



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES  
BIOLÓGICAS DE UM NOVO DERIVADO DA NARINGENINA

RAYANNE DA SILVA SOUZA

MANAUS

2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS

RAYANNE DA SILVA SOUZA

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES  
BIOLÓGICAS DE UM NOVO DERIVADO DA NARINGENINA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Emerson Silva Lima

MANAUS

2017

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S729s Souza, Rayanne da Silva  
Síntese, caracterização química e atividades biológicas de um novo derivado da naringenina / Rayanne da Silva Souza. 2017 83 f.: il. color; 31 cm.


Orientador: Emerson Silva Lima  
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -  
Universidade Federal do Amazonas.

1. flavonoides. 2. naringenina. 3. inflamação. 4. estresse oxidativo. 5. glicação. I. Lima, Emerson Silva II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

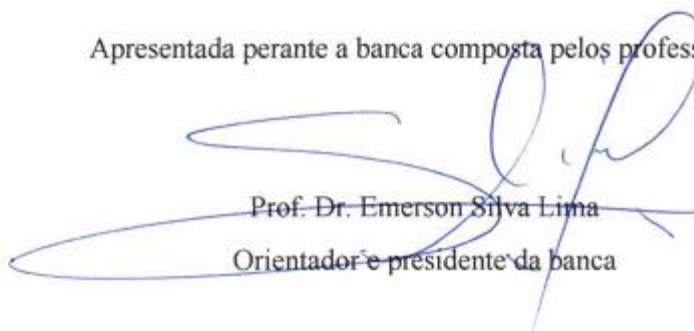
SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE UM  
NOVO DERIVADO DA NARINGENINA

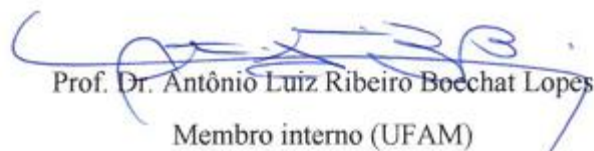
**RAYANNE DA SILVA SOUZA**


Esta Dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas em sua forma final e definitiva pelo Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas. Manaus, AM, 27/06/2017.

  
Prof. Dra. Marne Carvalho de Vasconcellos  
Coordenadora do PPGCF

Apresentada perante a banca composta pelos professores:

  
Prof. Dr. Emerson Silva Lima  
Orientador e presidente da banca

  
Prof. Dr. Antônio Luiz Ribeiro Boechat Lopes  
Membro interno (UFAM)

  
Prof. Dr. Hector Henrique Ferreira Koolen  
Membro externo (UEA)

*Dedico a Santíssima Trindade, a Nossa Senhora, aos meus pais, a minha vó, aos familiares e amigos pelo incentivo para a realização deste trabalho.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu Deus Soberano por Seu imenso amor e infinita misericórdia que foram meu sustento e minha esperança.

Agradeço a minha amada mãe Socorro pelo amor, carinho, dedicação, companheirismo, incentivo e também pelas orações, tudo essencial para que eu me tornasse quem sou.

Agradeço também a Mãe do Céu pela por seu amor, fidelidade e intercessão.

Agradeço ao meu amado pai Jorge pelo amor e dedicação. Mesmo distante, seu apoio e incentivo contribuíram para que eu chegasse até aqui.

Agradeço de todo coração a minha vó Mariene a quem amo muito. Agradeço pelo amor, pela dedicação, pela atenção, pelo incentivo e, principalmente, por suas orações.

Agradeço a todos os meus familiares que sempre me apoiaram e compartilharam as minhas conquistas, principalmente, minhas tias.

Agradeço as amigas que moram em outras cidades pelo carinho, pelo incentivo e também por partilharem comigo de muitos momentos importantes.

Agradeço aos meus, mais que amigos, irmãos de fé que dedicaram suas orações a mim. Agradeço pelo carinho, pelo apoio, pelo incentivo e pela amizade.

Agradeço a todos os amigos e colegas de faculdade que muitos acompanharam de perto a trajetória destes dois anos. Agradeço pela torcida e pelo apoio.

Agradeço aos colegas de trabalho do Biophar, em especial Rodrigo Souza, Leonard Rosales, Carolina Valentim, Angela Comapa, Bárbara Janaína, Tatiana Pedrosa, Larissa Borges e Fábio Cicalise.

Agradeço ao meu orientador, Professor Doutor Emerson Silva Lima, por ter me proporcionado esta oportunidade de muito aprendizado. Agradeço pelo empenho, pela orientação e, principalmente, pela paciência.

Agradeço a Dra. Ana Cristina Pinto do Laboratório de Produtos Naturais da Universidade Federal do Amazonas

Agradeço ao Dr. Felipe Moura Araújo da Silva do Laboratório de Espectrometria de Massas da Universidade Federal do Amazonas.

Agradeço ao Professor Doutor Antônio Luiz Boechat e a Msc. Aguyda Rayany Cavalcante do Laboratório de Imunologia e Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Amazonas

Agradeço a Dra. Larissa Froede Brito do Laboratório de Sinalização da Inflamação da Universidade Federal de Minas Gerais.

Agradeço ao Professor Doutor Ádley Antonini Neves de Lima da Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Agradeço a Universidade Federal do Amazonas por proporcionar as instalações prediais para o desenvolvimento deste projeto.

Agradeço ao CNPQ pela concessão da bolsa de estudo.

*Nem olhos viram, nem ouvidos ouviram,  
nem jamais penetrou em coração humano  
o que Deus tem preparado para aqueles  
que O amam.*

**I Coríntios 2, 9**



## RESUMO

Investir no desenvolvimento de novas terapias preventivas contra a progressão de doenças crônicas é essencial, visto que essas enfermidades compartilham etiologias comuns como a inflamação e estresse oxidativo. Flavonoides como a naringenina tem sido objeto de vários estudos na prevenção, controle e tratamento de doenças crônicas. O objetivo deste trabalho foi sintetizar uma nova entidade química e, a partir desta, explorar suas características químicas e físico-químicas e suas atividades biológicas. A ACD41 foi sintetizada a partir da reação de condensação entre a naringenina e aminoguanidina. Sua estrutura química foi elucidada por meio das técnicas de ESI-MS, MS-MS, RMN e FTIR e aspectos físico-químicos estudados utilizando TG, DSC, DTA e DRX. As atividades biológicas exploradas contemplaram os ensaios relacionados ao estresse oxidativo, glicação e inflamação. A ACD41 apresentou-se como um sólido cristalino, com rendimento de 81%, massa molecular de 328,33 g/mol, tempo de retenção de 12,1 minutos na análise por CLAE e com menor resistência térmica comparada à naringenina. A ACD41 apresentou baixa citotoxicidade com  $CI_{50}$  superior a 1000  $\mu\text{g/mL}$  em macrófagos humanos (THP-1) e  $767,4 \pm 18,71 \mu\text{g/mL}$  em fibroblastos humanos (MRC-5). Apresentou atividade sequestrante contra os radicais  $ABTS^{+\bullet}$  ( $CI_{50} = 5,26 \pm 0,10 \mu\text{g/mL}$ ) e  $DPPH^{\bullet}$  ( $CI_{50} = 8,33 \pm 0,49 \mu\text{g/mL}$ ). Reverteu os níveis de ROS e preservou a integridade da membrana mitocondrial em THP-1. Nos ensaios de glicação *in vitro*, a ACD41 inibiu a formação de AGEs pelas vias oxidativa ( $CI_{50} = 2,58 \pm 1,67 \mu\text{g/mL}$ ) e não oxidativa ( $CI_{50} = 72,23 \pm 2,28 \mu\text{g/mL}$ ). Em macrófagos ativados por LPS, inibiu a produção de  $TNF-\alpha$  nas concentrações de 5 e 10  $\mu\text{g/mL}$ . A ACD41 inibiu em 87,95% a produção de hidroperóxido pela LOX e nos estudos *in silico* interagiu com a enzima COX-2, apresentando uma energia de ligação igual a -10.3 kcal/mol. O presente estudo, pela primeira vez, descreve a molécula (2E)-2-[5,7-diidroxí-2-(4-hidroxifenil)-2,3-dihidro-4H-cromen-4-ilideno]hidrazina carboximidamida e demonstra o potencial antioxidante, antiglicante e anti-inflamatório desta nova entidade química, a qual pode ser promissora no desenvolvimento de novas terapias para doenças crônicas.

**Palavras-chave:** Flavonoides, naringenina, inflamação, estresse oxidativo, glicação.

## ABSTRACT

Investing in the development of new preventive therapies against the progression of chronic diseases is essential, since these diseases share common aetiologies such as inflammation and oxidative stress. Flavonoids such as naringenin have been the subject of several studies in the prevention, control and treatment of chronic diseases. The objective of this work was to synthesize a new chemical entity and, from this, to explore its chemical and physicochemical characteristics and its biological activities. ACD41 was synthesized from the condensation reaction between naringenin and aminoguanidine. Its chemical structure was elucidated using ESI-MS, MS-MS, NMR and FTIR techniques, and physicochemical aspects studied using TG, DSC, DTA and XRD. The biological activities explored included the trials related to oxidative stress, glycation and inflammation. ACD41 was presented as a crystalline solid, with 81% yield, 328.33 g / mol molecular mass, retention time of 12.1 minutes in HPLC analysis and with lower thermal resistance compared to naringenin. ACD41 showed low cytotoxicity with IC<sub>50</sub> greater than 1000 µg / mL in human macrophages (THP-1) and 767.4 ± 18.71 µg / mL in human fibroblasts (MRC-5). It presented sequestering activity against the radicals ABTS<sup>•+</sup> (IC<sub>50</sub> = 5.26 ± 0.10 µg / mL) and DPPH<sup>•</sup> (IC<sub>50</sub> = 8.33 ± 0.49 µg / mL). It reversed ROS levels and preserved mitochondrial membrane integrity in THP1. In the in vitro glycation assays, ACD41 inhibited the formation of AGEs by oxidative (IC<sub>50</sub> = 2.58 ± 1.67 µg / mL) and non-oxidative (IC<sub>50</sub> = 72.23 ± 2.28 µg / mL). In LPS-activated macrophages, it inhibited the production of TNF-α at concentrations of 5 and 10 µg / mL. ACD41 inhibited the production of hydroperoxide by 87.95% by LOX and in the in silico studies it interacted with the COX-2 enzyme, presenting a binding energy equal to -10.3 kcal / mol. The present study describes for the first time the molecule (2E) -2- [5,7-dihydroxy-2- (4-hydroxyphenyl) -2,3-dihydro-4H-chromen-4-ylidene] hydrazine carboxymidinedide And demonstrates the antioxidant, anti-inflammatory and anti-inflammatory potential of this new chemical entity, which may be promising in the development of new therapies for chronic diseases.

**Keywords:** Flavonoids, naringenin, inflammation, oxidative stress, glycation

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1 - Mecanismo do Processo inflamatório .....  | 22 |
| Figura 2 - Vias de sinalização pró-inflamatórias .....   | 26 |
| Figura 3 - Produção do radical $O_2^{\bullet-}$ e $H_2O_2$ .....   | 28 |
| Figura 4 - Fontes intracelulares de ROS .....  | 30 |
| Figura 5 - Formação de espécies reativas de carbonila (RCS) e AGEs .....   | 33 |
| Figura 6 - Estrutura básica das principais classes de flavonoides .....  | 34 |
| Figura 7 - Estrutura química da naringenina .....  | 37 |
| Figura 8 - Rota biossintética da naringenina .....   | 37 |
| Figura 9 – Reação de condensação entre naringenina e aminoguanidina .....  | 48 |
| Figura – 10 Cromatogramas e espectros de absorção UV-VIS .....   | 49 |
| Figura 11 - Espectro de massas da molécula ACD41 .....   | 50 |
| Figura 12 - Espectro MS/MS do íon m/z 329 .....  | 50 |
| Figura 13 - Proposta de fragmentação do íon m/z 329 .....  | 51 |
| Figura 14 - Espectro RMN de $^1H$ da molécula ACD41 .....  | 52 |
| Figura 15 – Espectro no Infravermelho .....  | 53 |
| Figura 16 – Curva DSC .....  | 54 |
| Figura 17 – Curva TG e DTA .....   | 55 |
| Figura 18 – Difratoograma da ACD41 .....   | 56 |
| Figura 19 - Viabilidade celular .....  | 58 |
| Figura 20 - Atividade sequestrante do radical ABTS e do radical DPPH .....   | 59 |
| Figura 21: Inibição da quelação do ferro e inibição da formação do radical ânion superóxido $O_2^{\bullet-}$ ..... | 61 |
| Figura 22 - Potencial antioxidante em ambiente celular induzido ao estresse oxidativo .....                        | 62 |
| Figura 23 - Atividade antiglicante .....   | 64 |
| Figura 24 - Efeito inibitório na produção de $TNF-\alpha$ .....  | 65 |
| Figura 25 – Produção de hidroperóxidos .....   | 67 |
| Figura 26 - Interação entre rofecoxib e COX-2 .....  | 68 |
| Figura 27 - Interação entre naringenina e COX-2 .....  | 68 |
| Figura 28 - Interação entre ACD41 e COX-2 .....  | 69 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1 - Atividade anti-inflamatória dos flavonoides .....                    | 36 |
| Tabela 2 - Dados de RMN de <sup>1</sup> H da ACD41 .....                        | 52 |
| Tabela 3 - Dados termoanalíticos do ACD 41 .....                                | 56 |
| Tabela 4 - Energias de ligação entre os ligantes e o sítio ativo da COX-2 ..... | 70 |

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIACOES

|                        |  |
|------------------------|--|
| $\cdot\text{OH}$       | Radical hidroxila                        |
| AGEs                   | Produtos finais de glicaco avançada     |
| akt                    | Proteína quinase B                       |
| AMG                    | Aminoguanidina                           |
| AP-1                   | Proteína ativadora -1                    |
| CAT                    | Catalase                                 |
| COX                    | Ciclooxigenase                           |
| DCFDA                  | Diclorofluorescena diacetato            |
| DiOC6(3)               | Iodeto de 3,3'-dihexiloxacarbocianina    |
| EDTA                   | cido etilenodiamino tetra-actico       |
| GPx                    | Glutationa peroxidase                    |
| $\text{H}_2\text{O}_2$ | Peróxido de hidrognio                   |
| IKK                    | Protena fosforiladora de I $\kappa$ B   |
| iNOS                   | xido nítrico sintase induzida           |
| I $\kappa$ B $\alpha$  | proteínas inibidoras de $\kappa$ B       |
| LOX                    | Lipoxigenase                             |
| LPS                    | Lipopolissacarídeo                       |
| MAPK                   | Proteína quinase ativada por mitógenos   |
| NADH                   | Nicotinamida adenina dinucleotídeo       |
| NAR                    | Naringenina                              |
| NBT                    | Nitro blue tetrazolium                   |
| NETs                   | Neutrophil extracellular traps           |
| NF- $\kappa$ B         | Fator nuclear kappa B                    |
| $\text{NO}\cdot$       | xido nítrico                            |
| $\text{O}_2^{\cdot-}$  | Radical ânion superóxido                 |
| PDK                    | Quinase dependente de fosfatidilinositol |
| PGs                    | Prostaglandinas                          |
| PI3K                   | Fosfatidilinositol-3-quinase             |
| PMA                    | acetato miristato de forbol              |
| PMS                    | Metilsulfato de fenazina                 |
| Ras/ERK1/2             | Via das MAPKs                            |

|                |   |
|----------------|---|
| RCS            | Espécies reativas de carbonila              |
| RCX            | Rofecoxib                                   |
| ROS/RNS        | Espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio |
| SAPKs          | quinases ativadas por estresse              |
| SBF            | Soro fetal bovino                           |
| SOD            | Superóxido dismutase                        |
| Staur          | Estaurosporina                              |
| Th1            | Células T helper fenótipo 1                 |
| THP-1          | Linhagem de monócitos humanos               |
| TNFR           | Receptor de TNF- $\alpha$                   |
| TNF- $\alpha$  | Fator de necrose tumoral alfa               |
| $\Delta\Psi_m$ | Potencial de membrana mitocondrial          |

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>   | <b>17</b> |
| <b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>  | <b>19</b> |
| 2.1 DOENÇAS CRÔNICAS .....   | 19        |
| 2.2. INFLAMAÇÃO .....  | 20        |
| 2.2.1. Mecanismo da resposta inflamatória .....                                  | 21        |
| 2.2.2. Vias de sinalização intracelular .....                                    | 23        |
| 2.2.3. TNF- $\alpha$ .....   | 27        |
| 2.3. ESTRESSE OXIDATIVO.....   | 27        |
| 2.4. GLICAÇÃO E PRODUÇÃO DE AGEs .....   | 31        |
| 2.5. FLAVONOIDES .....   | 34        |
| 2.5.1. Naringenina .....   | 36        |
| <b>3. OBJETIVOS .....</b>  | <b>39</b> |
| 3.1. Objetivo Geral .....  | 39        |
| 3.2. Objetivos Específicos .....   | 39        |
| <b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>  | <b>40</b> |
| 4.1. Materiais .....   | 40        |
| 4.2. Síntese da ACD41 .....  | 40        |
| 4.3. Análise da pureza por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ..... | 40        |
| 4.4. Elucidação estrutural .....   | 41        |
| 4.5. Análise Térmica.....  | 41        |
| 4.6. Difração de Raio X (DRX).....   | 42        |
| 4.7. Cultura Celular .....   | 42        |
| 4.8. Viabilidade Celular.....  | 42        |
| 4.8.1. MTT.....  | 42        |
| 4.8.2. Alamar Blue.....  | 43        |
| 4.9. Ensaio antioxidantes .....  | 43        |
| 4.9.1. Atividade sequestrante do radical DPPH.....                               | 43        |
| 4.9.2. Atividade sequestrante do radical ABTS.....                               | 44        |
| 4.9.3. Atividade quelante do ferro .....   | 44        |
| 4.9.4. Varredura do ânion superóxido .....                                       | 44        |
| 4.9.5. Detecção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) intracelular .....        | 45        |

|  |           |
|--|-----------|
| 4.9.6. Determinação do Potencial Elétrico de Membrana Mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) .....  | 45        |
| 4. 10. Ensaio de glicação <i>in vitro</i> .....  | 46        |
| 4.11. Inibição da ativação de macrófagos por LPS e produção de TNF- $\alpha$ .....           | 46        |
| 4.12. Inibição da lipoxigenase (LOX) <i>in vitro</i> .....                                   | 46        |
| 4.13. Ancoragem molecular.....   | 47        |
| 4.14. Análise Estatística .....  | 47        |
| <b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>   | <b>48</b> |
| 5.1. Síntese e obtenção da molécula .....  | 48        |
| 5.2. Determinação estrutural.....  | 49        |
| 5.3. Análise Térmica.....  | 54        |
| 5.4 Difração de Raio X .....   | 56        |
| 5.5. Atividades biológicas .....   | 57        |
| 5.5.1. Viabilidade Celular.....  | 57        |
| 5.5.2. Atividade Antioxidante .....  | 59        |
| 5.5.3. Atividade antiglicante.....   | 63        |
| 5.5.4. Atividade inibitória sobre a ativação de macrófagos e produção de TNF- $\alpha$ ..... | 65        |
| 5.5.5. Inibição da lipoxigenase (LOX) <i>in vitro</i> .....                                  | 66        |
| 5.5.6. Ancoragem Molecular .....   | 67        |
| <b>6. CONCLUSÕES.....</b>  | <b>71</b> |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>  | <b>72</b> |



## 1. INTRODUÇÃO

O aumento na expectativa de vida através da medicina moderna tem intensificado a prevalência de doenças crônicas relacionadas à idade como as doenças cardiovasculares, diabetes, síndrome metabólica e doenças neurodegenerativas (LÜSCHER, 2015). Essas doenças, embora se desenvolvam de forma única, compartilham etiologias comuns, dentre as quais, as principais são o estresse oxidativo cumulativo e a inflamação crônica (PETERSEN & SMITH, 2016).

A inflamação é uma defesa natural contra antígenos endógenos e exógenos (KHANSARI et al., 2009). É uma resposta fisiológica normal que tem a função de remover células e tecidos danificados, conduzindo-os ao reparo. Quando descontrolada, esta resposta inflamatória resulta em danos celulares e teciduais, causando a destruição desses e, conseqüentemente, estabelecendo um quadro de inflamação persistente que está associada a várias doenças crônicas (SÁNCHEZ et al., 2015).

Durante o processo inflamatório, as células liberam grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio no local da inflamação, levando ao estresse oxidativo que também ativa vias de sinalização que induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias (BISWAS, 2016)

Estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre a produção de radicais livres ou espécies reativas de oxigênio (ROS) e sua eliminação pelos sistemas antioxidantes a favor dos oxidantes (REUTER et al., 2010). ROS são gerados como resultado de um metabolismo celular normal que em baixas concentrações desempenham várias funções fisiológicas, mas que em altas concentrações provocam modificações estruturais nos componentes celulares contribuindo para o surgimento de diversas condições patológicas (BIRBEN et al., 2012).

Dentre essas modificações causadas pelos níveis elevados de ROS está a oxidação de lipídios e açúcares redutores que podem gerar produtos intermediários ou espécies reativas de carbonila, acelerando a formação dos produtos finais de glicação avançada (AGEs) (OTT et al., 2014). O acúmulo de AGEs pode gerar patologias através de reação cruzada destes com proteínas, alterando suas estruturas e funções ou através da ativação de vias de sinalização que induzem o aumento da produção de ROS e de citocinas pró-inflamatórias (URIBARRI et al., 2015).

A correlação entre esses processos celulares e moleculares é fundamental para compreender o desenvolvimento de patologias crônicas. Porém, tão importante quanto elucidar os mecanismos que causam estas condições crônicas, é investir na busca de terapias

preventivas potenciais que contribuam para o retardo da doença (PETERSEN & SMITH, 2016) visto que entre as dez principais causas de morte no mundo, sete são resultados de doenças crônicas (FRIEDEN, 2014).

Neste contexto, os produtos naturais têm desempenhado grande papel no desenvolvimento e criação de novos agentes terapêuticos pela indústria farmacêutica (STONIK, 2009), sendo alvos de modificações estruturais por exercerem efeitos potentes e atuarem em múltiplas vias de sinalização (KUMAR et al., 2014; ZHANG et al., 2016a).

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi sintetizar uma nova entidade química através da condensação entre a naringenina e aminoguanidina e, a partir do produto formado, elucidar sua estrutura química, explorar suas características físico-químicas e investigar suas atividades biológicas sobre o estresse oxidativo, a glicação e a inflamação.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 DOENÇAS CRÔNICAS**

As doenças crônicas são multifatoriais de lenta progressão e longa duração (MARTIN, 2007), geralmente podem ser controladas, mas raramente têm cura definitiva. São doenças debilitantes que impedem as funções físicas e mentais, reduzindo a habilidade em executar as atividades diárias (CDPM, 2007).

As doenças crônicas são altamente prevalentes. Um estudo realizado por Ward e cols (2014), nos EUA, estimou que uma a cada quatro pessoas tem uma ou duas doenças crônicas associadas. Essas doenças matam 40 milhões de pessoas por ano, o equivalente a 70% das mortes anuais. E dentre estes números, estima-se 31 milhões de mortes afetam, principalmente, os países em desenvolvimento (OMS, 2017).

Entre as mais prevalentes estão as doenças cardiovasculares, doença pulmonar obstrutiva crônica, asma, diabetes, câncer, artrite, obesidade e doenças mentais como a depressão (CLONINGER, 2013).

As doenças crônicas são um dos maiores e mais desafiadores problemas de saúde no século 21, não somente pelo sofrimento humano que elas causam, mas também pelos prejuízos socioeconômicos que elas infringem, principalmente, nos países em desenvolvimento (CHESTNOV, 2014).

Segundo dados do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC, 2016), em 2010, nos EUA, dos gastos relacionados à saúde, 80% foram de pessoas com uma ou mais condições crônicas.

As doenças crônicas são causadas pela combinação dos hábitos de vida como a inatividade física, má alimentação, estresse e uso de álcool e tabaco, e dos fatores genéticos (OMS, 2017). Essas doenças, embora se desenvolvam de forma única, elas compartilham etiologias comuns, dentre as quais, as principais são o estresse oxidativo cumulativo e a inflamação crônica, desencadeados pelos hábitos de vida. (PETERSEN & SMITH, 2016).

## 2.2. INFLAMAÇÃO

Inflamação é a primeira resposta do sistema imune contra infecções e injúrias teciduais (ZHANG & KAUFMAN, 2008). É um processo benéfico que conduz à remoção do fator desencadeante e à restauração da homeostase e da estrutura tecidual (RICCIOTTI & FITZGERALD, 2011).

É um evento fisiológico (CEKICI et al., 2014) que envolve componentes celulares e moleculares, tais como células residentes (macrófagos, fibroblastos, mastócitos e células dendríticas), leucócitos circulantes (principalmente neutrófilos e monócitos) (NEWTON & DIXIT, 2012), componentes do sistema complemento, anticorpos e mediadores inflamatórios como: citocinas, quimiocinas, aminas vasoativas, eicosanoides e radicais livres (MEDZHITOV, 2008).

As respostas inflamatórias são heterogêneas nos tipos celulares e mediadores moleculares envolvidos o que as distingue em diferentes modalidades: aguda e crônica (OKIN & MEDZHITOV, 2012). A resposta de fase aguda dura horas a poucos dias e origina os sinais agudos da inflamação, descritos por Aulus Cornelius Celsus no século I, conhecidos como sinais cardinais: rubor, calor, tumor e dor (RICCIOTTI & FITZGERALD, 2011; LIBBY, 2012). A fase aguda envolve a detecção do patógeno ou trauma no local do estímulo pelas células imunes residentes através da fagocitose (HAWKINS & STEPHENS, 2015), influxo de leucócitos, remoção do estímulo e reparação do tecido (WEISS, 2008).

Já a inflamação crônica é persistente (MURAKAMI & HIRANO, 2012) e ocorre como consequência do insucesso da fase aguda em eliminar o fator desencadeante. Esta fase adquire outras características que a determinam como a infiltração de células mononucleares (monócitos, macrófagos e linfócitos), proliferação vascular, fibrose e perda da função que é o quinto sinal cardinal descrito por Galeno (GRANGER & SENCHENKOVA, 2010; LEYVA-LÓPEZ et al., 2016).

A inflamação crônica está associada a diversas doenças crônicas e autoimunes como artrite reumatoide, asma, aterosclerose, Alzheimer, Parkinson, doenças metabólicas como diabetes tipo 2 e obesidade, doenças renais crônicas, doenças gastrointestinais autoimunes, esclerose múltipla, dentre outras (SÁNCHEZ et al., 2015; LEYVA-LÓPEZ et al., 2016).

### 2.2.1. Mecanismo da resposta inflamatória

A inflamação consiste de uma cascata firmemente regulada por processos imunológicos e fisiológicos que são orquestrados por moléculas sinalizadoras denominadas citocinas (ASHLEY et al., 2012).

O primeiro evento da cascata inflamatória é o reconhecimento da infecção ou do dano. A detecção dos patógenos se dá através do reconhecimento de moléculas conservadas denominadas de padrões moleculares associados a patógeno (PAMPs) que são essenciais para a sua sobrevivência. Dentre estes, destacam-se os ácidos nucleicos microbianos, lipoproteínas, glicoproteínas de superfície, componentes de membrana como peptidoglicanos, ácido lipotécóico e lipopolissacarídeo (LPS) (TANG et al., 2012).

Da mesma forma, a detecção do trauma se dá através do reconhecimento de moléculas endógenas sinalizadoras de dano ou necrose como DNA, ATP, ácido úrico, proteínas ligantes de DNA, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ROS/RNS) que podem gerar uma resposta imune e são denominadas alarminas ou padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) (SAÏD-SADIER & OJCIUS, 2012).

