

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE QUÍMICA  
CURSO DE LICENCIATURA EM QUÍMICA

BRUNA DANIELY BASSETTI

**ESTUDO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *ZINGINBER OFFICINALIS*,  
*MURRAYA KOENIGII* E *CORIANDRUM SATIVUM* VISANDO À  
BUSCA DE INIBIDORES DE HIV-1 PROTEASE**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CAMPO MOURÃO  
2015

BRUNA DANIELY BASSETTI

**ESTUDO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *ZINGINBER OFFICINALIS*,  
*MURRAYA KOENIGII* E *CORIANDRUM SATIVUM* VISANDO À  
BUSCA DE INIBIDORES DE HIV-1 PROTEASE**

Trabalho de conclusão de curso de graduação do Curso de Licenciatura em Química do Departamento Acadêmico de Química – DAQUI – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, como requisito parcial para obtenção do título de Licenciado em Química.

Professor Orientador: Msc. Adriano Lopes Romero

CAMPO MOURÃO

2015



Ministério da Educação  
**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ**

Câmpus Campo Mourão  
Diretoria de Graduação e Educação Profissional  
Departamento Acadêmico de Química - DAQUI  
Curso de Licenciatura em Química



## TERMO DE APROVAÇÃO

### **ESTUDO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *ZINGINBER OFFICINALIS*, *MURRAYA KOENIGII* E *CORIANDRUM SATIVUM* VISANDO À BUSCA DE INIBIDORES DE HIV-1 PROTEASE**

por

**BRUNA DANIELY BASSETTI**

Este trabalho foi apresentado em 9 de dezembro de 2015 como requisito parcial para a obtenção do título de Licenciada em Química. A Candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação a Banca Examinadora considerou o trabalho APROVADO.

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rafaella B. Romero  
(UTFPR)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daniela A. Barancelli  
(UTFPR)

---

Prof. Msc. Adriano L. Romero  
(UTFPR)  
*Orientador*

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

*(José de Alencar)*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço a Deus pela força, coragem e acima de tudo pela saúde para que pudesse chegar até aqui e concluir este trabalho.

Aos meus pais e ao meu esposo, que sempre me apoiaram, me motivaram e me ajudaram durante todo o curso, que tiveram muita paciência e cuidaram do meu filho nos momentos em que precisei.

Ao meu professor orientador Msc. Adriano Lopes Romero, pelos ensinamentos e auxílio para a realização deste trabalho.

Aos colegas de laboratório, que me ajudaram na realização das análises, em especial ao João Pedro Albuquerque que além de me auxiliar nas análises, também me solucionou muitas dúvidas durante a pesquisa.

Enfim, a todos os professores e colegas de curso me auxiliaram de alguma forma, muito obrigada!

## RESUMO

BASSETTI, Bruna D. Estudo dos óleos essenciais de *Zingiber officinalis*, *Murraya koenigii* e *Coriandrum sativum* visando à busca de inibidores de HIV-1 protease. 46 f. Trabalho de conclusão de curso (Curso Superior de Licenciatura em Química) - Departamento de Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2015.

Atualmente, a infecção pelo vírus HIV representa um grande problema para a população e cada vez mais rápido, se torna um dos vírus mais mortais do mundo. Desse modo, é crescente os estudos de agentes que possam interferir no estágio de replicação do vírus da AIDS. Esses estudos representam um desafio constante para toda comunidade científica, já que o HIV pode desenvolver, com muita facilidade, resistência contra medicamentos habitualmente utilizados. Tendo em vista que a HIV-1 protease desempenha papel fundamental no ciclo de vida do HIV. O presente trabalho teve como objetivo estudar os óleos essenciais de *Coriandrum sativum*, *Zingiber officinalis* e *Murraya koenigii* no intuito de verificar se eles são possíveis inibidores de HIV-1 protease. Nos testes *in vitro*, verificou-se, na maior concentração recomendada (1000 ppm), que os óleos essenciais estudados não apresentam promissora atividade inibidora de aspartilproteases. Os estudos por Ressonância Magnética Nuclear permitiram verificar que a composição dos óleos estudados é diferente daquela informada nos rótulos dos produtos comerciais. Desse modo, o presente trabalho contribuiu para o estudo de produtos naturais no sentido de outros pesquisadores não mais focar nestes óleos para a inibição da enzima HIV-1 protease, mas procurar novos óleos que tenham potencialidade ou até mesmo de testar os mesmos óleos com intuito de inibir outras enzimas do ciclo de replicação do vírus, como a transcriptase reversa e HIV- integrase.

**Palavras chave:** HIV. AIDS. Inibidores enzimáticos. HIV-1 protease. óleos essenciais. RMN de  $^1\text{H}$ . RMN de  $^{13}\text{C}$ .

## ABSTRACT

BASSETTI, Bruna D. Study of essential oils of *Zingiber officinale*, *Murraya koenigii*, and *Coriandrum sativum* order to search HIV-1 protease inhibitors. 46 f. Completion of course work (in Chemistry) - Chemistry Department, Federal University of Technology – Paraná. Campo Mourão, 2015.

Currently, HIV infection is a major problem for the population and ever faster, becomes one of the deadliest viruses in the world. Thus, studies are increasing agents that may interfere with the AIDS virus replication stage. These studies represent an ongoing challenge for the entire scientific community, since HIV can develop very easily, drugs commonly used resistance. Given that the HIV-1 protease plays a key role in the HIV life cycle. This work aimed to study the essential oils from *Coriandrum sativum*, *Zingiber officinalis* and *Murraya koenigii* in order to see if they are possible HIV-1 protease inhibitors. It was found, in most recommended concentration (1000 ppm), that essential oils do not present promising aspartylproteases inhibitory activity. Studies by Nuclear Magnetic Resonance helped confirm that the composition of the oils studied is different from that recorded on the labels of commercial products. Thus, this work contributed to the study of natural products towards other researchers not focus these oils for inhibition of HIV-1 protease, but seek new oils which have potential or even to test the same oils aiming of inhibiting other enzymes in the viral replication cycle, such as reverse transcriptase and HIV integrase.

**Keywords:** *HIV. AIDS. enzyme inhibitors. HIV-1 protease. essential oils. <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR.*

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Principais compostos do óleo essencial de gengibre.....	20
Figura 2. Principais compostos do óleo essencial de coentro.....	21
Figura 3. Principais compostos do óleo essencial de curry.....	22
Figura 4. Estrutura tridimensional da enzima HIV-1 protease (PDB 7HVP).....	24
Figura 5. Representações do processo de inibição da HIV-1 protease.....	25
Figura 6. Diferentes representações da HIV-1 protease (PDB 5PEP).....	25
Figura 7. Representações de resíduos de cisteína presentes estabelecendo pontes de.....	26
Figura 8. Representações de fármacos comerciais interagindo com a HIV-1 protease.....	26
Figura 9. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300,06 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do óleo essencial de coentro.....	31
Figura 10. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300,06 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do óleo essencial de curry.....	33
Figura 11. Comparação das estruturas do ar-curcumeno e zingibereno.....	34
Figura 12. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300,06 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do óleo essencial de gengibre.....	36
Figura 13. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (75,45 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do óleo essencial de gengibre.....	36
Figura 14. Absorbância dos óleos essenciais de <i>Coriandrum sativum</i> , <i>Zingiber officinalis</i> e <i>Murraya koenigii</i> .....	37
Figura 15. Percentual de inibição dos óleos essenciais de <i>Coriandrum sativum</i> , <i>Zingiber officinalis</i> e <i>Murraya koenigii</i> .....	38



## LISTA DE ABREVIações

AIDS	Síndrome Da Imunodeficiência Adquirida
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HAART	Terapia Antirretroviral Altamente Ativa
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN de $^1\text{H}$	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio 1
RMN de $^{13}\text{C}$	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>15</b>
2.1 O VÍRUS HIV .....	15
2.1.1 Replicação do HIV .....	15
2.2 A AIDS .....	16
2.3 EPIDEMIOLOGIA .....	16
2.4 TRANSMISSÃO .....	17
2.5 TRATAMENTO .....	18
2.6 ALTERNATIVAS NATURAIS DE TRATAMENTO: ÓLEOS ESSENCIAIS .....	18
2.7 HIV-1 PROTEASE .....	22
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>27</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	27
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	27
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>28</b>
4.1 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR .....	28
4.2 ATIVIDADE INIBIDORA DE PEPSINA .....	28
4.2.1 Preparo das soluções .....	28
4.2.2 Teste inibidor de pepsina .....	28
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>30</b>
5.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS .....	30
5.2 TESTE INIBIDOR DE PEPSINA .....	37
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>40</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>41</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), desde a sua identificação em 1981 se tornou um fenômeno global e assim um marco na história da humanidade (BRITO et al., 2000).

Nos dias de hoje, a infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) constitui um grande problema para a população e está se tornando com rapidez um dos vírus mais mortais do mundo. Desse modo, vários laboratórios no mundo inteiro estão empenhados na investigação de agentes que possam interferir no estágio de replicação do vírus da AIDS. Esses estudos representam um desafio constante para toda comunidade científica, já que o HIV pode desenvolver, com muita facilidade, resistência contra medicamentos habitualmente utilizados (SINGH et al., 2013).

Por afetar o sistema imunológico, o HIV invade micro-organismos não patogênicos, ou seja, que usualmente não são capazes de desencadear doença em pessoas com sistema imune normal. Assim, estes microrganismos ao se proliferarem no sangue e tecidos provocam doenças como, por exemplo, herpes simples, tuberculose, pneumonia, candidíase e toxoplasmose (CUNHA, 2006).

O tratamento mais utilizado atualmente para esta infecção é denominado de terapia antirretroviral altamente ativa (HAART, *Highly Active Anti-Retroviral Therapy*), sendo que este geralmente associa fármacos de duas principais classes como os inibidores da transcriptase reversa (AZT) e os inibidores de protease (raltegravir e efavirenz) (ROMERO & ROMERO, 2013).

No entanto, este tipo de tratamento causa muitos problemas aos pacientes de AIDS revelando efeitos secundários graves, entre eles estão a arritmia, problemas respiratórios, problemas ósseos, danos ao fígado, aumento dos níveis de açúcar no sangue e de gordura no corpo, acidose láctica, lipodistrofia, náuseas e erupções da pele. Dessa maneira, há a necessidade de desenvolver novos compostos anti-HIV que apresentem menor toxicidade e probabilidade de desenvolverem resistências, ou ainda novas formas de terapia, como exemplo a terapia gênica (SINGH et al., 2013; ROMERO & ROMERO, 2013).

Como a HIV-1 protease é uma enzima chave na terapia HAART por desempenhar um papel importante no ciclo de replicação do HIV, vários compostos naturais têm sido estudados visando à inibição desta enzima. Além disso, estudos

tem revelado que focar nos compostos naturais inibidores de enzimas utilizadas na replicação do vírus HIV, parece ser a melhor estratégia na busca de agentes antivirais com menor toxicidade (SINGH et al., 2013).

Estudos mostram que, os óleos essenciais tem se mostrado capazes no combate de alguns microrganismos. Estes compostos naturais são produtos resultantes do metabolismo secundário das plantas e seu comportamento é semelhante ao dos antibióticos (ALVES et al., 2009).

Uma pesquisa realizada por Souza et al. (2008), mostra que a (+)-calanolida A, um composto extraído de folhas e ramos da árvore tropical *Calophyllum lanigerum var. austroco-riaceum* é ativa contra a replicação do vírus HIV-1 ( $EC_{50} = 0,1\mu\text{M}$ ).

