

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ESTUDO DA RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE DE  
FLAVONÓIDES SINTÉTICOS COM POTENCIAL ATIVIDADE  
INIBITÓRIA DA FOSFOLIPASE A<sub>2</sub>

ADRIANA PEREIRA DA SILVA

MANAUS  
2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ADRIANA PEREIRA DA SILVA

ESTUDO DA RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE DE  
FLAVONÓIDES SINTÉTICOS COM POTENCIAL ATIVIDADE  
INIBITÓRIA DA FOSFOLIPASE A<sub>2</sub>

Documento apresentado ao Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal do Amazonas como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Química. Área de concentração Físico-Química. Programa de Pós-Graduação em Química, Departamento de Química, Universidade Federal do Amazonas.

Orientador: Prof. Dr. Saulo Luís da Silva  
Co-Orientador: Prof. Dr. Moacyr Comar Júnior

MANAUS  
2010

Ficha Catalográfica  
Catalogação na fonte pela Biblioteca  
Central da Universidade Federal do  
Amazonas

Silva, Adriana Pereira da.  
Estudo da relação estrutura-atividade de flavonóides sintéticos  
com potencial atividade inibitória da fosfolipase A<sub>2</sub>. / Adriana  
Pereira da Silva. – Manaus: UFAM, 2010  
Dissertação (Mestrado em Físico Química).  
Universidade Federal do  
Amazonas.

**ADRIANA PEREIRA DA SILVA**

**ESTUDO DA RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE DE  
FLAVONÓIDES SINTÉTICOS COM POTENCIAL ATIVIDADE  
INIBITÓRIA DA FOSFOLIPASE A<sub>2</sub>**


**BANCA EXAMINADORA**



.....  
**Prof. Dr. Genilson Pereira Santana - Presidente**  
Universidade Federal do Amazonas - UFAM



.....  
**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Lúcia Carneiro - Membro**  
Universidade Estadual do Amazonas - UEA



.....  
**Prof. Dr. Roberto Barbosa Castilho - Membro**  
Universidade Federal do Amazonas - UFAM

Manaus - AM, 17 de Dezembro de 2010.

Dedico mais esta  
vitória a minha PÃE,  
por me apoiar e  
incentivar em todas as  
minhas conquistas.  
TE AMO!!

## **Agradecimentos**

Agradeço a todos aqueles que tanto me ajudaram de forma direta no dia a dia, ou com uma palavra amiga de incentivo e apoio quando mais precisei.

Agradeço à Deus, acima de tudo.

A minha mãe pelos ensinamentos de vida, pela educação que me foi dada, sabedoria e por ser um grande exemplo de mãe e mulher.

Ao Profº Dr. Saulo e ao Profº Dr. Moacyr pela oportunidade de crescimento, amadurecimento e experiências de vida ao longo desses dois anos.

Aos teóricos do GQTCPB – UFAM, pelo companheirismo, pela amizade, pela palavra de incentivo, pelos poucos momentos de descontração que apesar de serem raros foram muito proveitosos, pelos inúmeros momentos de discussão quando as flavonas insistiam em não convergirem e quando tive vontade de jogar tudo para cima e desistir.

A Profª Dr. Ana Lúcia B. Carneiro, Profª Silvania da Conceição Furtado e Profº Boechat pela ajuda, orientação e paciência que tiveram em explicar com detalhes os experimentos de atividade edematogênica e miotóxica.

Não poderia esquecer de citar as teóricas Grêta, Tâmisia e Bete, que ao longo desses dois anos foram muito mais que amigas, em especial Bete que passou pelas mesmas dificuldades e alegrias que eu durante todo este tempo, já que muitas das vezes tínhamos apenas uma a outra para conversar e tentar minimizar os problemas e aflições. Tenho certeza de que tiramos boas lições disso tudo e que um dia daremos rizada das horas de aperreio.

Gostaria que vocês soubessem que sou imensamente grata a todos vocês por tudo a todos vocês o meu sincero **MUITO OBRIGADA!!!**

*Devemos acreditar que temos um dom para alguma coisa e que, custe o que custar, haveremos de consegu-la.*

*(Marie Curie)*

## Resumo

Os flavonóides são compostos orgânicos amplamente distribuídos na natureza e têm sido alvo de inúmeras pesquisas. Estudos indicam o uso de flavonóides como inibidores da enzima fosfolipase A da classe 2 (PLA<sub>2</sub>), tornando-os compostos com potencial antiinflamatório, já que essa enzima atua na liberação do ácido araquidônico. Devido eles fazerem parte da alimentação, o que introduz a idéia de não serem tóxicos, tornam-se mais interessantes, pois os medicamentos frequentemente utilizados para esse fim apresentam algum tipo de efeito colateral, porém faz-se necessário o conhecimento do mecanismo de ação dessas substâncias bioativas, para que assim estes possam vir a ser utilizados como possíveis fármacos. Para isso, foram feitos ensaios *in vivo* como atividade edematogênica e atividade miotóxica, ambas auxiliam na atuação dos compostos na inibição da enzima PLA<sub>2</sub>. Assim sendo, foram feitos cálculos químico quânticos que auxiliam na obtenção de informações estruturais e eletrônicas. Estes são obtidos através da Teoria do Funcional da Densidade (DFT – Density Functional Theory), do funcional híbrido B3LYP, a metodologia foi verificada com os conjuntos de base 6-31G\*, 6-31++G\*\*, e cc-pVTZ. Para cruzar os dados teóricos com resultados experimentais, usou-se a metodologia estatística e matemática denominada quimiometria. Dentre os diversos métodos quimiométricos, utilizou-se a análise de agrupamentos hierárquicos (HCA) e a análise de componentes principais (PCA). A análise deste grupo de flavonas sintéticas mostrou que as mesmas apresentam atividade inibitória frente a PLA<sub>2</sub>, isso pode ser justificado devido a presença do grupo OH em 7 que pode vir a interagir por ligação de hidrogênio com o sítio ativo da enzima. Além disso, a quimiometria mostrou que descritores como momento dipolar, log p, polarizabilidade, HOMO e moleza podem levar a um modelo teórico que nós dá uma boa previsão da atividade inibitória da PLA<sub>2</sub> pelas flavonas, ajudando no desenho de fármacos inibidores dessa enzima e, que o ambiente (vácuo e DMSO), exerce influência significativa na atividade inibitória da mesma. Sendo assim, as flavonas apresentaram resultados muito promissores para a inibição da PLA<sub>2</sub>, onde as mais ativas são as que apresentam a cadeia lateral maior, 3' e 4'-octoxi-flavonas. Apesar dos resultados obtidos serem satisfatórios, sugerimos que seja feito desenho de substâncias análogas, as estudadas aqui, para que dessa forma possamos ter uma análise quimiométrica completa, e modelagem molecular para avaliar o encaixe das flavonas no sítio alvo e verificar se a inibição dá-se de fato no sítio ativo da enzima.



## Abstract

The flavonoids are organics compounds widely distributed in nature and have been the target of many searches. Studies point the flavonoids use as phospholipase A enzyme from class 2 (PLA<sub>2</sub>), make them compounds with antiinflammatory potencial, since this enzyme act in arachidonic acid liberation. Due they make part of the feeding, that introduce the idea they aren't toxics, make them interesting, because the medicines usually use to this aim present some kind of collateral effect, however its necessary the action mechanism knowledge by these bioactives substances, so that the flavonoids have been used as possible drugs. So, were maked tests *in vivo* as edematous and myotoxic activities, both assist in compounds act in enzyme PLA<sub>2</sub> inhibition. Therefore, were maked chemistry quantum calculation that assist in obtain structural and eletronic informations. These are obtained through the Density Functional Theory (DFT), by hybrid functional B3LYP, the method was verified with the whole basis set 6-31G\*, 6-31\*\*G\*\*, and cc-pVTZ. To compare teorics with experimental results, use statistic and mathmatic methodology called chemometric. Among the various chemometrics methods, used the hierarchical groups of analysis (HCA) and the principals compounds analysis (PCA). The synthetics flavones analysis shows that they present inhibitory activity to tha PLA<sub>2</sub>, this can be justified because the OH presence in 7 that can be interact by hydrogen bond with the enzyme active site. Besides, the chemometrics showwed descriptors like dipole moment, log p, polarizability, HOMO and drowsiness can take to one theoric model give us a good inhibitory activity PLA<sub>2</sub> forecast, by flavones, helping in inhibitors drugs drawing of this enzyme and, the environment (vacuo and DMSO), exert significant ingluence on its inhibitory activity. Therefore, the flavones present results very promising for the PLA<sub>2</sub> inhibition, where the most active are that present the big lateral structure, 3' and 4'-octoxi-flavones. Although obtained results been satisfactory, we suggest analoga substances drawing have been maked, thereby we can have a whole chemometrics analysis, and molecular modeling to value the flavones fit in the target site and check i the inhibition is in fact on the enzyme active site.

## Lista de Figuras

Figura 1: Estrutura química e numeração padrão adotada para os flavonóides.....	15
Figura 2: 2-fenilcromona (figura da esquerda) e 3-hidróxi-2-fenilcromona (figura da direita).....	18
Figura 3: Núcleo fundamental das chalconas.....	19
Figura 4: Núcleo fundamental das auronas.....	19
Figura 5: Núcleo fundamental das flavanonas.....	20
Figura 6: Núcleo fundamental das isoflavonas.....	20
Figura 7: Representação do processo inflamatório.....	23
Figura 8: Representação macroscópica do processo inflamatório.....	25
Figura 9: Sítios de ação das fosfolipases A <sub>1</sub> , A <sub>2</sub> , C e D sobre uma molécula típica de fosfolípídeo, no caso, fosfatidilcolina.....	26
Figura 10: Possíveis formas de inibição da PLA <sub>2</sub> e provável lugar de atuação das flavonas sintéticas.....	27
Figura 11: Comportamento inadequado das funções de base.....	38
Figura 12: Rotina de cálculos.....	54
Figura 13: Representação dos ângulos diedros (1, 2 e 3) escolhidos com base nos radicais presentes nas flavonas para simulação no vácuo e em solvente. A figura da esquerda mostra a substituição em 3' e a figura da direita a substituição em 4', onde R indica a cadeia hidrocarbônica.....	58
Figura 14: Comparação entre o $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) e a 4'-octoxi-flavona.....	60
Figura 15: Interação do $\alpha$ -tocoferol com o sítio ativo da enzima PLA <sub>2</sub> (figura da esquerda) e preenchimento do canal hidrofóbico da enzima PLA <sub>2</sub> pelo $\alpha$ -tocoferol (figura da direita).....	60

## Lista de Tabelas

Tabela 1: Flavonóides sintéticos utilizados no estudo.....	21
Tabela 2: Comparação entre os antiinflamatórios esteroidais e os não esteroidais.....	30
Tabela 3: Propriedades farmacológicas atribuídas aos flavonóides juntamente com suas referências. .....	33
Tabela 4: Valores dos ângulos diedros obtidos no cálculo de simulação no vácuo.....	58
Tabela 5: Valores dos ângulos diedros obtidos no cálculo de simulação em solvente.....	58
Tabela 6: Valores de log p obtidos para as flavonas no vácuo e em DMSO.....	61
Tabela 7: Valores de momento dipolar obtidos para as flavonas no vácuo e em DMSO.....	64
Tabela 8: Valores de GAP obtidos para as flavonas no vácuo e em DMSO.....	66
Tabela 9: Valores de eletronegatividade obtidos para as flavonas no vácuo e em DMSO.....	68
Tabela 10: Valores de macieza obtidos para as flavonas no vácuo e em DMSO.....	68
Tabela 11: Valores de dureza obtidos para as flavonas no vácuo e em DMSO.....	68
Tabela 12: Valores de energia obtidos para as flavonas no vácuo e em DMSO.....	71
Tabela 13: Valores de refração obtidos para as flavonas no vácuo e em DMSO.....	74
Tabela 14: Valores de polarizabilidade obtidos para as flavonas no vácuo e em DMSO.....	74
Tabela 15: Valores da atividade miotóxica obtidos para as flavonas substituídas em 3'.....	77
Tabela 16: Valores da atividade edematogênica obtidos para as flavonas substituídas em 3'.....	77
Tabela 17: Valores da atividade miotóxica obtidos para as flavonas substituídas em 4'.....	79
Tabela 18: Valores da atividade edematogênica obtidos para as flavonas substituídas em 4'.....	79
Tabela 19: Comparação da atividade edematogênica com a atividade miotóxica das flavonas frente a PLA <sub>2</sub> .....	81
Tabela 20: Peso das componentes para PCA das flavonas no vácuo.....	82
Tabela 21: Valores dos parâmetros importantes para a construção dos pes das flavonas no vácuo..	84
Tabela 22: Valores dos parâmetros importantes para a construção do HCA das flavonas no vácuo..	85
Tabela 23: Peso das componentes para PCA das flavonas em DMSO.....	86
Tabela 24: Valores dos parâmetros importantes para a construção dos pes das flavonas em DMSO	87

## Lista de Gráficos

Gráfico 1: Valores de log p obtidos para as flavonas na simulação no vácuo e em DMSO.....	62
Gráfico 2: Valores de momento dipolar obtidos para as flavonas na simulação no vácuo e em DMSO.....	64
Gráfico 3: Valores de GAP obtidos para as flavonas na simulação no vácuo e em DMSO.....	66
Gráfico 4: Valores de eletronegatividade obtidos para as flavonas na simulação no vácuo e em DMSO.....	69
Gráfico 5: Valores de moleza obtidos para as flavonas na simulação no vácuo e em DMSO.....	70
Gráfico 6: Valores de dureza obtidos para as flavonas na simulação no vácuo e em DMSO.....	70
Gráfico 7: Valores de energia obtidos para as flavonas na simulação no vácuo e em DMSO.....	72
Gráfico 8: Valores de refração obtidos para as flavonas na simulação no vácuo e em DMSO..	75
Gráfico 9: Valores de polarizabilidade obtidos para as flavonas na simulação no vácuo e em DMSO.....	75
Gráfico 10: Atividade miotóxica das flavonas ramificadas em 3' frente a PLA <sub>2</sub> .....	78
Gráfico 11: Atividade edematogênica das flavonas ramificadas em 3' frente a PLA <sub>2</sub> .....	78
Gráfico 12: Atividade miotóxica das flavonas ramificadas em 4' frente a PLA <sub>2</sub> .....	80
Gráfico 13: Atividade edematogênica das flavonas ramificadas em 4' frente a PLA <sub>2</sub> .....	80
Gráfico 14: Pesos das flavonas no vácuo.....	83
Gráfico 15: PCA das flavonas no vácuo.....	84
Gráfico 16: HCA das flavonas no vácuo.....	85
Gráfico 17: Pesos das flavonas em DMSO.....	86
Gráfico 18: PCA das flavonas em DMSO.....	87

# Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	17
2.1. Flavonóides .....	17
2.1.1. Características gerais.....	17
2.1.2. Flavonas e Flavonóis.....	18
2.1.3. Flavonóides.....	19
2.1.3.1. Flavonóides sintéticos.....	21
2.1.4. Propriedades farmacológicas.....	22
2.1.5. Processo inflamatório.....	22
2.1.6. PLA <sub>2</sub> .....	25
2.1.7. Ciclooxygenase (COX).....	27
2.1.8. Drogas antiinflamatórias.....	28
2.1.9. Efeitos farmacológicos dos flavonóides.....	30
2.1.9.1. Propriedade antiinflamatória.....	30
2.2. Química Medicinal.....	33
2.3. Abordagem Teórica.....	34
2.3.1. Mecânica quântica (MQ).....	34
2.3.2. Aproximação de Born-Oppenheimer (ABO).....	35
2.3.3. Níveis de teoria.....	36
2.3.3.1. Modelagem molecular.....	36
2.3.3.2. Bases.....	37
2.3.3.2.1. Funções do tipo Slater (FTSs).....	38
2.3.3.2.2. Funções do tipo Gaussianas (FTGs).....	39
2.3.3.2.3. Método variacional.....	39
2.3.3.2.4. Funções de polarização.....	40
2.3.3.3. Princípio de exclusão de Pauli.....	40
2.3.3.4. Determinante de Slater.....	41
2.3.3.5. Método Hartree-Fock (HF).....	42
2.3.3.6. Teoria do Funcional da Densidade (DFT).....	43
2.3.3.7. Método de solvatação.....	46
2.3.4. Propriedades analisadas.....	48
2.3.4.1. Propriedades físico-químicas.....	48
2.3.4.1.1. Energia (E).....	48
2.3.4.1.2. Momento dipolar ( $\mu$ ).....	48
2.3.4.1.3. Eletronegatividade de Mulliken ( $\xi$ ).....	48
2.3.4.1.4. HOMO.....	48
2.3.4.1.5. LUMO.....	48
2.3.4.1.6. Polarizabilidade (POL).....	48
2.3.4.2. Propriedades correlacionadas a relação estrutura-atividade (SAR).....	49
2.3.4.2.1. Grupamentos estruturais (diedros, ângulos e raio).....	49
2.3.4.2.2. Logaritmo do coeficiente de partição (log p).....	49
2.3.4.2.3. Fatores de solubilidade (volume e massa).....	49
2.4. Quimiometria.....	50
2.4.1. Análise de Agrupamentos Hierárquicos (HCA).....	50
2.4.2. Análise de Componentes Principais (PCA).....	51
3. METODOLOGIA.....	52
3.1. Procedimento Teórico.....	52

3.1.1. Modelo utilizado.....	52
3.1.2. Método .....	52
3.1.3. Conjunto de base .....	52
3.1.4. Cálculos de pré-otimização.....	53
3.1.5. Cálculos das propriedades .....	53
3.1.6. Rotina de cálculos.....	53
3.2. Procedimento Experimental.....	54
3.2.1. Purificação da PLA <sub>2</sub> .....	54
3.2.2. Síntese dos flavonóides.....	55
3.2.3. Testes <i>in vivo</i> .....	55
3.2.4. Indução de edema.....	55
3.2.5. Atividade miotóxica.....	56
3.3. Análise Estatística.....	56
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	57
4.1. Abordagem Teórica.....	57
4.1.1. Ângulos diedros.....	57
4.1.2. Log p.....	61
4.1.3. Momento dipolar.....	63
4.1.4. GAP.....	65
4.1.5. Eletronegatividade, Macieza e Dureza.....	67
4.1.6. Energia.....	71
4.1.7. Refratividade e Polarizabilidade.....	73
4.2. Análises <i>in vivo</i> .....	76
4.3. Análise Quimiométrica.....	82
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	89
6. REFERÊNCIAS.....	91

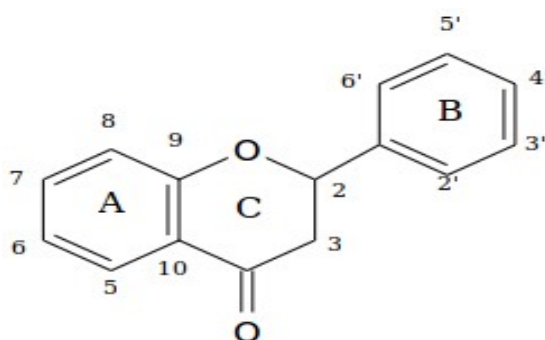
# 1. INTRODUÇÃO

Os flavonóides constituem uma classe de compostos formada por mais de 4000 substâncias. Estudos relatam inúmeras propriedades dos flavonóides dentre elas a antiinflamatória, ação anti-alérgica, anti viral [1,2] dentre outras. Eles podem ter origem biossintética (obtidos através de plantas), com uma abundância relativa entre os metabólitos secundários dos vegetais, ou sintética onde são produzidos por reagentes de partida e manipulados, para assim serem obtidos os produtos desejados.

Devido à sua capacidade antiinflamatória e por serem amplamente utilizados na dieta diária através do consumo de produtos naturais como frutas, chás e vinho [3] é que se introduz a idéia de não serem tóxicos possibilitando estudos que visam a elucidação do potencial terapêutico dos mesmos.

Alguns flavonóides com ação antiinflamatória foram capazes de inibir a ação das fosfolipases tipo A da classe II (PLA<sub>2</sub>). Esta enzima é uma das responsáveis pelo desencadeamento dos processos inflamatórios e é um possível alvo para a descoberta, desenho e síntese de novas drogas com a ação antiinflamatória [4-6].

Outra atividade atribuída aos flavonóides devido à sua estrutura fenólica, é a de apresentar capacidade antioxidante, que é dada em particular pela presença da hidroxila na posição c3' e c4' (figura 1), que pode doar elétrons e suportar a deslocalização em torno do sistema aromático que atuam no aumento do potencial antioxidante [7, 8].



*Figura 1: Estrutura química e numeração padrão adotada para os flavonóides.*

Dentre as enzimas inibidas pelos flavonóides, além das PLA<sub>2</sub>, estão as ciclooxigenase e lipoxigenase, que são enzimas chaves na biossíntese dos eicosanóides. Estes últimos desempenham papel muito importante na inflamação, na sensação de dor e

na reparação do tecido [9].

Devido o processo inflamatório ser normalmente uma resposta imune do corpo a qualquer agente externo seja ele químico, físico ou agentes infecciosos a atuação destes no organismo pode ser analisada por ensaios *in vivo* utilizando-se cobaias, e testes como atividade edematogênica e miotóxica para a comprovação da atividade inibitória de alguns compostos, como por exemplo os flavonóides, no combate a inflamação.

A literatura descreve uma combinação importante entre os estudos teóricos e ensaios *in vivo*, pois a análise conformacional em conjunto com os resultados experimentais obtidos elucidam a relação estrutura-atividade, já que os ensaios feitos podem indicar se a substância testada pode ou não apresentar atividade inibitória da enzima PLA<sub>2</sub>.

O estudo teórico desenvolvido para a análise dos flavonóides sintéticos baseia-se na DFT, desenvolvido por Hoemberg e Kohn [10], que demonstraram através do seu estudo que a energia de um sistema mecânico quântico é determinada exclusivamente pela sua densidade eletrônica.

Além disso, são utilizados juntamente com o método teórico as funções de base 6-31G\*, 6-31++G\*\* e cc-pVTZ, com o intuito de compará-las e verificar qual dos conjuntos de base melhor descreve o sistema estudado, e por fim o funcional, B3LYP, o qual apresenta características *ab initio* e semi-empíricas e por isso é classificado como funcional híbrido.

É com base nesse nível de teoria que os parâmetros físico-químicos (moleculares e eletrônicos) de importante relevância são calculados para que dessa forma nós possamos ter a elucidação estrutural das substâncias em estudo, dentre as principais propriedades a serem analisadas estão o momento dipolar, coeficiente de partição e energia, bem como os parâmetros estruturais.

Assim, a relação estrutura-atividade pode ser analisada através de um método chamado de quimiometria, que pode ser definida como “uma área da Química que emprega meios matemáticos e estatísticos para planejar ou selecionar experimentos de forma otimizada e para fornecer o máximo de informação química com a análise dos dados obtidos”[11, 12]. Este método é essencial no auxílio da análise e obtenção de informações relevantes da série de dados coletados que melhor descrevam os sistemas em estudo, através de ferramentas matemáticas e estatísticas. É por meio dessa técnica que os resultados obtidos ao longo de todo o estudo serão analisados a fim de que possamos relacionar a substância com suas propriedades que melhor indiquem as possíveis inibições de atividades.



## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1. Flavonóides

#### 2.1.1. Características gerais

Os flavonóides são biossintetizados a partir da via dos fenilpropanóides e constituem uma importante classe de polifenóis. O termo “fenólico” ou “polifenol” pode ser definido como uma substância que tem um ou mais núcleos aromáticos contendo grupos hidroxilas ou seus derivados funcionais (ésteres, metoxilas, glicosídeos e outros). Entretanto, uma definição levando em conta somente a estrutura química não é apropriada, uma vez que existem compostos contendo hidroxilas fenólicas, fazendo parte de outras classes de metabólitos. Dessa forma, é mais conveniente empregar-se uma definição que leva em conta também sua origem biogenética [13].

Na classe dos flavonóides, os nomes triviais são empregados frequentemente e possuem, na grande maioria dos casos, relação com a planta na qual foram identificadas pela primeira vez. Por exemplo: tricina foi isolada de *Triticum sp.*, robinetina de *Robinia sp.*, e quercetina de *Quercus sp* [13].

Os flavonóides representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural. Essa classe de compostos é amplamente distribuída no reino vegetal.

Podem-se encontrar flavonóides em diversas formas estruturais. Entretanto, a maioria dos representantes dessa classe possui 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, constituído de duas fenilas ligadas por uma cadeia de três átomos entre elas. Nos compostos tricíclicos, as unidades são chamadas núcleos A, B, e C e os átomos de carbono recebem a numeração com números ordinários para os núcleos A e C e os mesmos números seguidos de uma linha (') para o núcleo B (figura 1) [3].

O interesse econômico dos flavonóides é decorrente de suas diferentes propriedades, como por exemplo, as cores que esses pigmentos possuem, na fermentação do chá-da-índia, na manufatura do cacau e suas atribuições em nutrição e sabor dos alimentos. Além disso, esses compostos possuem importância farmacológica, resultados de algumas propriedades importantes atribuídas a alguns representantes da classe, como por exemplo: anticarcinogênico, antiinflamatório, antialérgico, antiulcerogênico, antivirais, entre outros [13].

Dentre os aspectos de relevância dessa classe importante de compostos,

destacam-se para esse estudo as propriedades farmacológicas que serão descritas com maiores detalhes mais adiante, vale ressaltar em especial a antiinflamatória que além de ser o foco da pesquisa, tem sido durante muitos anos estudada por cientistas de vários países com o intuito de elucidar a atuação dessas substâncias frente ao processo inflamatório e assim, ter o mecanismo de ação dos flavonóides descrito com mais eficiência.

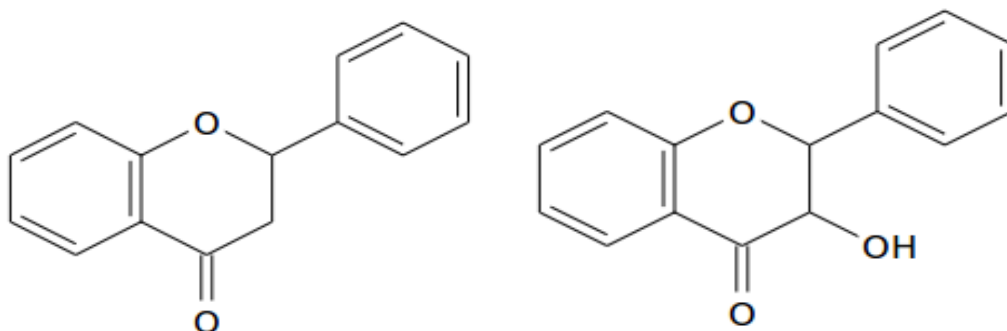
Dentre o grande número de flavonóides existentes, a seguir serão descritos alguns representantes agrupados em classes de acordo com suas características químicas e biossintéticas.

### 2.1.2. Flavonas e Flavonóis

Esses compostos fazem parte de um grande grupo de flavonóides de origem biossintética muito próximas, devido os flavonóis serem flavonas substituídas na posição C3 por uma hidroxila assim, alguns tipos de oxigenação como as posições em 5, 7, 3' e 4' são os mesmos para as duas classes [13].

As flavonas e os flavonóis naturais são frequentemente oxigenados, substituídos com hidroxilas e/ou metoxilas. As flavonas são derivadas da 2-fenilcromona (figura 2) e os flavonóis da 3-hidróxi-2-fenilcromona (figura 2) [13].

Os mais comuns para a flavona são a apigenina e luteonina, livres (agliconas) ou conjugadas (heterosídeos), com relação aos flavonóis tem-se canferol, quercetina e miricetina [13].



*Figura 2: 2-fenilcromona (figura da esquerda) e 3-hidróxi-2-fenilcromona (figura da direita).*

### 2.1.3. Flavonóides

Sua principal característica química é a resistência à hidrólise ácida. Dentre os mais abundantes tem-se: chalconas, auronas, di-hidroflavonóides, isoflavonóides, neoflavonóides e biflavonóides [13].

As chalconas são uma família de compostos que possuem como núcleo fundamental o 1,3-diarilpropano, modificado pela presença de uma ligação olefínica, de um grupamento cetona e /ou de um grupo hidroxila (figura 3). Elas são precursoras da via de biossíntese dos flavonóides [13].

As chalconas e auronas são identificadas em geral na mesma planta, tendo papel importante em sistemas ecológicos em função das cores que produzem nos vegetais [13].

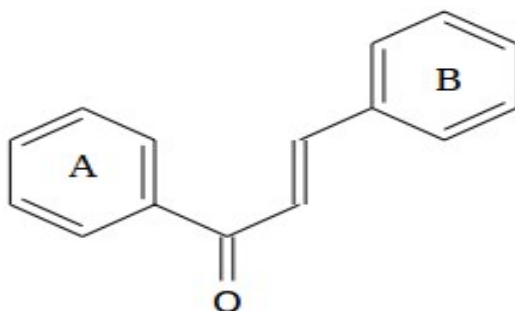


Figura 3: Núcleo fundamental das chalconas.

O termo aurona (figura 4) foi proposto por Bate-Smith e Geissman em razão da cor de ouro apresentada por esses compostos e da semelhança estrutural com as flavonas. As auronas são derivadas de 2-benzilidenocumaranonona [13].

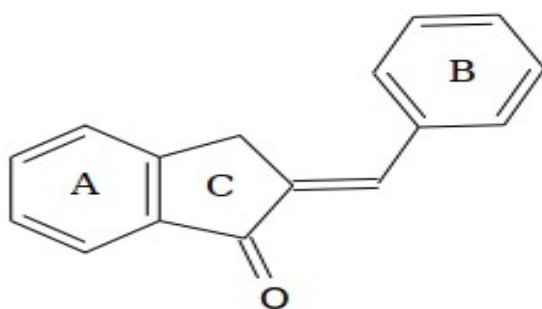
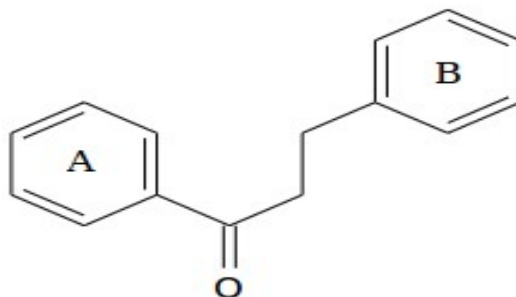


Figura 4: Núcleo fundamental das auronas.

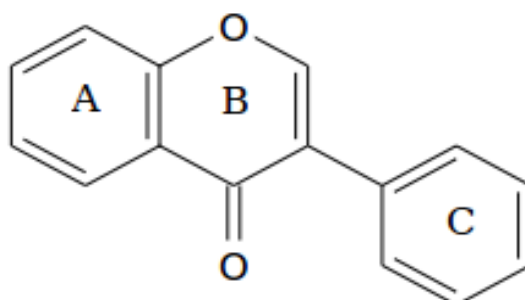
Os di-hidroflavonóides (figura 5) são representados pelas flavanonas ou di-hidroflavonas, di-hidroflavonóis ou flavononóis ou ainda 3-hidróxi-flavanonas e as hidrochalconas. As flavanonas são intermediárias da biossíntese da maioria das classes

de flavonóides, as di-hidrochalconas apresentam nas variações de estruturas os substituintes hidroxila, metila, alquila, dentre outros [13].



*Figura 5: Núcleo fundamental das flavanonas.*

Os isoflavonóides (figura 6) são caracterizados como os demais flavonóides por uma cadeia arila-c3-arila, mas do tipo difenil-1,2-propano. Seus substituintes mais comuns são os grupamentos hidroxila, metoxila e metilenodioxila, além do grupo isoprenila [13].



