



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Bruna Celeida Silva Santos**

**Síntese e modelagem molecular de análogos do metil chavicol e seus potenciais farmacológicos**

**Juiz de Fora  
2017**

**BRUNA CELEIDA SILVA SANTOS**

**Síntese e modelagem molecular de análogos do metil chavicol e seus potenciais farmacológicos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, área de concentração em Produtos Naturais Bioativos.

**Orientador:** Prof. Dr. Orlando Vieira de Sousa

**Coorientador:** Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Lúcia Santos de Matos Araújo

**Juiz de Fora**

**2017**

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Celeida Silva Santos, Bruna .

Síntese e modelagem molecular de análogos do metil chavicol e seus potenciais farmacológicos / Bruna Celeida Silva Santos. -- 2017.

128 f.

Orientador: Orlando Vieira de Sousa

Coorientadora: Ana Lúcia Santos de Matos Araújo

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2017.

1. Metil chavicol. 2. Síntese orgânica. 3. Modelagem molecular. 4. Atividade antilipidêmica. 5. Atividade anti-inflamatória. I. Vieira de Sousa, Orlando, orient. II. Santos de Matos Araújo, Ana Lúcia, coorient. III. Título.

SÍNTESE E MODELAGEM MOLECULAR DE ANÁLOGOS DO METIL  
CHAVICOL E SEUS POTENCIAIS FARMACOLÓGICOS.

**Bruna Celeida Silva Santos**

**ORIENTADOR: Orlando Vieira de Sousa**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF,  
como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em  
Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 24/02/2017



---

Simone Sacramento Valverde



---

Giovanni Wilson Amarante



---

Orlando Vieira de Sousa

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Terezinha e Allan, pelo imenso empenho, amor e carinho e por sempre me apoiarem e me conduzirem à realização dos meus sonhos.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Terezinha e Allan, pelo trabalho, carinho, amor, e por transformarem meus sonhos em projetos viáveis. Pai, mãe, muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Orlando Vieira de Sousa e a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Lúcia Santos de Matos Araújo, pela orientação, amizade, apoio, carinho, dedicação, e por abrirem muitas portas em minha caminhada acadêmica.

Ao meu amado noivo Wellington Rocha Ramalho, pelos conselhos, conversas e compreensão nos momentos difíceis.

Aos amigos do Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais da Faculdade de Farmácia (FF) da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), e a aluna Andressa Soares Pires por auxiliarem em determinados protocolos e, principalmente, por garantirem amizade, risada, brincadeira e resultados de qualidade.

Aos Técnicos Administrativos em Educação Éder Luis Tostes e Jésus de Paula Sarmento, lotados no Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais/FF/UFJF e responsáveis pelo Horto Medicinal da FF/UFJF, pela ajuda. O apoio de vocês foi imprescindível.

Aos grupos de pesquisa da Profa. Dra. Mara Rubia Costa Couri, especialmente ao doutorando Wiliam Caneschi, e grupo de pesquisa do Prof. Dr. Alex Taranto pela grande colaboração e conhecimentos transmitidos que foram essenciais para a realização do trabalho. Desejo prosperidade a vocês.

Ao Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFJF, pelo âmparo e oportunidade de dar mais esse passo. Extendo aqui os agradecimentos à solicitude e serviços prestados pelo secretário do programa, Arlem.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos e financiamento de projetos.

*“A vida é um sonho: realize”.*

*Madre Teresa de Calcutá*

## RESUMO

Metil chavicol é um fenilpropanoide encontrado em óleos essenciais e suas atividades antimicrobiana, anti-inflamatória, anestésica local e inseticida têm sido destacadas. O objetivo deste estudo foi sintetizar e avaliar o perfil de interação molecular do metil chavicol e análogos, assim como investigar as atividades antioxidante, antilipidêmica e anti-inflamatória tópica usando métodos *in vivo*, *in vitro* e *in silico*. A síntese dos análogos foi realizada por reações clássicas da química orgânica. A atividade antioxidante foi determinada pelos métodos DPPH e peroxidação lipídica, enquanto o efeito antilipidêmico foi testado contra a enzima lipase pancreática. O efeito anti-inflamatório tópico foi avaliado pelo método de edema de orelha usando óleo de Cróton, fenol e histamine como agentes irritantes. Análises histopatológicas e ensaios de mieloperoxidase (MPO), N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase (NAG), óxido nítrico, fator necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), interleucina 6 (IL-6) e ciclooxigenase *in vitro* foram realizados. Os ligantes foram gerados pelo Programa Marvin Sketch e refinado por método PM7 presente no Programa MOPAC2012. As enzimas foram obtidas do *Protein Data Bank* sob os códigos 1EQG e 5IKT (COX-1 e -2), 1R35 (iNOS) e 1LPA (lipase pancreática). O reconhecimento molecular foi definido usando o programa Discovery Studio v 4.5 2016. 2-[(4-metoxifenil)metil] oxirano (**2**), 3-(4-metoxifenil)propan-1,2-diol (**8**), 2-metoxi-3-(4 metoxifenil)propan-1-ol (**10**), 1-metoxi-3-(4 metoxifenil)propan-2-ol (**17**) e 3-(4-metoxifenil)propanal (**18**) foram os análogos sintetizados. Metil chavicol reduziu significativamente ( $p < 0,001$ ) a espessura e a massa do edema de orelha induzido por óleo de Cróton, fenol e histamina. Houve uma redução significativa de mieloperoxidase, N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase, óxido nítrico, fator necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e interleucina 6 (IL-6). Metil chavicol foi incapaz de inibir COX-1 e -2 em estudo *in vitro* e o *docking* molecular mostrou ausência de interação, incluindo os análogos **2**, **8**, **17** e **18**. Além disso, os estudos *in vitro* e de *docking* molecular revelaram que o metil chavicol e seus análogos inibiram a enzima lipase pancreática. Os resultados obtidos sugerem que o metil chavicol e seus análogos são promissores agentes terapêuticos que podem ser utilizados em doenças associadas a processos inflamatórios, oxidativos e metabólicos.

Palavras-chave: Metil chavicol. Síntese orgânica. Modelagem molecular. Atividade antioxidante. Atividade antilipidêmica. Atividade anti-inflamatória.



## ABSTRACT

Methyl chavicol is a phenylpropanoid found in essential oils and its antimicrobial, anti-inflammatory, local anesthetic and insecticide activities have been highlighted. The objective of this study was to synthesize and evaluate the molecular interaction profile of the methyl chavicol and analogues, as well as to investigate the antioxidant, antilipidemic and topical anti-inflammatory activities using *in vivo*, *in vitro* and *in silico* methods. Synthesis of the analogues was performed by classical reactions of organic chemistry. Antioxidant activity was determined by DPPH and lipid peroxidation methods, while the antilipidemic effect was assayed against to pancreatic lipase. Anti-inflammatory activity was evaluated using Croton oil-, phenol-, and histamine-induced ear edema models in mice. Histopathological analyzes and the myeloperoxidase (MPO), N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG), nitric oxide, tumor necrosis tumor (TNF- $\alpha$ ), interleukin 6 (IL-6) and cyclooxygenase assays were determined. The bindings were generated by the Marvin Sketch Program and refined by PM7 method present in the MOPAC2012 Program. Enzymes were obtained from protein database under 1EQG and 5IKT (COX-1 and -2), 1R35 (iNOS) and 1LPA (pancreatic lipase) codes. Molecular recognition was determined using the program Discovery Studio v 4.5 2016. 2 - [(4-methoxyphenyl) methyl] oxirane (**2**), 3-(4-methoxyphenyl) propane-1,2-diol (**8**), 2-Methoxy-3-(4-methoxyphenyl) propan-1-ol, 1-methoxy-3-(4-methoxyphenyl) propan-2-ol (**17**) and 3-(4-methoxyphenyl) propanal (**18**) were the synthesized analogues. Methyl chavicol significantly decreased the thickness and mass of ear edema induced by irritants ( $p < 0.001$ ). A significant reduction on myeloperoxidase, N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase, nitric oxide, tumor necrosis tumor (TNF- $\alpha$ ) and interleukin 6 (IL-6) was revealed ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  or  $p < 0.001$ ). Methyl chavicol was unable to inhibit COX-1 and-2 in *in vitro* test and the molecular docking showed no interaction, including the analogues **2**, **8**, **17** and **18**. In addition, molecular docking showed an inhibitory effect of the methyl chavicol and its analogues on the pancreatic lipase. The results indicate that methyl chavicol and its analogues are promising therapeutic agents that can be used in diseases associated with inflammatory, oxidative and metabolic processes.

Keywords: Methyl chavicol. Organic Synthesis. Molecular modeling. Antioxidant activity. Antilipidemic activity. Anti-inflammatory activity.

## LISTA DE ESQUEMA

		P.
<b>ESQUEMA 1</b>	Biossíntese do metil chavicol .....	4
<b>ESQUEMA 2</b>	Síntese do metil chavicol .....	5
<b>ESQUEMA 3</b>	Mecanismo da síntese do metil chavicol .....	6
<b>ESQUEMA 4</b>	Reação de haleto orgânico na obtenção de alilfenol .....	7
<b>ESQUEMA 5</b>	Síntese do metil chavicol por fotólise.....	8
<b>ESQUEMA 6</b>	Plano de síntese ( <b>A</b> ): obtenção de análogos do metil chavicol por meio do conceito de Isoterismo clássico .....	43
<b>ESQUEMA 7</b>	Plano de síntese ( <b>B</b> ): obtenção de análogos do metil chavicol por meio do conceito de Bioisoterismo .....	44
<b>ESQUEMA 8</b>	Mecanismo da reação de epoxidação do metil chavicol .....	45
<b>ESQUEMA 9</b>	Reações de abertura do epóxido <b>2</b> .....	46
<b>ESQUEMA 10</b>	Mecanismo da reação de formação de diol ( <b>8</b> ) .....	70
<b>ESQUEMA 11</b>	Mecanismo da reação de abertura de ( <b>2</b> ) com metanol .....	71
<b>ESQUEMA 12</b>	Mecanismo de reação de abertura de ( <b>2</b> ) via aminólise .....	72
<b>ESQUEMA 13</b>	Mecanismo de formação do aldeído ( <b>18</b> ) a partir do rearranjo do epóxido ( <b>2</b> ) .....	73
<b>ESQUEMA 14</b>	Rerrrananjo do pinacol .....	73

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	P.
<b>FIGURA 1</b>	Estrutura química do metil chavicol ..... 3
<b>FIGURA 2</b>	Metabolismo do metil chavicol ..... 9
<b>FIGURA 3</b>	Imagem ilustrativa do dano causado pelo radical hidroxila ao DNA.. 15
<b>FIGURA 4</b>	Estrutura química do radical DPPH e reação de estabilização com um antioxidante ..... 17
<b>FIGURA 5</b>	Reação de formação do complexo cromogênico a partir do ácido tiobarbitúrico com malonaldeído ..... 17
<b>FIGURA 6</b>	Imagem ilustrativa da composição da placa utilizada no ensaio ..... 39
<b>FIGURA 7</b>	Imagem ilustrativa da reação de EIA ..... 40
<b>FIGURA 8</b>	Comportamento cinético do metil chavicol ..... 48
<b>FIGURA 9</b>	Atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical DPPH... 49
<b>FIGURA 10</b>	Decaimento da absorvância em função do tempo para o metil chavicol e análogo pelo método da cooxidação do $\beta$ -caroteno/ácido linoleico ..... 49
<b>FIGURA 11</b>	Curva padrão de malonaldeído ..... 50
<b>FIGURA 12</b>	Fotomicrografia de seções transversais de tecido da orelha de camundongos submetidos à aplicação de óleo de cróton: efeito do metil chavicol sobre o tamanho do edema ..... 55
<b>FIGURA 13</b>	Efeito do metil chavicol sobre a enzima mieloperoxidase e N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase ..... 56
<b>FIGURA 14</b>	Efeito do metil chavicol sobre a produção de óxido nítrico e citocinas ..... 57
<b>FIGURA 15</b>	Estruturas dos ligantes cristalográficos após validação por <i>redocking</i> ..... 58
<b>FIGURA 16</b>	Orientações moleculares dos ligantes cristalográficos no sítio de ligação das enzimas COX-1, COX-2, i-NOS e lipase pancreática ..... 60
<b>FIGURA 17</b>	Orientações moleculares do metil chavicol no sítio de ligação das enzimas COX-1, COX-2, i-NOS e lipase pancreática ..... 62
<b>FIGURA 18</b>	Orientações moleculares do análogo ( <b>2</b> ) no sítio de ligação das enzimas COX-1, COX-2, i-NOS e lipase pancreática ..... 64
<b>FIGURA 19</b>	Orientações moleculares do análogo <b>8</b> no sítio de ligação das enzimas COX-1, COX-2, i-NOS e lipase pancreática ..... 65
<b>FIGURA 20</b>	Orientações moleculares do análogo ( <b>17</b> ) no sítio de ligação das enzimas COX-1, COX-2, i-NOS e lipase pancreática ..... 66
<b>FIGURA 21</b>	Orientações moleculares do análogo ( <b>18</b> ) no sítio de ligação das enzimas COX-1, COX-2, i-NOS e lipase pancreática ..... 67

## LISTA DE TABELAS

		P.
<b>TABELA 1</b>	Componentes da SM definida pela NCEP-ATP III .....	19
<b>TABELA 2</b>	Reagentes utilizados para a reação do ensaio imunoenzimático (EIA) COX .....	38
<b>TABELA 3</b>	Atividade antioxidante do metil chavicol e análogo pelo método do sequestro do radical DPPH .....	48
<b>TABELA 4</b>	Atividade antioxidante do metil chavicol e análogo pelo método de co-oxidação do $\beta$ -caroteno/ácido linoleico.....	50
<b>TABELA 5</b>	Concentração de malonaldeído (MDA) em $\mu$ M obtida pelo método do ácido tiobarbitúrico (TBARS) frente metil chavicol e análogo .....	51
<b>TABELA 6</b>	Atividade da lipase pancreática na presença do metil chavicol .....	52
<b>TABELA 7</b>	Efeito do metil-chavicol sobre o edema de orelha induzido por óleo de Crótonapós 6 e 24 horas .....	53
<b>TABELA 8</b>	Efeito do metil chavicol sobre o edema de orelha induzido por fenol.....	53
<b>TABELA 9</b>	Efeito do metil chavicol sobre o edema de orelha induzido por histamina .....	54
<b>TABELA 10</b>	Efeito in vitro do metil chavicol sobre as enzimas ciclooxigenases.....	58
<b>TABELA 11</b>	Afinidade de ligação entre ligantes e as enzimas COX-1, COX-2, i-NOS e lipase pancreática.....	63
<b>TABELA 12</b>	Afinidade de ligação entre os análogos do metil chavicol e as enzimas COX-1, COX-2, i-NOS e lipase pancreática.....	68

## SUMÁRIO

		P.
<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2.</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	3
2.1	METIL CHAVICOL .....	3
2.1.1	Biossíntese e síntese .....	3
2.1.2	Atividades biológicas .....	8
2.2	PLANEJAMENTO RACIONAL DE FÁRMACOS .....	10
2.2.1	Modelagem molecular .....	12
2.2.2	<i>Docking</i> molecular .....	12
2.2.2.1	AutoDock Vina .....	14
2.3	ASPECTOS GERAIS DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	14
2.4	ASPECTOS GERAIS DO METABOLISMO LÍPIDICO .....	18
2.4.1	Triglicerídeos e sua digestão .....	19
2.5	INFLAMAÇÃO TÓPICA .....	20
2.6	ASPECTOS GERAIS DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA .....	25
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	27
<b>4.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	28
4.1	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS ANÁLOGOS .....	28
4.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	29
4.2.1	Método do sequestro do radical DPPH .....	29
4.2.2	Método da co-oxidação $\beta$ -caroteno/ácido linoleico .....	30
4.2.3	Método de peroxidação lipídica pelo ácido tiobarbitúrico .....	31
4.3	AVALIAÇÃO DO EFEITO DO METIL CHAVICOL NA INIBIÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA LIPASE PANCREÁTICA .....	32
4.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA TÓPICA .....	33
4.4.1	Animais .....	33
4.4.2	Método do edema da orelha induzido por óleo de Cróton .....	33
4.4.3	Método do edema de orelha induzido por fenol .....	34
4.4.4	Método do edema de orelha induzido por histamina .....	34
4.4.5	Avaliação do edema de orelha .....	34
4.5	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA .....	35
4.6	DETERMINAÇÃO DA MIELOPEROXIDASE .....	35
4.7	DETERMINAÇÃO DA N-ACETIL- $\beta$ -D-GLICOSAMINIDASE .....	36
4.8	DETERMINAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO .....	36
4.9	DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS .....	37
4.10	EFEITO DO METIL CHAVICOL SOBRE CICLOOXIGENASE-1 E -2 .....	37
4.11	MODELAGEM MOLECULAR .....	40
4.11.1	Modelagem molecular dos ligantes .....	40
4.11.2	Obtenção das estruturas tridimensionais das proteínas .....	41
4.11.3	<i>Docking</i> .....	41
4.12	ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	42
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	43
5.1	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO .....	43
5.2	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	47
5.2.1	Atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical DPPH .....	47
5.2.2	Atividade antioxidante pelo método da co-oxidação $\beta$ -caroteno/ácido linoleico .....	49
5.2.3	Atividade antioxidante pelo método do ácido tiobarbitúrico .....	50
5.3	EFEITO DO METIL CHAVICOL SOBRE A LIPASE PANCREÁTICA .....	51

5.4	ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA TÓPICA .....	52
5.4.1	Efeito do metil chavicol sobre o edema de orelha induzido por óleo de Cróton. ....	52
5.4.2	Efeito do metil chavicol sobre o edema de orelha induzido por fenol.....	53
5.4.3	Efeito do metil chavicol sobre o edema de orelha induzido por histamina.....	54
5.4.4	Análise histopatológica .....	54
5.4.5	Efeito do metil chavicol sobre as enzimas mieloperoxidase e N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase .....	56
5.4.6	Efeito do metil chavicol sobre a produção de óxido nítrico e citocinas.....	56
5.5	EFEITO <i>IN VITRO</i> DO METIL CHAVICOL SOBRE AS ENZIMAS CICLOOXIGENASES .....	57
5.6	ESTUDOS DE <i>DOCKING</i> .....	58
5.6.1	<i>Redocking</i> .....	58
5.6.2	<i>Docking</i> do metil chavicol .....	59
5.6.3	<i>Docking</i> dos análogos do metil chavicol .....	63
6	<b>DISCUSSÃO</b> .....	69
7	<b>CONCLUSÕES</b> .....	80
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	81
	<b>ANEXO A</b> SEÇÃO DE ESPECTROS .....	102
	<b>ANEXO B</b> PARTE EXPERIMENTAL .....	112
	<b>ANEXO C</b> Resumo do trabalho científico intitulado “Molecular Interactions between Methyl chavicol and analogues with Inflammatory enzymes”, apresentado na forma de poster no VIII Simpósio Ibero-americano de Plantas Medicinais e III Simpósio Ibero-americano de Investigaçãom Câncer, 24 a 27 de outubro de 2016, Itajaí, Santa Catarina, Brasil .....	116
	<b>ANEXO D</b> Resumo do trabalho científico intitulado “Avaliação da Atividade Antioxidante <i>in vitro</i> do metil chavicol”, apresentado na forma de poster noXII Congresso Mundial de Farmacêuticos de Língua Portuguesa; V Simpósio de Plantas Medicinais e Fitoterápicos no Sistema Público de Saúde; CongressoInternacional de Fitoterapia; I Congresso Brasileiro de Farmácia Estética e I Simpósio Farmacêutico de Nutracêuticos, 8 a 10 de novembro de 2016, Gramado, Rio Grande do Sul, Brasil .....	117
	<b>ANEXO E</b> Resumo do trabalho científico intitulado “Interações Moleculares do metil chavicol e análogos frente a lipase pancreática usando ancoragem molecular”, apresentado na forma de poster no XII Congresso Mundial de Farmacêuticos de Língua Portuguesa; V Simpósio de Plantas Medicinais e Fitoterápicos no Sistema Público de Saúde; CongressoInternacional de Fitoterapia; I Congresso Brasileiro de Farmácia Estética e I Simpósio Farmacêutico de Nutracêuticos, 8 a 10 de novembro de 2016, Gramado, Rio Grande do Sul, Brasil .....	118

## 1. INTRODUÇÃO

---

O uso de produtos naturais para fins terapêuticos é uma prática que data milhares de anos como citada em documentos das civilizações Egípcia e Chinesa (LORENZI; MATOS, 2008). Sobre este aspecto, o conhecimento oriundo dos produtos naturais deve ser considerado um dos passos fundamentais para a descoberta de substâncias bioativas ao decorrer do tempo. O ópio, por exemplo, extraído dos bulbos da espécie *Papaver somniferum*, deu origem a diversos alcaloides como morfina (analgésico sedativo), codeína (antitussígeno), tebaína (antagonista opioide), narcotina (antitussígeno) e papaverina (espasmolítico) (VIEGAS JÚNIOR et al., 2006). A descoberta dos salicilatos em 1757 a partir das cascas do *Salix alba* foi outro importante marco no desenvolvimento dos fármacos, o qual resultou na síntese do ácido acetil salicílico com propriedades anti-inflamatória, analgésica e antitérmica por Felix Hoffmann em 1898 (ARNOUS et al., 2005; VIEGAS JÚNIOR et al., 2006).

No campo dos produtos naturais, os metabólitos especiais ou secundários possuem papel fundamental no desenvolvimento da síntese de novos fármacos. Calixto e colaboradores (2005) afirmaram que 25% a 30% dos fármacos utilizados efetivamente na terapêutica são provenientes de metabólitos biossintetizados por organismos vivos. Esses metabólitos também originaram 60% dos fármacos anti-carcinogênicos e 75% dos antimicrobianos (NEWMAN et al., 2003), principalmente quando considerado o perfil etnofarmacológico (MEDEIROS et al., 2007; REZENDE et al., 2002). Sob essa ótica, o conhecimento da biodiversidade e a utilização sustentável dos recursos naturais constituem uma extraordinária estratégia para a descoberta de novos medicamentos.

Por outro lado, os produtos sintéticos requerem elevados investimentos, contribuem significativamente para ações com relevantes pesquisas de bioprodutos e podem ser usados como protótipos para novas substâncias. Um exemplo marcante foi o uso dos antimaláricos naturais, quinina e artemisinina, como fontes de fármacos e de matéria-prima para produção de substâncias ativas semissintéticas (BRAZ-FILHO, 2010). No entanto, considerando que os fármacos são moléculas que têm ação sobre alvos fisiológicos, como proteínas, para modular sua função, os métodos computacionais constituem uma importante ferramenta para extrair informações de estruturas tridimensionais de um determinado alvo protéico e/ou complexo ligante-alvo através do conhecimento das interações moleculares. Assim, tais métodos tornaram-se centrais como estratégia no desenvolvimento de medicamentos a

partir do planejamento racional de fármacos (HUNG; CHEN, 2014; GÜNTHER et al., 2003; JORGENSEN, 2010; JOSEPH-McCARTHY, 1999).

O estudo *in silico* de estruturas e propriedades moleculares pelo uso de química computacional e técnicas de visualização gráfica tem como objetivo fornecer uma representação tridimensional do perfil de interação entre ligante e alvo fisiológico (SANT'ANNA, 2002). Nesse sentido, uma estrutura tridimensional da macromolécula alvo e ferramentas computacionais são necessárias no planejamento racional de fármacos para construir e examinar o encaixe entre pequenas moléculas e seu sítio receptor (JORGENSEN, 2010). Entre as ferramentas usadas nesses estudos, o *docking* molecular é de grande relevância neste planejamento.

Metil chavicol é um metabólito especial pertencente à classe dos fenilpropanoides e é um constituinte majoritário de óleos essenciais de plantas das famílias Apiaceae (*Pimpinella anisum* L., “anis”; *Foeniculum vulgare* Mill., “funcho”), Magnoliaceae (*Illicium verum* Hook f., “anis estrelado”) e Asteraceae (*Artemisiadracuncullus* L., “estragão”) (PAULA et al., 2007). Atividades biológicas, tais como antimicrobiana, anti-inflamatória, anestésica local e inseticida, são atribuídas a essa substância (PATNAIK et al., 1997; PAULA et al., 2003; SILVA-ALVES et al., 2013; SILVA-COMAR et al. 2014).

Com base nos aspectos citados acima, o presente trabalho realizou uma investigação sobre a síntese e modelagem molecular de análogos do metil chavicol, assim como avaliou alguns potenciais farmacológicos usando ferramentas *in vivo*, *in vitro* e *in silico*.



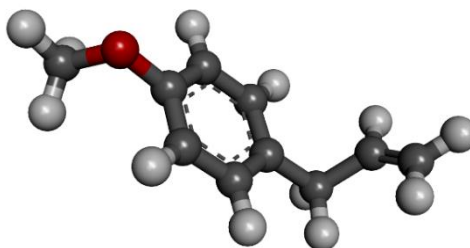
## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

### 2.1 METIL CHAVICOL

1-metóxi-4-prop-2-enilbenzeno, também conhecido como metil chavicol, estragol e *p*-alilanisol, é um metabólito especial pertencente à classe dos fenilpropanoides. Sua estrutura química é constituída por um anel benzeno com presença de um grupo metóxi (-OCH<sub>3</sub>) e um propenil (-CH<sub>3</sub>CHCH<sub>2</sub>) nas posições 1,4, respectivamente. É um líquido incolor com odor de anis, insolúvel em água, solúvel em etanol e clorofórmio. É constituinte majoritário de diversos óleos essenciais de plantas das famílias Apiaceae (*Pimpinella anisum* L., “anis”; *Foeniculum vulgare* Mill., “funcho”), Magnoliaceae (*Illicium verum* Hook f., “anis estrelado”) e Asteraceae (*Artemisia dracunculus* L., “estragão”) (PAULA et al., 2007). Figura 1 mostra a estrutura em 3D (modelo bolas e varetas) otimizada em Marvin Sketch 16.7.4 e refinada por MOPAC2012.

Figura 1 - Estrutura química do metil chavicol.



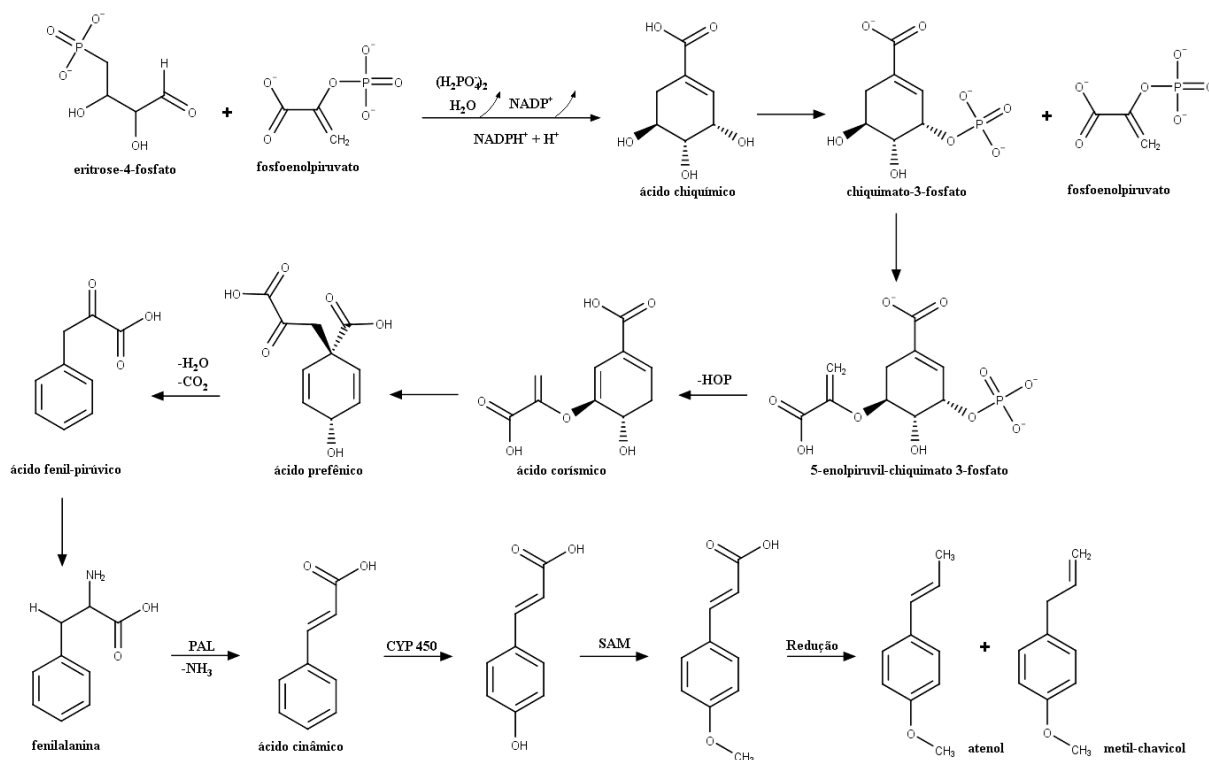
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017.

#### 2.1.1 Biossíntese e síntese

Metilchavicol é biossintetizado pela rota metabólica da via do ácido chiquímico. Essa rota inicia-se pela formação do ácido chiquímico por meio de uma condensação aldólica entre o fosfoenolpiruvato e a eritrose-4-fosfato, dois metabólitos da glicose. Uma vez formado, o ácido chiquímico pode ser metabolizado em ácido corísmico ou ácido gálico. O ácido corísmico, resultante da transformação de 5-enolpiruvil-chiquimato 3-fosfato (EPSP),

por meio de eliminação 1,4. O EPSP é formado a partir da incorporação uma molécula de fosfoenolpiruvato na cadeia lateral do ácido 3-fosfochiquímico. Para a formação dos aminoácidos aromáticos, um rearranjo intramolecular (rearranjo de Claisen) do ácido corísmico produz ácido prefênico (SIMÕES et al., 2003). Este sofre uma série de reações: descarboxilação, aromatização formando ácido fenil-pirúvico e, em seguida, uma aminação redutiva, origina o aminoácido fenilalanina. Pela ação da enzima fenilalanina amonialiase (PAL), a fenilalanina perde uma molécula de amônia originando o ácido cinâmico. Sob ação do citocromo P450-dependente, o ácido cinâmico recebe um grupamento hidroxila no anel aromático, formando o ácido *p*-cumárico. A hidroxila introduzida passa por uma reação de metilação, catalisada pela enzima metiltransferase de especificidade ampla (SAM – *specificity methyltransferase*). O processo de redução, também enzimático, gera dois isômeros: atenol e metil chavicol (DEWICK, 2009) (Esquema 1).

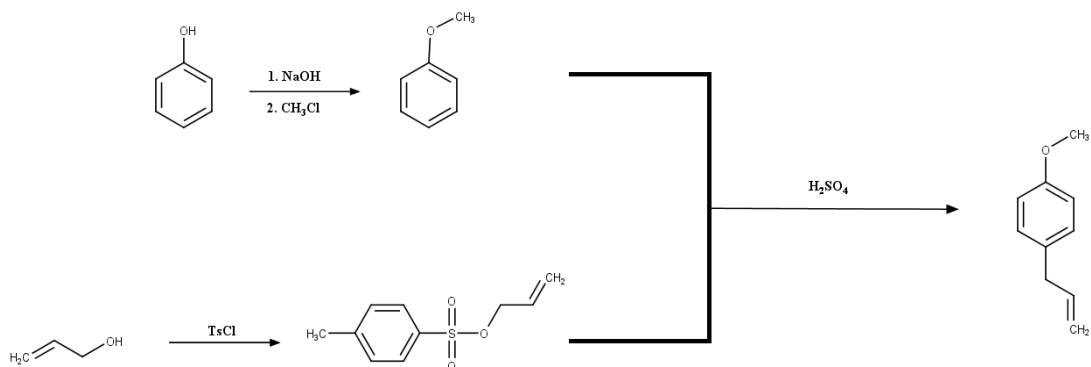
Esquema 1 - Biossíntese do metil chavicol.



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017.

A abordagem típica para síntese de constituintes alilfenólicos envolve a formação da ligação aril-alil C-C. Com isso, o metil chavicol pode ser obtido por meio de uma síntese convergente em três etapas realizadas a partir do fenol (Esquema 2).

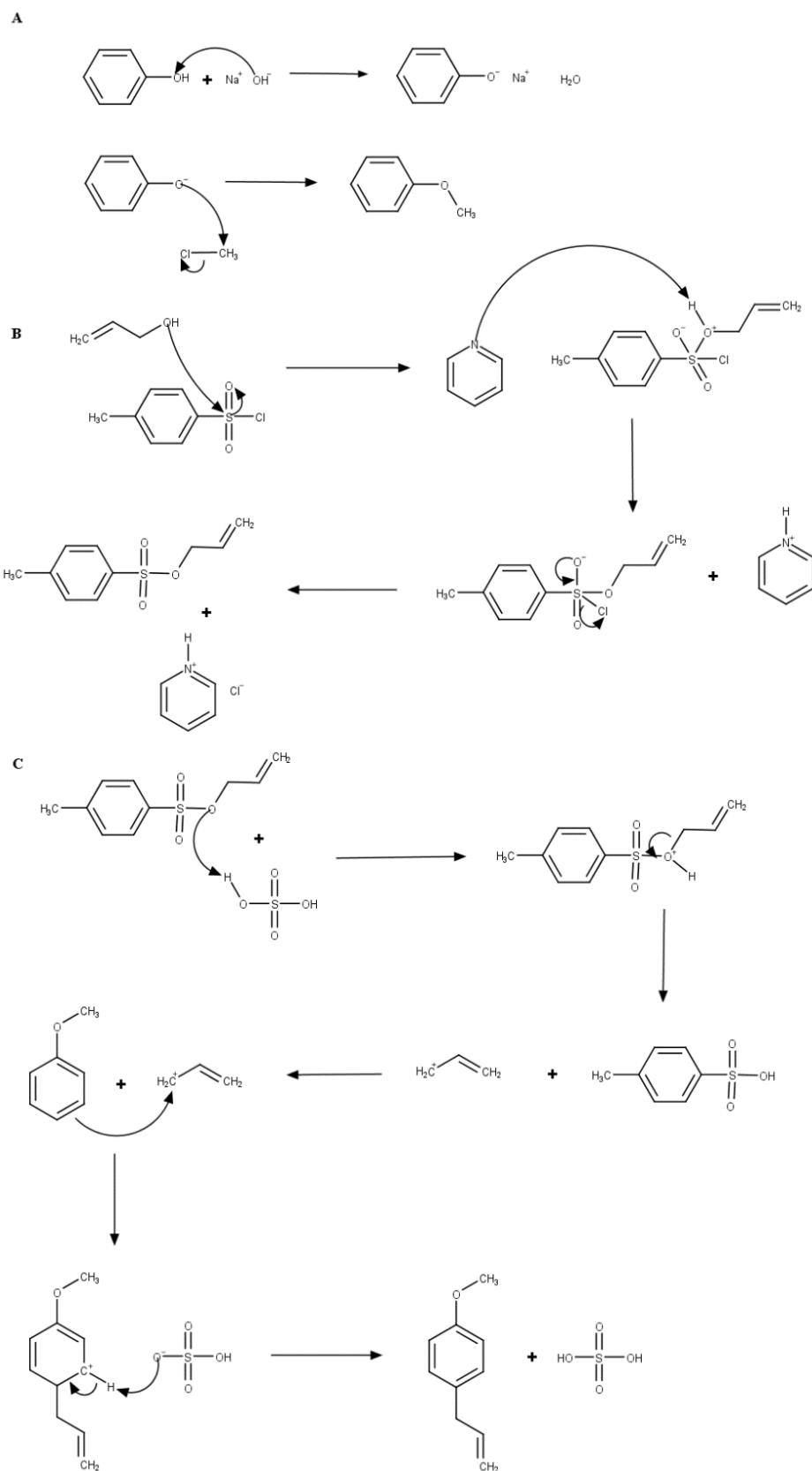
Esquema 2 - Síntese do metil chavicol



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017.

A primeira etapa consiste na preparação do ariléter por meio da reação de Williamson. A alquilação do oxigênio da hidroxila fenólica ocorre prontamente quando o íon fenóxido reage com cloreto de metila. O íon em questão forma-se a partir da desprotonação da hidroxila fenólica na presença de hidróxido de sódio (NaOH), uma base forte (Esquema 3A). A próxima etapa trata-se de uma reação de tosilação do álcool. O prop-2-ene-1-ol tem a hidroxila convertida a um grupo tosilato (excelente grupo de saída) ao reagir com cloreto de tosilato e piridina em excesso (Esquema 3B). O produto formado na presença de ácido sulfúrico é protonado, com formação subsequente do carbocátion prop-2-en-1-il. Tal espécie eletrofílica ataca o anel aromático, substituindo um dos átomos de hidrogênio em uma reação chamada substituição aromática eletrofílica (Esquema 3C) (BUCHOLZ et al., 2003). Entretanto, reações de alquilação, geralmente, são ineficientes ou não seletivas (SHIMIZU, 1997).

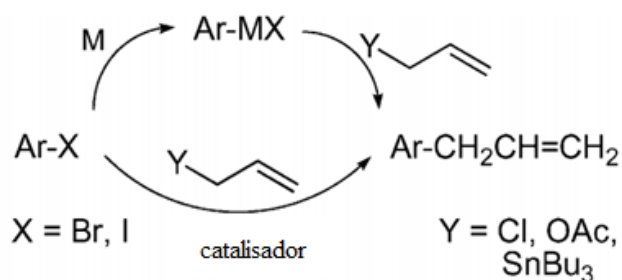
### Esquema 3 - Mecanismo da síntese do metil chavicol



Fonte: ADAPTADO DE BUCHOLZ et al., 2003.

Outras abordagens como acoplamento cruzado são preferencialmente utilizadas. Procedimentos eficientes com haletos de arila (principalmente iodetos ou brometos) por meio de reação de Stille. Trata-se de uma reação entre substância organoestanha com um haleto orgânico catalisado por paládio. Foram relatados estudos com uso de aril Grignard e derivados de aril zinco em catálise por níquel e /ou cobalto. Substâncias arilborônicas foram igualmente utilizados nas reações mediadas por paládio com acetato de alila (Esquema 4) (BOUYSSI; GERUSZ; BALME, 2002; GOMES; GOSMINI; PÉRICHON, 2003; INOUE et al., 2001; KONDO et al., 1994; LITTKE; FU, 1999; WENKERT et al., 1983;). Apesar do alto do rendimento obtido, essas reações mediadas por metais têm desvantagens significativas. Em muitos casos, estas ocorrem sob condições estritamente anidras e/ou a uma temperatura elevada e envolvem a utilização de reagentes caros e sensíveis, aditivos adicionais ou uma grande quantidade de catalisador. Além disso, se a molécula alvo tiver grupamento hidroxila livres, uma sequência de reação de proteção e desproteção deve ser cuidadosamente planejada. De qualquer forma, quando são destinados para uso farmacêutico, as substâncias organometálicas são tóxicas e devem ser completamente removidas (PROTTI; FAGNONI; ALBINI, 2005).

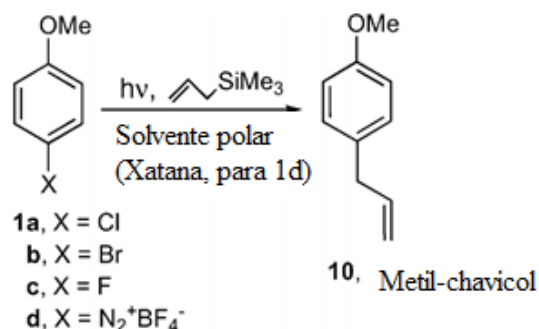
Esquema 4 - Reação de haleto orgânico na obtenção de alilfenol



Fonte: ADAPTADO DE PROTTI et al., 2005.

Alternativamente, a geração de cátion 4-metoxifenil por fotólise e adicionada prontamente a olefinas (Esquema 5). A reação deste cátion com aliltrimetilsilano conduziria ao correspondente aromático alilados após eliminação do cátion trimetilsilil (um bom grupo abandonador) (PROTTI et al.; 2004; PROTTI; FAGNONI; ALBINI, 2005).

Esquema 5 - Síntese do metil chavicol por fotólise.



Fonte: ADAPTADO DE PROTTI et al., 2005.

### 2.1.2 Atividades biológicas

Atividade inseticida do metilchavicol tem sido associada aos óleos essenciais de *Ocimum ssp.* (ricos em metil chavicol, trans-anetol, cis-anetol e eugenol, pois foram eficazes contra *Anopheles braziliensis*, mosquito transmissor da malária, dengue, febre amarela (PAULA et al., 2003). O óleo essencial de *Ocimum selloi* apresentou atividade repelente e ausência de risco mutagênico e de irritabilidade na pele humana. Essa substância também bloqueia a excitabilidade neuronal pela inibição dos canais de sódio ativados por voltagem através de um mecanismo semelhante aos anestésicos locais (SILVA-ALVES, 2013).

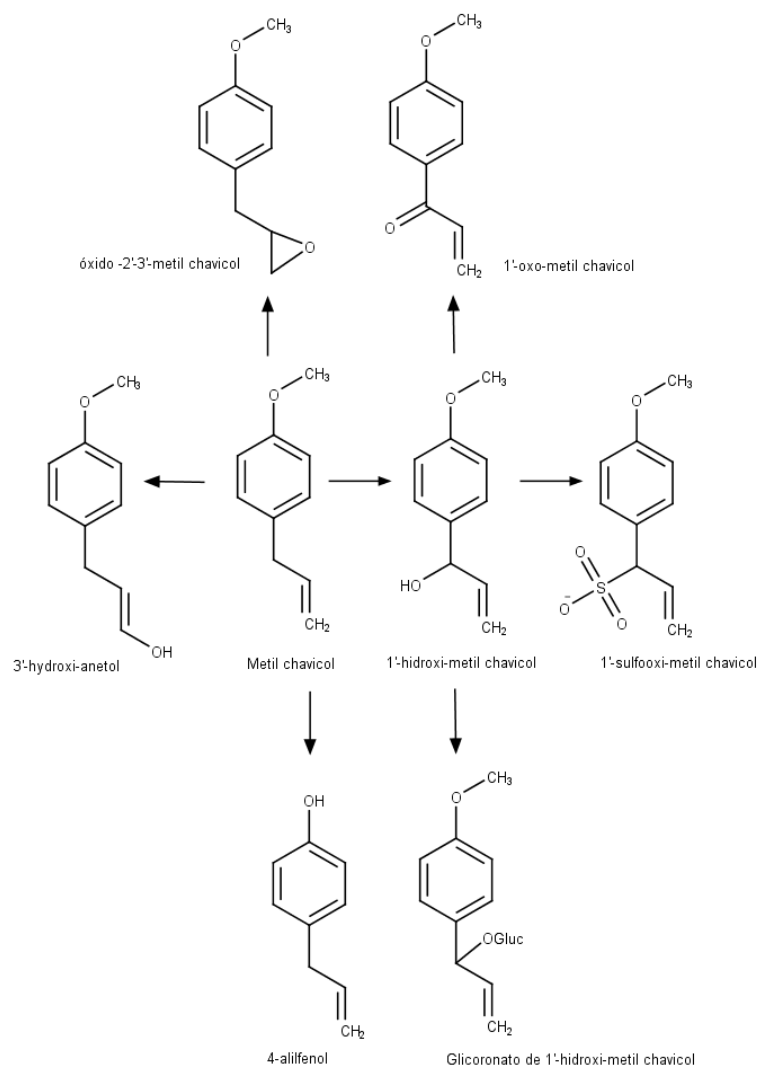
Atividade anti-inflamatória do metil chavicol foi descrita por Silva-Comar e colaboradores (2014), o qual inibiu a migração leucocitária e estimulou a fagocitose de macrófagos. Além disso, Pattanaik e colaboradores (1997) mostraram que o óleo essencial (linalol, 1,8 cineol, metil chavicol, eugenol e metil cinamato) de *O. basilicum* e seus constituintes revelaram que o metil chavicol apresentou uma atividade antimicrobiana relativamente pequena em comparação aos demais constituintes.

