

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PIAUÍ**

CENTRO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**AUTOMETÁTESE DA DL-KAVAIN E AVALIAÇÃO DA  
ATIVIDADE MUTAGÊNICA EM CÉLULAS  
SOMÁTICAS DE *Drosophila melanogaster***

**THAIS TEIXEIRA DA SILVA**

**ORIENTADOR(A): PROF. DRA. FRANCIELLE ALLINE MARTINS**

**CO-ORIENTADOR(A): PROF. DR. JOSÉ LUIZ SILVA SÁ**

Teresina – PI

2019

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PIAUÍ**

CENTRO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**AUTOMETÁTESE DA DL-KAVAIN E AVALIAÇÃO DA  
ATIVIDADE MUTAGÊNICA EM CÉLULAS  
SOMÁTICAS DE *Drosophila melanogaster***

**THAIS TEIXEIRA DA SILVA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Piauí, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Química – Área de concentração: Síntese Orgânica e Bioprospecção Fitoquímica  
Orientadora: Profa. Dra. Francielle Aline Martins

Teresina – PI

2019

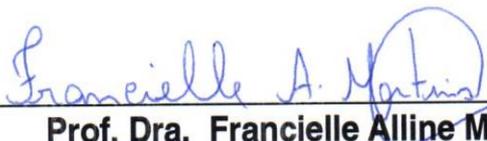
**“AUTOMETÁTESE DA DL-Kavain E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE  
MUTAGÊNICA EM CÉLULAS SOMÁTICAS DE *Drosophila melanogaster*”**

**THAIS TEIXEIRA DA SILVA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da  
Universidade Estadual do Piauí, como parte dos requisitos necessários à obtenção do  
título de Mestre em Química – Área de concentração: Química

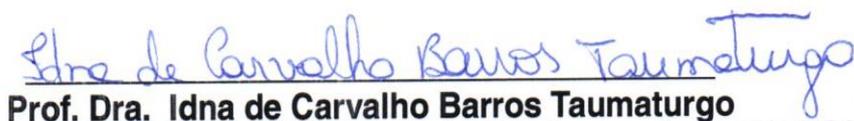
Aprovada em 09 de maio de 2019.

Membros da Banca:



**Prof. Dra. Francielle Aline Martins**

**(Presidente da Banca-UESPI)**



**Prof. Dra. Idna de Carvalho Barros Taumaturgo**

**(Membro Titular-IFPI)**

  
**Prof. Dr. Janildo Lopes Magalhães**

**(Membro Titular-UFPI)**

  
**Prof. Dr. José Luiz Silva Sá**

**(Membro Suplete-UESPI)**

Teresina – PI  
2019

*Dedico aos meus pais Solange e Erismar.*

## **AGRADECIMENTOS**

---

*Acima de tudo a Deus, por me conceder força e determinação, e por mostrar-me que mesmo com as dificuldades devo dar o melhor de mim.*

*A todos do grupo de pesquisa do Prof. José Luiz e ao LABGENE, pela companhia, apoio e ensinamentos durante esses anos, os quais foram essenciais para finalizar esse trabalho com sucesso.*

*A professora/Orientadora/amiga Dra. Francielle Alline Martins e ao professor/Co-Orientador/amigo Dr. José Luiz Silva Sá, por toda confiança, amizade e pelos muitos ensinamentos durante esses anos, os quais foram imprescindíveis para a finalização e sucesso deste trabalho. Foi uma honra trabalhar com vocês, são excelentes profissionais e seres humanos incríveis, obrigada por tudo.*

*Aos meus pais Solange e Erismar por todo amor, carinho e incentivo incondicional, obrigada por acreditarem em mim e por permitirem que eu lute pelos meus objetivos.*

*Aos meus familiares, minhas irmãs Érica e Talita, aos meus amigos e meu namorado Bruno, pela paciência, apoio e motivação no decorrer desse longo percurso.*

*Aos professores que participaram da banca de qualificação e defesa, os professores: Dra. Idna de Carvalho Barros Taumaturgo, Dr. Janildo Lopes Magalhães, Dr. Antônio Luiz Martins Maia Filho, Dr. Pedro Marcos de Almeida, pelas correções e sugestões, foram indispensáveis.*

*A todos os professores do programa de pós-graduação da UESPI.*

*A FAPEPI, pela bolsa de estudos, e UESPI por ceder o GERATEC e LABGENE, juntamente com todo o material, que tornaram possível o desenvolvimento desse trabalho.*

*Ao Instituto de São Carlos (IQSC- USP) por análises químicas, e Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) pelas análises computacionais, que contribuíram para elucidação desse estudo.*

*“Depois da tempestade, vem outra tempestade.*

*Feliz é quem sabe dançar na chuva”.*

*Marcel Camargo*

## RESUMO

SILVA, T. T. **Autometátese da DL-Kavain e avaliação da atividade mutagênica em células somáticas de *Drosophila melanogaster***. 2019. 66 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual do Piauí. Teresina.

