagentes e condições: (a) Me_2SO_4 / NaOH ; (b) MeOH / H_2SO_4 ; (c) Ac_2O / piridina/ DMAP.

O composto **7** foi obtido pela reação do ácido cafeico com sulfato de dimetila em meio básico, resultando em um sólido marrom claro com 57% de rendimento. (ZHANG, 2006) O produto foi analisado por CLAE, CLAE-EM e RMN de ^1H e ^{13}C . Pelo perfil cromatográfico de CLAE apresentado na Figura 37, pode-se perceber que o produto não se encontra totalmente

puro, contendo um pouco de impureza dos reagentes de partida, uma vez que foi analisado sem prévia purificação. No espectro de massas gerado no modo positivo observa-se a presença do íon molecular com relação m/z 209 referente à $[M+H]$, além de picos de fragmentos indicados na Figura 38. A obtenção do composto dimetilado **7** foi confirmada também pela análise dos espectros de RMN 1H e ^{13}C (Figura 39). Observa-se no espectro de 1H a presença de dois singletos em 3,79 e 3,80 ppm referentes aos seis hidrogênios das metilas com deslocamentos de 3,79 e 3,80 ppm, além dos picos característicos da porção cafeoil do ácido cafeico, hidrogênios vinílicos, (H-7' e H-8') apresentam-se na forma de dubletos com deslocamento de 6,40 e 7,51 ppm, respectivamente, com constante de acoplamento de 16 Hz, característicos de dupla trans. Os hidrogênios aromáticos também encontram-se bem caracterizados na região de 6,96 a 7,27 ppm, onde H-5' e H-6' aparecem como dubletos em 6,97 e 7,17 ppm, respectivamente.. Através do espectro de ^{13}C foi confirmada a obtenção do produto, onde se verifica a presença de dois sinais a 55,51 e 55,56 ppm relativos aos carbonos das metoxilas fenólicas, além dos sinais referentes as carbonos aromáticos e vinílicos característicos do cafeoil.

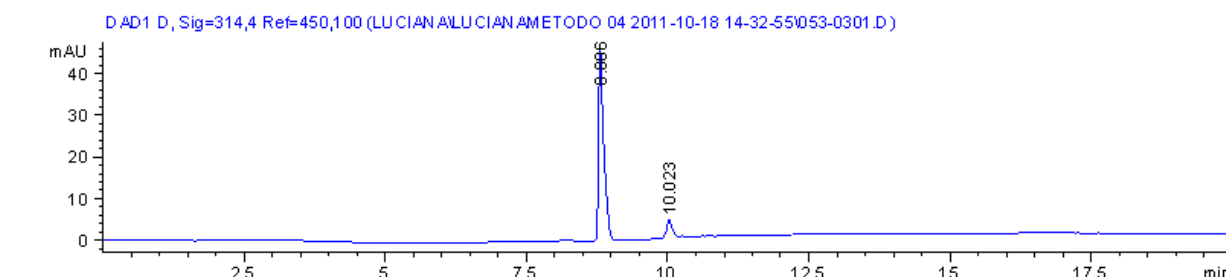


Figura 32 – Cromatograma analítico de CLAE em coluna C18 do composto **7**; gradiente linear 0-100% B (A: H₂O; B: MeOH) em 15 minutos, fluxo: 1 ml/mim. $\lambda= 314$ nm.

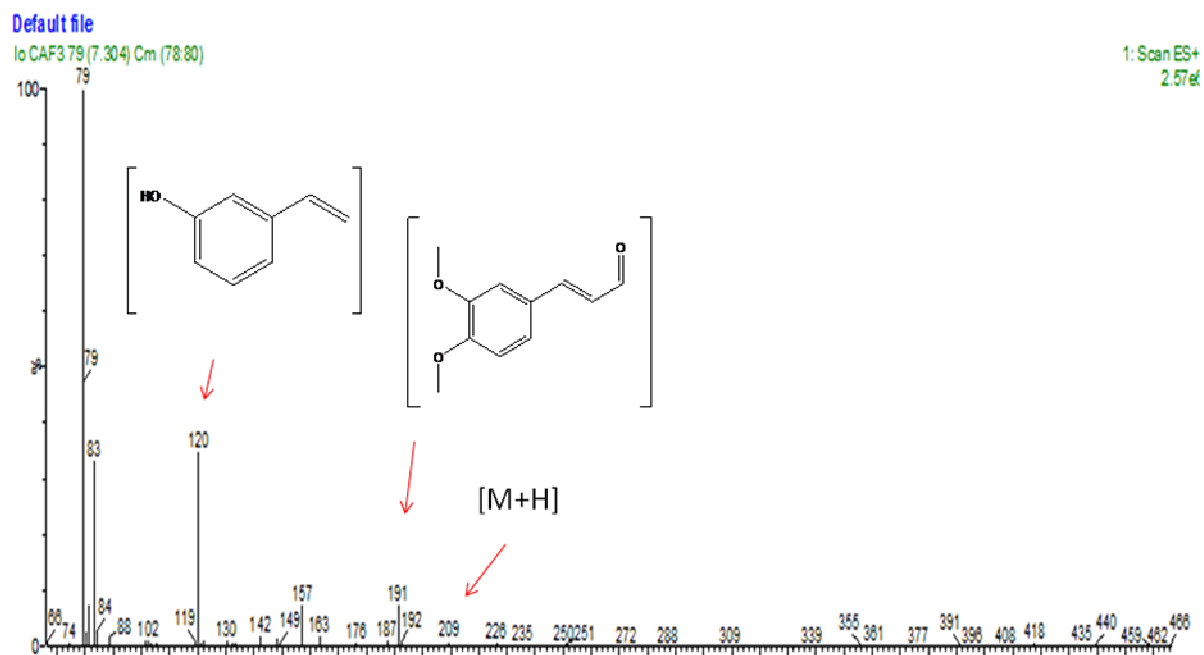
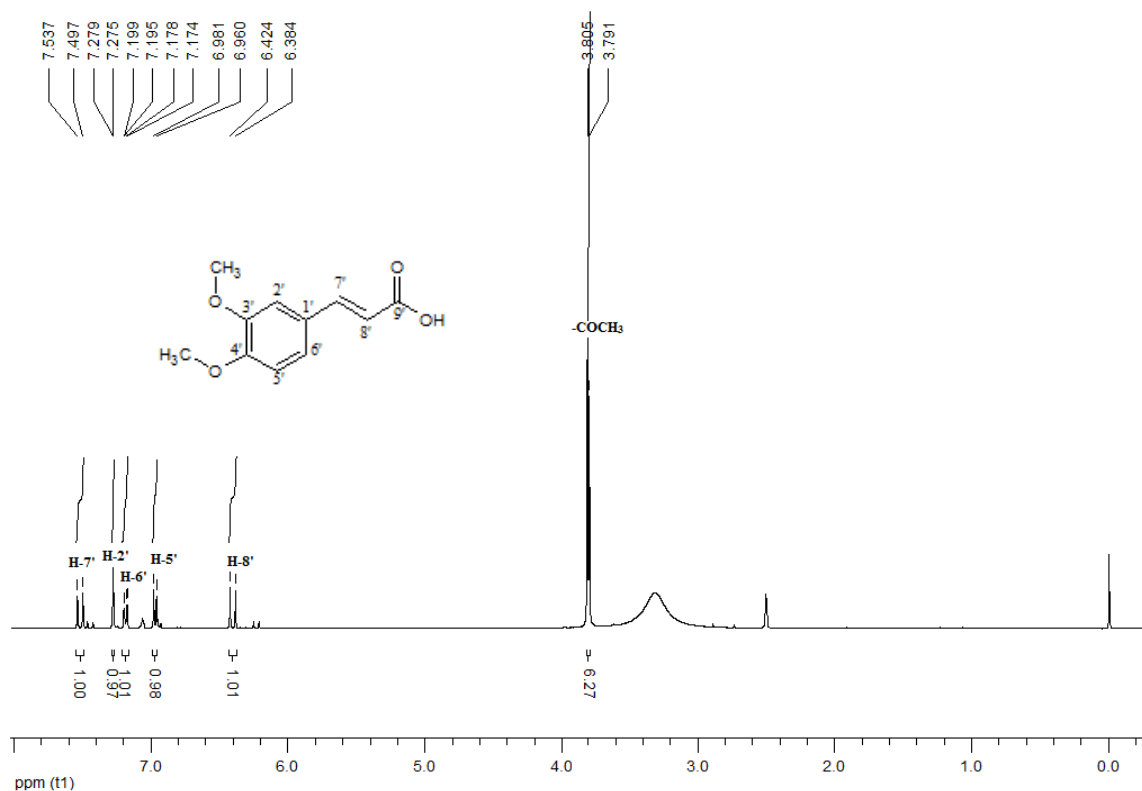


Figura 33 – Espectro de massas obtido por técnica de CLAE-EM gerado no modo positivo do composto 7.

a)



b)

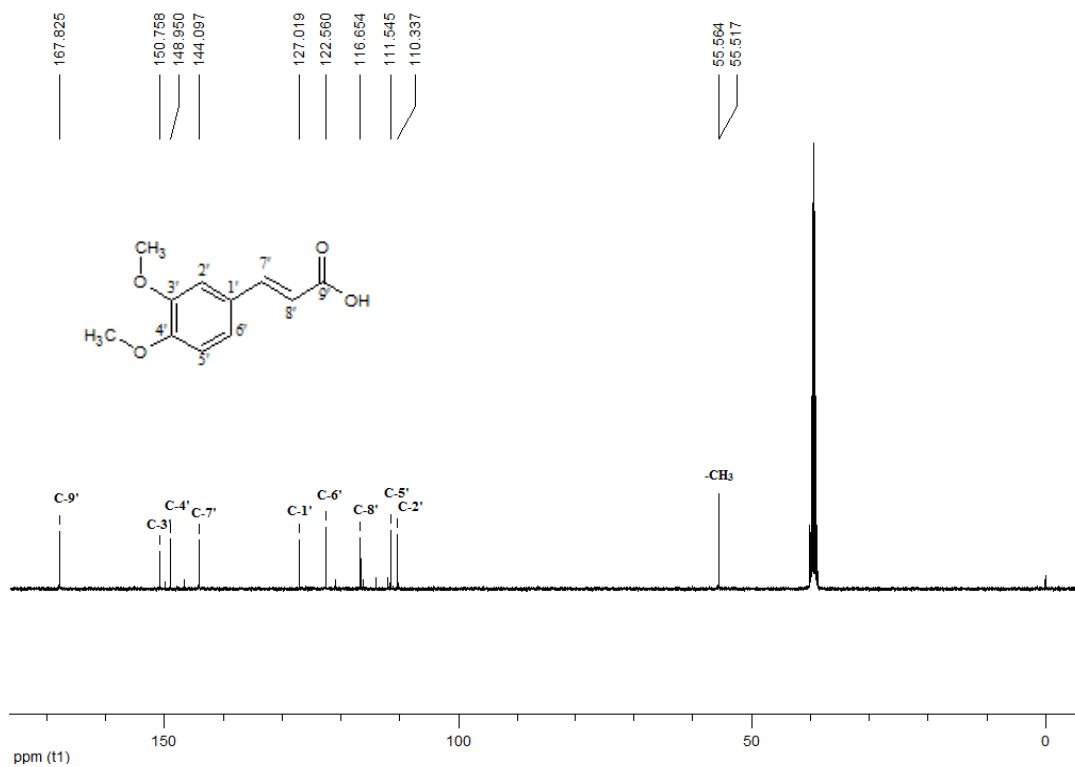


Figura 34 - (a) Espectro de RMN ¹H do composto **7** em CDCl₃ a 400,13 MHz; (b) Espectro de RMN ¹³C de **7** em CDCl₃ a 100,63 MHz.

O ácido cafeico esterificado **8** foi obtido segundo a metodologia descrita por Bisogno, 2007, que utiliza metanol anidro e H₂SO₄ concentrado. O produto **8** foi obtido com 76% de rendimento na forma de um sólido branco. O composto obtido foi analisado através de cromatografia CLAE, onde foi evidenciada a presença de um pico único com tempo de retenção de 6,81 min (Figura 35). A obtenção deste éster foi também confirmada através da análise dos espectros de RMN ¹H e ¹³C (Figura 36). No espectro de ¹H é observada a presença de um singlete referente aos hidrogênios da metoxila do éster a 3,67 ppm, além dos picos característicos da porção cafeoil do ácido cafeico. A obtenção do éster foi confirmada por RMN de ¹³C principalmente pela presença no espectro de um sinal a 52,03 ppm referente ao carbono da metoxila do éster.

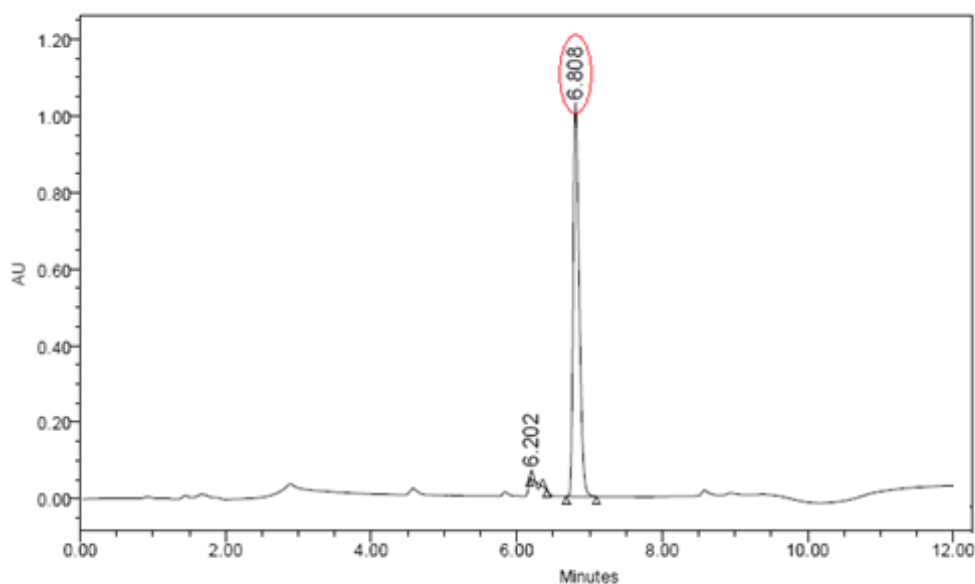
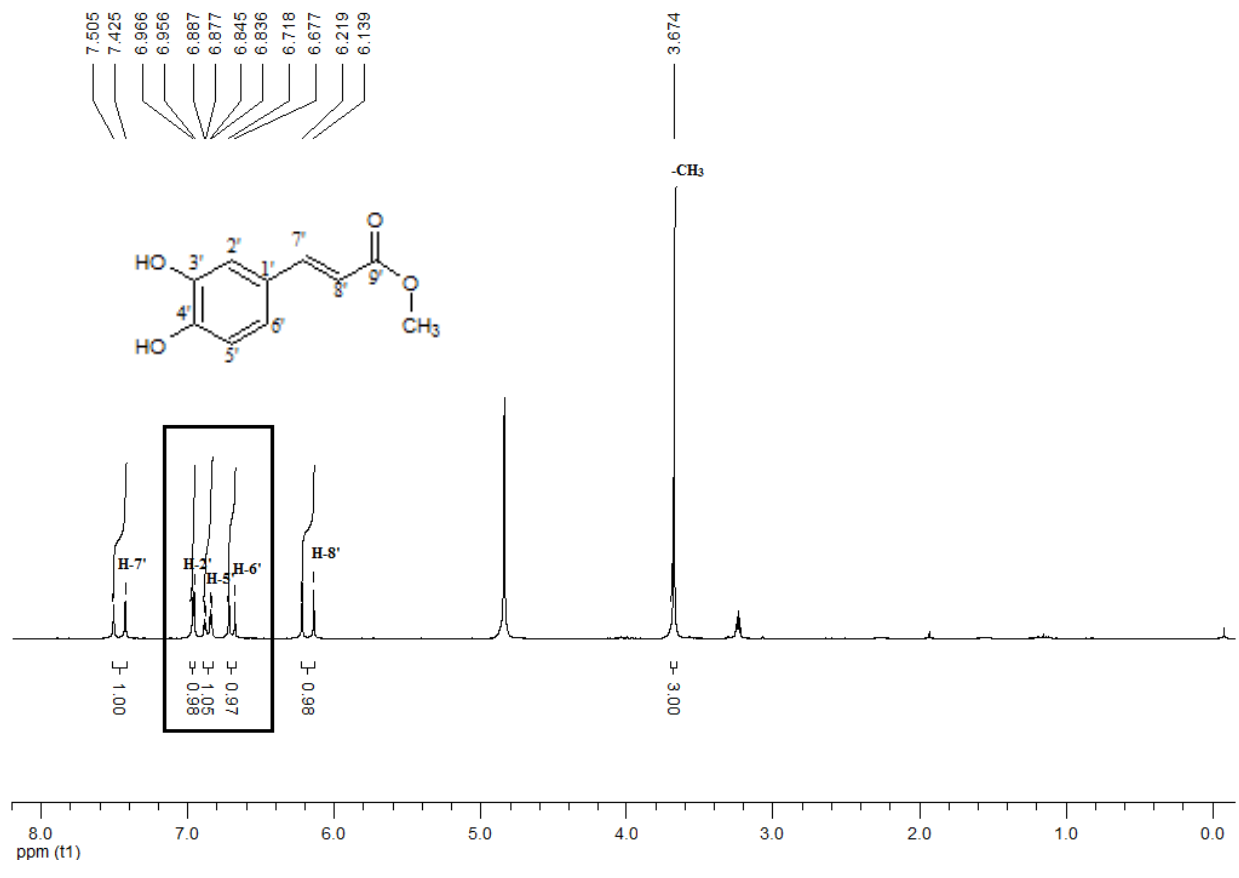
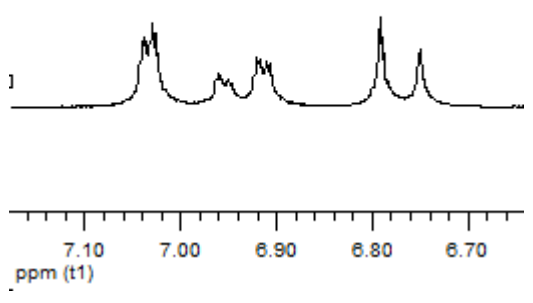


Figura 35 – Cromatograma analítico de CLAE do composto **8** em coluna C₁₈; gradiente linear de 0- 100% B (A- H₂O com 0,045% TFA; B- ACN com 0,036% TFA) em 8 min, ϕ : 1 mL/min e λ = 315 nm.

a)



b)



c)

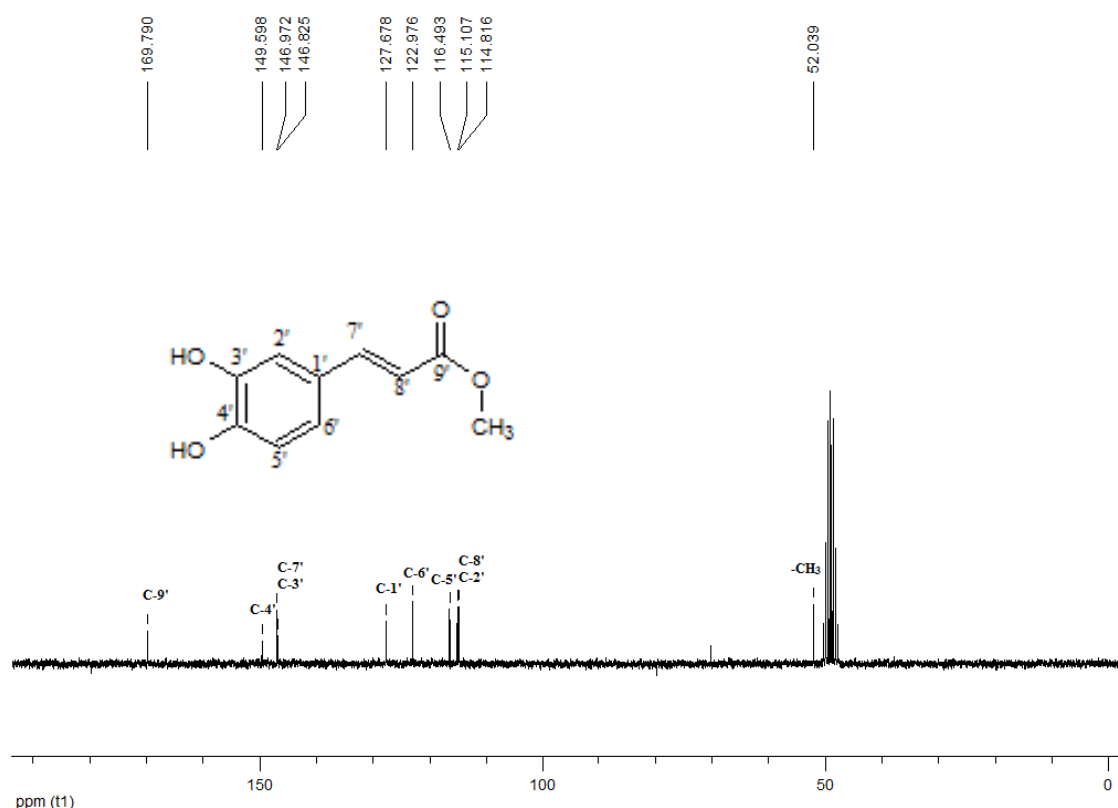


Figura 36 - (a) Espectro de RMN ^1H do composto **8** em CDCl_3 a 400,13 MHz; (b) Expansão da região de 6,70 a 7,10 ppm, (c) Espectro de RMN ^{13}C de **8** em CDCl_3 a 100,63 MHz.