Análises por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectroscopia de massas realizada por Fitsiou e colaboradores (2016) evidenciaram que a espécie *Ocimum basilicum* contém metil chavicol como constituinte majoritário. Neste estudo, a atividade antiproliferativa dessa espécie foi mais citotóxica contra o modelo *in vitro* de câncer de cólon humano (linhagem Caco2) seguida por câncer de hepatocelular humano (linhagens HepG2) e adenocarcinoma de mama humano (MCF-7).

Em doses elevadas, o metil chavicol tem um potencial hepatocarcinogênico em diferentes roedores. A carcinogenicidade dessa substância está vinculada à conversão metabólica em metabólitos genotóxicos (DRINKWATER et al., 1976; MILLER et al., 1983;

WISEMAN et al., 1985). A bioativação do metil chavicol começa com uma conversão catalisada por citocromo P4501A2 e P4502A6a um metabólito carcinogênico: 1'-hidroximetil chavicol (Figura 2) (JEURISSEN et al., 2007). O metabolismo de fase I incluem *O*-desmetilação, epoxidação e 3'-hidroxilação, formando 4-alilfenol, metil chavicol-2',3'-óxido e 3'-hidroxianetol, respectivamente (ANTHONY et al., 1987; GUENTHNER; LUO, 2001; LUO et al., 1992; PHILLIPS et al., 1981; SANGSTER et al., 1987; SOLHEIM;SCHELIN, 1973). A sulfonação de 1'-hidroximetil chavicol gera o metabólito cancerígeno que, devido a sua instabilidade, degrada-se em um carbocátion que é capaz de ligar DNA (Figura 2) (PHILLIPS et al., 1981a, 1984b; RANDERATH et al., 1984; WISEMAN et al.,1985).

Figura 2 - Metabolismo do metil chavicol.



Fonte: ADAPTADO DE PUNT et al., 2009.

## 2.2 PLANEJAMENTO RACIONAL DE FÁRMACOS

Os fármacos, em sua maioria, são pequenas moléculas que possuem a capacidade de ligarem a um alvo fisiológico, como proteínas, modulando sua função. Considerando-se este conceito, os métodos computacionais tornaram-se de grande relevância, uma vez que podem extrair informações contidas na estrutura tridimensional de um alvo protéico e/ou de complexo ligante-alvo, assim como permitem entender o perfil de interações moleculares através da afinidade de ligação da pequena molécula à proteína. Assim, tais métodos são centrais para a estratégia de desenvolvimento de medicamentos, denominada planejamento racional de fármacos (HUNG; CHEN, 2014; GÜNTHER et al., 2003; JORGENSEN, 2010; JOSEPH-McCARTHY, 1999).

Tradicionalmente, os fármacos eram descobertos de maneira empírica, sendo um processo trabalhoso, caro e demorado. Todavia, dado ao grande número de moléculas orgânicas conhecidas, este processo não seria simplificado ao método de “sintetizar e testar”. A transformação do processo de desenvolvimento de um novo fármaco de uma operação empírica em um processo racional, baseando-se na estrutura tridimensional do alvo de interação, reduziria significativamente tanto o tempo quanto os custos envolvidos na descoberta e otimização de constituintes líderes e, conseqüentemente, no desenvolvimento de agentes farmacológicos promissores. É neste contexto em que o planejamento racional de fármacos, baseado na estrutura do receptor, se insere, representando atualmente uma ferramenta essencial em pesquisas pré-clínicas. As maiores indústrias farmacêuticas e de biotecnologia do mundo utilizam ferramentas computacionais nesta etapa da pesquisa (AMZEL, 1998; DAVIS; TEAGUE; KLEYWEGT, 2003; FARBER, 1999; GRINTER; ZOU, 2014; GÜNTHER et al.; 2003; HUNG; CHEN, 2014; JORGENSEN, 2010;MANDAL; MOUDGIL; MANDAL, 2009; RICHARDS, 1994; SINGH; MALIK; SHARMA, 2006).

O planejamento racional de fármaco lança mão do conhecimento do alvo biológico de interesse para se otimizar o processo de descoberta de novos medicamentos (GRINTER, ZOU, 2014). Racionalizando-se o chamado “espaço químico”, ou número total de moléculas orgânicas pequenas possíveis, estima-se aproximadamente  $10^{60}$ , o que significa, ao tentar desenvolver novas moléculas, nos deparamos com infinitas possibilidades. Portanto, a pesquisa de novos ligantes deve se restringir àqueles os quais apresentem algumas relevantes características espaciais eletrônicas que lhes permitam se ligar a uma proteína alvo de forma favorável (CAIN et al., 2014).



No planejamento racional de fármacos baseado em estrutura alguns passos são necessários tais como (AMZEL, 1998; FARBER, 1999; JOSEPH-McCARTHY, 1999; LYNE, 2002; WIEMAN et al., 2004):

- Identificar uma macromolécula alvo envolvida com o problema em questão, baseado no conhecimento do metabolismo do organismo em tudo,
- Determinar a estrutura tridimensional desta macromolécula, o que pode ser feito por meio de cristalografia de Raios X, ressonância magnética nuclear (NMR) ou modelagem molecular por homologia;
- Simular o encaixe de ligantes a estas macromoléculas utilizando ferramentas computacionais, possibilitando o estudo do complexo formado e a caracterização dos tipos de interações entre as moléculas (um destes métodos é o *docking* molecular);
- Estimar a afinidade destes ligantes ao alvo (uma das finalidades dos *softwares* de *docking*);
- Identificar um possível protótipo;
- Planejar possíveis melhorias neste composto a partir resultados obtidos nas simulações.

Com base nesses aspectos, a estrutura do complexo ligante-alvo é utilizada para se aperfeiçoar o desenho de novas substâncias com intuito de alcançar uma afinidade maior. Dessa forma, o planejamento baseado na estrutura do receptor serve para otimizar a potência de um dado ligante, melhorar suas propriedades e reduzir os efeitos colaterais e toxicidade. Neste sentido, o método *in silico* permite identificar as melhores direções para sínteses de novas moléculas bioativas, mais específicas para apenas um subgrupo de substâncias mais promissoras para ser sintetizada e testada experimentalmente. Além disso, permite obter respostas mais rápidas quanto à eficácia e segurança dos novos ligantes, uma vez que se busca desenvolver substâncias que se liguem fortemente a sítios receptores específicos, exercendo seu efeito biológico em doses mais baixas e de maneira seletiva à proteína alvo (AMZEL, 1998; BHARATH; MANJULA; VIJAYCHAND, 2011; DAVIS; TEAGUE; KLEYWEGT, 2003; FARBER, 1999; HUNG; CHEN, 2014; JORGENSEN, 2010; JOSEPH-McCARTHY, 1999; LYNE, 2002; SINGH; MALIK; SHARMA, 2006; SCHLOSSER; RAREY, 2009; SLIWOSKI et al., 2014).

A relação custo-benefício de se utilizar ferramentas computacionais na nesta fase da otimização de substâncias é de grande importância. O custo de se desenvolver um novo medicamento está entre 400 milhões a 2 bilhões de dólares, sendo que a síntese e análise dos

análogos dos protótipos representam uma grande parcela deste valor. Utilizar os métodos *in silico* nesta etapa possivelmente reduzirá o número de substâncias a serem sintetizadas e testadas *in vitro*, por excluir aqueles menos promissores. Ao considerar, os custos das ferramentas computacionais, comparado com a síntese química e caracterização biológica de substâncias, são baixos, tornando este método atrativo para focar, reduzir e diversificar o espaço químico a ser explorado no desenvolvimento de um novo fármaco (CORRÊA, 2015).

O planejamento de fármacos auxiliado por métodos computacionais já foi utilizado no descobrimento de substâncias que ultrapassaram a etapa de triagem clínica e se tornaram novos medicamentos no tratamento de diversas doenças, tais como captopril, inibidor da enzima conversora de angiotensina, aprovado em 1981, como um medicamento anti-hipertensivo. Outros exemplos como a dorzolamida, inibidor da anidrase carbônica, aprovada em 1995; saquinavir aprovado em 1995, ritonavir e indinavir, ambos aprovados em 1996 e os estes utilizados no tratamento da AIDS; tirofiban, um antagonista do fibrinogênio aprovado em 1998 (SLIWOSKI et al., 2014).

### 2.2.1 Modelagem molecular

Modelagem molecular é o estudo *in silico* de estruturas e propriedades moleculares pelo uso de química computacional e técnicas de visualização gráfica, com objetivo de fornecer uma representação tridimensional (SANT'ANNA, 2002). Como mencionado acima, a utilização destes métodos pode reduzir significativamente o tempo e os custos para o desenvolvimento de novos fármacos (GELDENHUYS et al., 2006). Suas aplicabilidades vão desde a criação, edição e visualização de moléculas, até otimização de geometrias e interações entre alvos biológicos e seus potenciais ligantes, como é o caso do *docking* molecular (MDL ISISDraw, 2016; XDrawChem, 2016; DELANO, 2004; SAYLE; MILNERWHITE, 1995; PURANEN; VAINIO; JOHNSON, 2010; HESS et al., 2008; GOODSSELL; MORRIS; OLSON, 1996; MORRIS et al., 2009; TROTT; OLSON, 2010)

### 2.2.2 *Docking* molecular

No planejamento racional de fármacos se faz necessário a uma estrutura tridimensional da macromolécula alvo e ferramentas computacionais a qual permitam construir e examinar como pequenas moléculas se encaixam ao sítio receptor deste alvo (JORGENSEN, 2010). Uma destas ferramentas é o *docking* molecular de grande valia neste tipo de planejamento.

*Docking* é um termo utilizado para designar métodos computacionais, os quais procuram o melhor “encaixe” entre duas moléculas, um receptor e um ligante dadas as coordenadas atômicas destas moléculas, tenta-se prever a interação entre elas. De maneira simplificada, tem por objetivo a identificação do modo de ligação, ou seja, orientação e conformação de uma pequena molécula (ligante) em um sítio de ligação de uma macromolécula (receptor), podendo formar um complexo estrutural estável (EWING; KUNTZ, 1997; EWING et al., 2001; GRINTER; ZOU, 2014; HUNG, CHEN, 2014; KUNTZ et al., 1982; MOUSTAKAS et al., 2006).

Sabe-se que a capacidade de uma molécula de interagir com uma proteína específica e exercer seu efeito biológico depende de sua habilidade de interagir favoravelmente com um sítio de ligação. Portanto, moléculas as quais compartilham destas interações favoráveis possivelmente exercem efeitos biológicos similares (SLIWOSKI et al., 2014). Sendo assim, os mecanismos de interação receptor-ligante podem ser utilizados para propor novos ligantes de maneira a otimizar a interação com sítio estudado da macromolécula alvo (KONTOYIANNI; McCLELLAN; SOKOL, 2004). Com conhecimento prévio do complexo proteína-ligante, a estrutura química inicial de um ligante poderá ser modificada para melhorar a afinidade pelo mesmo sítio. Os métodos de *docking* permitem estimar a afinidade e modo de interação de um complexo ligante-receptor, fornecendo informações sobre substâncias promissoras a serem investigadas (GRINTER; ZOU, 2014; RESTER, 2006).

O *docking* molecular tem um histórico bem-sucedido de aplicações práticas, incluindo a descoberta de novos inibidores enzimáticos, antagonista e agonistas de receptores, bloqueadores de canais iônicos, bem como novos fármacos aprovados que foram desenvolvidos com o auxílio do planejamento de fármacos baseado na estrutura (GRINTER; ZOU, 2014). Além do *docking* proteína-ligante, esta técnica permite a interação proteína-DNA, proteína-proteína (HUNG; CHEN, 2014).

Nos programas de *docking* molecular, os quais utilizam uma função de pontuação (*score*) baseada em campos de força (*force field*) (programas AutoDock e AutoDock Vina), a estabilidade da ligação receptor-ligante é medida pela intensidade de energia de interação das forças intermoleculares envolvidas na ligação entre os átomos do ligante e dos átomos do sítio ativo do receptor. Estas forças intermoleculares são fracas comparadas com as forças intramoleculares e são, em geral, reversíveis. Quanto menor for a energia de interação, maior é a estabilidade do complexo. Assim, o número de interações intermoleculares, os tipos e intensidades das mesmas exercem profunda influência sobre a estabilidade de interação calculada entre o ligante e o receptor de interesse. Como é observado nos resultados de

cálculos, uma interação de ligação de hidrogênio é, tipicamente, cerca de dez vezes mais estável do que uma interação do tipo Van der Waals.

#### 2.2.2.1 AutoDock Vina

O programa AutoDock Vina (TROTT; OLSON, 2010) é uma versão adaptada do programa AutoDock (GOODSELL; MORRIS; OLSON, 1996; MORRIS et al., 2009) com suporte a execução *multicore*, ou seja, pode ocorrer em diversos núcleos de processamento existentes na máquina para paralelizar a carga ou demanda computacional dos cálculos envolvidos no procedimento. O paralelismo utilizado pelo AutoDock Vina consiste em dividir a superfície de busca de seus algoritmos genéticos em diversas subáreas de cálculos para distribuí-las nos diversos núcleos de processamento da máquina. Portanto, cada núcleo promove a evolução das populações em uma determinada região específica do domínio de buscas. No final, os complexos proteína alvo-ligante mais estáveis, encontrados durante cálculos, são reunidos e organizados de forma crescente em relação aos valores de energias de interação calculados (TROTT, OLSON, 2010).

É oportuno lembrar que AutoDock Vina é uma ferramenta *open-source*, que se faz necessário converter o formato dos arquivos das moléculas para o formato PDBQT, um formato estendido do PDB (PDB DATABASE, 2016) no qual conterà as informações estruturais da molécula, as cargas elétricas de cada átomo que constitui a molécula (Q) e os tipos e números de torções (T).

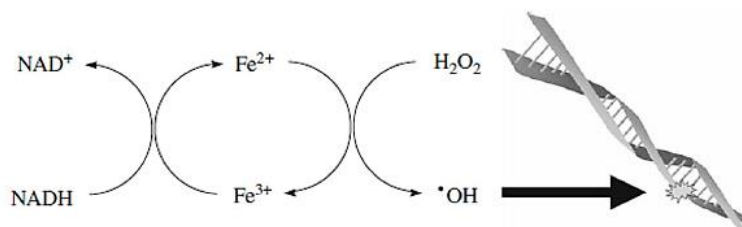
### 2.3 ASPECTOS GERAIS DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Com a produção energética em células eucarióticas, moléculas com elétrons desemparelhados, derivados do metabolismo oxidativo, altamente reativas e instáveis são geradas e, comumente, denominadas de radicais livres (RL) ou espécies reativas de oxigênio (EROS) (SOSA et al., 2013; VALKO et al., 2007). A produção endógena de RL está associada às atividades de enzimas, tais como oxidases, ciclo-oxigenases, lipoxigenases, desidrogenases e peroxidases, redução de flavinas e tióis, presença de metais de transição no interior da célula e de sistemas de transporte de elétrons. Além disso, RL podem ser gerados por fontes exógenas, incluindo uso de tabaco, poluição do ar, solventes orgânicos, anestésicos, pesticidas e radiações (DRÖGE, 2002; LI; ISHDORJ; GIBSON, 2012; SOSA et al., 2013).

RL classificam-se em quatro grupos, de acordo com o principal átomo envolvido: espécies reativas de oxigênio (ERO), nitrogênio (ERN), enxofre (ERS) e cloreto (ERC). As ERO são as mais abundantes e podem ser do tipo radicalar, como hidroxila ( $\text{OH}^\bullet$ ), superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), peroxila ( $\text{ROO}^\bullet$ ) e alcoxila ( $\text{RO}^\bullet$ ); e não-radicalar como peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e oxigênio ( $\text{O}_2$ ). O estresse oxidativo (dano causado pelos radicais livres) depende de suas concentrações intramoleculares, o que determina o equilíbrio redox, ou seja, o balanço entre suas taxas de produção e eliminação (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2005; LI; ISHDORJ; GIBSON, 2012; SOSA et al., 2013).

O desequilíbrio entre as espécies químicas “pró-oxidantes” e “antioxidantes” provoca o estresse oxidativo, o qual causa danos diversos, como peroxidação das membranas lipídicas, agressão às proteínas teciduais, danos ao DNA e RNA (Figura 3), levando a patologias, como doenças inflamatórias, cardiovasculares, neuro-degenerativas, alergias, envelhecimento acelerado, hemorragias, catarata, disfunções imunológicas e câncer (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2005; DRÖGE, 2002; SOSA et al., 2013; VALKO et al., 2007).

Figura 3 - Imagem ilustrativa do dano causado pelo radical hidroxila ao DNA



Fonte: ADAPTADO DE PERRON et al., 2009.

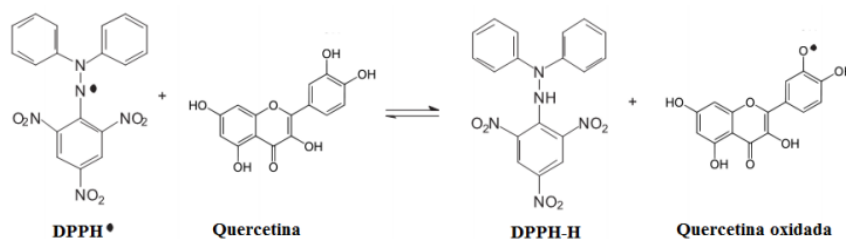
Em decorrência ao estresse oxidativo, os organismos vivos se adaptaram tanto à presença quanto a ação de RL, desenvolvendo complexos mecanismos, como de prevenção, reparo dos danos, defesa física e antioxidante. Este último mecanismo, são substâncias são capazes de retardar ou inibir a oxidação de substratos oxidáveis, mesmo em baixa concentração comparada ao substrato (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2005; LI; ISHDORJ; GIBSON, 2012; SOSA et al., 2013). O mecanismo de ação dos antioxidantes consiste em neutralizar RL, seja por meio de doação de elétrons ou por prevenção da formação destes e das cadeias autooxidativa, poder redutor, capacidade de complexar com metais, inibição de enzimas pró-oxidantes e reparo dos danos causados (LI; ISHDORJ; GIBSON, 2012; MAGALHÃES et al., 2008; VALKO et al., 2007).

Os antioxidantes podem ser enzimáticos ou não-enzimáticos. Dos enzimáticos podem ser citados glutatona peroxidase/GPX ou micromoléculas como ácido úrico e diversos aminoácidos. Os não-enzimáticos tem como exemplos produtos encontrados em espécies vegetais, destacando os flavonoides, carotenoides, tocoferóis, ácido ascórbico e outras substâncias fenólicas e/ ou antioxidantes sintéticos como N-acetilcisteína e selênio (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2005; SOSA et al., 2013; VALKO et al., 2007). As substâncias fenólicas têm papel fundamental como antioxidante devido às suas propriedades redutoras e estrutura química. Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou no sequestro de RL e na quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (LIMA et al., 2006; PERRON et al., 2009).

Os métodos para avaliar a atividade antioxidante podem ser divididos em químicos (*in vitro*) e biológicos (cultura de célula e *in vivo*). Como os mais utilizados na pesquisa, os ensaios químicos constituem quatro tipos principais, de acordo com o mecanismo antioxidante avaliado: sequestro de radicais livres estáveis; poder de redução de íons metálicos; métodos competitivos e inibição da oxidação lipídica.

O sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH<sup>•</sup>) ou método do DPPH tem sido utilizado preliminarmente na pesquisa por ser um ensaio simples e altamente sensível. É um método colorimétrico no qual, na presença de antioxidante, o DPPH<sup>•</sup>, cuja coloração púrpura é devido à sua capacidade de deslocalização eletrônica, é reduzido e gera sua forma estável DPPH-H (2,2-difenilpicril-hidrazina) cuja coloração é amarela. O mecanismo reacional consiste na transferência de elétrons do antioxidante para o radical, acompanhada pela abstração de um átomo de hidrogênio (Figura 4) (OLIVEIRA et al., 2009). O DPPH<sup>•</sup> absorve próximo a 520 nm e sua redução pelo antioxidante é monitorada por espectrofotometria pelo decaimento da absorbância (ALVES et al., 2010; CAROCHO; FERREIRA, 2013; MOON; SHIBAMOTO, 2009).

Figura 4 - Estrutura química do radical DPPH e reação de estabilização com um antioxidante

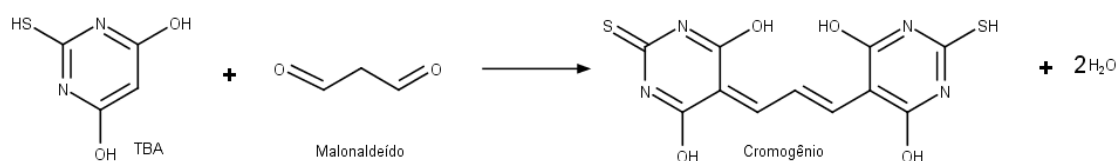


Fonte: ADAPTADO DE OLIVEIRA et al., 2009.

O sistema de co-oxidação  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico avalia a atividade antioxidante por meio da capacidade de determinada substância em inibir a formação e/ou sequestrar os radicais livres gerados na peroxidação lipídica (oxidação do ácido linoleico). Mediante a presença de ERO e  $O_2$ , o ácido linoleico forma radicais peroxila ( $LOO^\bullet$ ), os quais reagem com o  $\beta$ -caroteno, oxidando-o e diminuindo a sua quantidade no meio. Conseqüentemente, a perda da coloração alaranjada do sistema e queda da absorvância. Moléculas antioxidantes frente às soluções atuam inibindo a peroxidação lipídica, assim como competindo pela redução dos radicais peroxila, o que reduz ou inibe o clareamento da solução (ALVES et al., 2010; MOON; SHIBAMOTO, 2009).

Outro método que permite avaliar a peroxidação lipídica é a determinação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA). O ensaio permite a quantificação do malonaldeído (MDA), um dialdeído formado como produto secundário durante a oxidação de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) por cisão *beta* dos AGPI peroxidados (LIMA; ABDALLA, 2001). Em condições apropriadas (hidrólise ácida), reage eficientemente com uma variedade de agentes nucleofílicos, os quais produzem cromógenos com alta absorvidade molar no espectro visível. A condensação do MDA com TBA (Figura 5) forma produtos que podem ser determinados por espectrofotometria com absorção próximo em 532 nm.

Figura 5 - Reação de formação do complexo cromogênico a partir do ácido tiobarbitúrico com malonaldeído



Fonte: ADAPTADO DE OSAWA, FELÍCIO e GONÇALVES, 2005.

Embora o método seja sensível e simples, não possui especificidade para o MDA, visto que outras substâncias podem reagir com o TBA. Esta inespecificidade é particularmente importante contendo AGPI autoxidados como produtos de decomposição secundária, o que inclui mistura de substâncias saturadas de cadeia curta (alcano), insaturados (alcenos e alcadienos) e aldeídos, além de MDA. E estes, em condições apropriadas de incubação, também são reativos ao TBA, formando produtos com um espectro no visível similar ao do complexo MDA-TBA. O teste espectrofotométrico com TBA pode medir uma variedade de espécies que absorve em 532 nm. Outra interferência neste método deve-se a presença de metais de transição, o que possibilita a geração de MDA durante análise (LIMA; ABDALLA, 2001).

Os resultados obtidos por meio de ensaio *in vitro* não podem ser extrapolados para condições em *in vivo*, uma vez que o mecanismo de ação dos antioxidantes não se limita a sequestro de radicais livres e/ou inibição da formação destes. Os mecanismos também envolvem a suprarregulação enzimática e sinalização celular, o que leva à necessidade de teste *in vivo* e celulares (CAROCHO; FERREIRA, 2013).

## 2.4 ASPECTOS GERAIS DA ATIVIDADE DO METABOLISMO LÍPIDICO

A Síndrome Metabólica (SM) caracteriza-se por uma situação clínica a qual inclui fatores de risco para doença cardiovascular como obesidade visceral, disfunção endotelial, dislipidemia e hipertensão arterial. Além disso, está associada ao desenvolvimento de diabetes melito tipo 2, devido à presença de resistência à ação da insulina (PICON et al., 2005). A concomitância entre a SM e as afecções cardiovasculares aumenta o risco de mortalidade geral em cerca de 1,5 vezes e a cardiovasculares em aproximadamente 2,5 vezes (BRANDÃO et al., 2005).

A diagnose da SM tem tido divergência na definição, parâmetros e políticas de saúde entre a Organização Mundial de Saúde (considera a resistência à insulina ou distúrbio do metabolismo da glicose) (ALBERTI; ZIMMET, 1998) e o *National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III* (NCEP-ATP III), desenvolvida para uso clínico, não exige a comprovação de resistência de à insulina (NCEP-ATP III, 2002). Este define a SM como a combinação de no mínimo três componentes demonstrado na Tabela 1.



Tabela 1 - Componentes da SM definida pela NCEP-ATP III

Componentes	Níveis	
Obesidade abdominal por meio da circunferência abdominal	Homens	> 102 cm
	Mulheres	> 88 cm
Triglicerídeos		≤ 150 mg/dL
HDL Colesterol	Homens	< 40 mg/dL
	Mulheres	< 50 mg/dL
Pressão arterial		≤ 130 mmHg ou ≥ 885 mmHg
Glicemia de jejum		≤ 110 mg/dL

Fonte: ADAPTADO DE NCEP-ATP III, 2002.

Além de ser um componente da SM, a obesidade se tornou um grave problema de saúde mundial e dados epidemiológicos da OMS indicam que 1,9 bilhões de adultos acima de 18 anos estão com excesso de peso e 600 milhões são obesos (GANESH et al., 2015). O desequilíbrio do metabolismo lipídico pode desenvolver um quadro de hiperlipidemia ou de obesidade e medidas, como a redução da ingestão calórica e prática de exercícios, devem ser adotadas. A utilização de agentes antiobesidade é um coadjuvante indispensável na existênciade risco para a saúde (WADDEN, 1998).

A obesidade e a resistência à insulina promovem o aumento de doença por dano oxidativo a proteínas, lipídios, DNA e processo inflamatório devido à geração de RL e deficiência na desintoxicação celular e reparos de moléculas danificadas (MATTSON, 2009). Nessas vias do metabolismo, a peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO) é um dos processos desencadeados, pois forma hidroperóxido lipídico pela incorporação de oxigênio molecular a um dos ácidos graxos poliinsaturados (AGPI). No meio biológico, LPO pode ocorrer pela vias enzimática, envolvendo as ciclooxigenases e lipoxigenases na oxigenação do AGPI, e não enzimática, participação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e metais de transição. Portanto, a avaliação do processo de LPO pode ser utilizada como um indicador do estresse oxidativo celular da obesidade.

#### 2.4.1 Triglicerídios e sua digestão

Os lipídios são um grupo heterogêneo de substâncias, caracterizados pela hidrofobia e alta solubilidade em solventes orgânicos. Uma das mais abundantes classes de lipídios são os triacilgliceróis ou triglicerídios. As gorduras existem, sobretudo, no tecido

adiposo, são os componentes lipídicos da dieta e são misturas de diferentes tipos de triglicerídios. Por definição os triglicerídios são ésteres de ácidos graxos e glicerol (SILVA et al., 1999).

O processo de digestão dos triglicerídios inicia-se em no estômago, em pequenas quantidades, catalisada por uma lipase estável em meio ácido, que se origina de glândulas na base da língua (lipase lingual). Em seguida, os triglicerídios progridem praticamente intactos até o intestino delgado pela ação da lipase gástrica pela hidrólise estomacal, cuja atividade enzimática é lenta e pouco eficiente. No duodeno, ocorre a liberação de agentes emulsificantes, promovendo dois mecanismos: o uso das propriedades detergentes dos sais biliares e a mistura mecânica devido ao peristaltismo. Tais mecanismos aumentam a área da superfície das gotículas de lipídios, propiciando que a lipase pancreática atue (LOTTERNBERG, 2009).

A lipase pancreática remove ácidos graxos preferencialmente dos carbonos 1 e 3, liberando ácidos graxos livres e 2-monoacilglicerol, que formam micelas mistas e são absorvidos pelos enterócitos. Os ácidos graxos são unidos novamente em triglicerídios. Após sua absorção, os triglicerídios ligam-se a proteínas, devido à baixa solubilidade, para serem transportados pelo organismo. As principais lipoproteínas são os quilomicra, as lipoproteínas LDL-colesterol (*low density lipoprotein*) e as HDL-colesterol (*high density lipoprotein*). Vale ressaltar que o LDL transporta colesterol do fígado até os tecidos periféricos, enquanto o HDL captura colesterol dos tecidos e o transporta até o fígado, onde são convertidos a ácidos biliares (ALVIM, 2002; GUYTON et al., 2006).

Agentes antilipase (orlistate, por exemplo) são inibidores de lipases digestivas, atuam por meio da redução ou bloqueio da digestão de gordura, impedindo absorção da mesma e, portanto, imitam o efeito da redução da ingestão de alimentos (SILVA et al., 2009; FORTES et al., 2006).

## 2.5 INFLAMAÇÃO TÓPICA

A pele relaciona-se diretamente com meio externo como barreira física sujeita a lesões causadas por agentes químicos, mecânicos, patógenos e resposta autoimune. Esses estímulos podem desencadear reações imediatas de proteção ao organismo, denominada resposta inflamatória (FIRESTEIN, 2004). A inflamação descreve as respostas dos tecidos vascularizados, envolta de manifestações hemodinâmicas, interações celulares e atividade de

fatores solúveis, constituindo uma resposta protetora imediata do sistema imune a algum tipo de agressão ao organismo (LARSEN, HENSON, 1983).

O primeiro passo na cadeia integrada de reações mediadas pelo sistema imune envolve o reconhecimento do estímulo agressor o qual induz a produção e liberação de mediadores químicos como histamina, prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos, fator de ativação plaquetária, bradicinina, óxido nítrico, neuropeptídeos e citocininas (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009). Entretanto, cada tipo de estímulo resulta em um padrão característico de resposta por parte do sistema imunológico, dependente dos componentes de reconhecimento e mediadores produzidos (ALI et al., 1997; SILVA; CARVALHO, 2004).

O processo inflamatório tem base em três fases distintas: transitória aguda (vasodilatação local e aumento da permeabilidade vascular), subaguda (infiltração dos leucócitos e células fagocitárias) e proliferativa crônica (degeneração tecidual e fibrose) (SILVA; CARVALHO, 2004). Os sinais cardinais da inflamação – calor, rubor, dor, edema e perda de função – são consequência dos efeitos sobre a circulação sanguínea no local, permeabilidade vascular, infiltração de leucócitos, liberação de agentes indutores de dor. Tais efeitos podem levar ao processo de necrose o que depende do tipo de tecido envolvido e o processo inflamatório em si (ALI et al., 1997; LARSEN; HENSON, 1983). Neste sentido, a resposta inflamatória é benéfica e fisiológica pela qual o organismo se defende e repara danos teciduais ou perda de funções (LAWRENCE et al., 2002).

Como previamente mencionado, a pele tem função de proteger o organismo de estímulos nocivos, exercendo inclusive proteção imunológica associada à imunidade inata, também conhecida como natural ou nativa (ALI et al., 1997; LARSEN; HENSON, 1983). Os queratinócitos são os principais constituintes da epiderme e desempenham um papel ativo na resposta imune inata por secretar uma variedade de citocinas e quimiocinas. Estes armazenam grande quantidade de interleucina 1 (IL-1) em seu citoplasma, podendo liberá-la quando danificados, iniciando uma cascata inflamatória. A liberação de citocinas pró-inflamatórias é necessária para ativar a resposta imune (DONNARUMMA, 2011). Em resposta, os queratinócitos adjacentes liberam mais IL-1 $\alpha$ , assim como IL-1 $\beta$ , fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e IL-6, amplificando o sinal inicial. Simultaneamente, os queratinócitos produzem quimiocinas, incluindo IL-8 e fatores de crescimento, como IL-7 e IL-15, que facilitam sua sobrevivência e induzem à ativação de leucócitos em resposta às quimiocinas (SPELLBERG, 2000). Entretanto, entre todas as citocinas produzidas pelos queratinócitos, somente as primárias (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ) ativam um número suficiente de mecanismos efetores capazes de desencadear uma resposta inflamatória cutânea (KUPPER, 1990).

Além dos queratinócitos, outras células residentes na epiderme e derme, como fibroblastos, células endoteliais, melanócitos e macrófagos também produzem diversas citocinas mediante um estímulo (BURBACH et al., 2000). Em resposta à invasão microbiana, os queratinócitos montam eficazes defesas da imunidade inata através da ativação de uma grande variedade de receptores de tipo Toll (TLR) (MCINTURFF et al., 2005; POTAPOVICH, 2011).

Os mastócitos são células derivadas da medula óssea, residem na maioria dos tecidos adjacentes aos vasos sanguíneos, efetora das reações de hipersensibilidade e autoimunes participando das respostas imunes inata e adquirida. Expressam um receptor Fc de alta afinidade para imunoglobulina do tipo E (IgE) dependentes de reações de hipersensibilidade imediata por meio de sua capacidade de resposta aos alérgenos com liberação de mediadores inflamatórios via de liberação de grânulos, produção de lipídios inflamatórios e síntese de citocinas. É evidente que as respostas dos mastócitos aos alérgenos são reguladas por uma variedade de fatores endógenos e exógenos (ANDRADE et al., 2011).

A exposição da pele a uma variedade de estímulos, tais como citocinas (interferon- $\gamma$ , fator de necrose tumoral- $\alpha$ ), radiação UV e 12-*O*-tetradecanoilforbol-acetato (TPA) leva à produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROS), direta ou indiretamente, as quais desempenham um papel crítico no desenvolvimento de várias doenças inflamatórias da pele, tais como a dermatite atópica (OTUKI et al., 2011).

O óxido nítrico (NO) é uma molécula de sinalização envolvida em vários processos fisiológicos e patológicos. NO é sintetizado por três tipos de NO sintase (NOS): NOS neuronal (nNOS), NOS endotelial (eNOS) e NOS induzível (iNOS) que são expressas na pele (CALSGRIERSON; ORMEROD, 2004; MENDES, et al., 2012). Na pele, o NO tem numerosas funções homeostáticas, incluindo a proliferação de queratinócitos, melanogênese, angiogênese, a cura de feridas, o fluxo de sangue, a regulação do tônus vascular, neurotransmissão, a agregação plaquetária, o aquecimento e outros mecanismos homeostáticos. NO também está envolvido em condições patológicas, como doenças imuno-mediadas, pele e outras doenças inflamatórias, incluindo as queimaduras solares, necrose, psoríase e lúpus eritematoso cutâneo (MENDES, et al., 2012).

Citocinas são polipeptídeos ou glicoproteínas extracelulares, liberadas localmente durante a inflamação pelos queratinócitos (NIU; RO, 2011). Algumas citocinas podem ter ações pró como IL-1, 2, 6, e 7 e TNF ou anti-inflamatória como IL-4, 10, 13 e transformador de crescimento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), de acordo com o microambiente no qual estão localizadas. Não é possível classificar as citocinas quanto à célula de origem ou quanto à função biológica, elas

foram agrupadas em interleucinas 1 a interleucina 35 sequencialmente (IL-1 a IL-35), TNF, quimiocinas (citocinas quimiotáticas), interferons (IFN) e fatores de crescimento mesenquimal (OLIVEIRA et al., 2011).

As citocinas também podem diretamente sensibilizar nociceptores e aumentar a sensibilidade neuronal ao calor, estímulos mecânicos e químicos. As citocinas inflamatórias, tais como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , contribuem para a dore hiperalgesia indiretamente por meio da induçãoda produção de agentes inflamatórios que sensibilizamos nociceptores. Além disso, as citocinas inflamatórias são potentes moduladores da expressão dos receptores envolvidos na doreanalgesia (NIU; RO, 2011). As respostas imune e inflamatória são reguladas pelas citocinas, de forma autócrina e parácrina, por meio da interação com receptores específicos presentes nos queratinócitos, fibroblastos, células de Langerhans, células endoteliais e linfócitos T infiltrados, acarretando a mobilidade de leucócitos a partir do sangue e a ativação de outras células do tecido cutâneo (RANG et al., 2007; UCHI et al., 2000).

A ativação da proteína quinase C (PKC), proteína quinase A (PKA), fator de transcrição nuclear – Kappa B (NF- $\kappa$ B) e proteína ativadora-1 (AP-1) podem ocorrer pela exposição celular pelas citocinas primárias (IL-1 e TNF-  $\alpha$ ), por meio de receptores próprios. Estes fatores de transcrição, quando ativados, induzem a transcrição gênica de diversas citocinas (TNF-  $\alpha$ , IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, GM-CSF, TGFB1 - fator de crescimento tumoral), quimiocinas, moléculas de adesão e enzimas responsáveis pela produção de mediadores inflamatórios secundários óxido nítrico sintetase induzida (iNOS) e cicloxigenase-2 (COX-2) (PASCUAL; GLASS, 2006; LAWRENCE; GILROY, 2007). Essas citocinas difundem pela vasculatura cutânea, informando às células endoteliais que uma resposta inflamatória está em andamento. Ocorre também a ativação de linfócitos T locais e células de Langerhans que se encontram adjacentes às células T, desenvolvendo ação como apresentadoras de antígenos a estes linfócitos. Após ativação das células T, o meio de citocinas da epiderme torna-se significativamente mais complexo, uma vez que estas células irão produzir mais citocinas, interferon (IFN)- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e mais TNF- $\alpha$ , além de outras citocinas pró-inflamatórias como IL-17, a qual promove aumento na secreção de IL-6 e IL-8 pelos queratinócitos, que são, então, estimulados a expressar moléculas de adesão como ICAM (molécula de adesão intercelular). Simultaneamente, as defesas locais são rapidamente ativadas pelo recrutamento de macrófagos, que estimulados por citocinas oriundas da epiderme e por estímulos antigênicos, mobilizam seu citoesqueleto para tornarem-se móveis, acabando por secretar metaloproteinases e outras enzimas de degradação, que lhes permite romper o colágeno e outros componentes estruturais e assim atravessar em direção à epiderme. Enquanto isto, as

células de Langerhans ativadas irão fazer o caminho contrário aos macrófagos, deixando a epiderme em direção aos linfonodos, onde irão encontrar células T conservadas e apresentar o antígeno, voltando, posteriormente, ao compartimento dérmico. Ao mesmo tempo, a vasculatura dérmica iniciará um processo chamado de defesas sistêmicas (SPELLBERG, 2000).

O ácido araquidônico (AA) é liberado pelos fosfolipídios das membranas celulares através de alguns estímulos (químicos, inflamatórios, traumáticos e miogênicos) e/ou por mediadores, a partir da ativação da enzima fosfolipase A2 (PLA2), sendo esta precursora de vários eicosanóides. AA é liberado na inflamação a partir da membrana dos glóbulos brancos ativados, sendo fundamental para a inflamação, pois a sua metabolização gera vários mediadores inflamatórios como prostaglandinas e tromboxanos (PGE2, PGD2, PGF2 $\alpha$ , PGI2, TXA2). Existem duas vias que AA pode seguir simultaneamente após ser sintetizado: via ciclooxigenases 1, 2 e 3 (COX-1, COX-2 e COX-3) e via das lipoxigenase (HILÁRIO; TERRERI; LEN, 2006, YEDGAR et al., 2007). Na pele normal, a COX-1 está distribuída em toda a epiderme, enquanto a COX-2 se localiza principalmente nos queratinócitos supra-basais, sendo rapidamente induzida frente a um estímulo inflamatório (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004; LEE et al., 2003).

As lipoxigenases que estão presentes principalmente no citosol são encontradas nos pulmões, plaquetas, mastócitos e leucócitos. A principal enzima do grupo é a 5-lipoxigenase (5-LOX) que atua sobre o ácido araquidônico, produzindo o ácido 5-hidroperoxieicosatetraenóico (5 HPETE) e é convertido em leucotrieno A4 (LTA4). O LTA4 pode ser convertido em leucotrieno B4 (LTB4) ou em uma série de cisteinilleucotrienos (LTC4, LTD4 e LTE4). LTB4 é produzido principalmente por neutrófilos e macrófagos (MURI; SPOSITO; METSAVAH, 2009), enquanto os cisteinil leucotrienos, principalmente por eosinófilos, mastócitos, basófilos e macrófagos (BELCH; HILL, 2000).

As prostaglandinas E2 (PGE2) são as principais prostaglandinas presente no tecido cutâneo e são responsáveis pela modulação de vários eventos inflamatórios, como o aumento da permeabilidade vascular e vasodilatação, contribuindo para formação do edema e na adesão e diapedese dos neutrófilos e monócitos. No entanto, o tráfego dos linfócitos a partir do lúmen pós-capilar para o espaço intersticial já é um processo mediado em parte pelo LTB4 (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004; LEE et al., 2003).

A histamina e a serotonina, são especificamente importantes porque estão disponíveis em reservas pré-formadas e estão entre os primeiros mediadores a serem liberados durante a inflamação (MACGLASHAN, 2003). A histamina desempenha uma ação

importante durante o processo inflamatório cutâneo, pois atua em muitos processos fisiológicos celulares, mas também intervêm nas reações alérgicas e na inflamação, sendo esse um dos principais motivos dos mastócitos estarem estrategicamente localizados na microvasculatura dos tecidos que estão em contato com o meio externo, como a pele, pulmões e intestinos. A liberação da histamina ocorre pelo processo de exocitose durante as reações inflamatórias ou alérgicas, através da interação de fatores do sistema complemento (C3a e C5a) e de antígenos com anticorpos IgE fixados nos mastócitos. Após a degranulação dos mastócitos, a histamina atua em receptores específicos (receptores histaminérgicos), promovendo a constrição do músculo liso, vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular (SCHARAMM; THORLACIUS, 2004; SILVA; CARVALHO, 2004; SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

A função coordenada da população celular presente na derme e epiderme permite que ocorra uma resposta rápida e efetiva frente à variedade de estímulos que ocorrem na interface entre o organismo e o meio externo (WILLIAMS; KUPPER, 1996). Todo esse evento é dinâmico, culminando na resolução o que caracteriza o processo agudo. Entretanto, em certas ocasiões, o processo se perpetua passando a inflamação a deixar de ser um processo de proteção, mudando para agressão ao organismo como acontece com doenças inflamatórias autoimunes (SHIRASAKI et al., 2009).

## 2.6 ASPECTOS GERAIS DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

Os modelos de inflamação *in vivo*, como edema de pata e de orelha induzido por agentes flogísticos e pleurisia são frequentemente utilizados nos estudos de atividade anti-inflamatória de substâncias e produtos naturais (WILLOUGHBY, 2003). O modelo de edema de orelha é extremamente útil na avaliação da atividade anti-inflamatória tópica, por ser uma metodologia bastante simples e rápida, requer pequena quantidade de amostra, apresenta boa reprodutibilidade, fornece resultados rápidos e com elevado grau de confiança, além de identificar substâncias que tenham a capacidade de penetrar na pele (GÁBOR, 2003). O óleo de cróton é um potente agente irritante obtido da espécie *Croton tiglium* L. (Euphorbiaceae) conhecida por sua ação flogística. É constituído por uma mistura de lipídeos, onde o 13-acetato de 12-*O*-tetradecanoilforbol (TPA), agente irritante, é um dos principais ésteres de forbol presente no óleo. A aplicação tópica desse agente está associada à resposta inflamatória, estresse oxidativo, proliferação e ativação de oncogenes nucleares (GARG et al.,

2008). A aplicação única de óleo de cróton gera resposta inflamatória aguda, apresentando vasodilatação, infiltração de leucócitos polimorfonucleares e edema (SARAIVA et al., 2010).