A molécula de Kavain é o componente majoritário entre as cavalactonas presente em *Piper methysticum* G. Forster, apresenta atividades farmacológicas tais como: anticonvulsivas, analgésicas, ansiolíticas, antiepilépticos, antitrombóticas, anti-inflamatórias, antioxidante. O que leva ao interesse de sintetizar compostos a partir desta molécula, que poderão apresentar uma atividade melhorada. Este trabalho propôs sintetizar, via autometátese de olefinas, estes compostos, bem como avaliar o potencial efeito da Kavain sobre o DNA por meio do teste de mutação e recombinação somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*. As sínteses foram realizadas utilizando o catalisador de Grubbs 2ª geração sob condições variáveis de temperatura, tempo e proporções de catalisador:Kavain e analisadas por RMN e CG-EM. No bioensaio, larvas de *D. melanogaster* em terceiro estágio dos cruzamentos padrão (ST) e de alta bioativação metabólica (HB) foram tratadas com diferentes concentrações da Kavain (32, 64 e 128 µg/mL) isoladas e em associação com DXR (0,125 mg/mL), ao completarem o ciclo, a ocorrência de manchas mutantes nas asas foi avaliada. Observaram-se os produtos esperados com proporção de catalisador:substrato de 1:1 mol, nas condições de 50°C por 48 e 96h. A conversão de substrato para a formação do estilbeno foi maior que para formação do bis(4-metoxi-6-vinil-2H-pirona), os dois produtos obtidos. É possível que o baixo rendimento do bis(4-metoxi-6-vinil-2H-pirona), ocorreu devido a coordenação dos grupos oxigenados da parte metoxi-pirona da Kavain ao centro metálico, formando um intermediário mais estável e menos favorável a formação do produto. A catálise deste trabalho foi interpretada relacionando às características do catalisador e substrato, especialmente eletrônicas e estéricas. Na descendência ST, a Kavain não apresentou efeito mutagênico ou recombinogênico. Já no cruzamento HB, atividade mutagênica foi observada nas concentrações de Kavain 64 e 128 µg/mL. Quando administrada em co-tratamento simultaneamente a DXR, no cruzamento ST, a Kavain 32 µg/mL inibiu (75,94%) a atividade mutagênica da DXR enquanto a 128 µg/mL potencializou o dano ao DNA em 33,04%. Já no cruzamento HB, observou-se

indução (10,28%) e inibição (53,66%) do dano ao DNA nas concentrações de 32 e 64 µg/mL, respectivamente. O efeito mutagênico da Kavain e a observação de efeitos antagônicos dependente da concentração e da quantidade de enzimas metabólicas do complexo CYP450 quando em associação com a DXR ressaltam a importância da realização de testes toxicogenéticos a fim de garantir uma administração segura.

