

Estudos *in silico* dirigidos e *docking* molecular de constituintes químicos isolados de *Sinningia magnifica* (Gesneriaceae) frente à proteína quinase C (PKC) *alpha*

Palavras-Chave: *Sinningia magnifica*, PKC *alpha*, *docking* molecular

Autores:

Jullyane Gabryelly de Jesus [UNICAMP]

Carlos Jose Alvarez Cantero [UNICAMP]

Prof. Dr. Marcos José Salvador (orientador) [UNICAMP]

1. INTRODUÇÃO

Sinningia magnifica (Otto & A. Dietr.) Wiehler (Gesneriaceae) é uma planta que apresenta constituintes químicos promissores para o uso terapêutico. Dentre as substâncias reportadas como constituintes presentes nessa planta estão o ácido betulínico (terpenóide), calceolariosídeo B (glicosídeo fenólico), dunnioleína (naftoquinona), haleridona (etilcicloexanóide), tectoquinona (antraquinona), tirosol (substância fenólica), 1-hidroxitectoquinona (antraquinona), 1,6-dihidroxitectoquinona (antraquinona), 7-hidroxitectoquinona (antraquinona), 7-hidroxi- α -dunnioleína (naftoquinona), 8-hidroxi-dunnioleína (naftoquinona), 7-hidroxi-6-metoxi-tectoquinona (antraquinona) e 7-hidroxi-6-metoxi- α -dunnioleína (naftoquinona) (Serain *et al.*, 2021). Entre os diferentes grupos químicos citados, as quinonas destacam-se como substâncias com potenciais efeitos anticancerígenos e anti-inflamatórios (Gambhir *et al.*, 2014).

Apesar dos resultados biológicos satisfatórios com extratos de *S. magnifica*, estudos *in silico* de previsão farmacológica dos principais constituintes químicos de *S. magnifica* não foram encontrados em literatura até o presente momento. Os estudos *in silico* estão baseados em sistemas computacionais que estocam e manipulam estruturas químicas de interesse farmacológico. As informações obtidas *in silico* relacionadas a essas estruturas configuram uma ferramenta relativamente rápida e barata na descoberta de novos fármacos se comparadas com os métodos tradicionais de pesquisa em laboratório. Métodos computacionais e análises *in silico* têm sido utilizados crescentemente na identificação de proteínas-alvo de biomoléculas obtidas de produtos naturais. Baseado nisso, neste estudo procedeu-se a realização de análises de acoplamento molecular das relações entre substâncias reportadas para *S. magnifica* e a proteína quinase C isoforma *alpha* (PKC α). As PKCs são um importante alvo terapêutico por seus papéis como promotores tumorais, em doenças neurodegenerativas e diabetes (Silva *et al.*, 2009; Mochly-Rosen *et al.*, 2012; Rui *et al.*, 2017; Geribaldi-Doldán *et al.*, 2019). A PKC α modula diversos processos celulares, incluindo proliferação e crescimento tumoral, bem como diferenciação, motilidade e sobrevivência (Garg *et al.*, 2014). PKC α desempenha um papel central, por exemplo, na progressão do câncer de próstata, sendo super expressa em linhagens de células de câncer próstata mais agressivo (Cooke *et al.*, 2022).

Pesquisas prévias envolvendo glicosídeos feniletanóides extraídos de plantas da família Scrophulariaceae mostraram que estas tipo de substâncias possuem atividade inibitória *in vitro* sobre as PKC α (Zhou *et al.*, 1998). O calceolariosídeo B é um representante dos glicosídeos fenólicos isolados em plantas do gênero *Sinningia*. Em vista disso, substâncias presentes no gênero *Sinningia* com as mesmas características químicas poderiam ser potenciais inibidores desta família de quinases que mediam importantes processos biológicos. Assim mesmo, os terpenóides também são produtos naturais que já demonstraram potencial farmacológico, incluindo propriedades anticancerígenas. O ácido betulínico é um terpenóide que está entre as substâncias isoladas de *S. magnifica*. Esta substância possui um amplo espectro de propriedades farmacológicas, destacando-se atividades anti-HIV (Fujioka *et al.*, 1994) e antitumoral (Serain *et al.*, 2021).