A quercetina, um constituinte químico das folhas de arruda, possui muitas propriedades terapêuticas, dentre elas propriedades antiviral e anti-HIV, analgésica, bactericida, antioxidante, antidiabética, antiinflamatória, antiespasmódica, antitumoral e antigástrica (DONG et al., 2003; KAMINSKI et al., 2003).

O arzanol tem propriedades anti-inflamatórias (por interferência na cascata do ácido araquidônico), anti-oxidantes (em sistemas biológicos) e antivirais (inibindo a replicação do HIV-1) (OLIVEIRA et al., 2011).

O óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae) tem como principais componentes o terpinen-4-ol,  $\alpha$ -terpineno,  $\beta$ -terpineno, *p*-cimeno, terpinoleno e  $\alpha$ -terpineol e sua atividade antiviral foi atribuída, principalmente, ao terpinen-4-ol (GAROZZO et al., 2009).

Em 1999, algumas pesquisas realizadas no Hospital de São Lázaro, nas Filipinas, sob a responsabilidade do Dr. Eric Tayan, mostraram que a administração diária de 50 mL de óleo de coco em 15 pacientes com AIDS que nunca haviam recebido nenhum tipo de tratamento anti-HIV, levou a um aumento dos linfócitos de defesa do corpo, CD4 de 248 para 570 e CD8 de 1065 para 1671 (JORNAL AROMATOLOGIA, 2012).

Bicchi et al. (2009), por exemplo, relataram que os óleos essenciais de *Ridolfia segetum* e *Oenanthe crocata* inibem a atuação do vírus HIV por atuação sobre a enzima transcriptase reversa.

Segundo Braz Filho (2010), os triterpenoides lupânicos ácido betulínico e ácido platânico, que são isolados do extrato metanólico das folhas de *Zyzigium claviflorum* (família Myrtaceae) juntamente com o lupeol, revelaram atividade

inibitória na replicação do vírus HIV. Ele ainda relata que outras classes de substâncias naturais como às isolados das flores de *Chrysanthemum morifolium* (família Compositae) juntamente com mais sete substâncias conhecidas, também têm revelado potente atividade inibidora sobre o HIV, como exemplos, a cumarina e os flavonóides 7-O- $\beta$ -D-galactopiranosilacetina e crisina.

De acordo com Falcão e Menezes (2003), metabólitos terpenóides encontrados em espécies de plantas *H. capitata* da família Lamiaceae, parecem ser eficazes na ação anti-HIV.

Wu et al. (2003), avaliaram dezesseis flavonóides e os seus derivados de *Desmos spp.* Como possíveis inibidores da replicação do HIV em células de linfócitos H9. Dentre os compostos avaliados, os flavonóides cinamoilbenzaldeído e lawinal demonstraram potencial atividade anti-HIV.

Kashiwada et al. (1998), verificaram que o ácido oleanólico obtido de jambolão interfere na replicação do vírus HIV em cultura de células.

A curcumina, presente em plantas da família *Zingiberaceae*, ou seja, da família do gengibre, apresenta propriedades anti-inflamatória para inflamações crônicas e agudas, antioxidante, anti-protozoária, nematocida, antibacteriana, anti-HIV e anti-tumoral (ARAÚJO & LEON, 2013).

O *Zingiber officinale* Roscoe, é uma especiaria comum e também uma planta medicinal amplamente utilizada na China antiga. O gengibre provou ter atividade antiviral contra o Vírus Respiratório Sincicial Humano (HRSV). Os autores chegaram a conclusão que fresco, mas não seco, o gengibre é eficaz contra a formação de placa induzida por HRSV no epitélio das vias aéreas, bloqueando a ligação viral e interiorização (CHANG et al., 2012).

SOOKKONGWAREE et al. (2006), com o intuito de identificar novos compostos com efeito antiviral, foram investigados os extratos aquoso e metanólico de oito plantas medicinais da família *Zingiberaceae* como inibidores de proteases de vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1), vírus da hepatite C e citomegalovírus humano. Em geral, os extratos metanólicos inibiu mais eficazmente as enzimas do que os extratos aquosos. A HIV1 - protease foi fortemente inibida pelo extrato de *Alpinia galanga*.

Segundo Priyanka et al. (2015) as folhas, frutos, raízes e casca da *Murraya koenigii Spreng* (Rutaceae), são uma rica fonte de alcalóides carbazólicos. Sobre

estes alcalóides têm sido relatadas várias atividades farmacológicas, tais como anti-tumoral, anti-viral, anti-inflamatória, antidiarreico, diurético e antioxidante.

A atividade imunoestimulante do *Coriandrum sativum* é evidenciada pelo aumento da proliferação de linfócitos e produção de interleucinas (grupos constituintes do sistema imunológico dos organismos) (XAVIER INNOCENT et al., 2011). Ele aumenta a resposta imune de glóbulos brancos, inibe a replicação do HIV-1 e melhora a contagem de linfócitos (MISHRA et al., 2009).

Por estas razões, este trabalho teve como objetivo verificar uma possível atividade inibitória de HIV-1 protease a partir dos óleos essenciais de *Zingiber officinalis* (gengibre), *Murraya koenigii* (curry) e *Coriandrum sativum* (coentro).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 O VÍRUS HIV

O HIV (Vírus Imunodeficiência Humana, na sigla em inglês) atinge o sistema imunológico, no qual é normalmente responsável pela proteção do organismo contra infecções.

O vírus HIV faz parte dos retrovírus, que por ter como código genético o RNA, não pode inserir-se nos cromossomos da célula de DNA. Por isso, este vírus possui uma enzima específica chamada de transcriptase reversa (TR), permitindo a transcrição reversa do RNA viral em DNA viral. Assim, eles alojam seu DNA nas células atacadas de forma que novas células produzidas por elas passam a também portar o vírus (CUNHA, 2006).

O alvo principal do vírus HIV durante a infecção são as células de defesa (linfócitos) que contém em sua superfície um receptor chamado de T CD4<sup>+</sup>. Por esta razão, as células CD4<sup>+</sup> acabam morrendo durante o processo, de modo que organismo começa a não mais combater doenças, atingindo o ponto crítico que caracteriza a doença da AIDS. Assim, o quadro clínico da AIDS é caracterizado em função da contagem sanguínea de linfócitos T CD4<sup>+</sup> no indivíduo infectado com o HIV, e da caracterização das condições clínicas relacionadas à infecção com o HIV (PEÇANHA & ANTUNES, 2002).

#### 2.1.1 Replicação do HIV

Apesar da característica mais marcante da infecção por HIV ser a depleção seletiva de linfócitos CD4<sup>+</sup>, este vírus também infecta monócitos, macrófagos, células de Langerhans, entre outras (FERREIRA, 2010).

A infecção pelo HIV começa com a etapa de adsorção, na qual o vírion se liga à superfície da célula alvo. Quando chega à corrente sanguínea, o HIV ataca alguns tipos de células, sobretudo, os linfócitos T (FERREIRA, 2010). As proteínas de envelope do vírus se ligam à célula hospedeira, desencadeando a fusão das

membranas celular e vírica. Dentro da célula hospedeira, a proteína central é dissolvida e libera para o citoplasma RNA vírico e enzimas víricas tais como: transcriptase reversa, integrase e protease (SIDA, 2014).

No citoplasma, uma réplica do RNA original em DNA de dupla cadeia é produzida. Após a transcrição reversa, o DNA é transportado para o núcleo celular através do poro nuclear pró-viral associado com proteínas virais e celulares em um grande complexo nucleoproteico de pré-integração (PIC). A dupla cadeia de DNA linear do PIC é inserida no cromossomo do hospedeiro. Depois da integração, o DNA no núcleo informa a célula sobre quais as proteínas que deve produzir. Assim, o DNA atua como modelo do RNA mensageiro (RNAm), que abandona o núcleo e entra no citoplasma, com instruções para produzir proteínas víricas (FERREIRA, 2010).

As proteínas víricas migram e se inserem na membrana plasmática. As poliproteínas Gag e Gag-Pol também se movem para a membrana celular e começam a montagem do vírion direcionada pela poliproteína Gag. Além disso, enzimas virais, RNA genômico e compostos celulares se associam no nucleocapsídeo imaturo. Mais tarde, este complexo brota através da membrana plasmática produzindo um vírion imaturo (FERREIRA, 2010).

Após isso, os vírus imaturos libertam-se da célula entrando na corrente sanguínea, por ainda serem imaturos, estes são incapazes de infectar outras células, sendo necessário passar por um processo de amadurecimento no qual a enzima vírica protease corta e estrutura as proteínas víricas para assim se tornarem infecciosos. Devido ao grande número de vírus germinados ou pelo fato do sistema imunológico do corpo reconhecer as proteínas de envelope vírico na membrana da célula, as células CD4<sup>+</sup> desintegram-se e danificadas não conseguem sobreviver, como estas células são uma parte essencial do sistema imunológico, a sua destruição pode provocar então uma imunodeficiência profunda (SIDA, 2014).

## 2.2 A AIDS

A AIDS (Síndrome de Imunodeficiência Adquirida) estado final da infecção crônica provocada pelo retrovírus HIV é uma doença que afeta o sistema imunológico do organismo, podendo causar, entre outros problemas, infecções



oportunistas graves, como toxoplasmose, pneumonia e tuberculose pulmonar (CUNHA, 2006).

### 2.3 EPIDEMIOLOGIA

De acordo com o relatório anual do Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS existem aproximadamente 33 milhões de pessoas no mundo vivendo com a pandemia. A área mais afetada é a África Subsaariana, contendo aproximadamente dois terços do total, no qual três quartos são do sexo feminino. Na Europa Oriental e Ásia Central, 1,6 milhão de pessoas também estão infectadas, sendo que no leste Europeu, noventa por cento destas pessoas vivem na Ucrânia e na Rússia (UNAIDS/WHO, 2007).

No Brasil, foram notificados 39.185 casos de AIDS em 2012. Sendo que a taxa de detecção nacional foi de 20,2 casos para cada 100.000 habitantes. A maior taxa de detecção foi observada na Região Sul, 30,9/100.000 habitantes, seguida pela Região Norte (21,0), Região Sudeste (20,1), Região Centro-Oeste (19,5), e Região Nordeste (14,8) (PROGRAMA NACIONAL DE DST E AIDS. BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO – AIDS E DST, 2013).

### 2.4 TRANSMISSÃO

As principais formas de transmissão do HIV são: sexual, sanguínea, vertical e de forma menos frequente a ocupacional. A transmissão sexual ocorre através do sexo vaginal, anal ou oral com indivíduo infectado pelo HIV sem o uso de preservativo, a sanguínea ocorre em receptores de sangue e em usuários de drogas injetáveis e a vertical quando a criança é infectada pelo vírus HIV durante a gestação, pelo parto ou pelo aleitamento. A transmissão ocupacional é ocasionada por acidente de trabalho, onde profissionais da área da saúde sofrem ferimentos com instrumentos perfuro cortantes contaminados com sangue de pacientes infectados pelo HIV (CUNHA, 2006).

## 2.5 TRATAMENTO

No ciclo de replicação do HIV, diversos eventos relacionados exclusivamente a componentes virais, podem ser utilizados como alvos para intervenção quimioterápica. Atualmente, compostos disponíveis como fármacos anti-HIV podem atuar na inibição no sítio de ligação da enzima transcriptase reversa, na inibição alostérica da transcriptase reversa ou na inibição da protease. Com a combinação de diferentes inibidores de transcriptase reversa e inibidores de protease, um eficaz tratamento foi alcançado inicialmente, porém rapidamente começaram a aparecer cepas resistentes a diferentes combinações dos fármacos disponíveis. Além disso, os inibidores aprovados e disponíveis no mercado podem induzir a alguns efeitos colaterais, tais como: lipodistrofia, hiperlipidemia e resistência à insulina após o uso prolongado de um determinado medicamento (PEÇANHA & ANTUNES, 2002).