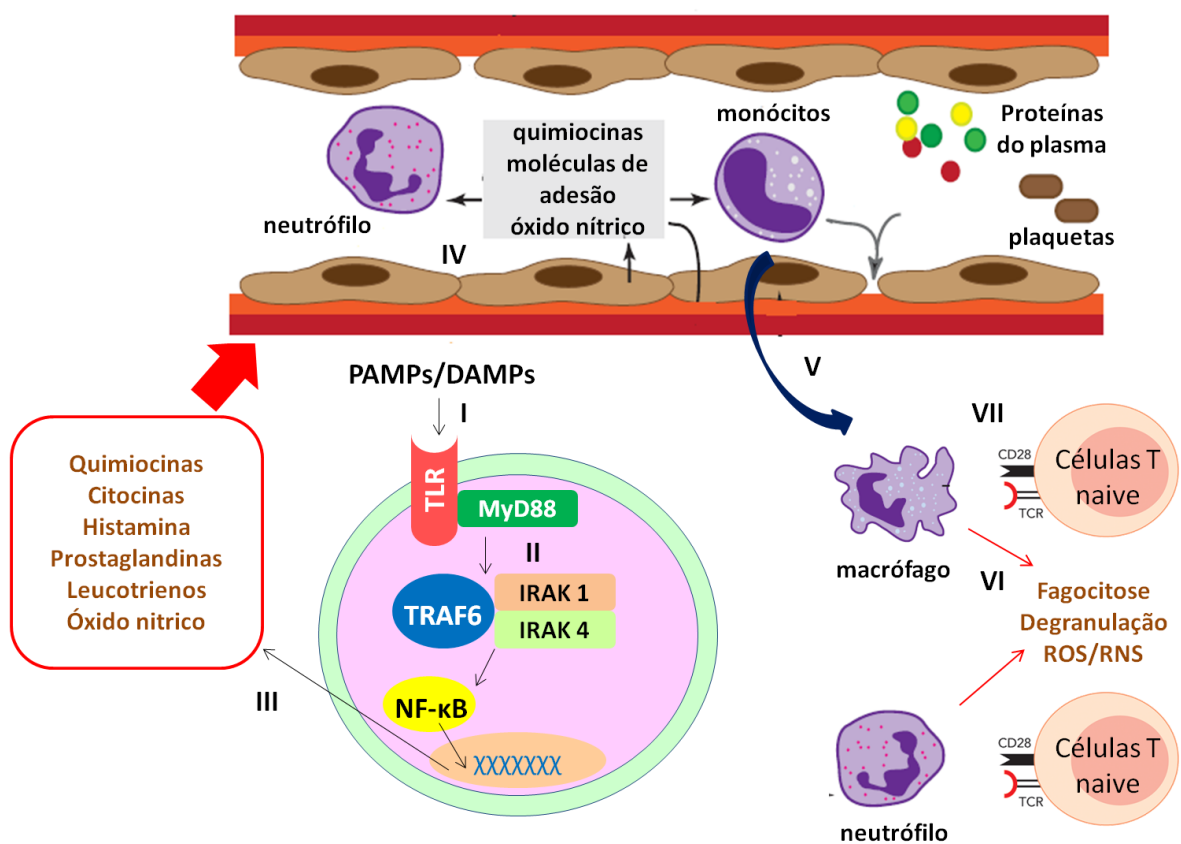
Esses estímulos são reconhecidos pelas células do sistema imune (**Fig.1 - I**) através de receptores transmembrana específicos, denominados receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) (AHMED, 2011), dentre os quais, destacam-se os receptores like Toll (TLRs) que estão presentes nas superfícies de células dendríticas, macrófagos residentes, monócitos, histiócitos e outros granulócitos (MUNN, 2017).

Uma vez ativados, os TLRs recrutam uma proteína adaptadora denominada MyD88 que recruta uma serina quinase (IRAK) que juntos propagarão o sinal pró-inflamatório (**Fig.1 - II**) (OZINSKY et al., 2000), resultando na ativação de duas vias de sinalização principais, NF- $\kappa$ B e MAPK que estimularão a transcrição de vários genes relacionados com a resposta inflamatória (**Fig.1 - III**), principalmente, interleucina-1-beta (IL-1 $\beta$ ), interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), bem como a ativação das enzimas relacionadas com o metabolismo dos eicosanóides como as COXs e LOXs. (AHMED, 2011).

A liberação de citocinas e quimiocinas inflamatórias pelas células residentes promovem mudanças hemodinâmicas em vênulas pós-capilares, resultando em vasodilatação, aumento da perfusão sanguínea, aumento da permeabilidade vascular (HAWKINS & STEPHENS, 2015), bem como uma reorganização da estrutura das células endoteliais que passam a expressar, em suas superfícies celulares, moléculas de adesão (**Fig.1 - IV**) que

promovem uma firme interação, sobretudo, entre os neutrófilos/monócitos (células efetoras) e o endotélio (CHANSON et al., 2005; FILIPPI, 2016).

A deposição desses mediadores inflamatórios na superfície endotelial induz a ativação das células aderidas. Em resposta a esses mediadores, as células efetoras sofrem uma mudança na sua forma celular e atravessam o endotélio vascular, processo conhecido como diapedese (Fig.1 - V). Posteriormente, essas células extravasam para a matriz extracelular e são direcionadas até o local da injúria juntamente com componentes do plasma como complemento e anticorpos (FILIPPI, 2016).



**Figura 1. Mecanismo do processo inflamatório:** no local da infecção ou injúria, as células residentes mastócitos, macrófagos e células dendríticas reconhecem os PAMPs ou DAMPs (I), ativam vias de sinalização pró-inflamatórias (II) e liberam mediadores inflamatórios (III) que estimulam a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais, o aumento do fluxo sanguíneo, o recrutamento de neutrófilos e monócitos e aumento da permeabilidade vascular (IV). Neutrófilos e monócitos, pelo processo de rolamento, aderem às células endoteliais via moléculas de adesão. Uma vez aderidas, estas células sofrem diapedese (V) e migram para o local do estímulo, promovendo a fagocitose, a produção de ROS/RNS e degranulação. Posteriormente, migram aos linfonodos e apresentam os antígenos às células T naíves (VII) (Adaptado de NEWTON & DIXIT, 2012).

No local da injúria, os neutrófilos e os macrófagos derivados dos monócitos, os macrófagos residentes e células dendríticas agem via fagocitose (**Fig.1 - VI**). Após o reconhecimento e fagocitose do patógeno ou dano, as células migram para os órgãos linfoides e apresentam os antígenos processados para as células T naive (**Fig.1 - VII**). Os antígenos apresentados estimulam receptores de células T específicos e moléculas coestimulatórias que em conjunto com o perfil de citocinas secretadas determinarão a polarização das células T efetoras em seus fenótipos Th1, Th2 ou Th17 (KAIKO et al., 2008).

A resposta Th1 está envolvida na proteção contra vírus, bactérias e outros microrganismos intracelulares. A resposta Th2 é responsável pela defesa contra parasitas e a resposta Th17 está envolvida na ativação de neutrófilos que combatem bactérias no ambiente extracelular (KAIKO et al., 2008). Esses neutrófilos criam um ambiente citotóxico pela liberação de seus grânulos citoplasmáticos ricos em enzimas antimicrobianas, processo conhecido como degranulação. Além disso, também liberam espécies reativas de oxigênio e nitrogênio provenientes da cadeia respiratória (ASHLEY et al., 2012; MUNN, 2017 ). Uma vez removido o estímulo, a reação inflamatória aguda é atenuada e segue para a fase final de reparação tecidual (RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011).

## 2.2.2. Vias de sinalização intracelular

### 2.2.2.1. NF- $\kappa$ B

Os dímeros de NF- $\kappa$ B são mantidos inativos no citoplasma através da associação com proteínas inibidoras de  $\kappa$ B (I $\kappa$ B). Na via canônica, membros da família IKK (IKK $\alpha$ / IKK $\beta$ ) formam um complexo com uma proteína adaptadora NEMO (**Fig.2 - IV**) (também conhecida como IKK $\gamma$ ). A presença de estímulo indutor desencadeia a ativação do complexo que conduz a fosforilação, ubiquitinação e degradação de I $\kappa$ B $\alpha$  no proteassoma (**Fig.2 - V**) (VERHELST et al., 2013). O dímero de NF- $\kappa$ B (p50/p65) é liberado e translocado para o núcleo (**Fig.2 - VI**), liga-se às regiões de DNA  $\kappa$ B e induz a expressão de citocinas pro-inflamatórias (**Fig.2 - VII**) como interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), IL-6, fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interferon gama (IFN- $\gamma$ ), entre outros (GHOSH et al., 2012; ASHLEY et al., 2012).

Na via não canônica ou alternativa, a ativação de uma quinase indutora de NF- $\kappa$ B (NIK) induz a ativação do dímero de IKK $\alpha$  (**Fig.2 - IV**). Este dímero induz a ubiquitinação e o processamento do precursor p100 na proteína p52 que forma dímero com RelB (**Fig.2 - V**). Este dímero é translocado para o núcleo (**Fig. 2 - VI**) e induz a transcrição de vários genes

(SUN, 2011). Essas duas vias, além dos genes pro-inflamatórios relacionados à imunidade, também induz a transcrição de genes relacionados à sobrevivência, proliferação e diferenciação celular, genes do metabolismo e oncogenes. (TORNATORE et al., 2012).

#### 2.2.2.2. COXs

As ciclooxigenases (COXs) também conhecidas como prostaglandina H sintases ou prostaglandina endoperoxidase sintases, são oxigenases de ácidos graxos (CHANDRASEKHARAN & SIMMONS, 2004). Essas enzimas catalisam a dioxigenação e subsequente redução do ácido araquidônico (AA) em prostaglandinas (PGs) (ROUZER & MARNETT, 2009).

A presença de estímulo inflamatório ativa a fosfolipase A2 que hidrolisa os glicerofosfolipídios de membrana, liberando ácido araquidônico (**Fig.2 – VIII**) (YANG et al., 2007). O AA é oxigenado pela COX e origina a prostanglandina G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>) que, posteriormente, é reduzida a prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>). A PGH<sub>2</sub> é metabolizada em diferentes prostanoídes que são relacionados estruturalmente: prostaglandina E2 (PGE<sub>2</sub>), prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), prostaglandina D2 (PGD<sub>2</sub>), prostaglandina F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) e tromboxano A2 (TXA<sub>2</sub>) (STOLFI et al., 2013) (**Fig. 2 - IX**).

As ciclooxigenases são expressas em duas isoformas: COX-1 e COX-2. A COX-1 é a forma constitutiva expressa em diversos tecidos e as PGs produzidas por esta enzima desempenham funções de manutenção (housekeeping) como citoproteção da mucosa gástrica, regulação do fluxo sanguíneo renal e agregação plaquetária (ZARGHI & ARFAEI, 2011).

Em contraste, a COX-2 não é detectada em muitos tecidos normais, mas sua expressão é rapidamente induzida por alguns estímulos como citocinas pró-inflamatórias (IL-1β e TNF-α), LPS, mitógenos oncogênicos, fatores de crescimento, hormônios e desequilíbrios eletrolíticos, resultando no aumento da síntese de PG. Esta forma induzida da enzima está implicada em muitos processos patológicos envolvendo inflamação (ZARGHI & ARFAEI, 2011).

Entretanto, alguns estudos têm mostrado que a COX-1 contribui com o processo inflamatório (VERMA et al., 2016) e a COX-2 é constitutivamente expressa em alguns órgãos como cérebro, timo, intestino e rins (KIRKBY et al., 2013)

As prostaglandinas (PGs) desempenham um papel chave na geração da resposta inflamatória. Esses mediadores estão aumentados nos tecidos inflamados e contribuem para o desenvolvimento dos sinais cardinais da inflamação aguda. (RICCIOTTI & FITZGERALD,



2011). Dentre as PGs, a  $PGE_2$  é o principal produto das COXs. Ela regula muitos aspectos da inflamação, promovendo vasodilatação, atração e ativação de neutrófilos, mastócitos, monócitos e macrófagos para o local da inflamação (KALINSKI, 2012).

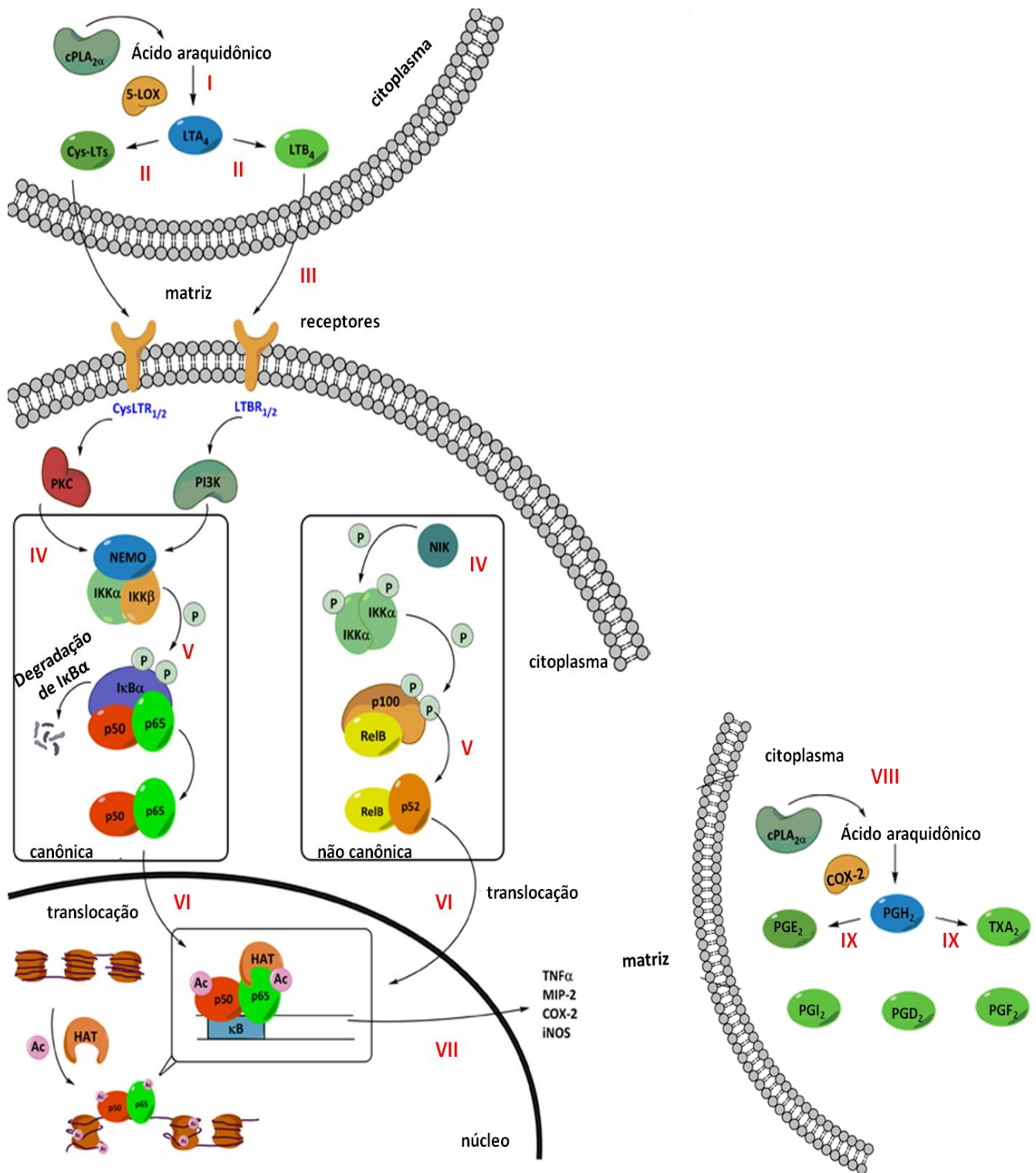
### 2.2.2.3. LOXs

As lipoxigenases (LOXs) são um grupo de enzimas oxidativas com um átomo de ferro não-heme no seu sítio ativo que estão envolvidas na regulação da resposta inflamatória pela geração de mediadores pró-inflamatórios, os leucotrienos, ou mediadores anti-inflamatórios, as lipoxinas (WISASTRA & DEKKER, 2014).

As LOXs apresentam diferentes isoformas e de acordo com a posição em que oxigenam os ácidos graxos poliinsaturados, principalmente o ácido araquidônico ou ácido linoleico, são nomeadas em 12-LOX, 15-LOX e 5-LOX. Destas isoformas, a 5-LOX é uma das principais enzimas envolvida na biossíntese dos leucotrienos (MOHAMED et al., 2013).

Após o estímulo pró-inflamatório, a 5-LOX catalisa a oxidação do ácido araquidônico, liberado pelas fosfolipases A2, convertendo-o ao ácido hidroperoxieicosatetraenoico (5-HPETE) e ao leucotrieno  $LTA_4$  (**Fig.2 - I**) com o auxílio da proteína ativadora de 5-LOX (FLAP). O  $LTA_4$  é instável e pode ser convertido tanto pela  $LTA_4$  sintase em  $LTB_4$  quanto pela  $LTC_4$  sintase em leucotrienos cisteínicos  $LTC_4$ ,  $LTD_4$  e  $LTE_4$  (**Fig.2 - II**) (STEINHILBER & HOFMANN, 2014).

$LTB_4$  e  $LTC_4$  são importantes mediadores pró-inflamatórios que atuam através de receptores ligados a proteína G, respectivamente, BLT-1 e CysLT1.  $LTB_4$  promove a quimioatração de neutrófilos e eosinófilos para o local da infecção ou injúria, estimula a produção de radical ânion superóxido, promove o influxo de íons e aumenta a liberação de enzimas lisossomais. Já os leucotrienos cisteínicos são responsáveis pelo aumento da permeabilidade vascular (YASHASWINI et al., 2017). Além disso, os leucotrienos estão envolvidos na ativação da via de sinalização do NF- $\kappa$ B (**Fig.2 - III**) (WISASTRA & DEKKER, 2014).



**Figura 2:** Vias de sinalização pró-inflamatórias. A produção de leucotrienos pela 5-lipoxigenase ativa a via do NF- $\kappa$ B que induz a expressão e ativação da COX-2, produzindo prostaglandinas e tromboxanos (Adaptado de WISA STRA & DEKKER, 2014).

### 2.2.3. TNF- $\alpha$

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) é uma potente citocina pró-inflamatória. É considerado o maior regulador da produção de citocinas pró-inflamatórias e está envolvido na patogênese de várias doenças inflamatórias crônicas (HORIUCHI et al., 2010). O TNF- $\alpha$  atua em diferentes vias de sinalização através de dois receptores TNFR1 e TNFR2, exercendo efeitos pleiotrópicos em vários tipos de células. Ele atua ativando a inflamação via NF- $\kappa$ B e SAPKs e também regulando vias apoptóticas (ZHANG & AN, 2007). Além disso, o TNF- $\alpha$  também aumenta a liberação de mediadores inflamatórios como as prostaglandinas e o fator ativador de plaquetas (PAF) (PARAMESWARAN & PATIAL, 2010).

O TNF- $\alpha$  é sintetizado como uma proteína transmembrana que é clivada por uma metaloproteinase de matriz em sua forma solúvel (GRAY & BLOCH, 2012). Ele é sintetizado em várias células, mas primeiramente, nas células da linhagem monocítica como os macrófagos (PARAMESWARAN & PATIAL, 2010). Nos macrófagos, o TNF- $\alpha$  promove a produção de espécies reativas de nitrogênio pela indução da sintase induzível de óxido nítrico (iNOS) que produz óxido nítrico (NO $\cdot$ ) (PARAMESWARAN & PATIAL, 2010).

## 2.3. ESTRESSE OXIDATIVO

O oxigênio, ou oxigênio molecular (O $_2$ ), é vital para a sobrevivência de todos os organismos aeróbicos. No metabolismo aeróbico em células normais, o oxigênio é reduzido à água através do recebimento de quatro elétrons provenientes das coenzimas NADH e FADH $_2$  que são oxidadas na cadeia transportadora de elétrons. Durante este processo ocorre a formação de radicais livres ou espécies reativas de oxigênio/nitrogênio (ROS/RNS) (KALYANARAMAN, 2013).

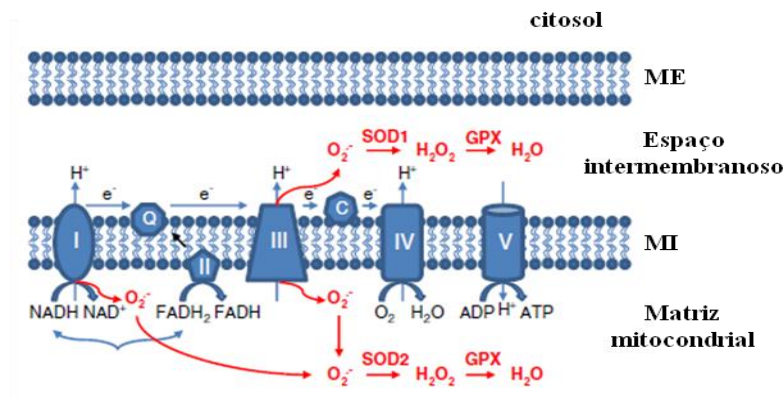
O termo radical livre refere-se às espécies químicas reativas que contêm um ou mais elétrons desemparelhados e que são, geralmente, instáveis e de curta duração (ASMAT et al., 2016). Já o termo ROS ou RNS é mais abrangente e compreende tanto os radicais livres quanto as espécies não radicalares (KRUMOVA & COSA, 2016).

Dentre os ROS estão o radical ânion superóxido (O $_2^{\cdot-}$ ) e o radical hidroxila ( $\cdot$ OH), além dos não radicais oxidantes como peróxido de hidrogênio (H $_2$ O $_2$ ) e o oxigênio singlete ( $^1$ O $_2$ ) (ZOROV et al., 2014). E dentre os RNS destacam-se o radical óxido nítrico (NO $\cdot$ ), o peroxinitrito (ONOO $^-$ ) e o radical dióxido de nitrogênio (NO $_2^{\cdot}$ ) (DHAWAN, 2014).

O radical livre mais abundante nos tecidos humanos é o ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) gerado pela adição de um elétron ao oxigênio molecular. Sua principal fonte está nos complexos I e III da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, os quais convertem 1-3% do oxigênio em ânion superóxido. Outra fonte de  $O_2^{\bullet-}$  são as reações catalisadas pela enzima xantina oxidase e pelo complexo enzimático de membrana NADPH oxidases (NOX) (PIECHOTA-POLANCZYK & FICHNA, 2014).

NADPH oxidases são encontradas nos leucócitos polimorfonucleares, monócitos e macrófagos (BIRBEN et al., 2012). No estado basal, os componentes do complexo NADPH oxidases estão presentes no citosol e nas membranas de várias organelas intracelulares. Após a fagocitose, os componentes são carregados para uma vesícula que posteriormente se funde às vesículas fagocíticas ou à membrana plasmática, liberando o radical ânion superóxido para o meio extracelular, resultando na atividade bactericida (PATLEVIC et al., 2016).

O ânion superóxido é convertido em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) pela enzima superóxido dismutase (SOD). O  $H_2O_2$  não é um radical livre, é menos reativo que  $O_2^{\bullet-}$ , e, devido sua natureza apolar, é capaz de se difundir pela membrana plasmática de organelas e células, atuando como segundo mensageiro em vias de transdução de sinais. O  $H_2O_2$  é convertido em água pelas enzimas catalase e glutathiona peroxidase (GPx) (Fig. 3).



**Figura 3: Produção do radical  $O_2^{\bullet-}$  e  $H_2O_2$ :** O ânion superóxido é produzido pelos complexos I e III. Uma vez gerado, o radical é dismutado em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) pela enzima superóxido dismutase (SOD). Posteriormente, o  $H_2O_2$  é convertido em água pela glutathiona peroxidase (GPx) (Adaptado de LI et al., 2013).

É importante que estes sistemas enzimáticos antioxidantes atuem em conjunto, pois havendo um desequilíbrio nas concentrações de superóxido e peróxido de hidrogênio pode resultar na formação do radical hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ) (BURTON & JAUNIAUX, 2011).

O radical hidroxila pode ser gerado por reações envolvendo metais de transição como ferro e cobre. Em condições de estresse oxidativo, altas concentrações de peróxido de

hidrogênio gera  $\text{OH}^\bullet$  pela reação de Fenton:  $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH} + \text{OH}^\bullet$  (PIECHOTA-POLANCZYK & FICHNA, 2014). Dentre os radicais livres, o  $\text{OH}^\bullet$  é o mais reativo e pode causar danos celulares através da peroxidação lipídica, desnaturação de proteínas e modificações no DNA podendo causar envelhecimento, mutagenicidade e carcinogenicidade (KANNO et al., 2012).

Além do ânion superóxido, o óxido nítrico ( $\text{NO}^\bullet$ ) também é um dos primeiros radicais livres a ser gerado nas células (RAHAL et al., 2014). O óxido nítrico pode ser gerado por três diferentes isoformas da enzima óxido nítrico sintase (NOS): neuronal NOS (nNOS), induzível NOS (iNOS) e endotelial NOS (eNOS). Todas as isoformas utilizam como substrato a L-arginina que é reduzida a citrulina e óxido nítrico (FORSTERMANN & SESSA, 2012).

O  $\text{NO}^\bullet$  é uma molécula mensageira que atua em uma diversidade processos biológicos como neurotransmissão, regulação da pressão sanguínea, regulação da resposta imune e mecanismos de defesa e relaxamento do músculo liso (LONE et al., 2013).

Nos macrófagos, o  $\text{NO}^\bullet$ , sintetizado pela iNOS, reage com radical ânion superóxido, induzindo a formação de peroxinitrito, o qual aumenta a atividade bactericida e o potencial citotóxico dos macrófagos. In vivo, a geração de peroxinitrito tem sido atribuída a várias doenças inflamatórias como acidente vascular cerebral, infarto agudo do miocárdio, insuficiência cardíaca crônica, choque sistêmico, diabetes, câncer e doenças neurodegenerativas (CASTANEDA et al., 2017).

ROS/RNS são gerados a partir de estímulos endógenos e exógenos. Dentre os estímulos endógenos estão inflamação, estresse, exercícios excessivos, isquemia, infecções, câncer e envelhecimento (KABEL, 2014). E os estímulos exógenos são os fatores ambientais como luz ultravioleta, radiação ionizante, poluentes e substâncias químicas (KRUMOVA & COSA, 2016).

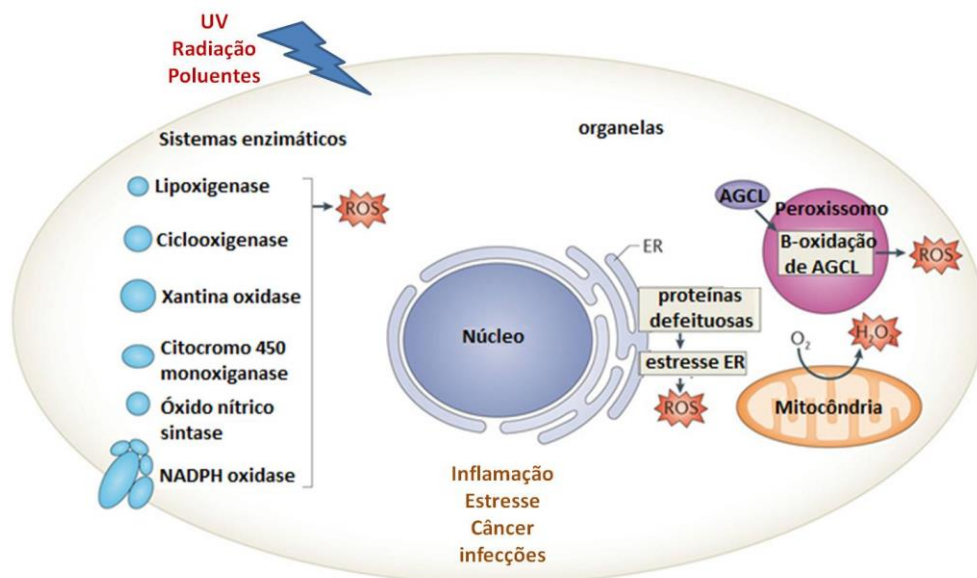
As mitocôndrias são importantes fontes de ROS e a produção destas espécies reativas contribui com a sinalização redox desta organela com o restante da célula, mas também com o dano mitocondrial observado em diversas patologias (MURPHY, 2009).