O ácido araquidônico, um ácido graxo também utilizado como agente flogístico, é o substrato das enzimas cicloxigenases (COX) e lipoxigenase (LOX), que origina mediadores da inflamação como prostaglandinas (PG) e leucotrienos (LT), respectivamente, promovendo a formação do edema. Nesse modelo, é possível identificar substâncias que inibem esse metabolismo (CRUMMEY et al., 1987; YOUNG et al., 1984).

Outro modelo de edema de orelha é a dermatite induzida por fenol é um dos modelos animais de dermatite de contato utilizado para produzir irritação imediata. É um modelo de inflamação cutânea aguda que mimetiza a dermatite de contato que ocorre em humanos (LIM; PARK; KIM, 2004). Diversos mecanismos estão envolvidos na inflamação causada pelo fenol decorrente principalmente da sua ação sobre os queratinócitos, como a liberação de mediadores pró- inflamatórios como IL-1 $\alpha$ , metabólitos do AA e espécies reativas de oxigênio (ERO) (MURRAY et al., 2007; WILMER et al., 1994).

Com base nos métodos de estudo de atividade anti-inflamatória, especialmente nos testes de edema de orelha, o desenvolvimento de terapias anti-inflamatórias e os novos agentes terapêuticos podem contribuir significativamente no tratamento de doenças associadas a processos inflamatórios (SKINNER, 2005). Portanto, a pesquisa de novas opções terapêuticas continua sendo uma das grandes linhas entre os pesquisadores nacionais e internacionais.



### 3. OBJETIVOS

---

#### **Objetivo Geral:**

Neste estudo, a síntese e a modelagem molecular de análogos do metil chavicol e avaliação das atividades antioxidante, anti-inflamatória e inibição da lipase pancreática foram realizadas com intuito de buscar novas opções terapêuticas através do entendimento de seus mecanismos moleculares.

#### **Objetivos Específicos:**

- Sintetizar análogos do metil chavicol;
- Caracterizar a estrutura de substâncias sintetizadas por métodos espectroscópicos e cromatográficos;
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* do metil chavicol;
- Avaliar o efeito do metilchavicol frente à atividade enzimática da lipase pancreática;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória tópica do metil chavicol em modelos de edema de orelha;
- Avaliar o efeito do metil chavicol na inibição da atividade enzimática da ciclooxigenase-1 e -2 *in vitro*;
- Propor um mecanismo de molecular envolvido na ação dessas substâncias por meio de estudo de *docking*.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

---

### 4.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS ANÁLOGOS

Os reagentes utilizados para a síntese dos compostos bem como os solventes P.A. utilizados na purificação são: metil chavicol ( $\geq 93,63\%$ ), ácido *meta*-cloroperbenzóico ( $\geq 77\%$ ), clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$  99,8%) (Sigma Aldrich<sup>®</sup>), hexano ( $\geq 99\%$ ) (Neon<sup>®</sup>), diclorometano ( $\geq 98\%$ ), acetato de etila ( $\geq 98,5\%$ ), éter etílico ( $\geq 98\%$ ), clorofórmio ( $\geq 99\%$ ), ácido clorídrico ( $\geq 37\%$ ), metanol ( $\geq 98\%$ ), ácido sulfúrico ( $\geq 95\%$ ), cloreto de sódio ( $\geq 99,5\%$ ), hidróxido de sódio em micropérolas ( $\geq 99\%$ ), piridina ( $\geq 98\%$ ), anidrido acético ( $\geq 99,5\%$ ) (Vetec<sup>®</sup>), etanol ( $\geq 99\%$ ) (Biotec<sup>®</sup>), iodo ( $\geq 95\%$ ) (Synth<sup>®</sup>), permanganato de potássio ( $\geq 98\%$ ) (Merck<sup>®</sup>), bicarbonato de sódio ( $\geq 95\%$ ) (Isifar<sup>®</sup>), sulfito de sódio ( $\geq 98\%$ ), tiosulfato de sódio ( $\geq 98\%$ ) (Reagen<sup>®</sup>) e sulfato de sódio anidro ( $\geq 99\%$ ) (Quimex<sup>®</sup>).

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono 13 foram realizados no Departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora com a colaboração da Professora Dra. Mara Rubia Costa Couri e obtidos a 500 MHz e 150 MHz, respectivamente, em um espectrômetro BRUKER AVANCE DRX/500. Como referência interna foi utilizado o tetrametilsilano (TMS) ou o hidrogênio residual do solvente deuterado. Os valores de deslocamento químico ( $\delta$ ) foram referidos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento ( $J$ ) em Hertz (Hz). As áreas dos picos foram obtidas por integração eletrônica e suas multiplicidades descritas como: s = simpleto; d = duplete; t = tripleto; tdd = tripleto de duplete duplo; dd = duplete duplo; ddd = duplo duplete duplo; m = multiplete.

O metil chavicol e seus análogos foram analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massas na Centralbio da Faculdade de Farmácia. As substâncias foram diluídas em acetato de etila a 1% (v/v) e, em seguida, 1,0  $\mu\text{L}$  da solução obtida foi injetada, com divisão de fluxo (1:20) em um cromatógrafo a gás, modelo SHIMADZU GCMS-QP2010 Plus, coluna capilar tipo Rtx-5 (5% fenil, 95% dimetilpolisiloxano). O hélio foi usado como gás de arraste com fluxo de 1,0 mL/minuto. A temperatura do forno foi programada de 60 a 240° C em uma taxa de aquecimento de 8° C/minuto. O detector de massa foi operado no modo de ionização de elétrons (70 eV). A composição percentual dos produtos sintetizados foi obtida por normalização, integração das áreas dos picos cromatográficos.

Para cromatografia em coluna de sílica utilizou-se sílica-gel 60G 0,063-0,200 mm (70-230 mesh ASTM) Sigma Aldrich<sup>®</sup> e para cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando placas de alumina F<sub>254</sub> em folhas pré-revestidas da Sigma-Aldrich<sup>®</sup> e sistemas solventes contendo hexano/acetato de etila (9:1; 8:2; 7:3; 6:4 e 1:1). Como reveladores foram utilizados lâmpada ultravioleta (UV) em 254 nm e vapores de iodo.

## 4.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

### 4.2.1 Método do sequestro do radical DPPH

A atividade antioxidante do metil chavicol e seus análogos foi determinada pelo método espectrofotométrico utilizando o radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) como descrito por Mensor e colaboradores (2001). Soluções estoques a 750mg/mL em etanol P.A. das amostras (metil chavicol e seus análogos) foram preparadas e 3,5-di-terc-butil-4-hidróxi tolueno (BHT) em 1mg/mL (controle positivo). A partir das soluções estoques, diluições foram realizadas em etanol, obtendo-se diferentes concentrações.

Alíquotas de 2,5 mL das amostras foram transferidas, em triplicata, para tubos de ensaio seguida de adição de 1 mL da solução de DPPH a 0,03 mM. A capacidade antioxidante do metil chavicol e análogos foi determinada pela cinética de reação do DPPH com antioxidante, nas categorias: cinética rápida (tempo de reação menor que 30 minutos), média (tempo de reação entre e 1 hora) e lenta (tempo de reação maior que 1 hora). As absorvâncias foram daterminadas por dez vezes em intervalos de 15 minutos: t<sub>0</sub>, t<sub>15</sub>, t<sub>30</sub>, t<sub>45</sub>, t<sub>60</sub>, t<sub>75</sub>, t<sub>90</sub>, t<sub>120</sub>, t<sub>150</sub>, t<sub>180</sub> e t<sub>210</sub> (MISHRA; OJHA; CHAUDHURY, 2012). Após tempo de incubação, verificou-se a capacidade das amostras em reduzir o 2,2-difenil-1-picril hidrazila em 2,2-difenil-1-picril hidrazina através mudança da cor púrpura para amarela que foidetectada em espectrofotômetro (SHIMADZU<sup>®</sup>, UV-1800) sob comprimento de onda de 518 nm (MENSOR et al., 2001). O branco (amostras e BHT) foi constituído por 2,5 mL das soluções e 1,0 mL de etanol. O controle negativo foi composto por 2,5 mL de etanol e 1,0 mL da solução de DPPH, cujo “auto-zero” foi realizado somente com metanol.

A partir das leituras em absorvância, foi determinada a porcentagem de atividade antioxidante (%AA) que corresponde à quantidade de DPPH reduzida pelas amostras, utilizando a seguinte fórmula:

$$\%AA = 100 - \left[ \left( \frac{Abs amostra - Abs branco da amostra}{Abs controle - Abs branco do controle} \right) \right] \times 100$$

Onde, *Abs amostra*: absorvância das amostras para uma concentração; *Abs branco da amostra*: absorvância do branco das amostras e BHT para uma concentração; *Abs controle*: absorvância do controle negativo; *Abs branco do controle*: absorvância do branco do controle negativo.

Após obtenção das porcentagens da atividade antioxidante, os valores foram utilizados para a elaboração dos gráficos, cuja abscissa corresponde à concentração da amostra e a ordenada à %AA. Por meio de análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, foram determinadas as equações da reta, as quais foram utilizadas para calcular a concentração efetiva 50% (CE<sub>50</sub>).

#### 4.2.2 Método de co-oxidação do β-caroteno/ácido linoleico

A atividade antioxidante do metil chavicol e seus análogos foi determinada pelo método de co-oxidação do β-caroteno/ácido linoléico descrito por Koleva e colaboradores (2002). O ensaio consiste na preparação de uma solução de β-caroteno a 0,2 mg/mL em clorofórmio P.A. Um mL dessa solução foi acondicionado a um balão de rotaevaporação, junto a 25 μL de ácido linoleico e 200 mg de Tween 40. Em seguida, o balão foi submetido à rotaevaporação em banho de água 40°C, para a remoção do clorofórmio. A este sistema foi adicionado lentamente e sob agitação constante 50 mL de água destilada, oxigenada por borbulhamento por meio de bomba de ar, para formação de uma emulsão. Paralelamente, foram preparadas as soluções das amostras e BHT (controle positivo) a 25 μg/mL. Em uma microplaca, alíquotas de 30 μL dessas soluções foram adicionadas, em triplicata, seguido de 250 μL da emulsão. O controle negativo foi composto, em triplicata, por 30 μL de etanol e 250 μL da emulsão. O branco do teste correspondeu a 280 μL de etanol.

O ensaio consistiu por leituras da microplaca a cada 15 minutos após incubação em estufa a 50°C, sendo a primeira leitura (t<sub>0</sub>), feita imediatamente após a adição das alíquotas da emulsão nos poços da microplaca. Este procedimento repetiu-se por sete vezes, obtendo no final, oito leituras: t<sub>0</sub>, t<sub>15</sub>, t<sub>30</sub>, t<sub>45</sub>, t<sub>60</sub>, t<sub>75</sub>, t<sub>90</sub> e t<sub>105</sub>. Neste sentido, houve monitoramento do processo da oxidação do β-caroteno, ou seja, o clareamento do sistema e conseqüentemente, a redução gradual das medidas de absorvâncias das soluções nos poços da microplaca. As absorvâncias foram medidas em leitor de microplaca (THERMOPLATE<sup>®</sup>,

TP-READER) em comprimento de onda de 492 nm. Com a obtenção das leituras, montou-seo gráfico de decaimento das absorbâncias em função do tempo e foi determinada a porcentagem de inibição da peroxidação lipídica (%I), calculada a partir da seguinte fórmula:

$$\%I = \left( \frac{A_{controle} - A_{amostra}}{A_{controle}} \right) \times 100$$

Onde,  $A_{controle} = Abs_{t_0} - Abs_{t_{105}}$  e  $A_{amostra} = Abs_{t_0} - Abs_{t_{105}}$ , sendo que  $A_{controle}$ : controle negativo e  $A_{amostra}$ : metil chavicol e seus análogos e controle positivo (BHT).

#### 4.2.3 Método de peroxidação lipídica pelo ácido tiobarbitúrico

A atividade antioxidante do metil chavicol e seus análogos foi determinada pelo método de peroxidação lipídica por meio da determinação das substâncias reativa ao ácido tiobarbitúrico descrito por Wong et al. (1995), com modificações. O ensaio consiste em determinar a presença de malonaldeído e substâncias provenientes de peroxidação lipídica (BUEGE; AUST, 1978), por meio da detecção do complexo cromogênico por espectrofotometria.

Homogenatos foram preparados com 25g de carne moída de baixo teor de gordura, 17 mL de água destilada e 200 µL do metil chavicol e análogos em metanol nas concentrações 7,5; 15 e 30 mg/200 µL. Em seguida, os homogenatos foram aquecidos até o cozimento inicial da carne. Após esse procedimento, adicionou-se água destilada até completar o volume para 100 mL, e procedeu-se à homogeneização e transferência do homogenato obtido para frascos âmbar, armazenando-os sob refrigeração.

No dia do preparo das amostras e nos quatro dias consecutivos foi realizado o teste o qual consiste na transferência em triplicata de 500 mg de cada homogenato e acrescidos de 50 µL de solução etanólica de BHT a 4% (p/v), 2,5 mL de ácido fosfórico a 1% (v/v) e 1,25 mL de ácido tiobarbitúrico a 1% (p/v) em hidróxido de sódio 0,05 M para um tubo de ensaio. Na sequência, os tubos foram submetidos a aquecimento por meio de banho fervente por 15 minutos e, em seguida, resfriados em banho de gelo por 10 minutos. Depois de arrefecidos, adicionou-se 3,0 mL de butanol em cada tubo e submetido vagarosamente à agitação sob inversão. Os tubos foram centrifugados a 4000 rpm por 5 minutos e retirou-se o sobrenadante de cada amostra. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (SHIMADZU,

1800) em comprimento de onda de 535 nm e calculou-se a concentração do complexo ácido tiobarbitúrico-malonaldeído a partir da curva padrão de malonaldeído (MDA). Butanol foi usado como branco, o BHT e metanol como controles positivo e negativo, respectivamente.

#### 4.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO METIL CHAVICOL NA INIBIÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA LIPASE PANCREÁTICA

O ensaio para determinação da inibição da atividade enzimática da lipase pancreática foi realizado em triplicata, utilizando-se método espectrofotométrico com algumas modificações (PEREIRA et al., 2010; SOUZA et al., 2011; SIMÃO et al., 2012; SOUZA et al., 2012). Metil chavicol foi preparado na concentração de 10 mg/mL em dimetilsulfóxido (DMSO). A partir da solução de trabalho obtida, o ensaio de inibição da lipase pancreática foi realizado. Foi preparada uma solução de lipase pancreática suína na concentração de 10 g/L em tampão Tris-HCl 0,05 mol/L, pH 8,0, contendo CaCl<sub>2</sub> 0,010 mol/L e NaCl 0,025 mol/L. O substrato  $\rho$ -nitrofenolpalmitato, 8 mmol/L, foi dissolvido em Triton-X 100, 0,5% (p/v). Em triplicata, foi adicionado em microtubos, 50  $\mu$ L da solução de amostras, 100  $\mu$ L da enzima e 50  $\mu$ L do substrato e incubada em banho-maria a 37 °C por quatro períodos de tempo (10, 20, 30, 40 minutos). Após esse período, a reação é interrompida com banho de gelo e 1,0 mL de tampão Tris-HCl 0,05 mol/L. Para cada tempo foram feitos os controles sem enzima (branco do substrato) e sem substrato (branco da enzima). Todos foram preparados e incubados do mesmo modo que os microtubos de experimentais. Como controle positivo foi utilizado orlistate 1 mg/mL. As absorbâncias dos produtos da ação da lipase ( $\rho$ -nitrofenol) foram determinadas em espectrofotômetro (SHIMADZU® UV-1800) a 410 nm. Posteriormente os valores obtidos nas leituras foram utilizados para montagem dos gráficos, cuja abscissa corresponde ao tempo de incubação e a ordenada às absorbâncias. Por meio de análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, foram determinadas as equações de reta. A partir dos valores dos coeficientes angular (inclinação da reta) obtidos foram utilizados como referência para o cálculo da inibição da lipase pancreática. A porcentagem de inibição (I %) da lipase pancreática foi determinada de acordo com a equação:

$$I\% = 100 \times \frac{(A - a) - (B - b)}{(A - a)}$$

Onde: A: na ausência do possível inibidor, que corresponde ao ensaio enzima controle; a: na ausência do extrato e da enzima (branco substrato); B: na presença do possível inibidor com a enzima e substrato; b: na ausência da enzima.

O coeficiente angular da reta é decorrente da velocidade de formação de produto (p-nitrofenol) por minuto de reação e a presença do inibidor ocasiona uma diminuição na inclinação.

#### 4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

##### 4.4.1 Animais

Camundongos Swiss albinos machos (*Mus musculus*, 45-55 dias e pesando 25-30 g) foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) e os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais da Faculdade de Farmácia da UFJF. Os animais foram mantidos em gaiolas de plástico (47 × 34 × 18 cm) (temperatura 24 ± 2 ° C e ciclos 12:12 claro/escuridão) e receberam água ad libitum e alimentação balanceada (Nuvilab Roedores - Nuvital Nutrients, Colombo, Brasil). O cuidado ea experimentação animal foram de acordo com as Diretrizes para Cuidados e Uso de Animais de Laboratório em Pesquisa Biomédica do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética Institucional (protocolo número 038/2015).

##### 4.4.2 Método do edema da orelha induzido por óleo de Cróton

O edema de orelha induzido por óleo de Cróton em camundongos foi realizado como descrito por Schiantarelli et al. (1982) com pequenas modificações. O edema de orelha foi induzido em grupos com seis camundongos cada (n = 6) usando 20 µl de óleo de Croton 2,5% (v/v, diluído em acetona) na superfície interna da orelha direita. Foi determinada uma linha de base na orelha esquerda aplicando 20 µl de acetona (veículo). Após 60 minutos, o tratamento foi realizado na orelha direita com metil chavicol (0,1, 0,5 e 1,0 mg/orelha) e dexametasona (0,1 mg/orelha, controle positivo), enquanto o controle negativo (não tratado) recebeu 20 µl de solução salina. A espessura da orelha (mm) foi medida após 6 e 24 horas para acompanhar a evolução do edema, enquanto que o peso foi quantificado após eutanásia com fragmentos de orelha (discos de 6mm). Uma parte destas amostras foi conservada em

formaldeído 10% (v/v) para análise histopatológica e outra foi utilizada para determinar os marcadores inflamatórios (mieloperoxidase, N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidase, óxido nítrico, interleucina 6 e fator de necrose tumoral).

#### 4.4.3 Método do edema de orelha induzido por fenol

Com base na descrição de Lim et al. (2004) com leves alterações, o fenol (10% v/v em 20  $\mu$ l de acetona) foi aplicado topicamente na superfície interna da orelha direita, induzindo o edema da orelha em camundongos (n = 6), enquanto 20  $\mu$ l de acetona Veículo) foram administrados na orelha esquerda. Após 15 minutos, o tratamento tópico foi realizado com metil chavicol (0,1, 0,5 e 1,0 mg/orelha em 20  $\mu$ l de acetona) e dexametasona (0,1 mg/orelha em 20  $\mu$ l de acetona, controle positivo). A acetona (20  $\mu$ l/orelha, controle negativo) foi aplicada topicamente na orelha esquerda. O edema da orelha foi avaliado 2 horas após a aplicação do fenol por meio do aumento da espessura e peso da orelha.

#### 4.4.4 Método do edema de orelha induzido por histamina

O efeito do metil chavicol sobre a reação de hipersensibilidade de tipo imediato foi avaliado utilizando o modelo de edema de orelha induzido por histamina. Para iniciar este procedimento, os animais foram anestesiados intraperitonealmente com cetamina (80 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg) e então a espessura da orelha foi medida no tempo zero (medida basal). Doses de metil chavicol (0,1, 0,5 e 1,0 mg/orelha em 20  $\mu$ l de acetona) e dexametasona (0,1 mg/orelha em 20  $\mu$ l de acetona) foram aplicadas topicamente na região dorsal da orelha direita (Brand et al, 2002). O grupo de controle negativo recebeu 20  $\mu$ l de solução salina. Após 30 minutos de tratamento, foram administrados por via intradérmica 5  $\mu$ l de histamina (100 mg/ml em solução salina) na região ventral das orelhas direitas. Noventa minutos após a aplicação de histamina, a espessura da orelha foi medida novamente. A diferença entre as medições da espessura da orelha nos tempos zero e 90 minutos foi considerada como o valor de edema avaliado neste ensaio. Além disso, foram realizadas medições de pesos das orelhas.

#### 4.4.5 Avaliação do edema de orelha

Para todos os modelos utilizados neste estudo, cada animal foi eutanizado com uma sobredosagem de cetamina (240 mg/kg) e xilazina (45 mg/kg) e um disco (6 mm de



diâmetro) das orelhas direita e esquerda foi removido com a ajuda de um punch metálico (Richter). Esses fragmentos foram pesados em balança analítica (AY220, Shimadzu) e a diferença de peso (mg) entre as orelhas direita e esquerda (não inflamada) foi a medida do edema.

#### 4.5 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

As amostras de tecido das orelhas dos camundongos (discos de 6 mm) do modelo de edema de orelha induzido por óleo de Cróton foram conservadas em formol 10%. Para o preparo das lâminas histológicas, as amostras foram fixadas em solução ALFAC (85 mL de álcool 80%, 10 mL de formol 40% e 5 mL de ácido acético glacial) em um período de 16 horas e conservadas em álcool 70% até início do processo de desidratação. Em seguida, o material foi desidratado, emblocado em parafina, seccionado em cortes de 5 µm em micrótomo e coradas com hematoxilina e eosina. O edema (espessura do corte histológico), infiltração de leucócitos e vasodilatação foram os parâmetros da inflamação avaliados em áreas representativas com aumento de 100x. Nesses mesmos aumentos, foram realizadas fotografias dos cortes histológicos utilizando microscópio acoplado a câmera fotográfica digital (OLYMPUS<sup>®</sup>, BX-41) (CHIBLI et al., 2014).

#### 4.6 DETERMINAÇÃO DA MIELOPEROXIDASE

A metodologia de Bradley et al. (1982) modificada por De Young et al. (1989) foi utilizada para avaliar a atividade da mieloperoxidase (MPO), um indicativo da presença de leucócitos polimorfonucleares nos tecidos. Fragmentos de tecidos retirados no modelo de edema de orelha induzida por óleo de cróton foram adicionadas a 750µl de tampão fosfato de sódio 80 mM (pH 5,4) contendo 0,5% de hexadeciltrimetilamônio (HTBA) e triturados por cerca de 45s a 0°C. O homogenato foi decantado em microtubos e adicionado a 750µl do tampão anteriormente descrito. A amostra (1,5ml) foi colocada em microtubos e centrifugada a 12000 x g a 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi coletado, armazenado em microtubos e determinada a concentração de proteínas por meio do método de Lowry (1951).

A avaliação de atividade enzimática de MPO foi realizada em triplicata em microplaca de 96 poços. Em cada poço foi adicionado 25 µL 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina

(TMB) cuja concentração final é de 1,6 mM em DMSO, 100 µL de peróxido de hidrogênio na concentração de 0,003% v/v em tampão fosfato de sódio pH 5,4 e 25 µL do homogenato obtido dos fragmentos como descrito anteriormente. A microplaca será incubada a 37°C por 5 minutos. Em seguida, cada poço foi adicionado 100 µL de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) a 4 M a 4°C, interromper a reação. As medidas das absorbâncias foram feitas em leitor de microplaca (THERMOPLATE<sup>®</sup>, TP-READER) em comprimento de onda de 450 nm e resultados expressos mDO/mg de proteína.

#### 4.7 DETERMINAÇÃO DA N-ACETIL-β-D-GLICOSAMINIDASE

A enzima N-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG) é usada como indicativo da presença de presença de leucócitos mononucleares no tecido no tecido e foi avaliada de acordo com a metodologia de Sanchez e Moreno (1999). Os fragmentos de tecidos retirados no modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton foram adicionados a 750 µL de tampão fosfato de sódio 80 mM (pH 5,4) contendo 0,5% de hexadeciltrimetilamônio (HTBA) e triturados por cerca de 45s a 0°C. O homogenato foi decantado em microtubos e adicionado a 750 µL do tampão citado. Amostra (1,5 ml) foi colocada em microtubos e centrifugada a 12000 x g a 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi coletado, armazenado em microtubos e determinada a concentração de proteínas por meio do método de Lowry (1951).

A determinação de NAG foi realizada em triplicata em microplaca de 96 poços. Em cada poço foi adicionado 100 µl do homogenato e 100 µl de p-nitrofenil-acetamida-μ-D-glicopiranosídeo (2,24 mM) dissolvido em tampão de citrato 0,1 M (pH 4,5). A microplaca foi incubada durante 10 minutos a 37° C, e a reação foi interrompida com a adição de 100 µl de tampão de glicina 0,2 M (pH 10,6). As medidas das absorbâncias foram feitas em leitor de microplaca (THERMOPLATE<sup>®</sup>, TP-READER) em comprimento de onda de 405 nm e resultados expressos mDO/mg de proteína.

#### 4.8 DETERMINAÇÃO DO ÓXIDO NITRÍCO

A concentração de óxido nítrico (NO) foi analisa indiretamente por meio da mensuração das concentrações de nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) pelo método de colorimétrico de Griess (GREEN et al, 1982). O reagente de Griess consiste de uma mistura 1:1 da solução de

sulfanilamida a 1% (m/v) com a solução de  $\alpha$ -naftil-etilenodiamina a 0,1% (m/v) ambas em ácido fosfórico a 5%. O homogenato foi preparado com os fragmentos de orelhas obtidos no modelo de edema induzido por óleo de Cróton pela adição de 3000  $\mu$ l de salina tamponada (PBS – pH 7,2) e triturados por cerca de 60 s. O homogenato foi coletado, armazenado em microtubos a -80° C.

A concentração de nitrito foi realizada em triplicata em microplaca de 96 poços. Em cada poço foi adicionado 100  $\mu$ L do homogenato e 100  $\mu$ L do reagente de Griess. A microplaca foi incubada durante 20 minutos em temperatura ambiente. As medidas das absorvâncias foram feitas em leitor de microplaca (THERMOPLATE<sup>®</sup>, TP-READER) em comprimento de onda de 540 nm. As concentrações de nitrito foram calculadas a partir de uma curva padrão realizada com uma solução de nitrito de sódio (NaNO<sub>2</sub>) nas concentrações 3,12, 6,25, 12,5, 25, 50, 100 e 200  $\mu$ M. As absorvâncias das diferentes amostras foram comparadas com a curva padrão, e os resultados obtidos expressos  $\mu$ M.

#### 4.9 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS

A dosagem das citocinas foi realizada pelo método de ensaio imunossorvente ligado à enzima (ELISA) usando kits comerciais (PeProtech Inc., Rocky Hill, NJ, EUA). As concentrações de fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina 6 (IL-6) foram medidas no homogenato preparado com os fragmentos de orelhas obtidos no modelo de edema induzido por óleo de Cróton. Após 24 horas de incubação do homogenato (recomendação do fabricante), 100  $\mu$ L de 3-etilbenzotiazolína-6-sulfônico (ABTS Sigma Chemical Co.) dissolvido em tampão citrato (0,05 M, pH 4,0 com 0,01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) foi aplicada para visualizar a ligação com anticorpo. As medidas das absorvâncias foram feitas em leitor de microplaca (THERMOPLATE<sup>®</sup>, TP-READER) em comprimento de onda de 405 nm. Os níveis de sensibilidade para os kits TNF- $\alpha$  e IL-6 foram de 16 pg/mL (de acordo com as especificações do fabricante).

#### 4.10 EFEITO DO METILCHAVICOL SOBRE CICLOOXIGENASE-1 E -2

A avaliação *in vitro* da atividade do metil chavicol sobre as enzimas COX-1 e COX-2 foi realizada usando o kit para ensaio imunoenzimático COX (*ovine/human*) Inhibitor

*Screening Assay Kit* (n° 560131, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EUA). Estes ensaios foram realizados pelo Professor Doutor Alberto Carlos Dias Pires, na Universidade Minho, Campus de Gualtar, Portugal. Diclofenaco e resveratrol (controles) e metil chavicol foram dissolvidos em dimetilssulfóxido (DMSO) e testados nas concentrações de 2 a 5  $\mu\text{M}$  e 0,01 a 150  $\mu\text{M}$ , respectivamente. 970  $\mu\text{l}$  de solução tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 contendo 5 mM de EDTA e 2 mM de fenol, 10  $\mu\text{l}$  das enzimas COX-1 ou COX-2, 10  $\mu\text{L}$  de heme e 10  $\mu\text{l}$  das moléculas (diclofenaco, resveratrol e metil chavicol) foi preparada. A reação foi incubada por 5 minutos a 37° C seguida da adição de 10  $\mu\text{l}$  de ácido araquidônico (AA) a 100 mM. A reação foi interrompida após 2 minutos com 10  $\mu\text{l}$  de ácido clorídrico (HCl) 1 M. Os tubos foram retirados do banho-maria e adicionado 20  $\mu\text{l}$  de cloreto de estanho ( $\text{SnCl}_2$ ).

Neste ensaio, a COX catalisa a primeira etapa da biossíntese de ácido araquidônico para prostaglandina  $\text{H}_2$  ( $\text{PGH}_2$ ) para produzir prostaglandina  $\text{F}_{2\alpha}$  ( $\text{PGF}_{2\alpha}$ ) por redução com cloreto de estanho que é medida pelo ensaio imunoenzimático (Tabela 2). Este método fundamenta-se na competição entre as prostaglandinas (PG) e um conjugado PG-acetilcolinesterase (PG-marcado) em uma quantidade limitada de anti-soro PG. A quantidade de um conjugado PG-acetilcolinesterase, que é capaz de se ligar ao anti-soro PG, é inversamente proporcional à concentração aos PGs nos poços. Como se sabe a concentração do conjugado PG-acetilcolinesterase é mantida constante, enquanto a concentração das PGs testadas varia conforme a capacidade de inibição de cada substância.

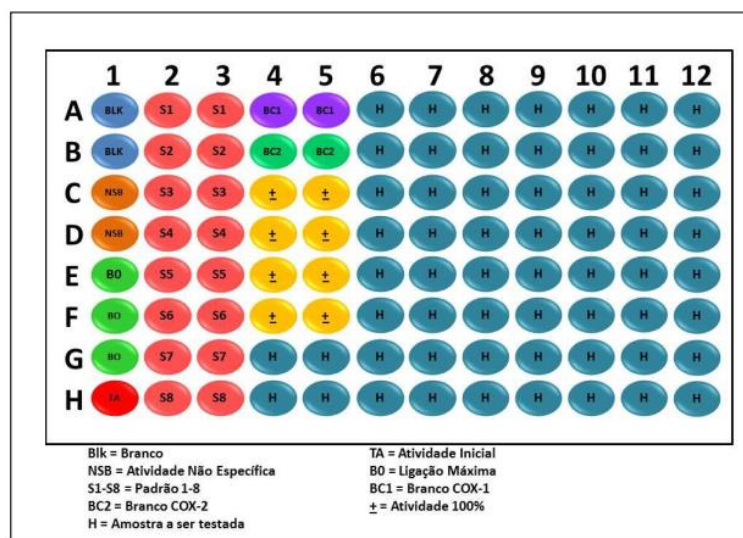
Tabela 2 - Reagentes utilizados para a reação do ensaio imunoenzimático (EIA) da COX.

Poço	Tampão EIA	Amostra/Controle	Marcador (Traço)	Antisoro
Branco	-	-	-	-
Atividade total (AT)	-	-	5 $\mu\text{l}$	-
Ligações específicas (LNE)	não	100 $\mu\text{l}$	50 $\mu\text{l}$	-
Ligação máxima (Bo)	50 $\mu\text{l}$		50 $\mu\text{l}$	50 $\mu\text{l}$
Amostra/controlé	-	50 $\mu\text{l}$	50 $\mu\text{l}$	50 $\mu\text{l}$

Fonte: ADAPTADO DE *COX (ovine/human) Inhibitor Screening Assay Kit* (n° 560131, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EUA), 2016.

A placa (Figura 6) foi elaborada com base nas instruções do fabricante, e incubada por 18 horas protegidas da luz, a temperatura ambiente e com agitação constante.

Figura 6 - Imagem ilustrativa da composição da placa utilizada no ensaio.

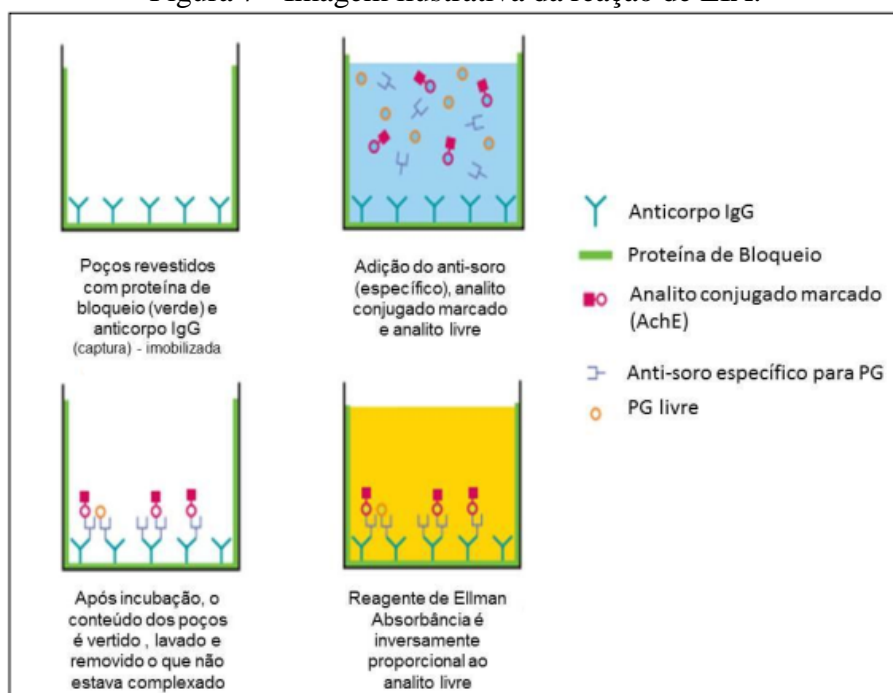


Fonte: ADAPTADO DE COX (ovine/human) Inhibitor Screening Assay Kit (nº 560131, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EUA), 2016.

Durante a incubação, o conjugado PG-acetilcolinesterase se liga ao anticorpo monoclonal previamente ligado ao poço. A placa foi lavada e em seguida 200 µL do Reagente de Ellman, que contém o substrato para a acetilcolinesterase, foram adicionados ao poço. A leitura da reação foi realizada por ELISA a 405 nm após 1 hora de incubação no escuro sob agitação (Figura 7).

A densidade óptica produzida é diretamente proporcional à quantidade de prostaglandinas presente nas amostras ou controles. A porcentagem de inibição foi calculada pela comparação dos poços tratados, seja com metil chavicol ou com diclofenaco e/ou resveratrol, com a ligação máxima para COX-1 ou COX-2. A concentração a qual provoca 50% de inibição (CI<sub>50</sub> µM/mL) foi calculada para cada substância a partir da curva de resposta (concentração-inibição). Os ensaios foram realizados em triplicata.

Figura 7 - Imagem ilustrativa da reação de EIA.



Fonte: ADAPTADO DE *COX (ovine/human) Inhibitor Screening Assay Kit* (nº 560131, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EUA), 2016.

## 4.11 MODELAGEM MOLECULAR

### 4.11.1 Modelagem molecular dos ligantes

A estrutura bidimensional dos ligantes foi desenhada no programa MarvinSketch 16.7.4 (CHEMAXON, s.d.), enquanto a tridimensional foi gerada utilizando-se a função *Clean in 3D*. Esta função calcula novas coordenadas tridimensionais para as moléculas através da construção de conformeros, dentre eles, o de menor energia é mantido. A qualidade das estruturas é medida por uma função de energia simples, baseada no campo de força DREIDING (CHEMAXON, s.d.). Todos os átomos que compõem os ligantes estudados (C, H, e O) estão parametrizados neste campo de força, o qual é capaz de fornecer geometrias precisas de moléculas orgânicas e biológicas (MAYO; OLAFSON; GOSSARD, 1990). Uma vez gerada a estrutura tridimensional dos ligantes, a geometria inicial foi refinada por meio de cálculos semi-empíricos com o MOPAC2012 (STEWART, 2013), utilizando o método PM7.

#### 4.11.2 Obtenção das estruturas tridimensionais das proteínas

As coordenadas cristalográficas das estruturas tridimensionais das proteínas foram obtidas do *Protein Data Bank* (PDB), banco de dados públicos. As enzimas utilizadas foram a ciclooxigenase 1 (COX-1) com código 1EQG (SELINSKY et al., 2001, PDB), ciclooxigenase 2 (COX-2) com código 5IKT (ORLANDO; MALKOWSKI, 2016, PDB), óxido nítrico sintase induzível com código 1R35 (HALLINAN et al., 2003, PDB) e lipase pancreática com código 1LPA (VAN TILBEURGH et al., 1993, PDB).

#### 4.11.3 *Docking*

Uma vez obtidas as coordenadas tridimensionais dos átomos dos ligantes (por modelagem molecular) e das enzimas alvos, o próximo passo foi realizar o *docking* molecular. Para esta simulação da formação dos complexos teóricos ligante-proteína alvo, foi utilizado o programa AutoDock Vina 1.1.2. Antes da execução deste programa, foi necessário converter o formato dos arquivos das moléculas para PDBQT, as informações estruturais contidas no formato PDB (formato prévio), as cargas elétricas de cada átomo que constitui a molécula (Q) e os tipos e números de torções (T). A geração do arquivo PDBQT foi obtida por meio da utilização do programa AutoDock Tools 1.5.6 (ADT 2016), o qual faz parte do pacote de ferramentas computacionais compatíveis com o programa AutoDock Vina. Esta ferramenta permite o processamento dos arquivos e ajustes para execução dos cálculos de *docking* molecular. O procedimento de acoplamento envolveu a preparação do ligante e macromoléculas usando caixas de simulação, as quais acomodem toda a região de interação entre o ligante e receptor (TROTT, OLSON, 2010). Para explorar o sítio ativo das enzimas foram construídas caixas como um cubo com o centro geométrico entre:

- Ciclooxigenase-1: 1EQG

Ligante cristalográfico: ibuprofeno.

Dimensões: 20x20x28, pontos espaçados de 1 Å.

Direções: X 28.185

Y 38.74

Z 192.606

- Ciclooxigenase-2: 5IKT

Ligante cristalográfico: ácido tolfenâmico.

Dimensões: 26x14x20, pontos espaçados de 1 Å.

Direções: X 158.398

Y 184.145

Z 197.63

- Óxido nítrico sintase induzível: 1R35

Ligante cristalográfico: 4R-flúor-N-6-etaniminoil-L-lisina.

Dimensões: 16x16x16, pontos espaçados de 1 Å.

Direções: X 123.563

Y 114.767

Z 34.215

- Lipase pancreática: 1LPA

Ligante cristalográfico: diundecilfosfatidilcolina.

Dimensões: 30x30x30, pontos espaçados de 1 Å.

Direções: X 6.309

Y 27.567

Z 48.586

Estes arquivos de configuração contêm informação importante sobre como serão efetuadas as buscas pela melhor solução estrutural e energética de *docking*. Os cálculos de *docking* foram feitos e considerados os parâmetros evolucionários automáticos baseados nas características dos ligantes cristalográficos e validados por *redocking*. As análises das interações de reconhecimento molecular foram realizadas por meio do programa *Discovery Studio* v. 4.5 2016 (DE OLIVEIRA et al., 2013; TARANTO, 2013). Os ligantes que apresentaram orientações e melhor *score* foram analisados em tela gráfica.

#### 4.12 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados dos testes foram demonstrados através da média  $\pm$  desvio padrão ou erro padrão médio (E.P.M.). Teste t e análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey ou Student–Newman–Keuls como *post-hoc* foram utilizadas para medir o grau de significância para  $p < 0,05$ . Para as análises estatísticas, foi utilizado o programa GraphPad Prism<sup>®</sup>.



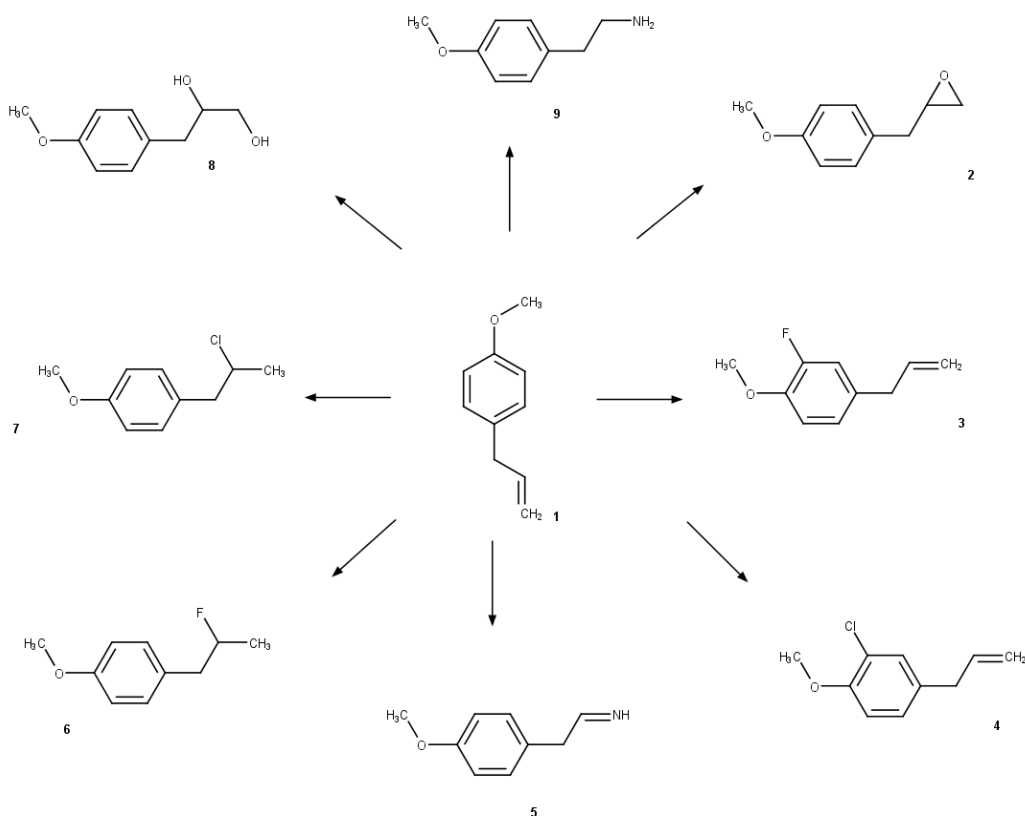
## 5. RESULTADOS

### 5.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO

A partir do metil chavicol foi possível produzir modificações estruturais em grupos reativos com intuito produzir derivados farmacologicamente distintos ou com atividades biológicas aprimoradas.

A proposta inicial foi sintetizar análogos do metil chavicol, mostrado no Esquema 6, baseado no conceito de isoterismo clássico, onde os grupamentos possuem a mesma configuração eletrônica e propriedades químicas semelhantes. Portanto a substituição isostérica é a troca de um elemento ou grupamento por outro com configuração estéricas e eletrônicas semelhantes, geralmente possuem volume molecular, número de átomos ou disposição eletrônica semelhantes.