**Palavras-chave:** Autometátese, *Drosophila melanogaster*, mutagênese, SMART.

## ABSTRACT

The Kavain molecule is the major component among the coumarones present in Kava (*Piper methysticum* G. Forst), exhibits different pharmacological activities, including: anticonvulsive, analgesic, anxiolytic, antiepileptic, antithrombotic, anti-inflammatory and antioxidant. What brings us to the interest of synthesizing compounds from this molecule, which may present an improved activity. The aim of this work was to synthesize these compounds by Self metathesis of olefins, as well as to evaluate the potential effect of Kavain on DNA by means of the mutation and somatic recombination test (SMART) in *Drosophila melanogaster*. In the bioassay, third-stage larvae derived from a standard (ST) cross and exhibiting high metabolic bioactivation (HB) were treated with different kavain concentrations (32, 64 and 128 µg/mL), alone and in combination with DXR (0.125 mg/mL), at the end of the cycle, the occurrence of mutant spots on the wings was evaluated. The expected products with catalyst: substrate proportion of 1: 1 mol were observed under conditions of 50 °C for 48 and 96 hours. The conversion of substrate to the formation of stilbene was higher than for formation of bis (4-methoxy-6-vinyl-2H-pyrone), the two products obtained. It is possible that the low yield of the bis (4-methoxy-6-vinyl-2H-pyrone) occurred because of the coordination of the oxygenated groups of the methoxy pyrone part of the Kavain to the metallic center, forming a more stable intermediate and less favorable formation of product. The catalysis of this work was interpreted relating to the characteristics of the catalyst and substrate, mainly electronic and steric. . In ST offspring, kavain showed no mutagenic or recombinogenic effect. In the HB cross, mutagenic activity was observed at kavain concentrations of 64 and 128 µg/mL. When co-administered simultaneously DXR treatment, ST crossing the kavain 32 ug / mL inhibited (75.94%) of the mutagenic activity whereas the DXR 128 ug / ml potentiate DNA damage in 33.04%. Induction (10.28%) and inhibition (53.66%) of DNA damage were observed at the concentrations of 32 and 64 µg / mL, respectively. The mutagenic effect of kavain and the antagonistic effects that depend on the concentration and amount of CYP450 complex metabolic enzymes when combined with DXR underscore the importance of toxicogenetic tests before new drugs are approved in order to ensure safe administration to the public.

**Keywords:** Self Metathesis, *Drosophila melanogaster*, mutagenesis, SMART.

## LISTA DE FIGURAS

---

<b>Figura 2.1.</b> Detalhes da folha de <i>Piper methysticum</i> G. Forster [2].....	16
<b>Figura 2.2.</b> Estrutura química das seis majoritárias cavalactonas [10].....	17
<b>Figura 2.3.</b> Estrutura química da cavalactona Kavain.....	18
<b>Figura 2.4.</b> Reação de metátese de olefinas [Adaptada de 32]. ....	20
<b>Figura 2.5.</b> Mecanismo geral da reação de metátese de olefinas [35]. ....	20
<b>Figura 2.6.</b> Mecanismo da reação de metátese de olefinas [37].....	21
<b>Figura 2.7.</b> Tipos de reações de metátese de olefinas [Adaptada de 32].....	22
<b>Figura 2.8.</b> Reação de autometátese. ....	23
<b>Figura 2.9.</b> Catalisadores de Schrock [48].....	24
<b>Figura 2.10.</b> Catalisadores de Grubbs de primeira (a) e segunda (b) geração. ....	25
<b>Figura 2.11.</b> A esquerda, fêmea trans-heterozigoto marcado (asa borda lisa); a direita, macho heterozigoto balanceado (asa borda serrilhada) de <i>D. melanogaster</i> . Fonte: Própria do autor. ....	26
<b>Figura 2.12.</b> Ciclo de vida da <i>D. melanogaster</i> . ....	27
<b>Figura 2.13.</b> Mancha simples com pelos <i>flr<sup>3</sup></i> (A) e <i>mwh</i> (B) e mancha gêmea <i>mwh</i> e <i>flr<sup>3</sup></i> (C) observadas em microscópio óptico (aumento de 400x). ....	28
<b>Figura 2.14.</b> Pares de asas de <i>D. melanogaster</i> ; asas com bordas serrilhadas (A) e com bordas lisas (B).....	29
<b>Figura 2.15.</b> Representação do cruzamento padrão (ST): fêmeas virgens <i>flr<sup>3</sup></i> cruzadas com machos <i>mwh</i> dão origem a indivíduos trans-heterozigotos marcados (MH) e heterozigotos balanceados (BH) [60]. .	30
<b>Figura 2.16.</b> Estrutura química da doxorubicina [74]. ....	31
<b>Figura 4.1.</b> Reação de autometátese da Kavain.....	38
<b>Figura 4.2.</b> Cromatograma de CG-EM da mistura resultante a partir da metátese da Kavain, condições de catalisador:substrato 1:100 mol, 25°C (esquerda) e 50°C (direita), por 24h. ....	40