Portanto, há atualmente uma constante procura de novos inibidores da protease do HIV tendo como foco os produtos naturais pelo fato destes apresentarem menor toxicidade para os seres humanos.

## 2.6 ALTERNATIVAS NATURAIS DE TRATAMENTO: ÓLEOS ESSENCIAIS

As plantas medicinais têm sido utilizadas para o tratamento de uma variedade de enfermidades infecciosas e não infecciosas. Desse modo, elas tem sido o principal foco na pesquisa de produtos naturais com atividade antiviral, além do fato delas poderem ser selecionadas com base em seu uso etnomedicinal. Estima-se que cerca de 25% dos medicamentos comumente utilizados contêm compostos isolados de plantas e acredita-se que muitas plantas podem ser um rico reservatório para a descoberta de novas substâncias contra doenças infecciosas (FERREIRA, 2010).

Os óleos essenciais são produtos naturais produzidos pelas plantas para que possam sobreviver, pois funcionam como um metabólito secundário que além de exercerem papel fundamental na defesa contra microrganismos e predadores, favorecem a sua polinização, atraindo insetos e outros agentes fecundadores (SIANI

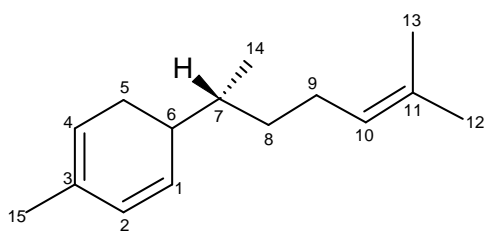
et al., 2000). São constituídos por diferentes substâncias orgânicas voláteis, que em conjunto, conferem a cada óleo essencial um perfume singular e também características terapêuticas específicas (LEVERT & ROTHFELD, 2003).

Desde a antiguidade, os óleos essenciais são conhecidos como agentes medicinais estando associados à cura de doenças e à busca de bem estar físico (SIANI et al., 2000). Atualmente, sua utilização tem se concentrado nas indústrias alimentícias e de cosméticos. Contudo, estudos vêm comprovando que os óleos essenciais podem sim ter efeitos terapêuticos, dos quais são estudados a partir dos componentes químicos dos óleos essenciais e que separados em tipos de compostos químicos, cada tipo é descrito como tendo efeitos terapêuticos próprios. Seus efeitos podem ser diretos (por exemplo, em microrganismos em processos metabólicos) e indiretos (via processos biológicos, olfativos, neurológicos, endócrinos e etc.) (LYRA, 2009).

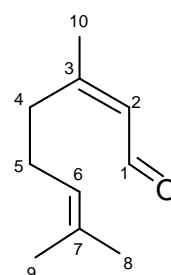
Neste trabalho será avaliado se os óleos essenciais de gengibre, curry e coentro possuem atividade inibidora de HIV-1 protease. Desse modo, uma breve descrição sobre cada um destes óleos é apresentada a seguir.

O gengibre (*Zingiber officinalis*) é uma planta aromática utilizada como condimento e como erva medicinal desde a antiguidade pelos povos asiáticos (DEBAGUE et al., 2011). Esta planta tem como principal componente do seu óleo essencial o sesquiterpeno zingibereno (20,6% a 24,3%), que lhe dá o aroma de gengibre (ÓLEOS ESSENCIAIS, 2009).

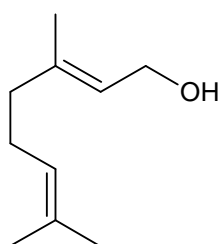
Atualmente, o óleo essencial de gengibre possui grande aplicabilidade na indústria de alimentos como aromatizante e condimento, na indústria cosmética como fragrância e antioxidante e na indústria farmacêutica devido às propriedades anti-inflamatória, antibacteriana e antitumoral. Dessa forma, a obtenção de óleos essenciais, extratos e concentrados de gengibre a partir do rizoma da planta, têm despertado interesse da indústria farmacêutica e cosmética devido à presença dos constituintes químicos como: neral (8,2% a 14,9%), geraniol (4,5% a 6,9%), geranial (21,6% a 17,7%),  $\beta$ -bisaboleno (2,8 a 3,4%), canfeno (2,8 a 5,8%), eucaliptol (3,6 a 5,9%),  $\beta$ -sesquifelandreno (8,5% a 11%),  $\alpha$ -farneseno (6,9% a 8%) e acetato de geranila (3,5 a 4,5%) (DABAGUE et al., 2011). A estrutura de alguns compostos são mostradas na Figura 1.



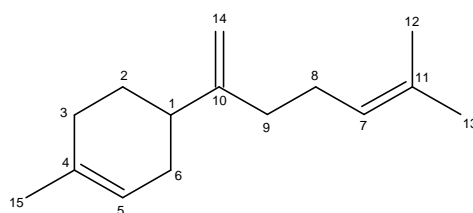
**Zingibereno**



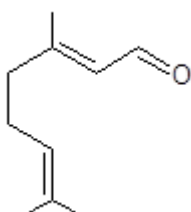
**Neral**



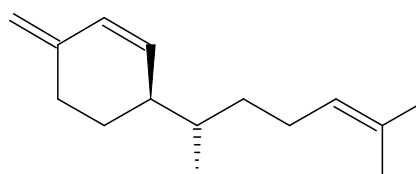
**Geraniol**



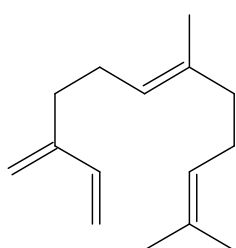
**$\beta$ -bisaboleno**



**Geranial**



**$\beta$ -sesquifelandreno**



**$\alpha$ -farneseno**

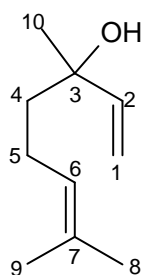
Figura 1 – Principais compostos do óleo essencial de *Zingiber officinalis*.

Fonte: Autoria própria.

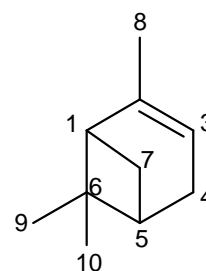
O coentro (*Coriandrum sativum* L.) é uma hortaliça herbácea pertencente à família Apiaceae, nativa da bacia do Mar Mediterrâneo (JOLY, 2002). Há registros de sua utilização medicinal desde a antiguidade, com destaque na região do

Mediterrâneo e leste Europeu. Segundo Costa (2002), tanto os frutos quanto as folhas do coentro apresentam propriedades estomáquicas e carminativas. Além disso, ele pode ser utilizado no tratamento de dores articulares e reumatismo com efeito antipirético, anti-helmíntico e analgésico. Diversas pesquisas mostram que o coentro também apresenta atividades como hipolipemiante, antimicrobiana, hipoglicemiante, anti-hipertensiva e diurética (SILVA et al., 2012).

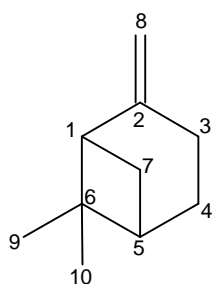
O óleo essencial do fruto do coentro é empregado na perfumaria, em preparações farmacêuticas como flavorizante e edulcorante em medicamentos e em bebidas alcoólicas (SILVA et al., 2012). Seu principal componente é o linalol (70%) e como componentes minoritários têm-se  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, dipenteno, *p*-cimeno, dodecanal, dodecanol, *n*-tetradecanol, decanal, geraniol e cânfora (DIAS, 2011). A Figura 2 mostra a estrutura de alguns compostos do óleo de coentro.



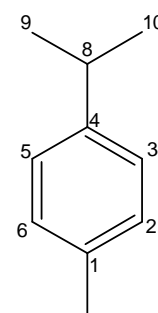
**Linalol**



**$\alpha$ -pineno**



**$\beta$ -pineno**



***p*-cimeno**

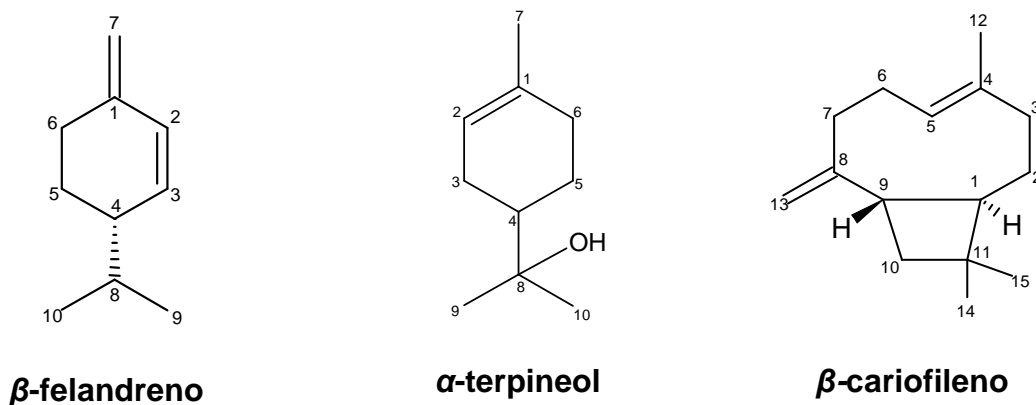
Figura 2 – Principais compostos do óleo essencial de *Coriandrum sativum*.

Fonte: Autoria própria.

A árvore-do-caril (*Murraya koenigii*) é uma planta nativa da Índia e Sri Lanka, sendo suas folhas pequenas e de aroma pungente. As folhas são usadas como condimento na culinária asiática principalmente em molhos e sopas, na qual recebe

o nome de curry (PARMAR & KAUSHAL, 1982). Uma erva medicinalmente importante que possui grande número de aplicações terapêuticas, como em distúrbios brônquias, vômitos, doenças de pele, e etc. As folhas, a casca e as raízes da *Murraya koenigii* podem ser usadas para o tratamento de disfunções estomacais. Eles também são usados externamente para curar erupções e as mordidas de animais peçonhentos. As folhas verdes são indicadas para serem consumidas cruas no intuito de curar disenteria e a infusão das folhas lavadas é indicada para cessar vômito. O óleo essencial das folhas e das sementes de *Murraya koenigii* possui uma forte atividade antibacteriana, antifúngica, anti-úlcera e de redução de colesterol (VANDANA et al., 2012).

Relatos mostram que o óleo essencial de origem chinesa contém  $\alpha$ - e  $\beta$ -pinenos,  $\beta$ -cariofileno como constituintes principais, enquanto que o óleo essencial de origem da Malásia rico em monoterpenos e monoterpenos oxigenados (85%) contém  $\alpha$ -pineno (14,7%),  $\beta$ -pineno (2,3%),  $\beta$ -cariofileno (13,8%),  $\beta$ -felandreno (27,7%) e  $\alpha$ -terpineol (5,5%) como os principais componentes (Figura 3) (DIKUI, 2009).



**Figura 3 – Principais compostos do óleo essencial de curry**

**Fonte: Autoria própria.**

## 2.7 HIV-1 PROTEASE

As enzimas são proteínas especializadas em catalisar reações químicas específicas. Dentre as enzimas existentes têm-se as proteases, estas são capazes

de hidrolisar as ligações peptídicas de outras proteínas clivando-as em aminoácido menores (INSTITUTO DE QUÍMICA DA USP, 2014).

