

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE QUÍMICA

CURSO DE LICENCIATURA EM QUÍMICA

HELLEN JÉSSICA FLÁVIO CONEJO

**SÍNTESE E ESTUDO *IN SILICO* DE DERIVADOS DE NAPROXENO
COM POTENCIAL ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CAMPO MOURÃO

2016

HELLEN JÉSSICA FLÁVIO CONEJO

**SÍNTESE E ESTUDO *IN SILICO* DE DERIVADOS DE NAPROXENO
COM POTENCIAL ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso 2 (TCC2), do Curso de Licenciatura em Química do Departamento Acadêmico de Química – DAQUI – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, como requisito parcial para obtenção do título de Licenciado em Química.

Orientador: Prof. Msc. Adriano Lopes Romero

CAMPO MOURÃO

2016



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
Câmpus Campo Mourão
Diretoria de Graduação e Educação Profissional
Departamento Acadêmico de Química - DAQUI
Curso de Licenciatura em Química



TERMO DE APROVAÇÃO

SÍNTESE E ESTUDO *IN SILICO* DE DERIVADOS DE NAPROXENO COM POTENCIAL ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

por

HELLEN JÉSSICA FLÁVIO CONEJO

Este trabalho foi apresentado em 30 de junho de 2016 como requisito parcial para a obtenção do título de Licenciada em Química. A Candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação a Banca Examinadora considerou o trabalho APROVADO.

Prof.^a. Dr.^a. Rafaelle Bonzanini Romero
(UTFPR)

Prof.^a. Dr.^a. Daniela Aline Barancelli
(UTFPR)

Prof. Msc. Adriano Lopes Romero
(UTFPR)
Orientador

À minha mãe (in memoriam), com todo meu amor e gratidão, por tudo que me ensinou. À toda minha família, pelo apoio durante essa trajetória. Aos amigos que durante esse percurso se tornaram família e deixaram esses anos de luta mais alegres. À Deus por ter me proporcionado essa conquista. A todos que contribuíram para a realização desse trabalho e da minha formação.

AGRADECIMENTOS

À Deus por me proporcionar essa vitória.

À minha família por estar sempre me apoiando e por estar ao meu lado nos momentos mais difíceis.

Ao professor Adriano pela orientação e paciência, pela dedicação e comprometimento ao curso e aos alunos.

Aos professores Rafaele e Adriano pelas contribuições que foram além de minha formação acadêmica, mas também em minha formação pessoal.

Aos amigos que alegraram os meus dias na universidade e me deram força para continuar: Letícia, João, Karin, Leandro, Larissa, Mirele, Andressa, Júlia, Tiago, Manoel, Helaine, Thays e todos que fizeram parte dessa jornada.

Às professoras da banca Daniela e Rafaele pela contribuição em meu trabalho e em minha formação.

A todos os professores com quem tive o privilégio de aprender ao longo de todo o percurso acadêmico.

"Por mais árdua que seja a luta, por mais distante que um ideal se apresente, por mais difícil que seja a caminhada, existe sempre uma maneira de vencer: A Nossa Fé."

RESUMO

CONEJO, Hellen Jéssica Flávio. Síntese e estudo *in silico* de derivados de naproxeno com potencial atividade anti-inflamatória. 2016. 69 f. Completion of Course Work (in Chemistry) – Departamento de Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2016.

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) estão entre os medicamentos mais utilizados dentre os agentes terapêuticos. Entretanto resultados de estudos clínicos indicam que os efeitos adversos causados por esses medicamentos incluem aumento do risco de hemorragia gastrointestinal, dispepsia, úlcera péptica, disfunção e falência renal, inibição da agregação plaquetária e aumento do tempo de sangramento, alterações dos testes de função renal dentre outros. Desse modo o presente trabalho busca contribuir com pesquisas visando minimizar os efeitos adversos causados pelos AINEs. Para isso realizou síntese de ésteres derivados de naproxeno e avaliou *in silico* a potencial atividade anti-inflamatória desses compostos. Foram sintetizados quatro compostos: o naproxenato de timila, carvacrila, eugenila e vanilinila. No estudo *in silico* foram avaliadas as propriedades ADMET a fim de analisar a biodisponibilidade dos compostos candidatos a fármaco, bem como o estudo de ancoragem molecular com as enzimas COX-1 e COX-2. Através da avaliação na ferramenta admetSar, Osiris e Molinspiration é possível complementar que os compostos derivados avaliados apresentam boa disponibilidade oral, não apresentam toxicidade comparado ao precursor da derivação, não são carcinogênicos, porém uma desvantagem é que alguns dos compostos apresentam maior promiscuidade em relação a inibição de algumas enzimas do citocromo P 450, o que pode acarretar menor eficiência do fármaco. No estudo de ancoragem molecular foi observado que os compostos apresentam maiores valores de energia de interação com a enzima COX-2 do que com a enzima COX-1. Os compostos avaliados interagem com as duas isoformas de COX, porém apresentam interações mais favoráveis tanto em energia quanto em localização com a enzima COX-2. A síntese dos derivados de naproxeno foi realizada e os compostos naproxenato de timila, e eugenila sintetizados foram caracterizados por RMN de ^1H e de ^{13}C apresentando descolamentos químicos coerentes com os dados da literatura.

Palavras chaves: anti-inflamatórios, cicloxigenase, derivados de naproxeno.

ABSTRACT

CONEJO, Hellen Jéssica Flávio. Synthesis and in silico study of naproxen derivatives with anti-inflammatory activity potential. 2016. 69 f. TCC (Curso de Licenciatura em Química) – Chemistry Department, Federal University of Technology - Paraná. Campo Mourão, 2016.

Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are among the drugs most commonly used among therapeutic agents. However results of clinical studies indicate that adverse effects caused by these drugs include increased risk of gastrointestinal bleeding, dyspepsia, peptic ulcer disease, and renal failure, platelet aggregation inhibition and increase of bleeding time, changes in renal function tests among others. Thus the present work seeks to contribute to research aimed at minimizing the adverse effects caused by NSAIDs. For this held synthesis of derivatives of naproxen esters and evaluated in silico anti-inflammatory potential activity of these compounds. four compounds were synthesized: the naproxenato of Timila, carvacrila, eugenila and vanilinila. In silico study in the ADMET properties were evaluated to examine the bioavailability of the drug candidate compounds, as well as the study of molecular docking with the COX-1 and COX-2 enzymes. By evaluating the admetSar tool, Osiris and Molinspiration is possible to supplement the compounds evaluated derivatives exhibit good oral availability, have no toxicity compared to precursor tap, they are not carcinogenic, but a disadvantage is that some of the compounds show higher promiscuity in relation to inhibition of some enzymes of the cytochrome P 450, which may result in lower efficiency of fármaco.No molecular docking study demonstrated that the compounds exhibit higher interaction energy values with the COX-2 enzyme than the COX-1 enzyme. The evaluated compounds interact with both isoforms of COX, but exhibit favorable interactions both in energy and in location to the COX-2 enzyme. The synthesis of naproxen derivatives was performed and the naproxenato compounds Timila and eugenila synthesized were characterized by ^1H and ^{13}C NMR chemical debonding having consistent with literature data.

Key words: anti-inflammatory drugs, cyclooxygenase, naproxen derivatives.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Neutrófilos: Quimiotaxia, diapedese e fagocitose.....	7
Figura 2 - Estrutura da enzima cicloxigenase 1 (PDB 1EQG).....	9
Figura 3 - Ecosanoides produzidos pela via da cicloxigenase.....	9
Figura 4 - Representação esquemática dos efeitos relacionados à ativação das cicloxigenases (COX-1) e (COX-2).....	10
Figura 5 - Estrutura molecular do cortisol.....	12
Figura 6 - Modelo chave-fechadura e o reconhecimento do ligante com o receptor	13
Figura 7 - Estrutura molecular do (S)-naproxeno.....	16
Figura 8 - Interação do Naproxeno ao sítio ativo da enzima cicloxigenase.....	17
Figura 9 - Estrutura molecular do (A) Timol e (B) Carvacrol.....	18
Figura 10 - Estrutura molecular do (A) Eugenol (B) Vanilina.....	19
Figura 11 - Estrutura molecular dos ésteres de Naproxeno com (A) Timol, (B) Carvacrol, (C) Eugenol e (D) Vanilina.....	21
Figura 12 - Representação molecular dos fragmentos que causam os efeitos tóxicos nos compostos derivados calculados pela ferramenta Osiris.....	29
Figura 13 - Estrutura tridimensional da enzima COX-1 PDB 1EQG com destaque para o sítio ativo.....	35
Figura 14 - (a) Representação das interações dos derivados avaliados com a enzima COX-1 PDB 1EQG obtidas no estudo de ancoragem molecular realizado na ferramenta iGEMDOCK e (b) agrupamento hierárquico do perfil de interação dos ligantes.....	36
Figura 15 - (a) Representação das interações dos derivados avaliados com a enzima COX-1 PDB 1EQH obtidas no estudo de ancoragem molecular realizado na ferramenta iGEMDOCK e (b) agrupamento hierárquico do perfil de interação dos ligantes.....	37
Figura 16 - (a) Representação das interações dos derivados avaliados com a enzima COX-2 PDB 3NT1 obtidas no estudo de ancoragem molecular realizado na ferramenta iGEMDOCK e (b) agrupamento hierárquico do perfil de interação dos ligantes.....	38
Figura 17 - (a) Representação das interações dos derivados avaliados com a enzima COX-2 PDB 3Q7D obtidas no estudo de ancoragem molecular realizado na ferramenta iGEMDOCK e (b) agrupamento hierárquico do perfil de interação dos ligantes.....	39
Figura 18 - (a) Representação das interações dos derivados avaliados com a enzima COX-2 PDB 3NTB obtidas no estudo de ancoragem molecular realizado na ferramenta iGEMDOCK e (b) agrupamento hierárquico do perfil de interação dos ligantes.....	40

Figura 19 - Representação genérica para a reação síntese dos ésteres a partir do naproxeno.....	43
Figura 20- Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) do naproxeno.....	48
Figura 21 - Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75,5 MHz) do naproxeno.....	49
Figura 22 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) do naproxenato de timila.....	49
Figura 23 - Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75,5 MHz) do naproxenato de timila..	50
Figura 24 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) do naproxenato de Carvacrila.....	50
Figura 25 - Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75,5 MHz) do naproxenato de Carvacrila.....	51
Figura 26 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) do naproxenato de Eugenila.....	51
Figura 27 - Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75,5 MHz) do naproxenato de Eugenila.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características das enzimas HIV-1 TP e HIV-1 PT utilizadas neste trabalho.....	24
Tabela 2 – Propriedades moleculares dos compostos derivados de naproxeno calculadas no software Molinspiration.....	26
Tabela 3 – Predição de bioatividades, calculadas no software Molinspiration, para os compostos derivados de naproxeno.....	28
Tabela 4 - Predição de toxicidade, determinadas no software Osiris, para os naproxenatos 7-10.....	29
Tabela 5 - Propriedades ADMET, calculadas no software admetSAR, para o naproxeno (2) e os naproxenatos 7-10.....	31
Tabela 6 - Energias, em kcal.mol ⁻¹ , obtidas do estudo de ancoragem molecular, no software iGEMDOCK para a enzima cicloxigenase 1 (PDB 1EQG e PDB 1EQH).....	34
Tabela 7 - Energias, em kcal.mol ⁻¹ , obtidas do estudo de ancoragem molecular, no software iGEMDOCK para a enzima cicloxigenase 2 (PDB 3NT1 e PDB 3NTB).....	34
TABELA 8 – Deslocamentos químicos de ¹³ C e de ¹ H do naproxeno e dos naproxenatos de timila e de eugenila.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS

ADMET	Administração, Distribuição, Metabolização, Excreção e Toxicidade
AINEs	Anti-inflamatórios não esteróides
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
COX	Cicloxygenase
CYP450	Citocromo P 450
DCC	<i>N,N</i> -dícicloexilcarbodiimida
DL₅₀	Dose Letal Mediana
DMAP	<i>N,N</i> -4-dimetilaminopiridina
I	Inibe
LH	Ligação de Hidrogênio
(M)	Cadeia principal
miLogP	Coeficiente de Partição Octanol/Água
MM	Massa Molar
nALH	Número de Aceptores de Ligação de Hidrogênio
NC	Não carcinogênico
nDLH	Número de Doadores de Ligação de
NI	Não inibe
nrotb	Número de bandas rotáveis
NT	Não tóxico
PDB	Banco de dados de proteínas
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
(S)	Cadeia lateral
S	Substrato
TPSA	Área Superficial Topológica Polar
VDW	Interações de van der Waals

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	3
2 REVISÃO TEÓRICA	5
2.1 PROCESSO INFLAMATÓRIO	5
2.1.1 Eicoisanoides.....	8
2.1.2 Via da cicloxigenase.....	8
2.2 ANTI-INFLAMATÓRIOS.....	11
2.2.1 Anti-inflamatórios esteroidais.....	12
2.2.2 Anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs).....	13
2.2.2.1 Inibidores não seletivos da COX.....	14
2.2.2.2 Inibidores seletivos da COX-2.....	14
2.2.3 Efeitos adversos	15
2.2.3.1 Efeitos Gastrointestinais	15
2.2.3.2 Efeitos Renais	15
2.2.3.3 Efeitos Cardiovasculares	16
2.2.4 Naproxeno	16
2.3 PRODUTOS NATURAIS	18
2.3.1 Timol e Carvacrol.....	19
2.3.2 Eugenol e Vanilina.....	20
3 OBJETIVO	21
3.1 OBJETIVO GERAL.....	21
3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	21
4 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	22
4.1 ESTUDO <i>IN SILICO</i>	22
4.2 SÍNTESE DOS ÉSTERES DERIVADOS DO NAPROXENO.....	24
5 RESULTADOS	26
5.1 ESTUDOS <i>IN SILICO</i>	26
5.1.1 Molinspiration.....	26
5.1.2 Osiris.....	28
5.1.3 AdmetSar.....	30
5.1.4 Docking Molecular.....	34
5.2 SÍNTESE DOS ÉSTERES DERIVADOS DO NAPROXENO.....	42
5.3 CARACTERIZAÇÃO POR RMN.....	46
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	53
REFERÊNCIAS	54

1 INTRODUÇÃO

Os anti-inflamatórios não esteróides (AINEs), tal como o naproxeno, constituem uma das classes de fármacos mais prescritos em todo o mundo. Essa vasta classe de fármacos atuam como inibidores de prostaglandinas endoperóxido sintase, também conhecida como cicloxigenases 1 (COX-1) e/ou 2 (COX-2). Os AINEs podem ser seletivos quando inibem apenas a cicloxigenase COX-2, sendo designados como COXIBEs, ou não seletivos quando inibem as cicloxigenases COX-1 e COX-2.

A segurança do uso dos anti-inflamatórios não esteróides tem sido questionada nos últimos anos, devido a inúmeros efeitos adversos e estudos clínicos (BATLOUNI, 2009). Dentre os efeitos adversos mais decorrentes estão os problemas gastrointestinais, renais e cardiovasculares (BATLOUNI, 2009).

Os AINEs tradicionais, como o naproxeno, são utilizados no tratamento de doença que tem por base uma resposta inflamatória e atua na inibição das cicloxigenases. Por ser um AINE não seletivo inibem as cicloxigenases (COX-1) e 2 (COX-2), porém são inibidores mais ativos da COX-1.

Todavia os efeitos adversos decorrente do uso prolongado representam um grande problema clínico (PELLETIER, 2003 apud REGO, 2012).

A COX-1 é essencial para a manutenção do estado fisiológico normal de muitos tecidos. A prostaglandina (PG)_{H2}, produzida por esta cicloxigenase a partir do ácido araquidônico, é responsável pela formação de mucos citoprotetores no estômago, que protege a parede gástrica do ácido clorídrico. Portanto a inibição desta cicloxigenase pode ocasionar sangramento gastrintestinal ou perfuração, úlceras pépticas e complicações renais.

A preocupação é maior no caso de anti-inflamatórios inibidores seletivos da COX-2, pois a inibição desta isoenzima aumenta a probabilidade de eventos trombóticos como infarto do miocárdio, acidente vascular encefálico ou tromboembolismo pulmonar (BATLOUNI, 2009).

Diversos estudos vêm sendo realizados com produtos naturais como timol, carvacrol, eugenol e vanilina por apresentarem ação farmacológica condizente para o tratamento de condições dolorosas e inflamação (ALMEIDA, 2015). Segundo dados da literatura o eugenol, por exemplo, apresenta atividade anti-inflamatória,

inibição do edema, e atividade eficaz na proteção gástrica (FRANÇA, 2012). Esses compostos apresentam grupos hidroxilas que podem se ligar ao naproxeno formando ésteres, que espera-se que mantenham afinidade com a enzima cicloxigenase, podendo atuar como substrato competitivo ao sítio ativo da enzima.

Neste cenário o estudo utilizando ferramentas computacionais (*in silico*) tem contribuído para direcionar o estudo de novos compostos farmacologicamente ativos, diminuindo o tempo e reduzindo os custos envolvidos no processo. A partir do uso destas ferramentas é possível, por exemplo, determinar o perfil de biodisponibilidade oral, alguns efeitos toxicológicos, assim como o efeito farmacológico (farmacologia *in silico*).

Visando contribuir para a atenuação de efeitos adversos causados pelos AINEs, este trabalho buscou realizar a síntese e avaliar *in silico* o potencial anti-inflamatório de naproxenatos derivados de produtos naturais, que espera-se que possuam efeito sinérgico, que resultem na diminuição da dose terapêutica e dos efeitos indesejáveis quando comparado ao anti-inflamatório comercial.

2 REVISÃO TEÓRICA

2.1 PROCESSO INFLAMATÓRIO

Em 1794 surgiu a primeira referência na literatura sobre o papel da inflamação, publicação do livro de John Hunter, médico do hospital São Bartolomeu em Londres, que afirmava que a inflamação não deveria ser considerada uma enfermidade, mas sim uma condição benéfica do organismo em resposta a lesões celulares ou padecimento (SZABÓ, 2006).

No século XIX ocorreram novos avanços com os patologistas alemães Virchow, Conheim, Arnold, Ziegler e com o naturalista russo Metchnikoff. Nessa mesma época Paul Ehrlich e Metchnikoff dividiram o prêmio Nobel de medicina em 1906 com a teoria da resposta imune (SZABÓ, 2006).

Atualmente, é aceito que o processo inflamatório é uma reação de defesa do organismo perante a exposição a estímulos prejudiciais, como por exemplo, microorganismos, queimaduras, trauma físico ou células tumorais (DEJANA, 1995). Os cinco sinais cardinais da inflamação são: calor, rubor, tumor, perda de função e dor (REGO, 2013).

Quando há uma lesão tecidual ocorre vasoconstrição reflexa para evitar perda de sangue, em seguida os mastócitos liberam histamina, que é um potente vasodilatador. A vasodilatação é responsável pelo calor, rubor e tumor, pois aumenta o fluxo de sangue no local. Com o aumento do fluxo sanguíneo ocorre aumento da temperatura, vermelhidão e edema no local da inflamação (PUNCHARD, 2004).

A sensação de calor é causada pelo movimento de sangue através dos vasos dilatados resultando no aumento da vermelhidão devido ao aumento do número de eritrócitos que passam através da área.

O inchaço ou edema é o resultado do aumento da passagem de fluido de dilatação dos vasos sanguíneos e permeável para os tecidos circundantes, infiltração de células na área danificada, e em respostas inflamatórias a deposição prolongada de tecido conjuntivo (PUNCHARD, 2004).

A dor é devido aos efeitos diretos de mediadores, de dano inicial ou resulta da resposta inflamatória, e o alongamento dos nervos sensoriais devido ao edema. A perda da função refere-se a uma simples perda de mobilidade em qualquer articulação, devido ao edema e dor, ou a substituição de células funcionais com tecido da cicatriz (PUNCHARD, 2004).

Uma das consequências do processo inflamatório é o aumento de temperatura local. Este aumento pode causar desnaturação de proteínas estruturais e enzimáticas. Quando isso ocorre, as proteínas perdem sua função biológica (REGO, 2013 apud TORTORA & DERRICKSON, 2009).

A inflamação pode ser aguda ou crônica. A inflamação aguda é de curta duração, dependendo do estímulo responsável. Suas características principais são exsudação de fluidos e proteínas do plasma e emigração de leucócitos (SZABÓ, 2006).

Para que haja uma inflamação é preciso de um estímulo causal, tal como, infecção por vírus, bactérias dentre outros: trauma mecânico; temperatura; agentes químicos; radiação; auto-imune; isquemia e necrose (CALDER, 2004).