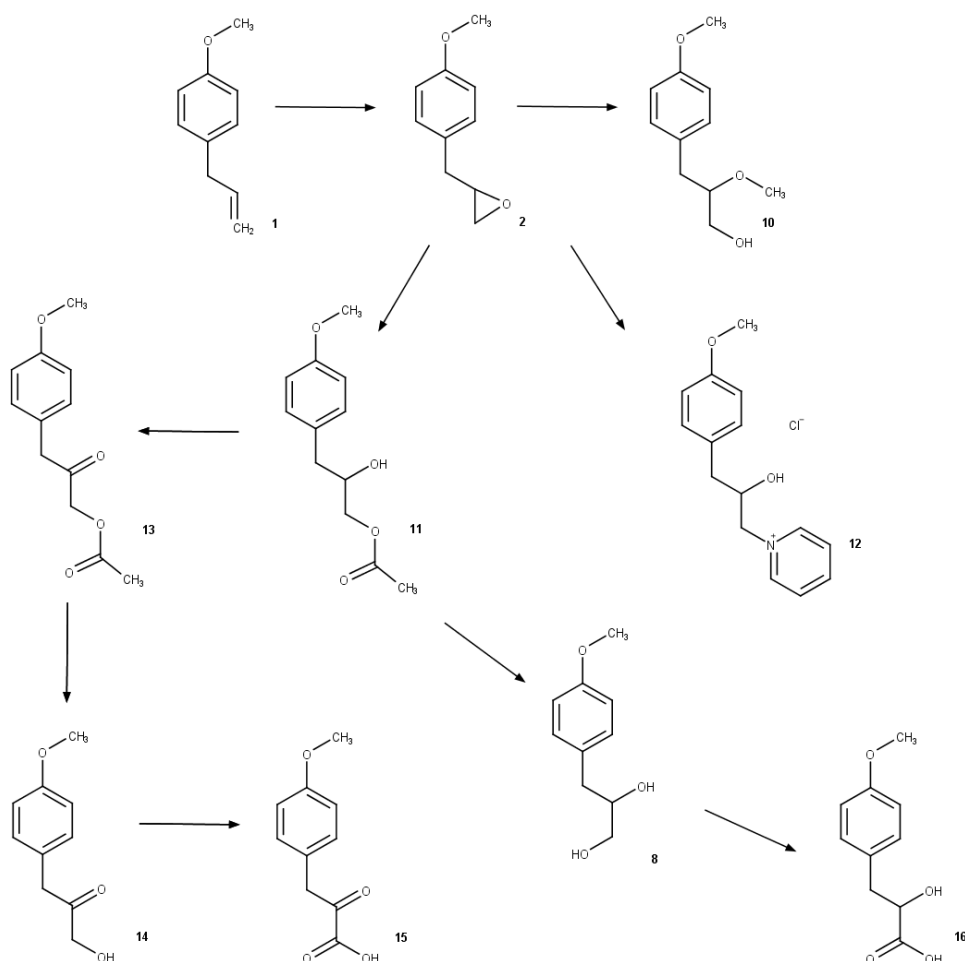
Esquema 6 - Plano de síntese (A): obtenção de análogos do metil chavicol por meio do conceito de Isoterismo clássico.



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017.

No entanto, após estudo preliminar de *docking* molecular, verificou-se que não houve ganho na estabilidade do complexo ligante-receptor quando comparado com o material de partida (*Seção 5.6.3*). Assim, os análogos foram reavaliados e um novo plano de pesquisa foi delineado a fim de conferir diminuição da hidrofobicidade das substâncias. Além disso, desenharam-se moléculas que continham grupos farmacóforicos (cetona, éter, álcoois e ácidos carboxílicos) com atividade biológica conhecida para enquadrar no conceito de Bioisosterismo. Sob este aspecto, a substituição bioisotérica é a troca de elementos ou grupos que possuem similaridades químicas ou físico-químicas que apresentam propriedades biológicas similares (Esquema 7). Os bioisósteros são ferramentas estratégicas de geração de novas moléculas biologicamente ativas que afetam o mesmo sistema biológico, como agonista ou antagonistas. Além disso, sua aplicabilidade tem sido fundamental como tática para a otimização de propriedades e desenvolvimento de candidatos a fármacos mais qualificados.

Esquema 7 - Plano de síntese (**B**): obtenção de análogos do metil chavicol por meio do conceito de Bioisoterismo.



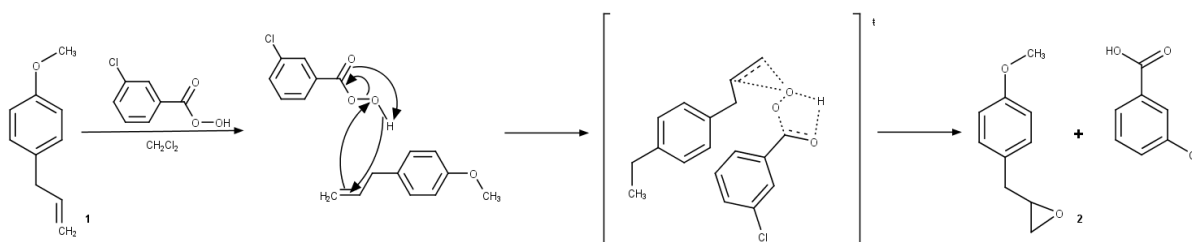
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017.

Iniciou-se a rota sintética do plano de síntese **B** a partir do metil chavicol (**1**) usando o peróxido de hidrogênio em solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 4M (HENBEST; JACKSON, 1967). O epóxido desejado (**2**) foi obtido, entretanto, o rendimento foi insatisfatório (4,4%). Alternativamente, o metil chavicol (**1**) foi tratado com ácido *meta*-cloroperbenzóico (MCPBA).

A epoxidação do composto (**1**) forneceu o produto desejado (**2**), líquido oleoso castanho, o qual foi purificado por cromatografia em coluna eluída em hexano/acetato de etila (8:2). O rendimento desta reação foi de 75% e 99% de pureza.

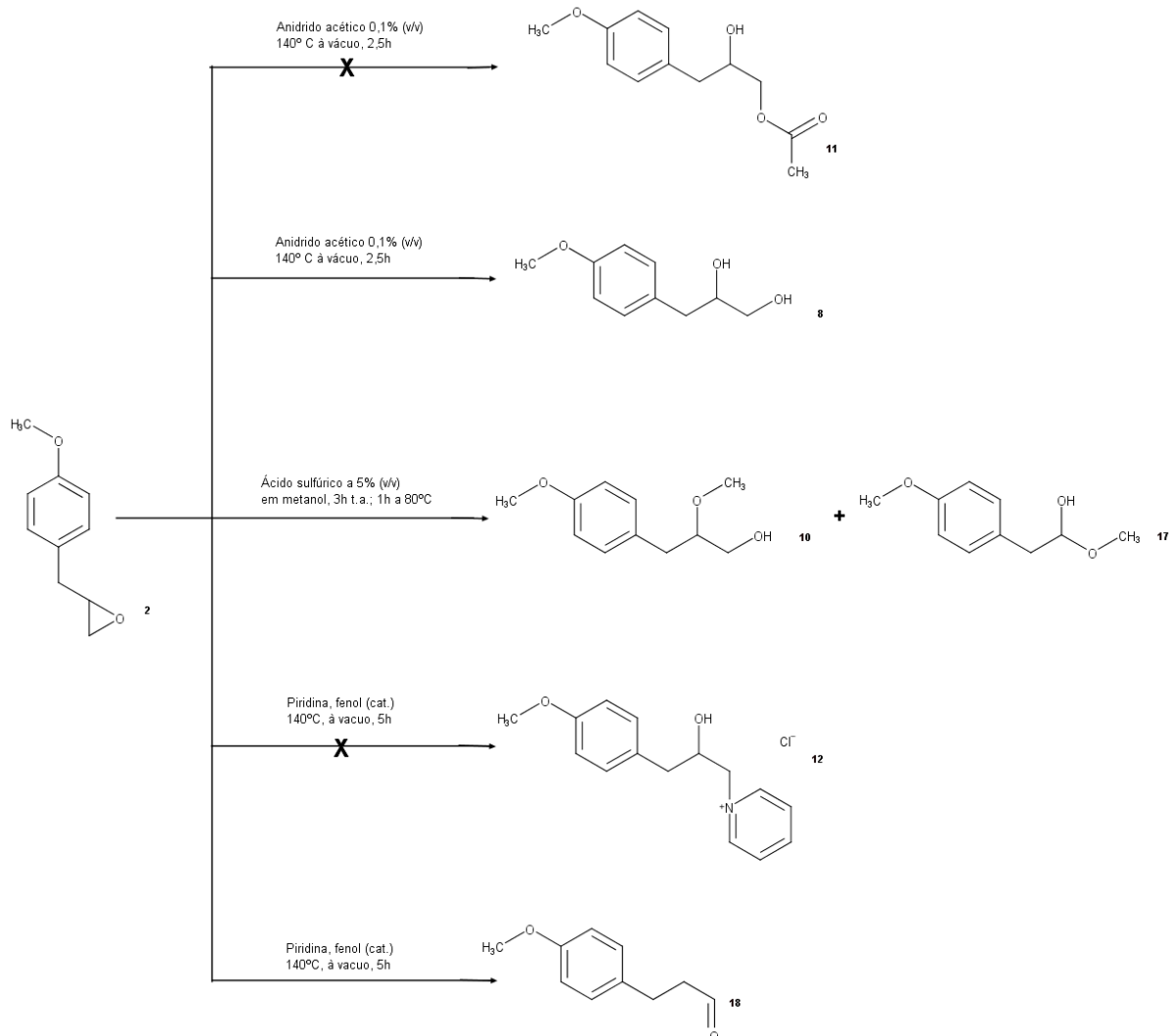
O esquema 8 mostra o mecanismo cíclico em uma única etapa de transferência um átomo de oxigênio do MCPBA ao alceno. O resultado é uma adição *sin* do oxigênio à ligação dupla com a formação do epóxido **2** e ácido 3-clorobenzóico.

Esquema 8 - Mecanismo da reação de epoxidação do metil chavicol.



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017.

A combinação da tensão anelar com a polarização das ligações C-heteroátomo confere aos epóxidos uma grande reatividade frente a eletrófilos e nucleófilos, gerando produtos de expansão do anel ou de cadeia aberta de forma regio- e diastereosseletiva. Tais características os tornam ferramentas de construção muito versáteis em síntese orgânica. As reações de abertura de epóxidos ocorrer por ataque nucleofílico utilização um nucleófilo forte (meio básico) ou por meio de ativação do anel via catálise com ácido de Brønsted ou de Lewis. Nesta proposta, foi planejado a abertura do epóxido **2** de três maneiras diferentes: por meio de esterificação com anidrido acético em água; por metoxilação em meio ácido e por aminólise (Esquema 9).

Esquema 9 - Reações de abertura do epóxido **2**

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017.

A reação de esterificação foi realizada a fim de promover abertura do oxirano (**2**) visando a síntese do análogo (**11**) (Esquema 9). O tratamento do epóxido (**2**) com solução anidrido acético a 0,1% (v/v) a 140° C a vácuo por 2,5 horas resultou na formação do diol (**8**) (COLCLOUGH; CUNNEEN; MOORE, 1961) por uma provável hidrólise catalisado por ácido. Nesse processo, obteve-se um produto 3-(4-metoxifenil)propano-1,2-diol (**8**), líquido oleoso incolor, com rendimento de 68% e pureza de 98%.

Anteriormente, tentou-se sintetizar o diol (**8**) por meio da oxidação da olefina do metil chavicol com permangato de potássio (WIBERG; SAEGBARTH, 1957). Entretanto, foi obtido como produto o *para*-metoxibenzaldeído devido à clivagem oxidativa na porção propanoide.

A reação seguinte foi a abertura do anel que ocorreu por meio de uma substituição nucleofílica biomolecular ( $SN_2$ ) do epóxido (**2**) tratado com solução de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) a 5% (v/v) em metanol (Esquema 9). Os produtos (**10**) e (**17**) foram obtidos nesta reação que foram purificados por cromatografia em coluna eluída em hexano/acetato de etila (1:1) com rendimento de 77%, aspecto físico líquido oleoso incolor e pureza 49,08%.

Outra alternativa para abertura do epóxido (**2**) abordada neste trabalho foi a via aminólise. O tratamento do oxirano (**2**) com piridina catalisada por fenol (sob vácuo a  $140^\circ C$  por 5h) não resultou no sal desejado (COLCLOUGH; CUNNEEN; MOORE, 1961) (Esquema 9).

No entanto, na caracterização estrutural do produto formado evidenciou a síntese de 3-(4-metoxifenil)propanal (**18**), possivelmente, em decorrência de um rearranjo do epóxido em compostos carbonílicos. O aldeído (**18**) é um líquido oleoso incolor, foi purificado por cromatografia em coluna eluída em hexano/acetato 8:2 e obtido em rendimento de 52,30% com pureza de 97%.

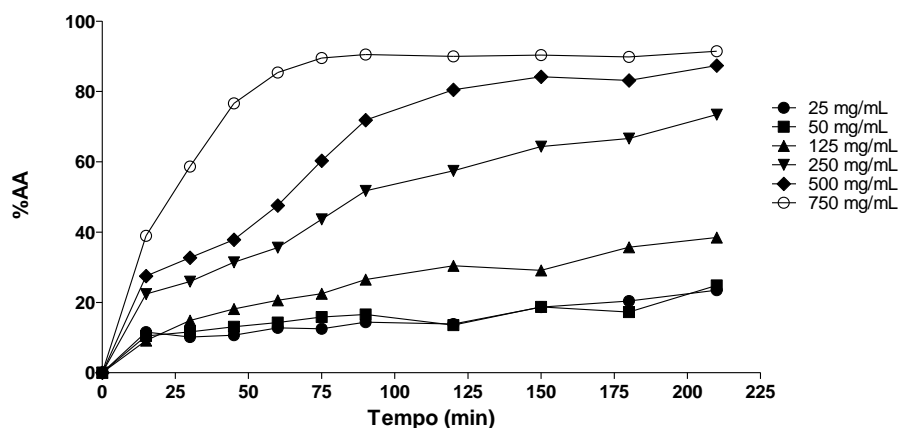
Outras reações planejadas para obtenção de análogos, tais como halogenação do anel aromático, oxidação da olefina e adição de haleto de hidrogênio ao alceno foram efetuadas utilizando-se diferentes metodologias, no entanto não se obteve os produtos desejados em rendimentos e pureza aceitáveis.

## 5.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

### 5.2.1 Atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical DPPH

O estudo cinético da reação do metil chavicol com radical DPPH mostrou que este constituinte apresenta capacidade antioxidante de cinética lenta com tempo de reação maior que uma hora. Neste estudo, a porcentagem de radicais DPPH existentes no meio reacional que ainda não reagiram com o metil chavicol ao longo do tempo é mostrada na Figura 8. Ao atingir o estado estacionário, tempo de 90 minutos, a reação entre o antioxidante e o radical DPPH cessa. Assim, é possível calcular a quantidade real de radicais DPPH que foram reduzidos pela amostra em estudo, evitando a seleção de um intervalo de tempo inadequado em que a reação ainda ocorre.

Figura 8 - Comportamento cinético do metil chavicol



Os valores correspondem à média  $\pm$  E.P.M. As médias diferem entre si após análise de variância seguida do teste de Turkey para  $p < 0,001$ .

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017.

O potencial antioxidante frente ao DPPH do metil chavicol, análogo 2 e BHT (controle positivo) estão apresentados na Tabela 3 na forma de  $CE_{50}$ . Os valores de  $CE_{50}$  das amostras variaram entre  $0,01 \pm 0,0001$  a  $312,50 \pm 2,28$  mg/mL e foram significativamente diferentes entre si ( $p < 0,001$ ).

Tabela 3 - Atividade antioxidante do metilchavicol e análogo pelo método do DPPH

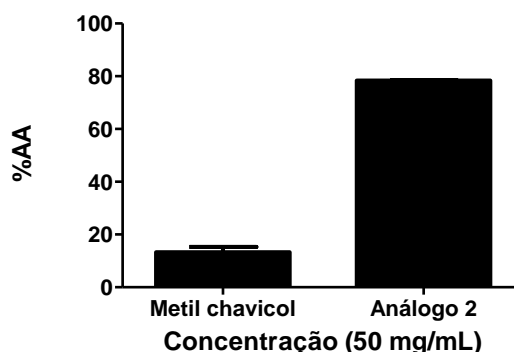
Amostra	$CE_{50}$ (mg/ml)
Metil chavicol	$312,50 \pm 2,28$
Análogo 2	$8,29 \pm 0,80$
BHT	$0,01 \pm 0,0001$

Os valores correspondem à média  $\pm$  E.P.M (n = 3). As médias diferem entre si após análise de variância seguida do teste de Turkey para  $p < 0,001$ .

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017.

Na Figura 9, os valores da porcentagem de atividade (%AA) na concentração de 50 mg/mL são mostrados. É observado que o análogo 2 foi capaz de inibir o DPPH em aproximadamente 80%, demonstrando um melhor efeito antioxidante do que o metil chavicol.

Figura 9 - Atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical DPPH.



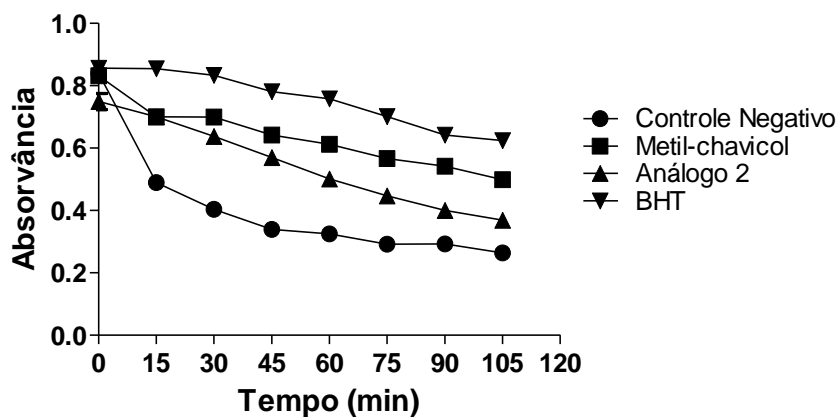
Os valores correspondem à média  $\pm$  E.P.M (n = 3). As médias diferem entre si após aplicação do teste T para  $p < 0,05$ .

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017.

### 5.2.2 Atividade antioxidante pelo método da co-oxidação do $\beta$ -caroteno/ácido linoleico

Na Figura 10 são mostradas as leituras obtidas das absorvâncias nos tempos (minutos)  $t_0$ ,  $t_{15}$ ,  $t_{30}$ ,  $t_{45}$ ,  $t_{60}$ ,  $t_{75}$ ,  $t_{90}$ , e  $t_{105}$  do metil chavicol, análogo e controle positivo (BHT). É observado o decaimento das absorvâncias em função do tempo em decorrência da oxidação do  $\beta$ -caroteno. Quanto menor o decaimento, maior a inibição da peroxidação lipídica e consequentemente da oxidação do  $\beta$ -caroteno. O BHT, como esperado foi mais ativo, produzindo um menor decaimento das absorvância. Entre as amostras, o metilchavicol apresentou menor variação, demonstrando maior inibição da peroxidação lipídica.

Figura 10 - Decaimento da absorvância em função do tempo pelo método da cooxidação do  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico.



Os valores correspondem à média  $\pm$  E.P.M. As médias diferem em relação ao controle negativo após análise de variância seguida do teste de Turkey para  $p < 0,001$ .

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017.

Considerando a porcentagem de inibição da peroxidação lipídica (%I), as amostras e o BHT (25 µg/mL) produziram valores entre 36,16 e 73,08% (Tabela 4). Nesta Tabela, fica evidenciado que o metil chavicol, com inibição igual a 73,08%, foi mais ativo do que o BHT (controle positivo) com 59,66% de inibição.

Tabela 4 - Atividade antioxidante do metil chavicol e análogo pelo método de co-oxidação do β-caroteno/ácido linoleico

Amostras	Inibição da peroxidação lipídica (%)
Metil chavicol	73,08 ± 4,79
Análogo 2	36,16 ± 4,11
BHT	59,66 ± 0,52

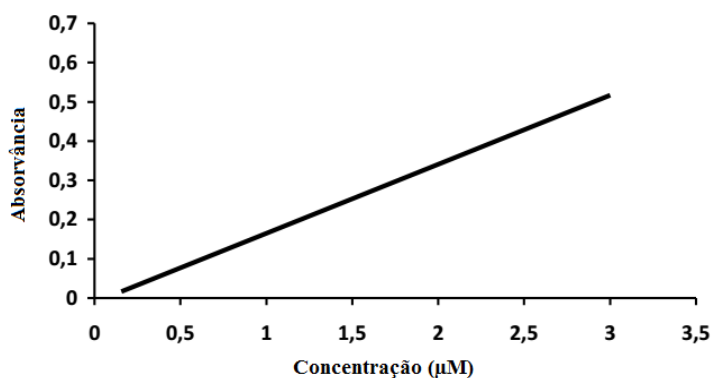
Os valores correspondem à média ± E.P.M. As médias diferem entre si após aplicação do teste T para  $p < 0,001$ .

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017.

### 5.2.3 Atividade antioxidante pelo método do ácido tiobarbitúrico

A atividade antioxidante foi avaliada pelo método de peroxidação lipídica usando o ácido tiobarbitúrico (TBARS) com leituras do padrão de malonaldeído (MDA) em diferentes concentrações para obtenção da curva padrão (Figura 11). Após análise de regressão linear obteve-se a equação da reta  $y = 0,1233x + 0,105$ , com coeficiente de determinação  $R^2 = 0,9789$ . As absorvâncias das amostras foram substituídas no y, obtendo uma concentração inicial com a obtenção do valor de x.

Figura 11 - Curva padrão de malonaldeído



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017.



A concentração de MDA formado ao longo dos cinco dias de experimento diminuiu no homogenato tratado com metilchavicol, análogo **2** (concentrações de 7,5, 15, e 30 mg/ml) e BHT (controle positivo) quando comparado ao controle negativo (Tabela 5). Considerando a concentração de 7,5 mg/mL no 5º dia de experimento, o metil chavicol foi mais ativo em inibir a formação da MDA.

Tabela 5 - Concentração de malonaldeído (MDA) em  $\mu\text{M}$  obtida pelo método do ácido tiobarbitúrico (TBARS) frente metil chavicol e análogo

Amostras	Dose	Concentração de MDA ( $\mu\text{M}$ )				
		Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4
Controle	Salina	0,42±0,02	0,59±0,04	0,67±0,06	0,64±0,03	0,91±0,08
	7,5 mg	0,08±0,02 <sup>***</sup>	0,16±0,02 <sup>***</sup>	0,12±0,03 <sup>***</sup>	0,06±0,00 <sup>***</sup>	0,22±0,05 <sup>***</sup>
BHT	15 mg	0,10±0,02 <sup>***</sup>	0,11±0,03 <sup>***</sup>	0,08±0,01 <sup>***</sup>	0,17±0,06 <sup>***</sup>	0,16±0,00 <sup>***</sup>
	30 mg	0,20±0,01 <sup>***</sup>	0,20±0,03 <sup>***</sup>	0,23±0,06 <sup>***</sup>	0,12±0,08 <sup>***</sup>	0,22±0,08 <sup>***</sup>
Metil	7,5 mg	0,41±0,01	0,18±0,02 <sup>***</sup>	0,22±0,06 <sup>***</sup>	0,22±0,06 <sup>***</sup>	0,16±0,02 <sup>***</sup>
chavicol	15 mg	0,39±0,06	0,29±0,04 <sup>***</sup>	0,53±0,06 <sup>***</sup>	0,32±0,07 <sup>***</sup>	0,21±0,08 <sup>***</sup>
	30 mg	0,35±0,02 <sup>***</sup>	0,20±0,01 <sup>***</sup>	0,40±0,06 <sup>***</sup>	0,48±0,03 <sup>***</sup>	0,62±0,02 <sup>***</sup>
Análogo 2	7,5 mg	0,24±0,02 <sup>***</sup>	0,39±0,07 <sup>***</sup>	0,46±0,01 <sup>***</sup>	0,35±0,03 <sup>***</sup>	0,54±0,04 <sup>***</sup>
	15 mg	0,20±0,01 <sup>***</sup>	0,25±0,00 <sup>***</sup>	0,37±0,05 <sup>***</sup>	0,19±0,01 <sup>***</sup>	0,38±0,01 <sup>***</sup>
	30 mg	0,18±0,06 <sup>***</sup>	0,26±0,02 <sup>***</sup>	0,32±0,00 <sup>***</sup>	0,57±0,01	0,34±0,05 <sup>***</sup>

Os valores correspondem à média  $\pm$  E. P. M. (n = 3). <sup>\*\*\*</sup>  $p < 0,001$ , diferente do grupo controle negativo após análise de variância seguida do teste de Turkey.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017.

### 5.3 EFEITO DO METIL CHAVICOL SOBRE A LIPASE PANCREÁTICA

A inibição da enzima lipase pancreática pelo metil chavicol foi realizada por método espectrofotométrico usando como controle positivo o orlistate, um inibidor enzimático da lipase pancreática, liberado pelo FDA e ANVISA para o tratamento da obesidade. A atividade de inibição do metil chavicol foi de 58,12% e do controle positivo de 76,80% (Tabela 6).

Tabela 6 - Atividade da lipase pancreática na presença do metil chavicol

Amostras testadas	Inibição (%)
Metil chavicol	58,12 ± 2,66
Orlistate	76,80 ± 2,22

Os valores correspondem à média ± E.P.M. As médias diferem entre si após aplicação do teste T para  $p < 0,05$ .

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017.

#### 5.4 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA TÓPICA

##### 5.4.1 Efeito do metilchavicol sobre o edema de orelha induzido por óleo de Cróton

Após 6 horas da aplicação tópica do óleo de Cróton, observa-se na Tabela 7 que houve formação efetiva de edema, demonstrado pelo aumento da espessura da orelha do grupo controle (solução salina). Nas doses de 0,1, 0,5 e 1,0 mg/orelha, o metil chavicol inibiu significativamente ( $p < 0,001$ ) a formação do edema em 58,02, 57,98 e 67,75%, respectivamente, quando comparado ao grupo controle. A dexametasona foi utilizada como controle positivo, produziu 53,23% de inibição do edema (Tabela 7).

O efeito do metil chavicol sobre o processo inflamatório foi também avaliado após 24 horas por aplicação do óleo de Cróton. Observou-se uma redução significativa ( $p < 0,001$ ) da espessura do edema frente às doses de 0,1, 0,5 e 1,0 mg/orelha de metil chavicol, as quais inibiram 68,65, 69,09 e 81,95% respectivamente, quando comparado ao grupo controle. A inibição do edema produzida pela dexametasona foi de 78,61% (Tabela 7). Considerando a massa do edema nesse tempo, os resultados corroboram a redução significativa ( $p < 0,001$ ) do edema nas doses de 0,1, 0,5 e 1,0 mg/orelha de metil chavicol, diminuindo por 56,26, 60,25 e 70,55%, respectivamente, em comparação ao controle negativo. Dexametasona reduziu em 82,92% a massa do edema (Tabela 7).

Tabela 7 - Efeito do metil chavicol sobre o edema de orelha induzido por óleo de Cróton.

Grupo	Dose	Espessura ( $\mu\text{m}$ )				Massa (mg)	
		6h	Inibição (%)	24 h	Inibição (%)	24 h	Inibição (%)
Controle (salina)	20 $\mu\text{L}$ /orelha	217,20 $\pm$ 5,00	-	224,55 $\pm$ 4,56	-	1,46 $\pm$ 0,07	-
Metil-chavicol	0,1 mg/orelha	91,17 $\pm$ 3,9***	58,02	70,40 $\pm$ 3,16	68,65	0,64 $\pm$ 0,042	56,16
	0,5 mg/orelha	91,26 $\pm$ 3,81***	57,98	69,41 $\pm$ 5,73	69,09	0,58 $\pm$ 0,03	60,27
	1,0 mg/orelha	70,05 $\pm$ 7,31***	67,75	40,53 $\pm$ 2,89	81,95	0,43 $\pm$ 0,04	70,55
Dexametasona	0,1 mg/orelha	102,33 $\pm$ 3,95***	52,89	46,45 $\pm$ 1,57	79,31	0,25 $\pm$ 0,03	82,88
Basal	-	8,31 $\pm$ 0,66***	-	9,01 $\pm$ 0,19	-	0,02 $\pm$ 0,01	-
Veículo (acetona)	20 $\mu\text{L}$ /orelha	12,25 $\pm$ 0,95***	-	11,31 $\pm$ 0,19	-	0,02 $\pm$ 0,01	-

Os valores correspondem à média  $\pm$  E. P. M. (n = 6). \*\*\*  $p < 0,001$  diferente do grupo controle após análise de variância seguida do teste Student-Newman-Keuls.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017.

#### 5.4.2 Efeito do metil chavicol sobre o edema de orelha induzido por fenol

A aplicação tópica de fenol induziu, após 2 horas, a formação do edema que foi evidenciado pelo aumento da espessura e da massa do edema (Tabela 8). O metil chavicol administrado topicamente foi capaz de inibir significativamente em 65,71, 67,68 e 67,96% ( $p < 0,001$ ) a espessura do edema nas doses de 0,1, 0,5 e 1,0 mg/orelha, respectivamente, em relação ao grupo controle (Tabela 8). Nessas doses, em ordem crescente, metil chavicol também reduziu a massa do edema em 21,96, 21,75 e 23,45%, respectivamente, quando comparado ao grupo controle (Tabela 8). Dexametasona foi efetiva em ambas as medidas do edema.

Tabela 8 - Efeito do metil chavicol sobre o edema de orelha induzido por fenol.

Grupo	Dose	Espessura ( $\mu\text{m}$ )	Inibição (%)	Massa (mg)	Inibição (%)
Controle (salina)	20 $\mu\text{L}$ /orelha	355,34 $\pm$ 19,57	-	7,82 $\pm$ 0,69	-
Metil chavicol	0,1 mg/orelha	121,83 $\pm$ 8,42***	65,71	6,10 $\pm$ 0,73***	21,96
	0,5 mg/orelha	114,83 $\pm$ 3,92***	67,68	6,12 $\pm$ 0,30***	21,75
	1,0 mg/orelha	113,84 $\pm$ 12,15***	67,96	5,98 $\pm$ 0,68***	23,45
Dexametasona	0,1 mg/orelha	96,84 $\pm$ 9,24***	72,75	4,83 $\pm$ 0,42***	38,17
Basal	-	3,17 $\pm$ 1,83***	-	0,35 $\pm$ 0,01***	-
Veículo (acetona)	20 $\mu\text{L}$ /orelha	14,83 $\pm$ 2,31***	-	0,40 $\pm$ 0,03***	-

Os valores correspondem à média  $\pm$  E. P. M. (n = 6). \*\*\*  $p < 0,001$  diferente do grupo controle após análise de variância seguida do teste Student-Newman-Keuls.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017.

#### 5.4.3 Efeito do metil chavicol sobre o edema de orelha induzido por histamina

A aplicação intradérmica de histamina na orelha de camundongos resultou no aumento significativo da espessura e massa da orelha como observado no grupo controle. A aplicação tópica prévia do metil chavicol nas doses de 0,1, 0,5 e 1,0 mg/orelha promoveu uma inibição de 15,28, 64,07 e 72,65% respectivamente, evidenciando um possível efeito anti-edematogênico desse fenilpropanoide (Tabela 9). As doses de 0,1, 0,5 e 1,0 mg/orelha de metil chavicol também diminuíram a massa do edema em 23,09, 72,16 e 86,08%, respectivamente (Tabela 9). Neste ensaio, a dexametasona foi ativa nas duas medidas do edema.

Tabela 9 - Efeito do metil chavicol sobre o edema de orelha induzido por histamina.

Grupo	Dose	Espessura ( $\mu\text{m}$ )	Inibição (%)	Massa (mg)	Inibição (%)
Controle (salina)	20 $\mu\text{L}$ /orelha	62,17 $\pm$ 3,43	-	1,44 $\pm$ 0,20	-
	0,1 mg/orelha	52,67 $\pm$ 1,21***	15,28	1,11 $\pm$ 0,16***	23,09
Metil chavicol	0,5 mg/orelha	22,34 $\pm$ 2,07***	64,07	0,40 $\pm$ 0,17***	72,16
	1,0 mg/orelha	17,00 $\pm$ 4,86***	72,65	0,20 $\pm$ 0,06***	86,08
Dexametasona	0,1 mg/orelha	42,84 $\pm$ 3,19***	31,10	0,39 $\pm$ 0,10***	72,97
Basal	-	7,00 $\pm$ 2,10***	-	0,03 $\pm$ 0,00***	-
Veículo	20 $\mu\text{L}$ /orelha	16,50 $\pm$ 2,43***	-	0,04 $\pm$ 0,00***	-

Os valores correspondem à média  $\pm$  E. P. M. (n = 6). \*\*\*  $p < 0,001$ , diferente do grupo controle após análise de variância seguida do teste Student-Newman-Keuls.

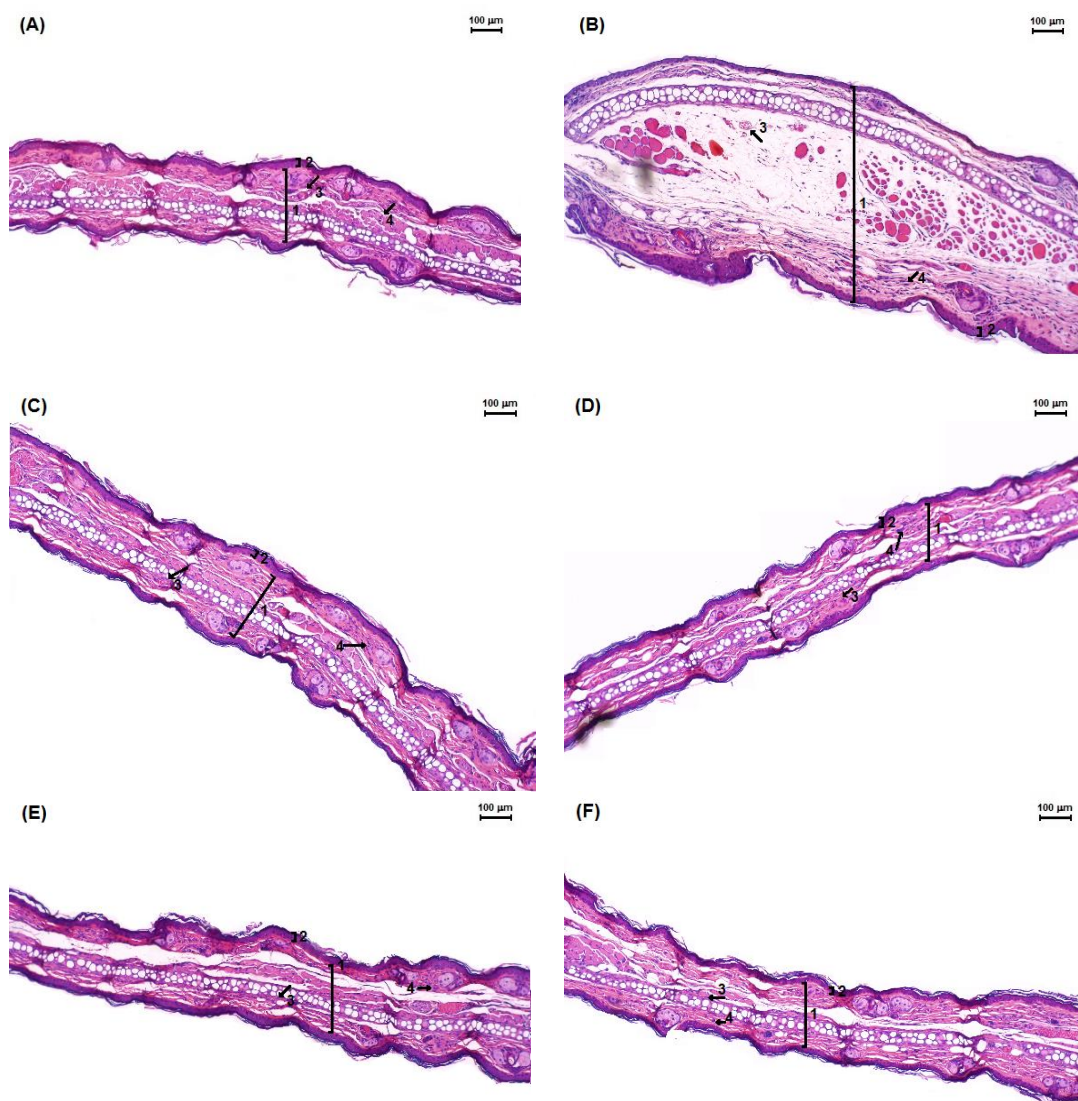
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017.

#### 5.4.4 Análise histopatológica

Com intuito de confirmar e compreender o efeito do anti-inflamatório do metil chavicol após indução do edema por óleo de Cróton, análise histológica de parâmetros de inflamação foi realizado. Na Figura 12 são apresentadas fotos representativas dos cortes histológicos (100x, escala 100  $\mu\text{m}$ ) de orelhas de camundongos de cada grupo experimental. Ao comparar o grupo controle negativo (Figura 12B) com o grupo basal (Figura 12A), o óleo de Cróton produziu um aumento acentuado da espessura da derme, tecido conjuntivo, infiltração leucocitária e desorganização da matrix extracelular. O tratamento com metil chavicol, nas doses de 0,1, 0,5 e 1,0 mg/orelha, reduziu o processo inflamatório, como a formação de edema com diminuiu a espessura do edema, vasodilatação e redução no número

de leucócitos (Figuras 12D, 12E e 12F). Como esperado, dexametasona (0,1 mg/orelha) foi também capaz de reduzir esses parâmetros da inflamação (Figura 12C).

Figura 12 - Fotomicrografia de seções transversais de tecidos da orelha de camundongos após indução do edema por óleo de Cróton.



Cortes histológicos de orelhas dos camundongos corados com hematoxilina-eosina (100x, escala de 100 µm). (A) Basal (sem inflamação); (B) Controle (solução salina); (C) dexametasona 0,1 mg/orelha; (D) metil chavicol 0,1 mg/orelha; (E) metil chavicol 0,5 mg/orelha; (F) metil chavicol 1,0 mg/orelha. Números: 1 (derme), 2 (epiderme), 3 (vasodilatação) and 4 (leucócitos).

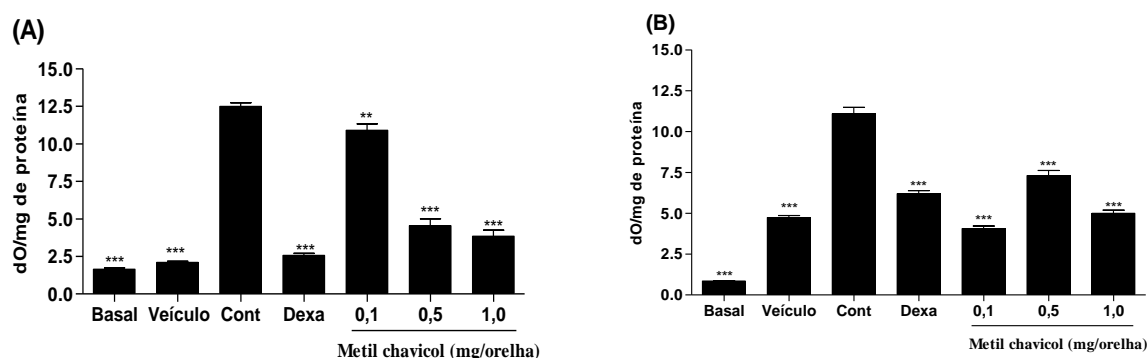
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017.

#### 5.4.5 Efeito do metil chavicol sobre as enzimas mieloperoxidase e N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase

A ação do óleo de Cróton promoveu um aumento expressivo na mieloperoxidase (MPO) quando comparado aos grupos basal e veículo (Figura 13A). Nos grupos submetidos ao tratamento com metil chavicol, doses de 0,1, 0,5 e 1,0 mg/orelha reduziram a MPO em 12,66, 63,62 e 69,23% respectivamente ( $p < 0,01$  ou  $p < 0,001$ ) em relação ao grupo controle. Dexametasona produziu 78,94% de inibição da referida enzima.

A Figura 13B mostra que o óleo de Cróton aumentou significativamente a presença de N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase (NAG) no grupo controle negativo. Nas doses de 0,1, 0,5 e 1,0 mg/orelha de metil chavicol ocorreu uma redução da NAG em 63,34, 34,13 e 54,88%, respectivamente, quando comparado com grupo controle. A dexametasona, como esperado, foi efetiva em reduzir a NAG.

Figura 13 - Efeito do metil chavicol sobre a enzima mieloperoxidase e N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase.



Os valores correspondem à média  $\pm$  E. P. M. ( $n = 6$ ). (A) Mieloperoxidase; (B) N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase. \*\*  $p < 0,01$  ou \*\*\*  $p < 0,001$ , diferente do grupo controle após análise de variância seguida do teste Student-Newman-Keuls. Cont = Controle; Dexa = Dexametasona.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017.

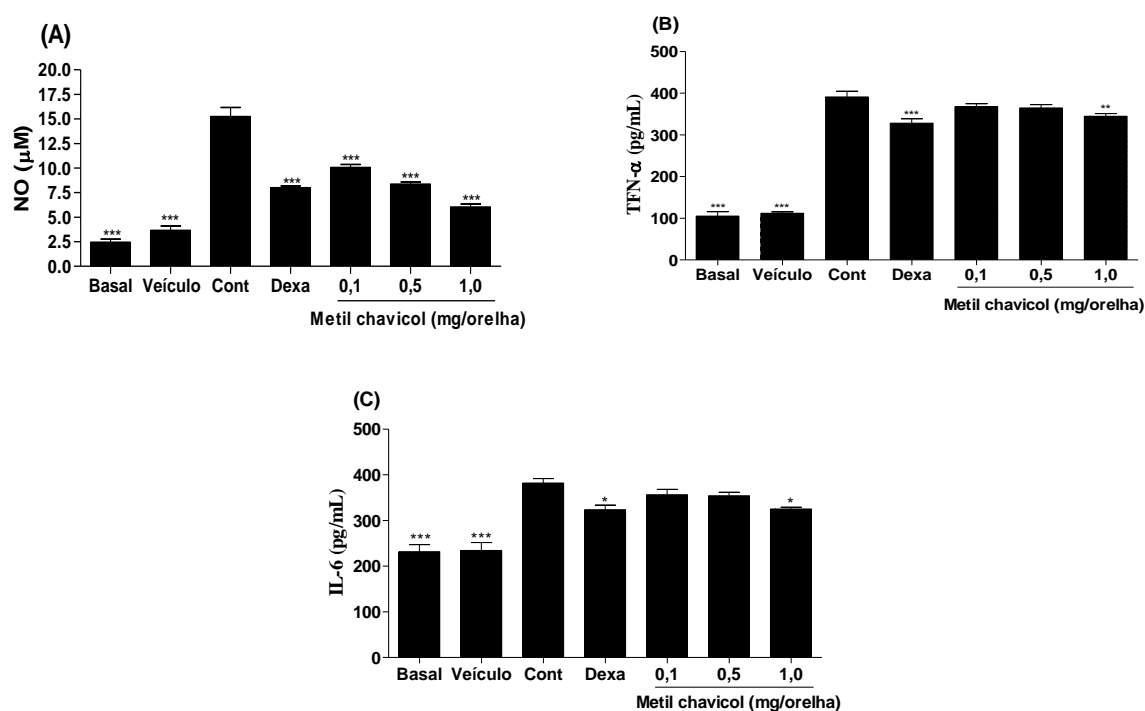
#### 5.4.6 Efeito do metil chavicol sobre a produção de óxido nítrico e citocinas

A dosagem de óxido nítrico (NO) foi realizada de maneira indireta pela reação de Griess que detecta a presença de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), um dos produtos estáveis da síntese de NO. A Figura 14A representa os níveis de nitrito nos grupos submetidos ao edema de orelha induzido por óleo de Cróton. O grupo controle promoveu um aumento significativo nos níveis de NO, quando comparado aos grupos basal e veículo (Figura 14A). Metil chavicol, nas doses de 0,1,

0,5 e 1,0 mg/orelha inibiu a produção de NO em 34,11, 45,17 e 60,39%, respectivamente, em relação ao grupo controle. A dexametasona reduziu em 47,59% esse mediador.