A HIV protease é a responsável pelo processamento das poliproteínas denominadas gag e gag-pol, levando a formação das proteínas estruturais e funcionais do vírus. A inativação da protease, em estudos de mutagênese sítio dirigida ou pela utilização de inibidores de protease, demonstrou a incapacidade das partículas virais formadas de se replicar, produzindo, após a etapa de “brotamento”, apenas vírions não infectivos nos linfócitos T infectados, o que resulta em efeito terapêutico antiviral significativo (PEÇANHA & ANTUNES, 2002).

Tanto a enzima HIV-1 protease quanto a pepsina possuem a sequência de resíduos Asp-Thr-Gli, uma geral semelhança da estrutura primária, a inibição pela pepstatina A (um inibidor seletivo de proteases aspárticas) através de mutação do sítio ativo Asp-25 sugerem que a pepsina pode ser utilizada como modelo na busca de inibidores de HIV-1 protease (SINGH et al., 2013).

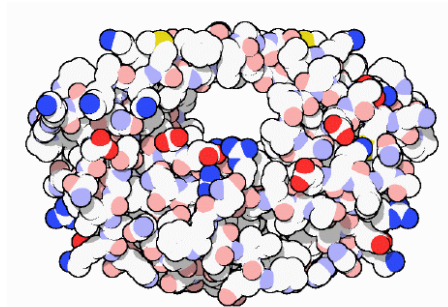
A pepstatina, um conhecido inibidor de pepsina obtido a partir de fermentação microbiológica, foi o primeiro inibidor da HIV-1 protease. Atualmente estão disponíveis comercialmente dez inibidores de protease, são eles: amprenavir (Agenerase), saquinavir (Invirase), ritonavir (Norvir), lopinavir/ritonavir (Kaletra), indinavir (Crixivan), nelfinavir (Viracept), atazanavir (Reyataz), tipranavir (Aptivus), fosamprenavir (Lexiva) e darunavir (Prezista) (MARTINS, 2007).

Portanto, entre as várias proteases existentes, a pepsina tem uma atividade proteolítica bastante semelhante à enzima HIV-1 protease (BRIK e WONG, 2003), uma enzima-chave do ciclo de vida do vírus HIV-1. Por isso, a pepsina tem sido utilizada por diferentes pesquisadores como uma substituta da HIV-1 protease para verificar a atividade anti-HIV de extratos vegetais e/ou produtos sintéticos (GOPINATH et al., 2014; GOVINDAPPA et al., 2011).

Como muitos vírus, o HIV possui muitas proteínas de cadeia longa, sendo várias encadeadas. Desse modo, a HIV-1 protease tem o trabalho de cortar as poliproteínas em pedaços menores, que tenham tamanho apropriado de proteína. É necessário que a poliproteína esteja intacta no início do ciclo de vida do vírus, quando se monta a sua forma imatura. Em seguida, a poliproteína deve ser clivada em pedaços adequados para formar o vírus maduro, que pode então infectar uma nova célula. Essas reações de clivagem devem ser perfeitamente cronometradas, permitindo que o vírus imaturo monte corretamente a poliproteína antes dela ser

quebrada. Devido à sua função essencial e sensível, a HIV-1 protease é um excelente alvo para a terapia anti-HIV. Fármacos que bloqueiam a ação da HIV-1 protease faz com que o vírus morra porque é incapaz de amadurecer em sua forma infecciosa.

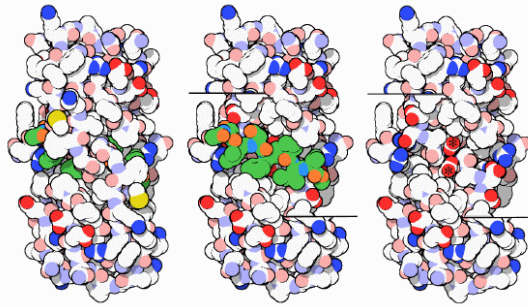
A HIV-1 protease é uma pequena enzima, composta por duas cadeias de proteínas idênticas, cada uma com apenas 99 aminoácidos. As duas cadeias se juntam para formar um túnel (Figura 4), coberta por duas "abas flexíveis". As abas se abrem e a enzima envolve uma cadeia de proteína, fechando e segurando-a firmemente no túnel.



**Figura 4. Estrutura tridimensional da enzima HIV-1 protease (PDB 7HVP).  
Fonte: Protein Data Bank**

O sítio ativo da HIV-1 protease (PDB 7HVP) está no centro do túnel, onde uma molécula de água é utilizada para quebrar cadeias de proteínas. Na Figura 5, à direita, as abas foram removidas para mostrar o sítio ativo. A ilustração mostra o centro de localização de um inibidor (verde), que é semelhante à posição ocupada por uma cadeia de proteína. (Não há estruturas de uma proteína ligada à forma ativa da HIV-1 protease, porque a cadeia seria clivada antes que a estrutura pudesse ser montada. Então, é preciso olhar e imaginar como os inibidores ligam-se à cadeia da proteína). Observe como a cadeia de inibidor é esticada em linha reta através do sítio ativo. Dois resíduos de aspartato, mostrados com asteriscos, fazem todo o trabalho, atacando a cadeia de proteína no próprio meio (RCSB PROTEIN DATA BANK, 2015).

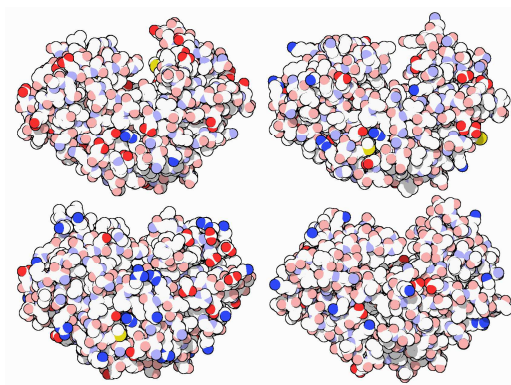




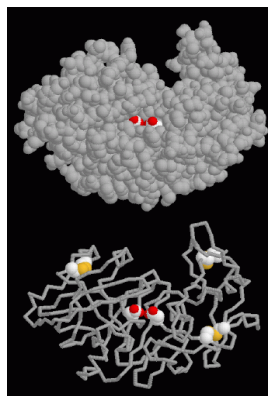
**Figura 5. Representações do processo de inibição da HIV-1 protease.**  
**Fonte: Protein Data Bank**

A pepsina é um exemplo de um grupo de enzimas denominadas proteases ácidas. A pepsina trabalha melhor em condições estramente ácidas. Mas a semelhança com outras enzimas como a HIV-1 protease refere-se a um segundo tipo de ácido. Como dito anteriormente, o local ativo das proteases ácidas depende de dois aminoácidos asparticos, que ativam uma molécula de água para clivar cadeias proteicas (RCSB PROTEIN DATA BANK, 2015).

Assim, a pepsina utiliza um par de resíduos de aspartato para realizar a reação de clivagem da proteína, que é um mecanismo semelhante ao utilizado pela protease de HIV. Na Figura 6 os aspartatos presentes no sítio ativo da enzima HIV-1 protease (PDB 5PEP) são vistos como esfera espacial compacta colorida em branco e vermelho. Na Figura 7, três pontes de dissulfeto também são mostradas. Estas ligações transversais, formados entre átomos de enxofre (amarelo) em aminoácidos cisteína, fortalecem a cadeia de proteína (RCSB PROTEIN DATA BANK, 2015).

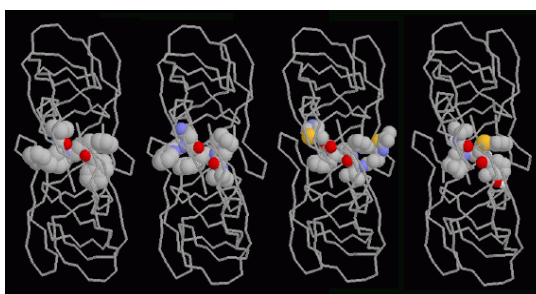


**Figura 6. Diferentes representações da HIV-1 protease (PDB 5PEP).**  
**Fonte: Protein Data Bank**



**Figura 7. Representações de resíduos de cisteína presentes estabelecendo pontes de dissulfeto na HIV-1 protease (PDB 5PEP).**  
**Fonte: Protein Data Bank**

Atualmente, quatro fármacos que inibem a HIV-1 protease estão sendo usados para tratar pessoas infectadas com o vírus. Na Figura 8, a enzima é apresentada como uma fita, que segue as duas cadeias de proteínas, e os fármacos são mostrados como modelo espacial compacto. Da esquerda para a direita, os fármacos são Indinavir (PDB 1HSG), Saquinavir (PDB 1HXB), Ritonavir (PDB 1HXW) e Nelfinavir (PDB 1OHR). Observa-se que esses fármacos são semelhantes, possuem grandes esqueletos carbônicos interagindo com os lados do túnel do sítio ativo. Todos os fármacos imitam a ligação de uma cadeia de proteína à enzima. Porém, os fármacos são mais estáveis do que uma cadeia de proteína. A HIV-1 protease não pode clivá-los, de forma que ficam alojados no sítio ativo, bloqueando a função normal da enzima (RCSB PROTEIN DATA BANK, 2015).



**Figura 8. Representações de fármacos comerciais interagindo com a HIV-1 protease.**  
**Fonte: Protein Data Bank**

Como para outras proteases aspárticas, a configuração absoluta das hidroxilas é fundamental para a atividade inibitória da HIV-1 protease. Assim, inibidores apresentando o álcool secundário com configuração *S* apresentaram potência farmacológica mais elevada que seu isômero *R*.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito dos óleos essenciais de *Zingiber officinalis* (gengibre), *Murraya koenigii* (curry) e *Coriandrum sativum* (coentro) sobre a atividade da enzima pepsina, utilizada como modelo para busca de inibidores de HIV-1 protease *in vitro*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito dos óleos essenciais de *Zingiber officinale* (gengibre), *Murraya koenigii* (curry) e *Coriandrum sativum* (coentro) sobre a enzima pepsina, utilizada como modelo para a busca de inibidores de HIV-1 protease *in vitro*;
- Estudar a composição química dos óleos essenciais de *Zingiber officinale* (gengibre), *Murraya koenigii* (curry) e *Coriandrum sativum* (coentro) por Ressonância Magnética Nuclear;
- Correlacionar, de forma qualitativa, os efeitos inibitórios da enzima HIV-1 protease aos constituintes dos óleos essenciais de *Zingiber officinale* (gengibre), *Murraya koenigii* (curry) e *Coriandrum sativum* (coentro);
- Contribuir para o estudo de produtos naturais com potencialidade para o controle do vírus HIV.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 ANÁLISE QUÍMICA DOS CONSTITUINTES

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (300,06 MHz) e RMN de  $^{13}\text{C}$  RMN (75,45 MHz) dos óleos essenciais adquiridos de fonte comercial foram registrados em um espectrômetro Mercuri-300BB utilizando  $\text{CDCl}_3$  como solvente. Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram registrados em ppm e os espectros foram referenciados utilizando os sinais do  $\text{CDCl}_3$  ( $\delta$  7,27 para  $^1\text{H}$  e 77,00 para  $^{13}\text{C}$ ). As análises foram realizadas na Universidade Estadual de Maringá (UEM).