Para a obtenção do ácido diacetilcafeico **9** (Esquema 7) procedeu-se a reação de **6** com anidrido acético em piridina e DMAP tal como descrito para a obtenção do composto **2**. (KANG et al., 1997; SELFKOW, 2001) O óleo obtido foi cristalizado em acetato de etila e éter de petróleo, obtendo-se **9** com 73,5 % de rendimento na forma de um sólido branco de ponto de fusão 181-183°C. O derivado **9** foi caracterizado por CLAE (Figura 32) e por espectrometria de massas CLAE-EM no modo positivo (Figura 33), onde se observa o íon dimérico $[2\text{M}+\text{H}]^+$ e outros fragmentos moleculares que confirmam a obtenção deste derivado. O composto **9** foi também caracterizado por espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C (Figura 34), sendo os sinais identificados a partir da comparação com dados de RMN existentes na literatura. (SELFKOW, 2001) No espectro de ^1H RMN (Figura 34 a) observa-se os sinais característicos referentes aos hidrogênios aromáticos e da dupla ligação da porção cafeoil, onde os hidrogênios da dupla, H-7' e H-8' apresentam-se na forma de dubletos com deslocamento de 7,63 e 6,53 ppm, respectivamente, com constante de acoplamento de 16 Hz, característico de dupla trans.

Também verifica-se a presença de dois singletos sobrepostos em 2,28 ppm com integração para seis hidrogênios correspondentes aos hidrogênios dos grupos acetila. No espectro de ^{13}C RMN (Figura, 34 b), observa-se a presença dos dois carbonos da porção acetila com deslocamentos de 18,84 e 18,89 ppm, além dos demais sinais característicos do cafeoil.

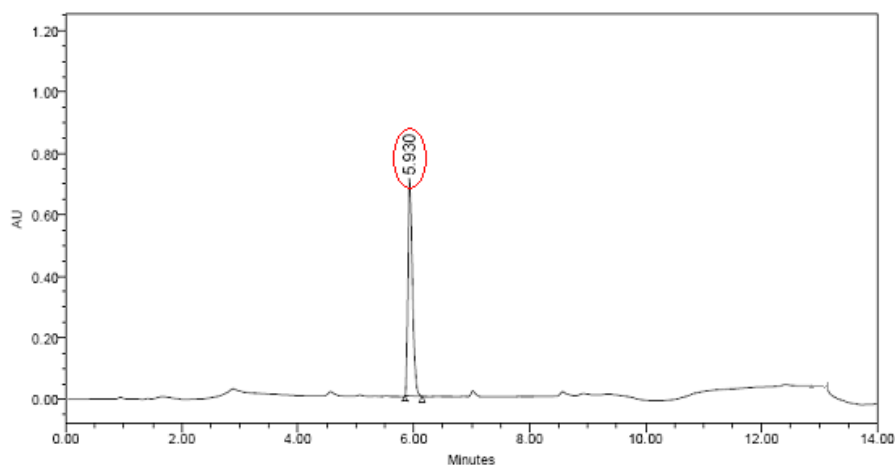


Figura 37 – Cromatograma analítico de CLAE do composto **9** em coluna C_{18} ; gradiente linear de 0- 100% B (A- H_2O com 0,045% TFA; B- ACN com 0,036% TFA) em 8 min, ϕ : 1 mL/min e $\lambda = 315$ nm.

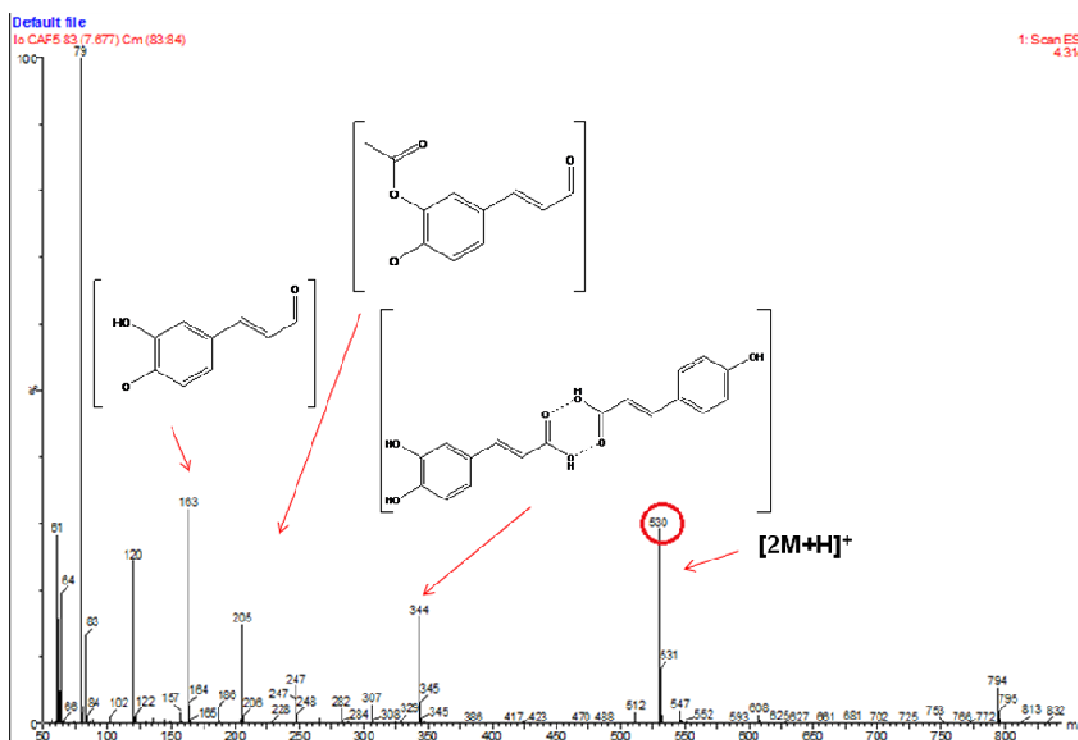
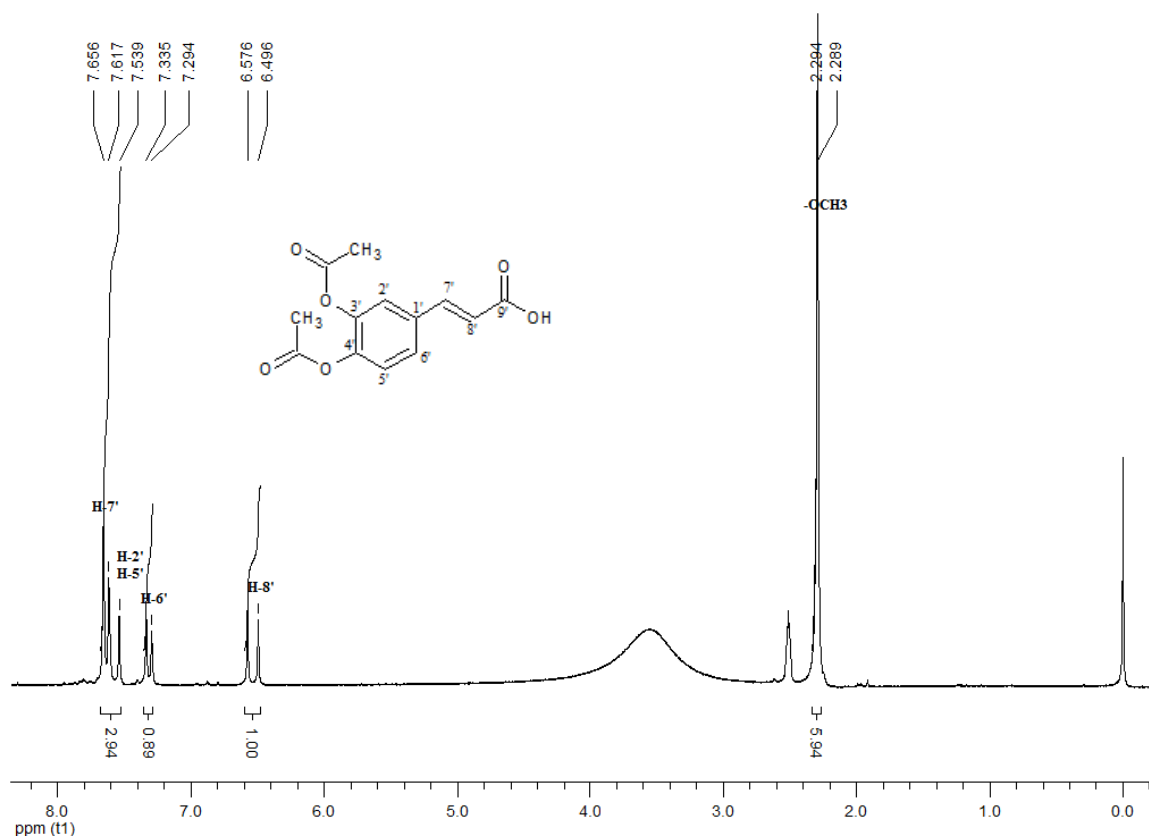


Figura 38 – Espectro de massas obtido por técnica de CLAE-EM gerado no modo positivo do composto **9**.

a)



b)

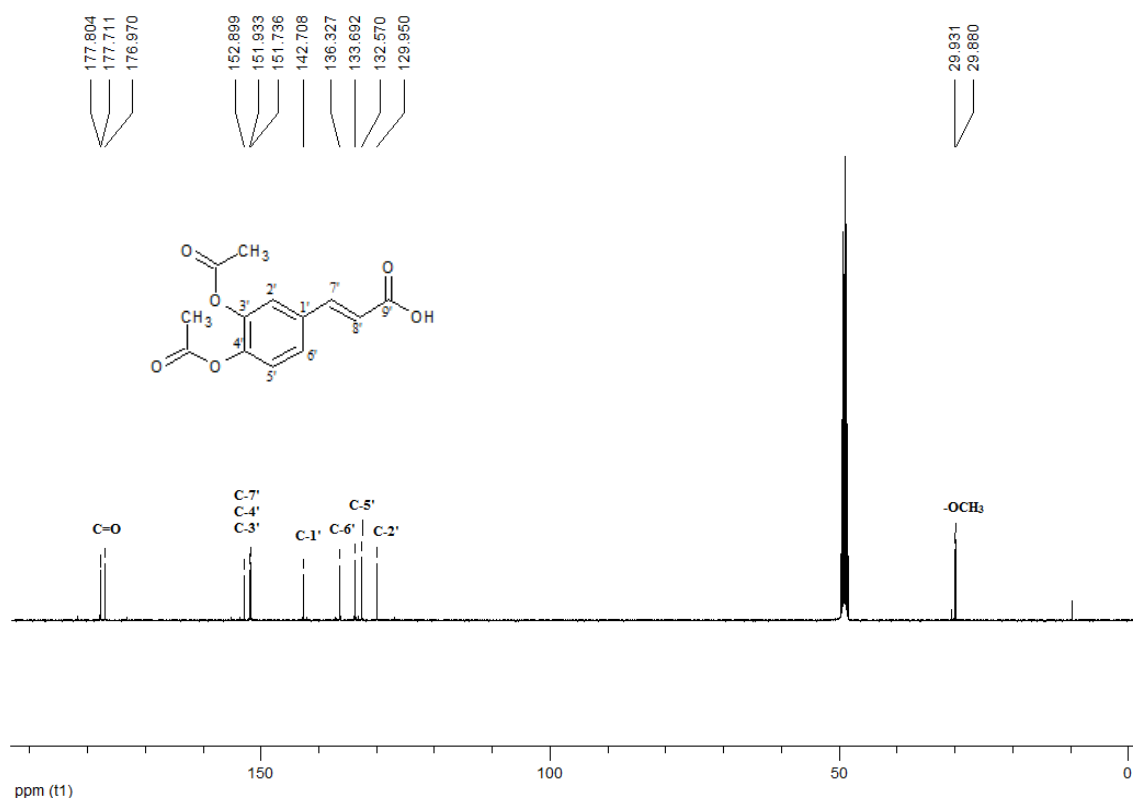
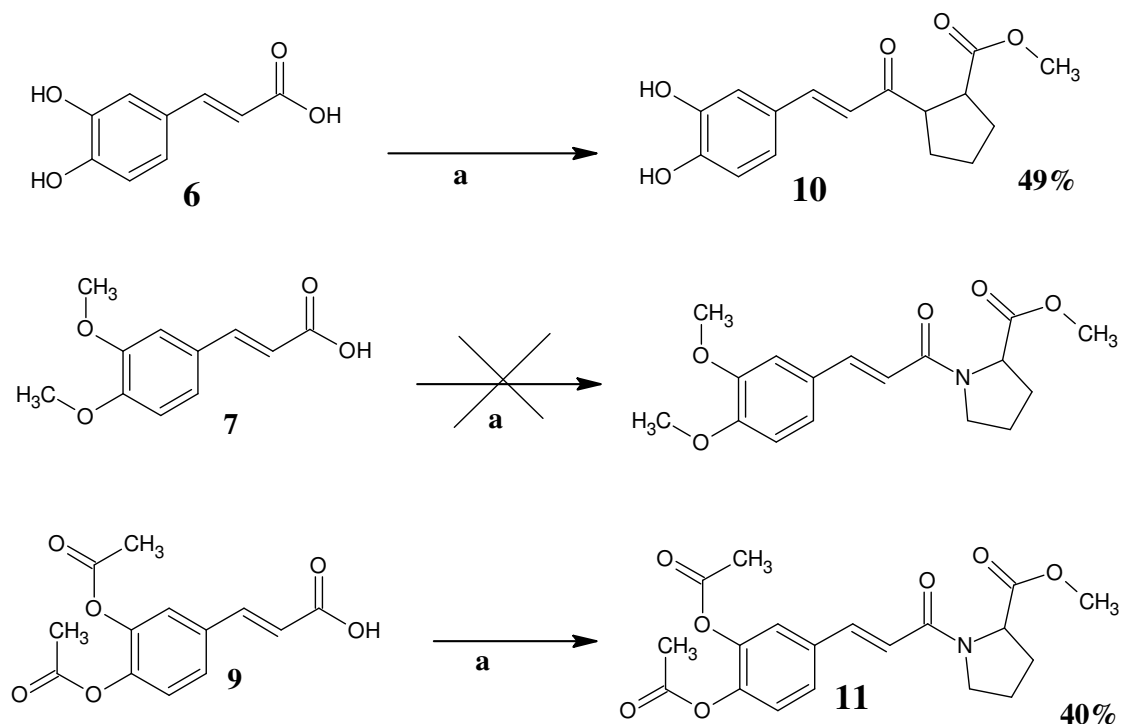


Figura 39 - (a) Espectro de RMN ^1H do composto **9** em CDCl_3 a 400.13 MHz; (b) Espectro de RMN ^{13}C de **9** em CDCl_3 a 100,63 MHz.



Esquema 8 – Obtenção dos compostos **10-11**. Reagentes e condições: (a) H-Pro-OMe.HCl, HATU/ DIEA em DMF.

Os acoplamentos do ácido cafeico **6**, do ácido cafeico dimetilado **7** e do ácido cafeico acetilado **9** com a H-Pro-OMe (Esquema 8), foram realizados seguindo-se a metodologia descrita por Salmi *et al*, 2005, que utiliza HATU como reagente de acoplamento, da mesma forma como anteriormente descrito para a obtenção do derivado **5**. Os acoplamentos foram realizados em DMF com adição de DMAP e DIEA, sendo acompanhados por CCD.

O produto **10** foi obtido com 49% de rendimento, sendo analisado por CLAE e CLAE-EM (Figuras 40 e 41). No espectro de massas observam-se os picos em m/z 293 do íon molecular $[M+2H]^{2+}$ e do íon dimérico $[2M+2H]^{2+}$ em m/z 584, além dos picos correspondentes aos fragmentos da porção aminoácido ($m/z=130$) e da porção cafeoil ($m/z=163$). Os espectros de RMN de 1H e ^{13}C permitiram confirmar a obtenção de **10**. O espectro de RMN de 1H mostrou a presença de um grupo de sinais referentes aos hidrogênios aromáticos e hidrogênios vinílicos da porção cafeoil, enquanto que a presença do resíduo de prolina é verificada pela observação de um multipletto a 4,38 ppm com integração para 1 hidrogênio (H do carbono α da prolina) e de sinais multipletos entre 1,83 e 2,20 ppm relativos aos hidrogênios do anel pirrolidínico. O singletto em 3,66ppm é referente aos hidrogênios da metoxila do éster. No espectro de RMN de ^{13}C observam-se a presença de 15 sinais que se encontram atribuídos na Figura 42.

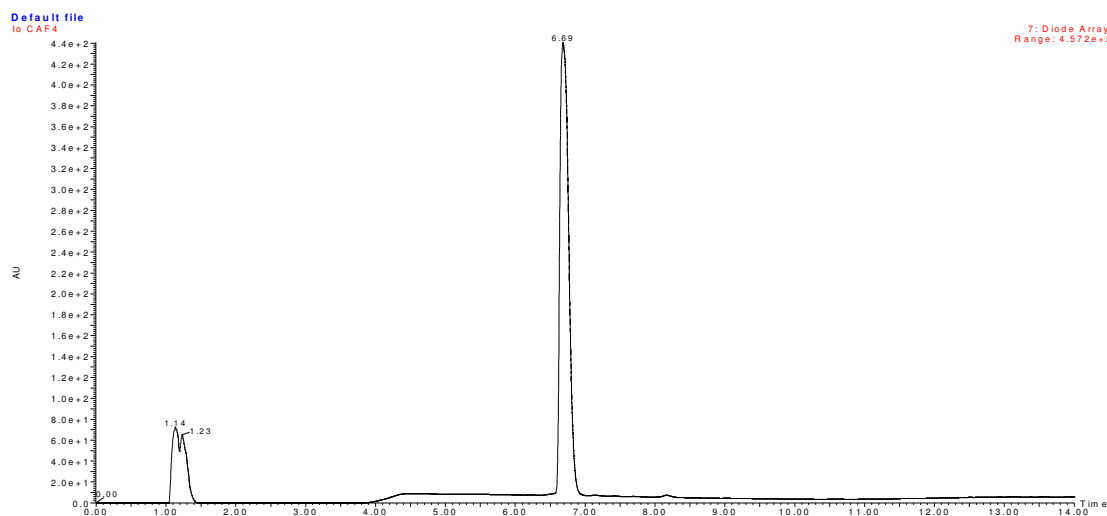


Figura 40 – Cromatograma analítico de CLAE do composto **10** em coluna C₁₈; gradiente linear de 0- 100% B (A- H₂O com 0,045% TFA; B- ACN com 0,036% TFA) em 8 min, ϕ : 1 mL/min e λ = 315 nm.