As mitocôndrias apresentam quatro camadas estruturais: membrana mitocondrial externa, espaço intermembranoso, membrana interna e matriz mitocondrial (STOWE & CAMARA, 2009). A geração de ROS mitocondrial (mROS) ocorre, principalmente, na cadeia transportadora de elétrons (CTE), localizada na membrana interna, durante o processo de fosforilação oxidativa que utiliza o oxigênio para produzir energia em forma de ATP para a célula (LI et al., 2013a).

A cadeia transportadora de elétrons (CTE) consiste em cinco complexos enzimáticos (I-V) de proteínas integrais de membrana: NADPH-CoQ redutase (complexo I), Succinato-CoQ redutase (complexo II), CoQ-citocromo c redutase (complexo III), citocromo c oxidase (complexo IV) e ATP sintase (complexo V) (GAO et al., 2008). A passagem de elétrons pela CTE promove o bombeamento de prótons da matriz mitocondrial (carregada negativamente) para o espaço intermembranoso (carregado positivamente), resultando em um potencial de membrana ( $\Delta\Psi_m$ ) (LI et al., 2013).

O potencial de membrana mitocondrial é essencial para a manutenção da função fisiológica da CTE e faz parte da força próton-motriz que permite a geração de ATP quando os elétrons reentram à matriz mitocondrial através do complexo ATP sintase. O  $\Delta\Psi_m$  é um indicador de injúria celular que quanto mais negativo (mais polarizada), maior é a depleção de energia das células e subsequente morte celular (JOSHI & BAKOWSKA, 2011).

Além da CTE nas mitocôndrias, outros sistemas enzimáticos como citocromo P450, lipoxigenase e ciclooxigenase, xantina oxidase, sintase de óxido nítrico e outras organelas como nos retículos endoplasmáticos e nos peroxissomos há produção de ROS/RNS (Fig. 4) (PETERSEN & SMITH, 2016).



**Figura 4: Fontes intracelulares de ROS.** Estímulos exógenos (UV, radiação, poluentes) e endógenos (inflamação, estresse, infecções, câncer) estimulam a produção de ROS por várias organelas como as mitocôndrias, o retículo endoplasmático e o peroxissomo. E também através de várias enzimas oxidases e oxigenases (Adaptado de HOLMSTRON & FINKEL 2014).

Ao mesmo tempo em que essas espécies são geradas, sistemas antioxidantes são ativados, buscando converter ROS/RNS em moléculas mais estáveis (UTTARA et al., 2009). Os antioxidantes são moléculas nucleofílicas e redutoras capazes de reagir com oxidantes, geralmente eletrofílicos, doando-lhes um ou mais elétrons (ESPINOSA-DIEZ et al., 2015). Dentre os antioxidantes pode-se citar as enzimas superóxido dismutase (SODs), glutatona peroxidases (GPx) e catalase; as proteínas albumina, transferrina e metalotioneína; além da glutatona, arginina, taurina, creatina, selênio, zinco, ácido úrico, ácido lipoico, ubiquinol, tocoferol/vitamina E e flavonoides (UTTARA et al., 2009; RAHAL et al., 2014).

Em baixas ou moderadas concentrações, os radicais livres estão envolvidos em respostas fisiológicas como parte de processos de sinalização de diferenciação e migração, bem como, mecanismos de defesa contra agentes infecciosos. Porém, essas espécies oxidativas, quando produzidas em excesso, podem se comportar como produtos tóxicos e deletérios causando danos ao DNA, às proteínas e aos lipídios, resultando em estresse oxidativo (ESPINOSA-DIEZ et al., 2015; ASMAT et al., 2016).

Estresse oxidativo é a falta de equilíbrio entre a ocorrência de espécies reativas de oxigênio/nitrogênio (ROS/RNS) e a capacidade do organismo em neutralizar suas ações através de sistemas antioxidantes. É um estado onde ocorre o aumento da geração de ROS/RNS ou redução da capacidade dos sistemas endógenos em combater as espécies reativas (PISOSCHI & POP, 2015). Os danos celulares causados pelos ROS/RNS estão relacionados com alguns processos biológicos como envelhecimento, inflamação, estresse, glicação e várias doenças crônicas como diabetes mellitus, doenças cardiovasculares, câncer, catarata, doenças hepáticas, insuficiência renal e doenças neurodegenerativas (SÁNCHEZ, 2016).

#### **2.4. GLICAÇÃO E PRODUÇÃO DE AGEs**

Níveis elevados de ROS implicam na oxidação de proteínas, lipídios e ácidos nucleicos. Geralmente, as proteínas oxidadas são degradadas pelo sistema proteassoma-ubiquitina (UPS) localizado no citosol e no núcleo das células (OTT et al., 2014). Porém, em condições normais ou patológicas como na diabetes, os níveis aumentados de glicose e estresse oxidativo induzem uma reação não enzimática entre açúcares redutores e proteínas, lipídios ou ácidos nucleicos denominada reação de Maillard ou glicação que dá origem aos produtos finais de glicação avançada (AGEs) (SINGH et al., 2014; NOWOTNY et al., 2015).

Os AGEs são um grupo heterogêneo de produtos irreversíveis e volumosos que bloqueiam o sítio catalítico do UPS, diminuindo a atividade proteolítica deste sistema (OTT et al., 2014). Elevados níveis de AGEs induzem a produção de estresse oxidativo e este, por sua vez, acelera a formação dos AGEs, causando disfunção mitocondrial. O acúmulo deles na matriz extracelular dos tecidos contribui com o envelhecimento e com várias doenças crônicas como artrite, diabetes mellitus, doenças cardiovasculares, câncer e doenças neurológicas (BYUN et al., 2017). Dentre os AGEs estão a pentosidina, crossline, carboximetil-hidroxil-lisina (CML), carboxietil-lisina (CEL), hidroimidazolonas derivadas de metilglioxal, frutose-lisina, dímeros de glioxal-lisina e dímeros de metilglioxal-lisina (GKOGKOLOU & BÖHM, 2012).

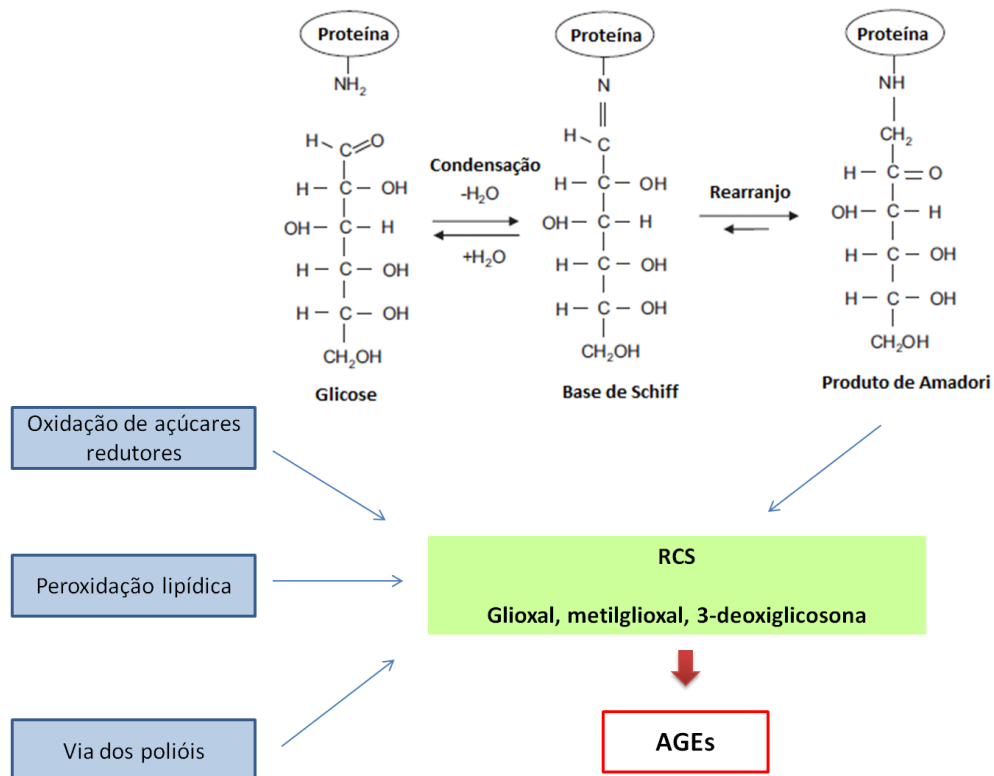
A formação dos AGEs é um processo molecular complexo que envolve várias etapas e requer dias e semanas para concluir (YEH et al., 2017). Uma das vias pelas quais são gerados é através da reação de Maillard, onde um grupo carbonila de açúcares redutores como glicose, frutose ou ribose reage com o grupo aminoterminal de uma proteína, lipídio ou ácido nucleico, gerando uma base instável de Schiff. Esta base sofre rearranjos gerando produtos mais estáveis denominados produtos de Amadori (STIRBAN et al., 2014).

Os AGEs são também gerados pela via glicoxidativa, assim denominada pelo envolvimento de estresse oxidativo, a partir de espécies reativas de carbonila (RCS) dentre as quais se destacam o glioxal, metilglioxal e 3-deoxiglicosona (NOWOTNY et al., 2015).

As RCS são oriundas da oxidação dos produtos de Amadori, da oxidação de açúcares redutores, da via dos polióis, da peroxidação lipídica e dão origem a outros AGEs (**Fig. 5**) (YOUNUS & ANWAR, 2016). Essas espécies podem se ligar aos resíduos de arginina e lisina de proteína, formando ligação cruzada (crosslink) com elas. Além das fontes endógenas, os AGEs também são provenientes de alimentos processados (YEH et al., 2017).

Os AGEs exercem suas funções celulares através da interação com receptores específicos (YANG et al., 2013a). Eles podem interagir com dois tipos de receptores de superfície: receptores scavenger envolvidos na captura, degradação e remoção dos AGEs e os receptores de AGEs (RAGE) que são os mais estudados e estão envolvidos em eventos específicos de sinalização celular (BYUN et al., 2017), ativando várias proteínas sinalizadoras e fatores de transcrição como Src, NADPH oxidases, Ras/ERK1/2, PI3K/PDK1/Akt, p38 MAPK, NF- $\kappa$ B e AP-1 (YANG et al., 2013a).





**Figura 5. Formação de espécies reativas de carbonila (RCS) e AGEs.** Os AGEs são originados pela reação de Maillard (via não oxidativa) e também a partir de RCS (via oxidativa) que são oriundas da oxidação dos produtos de Amadori ou de açúcares redutores, da peroxidação lipídica e também dos intermediários da via dos polióis (Adaptado de STIRBAN et al., 2014 e NOWOTNY et al., 2015).

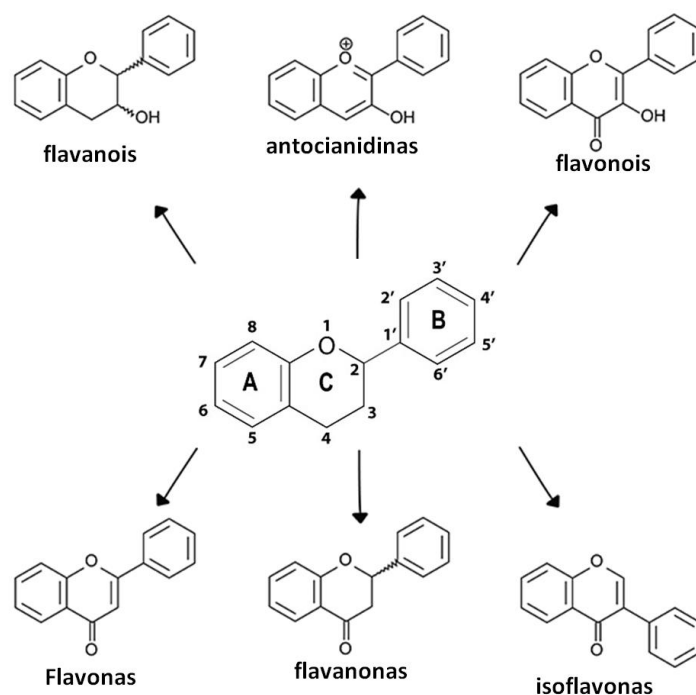
Alguns compostos são conhecidos por inibir o processo de glicação o que é uma estratégia efetiva capaz de suprimir reações inflamatórias e o estresse oxidativo, contribuindo para o retardo do envelhecimento e o surgimento de doenças crônicas (YEH et al., 2017). A primeira de classe de compostos compreende a aminoguanidina (AMG) que é um dos mais usados como agente inibidor da formação de AGEs (OAK et al., 2009). É um derivado da hidrazina que atua sequestrando espécies reativas de carbonila e, conseqüentemente, inibindo a formação de AGEs (JARIYAPAMORNKOON et al., 2013). A AMG previne as complicações da diabetes, principalmente, nefropatia, neuropatia e vasculopatia (YOUNUS & ANWAR, 2016).

Outras classes incluem os medicamentos para diabetes tipo 2 como metformina e pioglitazona, os bloqueadores do receptor de angiotensina, inibidores da enzima conversora de angiotensina e pentoxifilina, além dos antioxidantes como vitamina C e E, íons metálicos e flavonoides (SADOWSKA-BARTOSZ & BARTOSZ, 2015).

## 2.5. FLAVONOIDES

Os flavonoides são metabólitos secundários das plantas produzidos em resposta a fatores ambientais. Eles pertencem a uma família de compostos fenólicos e estão presentes nas frutas, sementes, flores, vegetais, bulbos, tubérculos, ervas, chás e vinhos (MA et al., 2016; CHEN et al., 2016).

Os flavonoides são sintetizados a partir da via dos fenilpropanoides em que há a transformação da fenilalanina em 4-cumaroil-CoA, o qual entra na rota biossintética dos flavonoides (FALCONE FERREYR et al., 2012). A estrutura básica dos flavonoides consiste de dois anéis aromáticos (A e B) conectados por uma cadeia de três carbonos que formam um anel heterocíclico oxigenado (anel C). As principais classes de flavonoides são (**Fig. 6**): flavonóis, flavonóis flavonas, flavanonas, isoflavonas e antocianidinas (LEYVA-LÓPEZ et al., 2016).



**Figura 6:** Estrutura básica das principais classes de flavonoides (adaptado de Higdon, 2005 – Instituto Linus Pauling)

Os flavonoides são bem reconhecidos por seu grande potencial terapêutico, como antioxidantes, anti-inflamatórios antibacterianos, antivirais, antitumorais, antialérgicos e hepatoprotetor (JANG et al., 2017). Porém, a principal e a mais estudada atividade biológica

dos flavonoides é sua atividade antioxidante. Esses compostos atuam como radicais de varredura (scavengers), devido sua habilidade em estabilizar radicais livres ou outras espécies reativas (CHERRAK et al., 2016)

Estudos de estrutura-reatividade têm demonstrado que a atividade antioxidante dos flavonoides está relacionada com algumas características estruturais como: a presença de um grupo catecol no anel B (diidroxilado), a presença de uma ou várias hidroxilas livres, presença de uma dupla ligação entre os carbonos C2-C3 no anel C, a presença de uma 3-hidroxila no anel C ou uma 5-hidroxila no anel A (FLORA, 2009; CHERRAK et al., 2016).

Outro mecanismo potencial pelo qual os flavonoides atuam como antioxidantes é a interação desses compostos com enzimas antioxidantes. Alguns flavonoides ativam enzimas antioxidantes como o sistema NADPH oxidase e a glutathione-S-transferase (CHERRAK et al., 2016). Além deste mecanismo, os flavonoides podem também atuar através da quelação de metais, da redução de radicais de  $\alpha$ -tocoferol, inibição de oxidases e outros (PROCHÁZKOVÁ & WILHELMOVÁ, 2011).

Vários estudos também têm relacionado a característica antioxidante dos flavonoides com sua atividade anti-inflamatória devido a habilidade desses compostos em modular a produção de espécies reativas nos fagócitos que podem gerar altos níveis de ROS/RNS, no local da inflamação, contribuindo com o aumento da injúria local e com o desenvolvimento de doenças crônicas. Dessa forma, os flavonoides utilizam diversos mecanismos antioxidantes e não antioxidantes como a inibição de enzimas envolvidas nas vias de sinalização fagocítica e de produção de ROS/RNS (KHLEBNIKOV et al., 2007).

Diversos estudos têm demonstrado que os flavonoides atuam de forma semelhante aos anti-inflamatórios não esteroidais (AINES), inibindo as enzimas ciclooxigenases (COXs). Mas, além disso, também atuam inibindo a atividade e a expressão gênica de outros mediadores inflamatórios como citocinas e inibindo a ativação de fatores de transcrição como o NF- $\kappa$ B e MAPK (**Tabela 1**) (LEYVA-LÓPEZ et al., 2016).

**Tabela 1:** Atividade anti-inflamatória dos flavonoides

| Flavonoide  | Efeitos   | Mecanismos moleculares envolvidos   | Referência  |
|-------------|---|---|---|
| Apigenina   | Diminuição dos níveis de mRNA de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ e IL-6. Inibição da secreção de CCL5, da expressão de ICAM-1 e VCAM-1 e prostaglandina E <sub>2</sub> (PGE <sub>2</sub> ) | Inibição da ativação de NF- $\kappa$ B pela hipofosforilação da subunidade p65 <i>in vivo</i> . Inibição da ativação de NF- $\kappa$ B e ERK1/2, COX-2 e caspase-1. | SOARES et al., 2006<br>ZHANG et al., 2014a  |
| Quercetina  | Diminuição dos níveis de NO, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$   | Inibição da ativação de NF- $\kappa$ B, AP-1 ou MAPK. Inibição de iNOS, COXs e LOX. Inibição da formação do complexo TLR4/MyD88/PI3K                                | CHEN et al., 2016;<br>LI et al., 2016   |
| Luteolina   | Diminuição da produção de NO e PGE <sub>2</sub> e TNF- $\alpha$ .   | Inibição da ativação de NF- $\kappa$ B e AP-1; inibição da expressão de iNOS e COX-2  | PARK et al., 2013;<br>KANAI et al., 2016  |
| Hesperetina | Diminuição dos níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$ e da expressão de CCL2, CCL5, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ e CXCL5.                       | Inibição dos níveis do mRNA de I $\kappa$ B- $\alpha$ e consequente inibição da ativação de NF- $\kappa$ B.   | FORDHAM et al., 2014  |
| Rutina      | Diminuição do estresse oxidativo<br><br>Diminuição de TNF- $\alpha$ , IL-6  | Aumento da expressão de SOD, CAT e GPx; diminuição da expressão de iNOS<br><br>Diminuição da expressão de p38-MAPK, NF- $\kappa$ B, i-NOS e COX-2                   | AKONDI et al., 2011;KANDEMIR et al., 2015<br>NAFEES et al., 2015; LI et al., 2017 |

### 2.5.1. Naringenina

A naringenina (NAR) ou 5,7,4'-triidroflavanona (**fig. 7**) é uma flavanona encontrada abundantemente em frutas cítricas como laranjas e toranjas (grapefruit) e também na casca de tomates (AKBARZADEH et al., 2016). Possui peso molecular igual a 272.26g/mol e é praticamente insolúvel em água, mas solúvel em solventes orgânicos como álcool (SUMATHI et al., 2015).

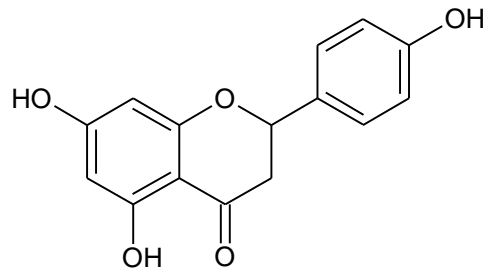
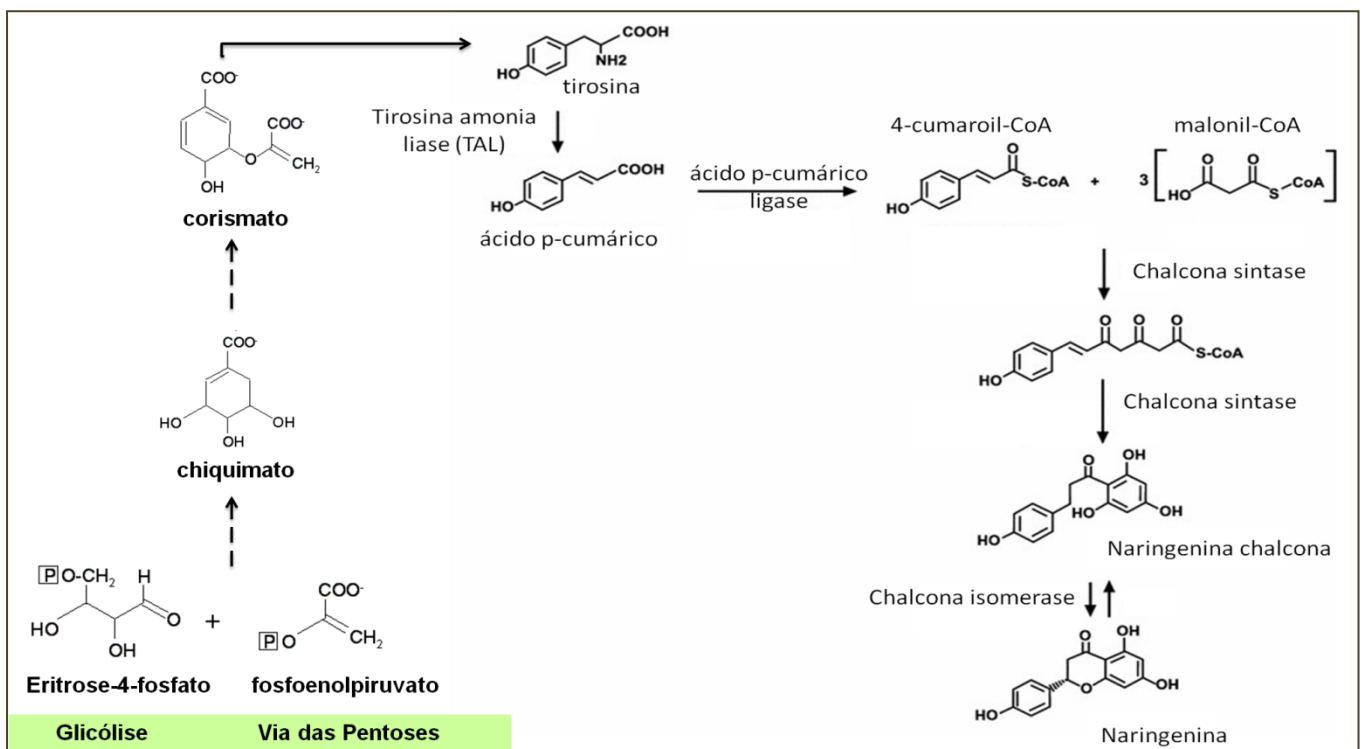


Figura 7: Estrutura química da naringenina (ACD/CHEMSketch)

A naringenina é o ponto de partida para a síntese de outros flavonoides visto que é a primeira a ser sintetizada quando uma molécula de 4-cumaroil-CoA reage com a 3 moléculas de malonil-CoA através da enzima chalcona sintase (**fig. 8**) originando uma naringenina chalcona que posteriormente é convertida a naringenina por uma chalcona isomerase (WU et al., 2014).



**Figura 8. Rota biosintética da naringenina.** Durante a glicólise e a via das pentoses são formados, respectivamente, a eritrose-4-fosfato e o fosfoenolpiruvato. A partir desses metabólitos, vários outros serão formados e darão origem ao chiquimato, corismato e posteriormente aos aminoácidos como fenilalanina e tirosina que entrarão na via dos fenilpropanoides. A tirosina é transformada em ácido p-cumárico que é transformado em 4-cumaroil-CoA. Este junto com 3 moléculas de malonil-CoA dá origem a naringenina chalcona que é, posteriormente, transformada em naringenina (adaptado de Tzin et al., 2013 e Álvarez-Álvarez et al., 2015).

Diversos efeitos farmacológicos têm sido reportados para a naringenina. Dentre estes, pode-se citar os efeitos anti-inflamatório, anticâncer, antiaterogênico e antioxidante (JI et al., 2016).

Quanto o seu potencial antioxidante, é relatado na literatura que a naringenina tem atividade sequestrante sobre o radical ânion superóxido e o radical hidroxila (CAVIA-SAIZ et al., 2010; ALAM et al., 2014) o que se deve ao aumento da expressão de SOD, GPx e CAT pela naringenina (VEZZA et al., 2016; MANCHOPE et al., 2016; MAATOUK ET AL., 2016), além disso tem efeito protetor contra a peroxidação lipídica (LI et al., 2007).

Diversos trabalhos da literatura evidenciam o potencial anti-inflamatório da naringenina através da inibição da produção de mediadores pró-inflamatórios como TNF- $\alpha$  e IL-6 (LIU et al., 2016; PINHO-RIBEIRO et al., 2016), NO e iNOS (VAFEIADOU et al., 2009; YILMA et al., 2013), através da inibição da translocação do NF- $\kappa$ B e fosforilação das enzimas ERK1/2 e p38 das MAPKs (LIU et al., 2012) e através da inibição da expressão da COX-2 (CHAO et al., 2010).

Além desses efeitos, há trabalhos que também relatam a propriedade antiglicante da naringenina como o de Wu e Yen (2005) e Zhang e cols (2014b).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Geral

Obter uma nova entidade química, e a partir desta, elucidar sua estrutura química, explorar suas características físico-químicas e investigar suas atividades biológicas.

#### 3.2. Objetivos Específicos

- ✓ Sintetizar uma nova entidade química a partir da condensação entre naringenina e aminoguanidina.
- ✓ Caracterizar química e físico-quimicamente o novo derivado.
- ✓ Estudar as atividades antioxidante, antiglicante e o efeito anti-inflamatório *in vitro* e *in silico* desta nova molécula.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Materiais

Marca Sigma Aldrich: DPPH, ABTS, glioxal, albumina bovina, frutose, quercetina, rutina, aminoguanidina, LPS (*E. coli* sorotipo 0111:B4), MTT, resazurina DCFDA, DiOC6(3), PMA, lipoxigenase de soja (soybean), NBT, NADH, PMS, EDTA, ferrozina, hidroxilamina hidrocloreada. Outras marcas: azida sódica (Nuclear); RPMI, SBF, penicilina/estreptomicina (Gibco<sup>®</sup>, Life Technologies); kit TNF- $\alpha$  humano (Invitrogen<sup>™</sup>)

### 4.2. Síntese da ACD41

Pesou-se a naringerina (50,8 mg; 0,1866 mmol) em balão de reação de 50 mL e adicionou-se aminoguanidina (51,5 mg; 0,4659 mmol) em 10 mL de EtOH, HCl concentrado (1 mL) e água destilada (1 mL), deixou-se sob agitação e aquecimento ( $\Delta=70$  °C) por 6h. A formação do produto foi acompanhado por CCD usando AcOEt: Acetona: H<sub>2</sub>CO<sub>2</sub> (4:1:0,5) e a reação foi finalizada. A solução foi colocada em um becker para secar totalmente. O resíduo foi dissolvido com água destilada (20 mL) e extraído com AcOEt (3x 20 mL). A solução AcOEt foi lavada com NaHCO<sub>3</sub> (2x 20 mL) e extraída novamente com AcOEt (3x 20 mL). A fase orgânica foi lavada com água destilada (20 mL) e foi seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro. Posteriormente foi filtrada em papel de filtro e evaporada. O resíduo seco foi redissolvido em EtOH (10 mL) adicionado de HCl 1M (10 mL) e deixado em agitação por 1h. A mistura foi evaporada e o resíduo foi recristalizado em EtOH para precipitar o produto da reação na forma de sal de HCl. O derivado ACD41 tem peso molecular igual a 328,33 g/mol e C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> (Adaptado de FUKUMOTO, 2002).