Em vista do apresentado, o objetivo principal deste estudo foi avaliar o painel biológico dos constituintes químicos isolados de *S. magnifica* e analisar *in silico* suas características farmacológicas, toxicológicas e estruturais através de estudos ADMET e de acoplamento molecular com a proteína quinase C isoforma *alpha*. A descoberta de ação inibitória por parte destes fitocompostos contra as PKC α pode contribuir para se ter um maior entendimento do mecanismo de ação citotóxica destas moléculas frente a células tumorais.

2. METODOLOGIA

Em revisão de literatura foram catalogados os principais constituintes químicos de *Sinningia magnifica* com estrutura química elucidada; informações sobre propriedades físico-químicas destas substâncias foram buscadas e predições de potenciais atividades biológicas para estas substâncias foram descritas em análises *in silico*. Para as predições de propriedades farmacológicas *in silico* das substâncias foram realizadas análises empregando o *software Prediction of Activity Spectra for Substances* (PASS online®). Com esta ferramenta, pôde-se estimar os índices P_a (probabilidade "de ser ativo") ou P_i (probabilidade "de ser inativo") frente à PKC α .

Além disso, foi utilizada a ferramenta SwissTargetPrediction (www.SwissTargetPrediction.ch) para prever as probabilidades de interação dos compostos analisados com a PKC α . Para isso, foi adotado o seguinte critério: probabilidade de atividade contra o alvo das quinases tipo C estivesse preenchida em menos de 50%, a probabilidade seria baixa, e se a barra estiver preenchida em mais de 50%, seria considerada alta.

Ensaio *in silico* de propriedades ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade) foram feitos com o servidor SwissADME, que permitiu a predição de parâmetros de absorção intestinal, penetração da barreira hematoencefálica (BBB), inibição de isoenzimas do CYP450 (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4 e predição do índice Lipinski. A triagem prévia das substâncias com ferramentas *in silico* foi feita de modo a conduzir o *docking* molecular com os resultados obtidos.

Para a realização do acoplamento molecular, foram preparados os ligantes e a proteína alvo (PKC α): os ligantes foram desenhados no programa ChemSketch 2020.2.0 e convertidos para a estrutura 3D (.pdb) usando o PyMOL 2.4 da Schrödinger, Inc; já a proteína PKC α foi recuperada do banco de dados do Protein Data Bank (PDB: 4RA4) e preparada. Seguiu-se com o acoplamento molecular utilizando-se a ferramenta Autodock 4.2, interface MGL 1.5.6 para todas as substâncias isoladas de *S. magnifica*. A validação do *docking* foi feita com o co-cristal com o qual a proteína PKC α estava depositada no Protein Data Bank e a molécula utilizada como controle foi a estaurosporina, que é uma molécula conhecida por suas atividades inibitórias contra PKC α . Os programas AutoDock e PyMOL foram usados para as análises pós-*docking*. A melhor posição de ligação entre os ligantes e a proteína foi selecionada com base na menor energia livre de ligação obtida (menores valores indicam complexos mais estáveis). A posição de acoplamento mais favorável foi, então, selecionada por PyMOL para que se pudessem analisar as interações entre os ligantes e a PKC α .