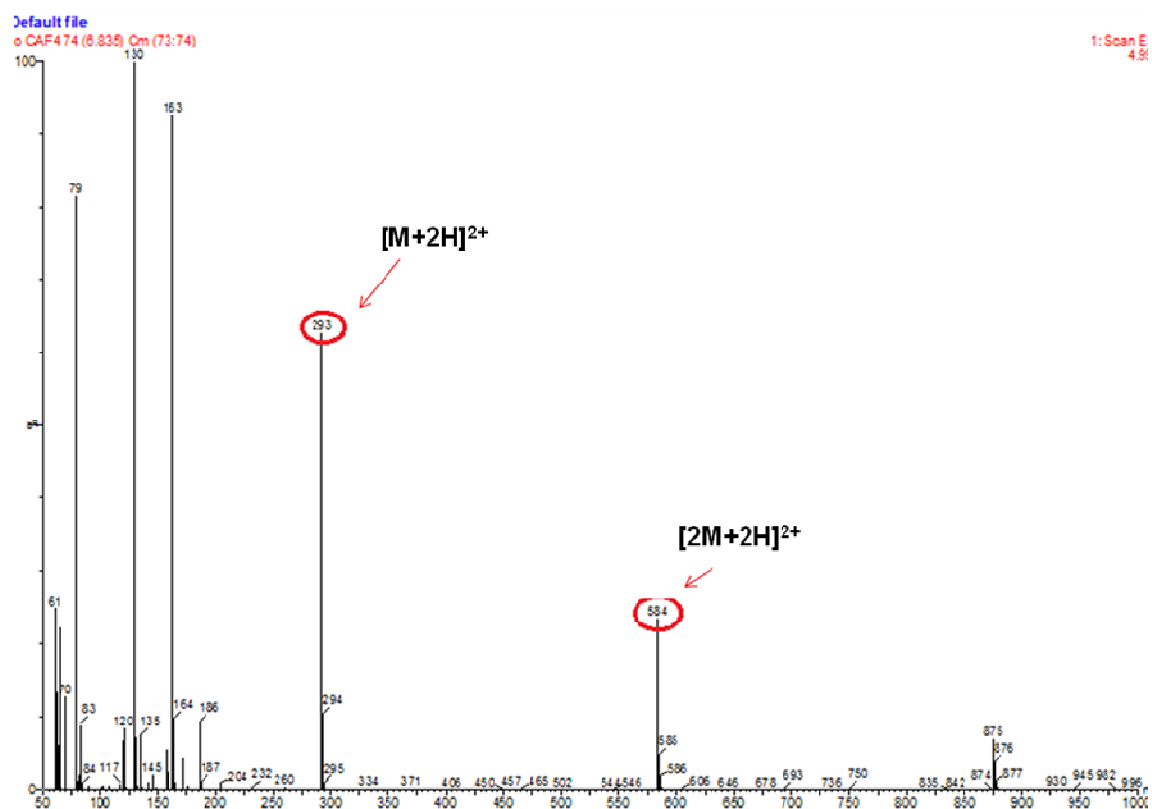
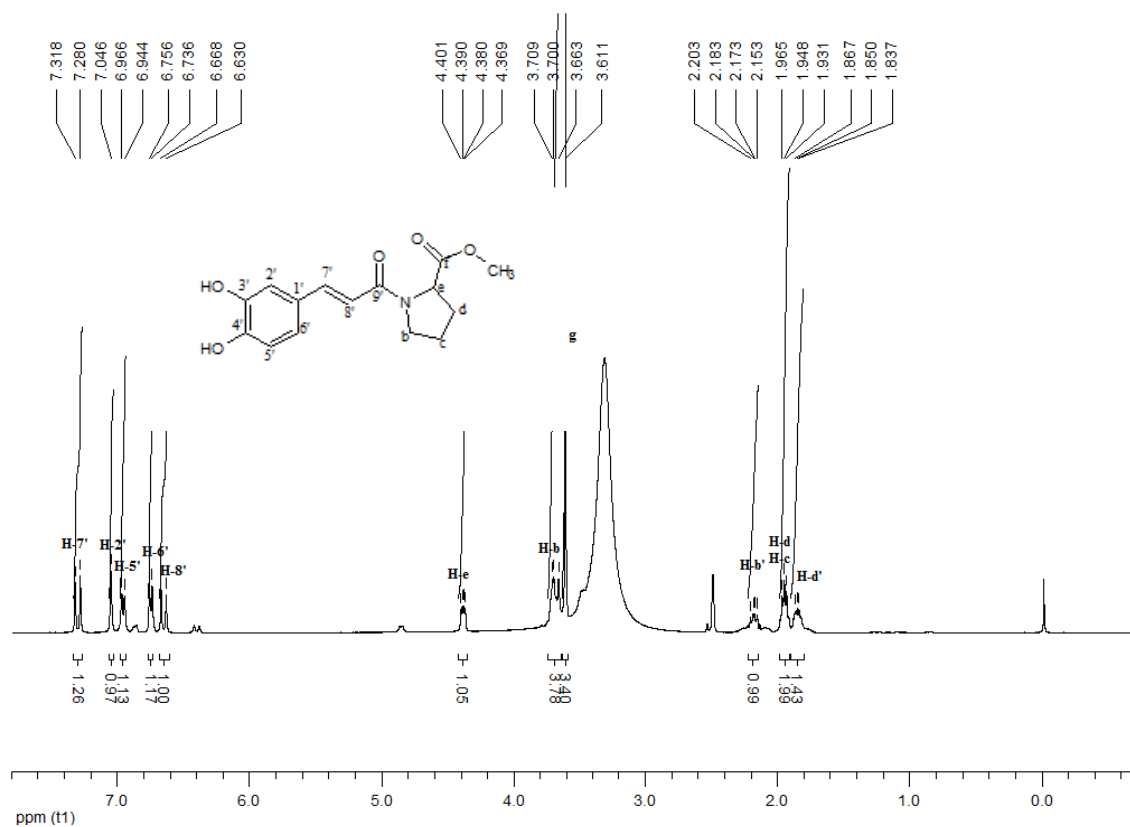


Figura 41 – Espectro de massas obtido por técnica de CLAE-EM gerado no modo positivo do composto **10**.

a)



b)

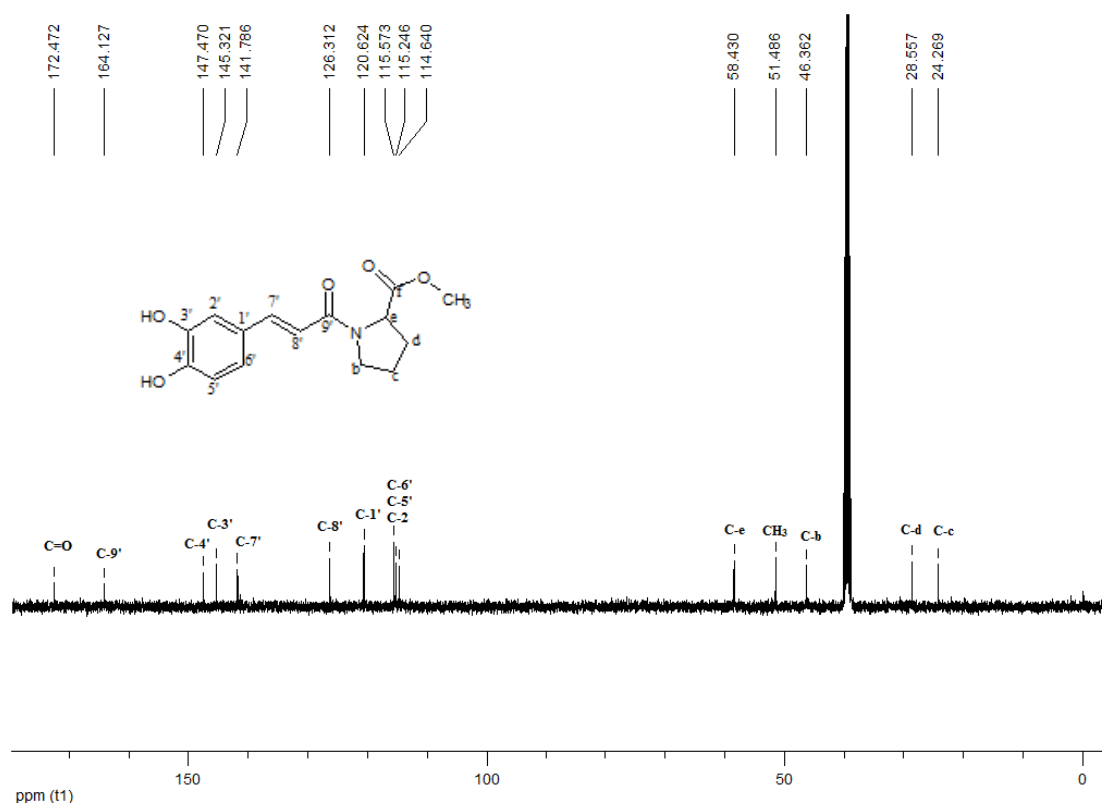


Figura 42 - (a) Espectro de RMN ^1H do composto **10** em CDCl_3 a 400.13 MHz; (b) Espectro de RMN ^{13}C de **10** em CDCl_3 a 100.63MHz.

O produto do acoplamento entre o ácido cafeico dimetilado **7** com H-Pro-OMe.HCl, utilizando a mesma metodologia empregada para obtenção de **10** e **11**, descrita por Salmi *et al*, 2005, utilizando HATU como reagente de acoplamento, não foi obtido de maneira satisfatória. Através da análise de seu perfil cromatográfico analítico de CLAE e por RMN ^1H e ^{13}C , não foi observada a formação do produto desejado.

O derivado **11** foi obtido com 40 % de rendimento, sendo analisado por CLAE e CLAE-EM (Figuras 43 e 44). No espectro de massas observam-se, além dos picos em m/z 377 do íon molecular $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ e do íon dimérico $[2\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ em m/z 752, dois picos correspondentes aos fragmentos da porção aminoácido ($m/z= 130$) e da porção cafeoil acetilada ($m/z= 205$). Pela análise dos espectros de RMN ^1H (Figura 45 a) observa-se a presença de um multipletto em 4,59 ppm com integração para um hidrogênio, referente ao H-C do carbono α da prolina. Com deslocamento de 3,74 ppm, verifica-se um singletto com integração para três hidrogênios correspondente aos hidrogênios da metoxila do éster e sinais entre 1,84 e 2,0 ppm relativos aos hidrogênios do anel pirrolidínico do fragmento prolina. Os hidrogênios do grupo acetil estão sobrepostos em 2,28 e 2,29 ppm com integração para seis hidrogênios. Além destes, observa-se a presença de sinais característicos no grupo cafeoil, como os sinais referentes aos hidrogênios fenólicos com deslocamento de 7,34-7,64 ppm e sinais dos hidrogênios vinílicos em 7,19 ppm e 6,67 ppm. No espectro de RMN de ^{13}C observam-se 19 sinais que se encontram atribuídos na Figura 45 b, destacando-se os sinais na região entre 24,26 a 58,43 que confirmam o produto da reação.

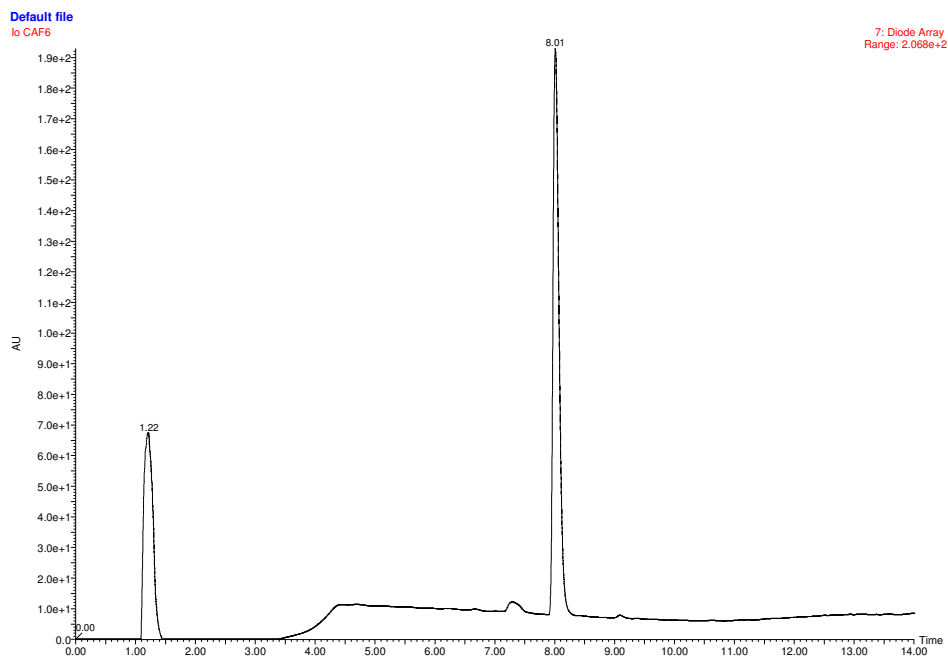


Figura 43 – Cromatograma analítico de CLAE do composto **11** em coluna C_{18} ; gradiente linear de 0- 100% B (A- H_2O com 0,045% TFA; B- ACN com 0,036% TFA) em 8 min, ϕ : 1 mL/min e $\lambda = 315$ nm.

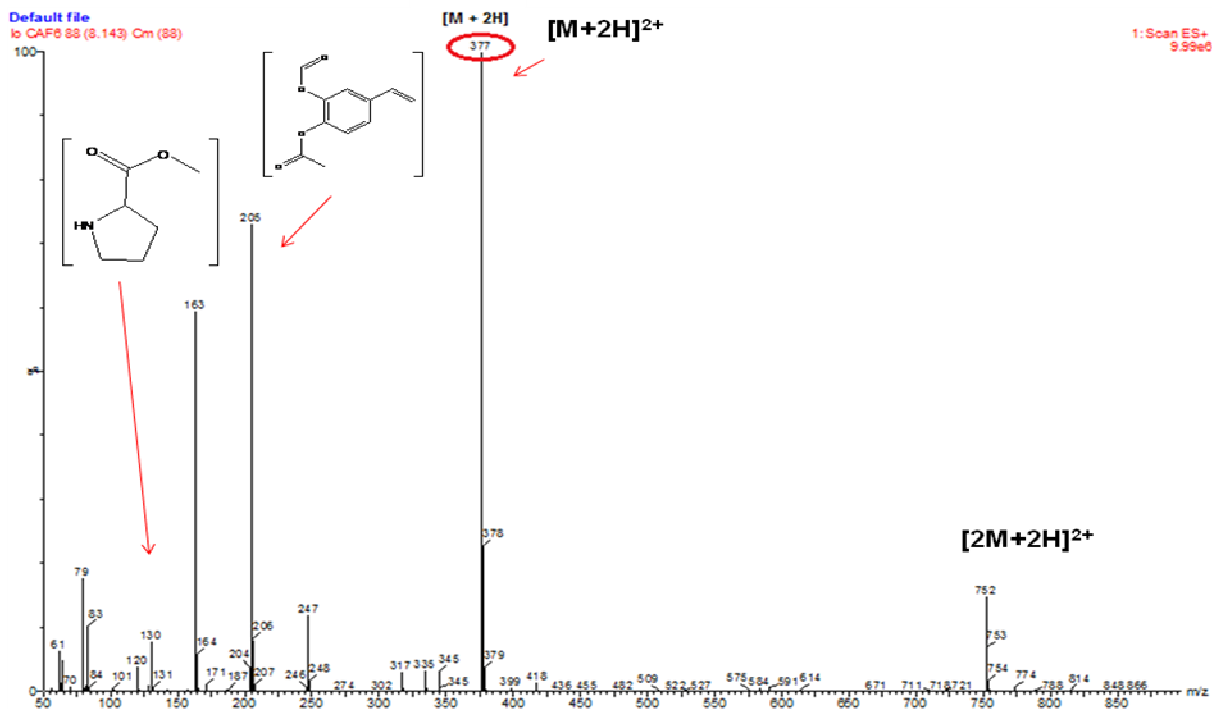
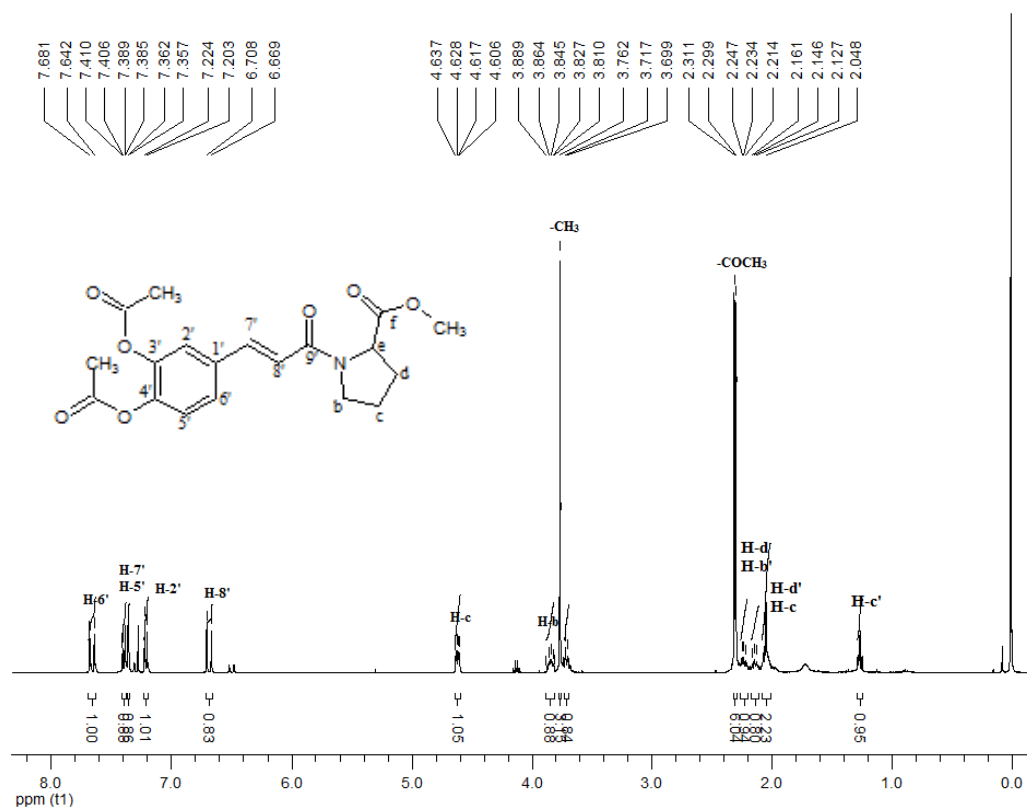


Figura 44 – Espectro de massas obtido por técnica de CLAE-EM gerado no modo positivo do composto **11**.