No processo inflamatório existe uma grande quantidade de substâncias sendo liberadas, que possuem um papel fundamental durante o processo. Dentre essas substâncias uma das mais importantes são as prostaglandinas que são responsáveis pela manutenção de algumas funções fisiológicas, porém elas não estão presentes apenas quando existe um processo inflamatório.

A resposta inflamatória ocorre quando há uma concentração das células de defesa do sistema imunológico, no local lesado (CALDER, 2004). O sistema imunológico consiste em células, órgãos e tecidos que atuam na defesa do organismo contra invasores externos. Quando isso ocorre há uma vasodilatação e aumento da permeabilidade das células. O sistema imune tem a função de proteger o hospedeiro contra agentes infecciosos e patogênicos além de desempenhar um importante papel na identificação e eliminação de células tumorais (CALDER, 2004).

Os neutrófilos são células circulantes na corrente sanguínea que desempenham um papel importante respondendo rapidamente ao estímulo quimiotático, constituindo também principal população celular da resposta inflamatória (MARTINS, 2010). A entrada dos neutrófilos no local da inflamação envolve uma sequência de eventos (ativação, rolamento, adesão e transmigração),

impulsionada por moléculas de adesão expressas na superfície das células endoteliais e dos neutrófilos (Figura 1) (MARTINS, 2010).

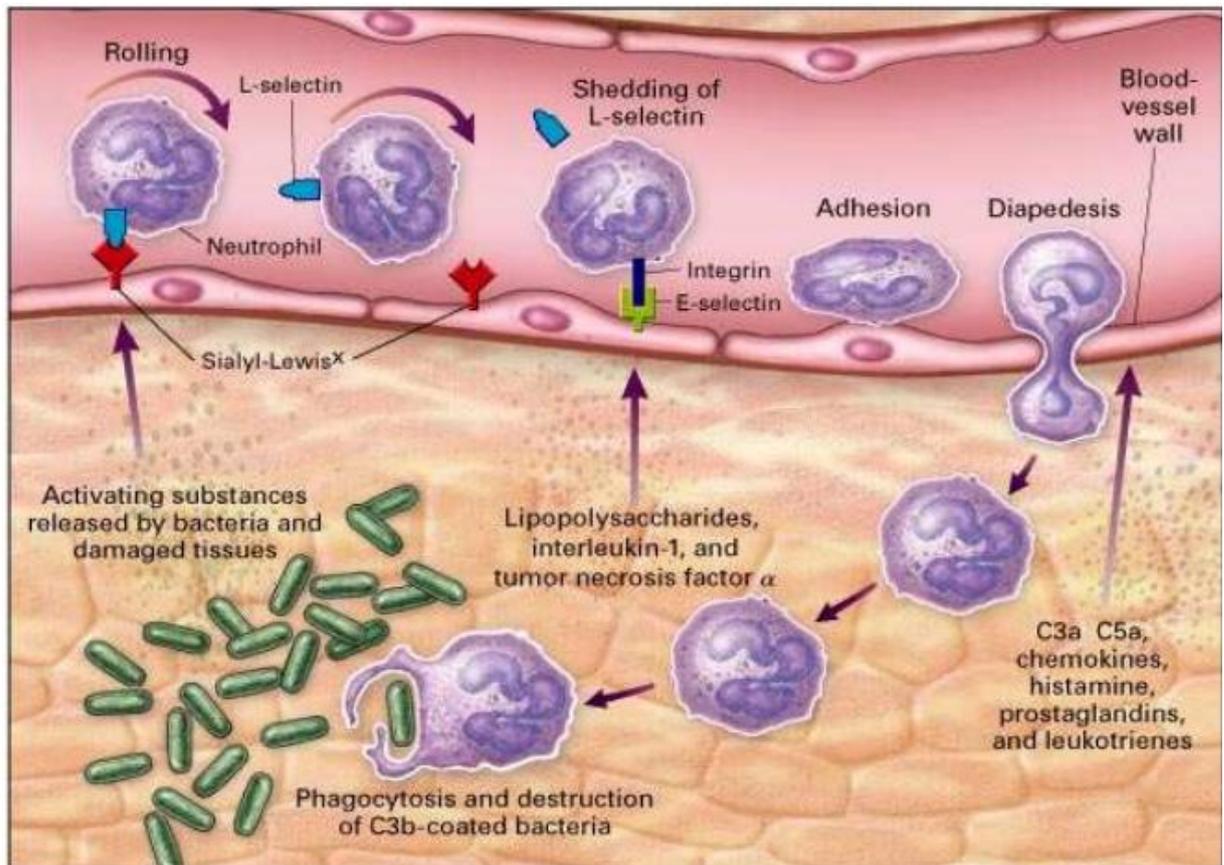


Figura 1 - Neutrófilos: Quimiotaxia, diapedese e fagocitose.

Fonte: Martins (2010).

A vasodilatação ocasiona afastamento das células endoteliais que expressam proteínas, atraindo os neutrófilos, que saem da corrente sanguínea e entram por diapedese para dentro do tecido lesado.

O início do rolamento dos neutrófilos é mediado pela ligação reversível das glicoproteínas selectinas encontradas tanto no neutrófilo como no endotélio (MARTINS, 2010 apud SPERTINI & KADONO, 2002). Em seguida ocorre a expressão de outras glicoproteínas na superfície dos leucócitos, designadas de integrinas, que reconhecem moléculas de adesão endoteliais (família das imunoglobulinas), havendo forte interação dos leucócitos ao endotélio (MICHELI, 2009).

Entre as células endoteliais ocorre diapedese, que é a passagem dos neutrófilos para dentro do tecido lesado para fazer fagocitose (DITTMAR, 2000).

2.1.1 Eicosanóides

A resposta inflamatória é condicionada por diversos mediadores químicos com funções específicas em cada fase da reação inflamatória (REGO, 2012). Esses mediadores podem ser exógenos (quando advém de agentes bacterianos ou químicos) ou endógenos (REGO, 2012). Os mediadores químicos endógenos do sangue, células inflamatórias e tecido lesado participam de maneira ativa no processo inflamatório. Esses mediadores podem ser aminas vasoativas (histamina e serotonina), bradicinina, enzimas lisossomais, radicais livres, o fator ativador de plaquetas (PAF) e eicosanóides (prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos). Eles podem ser pré-formados ou sintetizados nas células em resposta a um estímulo (REGO, 2012).

Os eicosanóides são mediadores inflamatórios sintetizados a partir de ácidos graxos como o ácido araquidônico (REGO, 2012). A biossíntese dos eicosanoides depende da disponibilidade do ácido araquidônico, que pode ser metabolizado enzimaticamente por duas vias principais: cicloxigenases (COX) e lipoxigenases (LOX).

2.1.2 Via da cicloxigenase (COX)

A prostaglandina endoperoxido sintase, também designada como cicloxigenase ou COX (Figura 2), desempenha duas atividades catalíticas distintas, a de cicloxigenase que oxida o ácido araquidônico e sintetiza diversas prostaglandinas, e de peroxidase que reduz as prostaglandinas PGH_2 (REGO, 2012).

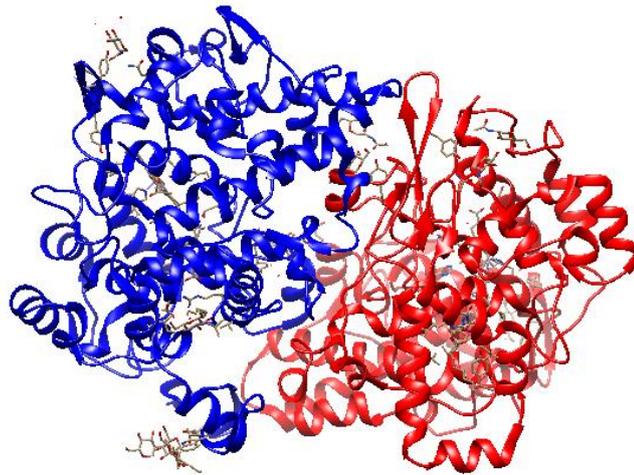


Figura 2 - Estrutura da enzima cicloxigenase 1 (PDB 1EQG).

Fonte: Autoria própria.

Posteriormente a prostaglandina (PGH_2) é transformada em eicosanoides incluindo as prostaglandinas (D_2 , E_2 e $\text{F}_{2\alpha}$), prostaciclina (PGI_2) e tromboxano A_2 (Figura 3) (CHARLIER, 2003).

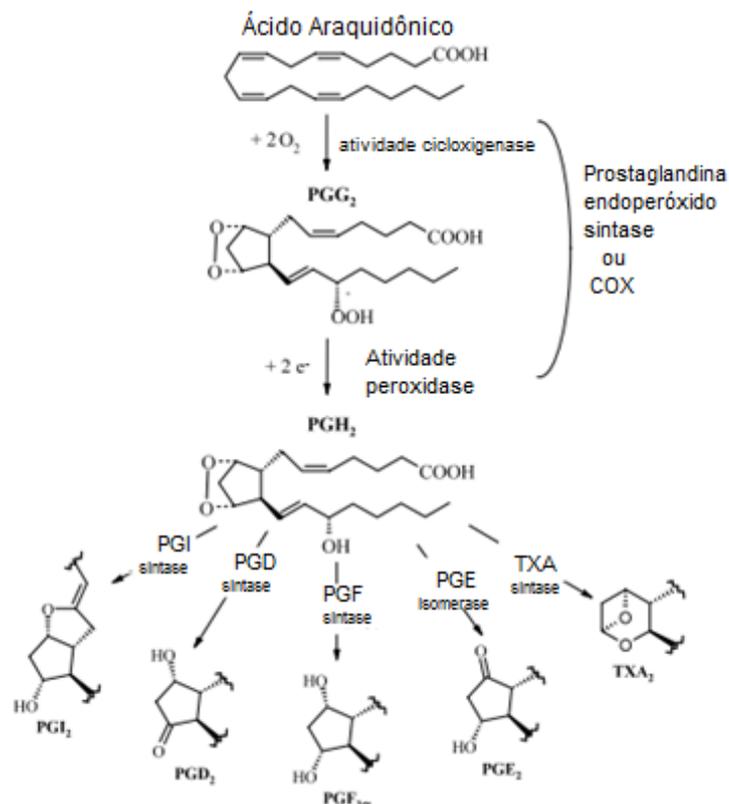


Figura 3 - Eicosanoides produzidos pela via da cicloxigenase.

Fonte: CHARLIER (2003).

Em 1991 evidenciou-se a existência de duas isoformas da enzima cicloxigenase, designadas como COX-1 e COX-2 (BATLOUNI, 2009).

A cicloxigenase (COX-1) é uma enzima constitutiva estando presente no corpo humano mesmo sem a existência de um processo inflamatório. É responsável em grande parte por sintetizar as prostaglandinas no corpo, estando presente na mucosa duodenal e nas plaquetas. A COX-1 é essencial para a manutenção do estado fisiológico de muitos tecidos, incluindo a proteção da mucosa gastrointestinal, controle do fluxo sanguíneo renal, homeostasia, respostas autoimunes, funções pulmonares e do sistema nervoso central, cardiovasculares e reprodutivas (BEZERRA et al., 2008).

A cicloxigenase (COX-2) é uma enzima induzível responsável pelo processo inflamatório. Esta enzima é induzida quando existe um processo inflamatório local, pois sua produção é causada por mediadores inflamatórios, tais como citocinas e endotoxinas. A COX-2 está presente fisiologicamente em três locais: rins, sistema nervoso central e endotélio vascular (BEZERRA et al., 2008). Os prostanóides produzidos pela ação da COX-2 estão relacionados aos processo de inflamação, dor e febre (BELUQUE, 2014).

Em resposta a diversos estímulos, há ativação da enzima fosfolipase A₂ que hidrolisa os fosfolipídios da membrana liberando ácido araquidônico no citoplasma. Como mencionado anteriormente o ácido araquidônico serve de substrato para duas vias enzimáticas: cicloxigenase e lipoxigenase. Através da via cicloxigenase é gerada prostaglandina (PGH₂), que estimula a formação dos prostanóides, que incluem as prostaglandinas PGI₂, PGE₂, PGD₂, PGF₂ α e tromboxano A₂ (Figura 4). Através da via lipoxigenase formam se leucotrieno, lipoxinas, dentre outros (BATLOUNI, 2009).

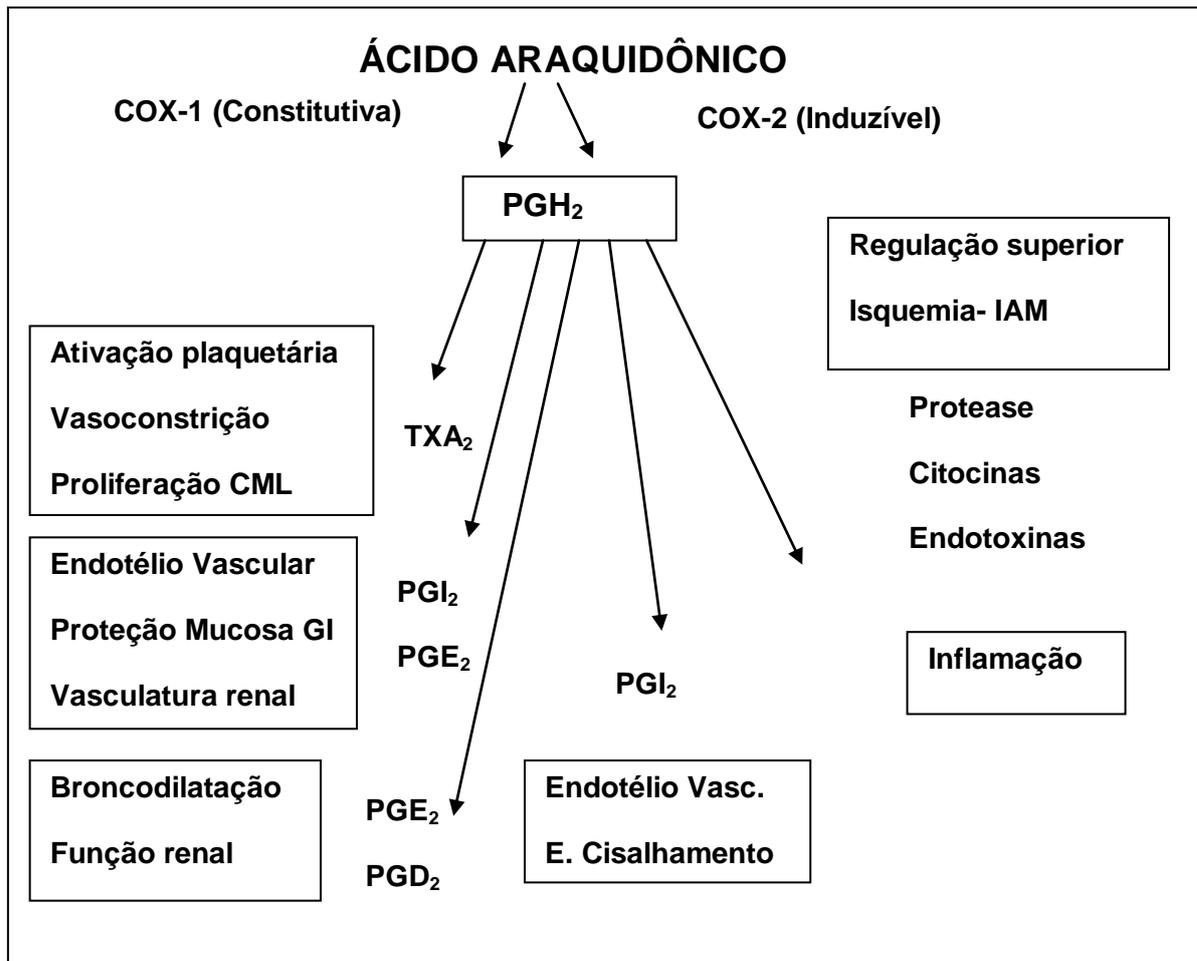


Figura 4 – Representação esquemática dos efeitos relacionados à ativação das cicloxigenases (COX-1) e (COX-2).

Fonte: Batlouni (2009).

2.2 ANTI-INFLAMATÓRIOS

Os anti-inflamatórios podem ser divididos em três grupos: os esteróides, não esteróides (AINEs) e os coxibes (REGO, 2012). A diferença entre eles está no local de atuação.

Quando há algum estímulo prejudicial ou lesão tecidual ocorre ativação da enzima fosfolipase A₂, que irá hidrolisar o fosfolípido presente na membrana dando origem ao ácido araquidônico. Este ácido graxo, por sua vez, é substrato para as enzimas cicloxigenases e lipoxigenases, que produzem eicosanóides ligados ao processo inflamatório e leucotrienos ligados a processos alérgicos e inflamações. É através da inibição destas vias enzimáticas, catalisadas pelas enzimas COX e LOX,

que os anti-inflamatórios evitam a formação de diversas moléculas pró-inflamatória (REGO, 2012).

2.2.1 Anti-inflamatórios Esteroidais

Os esteróides, também designados como glicocorticoides, são hormônios sintetizados no córtex da glândula adrenal (BAVARESCO, 2005), que afetam o metabolismo de carboidratos e reduzem a resposta inflamatória. Os anti-inflamatórios esteroidais (AIEs) são medicamentos que mimetizam os efeitos do hormônio cortisol (**1**, Figura 5) (BALBINO, 2011, p. 32).

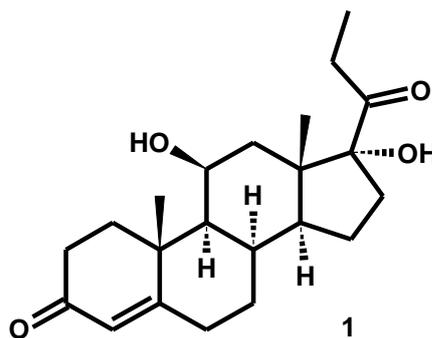


Figura 5 – Estrutura molecular do cortisol (**1**).

Fonte: Autoria própria.

Esses medicamentos são utilizados na terapia de reposição hormonal (em caso de problemas da córtex supra-renal), terapias de imunossupressão, terapia antialérgica, anti-inflamatória e anti-câncer (BAVARESCO, 2005). Os AIEs inibem tanto manifestações iniciais quanto posteriores a inflamação, ou seja, além da vermelhidão, edema, dor e calor inibem estágios após a cicatrização e reações proliferativas existentes na inflamação crônica (BAVARESCO, 2005).

Contudo os fármacos glicocorticoides apresentam vários efeitos adversos, como reduzir possível captação e utilização da glicose e aumentar a gliconeogênese, desencadeando glicemia de rebote, com consequente glicosúria,

além de aumentar o catabolismo e reduzir o anabolismo proteico (BAVARESCO, 2005).

2.2.2 Anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs)

Os anti-inflamatórios não esteróis (AINEs) são indicados para o tratamento de inflamações, dor, febre, edema, osteoartrite, artrite reumatoide e distúrbios músculo-esquelético (BATLOUNI, 2009).

Os fármacos pertencentes a esta classe podem ser divididos, de acordo com a forma de inibição da enzima cicloxigenase, em seletivos e não seletivos (REGO, 2012).

A interação do fármaco (micromolécula) com a enzima (biomacromolécula) depende do arranjo espacial dos grupos funcionais e da estrutura da micromolécula, que devem ser complementares ao sítio de ligação localizado na macromolécula, ou seja, o sítio receptor (BARREIRO, 2015). O modelo chave-fechadura ilustra a complementaridade molecular necessária para a interação do fármaco com a enzima receptora (Figura 6).