Por último, após obtenção dos resultados do acoplamento molecular, foi feito o diagrama de ovo cozido (do inglês, BOILED-Egg - Brain Or Intestinal EstimateD permeation method, ou método de permeação estimada ao sistema nervoso ou intestinal) utilizando o *software* SwissADME com as substâncias que exibiram resultados mais promissores comparados com a substância de referência - estaurosporina.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em geral, segundo as predições feitas no *Pass Online* as substâncias analisadas neste estudo apresentaram valores baixos de P_a (inferiores a 0,5) contra PKC α . Além disso, utilizando esta ferramenta conseguiu-se prever as probabilidades dos constituintes de *S. magnifica* serem ativos frente a uma grande variedade de alvos terapêuticos (P_a : probabilidade de ser ativo) ou inativos (P_i : probabilidade de ser inativo). Se $P_a > 0,7$, isto indica que a substância em questão tem altas chances de apresentar a atividade reportada. Se $0,5 < P_a < 0,7$, as chances de que essa substância seja ativa são menores (Porokoiv *et al.*, 1998).

No entanto, utilizando a ferramenta Target Prediction, foram obtidos resultados diferentes quando comparados com os derivados do *Pass Online*, por exemplo, o calceolariosídeo B apresentou alta probabilidade de ter atividade contra PKC α . Esta substância também já foi reportada como tendo atividade inibitória da proteína PRKC α humana (IC50 de 4,6 μ M) (Zhou *et al.*, 1998) e de aromatase (Yang *et al.*, 2011), bem como atividade anti-inflamatória (Jin *et al.*, 2014). O calceolariosídeo B e a haleridona apresentam possibilidade de interação com PKC α , com a primeira molécula apresentando alta e baixa probabilidade, respectivamente.

Os resultados do acoplamento molecular para todas as substâncias isoladas de *S. magnifica* foram ranqueados por seus valores de energia mínima de ligação.

Os valores mais negativos, isto é, os que indicam resultados mais promissores para complexos estáveis entre ligante e proteína, foram obtidos para o terpenóide - ácido betulínico (-8,83 Kcal/mol) e para a naftoquinona 7-hidroxi- α -dunnionina (-8,58 Kcal/mol). Estas substâncias estão representadas na figura 1, juntamente com a estaurosporina, dispostas ao redor do sítio ativo da PKC α (PDB ID: 4RA4). No sítio ativo mostra-se a melhor pose da substância de referência estaurosporina, que possui atividade inibitória conhecida contra PKCs.

Tabela 1. *Score* de energia mínima de ligação para cada uma das substâncias que foram alvo de estudos de *docking* molecular.

Compostos	<i>Score</i> de energia mínima de ligação (Kcal/mol)
Estaurosporina (Substância de referência)	-9,95
Ácido betulínico	-8,83
7-hidroxi- α -dunniona	-8,58
Tectoquinona	-8,35
8-hidroxi-dunniona	-8,22
1-hidroxi tectoquinona	-7,99
1,6-dihidroxi-tectoquinona	-7,80
7-hidroxi-6-metoxi- α -dunniona	-7,65
7-hidroxi tectoquinona	-7,52
7-hidroxi-6-metoxi-tectoquinona	-7,09
Calceolariosídeo B	-6,80
Haleridona	-4,79
Tirosol	-4,28
Dunniol	-7,63
Co-cristal 3KZ (validação)	-9,79

A ligação proteína-ligante, sem o consumo de energia, ocorre apenas quando a variação da energia livre de Gibbs (ΔG) do sistema é negativa. Quanto mais negativa é a energia, maior a afinidade de ligação entre as moléculas envolvidas (Du *et al.*, 2016).

Discorrendo sobre as substâncias que mais se destacaram nos resultados de energia mínima, temos que o ácido betulínico é um triterpeno pentacíclico que já foi reportado na literatura como tendo diversas propriedades farmacológicas, incluindo atividade antitumoral (Serain *et al.*, 2021), anti-HIV (Fujioka *et al.*, 1994), bem como alta afinidade de ligação com a proteína tRdRp, que é crucial para o ciclo de vida do SARS-CoV-2 (Hossain, 2022).