<b>Figura 4.3.</b> Cromatograma de CG-EM da mistura resultante a partir da metátese da Kavain, condições de: substrato/catalisador 1:1 mol, 50°C por 48h (A) e 96h (B). .....	40
<b>Figura 4.4.</b> Espectros de RMN de <sup>1</sup> H da Kavain pura (azul), e da mistura resultante da metátese sob condições de: substrato/catalisador 1:1 mol e 50°C por 48h (vermelho) e 50°C por 96h (azul).....	41
<b>Figura 4.5.</b> Esquema reacional da autometátese da Kavain catalisado por G2. ....	42
<b>Figura 4.6.</b> Esquema reacional para formação do estilbeno (Produto 3) e bis(4-metoxi-6-vinil-2H-pirona) (Produto 2); rendimentos da mistura resultante da síntese sob condições de: substrato/catalisador 1:1 mol e 50°C por 96h.....	44

## LISTA DE TABELAS

---

- Tabela 4.1.** Variações das condições reacionais. .... 39
- Tabela 4.2.** Resultados observados nos descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) e nos heterozigotos balanceados (BH) de *Drosophila melanogaster* derivados do cruzamento padrão (ST), tratados com de Kavain (KV), Doxorubicina (DXR, controle positivo) e Acetona 2% (controle negativo). .... 46
- Tabela 4.3.** Resultados observados nos descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) e nos heterozigotos balanceados (BH) de *Drosophila melanogaster* derivados do cruzamento de alto-bioativação (HB), tratados com Kavain (KV), Doxorubicina (DXR, controle positivo) e Acetona 2% (controle negativo). .... 49

## SUMÁRIO

---

<b>CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
1.1 Objetivos .....	15
1.1.1 Objetivo geral .....	15
1.1.2 Objetivos Específicos .....	15
<b>CAPÍTULO 2 - REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>16</b>
2.1 Kava ( <i>Piper methysticum</i> G. Forst).....	16
2.2 DL-Kavain .....	18
2.3 Metátese de olefinas .....	19
2.3.1 Autometátese .....	22
2.3.2.Catalisadores usados em Metátese de Olefinas.....	23
2.4 Teste de Mutação e Recombinação Somática – SMART .....	25
2.4.1 Linhagens de <i>D. melanogaster</i> no SMART .....	28
2.4.2 Cruzamentos.....	29
2.4.3 Doxorrubicina .....	30
<b>CAPÍTULO 3 - METODOLOGIA EXPERIMENTAL .....</b>	<b>33</b>
3.1 Autometátese da Kavain .....	33
3.1.1 Materiais e Reagentes .....	33
3.1.2 Procedimentos Gerais de Síntese .....	33
3.1.3 Análises .....	34
3.2 Teste de Mutação e Recombinação Somática – SMART .....	34
3.2.1 Agentes Químicos .....	34
3.2.2 Linhagens de <i>D. melanogaster</i> .....	35
3.2.3 Cruzamentos.....	35
3.2.4 Bioensaio .....	35
3.2.5 Análise Estatística .....	36
<b>CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>38</b>
4.1 Autometátese .....	38
4.2 Teste de Mutação e Recombinação Somática – SMART .....	45
<b>CAPÍTULO 5 - CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>
<b>CAPÍTULO 6 - CÁLCULOS COMPUTACIONAIS .....</b>	<b>61</b>

# Capítulo 1

## INTRODUÇÃO

---

As plantas medicinais constituem parte da biodiversidade e representam a principal fonte utilizada na medicina tradicional, a maioria das pesquisas estão voltadas para o isolamento e a identificação de substâncias. Entretanto, a carência de estudos, principalmente na área toxicológica torna, infelizmente, o uso das plantas medicinais e dos medicamentos fitoterápicos, uma alternativa ainda duvidosa no que se refere à prevenção e tratamento de patologias [1-2].

Dentre a ampla variedade de fitoterápicos existentes, destaca-se *Piper methysticum* G. Forster, popularmente conhecido como Kava, kava-kava, raiz-kava, awa, entre outras denominações [3, 4-5], que é uma planta cultivada no Pacífico Sul, pertencente à família *Piperaceae*. Kava era inicialmente usada apenas em rituais religiosos, devido sua capacidade de tornar as pessoas mais relaxadas, porém nos anos 80, foi introduzida nas comunidades aborígenes da Austrália onde tornou-se uma droga de abuso pela ausência de um controle ritualístico de seu consumo, sendo assim usada para fins espirituais, medicinais e recreativos [6]. Entre os anos de 1999 a 2002, Kava esteve entre os 10 medicamentos fitoterápicos mais vendidos no Brasil, sendo utilizado no tratamento de ansiedade e insônia, é conhecido como Ansiopax®, Laitan®, Kavasedon® [7-8].