Níveis elevados de TNF- $\alpha$  e IL-6 foram observados no grupo controle quando comparado com os grupos basal e veículo (Figura 14B e C). Metil chavicol, na dose de 1,0 mg/orelha, inibiu a produção de TNF- $\alpha$  em 11,83% and IL-6 em 14,92% em relação ao grupo controle ( $p < 0,01$  and  $p < 0,05$ , respectivamente). Dexametasona reduziu ambos marcadores do processo inflamatório.

Figura 14 - Efeito do metil chavicol sobre a produção de óxido nítrico e citocinas.



Os valores correspondem à média  $\pm$  E. P. M. (n = 6). (A) NO; (B) TNF- $\alpha$ ; (C) IL-6. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  diferente do grupo controle após análise de variância seguida do teste Student-Newman-Keuls.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017.

## 5.5 EFEITO *IN VITRO* DO METIL CHAVICOL SOBRE AS ENZIMAS CICLOOXIGENASES

Na Tabela 10 é mostrado que o metil chavicol foi inativo frente às enzimas ciclooxigenase-1 ovina e ciclooxigenase-2 humana (COX-1 e -2). Como controles positivos, diclofenaco e resveratrol inibiram as respectivas enzimas.

Tabela 10 - Efeito in vitro do metil chavicol sobre as enzimas ciclooxigenases.

Amostra	Concentração	COX-1		COX-2	
		IC <sub>50</sub> (µM) <sup>a</sup>	Inibição (%)	IC <sub>50</sub> (µM) <sup>a</sup>	Inibição (%)
Metil chavicol	0,01 a 150 µM	-	0	-	0
Diclofenaco	2 µM	0,06	100	0,4	100
Resveratrol	5 µM	0,90	100	3,1	70

<sup>a</sup>Concentração necessária para produzir 50% de inibição de COX-1 ovina ou COX-2 humana. O resultado (IC<sub>50</sub>, µM) é média de três determinações. - valor não determinado.

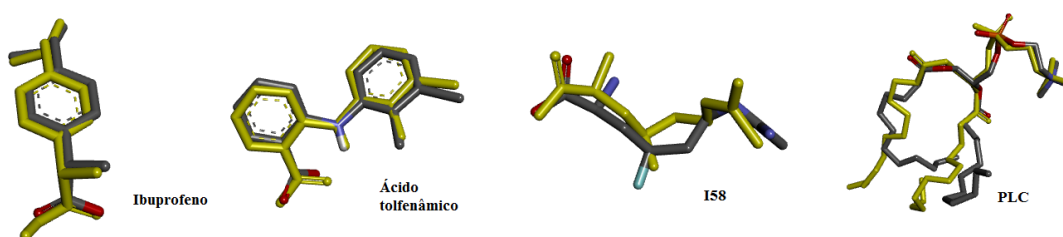
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

## 5.6 ESTUDOS DE *DOCKING*

### 5.6.1 *Redocking*

Com base nos resultados do efeito do anti-inflamatório do metilchavicol e e para uma melhor compreensão das interações moleculares entre essa substância e enzimas inflamatórias foi realizado estudo de Docking. Os parâmetros utilizados foram validados por meio de *redocking* que consiste em reproduzir um complexo cristalográfico proteína-ligante com um *root-mean-square deviation* (RMSD) menor do que 2 Å. Na Figura 15 são representados os resultados do *redocking* dos ligantes cristalográficos ibuprofeno (IBU), ácido tolfenâmico (TLF), I58 e diundecilfosfatidilcolina (PLC) nos sítios de ligação da COX-1, COX-2, óxido nítrico sintase induzível (i-NOS) e lipase pancreática, respectivamente. Observa-se que houve uma expressiva reconstrução dos complexos cristalográficos, o que validou a metodologia para dar continuidade na sequência dos testes que foram realizados.

Figura 15 - Estruturas dos ligantes cristalográficos após validação por *redocking*.



Em amarelo, ligantes iniciais obtidos do PDB.

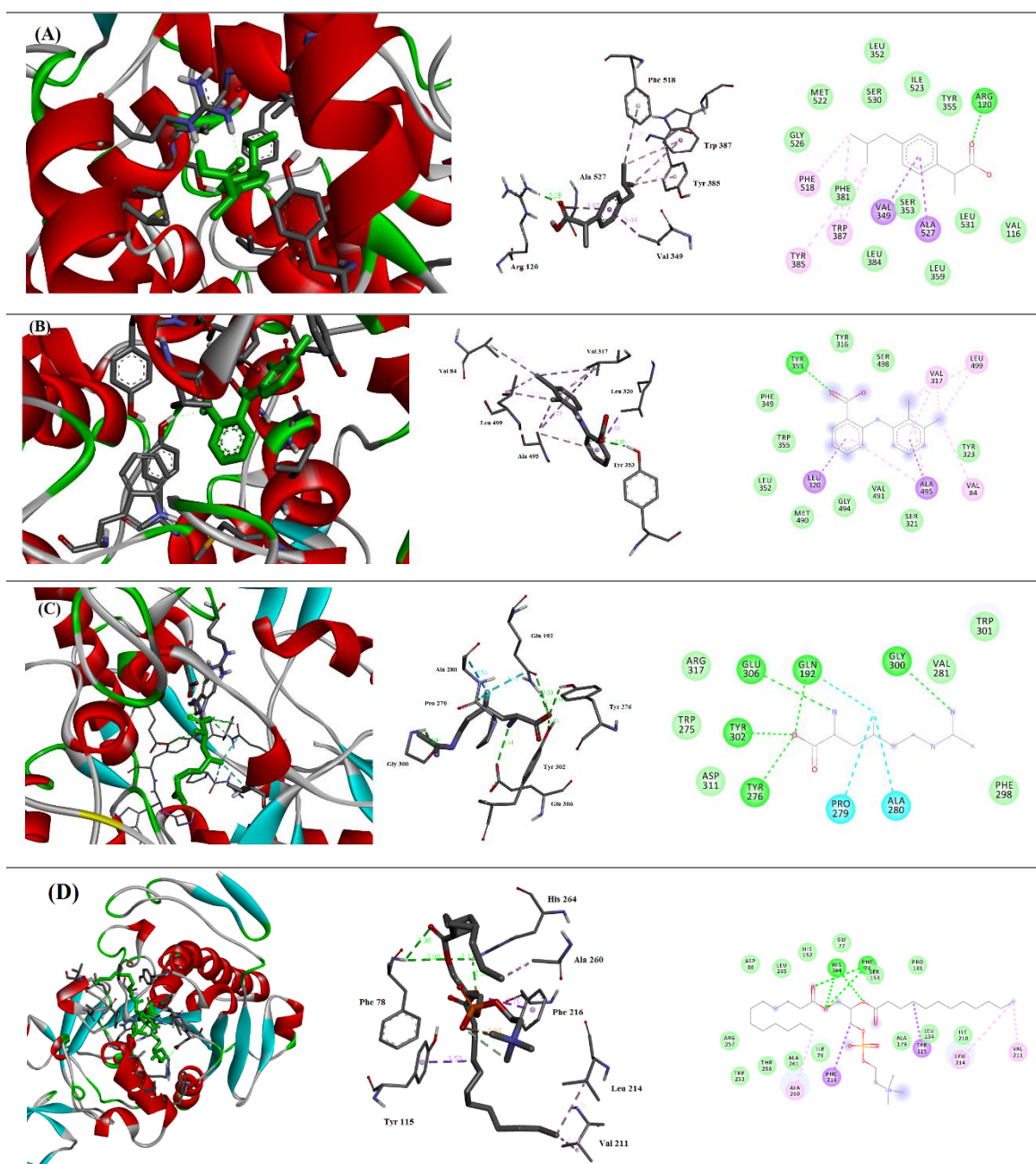
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017.



### 5.6.2 *Docking* do metil chavicol

Utilizando os mesmos parâmetros do *redocking* nas COX-1 (PDB 1EQG), COX-2 (PDB 5IKT), i-NOS (PDB 1R35) e lipase pancreática (PDB 1LPA), realizou-se o *docking* do metil chavicol. A primeira etapa do estudo de *docking* molecular consistiu em descrever o modo de ligação dos inibidores ibuprofeno, TLF, I58 e PLC com suas respectivas enzimas. A orientação obtida para cada ligante no sítio de ligação das COX-1, COX-2, i-NOS e lipase pancreática está apresentada na Figura 16. As interações moleculares relevantes para COX-1 e COX-2 são ligação de hidrogênio com resíduo Arg 120, dipolo-dipolo com Tyr 385 e força de Van der Waals com Ser 530. Tais interações são perfeitamente observadas com ibuprofeno (Figura 16A). Considerando a i-NOS, as interações relevantes são ligação de hidrogênio, eletrostática e van der Waals (Figura 16C). Os resíduos Ser 153, Asp 177 e His 264, os quais formam a tríade catalítica, foram as interações moleculares mais importantes entre os ligantes e a lipase pancreática. Entre esses três resíduos, Ser 153 é fundamental para realizar a lipólise. Na Figura 16D, está representada interações de Van der Waals e ligação de hidrogênio com os respectivos resíduos Ser 153 e His 264, o que possivelmente inibe a atividade enzimática.

Figura 16 - Orientações moleculares dos ligantes cristalográficos no sítio de ligação das enzimas COX-1, COX-2, i-NOS e lipase pancreática.



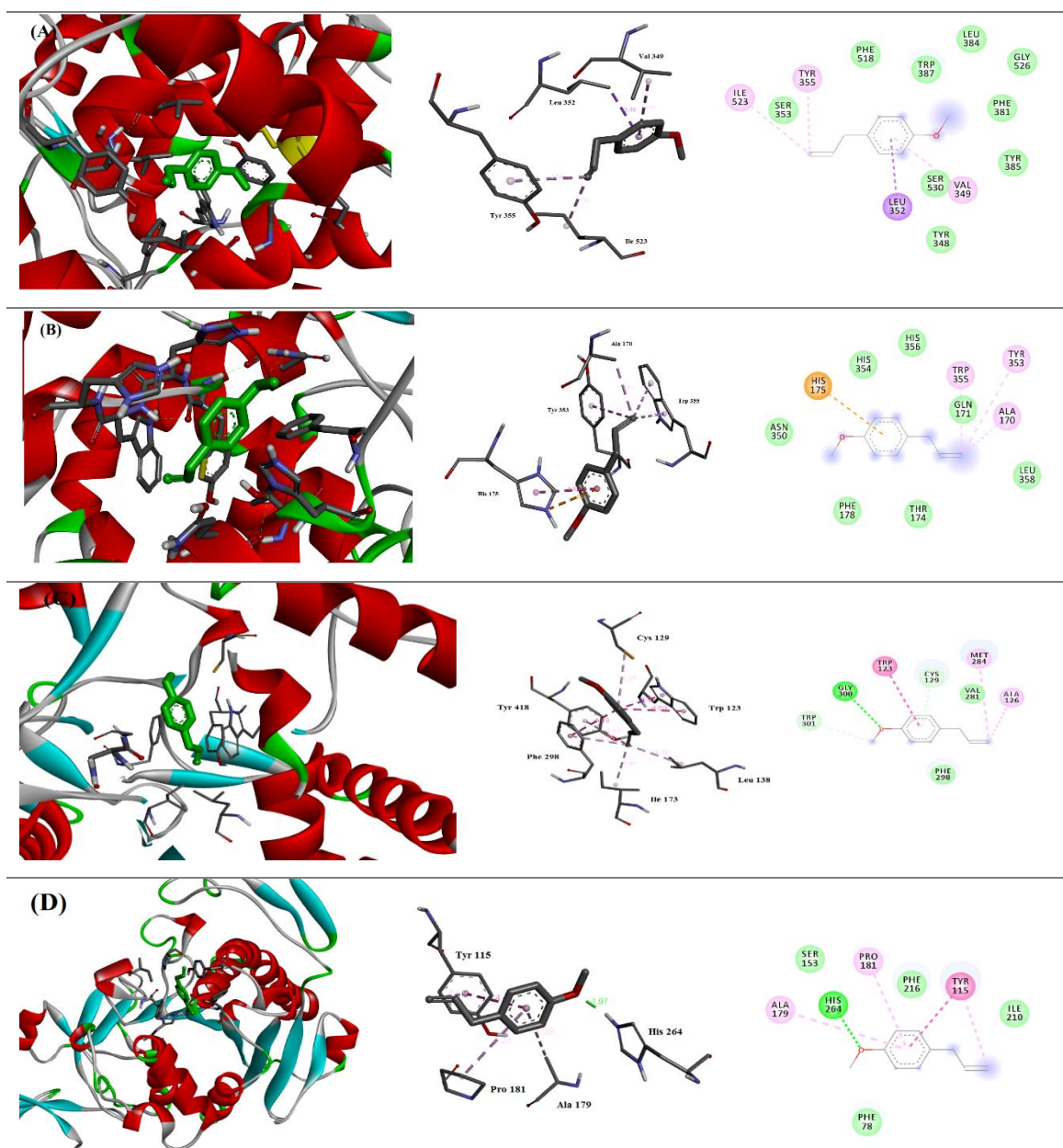
Orientação dos ligantes cristalográficos no sítio enzimático. **(A)** Principais interações moleculares entre ibuprofeno e COX-1. **(B)** Principais interações moleculares entre TLF e COX-2. **(C)** Principais interações moleculares entre I58 e i-NOS. **(D)** Principais interações moleculares entre PLC e lipase pancreática.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

As orientações obtidas do metil chavicol nas enzimas COX-1, COX-2, i-NOS e lipase pancreática estão representadas na Figura 17 enquanto os valores de energia livre (afinidade) associados a essas enzimas são mostrados na Tabela 11. A interação molecular por ligação de hidrogênio é fundamental para inibir a COX-1 e -2. Como o metil chavicol foi incapaz de inibir COX-1 e -2 no estudo *in vitro*, o *docking* molecular mostrou ausência deste tipo de interação com este ligante. Além disso, o valor da afinidade de ligação foi maior para ambas as enzimas (-6,3 e -6,2 kcal.mol<sup>-1</sup>, COX-1 e -2, respectivamente) quando comparados com seus respectivos inibidores IBU e TLF (Tabela 11). Esse achado corrobora a falta da ação anti-inflamatória sobre a via da ciclooxigenase. No entanto, o estudo de *docking* e o efeito sobre o óxido nítrico sugerem que a ação anti-inflamatória do metilchavicol pode estar relacionada à inibição da i-NOS.

O estudo do *docking* molecular também mostrou o efeito do metil chavicol sobre a lipase pancreática, onde a afinidade de ligação foi menor para esta enzima quando comparado com seus respectivos inibidor PLC (-6,1 e -5,6 kcal.mol<sup>-1</sup>). O perfil de interação molecular está representada na Figura 17D, onde foram destacadas as interações de ligação de hidrogênio com os respectivos resíduos Ser 153 e His 264, o que sugere o possível mecanismo do efeito do metil chavicol sobre a lipase pancreática.

Figura 17 - Orientações moleculares do metil chavicol no sítio de ligação das enzimas COX-1, COX-2, i-NOS e lipase pancreática.



Orientação do ligante cristalográfico no sítio enzimático. **(A)** Principais interações moleculares entre metil chavicol e COX-1. **(B)** Principais interações moleculares entre metil chavicol e COX-2. **(C)** Principais interações moleculares entre metil chavicol e i-NOS. **(D)** Principais interações moleculares entre metil chavicol e lipase pancreática.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017.

Tabela 11 - Afinidade de ligação entre ligantes e as enzimas COX-1, COX-2, i-NOS e lipase pancreática.

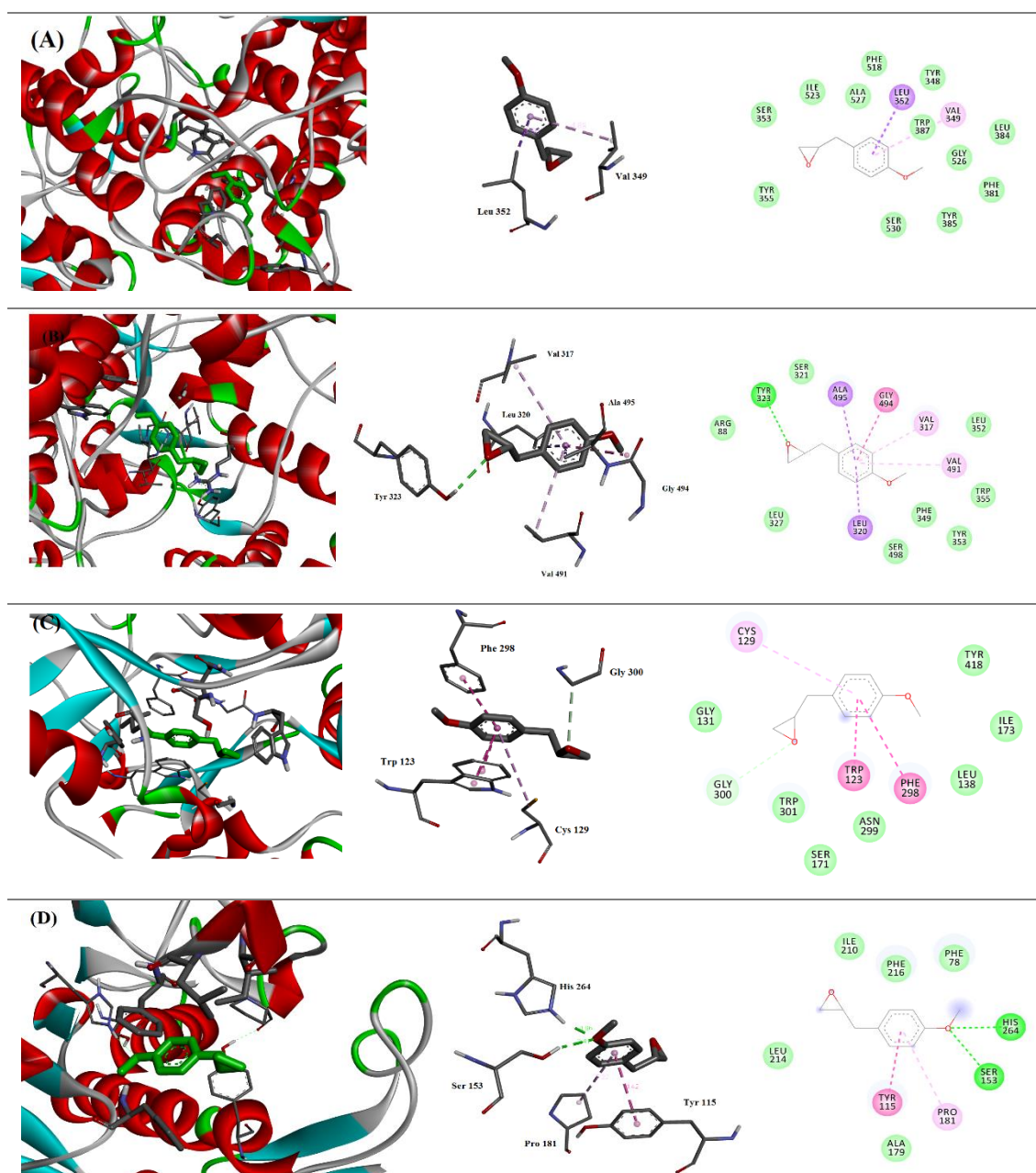
Ligantes	Afinidade de ligação (kcal.mol <sup>-1</sup> )			
	COX-1	COX-2	i-NOS	Lipase
Ibuprofeno	-7,6	-7,4	-	-
Ácido tolfenâmico	-9,5	-9,0	-	-
I58	-	-	-4,9	-
PLC	-	-	-	-5,6
Metil chavicol	-6,3	-6,2	-6,0	-6,1

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017.

### 5.6.3 Docking dos análogos do metil chavicol

As orientações obtidas para os análogos **2**, **8**, **17** e **18** frente às enzimas COX-1, COX-2, i-NOS e lipase pancreática são representadas nas Figuras 18 a 21 e os valores de energia livre (afinidade de ligação) foram associados a cada substância representada na Tabela 12. Como descrito acima, a presença de interação por ligação de hidrogênio é fundamental para inibir a COX-1 e -2. Aplicando o estudo de docking molecular, foi constatado que os análogos **2**, **8**, **17** e **18** não apresentaram este tipo de interação. Além disso, os valores de afinidade de ligação foram maiores do que os fármacos controle (IBU e TFA), o que corrobora a falha da ação anti-inflamatória sobre a via COX (Tabela 12). No entanto, nossos dados sugerem que todos análogos tem a capacidade de inibir a enzima i-NOS, destacando-se o análogo **18** que forma um complexo com maior (-6,2 kcal.mol<sup>-1</sup>). Considerando a ação sobre a lipase, o valor de energia de afinidade é bem próximo ao do inibidor PLC e o análogo **18** foi mais efetiva, pois produziu um valor de afinidade de -6,2 kcal.mol<sup>-1</sup>. As interações moleculares entre os análogos e a lipase pancreática são do tipo ligação de hidrogênio que apresenta resíduos de Ser 153 e His 264 parecido com o efeito do metil chavicol.

Figura 18 - Orientações moleculares do análogo **2** no sítio de ligação das enzimas COX-1, COX-2, i-NOS e lipase pancreática.

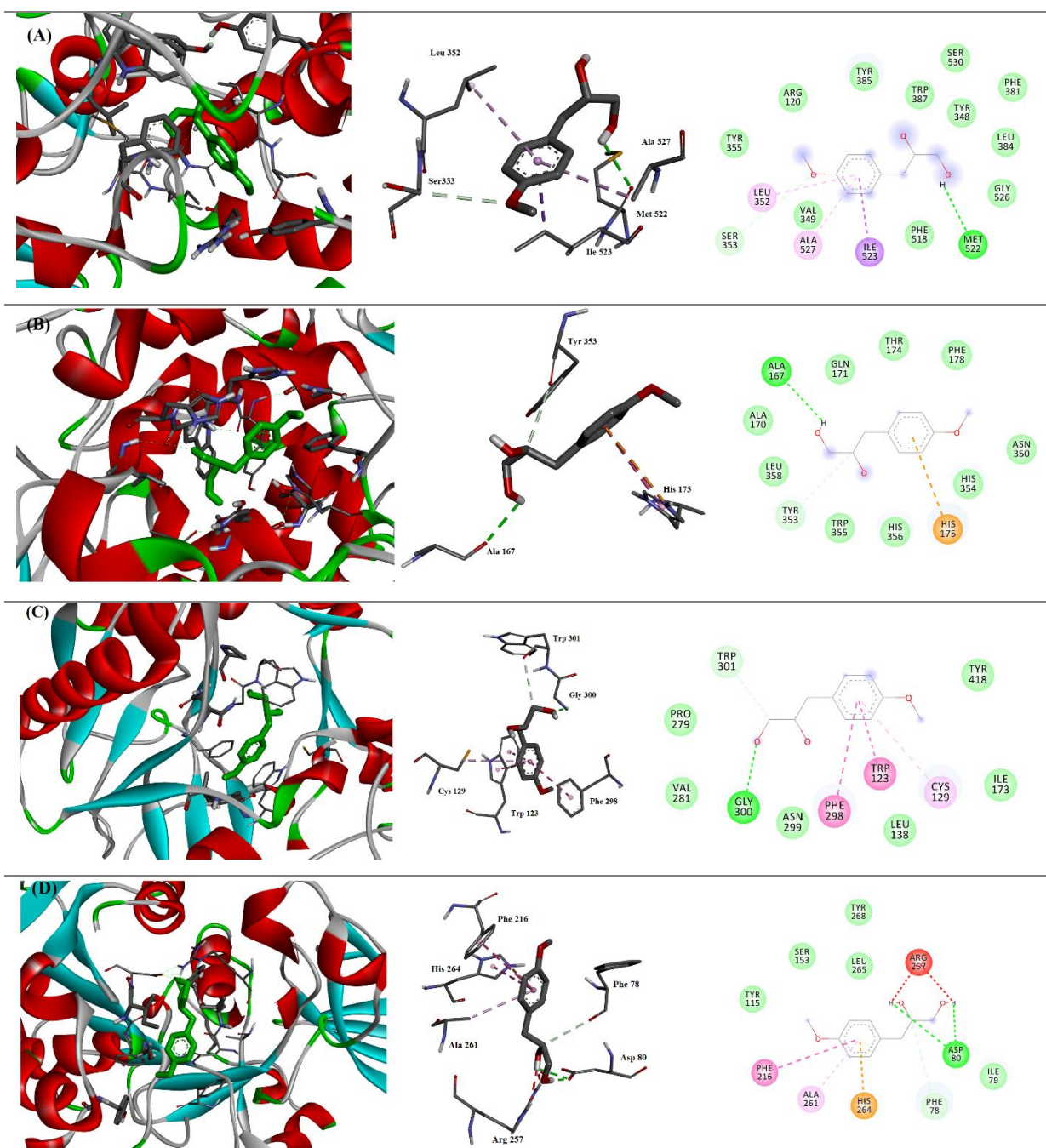


Orientação do ligante cristalográfico no sítio enzimático. (A) Principais interações moleculares entre o análogo **2** e COX-1. (B) Principais interações moleculares entre o análogo **2** e COX-2. (C) Principais interações moleculares entre o análogo **2** e i-NOS. (D) Principais interações moleculares entre o análogo **2** e lipase pancreática

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017.



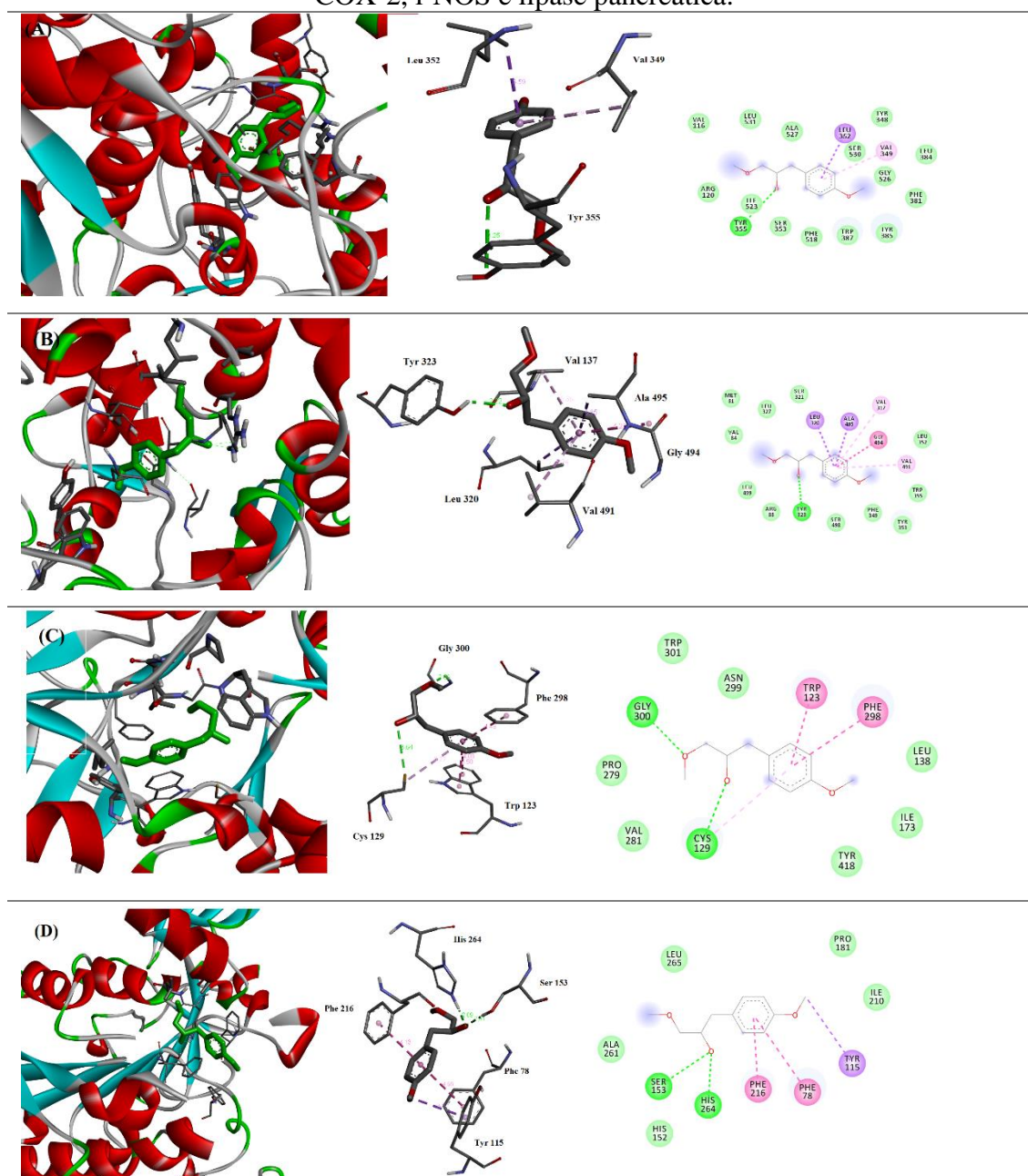
Figura 19 - Orientações moleculares do análogo **8** no sítio de ligação das enzimas COX-1, COX-2, i-NOS e lipase pancreática.



Orientação do ligante cristalográfico no sítio enzimático. (A) Principais interações moleculares entre o análogo **8** e COX-1. (B) Principais interações moleculares entre o análogo **8** e COX-2. (C) Principais interações moleculares entre o análogo **8** e i-NOS. (D) Principais interações moleculares entre o análogo **8** e lipase pancreática

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017.

Figura 20 - Orientações moleculares do análogo **17** no sítio de ligação das enzimas COX-1, COX-2, i-NOS e lipase pancreática.

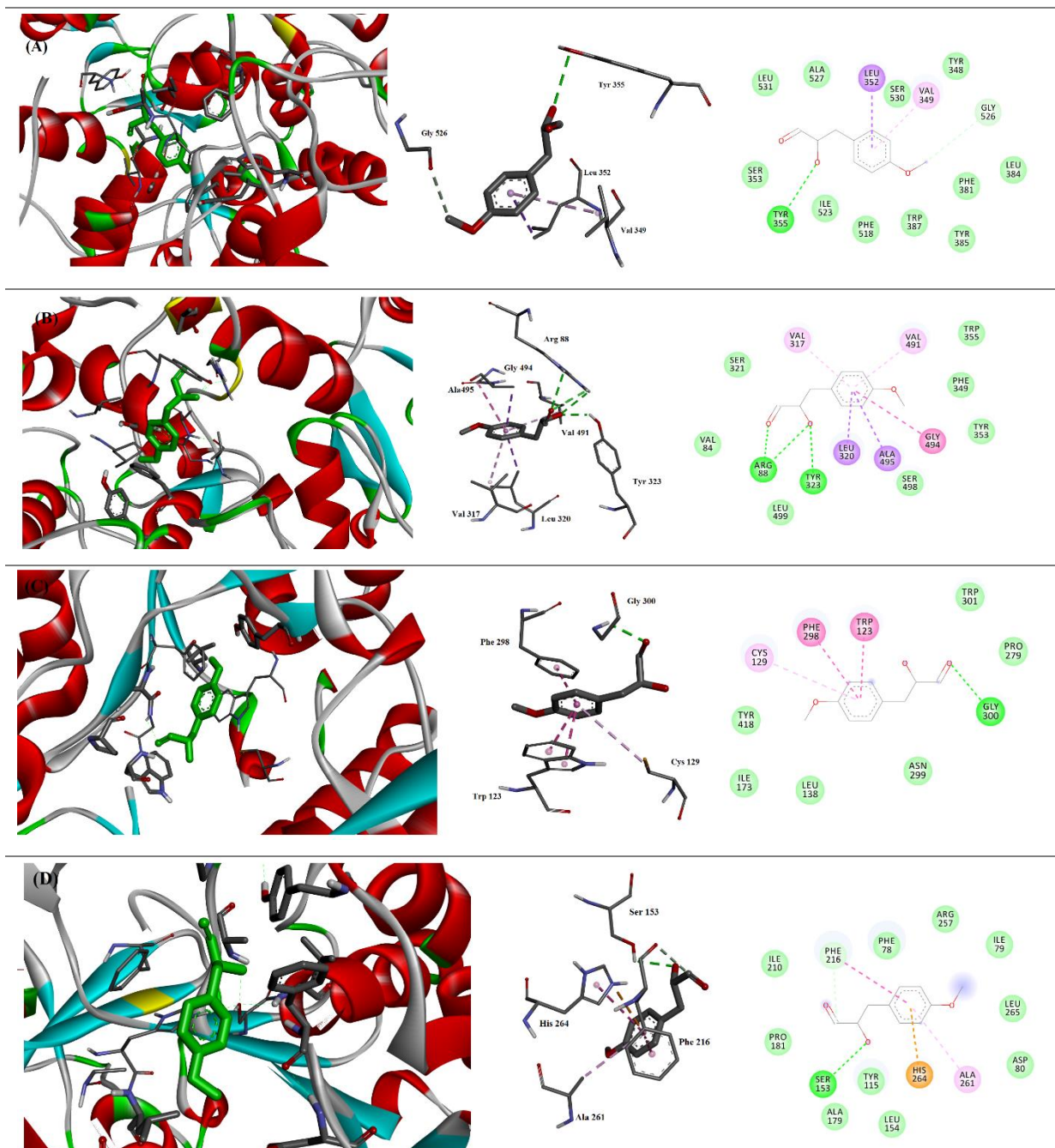


Orientação do ligante cristalográfico no sítio enzimático. **(A)** Principais interações moleculares entre o análogo **17** e a COX-1. **(B)** Principais interações moleculares entre o análogo **17** e COX-2. **(C)** Principais interações moleculares entre o análogo **17** e i-NOS. **(D)** Principais interações moleculares entre o análogo **17** e lipase pancreática

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017.



Figura 21 - Orientações moleculares do análogo **18** no sítio de ligação das enzimas COX-1, COX-2, i-NOS e lipase pancreática.



Orientação do ligante cristalográfico no sítio enzimático. **(A)** Principais interações moleculares entre o análogo **18** e a COX-1. **(B)** Principais interações moleculares entre o análogo **18** e a COX-2. **(C)** Principais interações moleculares entre o análogo **18** e a i-NOS. **(D)** Principais interações moleculares entre o análogo **18** e a lipase pancreática

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017.

Tabela 12 - Afinidade de ligação entre os análogos do metil chavicol e as enzimas COX-1, COX-2, i-NOS e lipase pancreática.

Ligantes	Afinidade de ligação (kcal.mol <sup>-1</sup> )			
	COX-1	COX-2	i-NOS	Lipase
Ibuprofeno	-7,6	-7,4	-	-
Ácido tolfenâmico	-9,5	-9,0	-	-
I58	-	-	-4,9	-
PLC	-	-	-	-5,6
Análogo 2	-6,3	-6,2	-5,7	-6,1
Análogo 3	-6,5	-6,3	-6,1	-6,5
Análogo 4	-6,5	-6,1	-6,0	-6,0
Análogo 5	-6,2	-5,9	-5,8	-5,6
Análogo 6	-6,5	-6,3	-5,8	-6,1
Análogo 7	-6,6	-6,3	-5,7	-6,1
Análogo 8	-6,2	-6,3	-5,8	-5,8
Análogo 9	-6,0	-5,7	-5,8	-6,2
Análogo 10	-6,5	-6,2	-5,9	-6
Análogo 11	-7,2	-7,0	-6,0	-6,7
Análogo 12	-6,4	-6,5	-6,2	-5,8
Análogo 13	-7,2	-6,8	-6,1	-6,3
Análogo 14	-6,4	-6,6	-5,8	-6,1
Análogo 15	-6,9	-6,9	-6,1	-6,5
Análogo 16	-6,8	-6,8	-6,2	-6,1
Análogo 17	-6,2	-6,4	-5,8	-6,0
Análogo 18	-6,4	-6,5	-5,8	-6,2

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017.

## 6. DISCUSSÃO

---

A proposta deste trabalho foi sintetizar análogos do metil chavicol baseado no conceito de isosterismo clássico e tendo como estratégia o Bioisosterismo que conduz ao planejamento, desenho e modificações moleculares de fármacos e protótipos. Bioisostéros, por definição, são substâncias ou subunidades estruturais de constituintes bioativos que apresentam volumes moleculares, formas, distribuições eletrônicas e propriedades físico-químicas semelhantes, capazes de apresentar bioatividades similares, o qual resultou da aplicação do princípio do Isosterismo (BARREIRO; FRAGA, 2008). Em 1919, Langmir estudava o comportamento químico e a reatividade de determinadas substâncias que possuíam átomos isoeletrônicos. Esses aspectos foram considerados como estratégia de modificação molecular para a descoberta de novos agentes bioativos, pois permite antecipadamente uma comparação da afinidade entre duas substâncias bioisostéricas por um mesmo sítio receptor, ou seja, uma bioatividade similar (BARREIRO; FRAGA, 2008; LIMA; BARREIRO, 2005).

A síntese do análogo **2** foi possível devido a pré-existência da olefina na porção propanóide do metil chavicol. Os epóxidos são versáteis por poderem conferir quiralidade às moléculas. Além disso, devido à tensão do anel de membros e a polaridade (comparado ao material de partida), são suscetíveis a reações com um grande número de nucleófilos, eletrófilos, ácidos, bases, com agentes redutores e alguns agentes oxidantes.

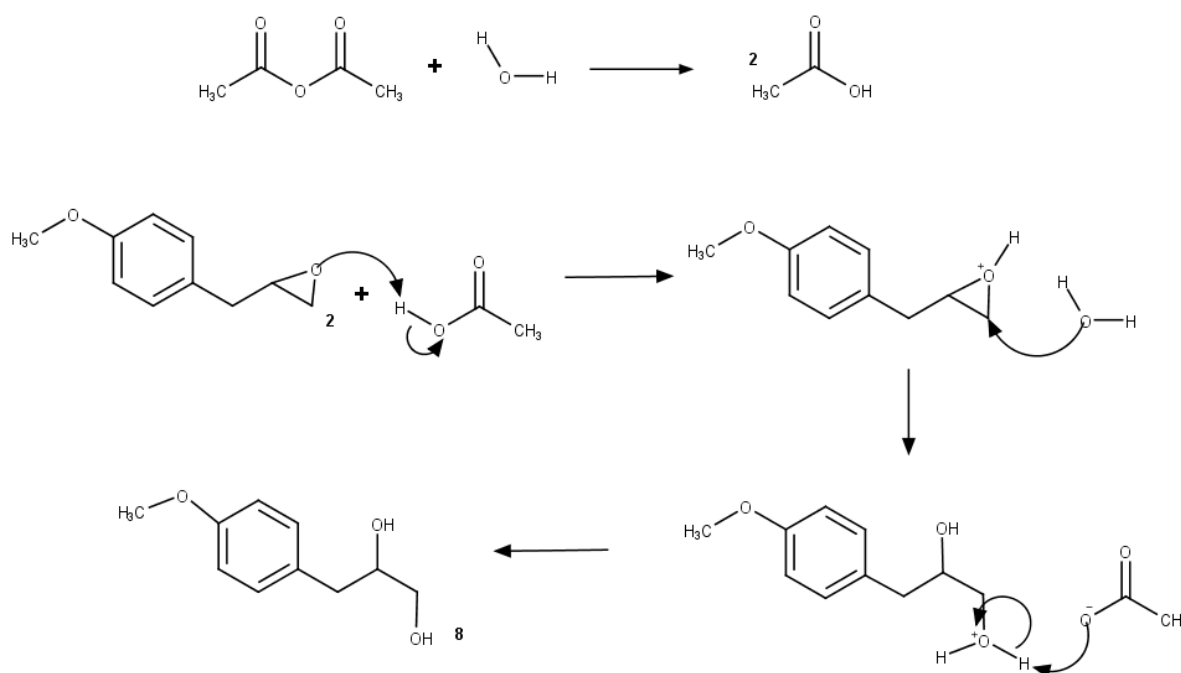
Para obtenção de **2**, utilizou-se a princípio o peróxido de hidrogênio em meio básico como reagente epoxidante. Entretanto, devido a sua baixa eletrofilicidade necessita ser ativado, por meio de conjugação do grupo hidroperóxido com ligações múltiplas ou pela ação de um catalisador metálico, para reagir com olefina (VON HOLLEBEN; SCHUCH, 1996). Além disso, este sistema, peróxido de hidrogênio e hidróxido de sódio, é mais eficiente como reagente epoxidante em olefinas portadoras de grupo hidroxila (álcoois alílicos, *homo*-alílicos ou *bis-homo*-alílicos) (HENBEST, 1967).

Alternativamente, o análogo **2** foi obtido por meio da reação de Prislashajew utilizando o ácido *meta*-cloroperbenzóico como reagente epoxidante. A epoxidação da olefina a partir do material de partida **1** com perácidos, ocorre por um possível mecanismo biomolecular eletrofílico, onde o perácido estaria em uma estrutura cíclica, estabilizada por uma ponte de hidrogênio intramolecular, formando um quelato. A principal evidência para este mecanismo é o aumento da velocidade de reação pela presença de substituintes retiradores de elétrons no perácido que aumenta a eletrofilicidade da ligação O-O (grupo

ativador do peróxido) e/ou pela presença de grupos doadores de elétrons elevando a nucleofilicidade da ligação C-C (SWERN, 1949). O mecanismo eletrofílico é reforçado pela basicidade do solvente, pois é capaz de desfazer a ponte de hidrogênio intramolecular, o que diminui a velocidade da reação. Portanto, a epoxidação de olefinas com perácidos é geralmente realizada em solvente apróticos de baixa polaridade, como diclorometano (VON HOLLEBEM, SCHUCH, 1996).

Planejou-se ainda a abertura do epóxido **2** por meio da esterificação a fim de sintetizar o éster **11**. Para obter o análogo **11**, o uso de condições mais brandas e solvente anidro se fizeram necessários. Tal procedimento resultou na formação do diol **8**, devido a abertura do epóxido **2** por catálise ácida seguida do ataque nucleofílico (água). O ácido acético com epóxido protonando o oxigênio. O epóxido protonado reage com água (nucleófilo fraco) formando glicol (**8**) (Esquema 10).

Esquema 10 - Mecanismo da reação de formação de diol (**8**)



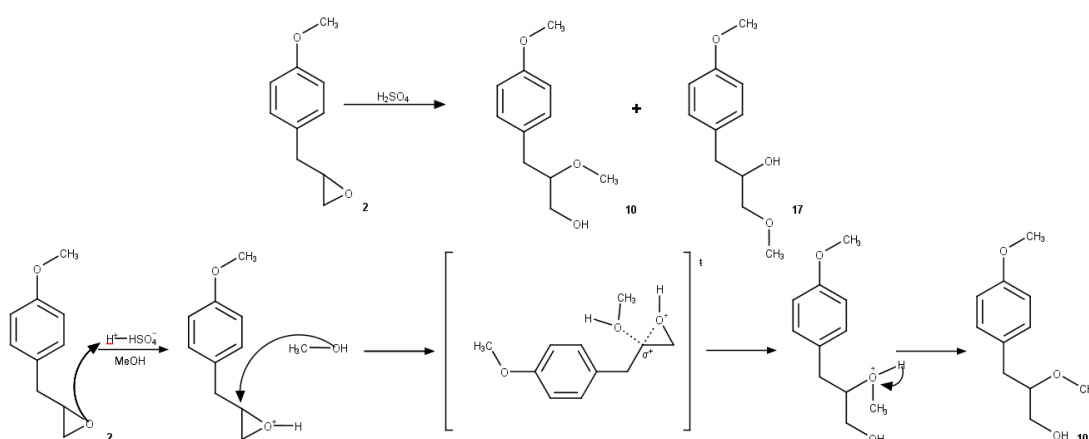
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017.