### 4.3. Análise do perfil cromatográfico por CLAE

A análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi efetuada de acordo com MOHEBALI *et al.* (2016) com pequenas modificações, utilizando cromatógrafo líquido da marca Shimadzu, modelo Proeminence com detector UV/VIS em arranjo de diodos. A análise cromatográfica da naringenina e do seu derivado foi obtida utilizando a coluna C<sub>18</sub> 150 mm x 4,6  $\mu$ , a uma temperatura controlada de 25 °C. A fase móvel consistiu em solvente (A) ácido fosfórico a 0,1% (marca Neon) e solvente (B) metanol a 100% (marca



Sigma Aldrich) grau HPLC. Utilizou-se o programa de gradiente como se segue: 0-30 minutos de 5% de B a 100%; 33-35 minutos de 80% de B a 5%. O caudal e o volume de injeção a ser utilizado foi de 1,0 mL/min e 10 µL, respectivamente. Os espectros de UV/VIS foram registrados nos comprimentos de onda entre 200 e 600 nm.

#### 4.4. Elucidação estrutural

A identificação da estrutura química da ACD41 foi realizada através da espectrometria de massas sequencial (ESI-MS/MS-MS) e da ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio nos Laboratórios de espectrometria de massas e RMN da Central Analítica da Universidade Federal do Amazonas. E também por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) na Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

Os espectros de massas foram registrados em espectrômetro do tipo *Íon-trap*, modelo LCQ Fleet (Thermo scientific), operando com fonte de eletron spray (ESI). Já os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  foram obtidos no equipamento modelo Bruker Ascend (500 MHz). A amostra foi solubilizada em DMSO deuterado ( $\text{CD}_3$ )<sub>2</sub>SO e o tetrametilsilano (TMS) foi utilizado como padrão de referência interna. Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm ( $\delta$ ) e as constantes de acoplamento (J) foram registradas em Hertz (Hz).

Os espectros do infravermelho foram registrados em espectrômetro Shimadzu, modelo IR Prestige-21. Os espectros foram obtidos com resolução espectral de  $4\text{ cm}^{-1}$  e 20 varreduras da região de  $400\text{ a }4000\text{ cm}^{-1}$ .

#### 4.5. Análise Térmica

A Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) foi realizada pesando-se aproximadamente 2,0 mg da amostra em cadinho de alumínio, sob atmosfera de nitrogênio, fluxo do gás de purga de 100mL/min, razão de aquecimento de  $10^\circ\text{ C/min}$  com temperatura final de  $250^\circ\text{C}$ .

Já para a análise Termogravimétrica (TG), amostra de aproximadamente 5 mg foi pesada em cadinho de alumina, sob atmosfera de nitrogênio, fluxo do gás de purga de 50 mL/min, razão de aquecimento de  $10^\circ\text{ C/min}$ , com temperatura final de  $900^\circ\text{C}$ .

Para o cálculo da DTG e análise das curvas obtidas foi utilizado o software TA Instruments Universal Analysis 2000.

#### 4.6. Difração de Raio X (DRX)

A caracterização cristalina e perfil cristalino da molécula foram obtidos em difratômetro Bruker, modelo D2 Phaser, utilizando radiação  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda=1,54\text{\AA}$ ) com um filtro de Ni, na variação de  $10\text{-}45^\circ$  ( $2\theta$ ), com passo de  $0,02^\circ$ , corrente de 10 mA, voltagem de 30kV, utilizando um detector Lynxeye, usando a técnica de Difração de Raios-X do pó.

#### 4.7. Cultura Celular

As linhagens de monócitos humanos THP-1 e fibroblastos humanos MRC-5 foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). No Laboratório de Cultura Celular da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas (FCF/UFAM), as células foram cultivadas, respectivamente, em RPMI e DMEM, suplementados com 10% de soro fetal bovino (FBS) e 1% de penicilina-estreptomicina. As células foram incubadas em estufa a  $37^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$ .

Os monócitos THP-1, por serem células em suspensão, foram ativados a macrófagos aderentes com acetato miristato de forbol (PMA) a 200 ng/mL.

#### 4.8. Viabilidade Celular

##### 4.8.1. MTT

A citotoxicidade da ACD41, aminoguanidina e naringenina foi avaliada na linhagem THP-1 pelo método do MTT que é um método colorimétrico baseado na redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), amarelo, em cristais de formazan púrpuros e insolúveis.

Neste ensaio, os monócitos THP-1 foram ativados com PMA e foram plaqueados em placa de 96 poços, a uma densidade de 100.000 células/poço e incubados por 48 horas. Os macrófagos aderentes foram lavados com meio de cultura fresco e deixado em repouso durante 2 dias, com troca de meio diariamente. Posteriormente as células foram tratadas com 1, 10, 100 e 1000 $\mu\text{g/mL}$  das substâncias durante 48 h. Como controle positivo foi utilizado a estaurosporina (Staur - 5 $\mu\text{g/mL}$ ) e controle negativo o meio de cultura e o diluente DMSO (0,1% v/v).

Após o período de tratamento, o meio contendo as substâncias foi removido e as células foram lavadas duas vezes com 100µL de Tampão Fosfato-Salino (PBS) 1X. Após a remoção do PBS, adicionou-se 90µL de meio de cultura RPMI e 10µL de MTT (5mg/mL) nos poços. As células foram incubadas durante 3h e a solução foi, em seguida, removida. Adicionou 100µL de DMSO e a placa foi deixada por 20 minutos sobre agitação, para total dissolução dos cristais de formazan. Por fim, a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 560nm. A porcentagem de células viáveis foi calculada com base no controle negativo (Adaptado de MOSMANN, 1983).

#### **4.8.2. Alamar Blue**

Na linhagem MRC-5, a citotoxicidade das substâncias foi avaliada pelo método do Alamar Blue. O Alamar Blue também conhecido como resazurina, em seu estado oxidado, é azul não fluorescente. Em células viáveis, as enzimas presentes no interior das mitocôndrias reduzem a resazurina em resofurina de cor rosa e fluorescente (RAMPERSAD, 2012).

Neste ensaio as células foram plaqueadas na densidade de  $5 \times 10^3$  células/poço em placas de 96 poços. Após 24 horas de incubação e aderência das células, as mesmas foram tratadas com as substâncias nas concentrações de 12.5, 50, 200, 800 e µg/mL. Como controle positivo de morte foi utilizada a doxorrubicina (10 µg/mL) e como controle negativo, o meio de cultura e o diluente DMSO (0,1% v/v). Após o período de tratamento 24 horas foram adicionados 10 µL de resazurina 0,4% (diluída 1:20). Posterior ao tempo de metabolização da resazurina de 3 horas foi realizada a leitura da fluorescência em espectrofotômetro com excitação em 570 nm e emissão em 610nm. A porcentagem de células viáveis foi calculada com base no controle negativo (NAKAYAMA *et al.* 1997).

#### **4.9. Ensaio antioxidantes**

##### **4.9.1. Atividade sequestrante do radical DPPH<sup>•</sup>**

O ensaio foi realizado segundo metodologia utilizada por Marxen e cols (2007), com modificações. Para a realização do teste, primeiramente, foi calibrada a absorbância do DPPH (2-difenil-1-picril-hidrazila) entre 0,8-1,00 ± 0,1 nm. Posteriormente, 30 µL das substâncias foram adicionados juntamente com 170 µL de DPPH em microplacas de 96 poços. A quercetina (50 µg/mL) foi utilizada como controle positivo. Em seguida, a

microplaca foi incubada por 30 minutos em temperatura ambiente no escuro. Por fim, a placa foi lida em espectrofotômetro (DTX800, Beckman Coulter) a 517 nm. Os cálculos de inibição foram realizados por meio da seguinte fórmula:

$$\% \text{ inibição DPPH} = 100 - (\text{Abs da amostra/média controle}) * 100$$

#### **4.9.2. Atividade sequestrante do radical ABTS<sup>++</sup>**

O ensaio foi realizado segundo metodologia adaptada de Jemli e cols (2016) com modificações. O 2,2'-azino-bis(ácido-etilbenzoalina-6-sulfônico (ABTS) foi, primeiramente, diluído em água destilada e oxidado com persulfato de potássio a 5 mM por 24 horas, no escuro, em temperatura ambiente. 270 µL do ABTS foram adicionados a 30 µL das substâncias. A quercetina (50 µg/mL) foi utilizada como controle positivo. Em seguida, a microplaca foi incubada em temperatura ambiente, no escuro, por 30 minutos. Posteriormente, a leitura da análise foi realizada em espectrofotômetro (modelo DTX800, Beckman Coulter) a 630 nm. Os cálculos de inibição foram realizados por meio da seguinte fórmula:

$$\% \text{ inibição ABTS} = 100 - (\text{Abs da amostra/média controle}) * 100$$

#### **4.9.3. Atividade quelante do ferro**

O ensaio foi realizado segundo metodologia descrita por Ebrahimzadeh e cols (2008). Em placa de 96 poços foram adicionados 200 µL das substâncias, nas concentrações de 31,25 a 1000 µg/mL e 10 µL de cloreto férrico (2mM). A placa foi incubada por 5 minutos a 37°C e posteriormente foi realizada a primeira leitura (A1) em espectrofotômetro a 562 nm. Em seguida foram adicionados 10 µL de hidroxilamina hidrocloreada (300mM) e 30 µL de ferrozina (5mM). A placa foi incubada por 15 minutos a 37°C e, por fim, foi realizada a última leitura (A2). O EDTA (1mg/mL) foi utilizado por controle positivo. A porcentagem de inibição foi calculada pela fórmula:

$$\% \text{ inibição da quelação do ferro} = 100 - (\text{A2-A1 da amostra/A2-A1 controle}) * 100$$

#### **4.9.4. Varredura do radical ânion superóxido**

O ensaio foi realizado segundo metodologia descrita por Santos e cols (2014). Foram preparados inicialmente os reagentes NBT (250 µM), NADH (390 µM) e PMS (10 µM) em

tampão Tris-HCl (16 mM, pH=8,0) e, em seguida, em uma placa de 96 poços foram adicionados: 30 µL das substâncias nas concentrações de 31,25 a 1000 µg/mL, 90 µL de NADH e 90 µL de NBT. A absorbância inicial (A1) foi obtida a partir da leitura da microplaca a 560 nm. Em seguida foram adicionados 90 µL de PMS. A placa foi então incubada a 25 °C por 5 minutos e, logo após, realizada a leitura da absorbância final (A2) a 560 nm. A atividade foi calculada através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ inibição de superóxido} = 100 - (A2-A1 \text{ da amostra}/A2-A1 \text{ controle}) * 100$$

#### **4.9.5. Detecção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) intracelular**

Os níveis de ROS intracelular foram analisados através da sonda fluorescente 2'7'-Acetato Diclorofluoresceína (DCFDA). A DCFDA difunde-se pela membrana celular e é hidrolisada por esterases intracelulares, formando a diclorofluoresceína (DCF, não fluorescente), que reage com ROS intracelular, formando a diclorofluoresceína oxidada (oxDCF, fluorescente) (TETZ et al., 2013).

Células THP-1 foram plaqueada na densidade de  $10 \times 10^6$ /mL em placas de 96 poços (ativadas com PMA). Após 48 horas, as células THP-1 foram tratadas com as substâncias nas concentrações de 50 e 200 µg/mL juntamente com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50µM) como indutor de ROS. Após 24 horas a DCFDA (25µM) foi adicionada às células por 45 minutos, a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub>, ao abrigo da luz. As placas foram raspadas para remoção das células e os níveis de fluorescência foram medidos em espectrofotômetro (Chameleao™ V Multitechnology Plate Reader) com 450nm de excitação e 535nm de emissão (Adaptado de KUMAR et al., 2015a).

#### **4.9.6. Determinação do Potencial Elétrico de Membrana Mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ )**

Células THP-1 foram plaqueadas na densidade de  $10 \times 10^6$ /mL em placas de 96 poços (ativadas com PMA). Após 48 horas, as células foram tratadas com as substâncias nas concentrações de 50 e 200µg/mL. Após 24 horas, as células foram incubadas com DiOC6 (2µM) em estufa por 20 minutos, e posteriormente, foram retiradas da placa (raspagem) e lavadas 3x com 100µL de PBS 1X. Os níveis de florescências foram medidos em espectrofotômetro (Chameleao™ V Multitechnology Plate Reader) com excitação de 450nM e emissão 500nM (adaptado de JIN et al., 2009).

#### **4.10. Ensaio de glicação *in vitro***

O ensaio foi realizado segundo as metodologias descritas por Malakul e Sirinat Pengnet (2017) e Esmaeili (2014) com modificações.

Primeiramente foi preparada uma solução de Tampão Fosfato a 200mM, pH 7,4 com conservante Azida Sódica 3mM. Posteriormente foram obtidas as soluções de do Glicoxal a 30mM, da Frutose a 0,5M e da albumina a 10 mg/mL em Tampão Fosfato na concentração e pH supracitados. Posteriormente, em uma placa escura de 96 poços, foram adicionados em cada poço 135 µL do açúcar ou do glicoxal, 135 µL da proteína e 30 µL das substâncias.

Em seguida foi realizada a leitura por fluorescência, em espectrofotômetro (DTX800, Beckman Coulter), com excitação em 365nm e emissão em 465nm que correspondeu ao dia 0 da reação. Após a leitura, a placa foi vedada e incubada na estufa a 37 °C por 24h para a reação com glicoxal, e 5 dias para a reação com frutose, quando a leitura foi realizada novamente para avaliar a inibição da reação pela amostra. Como controle positivo foi utilizado a quercetina. Em seguida, foram efetuados os cálculos por meio da seguinte fórmula: % Inibição AGEs = 100 - (luminescência da amostra / luminescência do controle) x 100

#### **4.11. Inibição da ativação de macrófagos por LPS e produção de TNF- $\alpha$**

Células THP-1 foram plaqueadas em placa de 96 poços, na quantidade 10<sup>6</sup> células por poço. Para a indução de diferenciação dos monócitos a macrófagos, acetato de forbol miristato (PMA) foi adicionado à suspensão celular. Após 24h de incubação as células não aderidas foram eliminadas e as aderentes foram carenciadas pela redução na concentração de soro fetal bovino no meio de cultura de 10% para 0,5%. Após 16h de carenciamento as células foram tratadas com os diferentes compostos nas concentrações 1, 5 e 10 µg/mL. Após 2h horas as células foram ativadas com LPS (GUSMAN et al., 2015).

Em seguida, após 6 horas, o sobrenadante foi coletado e submetido a ensaio imunoenzimático (ELISA – Invitrogen™) para a quantificação dos níveis de TNF- $\alpha$ .

#### **4.12. Inibição da lipoxigenase (LOX) *in vitro***

A atividade da lipoxigenase foi mensurada baseada na formação de hidroperóxido originado pela oxidação enzimática do ácido linoleico (Adaptado de D'ALMEIDA et al., 2013).

No ensaio foram misturados 1750  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de sódio (20 mM), 50  $\mu\text{L}$  de lipoxigenase (0,1 mg/mL) e 50  $\mu\text{L}$  (20  $\mu\text{g/mL}$ ) das substâncias que foram incubados por 5 minutos a temperatura ambiente. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 234 nm durante 5 minutos. Antes de iniciar a leitura, o aparelho foi zerado, foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  do ácido linoleico (40  $\mu\text{M}$ ) e a leitura iniciada imediatamente.

A porcentagem de inibição foi calculada a partir do controle positivo sem adição das substâncias.

#### 4.13. Ancoragem molecular

O procedimento de ancoragem molecular foi realizado com a estrutura cristalográfica da proteína ciclooxigenase-2 (COX-2), complexada com o ligante rofecoxib (RCX). Essa proteína, de origem humana (*Homo sapiens*), está disponível no banco de dados *Protein Data Bank* (PDB) (código: 5KIR), com resolução de 2,7Å. (ORLANDO & MALKOWSKI, 2016). As estruturas tridimensionais (3D) dos ligantes rofecoxib e naringenina foram obtidas a partir do banco de dados ZINC (IRWIN et al., 2012) e a estrutura 3D do derivado ACD41 foi gerada através do software *Marvin Sketch* (CHEMAXON, 2017).

A otimização geométrica de todos os ligantes foi feita através do método semi-empírico PM7 (STEWART, 2013) disponível no software *MOPAC2016* (STEWART, 2016). A preparação do receptor e dos ligantes foi alcançada através do software *Autodock tools* (MORRIS et al., 2009), sendo o *grid box* definido em relação ao sítio ativo ocupado pelo ligante RCX. O procedimento de ancoragem foi então realizado através do software *Autodock Vina* (TROTT & OLSON, 2010). Os resultados foram processados através do software *Discovery Studio* (Discovery Studio Visualizer, 2016).

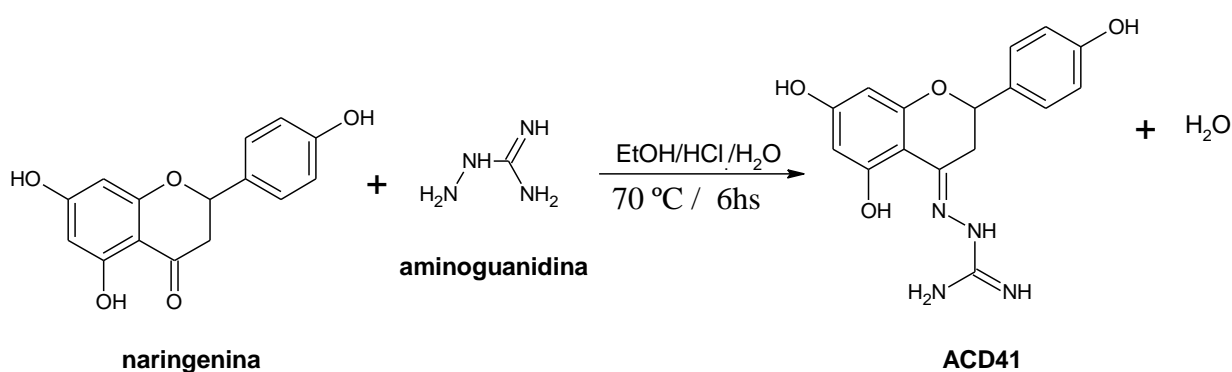
#### 4.14. Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  D.P.M. (desvio padrão da média) de dois ensaios independentes. As médias foram analisadas pelo software GraphPad Prisma® 6.0 através da análise de variância one-way ou two-way ANOVA seguidas, respectivamente, dos testes de Tukey ou Dunnett de comparações múltiplas com nível de significância de  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Síntese e obtenção da molécula

A reação de condensação entre a naringenina e aminoguanidina (**Fig. 9**) deu origem à molécula *(2E)*-2-[5,7-diidroxí-2-(4-hidroxifenil)-2,3-dihidro-4*H*-cromen-4-ilideno] hidrazina carboximidamida (ACD/ChemSketch), a qual foi codificada como ACD41. A molécula apresentou-se como um sólido cristalino (**Fig. 18**) de coloração cinza com rendimento de 81%.



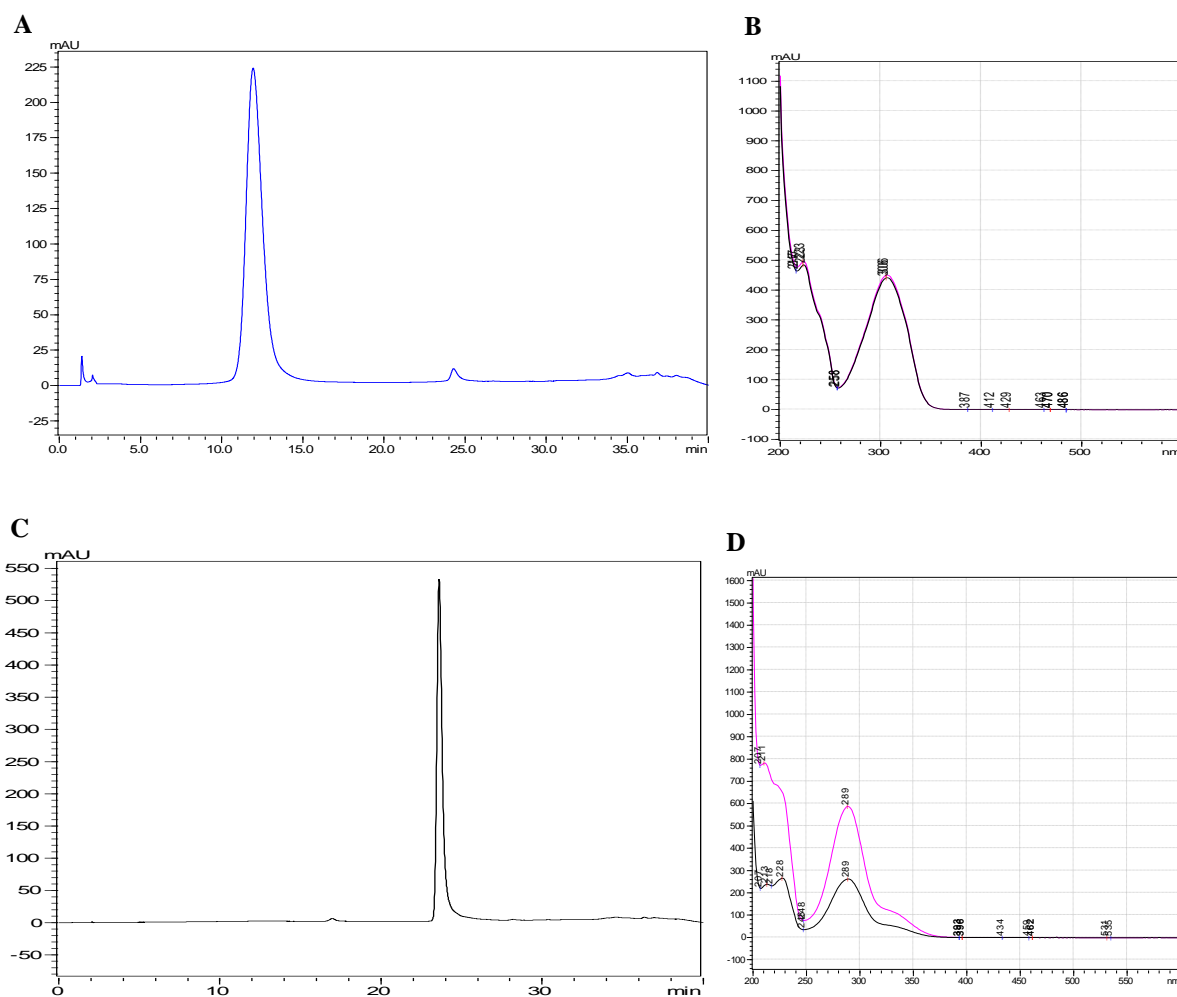
**Figura 9:** Reação de condensação entre naringenina e aminoguanidina em ambiente ácido com etanol, ácido clorídrico concentrado e água, sob refluxo a 70° C, durante 6 horas, originando a ACD41.

A ACD41 foi submetida à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de fase reversa para avaliar, de modo qualitativo, sua pureza e confirmar a reação de síntese.

De acordo com os cromatogramas da **fig. 10** observa-se que a ACD41 apresentou um perfil cromatográfico com um pico predominante no tempo de 11,87 minutos diferente da naringenina que apresentou tempo de retenção de 24,24 minutos.

A ordem de eluição na CLAE de fase reversa é baseada no aumento da hidrofobicidade dos solutos (AGUILAR, 2004), ou seja, quanto maior o tempo de retenção, mais apolar é a substância. Com isso, pode-se inferir, com base nos tempos de retenção, que a ACD41 é menos hidrofóbica ou mais hidrossolúvel que a naringenina, característica esperada visto que a aminoguanidina é uma substância solúvel em água (ABCAM - ab120123).



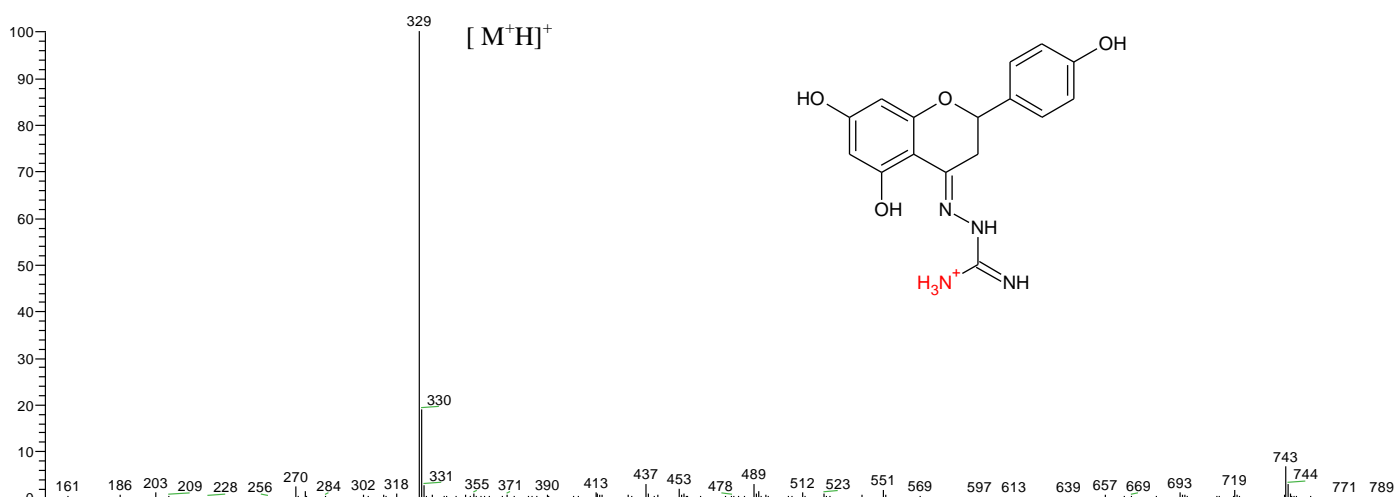


**Figura 10:** Cromatogramas e espectros de absorção UV-VIS da ACD41 (A e B) e da naringenina (C e D). As amostras foram injetadas (10  $\mu$ L) em cromatógrafo líquido acoplado ao detector UV/VIS com arranjo de diodos (HPLC/UV-VIS), marca Shimadzu, modelo Proeminence.