### 4.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE INIBIDORA DE PEPSINA

A avaliação da inibição da pepsina foi realizada como descrito por Singh et al. (2011) em conjunto com o método descrito por Sang-Duck Yang e Dong-Heui Yi (1987).

#### 4.2.1 Preparo das soluções

Solução de pepsina (Marca: Vetec; lote: 1204704) - Preparou-se uma solução de 20 g de pepsina em 10 mL de água destilada.

Solução de caseína (Marca: Dinâmica; lote: 52454) - Pesou-se 5 g de caseína e dissolveu-se em 500 mL de uma solução tampão de 0,1 mol/L de  $\text{NaHPO}_4$  (pH 6,4). A solução foi aquecida a 30 °C por 30 minutos e centrifugada a 14000 rpm por 20 minutos. A fase sobrenadante foi utilizada nos testes de inibição da pepsina.

#### 4.2.2 Teste inibidor de pepsina

Resumidamente, a mistura reacional foi preparada com 5 mL de solução de pepsina, 2 mL de solução de caseína e 0,2 mL de solução de cada óleo essencial

em acetato de etila (1000 ppm). Preparada a mistura, a mesma foi incubada a 37 °C durante 30 min. Após a incubação, 0,2 µl de ácido tricloroacético (Marca: Vetec; lote: 1201251) 20% foi adicionado para parar a reação. A mistura foi em seguida centrifugada a 14000 rpm durante 5 minutos e o sobrenadante foi recolhido e então filtrado. Após isso, 0,5 mL do filtrado, 2,5 mL de 0,55 M de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Marca: Neon; lote: 9110) e 0,5 mL de reagente de Folin (Marca: Dinâmica; lote: 46356) foram adicionadas em tubos de ensaio para formar um complexo colorido (azul) e então determinou-se a absorção da mistura, em 650 nm, utilizando um espectrofotômetro da marca PG Instruments Ltda.

O cálculo de inibição foi realizado da seguinte maneira:

$$\% \text{ Inibição} = ((\text{Abs. do controle} - \text{Abs. da amostra}) / \text{Abs. do Controle}) \times 100$$

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

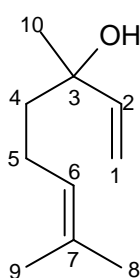
### 5.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

O objetivo inicial foi estudar a composição química dos óleos essenciais de *Zingiber officinale* (gengibre), *Murraya koenigii* (curry) e *Coriandrum sativum* (coentro) através da análise de espectros de RMN de  $^1\text{H}$ .

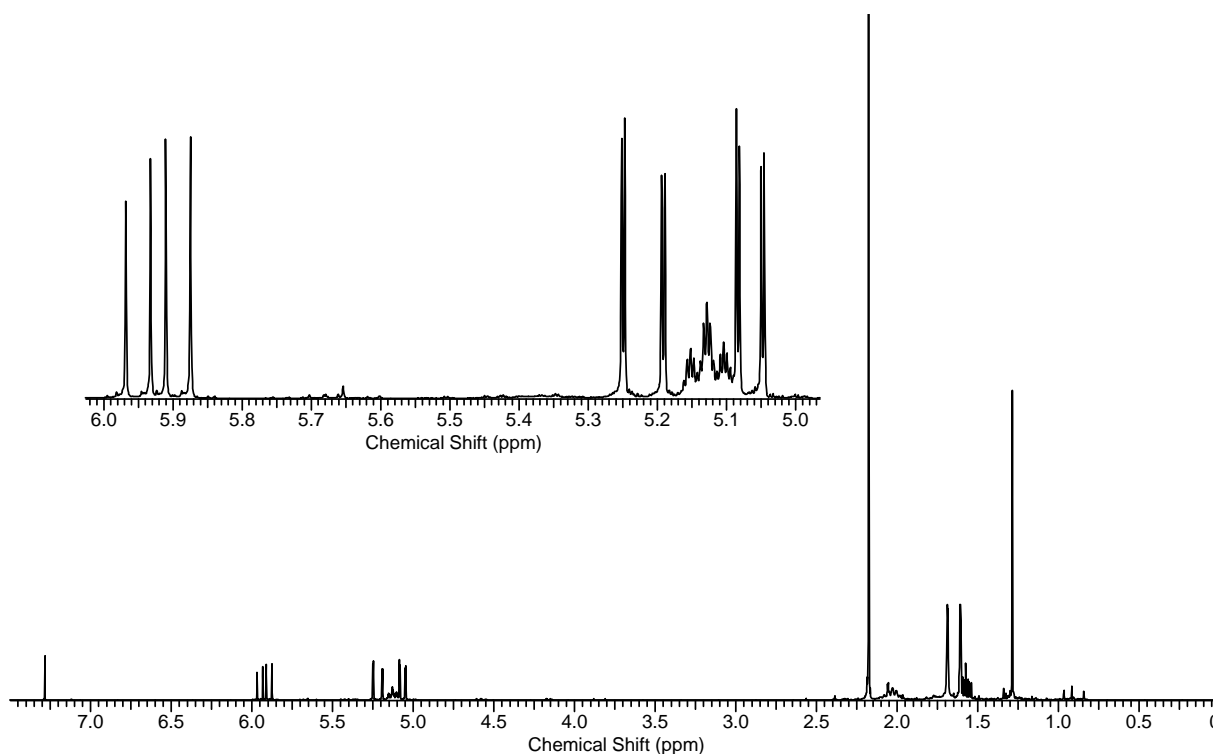
A Ressonância Magnética Nuclear é uma técnica analítica que pode ser utilizada tanto para sólidos, quanto para líquidos, sem alterar a amostra e sem produzir resíduos perigosos. Esta técnica possui várias vantagens, tais como: análise química composicional e identificação estrutural dos componentes funcionais nos alimentos, determinação da composição e formulação de materiais de embalagem, detecção de autenticação de alimentos, otimização de parâmetros de processamento de alimentos e inspeção microbiológica, como também a qualidade física e química dos alimentos (ALMOSELHY et al., 2014).

A composição química do óleo essencial de *Coriandrum sativum* (coentro) foi investigada por meio de ressonância magnética nuclear. A partir da análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 9), observou-se que o óleo essencial de coentro apresentou o linalol como composto majoritário, estando de acordo com o indicado no rótulo do produto comercial. Este álcool monoterpênico foi identificado utilizando como base para análise dos deslocamentos químicos os dados de RMN de  $^1\text{H}$  reportados por Xin et al. (2013).

*Linalol* - RMN de  $^1\text{H}$  (300,06 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  5,91 (dd, 1H  $J = 17,3$  e 10,8 Hz, H-2); 5,21 (dd, 1H  $J = 17,3$  e 1,3 Hz, H-1 *trans*); 5,11 (tq, 1H  $J = 7,2$  e 1,4Hz, H-6); 5,06 (dd, 1H  $J = 10,8$  e 1,3 Hz, H-1 *cis*); 1,68 (s, 3H, H-9); 1,60 (s, 3H, H-8); 1,28 (s, 3H, H-10).



**Linalol**



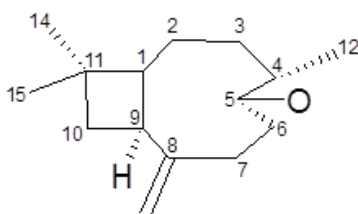
**Figura 9 - Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (300,06 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do óleo essencial de coentro.**

**Fonte: Autoria própria**

O óleo essencial de *Murraya koenigi* (curry), de acordo com as informações fornecidas pelo fabricante, deveria conter os seguintes constituintes: β-cariofileno, biciclogermacreno, óxido de cariofileno, α-humuleno, α-cadinol e β-selineno. Porém, a partir da análise do espectro do RMN de <sup>1</sup>H (Figura 10), foram identificados apenas o β-cariofileno, óxido de cariofileno e α-humuleno. Além destes, outros compostos descritos na literatura como constituintes do óleo de curry foram identificados: α-pineno, β-felandreno e α-terpineol. O compostos identificados por RMN de <sup>1</sup>H estão concordantes com os dados reportados por Romero (2007); Grau & Mecking (2013) e Baptistella et al. (2009).

*β-cariofileno* - RMN de <sup>1</sup>H (300,06 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 0,98 (s); 1,03 (s); 4,83 (sl); 4,95 (sl); 5,31 (m).

*Óxido de cariofileno* - RMN de <sup>1</sup>H (300,06 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1,00 (s); 1,23 (s); 2,62 (q); 2,89 (dd, *J* = 10,6 e 4,0 Hz); 4,87 (d, *J* = 1,28 Hz); 4,95 (d, *J* = 1,28 Hz).



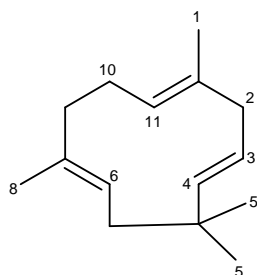
**Óxido de cariofileno**

*β-felandreno* - RMN de  $^1\text{H}$  (300,06 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  6,17 (dd,  $J = 10,0$  e  $2,7$  Hz); 7,76 (m); 4,73 (m); 0,94 (d,  $J = 7,0$  Hz); 0,93 (d,  $J = 7,0$  Hz).

*α-pineno* - RMN de  $^1\text{H}$  (300,06 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  0,83 (s); 1,25 (s); 1,64 (d,  $J = 1,28$  Hz); 5,19 (s).

*α-terpineol* - RMN de  $^1\text{H}$  (300,06 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1,18 e 1,20 (s); 1,66 (sl); 5,38 (m).

*α-humuleno* - RMN de  $^1\text{H}$  (300,06 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1,16 (s), 1,69 (s); 2,56 (d, H-2); 5,44 (m, H-6).