A literatura reporta metodologias para a obtenção de diol por meio da oxidação de alcenos com uso de agentes oxidantes como tetróxido de ósmio e permanganato de potássio. O presente estudo lançou mão da metodologia realizada por Wiberg e Saegbarth (1957) a fim de obter o diol **8** a partir da oxidação da olefina do metil chavicol.

Como primeira escolha, utilizou-se o permanganato de potássio em água (WIBERG; SAEGBARTH, 1957), mas devido ao  $\text{KMnO}_4$  ser um poderoso agente oxidante, nesta reação houve um processo oxidativo extremo da porção propanoide, formando o *para*-metoxibenzaldeído.

A abertura do grupo epóxido confere uma regioseletividade dependente das condições experimentais empregadas. Assim, o análogo **2** foi tratado com metanol em meio ácido, a fim de se obter o produto de oxidação dos carbonos terminais da porção fenilpropanoide (**10**). Em meio ácido a reação procede via substituição nucleofílica bimolecular ( $\text{S}_\text{N}2$ ), levando ao ataque ao carbono mais substituído resultando no produto termodinâmico, análogo **10**. Entretanto, a reação que iniciou a temperatura ambiente possivelmente favoreceu a formação do produto cinético, análogo **17**, normalmente obtido por  $\text{S}_\text{N}2$  em meio básico. Nesse caso, o ataque procede no carbono menos substituído (KADESH, 1946) o que explica a obtenção do composto **17** (Esquema 11).

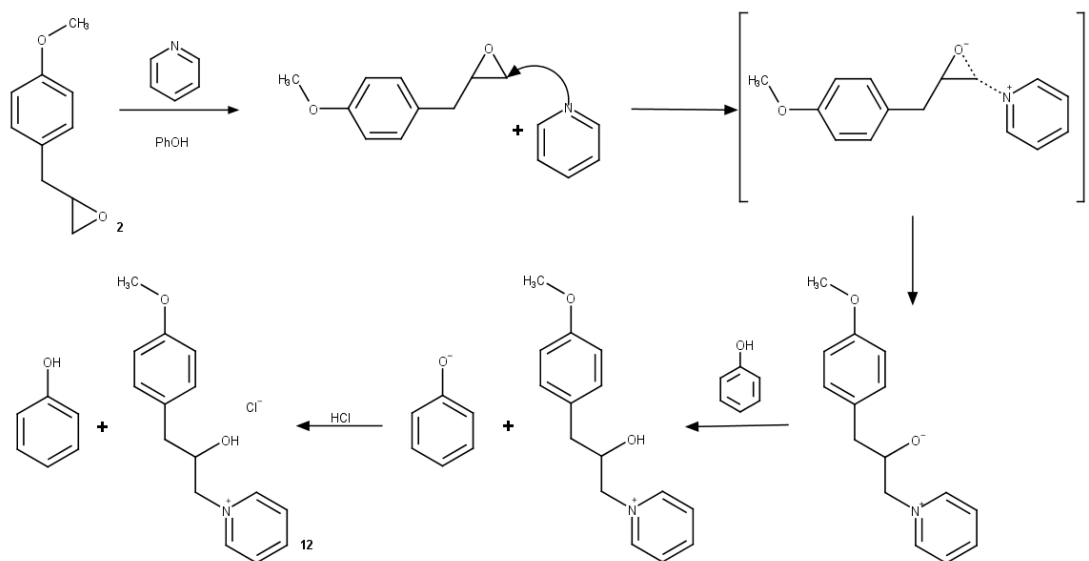
Esquema 11 - Mecanismo da reação de abertura de (**2**) com metanol



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017.

Outra metodologia utilizada para abertura do epóxido foi a reação de **2** para obtenção de **12**, baseando-se na formação de aminoálcool em piridina usando fenol como catalisador. O mecanismo envolve o ataque da amina no átomo de carbono menos substituído do epóxido. O fenol tem como função transferir um próton para o oxi-ânion no estado de transição, o que implica na formação do aminoálcool (Esquema 12).

Esquema 12 - Mecanismo de reação de abertura de (**2**) via aminólise

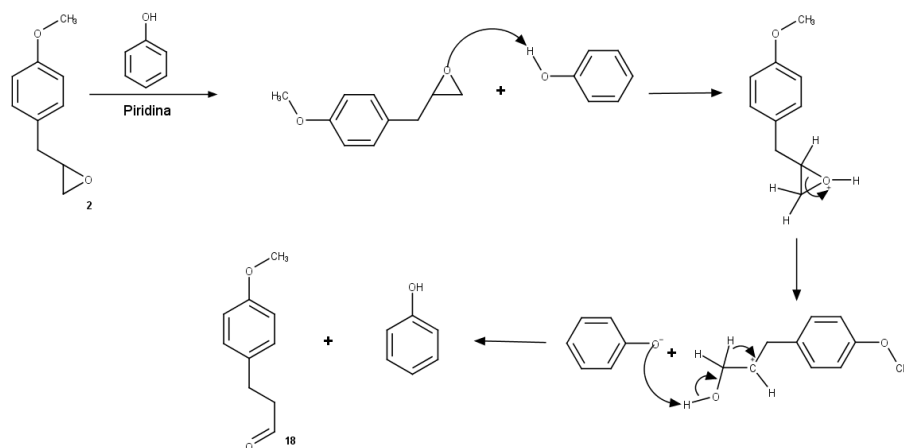


Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017.

Os oxiranos podem ser isomerizados em compostos carbonílicos na presença de ácido de Lewis (Esquema 9) (MARUOKA et al., 1994). Um possível mecanismo ocorrido neste experimento seria o fenol, em meio básico, atuando como um ácido de Lewis e protonando o oxigênio do epóxido, formando o carbonílico, originando o aldeído **18**, 3-(4-metoxifenil)propanal. Os carbocátions intermediários estão envolvidos na estrutura e estereoquímica do produto. A literatura reporta que estas reações são limpas e de elevado rendimento, entre 73-86% (CAREY, 2007).

Assim como o tetracloreto de estanho e pentafluoreto de antimônio, o trifluoreto de boro é frequentemente utilizado como reagente seletivo para rearranjo em aldeídos (CAREY, 2007), semelhantemente ao observado na formação do composto **18** (Esquema 13).

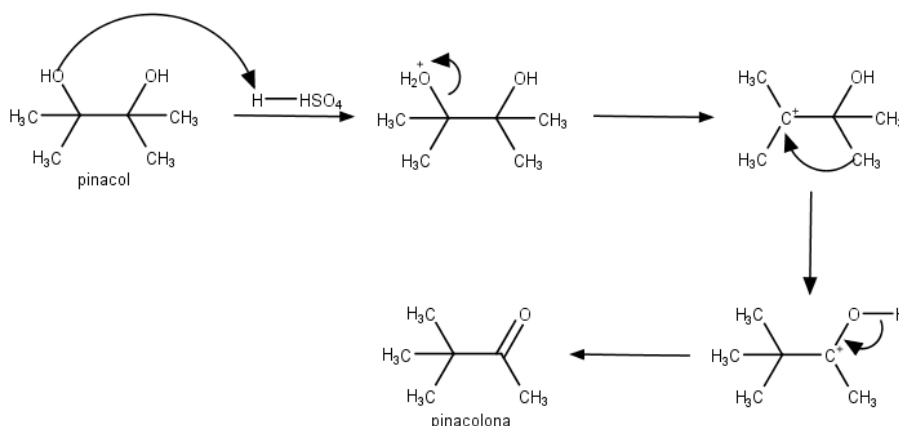
Esquema 13 - Mecanismo de formação do aldeído (**18**) a partir do rearranjo do epóxido (**2**).



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017.

É importante salientar que diol vicinal em meio ácido também sofre este tipo de rearranjo, como por exemplo, pinacol em ácido sulfúrico sob aquecimento que forma a cetona, a pinacolona (HILL; FLOSDORF, 1941) (Esquema 14).

Esquema 14 - Rerrrananjo do pinacol



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017.

A obtenção de derivados do metil-chavicol por modificação funcional mostrou grande potencial para obtenção de muitos análogos que podem gerar moléculas de interesse farmacológico.

Considerando a atividade antioxidante, o metil chavicol e análogo **2** apresetaram potencial antioxidante, em ensaios que diferem em relação ao mecanismo avalidado. No ensaio de sequestro do radical livre DPPH, o metil chavicol produziu  $CE_{50}$  ( $312 \pm 2,28$  mg/mL) muito elevada quando comparada a BHT (0,01 mg/mL). No entanto, o óleo essencial de *Croton zenhtneri*, que contém esta substância, bem como de outras espécies do gênero, apresentam esta atividade mais expressiva (MORAIS et al., 2006). Possivelmente, essa

diferença é devido ao fato de outros constituintes nos óleos essenciais que têm a capacidade de aumentar a atividade antioxidante ao agir sinergisticamente com outras substâncias (DORMAN et al., 1995). O análogo **2** foi capaz de produzir uma  $CE_{50}$  de  $8,29 \pm 0,80$  mg/mL. Embora a escala da concentração ainda esteja em mg/mL, quando comparado ao metil chavicol, ocorreu um aumento significativo da atividade. A Figura 9 mostra a atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical DPPH, frente à concentração de 50 mg/mL para ambas amostras. Foi observado que o análogo **2** produz uma atividade em torno de 80%, enquanto o metil chavicol foi capaz de produzir 18%. A diferença na atividade antioxidante está relacionada a polaridade conferida ao análogo **2** pela presença do epóxido na molécula, quando comparado com metil chavicol. As substâncias responsáveis pela atividade antioxidante conferida a alguns óleos essenciais são principalmente aqueles que possuem grupos hidroxila ligados ao anel aromáticos, insaturações e elétrons disponíveis para serem doados (CARVALHO, 2004).

Os ensaios da peroxidação lipídica com o sistema de cooxidação  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico e pelo ácido tiobarbitúrico são testes *in vitro* que reproduzem situações fisiológicas de estresse oxidativo que em casos extremos podem levar a morte celular (ALVES et al., 2010; LIMA, ABDALLA, 2001). Os dados obtidos revelaram que o gráfico de decaimento da absorbância da emulsão do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico em função do tempo (Figura 10) mostra que o metil chavicol e o análogo **2** retardaram e reduziram a lipoperoxidação e, conseqüentemente, a oxidação do  $\beta$ -caroteno. Desse modo, esses achados evidenciam que o metil chavicol é uma potente molécula antioxidante contra a peroxidação lipídica, pois inibiu 73,08% do processo oxidativo, enquanto o BHT (controle positivo) apresentou 59,66% e o análogo **2** foi capaz de inibir 36,16% da peroxidação. Os resultados do ensaio pelo método do ácido tiobarbitúrico corroboram este ensaio, uma vez que o metil chavicol (7,5 mg/mL) foi mais ativo em inibir a formação do malonaldeído no homogenato no quinto dia do experimento. A lipoperoxidação é um processo que envolveas etapas de iniciação, propagação e terminação de modo que os antioxidantes podem atuar cessando o início do processo por neutralização de espécies reativas de oxigênio do meio e/ou inibindo a propagação da lipoperoxidação através da neutralização dos radicais peroxila formados pela oxidação dos lipídios (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006; LIMA, ABDALLA, 2001).

A avaliação do metil chavicol sobre a enzima lipase pancreática, usando o orlistate, como substância de referência, é baseada na cinética da reação de hidrólise lipolítica do substrato sintético palmitato de *p*-nitrofenol em ácido palmítico e *p*-nitrofenol. A liberação dessas substâncias resulta um cromógeno de coloração amarela que é intensificada com pH



elevado (pH ótimo igual a 8) (BUENO, 2012). Além disso, a adição de um surfactante, como Triton X-100, aumenta a lipofilicidade do meio reacional, estabilizando a reação, assim como aumentando a permeabilidade. Adição de sais de cloreto de sódio e  $\text{CaCl}_2$  diminui a camada de solvatação da enzima, o que implica em uma melhor dissolução, aumenta a força iônica do meio e possibilita a formação do complexo ligante-proteína (SOUZA et al., 2011). O metil chavicol inibiu a lipase pancreática *in vitro* em 58,12% (Tabela 6) e interagiu com dois resíduos revelante para ação lipolítica no estudo de docking (Figura 16D). As interações moleculares relevantes do ligante e a lipase pancreática são com os resíduos Ser153, Asp177 e His264, os quais formam a tríade catalítica. No entanto, o resíduo Ser153 é o mais importante para realizar a atividade da lipólise, embora o metil chavicol possa interagir com ambos resíduos por meio de ligação de hidrogênio. Já o ligante cristalográfico (PLC) fez interação com Ser153 por meio de força de Van der Waals e ligação de hidrogênio com His264. Dessa forma, o metil chavicol obteve um menor valor de energia de afinidade do que o ligante PLC, demonstrando ser mais ativo (Tabela 11). Além disso, a interação de ligação de hidrogênio é tipicamente mais estável do que uma interação do tipo Van der Waals (FERREIRA, 2013; VEERAMACHANENI et al., 2015). O análogo **2** é formado pela oxidação do metil chavicol no fígado pelo CYP 450 (PUNT et al., 2009) e apresentou o valor de energia de afinidade bem próximo ao PLC. Analisando os tipos de interações, verificou-se que o oxigênio do epóxido foi capaz de manter uma ligação de hidrogênio com resíduo de Ser153, mas não houve interação com os demais resíduos importantes para ação lipolítica.

Substâncias capazes de inibir a lipase já foram isoladas de extrato de plantas e, entre elas, os constituintes fenólicos podem ser responsáveis pela ação antilipase. Segundo Gonçalves (2007), derivados fenólicos usados no tratamento e prevenção de hiperlipidemia e hipercolesterolemia têm como ação a inibição da lipase (NINOMIYA et al., 2004; SHARMA et al., 2005; AGBAFOR et al., 2007). Por ser um derivado fenilpropanoide, a estrutura do metil chavicol pode justificar a ação antilipase encontrada no presente estudo.

Os modelos de inflamação *in vivo*, como edema de orelha induzido por agentes flogísticos, são frequentemente utilizados nos estudos de atividade anti-inflamatória tópica (WILLOUGHBY, 2003; CHIBLI et al., 2014; RODRIGUES et al., 2016). Normalmente, são técnicas rápidas e simples que apresentam boa reprodutibilidade, requerem pequena quantidade de amostra e fornecem resultados apropriados. Além disso, os ensaios permitem identificar produtos com capacidade de permear na pele e atingir concentrações adequadas para exercer o efeito farmacológico (GÁBOR, 2003). A literatura reporta atividade anti-

inflamatória ao metil chavicol (OLIVEIRA et al., 2014; WIIRZLER et al., 2016), mas apesar disso, ainda não havia sido avaliada sua ação tópica por modelos de edema de orelha.

O óleo de Cróton é um agente flogístico composto por uma mistura de lipídeos, cujo componente majoritário é o 13-acetato de 12-*O*-tetradecanoiforbol (TPA). A aplicação tópica desse agente está associada à vasodilatação, infiltração de leucócitos e edema, produzindo uma resposta inflamatória com estresse oxidativo, proliferação e ativação de oncogenes nucleares. O modelo de edema de orelha induzido por óleo de Cróton é útil na triagem de substâncias que atuam na fase aguda da inflamação e processos inflamatórios hiperproliferativos (GARG et al., 2008; SARAIVA et al., 2010). O TPA exerce diferentes mecanismos de ação como ativação da proteína quinase C (PKC) com estimulação sequencial da via das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAP quinase) e ativação das fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) com indução da expressão da ciclooxigenases e translocação/ativação da lipoxigenase (LOX), que leva a síntese e liberação de diferentes mediadores pró-inflamatórios associados à formação de edema, hiperproliferação celular e migração de leucócitos para derme (MURAKAWA et al., 2006; DE BERNARDIS et al., 1994). A ativação da via da MAP quinase pela PKC induz alguns fatores de transcrição nuclear, como o NF- $\kappa$ B e a AP-1, os quais estão associados a regulação da produção de diversas proteínas pró-inflamatórias (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ), enzimas pró-inflamatórias (COX-2, iNOS, metaloprotease) e moléculas de adesão (PASCUAL; GLASS, 2006; GLASS; OGAWA, 2006; GARCIA PIÑERES et al., 2001; SANCHEZ; MORENO, 1999). A fosforilação da PLA<sub>2</sub> pela PKC resulta na liberação do ácido araquidônico (AA), o qual é substrato nas vias COX e LOX, produzindo prostaglandinas (PG) e leucotrienos (LT), respectivamente (YOUNG et al., 1984).

Os resultados no modelo de edema de orelha induzido por óleo de Cróton demonstraram que o metil chavicol foi capaz de inibir o edema após 6 e 24 horas do experimento (Tabela 7), promovendo resposta semelhante a dexametasona. Essa ação antiedematogênica está relacionada à redução da permeabilidade vascular, pois análise histopatológica (Figura 12) revelou uma redução na vasodilatação e migração leucocitária (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; CHRISTY et al., 2013; GEERING et al., 2013). A redução das enzimas MPO e NAG (Figura 13) também corroboraram estes resultados, uma vez que MPO é frequentemente associada à presença de polimorfonucleares (BRADLEY et al., 1982), enquanto a NAG é indicativa de mononucleares no sítio da inflamação, principalmente em processos inflamatórios crônicos (SANCHEZ, MORENO, 1999).

A diminuição da vasodilatação pelo metil chavicol foi também confirmada pelo ensaio do óxido nítrico (Figura 14). O óxido nítrico, gerado pela ação da enzima óxido nítrico

sintase induzida, contribui para a permeabilidade endotelial, o que resulta em infiltração celular e extravasamento de plasma e proteínas plasmáticas para os tecidos, favorecendo a formação do edema e processo inflamatório. Além disso, a exposição de leucócitos ao óxido nítrico promove o aumento da produção de interleucina -8 (IL-8) e fator necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), reforçando o gradiente quimiotático no tecido danificado (CORRIVEAU et al., 1998; MUHL et al., 2000; MA et al., 2004). Pontes et al. (2012) evidenciaram uma resposta inibitória do metil chavicol em modelo de edema de pata induzido por nitroprussiato de sódio (doador de NO), associando este fenilpropanoide a inibição da via do NO de maneira direta ou indiretamente por meio da produção de prostanoídes com redução da vasodilatação e edema. Portanto, nossos resultados estão de acordo com aqueles achados descritos na literatura (PONTES et al., 2012).

Com intuito de compreender e determinar um possível mecanismo de ação foi realizado o estudo de *docking* molecular do metil chavicol e seus análogos frente a óxido nítrico sintase induzida (iNOS). Os resultados sugerem que o metil chavicol e análogo (2) são capazes de interagir com iNOS, inibindo-a. Tanto o metil chavicol, análogo (2) e I58 formam ligação de hidrogênio com resíduo de Gly 300, o que indicase fundamental para atividade da inibição enzimática.

A atividade anti-inflamatória do metil chavicol foi também avaliada pelo modelo de inflamação cutânea aguda induzida pelo fenol que produz edema e está relacionado a mediadores associados à dermatite de contato como ocorre em seres humanos (LIM, PARK, KIM, 2004). Diferentes mecanismos estão envolvidos na inflamação causada pelo fenol, principalmente sua ação sobre os queratinócitos que liberam mediadores pró-inflamatórios, tais como IL-1  $\alpha$ , TNF- $\alpha$  e IL-8, metabólitos do AA e espécies reativas de oxigênio (ERO) (MURRAY et al., 2007; WILMER et al., 1994). O fenol pode ser oxidado por peroxidases e tirosinases para gerar radicais fenoxila que irão aumentar a produção e liberação de mediadores inflamatórios (LIM, PARK, KIM, 2004; MURRAY et al., 2007). Ao inibir o edema induzido por fenol, o metil chavicol demonstrou uma possível ação contra dermatite de contato que pode estar associado a diferentes mecanismos, corroborando os resultados do modelo de edema induzido por óleo de Cróton.

A atividade anti-inflamatória do metil chavicol foi avaliada por meio do modelo de edema de orelha induzido pela aplicação intradérmica da histamina, o qual mimetiza reações alérgicas do tipo imediata. Nestas reações, os mastócitos desencadeiam resposta a diversos alérgenos que interage com a imunoglobulina E (IgE) ligada a receptores de superfície, ocasionando desgranulação e liberação de diversos mediadores vasoativos pró-

inflamatórios e nociceptivos, tais como histamina, citocinas, protasglandinas e leucotrienos (THEOHARIS et al., 2007). A histamina causa vasodilatação e aumenta a permeabilidade vascular, promovendo uma resposta edematogênica (BRAND et al., 2002). Além dessas ações, este mediador estimula fibras nervosas sensitivas por meio de mecanismo dependente dos receptores  $H_1$  que gera prurido e é responsável por reações de hipersensibilidade do tipo I, como urticária (RANG et al., 2007; BRAND et al., 2002). A reação de hipersensibilidade imediata desenvolve-se após a desgranulação dos mastócitos com liberação de histamina. A aplicação prévia do metil chavicol promoveu uma redução do edema induzido pela histamina, indicando uma ação inibitória da via deste mediador. Rodrigues et al. (2016) realizaram estudo da atividade anti-inflamatória do metil chavicol frente ao modelo do edema de pata induzido pela administração intra-plantar de histamina. Tal estudo demonstrou que o óleo essencial de *Ocimum basilicum*, cujo constituinte majoritário é o metil chavicol, foi ativo ao reduzir o edema em 22% durante o pico de histamina (2 horas). Outro estudo evidenciou que metil chavicol e seu isômero anetol apresentaram resposta anti-inflamatória a diferentes agentes inflamatórios como a substância P, bradicinina, histamina, serotonina e TNF- $\alpha$  (PONTES et al., 2012). Considerando os achados descritos na literatura, os resultados obtidos estão em concordância e a ação anti-inflamatória do metil chavicol pode ser decorrente da inibição de diferentes vias do processo inflamatório, como mostrado nos modelos do óleo de Cróton e fenol.

Para uma melhor compreensão dos mecanismos anti-inflamatórios do metil chavicol, o efeito *in vitro* foi avaliado frente à atividade das enzimas COX-1 e COX-2. Embora Wiirzler et al. (2016) tenham relatado uma redução nos níveis de prostaglandinas em tecido oriundo do edema de pata induzido por carragenina, os resultados apresentados mostraram que a ação anti-inflamatória do metil chavicol não está relacionada com a inibição direta da ciclooxigenase (Tabela 10). É possível que esta ação seja indireta, pois estudos indicam que este fenilpropanoide inibe a translocação do fator nuclear  $\kappa B$  (NF- $\kappa B$ ) do citoplasma para o núcleo celular após estímulos inflamatórios tanto *in vitro* quanto *in vivo* (WIIRZLER et al., 2015a; 2016b; SILVA-COMAR et al., 2014). O NF- $\kappa B$  é um importante fator de transcrição associado ao processo inflamatório que promove a produção de citocinas (IL- $1\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ), melhora a diferenciação e maturação de monócitos/macrófagos, induz a fagocitose e aumenta a produção de eicosanoides devido à estimulação de produção e expressão de COX-2 em células. Portanto, é provável que o efeito anti-inflamatório do metil chavicol esteja associado à supressão da produção e expressão de COX-2 por regulação de NF- $\kappa B$ , conseqüentemente com a redução dos níveis de prostaglandinas. A diminuição na

produção de TNF- $\alpha$  e IL-6 (Figura 14) corrobora para este possível mecanismo de ação anti-inflamatório do metil chavicol por inibição do fator de transcrição NF- $\kappa$ B. Portanto, os dados sugerem que o metil chavicol interfere na ação enzimática da isoforma COX-2 após os estímulos inflamatórios (por supressão de NF- $\kappa$ B), sem interferência com a atividade COX-1.

A interação molecular no sítio de ação entre COX e ácido araquidônico é do tipo ligação de hidrogênio entre o carboxilato do ácido araquidônico e os resíduos Arg120 e Tyr355. O carbono 13 do ácido araquidônico está próximo ao oxigênio fenólico da Tyr385 orientado justamente para abstração do H. O final  $\omega$  fica entre Ser 530 e Gly533. Os resíduos Phe381, Leu384, Trp387, Phe518 e Met522 constituem uma fenda que pode acomodar as transições conformacionais do C8 até o C12 durante a adição e formação do endoperóxido (MALKOWSKI et al., 2000). Na grande maioria, os AINES interagem principalmente Arg120, como foi representado pelo ibuprofeno neste trabalho. O estudo de *docking* entre metil chavicol e seus análogos a COX-1 e COX-2 ovina e humana respectivamente, corrobora o resultado obtido *in vitro*. Isso se deve a formação de complexo ligante-receptor instável, principalmente pela ausência de interação ligação de hidrogênio com Arg120.

Por outro lado, duas alterações sistêmicas estão envolvidas na obesidade e síndrome metabólica: o aumento do dano oxidativo dos constituintes celulares (proteínas, lipídios e DNA) e a instalação do processo inflamatório pela elevação dos níveis de TNF, IL-1 $\beta$  e outras citocinas (SUTHERLAND et al., 2004; PENNATHUR; HEINECKE, 2007; GRATAGLIANO et al., 2008). O estresse oxidativo e inflamação são processos complementares, pois o primeiro induz a produção de citocinas inflamatórias e essas, por sua vez, induzem a produção de radicais livres. Portanto, estresse oxidativo, peroxidação de lipídios de membrana e inflamação são geralmente considerados fundamentais para o desencadeamento da síndrome metabólica (CHUNG et al., 2009). A peroxidação é um processo autocatalítico iniciado pelo ataque de radicais livres nas insaturações dos ácidos graxos. Espécies como o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radical hidroxila ( $OH^\cdot$ ), óxido nítrico (NO) e peroxinitrito (ONOO) são comumente envolvidos na iniciação de peroxidação lipídica. Portanto, os resultados do presente trabalho são promissores, pois indicam atividade antioxidante frente à lipoperoxidação, antilipase e antiinflamatória do metil chavicol e análogos, mostrando sua aplicabilidade para desenvolvimento de novas terapias da obesidade e síndrome metabólica.

## 7. CONCLUSÕES

---

Considerando os resultados apresentados nesta dissertação, foi possível obter as seguintes conclusões:

O metil chavicol deu origem aos análogos 2-[(4-metoxifenil)metil] oxirano (**2**), 3-(4-metoxifenil)propan-1,2-diol (**8**), 2-metoxi-3-(4 metoxifenil)propan-1-ol (**10**), 1-metoxi-3-(4 metoxifenil)propan-2-ol (**17**) e 3-(4-metoxifenil)propanal (**18**) com potenciais biológicos promissores;

O metil chavicol foi capaz de inibir a atividade da enzima lipase pancreática e este efeito pode ser relacionado à redução de lipídios no organismo;

O metil chavicol apresentou atividade anti-inflamatória tópica em modelo agudo de edema de orelha utilizando diferentes agentes flogísticos, entretanto, o mecanismo não está associado com a inibição direta da ciclooxigenase-1 e -2;

O estudo de docking molecular revelou que os análogos do metil chavicol inibiram as enzimas i-NOS e lipase.

Os resultados do presente estudo indicam que o metil chavicol e seu análogos são promissores agentes terapêuticos que podem ser utilizados em doenças associadas à inflamação, processos oxidativos e alterações metabólicas.

## REFERÊNCIAS

---

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 6.ed. Elsevier, 2008, 576 p.

ADT. Disponível em: <<http://autodock.scripps.edu/resources/adt>>. Acessado em Julho de 2016.

AGBAFOR, K. N., AKUBUGWO, E.I. Hypocholesterolaemic effect of ethanolic extract of fresh leaves of *Cymbopogon citratus* (lemongrass). **African Journal of Biotechnology**, v.6, p.596-598, 2007.

ALBERTI, F. G. M. M., ZIMMET, P. Z. for the WHO Consultation. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus, provisional report of a WHO consultation. **Diabetic Medicine**, v. 15, p. 539-553, 1998.

ALI, H.; HARIBABU, B.; RICHARDSON, R. M.; SNYDERMAN, R. Mechanisms of inflammation and leukocyte activation. **Advances in Rheumatology**, v. 81, n.1, p. 1-28, 1997.

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.

ALVIM, T. C. **Redução *in vitro* do teor de colesterol de óleo de manteiga utilizando farelos de trigo, aveia e soja**. 106p.Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e tecnologia de Alimentos, Universidade federal de Viçosa, Viçosa / Minas Gerais, 2002.

AMZEL, L. M. Structure-based drug design. **Current Opinion Biotechnology**, v. 9, p. 366-369, 1998.

ANDRADE, M.V.; IWAKI, S.; ROPERT, C.; GAZZINELLI, R.T.; CUNHA-MELO, J.R.; BEAVEN, M.A. Amplification of cytokine production through synergistic activation of NFAT and AP-1 following stimulation of mast cells with antigen and IL-33. **European Journal of Immunology**, v. 41, p. 760-772, 2011.

ANTHONY, A.; CALDWELL, J.; HUTT, A. J.; SMITH, R. L. Metabolism of estragole in rat and mouse and influence of dose size on excretion of the proximate carcinogen 1'-hydroxyestragole. **Food Chemical Toxicology**, v. 25, p. 799-806, 1987.

ARNOUS, A.H.; SANTOS, A.S.; BEINNE, R.P.C. Plantas medicinais de uso caseiro - conhecimento popular e interesse por cultivo comunitário. **Revista espaço para a saúde**, v. 6, n. 2, p. 1-6, 2005.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M.; **Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos**, 2ed Artmed, p. 271-341, 2008.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BELCH, J. J. F.; HILL, A. Evening primrose oil and borage oil in rheumatologic conditions. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, p. 352, 2000.

BHARATH, E. N.; MANJULA, S. N.; VIJAYCHAND, A. *In silico* drug design-tool for overcoming the innovation deficit in the drug discovery process. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 2, p. 8-12, 2011.

BOUYSSI, D.; GERUSZ, V.; BALME, G.; A Novel Palladium Catalyst for Cross-Coupling of Allyl Acetates with Arylboronic Acids. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2002, n. 15, p. 2445-2448, 2002.

BRADLEY, P. P.; PRIEBAT, D. A.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammations: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 78, p. 206-209, 1982.

BRAND, C.; TOWNLEY, S.L.; FINLAY-JONES, J.J.; HART, P.H. Tea tree oil reduces histamine-induced oedema in murine ears. **Inflammation Research**, v.51, p. 283-289, 2002.

BRANDÃO, A. P.; BRANDÃO, A. A.; NOGUEIRA, A. R.; SUPPLY, H.; GUIMARÃES, J. I.; OLIVEIRA, J. E. P. I Diretriz brasileira de diagnóstico e tratamento da síndrome metabólica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 84, n. 1, p. 1-28, 2005.

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

BUCHOLZ B.; FU, C.; SEYERLE, A. Disponível em: <[www.umich.edu/~chemh215/CHEM216/HonorsCup/HC270-III.pdf](http://www.umich.edu/~chemh215/CHEM216/HonorsCup/HC270-III.pdf)>. Acessado em Março de 2015.

BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v. 52, n. X, p. 302-310, 1978.

BUENO, P. R. **Isolamento, seleção e cultivo de bactérias produtoras de lipases para tratamento de efluentes da indústria de alimentos**. 2012. 100f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação, Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia / Goiás, 2012.

BURBACH, G. J; ANSEL, J. C.; ARMSTRONG, C. A. Cytokines in the skin. In: *The Biology of the Skin*. **Parthenon Publishing Group**, v.1, p. 299-3319, 2000.

CAIN, R.; NARRAMORE, S.; McPHILLIE, M.; SIMMONS, K.; FISHWICK, C.W.G. Applications of structure-based design to antibacterial drug discovery. **Bioorganic Chemistry**, v. 55, p. 69-76, 2014.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 131-134, 2005.



CALS-GRIERSON, M. M.; ORMEROD, A. D. Nitric oxide function in the skin. **Nitric Oxide**, v. 10, p. 179-193, 2004.

CAREY, F. A.; SUNDBERG, R. J. **Advanced Organic Chemistry, Part B: Reactions and Synthesis**. University of Virginia, Charlottesville, Virginia. 5ªed. Springer, 2007.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 15-25, 2013.

CARVALHO, J.C.T. **Fitoterápicos antiinflamatórios: Aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. Tccmedd, 480 p, 2004.

CHEMAXON, s.d. Disponível em: <<http://www.chemaxon.com/download/marvin-suite/#marvin>>. Acessado em Julho de 2016.

CHIBLI, L.A.; RODRIGUES, K.C.M.; GASPARETTO, C.M.; PINTO, N.C.C.; FABRI, R.L.; SCIO, E.; ALVES, M.S.; DEL-VECHIO-VIEIRA, G.; SOUSA, O.V. Anti-inflammatory effects of *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken ethanol extract in acute and chronic cutaneous inflammation. **Journal Ethnopharmacology**, v. 154, n. 2, p. 330-338, 2014.

CHRISTY, A. L.; WALKER, M. E.; HESSNER, M. J.; BROWN, M. A. Mast cell activation and neutrophil recruitment promotes early and robust inflammation in the meninges in EAE. **Journal of Autoimmunity**, v. 42, p. 50-61, 2013.

CHUNG H. Y.; CESARI, M.; ANTON, S.; MARZETTI, E.; GIOVANNINI, S.; SEO, A. Y.; CARTER, C.; YU B. P.; LEEUWENBURGH, C. Molecular inflammation: underpinnings of aging and age-related diseases. **Ageing Research Reviews**, v. 8, p. 18-30, 2009.

COLCLOUGH, T.; CUNNEN, J. I.; MOORE, C. G. The Aminolysis and Esterification of Unsymmetrical Epoxides. **Tetrahedron**, v. 15, p. 187-192, 1961.

CORRÊA, D.S. **Modelagem por homologia da tubulina do Plasmodium falciparum e o estudo de lignanas ariltetralônicas antimaláricas por docking molecular**. 141p. São Carlos: UFSCar, 141p. 2015. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos Biotecnologia – São Carlos, São Paulo, 2015.

CORRIVEU, C. C.; MADARA, P. J.; VAN DERVORT, A. L.; TROPEA, M. M.; WESLEY, R. A.; DANNER, R. L. Effects of nitric oxide on chemotaxis and endotoxin-induced interleukin-8 production in human neutrophils. **Journal of Infectious Diseases**, v. 177, n. 1, p. 116-126, 1998.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoides: potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 3, p. 241-256, 2009.

COX (ovine/human) Inhibitor Screening Assay Kit. Disponível em: <<https://www.caymanchem.com/app/template/Product.vm/catalog/560131>>. Acesso em dezembro de 2016.

CRUMMEY, A.; HARPER, G.P.; BOYLE, E.A.; MANGAN, F.R. Inhibition of arachidonic acid-induced ear oedema as a model for assessing topical anti-inflammatory compounds. **Agents and Actions**, v. 20, p. 69-76, 1987.

DAVIS, A.M.; TEAGUE, S.J.; KLEYWEGT, G.J. Application and limitations of X-ray crystallographic data in structure-based ligand and drug design. **Angewandte Chemie International Edition**.v. 42, p. 2718-2736, 2003.

DE BERNARDIS, L.; LEONARDI, G.; CARUSO, A.; CUTULI, V.M; ARNICO-ROXAS, M. Protective effects of papavarine salicylate in mouse ear dermatitis and PAF-induced rat paw oedema. **Agents and Actions**, v. 42, p.29-33, 1994.

DE OLIVEIRA, M.; CENZI, G.; NUNES, R.; ANDRIGHETTI, C.; DE SOUSA VALADÃO, D.; DOS REIS, C.; SIMÕES, C.; NUNES, R.; JÚNIOR, M.; TARANTO, A.; SANCHEZ, B.; VIANA, G.; DE PILLA VAROTTI, F. Antimalarial activity of 4- metoxychalcones: docking studies as falcipain/plasmeprin inhibitors, admet and lipophilic efficiency analysis to identify a putative oral lead candidate. **Molecules**, v. 18, p. 15276-15287, 2013.

DE YONG, L. M.; KHEIFETS, J. B.; BALLARON, S. J.; YOUNG, J. M. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. **Agents Actions**, v. 26, p. 335-341, 1989.

DELANO, W. L. Use of PYMOL as a communications tool for molecular science. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society**, v. 228, p. U313-U314, 2004.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products** – A biosynthetic approach. 3<sup>a</sup> ed. University of Nottingham, UK: Wiley, 2009, p. 550.

DONNARUMMA, G.; PAOLETTI, I.; BUOMMINO, E.; FUSCO, A.; BAUDOUIN, C.; MSIKA, P.; TUFANO, M. A.; BARONI, A. AV119, a Natural Sugar from *Avocado gratissima*, Modulates the LPS-Induced Proinflammatory Response in Human Keratinocytes. **Inflammation**, v. 34, p. 568-575, 2011.

DORMAN, D.H.J., DEANS, S.G., NOBLE, R.C. Evaluation in vitro of plant essential oils as natural anti-oxidants. **Journal of Essential Oil Research**. v.7, p.645–651, 1995.

DRINKWATER, N. R.; MILLER, E. C.; MILLER, J. A.; PITOT, H. C.; Hepatocarcinogenicity of estragole (1-allyl-4-methoxybenzene) and 1'-hydroxyestragole in the mouse and mutagenicity of 1'-acetoxyestragole in bacteria. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 57, p. 1323–1331, 1976.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 82, p. 47-95, 2002.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando o sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico e método de 122

sequestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.

EWING, T. J. A.; KUNTZ, I. D. Critical evaluation of search algorithms for automated molecular docking and database screening. **Journal of Computational Chemistry**, v. 18, p. 1175-1189, 1997.

EWING, T. J. A.; MAKINO, S.; SKILLMAN, A. G.; KUNTZ, I. D. DOCK 4.0: search strategies for automated molecular docking of flexible molecule databases. **Journal Computer-Aided Molecular Design**, v. 15, p. 411-428, 2001

FARBER, G. K. New approaches to rational drug design. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 84, p. 327-332, 1999.

FERREIRA, A.V.D. **Caracterização química e potencial antimalárico de *Andira nitida* Mart. ex Benth.** 153p. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, 2013.

FIRESTEIN, G. S. Mechanisms of inflammation and tissue repair. GOLDMAN, L.; ANSIELLO, D. **Textbook of Medicine**, 22 ed., p. 227, 2004.

FITSIOU, E.; MITROPOULOU, G.; SPYRIDOPOULOU, K.; TIPTIRI-KOURPETI, A.; VAMVAKIAS, M.; BARDOUKI, H.; PANAYIOTIDIS, M. I.; GALANIS, A.; KOURKOUTAS, Y.; CHLICHLIA, K.; PAPPA, A.; Phytochemical Profile and Evaluation of the Biological Activities of Essential Oils Derived from the Greek Aromatic Plant Species *Ocimum basilicum*, *Mentha spicata*, *Pimpinella anisum* and *Fortunella margarita*. **Molecules**, v.21, n. 8, p.1-15, 2016.

FORTES, R. C., GUIMARÃES, N. G., HAACK, A., TORRES, A. A. L., CARVALHO, K. M. B. Orlistat e sibutramina: bons coadjuvantes para perda e manutenção de peso? **Revista Brasileira Nutrição Clínica**, v. 21, n.3, p. 244-51, 2006.

GÁBOR, M. Models of acute inflammation in the ear. In: WINYARD, P. G.; WILLOUGHBY, D. A. **Inflammation protocols**, New Jersey: Humana Press, p. 129-131, 2003.

GANESH, V. K.; KRANTHI, R. K.; LEELA, C. M.; SAI, A. K.; BONDILI, J. S.; VENKATESWARA, T. R. Shape based virtual screening and molecular docking towards designing novel pancreatic lipase inhibitors. **Bioinformation**, v. 11, n. 12, p 535-542, 2015.

GARCIAPÍÑERES, A. J.; CASTRO, V.; MORAES, G.; SCHMIDT, T. J.; STRUNCK, E.; PAHL, H. L.; MERFORT, I. Cysteine 38 in p65/NF-KB plays a crucial role in DNA binding inhibition by sesquiterpene lactones. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 39713-39720, 2001.

GARG, R.; RAMCHANDANI, A. G.; MARU, G. B. Curcumin decreases 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate induced protein kinase C translocation to modulate downstream targets in mouse skin. **Carcinogenesis**, v. 29, n. 6, p. 1249-1257, 2008.

GEERING, B.; STOECKLE, C.; CONUS, S.; SIMON, H. Living and dying for inflammation: neutrophils, eosinophils, basophils. **Cell Press**, p. 1-12, 2013.

GELDENHUYS, W. J.; GAASCH, K. E.; WATSON, M.; ALLEN, D. D.; VAN DER SCHYF, C. J. Optimizing the use of open-source software applications in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 11, n. 3-4, p. 127-32, 2006.

GLASS, C. K.; OGAWA, S. Combinatorial roles of nuclear receptors in inflammation and immunity. **Nature Reviews in Immunology**, v. 6, p. 44-55, 2006.

GOMES, P.; GOSMINI, C.; PÉRICHON, J.; New chemical cross-coupling between aryl halides and allylic acetates using cobalt catalyst. **Organic Letters**. v.7, n.5, p. 1043-1045, 2003.

GONÇALVES, R. M. F. **Estudo da inibição de tripsina por compostos fenólicos isolados de fontes naturais**: efeito antinutricional de bebidas comuns.128f. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Química, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto - Escola de Engenharia da Universidade do Minho, Portugal, 2007.

GOODSELL, D. S.; MORRIS, G. M.; OLSON, A. J. Automated docking of flexible ligands: Applications of AutoDock. **Journal of Molecular Recognition**, v. 9, n. 1, p. 1-5, 1996.

GRATTAGLIANO I, PALMIERI VO, PORTINCASA P, MOSCHETTA A, PALASCIANO G. Oxidative stress-induced risk factors associated with the metabolic syndrome: a unifying hypothesis. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 19, p.491-504, 2008.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15n]nitrate in biological fluids. **Analysis Biochemistry**, v.126, n. 1, p. 131-138, 1982.

GRINTER, S.Z.; ZOU, X. Challenges, application, and recent advances of protein-ligand docking in structure-based drug design. **Molecules**, v. 19, p. 10150-10176, 2014.

GUENTHNER, T. M., AND LUO, G. Investigation of the role of the 2',3'-epoxidation pathway in the bioactivation and genotoxicity of dietary allylbenzene analogs. **Toxicology**, v. 160, p. 47-58, 2001.

GÜNTHER, J.; BERGNER, A.; HENDLICH, M.; KLEBE, G. Utilising structural knowledge in drug design strategies: applications using relibase. **Journal of Molecular Biology**, v. 326, p. 621-636, 2003.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **O Tratado de Fisiologia Médica**. 11. ed. Elsevier, 2006.

HALLIN, AN, E. A.; KRAMER, S. W.; HOUDEK, S. C.; MOORE, W. M.; JEROME, G. M.; SPANGLER, D. P.; STEVENS, A. M.; SHIEH, H. S.; MANNING, P. T., PITZELE, B. S. 4-Fluorinated L-lysine análogos as selective i-NOS inhibitors: methodology for introducing fluorine into the lysine side chain. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 1, p. 3527-3534, 2003.

HENBEST, H. B.; JACKSON, W. R. Aspects of stereochemistry. Part XIX. Directive effects of remote substituents on the alkaline epoxidation of 3-oxo- $\Delta^4$ -steroids. **Journal of the Chemical Society C**, v. 0, p. 2459-2465, 1967.