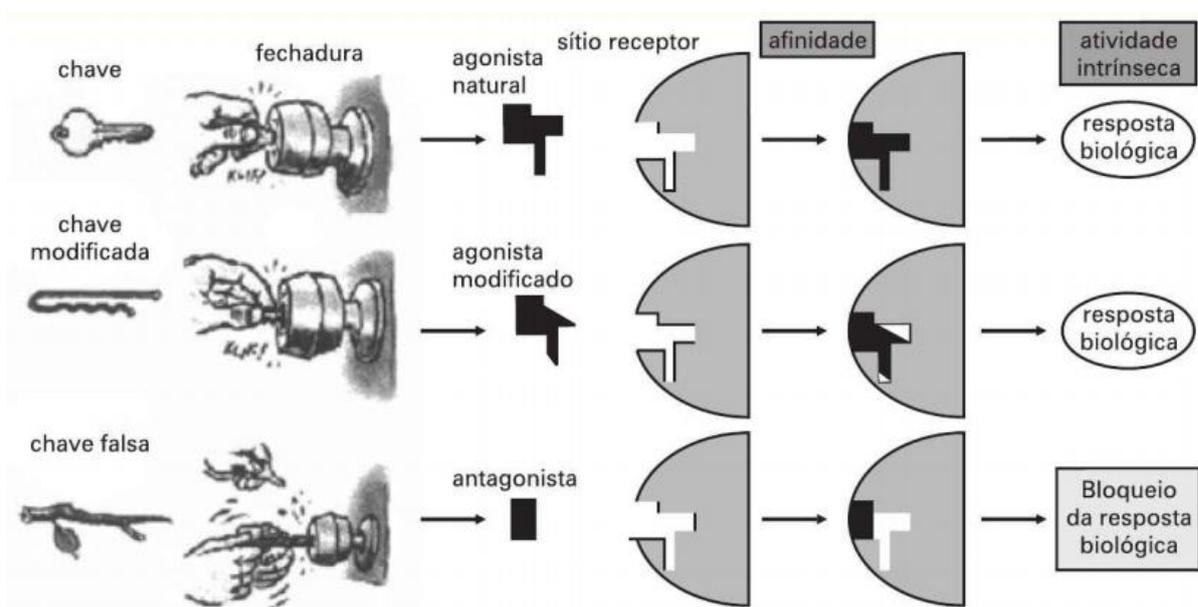


Figura 6 – Modelo chave-fechadura e o reconhecimento do ligante com o receptor.

Fonte: Barreiro (2015).

Neste modelo a biomacromolécula (enzima) é analogamente representada pela fechadura. O sítio receptor da enzima, ou seja, a região da enzima que interage diretamente com o fármaco é representada pelo buraco da fechadura, e as chaves são os ligantes do sítio receptor (BARREIRO, 2015).

2.2.2.1 Inibidores não seletivos da COX

Os AINEs não seletivos são os mais antigos, designados tradicionais. Eles competem com o ácido araquidônico para se ligar ao sítio ativo das COXs inibindo a síntese de prostaglandinas (CHARLIER, 2003). Os AINEs não seletivos inibem tanto a enzima COX-1 quanto a COX-2, porém são inibidores mais ativos da COX-1. Essa inibição preferencial da COX-1 é responsável pelos efeitos tóxicos gastrointestinais causados por esses AINEs (REGO, 2012). Como a COX-1 é essencial para a manutenção de muitos tecidos a inibição da mesma ocasiona inúmeros efeitos indesejados, como problemas cardiovasculares, gastrointestinais e problemas renais.

2.2.2.2 Inibidores seletivos da COX-2

Os inibidores seletivos da COX-2 são conhecidos como Coxibes. Os coxibes foram comercializados nos Estados Unidos e no Canadá a partir de 1999. Na época, os idealizadores desta classe de anti-inflamatórios afirmavam que se o anti-inflamatório inibisse apenas a enzima COX-2 não teria os efeitos secundários causados pela inibição da enzima COX-1 (CAIRNS, 2007). No entanto, estudos posteriores constataram a incidência de efeitos adversos mais graves, como eventos trombóticos causados por esse tipo de AINEs, o que levou a retirada de grande parte desses fármacos do mercado (CAIRNS, 2007).

Os AINEs seletivos são fármacos estruturalmente específicos que exercem seu efeito biológico pela interação seletiva com determinada biomacromolécula – alvo, no caso a COX-2 (BARREIRO, 2015, p. 20).

2.2.3 Efeitos adversos dos AINEs

2.2.3.1 Efeitos Gastrointestinais

O efeito colateral mais recorrente pelo uso dos AINEs ocorre no aparelho gastrointestinal (MATEUS, 2014). Esses efeitos podem ocorrer em diferentes graus de incidência, o mais comum é o aparecimento de sintomas como azia, dispepsia, náuseas, dor abdominal que ocorrem em 15 a 40% das pessoas que utilizam AINES. O tratamento com esses anti-inflamatórios, em longo prazo, pode causar erosões e úlceras gástricas e duodenais (BATLOUNI, 2009). Vale lembrar que no aparelho gastrointestinal o alimento é degradado tanto pelo movimento que o estômago faz quanto pelo ácido clorídrico. Para evitar que o ácido cause lesões à parede gástrica, é produzido em resposta a diversas prostaglandinas sintetizadas no local pela enzima cicloxigenase, mucos citoprotetores que protegem as células de sofrerem danos pelo ácido clorídrico. A inibição da COX-1 pelos AINEs diminui a formação de muco citoprotetor no estômago o que pode gerar dor abdominal, azia, diarreia, além de alto risco de desenvolver complicações graves, como sangramento e perfuração do estômago (BATLOUNI, 2009).

2.2.3.2 Efeitos Renais

Outro dos efeitos colaterais dos AINEs é a insuficiência renal, ocorrendo tanto pelo uso de AINEs seletivos da COX-2 ou não seletivos (MATEUS, 2014). Prostaglandinas homeostáticas - prostaciclina, PGE2 e PGD2, geradas por ação da COX-1 em distintas regiões dos rins, dilatam a vasculatura, diminuem a resistência vascular renal e aumentam a perfusão do órgão. Isso leva à redistribuição do fluxo sanguíneo do córtex renal para os néfrons na região intramedular (BATLOUNI, 2009). Em pessoas com algum tipo de acometimento renal há um aumento da produção de prostaglandinas na arteríola aferente renal ocasionando uma

vasodilatação e conseqüentemente uma manutenção da taxa de filtração glomerular de modo que os rins sejam minimamente acometidos funcionando mais próximo do normal. Contudo a inibição da síntese de prostaglandina pode causar diminuição na taxa de filtração glomerular e insuficiência renal aguda (MATEUS, 2014).

2.2.3.3 Efeitos Cardiovasculares

Estudos constataram que os AINEs seletivos da COX-2 desenvolvidos para amenizar problemas gastrointestinais causados pela inibição da COX-1, estão associados ao risco de trombose. A homeostase cardiovascular é regulada pelo equilíbrio entre as enzimas COX-1 e COX-2. A COX-1 regula a produção de tromboxanos (TXs) pelas plaquetas, que promove a ativação de outras plaquetas e também a agregação plaquetária. Já a COX-2 é responsável pela produção de prostaciclina (PGI₂) pelas células endoteliais, que inibe a agregação plaquetária e a formação de trombos. Em AINEs seletivos para a COX-2 terá a inibição da coagulação, em contrapartida a COX-1 estará induzindo a coagulação. Como não terá COX-2 para antagonizar o tromboxano A₂ produzido pela COX-1 a probabilidade de eventos trombóticos aumenta muito (BELUQUE, 2014).

2.2.4 Naproxeno

O naproxeno, ácido 2-(6-metoxinaftalen-2-il)propanóico (**2**, Figura 7), é um anti-inflamatório não esteroideal com propriedades analgésicas, anti-inflamatórias e antipiréticas. É o único AINEs comercializado sob a forma enantiomericamente pura, (S)-naproxeno (RODRIGUES, 2012).

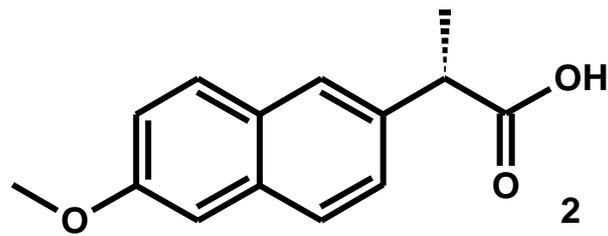


Figura 7 - Estrutura molecular do (S)-naproxeno (2).

Fonte: Autoria própria.

O naproxeno age na inibição da síntese de prostaglandinas sendo inibidor não seletivo de COX-1 e COX-2, todavia atua como inibidor mais ativo da COX-1. O efeito anti-inflamatório do naproxeno foi demonstrado até mesmo em animais adrenalectomizados, o que indica que sua ação não é mediada pelo eixo hipófise suprarrenal (LABORATÓRIO TEUTO BRASILEIRO S/A, 2015).

Ele atua como um inibidor competitivo do substrato ácido araquidônico, se ligando ao sítio ativo das enzimas cicloxigenase (Figura 8), impedindo a síntese de prostaglandinas (PGE_2) e prostaciclina (PGI_2) responsáveis pela febre e dor no processo inflamatório.

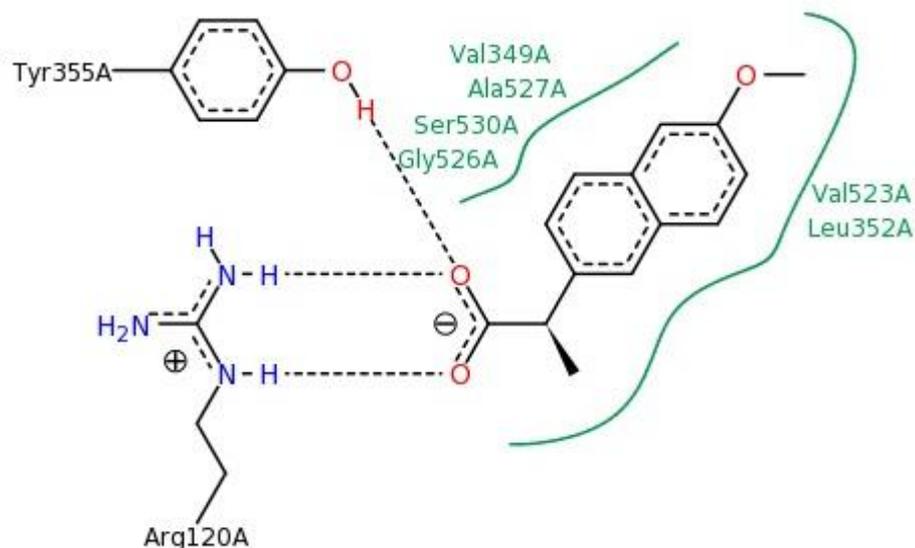


Figura 8 - Interação do naproxeno ao sítio ativo da enzima cicloxigenase.

Fonte: Protein Data Bank (2015).

O naproxeno possui em sua estrutura o ácido propiônico, derivado do ácido carboxílico que interage ao sítio catalítico da ciclooxigenase, formando ligações de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos Tir-355 e Arg-120 localizados no canal do sítio catalítico. Os derivados dos ácidos carboxílicos tais como ácidos propiônicos e ácido acetilsalicílico provocam reações cutâneas, ocasionando intolerância gastrointestinal (CHAHADE; GIORGI; SZAJUBOK, 2008). Para evitar tais problemas, vários grupos de pesquisa têm buscado a obtenção de derivados de ácido carboxílicos, tais como ésteres, formados pela reação entre anti-inflamatórios e produtos naturais. Nesse caso, o grupo éster tende a interagir com os resíduos de aminoácidos localizados no sítio ativo da ciclooxigenase através de ligações de hidrogênio e interações de van der Waals.

O éster naproxenato de eugenila, por exemplo, reportado por (GUANG-SHU, 2013) apresentou atividades analgésica e anti-inflamatória semelhantes aos do naproxeno, e uma diminuição da atividade ulcerogênica, indicando que o possível fármaco pode diminuir significativamente a irritação após a administração oral.

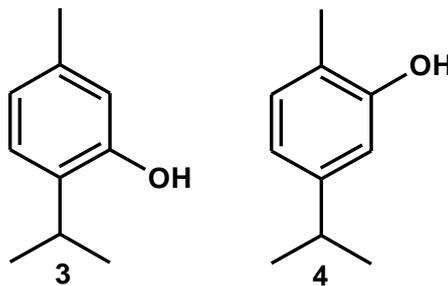
2.3 PRODUTOS NATURAIS

Produtos naturais oriundos de plantas medicinais vêm sendo explorados, devido suas propriedades biológicas e farmacológicas, por pesquisadores ao longo dos anos. As plantas são consideradas importantes fontes de moléculas biologicamente ativas, que podem contribuir para o desenvolvimento de novos compostos com diferentes aplicações biológicas e/ou farmacológicas (ALMEIDA, 2015). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) 80% da população mundial dependem de medicamentos derivados de plantas. Isso denota o quanto as plantas apresentam papel importante no desenvolvimento da medicina (NEVES, 2009).

Entre os produtos naturais estudados, destacam-se os óleos essenciais, que apresentam interessantes atividades biológicas/farmacológicas (CARDOSO, 1999). Quimicamente, os óleos essenciais, óleos etéreos ou essências, podem ser definidos como misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, com características odoríferas, sabor (ácido) e consistência oleosa (FRANCA, 2012).

2.3.1 Timol e Carvacrol

Os isômeros de posição carvacrol, 2-metil-5-(1-metiletil)-fenol e timol 5-metil-2-(1-metiletil)-fenol (Figura 9), são fenóis monoterpênóides presentes em óleos essenciais de plantas dos gêneros *Origanum*, *Thymus* e *Lippia* (NEVES, 2009).



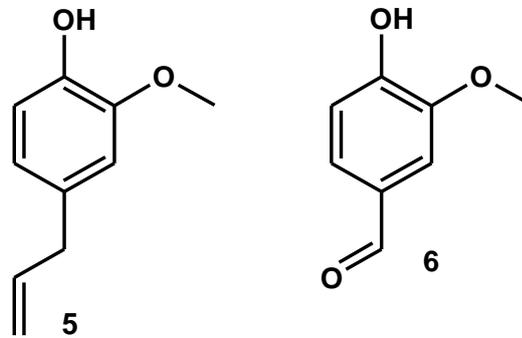
**Figura 9 - Estrutura molecular do timol (3) e carvacrol (4).
Fonte: Autoria própria.**

Estes fenóis monoterpênicos possuem fórmula molecular igual a C₁₀H₁₄O e peso molecular de 150,22 g.mol⁻¹. Apesar da semelhança estrutural, estes dois fenóis apresentam odor e propriedades físico-químicas diferentes. O carvacrol encontra-se na forma líquida em temperatura ambiente e timol na forma de cristais (ALMEIDA, 2015).

Estudos reportam que há efeitos benéficos desses compostos associados ao tratamento de condições dolorosas, como inflamações. Sousa, Andrade e Sá (2013), por exemplo, ao investigar a atividade anti-inflamatória desses compostos em ensaios de inibição das enzimas COX-1 e COX-2, reportaram que o timol inibe eficazmente a COX-1, enquanto o carvacrol atua como inibidor mais ativo da COX-2.

2.3.2 Eugenol e Vanilina

O eugenol (**5**) de forma molecular $C_{10}H_{12}O_2$ e massa molar $164,2 \text{ g.mol}^{-1}$ é um líquido incolor a amarelo claro de baixa solubilidade em água. O eugenol é o principal componente do óleo essencial do cravo da Índia. Tem sido empregado na fabricação de outros compostos fenólicos como a vanilina (**6**), Figura 10 (RABELO, 2010).



**Figura 10 – Estrutura molecular (5) Eugenol (6) Vanilina.
Fonte: Autoria própria.**

Estudos sugerem que a atividade anti-inflamatória do eugenol está relacionada à liberação de mediadores endógenos e à síntese de prostaglandinas (FRANCA, 2012). A inibição do edema é comparável a dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), tais como a indometacina e o celecoxibe. Tais estudos constataram que o eugenol apresenta efeito farmacológico semelhante aos antagonistas das enzimas COX-1 e COX-2 (FRANCA, 2012).

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Visando contribuir para atenuar os efeitos adversos causados pelos anti-inflamatórios, este trabalho buscou realizar a síntese e avaliar *in silico* o potencial anti-inflamatório de naproxenatos derivados de produtos naturais.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Síntetizar e caracterizar naproxenatos derivados de produtos naturais (timol, eugenol, carvacrol e vanilina).
- Estudar *in silico* as propriedades farmacocinéticas dos naproxenatos derivados de produtos naturais (timol, carvacrol, eugenol, e vanilina).
- Realizar estudos de ancoragem molecular dos naproxenatos de timila, eugenila, carvacrila e vanilina frente as enzimas COX-1 e COX-2.

4 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

Para a avaliação da potencial atividade anti-inflamatória em derivados de naproxeno, cujas estruturas estão representadas na Figura 11, foram realizados estudos *in silico* utilizando as ferramentas: Molinspiration, Osiris, AdmetSAR e iGEMDOCK. Também, no presente trabalho, foi proposta uma metodologia para a síntese de derivados de naproxeno e em seguida a caracterização de alguns dos compostos propostos.

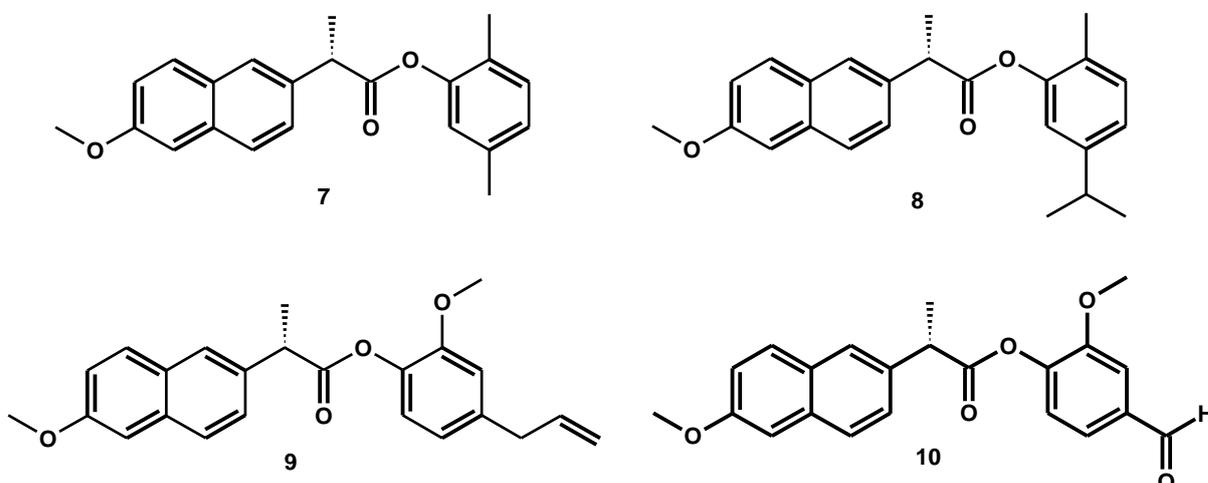


Figura 11 - Estrutura molecular dos naproxenatos de timila (7), de carvacrila (8), de eugenila (9) e de vanilina (10).

Fonte: Autoria própria.

4.1 ESTUDO *IN SILICO*

Os parâmetros farmacocinéticos e toxicológicos teóricos (ADMET – Absorção, Distribuição, Metabolização, Excreção e Toxicidade) foram calculados com o objetivo de analisar se os naproxenatos **7-10** possuem as características essenciais para que possam ser considerados como possíveis fármacos anti-inflamatórios e, dessa forma, evitar gastos desnecessários durante o processo de pesquisa & Desenvolvimento (AFONSO, 2008). Alguns parâmetros relacionados à absorção, toxicidade e metabolização foram avaliados pela ferramenta admetSAR (<http://lmm.d.ecust.edu.cn:8000/>) (SOUZA, 2015). Esses parâmetros são

permeabilidade na barreira hematoencefálica, permeabilidade Caco-2, absorção no intestino, se são substratos e inibidores das enzimas do citocromo e se são inibidores de transporte renal de cátions. Através desta ferramenta foi avaliada a metabolização utilizando algumas enzimas do citocromo P450, comparando se os compostos são substratos para os citocromos CYP450 2D6, CYP450 3A4, CYP450 2C9, se são inibidores dos citocromos CYP450 1A2, CYP450 2C9, CYP450 2D6, CYP450 2C19, CYP450 3A4 e a promiscuidade de inibição dos citocromos.

A avaliação da toxicidade teórica foi realizada utilizando o programa *Osiris Property Explorer* (www.organicchemistry.org/prog/peo/). O programa avalia os riscos de efeitos toxicológicos, tais como mutagênico, tumorigênico, efeitos irritantes e na reprodução humana por meio de cores (vermelho = alto risco, amarelo = risco moderado, verde = sem risco).

As propriedades moleculares foram calculadas, com base em descritores moleculares utilizando a regra dos cinco de Lipinski, no software Molinspiration Online Property Calculation Toolkit (www.molinspiration.com/). A investigação de Lipinski e colaboradores deu origem a chamada “regra dos 5”, que traçou um perfil para moléculas de fármacos dentro de limites de massa molar, lipofilia que é representada pelo coeficiente de partição, log P, e hidrofília, representada pelo número de doadores e receptores de ligação de hidrogênio.