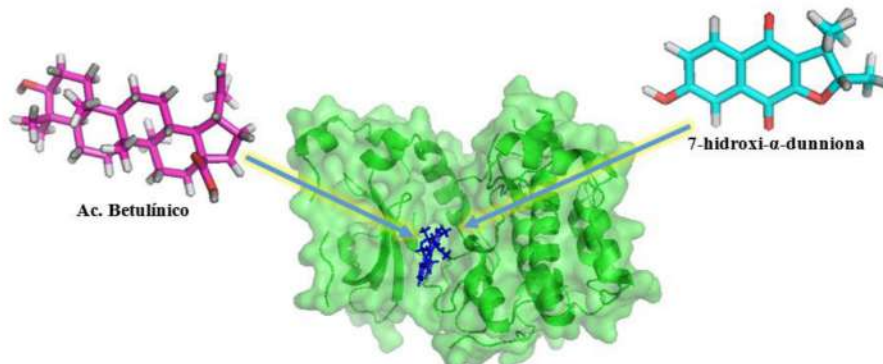


Figura 1. Representação dos dois melhores ligantes dispostos ao redor do sítio ativo da PKC α (PDB ID: 4RA4).

No sítio ativo mostra-se a melhor pose da substância de referência estaurosporina, que possui atividade inibitória conhecida contra PKCs.

A potente atividade anticancerígena do ácido betulínico dá-se por sua capacidade de induzir apoptose somente em células tumorais, não afetando células e tecidos normais. Esta substância causa danos às mitocôndrias levando, assim, à morte das células malignas (Seyed *et al.*, 2016). Já a 7-hidroxi- α -dunniona é uma naftoquinona com atividade citotóxica contra linhagens celulares de câncer de mama e tumor pancreático (Sheridan *et al.*, 2011).

O “diagrama de ovo cozido” (do inglês, BOILED-Egg - Brain Or Intestinal EstimateD permeation method) é um modelo de predição que calcula a lipofilicidade e polaridade de moléculas pequenas e é utilizado em análises preliminares do potencial farmacológico de diferentes substâncias (Daina & Zoete, 2016). A região branca (clara do ovo) e a região amarela (gema) indicam, respectivamente, as regiões de maiores probabilidades de permeabilidade nos sistemas gastrointestinal e nervoso (Olasupo *et al.*, 2020). Dentre as substâncias mostradas no gráfico (figura 1), duas delas foram isoladas da planta em estudo *S. magnifica*: ácido betulínico e 7-hidroxi- α -dunniona. Estas substâncias representam, respectivamente, os resultados de primeiro e segundo maior potencial farmacológico após a análise dos resultados do *docking* molecular (tabela 1). A terceira molécula analisada, por

sua vez, corresponde à estaurosporina, que é um alcaloide isolado da bactéria *Streptomyces staurosporus* que foi escolhido como molécula de referência por ser conhecido como um forte e amplamente seletivo inibidor das proteínas quinases C (Gani & Engh, 2010), exibindo assim atividade anticâncer.

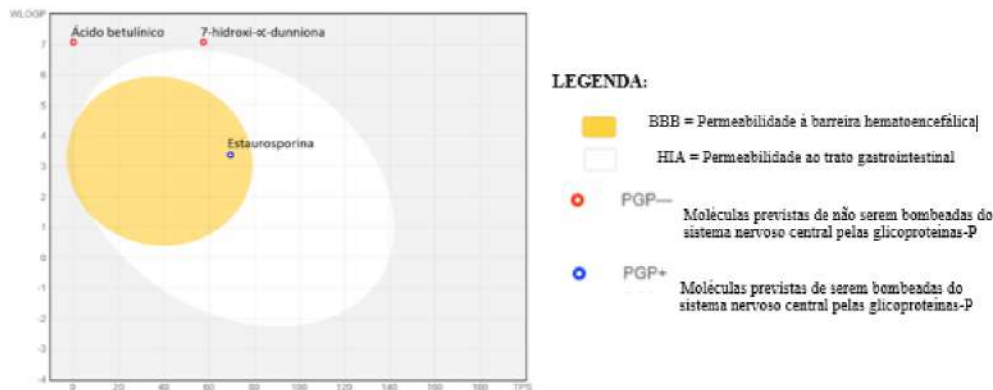


Figura 2. Diagrama de ovo cozido (do inglês, BOILED-Egg - Brain Or Intestinal EstimateD permeation method) com as substâncias que exibiram resultados mais promissores, o ácido betulínico e 7-hidroxi- α -dunniona, e com a substância controle/referência, a estaurosporina.