***α-humuleno***



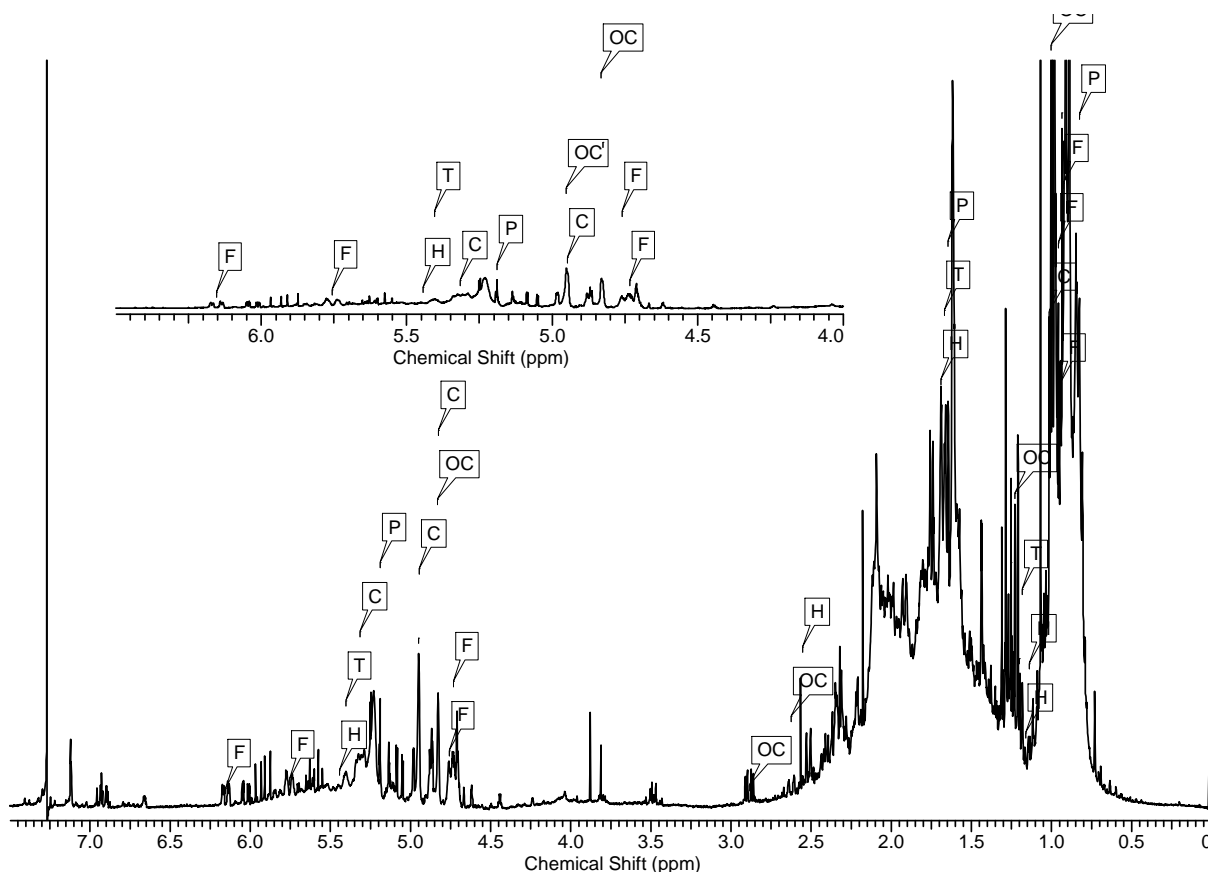
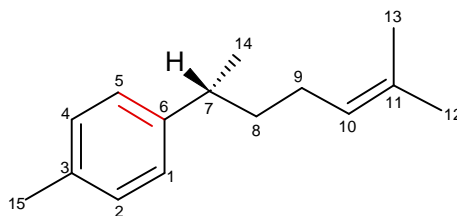


Figura 10 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300,06 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do óleo essencial de curry.

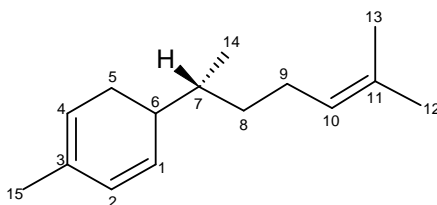
Fonte: Autoria própria

A composição química do óleo essencial de *Zingiber officinale* (gingibre) foi investigada por meio de RMN de  $^1\text{H}$  e RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 11 e 12). Segundo informações do fabricante este óleo essencial possui como compostos majoritários o zingibireno,  $\beta$ -sesquifelandreno, canfeno,  $\alpha$ -farneseno e limoneno. Porém, a análise realizada mostrou que o óleo comprado não apresenta o composto que deveria estar em maior quantidade, o zingibereno (30% a 33%), assim como também não apresenta o  $\beta$ -sesquifelandreno e o  $\alpha$ -farneseno. O composto majoritário encontrado foi o ar-curcumeno, que não estava indicado no rótulo e nem se encontra na literatura, porém possui uma estrutura bastante semelhante ao do zingibereno, possuindo apenas uma dupla a mais entre o carbono 5 e 6, classificando-se como composto aromático como se pode ver na figura 11. O canfeno e limoneno foram encontrados no espectro, além do  $\beta$ -bisaboleno e cineol descrito na literatura como constituinte do óleo de gengibre, a descrição da análise de RMN de  $^1\text{H}$  foi comparada com Skakovsky et al., 2013 e se encontra a seguir.

*Ar-curcumeno* - RMN de  $^1\text{H}$  (300,06 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1,23 (d, 3H,  $J = 7,0$ , H-14); 1,60 (s, 3H, H-13); 1,68 (s, 3H, H-12); 2,33 (s, 3H, H-15); 2,67 (sext., 1H,  $J = 7,1$ , H-7); 5,11 (tm, 1H,  $J = 7,0$ , H-10); 7,08 (d, 2H,  $J = 8,3$ , H-1 e H-5); 7,11 (d, 2H,  $J = 8,3$ , H-2 e H-4).



**Ar-curcumeno**

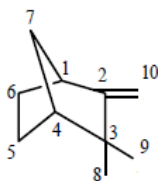


**Zingibereno**

**Figura 11 – Comparação das estruturas do ar-curcumeno e zingibereno**

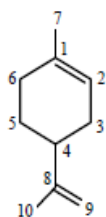
**Fonte: Autoria própria**

*Canfeno* - RMN de  $^1\text{H}$  (300,06 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1,04 (s, H-9, 1H); 1,07 (s, H-8, 3H); 4,50 (sl, H-10, 1H); 4,75 (sl, H-10, 1H).



**Canfeno**

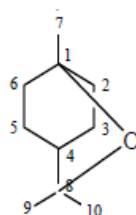
*Limoneno* - RMN de  $^1\text{H}$  (300,06 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1,67 (s, H-7, 3H); 1,75 (s, H-10, 3H); 4,73 (sl, H-9, 2H); 5,42 (sl, H-2, 1H).



**Limoneno**

*β-bisaboleno* - RMN de  $^1\text{H}$  (300,06 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1,27 (dt, 2H); 1,62 (s, 3H, H-13); 1,70 (s, 3H, H-15); 1,77 (m, 9H); 4,75 (s); 4,77 (s, 1H, H-14a); 5,13 (dd,  $J = 7,0$  e  $5,7$ , 1H, H-7).

*Cineol* - RMN de  $^1\text{H}$  (300,06 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  0,93 (s, H-7, 3H); 1,15 (s, 3H, H-13); 1,70 (s, 3H, H-15); 1,77 (m, 9H); 4,75 (s); 4,77 (s, 1H, H-14a); 5,13 (dd,  $J = 7,0$  e  $5,7$ , 1H, H-7).



**Cineol**

Os dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 12) são concordantes com os dados obtidos no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , cujos deslocamentos químicos foram atribuídos de acordo com Diastuti et al. (2014):

*Ar-curcumeno* - RMN de  $^{13}\text{C}$  (75,45 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  17,6 (C-13); 20,9 (C-15); 22,4 (C-14); 25,7 (C-12); 26,0 (C-9); 38,4 (C-8); 126,8 (C-1 e C-5); 128,9 (C-2 e C-4); 135,0 (C-3).

*Canfeno* - RMN de  $^{13}\text{C}$  (75,45 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  24,5 (C-6); 26,6 (C-10); 29,6 (C-7); 30,1 (C-9); 38,1 (C-8); 42,5 (C-4); 47,6 (C-2); 48,8 (C-5); 99,8 (C-11).

*Limoneno* - RMN de  $^{13}\text{C}$  (75,45 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  21,5 (C-10); 24,1 (C-7); 31,5 (C-3); 109,1 (C-9); 134,3 (C-1);.

*β-bisaboleno* - RMN de  $^{13}\text{C}$  (75,45 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  39,7 (C-1); 25,7 (C-2); 30,8 (C-3); 133,7 (C-4); 124,3 (C-5); 31,4 (C-6); 120,8 (C-7); 28,4 (C-8); 34,9 (C-9); 154,3 (C-10); 131,5 (C-11); 25,7 (C-12); 17,7 (C-13); 107,1 (C-14); 23,4 (C-15).

*Cineol* - RMN de  $^{13}\text{C}$  (75,45 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  23,3 (C-4); 28,1 (C-8); 29,4 (C-10); 70,2 (C-9); 74,1 (C-2).

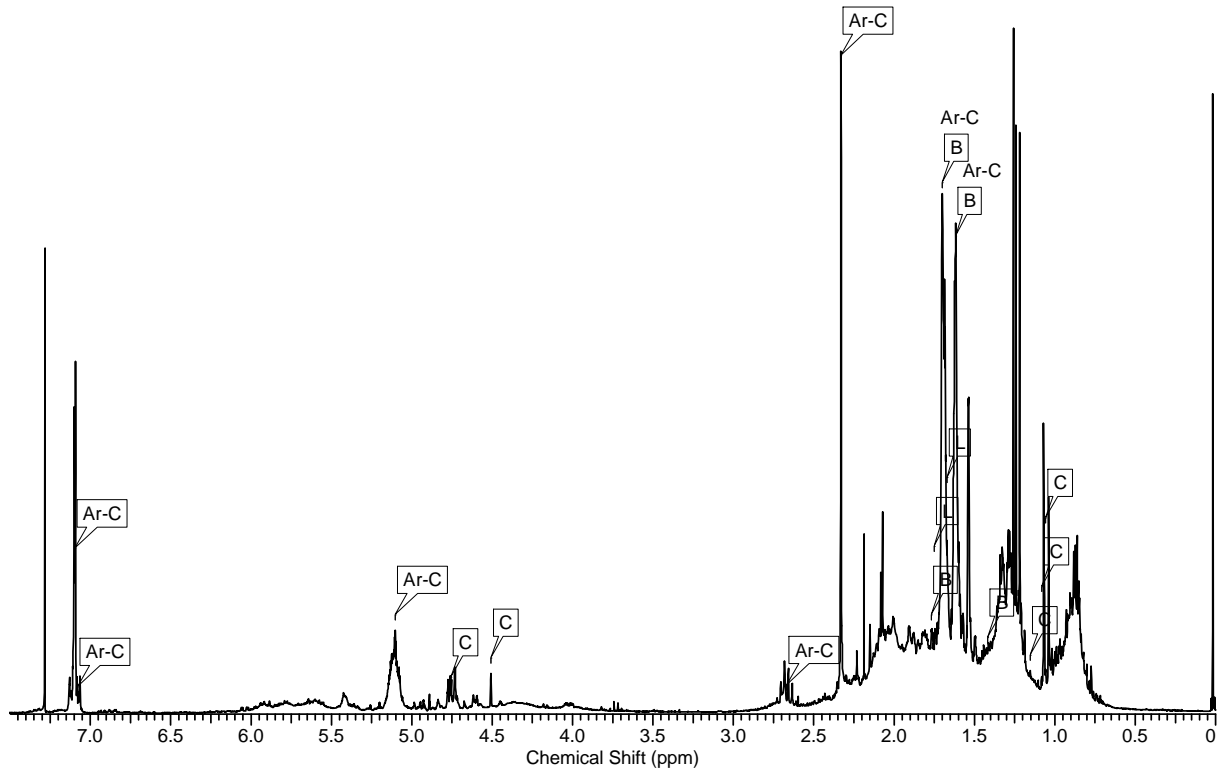


Figura 12 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300,06 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do óleo essencial de *Zingiber officinalis* (gingibre).