A regra dos cinco de Lipinski estabelece alguns parâmetros estruturais relevantes para a predição teórica do perfil de biodisponibilidade oral. Esta biodisponibilidade está associada à absorção e a permeabilidade de possíveis fármacos e depende de cinco parâmetros: (a) número de grupos aceptores de ligação hidrogênio (nALH) menor ou igual a 10; (b) número de grupos doadores de ligação hidrogênio (nDLH) menor ou igual a 5; (c) massa molecular (MM) menor ou igual a 500 g/mol; (d) coeficiente de partição octanol-água (milog P) menor ou igual a 5; (e) área de superfície polar (PSA) menor ou igual a 140 Å². Moléculas que violam mais do que uma destas regras podem ter problemas com a biodisponibilidade (SILVA, 2015).

O estudo de ancoragem molecular foi realizado através do software iGEMDOCK 2.1 visando analisar a orientação, a energia de interação e a afinidade dos naproxenatos **7-10** ao sítio ativo das isoenzimas cicloxigenases (COX-1 e COX-2). Para esse estudo foram utilizadas as estruturas de cinco isoenzimas obtidas através do Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). As COX-1

escolhidas foram (PDB 1EQG e 1EQH) e as COX-2 (PDB 3NT1, 3NTB e 3Q7D). Estas enzimas foram selecionadas para o estudo porque apresentam como ligante cristalográfico um anti-inflamatório da classe arilpropiônico. A tabela 1 mostra as características das enzimas utilizadas neste trabalho.

Tabela 1 – Características das enzimas COX-1 e COX-2 utilizadas neste trabalho.

PDB	Resolução (Å)	Ligante cristalográfico	Autor
1EQG	2,61	Ibuprofeno	SELINSKY et al. (2001)
1EQH	2,70	Flurbiprofeno	SELINSKY et al. (2001)
3NT1	1,73	(S)-Naproxeno	DUGGAN et al. (2010)
3NTB	2,27	Ácido 2(S)-2-[6-(metilsulfanil) naftalen-2-il] propanóico	DUGGAN et al. (2010)
3Q7D	2,40	(R)-Naproxeno	DUGGAN et al. (2010)

Fonte: Autoria própria.

4.2 SÍNTESE DOS ÉSTERES DERIVADOS DE NAPROXENO

A extração do Naproxeno foi realizada através de isolamento. Para a síntese dos ésteres derivados de Naproxeno utilizou-se *N,N*-dimetilaminopiridina (DMAP) como catalisador, dicicloexilcarbodiimida (DCC) (1,29 g, 6,25 mmol) como agente de acoplamento. Foi adicionado Naproxeno (1,030 g, 5,0 mmol), a quantidade equivalente ao mesmo número de mol de timol/carvacrol/eugenol/vanilina (5,00 mmol) e diclorometano (10 mL). A mistura reacional ficou sob agitação magnética, a temperatura ambiente, por 48 horas, monitorada por cromatografia em camada delgada. Após o período indicado, o produto da reação foi filtrado para remoção da dicicloexiluréia e em seguida foi feita a purificação por cromatografia em coluna de sílica gel.

Para a purificação dos compostos foi realizada cromatografia em coluna de sílica gel 60 (Merck), com granulometria 70-230 mesh e solventes hexano e acetato de etila destilados. O monitoramento das separações dos produtos foram realizadas por cromatografia em camada delgada analítica em placa de alumínio recobertas com sílica gel 60. A visualização dos compostos em CCD foi feita por irradiação com lâmpada de ultravioleta no comprimento de onda de 254 nm e com vapor de iodo.

A caracterização dos compostos sintetizados foi realizada por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e de ^{13}C . As análises de RMN foram realizadas na Universidade Estadual de Maringá. Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C foram obtidos em um espectrômetro VARIAN modelo Gemini 2000BB 300 MHz (300 MHz para ^1H e 75,5 MHz para ^{13}C). Os deslocamentos químicos foram dados em ppm, tendo como referência interna o tetrametilsilano (TMS) ou o próprio solvente (CDCl_3 , 7,27 ppm para ^1H e 77,00 ppm para ^{13}C).

5 RESULTADOS

5.1 ESTUDOS *IN SILICO*

Os métodos de química e bio-informática são empregados no planejamento de um possível fármaco. Sua utilização na química medicinal vão desde identificação, seleção e otimização de moléculas candidatas a novo fármaco com potencial atividade terapêutica (MODA, 2007).

Os modelos *in silico* (estudo computacional) vem sendo empregados nos estágios iniciais de pesquisas e desenvolvimento de moléculas para análise de potencial atividade terapêutica. Esses modelos devem ser associados aos estudos *in vitro* e *in vivo* visando diminuir a quantidade de moléculas avaliadas e otimizar a identificação de novas entidades químicas (MODA, 2007).

5.1.1 Molinspiration

As propriedades moleculares dos compostos, derivados de naproxeno, calculadas no software Molinspiration, são representadas na tabela 2.

Tabela 2 - Propriedades moleculares dos naproxenatos 7-10 calculadas no software Molinspiration.

Comp.	miLogP	MM	nALH	nDLH	nviolações	TPSA	nrotb
2	3,38	230,26	3	1	0	46,53	3
7	6,51	362,47	3	0	1	35,54	6
8	6,93	376,50	3	0	1	35,54	7
9	6,37	374,48	3	0	1	35,54	8
10	4,48	364,40	5	0	0	61,48	7

Comp. – composto; **miLogP** – coeficiente de partição octanol/água; **nALH** – número de grupos aceptores de ligação de hidrogênio; **nDLH** – número de grupos doadores de ligação de hidrogênio; **nviolações** – número de violações; **TPSA** – área superficial polar topológica; **nrotb** – número de bandas rotáveis.

Fonte: A autoria própria.

Através da ferramenta é possível obter valores das propriedades (TPSA) Área de superfície polar topológica, nALH e nDLH, relacionados com a biodisponibilidade oral de uma molécula bioativa, que é uma consideração importante para uma molécula ser um candidato a fármaco.

Os resultados obtidos (Tabela 2) foram comparados com a Regra dos Cinco de Lipinski em que um composto deve apresentar os seguintes resultados, para ter boa biodisponibilidade oral: miLogP menor ou igual a 5,00; MM menor ou igual a 500 g.mol⁻¹; Área de superfície polar (TPSA) menor ou igual a 140 Å² ou a soma do número de aceptores e doadores de ligação de hidrogênio menor que 12; Máximo de 10 grupos aceptores de ligação de hidrogênio (nALH), que é expresso pela soma de átomos de N e O; Máximo de 5 grupos doadores de ligação de hidrogênio (nDLH), expresso pela soma de OH e NH na molécula (MARIÑO, 2014). Os compostos que violarem mais de um desses parâmetros poderão apresentar problemas de biodisponibilidade.

O número de bandas rotáveis (nrotb) relacionado à flexibilidade da molécula é outro parâmetro importante para a predição da biodisponibilidade, pois quanto maior a sua flexibilidade mais fácil a interação com a enzima. A flexibilidade da molécula está associada ao número de ligações rotáveis que corresponde ao número de ligações simples, fora de um anel, ligado a um átomo não terminal. Quanto mais ligações simples tiver a molécula maior é a interação com a enzima facilitando a transposição da barreira, ou seja, maior a biodisponibilidade do fármaco. Através de alguns estudos Veber e colaboradores (2002) estabeleceram que compostos, com uma TPSA menor ou igual a 140 Å² e um número de ligações rotáveis menor ou igual a 10, apresentaram elevada probabilidade de boa biodisponibilidade oral.

Analisando os dados de propriedades moleculares calculados (Tabela 2) é possível inferir que os compostos **7**, **8** e **9** violam uma das propriedades da regra dos cinco de Lipinski, apresentando miLogP maior do que cinco. A lipofilia, associada ao coeficiente de partição (Log P, partição de uma substância entre as fases aquosa e orgânica no sistema água/octanol), representa a passagem do meio extracelular para o meio intracelular através da bicamada lipídica (MODA, 2009). Contudo os compostos violam somente um dos parâmetros da regra de Lipinski, portanto não tendem a apresentar problemas de biodisponibilidade oral.

A área superficial polar topológica e o número de ligações rotáveis de todos os compostos apresentam valores favoráveis dentro dos parâmetros estabelecidos por Veber et al. (2013), o que indica que tendem a apresentar boa absorção se administrado por via oral.

Segundo Singh, Gupta e Verma (2013), para um estudo utilizando Molinspiration, a probabilidade da molécula ser bioativa existe se o *score* for maior do que zero, se o *score* estiver entre 0,00 e -5,00 a probabilidade de bioatividade é moderada e *score* menor do que -5,00 a molécula é considerada inativa.

Tabela 3 - Predição de bioatividades, calculadas no software Molinspiration, para os naproxenatos 7-10.

Comp.	Ligante GPCR	Modulador de canal de íon	Inibidor de quinase	Ligante de receptor nuclear	Inibidor de protease	Inibidor de enzima
2	-0,11	- 0,06	- 0,38	0,14	- 0,25	0,15
7	- 0,06	- 0,21	-0,24	0,13	- 0,19	0,00
8	- 0,06	- 0,23	- 0,23	0,28	- 0,04	- 0,03
9	- 0,05	- 0,13	- 0,30	0,08	- 0,20	- 0,04
10	- 0,11	- 0,16	- 0,16	0,14	- 0,25	0,02

Fonte: Autoria própria.

Com base nos dados apresentados na tabela 3, e nas considerações reportadas por Singh, Gupta e Verma (2013), é possível concluir que os compostos avaliados tendem a apresentar bioatividade moderada para inibição enzimática. Este dado é condizente com o perfil farmacológico que espera-se dos naproxenatos **7-10**, inibidores das enzimas ciclooxigenases.

5.1.2 Osiris

Os resultados obtidos através do software Osiris para os naproxenatos **7-10** são apresentados na tabela 4. Avaliou-se quatro potenciais riscos toxicológicos: mutagenicidade, tumorigenicidade, efeito irritante e alterações no sistema reprodutivo humano.

Tabela 4 - Predição de toxicidade, determinadas no software Osiris, para os naproxenatos 7-10.

Composto	Toxicidade			
	Mutagênico	Tumorigênico	Irritante	Reprodução
2	Sem risco	Sem risco	Sem risco	Sem risco
7	Sem risco	Sem risco	Alto risco	Sem risco
8	Sem risco	Sem risco	Alto risco	Sem risco
9	Sem risco	Alto risco	Alto risco	Sem risco
10	Sem risco	Sem risco	Alto risco	Sem risco
3	alto risco	sem risco	Sem risco	Alto risco
4	Sem risco	Sem risco	Alto risco	Sem risco
5	Alto risco	Alto risco	Alto risco	Sem risco
6	Alto risco	Sem risco	Alto risco	Alto risco

Fonte: Autoria própria.

A partir dos dados apresentados na tabela 4, obtidos através da ferramenta Osiris, é possível observar que todos os compostos apresentaram alto risco toxicológico irritante. O naproxenato de eugenila apresentou alto risco toxicológico tumorigênico. A ferramenta Osiris funciona através do uso de bases de dados que contém moléculas tóxicas e não tóxicas esse modelo é calibrado com as moléculas fragmentadas, a partir da quebra de ligações simples, o que ocasiona fragmentos que constitui o efeito indesejado na molécula. Além de indicar a toxicidade, a ferramenta destaca que os compostos apresentam toxicidade irritante devido à presença dos fragmentos apresentados na figura 13.

Os cálculos realizados através do software apontam que o fragmento molecular que ocasiona alto risco tumorigênico do composto naproxenato de eugenila é a dupla ligação na extremidade da sua estrutura molecular.

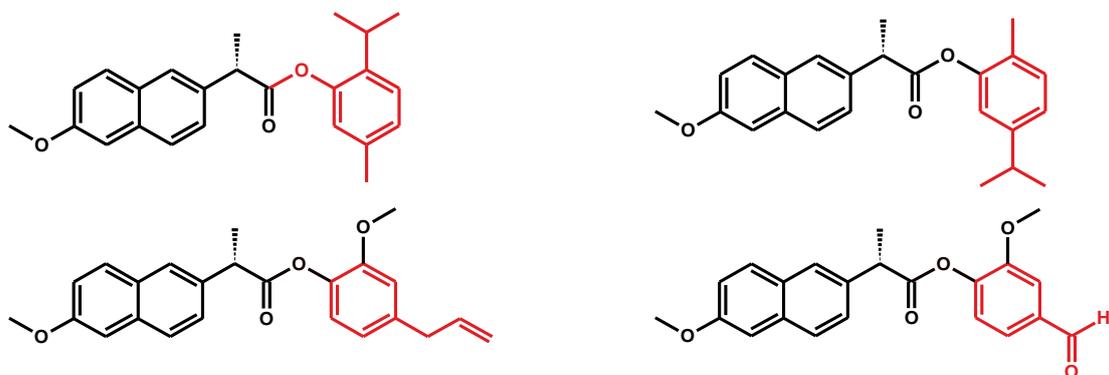


Figura 12 - Indicação dos fragmentos relacionados aos efeitos toxicológicos calculados pela ferramenta Osiris.

Fonte: Autoria própria.

De acordo com a tabela 4 os produtos naturais avaliados também apresentam potenciais riscos toxicológicos mutagênicos, tumorigênico, irritante e sobre a reprodução, porém observa-se que esses efeitos tóxicos foram reduzidos com a derivatização.

5.1.3 AdmetSAR

O estudo sobre os caminhos que o princípio ativo deve percorrer, no compartimento biológico, desde a administração oral, até atingir a circulação sistêmica para realizar o efeito terapêutico desejado fazem parte da farmacocinética (MODA, 2007). É amplamente relevante o estudo das propriedades de ADME, que se referem aos processos farmacocinéticos de absorção (A), distribuição (D), metabolismo (M) e excreção (E), para os compostos candidatos a fármaco nos estágios iniciais dos processos de descoberta (MODA, 2007). O estudo dessas propriedades foi realizado através da ferramenta admetSAR e está apresentado na tabela 6.

O coeficiente de partição sangue-cérebro ($\log BB$, do inglês *Blood-Brain Barrier Partition*) é um parâmetro que avalia a penetração na barreira hematoencefálica (ROMERO e ROMERO, 2014). No sistema nervoso central as células capilares não têm poros e possuem pouca atividade transcitótica. Os fármacos para atravessarem a barreira hematoencefálica têm que se difundir transcelularmente, ou seja, penetrar as membranas luminal e basal do endotélio. Este movimento do fármaco requer que ele tenha propriedades físico-químicas específicas (BALLABH; BRAUN; NEDERGAARD, 2014). No estudo realizado observou-se que todos os compostos avaliados foram classificados como absorção positiva para o modelo barreira sangue-cérebro.

Após a administração, o fármaco deve se dissolver e ser solubilizado no trato gastrointestinal para poder ser absorvido através da membrana intestinal. A absorção ocorre por dois mecanismos principais: o mecanismo transcelular, que é a simples difusão passiva através das membranas celulares, e o mecanismo paracelular, é a passagem entre as células intestinais. No entanto, a absorção pode ocorrer também por transporte ativo, em que necessita de energia e é mediado por

transportadores (MODA, 2009). Observou-se que todos os compostos avaliados foram classificados com absorção positiva para os modelos de absorção no intestino humano e permeabilidade em Caco-2.

Tabela 5 - Propriedades ADMET, calculadas no software admetSAR, para o naproxeno (2) e os naproxenatos 7-10.

Absorção e Distribuição					
Modelo	7	8	9	10	2
Barreira sangue-cérebro	BBB+	BBB+	BBB+	BBB+	BBB+
Absorção no intestino humano	HIA+	HIA+	HIA+	HIA+	HIA+
Permeabilidade Caco-2	Caco2+	Caco2+	Caco2+	Caco2+	Caco2+
Transporte renal de cátions orgânicos	NI	NI	NI	NI	NI
Metabolismo					
CYP450 2C9 Substrato	NS	NS	NS	NS	NS
CYP450 2D6 Substrato	NS	NS	NS	NS	NS
CYP450 3A4 Substrato	S	S	S	S	S
CYP450 1A2 Inibidor	I	I	I	I	I
CYP450 2C9 Inibidor	I	I	NI	NI	NI
CYP450 2D6 Inibidor	NI	NI	NI	NI	NI
CYP450 2C19 Inibidor	NI	NI	NI	NI	NI
CYP450 3A4 Inibidor	NI	NI	NI	NI	NI
CYP Promiscuidade inibitória	Alta	Alta	Alta	Baixa	Baixa
Toxicidade					
Toxicidade AMES	NT	NT	NT	NT	T
Carcinogênico	NC	NC	NC	NC	NC
Toxicidade oral aguda	III	III	III	II	II

+ (permeia); NI – não inibe; NS – não substrato; S – substrato; I – inibe; NT – não tóxico; NC – não carcinogênico.

Fonte: Autoria própria.

Nos rins, a secreção de substâncias estruturalmente diferentes, incluindo muitos fármacos, é uma etapa fundamental à defesa do organismo contra substâncias estranhas (MODA, 2007). O rim é o principal órgão excretor de fármacos e seus metabólitos, possuindo sistemas de transporte de alta capacidade para eliminar rapidamente grandes quantidades de compostos exógenos. Os mecanismos celulares de transporte renal envolvem um sistema de transporte para ânions orgânicos, um sistema de transporte para cátions orgânicos e um transportador de múltiplas drogas ou glicoproteína P (GIACOMINI et al., 2011). Para o modelo estudado, transporte renal de cátions orgânicos, observou-se que todos os compostos avaliados foram classificados como não inibidores deste sistema.

O organismo realiza diversos mecanismos para eliminar xenobióticos, incluindo, os fármacos. A excreção se refere aos processos que o organismo utiliza para eliminar um fármaco, sendo a urina a principal via.

O metabolismo de fármacos ocorre em duas fases: a primeira fase engloba reações que são catalisadas através das enzimas do citocromo P450 oxidase (identificada como CYP ou CYP450). Neste processo, os metabólitos formados podem ser inativos ou apresentar toxicidade maior em comparação ao fármaco original. Na segunda fase ocorrem reações, onde os produtos formados na fase 1 se ligam covalentemente com substâncias como a glutatona, ácidos glicurônico, sulfato ou aminoácidos, formando conjugados hidrossolúveis que são eliminados preferencialmente pela urina, ou excretados pela bile e eliminados nas fezes (MODA, 2009).

A CYP é usada de forma genérica para enzimas oxidativas, do citocromo. Elas são responsáveis pelo metabolismo da maioria dos fármacos. Estas são: CYP 1A2, CYP 2C9, CYP 2C18, CYP 2C19, CYP 2D6, CYP 2E1 e CYP 3A4. A CYP3A4 é a forma mais abundante no fígado, sendo responsável pela metabolização de 50% dos fármacos. As diferentes isoformas do CYP também estão presentes em outros órgãos do corpo, como pulmão, rins e na parede intestinal (MODA, 2009).

Quanto maior a interação com essas enzimas do citocromo, menor a eficiência do fármaco, pois a dose do princípio ativo deverá ser maior para que tenha fármacos livre para agir (TANG et al., 2011). Entre as três enzimas do citocromo avaliadas pelo admetSAR, observou-se que todos os compostos avaliados, foram classificados como substrato apenas para CYP450 3A4. Estima-se que a enzima CYP450 3A4 - que atua em reações de hidroxilação de ligação C-H sp³ - está envolvida no metabolismo de aproximadamente metade dos medicamentos que são utilizados atualmente (MEUNIER; DE VISSER; SHAIK, 2004).

A atuação como inibidor de enzimas do citocromo P 450 pode contribuir para a diminuição da metabolização de xenobióticos. Portanto, a inibição dessas proteínas não é vantajosa para o organismo, pois essas estão atuando na defesa do organismo contra agentes químicos (ALBUQUERQUE, 2015; CHENG et al., 2011). A ferramenta classificou os compostos **7**, **8** e **9** com alta promiscuidade inibitória de enzimas do citocromo e os compostos **10** e **2** com baixa promiscuidade.

A toxicidade oral aguda foi classificada com base nas quatro categorias da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos que divide os compostos de acordo com a dose letal mediana (DL₅₀). A categoria I contém os compostos com valores de DL₅₀ inferior ou igual a 50 mg/kg, a Categoria II contém compostos com DL₅₀ valores superiores a 50 mg/kg e inferior a 500 mg/kg, a Categoria III inclui

compostos com DL_{50} valores superiores a 500 mg/kg e inferior a 5000 mg/kg e a Categoria IV consiste de compostos com DL_{50} valores superiores a 5000 mg/kg.