*Figura 6: Núcleo fundamental das isoflavonas.*

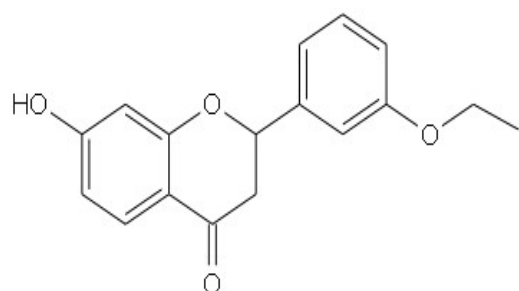
Por fim, tem-se os biflavonóides que contituem uma classe de flavonóides dímeros de flavonas e flavanonas, raramente chalconas, apresentando substituintes nas posições dos carbonos 5, 7, 4' e, mais raramente 5, 7, 3', 4'. Os monômeros podem ser iguais ou de diferentes tipos: flavona-flavona, flavanona-flavanona ou flavona-flavanona [13].

Dentre as inúmeras classes de flavonóides existentes e passíveis de extração biossintética de plantas da flora brasileira, escolheu-se para o presente estudo flavonas sintéticas, que são obtidas de maneira mais fácil, pois são economicamente viáveis, além de terem um custo laboratorial menor. É bom frisar que o método de obtenção para as

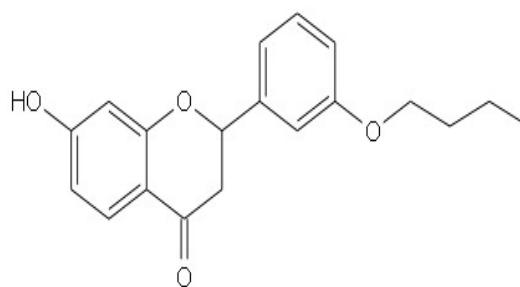
substâncias a serem testadas em nada altera as análises executadas.

### 2.1.3.1. Flavonóides sintéticos

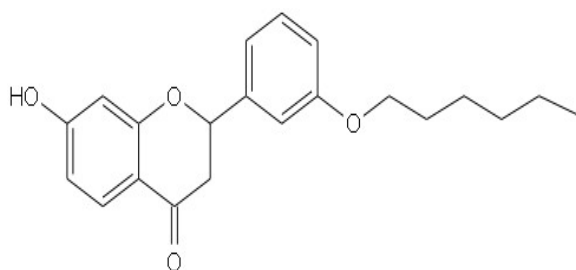
Os flavonóides sintéticos foram obtidos pelo grupo de síntese orgânica da Universidade Federal do Paraná (UFPR), coordenado pelo Prof<sup>o</sup> Dr. Alfredo Oliveira, que tem parceria com o Grupo de Química Teórica Computacional e Prospecção de Substâncias Bioativas (GQTCPSB – UFAM).



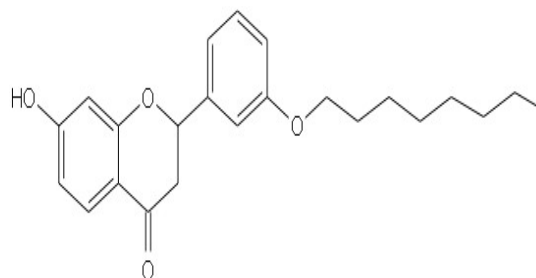
3'-etoxi-flavona



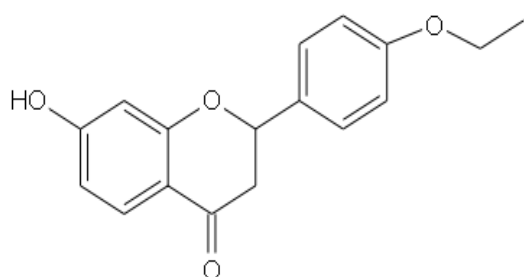
3'-butoxi-flavona



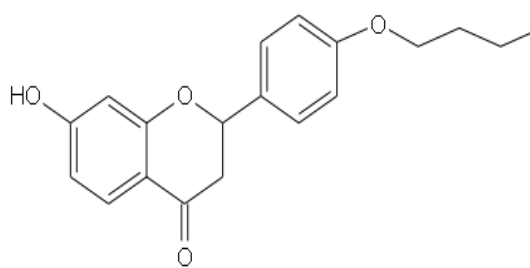
3'-hexoxi-flavona



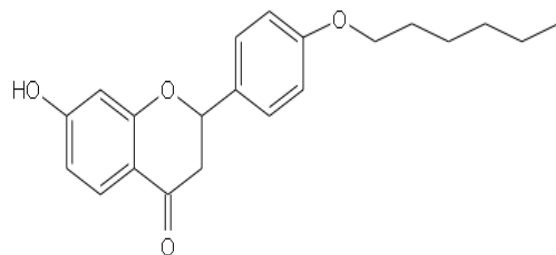
3'-octoxi-flavona



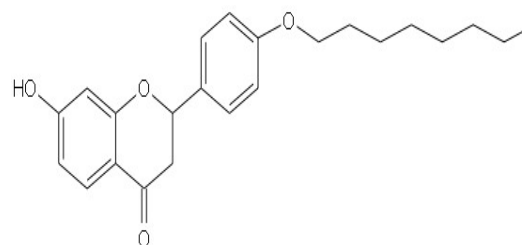
4'-etoxi-flavona



4'-butoxi-flavona



4'-hexoxi-flavona



4'-octoxi-flavona

Tabela 1: Flavonóides sintéticos utilizados no estudo.

#### **2.1.4. Propriedades farmacológicas**

O emprego dos flavonóides em terapêutica é vasto e ainda empírico, uma vez que a prática de uso é mais antiga que o desenvolvimento de análises farmacológicas modernas. Embora, alguns resultados tenham mostrado que os flavonóides podem apresentar efeito mutagênico, em geral são considerados compostos com propriedades farmacológicas interessantes e benéficas. Alguns medicamentos contêm flavonóides, indicados, em particular, para o tratamento de doenças circulatórias, hipertensão e agindo com cofator da vitamina C (catequina e rutina, hesperidina, e epicatequina respectivamente [14]). Outras pesquisas sugerem que alguns flavonóides possuam uma ação anticarcinogênica, agentes antivirais, anti-hemorrágicos entre outros [15 - 18].

#### **2.1.5. Processo inflamatório**

Existem duas famílias de derivados dos fosfolipídeos da membrana: os eicosanóides, que são formados a partir de alguns ácidos graxos poliinsaturados (principalmente ácido araquidônico), incluem as prostaglandinas, prostaciclina, tromboxano A<sub>2</sub> e leucotrienos; e os fosfolipídeos modificados, representados pelo fator ativador plaquetário (FAP). Os eicosanóides são extremamente prevalentes e têm sido detectados em quase todos os tecidos e líquidos do corpo. Sua produção aumenta em resposta a vários estímulos e eles produzem uma grande variedade de efeitos biológicos, decorrentes de estímulos mecânicos, térmicos, químicos, bacterianos e outros e contribuem significativamente para a patogenia dos sinais e sintomas da inflamação [19 – 21].

O processo inflamatório consiste em uma resposta orgânica à lesão tecidual, levando a sucessivos eventos celulares e vasculares no tecido lesado [18, 22, 23]. Cada estímulo provoca um padrão característico de resposta, que representa uma variação relativamente pequena do mesmo tema. A resposta geralmente é acompanhada de sinais clínicos bem conhecidos como [24]:

- Calor;
- Rubor;
- Edema;
- Dor;
- Perda da função do tecido lesado.

As respostas inflamatórias ocorrem em três fases diferentes, cada qual aparentemente mediada por mecanismos diversos: (1) fase transitória aguda caracterizada por vasodilatação localizada e aumento da permeabilidade vascular; (2) fase subaguda, ou tardia, marcada pela infiltração dos leucócitos e células fagocitárias; e (3) fase proliferativa crônica, na qual há degeneração tecidual e fibrose. Vários mecanismos diferentes estão envolvidos no processo inflamatório [25, 26]. A capacidade de desencadear uma resposta inflamatória é fundamental à sobrevivência, em vista dos patógenos e lesões ambientais, embora em algumas situações e doenças a resposta inflamatória possa ser exagerada e persistente, sem qualquer benefício aparente [24].

No processo inflamatório a fosfolipase  $A_2$  hidrolisa os fosfolipídeos de membrana, dando origem aos ácidos araquidônicos que serão utilizados como substrato da ciclooxigenase e da lipoxigenase, para formar os eicosanóides (leucotrienos, tromboxanos e prostaglandinas) que são responsáveis pelos efeitos fisiológicos associados à inflamação (dor, febre e etc.) [18, 22, 23].

O processo inflamatório juntamente com as substâncias envolvidas nele, estão esquematizados na figura abaixo.

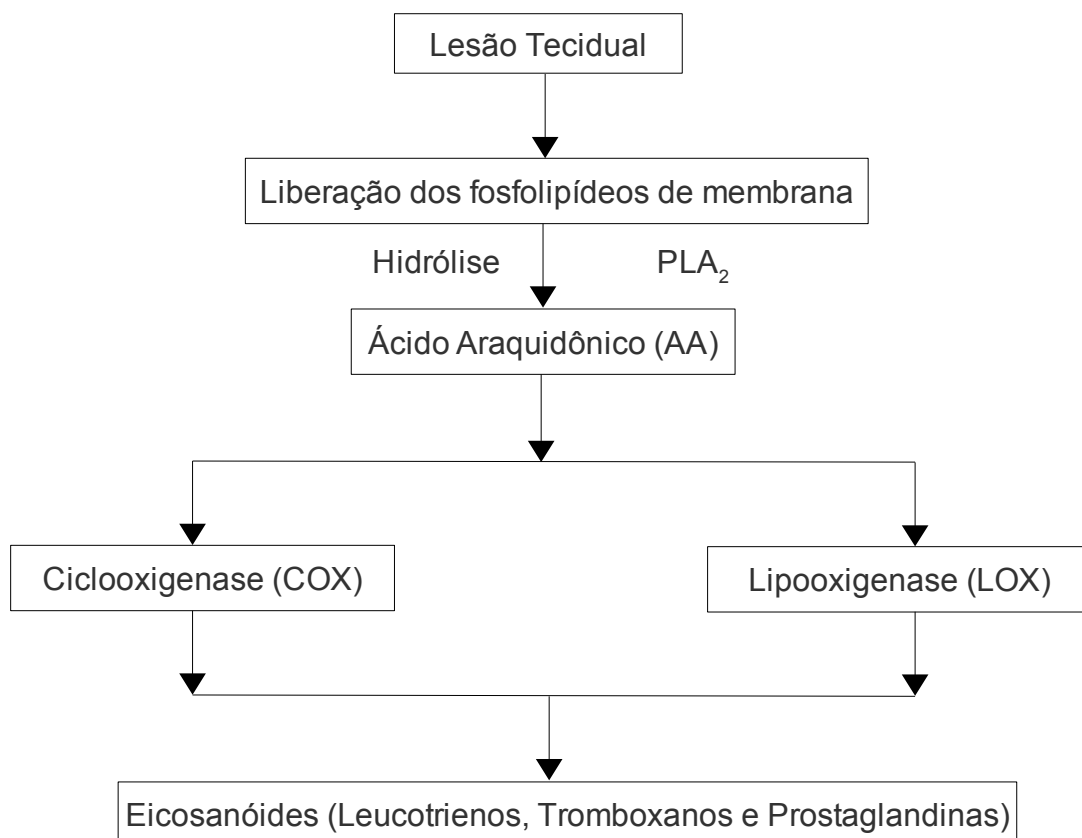


Figura 7: Representação do processo inflamatório.

Logo que o agente inflamatório se instala nos tecidos, ocorrem dois grupos de fenômenos: (1) alterações no calibre dos vasos e no fluxo do sangue; e (2) alterações na permeabilidade vascular.

(1) alterações no calibre dos vasos e no fluxo do sangue

Começam logo depois da aplicação ou instalação do agente inflamatório no tecido. A intensidade das alterações depende da severidade do agente [27]. Apesar dos vasos sanguíneos não serem habitualmente considerados como parte do sistema imunológico, eles reagem de modo característico à lesão ou infecção, sendo estas reações de suma importância para a defesa do organismo. Praticamente qualquer tipo de agressão para um tecido sólido tende a ser acompanhado de rápida dilatação dos pequenos vasos sanguíneos nos tecidos lesados e ao seu redor. Esta resposta vascular (vasodilatação) pode ocorrer dentro de poucos minutos após uma lesão aguda e resulta em um aumento do fluxo sanguíneo local na área lesada [28].

(2) alterações na permeabilidade vascular

O aumento da permeabilidade que leva à saída de um líquido rico em proteínas, denominado exsudato, do interior dos vasos para os espaços extravasculares, é o fenômeno chave do processo inflamatório agudo [27].

A saída do exsudato produz dois efeitos interdependentes e simultâneos: (a) desfalca o plasma de parte de suas proteínas e reduz a pressão osmótica intravascular; (b) enriquece os espaços extravasculares adjacentes com quantidades extra de proteínas e aumenta a pressão osmótica extravascular. Esses dois fenômenos, associados ao aumento da pressão hidrostática, levam a uma acentuada saída de líquido do vaso para o espaço extravascular. O acúmulo de exsudato nos tecidos é conhecido como edema [27].

Estas alterações fisiológicas são benéficas, de várias maneiras, para o hospedeiro. Assim, por exemplo, o aumento do suprimento sanguíneo local ajuda a melhorar o suprimento de oxigênio, plaquetas e fatores de coagulação na área lesada, o que, por sua vez, ajuda a estabilizar os tecidos lesados e facilita a cicatrização e reparo das feridas. Além disso, o líquido vascular que extravasa nos tecidos pode diluir ou dissolver substâncias nocivas e trazer com ele muitas das proteínas antimicrobianas do soro, ajudando, assim, a fornecer rapidamente fatores de defesa inespecíficos e inatos nos locais onde são necessários [28]. A descrição dos fenômenos que ocorrem no processo inflamatório pode ser observada de forma resumida no esquema a seguir (figura 8).

Para analisarmos as substâncias estudadas frente a fosfolipase A<sub>2</sub>, a qual é tida como a enzima principal no processo inflamatório, fez-se necessário o uso de cobaias



(ratos ou camundongos) para assim, serem feitas induções inflamatórias, que é conhecida como atividade edematogênica, e por fim termos a atuação dos flavonóides na inibição da PLA<sub>2</sub>.

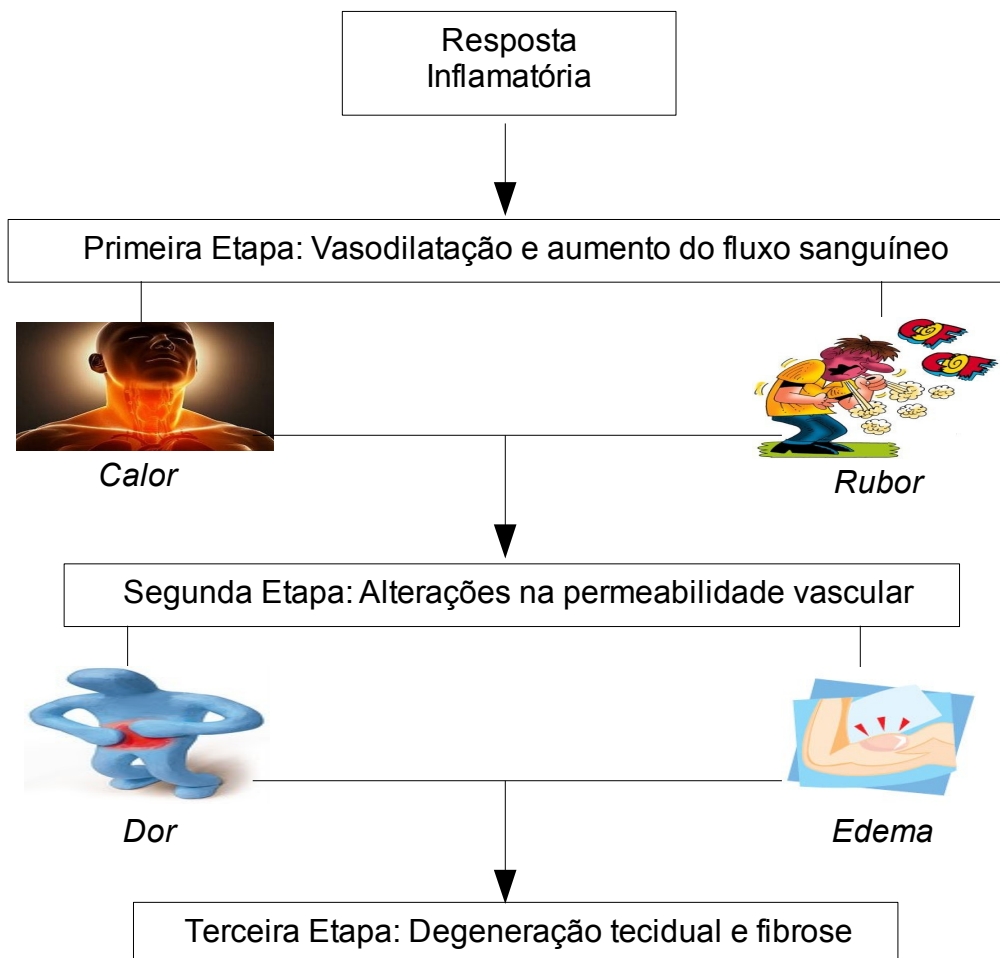
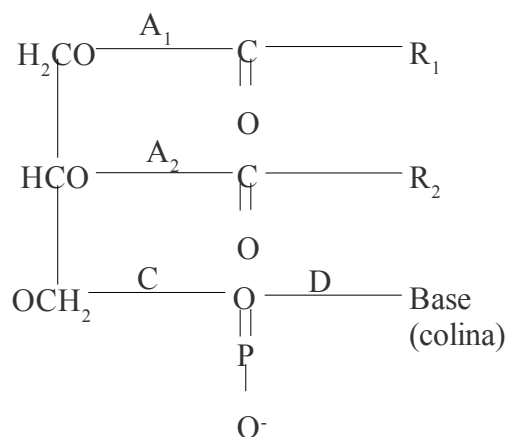


Figura 8: Representação macroscópica do processo inflamatório.

### 2.1.6. PLA<sub>2</sub>

A fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) é uma classe de enzimas envolvida em muitos processos celulares como o crescimento normal das células, imunoregulação, bem como estado de enfermidade (inflamação) [5] este último é catalizado pela hidrólise sn-2 do éster dos glicerofosfolipídeos de membrana (figura 8) resultando na liberação do ácido araquidônico, que é precursor metabólico de vários compostos lipofílicos bioativos, dentre eles as enzimas ciclooxigenase e a lipooxigenase e, como consequência, os produtos da cascata do ácido araquidônico, os chamados eicosanóides [6, 29 – 31]. Além deles, outro potente mediador celular também originado pela hidrólise sn-2 é o fator de ativação plaquetária (PAF), que assim como os eicosanóides também está envolvido no processo

inflamatório [4, 29].



*Figura 9: Sítios de ação das fosfolipases A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, C e D sobre uma molécula típica de fosfolípido, no caso, fosfatidilcolina.*

Avanços recentes na biologia molecular e celular tem levado à identificação de mais de dez isoenzimas da PLA<sub>2</sub> que podem ser subdivididas nos diversos grupos baseando-se nas estruturas, atividade enzimática, distribuição subcelular e função celular. Dessa forma tem-se a PLA<sub>2</sub> intracelular (iPLA<sub>2</sub>); citosólica dependente de Ca<sup>+2</sup> (cPLA<sub>2</sub> α, tipo IV) que são essenciais para a produção de mediadores lipídicos em resposta a vários estímulos; enquanto que a citosólica independente de Ca<sup>+2</sup> (iPLA<sub>2</sub>, tipo VI) é importante na remodelagem lipídica [32, 33]; PLA<sub>2</sub> secretada (sPLA<sub>2</sub>) que compreende uma família de seis enzimas identificadas em mamíferos, a sPLA<sub>2</sub> IIA que é encontrada em humanos e ratos, é induzida somente por estímulos pró-inflamatórios[32].

O grupo II da PLA<sub>2</sub> foi primeiramente encontrada no veneno de cobras do tipo *Viperidae* e *Crotalidae*, mas recentemente foi identificada no veneno de abelhas [6]. Apesar da rota dos diferentes tipos de PLA<sub>2</sub> no processo inflamatório e em outras patologias ser ainda incerto, a sPLA<sub>2</sub> tem sido encontrada no fluido sinovial do reumatismo [6, 29, 30, 34], no plasma depois da inflamação, em choques sépticos, além de outras doenças inflamatórias como asma, psoríase, doença de Crohn's e no colapso circulatório [29, 30].

Devido à sPLA<sub>2</sub> ser considerada a enzima responsável pelo processo inflamatório, diversos estudos têm sido desenvolvidos com o intuito de descobrir agentes farmacológicos que inibam esta enzima e dessa forma controlem o processo inflamatório. Para isso, é necessário sabermos a estrutura da mesma bem como seu sítio ativo, na década de 90, pesquisadores como Scott et al., 1990a, 1991; White et al., 1990,

estudaram a estrutura da sPLA<sub>2</sub> em 3D, particularmente o sítio ativo desta enzima, estes estudos ajudaram a indicar o mecanismo catalítico para a hidrólise do substrato e para uma possível estrutura que venha a inibir a mesma [29].

Muitas das etapas biossintéticas envolvidas no processo inflamatório podem ser inibidas por medicamentos. A inibição da sPLA<sub>2</sub> reduz a liberação dos ácidos graxos precursores e, desta forma, a síntese de todos os metabólitos derivados deles. Como a sPLA<sub>2</sub> é ativada pelo Ca<sup>+2</sup>, ela pode ser inibida pelos medicamentos que reduzem a disponibilidade deste cátion. Os glicocorticóides também inibem a sPLA<sub>2</sub>, porém eles o fazem indiretamente induzindo a síntese de uma proteína (lipocortina), que inibe a enzima [38]. Assim, substâncias de origem natural ou sintéticas são testadas visando o desenvolvimento de agentes antiinflamatórios e a inibição específica dessa enzima [31].

O esquema a seguir nos dá uma visão mais simplificada das possíveis formas de inibição da PLA<sub>2</sub> e do provável lugar de atuação das flavonas sintéticas utilizadas nesse estudo. Dessa forma, podemos verificar a eficiência das substâncias em questão comparadas com as drogas comercializadas.

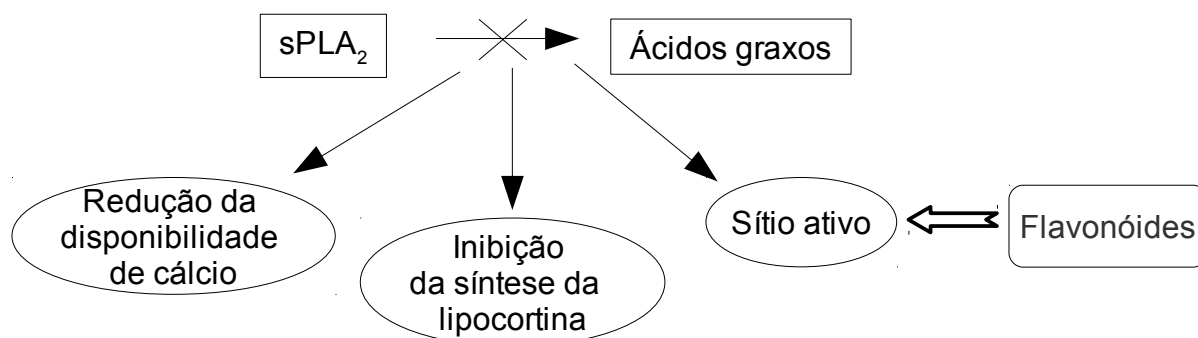


Figura 10: Possíveis formas de inibição da PLA<sub>2</sub> e provável lugar de atuação das flavonas sintéticas.

### 2.1.7. Ciclooxygenase (COX)

A prostaglandina H<sub>2</sub>-sintase tem duas isoformas, COX-1 e COX-2 e recentemente Daniel Simmons descobriu a terceira isoenzima, a COX-3, que é expressa em altos níveis no sistema nervoso central e, aparentemente, é o alvo de drogas que reduzem a dor e a febre [23]. A COX-1 é expressa constitutivamente (sem regulação) na maioria dos tecidos dos mamíferos (mucosa gástrica, plaquetas, endotélio vascular e rim), mantendo assim os níveis de síntese de prostaglandina necessários para manter a homeostasia dos órgãos e

tecidos [22, 23, 39].

A COX-2 é expressa somente em determinados tecidos em resposta a estímulos inflamatórios, sendo conhecida como indutiva e por isso é a responsável pelos níveis elevados de prostaglandinas que causam a inflamação [22, 23, 39].

A COX-1 e a COX-2 diferem quanto à sua sensibilidade à inibição por alguns medicamentos antiinflamatórios [40]. A inibição seletiva da COX-2 pode ter vantagens terapêuticas, já que esta isoenzima provavelmente está envolvida na produção das prostaglandinas no local inflamatório, porém não em outros locais, como no trato gastrointestinal e os rins. Portanto, um inibidor da COX-2 pode ter ação antiinflamatória sem produzir os efeitos colaterais de reduzir a função renal ou formar ulcerações gástricas [24].

### **2.1.8. Drogas antiinflamatórias**

As drogas antiinflamatórias existentes hoje, tendem a não somente minimizar os efeitos da inflamação, mas também diminuir os efeitos colaterais resultantes da sua administração por tempo prolongado [41]. Estão divididas em duas classe antiinflamatórios esteroidais e antiinflamatórios não-esteroidais, esta última classe também é conhecida como medicamentos antiinflamatórios não-esteroidais (MAINE) [24].

As drogas antiinflamatórias não-esteroidais (AINEs), estão entre os agentes farmacológicos mais usados na prática médica. Apresentam amplo espectro de indicações terapêuticas, como: analgesia, antiinflamação, profilaxia contra doenças cardiovasculares, além de serem de grande utilidade na anestesiologia [39].

As AINEs, como a aspirina, indometacina e fenilbutazona, bloqueiam a produção de prostaglandinas por inibição irreversível da COX. A aspirina inibe a enzima por acetilação, as demais inibem por ligarem-se não covalentemente, em vez de acetilarem. A aspirina é mais potente contra a COX-1 do que contra a COX-2, o mesmo ocorre para os demais AINEs [22]. Devido os AINEs serem relativamente inespecíficos podem apresentar efeitos colaterais adversos quando usados no tratamento de inflamação e febre [23].

A grande maioria dos AINES é de ácido orgânico e, ao contrário da aspirina, funcionam como inibidores competitivos reversíveis da atividade da ciclooxigenase. Mesmo o medicamento original não ácido (nabumetona) é convertido num derivado ativo do ácido acético *in vivo*. Como ácidos orgânicos, esses compostos geralmente são bem absorvidos por via oral, ligam-se amplamente às proteínas plasmáticas e são excretados pelos rins. Ao contrário da aspirina, cuja duração da ação é determinada pela taxa da

síntese de novas enzimas ciclooxigenases, a duração da ação de todos os outros AINEs está relacionada principalmente à depuração farmacocinética dos medicamentos pelo organismo. Os AINEs podem ser, grosso modo, divididos em dois grupos: os que possuem meias-vidas curtas (< 6 horas) e longas (> 10 horas) [42]. Como a aspirina e outros AINEs são ácidos orgânicos, eles se acumulam nos locais da inflamação, o que representa uma propriedade farmacocinética interessante para os agentes administrados como antiinflamatórios.

Inicialmente, foi demonstrado que a aspirina e medicamentos antiinflamatórios não-esteróides semelhantes evitavam a síntese das prostaglandinas a partir do araquidonato nos tecidos [43]. Hoje em dia, está claro que esses medicamentos inibem a ciclooxigenase e, conseqüentemente, de todos os compostos que lhes seguem. Entretanto, esses medicamentos não inibem o metabolismo do araquidonato pelas lipoxigenases. Na verdade, a inibição da ciclooxigenase pode aumentar a produção de leucotrienos, talvez por ampliar a quantidade de araquidonato disponível para as lipoxigenases [44]. A inibição da ciclooxigenase oferece uma base importante para se compreender muitos dos efeitos terapêuticos dos fármacos [24].

Drogas antiinflamatórias esteroidais, como hidrocortizona, prednisona e betametasona, bloqueiam a liberação de prostaglandinas por inibirem a atividade de fosfolipase A<sub>2</sub> e interferirem com a liberação de ácido araquidônico. Controle na síntese de prostaglandinas é pouco conhecido, mas, em geral, a liberação de prostaglandinas parece ser disparada por excitação hormonal ou neuronal, ou por atividade muscular [22]. As formas de atuação dos antiinflamatórios esteroidais e não esteroidais são observadas de forma comparativa na tabela 2.

As estruturas tridimensionais da COX-1 e da COX-2 são quase idênticas. Contudo, as diferenças em aminoácidos fazem com que o canal do sítio ativo da COX-2 seja 20% maior em volume do que o da COX-1, por isso, são produzidos inibidores seletivos, chamados de coxibs, que podem entrar no canal da COX-2, mas não no canal da COX-1. Dois desses inibidores rofecoxib (vioxx) e celecoxib (celebrex), tornaram-se as principais drogas no tratamento de doenças antiinflamatórias como a artrite porque não têm os principais efeitos colaterais dos AINEs não-específicos. Contudo, em 2004, o vioxx foi retirado do mercado devido a efeitos colaterais cardíacos não previstos [23].

<b>Antiinflamatórios Esteroidais</b>	<b>Antiinflamatórios Não Esteroidais</b>
Inibem a PLA <sub>2</sub>	Inibem a COX
Não há liberação de AA	Inespecíficos
	Efeitos colaterais
Hidrocortisona, Betametasona, dentre outros	Aspirina, Fenilbutasona, etc.

*Tabela 2: Comparação entre os antiinflamatórios esteroidais e os não esteroidais.*

### **2.1.9. Efeitos farmacológicos dos flavonóides**

São atribuídos vários efeitos biológicos aos flavonóides através de inúmeros estudos que relatam a atividade de inibição da agregação plaquetária, inibição de enzimas como a COX e a LOX (lipoxigenase) e inibição da peroxidação de lipídeos, esses efeitos são justificados devido a capacidade de quelar cátions divalentes e remover radicais livres [18, 45], além da inibição das interações entre o sangue e a parede dos vasos, relacionado ao processo de trombose e efeito protetor nas células endoteliais [46], é essa capacidade inibitória dos mesmos que desperta interesse para a desenvolvimento de inibidores.

O número de flavonóides com alto potencial terapêutico, bem como a classe a qual eles pertencem é muito ampla, logo ficaria muito extensa a citação das aplicações farmacológicas desses compostos, assim foi dado maior ênfase a propriedade aqui estudada, antiinflamatória, e algumas foram relacionadas na tabela 3 juntamente com as devidas referências a serem consultadas de acordo com o interesse.

#### **2.1.9.1. Propriedade antiinflamatória**

Os flavonóides podem inibir a via das ciclooxigenase e/ou a das lipooxigenase. Williams et al. (1995), descobriu em suas análises a maior concentração de flavonóides em *Tanacetum parthanium* que inibe a ligação de enzimas com potencia similar aquela usada na ativação de leucócitos em ratos. Dentre os flavonóides presentes nesta planta, o 6-hidroxicampferol 3,6-dimetil éter e a quercetagetina 3,6,3'-trimetil éter, foram os que demonstraram maior atividade frente a ciclooxigenase, já o 6-hidroxiluteolina 6-metil éter e o 6-3'-dimetil éter inibiram tanto a rota da ciclooxigenase quanto a da 5-lipoxigenase. Esse fato é confirmado pela descoberta de Moroney et al. 1988, a qual mostra que compostos com hidroxilas vicinais apresentam atividade frente a 5-lipoxigenase, um bom exemplo desses compostos é a 8-hidroxiluteolina [47 – 51].