a)



b)

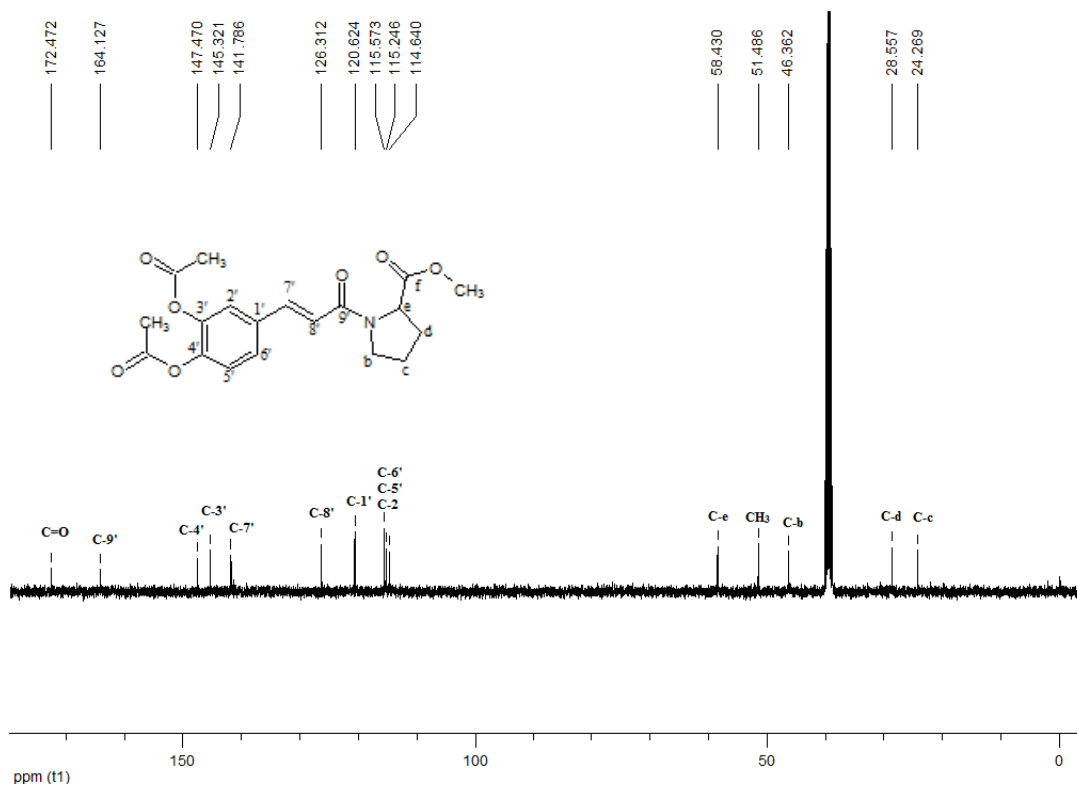
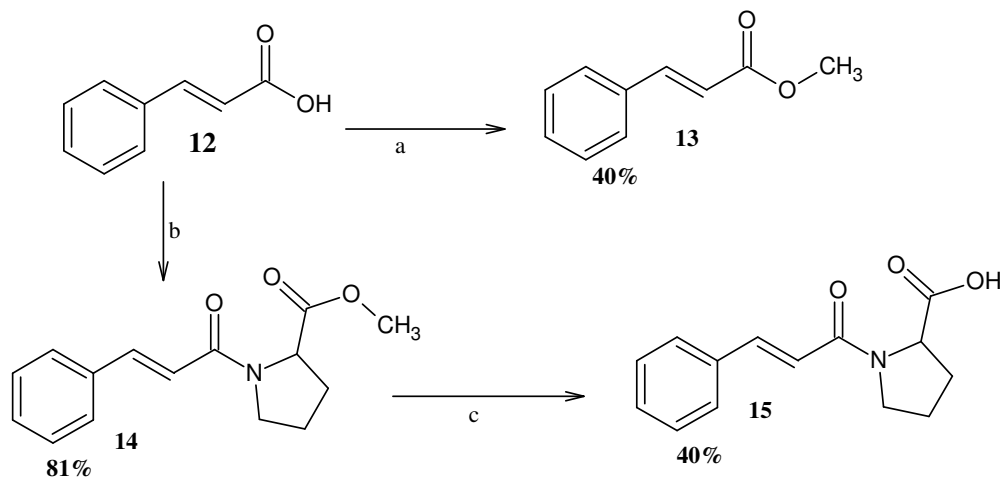


Figura 45 - (a) Espectro de RMN ¹H do composto **11** em CDCl₃ a 400,13 MHz; (b) Espectro de RMN ¹³C de **11** em CDCl₃ a 100,63 MHz.

5.1.3 Obtenção dos derivados do ácido cinâmico (compostos **13-15**)

Esquema 9 – Obtenção dos compostos **13-15**. Reagentes e condições: (a) MeOH/ H₂SO₄; (b) Pro-OMe.HCl, cloreto de isobutila, DMF/THF, n-metil-morfolina; (c) KOH.

O ácido cinâmico esterificado foi obtido seguindo-se o procedimento descrito para o composto **11**, sendo obtido **13** com 40% de rendimento na forma de um sólido branco (Esquema 9). O composto obtido foi analisado por CLAE analítica (Figura 46) e espectroscopia de RMN de ¹H e ¹³C (Figura 47). No espectro de ¹H é observada a presença de um singlete referente aos hidrogênios da metoxila do éster a 3,69 ppm, além dos picos característicos da porção cafeoil do ácido cafeico. A reação de esterificação foi confirmada por RMN de ¹³C pela verificação da presença no espectro de um sinal a 51,69 ppm relativo ao carbono da metoxila do éster.

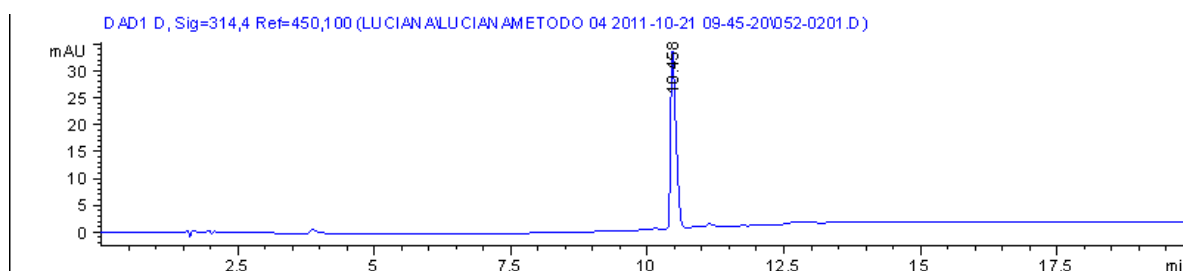
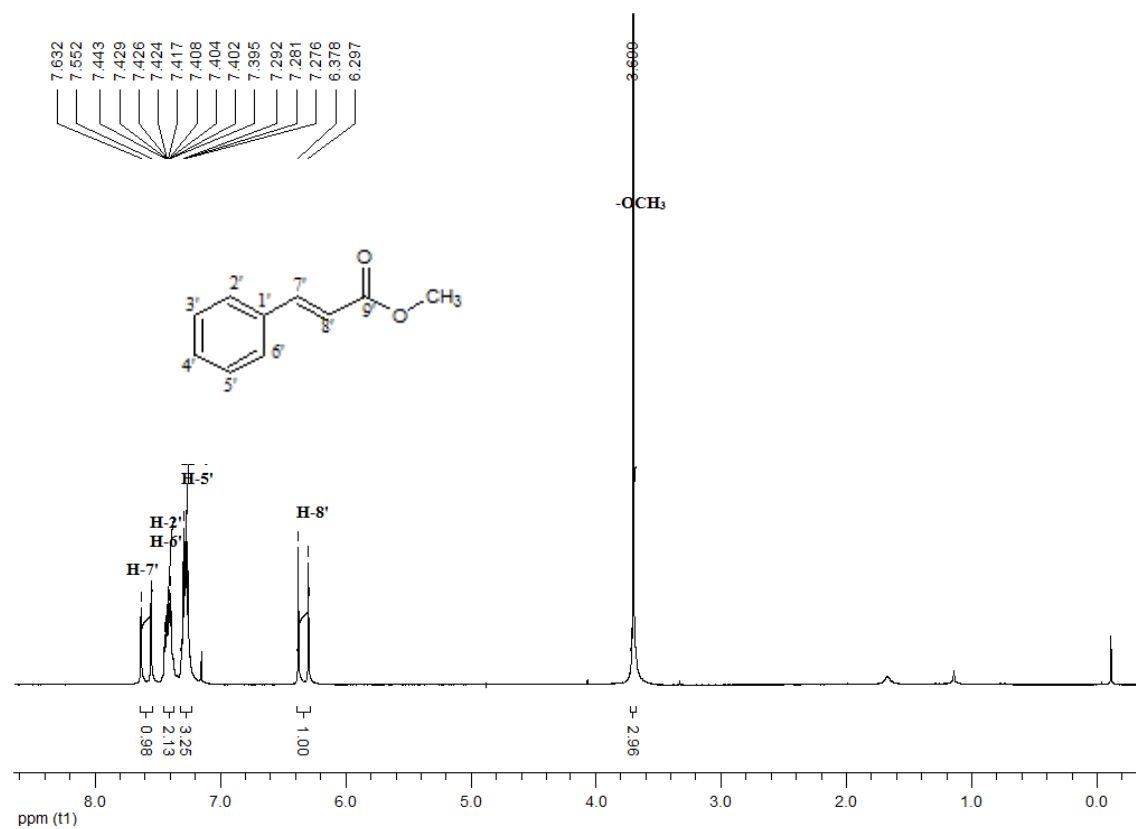


Figura 46 – Cromatograma analítico de CLAE em coluna C₁₈ do composto **13**. Condições: 0-100% B (A: H₂O; B: MeOH) em 20 minutos. Fluxo: 1 ml/min. λ= 314 nm

a)



b)

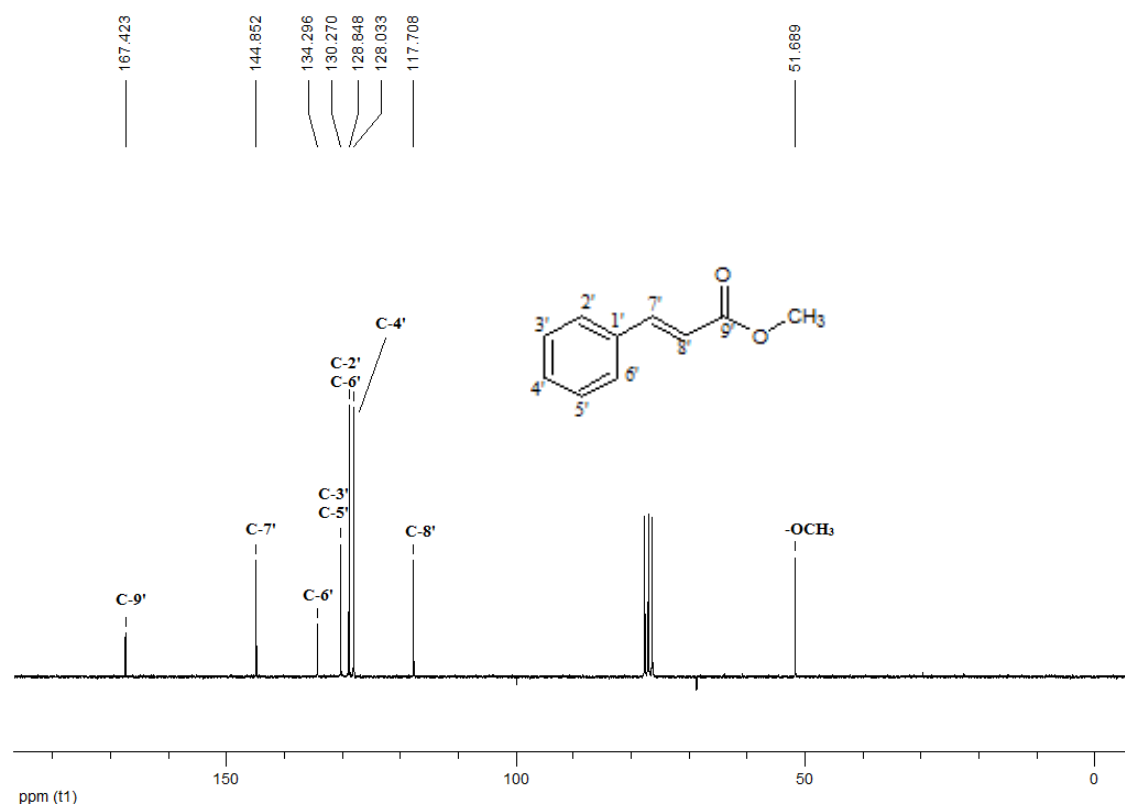


Figura 47 - (a) Espectro de RMN ^1H do composto **13** em CDCl_3 a 400,13 MHz; (b) Espectro de RMN ^{13}C de **13** em CDCl_3 a 100,63 MHz.

Para o acoplamento do ácido cinâmico **12** com H-Pro-OMe.HCl (Esquema 9) também seguiu-se a metodologia do anidrido misto descrita por Bodanszky (BODANSZKY, M., BODANSZKY, A., 1984). Utilizou-se o cloroformiato de isobutila como reagente de acoplamento, em presença de DMF/THF e *N*-metilmorfolina. O produto **14** foi obtido com 81% de rendimento. Este composto **14** foi analisado por CLAE (Figura 48) e espectroscopia de RMN. No espectro de RMN de ^1H , observam-se os sinais referentes aos seis hidrogênios do anel pirrolidínico da prolina em uma região entre 2,0 e 4,0 ppm, assim como a presença de um singleto com deslocamento químico de 3,7 ppm relativo aos hidrogênios ligados a metila do éster. Em campo mais baixo, observam-se os sinais referentes à porção cinamoil, como indicado na Figura 49 a. O espectro de RMN de ^{13}C confirma a obtenção de **14** (Figura 49 b), principalmente pelos sinais característicos na região entre 24,78 a 58,57 ppm.

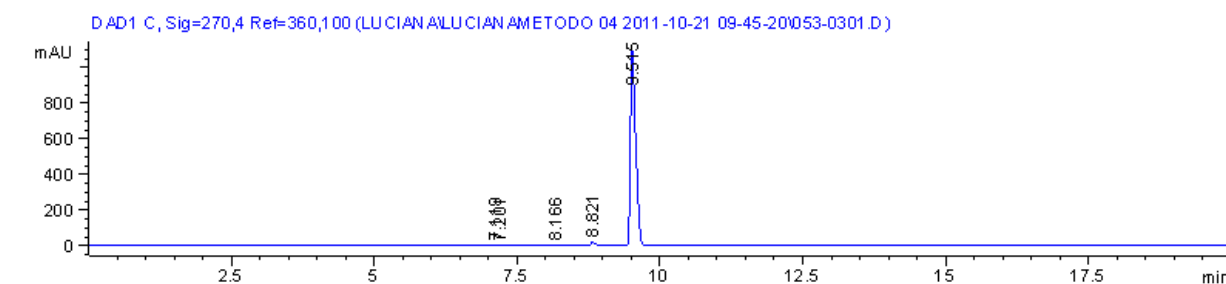
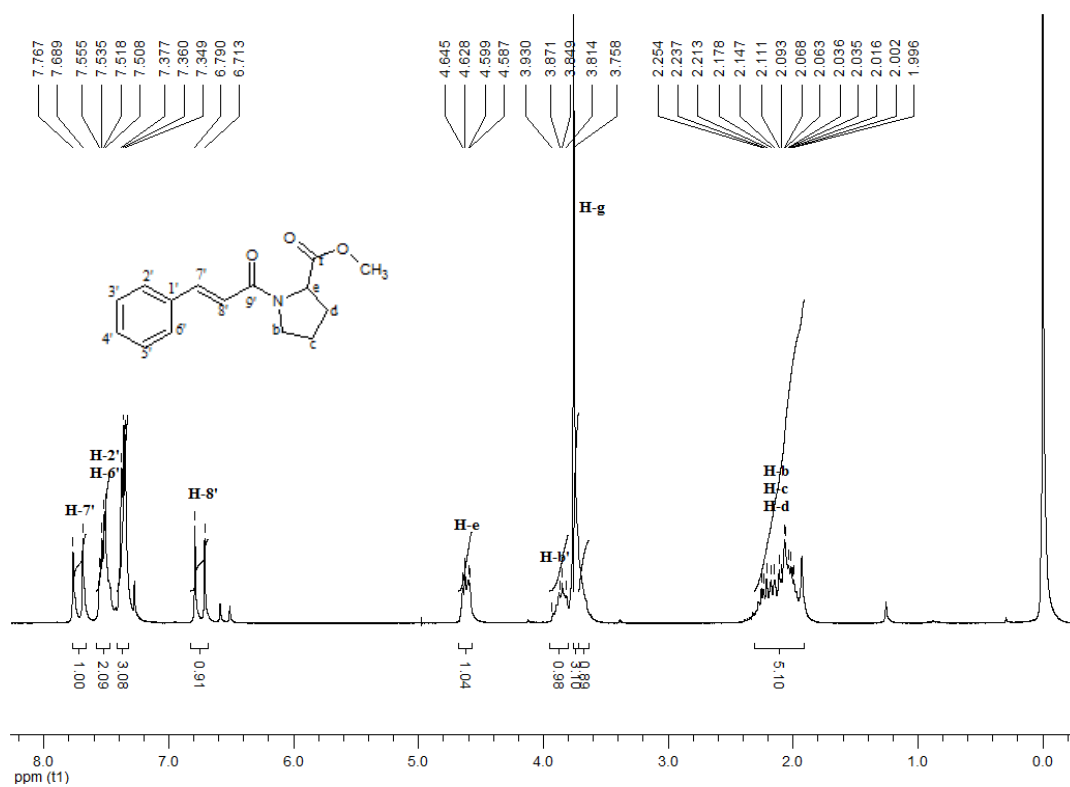


Figura 48 – Cromatograma analítico de CLAE em coluna C_{18} do composto **14**. Condições: 0-100% B (A: H_2O ; B: MeOH) em 20 min. Fluxo: 1 ml/min. $\lambda = 277,4$ nm

a)



b)

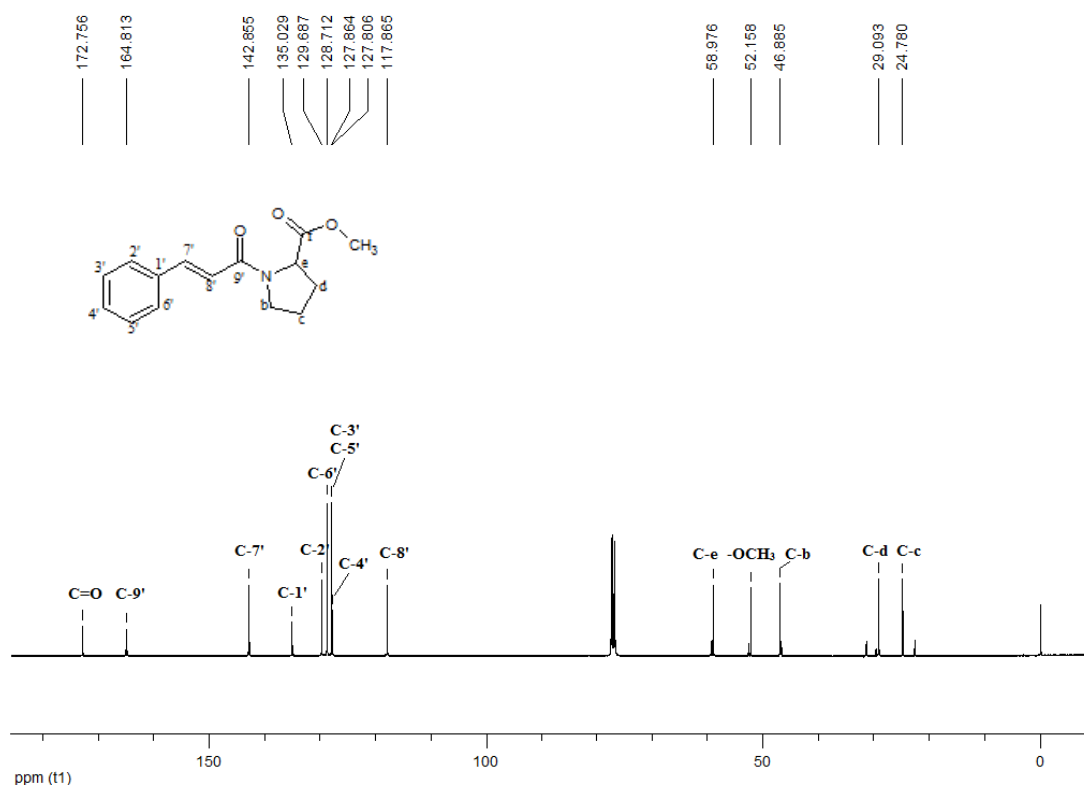


Figura 49 - (a) Espectro de RMN ^1H do composto **14** em CDCl_3 a 400,13 MHz; (b) Espectro de RMN ^{13}C de **14** em CDCl_3 a 100,63 MHz.