A barreira hematoencefálica (BBB, do inglês Blood-Brain-Barrier) é responsável por impedir a entrada no sistema nervoso da maioria dos fármacos que se encontram na corrente sanguínea, o que impõe um desafio no desenvolvimento de fármacos contra doenças cerebrais ou radiofármacos que possibilitem a obtenção de neuroimagens do cérebro (Pardridge, 2012). Isto pode ser visto no diagrama do ovo cozido, no qual pontos em vermelho representam moléculas previstas de não serem bombeadas do sistema nervoso central pelas glicoproteínas-P (PGP -), enquanto pontos em azul indicam o contrário, isto é, predições de moléculas que devem ser bombeadas por estas mesmas glicoproteínas (PGP +). A glicoproteína-P ou proteína de resistência à múltiplas drogas (MDR1), é assim chamada por ser um transportador de efluxo transmembrana limitando, desta maneira, a absorção celular de um amplo espectro de drogas, incluindo várias drogas utilizadas nas diferentes terapias contra cânceres (Seelig, 2020). A inibição da glicoproteína-P aumenta a biodisponibilidade de drogas, enquanto sua indução faz o contrário (Finch *et al.*, 2014). Observando gráfico (figura 2), tem-se que o ácido betulínico (ponto vermelho mais à esquerda) e a 7-hidroxi- α -dunniona (ponto vermelho mais à direita) não são absorvidos pelo sistema nervoso central, pois não ultrapassam a barreira hematoencefálica passivamente (fora do ovo), mas também não sofrem efluxo pelas PGPs (ponto vermelho). Enquanto que a substância controle, a estaurosporina, aparece na gema, sinalizando sua permeabilidade passiva à barreira hematoencefálica, mas é representada por um ponto azul, o que indica que é bombeada para fora pelas PGPs. Com isso, o ácido betulínico e 7-hidroxi- α -dunniona, não chegam passivamente ao sistema nervoso central, mas se o acessassem, não sofreram efluxo.

Apesar da biodisponibilidade limitada do ácido betulínico, estudos recentes demonstram que o nanoencapsulamento desta substância poderia aumentar sua biodisponibilidade ou potencializar seus efeitos biológicos (Serain *et al.*, 2021). Estes resultados indicam que sistemas de liberação modificada podem contornar a biodisponibilidade limitada de algumas substâncias.

Enquanto os resultados apontados pelas análises *in silico* indicaram como substâncias mais promissoras o ácido betulínico e a 7-hidroxi- α -dunniona, o glicosídeo fenólico calceolariosídeo B apresenta relatos de atividades biológicas *in vitro* descritas em literatura (Zhou *et al.*, 1998; Riva *et al.*, 2012), mas através de simulações de acoplamento molecular observou-se, que após o *docking* rígido, o calceolariosídeo B mostrou ter uma energia menos negativa de ligação diferencial (-6,80 Kcal/mol), quando comparada com a estaurosporina (-9,95 Kcal/mol) substância de referência com atividade inibitória de PKC α .

Trabalhos realizados por nosso grupo de pesquisa avaliaram as propriedades de algumas destas substâncias frente às linhagens tumorais SK-MEL-103 (melanoma metastático humano) e PC-3 (tumor de próstata), encontrando-se bons resultados em termos de valores de IC₅₀ e que apresentam elevada correlação com os resultados obtidos nas análises *in silico*. Estudos mais aprofundados continuam sendo realizados por nosso grupo de pesquisa.