Três antocianinas e outras agliconas e cianidinas foram testadas por Wang et al. 1999b, quanto a habilidade de inibição da prostaglandina endoperóxido sintase-1 e 2 (PGHS-1 e 2). Esses glicosídeos mostraram pouca ou nenhuma atividade na concentração de 300  $\mu\text{M}$  e em concentrações maiores elas aumentaram a atividade da enzima. Entretanto, a aglicona e a cianidina mostraram atividade inibitória significativa na ligação com a enzima na concentração inibitória ( $\text{IC}_{50}$ ) em valores de 90 a 60  $\mu\text{M}$ , comparadas com a atividade da aspirina para essa mesma enzima que é de 1050  $\mu\text{M}$  [50, 51].

As propriedades ulcerogênicas e adversas de drogas antiinflamatórias não esteroidais são atribuídas a inibição da PGHS-1, enquanto que os resultados terapêuticos benéficos são atribuídos a PGHS-2. Uma forte preferência na inibição da PGHS-2, é exibida pela cianidina, o que reduz os efeitos indesejados da PGHS-1 [50, 51].

Outros flavonóides que tem mostrado uma boa atividade antiinflamatória são a apigenina e a quercetina. Koganov et al. 1999, mostrou que a apigenina apresenta uma significativa inibição no crescimento do fibroblasto na concentração de 0,01 a 100 mg/mL. A inibição do crescimento dos fibroblastos por flavonóides semelhantes a apigenina pode ser benéfica para o tratamento de lesões na pele e a quercetina, juntamente com o fenilpropanóide curcumina, pode ser utilizado na cicatrização de transplantes renais [50, 51].

O fato dos flavonóides como a quercetina inibirem a peroxidação não enzimática de ácidos graxos poliinsaturados faz com que atuem como inibidores do processo inflamatório da  $\text{PLA}_2$  de leucocitos em coelhos e humanos [54], da COX e da LOX, enzimas que dão origem aos eicosanóides, substâncias ligadas diretamente a inflamação [18, 55 - 57].

Dentre os outros efeitos biológicos que são exercidos pelos flavonóides está o efeito inibitório na exsudação (matéria resultante do processo inflamatório) de proteínas e migração de leucócito [54], o que torna-os compostos com diferentes vias de atuação biológica, sendo por isso alvo de inúmeras pesquisas que visam elucidar o mecanismo de inibição dos processos biológicos.

Além dessas relatadas anteriormente eles podem atuar ainda no combate a atividade miotóxica, que ocorre devido ao veneno de animais peçonhentos, já que os mesmos são constituídos por complexas misturas de toxinas de origem principalmente protéica, com ação enzimática ou não, sendo considerados peçonhentos somente aqueles animais capazes de produzir e inocular substâncias tóxicas em suas presas, tais

como serpentes, abelhas, aranhas, escorpiões e outros [55].

No Brasil, somente as serpentes dos gêneros *Bothrops*, *Crotalus*, *Micrurus* e *Lachesis* são consideradas peçonhentas. O gênero *Bothrops*, representado pelas serpentes conhecidas como jararacas (jararacuçu, moojeni ou caissaca, neuwied ou boca-de-sapo), são os responsáveis por 90% dos acidentes ofídicos no país [55].

O veneno de serpentes desse gênero causam distúrbios que afetam o sistema de coagulação sanguínea, induzem hemorragia, edema e necrose local. A necrose local frequentemente afeta a pele e as camadas musculares mais profundas e nos casos mais severos pode haver a completa destruição do tecido, perda do órgão ou até mesmo a morte [56]. Estes sintomas são devido ao efeito simultâneo ou aditivo entre as toxinas e enzimas presentes no veneno[55].

Por outro lado, as abelhas, principalmente aquelas pertencentes ao gênero *Apis mellifera*, também são responsáveis por um grande número de acidentes. Nestes casos, as toxinas presentes nestas peçonhas desencadeiam a liberação de mediadores químicos da resposta alérgica, o que também pode em casos mais graves culminar na morte do paciente [55].

Um dos principais componentes do veneno, tanto de serpentes quanto de abelhas, é a PLA<sub>2</sub>, a principal responsável pelo processo inflamatório, além de mionecrose e ação anticoagulante. O veneno de abelhas, apresentam juntamente com a PLA<sub>2</sub> as enzimas fosfatase ácida e a hialuronidase que formam um conjunto de proteínas responsáveis pelo processo alérgico [55]. Para as serpentes do gênero *Bothrops*, a hemorragia local ou sistêmica, também é considerada um dos efeitos mais acentuados do envenenamento e se desenvolve logo após a injeção do veneno, causando danos microvasculares e extravasamento sanguíneo, o que leva o músculo ou outro tecido à degeneração, sendo necessário às vezes a amputação [55].

A atividade edematogênica é outra característica comum do envenenamento por espécies botrópicas. Ocorre devido à ação específica das toxinas do veneno no músculo esquelético, afetando somente as células musculares e deixando intactos o tecido conjuntivo, nervos e vasos [57]. Várias toxinas tem sido isoladas dos venenos botrópicos na tentativa de melhor conhecer o mecanismo de ação da patogenicidade.

Devido aos inúmeros casos de acidentes com animais peçonhentos, faz-se necessário o uso de substâncias que apresentem melhores resultados do que os existentes hoje, como o soro antiofídico e os anti-histamínicos que são usados para as picadas de abelhas. Dessa forma, foram feitos testes *in vivo* utilizando as substâncias em



estudo com o intuito de verificar a ação das mesmas na intervenção do processo inflamatório causado por veneno de cobra obtido da espécie jararacuçu.

<b>Propriedades Farmacológicas</b>	<b>Referências</b>
Hipertensão	[58 - 63]
Antioxidante	[64 - 71]
Arteriosclerose	[72 - 74]
Diabetes melitus	[72 - 79]
Inibidores enzimáticos	[80 - 89]
Inflamação	[90 - 96]
Microorganismos (bactérias e fungos)	[97 - 104]
Câncer	[51, 105 - 114]
Alergia e asma	[115 - 122]

*Tabela 3: Propriedades farmacológicas atribuídas aos flavonóides juntamente com suas referências.*

## **2.2. Química Medicinal**

A química medicinal é baseada na química, envolvendo aspectos das ciências biológica, médica e farmacêutica, cuja missão é o planejamento, descoberta, invenção, identificação e preparação de compostos biologicamente ativos (protótipos), o estudo do metabolismo, interpretação do mecanismo de ação a nível molecular e construção de relações entre a estrutura química e a atividade farmacológica (SAR) [123], visando o uso desses protótipos na medicina para prevenir, tratar ou curar doenças [124].

Surgiu no final do século XIX, devido a busca por medicamentos menos tóxicos do que aqueles baseados em fontes naturais, a partir da introdução de substâncias sintéticas para atuarem como fármacos, que tiveram seu uso amplamente disseminado no século XX. Inicialmente, este desenvolvimento estava centrado ao redor dos produtos naturais isolados de material vegetal e animal, mas, à medida que o conhecimento aumentou, uma ampla faixa de compostos sintéticos evoluiu como fármacos [125].

Devido ao processo de descoberta de fármacos ser caro e exigir muito tempo, a modelagem por computador reduz a necessidade de sintetizar cada análogo de um composto-protótipo. Isso nos permite determinar quali e quantitativamente as diferentes contribuições das distintas sub-unidades estruturais dos fármacos, tanto aquelas de natureza eletrônica como estéricas, quanto de seu reconhecimento molecular pelos sítios

receptores. Ademais, fatores farmacocinéticos e toxicofóricos das substâncias candidatas a novos fármacos podem ser simuladas através da manipulação de grupamentos em um determinado composto que pode alterar a natureza da atividade do mesmo, aumentando sua potência ou o tempo de duração da atividade, o que aumenta as chances de alcançar seu local de ação [125 - 128].

## 2.3. Abordagem Teórica

### 2.3.1. Mecânica quântica (MQ)

A mecânica clássica (MC), estuda o sistema através de equações levando-se em consideração as forças que atuam sobre ele, estas podem ser resolvidas, pois o que é necessário saber como a posição e o momento precisos da partícula, são obtidos a partir de um certo instante  $t=0$ , e o movimento futuro fica determinado de forma exata [131].

A mecânica quântica, apresenta como ponto fundamental a interpretação probabilística, proposta por Heisenberg e Bohr, já que a mecânica clássica não explica os processos ocorridos nos sistemas microscópicos como a quantização proposta por Bohr, o spin semi-inteiro, a descrição de átomos não hidrogenóides e a falta de coerência entre a interpretação ondulatória e a descrição corpuscular [132].

Devido à necessidade de uma melhor descrição dos sistemas microscópicos, surge em 1925 a formulação da moderna teoria quântica, baseada no princípio da incerteza de Heisenberg, também conhecido como princípio da indeterminação, é composto por duas partes. A primeira está relacionada à medida simultânea de posição e momento. Nela uma experiência não pode determinar simultaneamente o valor exato de uma componente do momento, por exemplo  $p_x$ , de uma partícula e também o valor exato da coordenada correspondente,  $x$ . Em vez disso, a precisão de nossa medida está inerentemente ligada pelo processo de medida em si, de forma que,

$$\Delta p_x \Delta x \geq \frac{\hbar}{2} \quad \text{onde} \quad \hbar \equiv \frac{h}{2\pi} \quad (1)$$

onde o momento  $p_x$  é conhecido com uma incerteza de  $\Delta p_x$ , a posição  $x$  no instante com incerteza  $\Delta x$ , e  $h$  é a constante de Planck.

O produto das incertezas,  $\Delta p_x \Delta x$ , nos diz que quanto mais modificarmos uma

experiência para melhorarmos nossa medida de  $p_x$ , mais difícil será determinar  $x$  precisamente. Se o valor de  $p_x$  é conhecido exatamente, nada sabemos a respeito de  $x$  (isto é, se  $\Delta p_x = 0$ ,  $\Delta x = \infty$ ). Portanto, a restrição não é em relação à precisão com que  $p_x$  ou  $x$  podem ser medidas, mas em relação ao produto  $\Delta p_x \Delta x$  numa medida simultânea de ambos.

A segunda parte está relacionada com a medida da energia  $E$  e do tempo  $t$  necessários a medida. Neste caso,

$$\Delta E \Delta t \geq \frac{\hbar}{2} \quad (2)$$

As mesmas condições expostas para a medida simultânea de posição e momento são válidas para as medidas de energia e tempo, logo se não podemos determinar  $E$  e  $t$  simultaneamente, então não podemos especificar as condições iniciais do movimento de forma exata. Então, não podemos determinar precisamente o comportamento futuro de um sistema.

A nova teoria da mecânica quântica, está baseada na teoria de Schrödinger, a qual é uma generalização do postulado de de Broglie, já que uma partícula microscópica age como se certos aspectos de seu comportamento fossem governados pelo comportamento de uma onda ou de uma função de onda. Assim, Schrödinger, propôs uma equação que foi resolvida para o átomo de hidrogênio, nesta é possível obter uma compreensão detalhada das propriedades dos átomos relacionadas às propriedades dos núcleos. Sua forma é dada por:

$$\frac{-\hbar}{2m} \frac{\partial^2 \Psi(x, t)}{\partial x^2} + V(x, t) \Psi(x, t) = i \hbar \frac{\partial \Psi(x, t)}{\partial t} \quad (3)$$

### 2.3.2. Aproximação de Born-Oppenheimer (ABO)

A equação de Schrödinger não pode ser resolvida de maneira exata para sistemas moleculares, então são adicionadas aproximações, para dessa forma termos a descrição estrutural das interações das moléculas a serem estudadas.

Para o entendimento da ABO, faz-se necessário primeiramente o entendimento do

modelo adiabático. Nele, os elétrons contêm massa menor e são mais rápidos comparados ao núcleo sofrem adaptação de velocidade e posição em relação ao núcleo mais pesado e lento; já os núcleos sentem apenas um campo médio devido à presença dos elétrons e suas repulsões, resultando em uma superfície de energia potencial.

É essencial na química quântica o uso do Hamiltoniano para o cálculo das propriedades eletrônicas, uma maneira de calcularmos esse operador Hamiltoniano eletrônico é separarmos os movimentos eletrônico e nuclear, porém o operador continua dependente das coordenadas nucleares onde as autofunções desse operador são tidas como estados eletrônicos e os autovalores como energias eletrônicas.

A função de onda total da molécula pela ABO é representada por:

$$\psi_{total}(núcleo, elétron) = \psi(eletron) \psi(núcleo) \quad (4)$$

já a energia total é a soma da energia eletrônica e a energia nuclear representada por

$$E_{total} = E_{elétron} + E_{núcleo} \quad (5)$$

a energia elétrica compreende na energia cinética e energia potencial do movimento dos elétrons no campo eletrostático dos núcleos com as interações de repulsão elétron-elétron [133].

Portanto, a ABO, é uma maneira de calcularmos o operador Hamiltoniano eletrônico através de cálculos eletrônicos em diferentes configurações nucleares fixas, desprezando a energia cinética dos núcleos [133, 134].

### **2.3.3. Níveis de teoria**

Para termos uma boa descrição do sistema a ser estudado, ou seja, um modelo propriamente dito, faz-se necessário o uso de um conjunto de funções de base, com o auxílio de funcionais e método teórico que detalhem as propriedades elétricas e moleculares de forma que estas sejam mais acuradas possível.

#### **2.3.3.1. Modelagem molecular**

O processo de modelagem molecular envolve um ciclo de desenvolvimento e análise da química medicinal, incluindo outras experiências e intuição química, além disso

é um processo que requer muito tempo e tem um custo elevado, onde são construídas estruturas em 3D das substâncias em questão, e estas são submetidas a análises computacionais de interações entre elétron-elétron, elétron-núcleo e núcleo-núcleo.

Modelagem molecular pode ser simplesmente tida como uma potente técnica computacional baseada em métodos químico teóricos e experimentais que podem ser usados para análise de moléculas e sistemas moleculares para prever propriedades moleculares e biológicas [135].

Essa técnica é de suma importância, pois é através dela que podemos descobrir a relação estrutura atividade de substâncias biológicas comumente difundidas em uma determinada população e dessa forma podemos ter o desenho de um fármaco protótipo, o qual tem a possibilidade de ter sua atividade biológica elucidada e confirmada cientificamente, e tornar-se uma droga amplamente difundida.

### **2.3.3.2. Bases**

As funções de base, ou conjunto de base são tidas como o início de um cálculo químico quântico, já que a escolha das mesmas para um determinado sistema a ser estudado deve ser feita priorizando a qualidade dos resultados a serem obtidos, além disso ela deve obedecer três regras básicas: ser contínua e bem comportada no intervalo utilizado, ou seja, deve ser unívoca (não pode apresentar mais de um valor para o mesmo conjunto de coordenadas), ser independente e ortonormal e por fim deve ser finita para o intervalo usado (figura 11).

A utilização de conjuntos de base para a realização de cálculos químico-quânticos surgiu em 1954 com a proposta de Roothaan [136 - 139]. A introdução destes conjuntos permitiu que cálculos moleculares pudessem ser realizados sem a necessidade de se resolver às equações de Hartree-Fock numericamente, como era prática até então [137, 140, 141].

Dentre as bases existentes tem-se as hidrogenóides, em seguida as desenvolvidas por Slater e mais tarde as Gaussianas, esta última é mais difundida entre a comunidade científica devido seus resultados apresentarem uma boa descrição do sistema, apesar da mesma necessitar de um maior custo computacional para o desenvolvimento dos cálculos.

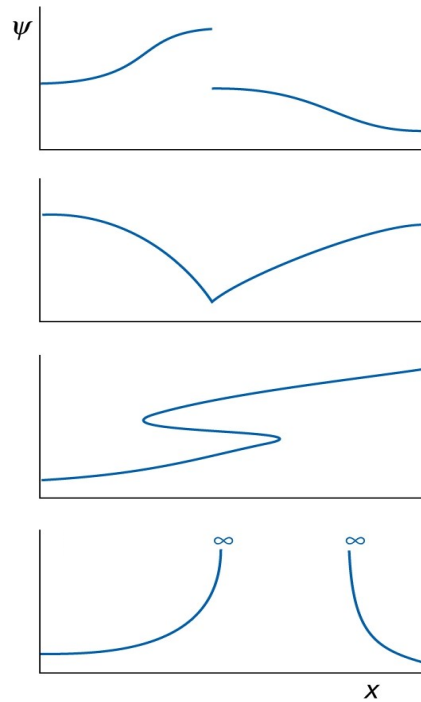


Figura 11: Comportamento inadequado das funções de base.

### 2.3.3.2.1. Funções do tipo Slater (FTSs)

Um dos primeiros casos de funções de base bem sucedidas, no sentido de simplificar a determinação das integrais de energia foram as funções de Slater [142, 143]. Estas funções apresentam certa semelhança com as funções hidrogenóides [144, 145]. Sua representação matemática corresponde à apresentada a seguir [137]:

$$\varphi(r, \theta, \phi) = \left[ \frac{2n!}{\pi} \right]^{-1/2} (2\alpha)^{n+1/2} r^{n-1} e^{-\alpha r} Y_{l,m}(\theta, \phi) \quad (6)$$

onde  $n$  e  $\alpha$  são parâmetros variacionais,  $l$  e  $m$  são números quânticos e  $Y_{l,m}(\theta, \phi)$  é um harmônico esférico. Estas funções apresentam um comportamento em valores pequenos e grandes de  $r$  e sua semelhança com as funções que são soluções do átomo de Hidrogênio fazem dela uma opção natural para cálculos atômicos. Entretanto, quando o cálculo deve ser transferido para uma molécula, as integrais multicêntricas geradas pela utilização de FTSs são de difícil resolução [137].

Para contornar o problema da solução analítica de integrais de energia, funções do tipo gaussianas (FTGs) [146, 147] foram introduzidas.

### 2.3.3.2.2. Funções do tipo Gaussianas (FTGs)

Podem ser representadas da seguinte forma:

$$\varphi(r, \theta, \phi) = N r^{n-1} e^{-\alpha r^2} Y_{l,m}(\theta, \phi) \quad (7)$$
$$N = \left[ \frac{2^{2n+3/2}}{(2n-1)! \sqrt{\pi}} \right]^{1/2} \alpha^{(2n+1)/4}$$

onde  $N$  é uma constante de normalização,  $\alpha$  é um parâmetro variacional e  $Y_{l,m}(\theta, \phi)$  é uma harmônico esférico. A introdução destas funções foi feita por Boys [148] e, apesar de não apresentarem o mesmo comportamento mostrado pelas FTs para valores de  $r$  grandes ou pequenos, sua popularidade reside no fato de que a resolução das integrais multicêntricas [149, 150] torna-se mais fácil do que quando se utiliza FTs [137].

É notório comparando-se os dois tipos de funções de base que a diferença está no termo exponencial, que nas funções gaussianas encontra-se elevado ao quadrado ( $e^{-\alpha r^2}$ ), esta diferença introduz a propriedade fundamental das gaussianas, o produto de duas ou mais funções gaussianas é sempre uma função gaussiana.

Dessa forma, a principal razão para a utilidade de funções gaussianas em cálculos de estrutura eletrônica está na facilidade com que produtos de integrais multidimensionais podem ser fatorados e reescritos em termos de centros alternativos, ou seja, convertemos uma integral tripla em três integrais unidimensionais possibilitando o cálculo analítico das integrais de energia com maior facilidade.

Como a distribuição eletrônica de uma molécula é diferente da de um átomo, faz-se necessário então levarmos em consideração as distorções eletrônicas que ocorrem nos sistemas moleculares, estando eles ionizados ou não, assim são introduzidas aos conjuntos de base funções adicionais que podem ser: funções de polarização ou funções difusas.

### 2.3.3.2.3. Método variacional

É um dos critérios mais utilizados para o desenvolvimento e adaptação de funções de base, sugere que pode-se criar qualquer função de onda com qualquer conjunto de base, que o melhor conjunto de base e a melhor função de onda será aquela que proporcionar a menor energia eletrônica para o sistema [144, 145].

Ele fornece um critério para selecionar, dentre os conjuntos de funções, aquela que mais se aproxima da solução exata, pode ser usado para analisar qualquer estado do sistema, mas a sua aplicação mais importante é no estudo do estado fundamental [134].

Segundo este método, para um sistema descrito pelo Hamiltoniano  $H$ , a energia calculada para qualquer função aproximada,  $(|\phi_{ap}\rangle)$ , será maior ou igual a energia do estado fundamental,  $E_0$ , do sistema:

$$E(|\phi_{ap}\rangle) = \frac{\langle \phi_{ap} | (H | \phi_{ap} \rangle)}{\langle \phi_{ap} | \phi_{ap} \rangle} \geq E_0 \quad (8)$$

A igualdade se verifica quando  $(|\phi_{ap}\rangle)$  for igual a função de onda do estado fundamental.

Deve-se sempre considerar os aspectos relacionados a minimização do custo computacional, para isso outros métodos de adaptação de funções de base atômicas e/ou moleculares são utilizados dentre eles estão os descritos a seguir.

#### 2.3.3.2.4. Funções de polarização

Auxiliam na descrição da distorção da nuvem eletrônica, comum em sistemas moleculares, são representadas por (\*), que indica a inclusão da função de polarização em todos os átomos diferentes do átomo de hidrogênio e (\*\*\*) indica a inclusão em todos os átomos, esta é muito utilizada em moléculas orgânicas de interesse biológico.

Um dos conjuntos de bases testados foi o cc-pVTZ, que é o conjunto de base consistente com a correlação de Dunning, onde cc-p indica, correlation-consistent polarized, ou seja, inclui as funções de polarização bem definidas com relação a valência, o V indica o tipo de valência a ser utilizada, que no caso do conjunto de base testado neste estudo é tripla (T).

De acordo com o que foi explanado, a escolha do conjunto de base (6-31G\*) para este estudo deu-se de forma comparativa entre os conjuntos testados (6-31G\*, 6-31\*\*G\*\* e cc-pVTZ) a fim de termos uma boa descrição para o sistema, além disso ela nos possibilita um menor custo computacional, tornando o cálculo químico quântico mais viável.

#### 2.3.3.3. Princípio de exclusão de Pauli

Todos os elétrons são caracterizados pelo número quântico de spin, este assume



dois valores possíveis  $\frac{\pm\hbar}{2}$ , onde o spin  $\frac{+1}{2}$  é chamado de elétron  $\alpha$ , e o spin  $\frac{-1}{2}$ , elétron  $\beta$ , o número quântico de spin é uma consequência da mecânica quântica relativística do elétron, outra consequência é o princípio de exclusão de Pauli [132, 151, 152].

Para considerar os efeitos de spin, uma função de onda deve incluir uma quarta coordenada para cada elétron, a coordenada de spin ( $\xi$ ), assim a função de onda total que é dada pelo produto das funções de onda monoelétrônicas passa a ser

$$\psi(1,2,\dots,2n)=\phi_1(x_1,y_1,z_1,\xi_1)\phi_2(x_2,y_2,z_2,\xi_2)\dots\phi_{2n}(x_{2n},y_{2n},z_{2n},\xi_{2n}) \quad (9)$$

Outra característica que deve ser incluída na função de onda é devido a mesma representar férmions, logo ela deve trocar de sinal toda vez que forem efetuadas trocas nas coordenadas de dois elétrons.

$$\psi(1,2,\dots,i,j,\dots,2n)=-\psi(1,2,\dots,j,i,\dots,2n) \quad (10)$$

A função de onda que apresenta esta característica é chamada de função de onda anti-simétrica, e a que não apresenta a troca de sinais é tida como função de onda simétrica [144, 145].

Dessa forma o princípio de exclusão de Pauli apresenta uma proibição: dois elétrons em um átomo ou molécula não poderão possuir os quatro números quânticos iguais, pois se isso ocorrer a função de onda se anula. Essa proibição faz com que haja a ocupação de orbitais de maior energia, favorecendo a ligação química [132].

#### **2.3.3.4. Determinante de Slater**

A antissimetria é uma característica dos determinantes, uma forma de se expandir a função de onda eletrônica num conjunto completo de funções determinantis, esta foi proposta por Slater e ficou conhecida como determinante de Slater.

A função de onda de muitos elétrons passa a ser escrita como:

$$\phi_0 = \frac{1}{\sqrt{N!}} \begin{vmatrix} \chi_1(x_1) & \chi_2(x_1) & \cdots & \chi_N(x_1) \\ \chi_1(x_2) & \chi_2(x_2) & \cdots & \chi_N(x_2) \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \chi_1(x_N) & \chi_2(x_N) & \cdots & \chi_N(x_N) \end{vmatrix} \quad (11)$$

onde os  $\chi'_s$  são funções das coordenadas espaciais e spin de um único elétron, admitindo-se que os  $\chi'_s$  são ortonormais, o fator  $\frac{1}{\sqrt{N!}}$  é uma constante de normalização para  $\phi_0$  [132, 134, 144, 145, 151, 152].

A simplificação introduzida pela aproximação do determinante único é a substituição do problema de se encontrar uma função de onda que depende das coordenadas de  $N$  elétrons pelo problema de se encontrar  $N$  funções de onda de um elétron [153].

Podemos observar que se trocarmos as coordenadas de dois elétrons equivale a trocarmos duas linhas do determinante, isto está de acordo com o princípio de exclusão de Pauli, que afirma que dois elétrons não podem ocupar o mesmo estado quântico [153].

### 2.3.3.5. Método Hartree-Fock (HF)

Devido a solução da equação de Schrödinger independente do tempo não ser exata, introduzimos alguns métodos para nos aproximarmos dessa solução, dentre eles tem-se o método HF, que é capaz de fornecer uma boa solução para o problema de muitos elétrons devido a aproximação de Born-Oppenheimer, além de servir de partida para outros métodos, onde as aproximações adicionais são incluídas após se reduzir o custo computacional. Assim, teremos que resolver somente a parte eletrônica da equação:

$$H\Psi = E\Psi \quad (12)$$

O método Hartree consiste em resolver a equação de Schrödinger de forma exata para sistema monoelétrônicos, porém quando temos um sistema multieletrônico a resolução torna-se difícil devido ao termo de repulsão elétron-elétron não ser considerado.

A função de onda obtida é conhecida como produto de Hartree, e descreve apenas um único elétron, considerando-o independente dos demais elétrons presentes no sistema, por isso o método Hartree também é conhecido como método das partículas

independentes.

Para resolver o problema da repulsão eletrônica ocorrido no método Hartree, Fock introduziu a idéia do determinante de Slater que está de acordo com o princípio de exclusão de Pauli, o qual afirma que dois elétrons não podem apresentar os mesmos números quânticos, e por essa inclusão o método passou a ser conhecido como método Hartree-Fock (HF).

A idéia do método HF é combinar o princípio variacional com a suposição de que a função de onda que descreve o sistema molecular é um determinante de Slater. Assim, a melhor função de onda é a que produz o valor do Hamiltoniano como sendo um limite superior para a energia exata do estado fundamental, ou seja,

$$\langle \phi | H | \phi \rangle \geq E_{\text{exata}} \quad (13)$$

A equação de HF pode ser resolvida numericamente para sistemas atômicos ou moleculares com poucos elétrons, porém para sistemas maiores este tipo de solução não é viável. Uma alternativa, inicialmente proposta por Slater e posteriormente formalizada por Roothaan, é expandir a parte espacial dos spin-orbitais moleculares em termos de um conjunto de funções-base conhecidas, levando a equação de Hartree-Fock-Roothaan (HFR) [153].

De acordo com as restrições feitas para orbitais moleculares, o método HFR pode ser caracterizado como Hartree-Fock não Restrito (UHF), sendo geralmente utilizado para sistemas de camada aberta, devido apresentar elétrons desemparelhados, ou Hartree-Fock Restrito (RHF), utilizado para sistemas com número par de elétrons e estado eletrônico de camada fechada, sendo conveniente diferenciar o par de elétrons, um com spin  $\alpha$  e outro com spin  $\beta$  [153].

### **2.3.3.6. Teoria do Funcional da Densidade (DFT)**

Para tratar o problema de sistemas com muitos elétrons e com o intuito de diminuir o custo computacional para os mesmos foi implementada em 1964 por Hohenberg e Kohn [142, 153], a Teoria do Funcional da Densidade, a mesma tem sido amplamente difundida na comunidade científica a partir de um importante avanço ocorrido na sua aplicabilidade, em 1965, por Kohn e Sham, a partir disso ele tem-se mostrado o método mais eficiente para o cálculo de propriedades eletrônicas e estruturais do estado fundamental para

sistemas de tamanho moderado a grande (  $N \geq 20$  átomos ) [153].

A principal característica da (DFT), é o uso da densidade (  $\rho(r)$  ) do estado fundamental como a base para os cálculos mecânico quânticos para assim, descrever a distribuição de carga da molécula. Além disso, as equações do funcional da densidade podem ser usadas para cálculos em sistemas moleculares, descrevendo sistemas orgânicos, inorgânicos, metálicos e semi-condutores [153].

A DFT, está baseada nos dois teoremas de Hohenberg e Kohn, que mostram como podemos chegar ao estado fundamental fazendo uso do potencial externo e da densidade eletrônica tridimensional.

#### Primeiro Teorema

Estabelece que o potencial externo é um funcional único de  $\rho(r)$  além de ser uma constante aditiva, ou seja, a densidade eletrônica de um sistema determina o potencial externo e o número de elétrons,  $N$ , e conseqüentemente, o Hamiltoniano do sistema [134].

A energia é calculada a partir da equação de Schrödinger, onde a energia do sistema eletrônico é determinada pela densidade eletrônica, dessa forma:

$$E = E_v[\rho] \quad (14)$$

#### Segundo Teorema

Havendo qualquer aproximação da densidade eletrônica,  $\rho(r) \geq 0$ , a energia total será maior ou igual a energia exata do sistema, ou seja, obedece ao princípio variacional onde os ajustes levam a energia eletrônica total do sistema a um mínimo, dessa forma a energia encontrada nunca deve ser maior do que a energia real do sistema [134].

Pode-se então, definir um funcional universal

$$F[\rho] = \langle \Psi | \hat{T} + \hat{V}_e | \Psi \rangle \quad (15)$$

pois  $T$  e  $V_e$  aplicam-se a todos os sistemas eletrônicos.

#### Equações de Kohn-Sham

Essas equações geram equações de um elétron que descrevem sistemas de

muitos elétrons, ou seja, a densidade eletrônica exata do estado fundamental de um sistema de elétrons que interagem é gerada a partir da solução de um problema auxiliar do sistema de elétrons que não interagem, para então fornecer a densidade do sistema de muitos elétrons [134].

Kohn e Sham reescreveram a equação da energia total, que considera que o potencial externo pode ser separado em um funcional da densidade eletrônica

$$E_0 = \langle \Psi | \hat{T} + \hat{V}_e | \Psi \rangle + \int \rho(r) v(r) dr \quad (16)$$

tornando explícita a repulsão elétron-elétron de Coulomb, obtendo uma nova função universal  $G[\rho]$

$$E_v[\rho] = G[\rho] + \frac{1}{2} \iint \frac{\rho(r_1)\rho(r_2)}{|r_1 - r_2|} dr_1 dr_2 + \int \rho(r) v(r) dr \quad (17)$$

$$G[\rho] = T_s[\rho] + E_{xc}[\rho]$$

onde  $T_s[\rho]$  é o funcional de energia cinética de um sistema de elétrons que não interagem e tem a mesma densidade dos elétrons que interagem e o termo  $E_{xc}[\rho]$  é o termo de troca e correlação [134].