No rizoma desta planta estão presentes as cavactonas, os principais componentes responsáveis pelos efeitos farmacológicos de Kava. Embora Kava possua 18 cavactonas conhecidas, 96% da atividade biológica é atribuída a seis destas: Kavain, Dihidrocavain, Metisticina, Dihidrometisticina, langonina e a Desmetoxiangonina [9]. Entre os seis componentes majoritários, Kavain se destaca por estar presente em maior quantidade nos extratos de Kava [10].

Estudos demonstram que Kavain apresenta propriedades analgésicas [11], ansiolíticas [12-10], antiepiléticos [13], antitrombótica [14], propriedades anticonvulsivas [15], potencial uso no tratamento de doenças osteolíticas [16] e propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias [17] a partir da diminuição de TNF- $\alpha$  (Fator de Necrose Tumoral Alfa), e redução do estresse oxidativo [18].

Dado enorme potencial medicinal da Kavain, estudos de interação com o DNA e outros medicamentos são extremamente importantes para segurança em sua administração. Nesse sentido, um modelo biológico empregado com sucesso em estudos de toxicidade é a *Drosophila melanogaster*, popularmente conhecida como “moscas das frutas”. O SMART (Somatic Mutation and Recombination Test) – teste para detecção de mutação somática e recombinação – é uma técnica que utiliza o organismo *D. melanogaster*, como monitor de expressão de mutação e recombinação [19]. O SMART baseia-se no fato de que, durante o início do desenvolvimento embrionário da *D. melanogaster*, discos imaginais proliferam mitoticamente até se diferenciarem em estruturas do corpo da mosca adulta (olhos, asas, etc.) e caso ocorra uma alteração genética (como recombinação mitótica, mutação e aberrações cromossômicas) durante esse processo, esta alteração poderá levar a perda da heterozigose, que será detectado como uma mancha de pelos mutantes, na asa da mosca adulta [20].

Além da importância sobre o estudo genotóxico da Kavain, é de grande interesse sintetizar compostos a partir dessa molécula que poderão apresentar maior atividade biológica. Na última década, a metátese de olefinas tornou-se um importante método sintético para formação de ligações duplas carbono-carbono. As reações de metátese têm se mostrado um excelente método de síntese, permitindo o desenvolvimento de novos compostos de forma simples, eficiente e em menor número de etapas [21]. Entre os tipos de reações de metátese, temos a auto metátese, que permite a produção de olefinas altamente funcionalizadas de cadeias maiores a partir da formação de ligações duplas entre moléculas iguais, que são catalisadas por compostos carbênicos de metais de transição [22].

O presente trabalho propôs à autometátese da Kavain com intuito de obter novos compostos, bem como a avaliação do potencial mutagênico desta molécula em células somáticas de *D. melanogaster* por meio do teste SMART em associação ou não com o cloridrato de doxorrubicina, um agente carcinogênico muito utilizado no tratamento do câncer.

## 1.1 Objetivos

### 1.1.1 Objetivo geral

Realizar a autometátese da Kavain (trans-5,6-Dihydro-4-methoxy-6-(2-phenylethenyl) -2H-pyran-2-one) e avaliar seu potencial mutagênico em células somáticas de *D. melanogaster*

### 1.1.2 Objetivos Específicos

- I. Realizar a autometátese da Kavain pura utilizando catalisador de Grubbs de 2ª geração;
- II. Otimizar o processo catalítico proposto no item 1 por modificações nas condições reacionais como temperatura, razão catalisador/substrato, tempo e solvente;
- III. Caracterizar os produtos obtidos utilizando CG-EM e RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ;
- IV. Discutir os resultados baseados nas características eletrônicas e estéricas dos catalisadores;
- V. Investigar o potencial mutagênico e recombinogênico da Kavain em diferentes concentrações por meio do teste SMART em *D. melanogaster*;
- VI. Investigar o efeito da Kavain sobre os danos induzidos ao DNA pela Doxorubicina (DXR-0,125 mg/mL) quando ambas são administradas em co-tratamento no SMART em *D. melanogaster*.