Os espectros de absorção UV-VIS de ambas as moléculas foram semelhantes, apresentando absorção máxima na região ultravioleta, com  $\lambda_{\text{máx}}$  igual a 306 nm para ACD41 e 289 nm para naringenina

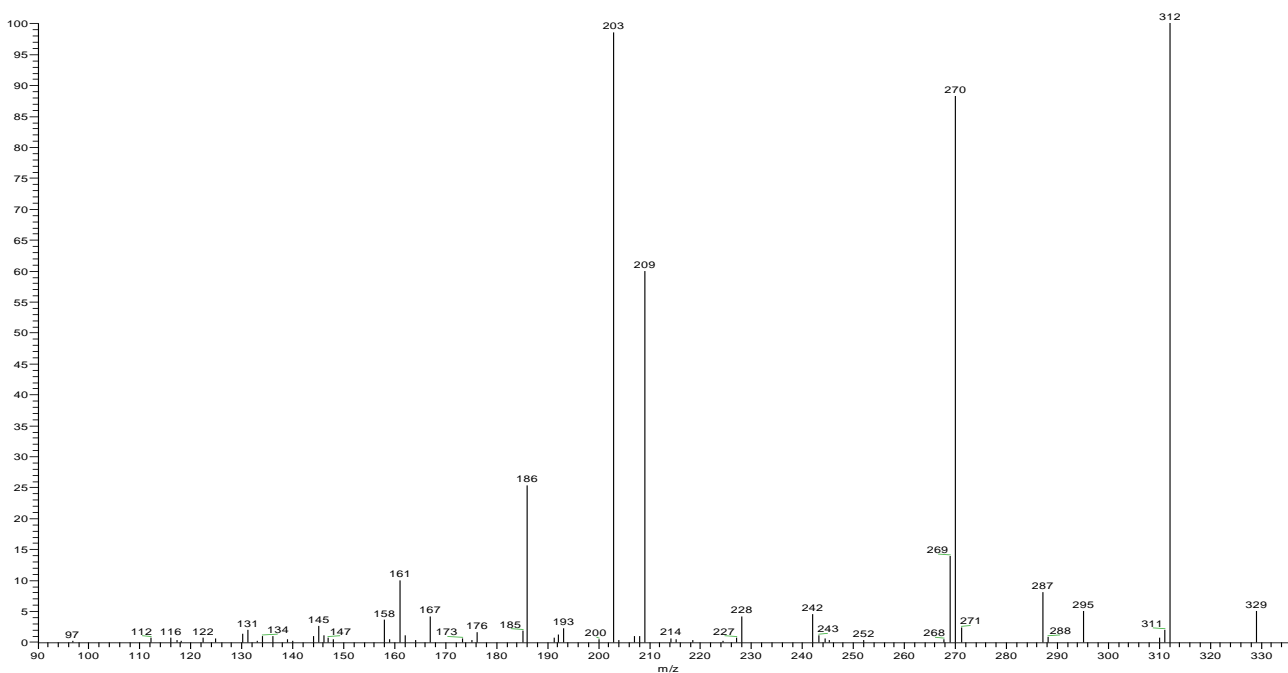
## 5.2. Determinação estrutural

O peso molecular esperada para esta substância era, aproximadamente, de 328,33g/mol. Logo, a molécula foi submetida à análise por espectrometria de massas (ESI-MS). O espectro de íons totais, modo positivo, (**Fig. 11**) revelou a presença de um pico base de  $m/z$  329 correspondente à massa esperada da molécula sintetizada já que no modo positivo há o acréscimo de uma unidade de massa devido à adição de um próton na molécula.



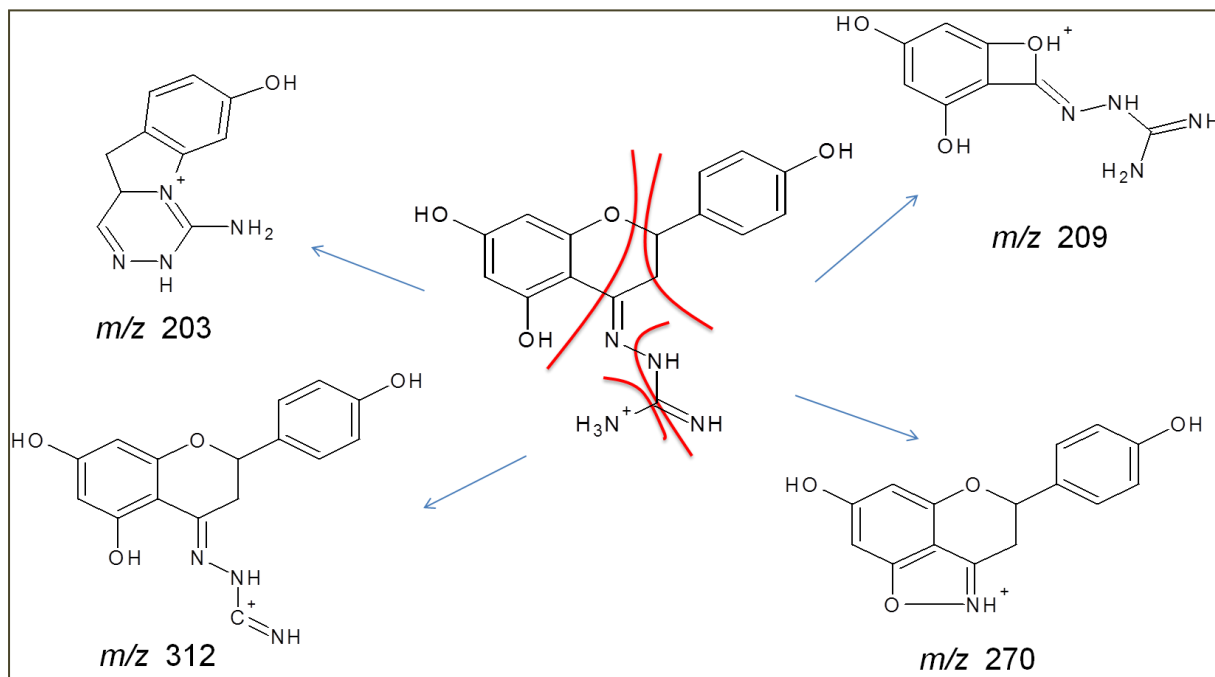
**Figura 11:** Espectro de massas da molécula ACD41 no modo positivo  $[M+H]^+$ , registrado no espectrômetro tipo *Íon-trap*, modelo LCQ Fleet (Thermo scientific) com fonte de eletronspray (ESI).

O espectro de fragmentação (MS/MS) do íon de  $m/z$  329 (**Fig. 12**) revelou a presença dos fragmentos com  $m/z$  312 e  $m/z$  270, os quais podem ser resultantes das perdas, respectivamente, de um grupo amina e da guanidina, evidenciando a reação entre naringenina e aminoguanidina.



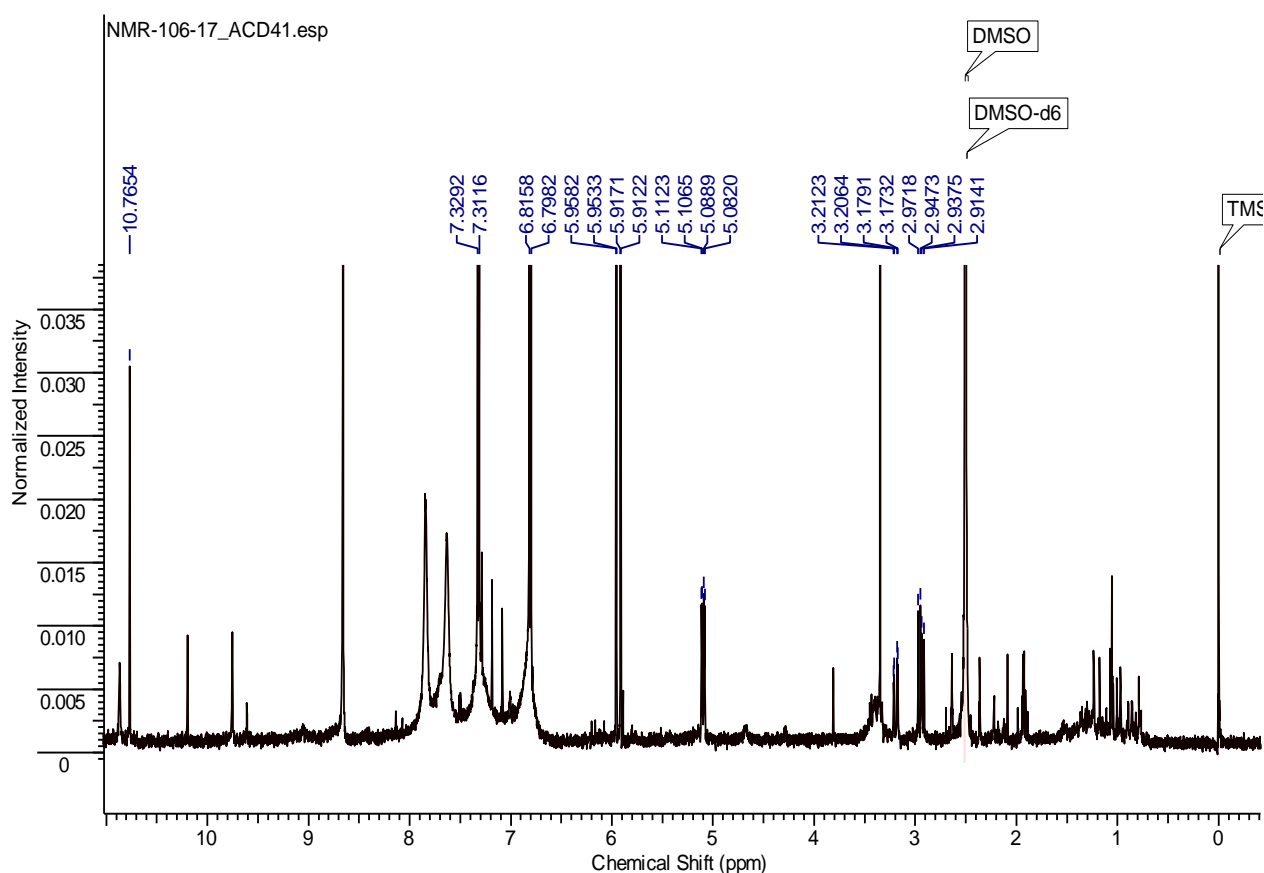
**Figura 12:** Espectro MS/MS do íon  $m/z$  329 registrado no espectrômetro tipo *Íon-trap*, modelo LCQ Fleet (Thermo scientific) com fonte de eletronspray (ESI).

Também se observou a presença do fragmento de  $m/z$  209 que deve ser proveniente da perda do grupo 4-etilfenol da naringenina que já é um padrão de fragmentação característica de flavonoides, denominada reação de retro-Diels-Alder como proposto por Li e cols (2013b) e Brito e cols (2014). Por fim, observou-se a presença do fragmento de  $m/z$  203 que pode ser referente à perda do grupo 1,3,5-trihidroxibenzeno da naringenina. A proposta de fragmentação para o íon  $m/z$  329 é mostrada na **figura 13**.



**Figura 13:** Proposta de fragmentação do íon  $m/z$  329.

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**figura 14 e tabela 2**), o derivado ACD41 apresentou perfil com sinais da naringenina (Andrade et al., 2010) e aminoguanidina (Fukumoto et al. 2002) onde observou-se singletos em  $\delta$ 10,77 ( $\text{NH}_2$ ), sinais dupletos em  $\delta$ 5,10 ppm (12 e 3,2 Hz) para H-2, sinais multipletos em  $\delta$ 2,94 (16,6 e 12 Hz) e 3,17 ppm (16,6 e 3,2 Hz) para H-3 e um singlete em  $\delta$ 5,92 (2,4 Hz) e  $\delta$ 5,95 ppm (2,4 Hz) atribuído aos hidrogênios H-6 e H-8, respectivamente. Sinais dupletos em  $\delta$ 7,32 (8,8 Hz) e  $\delta$ 6,81 ppm (8,8 Hz) para os hidrogênios H-2' e H-6' e H-3' e H-5' do anel B.



**Figura 14:** Espectro RMN de  $^1\text{H}$  da molécula ACD41 obtido no equipamento modelo Bruker Ascend (500 MHz). A amostra foi solubilizada em DMSO deuterado  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$  e o tetrametilsilano (TMS) foi utilizado como padrão de referência interna.

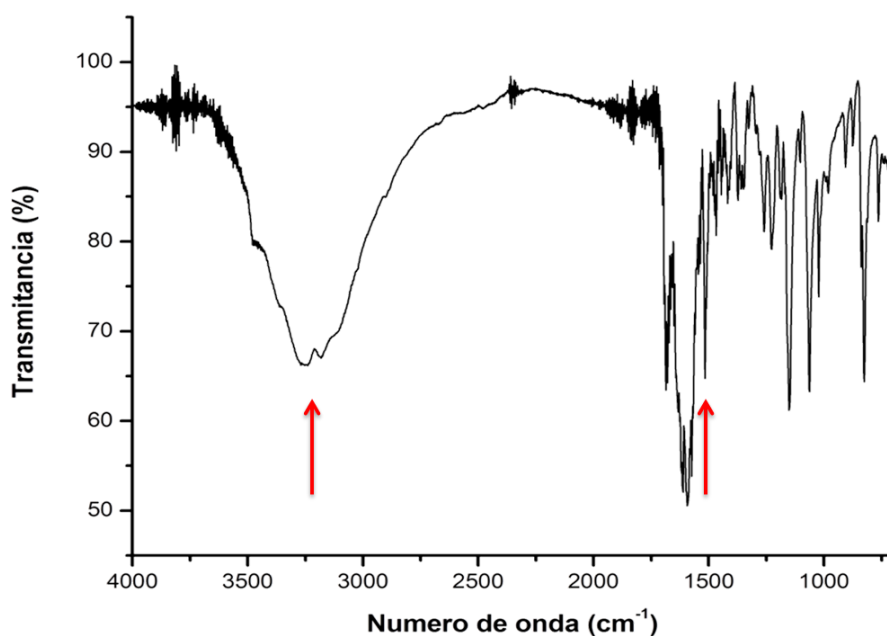
**Tabela 2.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  da ACD41 ( $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ; DMSO)

|           | $\delta^1\text{H}$ (ppm)                          | $\delta^1\text{HRef. 1,2}$ |                       | $\delta^1\text{H}$ (ppm) | $\delta^1\text{HRef. 1,2}$ |
|-----------|---|----------------------------|-----------------------|--------------------------|----------------------------|
| <b>1</b>  | -   | -                          | <b>11</b>             | -                        | -                          |
| <b>2</b>  | 5,10dd (12 e 3,2 Hz)                              | 5,24dd                     | <b>1'</b>             | -                        | -                          |
| <b>3</b>  | 2,94dd (16,6 e 12 Hz) ; 3,17dd<br>(16,6 e 3,2 Hz) | 2,99dd; 3,03dd             | <b>2'</b>             | 7,32d (8,8 Hz)           | 7,23d                      |
| <b>4</b>  | -   | -                          | <b>3'</b>             | 6,81d (8,8 Hz)           | 6,74d                      |
| <b>5</b>  | -   | -                          | <b>4'</b>             | -                        | -                          |
| <b>6</b>  | 5,92d (2,4 Hz)                                    | 5,81s                      | <b>5'</b>             | 6,81d (8,8 Hz)           | 6,74d                      |
| <b>7</b>  | -   | -                          | <b>6'</b>             | 7,32d (8,8 Hz)           | 7,23d                      |
| <b>8</b>  | 5,95d (2,4 Hz)                                    | 5,81s                      | <b>NH</b>             | -                        | -                          |
| <b>9</b>  | -   | -                          | <b>=NH</b>            | -                        | 12,31s                     |
| <b>10</b> | -   | -                          | <b>NH<sub>2</sub></b> | 10,77s                   | 10,77s (1)                 |

**Fonte:** (1) Fukumoto et al. 2002; (2) Andrade et al., 2010.

De forma complementar à sua elucidação estrutural, a ACD41 foi submetida à espectroscopia no infravermelho para identificar os grupos funcionais que compõem a molécula (**Fig. 15**).

A ACD41 sendo um derivado da naringenina apresenta algumas regiões de absorção no infravermelho semelhantes à esta molécula e já descritas pela literatura. Estas bandas características referem-se ao estiramento do  $\text{-C=O}$  ( $1600\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$ ), estiramento C-O ( $1080\text{-}1250\text{ cm}^{-1}$ ), alongamento d OH ( $3100\text{-}3290\text{ cm}^{-1}$ ), alongamento da ligação C-C ( $1150\text{ cm}^{-1}$ ) e o estiramento C=C ( $1450\text{-}1630\text{ cm}^{-1}$ ) (TURKKAN et al., 2012; KUMAR et al., 2015b). Em específico, a molécula apresenta pico forte na região de  $3000\text{ a }3500\text{ cm}^{-1}$  corresponde a picos combinados de vibração de alongamento que ocorre nas ligações O-H e N-H (ZHANG et al., 2016b). O pico em  $1490\text{ cm}^{-1}$  pertence a vibração de flexão N-H.



**Figura 15:** Espectro no infravermelho da ACD41 por FTIR, utilizando espectrômetro Shimadzu, modelo IR Prestige-21.

Todos os dados apresentados referentes à elucidação estrutural e a análise cromatográfica evidenciaram a reação entre a naringenina e aminoguanidina, originando a molécula ACD41.

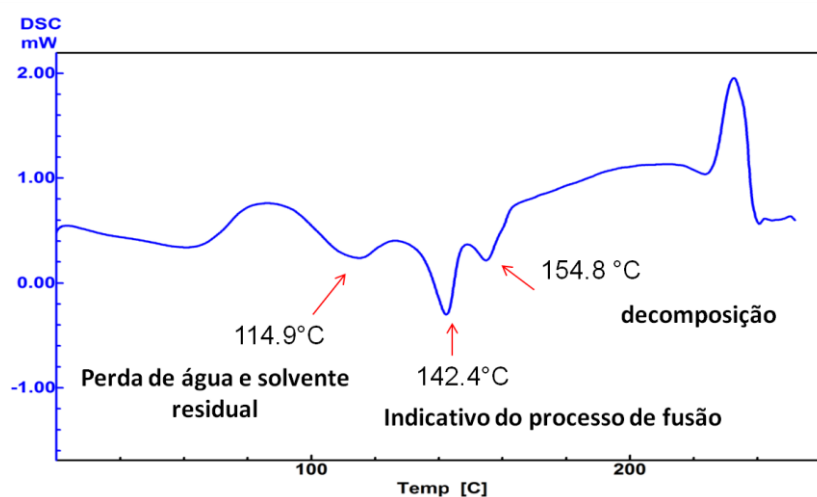
Uma pesquisa foi realizada no SciFinder, um conjunto de bases de dados desenvolvida pelo Chemical Abstracts Service (CAS) que dispõe de ferramentas de busca de moléculas, a fim de verificar se a ACD41 está entre os derivados da naringenina já registrados no CAS.

Dentre os inúmeros derivados da naringenina presentes no SciFinder, quarenta moléculas apresentaram semelhança com a ACD41 em relação ao padrão de substituição do oxigênio da carbonila no anel C por um átomo de nitrogênio. Porém, nenhuma dessas é igual a ACD41, indicando que, pela primeira vez, essa molécula está sendo descrita e que muito provavelmente seja inédita.

### 5.3. Análise Térmica

A ACD41 foi explorada quanto às suas características físico-químicas através da Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e da análise Termogravimétrica (TG) para verificar a estabilidade da molécula em função da temperatura.

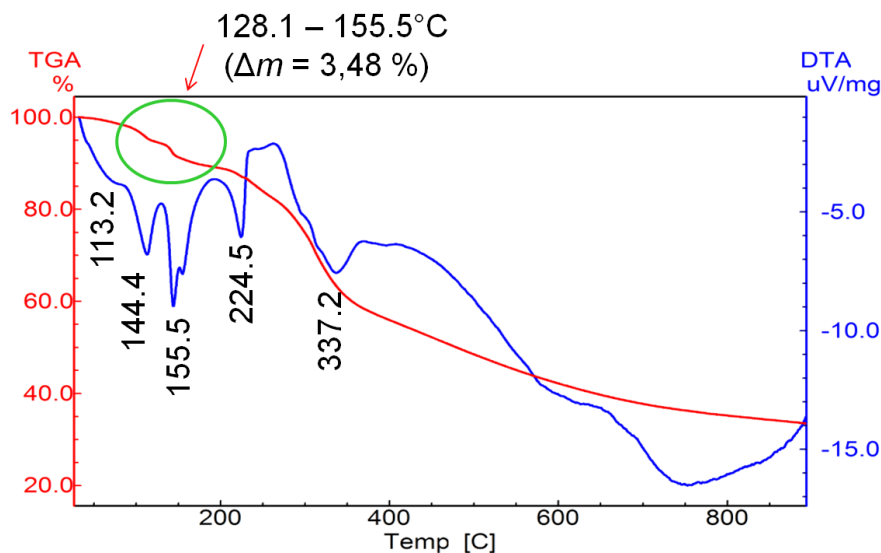
Analisando a curva de DSC da ACD41 (**Fig. 16**), observa-se inicialmente um evento endotérmico sutil atribuído à perda de água e solvente residual do processo de síntese com  $T_{onset}$  de 95.3°C °C ( $\Delta H = - 19,30 \text{ J.g}^{-1}$ ,  $T_{peak} = 114.9^\circ\text{C}$ ). O segundo pico endotérmico indicativo da fusão da molécula apresenta  $T_{onset}$  de 134.2°C °C ( $\Delta H = - 18,23 \text{ J.g}^{-1}$ ,  $T_{peak} = 142.4^\circ\text{C}$ ). Substâncias de caráter cristalino costumam apresentar ponto de fusão bem definido. Já o terceiro evento endotérmico é atribuído à decomposição e ocorre com  $T_{onset}$  de 149.5°C ( $\Delta H = - 7,83 \text{ J.g}^{-1}$ ,  $T_{peak} = 154.8^\circ\text{C}$ ).



**Figura 16:** Curva DSC do ACD41 na razão de aquecimento 10°C.min -1

Esta fusão seguida de decomposição pode ser confirmada quando associada à curva TG (**Fig.17**), a qual se observa uma perda de massa na faixa de temperatura entre 128.1 –

155.5°C ( $\Delta m = 3,48\%$ ), sendo esta perda de massa atribuída à decomposição da ACD41. Após a decomposição a linha de base da curva DSC progride no sentido exotérmico.



**Figura 17.** Curva TG e DTA do ACD41 na razão de aquecimento  $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$

A curva DTA, para a ACD41 em atmosfera de nitrogênio com razão de  $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  apresentou 5 eventos endotérmicos, sendo suas temperaturas de pico  $113,2^{\circ}\text{C}$ ,  $144,4^{\circ}\text{C}$ ,  $155,5^{\circ}\text{C}$ ,  $224,5^{\circ}\text{C}$  e  $337,2^{\circ}\text{C}$ , respectivamente. O primeiro pico é relacionado à evaporação de água ou outros solventes presentes, o segundo está atrelado à fusão da molécula e o terceiro e o quarto eventos podem ser atribuídos à decomposição e volatilização dos produtos de degradação.

Assim como discutido anteriormente, quando se associa o segundo e o terceiro pico ao TG, verifica-se uma leve perda de massa em torno de 3,48% relacionada à primeira etapa de decomposição. O derivado ACD41 apresenta menor resistência térmica quando comparado a naringenina, segundo Yang e cols (2013b), onde os eventos de fusão e degradação da naringenina iniciam-se em torno de  $255^{\circ}\text{C}$ .

Na tabela 3, é possível verificar numericamente todas as etapas dos eventos térmicos e calorimétricos da molécula.

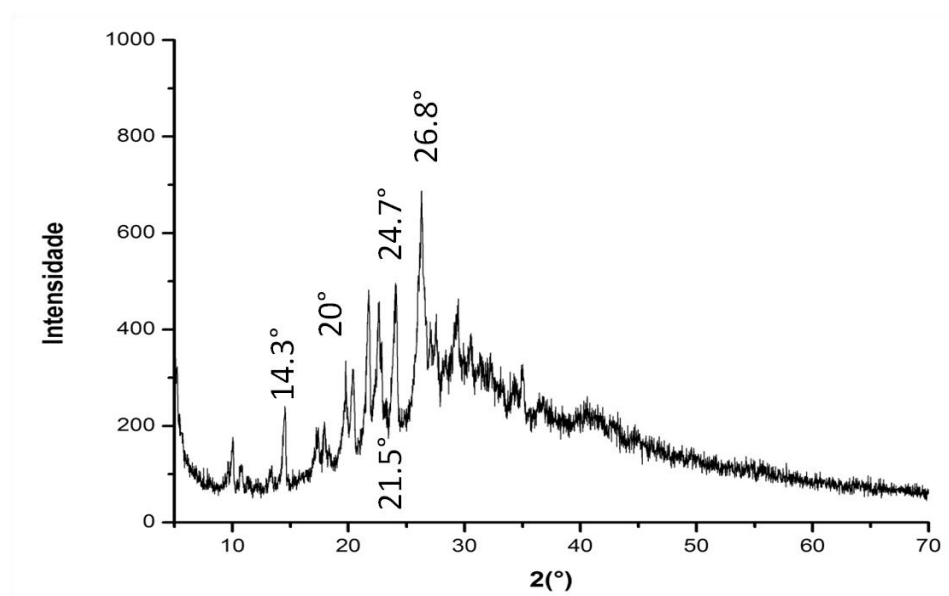
**Tabela 3** - Dados termoanalíticos do ACD 41 na razão de 10°C.min<sup>-1</sup>

| Transição | Evento | DSC           |              |                                   | TG                 | m/<br>% | DTA           |              |                                   |
|-----------|--------|---------------|--------------|-----------------------------------|--------------------|---------|---------------|--------------|-----------------------------------|
|           |        | Tonset/<br>°C | Tpeak/<br>°C | $\Delta H$ /<br>J.g <sup>-1</sup> | $\Delta T$ /<br>°C |         | Tonset/<br>°C | Tpeak/<br>°C | $\Delta H$ /<br>J.g <sup>-1</sup> |
| 1         |        | 95.3          | 114.9        | -19.30                            | 98.05 - 115.7      | 3.69    | 95.6          | 113.2        | -250.65                           |
| 2         | Endo   | 134.2         | 142.4        | -18.23                            | 128.1 – 155.5      | 3.48    | 137.1         | 144.4        | -97.61                            |
| 3         |        | 149.5         | 154.8        | - 7.83                            | 192.7 – 236.6      | 5.53    | 150.9         | 155.5        | -0,02                             |
| 4         |        |               |              |                                   | 260.6 – 365.0      | 24.29   | 211.7         | 224.5        | -278.63                           |
| 5         |        |               |              |                                   |                    |         | 285.5         | 337.2        | -948.33                           |

#### 5.4 Difração de Raio X

Os aspectos morfológicos da ACD41 foram explorados através da difração de raio X (DRX).

O difratograma (**Fig. 18**) demonstra o perfil cristalino do protótipo, caracterizado por diversas reflexões cristalinas de diferentes intensidades, no plano de difração até 34°. Uma reflexão cristalina de maior intensidade destaca-se em torno de 26.8°, além de reflexões acentuadas em 21.5° e 24.7° e de média intensidade em 14.3° e 20°. Este padrão de cristalinidade corrobora com os descritos por Khan e cols (2014) para a naringerina, segundo o autor, o padrão de difração desta mostrou-se predominantemente cristalino e indicado por reflexões cristalinas intrínsecas em 10.7°, 15.7° e 20.3°, entretanto, o protótipo apresenta uma cristalinidade mais acentuada.

**Figura 18:** Difratograma da ACD41



Este grande número de reflexões cristalinas são características de substâncias de caráter cristalino, o que pode ser confirmado através de técnicas microscópicas como a MEV. Pode-se associar o perfil cristalino de um fármaco ou de uma molécula, à sua baixa solubilidade em água, pois substâncias cristalinas, apresentam caráter hidrofóbico, devido à maior dificuldade de penetração da água nas moléculas dos cristais, por serem mais organizadas do que em substâncias amorfas (MURDANDE et al., 2011). Dessa forma, pode-se inferir que mesmo que a adição da aminoguanidina tenha aumentado a hidrossolubilidade da molécula, ela ainda manteve suas características hidrofóbicas.