Para os parâmetros de toxicidade foi possível observar que os compostos avaliados não apresentaram toxicidade pelo teste AMES, não foram classificados como carcinogênicos e as categorias de toxicidade oral aguda para a maioria dos compostos é a categoria III para os compostos **7**, **8** e **9** e categoria II para os compostos **10** e **2**. Segundo a empresa Cayman Chemical (2016) a DL_{50} (oral, rata) do naproxeno (**2**) é 248 mg/kg, valor concordante com a categoria II calculada pela ferramenta admetSAR.

A partir dos resultados obtidos na ferramenta admetSAR é possível inferir que os compostos derivados estudados apresentarão boa biodisponibilidade oral, não apresentarão toxicidade comparado ao precursor da derivatização e não serão carcinogênicos. Como desvantagem deve-se considerar que os compostos **7**, **8** e **9** foram classificados com alta promiscuidade inibitória de enzimas do citocromo.

5.1.4 Ancoragem molecular

O estudo de ancoragem molecular dos naproxenatos **7-10** e de seus precursores (naproxeno, timol, carvacrol, eugenol e vanilina) frente a enzimas cicloxigenases 1 e 2 foi realizado na ferramenta iGEMDOCK. Os valores de interação obtidos no estudo com a enzima COX-1 e COX-2 são apresentados nas tabelas 7 e 8, respectivamente.

Com base nos resultados apresentados nas tabelas 6 e 7 é possível inferir que os compostos apresentam valores de energia de interação relativamente próximos aos valores de energia de interação naproxeno-COX e maiores do que os valores apresentados pelos produtos naturais precursores.

No estudo de ancoragem molecular com a enzima COX-1 o naproxenato de timila (**7**) apresentou menor energia de interação e o naproxenato de eugenila (**9**) apresentou maior energia de interação.

Tabela 6 - Energias, em kcal.mol⁻¹, obtidas do estudo de ancoragem molecular, no software iGEMDOCK para a enzima cicloxigenase 1 (PDB 1EQG e PDB 1EQH).

Comp.	PDB 1 EQG				PDB 1 EQH			
	Total	VDW	LH	ELT	Total	VDW	LH	ELT
7	-103,63	-101,13	-2,50	0,00	-111,94	-107,68	-3,44	0,00
8	-116,55	-111,16	-5,38	0,00	-121,94	-115,66	-6,28	0,00
9	-141,28	-125,32	-15,96	0,00	-136,17	-129,63	-6,54	0,00
10	-107,36	-97,99	-9,37	0,00	-128,37	-118,3	-10,07	0,00
2	-101,35	-97,85	-3,50	0,00	-96,47	-91,72	-4,75	0,00
3	-71,52	-66,52	-5,00	0,00	-29,87	-29,87	0,00	0,00
4	-70,69	-64,76	-5,92	0,00	-29,89	-29,89	0,00	0,00
5	-71,94	-71,94	0,00	0,00	-34,48	-34,48	0,00	0,00
6	-68,46	-64,20	-4,26	0,00	-27,78	-27,78	0,00	0,00
média	-94,75	-88,98	-5,76	0,00	-79,65	-76,11	-3,45	0,00

Fonte: Autoria própria.

Tabela 7 - Energias, em kcal.mol⁻¹, obtidas do estudo de ancoragem molecular, no software iGEMDOCK para a enzima cicloxigenase 2 (PDB 3NT1 e PDB 3NTB).

Comp.	PDB 3NT1				PDB 3NTB			
	Total	VDW	LH	ELT	Total	VDW	LH	ELT
7	-108,15	-90,93	-17,22	0,00	-118,55	-111,8	-6,76	0,00
8	-128,44	-114,88	-13,56	0,00	-104,99	-97,99	-7,00	0,00
9	-128,49	-122,49	-6,00	0,00	-98,33	-84,59	-13,74	0,00
10	-123,66	-109,59	-14,07	0,00	-120,41	-103,68	-16,73	0,00
2	-81,87	-79,00	-2,87	0,00	-89,25	-74,345	-12,25	-2,66
3	-70,88	-64,77	-6,11	0,00	-72,61	-66,55	-6,06	0,00
4	-64,19	-61,69	-2,50	0,00	-71,5	-63,43	-8,15	0,00
5	-70,78	-67,28	-3,50	0,00	-74,37	-67,4	-6,97	0,00
6	-64,66	-62,16	-2,50	0,00	-69,05	-48,15	-20,9	0,00
média	-93,45	-85,86	-7,59	0,00	-91,00	-79,77	-10,95	0,00

Fonte: Autoria própria.

No estudo de ancoragem molecular entre a enzima COX-2 o naproxenato de timila (7) apresentou menor energia de interação e o naproxenato de eugenila (9) apresentou maior energia de interação com a enzima, comportamento semelhante ao observado no estudo com a enzima COX-1.

O estudo da região de interação ligante-enzima é a principal informação obtida do estudo de ancoragem molecular. A partir desta informação é possível inferir se uma determinada substância terá ou não um potencial farmacológico. Para apresentar o potencial anti-inflamatório desejado, os naproxenatos devem interagir com os resíduos de aminoácidos Arg-120, Tyr-355, Tyr-385, Val-349 localizados no sítio ativo da enzima cicloxigenase (Figura 14).

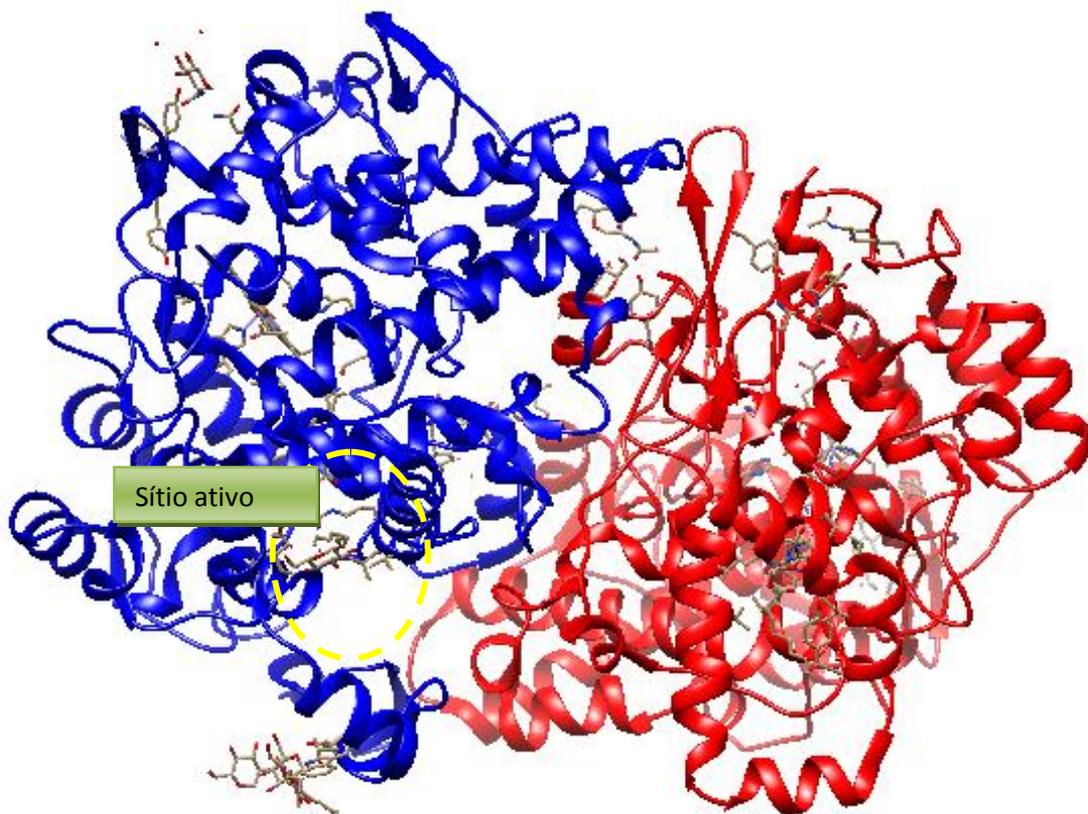


Figura 13 – Estrutura tridimensional da enzima COX-1 PDB 1EQG com destaque para o sítio ativo.

Fonte: Autoria própria.

O sítio catalítico da enzima cicloxigenase é um estreito canal hidrofóbico, cuja entrada é emoldurada por quatro hélices anfipáticas. A arginina 120, um de apenas dois resíduos iônicos encontrados no sítio ativo da COX forma uma rede interagindo com glutamato 524 que é outro resíduo iônico do canal, e com tirosina 355 por ligação de hidrogênio. A parte superior do canal contém tirosina 385, serina 530, isoleucina 523 e valina 349. Uma diferença estrutural importante entre os sítios ativos de COX-1 e COX-2 é uma substituição da isoleucina em 523 da COX - 1 para uma valina 349 na COX-2 (SIMMONS; BOTTING; HLA, 2016).

Na Figura 15, relativa ao estudo de ancoragem molecular com a enzima COX-1 PDB 1EQG, os compostos foram divididos em 3 grupos: no grupo 1 é possível observar a presença do naproxeno e dos produtos naturais; no grupo 2 estão os naproxenatos de carvacrila e de vanilina) e no grupo 3 estão os naproxenatos de timila e eugenila.

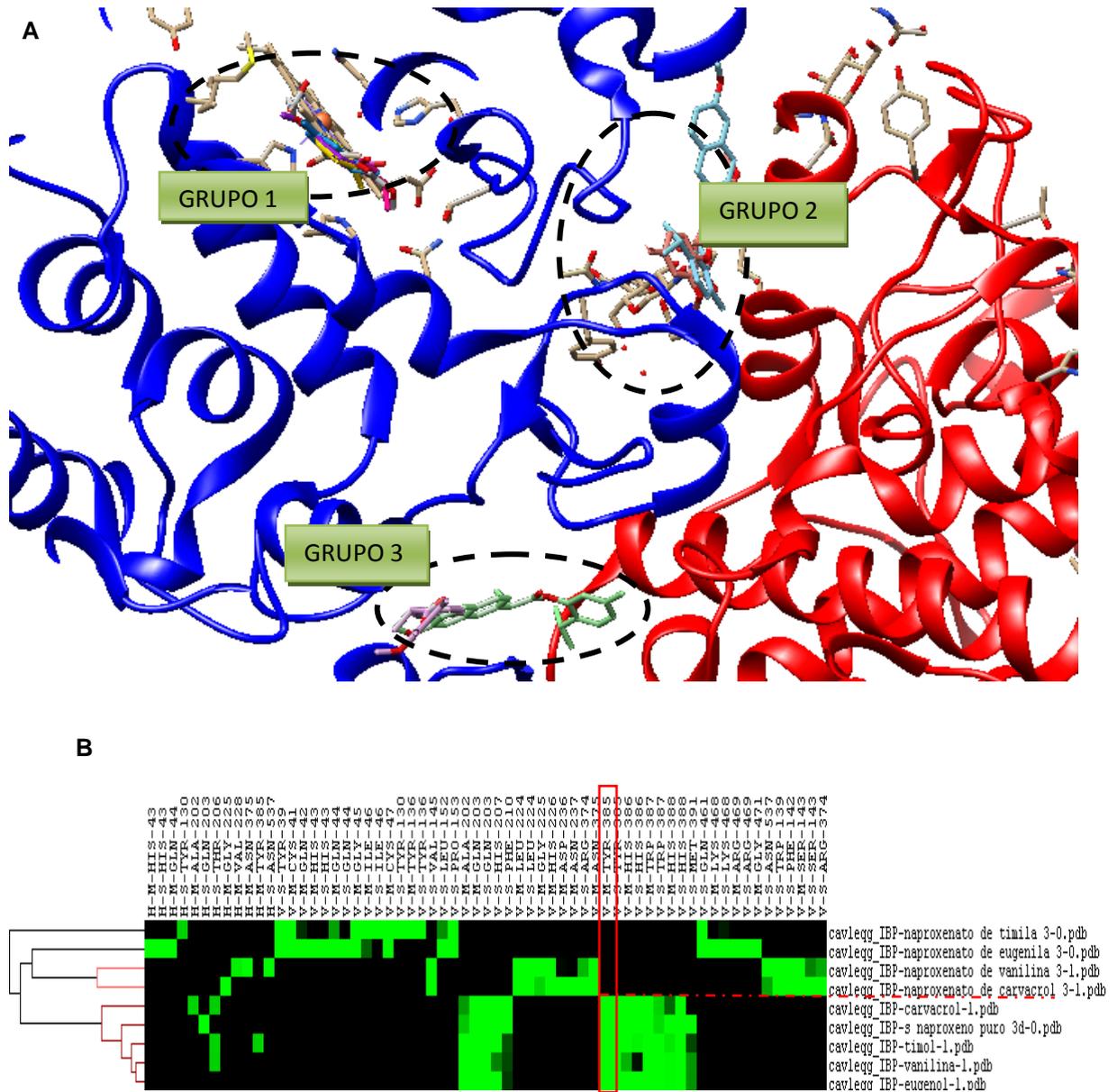


Figura 14 – (a) Representação das interações dos derivados avaliados com a enzima COX-1 PDB 1EQG obtidas no estudo de ancoragem molecular realizado na ferramenta iGEMDOCK e (b) agrupamento hierárquico do perfil de interação dos ligantes.

Fonte: Autoria própria.

No estudo realizado com a enzima COX-1 PDB 1EQH (Figura 16) os compostos se dividiram em 3 grupos: grupo 1 formado pelo naproxeno e seus derivados (naproxenatos de timila, carvacrila e eugenila); grupo 2 formado pelo naproxenato de vanilina) e grupo 3 formado pelos produtos naturais timol, carvacrol, eugenol e vanilina.

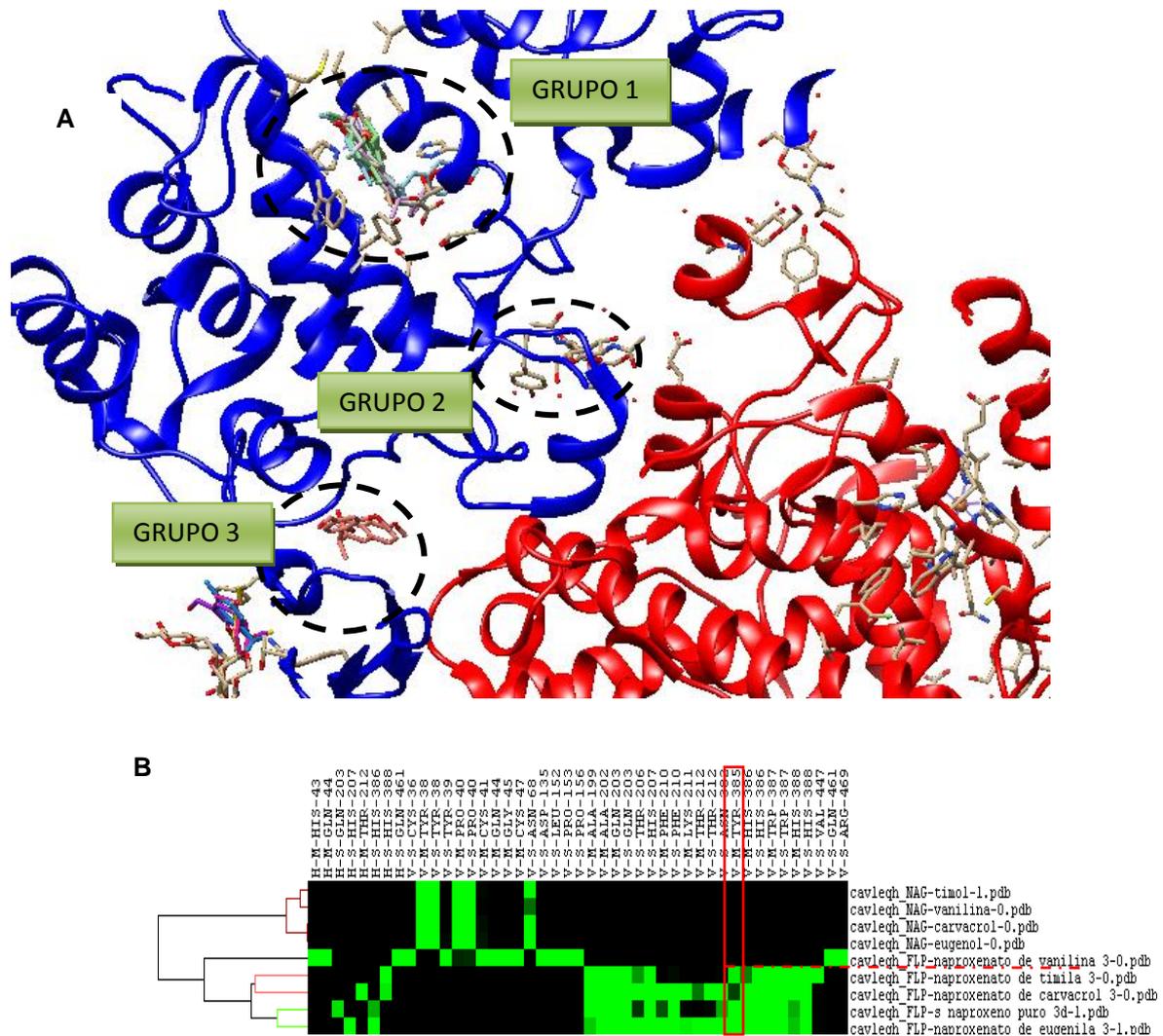


Figura 15 – (a) Representação das interações dos derivados avaliados com a enzima COX-1 PDB 1EQH obtidas no estudo de ancoragem molecular realizado na ferramenta iGEMDOCK e (b) agrupamento hierárquico do perfil de interação dos ligantes.
 Fonte: Autoria Própria.

Na Figura 17, relativa ao estudo de ancoragem molecular realizado com a enzima COX-2 PDB 3NT1, todos os compostos estão ancorados na mesma região da enzima, formando um único grupo.