A hidrólise básica de **14** deu origem ao derivado **15** com a carboxila livre. Neste caso também foi realizada a análise do produto por CLAE (Figura 50) e por espectroscopia de RMN. No perfil cromatográfico analítico de CLAE, observa-se um sinal majoritário com tempo de retenção igual a 8,45 min e uma impureza em 6,98 min não caracterizada. No espectro de RMN de ^1H pode-se evidenciar a ausência do singlete na região entre 3,6 e 3,9 ppm referente aos hidrogênios da metoxila de **15**. No espectro de RMN de ^{13}C verifica-se a ausência do sinal a 52,17 ppm referente ao carbono ligado ao oxigênio (Figura 51).

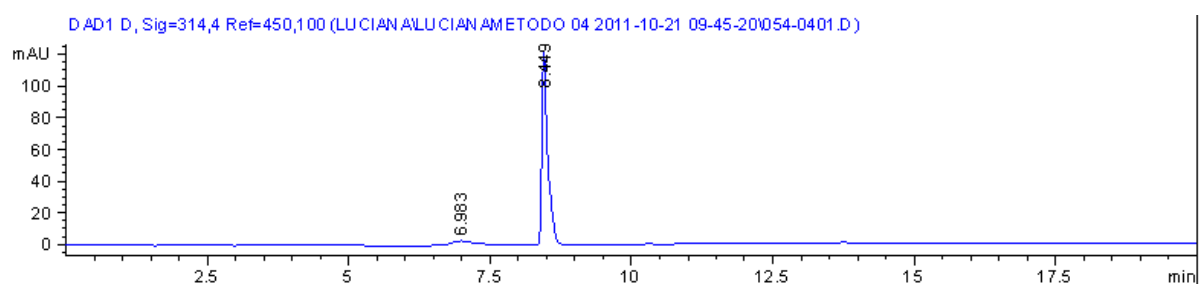
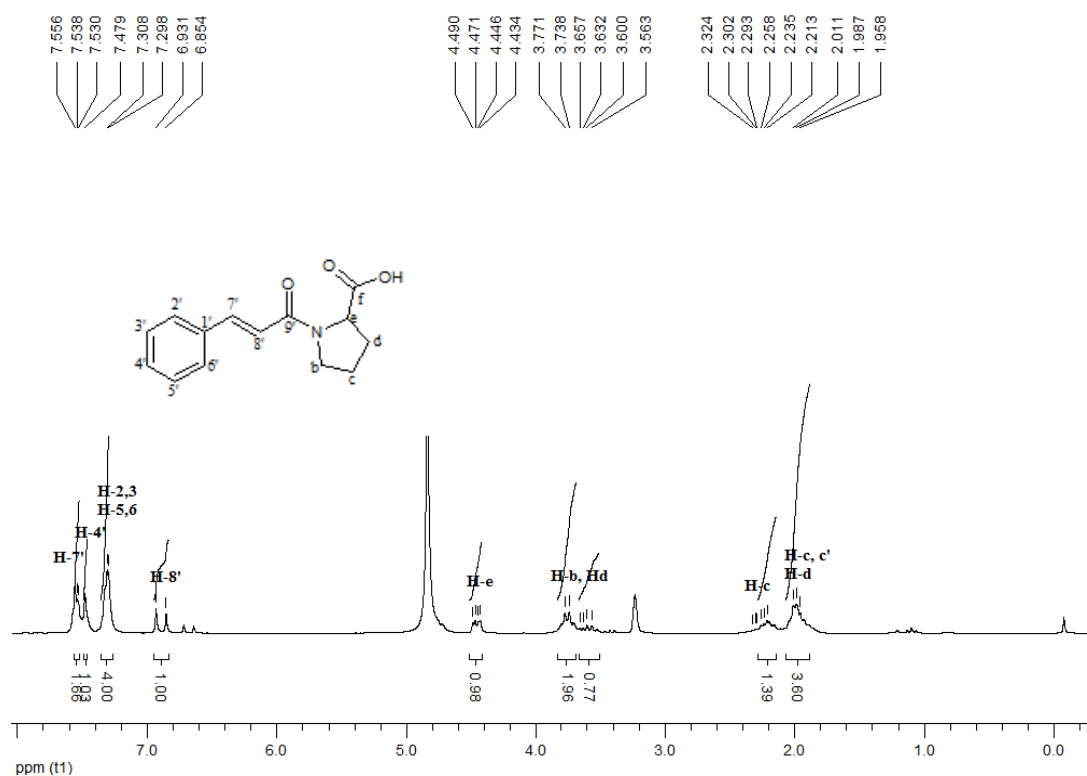


Figura 50 – Cromatograma analítico de CLAE em coluna C_{18} do composto **15**. Condições: 0-100% B (A: H_2O ; B: MeOH) em 20 min. Fluxo: 1 ml/min. $\lambda = 314 \text{ nm}$

a)



b)

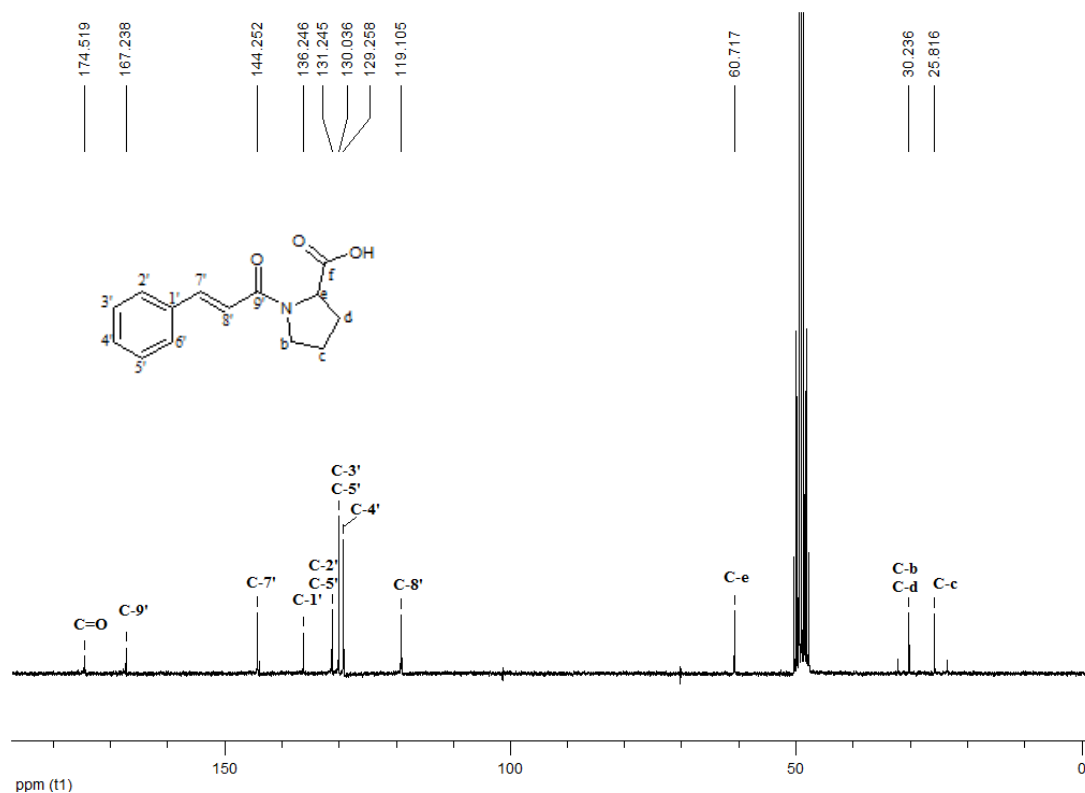
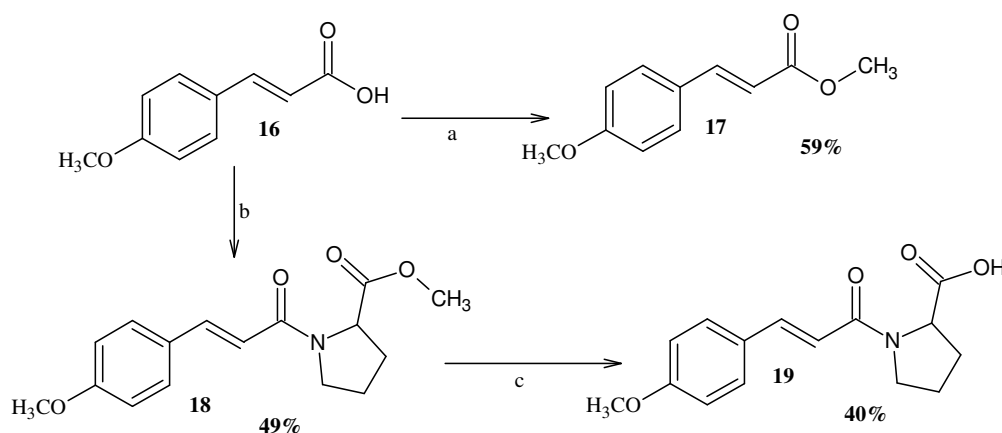


Figura 51 - (a) Espectro de RMN ^1H do composto **15** em CDCl_3 a 400,13 MHz; (b) Espectro de RMN ^{13}C de **15** em CDCl_3 a 100,63 MHz.

5.1.4 Obtenção dos derivados do ácido *p*-metoxicinâmico (compostos **17-19**)

Esquema 10 – Obtenção dos compostos **17-19**. Reagentes e condições: (a) MeOH/ H₂SO₄; (b) Pro-OMe.HCl, cloroformiato de isobutila, DMF/THF, *N*-metilmorfolina; (c) KOH

O éster metílico derivado do ácido *p*-metoxicinâmico **17** foi obtido conforme a mesma metodologia empregada para obtenção dos produtos **8** e **13**, resultando em um cristal com 59% de rendimento. Da mesma forma que para os demais, o composto **17** foi caracterizado por CLAE e através da análise dos espectros de RMN de ¹H e ¹³C. O perfil cromatográfico e CLAE apresentou um único sinal com tempo de retenção de 10,68 min, como pode ser visto na Figura 52. No espectro de RMN de ¹H (Figura 53 a) é evidenciada a presença de dois singletos com deslocamentos químicos de 3,83 e 3,79 ppm correspondentes aos hidrogênios das metoxilas presentes na estrutura de **17**, assim como os sinais característicos da porção cinamoil. No espectro de RMN de ¹³C (Figura 53 b), observam-se os sinais dos carbonos do esqueleto cinamoil, bem como dois sinais a 55,27 e 51,45 ppm referentes aos carbonos ligados aos oxigênios do grupo metoxila e do grupo éster.

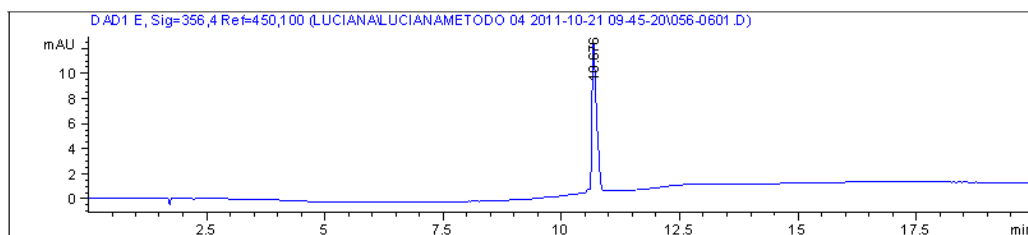
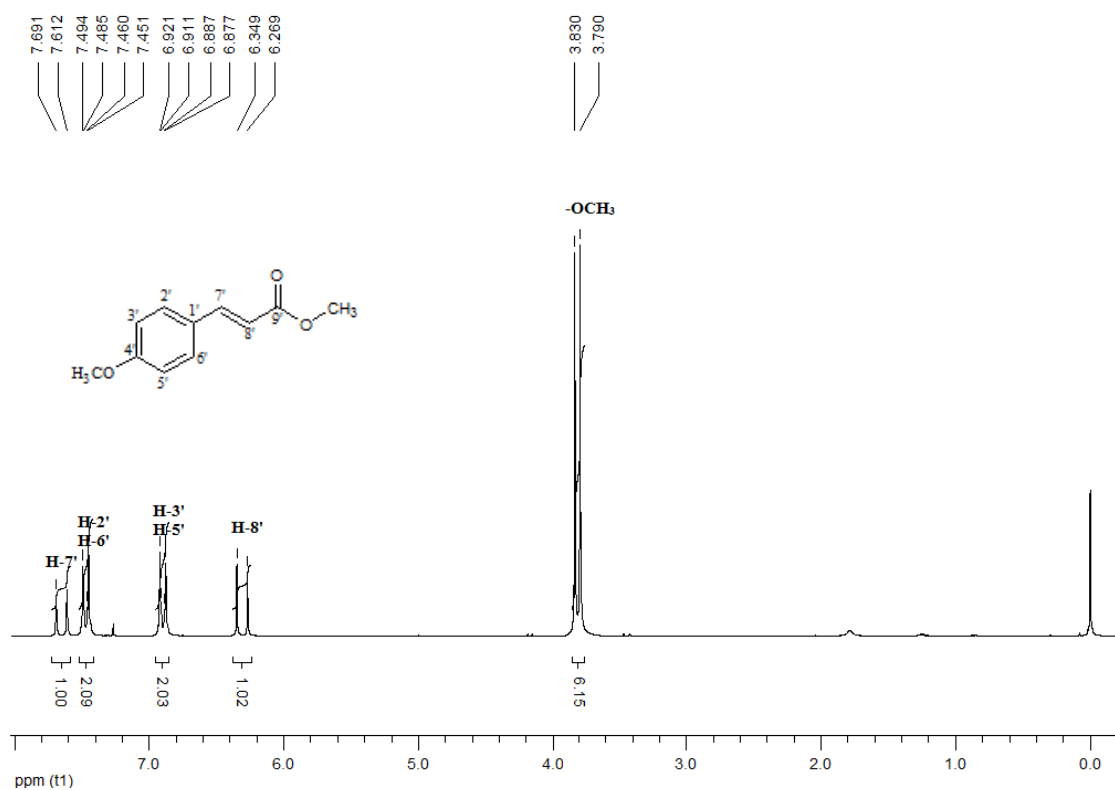


Figura 52 – Cromatograma analítico de CLAE em coluna C₁₈ do composto **17**. Condições: 0-100% B (A: H₂O; B: MeOH) em 20 min. Fluxo: 1 ml/mim. λ= 356 nm

a)



b)

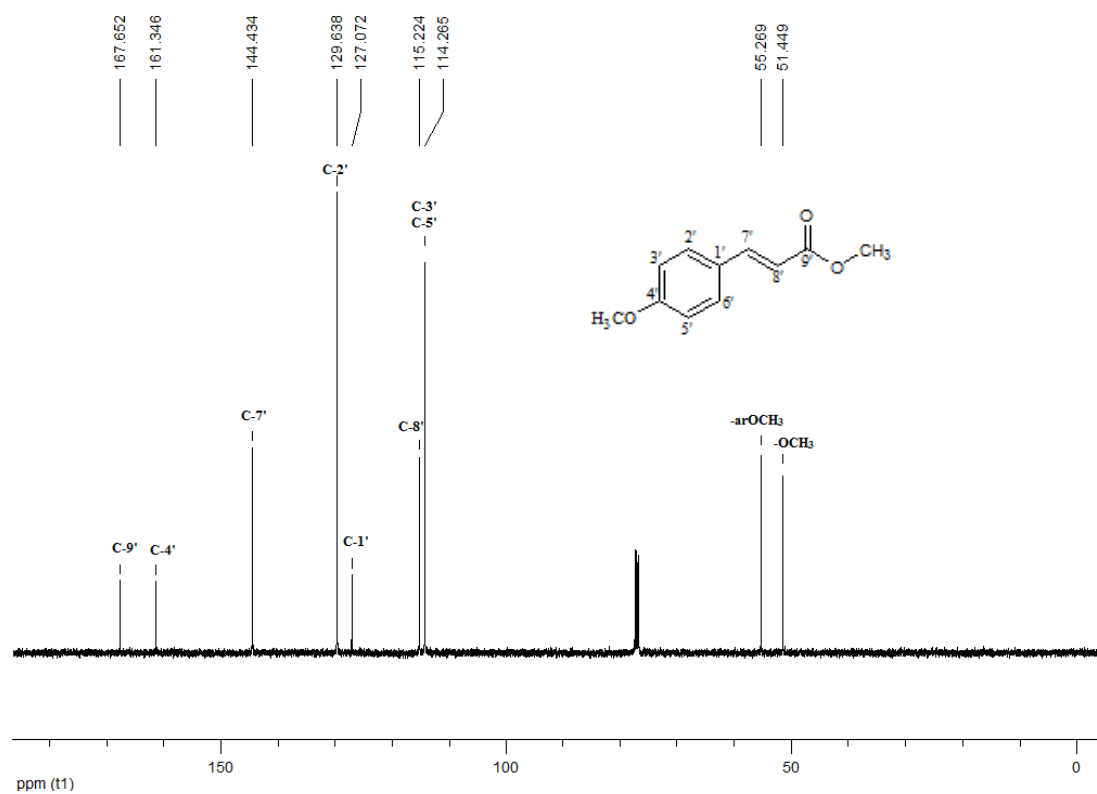


Figura 53 - (a) Espectro de RMN ¹H do composto **17** em CDCl₃ a 400,13 MHz; (b) Espectro de RMN ¹³C de **17** em CDCl₃ a 100,63 MHz.

Assim como para a obtenção do produto de acoplamento **14** descrito anteriormente, o composto **18** foi obtido a partir do ácido *p*-metoxicinâmico **16** e H-Pro-OMe (Esquema 10) seguindo-se a metodologia de acoplamento via anidrido misto descrita por Bodanszky, 1984. O produto **18** foi obtido com 49% de rendimento, sendo analisado por CLAE (Figura 54) e espectroscopia de RMN. No espectro de RMN de ^1H observam-se sinais multipletos na região entre 1,99 e 2,22 ppm referentes aos cinco hidrogênios do anel pirrolidínico da prolina, bem como um multiplete em 4,61 referente ao H-C do carbono alfa da prolina. Também a presença de dois singletos com deslocamentos químicos de 3,74 e 3,82 ppm relativos aos hidrogênios da porção metoxila do éster e da metoxila do ácido *p*-metoxicinâmico. Em campo mais baixo, observam-se os sinais referentes à porção cinamoil do derivado, como indicado na Figura 55 a. O espectro de RMN de ^{13}C mostra dezesseis sinais de carbono, sendo dois sinais referentes aos carbonos metálicos em 24,82 e 29,14 ppm (Figura 55 b), confirmando assim a obtenção de **18**.