Fonte: Autoria própria

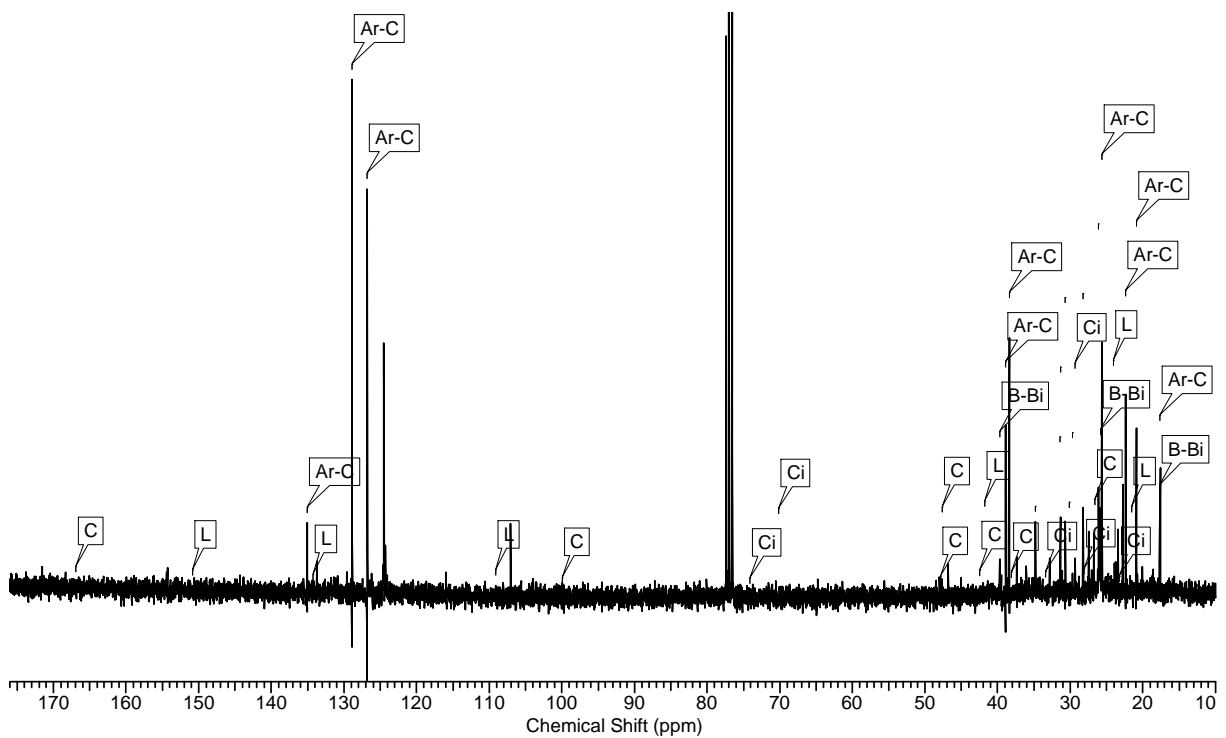


Figura 13 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75,45 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do óleo essencial de *Zingiber officinalis* (gingibre).

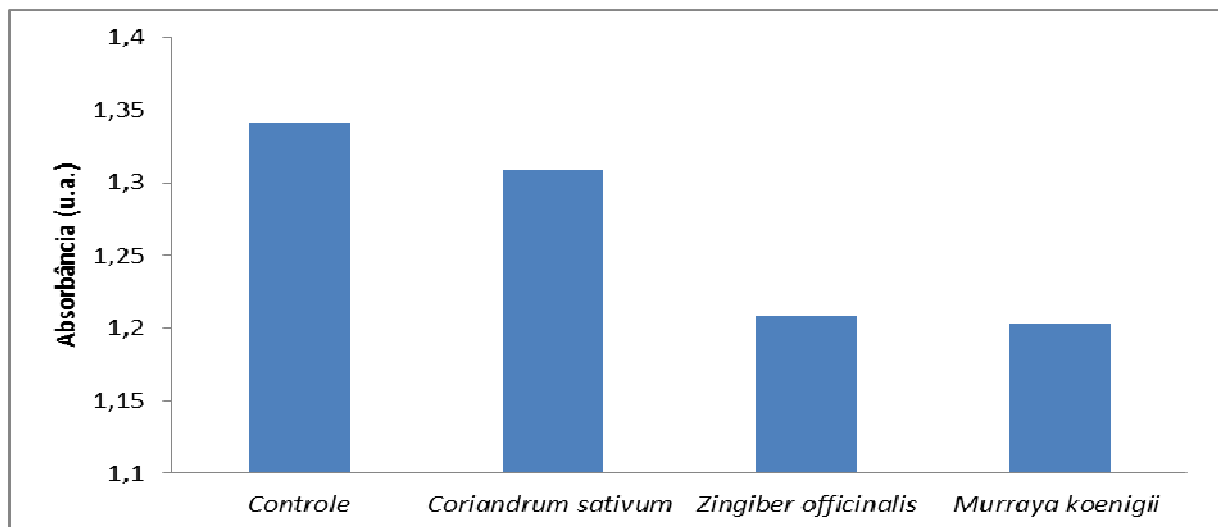
Fonte: Autoria própria

## 5.2 TESTE INIBIDOR DE PEPSINA

O teste inibidor de pepsina foi realizado em triplicata para cada óleo essencial em uma concentração de 1000 ppm e em seguida foi realizada a leitura das misturas em um espectrofotômetro a 650 nm. Os resultados encontram-se na tabelas e gráficos mostrados a seguir.

**Tabela 1. Absorbância dos óleos essenciais de *Coriandrum sativum* (coentro), *Zingiber officinalis* (gengibre) e *Murraya koenigii* (curry).**

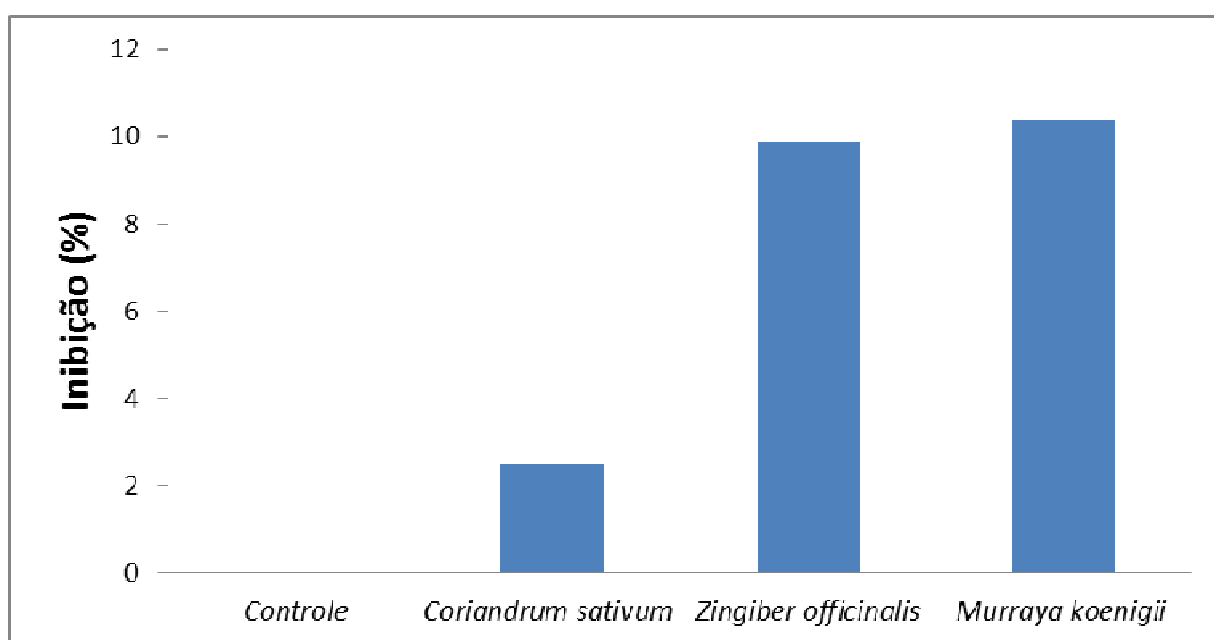
Amostra	Absorbância (u.a.)
Controle	1,342
<i>Coriandrum sativum</i>	1,309
<i>Zingiber officinalis</i>	1,208
<i>Murraya koenigii</i>	1,203



**Figura 14 - Absorbância dos óleos essenciais de *Coriandrum sativum* (coentro), *Zingiber officinalis* (gengibre) e *Murraya koenigii* (curry).**

**Tabela 2. Percentual de inibição dos óleos essenciais de *Coriandrum sativum*, *Zingiber officinalis* e *Murraya koenigii***

<b>Amostra</b>	<b>Inibição (%)</b>
Controle	<b>0,00</b>
<i>Coriandrum sativum</i>	<b>2,48</b>
<i>Zingiber officinalis</i>	<b>9,89</b>
<i>Murraya koenigii</i>	<b>10,36</b>



**Figura 15 - Percentual de inibição dos óleos essenciais de *Coriandrum sativum*, *Zingiber officinalis* e *Murraya koenigii***

Como se pode ver nos dados obtidos e mostrados nas tabelas 1 e 2 e gráficos 13 e 14, ambos os óleos apresentaram baixo poder de inibição da enzima HIV-1 protease. O óleo essencial da *Murraya koenigii* foi o que apresentou maior inibição da enzima, seguido do *Zingiber officinalis* e *Coriandrum sativum*. A baixa inibição pode ser atribuída ao fato de alguns constituintes principais destes óleos não estarem realmente presente no produto comprado, como comprovado pelas análises de RMN de  $^1\text{H}$  e RMN de  $^{13}\text{C}$ .

O baixo efeito inibitório observado nos testes *in vitro* pode ser explicado a partir do entendimento do mecanismo de ação de enzimas aspartilproteases, tal como a pepsina e HIV-1 protease. No caso da HIV-1 protease o sítio ativo possui dois aminoácidos aspartato 25, um em cada cadeia da enzima, e os aminoácidos treonina 26 e glicina 27, cuja catálise é auxiliada por moléculas de água presentes no sítio ativo (IAMARINO, 2012, p. 29). A quebra da ligação peptídica catalisada pela HIV-1 protease iniciada por um ataque nucleofílico de uma molécula de água que interage com os aspartatos, à carbonila da ligação peptídica a ser clivada dando origem a um intermediário tetraédrico. Desta forma, compostos que mimetizam o intermediário tetraédrico, ou seja que possuem semelhança estrutural com compostos carbonilados, impedem que a enzima hidrólise seu substrato (MOTWANI et al., 2015).

Correlacionando, de forma qualitativa, os resultados dos testes *in vitro*, a composição química dos três óleos avaliados e o mecanismo de atuação da enzima HIV-1 protease observa-se que os compostos presentes nesses produtos naturais não possuem características moleculares favoráveis ao estabelecimento de interações favoráveis com resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo e/ou sítio alostérico que impensa a atuação da enzima estudada. É importante salientar que não é possível afirmar, apenas com os dados apresentados, que óleos essenciais avaliados não possuem atividade anti-HIV. Mas, que o possível efeito anti-HIV destes óleos essenciais pode estar associado a inibição enzimática de outras enzimas atuantes no ciclo replicativo do vírus.

## 6 CONCLUSÃO

Os óleos essenciais estudados mostraram não ter potencial para inibir a HIV-1 protease na maior concentração recomendada (1000 ppm). Os estudos por Ressonância Magnética Nuclear permitiram verificar que a composição dos óleos estudados é diferente daquela informada nos rótulos dos produtos.

Conclui-se que o presente trabalho contribuiu para o estudo de produtos naturais no sentido de outros pesquisadores não mais focar nestes óleos para a inibição da enzima HIV-1 protease, mas procurar novos óleos que tenham potencialidade ou até mesmo de testar os mesmos óleos com intuito de inibir outras enzimas utilizadas no ciclo de replicação do vírus, como a transcriptase reversa e HIV integrase. Desta forma, os resultados apresentados não exclui a possibilidade dos óleos avaliados apresentarem atividade anti-HIV com mecanismo de ação baseado na inibição de outras enzimas do ciclo replicativo do vírus.



## REFERÊNCIAS

ALMOSELHY, Rania I.M.; ALLAM, Magda H.; EL-KALYOUNI M.H.; EL-SHARKAWY A.A. H NMR spectral analysis as a new aspect to evaluate the stability of some edible oils. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 59, n. 2, p. 201–206, dec. 2014.