## 5.5. Atividades biológicas

### 5.5.1. Viabilidade Celular

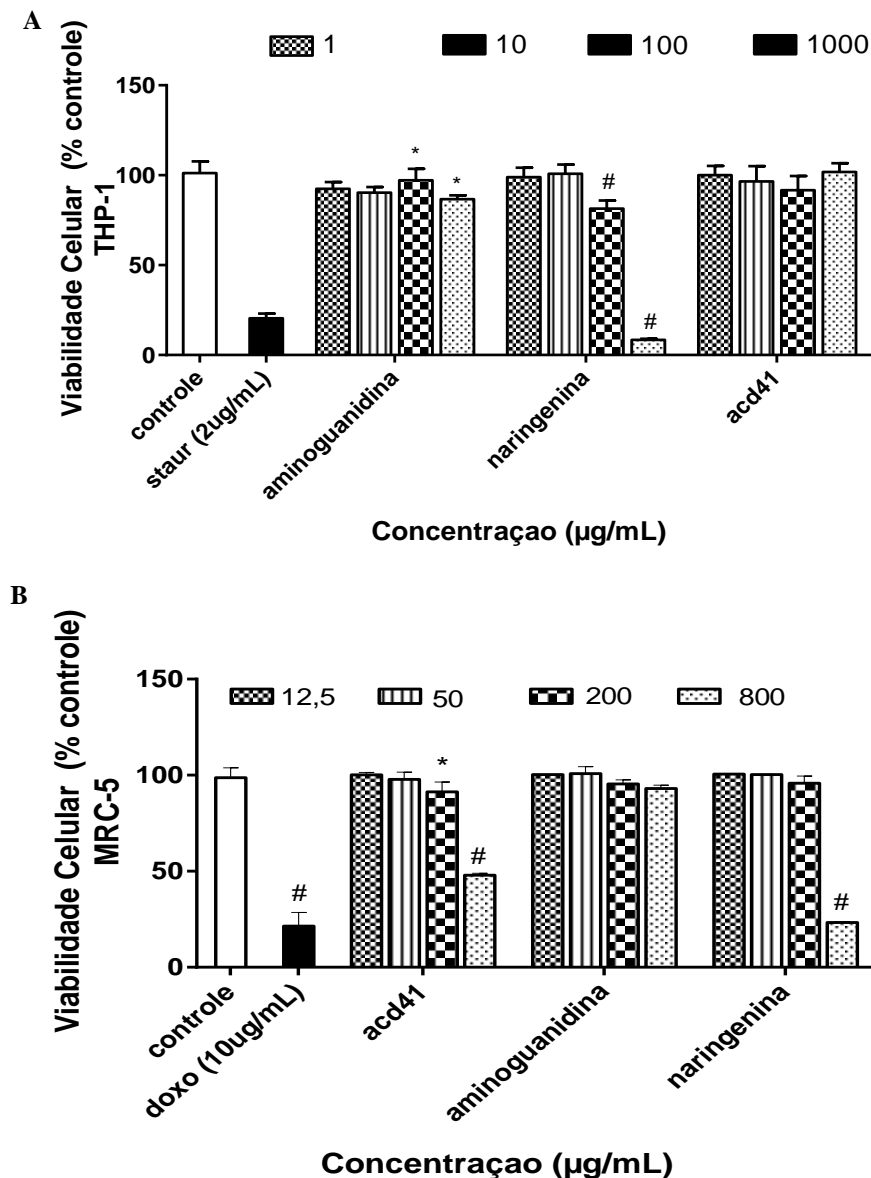
A fim de conhecer a segurança da nova molécula em testes *in vitro*, a ACD41 foi submetida a ensaios de citotoxicidade nas linhagens celulares de monócitos humanos THP-1 e fibroblastos humanos MRC-5.

Uma curva dose-resposta da ACD41, aminoguanidina e naringenina foi construída para verificar quais as concentrações seguras para os outros ensaios celulares e também para calcular a concentração que inibe a viabilidade em 50% ( $CI_{50}$ ).

As substâncias foram testadas na linhagem THP-1, a mesma utilizada para os outros ensaios, nas concentrações de 1, 10, 100 e 1000  $\mu\text{g/mL}$  por 48 horas pelo método do MTT. E na linhagem MRC-5 foram testadas nas concentrações de 12.5, 50, 200 e 800  $\mu\text{g/mL}$  por 24 horas pelo método do Alamar Blue.

Como mostrado na **figura 19A**, a ACD41 e AMG apresentaram, em todas as concentrações, viabilidade superior a 80% e  $CI_{50}$  maior que 1000  $\mu\text{g/mL}$ . A NAR, somente na concentração de 1000  $\mu\text{g/mL}$ , apresentou viabilidade inferior a 80% e  $CI_{50}$  igual a  $253,95 \pm 5,02$   $\mu\text{g/mL}$  em monócitos THP-1.

Nos fibroblastos MRC-5 (**Fig. 19B**), a AMG apresentou viabilidade superior a 80% em todas as concentrações testadas com  $CI_{50}$  superior a 1000  $\mu\text{g/mL}$ . A ACD41 e a NAR, somente na concentração de 800  $\mu\text{g/mL}$ , apresentaram viabilidade inferior a 80% com  $CI_{50}$  igual a  $767,4 \pm 18,71$   $\mu\text{g/mL}$  e  $524,45 \pm 12,23$   $\mu\text{g/mL}$  respectivamente.



**Figura 19: Viabilidade celular.** ACD41, AMG e NAR foram testadas em células THP-1 por 48 horas e MRC-5 por 24 horas. Dados expressos como média  $\pm$  desvio padrão analisados por two-way ANOVA seguido do teste de Dunnett. \*  $p < 0,05$ . #  $p < 0,0001$  do controle

A ISO 10993-5 (2009) é uma padronização internacional dos testes de citotoxicidade *in vitro* que determina alguns parâmetros quantitativos e qualitativos de avaliação da citotoxicidade, dentre os quais, os primeiros são preferíveis. De acordo com esta padronização, quando a porcentagem de células viáveis está acima de 80% considera-se nenhuma citotoxicidade; entre 80 e 60% baixa; 60 e 40% moderada e abaixo de 40% alta citotoxicidade.

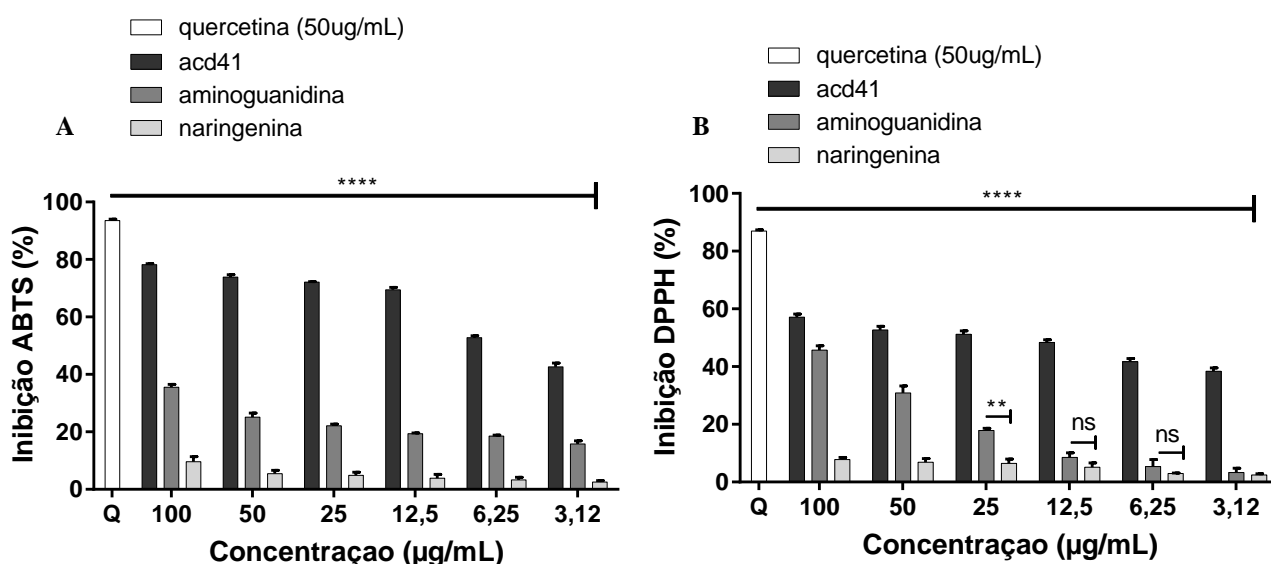
De acordo com estes parâmetros, a ACD41 apresentou moderada e nenhuma citotoxicidade, respectivamente, em MRC-5 e THP-1. A aminoguanidina apresentou nenhuma

citotoxicidade nas concentrações testadas em ambas as células. E a naringenina apresentou alta citotoxicidade nas concentrações de 800 e 1000  $\mu\text{g/mL}$  para MRC-5 e THP-1 respectivamente. Esses dados estão de acordo com os estudos reportados por Park e cols (2008) e Shi e cols (2015) que demonstraram que a naringenina diminuía a viabilidade a partir de 200  $\mu\text{g/mL}$  em células THP-1. E também com o estudo de Zingarelli e cols (1997) que não reporta citotoxicidade para a aminoguanidina em concentrações superiores a 3000  $\text{mM}$ .

Além disso, esses resultados refletem a baixa citotoxicidade dessas substâncias, corroborando com seus altos valores de  $\text{CI}_{50}$  quando comparadas a estaurosporina (staurosporine) com  $\text{CI}_{50}$  igual a 6,16  $\mu\text{g/mL}$  (MAUGG et al., 2015) e doxorubicina igual a 5,71  $\mu\text{g/mL}$  (YONG et al., 2015). Dessa forma, todas as concentrações utilizadas para os ensaios posteriores não interferiram nos resultados apresentados.

### 5.5.2. Atividade Antioxidante

A capacidade antioxidante da ACD41, aminoguanidina e naringenina foi avaliada, por ensaios colorimétricos, através da atividade sequestrante dos radicais  $\text{DPPH}^{\bullet}$  e  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  (**Fig. 20 A-B**), inibição da formação do radical superóxido e inibição da quelação do ferro (**Fig. 21**) Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição.



**Figura 20:** Atividade sequestrante do radical ABTS (A) e do radical DPPH (B). Dados expressos como média  $\pm$  desvio padrão analisados por one-way ANOVA seguido do teste de Tukey. \*\*\*\*  $p < 0,0001$  – todas as concentrações foram estatisticamente significativas em relação ao controle quercetina. \*\*  $p < 0,05$  e nenhuma significância (ns) entre aminoguanidina e naringenina.

No ensaio do ABTS, a ACD41 apresentou  $CI_{50}$  igual  $5,26 \pm 0,10 \mu\text{g/mL}$  em comparação a AMG e NAR que apresentaram, respectivamente,  $CI_{50}$  igual a  $1.025,5 \pm 1,73 \mu\text{g/mL}$  e  $1.080 \pm 3,07 \mu\text{g/mL}$ . Já no ensaio DPPH, a ACD41 obteve  $CI_{50}$  igual a  $8,33 \pm 0,49 \mu\text{g/mL}$ , enquanto a AMG e NAR apresentaram  $CI_{50}$  igual a  $86,73 \pm 1,05 \mu\text{g/mL}$  e  $122.731,5 \pm 2,95 \mu\text{g/mL}$ .

Já se sabe que capacidade antioxidante dos flavonoides está relacionada com suas hidroxilas. Porém, não somente o número de hidroxilas livres, mas também a posição que elas ocupam é importante para atividade antioxidante. A naringenina possui algumas hidroxilas livres, dentre as quais, uma está no C5 do anel A cuja posição é uma das exigidas para a capacidade antioxidante (FLORA, 2009).

Essa característica estrutural, talvez, seja o porquê da naringenina ser considerada um fraco antioxidante contra os radicais ABTS e DPPH (WYBRANOWSK et al., 2013) como pode ser observado nos valores de  $CI_{50}$  comparados com os da literatura:  $630 \pm 0,02 \mu\text{M}$  para ABTS e  $9.990 \pm 0,01 \mu\text{M}$  para DPPH (BRODOWSKA & SYKUŁA, 2016).

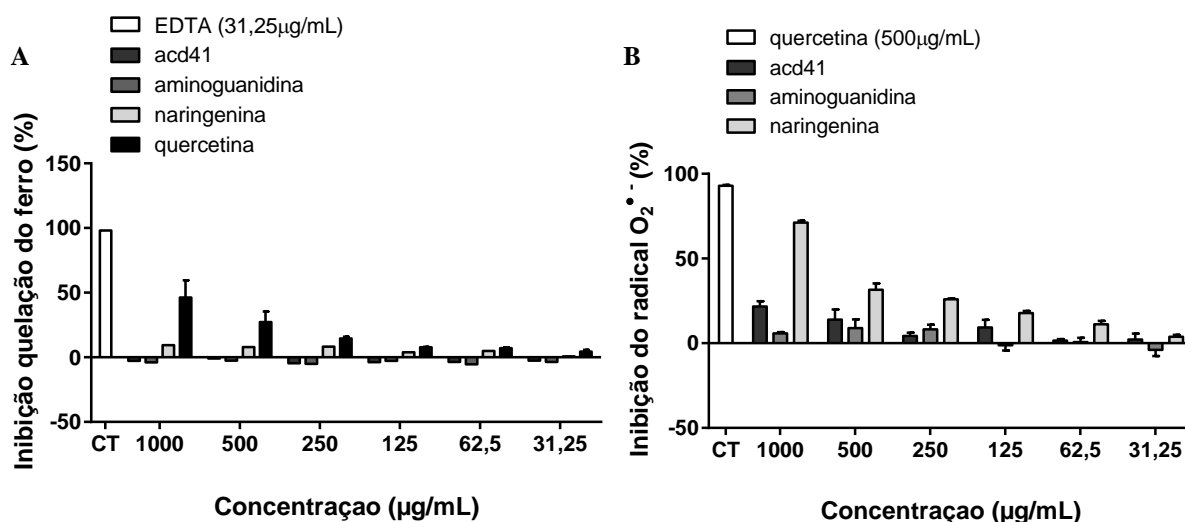
A aminoguanidina, por sua vez, é também considerada um antioxidante em algumas condições *in vitro*, como na inibição da peroxidação lipídica e na inibição da enzima induzida óxido nítrico sintase (iNOS) (KARATAS et a., 2011). Porém, mesmo sendo considerada como um agente nucleofílico, pela presença dos grupamentos aminas (THORNALLEY, 2003), de forma semelhante à naringenina, a aminoguanidina também se apresentou como um fraco antioxidante contra o radical ABTS, mas apresentou uma atividade moderada contra o radical DPPH em relação à naringenina e ACD41.

As aminas são um dos reagentes mais importantes nas sínteses orgânicas. Elas apresentam características básicas e sua nucleofilicidade é fortemente dependente dos solventes em que são solubilizadas (KANZIAN et al., 2009). As aminas apresentam um par de elétrons desemparelhados e por isso são capazes de funcionar como nucleófilos ou doadoras de elétrons que participam de reações com eletrófilos ou aceptores de elétrons (DERUITER, 2005) como é o caso das reações envolvendo os radicais DPPH e ABTS.

Portanto, pode-se inferir que a adição dos grupamentos aminas da aminoguanidina na estrutura do flavonoide juntamente com suas hidroxilas pode ter potencializado a atividade da ACD41 contra os radicais DPPH e ABTS visto que a mesma apresentou maior capacidade antioxidante frente à NAR e AMG com valores menores de  $CI_{50}$ .

Além da atividade sequestrante dos radicais citados, as moléculas também foram testadas quanto à sua capacidade de inibir a produção do radical ânion superóxido e inibir a quelação do ferro. Nestes ensaios, somente a naringenina apresentou uma inibição melhor da

formação do radical superóxido, enquanto a ACD41 e aminoguanidina não apresentaram atividade quando comparadas com os controles positivos quercetina e EDTA, respectivamente (**Fig. 21**).



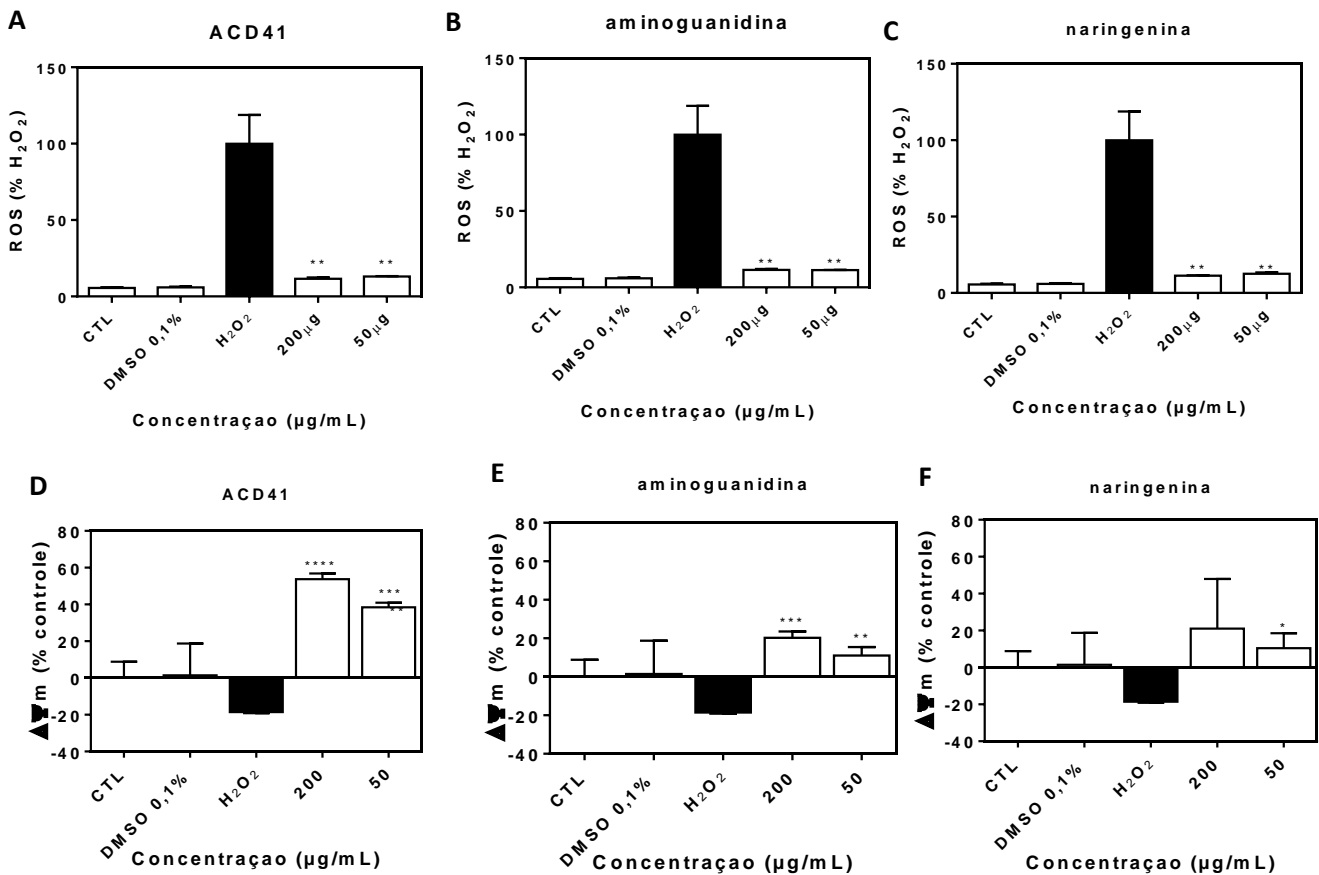
**Figura 21:** Inibição da quelação do ferro (A) e inibição da formação do radical ânion superóxido  $O_2^{\bullet-}$  (B). Dados expressos como média  $\pm$  desvio padrão analisados por one-way ANOVA seguido do teste de Tukey.

Após o resultado prévio dos ensaios colorimétricos, o possível potencial antioxidante da ACD41 também foi avaliado num ambiente celular induzido ao estresse oxidativo com peróxido de hidrogênio.

Na **figura 22** é possível observar que todas as moléculas, nas concentrações testadas, conseguiram reverter os níveis elevados de ROS (**Fig. 22A-C**), bem como conseguiram preservar a membrana mitocondrial (**Fig. 22D-F**).

Os níveis elevados de ROS podem gerar a ativação dos mecanismos de controle através dos sistemas antioxidantes que atuarão de forma a minimizar os possíveis danos causados pelas espécies reativas, transformando-as em produtos menos reativos como no caso do peróxido de hidrogênio que é reduzido à água pelas enzimas catalase ou glutathione peroxidase (LI et al., 2013).

Caso haja falha ou deficiência dos sistemas antioxidantes, os níveis elevados de ROS podem induzir mais ainda a produção de ROS (LI et al., 2013), gerando espécies reativas mais tóxicas que poderão causar danos irreversíveis às células como o radical hidroxila gerado a partir do  $H_2O_2$  (PIECHOTA-POLANCZYK & FICHNA, 2014).



**Figura 22: Potencial antioxidante em ambiente celular induzido ao estresse oxidativo.** Os monócitos THP-1 foram induzidos ao estresse com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50 μM) e tratados com as moléculas nas concentrações de 200 e 50 μg/mL por 24 horas. Para detecção dos níveis de ROS intracelular (A-C) foi utilizada sonda fluorescente DCF-DA e para mensuração do potencial de membrana (ΔΨ<sub>m</sub>) (D-F) a sonda DioC6(3). Dados são expressos como média ± desvio padrão (em relação ao controle) analisados por two-way ANOVA seguido do teste de Dunnett. \* e \*\* p < 0,05 \*\*\* p = 0,0001 \*\*\*\* p < 0,0001 em relação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Dentre esses danos celulares está a disfunção mitocondrial que é caracterizada, sobretudo, por valores anormais de potencial de membrana (ΔΨ<sub>m</sub>) (BAGKOS et al., 2014). A manutenção do ΔΨ<sub>m</sub> é fundamental para o desempenho normal e sobrevivências das células. Durante períodos prolongados de estresse oxidativo ocorre uma brusca queda de potencial de membrana (mais negativo) que pode resultar na abertura irreversível de poros de transição de permeabilidade que induzirão o processo apoptótico (ŠKÁRKA & OŠŤÁDAL, 2002).

Neste contexto, foi possível observar que os sistemas antioxidantes celulares, sozinhos, não foram efetivos em diminuir os altos níveis de ROS como visto no controle positivo somente com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Porém, no tratamento dessas células com ACD41, AMG e NAR

observou-se que todas as moléculas conseguiram diminuir os níveis de ROS, bem como favoreceram a integridade mitocondrial e celular através da manutenção do potencial de membrana (positivo), corroborando a estreita relação entre esses dois fatores.

Os resultados destes testes são condizentes com outros trabalhos na literatura que apresentam a eficácia da naringenina e da aminoguanidina em diminuir os níveis de ROS e também aumentar o potencial de membrana. São exemplos os trabalhos realizados por Kapoor e cols (2012) que observaram o papel efetivo da naringenina em prevenir a apoptose celular induzida por hiperglicemia e o trabalho realizado por Muthaiah e cols (2013) que avaliaram o papel neuroprotetor da naringenina na neurotoxicidade induzida por carbaril em células de neuroblastoma murino.

Da mesma forma, Alizadeh e cols (2016) avaliaram o efeito antioxidante da aminoguanidina ao inibir a produção de NO, aumentando a motilidade, a viabilidade e potencial de membrana dos espermatozoides de ratos com varicocele.

### 5.5.3. Atividade antiglicante

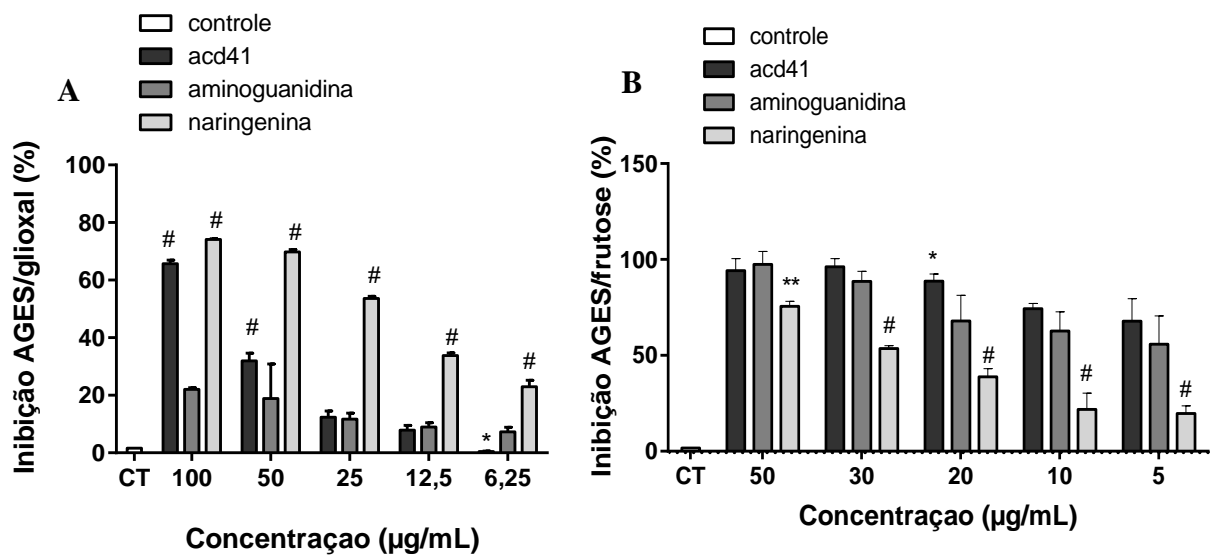
AGEs são importantes na prática clínica pois estão associados com o estresse oxidativo e com a inflamação que são processos envolvidos na patogênese de muitas doenças crônicas, incluindo doenças cardiovasculares, diabetes, doença renal e doenças neurodegenerativas. (URIBARRI et al., 2015).

Baseado na importância clínica dos AGEs e na relação destes com o estresse oxidativo, bem como na estrutura molecular da ACD41 que contempla a naringenina e aminoguanidina que são substâncias já relatadas na literatura como agentes antiglicantes (WU & YEN, 2005; MEEPROM et al., 2013), principalmente a AMG que já é estabelecida na prática clínica, foi explorada a capacidade antiglicante da ACD41.

Na **figura 23** é possível observar que na formação de AGEs via glioxal, a ACD41 somente apresentou uma melhor inibição na concentração de 100 µg/mL semelhante à naringenina. Em menores concentrações apresentou um baixo perfil de inibição semelhante à aminoguanidina. Nesta via, a ACD41, AMG e NAR apresentaram  $CI_{50}$ , respectivamente, igual a  $72,23 \pm 2,28$  µg/mL,  $1.394 \pm 9,26$  µg/mL e  $23,54 \pm 1,02$  µg/mL.

Já na formação de AGEs via frutose, ambas ACD41 e AMG apresentaram um melhor perfil de inibição enquanto a NAR manteve o mesmo comportamento anterior com  $CI_{50}$ , respectivamente, igual a  $2,58 \pm 1,67$  µg/mL,  $5,28 \pm 3,19$  µg/mL e  $25,09 \pm 3,09$  µg/mL. Esses dados condizem com o trabalho de Meepprom e cols (2013) que demonstram que a

aminoguanidina, a 5 mM, apresenta 87,3% de inibição da glicação entre albumina e frutose, com o trabalho de Wu & Yen (2005) que relata  $CI_{50}$  igual a 4,1  $\mu\text{g/mL}$  para inibição da glicação entre albumina e glicose e com o estudo de Gutierrez (2012) que apresenta um valor de  $CI_{50}$  igual a 195  $\mu\text{g/mL}$  para inibição da glicação com metilglioxal. O estudo de Zhang e cols (2014b) relata para a naringenina inibição superior a 70% na glicação entre caseína e glicose.



**Figura 23: Atividade antiglicante.** ACD41, AMG e NAR foram avaliadas quanto a sua capacidade de inibir as reações de glicação *in vitro* com glioxal (A) e frutose (B). Dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão (em relação ao controle) analisados por two-way ANOVA seguido do teste de Dunnett. \*  $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$  e #  $p < 0,0001$  em relação a aminoguanidina.

Os AGEs podem ser formados por um via não oxidativa que é classicamente caracterizada pela reação de Maillard entre um açúcar redutor e uma proteína com formação dos produtos de Amadori ou por uma via oxidativa conhecida como reação de glicoxidação pelo envolvimento de ROS (NOWOTNY et al., 2015).

Os produtos de Amadori podem sofrer oxidação e dar origem a espécies reativas de carbonila (RCS) que podem também se originar da oxidação de açúcares redutores como durante a autooxidação da glicose e a via dos polióis e também durante a peroxidação lipídica dando origem a outros AGEs (YOUNUS & ANWAR, 2016).

Neste trabalho, duas vias foram exploradas. Uma via mais precoce envolvendo a frutose, e outra mais avançada já envolvendo uma espécie reativa de carbonila, o glioxal.