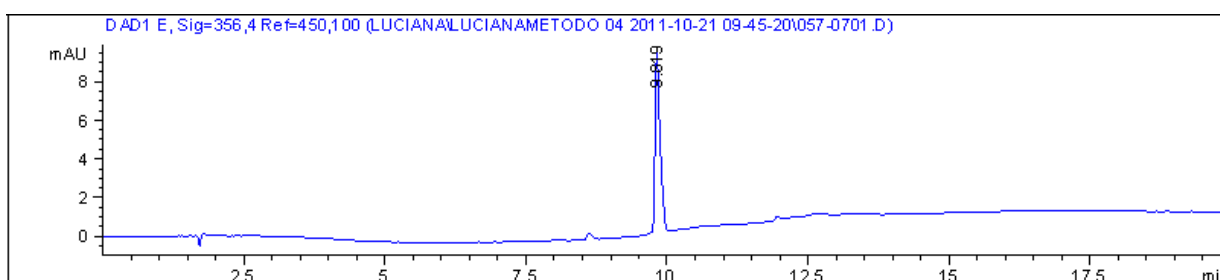
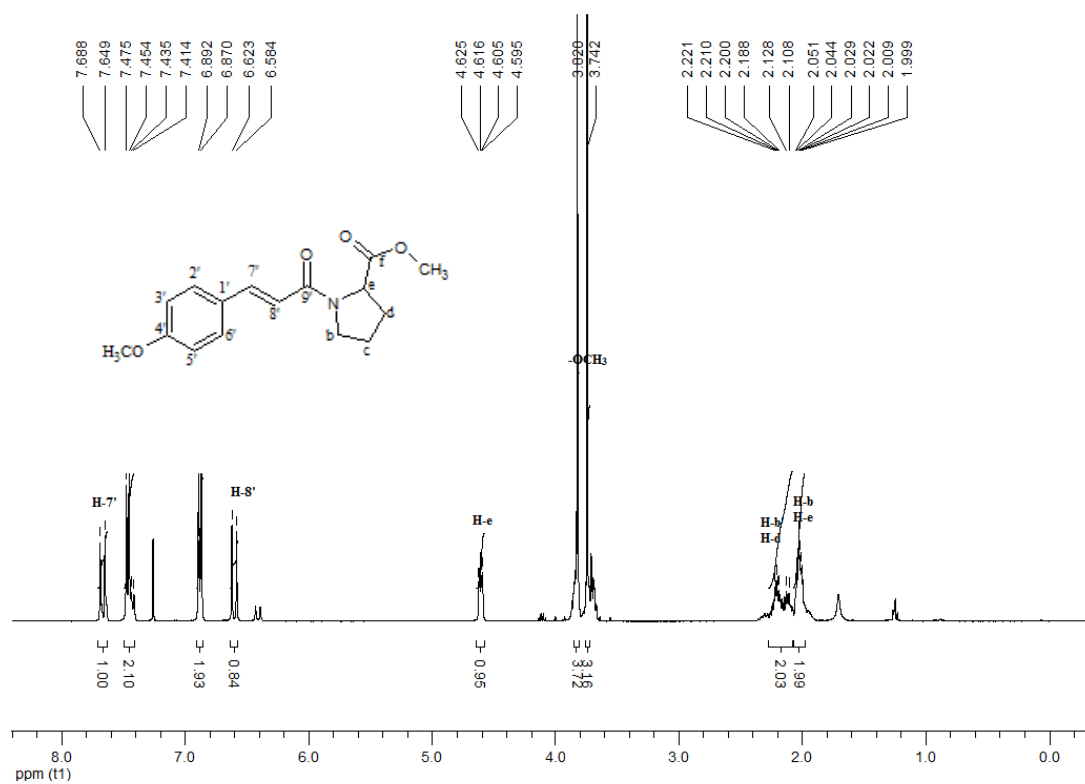


Figura 54 – Cromatograma analítico de CLAE em coluna C_{18} do composto **18**. Condições: 0-100% B (A: H_2O ; B: MeOH) em 20 min. Fluxo: 1 ml/min. $\lambda = 356 \text{ nm}$

a)



b)

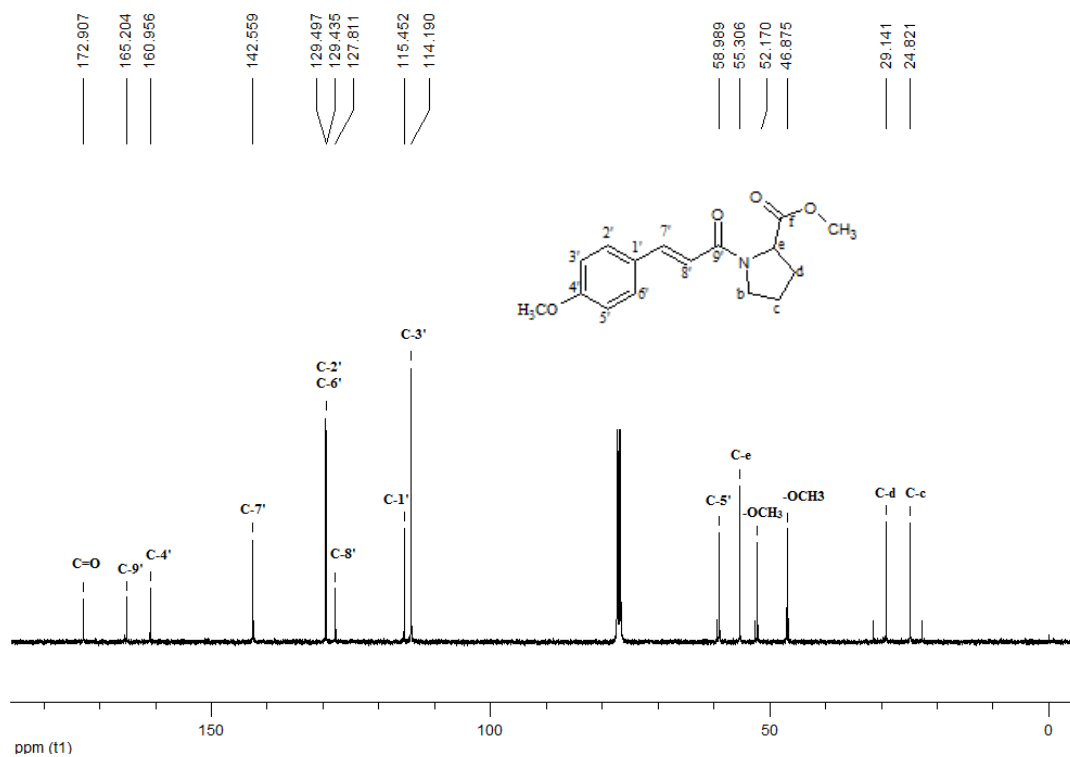


Figura 55 - (a) Espectro de RMN ^1H do composto **18** em CDCl_3 a 400,13 MHz; (b) Espectro de RMN ^{13}C de **18** em CDCl_3 a 100,63 MHz

A hidrólise básica de **18** deu origem ao composto **19** com a carboxila livre. Da mesma forma que para os demais derivados obtidos, este foi analisado por CLAE (Figura 56) e por espectroscopia de RMN. No perfil cromatográfico analítico de CLAE, observa-se um sinal majoritário com tempo de retenção igual a 8,45 min e uma impureza em 6,98 min não caracterizada. No espectro de RMN de ^1H da Figura 57 a, pode-se evidenciar um singlete em 4,0 ppm referente aos hidrogênios de uma metoxila de **19**, além dos demais sinais característicos do cafeoil, os quais encontram-se identificados no espectro. No espectro de RMN de ^{13}C verifica-se a apenas um sinal referente ao carbono ligado ao oxigênio e não dois, evidenciando a ocorrência da hidrólise (Figura 57 b).

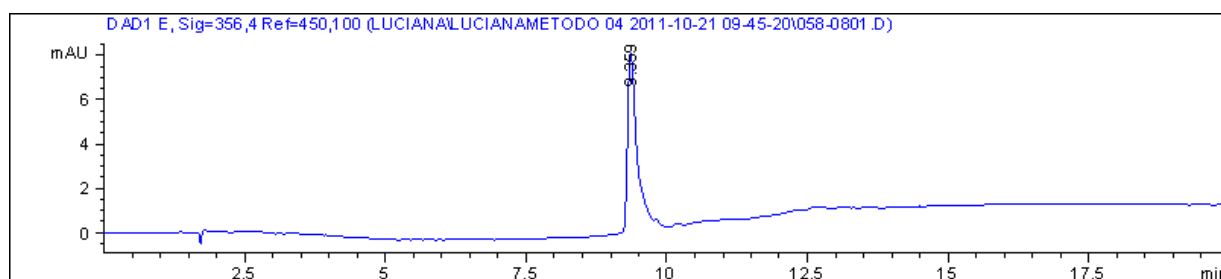
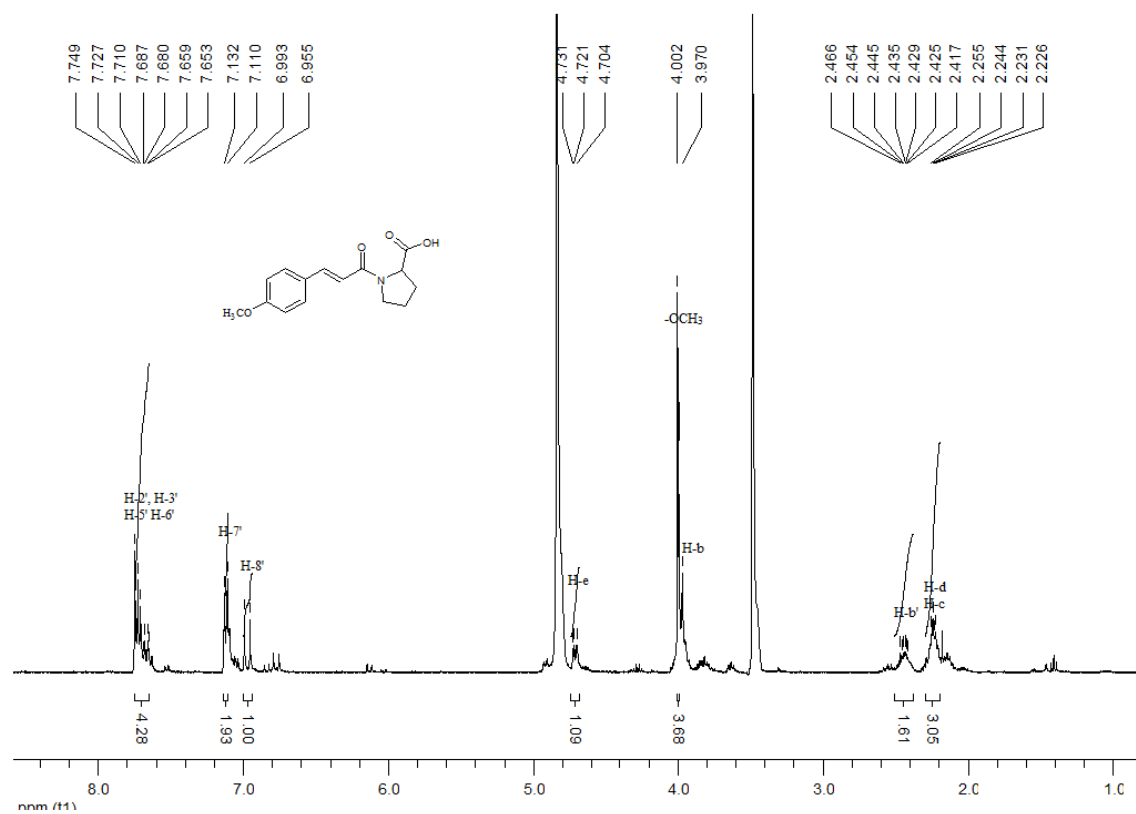


Figura 56 – Cromatograma analítico de CLAE em coluna C_{18} do composto **19**. Condições: 0-100% B (A: H_2O ; B: MeOH) em 20 min. Fluxo: 1 ml/min. $\lambda = 356 \text{ nm}$

a)



b)

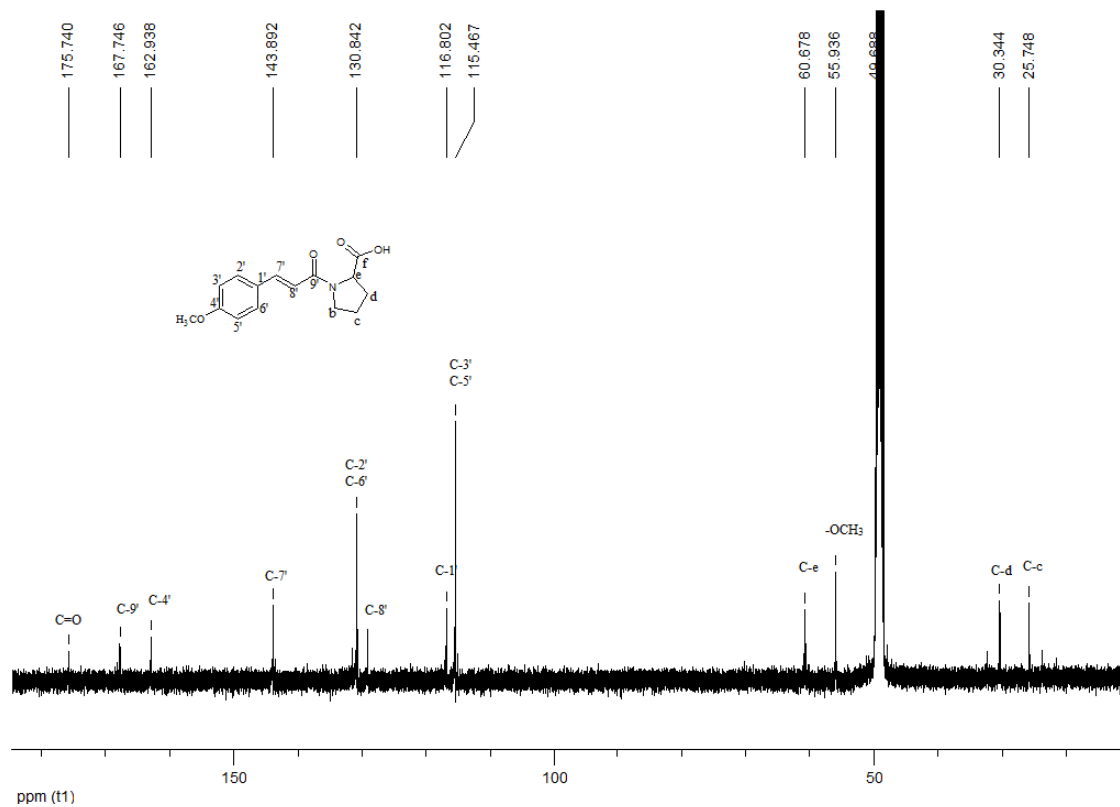


Figura 57 - (a) Espectro de RMN ^1H do composto **19** em CD_3OD a 400,13 MHz; (b) Espectro de RMN ^{13}C de **19** em CD_3OD a 100,63 MHz.

5.2 Ensaio de inibição enzimática

5.2.1 Ensaio de Inibição das enzimas POP e da DPP IV

Apesar da POP e da DPP IV estarem relacionadas com diferentes patologias e terem baixa homologia de seqüência de aminoácidos, o estudo em paralelo da capacidade inibitória de um determinado composto frente a estas enzimas é realizado com o fim de estudar a *seletividade* da atividade inibitória. Isto devido à similaridade nas estruturas tridimensionais destas serina proteases que faz com que muitos compostos funcionem indiscriminadamente como inibidores de ambas as enzimas. Assim, em um primeiro momento deste trabalho foram realizados ensaios preliminares de inibição da POP e da DPP IV a uma concentração de 500 μM com todos os derivados obtidos das quatro séries. A Tabela 1 apresenta os resultados deste estudo preliminar de todos os derivados obtidos no decorrer do trabalho frente às enzimas POP e DPP IV.

Tabela 1 – Resultados dos ensaios de inibição da POP e DPP IV de 1 – 21

Amostra [500 µM]	Inibição POP (%)	Inibição DPP IV (%)
1	86,61	73,37
2	92,87	72,70
3	88,10	63,62
4	81,52	57,60
5	80,43	63,80
6	94,35	63,25
7	29,57	45,03
8	90,16	69,40
9	94,69	48,83
10	72,89	28,18
11	90,28	43,50
12	15,85	4,66
13	5,49	12,26
14	17,34	4,56
15	16,75	28,07
16	20,39	9,18
17	24,25	17,74
18	44,86	20,94
19	7,00	14,97

* Ensaio fluorimétrico realizado em triplicata.

** Composto não obtido

A partir dos primeiros resultados obtidos e apresentados na Tabela 1, fez-se a seleção dos compostos a serem testados em diferentes concentrações para a determinação das IC_{50} . O valor de IC_{50} é definido como a concentração de inibidor necessária para a inibição de 50% de atividade da enzima. A série de derivados dos ácidos cinâmico e *p*-metoxicinâmico (compostos **12- 19**) mostraram atividade inibitória abaixo de 50% nos ensaios preliminares a 500 μ M de inibição da POP e da DPP IV (Tabela 1), enquanto que os derivados do ácido clorogênico e do ácido cafeico apresentaram resultados promissores frente à POP, assim que as IC_{50} dos derivados e dos ácidos de partida foram determinadas, conforme mostram as Figuras 56 e 57. Como se observa na Figura 58, os derivados **3** (éster metílico derivado do ácido clorogênico) e **4** (mono-acetonídeo do ácido clorogênico) demonstraram potente inibição da enzima POP, apresentando IC_{50} de 3,0 e 14,3 μ M, respectivamente. O próprio ácido clorogênico (**1**) não se apresentou como um inibidor destacado para POP. A inserção de grupamentos acetilas (**2**) representou somente uma pequena melhora na atividade inibitória da POP, principalmente quando comparado ao produto natural, porém este derivado penta-acetilado pode ser interessante para aplicação biológica devido a sua maior lipossolubilidade, que facilitaria a passagem pela barreira hemato-encefálica.

Considerando-se que a POP possui alta afinidade por substratos contendo prolina, esperava-se que a presença de um resíduo de prolina acoplado ao ácido clorogênico melhorasse seu desempenho como inibidor. Porém, ao contrário do resultado esperado para o produto de acoplamento do ácido clorogênico acetilado com prolina na forma de seu éster metílico **3**, este demonstrou atividade inibitória moderada quando comparado com os demais derivados analisados.

O ácido cafeico e seus derivados sintetizados apresentaram-se também como inibidores ativos da POP, conforme se verifica nos gráficos de IC_{50} representados na figura 59 e tabela **2**. Destaca-se o derivado cafeoato de metila **8** que, com uma IC_{50} de 5,0 μ M, é duas vezes mais ativo que o próprio ácido cafeico (IC_{50} = 12,5 μ M). Da série dos derivados cafeoil, além destes dois compostos o ácido cafeico acetilado **9** também apresentou atividade inibitória elevada, com uma IC_{50} de 28 μ M, com a vantagem de apresentar maior lipossolubilidade que o ácido cafeico. Assim como se verificou para os derivados cafeoilquínicos, os derivados do ácido cafeico obtidos através da inserção de um resíduo de prolina na molécula (compostos **10** e **11**), não apresentaram melhora na capacidade inibitória da POP, com IC_{50} de 106,0 e 161,0 μ M para **10** e **11**, respectivamente.