# Capítulo 2

## REFERENCIAL TEÓRICO

---

### 2.1 Kava (*Piper methysticum* G. Forster)

Desde os primórdios das civilizações mais antigas, o homem busca nas plantas recursos terapêuticos para tratar suas enfermidades. O conhecimento e manejo dessas plantas pela população proporcionou o surgimento dos medicamentos fitoterápicos. Dentre esses fitoterápicos, destaca-se o *Piper methysticum* G. Forster, popularmente conhecido como Kava, Kava-Kava, raiz-Kava, awa, entre outras denominações [3, 23-5].



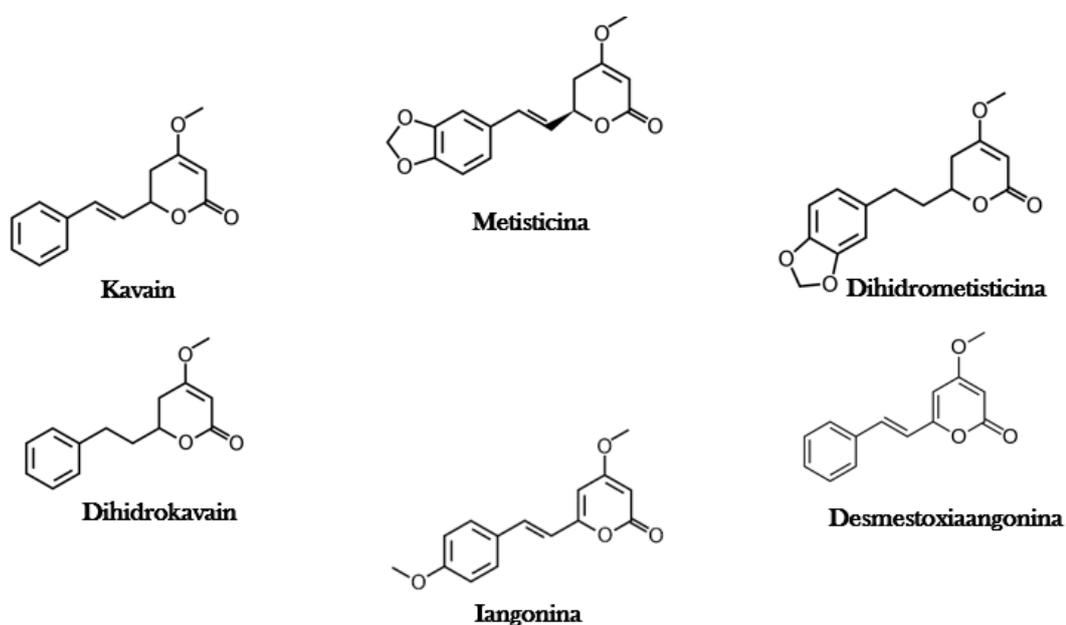
**Figura 2.1.** Detalhes da folha de *Piper methysticum* G. Forster [2].

Pertencente à família Piperaceae e cultivada no Pacífico Sul, Kava é um arbusto perene com dois a três metros de altura com folhas grandes e rígidas e apresenta inúmeras flores pequenas que se arranjam em cachos com 3 a 9 centímetros de comprimento [24]. O caule é subterrâneo do tipo rizoma, com várias raízes, cor negro-acinzentado por fora e esbranquiçado no interior [23].

A constituição química dessa espécie apresenta diversas substâncias, como ácido benzoico, ácido cinâmico, açúcares, estigmasterol, flavocavaínas,

taninos, alguns sais minerais e potássio [2]. Entretanto, os principais constituintes responsáveis por suas propriedades farmacológicas são as cavalactonas. Kava possui 18 cavalactonas conhecidas que estão presentes principalmente no rizoma dessa planta [6]. Porém, 96% da atividade biológica é atribuída a seis destas (Figura 2.1): Kavain (1,2 - 2,0%), Metisticina (1,0 - 2,0%), Iangonina (1,0 - 1,7%), Dihidro kavain (0,6 - 1,0%), Desmetoxiangonina (0,6 - 1,0%) e a Dihidrometisticina (0,5 - 0,8%) [9], entretanto destaca-se o Kavain, presente em maior quantidade nos extratos de Kava [10].