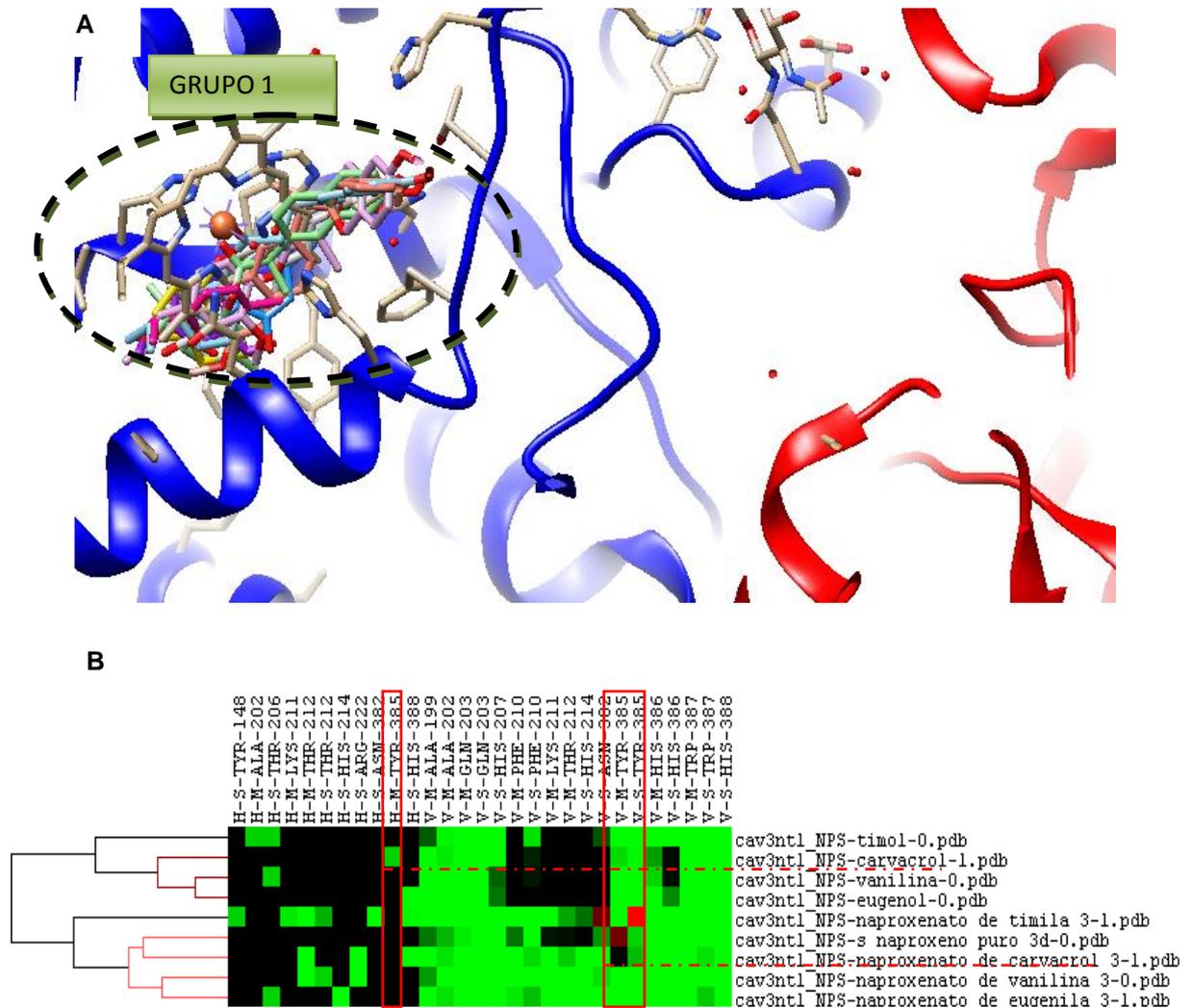
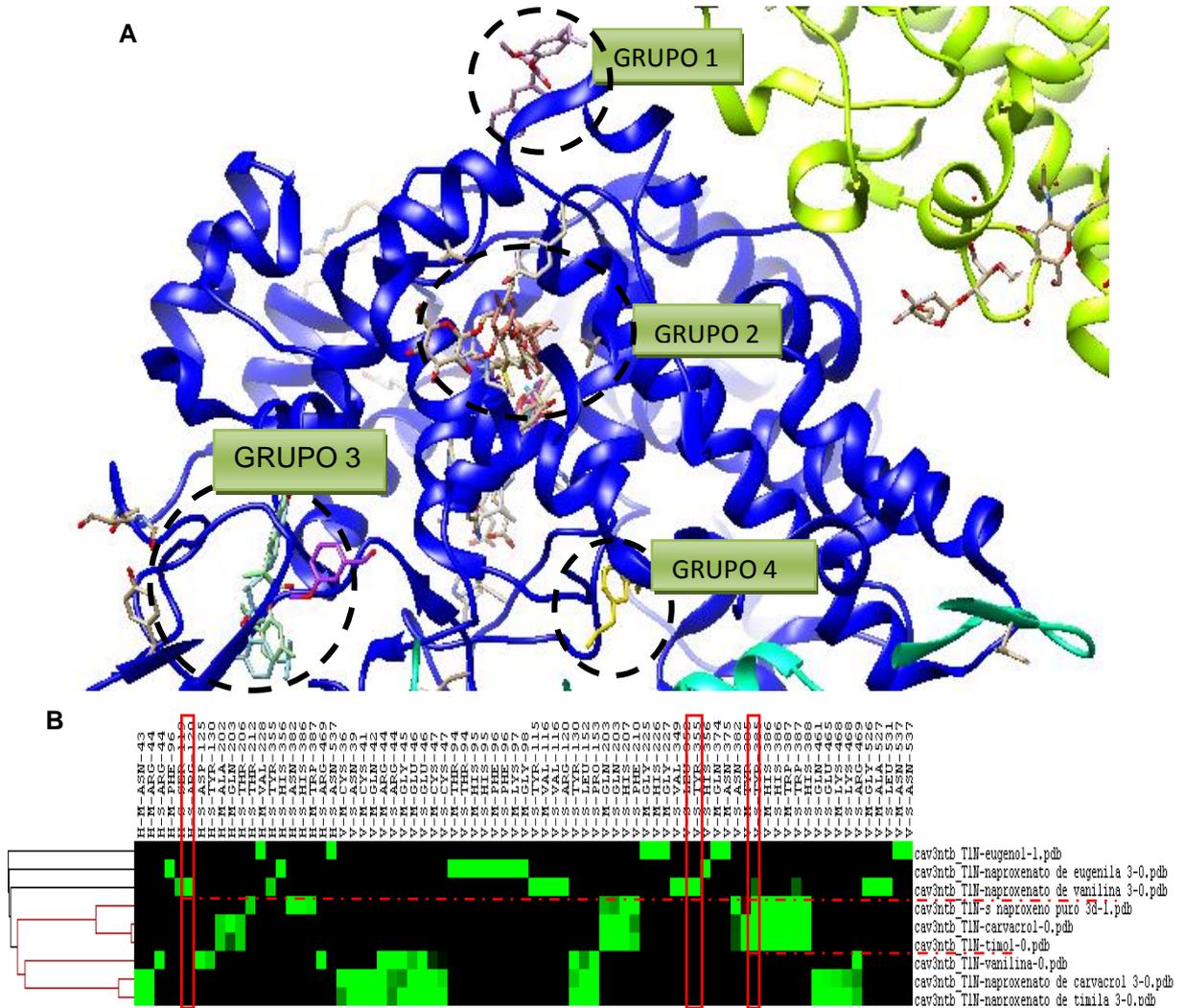


Figura 16 – (a) Representação das interações dos derivados avaliados com a enzima COX-2 PDB 3NT1 obtidas no estudo de ancoragem molecular realizado na ferramenta iGEMDOCK e (b) agrupamento hierárquico do perfil de interação dos ligantes.
 Fonte: Autoria própria.

A Figura 18, relativa ao estudo de ancoragem molecular realizado com a enzima COX-2 PDB 3Q7D, revela a existência de 4 grupos: grupo 1 formado pelos naproxenatos de carvacrila e vanilina; grupo 2 formado pelo eugenol, grupo 3 formado pelo naproxenato de eugenila e grupo 4 formado naproxeno e naproxenato de timila.



direita da imagem é mencionado o composto que está interagindo. Na lateral esquerda um dendograma que agrupa os compostos similares de acordo com os perfis de interações. Quanto menor a distancia dos grupamentos maior a similaridade.

No estudo com a enzima COX-1 PDB 1EQG (Figura 15 b) os derivados não interagem com nenhum dos principais resíduos de aminoácidos (Arg-120, Tyr-355, Ser-320, Tyr-385) presentes no sítio catalítico da enzima. É possível observar que timol interage com o resíduo de aminoácido Tyr 385 por ligação de hidrogênio, o naproxeno e todos os produtos naturais se ligam a Tyr-385 por interação de Van der Waals. A maioria das interações dos compostos com a enzima ocorre através de interações de van der Waals.

Com base na Figura 16, o estudo realizado com a enzima COX-1 PDB 1EQH, o naproxeno e os naproxenatos de timila e de eugenila, estabelecem interações de van der Waals com o resíduo de aminoácido Tyr-385 da cadeia principal (M), os demais compostos não estabelecem interação com nenhum resíduo de aminoácido localizado no sítio catalítico.

A figura 17 ilustra o estudo realizado com a enzima COX-2 PDB 3NT1, no qual a maioria dos compostos interage com os mesmos resíduos de aminoácidos. Como se pode observar todos os compostos estabelecem interações de van der Waals com o resíduo de aminoácido Tyr-385 da cadeia lateral (s) e da cadeia principal (M) com exceção do naproxenato de carvacrila que interage apenas na cadeia lateral. O carvacrol interage com o resíduo de aminoácido da cadeia principal (M) por ligação de hidrogênio.

O naproxenato de eugenila, pertencente ao grupo 3, do estudo com a enzima COX-2 PDB 3Q7D estabelece interação de van der Waals com o resíduo de Tyr-355 da cadeia principal (M). Os naproxenatos de carvacrila e de vanilina e seus produtos naturais precursores, estabelecem interação de van der Waals com os resíduos de Tyr-385 da cadeia principal e lateral.

No estudo com a enzima COX-2 PDB 3NTB (Figura 19), apenas o naproxenato de vanilina interage com os resíduos de aminoácidos Arg-120 e Tyr-355 da cadeia lateral (s) por ligação de hidrogênio, também estabelece interação de van der Waals com os mesmos resíduos Arg-120 e Tyr-355 da cadeia lateral (s). Além disso, ocorre interação de van der Waals com o resíduo de Val-349 da cadeia lateral (s). O naproxeno estabelece interação de van der Waals com Tyr-385 da

cadeia principal (M), timol e carvacrol interagem com Tyr-385 da cadeia lateral (s) por interação de van der Waals.

Com base nos dados analisados é possível inferir que todos os compostos interagem com algum dos resíduos de aminoácidos Arg-120, Tyr-355, Tyr-385 e Val-349 que compõem o canal do sítio catalítico das cicloxigenases. Isso indica a interação dos compostos com o sítio ativo da enzima.

Complementando os estudos de energia de interação dos compostos com as enzimas, observa-se que para a COX-1 PDB 1EQG não houve interação dos compostos com nenhum dos resíduos de aminoácidos do sítio catalítico da enzima, além disso, no estudo com COX-1 PDB 1EQH apenas os compostos naproxenatos de timila e de eugenila estabelecem interações de van der Waals com o resíduo Tyr-385 apresentando menores energias de interações. Já para os estudos com as enzimas COX-2 observou-se o estabelecimento de um número maior de interações intermoleculares, tanto de van der Waals quanto ligações de hidrogênio, com os resíduos de Tyr-385, Tyr-355, Arg-120 e Val-349. Portanto é possível concluir que os compostos avaliados interagem com a COX-1 e também com a COX-2, porém apresentam interações mais favoráveis, tanto em energia quanto em localização, com a enzima COX-2.

5.2 SÍNTESE DE ÉSTERES DERIVADOS DE NAPROXENO

Os ésteres de naproxeno foram sintetizados por meio da metodologia proposta por Steglich (1978). A metodologia se pauta na reação de esterificação através do acoplamento de naproxeno com DCC (dicicloexilcarbodiimida) e o uso do catalisador DMAP (*N,N*-dimetilaminopiridina), onde HO-R é um produto natural fenólico, conforme a reação ilustrada na Figura 20.

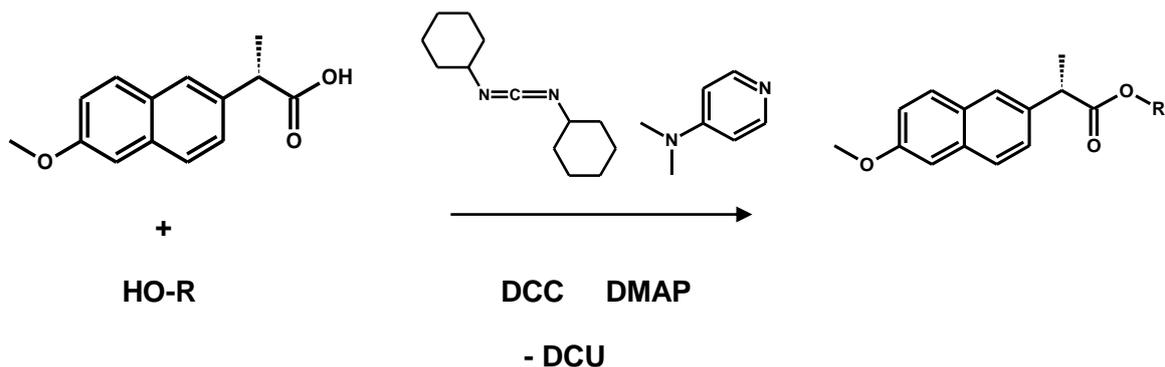
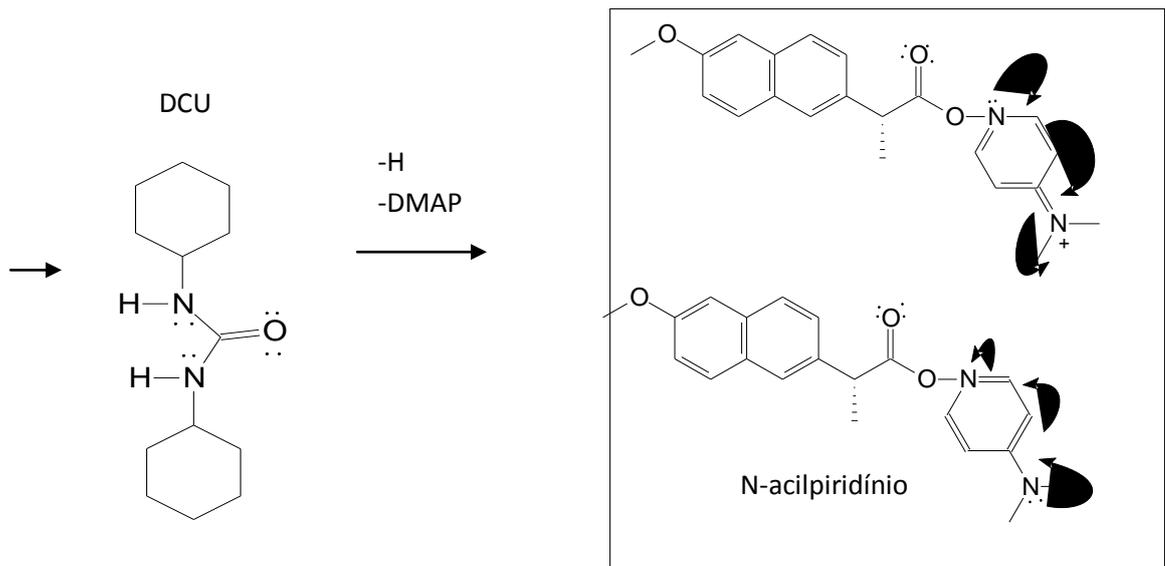
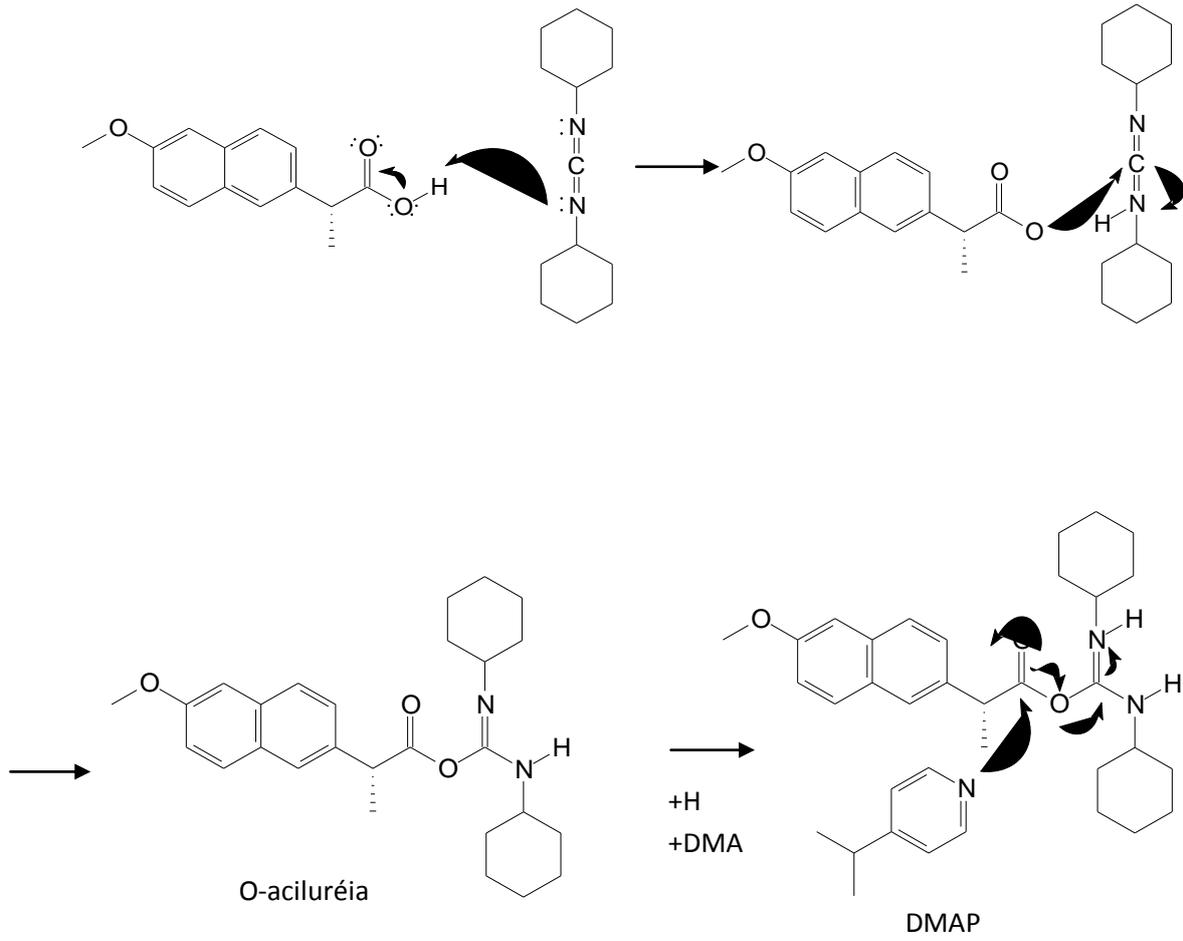


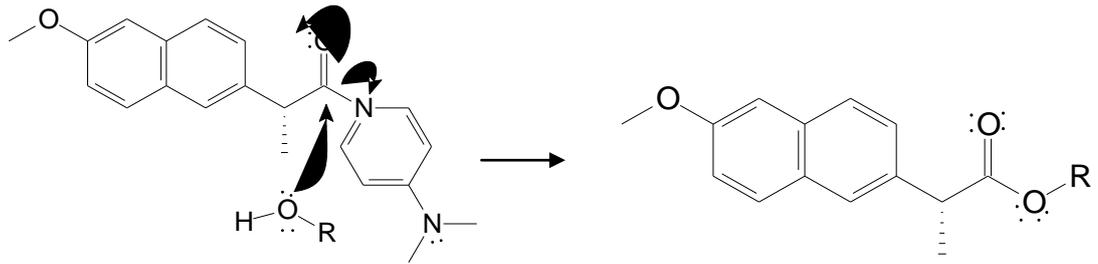
Figura 19 – Representação genérica para a síntese dos ésteres de naproxeno.
Fonte: Autoria própria.

Foram sintetizados os compostos avaliados nos estudos *in silico*: naproxenatos de timila, de carvacrila, de eugenila e de vanilina. Devido a limitação de tempo todos os produtos reacionais foram submetidos a purificação utilizando coluna cromatográfica de sílica gel. No entanto, as funções obtidas não foram agrupadas de acordo com o perfil cromatográfico, o que impossibilitou o cálculo de rendimento reacional.

O Esquema 1, ilustra o mecanismo da reação de esterificação de Steglich que se inicia com a desprotonação do ácido carboxílico do naproxeno por um dos nitrogênios da DCC, em seguida ocorre o ataque do par de elétrons do oxigênio desprotonado ao carbono da DCC formando O-aciluréia. O intermediário O-aciluréia apresenta reatividade correspondente ao anidrido do ácido carboxílico do fármaco.

Em seguida os elétrons desemparelhados do nitrogênio presente na DMAP atacam o carbono carbonílico do ácido, eliminando a dicitloexiluréia (DCU) formando o N-acilpiridínio. O DMAP catalisa a reação formando o N- acilpiridônio, que é mais reativo do que a O-aciluréia, evitando formação de outros produtos e melhorando o rendimento da reação. O carbono carbonílico da amida formada é facilmente atacado pelo oxigênio do álcool ou fenol, devido a sua eletrofilicidade, formando um éster protonado (PASSO, 2012).