ALVES, Rodrigo S. et al. **Atividade antifúngica de óleo essencial de plantas aromáticas frente a diferentes espécies de candida isoladas de pacientes portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA)**. 49º Congresso Brasileiro de Química: A Química e a sustentabilidade. Porto Alegre, 2009. Disponível em: <http://www.abq.org.br/cbq/2009/trabalhos/7/7-533-3146.htm>. Acesso em: 18 out. 2014.

ARAÚJO, Catarina A. C.; LEON, Leonor L. Atividades biológicas da *Curcuma longa* L. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 5, p. 723-728, 2001.

BAPTISTELLA, Lúcia H. B. et al. Preparação do (+)- $\alpha$ -terpineol a partir do (+)-limoneno: monoterpenos de odor agradável em um projeto para química orgânica experimental. **Química Nova**, v. 32, n. 4, 2009.

BICCHI, Carlo et al. HIV-1 inhibiting activity of the essential oil of *Ridolfia segetum* and *Oenanthe crocata*. **Planta Medica**, v. 75, n. 12, p. 1331-5, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e AIDS. Boletim Epidemiológico – AIDS e DST Ano II – nº 1 – dez. 2013. Disponível em: [http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2013/55559/\\_p\\_boletim\\_2013\\_internet\\_pdf\\_p\\_\\_51315.pdf](http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2013/55559/_p_boletim_2013_internet_pdf_p__51315.pdf). Acesso em: 13 nov. 2014.

BRAZ FILHO, Raimundo. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 229-239, 2010.

BRIK, Ashraf; WONG, Chi-Huey. HIV-1 protease: mechanism and drug discovery. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 1, p. 5–14, 2003.

BRITO, Ana M. et al. AIDS e infecção pelo HIV no Brasil: uma epidemia multifacetada. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, p. 207-217, 2001.

CHANG J.S. Fresh ginger (*Zingiber officinale*) has anti-viral activity against human respiratory syncytial virus in human respiratory tract cell lines. **Jornal Ethnopharmacol**, v. 145, n. 1, p. 146-51, 2013.

CUNHA, Elaine F. F. da. **Estudos quantitativos de correlação estrutura-atividade em 3D e 4D de inibidores peptídicos da HIV-1 protease**. 2006. 194 f. (Dissertação Doutorado) – Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

DABAGUE, Isabel C. M. et al. Teor e composição de óleo essencial de rizomas de gengibre (*Zingiber officinale Roscoe*) após diferentes períodos de secagem. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 1, p. 79-84, 2011.

DIAS, Maria Inês M. F. **Caracterização química e molecular de amostras de *Coriandrum sativum* L. obtidas *in vivo* e *in vitro***. 2010/2011. Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia – Instituto Politécnico de Bragança – Escola Superior Agrária. Bragança, 2011.

DIASTUTI, Hartiwi et al. Antibacterial *Curcuma xanthorrhiza* Extract and Fractions. **Journal of Mathematical and Fundamental Sciences**, v. 46, n. 3, p. 224-234, 2014.

DIKUI, ZA I. B. M. **Extraction of essential oil from *Murraya koenigii* leaves using ultrasonic-assisted solvent extraction method**. Bachelor os Chemical Engineering (Gas Technology). Universiti Malaysia Pahang. 101 f., 2009. Disponível em: <http://umpir.ump.edu.my/718/>. Acesso em: 15 nov. 2014.

DONG, N. T. et al. Quantitative determination of psoralen and angelicin from some medicinal herbs by high performance liquid cromatography. **Archives of Pharmacal Research**, v. 26, n. 07, p. 516-520, 2003.

FALCÃO, Deborah Q.; MENEZES, Fábio S. Revisão etnofarmacológica, farmacológica e química do gênero Hyptis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 84, n. 3, p. 69-74, 2003.

FERREIRA, Roberta C. S. et al. HIV: mecanismo de replicação, alvos farmacológicos e inibição por produtos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, n. 8, 2010.

GAROZZO, Aldo et al. Anti-rhinovirus activity of 3-methylthio-5-aryl-4-isothazolecarbonitriles derivatives. **Antiviral Research**, v. 45, p. 199–210, 2000.

GOPINATH, S. M. et al. Isolation, Characterization and Purification of Bio-Active Compounds from *Andrographis paniculata* and *Cinnamon verum* for Anti-Hiv Activity. **International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology**, v. 3, n. 6, p. 13777- 13783, 2014.

GOVINDAPPA, Melappa; ANIL KUMAR, Nanjangud V.; SANTOYO, Gustavo. *Crotalaria pallida* extracts as a putative HIV-1 protease inhibitors. **Journal of Research in Biology**, v. 1, n. 4, p. 285-291, 2011.

GRAU, Etienne; MECKING, Stefan. Polyterpenes by ring opening metathesis polymerization of caryophyllene and humulene. **Green Chemistry**, v. 15, p. 1112-1115, 2013

IAMARINO, Atila. **Análise e Caracterização Molecular, Estrutural e Populacional de Proteases de HIV-1 do Estado de São Paulo**. 2012. 193 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Pulo, 2012.

INSTITUTO DE QUÍMICA DA USP. Disponível em:  
<http://www.iq.usp.br/bayardo/software/proteina/advanced/cap2/main2.html>. Acesso em: 15 nov. 2014

JORNAL AROMATOLOGIA. Disponível em:  
<http://www.ufjf.br/proplamed/files/2012/05/jornal-aromatologia.pdf>. Acesso em: 20 nov. 2015.

KAGAN, Ron M. et al. Structural analysis of an HIV-1 protease I47A mutant resistant to the protease inhibitor lopinavir. **Protein Science**, v. 14, p. 1870-1878, 2005.

KAMINSKI, M. et al. HPLC-DAD in identificacion and quantificacion of selected coumarins in crude extracts from plant cultures of *Ammi majus* and *Ruta graveolens*. **Journal of Separation Science**. v. 26, n. 14, p. 1287-291, 2003.

KASHIWADA, Yoshiki et al. Anti HIV activity of oleanolic acid, pomolic acid and structurally related triterpenoids. **Journal of Natural Products**, v. 61, p. 1090-1095, 1998.

LYRA, Cassandra S. de. **A aromaterapia científica na visão psiconeuroendocrinoimunológica – Um panorama atual da aromaterapia**

**clínica e científica no mundo e da psiconeuroendocrinoimunologia.** 2009. 194 f. (Dissertação Mestrado) – Departamento de Química Orgânica do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

MARTINS, Nádia H. **Ensaio de proteases de HIV-1 de subtipos brasileiros.** 2007. 119 f. Dissertação (Mestrado em Física aplicada) – Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo. São Carlos, 2007

MISHRA, Aushutosh et al. HIV drugs from natural sources. **Research Pharma.** v. 1 p. 93, 2009.

MOTWANI, Hitesh V. et al. Aspartic protease inhibitors containing tertiary alcohol transition-state mimics. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 90, p. 462-490, 2015.

OLIVEIRA, Rita Palmeira-de- et al. Formulações com óleos essenciais: desenvolvimento de um lápis medicamentoso de *Helichrysum italicum*. **Revista de Fitoterapia**, v. 11, n. 1, p. 33-42, 2011

PARMAR, Chiranjit; KAUSHAL, Mitesh K. *Murraya koenigii*. In: **Wild Fruits**. Kalyani Publishers, New Delhi, India. p. 45–48, 1982

PEÇANHA, Emerson P.; ANTUNES, Otávio A. C. Estratégias farmacológicas para terapia Anti-Aids. **Química Nova**, v. 25, n. 6B, p. 1108-1116, 2002.

PRIYANKA, Gupta et al. An update on *Murraya koenigii* Spreng: a multifunctional Ayurvedic herb. **Journal of Chinese Integrative Medicine**, v. 9, n. 8, p. 824-833. 2011.

RCSB PROTEIN DATA BANK. Disponível em:  
<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>. Acesso em: 30 nov. de 2015

RANA, Inder S.; SINGH, Aarti; GWAL, Rashmi: In vitro study of antibacterial activity of aromatic and medicinal plants essential oils with special reference to cinnamon oil. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, p. 376-380, 2011.

ROMERO, Adriano L. **Contribuição ao conhecimento químico do óleo-resina de copaíba: configuração absoluta de terpenos.** Dissertação (Mestrado em Química

Orgânica) – Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas. Campinas, fev. de 2007.

ROMERO, Adriano L.; ROMERO, Rafaelle B. **Síntese e avaliação da atividade antiviral do 1'S-1'-acetoxidiidrochavicol**. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pró-Reitoria de relações empresariais e comunitárias. Campo Mourão, jun. de 2013.

ROTHFELD, Glenn S.; LEVERT, Suzanne. **Medicina natural para doenças do coração: Os melhores métodos alternativos para prevenção e tratamento**. Ed. Cultrix. São Paulo, 2003.

SIANI, Antônio C. et al. Óleos essenciais: potencial antiinflamatório. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 16, p. 38-43, 2000.

SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida. Disponível em: <http://sida.roche.pt/virus/ciclovida.cfm>. Acesso em: 07 dez. 2014.

SILVA, Monalisa A. D. COELHO JÚNIOR, Luiz F.; SANTOS, A. P. Vigor de sementes de coentro (*Coriandrum sativum* L.) provenientes de sistemas orgânico e convencional. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14 n. Especial, p. 192-196, 2012.

SINGH Pal K., KUMAR Anil, PRASAD R. Pepsin assay one of the easiest approach for prescreening of HIV-1 protease inhibitors. **Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation**, v. 2, n. 1, p. 53-56, 2003.

SKAKOVSKY, Eugene D. et al. NMR analysis of the composition of the spruce needles essential oils, depending on the air pollution of various district in minsk. **Journal.asu.ru**. n. 3. p. 121–128, 2013.

SOOKKONGWAREE K. et al. Inhibition of viral proteases by Zingiberaceae extracts and flavones isolated from *Kaempferia parviflora*. **Pharmazie**, v. 61, n. 8, p. 717-21, 2006.

SOUSA, Marcus V. N. et al. (+)-Calanolida A, um promissor produto natural no combate à replicação do vírus HIV e da bactéria *Mycobacterium tuberculosis*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 89, n. 2, p. 125-130, 2008.

UNAIDS/WHO, Joint United Nations Programme on HIV/AIDS/World Health Organization, AIDS, epidemic update: Geneva, dez. 2007. Disponível em:

<http://www.who.int/hiv/pub/epidemiology/epiupdate2007/en/>. Acesso em: 10 out. 2014.

VANDANA Jain, MUNIRA Momin, KIRTI Laddha. Murraya Koenigii: An Updated Review. **International Journal Of Ayurvedic And Herbal Medicine**, v. 2, n. 4, p. 607-627, 2012.

XAVIER INNOCENT, B.; SYED, M.; DHANALAKSHM. Studies on the immunostimulant activity of *Coriandrum sativum* and resistance to eromonas hydrophila in *Catla catla*. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 1, n. 07, p. 132-135, 2011

XIN, Liu C. et al. Identification of repellent and insecticidal constituents of the essential oil of *Artemisia rupestris* L. aerial parts against *Liposcelis bostrychophila* Badonnel. **Molecules**, v. 18, n. 9, p. 10733–10746, 2013.

WU, Xiaolin et. al. Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. **Science**, v. 300, p. 1749–1751, 2003.

YANG, Sang-Duck; YI, Dong-Heui. Purification and Properties of Pepsin inhibitor from *Streptomyces* sp. YH-276. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 2, p. 13-18, 1987.