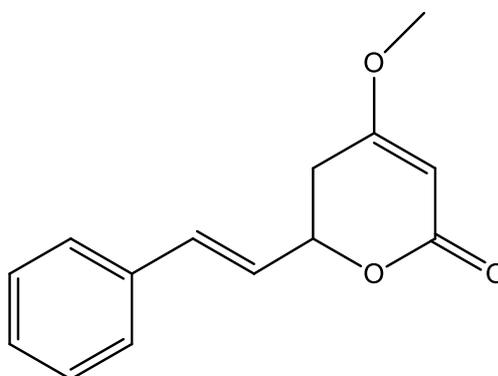
Estudos revelaram que os componentes de Kava possuem atividade quimiopreventiva e inibem o crescimento de células cancerosas [23-24], são analgésicos e sedativos [11] e possuem atividade ansiolítica [10], antitrombótica [14] e anticonvulsivo, que pode estar associada à ação antagonista das cavalactonas, em especial da Kavain [15]. Contudo, é a propriedade ansiolítica desta espécie o principal alvo dos estudos científicos. A ação ansiolítica da Kava não apresenta os efeitos adversos dos benzodiazepínicos como prejuízo das funções cognitivas, sonolência, redução da coordenação motora e dependência [23]. Apesar de estudos apontarem a toxicidade de Kava, muitos estudos sugerem o aprofundamento sobre as atividades farmacológicas e toxicológicas das cavalactonas, bem como o efeito das preparações tradicionais e orgânicas [3-24].



**Figura 2.2.** Estrutura química das seis majoritárias cavalactonas [10].

## 2.2 DL-Kavain

As cavalactonas são compostos químicos presentes principalmente na raiz de Kava, e são responsáveis pela atividade farmacológica dessa planta. Kavain está entre seis cavalactonas majoritárias, presente em maior quantidade nos extratos de Kava [10]. Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram que atividades farmacológicas e mecanismos de ação da Kavain apresentam propriedades anticonvulsivas [15], analgésicas [11], ansiolíticas [12-10], antiepilépticas [13], antitrombóticas [14] e potencial uso no tratamento de doenças osteolíticas [16].



**Figura 2.3.** Estrutura química da cavalactona Kavain.

Fonte: Própria do autor.

Além dessas propriedades, estudos recentes de Sing et al. (2018), demonstraram efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes de Kavain e enfatizam a ação protetora contra a adipogênese a partir da diminuição dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, especificamente TNF- $\alpha$  (Fator de Necrose Tumoral Alfa), e redução do estresse oxidativo associado à formação de espécies reativas de oxigênio (ERO). Tang e Amar (2016), também realizaram estudos que demonstraram a propriedade anti-inflamatória de Kavain em diferentes tipos de células inclusive em macrófagos primários.

Wruck e colaboradores (2008) também avaliaram Kavain e as cavalactonas Metisticina e langonina como potentes redutoras de eventos oxidativos causados pelo acúmulo do peptídeo  $\beta$ -amiloide, ao induzir a expressão gênica protetora mediada pela ativação de Nrf2 (Fator Nuclear Eritróide 2 relacionado ao Fator 2) *in vitro*. O Nrf2 é o principal regulador de uma bateria de genes que codificam enzimas

antioxidantes e desintoxicantes por meio da ligação ao elemento de resposta antioxidante. Os resultados mostraram que todas as cavalactonas individualmente ativam Nrf2, dependendo do tempo e dose.

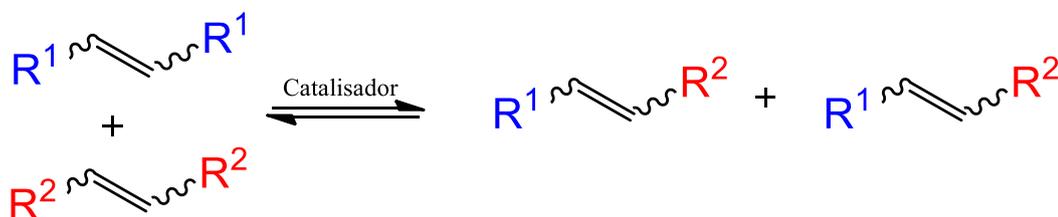
Além de redutor de efeitos oxidativos, como mostrado nos trabalhos anteriores [17-18], em estudos realizados por Upadhyay et al., (2014) Kavain e cavalactonas Metisticin e Dihidrometisticin, apresentaram atividade inibitória de produtos finais de glicação avançada mais significativa que o potente inibidor usado no estudo, a aminoguanidina. Os produtos finais de glicação e lipoxidação avançada, implicam em doenças crônicas relacionadas à idade e o envelhecimento protéico. Kavain e aminoquanidina impediram a formação de substâncias reativas tiobarbitúricas (inibição da peroxidação lipídica). Kavain também apresentou inibição de produtos finais de glicação através de propriedades quelantes (quelação de  $Fe^{3+}$  e  $Cu^{2+}$ ), ao qual desempenhou essa propriedade duas a três vezes melhor que a aminoguanidina.