A energia de troca-correlação, inclui o termo de troca que se refere à correlação entre elétrons de mesmo spin, e a diferença entre a energia cinética exata e a do sistema de elétrons que não interagem.

Dentre os funcionais de correlação mais importantes estão os propostos por Lee, Yang e Parr (LYP) e os funcionais de troca mais populares está o proposto por Becke, muitos foram desenvolvidos para atender as restrições que o funcional exato deve possuir como, o comportamento assintótico para distâncias grandes. Dessa forma, o funcional a ser utilizado neste estudo é caracterizado como funcional híbrido (B3LYP), pois apresenta características do método HF e do DFT, e os funcionais de correlação serem dependentes da energia cinética.

A conexão entre esse sistema hipotético e o sistema real pode ser estabelecida escolhendo-se o potencial efetivo, de forma que a densidade eletrônica resultante seja igual a densidade fundamental. Como o potencial efetivo,  $v_{ef}(r)$ , depende da

densidade eletrônica,  $\rho(r)$ , as equações de Kohn-Sham são resolvidas por meio de um procedimento autoconsistente [134].

$$\begin{array}{ccc}
 & \rho(r) & \\
 \nearrow & & \searrow \\
 \rho(r) = \sum_i^N n_i |\psi_i^{KS}(r)|^2 & SC & v_{ef}(r) = v(r) + \int \frac{\rho(r)}{|r-r_1|} dr_1 + v_{XC}(r) \\
 \{\psi_i^{KS}, \varepsilon_i\} & \leftarrow & v_{ef}(r) \\
 & \left( \frac{-1}{2} \nabla^2 + v_{ef} \right) \psi_i^{KS} = \varepsilon_i \psi_i^{KS} & 
 \end{array} \quad (18)$$

Sendo assim, são exatas e incorporam o efeito da correlação eletrônica, por isso suas soluções equivalem ao problema variacional da DFT.

### 2.3.3.7. Método de solvatação

O estado líquido é caracterizado por apresentar alta densidade, mobilidade e ausência de ordem, o que resulta em inúmeras configurações possíveis. O solvente pode influenciar as propriedades das moléculas, nas reações químicas afetando a estabilidade relativa entre reagentes e produtos, bem como o estado de transição [153].

Uma das formas de se estudar o efeito do solvente em um determinado sistema é a baseada na descrição contínua do solvente, ou como ela é conhecida modelo contínuo polarizável (PCM), que teve seus primeiros estudos feitos por Tomasi e colaboradores [154].

Neste modelo, o soluto é colocado em uma cavidade ( $\varepsilon=1$ ) circundada por um dielétrico constante  $\varepsilon$ . Portanto, há duas regiões distintas para as quais a equação de Poisson deve ser resolvida, a primeira é a cavidade e a segunda é a superfície, onde as condições de contorno usuais na superfície da cavidade devem ser satisfeitas pela equação abaixo [153, 154]

$$\nabla^2 \phi(r) = \frac{-4\pi\rho(r)}{\varepsilon} \quad (19)$$

ela relaciona a distribuição de cargas  $\rho$ , o potencial eletrostático  $\phi$  e a constante dielétrica  $\varepsilon$ .

No PCM, a cavidade molecular é representada por esferas sobrepostas, uma para

cada átomo, cujo raio depende da natureza do átomo. Para a obtenção do potencial eletrostático gerado pelo dielétrico, é utilizado o método das cargas aparentes de superfície, fazendo com que a distribuição de cargas do soluto seja contínua, sendo a descrição da mesma realista [154, 155].

Dentre os métodos mais populares que utilizam o formato da molécula de referência para formar a cavidade, o PCM utiliza-se dos raios de van der Waals acrescidos de aproximadamente 20% para desenhar cavidades [153, 156]. Porém, este método apresenta um problema, onde a nuvem eletrônica tende a escapar da cavidade, fazendo com que uma parte da carga esteja fora da cavidade e a polarização não seja completa [154].

Para a correção do problema das descrições iônicas, foi introduzido o formalismo de equações integrais (IEF – Integral Equation Formalism) que é capaz de incluir parcialmente a polarização de volume [154]. Por isso o mesmo é considerado padrão devido a demonstração numérica experimental do volume polarizado ser mais aproximada que a do PCM [157]. O fato do IEF ser considerado padrão muito tem haver com as considerações eletrostáticas que são feitas utilizando-se de esferas simples de soluto que assumem a simetria radial da densidade eletrônica [158].

Dependendo da capacidade do solvente em formar ligações de hidrogênio com as moléculas de soluto eles podem ser classificados em apolares apróticos, polares próticos e polares apróticos, os primeiros apresentam momento de dipolo nulo ou muito pequeno, o segundo grupo apresentam constantes dielétricas altas devido apresentar o átomo de hidrogênio ligado a átomos eletronegativos, e o último grupo apresentam um par de elétrons livres, fazendo com que solvatem mais fortemente os cátions, nesta classe inclui-se o dimetilsulfóxido (DMSO), que é o solvente usado na simulação em estudo [155].

Solventes apróticos tem uma fraca habilidade em solvatar ânions, estes ficam mais livres para reagir, do que os solvatados por solventes próticos no qual os ânions estão fortemente ligados ao solvente por ligações de hidrogênio [155].

Como são feitos cálculos das flavonas com simulação de carga em solvente, faz-se necessário o uso de um método que melhor descreva o sistema em questão, logo para isso utiliza-se aqui o método IEF.

## 2.3.4. Propriedades analisadas

### 2.3.4.1. Propriedades físico-químicas

#### 2.3.4.1.1. Energia ( $E$ )

Indica a melhor conformação de um sistema, ou seja, é a conformação mais estável para o mesmo.

#### 2.3.4.1.2. Momento dipolar ( $\mu$ )

É a distribuição de carga assimétrica na molécula que é dada por vetores nas três dimensões.

Define a produção de cargas, e a distância que separa as cargas positivas das negativas, além de ser usado para determinar a geometria molecular [124]. É dado por:

$$\vec{\mu} = \sum_i q_i d_i \quad (20)$$

onde  $\vec{\mu}$  é o momento dipolar,  $q_i$  é a carga eletrônica e  $d_i$  a distância de separação entre as cargas.

#### 2.3.4.1.3. Eletronegatividade de Mulliken ( $\xi$ )

Indica a capacidade que átomos ou a molécula tem em atrair elétrons. Pode ser:

$$\xi = \frac{-HOMO - LUMO}{2} \quad (21)$$

#### 2.3.4.1.4. HOMO

Indica o orbital ocupado de mais alta energia, é nele que acontece um ataque eletrofílico [134].

#### 2.3.4.1.5. LUMO

São os orbitais desocupados de mais baixa energia, neles ocorrem o ataque nucleofílico [134].

#### 2.3.4.1.6. Polarizabilidade (POL)

É a facilidade com a qual pode ser distorcida a densidade eletrônica de forma geral quanto maior o número de elétrons e o volume ocupado por eles no átomo, maior será



sua polarizabilidade [145].

#### **2.3.4.2. Propriedades correlacionadas a relação estrutura-atividade (SAR)**

As SAR geralmente são determinadas fazendo-se pequenas alterações na estrutura do protótipo, seguidas da avaliação do efeito sobre a atividade biológica. A seleção das alterações necessárias para produzir análogos de um determinado protótipo é realizada considerando-se as atividades dos compostos com estruturas semelhantes e também a possível química e bioquímica do análogo almejado [125].

##### **2.3.4.2.1. Grupamentos estruturais (diedros, ângulos e raio)**

A conformação da molécula é um dos fatores mais importantes que afetam a atividade do fármaco, em consequência, a conformação global da estrutura de uma molécula é uma consideração importante ao se desenhar um análogo. É necessário considerar características estereoquímicas como grau de rigidez na estrutura, grupos substituintes volumosos, anéis, insaturações na estrutura, dentre outros durante o desenho de um possível fármaco [125].

##### **2.3.4.2.2. Logarítmo do coeficiente de partição ( $\log p$ )**

Trata-se de um parâmetro que se usa como medida para o movimento do fármaco através da membrana. Os coeficientes de partição (distribuição),  $\log p$ , são uma medida do modo com o qual o composto distribui-se entre dois solventes imiscíveis. O coeficiente de partição é dado por:

$$\log p = \frac{[\text{fármaco na fase orgânica}]}{[\text{fármaco na fase aquosa}]} \quad (21)$$

Um valor alto de  $p$  para o coeficiente de partição indica que o composto se difundirá prontamente nas membranas lipídicas e no tecido gorduroso, logo o composto é hidrofóbico e possui uma alta hidrofobicidade [125].

Um baixo valor de  $p$  indica que o composto tem dificuldade de penetrar no material lipídico e prefere permanecer no meio aquoso mais polar, indicando que esse composto é hidrofílico e possui baixa hidrofobicidade [125].

##### **2.3.4.2.3. Fatores de solubilidade (volume e massa)**

A correlação de fármacos com suas estruturas e solubilidade em uma determinada

fase é geralmente fraca, indicando que existem outros fatores que desempenham papéis importantes no controle da atividade do fármaco.

A solubilidade de um fármaco normalmente é dada como a quantidade do soluto num volume específico, ou numa massa de solução, ou de solvente.

## **2.4. Quimiometria**

É uma técnica que utiliza de tratamentos estatísticos aplicados a análises química, através dela podemos relacionar os dados obtidos pela química quântica computacional e o procedimento experimental, para assim podermos identificar quais são as propriedades físico-químicas que mais influenciam na relação estrutura-atividade das substâncias em estudo.

A extração de informações dos resultados de um experimento químico envolve a análise de grande número de variáveis. Muitas vezes, um pequeno número destas variáveis contém as informações químicas mais relevantes, enquanto que a maioria das variáveis adiciona pouco ou nada à interpretação dos resultados em termos químicos [11].

A redução de variáveis através de critérios objetivos, permitindo a construção de gráficos bidimensionais contendo maior informações estatísticas, pode ser conseguida através da análise de componentes principais. Também é possível construir agrupamentos entre as amostras de acordo com as similaridades, utilizando todas as variáveis disponíveis, e representá-los de forma bidimensional através de um dendograma. A análise de componentes principais e de agrupamentos hierárquicos são técnicas de estatística multivariadas complementares que tem grande aceitação na análise de dados químicos [11].

### **2.4.1. Análise de Agrupamentos Hierárquicos (HCA)**

Essa técnica interliga as amostras por suas associações, produzindo o dendograma, onde as amostras semelhantes, segundo as variáveis escolhidas, são agrupadas entre si. Assim, quanto menor a distância entre os pontos, maior a semelhança entre as amostras. Os dendogramas são especialmente úteis na visualização de semelhanças entre amostras ou objetos representados por pontos em espaço com dimensão maior do que três, onde a representação de gráficos convencionais não é possível [11, 159].

### **2.4.2. Análise de Componentes Principais (PCA)**

A análise de componentes principais consiste essencialmente em reescrever as coordenadas das amostras em outro sistema de eixo mais conveniente para a análise de dados. Em outras palavras, as  $n$ -variáveis originais geram, através de suas combinações lineares,  $n$ -componentes principais, cuja principal característica, além da ortogonalidade, é que são obtidos em ordem decrescente de máxima variância, ou seja, a componente principal 1 detem mais informações que a componente principal 2, que por sua vez tem mais informações estatística que a componente principal 3 e assim por diante [11, 159, 160].

A análise de componente principais também pode ser usada para julgar a importância das próprias variáveis originais escolhidas, ou seja, as variáveis originais com maior peso na combinação linear dos primeiros componentes principais são as mais importantes do ponto de vista estatístico [11].

A apresentação dos resultados experimentais na forma de gráficos facilita a interpretação dos dados. Por esse motivo, a identificação de grupos de amostras com características parecidas é quase imediata quando se utiliza HCA e PCA. Além disso, é possível verificar quais os parâmetros analisados (variáveis) são os principais responsáveis pela formação dos grupos de amostras. A avaliação das PCs pode auxiliar no estabelecimento de uma assinatura química particular para cada grupo de amostras, sendo esse o objetivo principal no estudo de reconhecimento de padrões [12].

## **3. METODOLOGIA**

### **3.1. Procedimento Teórico**

#### **3.1.1. Modelo utilizado**

Sabe-se que a química medicinal é hoje uma das áreas químicas que mais apresenta desenvolvimento, devido aos inúmeros compostos protótipos que vem sendo desenvolvidos por grupos de pesquisas que incluem químicos orgânicos sintéticos, químicos teóricos, bioquímicos, farmacêuticos, e outros. O objetivo principal da química medicinal é desenvolver drogas, obtidas a partir do desenho dos protótipos que mais se encaixem no perfil de fármacos ativos com redução de efeitos colaterais que são avaliados por testes elaborados de forma adequada seja *in vivo* ou *in vitro* [124, 125].

Neste estudo as moléculas estudadas foram processadas no Grupo de Química Teórica e Computacional e Prospecção de Substâncias Bioativas da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

Os computadores estão equipados com os sistemas operacionais Windows e Linux, o primeiro é utilizado para os cálculos de pré-otimização e o segundo apresenta a versão Scientific Linux, vale ressaltar que a diferença dos sistemas operacionais em nada interferem na obtenção dos resultados finais.

Os softwares utilizados nos cálculos teóricos foram HyperChem 7.5 [161], GAUSSIAN [162] para Windows e, GAMESS [163] no sistema Linux são eles, Openbabel para converter dados gerados por diferentes programas, GChemical editor de Moléculas em 3D, GChempaint como editor de moléculas em 2D, Avogrado como editor e visualizador de moléculas em 3D, MacMolpti como editor e visualizador de moléculas em 3D e Gabedit como editor e visualizador de moléculas em 3D.

#### **3.1.2. Método**

Dentre os métodos existentes para os cálculos químico quânticos foi utilizado o DFT, que usa a densidade de elétrons no estado fundamental para a obtenção das propriedades desejadas, em conjunto com o funcional híbrido B3LYP.

#### **3.1.3. Conjunto de base**

A escolha do conjunto de base foi feita utilizando-se como referência as moléculas

em questão, assim utilizou-se a base 6-31G\*, ou seja, é uma base que descreve o sistema usando 6 primitivas (bases não contraídas) no primeiro grupo para a descrição do núcleo, 3 primitivas no segundo grupo e 1 primitiva no terceiro grupo, estas duas últimas descrevem a região de valência.

Apesar do conjunto de base escolhido, 6-31G\*, não levar em consideração todos os átomos do sistema estudado e ser um conjunto menor, ele apresenta uma boa descrição do sistema, já que mantém o critério de convergência. O conjunto de base 6-31+\*G\*\*, é maior em relação ao anterior, porém o critério de convergência não é estabelecido, já o último conjunto testado, cc-pVTZ, por ser um conjunto maior que os demais, tornou o cálculo químico quântico inviável com relação ao tempo computacional para a convergência do sistema.

### **3.1.4. Cálculos de pré-otimização**

Com o intuito de termos um sistema mais estável para o cálculos das propriedades desejadas, fez-se uma pré-otimização das moléculas no programa Hyper Chem 7.5.

### **3.1.5. Cálculos das propriedades**

Todas as propriedades foram obtidas no programa de simulação computacional GAUSSIAN, Gauss-View e GAMESS, após a pré-otimização.

### **3.1.6. Rotina de cálculos**

Após a escolha do sistema a ser estudado a rotina de cálculos químico quânticos apresenta a seguinte descrição:

1. Desenho das estruturas no programa Hyper Chem 7.5 para a obtenção da melhor conformação, através da opção de análise conformacional;
2. As geometrias obtidas, ou seja, os dados gerados são convertidos em input utilizando-se dos editores e visualizadores do Linux;
3. Após o input ser gerado com as especificações para o cálculo, o mesmo é submetido no GAMESS;
4. Os logs são analisados primeiramente para a verificação da convergência;
5. Caso o cálculo tenha convergido normalmente, as propriedades são extraídas, se o cálculo não convergir, o mesmo é ajustado e submetido novamente.
6. Os resultados extraídos são analisados, de forma a verificar se o objetivo do estudo foi ou não obtido, justificando-se cada aspecto relevante dentro dos mesmos.

7. Quando os cálculos são feitos no GAUSSIAN após o passo 1 utiliza-se o Gauss-View para fazer o input da moléculas, após isso usa-se o gaussian para submissão do cálculo químico quântico, e por fim os outs são analisados primeiramente quanto a convergência e em seguida, são extraídas as propriedades desejadas.

A rotina de cálculo descrita anteriormente pode ser observada de forma mais simplificada no fluxograma a seguir.

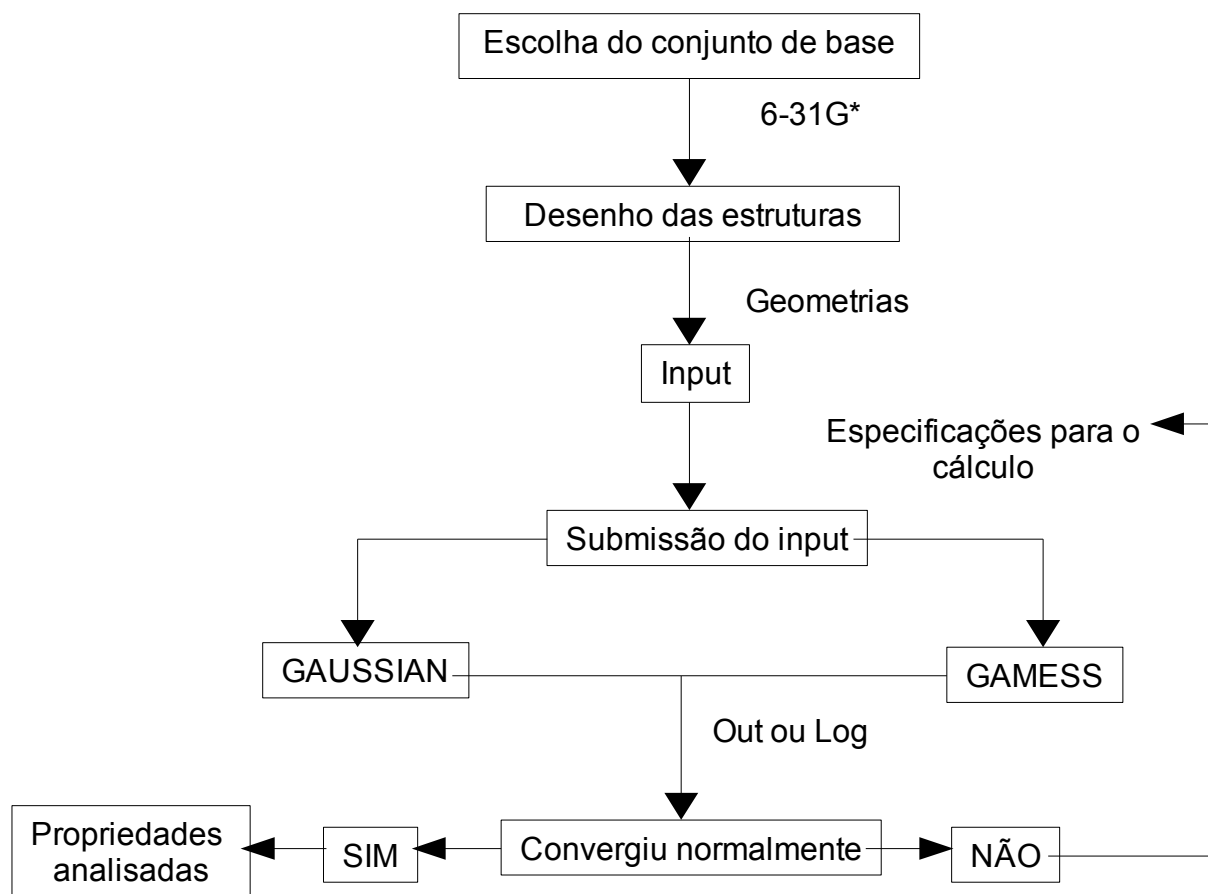


Figura 12: Rotina de cálculos.

### 3.2. Procedimento Experimental

Os procedimentos experimentais para a purificação da PLA<sub>2</sub>, indução de edema e verificação da atividade miotóxica das flavonas sintéticas frente a PLA<sub>2</sub> estão de acordo com o descrito em Villar et al., 2008; da Silva et al., 2009 [164,165].

#### 3.2.1. Purificação da PLA<sub>2</sub>

Feita pelo Prof. Dr. Saulo Luís, no laboratório de química de proteína do

departamento de bioquímica da UNICAMP, coordenado pelo Prof. Sérgio Marangoni. O veneno de *B. Jararacussu* foi comprado de um criadouro particular em Batatais, São Paulo. A PLA<sub>2</sub> da *B. Jararacussu* foi isolada em Sephadex G-75, seguida de cromatografia por troca catiônica. A coluna é previamente tratada com solução tampão de bicarbonato de amônio 0,05M e pH 8,0. O material coletado foi transferido para um gradiente contínuo de concentração 0,05M de bicarbonato de amônio. A absorbância da solução eluída foi registrada no comprimento de onda de 280 nm [166, 167]. A PLA<sub>2</sub> homogênea foi avaliada por SDS-PAGE e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – High Performance Liquid Chromatography) em fase reversa. Neste estudo foi utilizada a fração II conhecida como Asp49 BthTX-II. Essa fosfolipase pode ser chamada somente de PLA<sub>2</sub>. Todos os reagentes foram comprados da Aldrich ou Sigma Co (USA).

### **3.2.2. Síntese dos flavonóides**

Os flavonóides sintéticos foram obtidos pelo grupo de síntese orgânica da Universidade Federal do Paraná (UFPR), coordenado pelo Prof<sup>o</sup> Dr. Alfredo Oliveira. A metodologia utilizada para a obtenção das flavonas sintéticas encontra-se descrita em Veber, 2008 [168].

### **3.2.3. Testes *in vivo***

Os ensaios *in vivo* deram-se de acordo com a Lei nº 11.794 de 08 de outubro de 2008, que regulamenta procedimentos científicos para o uso de animais, os dados referentes aos animais encontram-se descritos em Villar, *et al.* 2008 [164].

### **3.2.4. Indução de edema**

A indução de edema foi feita no laboratório de química de proteína do departamento de bioquímica da UNICAMP, coordenado pelo Prof. Dr. Sérgio Marangoni, este ensaio foi feito no pé direito do camundongo macho Swiss com peso entre 18-22g, foi injetado 50 µL de uma solução que continha 50 µg de PLA<sub>2</sub> purificada do veneno de *B. Jararacussu* dissolvido em 1% de DMSO (Dimetil Sulfóxido) em PBS (Phosphate-Buffered Saline – pH 7.2). O estudo de inibição foi realizado pela administração de injeção com 50 µL de uma solução que continha uma mistura de 50 µg de PLA<sub>2</sub> e 25 µg de cada flavonóide sintetizado dissolvido em 1% de DMSO em PBS (pH 7.2). Antes da administração da injeção a mistura que continha a PLA<sub>2</sub> e os inibidores foi pré-incubada

por 10 minutos a 37° C. Para o teste em branco, foi administrado 50 µL de 1% DMSO em PBS (pH 7.2). O controle do grupo de cada flavonóide foi concluído através de injeções de 50 µL de uma solução que continha somente 25 µg de cada flavonóide dissolvido em DMSO e PBS (pH 7.2). O progresso do edema foi evoluindo com a queda da pressão (Mitutoyo, Japan) e medido por um paquímetro por vários intervalos de tempo após a injeção (0,5; 1; 2; 4; 6; 24 h) [169, 170].

### **3.2.5. Atividade miotóxica**

A atividade miotóxica foi feita no laboratório de química de proteína do departamento de bioquímica da UNICAMP, coordenado pelo Prof. Sérgio Marangoni, onde foram utilizados camundongos machos Swiss com peso entre 18-22g foi injetado no músculo gastrocnêmio direito, 50 µL de uma solução que continha 25 µg de PLA<sub>2</sub> purificada do veneno de *B. jararacussu*. Estudos inibitórios foram feitos injetando 50 µL de uma mistura de soluções que continha 25 µg de PLA<sub>2</sub> e 25 µg de cada flavonóide dissolvido em 1% de DMSO em PBS (pH 7.2). Antes da administração da injeção a mistura que continha a PLA<sub>2</sub> e os inibidores foram pré-incubados por 10 minutos a 37° C. Para o teste em branco, foi administrado somente 50 µL de 1% DMSO-PBS. O controle do grupo de cada flavonóide na injeção de 50 µL intramuscular, da solução continha somente 25 µg de cada flavonóide dissolvido em 1% DMSO em PBS (pH 7.2). Os camundongos foram sangrados pela calda 3h após a administração da injeção, o sangue foi coletado em um tubo capilar. A atividade da creatina quinase no plasma foi determinada usando o kit 47-UV (Sigma Chemical Co.). A atividade foi expressa em unidade/L, uma unidade corresponde a produção de um micromol de NADH por minuto a 30°C [169, 170].

### **3.3. Análise Estatística**

Nesta etapa do trabalho, foi avaliada a correlação estrutura-atividade das substâncias em estudo com base nas propriedades eletrônicas, atividades miotóxicas e edematogênica, para essa correlação utilizou-se o software Pirouette 2.0 [171] e dessa forma pôde-se estabelecer a correlação estrutural dos compostos indicando-se assim os que apresentam um maior potencial inibitório frente a enzima PLA<sub>2</sub>.



## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Serão analisadas aqui alguns descritores que são relevantes para a determinação da relação estrutura-atividade das flavonas sintéticas que foram testadas por modelagem assistida por computador com simulação no vácuo e em solvente (DMSO) e por testes biológicos *in vivo*, para que assim possamos indicar qual (ais) a (s) que mais é significativa frente a enzima PLA<sub>2</sub>.

### 4.1. Abordagem Teórica

#### 4.1.1. Ângulos diedros

As interações de um protótipo, ou fármaco com seu receptor biológico são determinadas por forças intermoleculares, ou seja, interações lipofílicas, polares, eletrostáticas e etéricas. Assim sendo, substâncias que apresentam propriedades terapêuticas, ao interagirem com um alvo específico (uma enzima, um receptor, ou qualquer outra molécula biológica), devem possuir uma estrutura tridimensional de forma que as disposições de seus grupos funcionais favoreçam uma maior complementaridade ao sítio de ligação. Isto pode ser resumido da seguinte forma: quanto melhor o “encaixe” e a complementaridade das propriedades superficiais de um fármaco, maior será sua afinidade e maior poderá ser sua atividade biológica.[172]

Para os primeiros cálculos de pré-otimização foi utilizado o programa Hyper, nele fez-se uma análise preliminar da conformação geométrica molecular, onde os ângulos diedros foram escolhidos com base na possível influência que os radicais substituintes podem vir a exercer na conformação geométrica e até mesmo na atividade biológica.

Foram escolhidos três ângulos, os quais podem vir a corroborar com a atividade das substâncias em questão, assim têm-se o ângulo diedro 1 que apresenta um radical hidroxila em todas as flavonas; o ângulo diedro 2, o qual indica a ligação entre os anéis C e B, e o ângulo diedro 3 indicando os radicais no anel B, estes são diferenciados pela posição no anel (posição 3' ou 4'), ou pelo tamanho da cadeia hidrocarbônica.

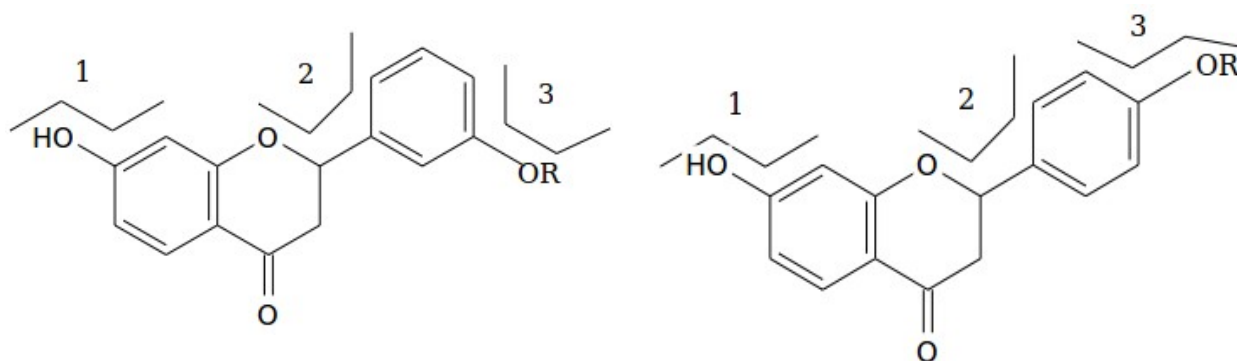


Figura 13: Representação dos ângulos diedros (1, 2 e 3) escolhidos com base nos radicais presentes nas flavonas para simulação no vácuo e em solvente. A figura da esquerda mostra a substituição em 3' e a figura da direita a substituição em 4', onde R indica a cadeia hidrocarbônica.

Flavonas	Diedro 1	Diedro 2	Diedro 3
3'-etoxi-flavona	179,9653	40,0115	179,4337
3'-butoxi-flavona	0,6024	-57,8118	-178,1565
3'-hexoxi-flavona	0,6898	-54,4303	-179,1817
3'-octoxi-flavona	-178,8001	-52,4707	179,7936
4'-etoxi-flavona	0,5782	-56,8461	179,8479
4'-butoxi-flavona	-178,9900	-56,3124	-179,7255
4'-hexoxi-flavona	-1,0096	43,6622	-179,3246
4'-octoxi-flavona	-1,0795	44,7467	179,1680

Tabela 4: Valores dos ângulos diedros obtidos no cálculo de simulação no vácuo.

Flavonas	Diedro 1	Diedro 2	Diedro 3
3'-etoxi-flavona	-179,1837	22,4336	-1,3648
3'-butoxi-flavona	-179,1223	-24,9941	-4,2058
3'-hexoxi-flavona	-179,3473	-31,5331	-2,6381
3'-octoxi-flavona	-179,3978	-13,7801	-8,7609
4'-etoxi-flavona	-179,0720	28,1203	-2,0472
4'-butoxi-flavona	-179,1328	49,0286	-2,4367
4'-hexoxi-flavona	-179,1684	-45,1133	1,4915
4'-octoxi-flavona	-179,0826	31,6648	-0,1592

Tabela 5: Valores dos ângulos diedros obtidos no cálculo de simulação em solvente.

As tabelas apresentadas acima mostram os valores dos ângulos obtidos para a simulação no vácuo e em solvente (DMSO).

Analisando-se os diedros 1 e 3 cujos valores não apresentam muita variação apesar da simulação de carga feita nas estruturas, pode-se apontar a tendência a planaridade que os três anéis apresentam, já que os valores obtidos são próximos de 0 ou de 180°.

O diedro 1 apresenta uma hidroxila como radical, por este ser um grupo eletronegativo e estar ligado diretamente ao anel, temos a possibilidade de formação de ponte de hidrogênio entre a hidroxila em 7 e o sítio ativo da enzima, tornando essa parte da molécula reativa.

No que diz respeito ao ângulo diedro 3, temos a presença de grupos metoxila ligados a um anel que podem sofrer oxidação tornando-os mais reativos em meio biológico, dando origem ao grupo carboxílico que são eliminados com maior facilidade e aumentam a atividade, dessa forma, se aumentarmos o grupamento metila, aumentaremos também a lipofilicidade e como consequência a penetração na membrana, além disso, esse aumento de tamanho na cadeia lateral pode ser viável no preenchimento do canal hidrofóbico no sítio ativo, fortalecendo a ligação substância-sítio ativo [125].