HESS, B.; KUTZNER, C.; VAN DER SPOEL, D.; LINDAHL, E. GROMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 4, n. 3, p. 435-447, 2008.

HILÁRIO, M. O. E., TERRERI, M. T., LEN, C. A. Anti-inflamatórios não-hormonais: inibidores da ciclooxigenase 2. **Jornal de Pediatria**, v. 82, 2006.

HILL, G. A.; FLOSDORF, E. W. Pinacolone. **Organic Syntheses**. v. 5, n. 91, p. 462-465, 1941.

HUNG, C. L.; CHEN, C. C.; Computational approaches for drug discovery. **Drug Development Research**, v. 75, p. 412-418, 2014.

HUNG, C.L.; CHEN, C.C. Computational approaches for drug discovery. **Drug Development Research**, v.75, p. 412-418, 2014.

INOUE, A.; KITAAWA, K.; SHINOKUBO, H.; OSHIIMA, K.; Selective Halogen-Magnesium Exchange Reaction via Organomagnesium ate Complex. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 12, n.66, p.4333-4339, 2001.

JEURISSEN, S. M.; PUNT, A.; BOERSMA, M. G.; BOGAARDS, J. J. P.; FIAMEGOS, Y. C.; SCHILTER, B.; VAN BLADEREN, P. J.; CNUBBEN, N. H. P.; RIETJENS, I. M. C. M. Human cytochrome P450 enzyme specificity for the bioactivation of estragole and related alkenylbenzenes. **Chemical Research Toxicology**, v. 20, p. 798-806, 2007.

JORGENSEN, W. L. Pulled from a protein's embrace. **Nature**, v. 466, p. 42-43, 2010.

JOSEPH-McCARTHY, D. Computational approaches to structure-based ligand design. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 84, n.2, p. 179-191, 1999.

KADESCH, R. G.; Ring Opening of 3,4-epoxide-1-butene with Methanol. Direction and Mechanism of Ring Opening. **Journal of the American Chemical Society**, v. 68, n. 1, p. 41-45, 1946.

KOLEVA, I. I.; VAN BEEK, T. A.; LINSSEN, J. P. H.; DE GROOT, A.; EVSTATIEVA, L. N. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. **Phytochemical analysis**, v. 13, p. 8-17, 2002.

KONDO, Y.; TAKAZAWA, N.; YAMAZAKI, C.; SAKAMOTO, T.; Halogen-zinc exchange reaction of haloaromatics with Lithium Trimethylzincate. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 17, n.59, p.4333-4339, 2001.

KONTOYIANNI, M.; McCLELLAN, L. M.; SOKOL, G. S. Evaluation of docking performance: comparative data on docking algorithms. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, p. 558-565, 2004.

KUNTZ, I. D.; BLANEY J. M.; OATLAY S. J.; LANDRIDGE R.; FERRIN T. E. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. **Journal of Molecular Biology**, v. 161, p. 269, 1982.

KUPPER, T. S. Immune and inflammatory processes in cutaneous tissues – mechanisms and speculations. **Journal of Clinical Investigation**, v. 86, p. 1783-1789, 1990.

LARSEN, G. L.; HENSON, P. M. Mediators of inflammation. **Annual Review of Immunology**, v. 1, p. 335-359, 1983.

LAWRENCE, T.; GILROY, D. W. Chronic inflammation: a failure of resolution? **International Journal of Experimental Pathology**, v. 88, p. 85-94, 2007.

LEE, J. L.; MUKHTAR, H.; BICKERS, D. R.; KOPELOVICH, L.; ATHAR, M. Cyclooxygenase in the skin: pharmacological and toxicological implications. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 192, p. 294-306, 2003.

LI, L.; ISHDORJ, G.; GIBSON, S. B. Reactive oxygen species regulation of autophagy in cancer: Implications for cancer treatment. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 53, p. 1399-1410, 2012.

LIM, H.; PARK, H.; KIM, H.P. Inhibition of contact dermatitis in animal models and suppression of proinflammatory gene expression by topically applied flavonoid, wogonin. **Archives of Pharmacal Research**, v. 27, p. 442-448, 2004.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.

LIMA, L. M.; BARREIRO, E. J.; Bioisosterism: na useful strategy for molecular modificaticon and drug desing. **Current Medicinal Chemistry**. v. 12, p. 23-49, 2005.

LITTKE, A.; FU, G. C.; The first general method for stille cross-couplings of aryl chlorides. **Angewandte Chemie International Edition**, v.38, n. 16, p. 2411-2413, 1999.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil – Nativas e Exóticas**. 2ª ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, p.544, 2008.

LOTTENBERG, A. M.P. Importância da gordura alimentar na prenvenção e no controle de distúrbios metabólicos e as cardiovascular. **Arquivos Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 53, n. 5, p. 595-607, 2009.

LUO, G.; QATO, M. K.; GUENTHNER, T. M. Hydrolysis of the 2',3'-allylic epoxides of allylbenzene, estragole, eugenol, and safrole by both microsomal and cytosolic epoxide hydrolases. **Drug Metabolism & Disposition**, v.20, p. 440–445, 1992.

LYNE, P. D. Structure-based virtual screening: an overview. **Drug discovery today**, v. 7, n. 20, p. 1047-1055, 2002.

MA, P. CUI, X.; WANG, S.; ZHANG, J.; NISHANIAN, E. V.; WANG, W.; WESLEY, R. A.; DANNER, R. L. nitric oxide post-transcriptionally up-regulates LPS-induced IL-8



expression through p38 MAPK activation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 76, n. 1, p. 278-287, 2004.

MACGLASHAN, D. Jr. Histamine: A mediator of inflammation. **The Journal of allergy and clinical Immunology**, v. 112, p. 53-59, 2003.

MAGALHÃES, L. M.; SEGUNDO, M. A.; REIS, S.; LIMA, J. F. L. C. Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties. **Analytica Chimica Acta**, v. 613, p. 1-19, 2008.

MALKOWSKI, M., G.; GINELL, S., L.; SMITH, W., L.; GARAVITO, R., M..Arachidonic acid bound to prostaglandin synthase. **Science**, v. 289, p. 1993-1937, 2000.

MANDAL, S.; MOUDGIL, M.; MANDAL, S. K. Rational drug design. **European Journal Pharmacology**, v. 625, p. 90-100, 2009.

MARUOKA, K.; MURASE, N.; BUREAU, R.; OOI, T.; YAMAMOTO, H. Lewis acid-promoted selective rearrangement of trisubstituted epoxides to aldehydes or ketones. **Tetrahedron**. v. 50, n. 12, p-3663-3672, 1994.

MATTSON M. P. Dietary factors, hormesis and health. **Ageing Research Reviews**. v. 7, n. 1, p. 43-48, 2008.

MAYO, S.L.; OLAFSON, B.D.; GODDARD, W.A. DREIDING: a generic force field for molecular simulations. **The Journal Physical Chemistry A**, v. 94, p. 8897-8909, 1990.

MCINTURFF, J. E.; MODLIN, R. L.; KIM, J. The role of Toll-like receptors in the pathogenesis and treatment of dermatological diseases. **Journal Investigative Dermatology**, v. 125, p. 1-8, 2005.

MDL Isis Draw (2016). Disponível em: <<http://mdl-isis-draw.software.informer.com/>>. Acessado em Julho de 2016.

MEDEIROS, M. F. T., SENNA-VELLE, L., ANDREATA, R. H. P., FERNANDES, L. R. R. M. V. Informações estratégicas geradas através do estudo de patentes de plantas medicinais citadas pelos visitantes da reserva Rio das pedras, Mangaratiba, Rio de Janeiro. **Revista de Biologia Neotropical**, v. 4, n. 2, p. 139-147, 2007.

MENDES, D. A. G. B.; HORINOUCI, C. D. S.; PRUDENTE, A. S.; SOLEY, B. S.; ASSREUY, J.; OTUKI, M. F.; CABRINI, D. A. *In vivo* participation of nitric oxide in hyperproliferative epidermal phenomena in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 687, p. 1-8, 2012.

MENSOR, L.L.; MENEZES, F.S.; LEITÃO, G.G.; REIS, A.S.; DOS SANTOS, T.C., COUBE, C.S.; LEITÃO, S.G. Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 2, p. 127- 130, 2001.

MILLER, E. C.; SWANSON, A. B.; PHILLIPS, D. H.; FLETCHER, T. L.; LIEM, A.; MILLER, J. A. Structure-activity studies of the carcinogenicities in the mouse and rat of some

naturally occurring and synthetic alkenylbenzene derivatives related to safrole and estragole. **Cancer Research**, v. 43, p. 1124–1134, 1983.

MISHRA, K.; OJHA, H.; CHAUDHURY, N. K.; Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical and results. **Food Chemistry**, v. 130, n.4, p. 1036-1043, 2012.

MOON, J. K.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant assays for plant and food components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 1655-1666, 2009.

MORAIS, S.M.; CATUNDA JÚNIOR, F. E. A.; SILVA, A. R. A.; NETO, J. S. M. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de *Croton* do nordeste do Brasil. **Química Nova**, v.29, p.907-10, 2006.

MORRIS, G. M.; HUEY, R.; LINDSTROM, W.; SANNER, M. F.; BELEW, R. K.; GOODSSELL, D. S.; OLSON, A. J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. **Journal of Computational Chemistry**, v. 30, n. 16, p. 2785-2791, 2009.

MOUSTAKAS, D. T.; LANG, P. T.; PEGG, S.; PETTERSEN, E.; KUNTZ, I. D.; BROOIJMANS, N.; RIZZO, R. C. Development and validation of a modular, extensible docking program: DOCK 5. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 20, p. 601-619, 2006.

MUHL, H.; CHANG, J. H.; HUWILER, A.; BOSMANN, M.; PAULUKAT, J.; NINIC, R.; NOLD, M.; HELLMUTH, M.; PFEILSCHIFTER, J. Nitric oxide augments release of chemokines from monocytic U937 cells: modulation by anti-inflammatory pathways. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 29, n. 10, p. 969-980, 2000.

MURAKAWA, M.; YAMAOKA, K.; TANAKA, Y.; FUKUDA, Y. Involvement of tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  in phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced skin edema in mice. **Biochemical Pharmacology**, v.71, p. 1331-1336, 2006.

MURI, E. M. F.; SPOSITO, M. M. M.; METSAVAHT, L. Anti-inflamatórios não-esteróides e sua farmacologia local. Artigo de revisão. **Acta Fisiátrica**, v. 16, p. 186-190, 2009.

MURRAY, A. R.; KISIN, E.; CASTRANOVA, V.; KOMMINEMI, C.; GUNTHER, M. R.; SHVEDOVA, A. A. Phenol-induced *in vivo* oxidative stress in Skin: Evidence for enhanced free radical generation, thiol oxidation, and antioxidant depletion. **Chemistry Research in Toxicology**, v. 20, p. 1769-1777, 2007.

NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Third report of the National Cholesterol Education Program expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults - Adult Treatment Panel III (NCEP-ATP III). **Circulation**, v. 106 p. 3143-21, 2002.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981–2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 1022–1037, 2003.



NINOMIYA, K., MATSUDA, H., SHIMODA, H., NISHIDA, N., KASAJIMA, N., YOSHINO, T., MORIKAWA, T. YPSHIKAWA, M. Carnosic acid, a new class of lipid absorption inhibitor from sage. **Bioorganic e Medicinal Chemistry Letters**, v.14, p.1943-1946, 2004.

NIU, K. Y.; RO, J. Y. Changes in intramuscular cytokine levels during masseter inflammation in male and female rats. **Neuroscience letters**, v. 487, p. 223-227, 2011.

OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. Fontes vegetais naturais antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.

OLIVEIRA, C. M. B.; SAKATA, R. K.; ISSY, A. M.; GEROLA, L. R.; SALOMÃO, R. Citocinas e dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 61, p. 255-265, 2011.

ORLANDO, B. J.; MALKOWSKI, M. G.; Substrate-selective Inhibition of Cyclooxygenase-2 by Fenamic Acid Derivatives Is Dependent on Peroxide Tone. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 291, p. 15069-15081, 2016.

OSAWA, C.C; FELÍCIO, P.E.; GONÇALVES, L.A.G. Teste de TBA aplicado a carnes e derivados: métodos tradicionais, modificados e alternativos. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 655-663, 2005.

OTUKI, M. F.; BERNARDI, C. A.; PRUDENTE, A. S.; LASKOSKI, K.; GOMIG, F.; HORINOUCI, C. D. S.; GUIMARÃES, C. L.; FERREIRA, J.; DELLE-MONACHE, F.; CECHINEL-FILHO, V.; CABRINI, D. A. *Garcinia gardneriana* (Planchon & Triana) Zappi. (Clusiaceae) as a topical anti-inflammatory alternative for cutaneous inflammation. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 109, p. 56-62, 2011.

PASCUAL, G.; GLASS, C. K. Nuclear receptor versus inflammation: mechanisms of transrepression. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 17, p. 321-328, 2006.

PATTNAIK, S. et al. Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. **Microbios**, v.89, n.358, p.39-46, 1997.

PAULA, J. P.; FARAGO, P. V.; RIBAS, J. L. C.; SPINARDI, G. M. S.; DÖLL, P. M.; ARTONI, R. F.; ZAWADZKI, S. F. *In vivo* evaluation of the mutagenic potential of estragole and eugenol chemotypes of *Ocimum selloi* Benth. essential oil. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, p. 846-851, 2007.

PAULA, J. P.; GOMES-CARNEIRO, M. R.; PAUM-GARTTEN, F. J. R. Chemical composition, toxicity and mosquito repellency of *Ocimum selloi* oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.88, p. 253-260, 2003.

PDB Database (2016). Disponível em: <<http://www.pdb.org>>. Acessado em Julho de 2016.

PENNATHUR S., HEINECKE J. W. Mechanisms for oxidative stress in diabetic cardiovascular disease. **Antioxidants Redox Signaling**, v. 9 p. 955–969, 2007.

PEREIRA, L. L. S., SOUZA, S. P., SILVA, M. C., CARVALHO, G. A., SANTOS C. D., CORRÊA, A. D., ABREU, C. M. P. Atividade das glicosidases na presença de chá verde e de chá preto. **Revista Brasileira Planta Medicinai**s, v. 12. n 4. p. 516-518, 2010.

PHILLIPS, D. H., MILLER, J. A., MILLER, E. C., AND ADAMS, B. Structures of the DNA adducts formed in mouse liver after administration of the proximate hepatocarcinogen 1'-hydroxyestragole. **Cancer Research**, v. 41, p. 176-186, 1981.

PHILLIPS, D. H., REDDY, M. V., AND RANDEPATH, K. <sup>32</sup>P-post-labelling analysis of DNA adducts formed in the livers of animals treated with safrole, estragole and other naturally-occurring alkenylbenzenes. II. Newborn male B6C3F1 mice. **Carcinogenesis**, v. 5, p. 1623-1628, 1984.

PICON, P. X.; ZANATTA, C. M.; GERCHMAN, F., ZELMANOVITZ, T.; GROSS, J. L.; CANANI, L.H. Análise dos critérios de definição da Síndrome Metabólica em Pacientes com Diabetes Metilo tipo 2. **Arquivos Brasileiros Endocrinologia & Metabologia**, v. 50 n. 2, p. 264-270, 2006.

PONTES, E. L.; SOUSA, P. L.; ROCHA, M. V. A. P.; SOARES, P. M. G.; COELHO-DE-SOUSA, A. N.; LEAL-CARDOSO, J. H.; ASSREUY, A. M. S. Comparative study of the anti-edematogenic effects of anethole and estragole. **Pharmacological Reports**, v. 64, p. 984-990, 2012.

POTAPOVICH, A. I.; LULLI, D.; FIDANZA, P.; KOSTYUK, V. A.; LUCA, C.; PASTORE, S.; KORKINA, L. G. Plant polyphenols differentially modulate inflammatory responses of human keratinocytes by interfering with activation of transcription factors NFB and AhR and EGFRñERK pathway. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 255, p. 138-149, 2011.

PROTTI, S.; FAGNONI, M.; ALBINI, A.; Expeditious synthesis of bioactive allyphenol constituents of the genus *Piper* through a metal-free photoallylation procedure. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 3, p. 2868-2871, 2005.

PROTTI, S.; FAGNONI, M.; MELLA, M.; ALBINI, A.; Aryl Cations from Aromatic Halodes. Photogeneration and Reactivity of 4-Hydroxy(methoxy)phenyl cation. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 69, n. 10, p. 3465-3473, 2004.

PUNT, A.; PAINI, A.; BOERSMA, M. G.; FREIDIG, A. P.; DELATOUR, T.; SCHOLZ, G.; SCHILTER, B.; VAN BLANDEREN, P. J.; RIETJENS, I. M. C. M. Use of physiologically based biokinetic (PBBK) modeling to study estragole bioactivation and detoxification in humans as compared with male rats. **Toxicological Sciences**, v. 110, n. 2, p. 255-269, 2009.

PURANEN, J. S.; VAINIO, M. J.; JOHNSON, M. S. Accurate conformation-dependent molecular electrostatic potentials for high-throughput in silico drug discovery. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, n. 8, p. 1722-1732, 2010.

RANDEPATH, K., HAGLUND, R. E., PHILLIPS, D. H., AND REDDY, M. V. <sup>32</sup>Ppost-labelling analysis of DNA adducts formed in the livers of animals treated with safrole, estragole and other naturally-occurring alkenylbenzenes. I. Adult female CD-1 mice. **Carcinogenesis** v. 5, p. 1613-1622, 1984.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. **Farmacologia**. 6. ed. Trad.: Raimundo Rodrigues Santos [et al]. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

RESTER, U. Dock around the clock – current status of small molecule docking and scoring. **QSAR& Combinatorial Science**. v. 25, n. 7, p. 605-615, 2006.

REZENDE, H. A.; COCCO, M. I. M. A utilização de fitoterapia no cotidiano de uma população rural. **Revista da Escola de Enfermagem**, v. 36, n. 3, p. 282-288, 2002.

RICHARDS, W. G. Computer-aided drug design. **Pure & Applied Chemistry**, v. 66, n. 8, p. 1589-1596, 1994.

RODRIGUES, K. C. M.; CHIBLI, L. A.; SANTOS, B. C. S.; TEMPONI, V. S.; PINTO, N. C. C.; SCIO, E.; DEL-VECHIO-VIEIRA, G.; ALVES, M. S.; SOUSA, O. V. Evidence of bioactive compounds from *Vernonia polyanthes* leaves with topical anti-inflammatory potential. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 12, p. 1-16, 2016.

RODRIGUES, L. B.; MARTINS, A. O. B. P. B., CESÁRIO, F. R. A. S.; CASTRO, F. F.; ALBURQUERQUE, T. R.; FERNANDES, M. N. M.; SILVA, B. A. F.; QUINTANS JÚNIOR, L. J.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M.; BARBOSA, R.; MENEZES, I. R. A. Anti-inflammatory and antiedematogenic activity of the *Ocimum basilicum* essential oil and its main compound estragole: *In vivo* mouse models. **Chemico-Biological Interactions**, v. 257, p. 14-25, 2016a.

SANCHEZ, T.; MORENO, J. J. Role of leukocyte influx in tissue prostaglandin H synthase-2 overexpression induced by phorbol ester and arachidonic acid in skin. **Biochemical Pharmacology**, v. 58, n. 5, p. 877-879, 1999.

SANGSTER, S. A.; CALDWELL, J.; HUTT, A. J.; ANTHONY, A.; SMITH, R. L. The metabolic disposition of [methoxy-14C]-labeled trans-anethole, estragole and p-propylanisole in human volunteers. **Xenobiotica**, v.17, p. 1223–1232, 1987.

SANT'ANNA, C. M. R.; Glossário de termos usados no Planejamento de Fármacos (recomendações de IUPAC para 1997). **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 505-512, 2002.

SARAIVA, R. A.; ARARUNA, M. K. A.; OLIVEIRA, R. C.; MENEZES, K. D. P.; LEITE, G. O.; KERNTOPF, M. F.; COSTA, J. G. M.; ROCHA, J. B. T.; TOME, A. R.; CAMPOS, A.R.; MENEZES, I. R. A. Topical anti-inflammatory effect of *Caryocar coriaceum* Wittm. (Caryocaraceae) fruit pulp fixed oil on mice ear edema induced by different irritant agents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, p. 504-510, 2010.

SAYLE, R. A.; MILNERWHITE, E. J. Rasmol - biomolecular graphics for all. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 20, n. 9, p. 374-376, 1995.

SCHIANTARELLI, P.; CADEL, S.; ACERBI, D.; PAVESI, L. Antiinflammatory activity and bioavailability of percutaneous piroxicam. **Drug Research**, v. 32, n. 3, 1982, p. 230-235, 1982.

SCHLOSSER, J.; RAREY, M. Beyond the virtual screening paradigm: structure-based searching for new lead compounds. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 49, p. 800-809, 2009.

SENLINSKY, B. S.; GUPTA, K.; SHARKEY, C. T.; LOLL, P. J. Structural analysis of NSAID binding by prostaglandin H2 synthase: time-dependent and time-independent inhibitors elicit identical enzyme conformations. **Biochemistry**, v. 40 n. 17 p. 5172-5180, 2001.

SHARMA, N. SHARMA, V. K., SEO, S. Y. Screening of some medicinal plants for anti-lipase activity. **Journal Ethnopharmacology**, v.97, p.453-456, 2005.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anesthesiology**, v. 18, p. 385-405, 2004.

SHIMIZU, I.; SAKAMOTO, T.; KAWARAGI, S.; MARUYAMA, Y.; YAMAMOTO, A.; Molybdenum- and tungsten-catalyzed allylation of aromatic compounds with allylic esters and alcohols. **Chemistry Letters**, v 2, p. 137-138, 1997.

SHIRASAKI, H.; KANAIZUMI, E.; HIMI, T. Immunohistochemical localization of the bradykinin b1 and b2 receptors in human nasal mucosa. **Mediators of Inflammation**, v. 9, p. 1-9, 2009.

SILVA, M. C.; CARVALHO, J. C. T. Inflamação. In: CARVALHO, J. C. T. **Fitoterápicos anti-inflamatórios – Aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. Ribeirão preto, SP: Tecmedd, 2004, 480p.

SILVA, M. R., SILVA, M. A. A. P. Aspectos nutricionais de fitatos e taninos. **Revista de Nutrição**, v. 12, n.1, p. 5-19, 1999.

SILVA, P. C., ZAFFARI, D. Prevalência de excesso de peso e associação com outras variáveis em indivíduos adultos atendidos em unidade básica de saúde. **Scientia Medica**, v. 19, n. 1, p. 17-26, 2009.

SILVA-ALVES, K. S.; FERREIRA-DA-SILVA, F. W.; PEIXOTO-NEVES, D.; VIANA-CARDOSO, K. V.; MOREIRA-JÚNIOR, L.; OQUENDO, M. B.; OLIVEIRA-ABREU, K., ALBURQUERQUE, A. A. C.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; LEAL-CARDOSO, J. H. Estragole blocks neuronal excitability by direct inhibition of Na<sup>+</sup> channels. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 46, p. 1056-1063, 2013.

SILVA-COMAR, F. M. S.; WIIRZLER, L. A. M.; SILVA-FILHO, S. E.; KUMMER, R.; PEDROSO, R. B.; SPIRONELLO, R. A. SILVA, E. L., BERSANI-AMADO, C. A.; CUMAN, K. N. Effect of estragole on leukocyte behavior and phagocytic activity of macrophages. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, p.1-7, 2014.

SIMÃO, A. A. **Composição química, eficácia e toxicidade de plantas medicinais utilizadas no tratamento da obesidade**. 182f. Tese (Doutorado) Universidade Federal de Lavras, Lavras / Minas Gerais, 2013.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos Voláteis. In: SIMÕES, C.M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: daplanta ao medicamento**. 5ªed. rev. ampl. Porto Alegre / Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora da UFSC, 2003, p. 466-496.

SINGH, S.; MALIK, B. K.; SHARMA, D. K. Molecular drug targets and structure based drug design: a holistic approach. **Bioinformatics**, v. 1, n. 8, p. 314-320, 2006.

SKINNER, R. Role of topical therapies in the management of cutaneous disease. **Journal of Cutaneous Medicine and Surgery**, p.22-31, 2005.

SLIWOSKI, G.; KOTHIWALE, S.; MEILER, J.; LOWE Jr, E.W. Computational methods in drug discovery. **Pharmacological Reviews**, v. 66, p. 334-395, 2014.

SOLHEIM, E.; SCHELIN, R. R. Metabolism of alkenebenzenederivatives in the rat I. p-Methoxyallylbenzene (estragole)and p-methoxypropenylbenzene (anethole). **Xenobiotica**, v. 3, p. 493-510, 1973.

SOSA, V.; MOLINÉ, T.; SOMOZA, R.; PACIUCCI, R.; HIROSHI, K.; LLEONART, M. E. Oxidative stress and câncer: An overview. **Ageing Research Reviews**, v. 12, p. 376-390, 2013.

SOUZA, S. P., PEREIRA, L. L. S., SOUZA, A. A., SANTOS, C. D. Inhibition of pancreatic lipase by extratcts of *Baccharis trimera*: avaluation of antinutrients and effect on glycosidases. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v.21, n.3, p.450-455, 2011.

SOUZA, S. P.; PEREIRA, L. L. S.; SOUZA, A. A.; SANTOS, C. D. Seleção de extratos brutos de plantas com atividade antiobesidade. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, v.14, n.4, p.643-648, 2012.

SPELLBERG, B. The cutaneous citadel: a holistic view of skin and immunity. **Life Sciences**, v. 67, p. 477-502, 2000.

STEWART, J.J. Optimization of parameters for semiempirical methods VI: More modifications to the NDDO approximations and re-optimization of parameters.**Journal of Molecular Modeling**, v. 19, n. 1, p. 1- 32, 2013.

SUTHERLAND, J. P.; MCKINLEY, B.; ECKEL, R. H. The metabolic syndrome and inflammation. **Metabolic Syndrome Related Disorders**, v.2, p. 82–104, 2004.

SWERN, D. Organic Peracids. **Chemical Rewies**. v. 45, n. 1, p. 1-68, 1949.

TARANTO, A. G. Structure-based drug design studies of UDP-Nacetylglucosamine pyrophosphosrylase, a key enzyme for the control of witches' broom disease. **Chemistry Central Journal**, v. 7, p. 48-53, 2013.

THEOHARIDES, T.C.; KEMPURAJ, D.; TAGEN, M.; CONTI, PIO; KALOGEROMITROS, D. Differential release of mast cell mediators and the pathogenesis of inflammation. **Immunological Reviews**, v.217, p. 65-78, 2007.

TROTT, O.; OLSON, A. J. Software News and Update AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455-461, 2010.

UCHI, H.; TERAOKA, H.; KOGA, T.; FURUE, M. Cytokines and chemokines in the epidermis. **Journal of Dermatological Science**, v. 24, p. 29-38, 2000.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T. D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 44-84, 2007.

VAN TILBEURGH, H.; EGLOFF, M. P.; MARTINEZ, C.; RUGANI, N.; VERGER, R.; CAMBILLA, C.; Interfacial activation of the lipase-procolipase complex by mixed micelles revealed by X-ray crystallography. **Nature**, v. 362, n. 6423, p. 814-820, 1993.

VEERAMACHANENI, G. K.; RAJ, K. K.; CHALASANI, L. M.; ANNAMRAJU, S. K.; BONDILI, J. S.; TALLURI, V. R.; Shape based virtual screening and molecular docking towards designing novel pancreatic lipase inhibitors. **Bioinformation**, v. 11, p. 535-542, 2015.

VIEGAS JÚNIOR, C.; BOLZANI, V.S.; BARREIRO, E.J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

VON HOLLEBEN, M. L. A.; SCHUCH, C. M. Ativação do peróxido de hidrogênio para a epoxidação de olefinas não funcionalizadas. **Química Nova**, v. 20, n. 1, p. 58-71, 1996.

WADDEN, T. A. New goals of obesity treatment: a healthier weight and other ideals. **Primary Psychiatry**, v.5, p. 45-54, 1998.

WENKERT, E.; FERNANDES, J. B.; MICHELOTTI, E., L.; SWINDELL, C. S.; The Synthesis of naturally occurring C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> and C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> substances by the use of low-valent nickel-mediated Grignard reactions. **Synthesis**, n.9 p.701-703, 1983.

WIBERG, K. B.; SAEGBARTH, K. A. The mechanisms of permanganate oxidation. IV. hydroxylation of olefins and related reactions. **Journal of the American Chemical Society**, v.79, n. 11, p. 2822-2824, 1957.

WIEMAN, H.; TØNDEL, K.; ANDERSSON, E.; DRABLØS, F. Homology-based modelling of targets for rational drug design. **Mini-Reviews Medicinal Chemistry**, v. 4, p. 793-804, 2004.

WIIRZLER, L. A. M.; SILVA-COMAR, F. M. S.; SILVA-FILHO, S.E.; OLIVEIRA, M. J. A.; BERSANI AMADO, C. A.; CUMAN, R. K. N. Evaluation of immunomodulatory activity of transanethole and estragole, and protective effect against cyclophosphamide-induced suppression of immunity in Swiss albino mice. **Internacional Journal Applied Research Natural Products**, v. 8, n. 1, p. 26-33, 2015.

WIIRZLER, L. A. M.; SILVA-FILHO, S. E.; AGUIAR, P.; CAVALCANTE, H. A. O.; CUMAN, R. K. N. Evaluation of anti-inflammatory activity of estragole by modulation of



eicosanoids production. **International Journal of Pharma and Chemical Research**, v. 2, n. 1, p. 7-13, 2016.

WILLIAMS, I. R.; KUPPER, T. S. Immunity at the surface: Homeostatic mechanisms of the skin immune system. **Life Sciences**, v. 58, p. 1485-1507, 1996.

WILLOUGHBY, D. A. *In vivo* models of Inflammation. In: WINYARD, P. G.; WILLOUGHBY, D. A. **Inflammation protocols**, New Jersey: Humana Press, p. 129-131, 2003.

WILMER, J. L.; BURLESON, F. G.; KAYAMA, F.; KANNO, J.; LUSTER, M. I. Cytokine induction in human epidermal keratinocytes exposed to contact irritants and its relation to chemical-induced inflammation in mouse skin. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 102, n. 6, 1994.

WISEMAN, R. W.; FENNELL, T. R.; MILLER, J. A.; MILLER, E. C. Further characterization of the DNA adducts formed by electrophilic esters of the hepatocarcinogens 1'-hydroxysafrole and 1'-hydroxyestragole in vitro and in mouse liver in vivo, including new adducts at C-8 and N-7 of guanine residues. **Cancer Research**, v. 45, p. 3096-3105, 1985.

WONG, D.W.S. **Química de los alimentos: mecanismos y teoría**. 3. ed. Zaragoza: Acríbia, 1995, 476p.

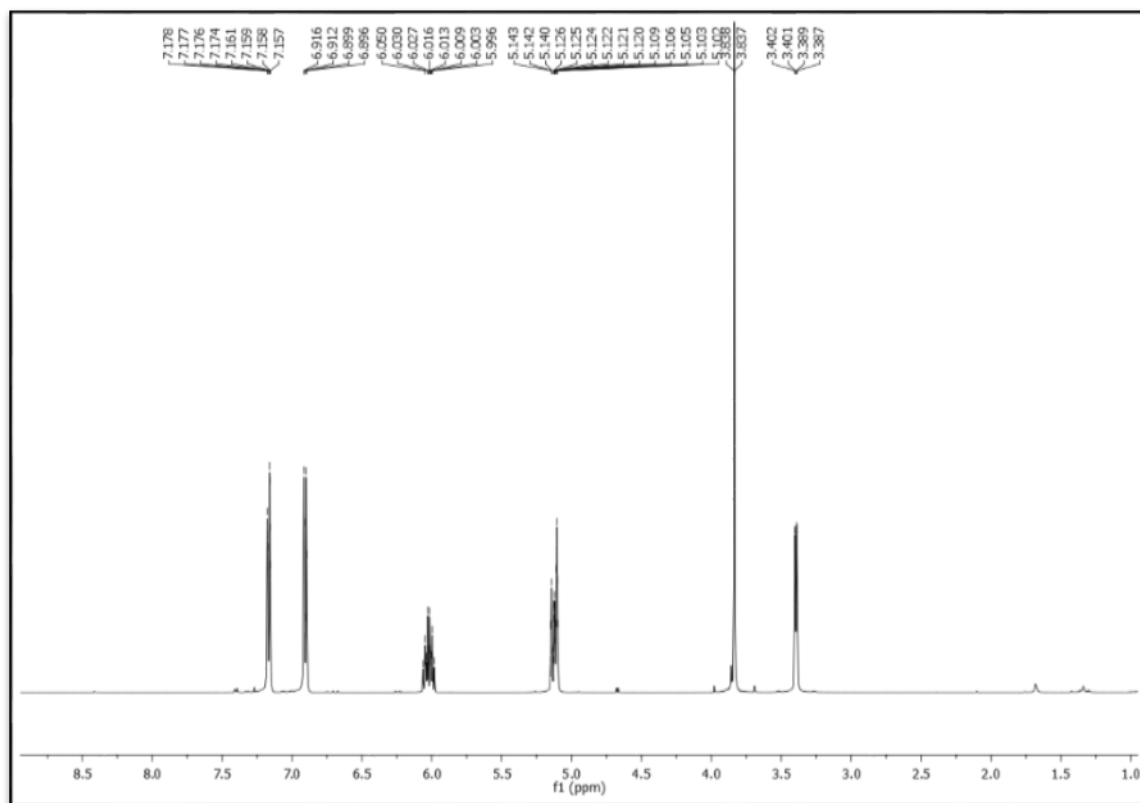
XDrawChem (2016). Disponível em: <<http://xdrawchem.sourceforge.net/>>. Acessado em Julho de 2016.

YEDGAR, S.; KRIMSKY, M.; COHEN, Y.; FLOWER, R. Treatment of inflammatory diseases by aselective eicosanoid inhibitor: a double-edged sword?. **Pharmacological Sciences**, v. 28, p. 459-464, 2007.

YOUNG, J.M.; SPIRES, D.A.; BEDORD, C.J.; WAGNER, B.; BALLRON, S.J.; DE YOUNG, L.M. The mouse ear inflammatory response to topical arachidonic acid. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 82, p. 367-371, 1984.

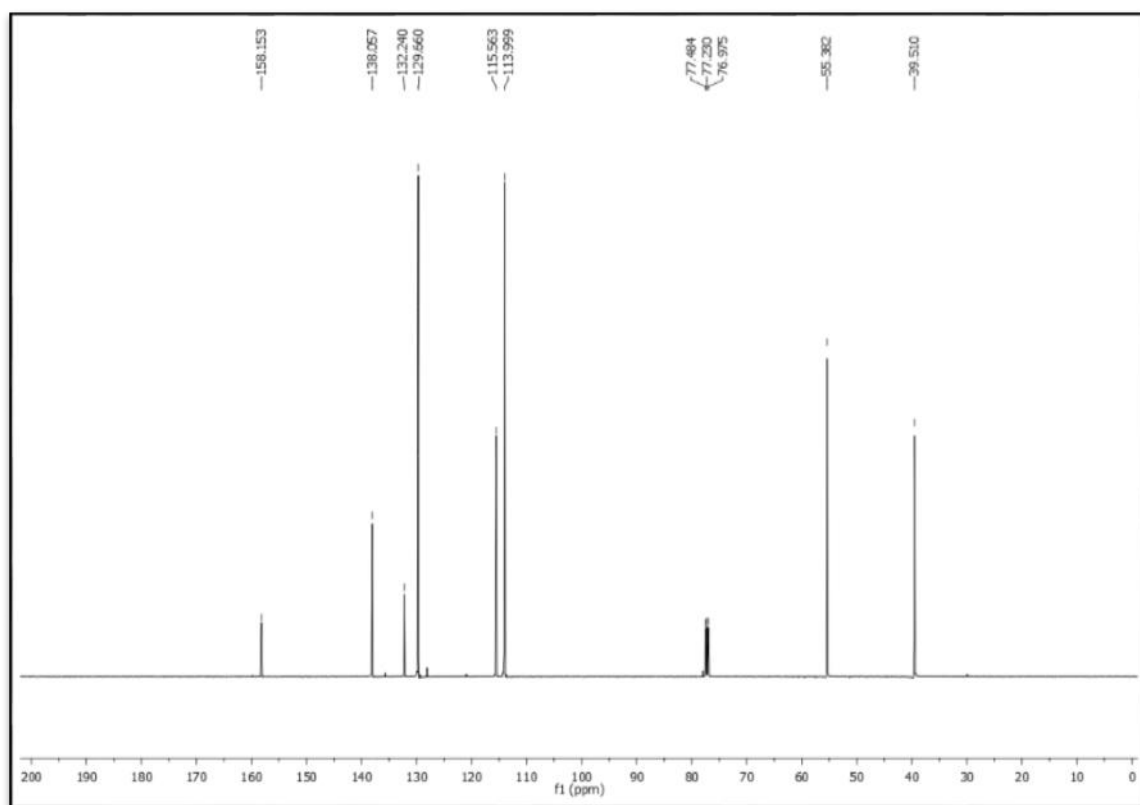
## ANEXO A – SEÇÃO DE ESPECTROS

### A.1 Espectro de RMN $^1\text{H}$ de metil chavicol (**1**)





### Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ de metil chavicol (1)



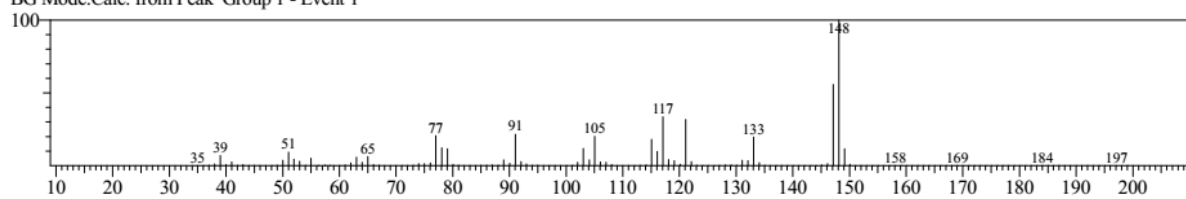
### Espectro de massas de metil chavicol (1)

<< Target >>

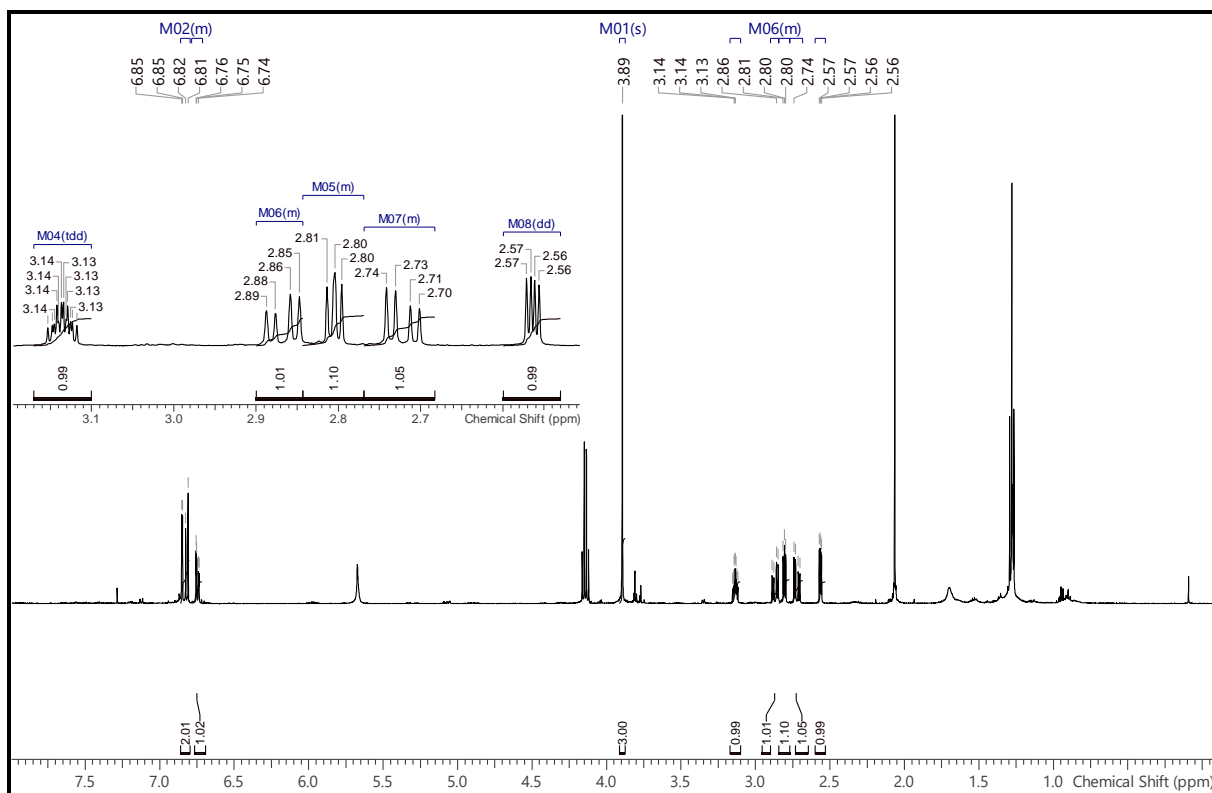
Line#:1 R.Time:9.355(Scan#:872) MassPeaks:166

RawMode:Averaged 9.350-9.360(871-873) BasePeak:148.15(7330228)

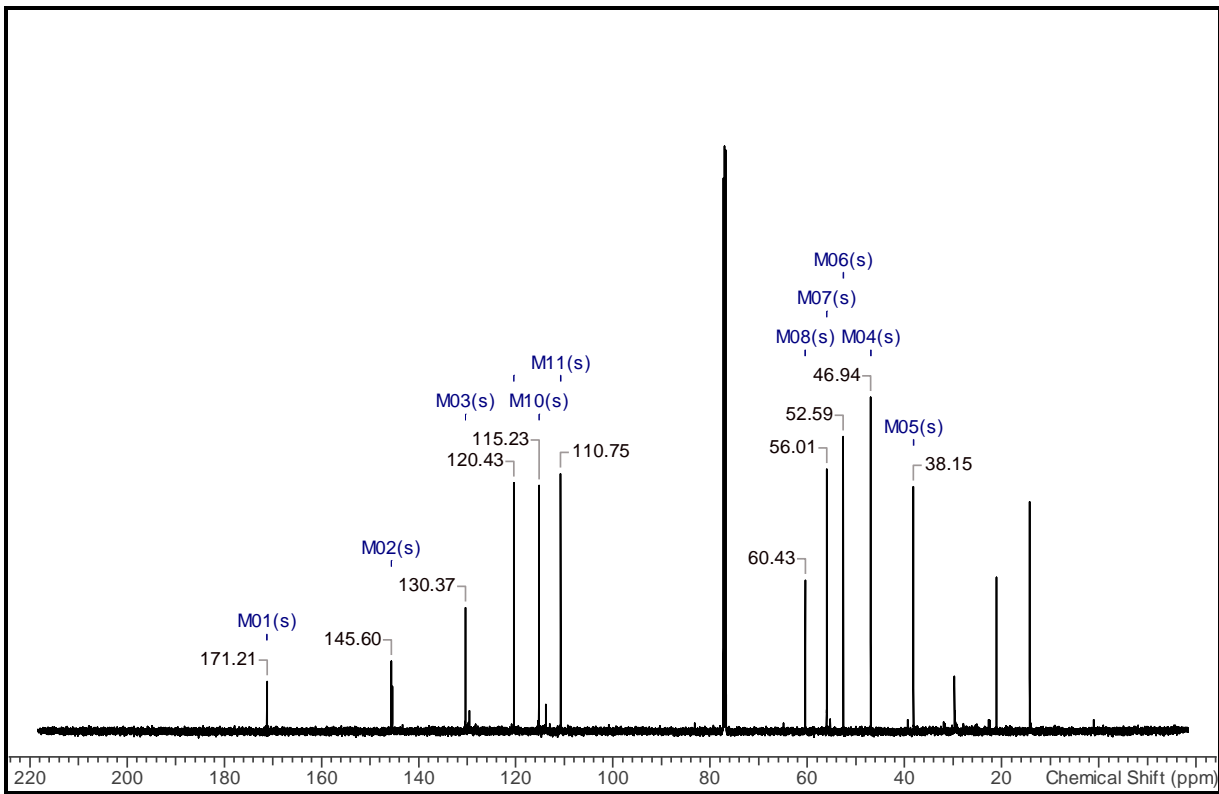
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