4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo a partir das predições feitas no *software Pass Online* indicam que as substâncias reportadas em literatura para extrato bioativo de *S. magnifica* apresentam baixos valores de probabilidade de predição para serem ativas contra PKC α . No entanto, utilizando a ferramenta Target Prediction, foram obtidos resultados diferentes quando comparados com os derivados do *Pass Online*, por exemplo, o calceolariosídeo B apresentou alta probabilidade de ter atividade contra PKC α . Além disso, empregando-se análises de acoplamento molecular, os dados obtidos sustentam que o diterpenóide ácido betulínico (-8,83 Kcal/mol) e a naftoquinona 7-hidroxi- α -dunnionina (-8,58 Kcal/mol) são constituintes com valores de energia de ligação diferencial comparáveis ao reportado para a estaurosporina (-9,95 Kcal/mol), substância de referência e conhecida por ter atividade inibitória sobre as PKC α . Considerando-se dados de disposição cinética do servidor SwissADME para estas substâncias com potencial efeito inibitório para PKC α , observou-se que o ácido betulínico e a 7-hidroxi- α -dunnionina apresentam baixa biodisponibilidade e os dados sugerem que não ultrapassam a barreira hematoencefálica passivamente mas, por outro lado não sofrem efluxo pelas glicoproteínas-P (PGPs). Estes achados indicam a necessidade de estudos para melhorar parâmetros farmacocinéticos destas substâncias no que diz respeito a biodisponibilidade, ou abordagens com o desenvolvimento de sistemas de liberação modificada visando a seus possíveis usos como fármacos e medicamentos. Em conjunto, estes resultados preliminares indicam que algumas substâncias isoladas da *S. magnifica* apresentam propriedades biológicas promissoras e que esta abordagem *in silico* suportaria modelos de ensaios biológicos *in vitro* e posteriormente *in vivo*. Ainda, estudos complementares de dinâmica molecular (DM) entre o ácido betulínico ou a 7-hidroxi- α -dunnionina com a PKC α são necessários, pois ajudariam a compreender melhor a interação e a estabilidade entre estes constituintes com a proteína objeto de estudo.