Vale ressaltar que a adição de grupos metila impõe restrições estéricas, e quanto maior o grupo alquila, maior a hidrofobicidade, conseqüentemente maior sua absorção na membrana fazendo com que a eliminação dessa substância seja mais difícil [125].

O ângulo diedro 2, apresenta variações nos valores obtidos, porém para a maioria dos compostos, sejam eles neutros ou com carga simulada, o ângulo fica entre 50-60°, esse fato pode ajudar na interação das substâncias com o sítio ativo da enzima, pois introduz uma angulação significativa na molécula já que, moléculas muito planares podem causar efeitos repulsivos entre o sítio ativo e sua estrutura de forma geral [125].

Na simulação com solvente (ver dados listados na tabela 5) pode-se perceber que as considerações feitas para os ângulos diedrais 1 e 3 são aceitas, já que se compararmos os ângulos de cada substância para a simulação no vácuo e em solvente, veremos que os valores não apresentam mudança significativa e tendem a planaridade.

É bom ressaltar que a análise estrutural dos ângulos diedrais das flavonas foi feita com base na estrutura do  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), devido a semelhança estrutural existente entre ambas.

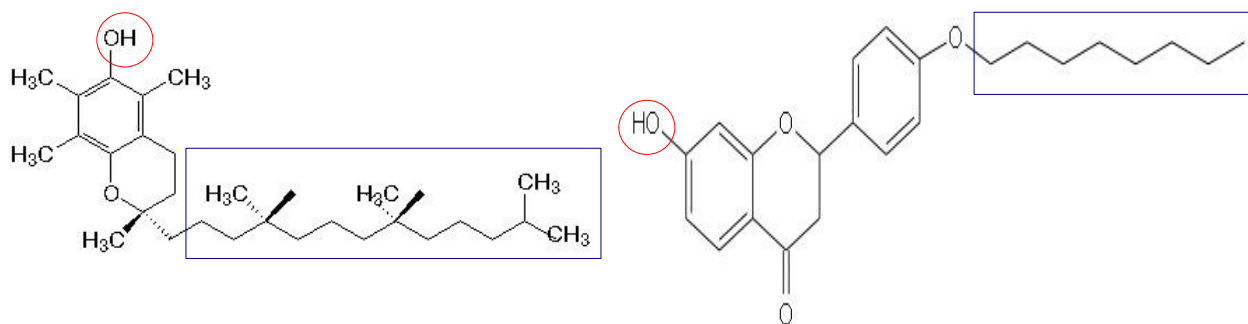


Figura 14: Comparação entre o  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) e a 4'-octóxi-flavona.

Segundo Chandra et. al. 2002, no  $\alpha$ -tocoferol ocorre a interação da ligação -OH do anel aromático com os resíduos His48 e Asp49 do sítio ativo, que são consistentes com as ligações observadas na estrutura da PLA<sub>2</sub>. Um outro aspecto importante é o oxigênio existente no anel aromático que forma ligação de hidrogênio com o Trp31, essa ligação influencia na orientação molecular. Já a cadeia hidrocarbônica longa é envolvida por interações hidrofóbicas fortes que são predominantes no canal enzimático (figura 15) [31].

Portanto, devido as semelhanças estruturais entre as flavonas e o  $\alpha$ -tocoferol, pode-se indicar a presença de dois aspectos fortes para uma provável atividade biológica nas substâncias em questão, 1) presença da hidroxila que pode indicar uma possibilidade de atuação dessas substâncias no sítio ativo da enzima; 2) os radicais alquila que podem envolver o canal hidrofóbico da PLA<sub>2</sub>, tornando esses compostos substâncias com alto potencial farmacêutico.

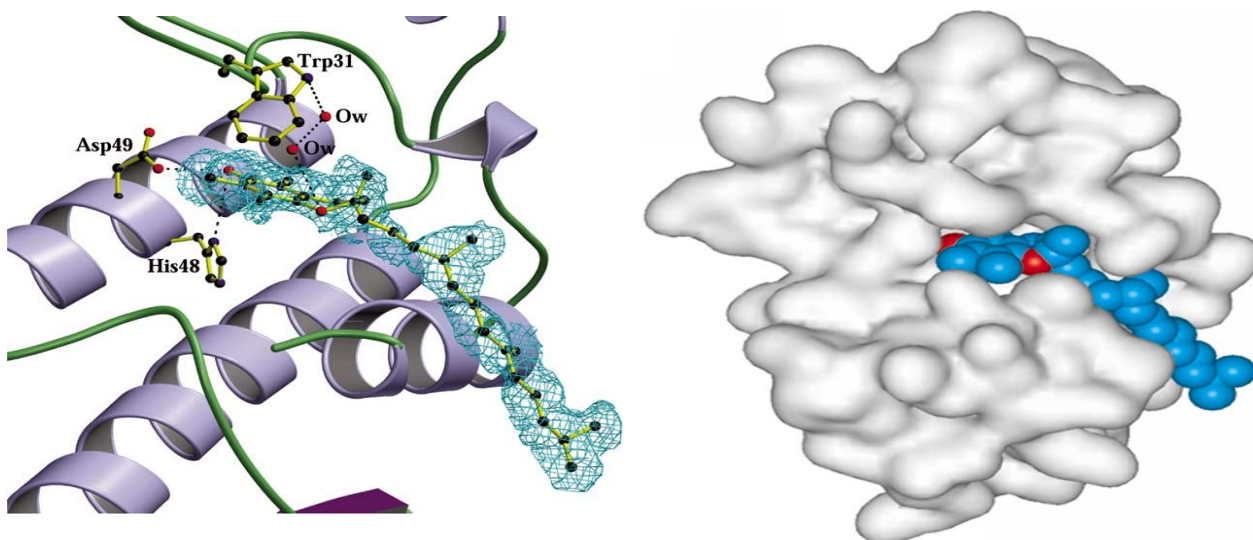


Figura 15: Interação do  $\alpha$ -tocoferol com o sítio ativo da enzima PLA<sub>2</sub> (figura da esquerda) e preenchimento do canal hidrofóbico da enzima PLA<sub>2</sub> pelo  $\alpha$ -tocoferol (figura da direita).

### 4.1.2. Log p

O transporte de um fármaco até seu sítio de ação normalmente envolve a passagem do fármaco através de várias membranas lipídicas. Os coeficientes de partição são uma medida da solubilidade e do transporte por difusão através de uma membrana e estes são os principais fatores que controlam a ação do fármaco [125].

Assim, um valor alto de p para o coeficiente de partição indica que o composto se difundirá prontamente nas membranas lipídicas e no tecido gorduroso, diz-se então que o composto é hidrofóbico, apresentando uma alta lipofilicidade. Um valor baixo de p indica que o composto tem dificuldade em penetrar no material lipídico, sendo caracterizado como hidrofílico, logo este apresenta baixa lipofilicidade [125].

Compostos que apresentam hidrofobicidade relativamente alta penetrarão facilmente na membrana, porém terão dificuldade em deixá-la e como consequência poderão não atingir o sítio de ação em quantidade suficiente para sua ação biológica, já os que apresentam hidrofílico alta terão maior dificuldade em penetrar pela membrana, mas atingirão com maior facilidade o sítio de ação biológica [125].

De acordo com os resultados obtidos para simulação no vácuo e em solvente pode-se observar que as flavonas que apresentam caráter hidrofóbico e alta lipofilicidade são as 3'-octoxi-flavona e 4'-octoxi-flavona e as de caráter hidrofílico e baixa lipofilicidade são as 3'-etoxi-flavona e 4'-etoxi-flavona, é notório ainda que as flavonas tendem a um comportamento padrão independente da simulação utilizada.

A semelhança nos valores e como consequência nos gráficos de log p obtidos para a simulação no vácuo e com solvente (DMSO), pode ser explicada pelo fato desse solvente ter a propriedade interessante de ser rapidamente absorvido pelos tecidos [173], o que facilitaria a absorção e a passagem das flavonas pela membrana celular.

	Nº	Flavonas	Neutras no Vácuo	Neutras em DMSO
Log p	2	3'-etoxi-flavona	2,65	2,65
	3	3'-butoxi-flavona	3,51	3,51
	4	3'-hexoxi-flavona	4,30	4,30
	5	3'-octoxi-flavona	5,10	5,10
	8	4'-etoxi-flavona	2,65	2,65
	9	4'-butoxi-flavona	3,51	3,51
	10	4'-hexoxi-flavona	4,30	4,30
	11	4'-octoxi-flavona	5,10	5,10

Tabela 6: Valores de log p obtidos para as flavonas no vácuo e em DMSO.

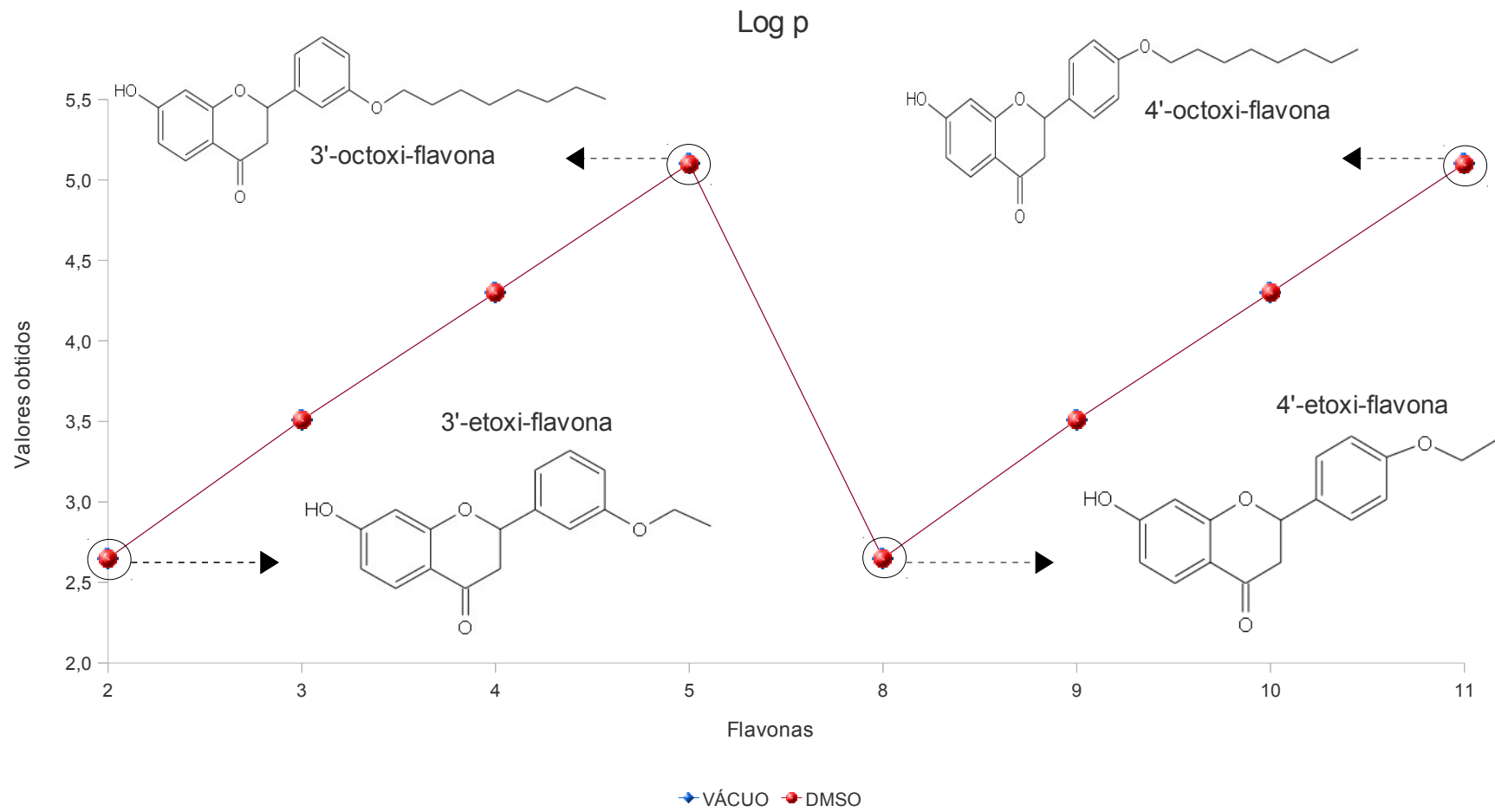


Gráfico 1: Valores de log p obtidos para as flavonas na simulação no vácuo e em DMSO.

### 4.1.3. Momento dipolar

O dipolo é produzido em um átomo ou entre átomos, quando ocorre a separação de cargas positiva e negativa. Então, o momento dipolar mede a quantidade de carga deslocada quando átomos de eletronegatividades diferentes são ligados [124]. A interação ligante-sítio ativo está diretamente relacionada a esta distribuição de carga na molécula já que é ligada ao mecanismo eletrostático (atração, repulsão e transferências de cargas)[174].

Pode-se observar que para as flavonas substituídas em 3' apresentam um momento dipolar decrescente com o aumento da cadeia do substituinte, o que pode ser justificado pela substituição do grupo alquila no anel ser na posição meta, a diminuição dos valores de momento são menos pronunciados na simulação com DMSO, devido o mesmo apresentar um par de elétrons livre, fazendo com que a transferência de carga seja facilitada.

Para as flavonas substituídas em 4' nota-se valores crescentes de momento, os mesmos podem ser explicados pela substituição do grupo alquila ser feita na posição *para*, fato esse que possibilita uma maior distribuição de carga pela molécula facilitando assim a formação de pólos.

Após a simulação das flavonas em questão com solvente, verificou-se o mesmo comportamento anteriormente visto com a simulação no vácuo porém com menor intensidade, que pode ser justificado pela forte interação eletrostática do grupo sulfóxido com as substâncias analisadas, esse efeito é menos pronunciado nas flavonas substituídas em 4' e nas que apresentam cadeia lateral maior.

As moléculas apresentam em extremidades opostas um grupo alquila ligado ao anel aromático pela presença de um átomo muito eletronegativo (oxigênio), tende a ser um grupo doador forte de elétrons, e na outra extremidade da molécula (em 7) um grupo -OH, que também é um grupo doador de elétrons, o fato desses grupos encontrarem-se na posição *para* induz a formação de pólos, esses aspectos observados aqui vêm a corroborar com a análise dos valores obtidos para o log p.

	Nº	Flavonas	Neutras no Vácuo	Neutras em DMSO
<b>Momento Dipolar</b>	2	3'-etoxi-flavona	4,0320	5,9751
	3	3'-butoxi-flavona	2,2904	4,4394
	4	3'-hexoxi-flavona	2,2536	2,2376
	5	3'-octoxi-flavona	0,9882	2,0620
	8	4'-etoxi-flavona	3,1746	1,4031
	9	4'-butoxi-flavona	2,1121	1,7032
	10	4'-hexoxi-flavona	5,1857	2,3316
	11	4'-octoxi-flavona	5,1870	1,5678

Tabela 7: Valores de momento dipolar obtidos para as flavonas no vácuo e em DMSO.

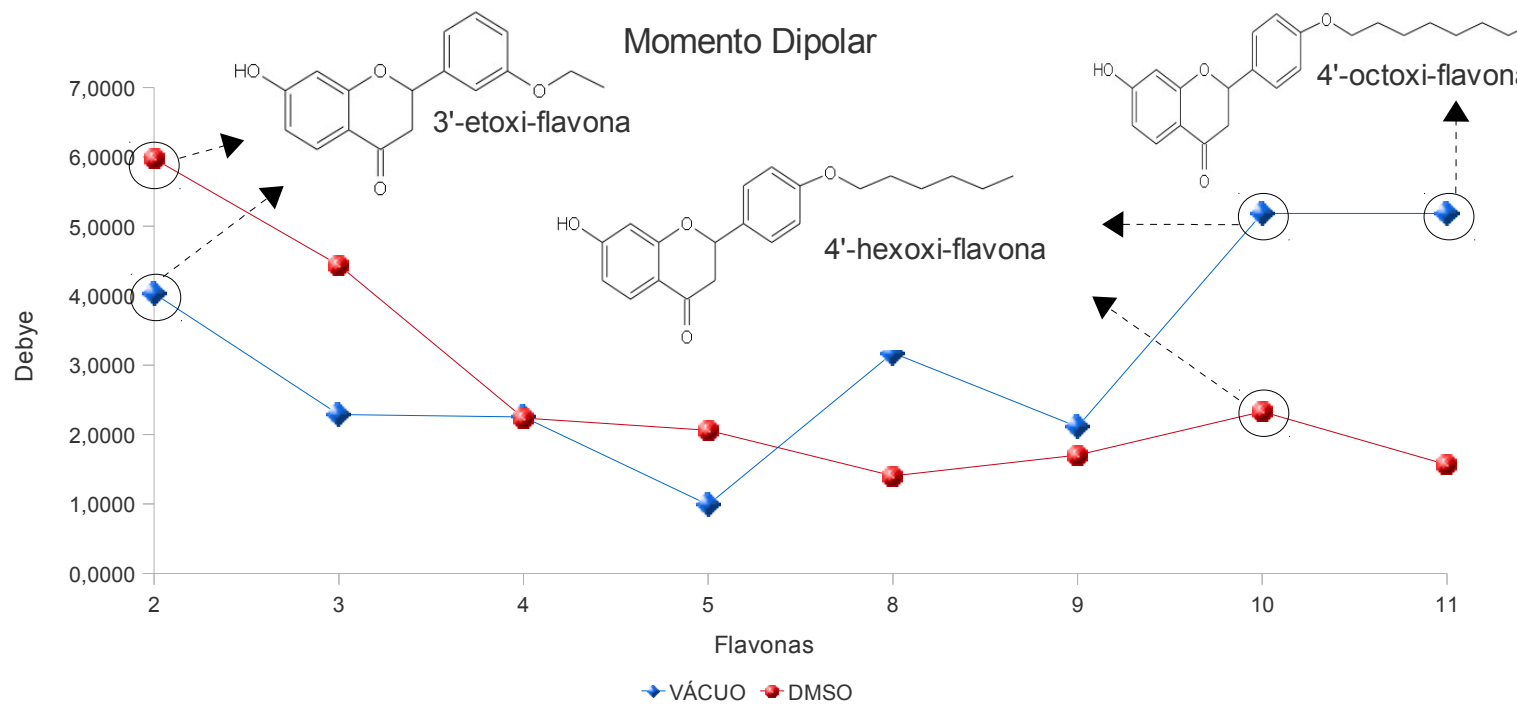


Gráfico 2: Valores de momento dipolar obtidos para as flavonas na simulação no vácuo e em DMSO.



#### 4.1.4. GAP

Este parâmetro está relacionado a energia dos orbitais de fronteira, entre o orbital molecular mais alto ocupado (Highest Occupied Molecular Orbital, HOMO) e o orbital molecular mais baixo desocupado (Lowest Unoccupied Molecular Orbital, LUMO), que são os responsáveis pelas informações elétron-doador e elétron-receptor. A energia do HOMO mede o caráter elétron-doador e o LUMO o caráter elétron-aceitador, ambos são os responsáveis pela reatividade química de uma molécula [175].

Quando combinamos um orbital ocupado com outro desocupado, teremos sempre um decréscimo na energia, pois os elétrons tendem a ir para um orbital ligante, logo é necessário que a diferença entre HOMO e LUMO seja relativamente pequena para que ocorra a reação [175].

Analisando os resultados obtidos, pode-se notar que na simulação no vácuo a flavona que indica maior tendência a reatividade é a 3'-octoxi-flavona devido apresentar um menor valor de GAP comparado-se com as demais, para a simulação com DMSO pode-se dizer que o solvente auxilia na diminuição da energia necessária para a interação entre os orbitais de fronteira e dessa forma temos a 3'-etóxi-flavona e a 3'-butóxi-flavona como as que apresentam maior tendência a reatividade.

Assim, para as flavonas simuladas em solvente tem-se na substituição em 4' um aumento de reatividade com o aumento da cadeia hidrocarbônica, para as substituídas em 3' as mais reativas tendem a ser as que apresentam substituintes menores, para a simulação no vácuo a reatividade aumenta com o aumento da cadeia, nota-se ainda que a reatividade tende à estabilidade para as substituídas em 4'.

Dessa forma, observa-se que a presença do solvente aumenta a reatividade da molécula devido apresentar elétrons livres facilitando o caráter doador e assim a interação entre os orbitais HOMO e LUMO, o que foi percebido aqui pode ser confirmando pela análise dos dados obtidos no momento dipolar.

	Nº	Flavonas	Neutras no Vácuo	Neutras em DMSO
<b>GAP</b>	2	3'-etoxi-flavona	0,17439	0,16410
	3	3'-butoxi-flavona	0,16962	0,16260
	4	3'-hexoxi-flavona	0,16977	0,17370
	5	3'-octoxi-flavona	0,16841	0,17280
	8	4'-etoxi-flavona	0,17590	0,17290
	9	4'-butoxi-flavona	0,17373	0,17390
	10	4'-hexoxi-flavona	0,17354	0,17240
	11	4'-octoxi-flavona	0,17361	0,17120

Tabela 8: Valores de GAP obtidos para as flavonas no vácuo e em DMSO.

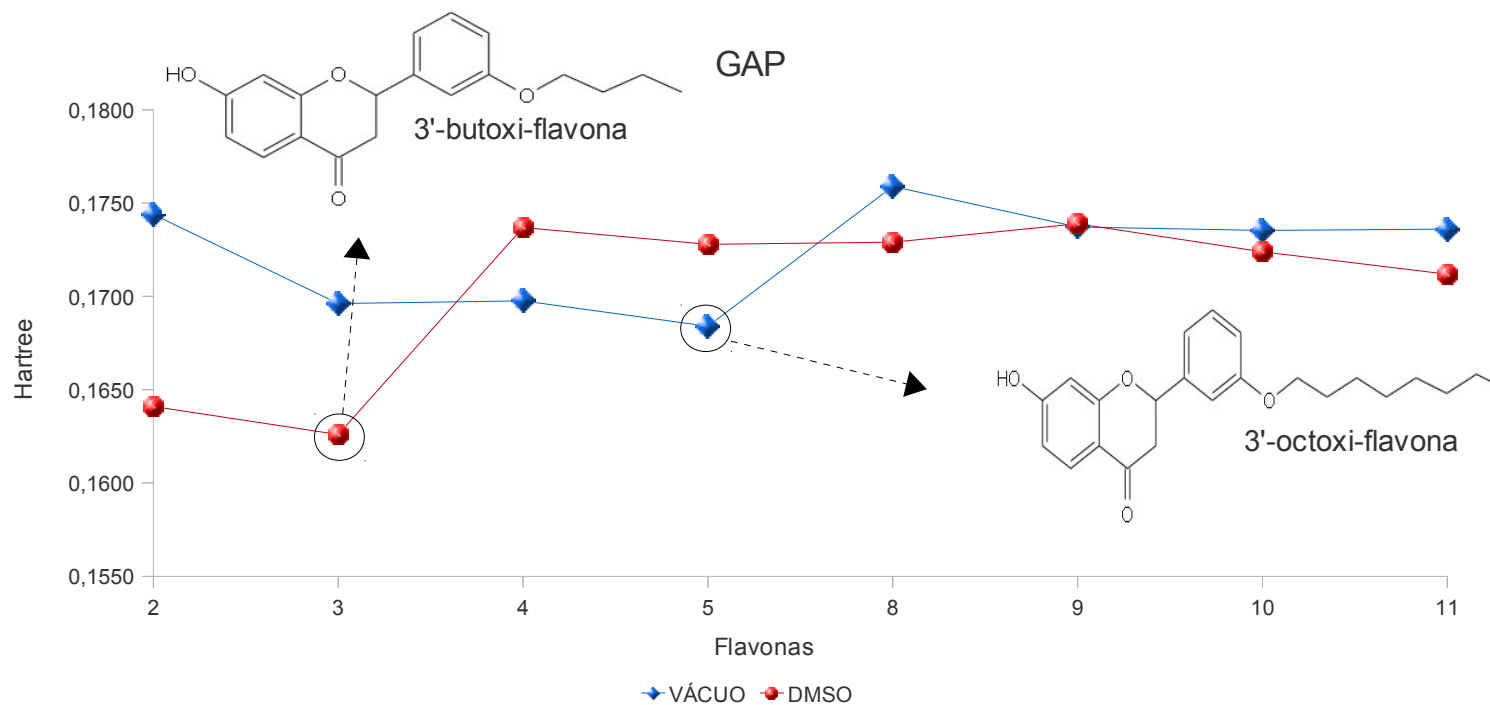


Gráfico 3: Valores de GAP obtidos para as flavonas na simulação no vácuo e em DMSO.

#### 4.1.5. Eletronegatividade, Macieza e Dureza

Eletronegatividade é a tendência que um átomo apresenta em atrair para si os elétrons envolvidos na reação. É possível estimar a macieza e a dureza de uma molécula pelo potencial de ionização e pela eletronegatividade [174].

O potencial de ionização de um átomo é medida pela força com que um elétron está ligado ao átomo, dessa forma um valor baixo para o potencial de ionização de compostos ativos podem indicar possíveis mecanismos de transferência de cargas na interação ligante-receptor, assim como pode indicar também que a forma iônica da substância em questão é a que apresenta atividade biológica [174].

Assim, quando as moléculas apresentam elevado potencial de ionização e elevada eletronegatividade, possuem também elevada dureza, e quanto maior a dureza, menor será a macieza da molécula.

A dureza representa a resistência de uma molécula à deformação e a macieza a facilidade com que uma molécula se deforma. Quanto menor a dureza, maior a macieza, menor a quantidade de energia necessária para a transição de um elétron do HOMO para o LUMO [175].

Então, pode-se perceber que na simulação com solvente e no vácuo as flavonas, que apresentam valores mais significativos, são as 3'-etoxi-flavona e a 3'-butoxi-flavona comparando-se os dados de eletronegatividade.

Com relação à dureza simulada no vácuo e em solvente, pode-se observar que quando adicionamos carga, as substituídas em 3' e 4' tendem a diminuir com o aumento da cadeia. Observa-se também que na moleza as flavonas apresentam comportamento inverso ao da dureza para a simulação no vácuo, na simulação com solvente observamos um desvio nesse comportamento, já que para as substituídas em 3' tendem a ter valores menores.

Como moleza e dureza são propriedades inversas, tem-se que quanto maior for o valor obtido para a moleza, maior será a tendência à reatividade da molécula em questão, logo as que apresentarem os menores valores para a dureza, são as mais propensas a reatividade.

Sendo assim, as flavonas que apresentaram maior tendência à reatividade analisando-se a simulação no vácuo e os valores de dureza e moleza obtidos, foram a 3'-octóxi-flavona e a 4'-octoxi-flavona. Quando a simulação foi com o solvente, fazendo-se a mesma análise para os valores de dureza e moleza, observou-se que a que tem maior

tendência a reatividade é a 3'-butoxi-flavona e a 4'-octóxi-flavona.

	Nº	Flavonas	Neutras no Vácuo	Neutras em DMSO
<b>Eletronegatividade</b>	2	3'-etoxi-flavona	0,26897	0,29971
	3	3'-butoxi-flavona	0,26362	0,29777
	4	3'-hexoxi-flavona	0,26329	0,25770
	5	3'-octoxi-flavona	0,26243	0,25740
	8	4'-etoxi-flavona	0,26472	0,26090
	9	4'-butoxi-flavona	0,26285	0,25770
	10	4'-hexoxi-flavona	0,26294	0,25520
	11	4'-octoxi-flavona	0,26289	0,25640

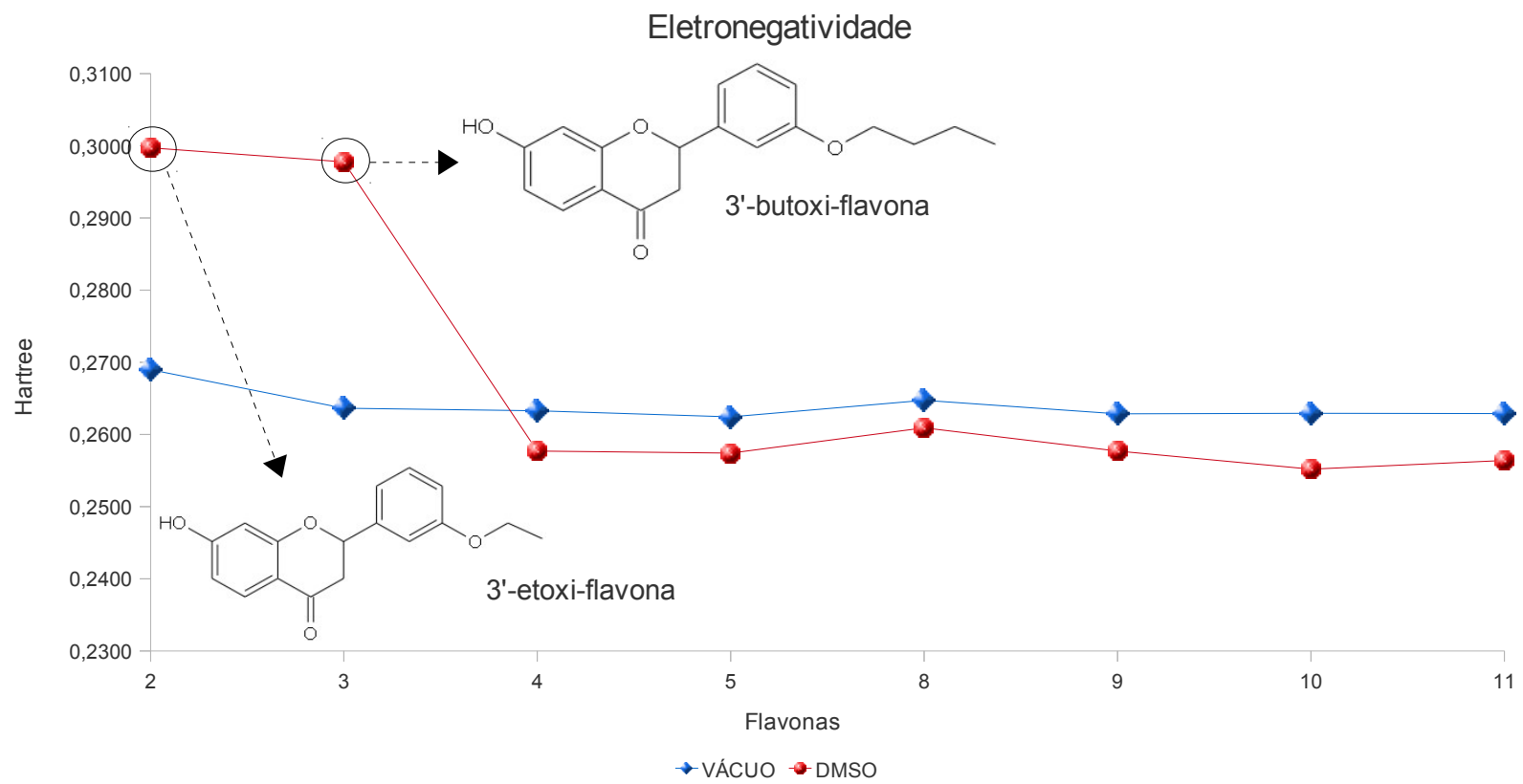
*Tabela 9: Valores de eletronegatividade obtidos para as flavonas no vácuo e em DMSO.*

	Nº	Flavonas	Neutras no Vácuo	Neutras em DMSO
<b>Moleza</b>	2	3'-etoxi-flavona	2,86714	3,04785
	3	3'-butoxi-flavona	2,94777	3,07598
	4	3'-hexoxi-flavona	2,94516	2,87853
	5	3'-octoxi-flavona	2,96894	2,89352
	8	4'-etoxi-flavona	2,84252	2,89184
	9	4'-butoxi-flavona	2,87803	2,87522
	10	4'-hexoxi-flavona	2,88118	2,90023
	11	4'-octoxi-flavona	2,88002	2,92056

*Tabela 10: Valores de macieza obtidos para as flavonas no vácuo e em DMSO.*

	Nº	Flavonas	Neutras no Vácuo	Neutras em DMSO
<b>Dureza</b>	2	3'-etoxi-flavona	0,17439	0,16410
	3	3'-butoxi-flavona	0,16962	0,16260
	4	3'-hexoxi-flavona	0,16977	0,17370
	5	3'-octoxi-flavona	0,16841	0,17280
	8	4'-etoxi-flavona	0,17590	0,17290
	9	4'-butoxi-flavona	0,17373	0,17390
	10	4'-hexoxi-flavona	0,17354	0,17240
	11	4'-octoxi-flavona	0,17361	0,17120

*Tabela 11 - Valores de dureza obtidos para as flavonas no vácuo e em DMSO.*



*Gráfico 4: Valores de eletronegatividade obtidos para as flavonas na simulação no vácuo e em DMSO.*

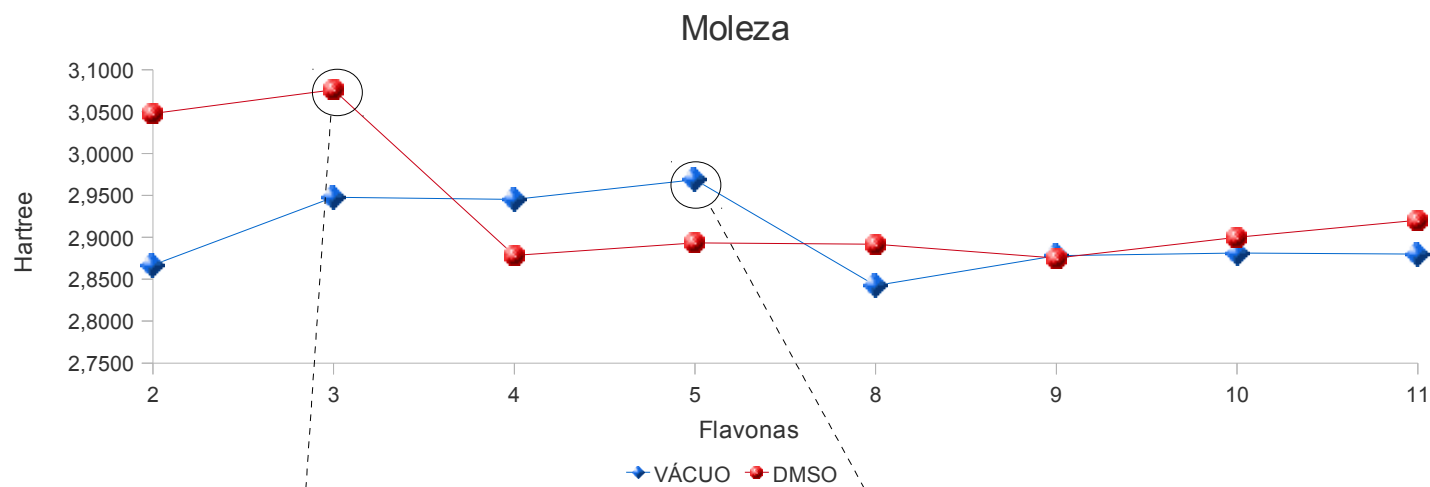


Gráfico 5: Valores de moleza obtidos para as flavonas na simulação no vácuo e em DMSO.