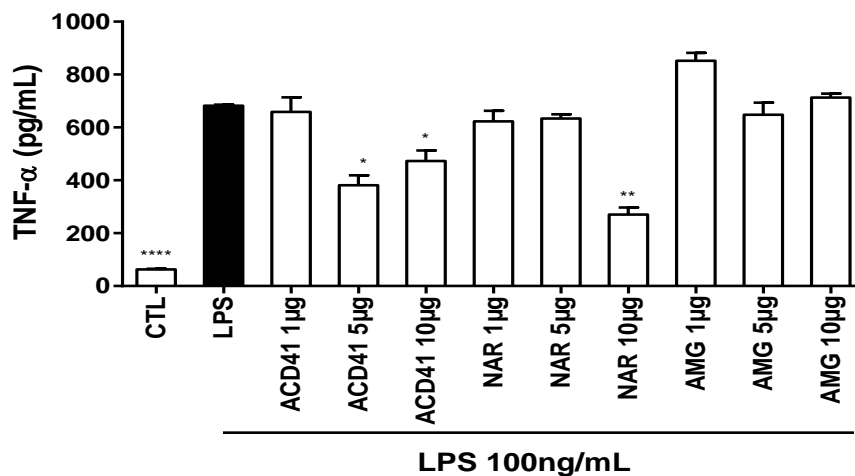


Ambas foram inibidas pela ACD41, porém aquela que envolveu a frutose apresentou melhor perfil de inibição contra a formação de AGEs.

Este comportamento pode indicar que a molécula preveniu a oxidação do açúcar redutor bem como preveniu os efeitos das RCS, corroborando as informações da literatura que afirmam que as características antiglicantes dos flavonoides podem estar associadas com suas propriedades antioxidantes (YEH et al., 2017). Então, neste contexto, é possível que a ACD41 também tenha apresentado este potencial antiglicante devido suas características antioxidantes.

#### 5.5.4. Atividade inibitória sobre a ativação de macrófagos e produção de TNF- $\alpha$

Os resultados anteriores evidenciaram um possível potencial antioxidante da ACD41 ao reduzir os níveis de ROS, conduzindo-nos a investigar a possível atividade anti-inflamatória desta molécula, partindo do pressuposto que os ROS atuam como moléculas sinalizadoras e como mediadores da inflamação (MITTAL et al., 2014). Em macrófagos ativados por LPS foi realizada a mensuração da produção de TNF- $\alpha$ , uma das principais citocinas envolvidas no processo inflamatório (HORIUCHI et al., 2010).



**Figura 24: Efeito inibitório na produção de TNF- $\alpha$ .** Macrófagos derivados de monócitos humanos (THP-1) foram ativados com LPS e tratados com ACD41, NAR e AMG nas concentrações de 1, 5 e 10  $\mu$ g/mL por 24 horas. Dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão (em relação ao LPS) analisados por two-way ANOVA seguido de teste de Dunnett \*  $p < 0,05$ . \*\*  $p < 0,005$ . \*\*\*\*  $p < 0,0001$  em relação ao LPS.

Como esperado, pelos diversos trabalhos relatando o potencial anti-inflamatório da naringenina (LIU et al., 2016; PINHO-RIBEIRO et al., 2016), esta molécula apresentou inibição na produção de TNF- $\alpha$  na concentração de 10  $\mu\text{g/mL}$  (**Fig. 24**), enquanto a ACD41 inibiu nas concentrações de 5 e 10  $\mu\text{g/mL}$  em relação ao controle positivo LPS. Em contraste, a AMG não apresentou efeito inibitório nas concentrações testadas.

Apesar da sutil inibição contra a produção de TNF- $\alpha$ , como mostrado na **figura 24**, a ACD41, ainda sim, pode apresentar um potencial anti-inflamatório, pois mesmo em baixas concentrações apresentou uma inibição que variou entre 35 a 39% em relação ao LPS.

Com isso, um possível mecanismo anti-inflamatório pode ser proposto baseado na via de sinalização do TNF- $\alpha$  que é um dos principais mediadores pró-inflamatórios (WAJANT et al., 2003) cuja produção é induzida, principalmente, pela ativação de NF- $\kappa\text{B}$  (PARAMESWARAN & PATIAL, 2010).

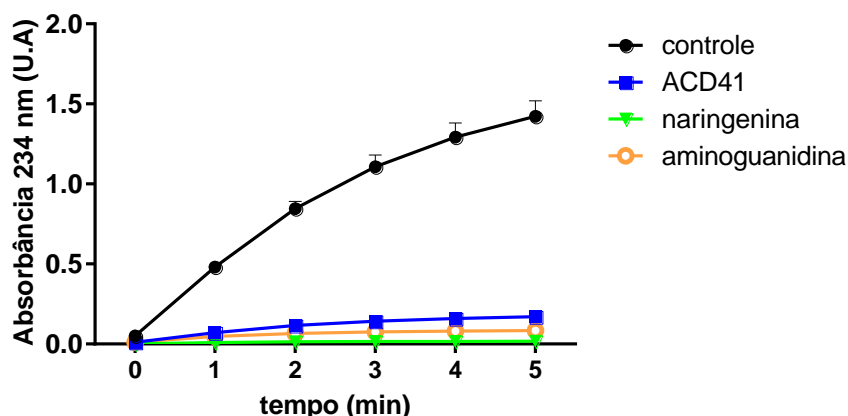
Então, de forma subjetiva, é possível inferir que uma das vias pelas quais a ACD41 exerça seu efeito anti-inflamatório seja através da inibição da ativação de NF- $\kappa\text{B}$ , semelhante ao relatado para a naringenina (YILMA et al., 2013; LIM et al., 2013).

#### **5.5.5. Inibição da lipoxigenase (LOX) *in vitro***

Alguns estudos relatam a capacidade da naringenina em inibir a produção de eicosanoides através da inibição da lipoxigenase (LOX) (MIRZOEVA & CALDER, 1996; D'ALMEIDA et al., 2013).

A lipoxigenase oxida ácidos graxos insaturados que contém o sistema cis,cis-1,4-pentadieno como os ácidos araquidônico e linoleico, dando origem a hidroperóxidos. A LOX contém um átomo de ferro não-heme capaz de capturar o elétron de um átomo hidrogênio, produzindo um intermediário radical de ácido graxo que reage com o oxigênio triplete, gerando o radical peroxil. Após várias reações é gerado o hidroperóxido caracterizado pelo sistema 1-cis,3-trans-dieno que é fortemente absorvido na região ultravioleta diferente do sistema 1,4-dieno (FUKUSHIGE et al., 2005).

A atividade da LOX foi mensurada através da quantificação de hidroperóxidos formados após a oxidação do ácido linoleico pela enzima antes e após o tratamento com a ACD41, AMG e NAR (**Fig. 25**).



**Figura 25:** Produção de hidroperóxidos. A atividade enzimática da lipoxigenase foi mensurada através da produção de hidroperóxidos gerados a partir da oxidação do ácido linoleico (40  $\mu$ M) antes e após a adição de ACD41, AMG e NAR (20  $\mu$ g/mL). A quantidade de hidroperóxidos foi mensurada em espectrômetro a 234 nm.

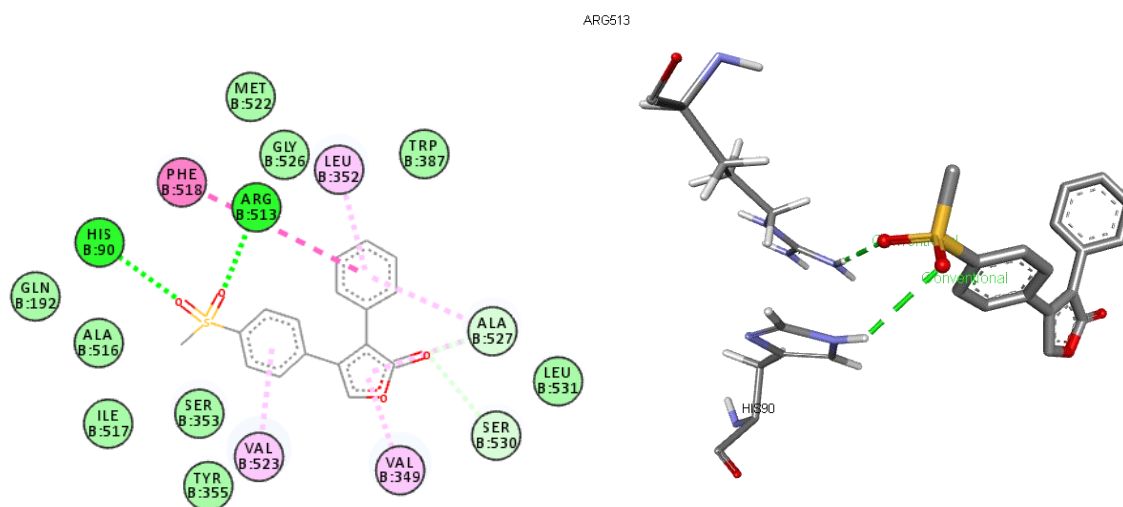
A ACD41 apresentou inibição de 87,95 %, a AMG de 94 % e a NAR de 98,87 % na concentração de 20  $\mu$ g/mL. Esses resultados mostram que a ACD41 foi capaz de inibir a produção de hidroperóxido, provavelmente, por sua característica nucleofílica capaz de doar elétrons à enzima, inibindo a oxidação do ácido linoleico semelhante às moléculas de origem.

### 5.5.6. Ancoragem Molecular

Outro possível mecanismo anti-inflamatório da naringenina relatado na literatura é a inibição da ciclooxygenase-2 (CHAO et al., 2010; MADESWARAN et al., 2012; MALDONADO-ROJAS & OLIVERO-VERBEL, 2011).

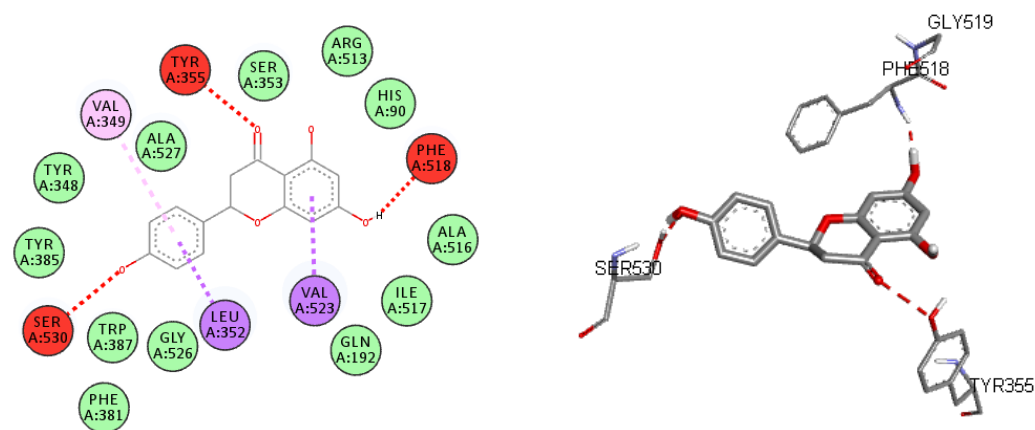
A relação estrutura-atividade da molécula ACD41 também foi explorada, utilizando ferramentas de ancoragem molecular, a fim de avaliar a possível inibição da enzima COX-2 que a isoforma responsável pela produção de PGs envolvidas na inflamação e um dos principais alvos terapêuticos para medicamentos anti-inflamatórios pelo menor número de efeitos adversos (DHANJAL et al., 2015).

No estudo *in silico* foi utilizado como inibidor seletivo de COX-2, o rofecoxib, para validação do sistema (**Fig. 26**). Esta molécula apresentou duas interações de hidrogênio entre seu grupo metil sulfona e os resíduos de Arg-513 e His-90, semelhante ao trabalho realizado por Orlando e Malkowski (2016), além de interações hidrofóbicas com os resíduos de Phe-518, Leu-352, Ala-527, Val-349, Ser-530 e Val-523.



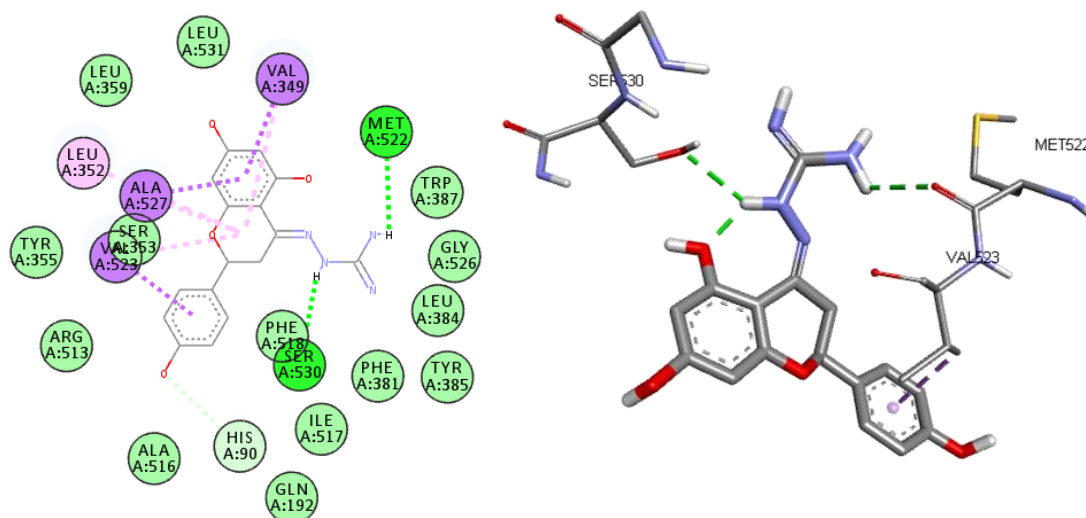
**Figura 26: Interação entre rofecoxib e COX-2.** Modelo 2D indicando todas as interações com os resíduos de aminoácidos da enzima e modelo 3D destacando as interações de hidrogênio, em verde, com os resíduos de His-90 e Arg-513.

A naringenina apresentou interações hidrofóbicas com os resíduos Leu-352, Val-349 e Val-523, além de interações desfavoráveis que podem ter sido decorrentes da repulsão entre grupos funcionais de mesma carga (**Fig. 27**).



**Figura 27: Interação entre naringenina e COX-2.** Modelo 2D indicando todas as interações com os resíduos de aminoácidos da enzima e modelo 3D destacando apenas as interações desfavoráveis em vermelho.

Por outro lado, diferente de sua molécula de origem, a ACD41 formou interações de hidrogênio entre seu grupo guanidina e os resíduos de Met-522 e Ser-530 e interações hidrofóbicas com os resíduos de Leu-352, Val-523, Ala-527, Ser-353 e Val-349, muitas das quais foram semelhantes ao rofecoxib (**Fig. 28**).



**Figura 28: Interação entre ACD41 e COX-2.** Modelo 2D indicando todas as interações com os resíduos de aminoácidos da enzima e modelo 3D destacando as interações de hidrogênio, em verde, com os resíduos de Met-522 e Ser-530 e a interação com resíduo Val-523 em roxo.

Já é bem relatado na literatura que a COX-2 apresenta três regiões ativas importantes. Um bolso hidrofóbico caracterizado pela presença dos resíduos dos aminoácidos Tyr-385, Trp-387, Phe-518, Ala-201, Tyr-248, Leu-352, Ala-527, Val, 349, Ser-530, Met-522 e Ser-353. A segunda região é associada com três resíduos de aminoácidos hidrofílicos Arg-120, Glu-524 e Tyr-355 que estão localizados na entrada do sítio ativo enquanto a terceira região é um bolso lateral caracterizada pela presença de His-90, Arg-513 e Val-523 (KRISHNA et al., 2013).

Tseng e cols (2016) afirmam que a seletividade dos inibidores específicos de COX1/2 depende das interações formadas com os resíduos de aminoácidos não conservados específicos de cada isoforma. Logo, os resíduos Arg-513 e Val-523, que substituíram His-513 e Ile-523 na COX-1, são essenciais para a interação de inibidores seletivos de COX-2. Neste contexto, a interação da ACD41 com o resíduo de Val-523, semelhante à naringenina e ao rofecoxib, prevê uma possível seletividade desta molécula para COX-2.

Também é relatado na literatura que o ácido araquidônico é capaz de se configurar de forma invertida na COX-2, interagindo com o resíduo Ser-530 e Tyr-385, refletindo num modo não catalítico ou modo de ligação inibitório onde não há a formação de produtos viáveis (ROWLINSON et al., 2003; BLOBAUM & MARNETT, 2007; XU et al., 2014).

Portanto, é possível inferir a interação de hidrogênio entre o grupo guanidina e Ser-530 também favoreça a inibição da COX-2 semelhante a esta conformação invertida do AA e

de outros medicamentos como o diclofenaco que também interage com este resíduo (XU et al., 2014).

Além disso, a adição da aminoguanidina na estrutura do flavonoide favoreceu o aumento da estabilidade do sistema através da diminuição da energia de interação (**Tabela 4**), a qual foi semelhante à do rofecoxib e menor que a da naringenina, prevendo que a ACD41 interage espontaneamente com a COX-2 (HASANAH et al., 2011).

**Tabela 4.** Energias de ligação entre os ligantes e o sítio ativo da COX-2

| Ligante     | Energia de ligação<br>(kcal/mol) |
|-------------|----------------------------------|
| Rofecoxib   | -10,3                            |
| Naringenina | -9,9                             |
| ACD41       | -10,3                            |

\*Calculadas através do software AutoDock Vina

Este comportamento pode ser explicado pelas interações de hidrogênio e pelo número de interações hidrofóbicas entre a ACD41 e a enzima cuja maioria foi semelhante ao rofecoxib. Este estudo preditivo indica a possibilidade da ACD41 ser um inibidor seletivo de COX-2.

O presente trabalho descreveu pela primeira vez a entidade química (2*E*)-2-[5,7-diidroxil-2-(4-hidroxifenil)-2,3-dihidro-4*H*-cromen-4-ilideno] hidrazina carboximidamida, avaliou algumas de suas características físico-químicas e demonstrou algumas atividades biológicas da molécula.

Os resultados apresentados, principalmente os que se referem às atividades biológicas, são preliminares, sendo necessários estudos mais aprofundados que busquem consolidar essas atividades, além de estudos detalhados que procurem elucidar os mecanismos de ação pelos quais a ACD41 exerce seus efeitos. Dessa forma, sugere-se que a ACD41 também seja explorada através de ensaios biológicos *in vivo* a fim de verificar se a molécula apresenta o mesmo potencial em sistemas mais complexos.

## 6. CONCLUSÕES

A partir da reação de condensação entre a naringenina e aminoguanidina foi possível obter a nova entidade química (2*E*)-2-[5,7-diidroxil-2-(4-hidroxifenil)-2,3-dihidro-4*H*-cromen-4-ilideno] hidrazina carboximidamida (ACD41).

A ACD41 apresentou atividade sequestrante sobre os radicais ABTS e DPPH; reverteu os elevados níveis de ROS e preservou a integridade das membranas mitocondriais nos ensaios celulares.

A molécula inibiu a produção de TNF- $\alpha$  em macrófagos humanos ativados por LPS, inibiu a enzima lipoxigenase e, nos estudos preditivos de ancoragem molecular, apresentou interações com a enzima COX-2.

Nos ensaios de glicação, a ACD41 inibiu a formação de AGEs, principalmente, através da via glicoxidativa.

Todos os resultados observados no presente estudo, embora sejam preliminares, indicam o potencial antioxidante, antiglicante e anti-inflamatório da ACD41.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUILLAR, M. I. Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. In: **HPLC of Peptides and Proteins**, v. 251 of the series Methods in Molecular Biology™, p. 9-22, 2004.
- AHMED, A. U. An overview of inflammation: mechanism and consequences. **Front. Biol**, v. 6, n.4, p. 274–281, 2011.
- AKBARZADEH, Z. et al. The Effects of Naringenin on Some Human Breast Cancer Cells: A Systematic Review. **Arch Breast Cancer**, v. 3, n. 2, p. 34-40, 2016.
- AKONDI, B. R.; CHALLA, S. R.; AKULA, A. Protective effects of rutin and naringin in testicular ischemia-reperfusion induced oxidative stress in rats. **J Reprod Infertil**, v. 12, n. 3, p. 209-14, Jul 2011.
- ALAM, M. A. et al. Effect of citrus flavonoids, naringin and naringenin, on metabolic syndrome and their mechanisms of action. **Adv Nutr**, v. 5, n. 4, p. 404-17, 2014
- ALIZADEH, R. et al. The effect of aminoguanidine on sperm motility and mitochondrial membrane potential in varicocelized rats. **Iran J Basic Med Sci**, v. 19, n. 12, p. 1279-1284, 2016.
- ÁLVAREZ-ÁLVAREZ, R. et al. Molecular genetics of naringenin biosynthesis, a typical plant secondary metabolite produced by *Streptomyces clavuligerus*. **Microb Cell Fact**, v. 14, p. 178, 2015.
- ANDRADE, Cláudia Alexandra de et al. Antioxidant and antibacterial activity of extracts, fractions and isolated substances from the flowers of *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 46, n. 4, p. 715-722, 2010.
- ASHLEY, N. T. et al. Inflammation: Mechanisms, Costs, and Natural Variation. **Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst**, v. 43, p. 385–406, 2012.
- ASMAT, U.; ABAD, K.; ISMAIL, K. Diabetes mellitus and oxidative stress-A concise review. **Saudi Pharm J**, v. 24, n. 5, p. 547-553, 2016.
- BIRBEN, E. et al. Oxidative stress and antioxidant defense. **World Allergy Organ J**, v. 5, n. 1, p. 9-19, 2012.
- BISWAS, S. K. Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox? **Oxid Med Cell Longev**, v. 2016, p. 1-9, 2016.
- BLOBAUM, A. L.; MARNETT, L. J. Structural and functional basis of cyclooxygenase inhibition. **J Med Chem**, v. 50, n. 7, p. 1425-41, 2007.
- BRITO, A. et al. HPLC-UV-MS profiles of phenolic compounds and antioxidant activity of fruits from three citrus species consumed in Northern Chile. **Molecules**, v. 19, n. 11, p. 17400-21, 2014.
- BURTON, G. J.; JAUNIAUX, E. Oxidative stress. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, v. 25, n. 3, p. 287-99, 2011.
- BYUN, K. et al. Advanced glycation end-products produced systemically and by macrophages: A common contributor to inflammation and degenerative diseases. **Pharmacol Ther**, 2017.



CASTANEDA, O. A. Macrophages in oxidative stress and models to evaluate the antioxidant function of dietary natural compounds. **J Food Drug Anal**, v. 25, p. 111-118, 2017.

CAVIA-SAIZ, M. et al. Antioxidant properties, radical scavenging activity and biomolecule protection capacity of flavonoid naringenin and its glycoside naringin: a comparative study. **J Sci Food Agric**, v. 90, n. 7, p. 1238-44, 2010.

CDC – Centers of Disease Control and Prevention. Chronic Disease Overview. National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, 2016. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/chronicdisease/overview/index.htm>>. Acesso em 16/06/17.

CDPM – Chronic Disease Prevention and Management. Preventing and Managing Chronic Disease: Ontario's Framework. **MacColl Institute of Healthcare Innovation**, U.S.A, 2007.

CEKICI, A. et al. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. **Periodontol 2000**, v. 64, n. 1, p. 57-80, 2014.

CHANDRASEKHARAN, N. V.; SIMMONS, D. L. The cyclooxygenases. **Genome Biol**, v. 5, n. 9, p. 241, 2004.

CHANSON, M. et al. Gap junctional communication in tissue inflammation and repair. **Biochim Biophys Acta**, v. 1711, n. 2, p. 197-207, 2005.

CHAO, C. L. et al. Naringenin more effectively inhibits inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression in macrophages than in microglia. **Nutr Res**, v. 30, n. 12, p. 858-64, 2010.

CHEMAXON. *MarvinSketch* 17.1.2.0; ChemAxon, Budapest, 2017.

CHEN, S. et al. Therapeutic Effects of Quercetin on Inflammation, Obesity, and Type 2 Diabetes. **Mediators Inflamm**, v. 2016, p. 9340637, 2016.

CHERRAK, S. A. et al. In Vitro Antioxidant versus Metal Ion Chelating Properties of Flavonoids: A Structure-Activity Investigation. **PLoS One**, v. 11, n. 10, p. e0165575, 2016.

CHESTNOV, O. In: Global status report on noncommunicable diseases 2014. **WHO – World Health Organization**, 2014.

CLONINGER, C. R. Person-centered Health Promotion in Chronic Disease. *Int J Pers Cent Med.*, v.3, n.1, p. 5–12, 2013.

DERUITER, J. Resonance and Induction. *Principles Of Drug Action* 1, **Spring** 2005.

D'ALMEIDA, R. E. et al. Inhibition of arachidonic acid metabolism by the Andean crude drug *Parastrephia lucida* (Meyen) Cabrera. **J Ethnopharmacol**, v.150, n.2013, p. 1080–1086, 2013.

DHANJAL, J. K. et al. Computational Structure-Based De Novo Design of Hypothetical Inhibitors against the Anti- Inflammatory Target COX-2. **PLoS One**, v. 10, n. 8, p. e0134691, 2015.

DHAWAN, V. Reactive Oxygen and Nitrogen Species: General Considerations. *Studies on Respiratory Disorders*. New York, NY, Springer New York: 27-47.

DISCOVERY STUDIO VISUALIZER, V 16.1.0, Accelrys Inc, San Diego, CA, 2016.

EBRAHIMZADEH, M. A. et al. Iron chelating activity, phenol and flavonoid content of some medicinal plants from Iran. **Afr. J. Biotechnol.**, v. 7, n.18, p. 3188-3192, 2008.

ESMAEILI, M. A. Advanced Glycation End Product Inhibitory Effect of Quercetin-3-ORutinoside, Isolated from *Teucrium polium*. **J Pharm Sci**, v. 19, n.4, p. 125-134, 2014.

ESPINOSA-DIEZ, C. et al. Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. **Redox Biol**, v. 6, p. 183-97, 2015.

FALCONE FERREYRA, M. L.; RIUS, S. P.; CASATI, P. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. **Front Plant Sci**, v. 3, p. 222, 2012.

FILIPPI, M. D. Mechanism of Diapedesis: Importance of the Transcellular Route. **Adv Immunol**, v. 129, p. 25-53, 2016.

FLORA, S. J. Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2, n. 4, p. 191-206, 2009.

FORDHAM, J. B.; NAQVI, A. R.; NARES, S. Leukocyte production of inflammatory mediators is inhibited by the antioxidants phloretin, silymarin, hesperetin, and resveratrol. **Mediators Inflamm**, v. 2014, p. 1-11, 2014.

FÖRSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **Eur Heart J**, v. 33, n. 7, p. 829-37, 837a-837d, 2012.

FRIEDEN, T. R. CDC National Health Report: Leading Causes of Morbidity and Mortality and Associated Behavioral Risk and Protective Factors— United States, 2005–2013. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 63, n. 04, p. 1-2 2014.

FUKUMOTO, S. et al. Novel, non-acylguanidine-type Na(+)/H(+) exchanger inhibitors: synthesis and pharmacology of 5-tetrahydroquinolinylidene aminoguanidine derivatives. **J Med Chem**, v. 45, n. 14, p. 3009-21, 2002.

FUKUSHIGE, H. et al. Purification and Identification of Linoleic Acid Hydroperoxides Generated by Soybean Seed Lipoxygenases 2 and 3. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, p. 5691-5694, 2005.

GHOSH, G. et al. NF- $\kappa$ B regulation: lessons from structures. **Immunol Rev**, v. 246, n. 1, p. 36-58, 2012.

GKOGKOLOU, P.; BÖHM, M. Advanced glycation end products: Key players in skin aging? **Dermatoendocrinol**, v. 4, n. 3, p. 259-70, 2012.

GRANGER, D. N.; SENCHENKOVA, E. Inflammation and microcirculation. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences; 2010. Bookshelf ID: NBK53379.

GRAY, S. M.; BLOCH, M. H. Systematic review of proinflammatory cytokines in obsessive-compulsive disorder. **Curr Psychiatry Rep**, v. 14, n. 3, p. 220-8, 2012.