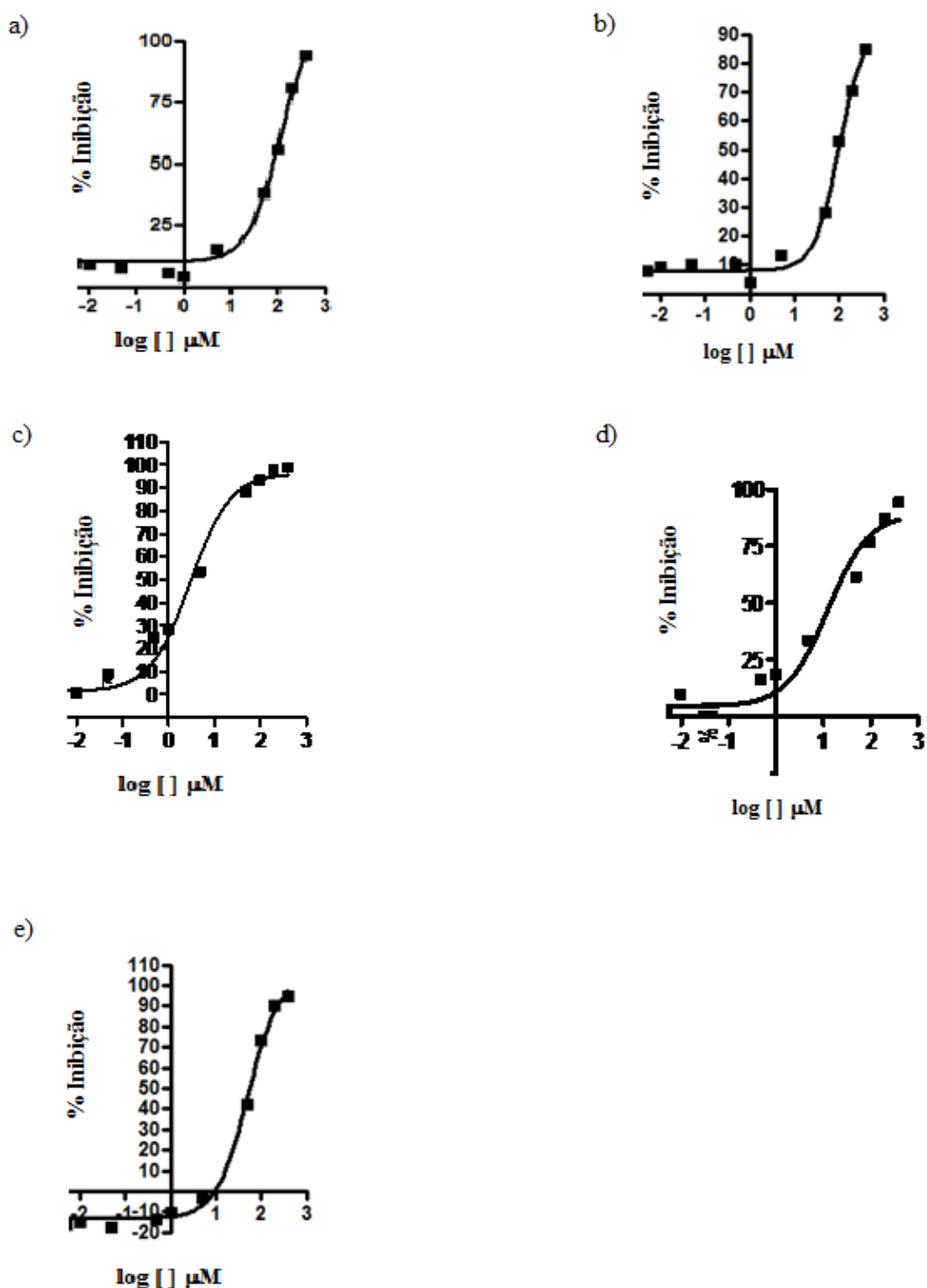


Figura 58 – Ensaio de inibição da POP dos derivados do ácido clorogênico. Gráficos de IC₅₀ para os compostos ativos: (a) composto 1 (IC₅₀ = 109,8 μM); (b) composto 2 (IC₅₀ = 98,88 μM); (c) composto 3 (IC₅₀ = 3,0 μM); (d) composto 4 (IC₅₀ = 14,3 μM); (e) composto 5 (IC₅₀ = 210 μM)

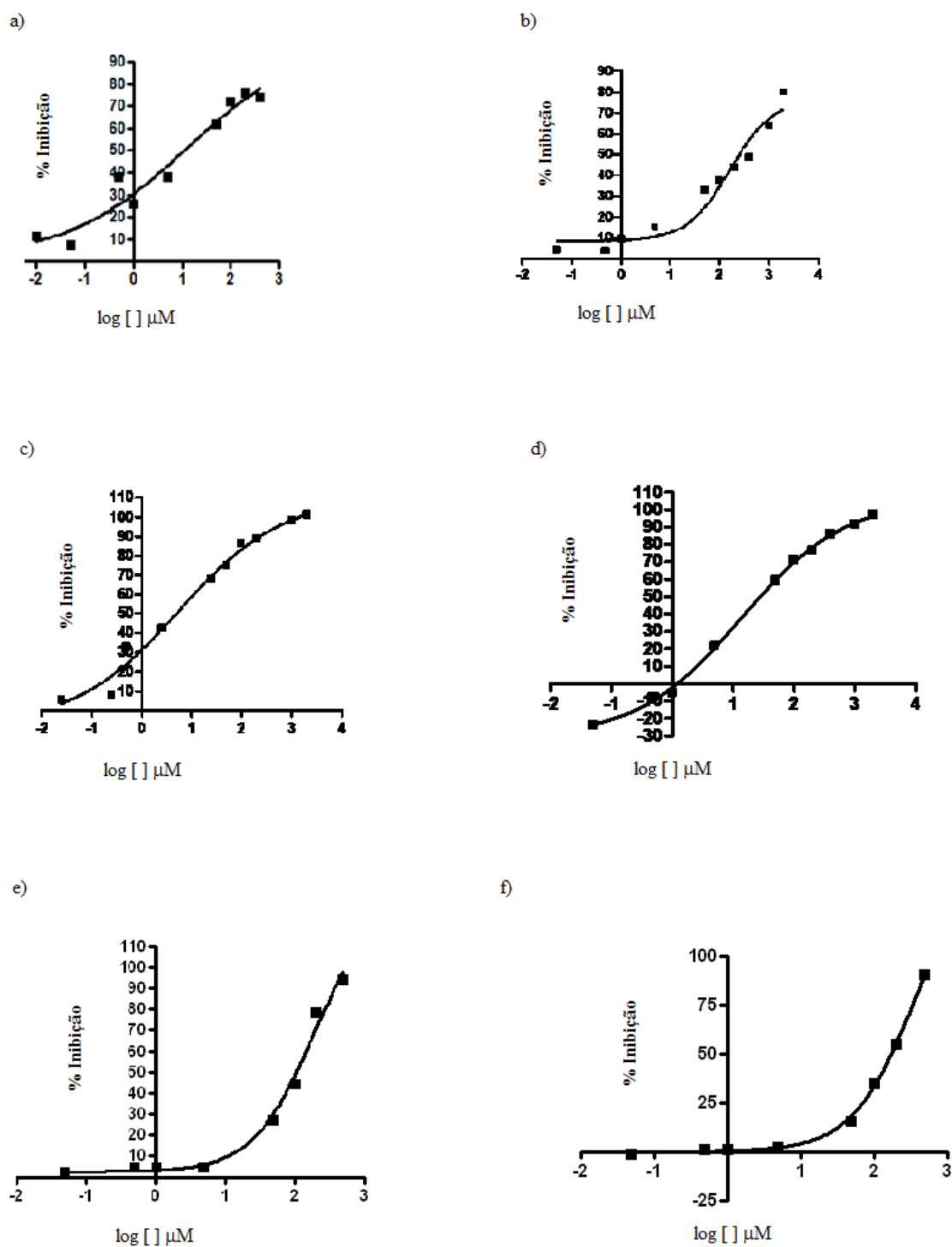


Figura 59 – Ensaio de inibição da POP dos derivados do ácido cafeico. Gráficos de IC₅₀ para os compostos ativos: a) composto **6** (IC₅₀ = 12,5 μM); b) composto **7** (IC₅₀ = 198 μM); c) composto **8** (IC₅₀ = 5 μM); d) composto **9** (IC₅₀ = 28 μM); e) composto **10** (IC₅₀ = 185 μM); f) composto **11** (IC₅₀ = 120 μM)

A partir dos resultados apresentados na Tabela 1 de atividade inibitória da DPP IV dos derivados obtidos neste trabalho, também foi realizada uma avaliação para a seleção dos compostos a serem testados em diferentes concentrações para a determinação das IC₅₀ frente à DPP IV. Contrariamente ao observado com os derivados cafeoilquínicos e cafeoil frente à POP, frente à DPP IV em geral os derivados testados não se apresentaram com ação inibitória significativa, uma vez que os ensaios preliminares foram realizados a alta concentração dos compostos (500 µM) e, a esta concentração, uma inibição abaixo de 50% pode ser considerada não significativa. Em virtude dos derivados sintéticos demonstrarem ineficácia em aumentar a ação inibitória dos compostos naturais, determinou-se a IC₅₀ frente à DPP IV somente de **1** e **6**, obtendo-se IC₅₀ de 128 µM e >200 µM, respectivamente.

Assim, fazendo uma análise geral dos resultados obtidos nos ensaios frente às enzimas POP e DPP IV, pode-se concluir que os compostos éster do ácido 5-cafeoilquínico **3**, o mono-acetonídeo do ACH **4** e éster do ácido cafeico **8** destacam-se como potentes e seletivos inibidores da POP, podendo ser considerados como candidatos promissores para ensaios futuros como inibidores da POP, com potencial valor terapêutico para o tratamento de enfermidades neuropsiquiátricas como o transtorno bipolar e a esquizofrenia.

5.2.2 Ensaios de Inibição da enzima AChE

A avaliação da atividade inibitória dos compostos sintetizados frente à enzima AChE foi realizada através de duas metodologias distintas: o método da bioautografia, método adaptado de Marston e Hostemann (2002), e o método colorimétrico quantitativo em microplacas de 96 poços, através do método adaptado de Ellman (RHEE, et al., 2001), a fim de comprovar os resultados obtidos, uma vez que o método qualitativo da bioautografia, realizado em um primeiro momento, deixou dúvidas devido ao fato da resposta ao ensaio ser unicamente visual (observação do aparecimento de mancha branca sobre a placa cromatográfica).

Nos ensaios de bioautografia nenhum dos derivados sintetizados apresentou capacidade inibitória significativa (Tabela 2). Os resultados deste método são expressos através do pMIQ (logaritmo negativo da concentração mínima inibitória em mol, o qual não apresenta a formação da coloração púrpura, ficando uma mancha esbranquiçada). Para um composto ser considerado bom inibidor da AChE, seu pMIQ deve ser maior que 10,5.

Tabela 2 – Resultados dos ensaios de atividade inibitória da AChE pelos métodos da bioautografia e colorimétrico*.

Amostra [5 mM]	pMIQ**	Inibição AChE*** (%)
1	5,85	28,4
2	5,05	17,4
3	N.A.	27,7
4	N.A.	N.T.
5	N.A.	N.T.
6	6,03	29,2
7	N.A.	20,5
8	N.A.	25,9
9	7,72.	<10
10	N.A.	39,0
11	N.A.	<10
12	4,47	15,6
13	N.A.	21,6
14	4,71	21,8
15	N.A.	18,3
16	N.A.	15,7
17	N.A.	30,1
18	N.A.	11,0
19	N.A.	<10

*N.A.: não ativo; N.T.: não testado

**Resultado obtido pelo método da bioautografia segundo Marston e Hostemann.

***Resultado obtido pelo método colimétrico em microplaca de 96 poços, segundo Ellman. Todos os compostos foram testados a concentração de 5 mM.

Os compostos que apresentaram formação de mancha esbranquiçada pelo método da bioautografia foram os compostos: **1, 2, 6, 9, 12, 14**, sendo todos considerados inativos por possuírem pMIQ <10,5. Os demais derivados apresentados na Tabela 2 não apresentaram formação de halo esbranquiçado, o que evidencia falta de atividade inibitória por este ensaio qualitativo. Analisando os dados obtidos no ensaio colorimétrico quantitativo (Tabela 2 e gráfico de inibição da AChE da Figura 60), é notável que os resultados corroboram com aqueles obtidos por bioautografia, uma vez que a uma concentração elevada de 5 mM todos os compostos testados mostraram atividade inibitória da enzima AChE abaixo de 50%.

5.3 Determinação de Atividade Antimicrobiana

5.3.1 Determinação da CIM pelo método de microdiluição

Os ensaios de microdiluição em caldo forma realizados em microplacas de 96 poços utilizando a técnica modificada do NCCLS. Foram efetuadas séries de diluições das amostras em meio caldo caseína de soja e Sabourand, iniciando na concentração de 200 µg/mL de amostra. Os poços foram então inoculados com a suspensão microbiana e as placas incubadas 24 horas a 35-37 °C para bactérias e 48 horas a 25-27 °C para fungos. Após o período de incubação, observou-se o crescimento microbiano, indicado pelo aparecimento de turvação, possibilitando assim, a verificação da CIM. Dos poços que não apresentaram crescimento foram retiradas alíquotas, as quais foram usadas para inocular placas de Petri contendo meio ágar estéril para a determinação da CBM (CFM, considerada a menor concentração da substância onde não ocorreu crescimento microbiano). Os testes foram realizados em triplicata, sendo sempre realizada simultaneamente a análise do padrão (cloranfenicol ou nistatina). As microplacas também continham um controle de branco (CB) e um controle de crescimento microbiano (controle de inóculo, CI).

Foram testados os derivados do ácido cafeico e ácido cinâmico obtidos neste trabalho. Em virtude da pequena quantidade dos derivados do ácido clorogênico que foi obtida, não foi possível a realização dos ensaios para a determinação da MIC. Dos resultados apresentados para a série dos derivados cafeoil, o composto que teve melhor desempenho como bactericida e fungicida foi o composto **8** (Tabela 3).

Tabela 3 – Concentração bactericida e fungicida (CIM) dos derivados do ácido cafeico expressa em µg/mL*

Amostras	Gram-positivas					Gram-negativas				Fungos		
	Sa	Se	Bs	Sp	Ss	Ec	Pa	Sg	Ca	Ct	Cn	Sc
6	100	200	200	100	200	100	200	200	NA	NA	NA	NA
7	200	100	NA	200	NA	200	200	NA	200	200	200	200
8	50	200	NA	100	200	100	100	200	200	200	200	200
9	50	100	50	50	100	50	50	100	200	200	200	200
10	100	200	200	100	NA	50	200	NA	NA	NA	NA	NA
11	100	200	200	100	200	50	200	200	200	200	200	200
Padrão**	3,12	3,12	3,12	3,12	3,12	3,12	3,12	3,12	6,25	6,25	6,25	10,3

*NA = Não ativo

** Cloranfenicol para bactérias e Nistatina para fungos

Sa = *Staphylococcus aureus* ATCC 6538p

Se = *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228

Bs = *Bacillus subtilis* ATCC 6633

Sp = *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615

Ss = *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 15305

Ec = *Escherichia coli* ATCC 25792

Pa = *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Sg = *Shigella sonnei* ATCC 25931

Ca = *Candida albicans* ATCC 10231

Ct = *Candida tropicalis*

Cn = *Cryptococcus neoformans* ATCC 28952

Sc = *Sacharomyces cerevisiae* ATCC 2601

A Tabela 4 mostra os resultados de atividade antimicrobiana para os derivados do ácido cinâmico **12**, onde se percebe que a esterificação de **12** conduziu a obtenção de um derivado com melhor atividade antimicrobiana, passando de uma atividade de 200 para 50 µg/mL para o microorganismos *Staphylococcus saprophyticus*. Com a adição de uma prolina a **12**, originando **14**, houve uma redução da atividade antimicrobiana. Da mesma forma, o derivado **15** demonstrou melhora em seu MIC somente para a bactéria *Bacillus subtilis*.

Os derivados do ácido para-metoxicinâmico não demonstraram melhora da atividade e aqueles com prolina tiveram sua atividade reduzida que, para a concentração testada de 200 µg/mL, nenhum deles mostrou-se ativo contra as bactérias. No entanto, para fungos, todos os compostos foram ativos com MC de 200 µg/mL.

Tabela 4 – Concentração bactericida e fungicida (CIM) dos derivados do ácido cinâmico expressa em µg/mL*

Amostras	Gram-positivas				Gram-negativas				Fungos			
	Sa	Se	Bs	Sp	Ss	Ec	Pa	Sg	Ca	Ct	Cn	Sc
12	NA	NA	NA	200	200	NA	NA	NA	100	50	100	100
13	100	100	100	50	50	100	100	100	100	50	200	100
14	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	200	100	200	100
15	100	100	50	100	100	100	100	100	200	100	200	100
16	200	NA	NA	NA	NA	NA	200	NA	100	100	100	100
17	200	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	100	100	100	100
18	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	200	200	200	200
19	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	200	200	200	200
Padrão**	3,12	3,12	3,12	3,12	3,12	3,12	3,12	3,12	6,25	6,25	6,25	10,3

*NA = Não ativo

** Cloranfenicol para bactérias e Nistatina para fungos

Sa = *Staphylococcus aureus* ATCC 6538p

Se = *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228

Bs = *Bacillus subtilis* ATCC 6633

Sp = *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615

Ss = *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 15305

Ec = *Escherichia coli* ATCC 25792

Pa = *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Sg = *Shigella sonnei* ATCC 25931

Ca = *Candida albicans* ATCC 10231

Ct = *Candida tropicalis*

Cn = *Cryptococcus neoformans* ATCC 28952

Sc = *Sacharomyces cervisiae* ATCC 2601

6 CONCLUSÕES

- Dentre os compostos propostos para derivatização a partir do ácido clorogênico, apenas um não foi possível sua obtenção através da metodologia empregada, o produto do acoplamento do ácido clorogênico penta-acetilado (**2**) com a prolina metil éster. Os demais derivados propostos foram obtidos com rendimento de 40 a 97%. O rendimento médio das reações de derivatização via acetilação, esterificação e metilação foi de 68%, já o rendimento dos acoplamentos com a prolina metil éster ficou entre 40 e 49%. Assim como na série do ácido clorogênico, na série do ácido cafeico (**6**) não foi possível a obtenção do produto de acoplamento do ácido cafeico dimetilado (**7**) com prolina metil éster usando a mesma metodologia dos outros acoplamentos.

- Os derivados propostos das séries dos ácidos cinâmico e *p*-metoxicinâmico foram obtidos com sucesso com rendimento entre 40- 80% e 49-87%, respectivamente.

- Todos os compostos obtidos foram testados frente às enzimas POP, DPP IV e AChE, como candidatos a inibidores destas enzimas. Nenhum dos compostos testados apresentou atividade inibitória satisfatória para a AChE, em nenhum tipo de ensaio, tanto o qualitativo quanto o quantitativo, apresentando resultados semelhantes, dando credibilidade aos ensaios qualitativos. Para a DPP IV foram realizados somente os ensaios preliminares com uma concentração de 500 μ M, uma vez que os derivados não demonstraram serem bons inibidores.