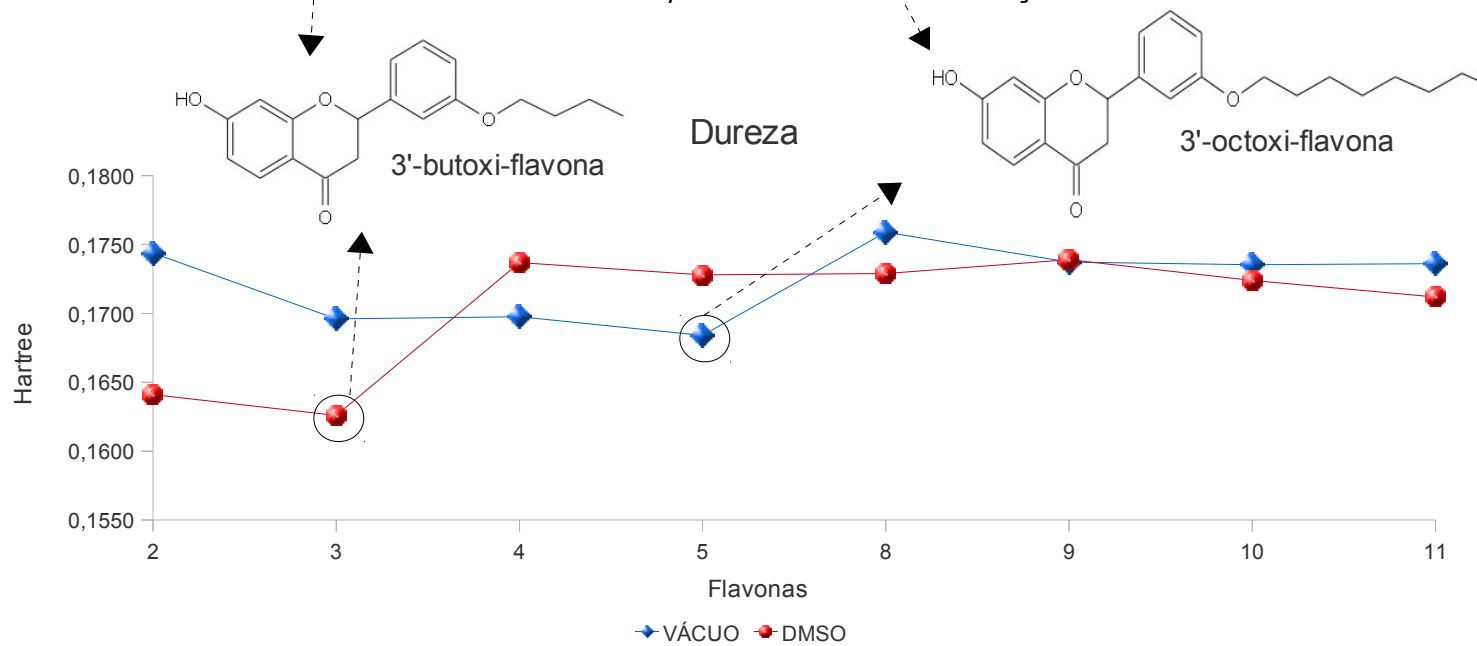


Gráfico 6: Valores de dureza obtidos para as flavonas na simulação no vácuo e em DMSO.

#### 4.1.6. Energia

A energia é determinada pela aproximação de Born-Oppenheimer, onde os núcleos permanecem fixos e a partir disso a equação de Schrödinger é resolvida, com o intuito de encontrar a melhor energia para o sistema. A energia obtida além de apresentar um valor mínimo, é também a menor conformação geométrica que pode ser obtida para o sistema em estudo. A energia total que é utilizada como parâmetro de estabilidade molecular corresponde a soma da energia de repulsão nuclear com a energia eletrônica [174].

Os gráficos mostram claramente um padrão seguido pelas flavonas em relação ao aumento do grupamento alquila que independem da simulação feita, nota-se que as flavonas que apresentam o grupo etoxi apresentam o valor de energia relativamente maior do as que apresentam o grupo octoxi como substituinte, independente da posição (3' ou 4') assim, quanto maior o grupo alquila, menor será o valor de energia.

	Nº	Flavonas	Neutras no Vácuo	Neutras em DMSO
<b>Energia</b>	2	3'-etoxi-flavona	-958,336167156	-958,424949745
	3	3'-butoxi-flavona	-1036,96035712	-1037,05975504
	4	3'-hexoxi-flavona	-1115,5878433	-1114,9181086
	5	3'-octoxi-flavona	-1194,21494610	-1193,4862969
	8	4'-etoxi-flavona	-958,333386137	-957,7779827
	9	4'-butoxi-flavona	-1036,9603465	-1036,3471949
	10	4'-hexoxi-flavona	-1115,5908236	-1114,9183935
	11	4'-octoxi-flavona	-1194,218260110	1193,4851212

Tabela 12: Valores de energia obtidos para as flavonas no vácuo e em DMSO.

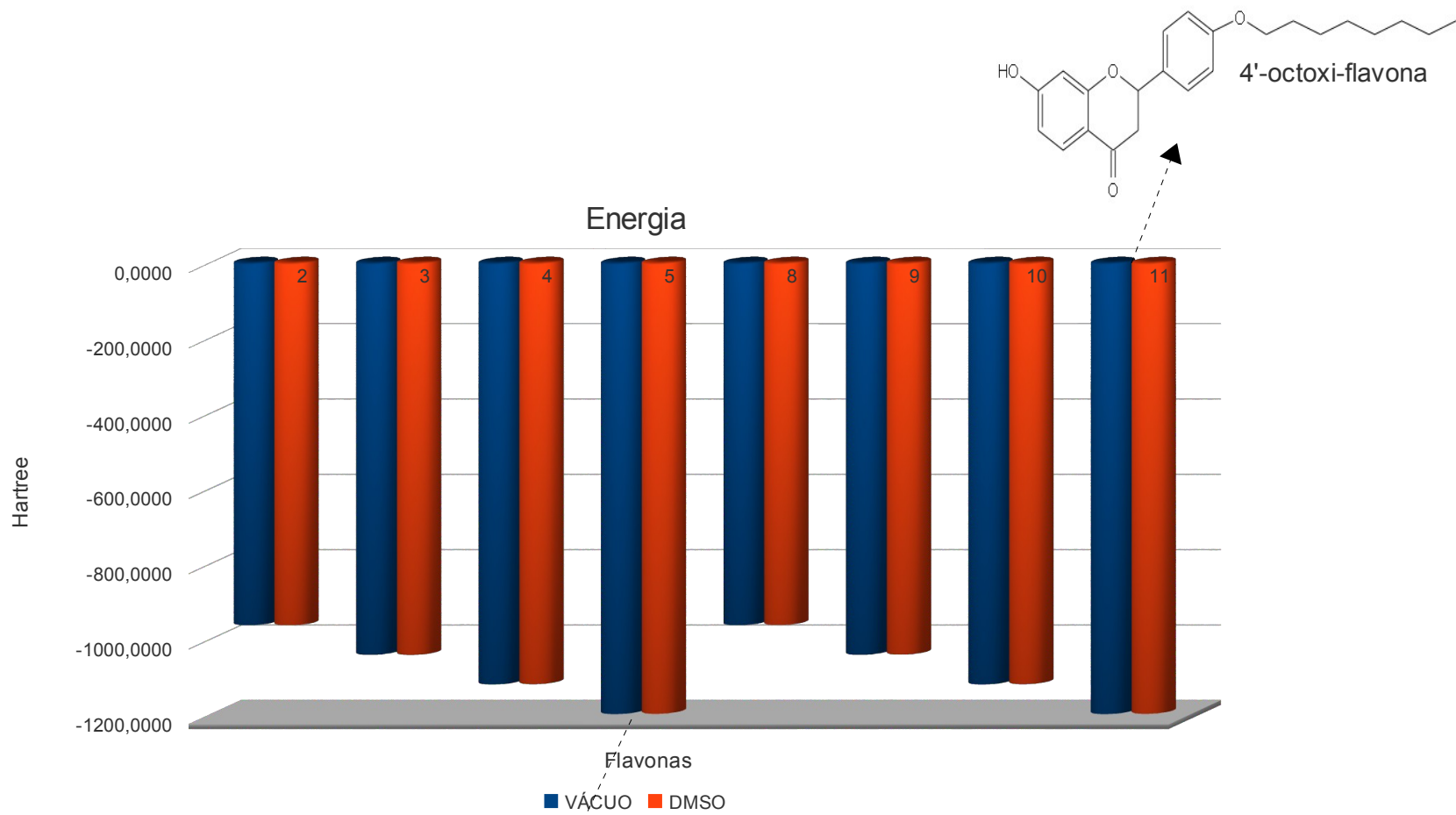
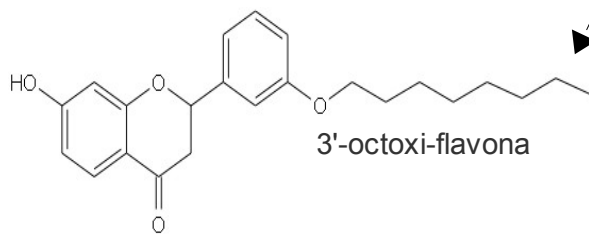


Gráfico 7: Valores de energia obtidos para as flavonas na simulação no vácuo e em DMSO.





#### **4.1.7. Refratividade e Polarizabilidade**

A refratividade está relacionada com o volume molar, assim um ligante pode representar forças dispersivas que ajudam na interação do ligante ao receptor, logo quanto maior for o volume do composto, maior será o valor de refratividade que apresenta como índice de refração a polarizabilidade da substância [176].

A polarizabilidade é uma medida experimental que pode indicar propriedades biológicas através da expressão dos gases reais pela equação de van der Waals em compostos líquidos ou sólidos. Sua interpretação indica a adsorção das moléculas gasosas na interface celular, o que afeta a permeabilidade, excitabilidade e a atividade metabólica de membranas celulares. A polarizabilidade pode estar relacionada à ligação de vários materiais com anticorpos, essa ligação é medida pelo volume do substituinte e pelas forças de van der Waals, onde ambos vão contribuir para a interação substância-receptor [124].

É notório através dos gráficos a seguir que independente da simulação feita as flavonas apresentam o mesmo comportamento, fato esse que pode ser justificado pela relação das duas propriedades com volume, já que ao simularmos solvente a tendência é que ocorra um acréscimo no volume, sendo assim, as flavonas que apresentam o grupo octoxi, substituído em 3' ou em 4' têm um maior volume molar, resultando em uma boa capacidade de distribuição de cargas que contribui para a organização molecular dentro do sítio ativo da enzima.

	Nº	Flavonas	Neutras no Vácuo	Neutras em DMSO
<b>Refratividade</b>	2	3'-etoxi-flavona	78,25	78,25
	3	3'-butoxi-flavona	87,38	87,38
	4	3'-hexoxi-flavona	96,58	96,58
	5	3'-octoxi-flavona	105,78	105,78
	8	4'-etoxi-flavona	78,25	78,25
	9	4'-butoxi-flavona	87,38	87,38
	10	4'-hexoxi-flavona	96,58	96,58
	11	4'-octoxi-flavona	105,78	105,78

*Tabela 13: Valores de refratividade obtidos para as flavonas no vácuo e em DMSO.*

	Nº	Flavonas	Neutras no Vácuo	Neutras em DMSO
<b>Polarizabilidade</b>	2	3'-etoxi-flavona	30,49	30,49
	3	3'-butoxi-flavona	34,16	34,16
	4	3'-hexoxi-flavona	37,83	37,83
	5	3'-octoxi-flavona	41,50	41,50
	8	4'-etoxi-flavona	30,49	30,49
	9	4'-butoxi-flavona	34,16	34,16
	10	4'-hexoxi-flavona	37,83	37,83
	11	4'-octoxi-flavona	41,50	41,50

*Tabela 14: Valores de polarizabilidade obtidos para as flavonas no vácuo e em DMSO.*

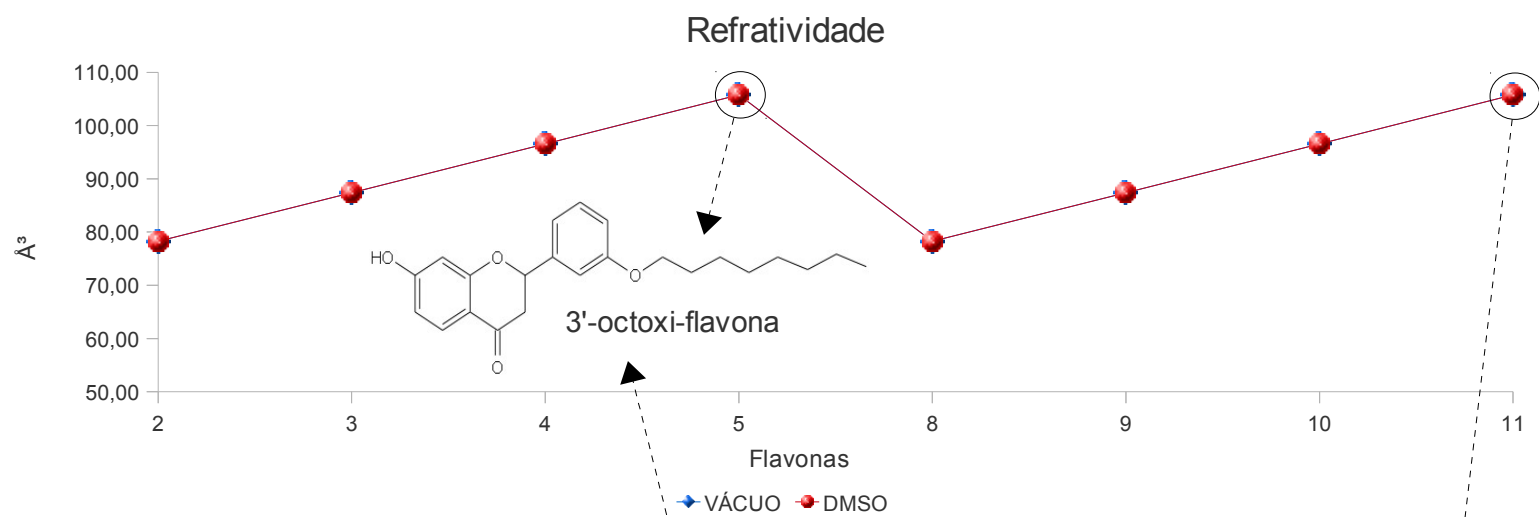


Gráfico 8: Valores de refratividade obtidos para as flavonas na simulação no vácuo e em DMSO.

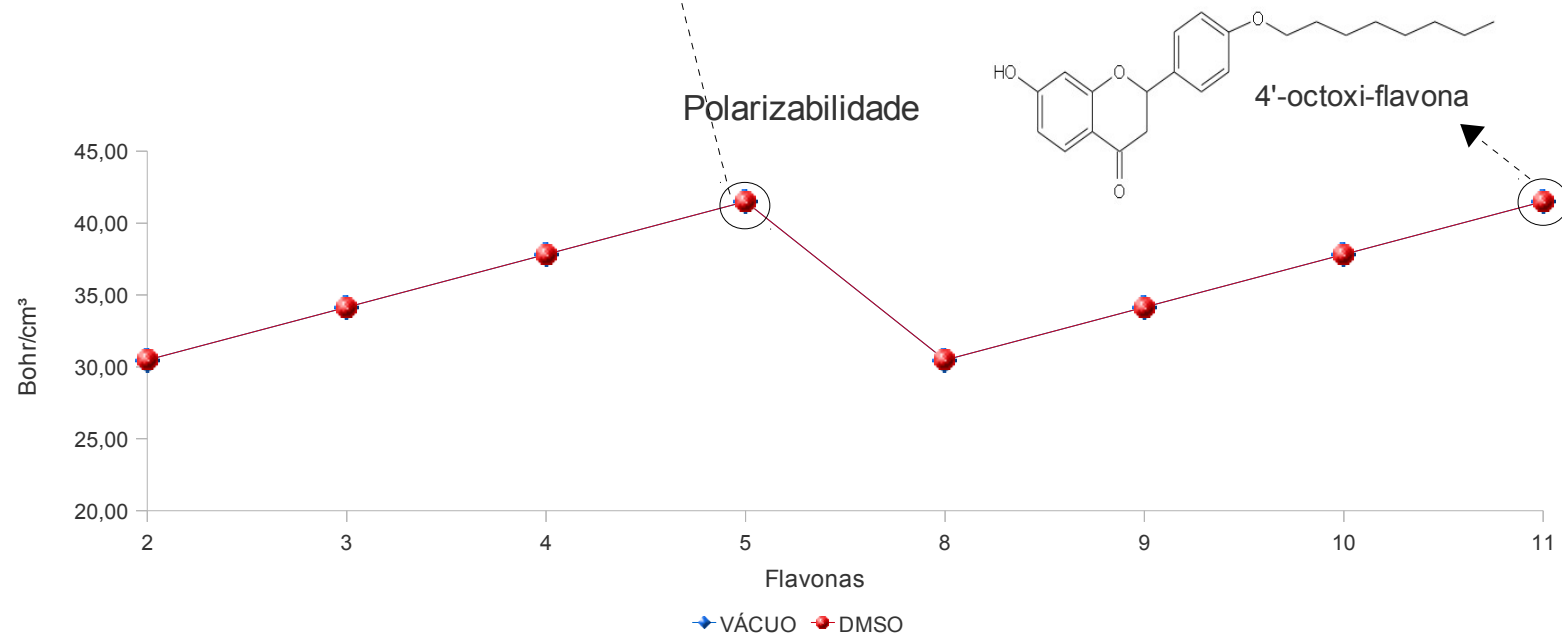


Gráfico 9: Valores de polarizabilidade obtidos para as flavonas na simulação no vácuo e em DMSO.

## 4.2. Análises *in vivo*

A indução de edema e a atividade miotóxica foram feitas no laboratório de química de proteína do departamento de bioquímica da UNICAMP, coordenado pelo Prof. Dr. Sérgio Marangoni. As flavonas foram divididas em dois grupos, o primeiro com as substituídas em 3' e o segundo com as substituídas em 4', onde cada grupo é constituído de quatro substâncias com os radicais etoxi, butoxi, hexoxi e octoxi.

As quatro flavonas sintéticas e ramificadas na posição 3' tiveram seus potenciais enzimáticos, miotóxicos e edemicos avaliados frente a PLA<sub>2</sub> isolada do veneno de *B. jararacussu*. Pode-se observar pelo gráfico 10 que a atividade miotóxica apresentou uma redução em relação a atividade da fosfolipase A<sub>2</sub> sozinha e essa redução aumentou com o aumento da cadeia lateral, assim, a flavona que teve atividade inibitória mais significativa foi a 3'-octóxi-flavona, onde a atividade foi de apenas 8,35%. Com relação a atividade edematogênica (gráfico 11) nota-se também uma redução da atividade com o aumento dos substituintes em relação a atividade da fosfolipase A<sub>2</sub> sozinha, neste caso a flavona que apresentou atividade inibitória mais significativa foi a 3'-octóxi-flavona, onde a atividade foi 13,04%. A comparação dos resultados mostra que o aumento dos radicais em 3', aumenta o potencial inibitório e o efeito biológico analisado. A informação obtida mostra que essas estruturas podem ajudar no desenvolvimento de protótipos que inibam a PLA<sub>2</sub>.

<b>Nº</b>	<b>Composto</b>	<b>Atividade (unidade/litro)</b>
CN	Controle negativo 1% de DMSO em PBS	282
CP	Controle positivo PLA <sub>2</sub>	2645
2	3'-etoxi-flavona	1188
3	3'-butoxi-flavona	986
4	3'-hexoxi-flavona	503
5	3'-octoxi-flavona	221

*Tabela 15: Valores da atividade miotóxica obtidos para as flavonas substituídas em 3'.*

<b>Nº</b>	<b>Composto</b>	<b>Redução (em %) do edema em relação a PLA<sub>2</sub> sozinha</b>
CN	Controle negativo 1% de DMSO em PBS	8
CP	Controle positivo PLA <sub>2</sub>	92
2	3'-etoxi-flavona	22,83
3	3'-butoxi-flavona	18,48
4	3'-hexoxi-flavona	15,22
5	3'-octoxi-flavona	13,04

*Tabela 16: Valores da atividade edematogênica obtidos para as flavonas substituídas em 3'.*

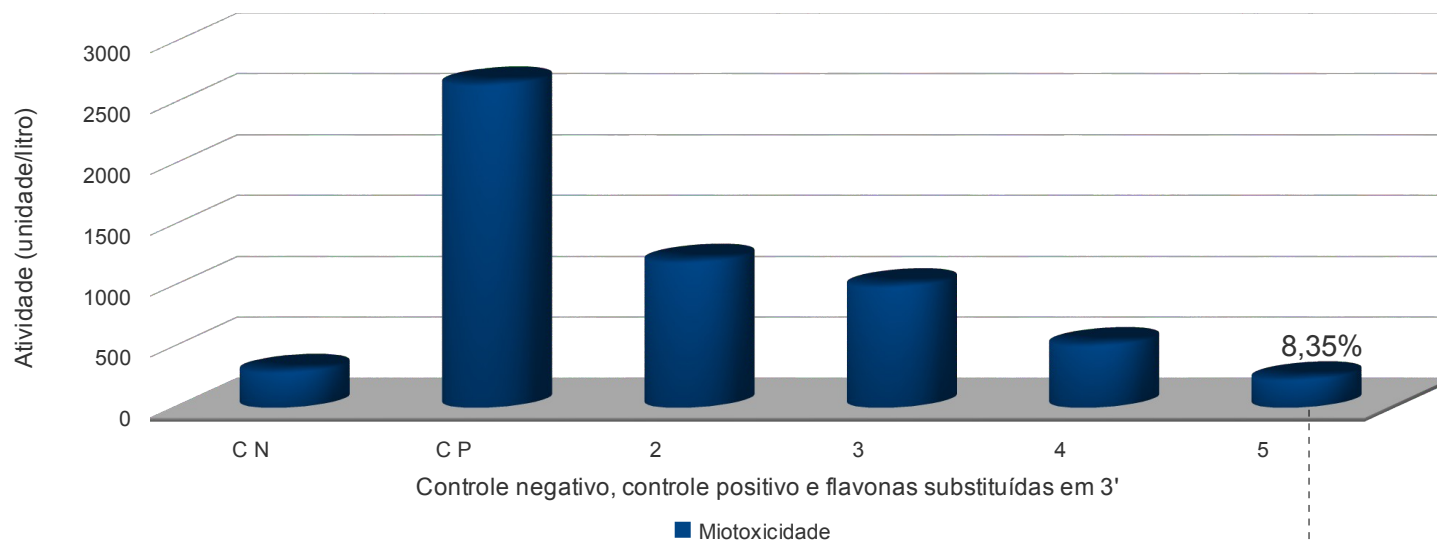


Gráfico 10: Atividade miotóxica das flavonas ramificadas em 3' frente a PLA2.

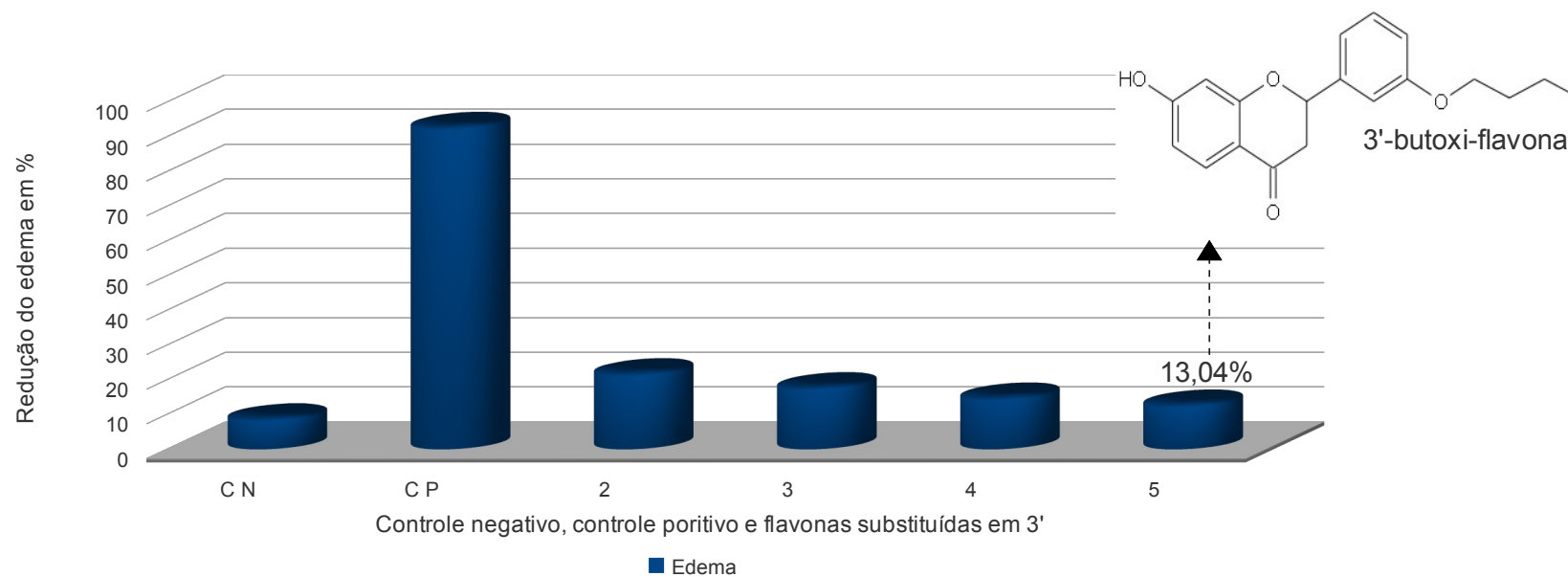


Gráfico 11: Atividade edematogênica das flavonas ramificadas em 3' frente a PLA2.

O segundo grupo a ser testado foi o que apresenta quatro compostos sintéticos derivados da posição 4' do 7-hidroxi-4H-cromo-4-ona. O potencial inibitório dessas flavonas (*in vivo*) induzido pela PLA<sub>2</sub> isolada da *B. jararacussu* foi testado pelas atividades miotóxica e edematogênica. O resultado mostra que esses compostos podem inibir o efeito tóxico induzido pela PLA<sub>2</sub>. A atividade miotóxica (gráfico 12 ) teve uma redução, essa redução teve um aumento de acordo com o aumento da cadeia substituinte, dessa forma, a flavona que teve maior atividade inibitória foi a 3-octóxica-flavona onde a atividade da fosfolipase A<sub>2</sub> foi de 31,38%. A atividade edematogênica (gráfico 13) segue o mesmo padrão visto anteriormente na atividade miotóxica e edematogênica para as flavonas substituídas em 3' e para a atividade miotóxica das flavonas substituídas em 4', então a flavona que apresentou maior atividade inibitória foi a 4'-octóxi-flavona, nela a fosfolipase A<sub>2</sub> teve atividade de 21,62% . É interessante observar que o aumento da hidrofobicidade da cadeia em 4', inibe a atividade enzimática. Essas informações reforçam o potencial das flavonas em inibir a PLA<sub>2</sub> e a construção desses compostos pode ajudar a desenvolver novos protótipos que podem gerar futuras drogas antiinflamatórias.

Nº	Composto	Atividade (unidade/litro)
CN	Controle negativo 1% de DMSO em PBS	282
CP	Controle positivo PLA <sub>2</sub>	2645
2	4'-etoxi-flavona	1956
3	4'-butoxi-flavona	1607
4	4'-hexoxi-flavona	1069
5	4'-octoxi-flavona	830

Tabela 17: Valores da atividade miotóxica obtidos para as flavonas substituídas em 4'.

Nº	Composto	Redução (em %) do edema em relação a PLA <sub>2</sub> sozinha
CN	Controle negativo 1% de DMSO em PBS	10
CP	Controle positivo PLA <sub>2</sub>	74
2	4'-etoxi-flavona	51,35
3	4'-butoxi-flavona	39,19
4	4'-hexoxi-flavona	24,32
5	4'-octoxi-flavona	21,62

Tabela 18: Valores da atividade edematogênica obtidos para as flavonas substituídas em 4'.