Agradecimentos: à Fapesp, Capes, CNPq e Faepex-Unicamp pelo apoio financeiro.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cooke, M., Zhang, X., Zhang, S., Lal, P., Daniel, R., Feldman, M., Abba, M., Kazanietz, M. Protein Kinase C Alpha is a Central Node for Tumorigenic Transcriptional Networks in Human Prostate Cancer, *bioRxiv* (2022). doi: <https://doi.org/10.1101/2022.04.08.487680>
- Daina, A., Michielin, O. e Zoete, V. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports*. 7 (2017).
- Du X, Li Y, Xia YL, Ai SM, Liang J, Sang P, Ji XL, Liu SQ. Insights into Protein-Ligand Interactions: Mechanisms, Models, and Methods. *Int J Mol Sci*. 17(2):144 (2016)
- Finch A., Pillans P. P-glycoprotein and its role in drug-drug interactions. *Aust Prescr*. 37:137-9 (2014). doi: <https://doi.org/10.18773/austprescr.2014.050>
- Fujioka T, Kashiwada Y, Kilkuskie RE, Cosentino LM, Ballas LM, Jiang JB, Janzen WP, Chen IS, Lee KH. Anti-AIDS agents. 11. Betulinic acid and platanic acid as anti-HIV principles from *Syzygium claviflorum*, and the anti-HIV activity of structurally related triterpenoids. *J Nat Prod*. 243-7 (1994).
- Gambhir, L., Checker, R., Thoh, M., Patwardhan, R., S., Sharma, D., Kumar, M., & Sandur, S. K. (2014). 1,4-Naphthoquinone, a pro-oxidant, suppresses immune responses via KEAP-1 glutathionylation. *Biochemical Pharmacology*, 88(1), 95–105.
- Gani, O; Engh, R. Protein kinase inhibition of clinically important staurosporine analogues. *Nat Prod Rep*. (2010). doi: 10.1039/b923848b.
- Garg R., Benedetti L., Abera M., Wang H., Abba M., Kazanietz M. Protein kinase C and cancer: what we know and what we do not. *Oncogene*, 33(45):5225-37 (2014) doi: 10.1038/onc.2013.524.
- Geribaldi-Doldán N, Gómez-Oliva R, Domínguez-García S, Nunez-Abades P, Castro C. Protein kinase C: Targets to regenerate brain injuries? *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 1–9 (2019).
- Hossain R, Sarkar C, Hassan SMH, Khan RA, Arman M, Ray P, Islam MT, Daştan SD, Sharifi-Rad J, Almarhoon ZM, Martorell M, Setzer WN, Calina D. In Silico Screening of Natural Products as Potential Inhibitors of SARS-CoV-2 Using Molecular Docking Simulation. *Chin J Integr Med*. 249-256 (2022).
- Jin HG, Kim AR, Ko HJ, Lee SK, Woo ER. Three new lignan glycosides with IL-6 inhibitory activity from *Akebia quinata*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 288-93 (2014).
- Mochly-Rosen D, Das K, Grimes KV. Protein kinase C, an elusive therapeutic target? *Nature Reviews Drug Discovery*. 937–957 (2012).
- Olasupo, S., Uzairu, A., Shallangwa, G. e Uba, S. Computational Modeling and Pharmacokinetics/ADMET Study of Some Arylpiperazine Derivatives as Novel Antipsychotic Agents Targeting Depression. *Chemistry Africa*. 3 (2020). Doi: 10.1007/s42250-020-00161-4.
- Pardridge W. Drug transport across the blood-brain barrier. *Journal of Cerebral Blood Flow Metabolism*. pp. 1959-1972 (2012).
- Poroikov, V., Filimonov, D., Glorizova, T., Lagunin, A., Stepanchikova, A., Prediction of Biological Activity Spectra for Substances: in House Applications and Internet Feasibility, 2nd International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry (ECSOC-2) (1998).
- Riva D, Barison A, Stefanello MEA, Poliquesi CB, Ruiz ALTG, Carvalho JE, Salvador MJ. Chemical study of *Sinningia allagophylla* guided by antiproliferative activity assays. *Química Nova*. (2012).
- Rui M, Nasti R, Bignardi E, Della Volpe S, Rossino G, Rossi D, Collina S. PKC in Regenerative Therapy: New Insights for Old Targets. *Pharmaceuticals (Basel)*. (2017).
- Serain, A., Morosi, L., Ceruti, T., Matteo, C., Meroni, M., Minatel, E., Zucchetti, M., e Salvador, M. Betulinic acid and its spray dried microparticle formulation: In vitro PDT effect against ovarian carcinoma cell line and in vivo plasma and tumor disposition, *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*, Vol. 224, 2021.
- Seelig A. P-Glycoprotein: One Mechanism, Many Tasks and the Consequences for Pharmacotherapy of Cancers. *Front Oncol* (2020). doi: 10.3389/fonc.2020.576559.
- Seyed, M., Jantan, I., Vijayaraghavan, K. e Bukhari, S. Betulinic acid: recent advances in chemical modifications, effective delivery, and molecular mechanisms of a promising anticancer therapy. *Chem. Biol. Drug Des.*, 87 (4) pp. 517-536 (2016).
- Yang JH, Kondratyuk TP, Jermihov KC, Marler LE, Qiu X, Choi Y, Cao H, Yu R, Sturdy M, Huang R, Liu Y, Wang LQ, Meseccar AD, van Breemen RB, Pezzuto JM, Fong HH, Chen YG, Zhang HJ. Bioactive compounds from the fern *Lepisorus contortus*. *J Nat Prod*. 129-36 (2011).
- Zhou B, Bahlér BD, Hofmann GA, Mattern MR, Johnson RK, Kingston DGI. Phenylethanoid Glycosides from *Digitalis purpurea* and *Penstemon linarioides* with PKC α -Inhibitory Activity. *J. Nat. Prod.*, 1410–1412 (1998).