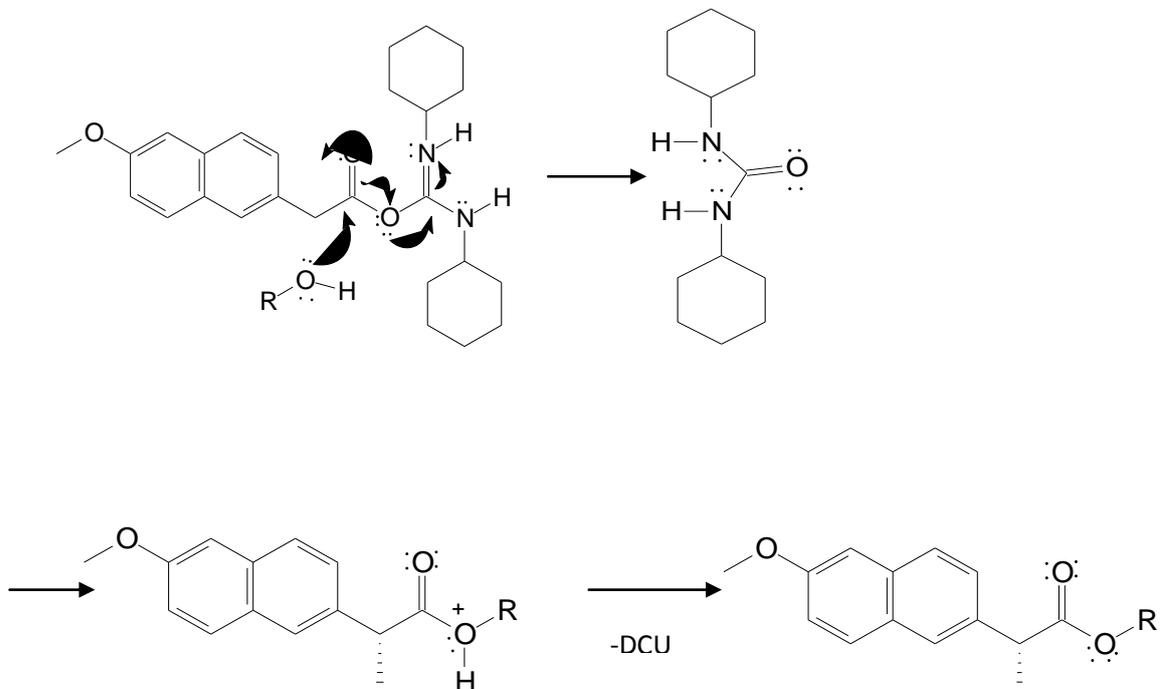




Esquema 1 – Mecanismo de esterificação do naproxeno comou fenol utilizando DCC como agente de acoplamento e DMAP como catalisador.

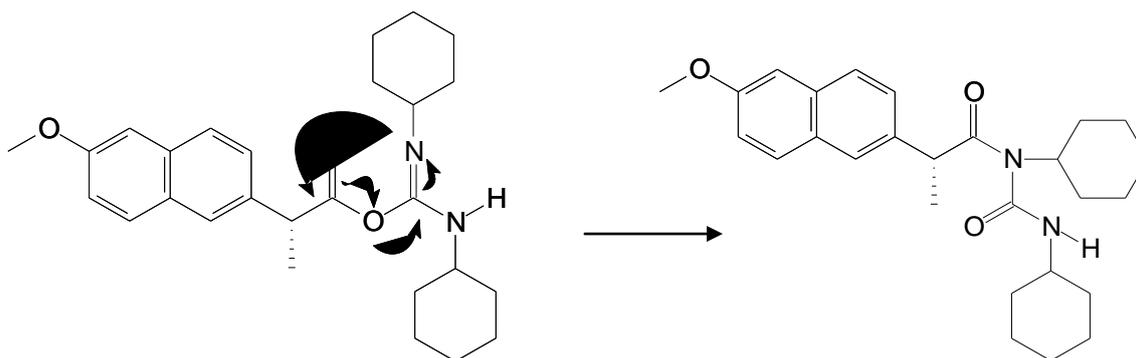
Fonte: Adaptado de PASSO (2012, p. 49).

A reação também ocorre sem a adição do catalisador DMAP (dimetilaminopiridina), porém o intermediário *O*-acilureia captura um próton do meio reacionário aumentando a eletrofilicidade do carbono carbonílico por efeito indutivo e de ressonância (SOUZA, 2015, p. 56). Em seguida o carbono carbonílico sofre um ataque pela hidroxila do álcool ou fenol, eliminando DCU e formando o éster (Esquema 2). Nesse caso, como o nucleófico é pouco reativo pode haver formação de subprodutos, como a tautomerização da *O*-aciluréia, formando *N*-aciluréia (Esquema 3).



Esquema 2 – Mecanismo de esterificação do naproxeno com fenol utilizando DCC como agente de acoplamento.

Fonte: Adaptado de PASSO (2012, p. 50).



Esquema 3 – Mecanismo de tautomerização da O-aciluréia em N-aciluréia.
 Fonte: Adaptado de PASSO (2012, p. 50).

5.3 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS POR RMN

Neste trabalho foram analisados apenas os conjuntos de espectros dos naproxenatos de timila (sólido branco) e de eugenila (sólido ligeiramente amarelado) sintetizados e devidamente purificados, devido à limitação de tempo.

A caracterização dos compostos foi realizada por Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H) e de carbono-13 (RMN de ^{13}C). Foram avaliados e distribuídos os deslocamentos químicos de ^1H , pelo perfil dos sinais observados nos espectros, e de ^{13}C , através da comparação com a literatura. Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C de alguns naproxenatos estão ilustrados nas Figuras. Os deslocamentos químicos de ^1H e de ^{13}C estão de acordo com dados da literatura. A tabela 8 apresenta os deslocamentos químicos do naproxeno e dos naproxenatos de timila e de eugenila.

TABELA 8 – Deslocamentos químicos de ^{13}C e de ^1H do naproxeno e dos naproxenatos de timila e de eugenila.

$\delta \text{ C}/\delta \text{ H}^\#$	Naproxeno	Naproxenato de Timila	Naproxenato de Eugenila
1	180,1	173,2	172,9
2	45,2 / 3,87 (q, $J = 7,15$ Hz, 1H)	45,2 / 4,12 (q, 7,09 Hz, 1 H)	45,2 / 4,13 (q, $J = 7$ Hz)
3	18,2 / 1,58 (d, $J = 7,15$ Hz, 3H)	18,3 / 1,73 (d, 7,09 Hz, 3 H)	18,3 / 1,68 (d, $J = 7$ Hz)
4	134,9	135,2	135,6
5	126,1 / 7,66 – 7,22 (m, 3H, H-5, H-7 e H-12)	126,3 / 7,70-7,80 (m, 3H, H-5, H-7 e H-12)	126,5 / 7,70 – 7,75 (m, 3H, H-5, H-7, H-12)
6	128,9	129,0	129,0
7	129,1 / 7,66 – 7,22 (m, 3H, H-5, H-7 e H-12)	129,3 / 7,70-7,80 (m, 3H, H-5, H-7 e H-12)	129,3 / 7,70 – 7,75 (m, 3H, H-5, H-7, H-12)
8	119,1 / 7,13 (dd, $J = 8,8$ e 2,6 Hz, 3H)	119,1 / 7,08-7,19 (m, 3H, H-8, H-10 e H-17)	118,9 / 7,14 (dd, 8,5 e 2,4 Hz)
9	157,7	157,7	157,6
10	105,6 / 7,10 (t, $J = 2,4$ Hz, 3H)	103,6 / 7,08-7,19 (m, 3H, H-8, H-10 e H-17)	105,6 / 7,23 (t, $J = 2,4$ Hz)
11	133,8	133,9	133,7
12	127,2 / 7,66 – 7,22 (m, 3H, H-5, H-7 e H-12)	127,3 / 7,70-7,80 (m, 3H, H-8, H-10 e H-17)	127,0 / 7,70 – 7,75 (m, 3H, H-5, H-7, H-12)
13	45,2 / 7,40 (dd, $J = 8$ e 1,8 Hz, 3 H)	126,2	126,2 / 7,52 (dd, $J = 8,5$ e 1,8 Hz)
14		147,9 / -	138,2
15		127,0	150,9
16		126,3 / 6,96 (d, 8 Hz, 1 H)	112,8 / 7,79 (d, $J = 1,8$ Hz)
17		122,5 / 7,08-7,19 (m, 3H, H-8, H-10 e H-17)	138,8
18		136,4	120,6 / 6,70 – 6,72 (m)
19		119,1 / 6,72 (m, 1 H)	122,3 / 6,83 (d, $J = 8,2$ Hz)
20		20,8 / 2.26 (s, 3 H)	40,0 / 3,34 (d, $J = 6,7$ Hz)
21		26,6 / 2.61 (s, $J = 7$ Hz)	137,1 / 5,93 (m)
22		22,9 / 0,92 (d, $J = 7$ Hz)	116,0 / 5,05 (m) 5,06 – 5,10 (m)
23		26,7 / 0,95 (d, $J = 7$ Hz)	55,7 / 3,66 (s)

As Figuras 20 a 25 apresentam os espectros de RMN de ^{13}C e de ^1H para o naproxeno e naproxenatos de timila e de eugenila. Os sinais obtidos nos espectros estão coerentes com a estrutura molecular do naproxeno puro. As variações dos deslocamentos químicos em relação ao naproxeno puro e o aparecimento de novos sinais são concordantes com o derivado naproxenato de timila e de eugenila, coincidentes com os da molécula de timol puro. Os picos associados aos carbonos e hidrogênio estão ilustrados nas figuras.

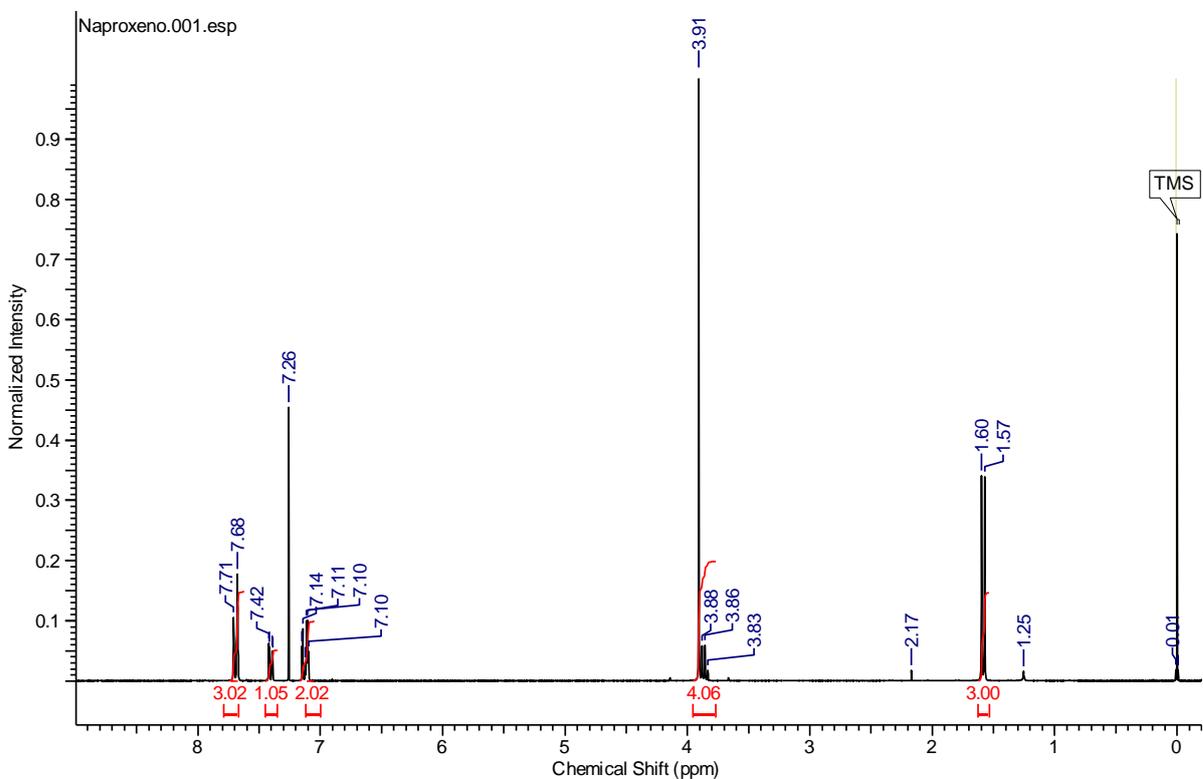


Figura 20- Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) do naproxeno.
Fonte: Autoria própria.

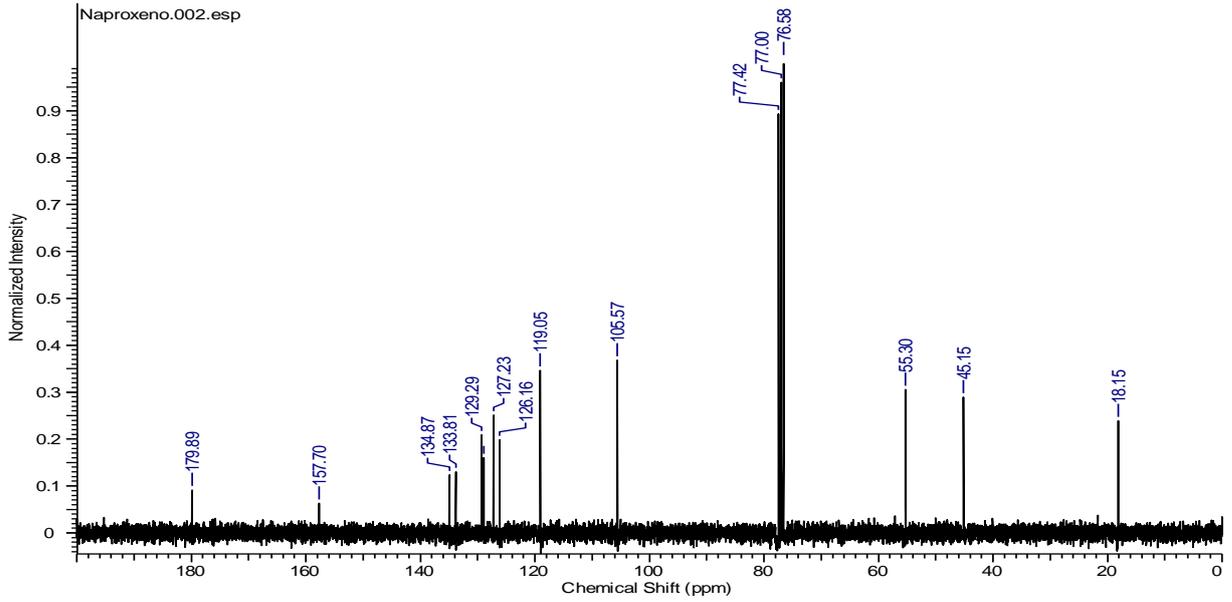


Figura 21 - Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75,5 MHz) do naproxeno.
Fonte: Autoria própria.

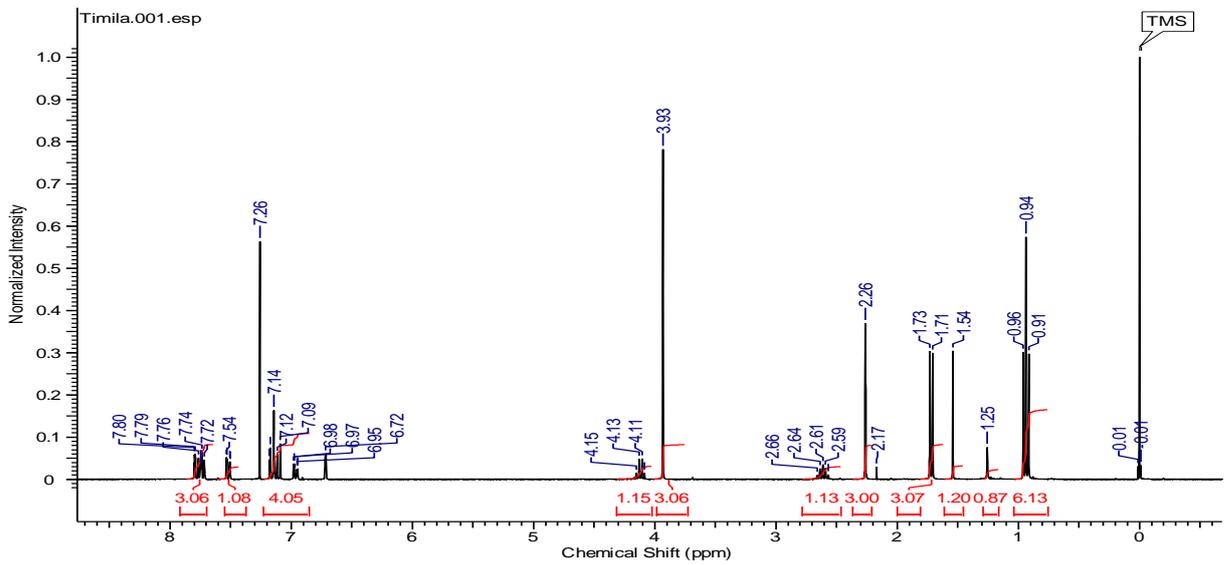


Figura 22 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) do naproxenato de timila.
Fonte: Autoria própria.

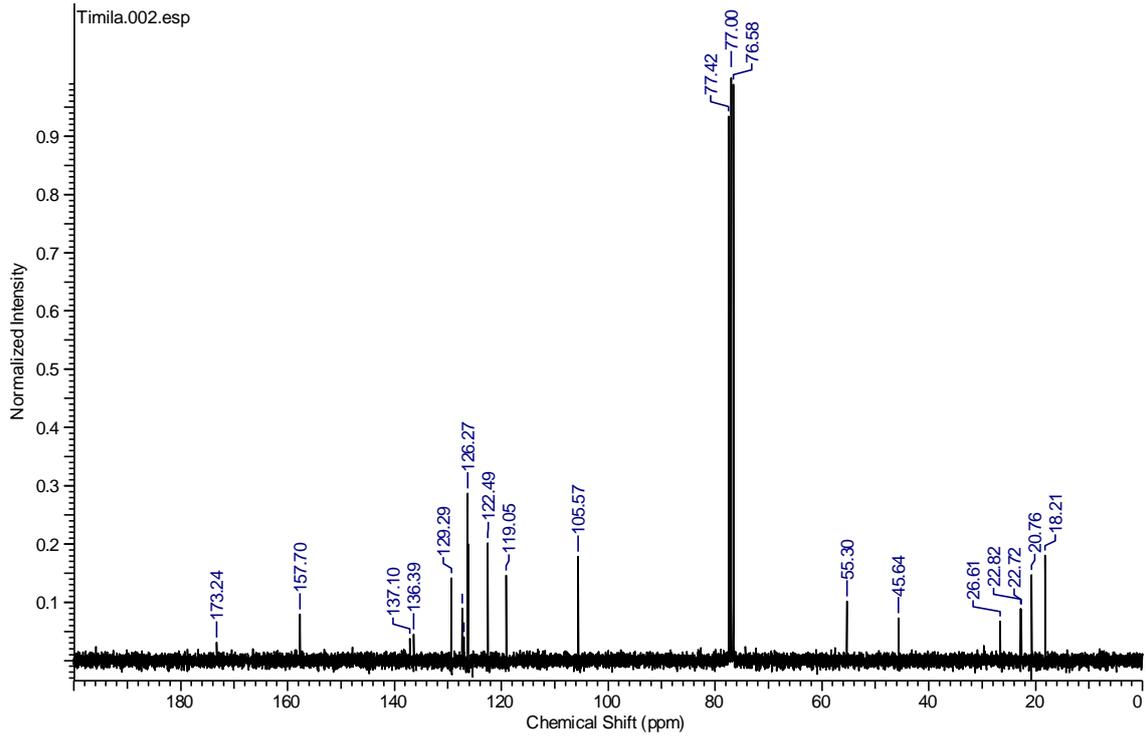


Figura 23 - Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75,5 MHz) do naproxenato de timila.
Fonte: Autoria própria.

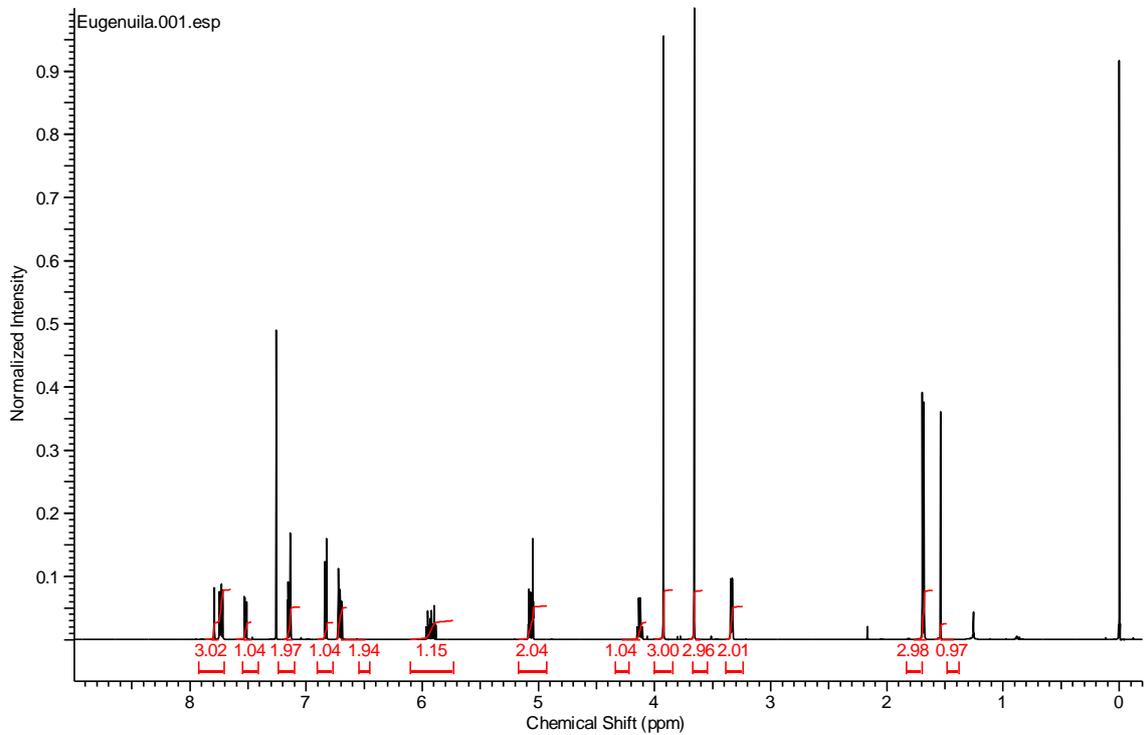


Figura 24 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) do naproxenato de eugenila.
Fonte: Autoria própria.