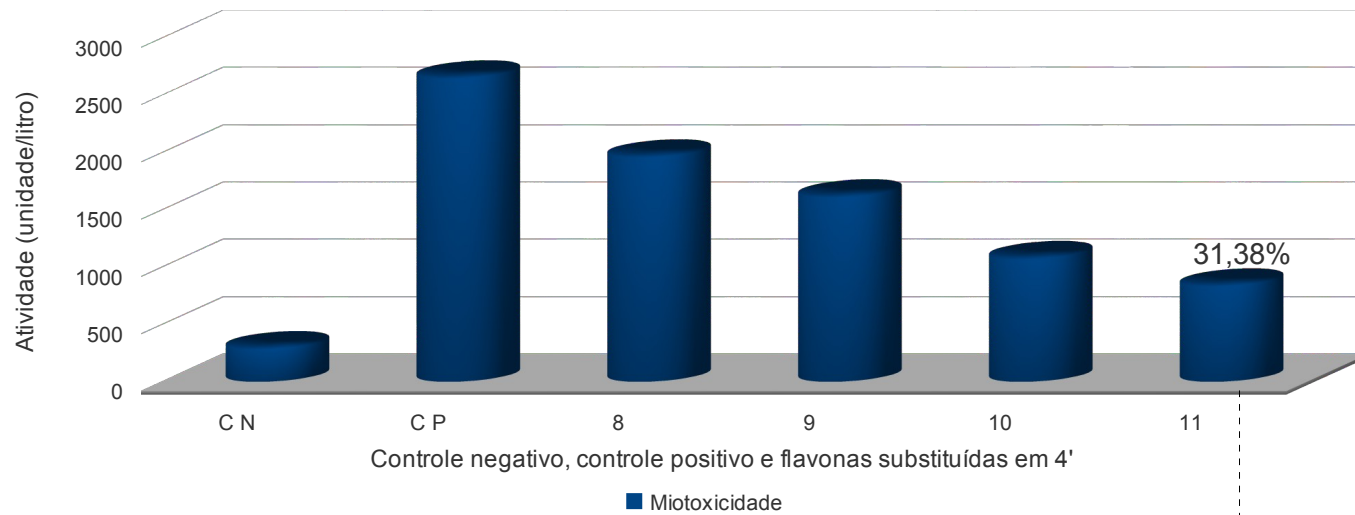


Gráfico 12: Atividade miotóxica das flavonas ramificadas em 4' frente a PLA<sub>2</sub>.

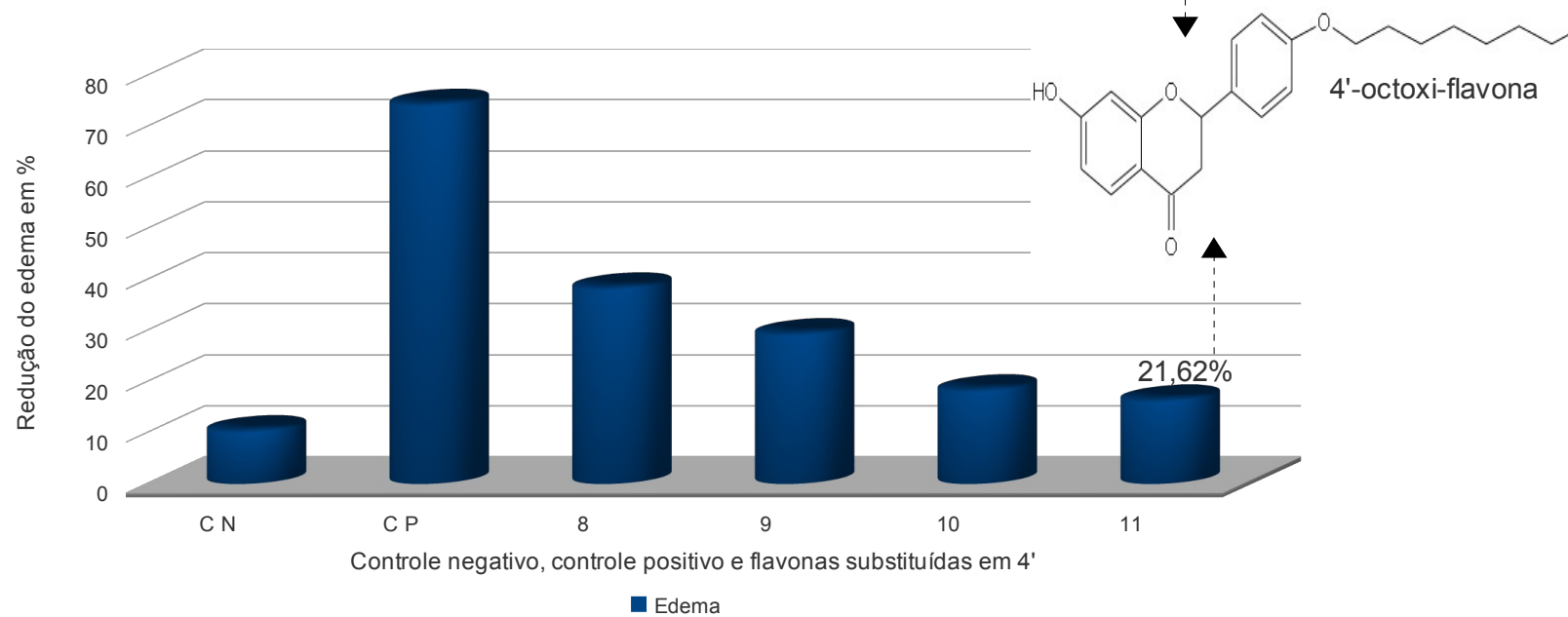


Gráfico 13: Atividade edematogênica das flavonas ramificadas em 4' frente a PLA<sub>2</sub>.



Ao compararmos a atividade edematogênica com a atividade miotóxica, tabela 19, observa-se que a atividade miotóxica teve uma redução de 91,65% na 3'-octóxi-flavona e de 68,62% na 4'-octóxi-flavona. Para a atividade edematogênica a 3'-octóxi-flavona inibiu 86,96% e a 4'-octóxi-flavona reduziu a atividade da PLA<sub>2</sub> em 78,38%. Logo, a flavona que apresenta maior atividade inibitória da enzima PLA<sub>2</sub> é a 3'-octóxi-flavona e portanto, é a flavona com maior propensão a protótipo de drogas com atividade antiinflamatórias.

	Atividade Miotóxica	Redução da Atividade Miotóxica	Atividade Edematogênica	Redução da Atividade Edematogênica
<b>3'-octóxi-flavona</b>	8,35%	<b>91,65%</b>	13,04%	<b>86,96%</b>
4'-octóxi-flavona	31,38%	68,62%	21,62%	78,38%

*Tabela 19: Comparação da atividade edematogênica com a atividade miotóxica das flavonas frente a PLA<sub>2</sub>.*

### 4.3. Análise Quimiométrica

A quimiometria nos proporciona construir um conjunto de dados que contém as medidas quantitativas, os parâmetros físico-químicos e estruturais capazes de descrever as propriedades dos compostos [177], para dessa forma termos a relação e interação entre os dados teóricos e experimentais que servem como guia para a interpretação estrutural a qual é essencial quando temos compostos protótipos com atividades biológicas e para o desenho e desenvolvimento de novos agentes de atividade biológica similar.

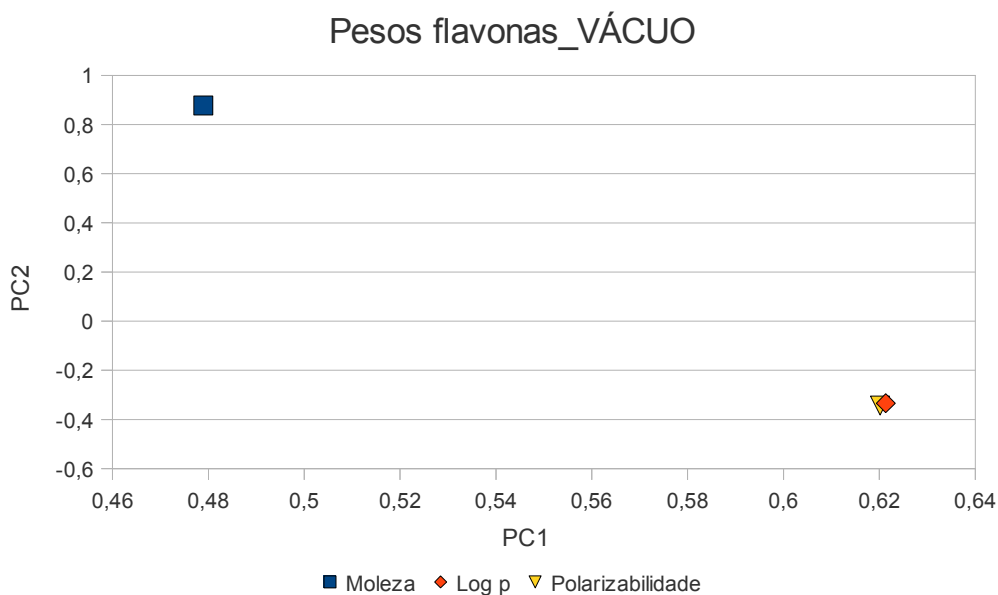
Uma forma de analisarmos qual o fator que irá ter mais importância e influência na atividade biológica dos compostos em questão é através da análise de componentes principais (PCA), nela obtemos as variáveis de maior peso na combinação linear dos primeiros e mais importantes componentes principais da amostra [11].

Os resultados da análise de componentes principais costumam ser visualizados em gráficos, facilitando a identificação de agrupamentos. Por exemplo, um gráfico de pesos contém informação sobre as variáveis e é usado para determinar quais delas são mais importantes para descrever a variação dos dados originais. Um gráfico de escores contém informações sobre os compostos tornando visível a similaridade, agrupamento e diferenças entre os mesmos, com base nas variáveis utilizadas [177].

Utilizou-se os valores descritos na tabela 20 para plotarmos o gráfico de pesos (ver gráfico 14) onde temos como variáveis mais importantes na descrição da variação a polarizabilidade e o log p, sendo a moleza a que contribui em grau menor para a atividade, ou seja, PC1, porém contribui muito para o PC2.

	<b>Moleza</b>	<b>Log p</b>	<b>Polarizabilidade</b>
PC1	0,48	0,62	0,62
PC2	0,88	-0,33	-0,34

*Tabela 20: Peso das componentes para PCA das flavonas no vácuo.*



*Gráfico 14: Pesos das flavonas no vácuo.*

Utilizando-se dos valores observados na tabela 21 produzimos o gráfico de escores. O PCA para as flavonas no vácuo (ver gráfico 15) mostra uma clara divisão das flavonas substituídas em 3' que encontram-se nos quadrantes superiores do gráfico e, as substituídas em 4' que encontram-se nos quadrantes inferiores, indicando que a atividade das substituídas em 3' é distinta daquelas substituídas em 4'. Pode-se perceber ainda que as mais ativas, são as que apresentam grupos alquila maiores (com 6 e 8 carbonos), são encontradas no lado esquerdo do gráfico e estão separadas das menos ativas, observadas no lado direito, independente da substituição ser em 3' ou em 4'.

Sendo assim, é possível dizer que o log p e a polarizabilidade são as propriedades mais influentes para a atividade da 4'-octoxi-flavona e da 4'-hexoxi-flavona. O fato de propriedades como a polarizabilidade ser resultante da distribuição de carga na molécula e de forças de van der Waals existentes, que atuam na adsorção superficial, solubilidade de lipídeos e reações químicas de interação atrativa, além de serem muito significantes entre compostos com similaridades estruturais [124], e do log p estar diretamente relacionado a passagem de um fármaco na membrana, nos diz que essas duas flavonas apresentam uma forte tendência a transpor as membranas biológicas e chegar ao sítio ativo da PLA<sub>2</sub> onde poderá inibir o processo inflamatório.

Nº	Flavonas	Moleza	Log p	Polarizabilidade
2	3'-etoxi-flavona	2,86714	2,65	30,49
3	3'-butoxi-flavona	2,94777	3,51	34,16
4	3'-hexoxi-flavona	2,94516	4,30	37,83
5	3'-octoxi-flavona	2,96894	5,10	41,50
8	4'-etoxi-flavona	2,84252	2,65	30,49
9	4'-butoxi-flavona	2,87803	3,51	34,16
10	4'-hexoxi-flavona	2,88118	4,30	37,83
11	4'-octoxi-flavona	2,88002	5,10	41,50

Tabela 21: Valores dos parâmetros importantes para a construção dos pcs das flavonas no vácuo.

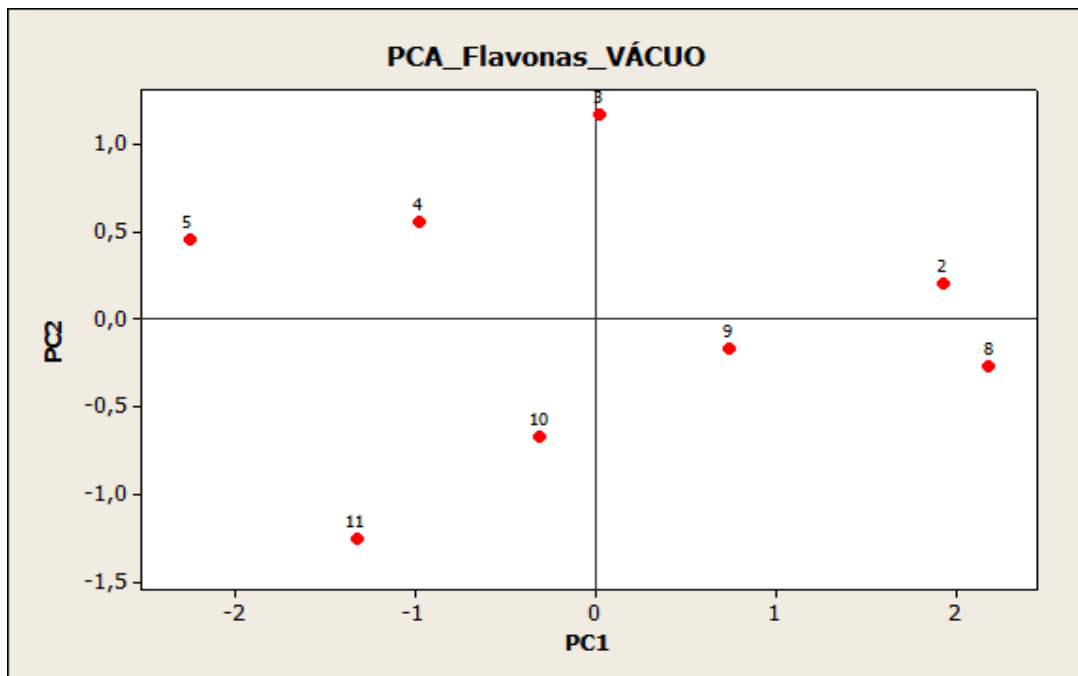


Gráfico 15: PCA das flavonas no vácuo.

Uma outra forma de procurarmos a similaridade entre as amostras é através da análise de grupamentos hierárquicos (HCA), onde estas são agrupadas por pares ou grupos de amostras de acordo com a similaridade [11]. Fazendo uso dos dados e das propriedades relacionadas na tabela 22 plotou-se o HCA (ver gráfico 16), este produz três braços: no primeiro temos as moléculas 3'-etoxi-flavona e 4'-etoxi-flavona que são as menos ativas, no segundo estão os pares 3'-butoxi-flavona e 4'-butoxi-flavona, 3'-hexoxi-flavona e 4'-hexoxi-flavona, sendo intermediárias e por fim temos o terceiro com o par de moléculas mais ativas 3'-octoxi-flavona e 4'-octoxi-flavona. Esse fato confirma o que foi

observado anteriormente no PCA e em sua análise.

Nº	Flavonas	Moleza	Log p	Polarizabilidade
2	3'-etoxi-flavona	2,86714	2,65	30,49
3	3'-butoxi-flavona	2,94777	3,51	34,16
4	3'-hexoxi-flavona	2,94516	4,30	37,83
5	3'-octoxi-flavona	2,96894	5,10	41,50
8	4'-etoxi-flavona	2,84252	2,65	30,49
9	4'-butoxi-flavona	2,87803	3,51	34,16
10	4'-hexoxi-flavona	2,88118	4,30	37,83
11	4'-octoxi-flavona	2,88002	5,10	41,50

Tabela 22: Valores dos parâmetros importantes para a construção do HCA das flavonas no vácuo.

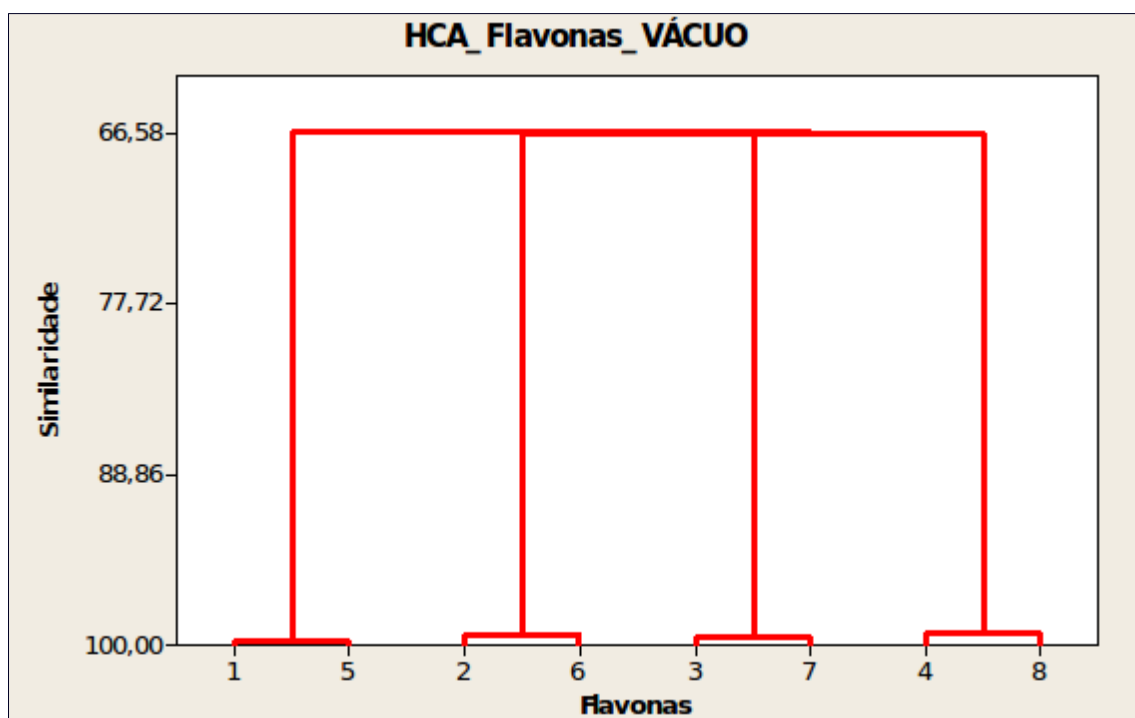


Gráfico 16: HCA das flavonas no vácuo.

Através da simulação com o solvente DMSO, obtivemos dados teóricos que foram tratados por métodos quimiométricos para assim, termos uma correlação entre os dados teóricos e experimentais. O gráfico dos pesos (ver gráfico 17) foi plotado com base nos valores da tabela 23, essa simulação mostra que apenas o orbital de fronteira HOMO é o parâmetro mais importante para a construção do PC1, o momento dipolar passa a ser

mais importante para a PC2 e o log p é o parâmetro que menos contribui para a atividade.

	HOMO	Log p	Momento Dipolar
PC1	0,63	0,49	0,60
PC2	-0,22	0,86	0,46

Tabela 23: Peso das componentes para PCA das flavonas em DMSO.

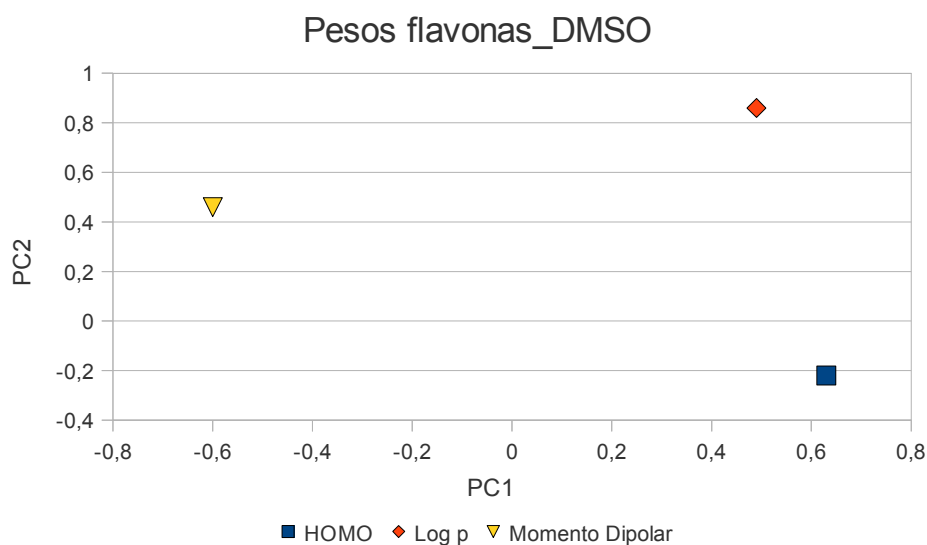


Gráfico 17: Pesos das flavonas em DMSO.

Fazendo uso dos dados da tabela 24 plotou-se o gráfico de PCA para a simulação em DMSO, nesta as propriedades que contribuíram de forma mais significativa para a atividade das flavonas foram: HOMO, log p e momento dipolar. Apesar da separação das moléculas neste não ser tão boa quanto a ocorrida no PCA das flavonas no vácuo, podemos perceber aqui a separação das moléculas mais ativas (4, 5, 10, 11) das menos ativas (2, 3, 8, 9).

Contudo, este ambiente de simulação é o mais próximo da realidade das condições experimentais, já que as flavonas foram testadas quanto seu poder inibitório da PLA<sub>2</sub> na atividade edematogênica e miotóxica utilizando-se o DMSO como solvente.

Nº	Flavonas	HOMO	Log p	Momento Dipolar
2	3'-etoxi-flavona	-0,23188	2,65	5,98
3	3'-butoxi-flavona	-0,23016	3,51	4,44
4	3'-hexoxi-flavona	-0,21570	4,30	2,24
5	3'-octoxi-flavona	-0,21510	5,10	2,26
8	4'-etoxi-flavona	-0,21690	2,65	1,40
9	4'-butoxi-flavona	-0,21580	3,51	1,70
10	4'-hexoxi-flavona	-0,21380	4,30	2,03
11	4'-octoxi-flavona	-0,21380	5,10	1,57

Tabela 24: Valores dos parâmetros importantes para a construção dos pcs das flavonas em DMSO.

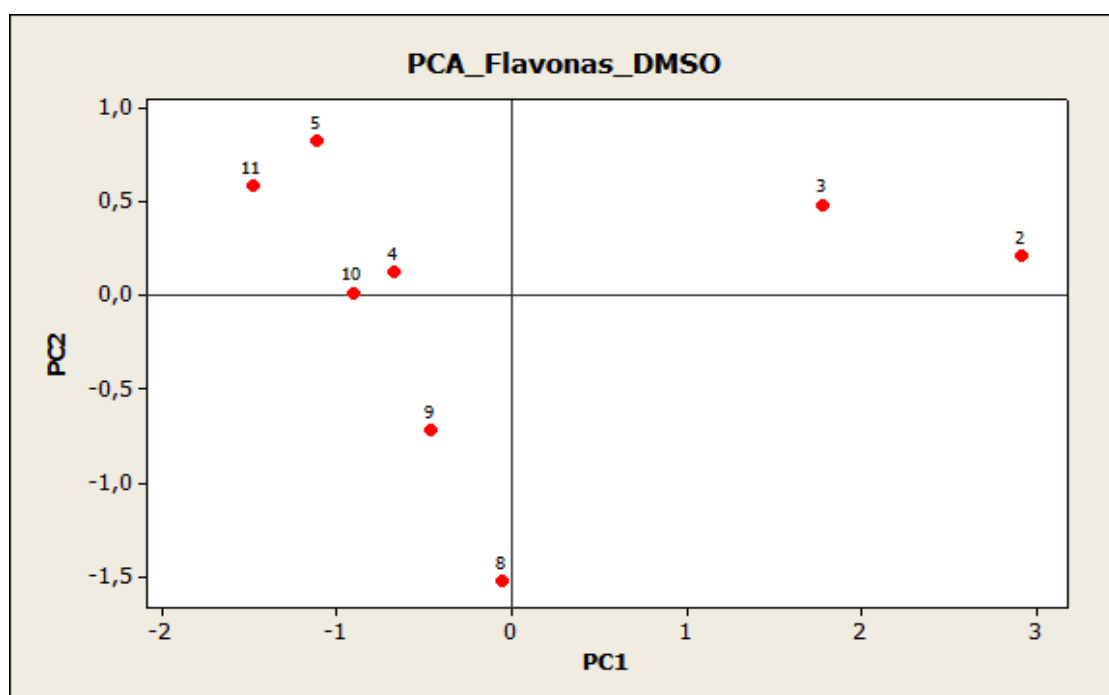


Gráfico 18: PCA das flavonas em DMSO.

Não foi possível a obtenção de resultados conclusivos para o HCA em DMSO, esse fato bem como a seleção de parâmetros diferentes para a simulação no vácuo e em DMSO pode ser explicado pelo fato de termos um número reduzido de moléculas para análise quimiométricas.

A análise quimiométrica foi feita para se achar uma correlação entre os parâmetros físico-químicos e as atividades biológicas, levando-se em consideração que as

propriedades que influenciam a atividade de um fármaco são bastante diversas, sendo as mais importantes a lipofilicidade, os efeitos eletrônicos e a conformação [125]. Neste estudo não foi diferente, pois os descritores mais importantes estão relacionados a lipofilicidade e aos efeitos eletrônicos.

Portanto, podemos observar que os descritores podem levar a um modelo teórico que nós dá uma boa previsão da atividade inibitória da PLA<sub>2</sub> pelas flavonas, ajudando no desenho de fármacos inibidores dessa enzima e que o ambiente (vácuo e DMSO), exerce influência significativa na atividade inibitória.



## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Devido os flavonóides fazerem parte da alimentação cotidiana, eles são caracterizados como compostos com pouco ou nenhum efeito colateral, isso faz com que pesquisadores voltem suas atenções a essa classe de substâncias com o intuito de elucidar seus mecanismos de ação em sistemas biológicos.

Para a constatação das informações contidas na literatura, este trabalho fez análises teóricas que comprovaram que as flavonas são substâncias estáveis e quanto maior a cadeia hidrocarbônica, mais estável é a molécula pois sua distribuição de carga tende a ser mais uniforme.

A hidroxila como radical em 7 e as cadeias hidrocarbônicas em 3' ou em 4' fazem com que essas substâncias possam vir a interagir com o sítio ativo da enzima através de ponte de hidrogênio ou por oxidação, formando grupo carboxílico e dessa forma possam vir a atuar no sítio ativo da enzima fosfolipase A<sub>2</sub>. Assim, os parâmetros de forma geral, indicam que as flavonas são compostos com grande propensão a atividade antiinflamatória.

A indução de edema e a atividade miotóxica indicam que quando maior a cadeia hidrocarbônica no substituinte, maior será a atividade inibitória da fosfolipase corroborando com os resultados obtidos por simulação computacional, levando-nos a acreditar que as flavonas apresentam características enzimáticas inibitórias e que as mesmas podem atuar diretamente no sítio ativo da PLA<sub>2</sub>, sendo essa atividade similar a atuação do  $\alpha$ -tocoferol para a mesma enzima.

Propriedades como log p, momento dipolar, moleza, HOMO e polarizabilidade, mostraram ser as mais influentes e servem como indicadores para a atividade biológica das flavonas, dentre estas podemos destacar o log p como a mais importante, pois a mesma é influente nas duas simulações feitas indicando que as flavonas podem ser absorvidas pelas membranas e ter uma ótima atividade.

Portanto, podemos observar que os descritores podem levar a um modelo teórico que nós dá uma boa previsão da atividade inibitória da PLA<sub>2</sub> pelas flavonas, ajudando no desenho de fármacos inibidores dessa enzima e que o ambiente (vácuo e DMSO), exerce influência significativa na atividade inibitória.

Sendo assim, as flavonas apresentaram resultados muito promissores para a inibição da PLA<sub>2</sub>, onde as mais ativas são as que apresentam a cadeia lateral maior, 3' e

4'-hexoxi-flavonas e as 3' e 4'-octoxi-flavonas. Apesar dos resultados obtidos serem satisfatórios, sugerimos que seja feito desenho de substâncias análogas às estudadas aqui para que dessa forma possamos ter uma análise quimiométrica completa, e modelagem molecular para avaliar o encaixe das flavonas no sítio alvo e verificar se a inibição dá-se de fato no sítio ativo da enzima.

## 6. REFERÊNCIAS

1. PIETTA, Pier-Giorgio. Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products*, n. 63, p. 1035-1042, 1999.
2. GONZÁLES-GALLEGO, J.; SÁNCHEZ-CAMPOS, S.; TUÑÓN, M. J. Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids. *Nutrición Hospitalaria*, v. 22, n. 3, p. 287-293, 2007.
3. SILVA, M. de B. S. Flavonóides com capacidade antioxidante. 2004/2005. *Química Aplicada*. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Portugal.
4. GIL, B. et al. Morelloflavone, a novel biflavonoid inhibitor of human secretory phospholipase A<sub>2</sub> with anti-inflammatory activity. *Biochemical Pharmacology*. v. 53, p. 733-740, 1997.
5. KIM, H. P; PHAM, H. T; ZIBOH, V. A. Flavonoids differentially inhibit guinea pig epidermal cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential FattyAcids*. v. 65, n. 5-6, p. 281-286, 2001.
6. LINDAHL, M; TAGESSON, C. Flavonoids as phospholipase A<sub>2</sub> inhibitors. *Inflammation*, v. 21, n. 3, p. 347-356, 1997.
7. DORNAS, W. C. et al. Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 28, n. 3, p. 241-249, 2007.
8. LIEN, E. J.; RENS, B.; WANG, R. Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants. *Free Radical Biomed*, n.26, p. 285-294, 1999.
9. HAVSTEEN, B. T. The biochemistry and medicinal significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther*, v. 96, n. 2-3, p. 67-202, 2002.
10. HOHENBERG, P.; KOHN, W. Inhomogeneous electron gas. *Physical Review B*, v. 136, n. 3B, p. B864-&, 1964.
11. NETO, J. M. M; MOITA, G. C. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. *Química Nova*, v. 21, n. 4, p. 467-469, 1998.
12. CORREIA, P. R.M; FERREIRA, M. M. C. Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos, v. 30, n. 2, p. 481-487, 2007.
13. SIMÕES, C. M. O. et al. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. Santa Catarina: Editora da UFSC, 1999.
14. COUTINHO, M. A. S; MUZITANO, M. F; COSTA, S. S. Flavonóides: potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. *Revista Virtual de Química*. v.1,

- n. 3, p. 241-256, 2009.
15. DI CARLO, G. et al. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sciences*, v. 65, n. 4, p. 337-353, 1999.
  16. TIJBURG, L.B.M. et al. Tea flavonoids and cardiovascular diseases: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 37, n.8, p 771-785, 1997.
  17. O'REILLY, J.D. et al. Consumption of flavonoids in onions and black tea lack of effect on flavonoids from *Stachys chrysantha* and *Stachys candida*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v. 23, p. 47-53, 2000.
  18. SILVA, R. R. da. et al. Efeito de flavonóides no metabolismo do ácido araquidônico. *Medicina Ribeirão Preto*, v. 35, p. 127-133, 2002.
  19. MONCADA, S; FERREIRA, S. H; VANE, J. R. Pain and inflammatory mediators. In *Inflammation. Handbook of Experimental Pharmacology*. v. 50-1. Berlin: Springer-Verlag, 1978.
  20. SAMUELSSON, B. Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science*. v. 220, p. 568-575, 1983.
  21. DAVIES, P. The role of arachidonic acid oxygenation products in pain and inflammation. *Annu. Rev. Immunol.* v. 2, p. 335-357, 1984.
  22. DEVLIN, T. M. *Manual de bioquímica com correlações clínicas*. 6. ed. São Paulo: Edgard Blucher, 2007.
  23. VOET, D; VOET, J; PRATT, C. W. *Fundamentos de bioquímica: a vida em nível molecular*. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.
  24. GOODMAN & GILMAN. *As bases farmacológicas da terapêutica*. 11. ed. Mc Graw Hill: Rio de Janeiro, 2005.
  25. GALLIN, J. I; GOLDSTEIN, I. M; SNYRDEMAN, R. *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*, 2 ed. Raven Press: New York, 1992.
  26. KELLEY, W. N. et al. *Textbook of Rheumatology*. 4 ed. W. B. Saunders: Philadelphia, 1993.
  27. Da SILVA, W. D; MOTA, I. *Imunologia básica e aplicada*. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.
  28. STITES, D. P; TERR, A. I; PARSLow, T. G. *Imunologia médica*. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
  29. BINISTI, C. et. al. Structure-activity relationship in platelet activating factor 9 from PAF-antagonism to PLA<sub>2</sub> inhibition. *Journal Lipid Mediators Cell Signalling*. v. 15, p. 125-144, 1996.