A.2 Espectro de RMN <sup>1</sup>H de 2 - [(4-metoxifenil) metil] oxirano (2)



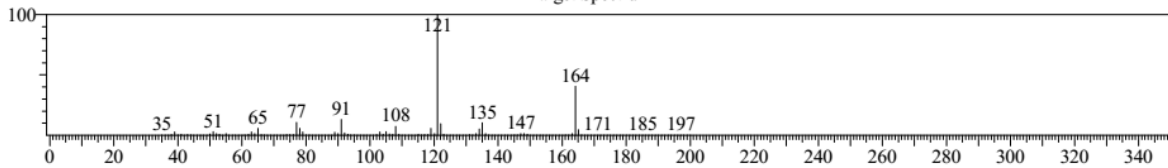
Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de 2 - [(4-metoxifenil) metil] oxirano (**2**)



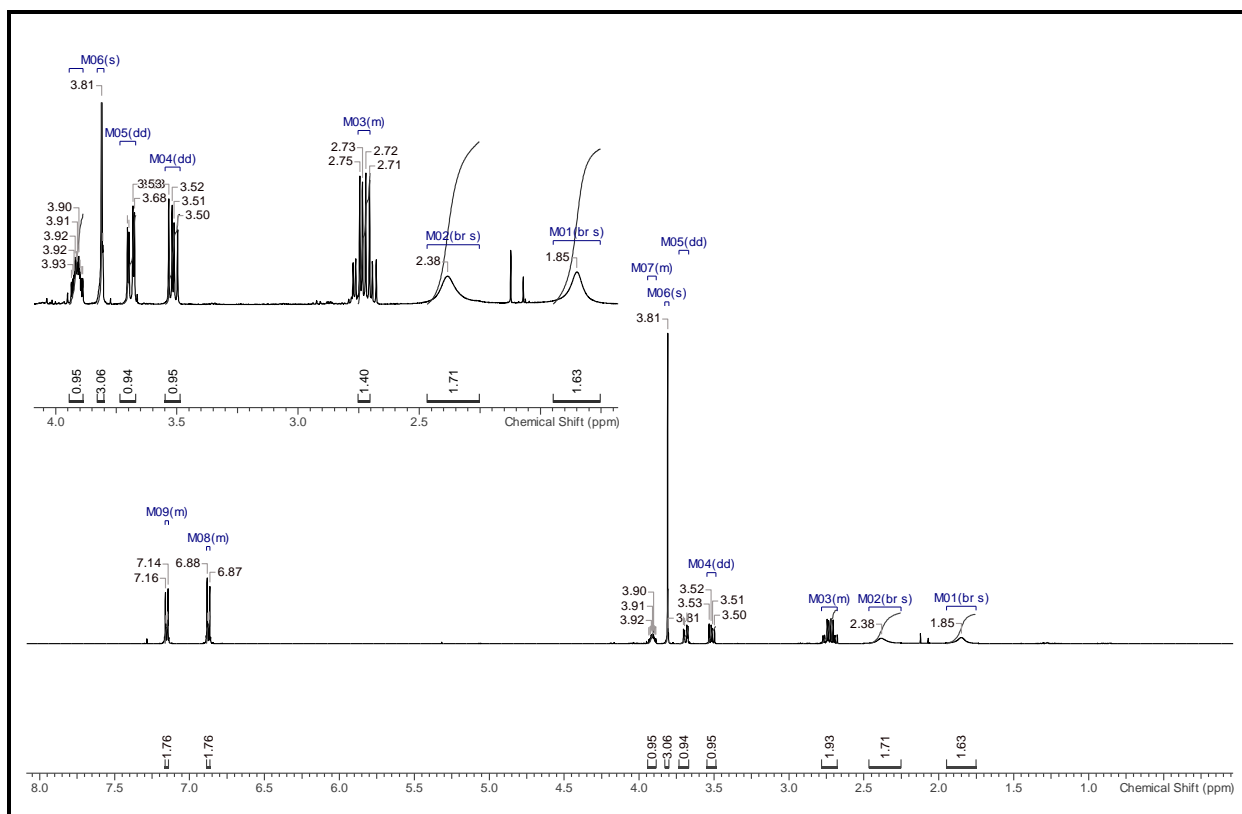
Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de 2 - [(4-metoxifenil) metil] oxirano (**2**)

Library

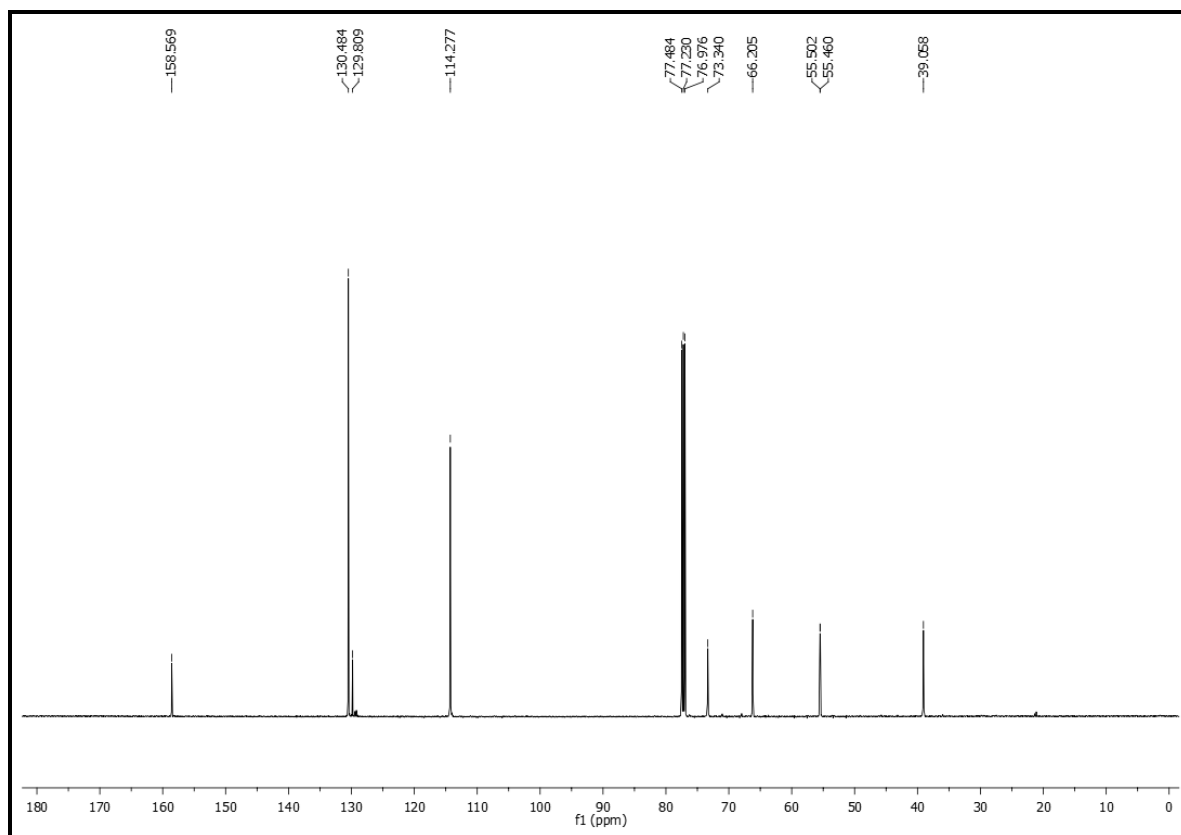
<< Target >>  
Line#:1 R.Time:12.890(Scan#:1579) MassPeaks:166  
RawMode:Averaged 12.885-12.895(1578-1580) BasePeak:121.10(6670236)  
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1  
Target Spectrum



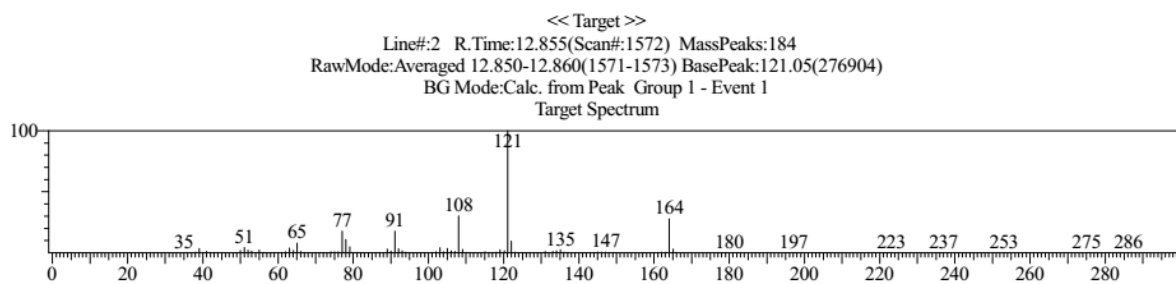
A.3 Espectro de RMN <sup>1</sup>H de 1-metoxi-3-(4-metoxifenil) propan-1,2-diol (**8**)



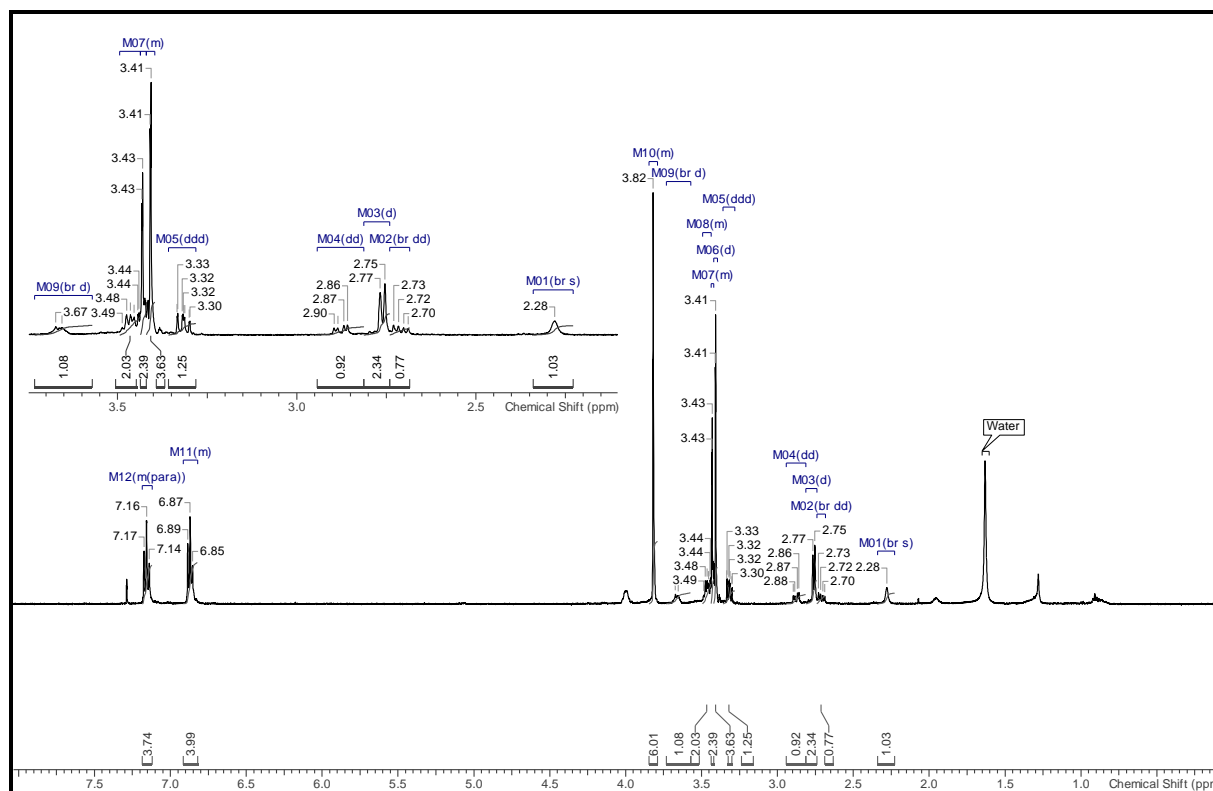
Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de 1-metoxi-3- (4-metoxifenil) propan-1,2-diol (**8**)



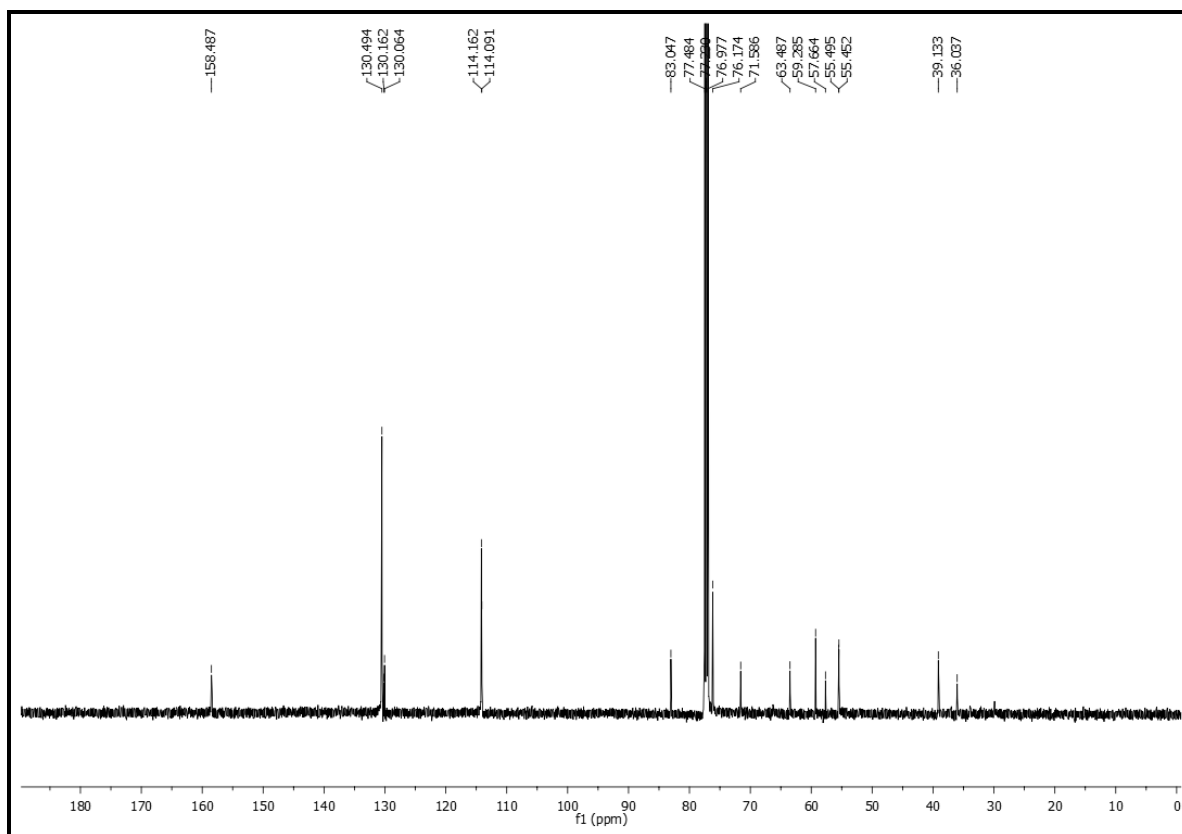
Espectro de massas de 1-metoxi-3- (4-metoxifenil) propan-1,2-diol (**8**)



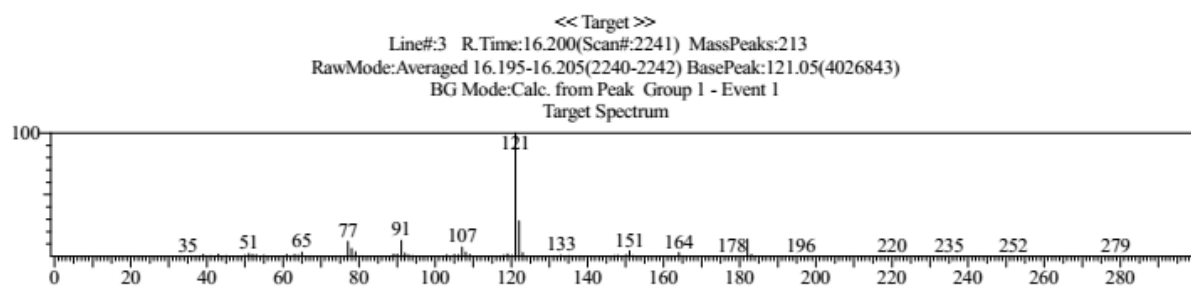
A.4 Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de 2-metoxi-3-(4-metoxifenil)propano-1-ol (**10**) e 1-metoxi-3-(4-metoxifenil)propano-2-ol (**17**)



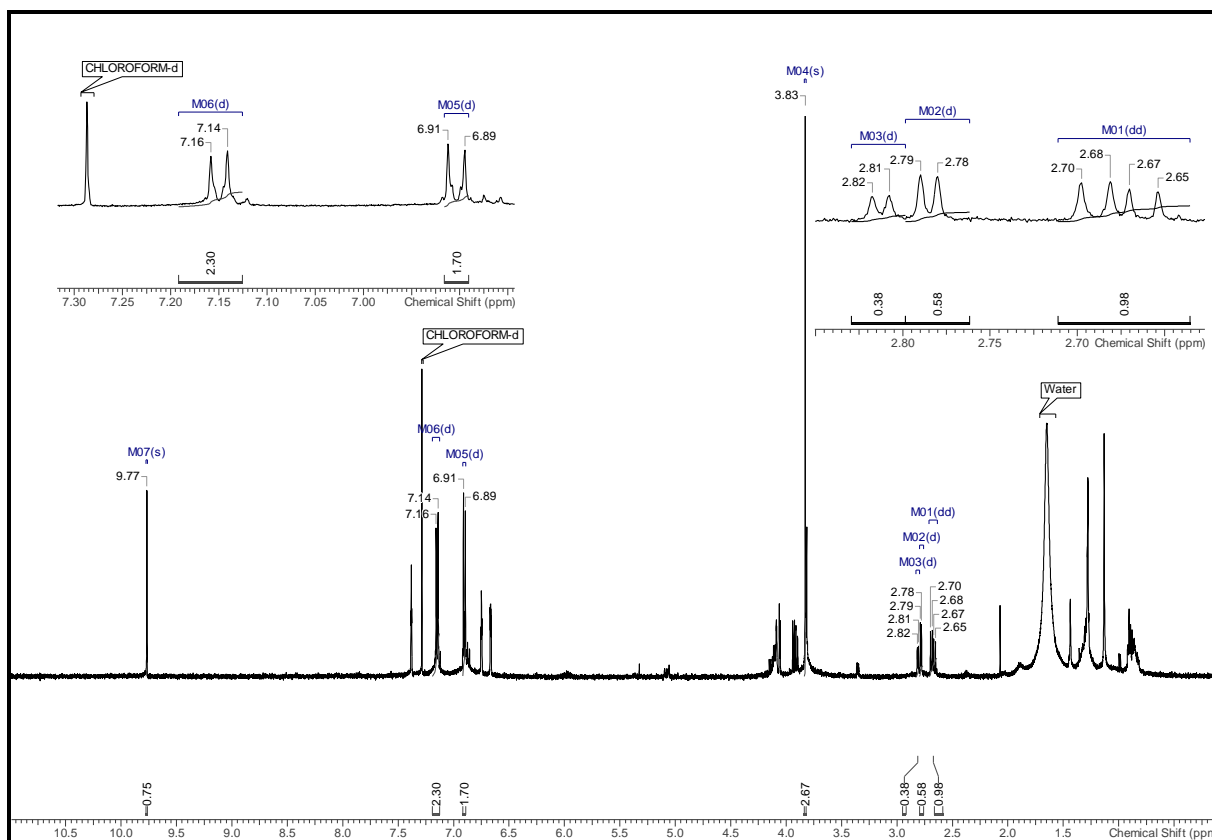
Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de de 2-metoxi-3-(4-metoxifenil)propano-1-ol (**10**) e 1-metoxi-3-(4-metoxifenil)propano-2-ol (**17**)



Espectro de massas de de 2-metoxi-3-(4-metoxifenil)propano-1-ol (**10**) e 1-metoxi-3-(4-metoxifenil)propano-2-ol (**17**)

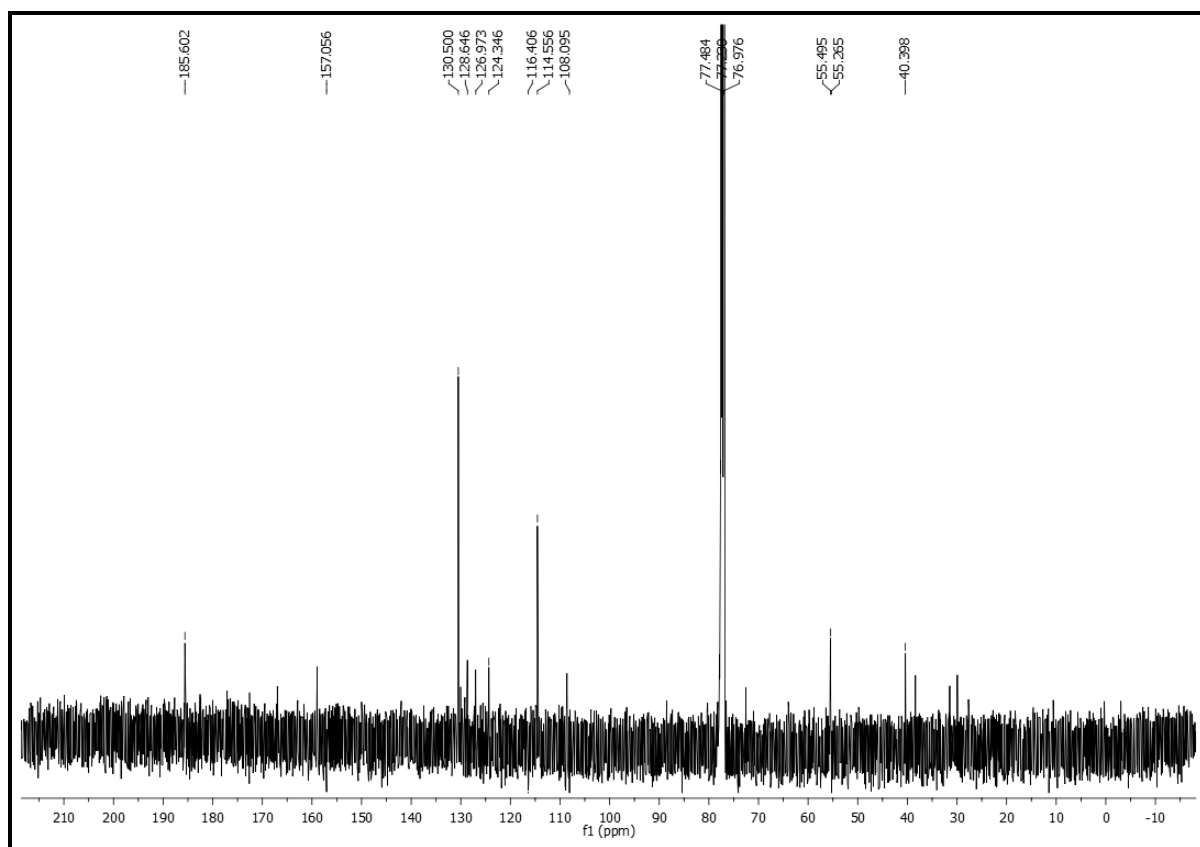


A.5 Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de 3-(4-metoxifenil)propanal (**18**).

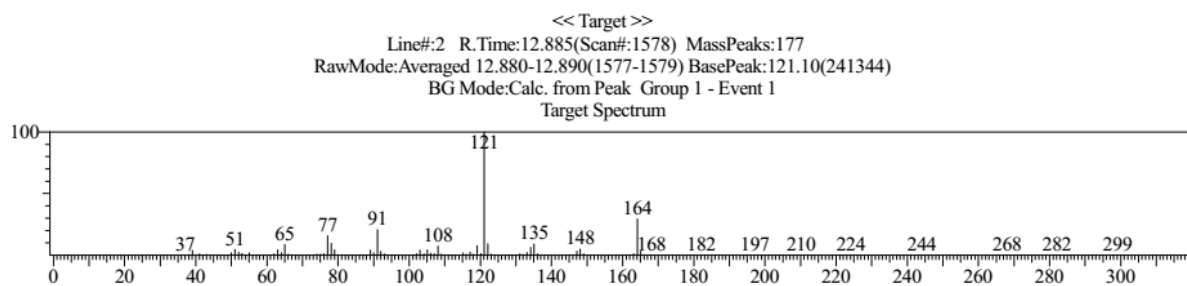




Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de 3-(4-metoxifenil)propanal (**18**).



Espectro de massas de 3-(4-metoxifenil)propanal (**18**).

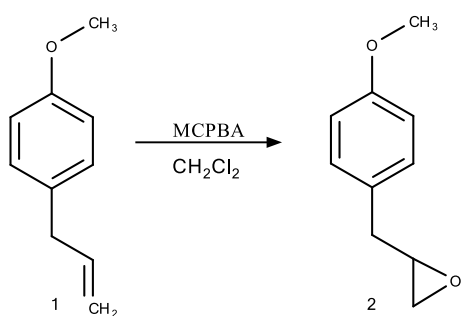


## ANEXO B - PARTE EXPERIMENTAL

## PROCEDIMENTOS:

## B.1 Obtenção de 2 - [(4-metoxifenil) metil] oxirano (2)

A uma solução de metil chavicol (1) (1,0 g; 6,74 mmol) em diclorometano (10 mL) o qual foi acrescida vagarosamente de uma solução de ácido metacloroperbenzóico 77% (3,1346 g; 14 mmol) em diclorometano (40 mL), tempo de adição 40 minutos, mantendo-se a temperatura a 0° C durante a adição (banho de gelo). Deixou-se agitando a temperatura ambiente por 24 horas e ao final desse tempo, adicionou-se solução aquosa de sulfito de sódio a 10% (60 mL), deixando-se agitar por uma hora. Separou-se a fase aquosa da fase orgânica, enquanto a fase aquosa foi extraída com diclorometano. As fases orgânicas foram reunidas e lavadas com solução de bicarbonato de sódio a 5%, solução saturada de cloreto de sódio e secas com sulfato de sódio anidro. O solvente foi evaporado e produto purificado em coluna cromatográfica cuja fase móvel hexano/ acetato de etila (8:2).



**Aspecto Físico:** líquido oleoso castanho

**F.M.:** C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub>

**M.M.:** 164,204 g.mol<sup>-1</sup>

**Rendimento:** 75%

**Pureza (CG):** 99%

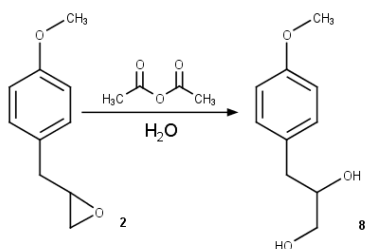
**RMN<sup>1</sup>H, 300Hz, (CDCl<sub>3</sub>):** δ (ppm): 6,85 (d, 2H, J = 2,14 Hz); 6,74 (d, 2H, J = 2,14 Hz); 3,89 (s, 3H); 3,14 (tdd, 1H, J = 5,53, 5,53, 3,89, 2,75 Hz), 2,70 (m, 3H) 2,56 (dd, 1H, J = 5,04, 2,59 Hz), 2,11 (m, 3H);

**RMN<sup>13</sup>, 75Hz, (CDCl<sub>3</sub>):** δ (ppm): 171,395; 145,782; 145,608; 130,553; 120,612; 115,412; 110,935; 60,610; 56,193; 52,774;

**EM:** m/z = 164 (M<sup>+</sup>); 147; 135; 121; 108; 91; 77; 65

## B.2 Obtenção de 3-(4-metoxifenil)propano-1,2-diol(**8**).

50 mg da substância (**2**) (0,33 mmol) foi adicionado a uma solução de anidrido acético a 0,1% (6 mL). O sistema foi mantido sob agitação magnética a 140° C a vácuo por 2,5 horas. Posteriormente, resfriou-se naturalmente e, em seguida, foi acrescido de uma solução de hidróxido de sódio a 37% (1,12 mL), mantendo-se sob agitação por 30 minutos. Em seguida foi realizada a extração com éter etílico e seca com sulfato de sódio anidro. Evaporou-se o solvente.



**Aspecto Físico:** líquido oleoso incolor

**F.M.:** C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>O<sub>3</sub>

**M.M.:** 182,219 g.mol<sup>-1</sup>

**Rendimento:** 68%

**Pureza (CG):** 98%

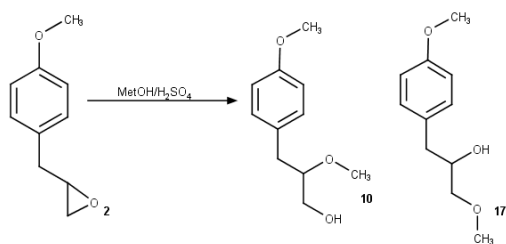
**RMN<sup>1</sup>H, 300Hz, (CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  (ppm): 7,15 (m, 2H); 6,87 (m, 2H); 3,91 (m, 1H); 3,81 (s, 3H); 3,69 (dd, 1H, J = 11,29, 3,05); 3,52 (dd, 1H, J = 11,29, 3,05); 2,73 (m, 1H);

**RMN<sup>13</sup>, 75Hz, (CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  (ppm): 158,596; 130,484; 129,809; 114,277; 73,340; 66,205; 55,502; 55,460; 39,058;

**EM:** m/z = 184 (M<sup>+</sup>); 164; 147; 135; 121; 108; 91; 77; 65

## B.3 Obtenção de 2-metoxi-3-(4-metoxifenil)propano-1-ol (**10**) e 1-metoxi-3-(4-metoxifenil)propano-2-ol (**17**).

A substância (**2**) (0,05g; 0,33mmol) foi adicionada a uma solução de ácido sulfúrico a 5% (v/v) em metanol (10 mL) e mantida sob agitação magnética em temperatura ambiente por 3 horas seguida de refluxo e temperatura elevada a 80° C por uma hora. Posteriormente, o sistema foi resfriado em banho de gelo até a temperatura ambiente novamente e lavada com solução de bicarbonato de sódio a 12,5%. Extraíu-se com éter etílico e seca com sulfato de sódio com evaporação do solvente. O produto foi purificado em coluna cromatográfica cuja fase móvel hexano/acetato de etila (1:1).



**Aspecto Físico:** líquido oleoso incolor

**F.M.:** C<sub>11</sub>H<sub>16</sub>O<sub>3</sub>

**M.M.:** 196,110 g.mol<sup>-1</sup>

**Rendimento:** 77%

**Pureza:** 49,08%

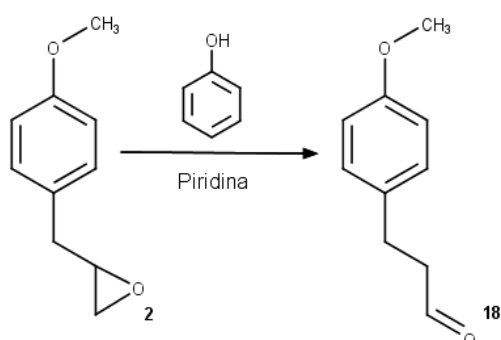
**RMN<sup>1</sup>H, 300Hz, (CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  (ppm): 7,15 (m, 4H); 6,87 (m, 4H); 3,82 (s, 6H); 3,66 (d, 1H, J = 8,85 Hz); 3,465 (m, 2H); 3,43 (m, 2H); 3,41 (d, 4H, J = 1,22 Hz); 3,32 (ddd, 1H, J = 9,46, 7,32, 1,22 Hz); 2,88 (dd, 1H, J = 13,58, 5,04 Hz); 2,76 (d, 2H, J = 6,71 Hz); 2,71 (dd, 1H, J = 13,89, 6,56 Hz); 2,28 (s, 1H);

**RMN<sup>13</sup>, 75Hz, (CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  (ppm): 158,487; 130,162; 130,064; 114,162; 76,174; 71,586; 63,487; 59,285; 55,452; 39,133; 36,037;

**EM:** m/z = 196 (M<sup>+</sup>); 178; 164; 151; 133; 121; 107; 91; 77; 65; 51;

#### B.4 Obtenção de 3-(4-metoxifenil)propanal (**18**).

A uma solução da substância (**2**) (0,328g; 2 mmol) em piridina (0,3164g; 4 mmol) foi adicionado fenol (0,188g; 2 mmol) como catalisador. O sistema foi mantido sob agitação magnética em temperatura ambiente por 5 horas. Em seguida, a mistura reacional foi lavada com ácido clorídrico a 1M, extraída com éter etílico e seca com sulfato de sódio anidro com evaporação do solvente. O produto foi purificado por coluna cromatográfica cuja fase móvel hexano/ acetato de etila (8:2).



**Aspecto Físico:** líquido oleoso incolor

**F.M.:** C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub>

**M.M.:** 164,204 g.mol<sup>-1</sup>

**Pureza:** 97%

**Rendimento:** 52,30%

**RMN<sup>1</sup>H, 300Hz, (CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm):** 9,77 (s, 1H); 7,15 (d, 2H, J = 8,54); 6,9 (d, 2H, J = 8,85); 3,83 (s, 3H); 2,81 (d, 1H, J = 4,88); 2,78 (d, 1H, J = 4,88); 2,68 (dd, 1H, J = 13,73, 8,24);

**RMN<sup>13</sup>, 75Hz, (CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm):** 185,602; 157,056; 130,500; 116,406; 55,495; 40,398;

**EM: m/z =** 164 (M<sup>+</sup>); 148; 135; 121; 108; 91; 77; 65; 51;

**ANEXO C** - Resumo do trabalho científico intitulado “Molecular Interactions between Methyl chavicol and analogues with Inflammatory enzymes”, apresentado na forma de poster no VIII Simpósio Ibero-americano de Plantas Medicinais e III Simpósio Ibero-americano de Investigaçãom Câncer, 24 a 27 de outubro de 2016, Itajaí, Santa Catarina, Brasil.



### **MOLECULAR INTERACTIONS BETWEEN METHYL CHAVICOL AND ANALOGUES WITH INFLAMMATORY ENZYMES**

*Celeida-Santos BS<sup>1</sup>, Pires AS<sup>1</sup>, Taranto AG<sup>2</sup>, Araujo ALSM<sup>1</sup> Sousa OV<sup>1</sup>*

**Introduction:** Methyl chavicol is a phenylpropanoid found in essential oils of medicinal plants and has been known for their antimicrobial, anti-inflammatory, local anesthetic and insecticide activities. **Objective:** Determine the profile of molecular interactions between methyl chavicol and analogues with inflammatory enzymes [phospholipase A2 (PLA<sub>2</sub>) and cyclooxygenase (COX-1 and -2)] by docking tools. **Materials and Methods:** Methyl chavicol was used as basis for the planning of analogues applying the concept of bioisosterism. The ligands were generated in Marvin Sketch Program and refined by the semi-empirical method PM7 present in the MOPAC2012 Program. The inflammatory enzymes were obtained from Protein Data Bank under the 3U8D, 3U8H and 5I8P (PLA<sub>2</sub>) and 1EQG, 3NT1 and 5IKT codes (COX-1 and -2). Subsequently, the Gasteiger's loads were determined for all ligands and receptors through MGLTools Program. The molecular recognition was defined using the Discovery Studio v 4.5 2016 Program. **Results and Discussion:** The analysis of molecular docking showed that the methyl chavicol and analogues were capable of complexing with the COX-1 and -2 with 0.6 Kcalmol<sup>-1</sup> more favorable than acetylsalicylic acid. Furthermore, the compounds recognized these enzymes by Van der Waals, dipole-dipole and hydrogen bonding interactions, which were similar to non-steroidal anti-inflammatory (acetylsalicylic acid, ibuprofen and naproxen). However, the compounds didn't produce interactions with the PLA<sub>2</sub> in the proposed model. **Conclusion:** The results indicate that methyl chavicol and analogues allowed stable interactions with COX-1 and -2, which should be associated with the anti-inflammatory action, while the molecular docking didn't evidence the recognition between compounds and PLA<sub>2</sub>.

*Acknowledgments: PPG Ciências Farmacêuticas-UFJF, FAPEMIG, CAPES, CNPQ.*

<sup>1</sup>Departamento de Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, PPG-CF, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brasil. [brunaceleida@gmail.com](mailto:brunaceleida@gmail.com)

<sup>2</sup> Universidade Federal de São João Del Rei, Campus Centro-Oeste Dona Lindu, Divinópolis, Brasil. [taranto@ufsj.edu.br](mailto:taranto@ufsj.edu.br)

**ANEXO D** - Resumo do trabalho científico intitulado “Avaliação da Atividade Antioxidante *in vitro* do metil chavicol”, apresentado na forma de poster no XII Congresso Mundial de Farmacêuticos de Língua Portuguesa; V Simpósio de Plantas Medicinais e Fitoterápicos no Sistema Público de Saúde; Congresso Internacional de Fitoterapia; I Congresso Brasileiro de Farmácia Estética e I Simpósio Farmacêutico de Nutracêuticos, 8 a 10 de novembro de 2016, Gramado, Rio Grande do Sul, Brasil.

## Área 2 – PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERAPIA

### AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO METIL-CHAVICOL

BRUNA CELEIDA SILVA SANTOS; ANDRESSA SOARES PIRES; ANA LÚCIA SANTOS DE MATOS ARAÚJO; ORLANDO VIEIRA DE SOUSA

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, FACULDADE DE FARMÁCIA,  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
E-MAIL: brunaceleida@gmail.com

**Introdução:** O estresse oxidativo causa danos como peroxidação lipídica e agressão teciduais, podendo desencadear patologias associadas a doenças inflamatórias, cardiovasculares e neurodegenerativas. Metil-chavicol é um constituinte fenilpropanoídico encontrado em óleos essenciais de plantas medicinais e as atividades biológicas, tais como, anti-inflamatória, antimicrobiana, anestésica local e inseticida, são atribuídas a esta substância. O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antioxidante do metil-chavicol usando diferentes ensaios *in vitro*. **Metodologia:** Atividade antioxidante foi avaliada frente aos métodos de sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), poder de redução do Ferro (FRAP), co-oxidação do  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico e peroxidação lipídica por meio da determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Hidroxitolueno butila (BHT) foi usado como controle positivo. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão. Análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey foi usado para determinar o nível de significância ( $p < 0,05$ ) usando o programa GraphPad Prism<sup>®</sup>. **Resultados:** O metil-chavicol não apresentou atividade antioxidante frente ao método DPPH nas concentrações testadas ( $CE_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$ ) e o perfil cinético demonstrou um comportamento lento. Através do método FRAP, o metil-chavicol teve  $CE_{50}$  superior a  $5000 \mu\text{g/mL}$ . Os percentuais de inibição de peroxidação lipídica pelos os métodos de co-oxidação do  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico e TBARS foram de  $75,38 \pm 0,43\%$  e  $71,29 \pm 1,41\%$ , respectivamente para o metil-chavicol e  $55,88 \pm 1,67\%$  e  $69,13 \pm 1,00\%$  para BHT. **Conclusão:** Os resultados sugerem que o metil-chavicol possui um promissor potencial antioxidante frente a inibição da peroxidação lipídica, o que pode ser relevante o desenvolvimento de produtos inovadores para combater diversas doenças associadas ao estresse oxidativo. **Palavras-chave:** Metil-chavicol; Atividade Antioxidante; Peroxidação Lipídica.

Agradecimentos: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - UFJF; FAPEMIG; CAPES; CNPq.

**ANEXO E** - Resumo do trabalho científico intitulado “Interações Moleculares do metil chavicol e análogos frente a lipase pancreática usando ancoragem molecular”, apresentado na forma de poster noXII Congresso Mundial de Farmacêuticos de Língua Portuguesa; V Simpósio de Plantas Medicinais e Fitoterápicos no Sistema Público de Saúde; Congresso Internacional de Fitoterapia; I Congresso Brasileiro de Farmácia Estética e I Simpósio Farmacêutico de Nutracêuticos, 8 a 10 de novembro de 2016, Gramado, Rio Grande do Sul, Brasil

## Área 2 – PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERAPIA

### INTERAÇÕES MOLECULARES DO METIL-CHAVICOL E ANÁLOGOS FRENTE A LIPASE PANCREÁTICA USANDO ANCORAGEM MOLECULAR

BRUNA CELEIDA SILVA SANTOS<sup>1</sup>; ANDRESSA SOARES PIRES<sup>1</sup>; ALEX GUTTERRES TARANTO<sup>2</sup>; ANA LÚCIA SANTOS DE MATOS ARAÚJO<sup>1</sup>; ORLANDO VIEIRA DE SOUSA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, FACULDADE DE FARMÁCIA, UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

<sup>2</sup>UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI, CAMPUS CENTRO-OESTE DONA LINDU

E-MAIL: brunaceleida@gmail.com

**Introdução:** Metil-chavicol é um fenilpropanoide encontrado em óleos essenciais em plantas de diversas famílias, o qual é conhecido por suas propriedades biológicas, tais como, anti-inflamatória, antimicrobiana, anestésica local e inseticida. Esta substância foi usada como material de partida para o planejamento e síntese de análogos por meio do conceito de bioisosterismo. O presente estudo teve como objetivo avaliar as interações moleculares *in silico* do metil-chavicol e dezenove análogos frente a Lipase pancreática usando estudos teóricos de Ancoragem Molecular. **Metodologia:** Inicialmente, os ligantes foram gerados no programa Marvin Sketch e refinados pelo método semi-empírico PM7 presente no programa MOPAC2012 e a lipase foi obtida através do Protein Data Bank sob códigos 1LPA, 1LPB e 1N8S. A seguir, as cargas de Gasteiger foram determinadas para todos os ligantes e lipase através do programa MGLTools. O mesmo processo foi realizado para obtenção das energias de ligação dos fármacos orlistat e ácido metoxi (undecil) fosfônico (MUP). As interações de reconhecimento molecular foram realizadas através do programa Discovery Studio v. 4.5 2016. **Resultados:** Os estudos de ancoragem molecular mostraram que os análogos do metil-chavicol são capazes de se complexarem com a lipase 0,4 Kcalmol<sup>-1</sup> e 1,4 Kcalmol<sup>-1</sup> favoravelmente do que o orlistat e MUP, respectivamente. Além disso, a lipase reconheceu as substâncias através de interações de Van der Waals, dipolo-dipolo e ligação de hidrogênio. **Conclusão:** Os resultados indicam que análogos obtidos a partir do metil-chavicol podem levar às interações intermolecular estáveis com a lipase pancreática, uma importante enzima associada a mecanismos fisiopatológicos de doenças do trato gastrointestinal e do metabolismo lipídico. De posse destes resultados, torna-se possível desenvolver compostos mais promissores para o tratamento da obesidade. **Palavras-chave:** Metil-chavicol; Lipase pancreática; Modelagem Molecular.

Agradecimentos: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - UFJF; FAPEMIG; CAPES; CNPq.