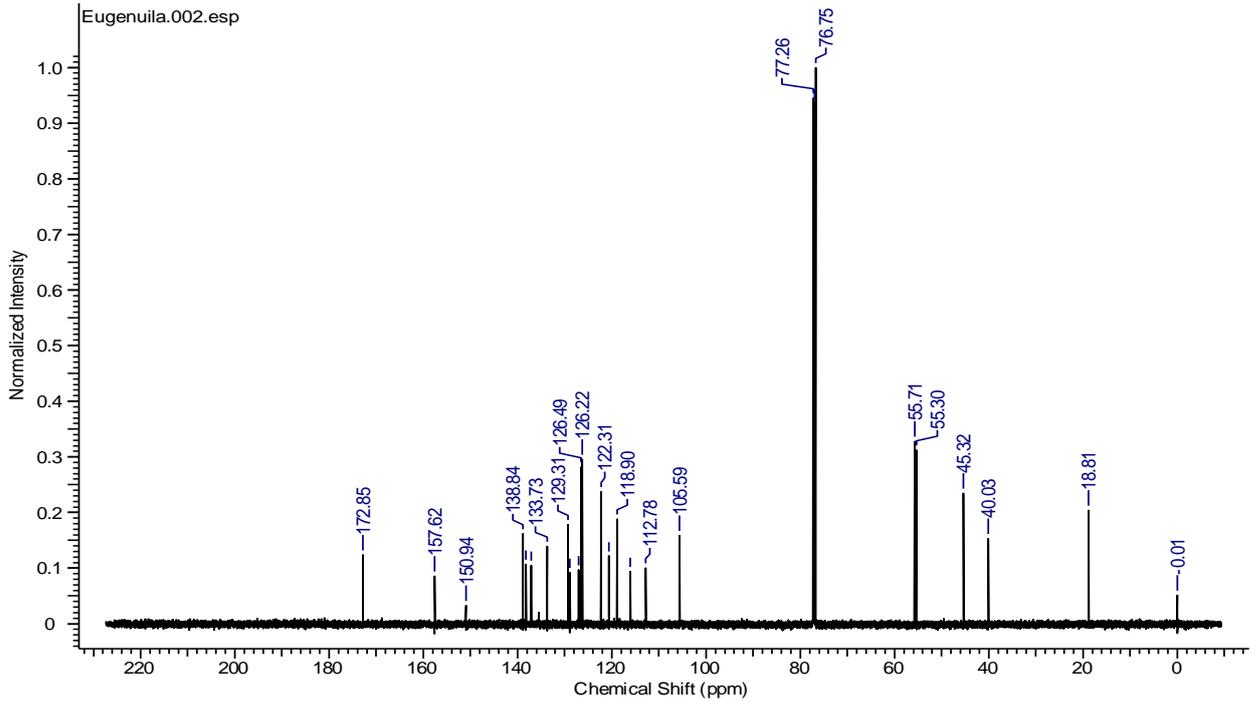


Figura 25 - Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75,5 MHz) do napproxeno de eugenila.
Fonte: Autoria própria.

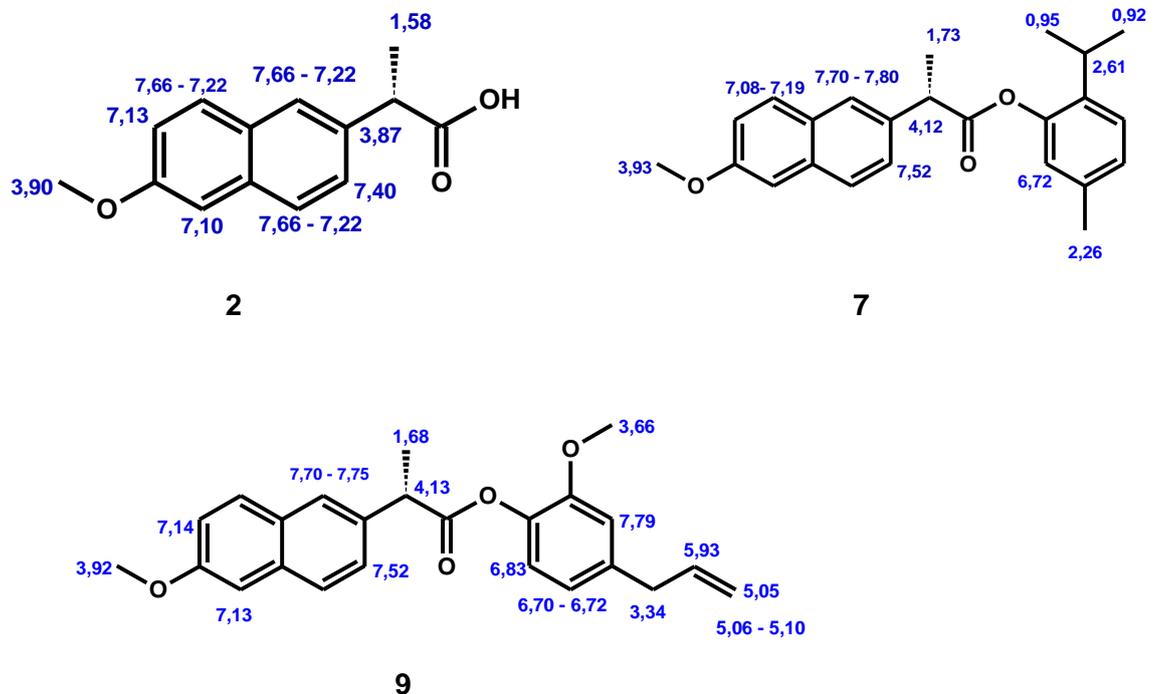


Figura 26 – Deslocamentos Químicos de ^1H do napproxeno (2) e napproxenos de timila (7) e de eugenila (9).
Fonte: Autoria Própria

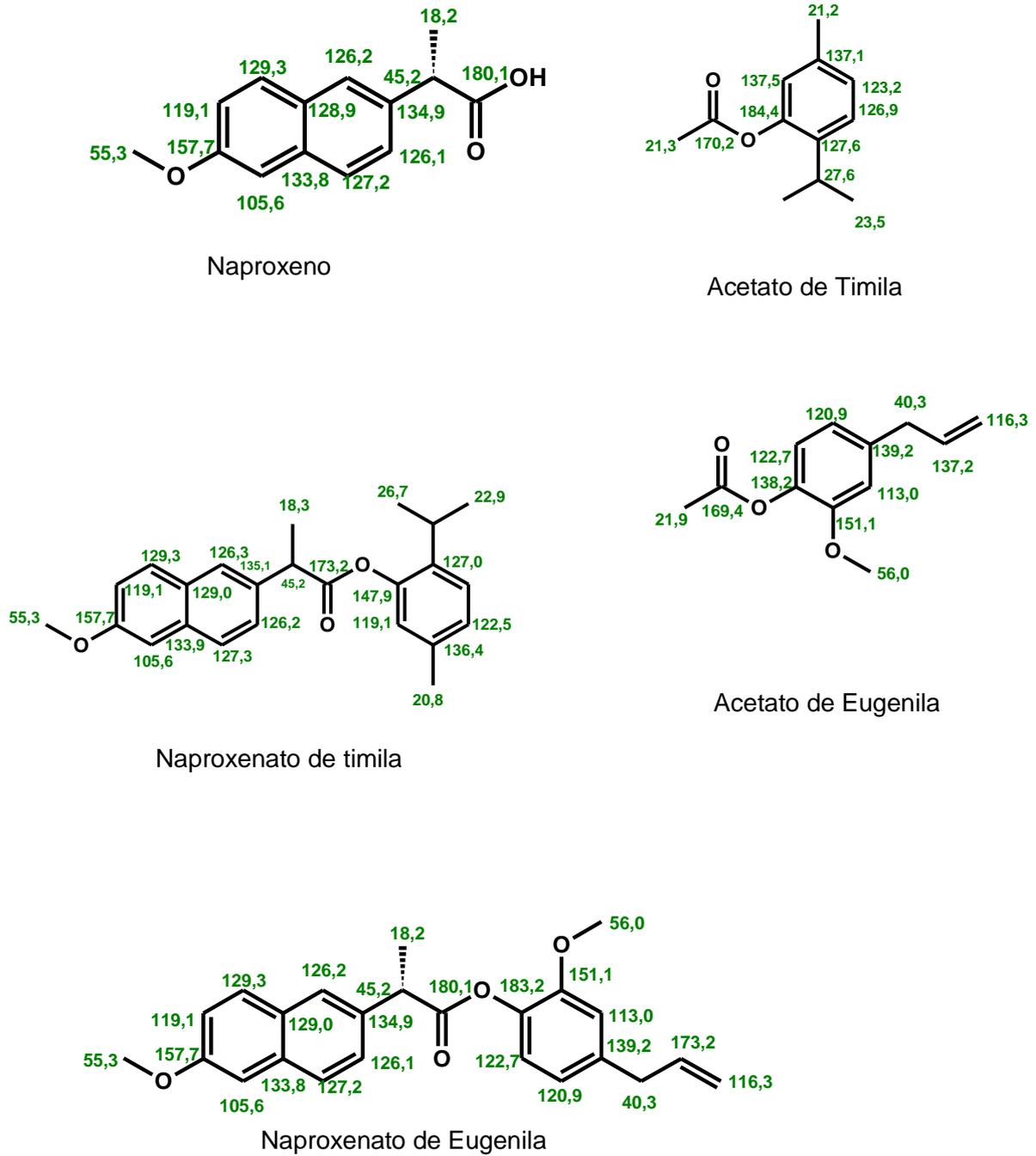


Figura 27 – Deslocamentos Químicos de ^{13}C do naproxeno (2), dos naproxenatos de timila e de eugenila e dos ésteres utilizados como modelo na atribuição dos deslocamentos.
 Fonte: Autoria Própria.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através dos estudos realizados para os compostos foi possível observar que os mesmos violam somente um dos parâmetros da regra de Lipinski, portanto não tendem a apresentar problemas de biodisponibilidade oral. A área superficial polar topológica e o número de bandas rotáveis de todos os compostos avaliados apresentaram valores favoráveis dentro dos parâmetros estabelecidos por Veber et al. (2013). Os scores para bioatividade apresentados pelos naproxenatos **7-10** sugerem uma moderada atividade inibidora de enzimas.

Quanto aos potenciais riscos toxicológicos observou-se uma diminuição dos riscos quando comparado aos precursores sintéticos, com exceção do naproxenato de eugenila que mantém o risco tumorigênico de seu precursor.

Através da avaliação na ferramenta admetSAR foi possível confirmar que os compostos avaliados tendem a apresentar boa biodisponibilidade oral, não apresentam toxicidade comparado ao precursor da derivatização e não serão carcinogênicos.

O estudo de ancoragem molecular entre os ligantes e a enzima COX-2 apresenta maiores valores de energias de interação do que com a enzima COX-1. Os compostos avaliados interagem com as duas isoformas de COX, porém apresentam interações mais favoráveis, tanto em energia quanto em localização, com a enzima COX-2, isso indica que os compostos estudados são inibidores preferenciais desta COX.

Em resumo o estudo *in silico* dos naproxenatos **7-10** sugere que estes compostos apresentam características e propriedades farmacocinéticas de moléculas bioativas condizentes com um candidato a fármaco. Desta forma, novos estudos *in vitro* e *in vivo* serão necessários para confirmar o potencial anti-inflamatório desses naproxenatos.

REFERÊNCIAS

AFONSO, I. F. **Modelagem molecular e avaliação da relação estrutura-atividade acoplados a estudos farmacocinéticos e toxicológicos *in silico* de derivados heterocíclicos com atividade antimicrobiana**. 2008. 136 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

ALMEIDA, R. R. **Mecanismos de ação dos monoterpenos aromáticos: timol e carvacrol**, 2015. 22f. Trabalho de Conclusão de Curso - Curso superior de Bacharelado em Química. Universidade Federal de São João Del-Rei, São João Del-Rei, 2015.

AYATI, Adile et al. Synthesis, in vitro antifungal evaluation and in silico study of 3-azolyl-4-chromanone phenylhydrazones. **Daru Journal pharmaceutical sciences**, v.20, n.1, p.20-46, 2012.

BALLABH, P; BRAUN, A; NEDERGAARD, M. The blood–brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. **Neurobiology of disease**, v. 16, n. 1, p. 1-13, jun. 2014.

BARREIRO, Eliezer J. **Química Medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos**. 3º ed. Porto Alegre: Artmed, 2015.

BATLOUNI, Michel. Anti-Inflamatórios não esteróides: efeitos cardiovasculares, cérebro-vasculares e renais. **Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia**, São Paulo, p. 556-563, fev. 2009.

BAVARESCO, Luci et al. Glicocorticóides: usos clássicos e emprego no tratamento do câncer. **Infarma**, v.17, n.7/9, 2005.

BEZERRA, Mirna M. et al. Enzimas cicloxigenases 1 e 2: inflamação e gastrocardio proteção. **Revista Eletrônica Pesquisa Médica**, Sobral, v. 2, n. 3, p. 01-10, set. 2008.

BELUQUE, Tamyris. **Efeitos da inibição da cox-2 no sistema cardiovascular de cães**. 2014. 19 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso Superior de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2014.

CAIRNS, J, A. The coxibs and traditional nonsteroidal anti-inflammatory drugs: A current perspective on cardiovascular risks. **Journal of cardiology**, v.23, p. 125-131, feb. 2007.

CALDER, Philip C. Polyunsaturated fatty acids and inflammation. **Olc Journal**, Southampton, v.75, n.3, p.197-202, jan. 2004.

CARDOSO, Leal et al, M.C. Pharmacological effects of essential oils of plants of the northeast of Brazil. **An. Acad. Bras. Ci.**, v.71, n.2, p.207-213, 1999.

CASAGRANDE, Diogo et al. Síntese do éster ibuprofeno-eugenol: um composto com potencial atividade anti-inflamatória. Congresso Científico da Região Centro-Ocidental do Paraná. **Anais do Concepar**, Campo Mourão, 2011.

CAYMAN CHEMICAL. **SAFETY DATA SHEET: (S)-Naproxen**. Disponível em: <<https://www.caymanchem.com/msdss/70290m.pdf>>. Acesso em: 18 jun. 2016.

CHARLIER, Caroline et al. Dual inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) and 5 - lipooxygenase (5-LOX) as a new stratege to provide safer non-steroidal anti-inflammatory drugs. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Belgium, p. 645-649, may. 2003.

DALRI, Rita, M, de. **Carga horário dos enfermeiros de emergência e sua relação com estresse e cortisol salivar**. 2013. 205f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

DEJANA, Elisabetta. Endothelial cell-to-cell junctions. **Nature Publishing Group**. Milan, v.5, abril, 2004.

FRANCA, Tanos C. C. et al. Aspectos químicos e biológicos do óleo essencial de Cravo da Índia. **Revista Virtual de Química**, Rio de Janeiro, v. 4, n. 2, p. 146-161, out. 2012.

GUANG-SHU, W. et al. Synthesis, crystal structure and biological activities of naproxen-eugenol ester prodrug. **The Editorial Department of Chemical Research in Chinese Universities and Springer-Verlag GmbH**, Changchun, v.29, n.2, p. 245-248, 2013.

GIACOMINI, Kathleen; MATSON, Par; KIDO, Yasuto. Profiling of a Prescription Drug Library for Potential Renal Drug–Drug Interactions Mediated by the Organic Cation Transporter 2. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.54, n.13, p. 4548-4558, nov. 2011.

JUVEKAR, A. R.; SAKAT, S. S; GAMBHIRE, M. N. In vitro antioxidant and anti-inflammatory activity of methanol extract of *Axalis corniculata* Linn. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, Índia, v.2, n.1, p. 146-155, nov. 2009.

LABORATÓRIO TEUTO BRASILEIRO S/A. **Modelo de bula com informações técnicas aos profissionais de saúde**. Teuto. Indústria Brasileira, Anápolis, 1999.

MARTINS, André, B. **Concentração e atividade sérica da mieloperoxidase em indivíduos Tabagistas**. 2010. 79f. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia aplicada à Farmácia) – Faculdade de Ciências farmacêuticas, Universidade Estadual “Júlio Mesquita Filho” de Araraquara, São Paulo, 2010.

MATEUS, Ana F. G. **O uso clínico dos anti-inflamatórios não esteróides**. 2014. 48 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências e Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2014.

MEUNIER, B.; DE VISSER, S.P.; SHAIK, S. Mechanism of oxidation reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. **Chemical Review.**, v. 104, n. 9, p. 3947-3980, sep. 2004.

MICHELI, Douglas, C. **Participação de mediadores circulantes na redução da migração de neutrófilos em pacientes com neoplasia de colo uterino**. 2009. 103f. Dissertação (Mestrado em Patologia Clínica) – Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, Minas Gerais, 2009.

NEVES, Dieniffer P. **Estudo farmacológico do timol e carvacrol sobre a contratilidade da aorta isolada de rato**. 2009. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual do Ceará. 2009.

PASSO, Joel A. **Síntese e caracterização de novos polímeros líquido-cristalinos de cadeia lateral derivados do heterociclo 2-isoxazolínico 3,5-dissubstituído**. 2012. 215 f. Tese (Doutorado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2012.

PROTEIN DATA BANK. Disponível em: < <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>>. Acesso em: 18 out. 2015.

PUNCHARD, Neville A. et al. Journal of inflammation. **Biomed Central**, v.1, n.1, p. 1476-2255, 2004.

RABÊLO, Waléria F. **Caracterização química, toxicidade e avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial do cravo da índia (Syzgium aromaticum)**. 2010. 79 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Programa de Pós Graduação em Química, Universidade Federal do Maranhão, São Luiz, 2010.

REGO, Elisabete A. **Avaliação da Actividade Anti-inflamatória de Plantas dos Açores**. 2012. 119 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) – Faculdade de Ciências Tecnológicas e Desenvolvimento, Universidade dos Açores, Ponta Delgada, 2012.

RODRIGUES, Joana F. M. **Síntese de derivados acilados do anti-inflamatório Naproxeno**. 108 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, 2012.

ROMERO, A. L.; ROMERO, R.B. Inibição de Cicloxigenases 1 (COX-1) e 2 (COX-2) por Monoterpenos: um Estudo in Silico. **UNOPAR Científica: Ciências Biológicas e da Saúde**, v.16, n.4, p. 307-316, Jun. 2014.

SILVA, Deisiane A. **Screening de produtos naturais com potencialidade para tratamento de doenças ocasionadas por *Helicobacter pylori*: um estudo in vitro e in silico**. 2015. 108 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso Superior de Licenciatura em Química. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2015.

SIMMONS, Daniel et al. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. **Pharmacological Reviews**, v. 56. p. 387-437, sep. 2004.

SOUZA, João P. A. **Síntese e estudo de docking molecular e Qsar de derivados do ácido cinâmico como potenciais inibidores de HIV-1 protease**. 2015. 90 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso Superior de Licenciatura em Química. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2015.

SOUSA, D. P.; ANDRADE, L. N.; SILVEIRA, R. C. S. A Review on anti-inflammatory activity of monoterpenes. **Molecules**, v.18, p.1227-1237, 2013.

VEBER, Daniel F. et al. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 12, p. 2615-2623, 2002.

TANG, Yun et al. Insights into Molecular Basis of Cytochrome P450 Inhibitory Promiscuity of Compounds. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v.51, n.10, p. 2482-2495, 2011.