- Dentre os compostos obtidos, destacam-se dois derivados do ácido clorogênico e um do ácido cafeico como inibidores da POP, sendo possíveis candidatos a novos estudos para o desenvolvimento de fármacos. Estes resultados são relevantes do ponto de vista de atividade inibitória, pois demonstra que moléculas de origem natural, com pequenas modificações estruturais realizadas através de simples reações de derivatização, podem melhorar o desempenho do produto natural de origem, tornando-o um candidato em potencial para a obtenção de novos fármacos. Assim, da série dos derivados cafeoilquinicos os melhores inibidores da POP obtidos foram os compostos **3** (éster metílico do ácido clorogênico; IC₅₀= 3,0 μ M) e **4** (monoacetonídeo do ácido clorogênico; IC₅₀=de 14,3 μ M). Da série dos cafeoil derivados destacam-se como inibidores da POP o cafeoato de metila **8** com IC₅₀ de 5,0 μ M e

o próprio ácido cafeico (**6**) com $IC_{50} = 12,5 \mu M$. Nenhum dos derivados obtidos da série do ácido cinâmico apresentou atividade inibitória satisfatória para a POP.

- Quanto aos ensaios de atividade antimicrobiana dos derivados testados, todos não apresentaram potencial satisfatório como antibióticos. Porém, dentre os compostos obtidos destacam-se os derivados do ácido cinâmico, os quais apresentaram atividade antifúngica e melhor atividade antibacteriana para o ácido cinâmico metil éster (**13**).

REFERÊNCIAS

AHREN, B. Emerging dipeptidyl peptidase-IV inhibitors for the treatment of diabetes. **Expert Opinion on Emergent Drugs**, v.13, p. 593-607, 2008.

ALONSO, A., ROJO, F., MARTÍNEZ, J. L. Environmental and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* show pathogenic and biodegradative properties irrespective of their origin. **Environmental Microbiology**, v. 1, n. 5, p. 421-430, 1999.

APARICIO, C. G., et al. Design and discovery of a novel dipeptidyl-peptidase IV (CD26)-based prodrug approach. **Journal of Medicinal and Chemistry**, v. 49, n. 17, p. 5339-5351, 2006.

ARAÚJO, J.C. et al. Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre microorganismos potencialmente causadores de infecções oportunistas. **Revista de Patologia Tropical**, v. 33, n. 1, p. 55-64, 2004.

AYTEKIN, A. O, MORIMURA, S., KIDA, K. Synthesis of chitosan-caffeic acid derivatives and evaluation of their antioxidant activities. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 111, n. 2, p. 212-216, 2011.

BARNARD, R., GUREVICH, K. G. In vitro bioassay as a predictor of in vivo response. **Theoretical Biology and Medical Modelling**, v. 2, n. 3, p.1-8, 2005.

BARREIRO, E. J., FRAGA, C.A.M. **Química Medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos**. Porto Alegre: Arned, 2009.536 p.

BISOGLIO, F., et al. Structure-antifungal activity relationship of cinnamic acid derivatives. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 26, p. 10635-10640, 2007.

BREWER, S. The relationship between natural products and synthetic chemistry in the discovery process. **The Royal Society of Chemistry**, 2000.

BODANSZKY, M., BODANSZKY, A. **The Practice of Peptide Synthesis**., Berlin: Springer-Verlag, 1984.

BUZZI, F. C., et al. Antinociceptive properties of caffeic acid derivatives in mice. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.4, n.11, p. 4596-4602, 2009.

CHAKRABARTI, R., et al. Dipeptidyl peptidase- IV inhibitory activity of *Berberis aristata*. **Journal of Natural Products**, v. 4, p. 158-163, 2011.

CHECLER, F., VICENT, J. P., KITABGI, P. Inactivation of neurotensin by rat brain synaptic membranes partly occurs through cleavage at the Arg8-Arg9 peptide bond by metalloendopeptidase. **Journal of Neurochemistry**, v.45, n. 5, p. 1509-1513, 1985.

CHRISTENSEN, G. D., et al. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. **Infection and Immunity**, v. 37, n. 1, p. 318-326, 1982.

CLIFFORD, M.N., KIRKPATRICK, J. , KUHNERT, N., ROOZENDAAL, H., SALGADO, P.R. Analytical, nutritional and clinical methods LC–MSn analysis of the cis isomers of chlorogenic acids. **Food Chemistry**, v. 106, n. 1, p. 379–385, 2008.

CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 7, p. 1033-1043, 2000.

DALCOL, I. I., ADOLPHO, L. DE O, TARRAGO, T. , KICHIK, N. , MOREL, A., GIRALT, E. Inhibitory effects of three species of *Hypericum* on POP and DPP IV activities. **Anales del VI International Symposium on Natural Products and its Applications**. Chillán, 2007.

DE MARIA, C.A. B., MOREIRA, E R. F. A. Métodos para análise de ácido clorogênico. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 586-592, 2004.

DEL CISTIA, C. De N. **Aminoácidos**. Rio de Janeiro, 2011.

DOS SANTOS, M. D., ALMEIDA, M. C., LOPES, N. P., DE SOUZA, G.E. P. Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the natural polyphenol chlorogenic acid. **Biological and Pharmacological Bulletin**, v. 29, n. 11, p. 2236-2240, 2006.

DRAUZ, K., KLEEMANN, A., MARTENS, J., SCHERBERICH, P. A novel synthetic route to L-proline. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 51, n. 11, p. 3494-3498, 1986.

EKMEKCIOGLU, C., FEYERTAG, J., MARKTL, W. Cinnamic acid inhibits proliferation and modulates brush border membrane enzyme activities in Caco-2 cells. **Cancer Letters**, v. 128, n. 2, p. 137-144, 1998.

FALCÃO, S. I. D. M. **Métodos de síntese peptídica em solução e em fase sólida: dois exemplos de aplicação**. 2004. 67 f. Tese (Doutorado)- Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 2004.

FARAH, A., PAULIS, T., TRUGO, L. C., MARTIN, P. R. Effect of roasting on the formation of chlorogenic acid lactones in coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1505-1513, 2005.

FERREIRO, L., et al. Associações entre o isolamento de *Candida albicans* com a infecção pelo vírus da leucemia felina (FELV), tratamentos com corticosteróides ou antimicrobianos em gatos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 30, n. 3, p. 179-183, 2002.

FILHO, J.M. B., et al. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16. n. 2, p. 258-285, 2006.

FRAUENDORF, H., HERZSCHUCH, R. Application of high-performance liquid chromatography/electrospray mass spectrometry for identification of carboxylic acids

containing several carboxy groups from aqueous solution. **Er. Mass Spetrometry**, v. 4, p. 269-278, 1998.

FU, J., CHENG, K., ZHANG, Z., FANG, R., ZHU, H. Synthesis, structure and structure-activity relationship analysis of caffeic acid amides as potential antimicrobials. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 6, p. 2638-2643, 2010.

FULÖP, V., POLGAR, L., BOCSKEI, Z. Prolyl oligopeptidase: an unusual beta-propeller domain regulates proteolysis. **Cellular**, v. 94, n. 2, 161-170, 1998.

GALLÃO, M. I. **Parede Celular Vegetal**. disponível em: <http://www.biologia.ufc.br/backup/docentes/IzabelGallao/PosGrad/Parede.Celular.Vegetal.pdf>, 2012.

GARAMBONE, E., ROSA, E.G. Possíveis benefícios do ácido clorogênico à saúde. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 18, n. 2, p. 229-235, 2007.

GARCÍA-HORSMAN, J. A., MÄNNISTÖ, P. T., VENÄLÄINEN, J. I. On the role of prolyl oligopeptidase in health and disease. **Neuropeptides**, v. 41, n. 1, p. 1-24, 2007.

GEISSMAN, T. A., CROUT, D. H. G. **Organic Chemistry of Secondary Plant Metabolism**. São Francisco: Freeman, Cooper and Company, 1968. 592 p.

GIRALDO, L.J. L., et al. Lipase-catalyzed synthesis of chlorogenate fatty esters in solvent-free medium. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, p. 721-726, 2007.

GREEN, B. D., FLATT, P. R., BAILEY, C. J. Dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) inhibitors: a newly emerging drug class for the treatment of type 2 diabetes. **Diabetes and Vascular Disease Research**, v. 3, p. 159-165, 2006.

GREENLEE, W., et al. Muscarinic agonist and antagonist in the treatment of Alzheimer's disease. **IL Farmaco**, v. 56, n. 4, p. 247-250, 2001.

HAMMER, K. A., CARSON, C. F., RILEY, T. V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, n. 6, p. 985-990, 1999.

HE, X-C., et al. Study on dual-site inhibitors of acetylcholinesterase: Highly potent derivatives of bis- and bifunctional huperizine B. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 3, p. 1394-1408, 2007.

HILDEBRANDT, M., REUTTER, W., ARK, P., ROSE, M., KLAPP, B. F. A guardian angel: the involvement of dipeptidyl peptidase IV in psychoneuroendocrine function, nutrition and immune defence. **Clinical Science**, v. 99, p. 93-104, 2000.

JALKAMEN, A. J., et al. Beneficial effect of prolyl oligopeptidase inhibition on spatial memory in young but not in old scopolamine - treated rats. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 100, n. 2, p. 132-138, 2006.

JALKANEN, A. J., et al. Brain pharmacokinetics of two prolyl oligopeptidase inhibitors, JTP-4819 and KYP-2047, in the rat. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 109, n. 6, p. 443-451, 2011.

KANG, S.S., LEE, C. K., KIM, S. S., JUNG, H. A., CHOI, J. S. Chlorogenic acid, an antioxidant principle from the aerial parts of *Artemisia iwayomogi* that acts on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. **Archives of Pharmacal Research**, v. 20, n. 2, p. 148-154, 1997.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia básica e clínica**. Vol. 9ª Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan SA, 2005. 1088 p.

KIM, C. B., KIM, K-Y., B. LEE, B., SHIN, H. Development of kilogram-scale synthesis of cis-LC15-0133 tartrate, a potent dipeptidyl peptidase IV inhibitor. **Organic Process Research and Development**, v. 12, n. 4, p. 626-631, 2008.

KLIMAVICIUSA, L., et al. In situ prolyl oligopeptidase activity assay in neural cell cultures. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 204, n. 1, p. 104-110, 2012:

KURATA, A., TAKEMOTO, S., FUJITA, T., IWAI, K., FURUSAWA, M., KISHIMOTO, N. Synthesis of 3-cyclohexylpropyl caffeate from 5-caffeoylquinic acid with consecutive enzymatic conversions in ionic liquid. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 69, n. 3-4, p. 161-167, 2011.

KURUKULASURIYA, R., et al. Xanthine mimetics as potent dipeptidyl peptidase IV inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, n. 24, p. 6226–6230, 2006.

LAWANDI, J., GERBER-LEMAIRE, S., JUILLERAT-JEANNERET, L., MOITESSIER, N. Inhibitors of prolyl oligopeptidases for the therapy of human diseases: defining diseases and inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry Perspective**, v. 53, n. 9. p. 3423-3438, 2010.

LIST, B. Proline-catalyzed asymmetric reactions. **Tetrahedron report**, v. 58, n. 28, p. 5573-5590, 2002.

LÓPEZ, G. J. et al. Lipase-catalyzed synthesis of chlorogenate fatty esters in solvent-free medium. **Enzyme and Microbial Technology**, v.41, p. 721-726, 2007.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 2ª. Vol. 2. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.

LOU, Z., WANG, H., ZHU, S., MA, C., WANG, Z. Antibacterial activity and mechanism of action of chlorogenic acid. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 6, p. 398-403, 2011.

MA, C-M., KULLY, M., KHAN, J.K, HATTORI, M., DANESHTALAB, M. Synthesis of chlorogenic acid derivatives with promising antifungal activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 21, p. 6830–6833, 2007.

MA, Y-C, WANG, X-Q., HOU, FF., MA, J., LUO, M., CHEN,A., JIN, P., LU, S., XU, I. Rapid resolution liquid chromatography (RRLC) analysis and studies on the stability of Shuang-Huang-Lian preparations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 54, n. 2, p. 265–272, 2011.

MAES, M., GOOSSENS, F., LIN, A., MEESTER, I., GASTEL, A., SCHARPÉ, S. Effects of psychological stress on serum prolyl endopeptidase and dipeptidyl peptidase IV activity in humans: Higher serum prolyl endopeptidase activity is related to stress-induced anxiety. **Psychoneuroendocrinology**, v. 23, n. 5, p. 485-495, 1999.

MARSTON, A., J. KISSLING, J., HOSTETTMANN, K. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. **Phytochemical analysis: PCA**, v. 13, n. 1, p. 51-54, 2002.

McINTOSH, C. H. S., DEMUTH, H.-U., KIM, U.-J., POSPISILIK, J. A., PEDERSON, R. A. Applications of dipeptidyl peptidase IV inhibitors in diabetes mellitus. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 38, n. 5-6, p. 860-872, 2006.

MICHALAK, A. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. **Polish J. of Environment Study**, v. 15, n. 4, p. 523-530, 2006.

MROCZCK, T. Highly efficient, selective and sensitive molecular screening of acetylcholinesterase inhibitors of natural origin by solid-phase extraction-liquid chromatography/electrospray ionisation-octopole-orthogonal acceleration time-of-flight-mass spectrometry and novel thin-layer chromatography-based bioautography. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 12, p. 2519-2528, 2009.

NAM, N. H., YOU, Y. J., KIM, Y. D., HONG, H., KIM, H. M., ANN, Y. Z. Synthesis of certain 3-aryl-2-propenoates and evaluation of their cytotoxicity. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 11, n. 9, p. 1173-1176, 2001.

NATARO, J. P., KAPER, J. B. Diarrhea genic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 1, p. 142-201, 1998.

NCCLS, National Committee for Clinical Laboratory Standard. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard. **National Committee for Clinical Laboratory Standard**, 5^a ed, 2000.

PARKA, D. H., PARK, S. J., KIM, J. M., JUNG, W. Y., RYU, J. H. Subchronic administration of rosmarinic acid, a natural prolyl oligopeptidase inhibitor, enhances cognitive performances. **Fitoterapia**, v. 81, n. 6, p. 644-648, 2010.

PEREIRA, A. S., et al. Avaliação da acurácia de testes laboratoriais para detecção de amostras de *Klebsiella pneumoniae* de betalactamase de espectro estendido. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboral**, 301-308, 2003.

PERES, L. E. P. **Metabolismo Secundário**. disponível em <http://www.ufpel.edu.br/biotecnologia/gbiotec/site/content/paginadoprofessor/uploadsprofessor/ce5449dfcf0e02f741a5af86c3c5ae9a.pdf?PHPSESSID=e32d8df36f08f86ef80010a253f33762>, 2012.

PHANG, J. M., W. LIU, AND O. ZABIRNYK. Proline metabolism and microenvironmental stress. **The Annual Review of Nutrition**, v. 30, p.441-463, 2010.

RACYS, D. T., REA, D., FÜLOP, V., WILLS, M. Inhibition of prolyl oligopeptidase with a synthetic unnatural dipeptide. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 13, p. 4775-4782, 2010.

RHEE, I. K., MEENT, M. V., INGKANINAN, K., VERPOORTE, R. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. **Journal of Chromatography A**, v. 915, n. 1-2, p. 217-223, 2001.

SALMI, C., BRUNEL, J., VIDAL, N., LETOURNEUX, Y. Scope and limitations of an efficient peptide coupling method. **Letters in Organic Chemistry**, v. 2, n. 7, p. 628-633, 2005.

SCHWAB, D., W. HERLING, A., HEMMERLE, H., SCHUBERT, G., HAGENBUCH, B., BURGER, H. Hepatic uptake of synthetic chlorogenic acid derivatives by the organic anion transport proteins. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 296, n. 1, p. 91-98, 2001.

SELFKOW, M. First efficient synthesis of chlorogenic acid. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2001, n. 6, p. 1137-1141, 2001.

SHAHIDI, F., NACZK, M. **Phenolics in food and nutraceutical**. Boca Raton: CRC Press, 2004. 576 p.

SHARMA, P. Cinnamic acid derivatives: A new chapter of various pharmacological activities. **Journal of Chemical and Pharmacological Research**, v. 3, n. 2, p. 403-423, 2011.

SINGH, S. K., MANNE, N., PAL, M. Synthesis of (S)-1-(2-chloroacetyl)pyrrolidine-2-carbonitrile: A key intermediate for dipeptidyl peptidase IV inhibitors. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 4, n. 20, p.1-5, 2008.

SIQUEIRA, S. J. L. **Clonagem do cDNA da endoglicanase 2 de *Humicola grisea* var *thermoidea* e sua expressão em *Saccharomyces cerevisiae***. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

SMITH, T.L., et al. Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. **The New England Journal of Medicine**, v. 340, n. 7, p. 493-501, 1999.

STEIN, T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, synthesis and specific functions. **Molecular Microbiology**, v- 56, n. 4, p. 845-857, 2005.

TARRAGÓ, T., SABIDÓ, E., KOGAN, M. J., de OLIVEIRA, E., GIRALT, E. Primary structure, recombinant expression and homology modelling of human brain prolyl oligopeptidase, an important therapeutic target in the treatment of neuropsychiatric diseases. **Journal of Peptide Science**, v. 11, n. 5, p. 283-287, 2005.

TARRAGÓ, T., KICHIK, N., CLAASEN, B., PRADES, R., TEIXIDO, M., GIRALT, E. Baicalin, a prodrug able to reach the CNS, is a prolyl oligopeptidase inhibitor. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 15, p. 7516-7524, 2008.

TAWATA, S., TAIRA, S., KOBAMOTO, S., ZHU, N., ISHIHARA, J., TOYAMA, S. Synthesis and antifungal activity of cinnamic acid esters. **Bioscience, Biotechnology Biochemistry**, v. 60, n. 5, p. 909-910, 1996.

TEIXIDÓ, T., TARRAGÓ, M. T., DALCOL, I., GIRALT, E. Natural products as a source of inspiration for the discovery of novel POP inhibitors with blood-brain barrier transport capacity. **Journal of Peptide Science**, 2010.

THEERASIN, S., BAKER, A. T. Analysis and identification of phenolic compounds in *Dioscorea hispida* Dennst. **Asian Journal of Food and Agroindustry**, v. 2, n. 4, p. 547-560, 2009.

TOIDE, K., IWAMOTO, Y., FUJIWARA, T., ABE, H. JTP-4819: a novel prolyl endopeptidase inhibitor with potential as a cognitive enhancer. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 274, n. 3, p. 1370-1378, 1995.

TREVISAN, M. T. S. Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para tratamento da doença de Alzheimer. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 301-304, 2003.

VENÄLÄINEN, J. I., JUVONEN, R. O., MÄNNITÖ, P. T. Evolutionary relationships of the prolyl oligopeptidase family enzymes. **European Journal Biochemistry**, v. 271, n. 13, p. 2705-2715, 2004.

WALLÉN, E. A. A., et al. 4-Phenylbutanoyl-2(S)-acylpyrrolidines and 4-phenylbutanoyl-L-prolyl-2(S)-acylpyrrolidines as prolyl oligopeptidase inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 7, p. 2199-2206, 2002.

WILLIAMS, ROBIN S. B. Prolyl oligopeptidase and bipolar disorder. **Clinical Neuroscience Research**, v.4, n. 3-4, p. 233-242, 2004.

YAMAMOTO, K., NOBUYUKI N. Hydrophobic hydration and hydrophobic interaction of carboxylic acids in aqueous solution: mass spectrometric analysis of liquid fragments isolated as clusters. **Journal of the American Chemical Society**, v. 112, n. 2, p. 549-558, 1990.

ZENG, G., H. XIAO, H., LIU J., LIANG, X. Identification of phenolic constituents in Radiz *Salvia miltiorrhizae* by liquid chromatography/eletrospray ionization mass spectrometry. **Mass Spectrometry**, v. 20, n. 3, p. 499-506, 2006.

ZHANG, L., et al. Design, synthesis and preliminary evaluation of new cinnamoyl pyrrolidine derivatives as potent gelatinase inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 24, p. 8286-8294, 2006.