30. KUDO, I; MURAKAMI, M. Phospholipase A<sub>2</sub> enzymes. Prostaglandins & other Lipid Mediators, v. 68-69, p. 3-58, 2002.
31. CHANDRA, V. et. al. First structural evidence of a specific inhibition of phospholipase A<sub>2</sub> by  $\alpha$ -tocopherol (vitamin E) and its implications in inflammation: crystal structure of the complex formed between phospholipase A<sub>2</sub> and  $\alpha$ -tocopherol at 1.8 Å resolution. Journal of Molecular Biology, v. 320, p. 215-222, 2002.
32. MURAKAMI, M. et. al. Different functional aspects of the group II subfamily (types IIA and V) and type X secretory phospholipase A<sub>2</sub>s in regulating arachidonic acid release and prostaglandin generation. The Journal of Biological Chemistry, v. 274, n. 44, p. 31435-31444, 1999.
33. KIM, S. W. et. al. Inhibition of cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> by annexin I. The Journal of Biological Chemistry, v. 276, n. 19, p. 15712-15719, 2001.
34. FUENTES, L. et. al. Biological effects of group IIA secreted phospholipase A<sub>2</sub>. FEBS Letters, v. 531, p. 7-11, 2002.
35. SCOTT, D. L. et. al. Crystal structure of bee-venom phospholipase A<sub>2</sub> in a complex with a transition state analogue. Science, v. 250, p. 1563-1566, 1990a.
36. SCOTT, D. L. et. al. Structure of free and inhibited human secretory phospholipase A<sub>2</sub> from inflammatory exudate. Science, v. 254, p. 1007-1010, 1991.
37. WHITE, S. P. et. al. Crystal structure of cobra venom phospholipase A<sub>2</sub> in a complex with a transition state analogue. Science, v. 250, p. 1560-1563, 1990.
38. FLOWER, R. J. Lipocortin. Prog. Clin. Biol. Res. v. 349, p. 11-25, 1990.
39. KUMMER, C. L; COELHO, T. C. R. B. Antiinflamatórios não esteróides inibidores da ciclooxigenase-2 (COX-2): Aspectos atuais. Revista Brasileira de Anestesiologia, v. 52, n. 4, p. 498-512, 2002.
40. SMITH, W. L. Prostanoid biosynthesis and mechanism of action. Am. J. Physiol. v. 268. p. F181-F191, 1992.
41. GABRIEL, S.E; JAAKKIRNAINEN, L; BOMBARDIER, C. Risk for serious gastrointestinal complications related to use of nonsteroidal antiinflammatory drugs. A meta-analysis. Ann. Intern. Med. v. 115, p. 787-796, 1991.
42. BROOKS, P. M; DAY, R. O. Nonsteroidal antiinflammatory drugs – differences and similarities. N. Engl. J. Med. v. 324, p. 1716-1725, 1991.
43. VANE, J; BOTTING, R. Inflammation and the mechanism of action of antiinflammatory drugs. FASEB J. v. 1, p. 89-96, 1987.
44. PIPER, P. J. Formation and actions of leukotrienes. Physiol. Rev. v. 64, p. 744-761, 1984.

45. BRODY, T. Nutritional biochemistry. 2. ed. San Diego: Academic Press, 1994.
46. KATZUNG, B. G. Farmacologia: básica e clínica. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.
47. WILLIAMS, C. A. et. al. A biologically active lipophilic flavonoid from *Tanacetum parthenium*. *Phytochemistry*, v. 38, p. 267-270, 1995.
48. MORONEY, M. A. et. al. Selectivity of neutrophil 5-lipoxygenase and cyclooxygenase inhibition by an anti-inflammatory flavonoid glycoside and related aglycone flavonoids. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 40, p. 787-792, 1988.
49. ALCAREZ, M. J; MORONEY, M; HOULT, J. R. S. Effects of hypolaetin 8-glucoside and its aglycone *in vivo* tests for anti-inflammatory agents. *Planta Medica*, v. 55, p. 107-108, 1989.
50. HARBONE, J. B; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoids research since 1992. *Phytochemistry*, v. 55, p. 481-504, 2000.
51. HAVSTEEN, B, H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 96, p. 67-202, 2002.
52. WANG, H. et. al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of anthocyanins and their aglycone, cyanidin, from tart cherries. *Journal of Natural Products*, v. 62, p. 294-296, 1999b.
53. KOGANOV, M. M; DUEVA, O. V; TSORIN, B. L. Activities of plant-derived phenols in a fibroblast cell culture model. *Journal of Natural Products*, v. 62, p. 481-483, 1999.
54. LANDOLFI, R; MOWER, R. L; STEINER, M. Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids. *Biochemistry Pharmacology*, v. 33, p. 1525-1530, 1984.
55. PELZER, L. E. et al. Acute and chronic anti-inflammatory effects of plant flavonoids. *IL Farmaco*, v. 53, p. 421-424, 1998.
56. GRYGLEWSKI, J. R. et al. On mechanism of antithrombotic action of flavonoids. *Biochemistry Pharmacology*, v. 36, p. 317-322, 1987.
57. KINSELLA, J. E. A. a - Linolenic acid: functions and effects on linolenic acid metabolism and eicosanoid-mediated reactions. *Adv Food Nutr Res*, v. 35, p. 89-101, 1991.
58. CUSHMAN, D. W; ONDETTI, M. A. History of the design of captopril and related inhibitors of angiotensin converting enzyme. *Hypertension*, v. 17, p. 589-592, 1991.
59. BETTINI, V; FRACCARO, A; LEGRENZI, E. Effect of flavonoid (4-methylesculetol) on the response of isolated calf hepatic arteries to angiotensin II. *Boll. Soc. Ital.*

- Biol. Sper, v. 53, p. 938-941, 1978a.
60. BETTINI, V. et. al. Effect of flavonoid (4-methylesculetol) on the response of isolated segments of coronary arteries to adrenalin. Boll. Soc. Ital. Biol. Sper, v. 53, p. 2027-2030, 1978b.
61. BETTINI, V; LEGRENZI, E; MONANNI, L. Effect of flavonoid (4-methylesculetol) on the response of isolated calf arteries to histamine. Boll. Soc. Ital. Biol. Sper, v. 53, p. 2015-2019, 1978c.
62. BETTINI, V; LEGRENZI, E; PETRELLA, C. Influence of flavonoid (4-methylesculetol) on the response of isolated calf coronary vessels to noradrenalin. Boll. Soc. Ital. Biol. Sper, v. 53, p. 1096-1100, 1978d.
63. KIMURA, Y. et. al. Effects of flavonoids isolated from scutellariae radix on the production of tissue-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 induced by thrombin and thrombin receptor agonist peptide in cultured human umbilical vein endothelial cells. Journal of Pharmacy Pharmacology, v. 49, p. 816-822, 1997.
64. DAS, N. P; PEREIRA, T. A. Effects of flavonoids on thermal autoxidation of palm oil: structure activity relationships. Journal of American Oil Chemists Society, v. 67, p. 255-258, 1990.
65. DZIEDZIC, S. Z; HUDSON, B. J. F. Hydroxyisoflavones as antioxidants for edible oils. Food Chemistry, v. 11, p. 161-166, 1983.
66. SHAHIDI, F; WANASUNDARA, P; HONG, C. Antioxidant activity of phenolic compounds in metal model systems. In: Phenolic compounds in food and their effects on health I: ACS Symposium Series 506. American Chemical Society, Washington DC, pp. 214-222, 1991.
67. OKUDA, K. Identification of antimicrobial and antioxidant constituents from licorice of Russian and Xinjing origin. Chemical and Pharmacy Bulletin, v. 37, p.2528-2530, 1989.
68. GORDON, M. H. Antioxidant activity of flavonoids isolated from licorice. Journal of Agriculture and Food Chemistry, v. 43, p. 1784-1788, 1995.
69. MIYASE, T. et. al. Antioxidants from *Lespedeza homoloba* (II). Phytochemistry, v. 52, p. 311-319, 1999b.
70. ARORA, A. et. al. Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids. Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 373, p. 102-109, 2000.
71. TSUDAT. et al. Antioxidative activity of the anthocyanin pigments cyanidin 3-O-b-D-glucoside and cyanidin. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 42, p. 2407-2410, 1994.
72. TSCHOPP, M; POMETTA, D; BABEL, J. Diabetic retinopathy: study of the action of

- O-beta-hydroxyethyl-rutosides (HR) by retinal fluoresceinography. *Diabetologia*, v. 6, p. 475-481, 1970.
73. POLLOCK, J; HEATH, H. Studies on the effects of  $\beta\beta'$ -iminodipropionitrile and O-( $\beta$ -hydroxyethyl)-rutoside on ADP-activated aggregation of rat platelets in relation to the developments of diabetic microangiopathy. *Biochem. Pharmacol*, v. 24, p. 397-400, 1975.
74. LEAN, M. E. et. al. Dietary flavonoids protect diabetic human lymphocytes against oxidative damage to DNA. *Diabetes*, v. 48, p. 176-181, 1999.
75. VERTOUNNEN, J. et al. Flavonoid treatment reduces glycation and lipid peroxidation in experimental diabetic rats. *Phytother Res*. v. 6, p. 430-432, 1994.
76. BLOSTEIN-FUJII, A. et al. Short term citrus flavonoid supplementation of tipe II diabetic women: no effect on lipoprotein oxidation tendencies. *Free Radic Res*. v. 30, p. 315-320, 1999.
77. CASALINI, C. et. al. Effect of complex polyphenols and tannins form red wine (WCPT) on chemically induced oxidative DNA damage in the rat. *Europe Journal Nutritional*. v. 38, p. 190-195, 1999.
78. HAENEN, G. R. et. al. Peroxynitrite scavenging by flavonoids. *Biochemical Biophysics Res Commum*. v. 236, p. 591-593, 1997.
79. LIN, C. N. et. al. Novel antiplatelet constituents from Formosan Moraceous plants. *Journal of Natural Products*. v. 59, p. 834-838, 1996.
80. KUEHL, F. A. Jr; EGAN, R. W. Prostaglandins, arachidonic acid and inflammation. *Science*. v. 210, p.978-984, 1980.
81. SÖRENSEN, A. H; HANSEN, H. Chronic venous insufficiency treated with hydroxyethylrutosides (HR). *Angiologica*. v. 7, p. 187-192, 1970.
82. HAMMERSEN, F. The fine structure of different types of experimental edemas for testing the effect o vasoactive drugs demonstrated with a flavonoid. *Angiologica*. v. 9, p. 194-222, 1972.
83. KLEMM, K. J. Alteration of the vessel wall in the capillary bed after irradiation with fast electrons. Experimental study of the protective substances trihydroxy-ethyl-rutosides (THR) by means of the rabbit's ear chamber. *Bibl. Anatomy*. v. 1, p. 207-213, 1967.
84. McEWAN, A. J; McARDLE, C. S. Effects of hydroxyethylrutosides on blood oxygen levels and venous insufficiency symptoms in vaicose veins. *Br. Medical Journal*. v. 2, p. 138-141, 1971.
85. NIEBES, P. Influence of flavonoids on mucopolysaccharide metabolism in the venous wall. *Angiologica*. v. 9, p. 226-234, 1972.



86. RISH, L; RODRIGUEZ, J. C. Effect of o-( $\beta$ -hydroxyethyl)-rutosides on oedema in chronic venous insufficiency of the lower limb. A double blind trial. *Angiologica*. v. 9, p. 62-66, 1972.
87. MASFERRER, J. L. et. al. Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is non-inflammatory and non-ulcerogenic. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. v. 91, p. 3228-3232, 1994.
88. HODNICK, W. F; AHMAD, S; PARDINI, R. S. Induction of oxidative stress by redox active flavonoids. *Adv. Exp. Med. Biol*. v. 439, p. 131-150, 1998.
89. COS, P. et. al. Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *Journal of Natural Productions*. v. 61, p. 71-76, 1998.
90. VAN CAUWENBERGE, H; FRANCHIMONT, P. Action of Z 6000 (trihydroxyethylrutoside) on various experimental inflammation tests carried out in rats. *Arch. Int. Pharmacodyn Ther*. v. 170, p. 74-80, 1967.
91. BRANDAO, M. G. et. al. Antimalarial activity of extracts and fractions from *bidens pilosa* and other *Bidens* species (Asteraceae) correlated with the presence of acetylene and flavonoid compounds. *Journal Ethnopharmacol*. v. 57, p. 131-138, 1997.
92. WILLIAMS, C. A. et. al. The flavonoids of *Tanacetum parthenium* and *T. Vulgare* and their anti-inflammatory properties. *Phytochemistry*. v. 51, p. 417-423, 1999.
93. LOGGIA, R. D. et. al. Topical anti-inflammatory activity of some flavonoids from *Quercus ilex* leaves. *Planta Medica*. v. 55, p. 109-110, 1989.
94. SERTIE, J. A. A. et. al. Anti-inflammatory activity and sub-acute toxicity of artemetin. *Planta Medica*. v. 56, p. 36-40, 1990.
95. SHOSKES, D. A. Effect of bioflavonoids quercetin and curcumin on ischemic renal injury. *Transplantation*, v. 66, p. 147-152, 1998.
96. YAMAMURA, S. et. al. Antihistaminic flavones and aliphatic glycosides from *Mentha spicata*. *Phytochemistry*. v. 48, p. 131-136, 1998.
97. METZNER, J. et. al. On the anti-microbiological activity of propolis constituents. *Pharmazie*. v. 34, p. 97-102, 1979.
98. MABRY, T. J; ULUBELEN, A. Chemistry and utilization of phenylpropanoids including flavonoids, coumarins and lignans. *Journal Agricultural Food Chemical*. v. 28, p. 188-195, 1980.
99. SCHMIDT, H. et. al. Double-blind trial of the effect of a propolis-containing mouthwash on inflamed and healthy gingiva. *Stomat DDR*. v. 30, p. 491-497, 1980.
100. CIZMARIK, J; MATEL, I. Examination of the chemical composition of

- propolis. I. Isolation and identification of 4-hydroxyl-3-methoxy-cinnamic acid from propolis. *Journal Apic. Res.* v. 12, p. 63-65, 1973.
101. BAGAEV, I. Flavonoids in the complex treatment of patients with pulmonary tuberculosis. *Probl. Tuberk.* v. 12, p. 74-75, 1978.
  102. EL-GAMMAL, A. A; MANSOUR, R. M. Antimicrobiological activities of some flavonoid compounds. *Zentralbl Mikrobiol.* v. 141, p. 561-565, 1986.
  103. OHNISHI, E; BANNAI, H. Quercetin potentiates TNF-induced antiviral activity. *Antiviral Res.* v. 22, p. 327-331, 1993.
  104. CONTI, C. et. al. Anti-picornavirus activity of synthetic flavone-3-yl esters. *Antiviral Chemistry Chemother.* v. 9, p. 511-515, 1998.
  105. CHEN, C. et. al. Different effects of the constituents of Egb761 on apoptosis in rat cerebellar granule cells induced by hydroxyl radicals. *Biochemical Molecular Biological Intent.* v. 47, p. 397-405.
  106. FOTSIS, T. et. al. Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and in vitro angiogenesis. *Cancer Res.* v. 57, p. 2916-2921, 1997.
  107. SUOLINNA, E. M; BUCHSBAUM, R. N; RACKER, E. The effects of flavonoids on aerobic glycolysis and growth of tumor cells. *Cancer Res.* v. 35, p. 1865-1872, 1975.
  108. SPECTOR. M; O'NEAL, S; RACKER, E. Reconstitution of the Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup> pump of Ehrlich ascites tumor and enhancement of efficiency by quercetin. *Journal of Biological Chemical.* v. 255, p. 5504-5507, 1980a.
  109. SPECTOR. M; O'NEAL, S; RACKER, E. Phosphorylation of the beta subunit of Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup> -ATPase in Ehrlich ascites tumor by a membrane bound protein kinase. *Journal of Biological Chemical.* v. 255, p. 8370-8373, 1980b.
  110. BERTORELLO, A. M. et. al. Phosphorilation of the catalytic subunit of Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup> -ATPase inhibits the activity of the enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* v. 88, p. 11359-11362, 1991.
  111. HORISBERGER, J. et. al. The H<sup>+</sup>-ATPase β-subunit can act as a surrogate for the β-subunit of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pumps. *Journal of Biological Chemical.* v. 266, p. 19131-19134, 1991.
  112. KIMMICH, G. A; RANGLES, J. Phloretin-like action of bioflavonoids on sugar accumulation capability of isolated intestinal cells. *Membr. Biochem.* v. 1, p. 221-237, 1978.
  113. SALTER. D. W; CUSTEAD-JONES, S; COOK, J. S. Quercetin inhibits hexose transport in a human diploid fibroblast. *Journal Membr Biological.* v. 40, p. 67-76, 1978.

114. AKIYAMA, T. et. al. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine specific protein kinases. *Journal of Biological Chemical*. v. 262, p. 5592-5595, 1987.
115. BENNETT, J. P; GOMPERTS, B. D; WOLLENWEBER, E. Inhibitory effects of natural flavonoids on secretion from mast cells and neutrophils. *Arzneimittelforschung*. v. 31, p. 433-437, 1981.
116. FROSTAD, A. B. The treatment of seasonal allergic rhinitis with a 2% aqueous solution of sodium cromoglycate delivered by a metered dose nasal spray. *Clin. Allergy*. v. 7, p. 347-353, 1977.
117. STEERENBERG, P. A. et. al. Protection of UV-induced suppression of skin contact hypersensitivity: a common feature of flavonoids after oral administration. *Photochem Photobiol*. v. 67, 456-461, 1998.
118. MIDDLETON, E. et. al. The flavonoids: a brief review and study of effects on antigen-induced histamine release from human basophils. *Trans Am Clin Climatol Assoc*. v. 92, p. 234-235, 1980.
119. MIDDLETON, E; Jr. DRZEWIECKI, G; KRISHNARAO, D. Quercetin: an inhibitor of antigen-induced human basophilic histamine release. *Journal of Immunology*. v. 127, p. 546-550.
120. MIDDLETON, E; Jr. DRZEWIECKI, G. Effects of flavonoids and transitional metal cations on antigen-induced histamine release from human basophiles. *Biochemical Pharmacol*. v. 31, p. 1449-1453, 1982.
121. CHEONG, H. et. al. Studies of structure activity relationship of flavonoids for the anti-allergic actions. *Arch Pharmacol*. v. 21, p. 478-481, 1998.
122. ILEK, B; FISCHER, H. Flavonoids stimulate chloride ion conductance o human airway epithelium in vitro and in vivo. *American Journal of Physiological*. v. 275, p. L902-L910, 1998.
123. LIMA, L. M. Química medicinal moderna: desafios e contribuição brasileira. *Química Nova*. v. 30, n. 6, p. 1456-1468, 2007.
124. BURGER, A. Medicinal chemistry. 3 ed. v. 1. Wiley-Interscience: Michigan, 1970.
125. GARETH, T. Química medicinal: uma introdução. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.
126. VIEGAS Jr, C; BOLZANI, V. S. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Química Nova*. v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.
127. MONTANARI, C. A. A química medicinal na próxima década. *Química Nova*. v. 23, n. 1, p. 134-137, 2000.
128. CARVALHO, I. et. al. Introdução a modelagem molecular de fármacos no

- curso experimental de química farmacêutica. Química Nova. v. 26, n. 3, p. 428-438, 2003.
129. YUNES, R. A; CECHINEL, F. V. Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. 1 ed. Editora Argos: Chapecó, 2001.
  130. MARDER, M. et. al. Molecular modeling and QSAR analysis of the interaction of flavone derivatives with the benzodiazepine binding site of the GABA<sub>A</sub> receptor complex. Bioorganic & Medicinal Chemistry. v. 9. p. 323-335, 2001.
  131. EISBERG, R; RESNICK, R. Física quântica. 26. reimpressão. Rio de Janeiro: Elsevier, 1979.
  132. HOLLAUER, E. Química quântica. Rio de Janeiro: LTC, 2008.
  133. LEACH, A. R. Molecular modelling: principles and applications. 2 ed. British: Prentice Hall, 2001.
  134. MORGON, N. H; COUTINHO, K. Métodos de química teórica e modelagem molecular. São Paulo: Editora Livraria da Física, 2007.
  135. COHEN, N. C. Guidebook on molecular modeling in drug design. San Diego: Academic Press, 1995.
  136. ROOHTAAN, C. C. J. New Developments in Molecular Orbital Theory. Reviews of Modern Physics, v.23, n.2, p.69-89, 1951.
  137. COMAR, JR. M. Geração de conjuntos de base gaussianos contraídos e polarizados para átomos da primeira fila da tabela periódica para aplicação em cálculos *ab initio* de propriedades atômicas e moleculares. 2005. 86 f. Tese (Doutorado em Ciências – Físico-Química). Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos: USP.
  138. VOISIN, C; CARTIER, A; RIVAIL, J. L. Computation of accurate electronic molecular polarizabilities. Physical Chemistry, v. 96, n. 20, p. 7966-7971, 1992.
  139. DAVIDSON, E. R; FELLER, D. Basis set selection for molecular calculations. Chemical Review, v. 86, p. 661-696, 1988.
  140. DE CASTRO, E. V. R; JORGE, F. E. Adapted gaussian basis sets for atoms Li through Xe generated with the generator coordinated Hartree-Fock method. Anais Academia Brasileira de Ciências, v. 73, n. 4, p.511-517, 2001.
  141. LEVINE, I. N. Quantum Chemistry. 4. ed. New Jersey: Prentice Hall, 1991.
  142. CANUTO, S.; VIANNA, J. D.; FAZZIO, A. Teoria quântica de moléculas e sólidos: simulação computacional. São Paulo: Livraria da Física, 2004.
  143. SZABO, A; OSTLUND, N.S. Modern Quantum Chemistry: Introduction to Structure Theory. Dover: New York, 1996.

144. CUSTODIO, R. & MORGON, N. H. Tópicos de química quântica. Disponível em: <<http://www.chemkeys.com>>. Acesso em: 28/10/2006.
145. CUSTODIO, R. & MORGON, N. H. Funções de base: o ajuste variacional. Disponível em: <<http://www.chemkeys.com>>. Acesso em: 28/10/2006.
146. BARRETO, M. T. et al. Accurate Gaussian Basis Sets for the Ground State of the CS Molecule. *Brazilian Journal of Physics*, v. 35, n. 4A, p. 965-970, 2005.
147. NETO, A. C. et al. Gaussian basis sets for correlated wave functions. Hydrogen, helium, first- and second-row atoms. *Theochem*, v. 718, p. 219–224, 2005.
148. BOYS, S. F. Electronic Wave Functions .1. A General Method of Calculation for the Stationary States of Any Molecular System. *Proceedings of the Royal Society of London Series a-Mathematical and Physical Sciences*, v. 200, n. 1063, p. 542-554, 1950.
149. SHAVITT, I; KARPLUS, M. Multicenter integrals in molecular quantum mechanics. *Chemical Physics*, v. 36, n. 2, p. 550-&, 1962.
150. SHAVITT, I; KARPLUS, M. Gaussian transform method for molecular integrals. I. formulation for energy integrals. *Chemical Physics*, v. 43, n. 2, p. 398-&, 1965.
151. RAMACHANDRAN, K. I; DEEPA, G; NAMBOORI, K. *Computational chemistry and molecular modeling: principles and applications*. Berlin: Springer, 2008.
152. CRAMER, C. J. *Essentials of computational chemistry: theories and models*. 2. ed. British: John Wiley & Sons, 1961.
153. MORGON, N. H; CUSTODIO, Rogério. Teoria do funcional de densidade. *Química Nova*. v. 18, n. 1, 1995.
154. PLIEGO JR. J. R. Modelos contínuo do solvente: fundamentos. *Química Nova*. v. 29, n. 3, p. 535-542, 2006.
155. BÖES, E. S. Estudo teórico da solvatação de ânions em solventes orgânicos. 2005. 112 f. (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
156. OLIVEIRA, G. S. de. Caracterização espectroscópica e por modelagem mecânico-quântica, de compostos dcom potencial aplicação em dispositivos ópticos não-lineares. 2009. 126f. (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais.
157. MENNUCCI, B; CANCÈS, E; TOMASI, J. Evaluation of solvent effects in isotropic and anisotropic dielectrics and in ionic solutions with a unified integral equation method: theoretical bases, computational implementation, and numerical

- application. Journal of Physics Chemical B. v. 101, n. 49, p. 10506-10517, 1997.
158. CANCÈS, E; MENNUCCI, B; TOMASI, J. A new integral equation formalism for the polarizable continuum model: Theoretical background and applications to isotropic and anisotropic dielectrics. Journal of Physics Chemical v. 107, n. 8, p. 3032-3041, 1997.
159. WEBER, K. C. et. al. Selection of quantum chemical descriptors by chemometric methods in the study of antioxidant activity of flavonoid compound. International Journal of Quantum Chemistry. v. 103, p. 731-737, 2005.
160. MUTIHAC, L; MUTIHAC, R. Mining in chemometrics. Analytica Chimica Acta. n. 612, p. 1-18, 2008.
161. Hyper 7.5. Hypercube Inc. Gainesville (EUA). 2002.
162. G.W. TRUCKS, H.B. SCHLEGEL, G.E. SCUSERIA, M.A. ROBB, J.R. CHEESEMAN, V.G. H, J.M. MILLAM, A.D.. BARONE, M. COSSI, R. CAMMI, B. TERSSON, P.Y. AYALA, Q. CUI, ACHARI, J.B. FORESMAN, J. CIOSLOWSKI, J.V. ORTIZ, A.G. BABOUL, B.B. STEFANOV, G. LIU, A., M.A. AL-. ANDRES, C. GONZALEZ, M. HEAD-GORDON, E.S. REPLOGLE, J.A. POPLE, GAUSSIAN M.J. FRISCH ZAKRZEWSKI, J.A. MONTGOMERY JR., R.E. STRATMANN, J.C. BURANT, S. DAPPRIC DANIELS, K.N. KUDIN, M.C. STRAIN, O. FARKAS, J. TOMASI, V MENNUCCI, C. POMELLI, C. ADAMO, S. CLIFFORD, J. OCHTERSKI, G.A. PEK. MOROKUMA, N. REGA, P. SALVADOR, J.J. DANNENBERG, D.K. MALICK, A.D. RABUCK, K. RAGHAV LIASHENKO, P. PISKORZ, I. KOMAROMI, R. GOMPERTS, R.L. MARTIN, .J. FOX, T. KEITH LAHAM, C.Y. PENG, A. NANAYAKKARA, M. HALLACOMBE, P.M.W. GILL, B. JOHNSON, W. CHEN, M.W. WONG, J.L 98, REVISION A.11.4, GAUSSIAN, INC.: PITTSBURGH PA, 2002.
163. GAMESS. Journal Computacional Chemistry. v. 14, p. 1347-1363, 1993.
164. VILLAR, J. A. F. P. et. al. Synthesis and evaluation of nitrostyrene derivative compounds, new snake venom phospholipase A<sub>2</sub> inhibitors. Toxicon. v. 51, p. 1467-1478, 2008.
165. da SILVA, S. L. et. al. Molecular modeling of the inhibition of enzyme PLA<sub>2</sub> from snake venom by dipyrone and 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone. International Journal of Quantum Chemistry. v. 108, n. 13, p. 2576-2585, 2008.
166. ANDRIÃO-ESCARSO, S. H. et al. Myotoxic phospholipase A<sub>2</sub> in Bothrops snake venoms: Effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from *Bothrops jararacussu*. Biochimie. v. 82, p. 755-763, 2000.
167. ANDRIÃO-ESCARSO, S. H. et al. Structural and functional characterization of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops jararacussu* snake venom. Biochem. Pharmacol. v. 64, p. 723-732, 2002.
168. VEBER, C. L. Elaboração de uma biblioteca de hidroxichalconas e

- hidroxiflavonas para estudos de inibição da fosfolipase A<sub>2</sub>. 2008. 86 f. Dissertação (Mestrado em Química – Química Orgânica). Instituto de Química da Universidade de Federal do Paraná, Curitiba: UFPR.
169. SOARES, A. M. et al. Structural and functional characterization of myotoxin I, a Lys49 phospholipase A<sub>2</sub> homologue from *Bothrops moojeni* (Caissaca) snake venom. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. v. 373, p. 7-15, 2000.
170. SOUZA, A. D. L. et al. Koninginins, phospholipase A<sub>2</sub> inhibitors from endophytic fungus *Trichoderma koningii*. *Toxicon*. v. 51, n. 2, p. 240-250, 2008.
171. PIROUETTE. Multivariate Data Analysis from IBM PC Systems. Version 2.0. Infometrix. Seattle, WA.
172. BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. Química Medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos. Porto Alegre: Artmed Ed. Ltda, 2001.
173. ALLINGER, N. L. Química Orgânica. 2. ed. Rio de Janeiro: LTC, 1976.
174. ARROIO, A; HONÓRIO, K. M; DA SILVA, A. B. F. Propriedades químico quânticas empregadas em estudos das relações estrutura-atividade. *Química Nova*. v. 33, n. 3, p. 694-699, 2010.
175. JUNIOR, L. V. et al. Reatividade em reações diels-alder: uma prática computacional. *Química Nova*. v. 30, n. 3, p. 727-730, 2007.
176. MONTANARI, M. L. C; MONTANARI, C. A; GAUDIO, A. C. Validação lateral em relações quantitativas entre estrutura e atividade farmacológica, QSAR. *Química Nova*. v. 25, n. 2, p. 231-240, 2002.
177. FERREIRA, M. M. C; MONTANARI, C. A; GAUDIO, A. C. Seleção de variáveis em QSAR. *Química Nova*. v. 25, n. 3, p. 439-448, 2002.