GUSMAN, G. S., et al. Evaluation of the Effects of Some Brazilian Medicinal Plants on the Production of TNF- $\alpha$  and CCL2 by THP-1 Cells. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2015, p. 497123, 2015.

- GUTIERREZ, R. M. P. Inhibition of Advanced Glycation End-Product Formation by *Origanum majorana* L. In Vitro and in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2012, p. 1- 8, 2012.
- HAWKINS, P. T.; STEPHENS, L. R. PI3K signalling in inflammation. **Biochim Biophys Acta**, v. 1851, n. 6, p. 882-97, 2015.
- HIGDON, J. Flavonoids. Linus Pauling Institute. Oregon State University, 2005.
- HOLMSTRÖM, K. M.; FINKEL, T. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 15, n. 6, p. 411-21, 2014.
- HORIUCHI, T. et al. Transmembrane TNF-alpha: structure, function and interaction with anti-TNF agents. **Rheumatology**, v. 49, n. 7, p. 1215-28, 2010.
- IRWIN, J. J. et al. ZINC: A Free Tool to Discover Chemistry for Biology. **J. Chem. Inf. Model.**, v. 52, p. 1757–1768, 2012.
- ISO 10993-5. In: Biological evaluation of medical devices —**Tests for *in vitro* cytotoxicity**. International Organization for Standardization, 2009.
- JANG, H. S. et al. The protective mechanism of QGC in feline esophageal epithelial cells by interleukin-1 $\beta$  treatment. **Arch Pharm Res**, v. 40, n. 2, p. 204-213, 2017.
- JARIYAPAMORNKOON, N.; YIBCHOK-ANUN, S.; ADISAKWATTANA, S. Inhibition of advanced glycation end products by red grape skin extract and its antioxidant activity. **BMC Complement Altern Med**, v. 13, p. 171, 2013.
- JEMLI, M. E. Radical-Scavenging Activity and Ferric Reducing Ability of *Juniperus thurifera* (L.), *J. oxycedrus* (L.), *J. phoenicea* (L.) and *Tetraclinis articulata* (L.). **Adv Pharmacol Sci**, v. 2016, p.1-7, 2016.
- JI, P. et al. Naringenin-loaded solid lipid nanoparticles: preparation, controlled delivery, cellular uptake, and pulmonary pharmacokinetics. **Drug Des Devel Ther**, v. 10, p. 911-25, 2016.
- JIN, J. O. et al. Differential effects of triterpene glycosides, frondoside A and cucumarioside A2-2 isolated from sea cucumbers on caspase activation and apoptosis of human leukemia cells. **FEBS Lett**, v. 583, n. 4, p. 697-702, 2009.
- JOSHI, D. C.; BAKOWSKA, J. C. Determination of mitochondrial membrane potential and reactive oxygen species in live rat cortical neurons. **J Vis Exp**, n. 51, 2011.
- KABEL, A. M. Free Radicals and Antioxidants: Role of Enzymes and Nutrition. **World J Nutr Health**, v. 2, n. 3, p. 35-38, 2014.
- KAIKO, G. E. et al. Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response? **Immunology**, v. 123, n. 3, p. 326-38, 2008.
- KALINSKI, P. Regulation of immune responses by prostaglandin E2. **J Immunol**, v. 188, n. 1, p. 21-8, 2012.
- KALYANARAMAN, B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. **Redox Biol**, v. 1, p. 244-57, 2013.

- KANAI, K. et al. Therapeutic anti-inflammatory effects of luteolin on endotoxin-induced uveitis in Lewis rats. **J Vet Med Sci**, v. 78, n. 8, p. 1381-4, 2016.
- KANDEMIR, F. M. et al. Rutin attenuates gentamicin-induced renal damage by reducing oxidative stress, inflammation, apoptosis, and autophagy in rats. **Ren Fail**, v. 37, n. 3, p. 518-25, 2015.
- KANNO, T. et al. Literature review of the role of hydroxyl radicals in chemically-induced mutagenicity and carcinogenicity for the risk assessment of a disinfection system utilizing photolysis of hydrogen peroxide. **J Clin Biochem Nutr**, v. 51, n. 1, p. 9-14, 2012.
- KANZIAN, T. et al. Nucleophilic Reactivities of Primary and Secondary Amines in Acetonitrile. **Eur. J. Org. Chem.**, p. 6379–6385, 2009.
- KAPOOR, R.; RIZVI, F.; KAKKAR, P. Naringenin prevents high glucose-induced mitochondria-mediated apoptosis involving AIF, Endo-G and caspases. **Apoptosis**, v. 18, n. 1, p. 9-27, 2012.
- KARATAS, F. et al. The effects of aminoguanidine on the antioxidant mechanisms and nitrate levels in incisional oral mucosal wound healing process. **Turk J Biochem**, v. 36, n. 1, p. 43–49, 2011.
- KASANAHA, A. N. Analyzing the Interaction of Shellegueain A: A Bioactive Compound of Pakis Tangkur (*Selliguea feei* or *Polypodium feei*) to Cyclooxygenase Enzyme by Molecular Docking. **Asian J. Chem.**, V. 23, n. 7, p. 3093-3096, 2011.
- KHAN, A.W. et al. Enhanced dissolution and bioavailability of grapefruit flavonoid Naringenin by solid dispersion utilizing fourth generation carrier. **Drug Dev Ind Pharm**. p.1-8, 2014.
- KHANSARI, N.; SHAKIBA, Y.; MAHMOUDI, M. Chronic inflammation and oxidative stress as a major cause of age-related diseases and cancer. **Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov**, v. 3, n. 1, p. 73-80, 2009.
- KHLEBNIKOV, A. I. et al. Improved quantitative structure-activity relationship models to predict antioxidant activity of flavonoids in chemical, enzymatic, and cellular systems. **Bioorg Med Chem**, v. 15, n. 4, p. 1749-70, 2007.
- KIRKBY, N. S. et al. LC-MS/MS confirms that COX-1 drives vascular prostacyclin whilst gene expression pattern reveals non-vascular sites of COX-2 expression. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e69524, 2013
- KRISHNA, P. S. et al. In -silico molecular docking analysis of prodigiosin and cycloprodigiosin as COX-2 inhibitors. **Springerplus**, v. 2, n. 1, p. 172, 2013.
- KRUMOVA, K.; COSA, G. Overview of Reactive Oxygen Species. **Royal Society of Chemistry**, 2016.
- KUMAR, A. et al. Sparstolonin B, a novel plant derived compound, arrests cell cycle and induces apoptosis in N-myc amplified and N-myc nonamplified neuroblastoma cells. **PLoS One**, v. 9, n. 5, p. e96343, 2015a.
- KUMAR, S.P. et al. Antioxidant studies of chitosan nanoparticles containing naringenin and their cytotoxicity effects in lung cancer cells. **Int J Biol Macromol**. n. 78, p.87-95, 2015b.
- KUMAR, S. V. et al. An update on prodrugs from natural products. **Asian Pac J Trop Med**, v. 7S1, p. S54-9, 2014.

- LEYVA-LÓPEZ, N. et al. Flavonoids as Cytokine Modulators: A Possible Therapy for Inflammation-Related Diseases. **Int J Mol Sci**, v. 17, n. 6, 2016.
- LI ,X. et al. Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. **J Hematol Oncol**, v. 6, p. 19, 2013a.
- LI, S. Q. et al. Comparative pharmacokinetics of naringin in rat after oral administration of chaihushu-gan-san aqueous extract and naringin alone. **Metabolites**, v. 3, n. 4, p. 867-80, 2013b.
- LI, T. R.; YANG, Z. Y.; WANG, B. D. Synthesis, characterization and antioxidant activity of naringenin Schiff base and its Cu(II), Ni(II), Zn(II) complexes. **Chem Pharm Bull (Tokyo)**, v. 55, n. 1, p. 26-8, 2007.
- LI, X. et al. Expression of NF-kappaB and p38 under intervention of rutin in lung cancer therapy. **Biomedical Research**, v. 28, n. 5, p. 2344-2347, 2017.
- LI, Y. et al. Quercetin, Inflammation and Immunity. **Nutrients**, v. 8, n. 3, p. 167, 2016.
- LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 32, n. 9, p. 2045-51, 2012.
- LIM, R. et al. Dietary phytochemicals curcumin, naringenin and apigenin reduce infection-induced inflammatory and contractile pathways in human placenta, foetal membranes and myometrium. **Mol Hum Reprod**, v. 19, n. 7, p. 451-62, 2013.
- LIU, X. et al. The citrus flavonoid naringenin confers protection in a murine endotoxaemia model through AMPK-ATF3-dependent negative regulation of the TLR4 signalling pathway. **Sci Rep**, v. 6, p. 39735, 2016.
- LIU, Y. et al. Naringenin inhibits chemokine production in an LPS-induced RAW 264.7 macrophage cell line. **Mol Med Rep**, v. 6, n. 6, p. 1343-50, 2012.
- LONE, A. A. et al. Free radicals and antioxidants: Myths, facts and mysteries. **Afr. J. Pure Appl. Chem.**, v. 7, n.3, p. 91-113, 2013.
- LÜSCHER, T. F. Ageing, inflammation, and oxidative stress: final common pathways of cardiovascular disease. **Eur Heart J**, v. 36, n. 48, p. 3381-3, 2015.
- MA, J. Q. et al. Quercitrin offers protection against brain injury in mice by inhibiting oxidative stress and inflammation. **Food Funct**, v. 7, n. 1, p. 549-56, 2016.
- MAATOUK, M. et al. Effect of heated naringenin on immunomodulatory properties and cellular antioxidant activity. **Cell Stress Chaperon**, v. 21, n. 6, p. 1101-1109, 2016.
- MADESWARAN, A. et al. In silico docking studies of cyclooxygenase inhibitory activity of commercially available flavonoids. **Asian J Pharm Life Sci**, v. 2, n 2, 2012.
- MALAKUL, W.; PENGNET, S. Inhibitory Effect of 6-shogaol on Fructose-Induced Protein Glycation and Oxidation *in Vitro*. **Naresuan Univ J: Sci Technol**, v. 25, n.2, 2017.
- MANCHOPE, M. F. et al. Naringenin Inhibits Superoxide Anion-Induced Inflammatory Pain: Role of Oxidative Stress, Cytokines, Nrf-2 and the NO-cGMP-PKG-KATP Channel Signaling Pathway. **PLoS One**, v. 11, n. 4, p. 1-20, 2016.

- MARTIN, C. M. Chronic disease and illness care. **Can Fam Physician**, v.53, 2007.
- MARXEN, K. et al. Determination of DPPH Radical Oxidation Caused by Methanolic Extracts of Some Microalgal Species by Linear Regression Analysis of Spectrophotometric Measurements. **Sensors**, v. 7, p. 2080-2095, 2007.
- MAUGG, D. et al. New small molecules targeting apoptosis and cell viability in osteosarcoma. **PLoS One**, v. 10, n. 6, p. e0129058, 2015.
- MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428-35, 2008.
- MEEPRM, A. et al. Isoferulic acid, a new anti-glycation agent, inhibits fructose- and glucose-mediated protein glycation in vitro. **Molecules**, v. 18, n. 6, p. 6439-54, 2013.
- MIRZOEVA, O. K.; CALDER, P. C. The effect of propolis and its components on eicosanoid production during the inflammatory response. **Prostag, Leukotr Ess**, v.55, n.6, p. 441-449, 1996.
- MITTAL, M. et al. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. **Antioxid Redox Signal**, v. 20, n. 7, p. 1126-67, 2014.
- MOHAMED, R. et al. Ascorbic acid 6-palmitate: a potent inhibitor of human and soybean lipoxygenase-dependent lipid peroxidation. **J Pharm Pharmacol**, v.66, p. 769-778, 2013.
- MOHEBALI, n. *et al.* Effect of Flavonoids Rich Extract of Capparis Spinosa on Inflammatory Involved Genes in Amyloid-Beta Peptide Injected Rat Model of Alzheimer's Disease. **Nutr. Neurosci.**, p. 1-8, 2016.
- MORRIS, G. M. et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **J Comput Chem**, v. 30, p. 2785-2791, 2009.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.
- MUNN, L. L. Cancer and inflammation. **Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med**, v. 9, n. 2, 2017.
- MURAKAMI, M.; HIRANO, T. The molecular mechanisms of chronic inflammation development. **Front Immunol**, v. 3, p. 323, 2012.
- MURDANDE, S. B. et al. Aqueous solubility of crystalline and amorphous drugs: Challenges in measurement. **Pharm Dev Technol**, v. 16, n.3, p. 187-200, 2011.
- MURPHY, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. **Biochem J**, v. 417, n. 1, p. 1-13, 2009.
- MUTHAIAH, V. P. et al. Neuroprotective role of naringenin on carbaryl induced neurotoxicity in mouse neuroblastoma cells. **J Pharmacol Pharmacother**, v. 4, n. 3, p. 192-7, 2013.
- NAFEES, S. et al. Rutin ameliorates cyclophosphamide induced oxidative stress and inflammation in Wistar rats: role of NFκB/MAPK pathway. **Chem Biol Interact**, v. 231, p. 98-107, 2015.
- NAKAYAMA, G. R.; CATON, M. C.; NOVA, M. P.; PARANDOOSH, Z. Assessment of the Alamar blue assay for cellular growth and viability in vitro. **J Immunol Methods**, n. 204, p. 205-208, 1997.

NEITZEL, J. J. Fatty Acid Molecules: A Role in Cell Signaling. **Nature Education**, v. 3, n. 9, p.57, 2010.

NEWTON, K.; DIXIT, V. M. Signaling in innate immunity and inflammation. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 4, n. 3, 2012.

NOWOTNY, K. et al. Advanced glycation end products and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. **Biomolecules**, v. 5, n. 1, p. 194-222, 2015.

OAK, J. H.; YOUN, J. Y.; CAI, H. Aminoguanidine inhibits aortic hydrogen peroxide production, VSMC NOX activity and hypercontractility in diabetic mice. **Cardiovasc Diabetol**, v. 8, p. 65, 2009.

OKIN, D.; MEDZHITOV, R. Evolution of inflammatory diseases. **Curr Biol**, v. 22, n. 17, p. R733-40, 2012.

OMS. Preventing CHRONIC DISEASES: a vital investment. **WHO Global Report**, 2005.

OMS – Organização Mundial da Saúde. **In: Noncommunicable diseases. WHO - World Health Organization**, 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs355/en/>>. Acesso em 16/06/17.

ORLANDO, B. J.; MALKOWSKI, M. G. Crystal structure of rofecoxib bound to human cyclooxygenase-2. **Acta Crystallogr, Sect.F** 72, p. 772-776, 2016.

OTT, C. et al. Role of advanced glycation end products in cellular signaling. **Redox Biol**, v. 2, p. 411-29, 2014.

OZINSKY, A. et al. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 97, n. 25, p. 13766-71, 2000.

PARAMESWARAN, N.; PATIAL, S. Tumor necrosis factor- $\alpha$  signaling in macrophages. **Crit Rev Eukaryot Gene Expr**, v. 20, n. 2, p. 87-103, 2010.

PARK, C. M.; SONG, Y. S. Luteolin and luteolin-7-O-glucoside inhibit lipopolysaccharide-induced inflammatory responses through modulation of NF- $\kappa$ B/AP-1/PI3K-Akt signaling cascades in RAW 264.7 cells. **Nutr Res Pract**, v. 7, n. 6, p. 423-9, 2013.

PARK, J. H. et al. Naringenin induces apoptosis through downregulation of Akt and caspase-3 activation in human leukemia THP-1 cells. **Food Chem Toxicol**, v. 46, p. 3684–3690, 2008.

PATLEVIČ, P. et al. Reactive oxygen species and antioxidant defense in human gastrointestinal diseases. **Integr Med Res**, v. 5, n. 4, p. 250-258, 2016.

PETERSEN, K. S.; SMITH, C. Ageing-Associated Oxidative Stress and Inflammation Are Alleviated by Products from Grapes. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2016, p. 1-12, 2016.

PIECHOTA-POLANCZYK, A.; FICHNA, J. Review article: the role of oxidative stress in pathogenesis and treatment of inflammatory bowel diseases. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 387, n. 7, p. 605-20, 2014.

PINHO-RIBEIRO, F. A. et al. The citrus flavonone naringenin reduces lipopolysaccharide-induced inflammatory pain and leukocyte recruitment by inhibiting NF- $\kappa$ B activation. **J Nutr Biochem**, v. 33, p. 8-14, 2016.

- PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **Eur J Med Chem**, v. 97, p. 55-74, 2015.
- PROCHÁZKOVÁ, D.; BOUŠOVÁ, I.; WILHELMOVÁ, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. **Fitoterapia**, v. 82, n. 4, p. 513-23, 2011.
- RAHAL, A. et al. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 761264, 2014.
- REUTER, S. et al. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? **Free Radic Biol Med**, v. 49, n. 11, p. 1603-16, 2010.
- RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G. A. Prostaglandins and inflammation. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 31, n. 5, p. 986-1000, 2011.
- ROUZER, C. A.; MARNETT, L. J. Cyclooxygenases: structural and functional insights. **J Lipid Res**, v. 50 Suppl, p. S29-34, 2009.
- ROWLINSON, S. W. et al. A novel mechanism of cyclooxygenase-2 inhibition involving interactions with Ser-530 and Tyr-385. **J Biol Chem**, v. 278, n. 46, p. 45763-9, 2003.
- SADOWSKA-BARTOSZ, I.; BARTOSZ, G. Prevention of protein glycation by natural compounds. **Molecules**, v. 20, n. 2, p. 3309-34, 2015.
- SAÏD-SADIER, N.; OJCIUS, D. M. Alarmins, inflammasomes and immunity. **Biomed J**, v. 35, n. 6, p. 437-49, 2012.
- SÁNCHEZ, A.; CALPENA, A. C.; CLARES, B. Evaluating the Oxidative Stress in Inflammation: Role of Melatonin. **Int J Mol Sci**, v. 16, n. 8, p. 16981-7004, 2015.
- SÁNCHEZ, C. Reactive oxygen species and antioxidant properties from mushrooms. **Synth Syst Biotechnol xxx**, p. 1-10, 2016.
- SANTOS, P. M. et al. Perfil de flavonoides e avaliação do potencial antioxidante e citotóxico de bauhinia purpurea (fabaceae) da região amazônica. **Quim. Nova**, v. 37, n. 1, p. 89-94, 2014.
- SHI, D. et al. Co-treatment of THP-1 cells with naringenin and curcumin induces cell cycle arrest and apoptosis via numerous pathways. **Mol Med Rep**, v. 12, p. 8223-8228, 2015.
- SINGH, V. P. et al. Advanced glycation end products and diabetic complications. **Korean J Physiol Pharmacol**, v. 18, n. 1, p. 1-14, 2014.
- SKÁRKA, L.; OSTÁDAL, B. Mitochondrial membrane potential in cardiac myocytes. **Physiol Res**, v. 51, n. 5, p. 425-34, 2002.
- SOARES, R.; AZEVEDO, I. Apigenin: is it a pro- or anti-inflammatory agent? **Am J Pathol**, v. 168, n. 5, p. 1762-3, 2006.
- STEINHILBER, D.; HOFMANN, B. Recent Advances in the Search for Novel 5-Lipoxygenase Inhibitors. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 114, p. 70-77, 2014.



STEWART, J. J. P. Computational Chemistry, Colorado Springs, CO, USA, 2016. [HTTP://OpenMOPAC.net](http://OpenMOPAC.net)

STEWART, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods VI: more modifications to the NDDO approximations and re-optimization of parameters. **J Mol Model.**, v.19, p. 1-32, 2013.

STIRBAN, A.; GAWLOWSKI, T.; RODEN, M. Vascular effects of advanced glycation endproducts: Clinical effects and molecular mechanisms. **Mol Metab**, v. 3, n. 2, p. 94-108, 2014.

STOLFI, C. et al. Mechanisms of action of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and mesalazine in the chemoprevention of colorectal cancer. **Int J Mol Sci**, v. 14, n. 9, p. 17972-85, 2013.

STONIK, V. A. Marine natural products: a way to new drugs. **Acta Naturae**, v. 1, n. 2, p. 15-25, 2009.

STOWE, D. F.; CAMARA, A. K. Mitochondrial reactive oxygen species production in excitable cells: modulators of mitochondrial and cell function. **Antioxid Redox Signal**, v. 11, n. 6, p. 1373-414, 2009.

SUMATHI, R. et al. Bio-dynamic activity of naringenin – a review. **Int J Curr Adv Res**, v. 4, n.8, p. 234-236, 2015.

SUN, S. C. Non-canonical NF- $\kappa$ B signaling pathway. **Cell Res**, v. 21, n. 1, p. 71-85, 2011.

TALEVI, A. Multi-target pharmacology: possibilities and limitations of the "skeleton key approach" from a medicinal chemist perspective. **Front Pharmacol**, v. 6, p. 205, 2015.

TANG, D. et al. PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity. **Immunol Rev**, v. 249, n. 1, p. 158-75, 2012.

TETZ, L. M. et al. Troubleshooting the dichlorofluorescein assay to avoid artifacts in measurement of toxicant-stimulated cellular production of reactive oxidant species. **J Pharmacol Toxicol Methods**, v. 67, n. 2, p. 56-60, 2013.

THORNALLEY, P. J. Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation endproducts. **Arch Biochem Biophys**, v. 419, n. 1, p. 31-40, 2003.

TORNATORE, L. et al. The nuclear factor kappa B signaling pathway: integrating metabolism with inflammation. **Trends Cell Biol**, v. 22, n. 11, p. 557-66, 2012.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. **J Comput Chem**, v.30, p. 455–461, 2010.

TSENG, T. S. et al. Discovery of a potent cyclooxygenase-2 inhibitor, S4, through docking-based pharmacophore screening, in vivo and in vitro estimations. **Mol Biosyst**, v. 12, n. 8, p. 2541-51, 2016.

TURKKAN, B. et al. Synthesis, characterization and antioxidant capacity of naringenin-oxime. **Spectrochimica Acta Part A**. n.85, p.235– 240, 2012.

TZIN, V. et al. Tomato fruits expressing a bacterial feedback-insensitive 3-deoxy-d-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase of the shikimate pathway possess enhanced levels of multiple specialized metabolites and upgraded aroma. **J Exp Bot**, v.4, p. 1-12, 2013.

- URIBARRI, J. et al. Dietary advanced glycation end products and their role in health and disease. **Adv Nutr**, v. 6, n. 4, p. 461-73, 2015.
- UTTARA, B. et al. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. **Curr Neuropharmacol**, v. 7, n. 1, p. 65-74, 2009.
- VAFEIADOU, K. et al. The citrus flavanone naringenin inhibits inflammatory signalling in glial cells and protects against neuroinflammatory injury. **Arch Biochem Biophys**, v. 484, n. 1, p. 100-9, 2009.
- VERHELST, K. et al. I $\kappa$ B kinase  $\epsilon$  (IKK $\epsilon$ ): a therapeutic target in inflammation and cancer. **Biochem Pharmacol**, v. 85, n. 7, p. 873-80, 2013.
- VERMA, S. et al. Cyclooxygenase 1 (COX1) expression in Type 2 diabetes mellitus: A preliminary study from North India. **Egypt J Med Hum Genet**, v. 17, p. 41–45, 2016.
- VEZZA, T. et al. Flavonoids in Inflammatory Bowel Disease: A Review. **Nutrients**, v. 8, n. 4, p. 211, 2016.
- WARD, B. W. et al. Multiple chronic conditions among US adults : a 2012 update. **Preventing Chronic Disease, CDC**, v. 11, 2014.
- WISASTRA, R.; DEKKER, F. J. Inflammation, Cancer and Oxidative Lipoxygenase Activity are Intimately Linked. **Cancers**, v. 6, p. 1500-1521, 2014.
- WEISS, U. Inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 427, 2008.
- WU, C. H.; YEN, G. C. Inhibitory effect of naturally occurring flavonoids on the formation of advanced glycation endproducts. **J Agric Food Chem**, v. 53, n. 8, p. 3167-73, 2005.
- WU, J. et al. Modular optimization of heterologous pathways for de novo synthesis of (2S)-naringenin in Escherichia coli. **PLoS One**, v. 9, n. 7, p. e101492, 2014.
- WYBRANOWSKI, T. et al. Antioxidant properties of flavonoids and honeys studied by optical spectroscopy methods. **Med Biol Sci**, v.27, n.4, p. 53-58,2013.
- XU, S. et al. Oxicams bind in a novel mode to the cyclooxygenase active site via a two-water-mediated H-bonding Network. **J Biol Chem**, v. 289, n. 10, p. 6799-808, 2014.
- XU, Y.; LI, X. J. Multi-target therapeutics and new drug discovery. **Yao Xue Xue Bao**, v. 44, n. 3, p. 226-30, 2009.
- YANG, K. et al. Dynamic simulations on the arachidonic acid metabolic network. **PLoS Comput Biol**, v. 3, n. 3, p. e55, 2007.
- YANG, L.J. et al. Preparation and characterization of inclusion complexes of naringenin with B-cyclodextrin or its derivative. **Carbohydr Polym**. n.98, p. 861-869, 2013b.
- YANG, S. J. et al. Activation of Akt by advanced glycation end products (AGEs): involvement of IGF-1 receptor and caveolin-1. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. 1-14, 2013a.
- YASHASWINI, P. S. et al. Encapsulation of sesamol in phosphatidyl choline micelles: Enhanced bioavailability and anti-inflammatory activity. **Food Chem**, v. 228, p. 330-337, 2017.

YEH, WJ. Et al. Polyphenols with antiglycation activity and mechanisms of action: A review of recent findings. **J Food Drug Anal**, v. 25, p. 84-92, 2017.

YILMA, A. N. et al. Flavonoid naringenin: a potential immunomodulator for Chlamydia trachomatis inflammation. **Mediators Inflamm**, v. 2013, p. 1-13, 2013.

YONG, W. K.; HO, Y. F.; MALEK, S. N. Xanthohumol induces apoptosis and S phase cell cycle arrest in A549 non-small cell lung cancer cells. **Pharmacogn Mag**, v. 11, n. Suppl 2, p. S275-83, 2015.

YOUNUS, H.; ANWAR, S. Prevention of non-enzymatic glycosylation (glycation): Implication in the treatment of diabetic complication. **Int J Health Sci (Qassim)**, v. 10, n. 2, p. 261-77, 2016.

ZARGHI, A.; ARFAEI, S. Selective COX-2 Inhibitors: A Review of Their Structure-Activity Relationships. **Iran J Pharm Res**, v. 10, n. 4, p. 655-83, 2011.

ZHANG, A.; SUN, H.; WANG, X. Mass spectrometry-driven drug discovery for development of herbal medicine. **Mass Spectrom Rev**, v. 35, p. 1-14, 2016a.

ZHANG, J. M.; AN, J. Cytokines, inflammation, and pain. **Int Anesthesiol Clin**, v. 45, n. 2, p. 27-37, 2007.

ZHANG, K.; KAUFMAN, R. J. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 455-62, 2008.

ZHANG, P. et al. Preparation and evaluation of naringenin-loaded sulfobutylether- $\beta$ -cyclodextrin/chitosan nanoparticles for ocular drug delivery. **Carbohydr Polym**, n.149, p. 224-230, 2016b.

ZHANG, X. et al. Flavonoid apigenin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response through multiple mechanisms in macrophages. **PLoS One**, v. 9, n. 9, p. e107072, 2014a.

ZHANG, X. et al. Treatment of proteins with dietary polyphenols lowers the formation of AGEs and AGE-induced toxicity. **Food Funct.**, v. 5, p. 2656–2661, 2014b.

ZINGARELLI, B. et al. The inhibitory effects of mercaptoalkylguanidines on cyclooxygenase activity. **Brit J Pharmacol**, v. 120, p. 357- 366, 1997.

ZOROV, D. B.; JUHASZOVA, M.; SOLLOTT, S. J. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. **Physiol Rev**, v. 94, n. 3, p. 909-50, 2014.