Segundo Matheus e colaboradores (2002), Kavain e outras cavalactonas individualmente ou associadas ao extrato de Kava apresentam a capacidade de inibir diversas isoformas do citocromo P450 (CYP450), sendo elas: CYP1A2, CYP2C9; CYP2C19; CYP2D6, CYP3A4; CYP4A9 e CYP4A9/11 [25]. Esta propriedade é fonte de inúmeras interações, principalmente farmacocinéticas, com outras drogas, pois diminui a metabolização destas pelas enzimas inibidas do complexo CYP450, podendo induzir a toxicidade [26-27]. No entanto, evidências de interações farmacocinéticas e/ou farmacodinâmicas permanecem insustentáveis e apenas foram realizadas poucas investigações sobre o potencial de preparações de Kava e cavalactonas para interagir com drogas específicas [28].

## 2.3 Metátese de olefinas

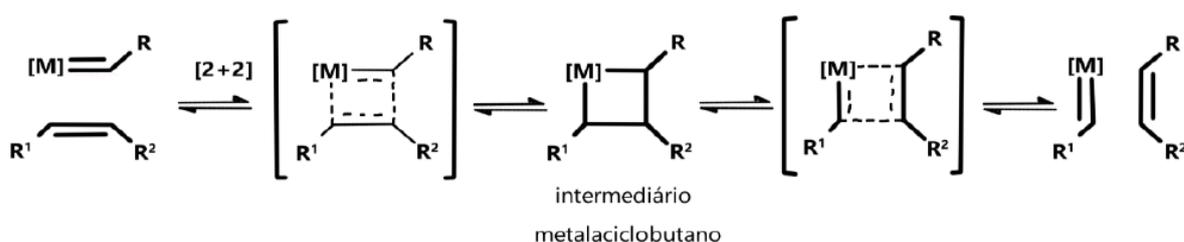
As reações de metátese de olefinas foram descobertas por acidente na década de 1950 na tentativa de encontrar catalisadores alternativos com diferentes metais para reação de polimerização via processo Ziegler-Natta [29,30-31]. A palavra metátese tem origem da palavra grega “*metatithemi*” que significa troca de lugar. Na química a metátese refere-se à troca de grupos ou átomos entre duas

olefinas, é uma reação na qual ligações insaturadas entre carbonos são quebradas dando origem a fragmentos alquilidênicos que se rearranjam formando novas moléculas, como ilustrado na Figura 2.4 [30-32].



**Figura 2.4.** Reação de metátese de olefinas [Adaptada de 32].

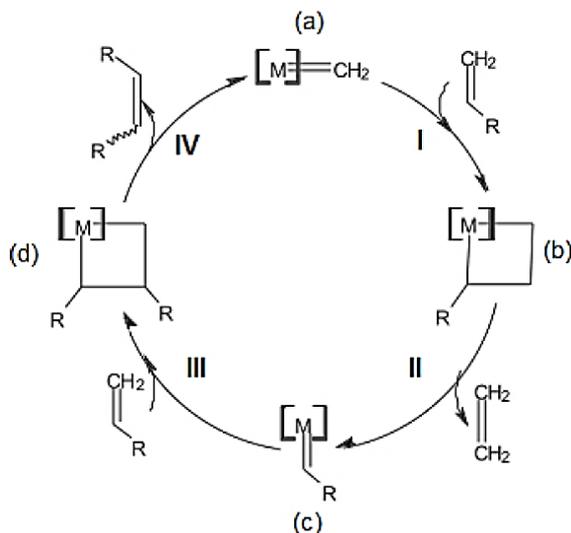
O mecanismo da reação de metátese foi estudado por muitos anos. Resultados experimentais de Calderon et al., (1968) e Clarck e Cook (1969), confirmaram a hipótese que a reação ocorria pela clivagem e formação das ligações duplas, descartando a possibilidade de troca de grupos alquila [35-36]. Em 1971, estudos cinéticos de Chauvin & Harrison, propuseram que a reação de metátese, tem início pela formação de um complexo metal-carbeno que reage com uma olefina menos substituída para formar o intermediário metalociclobutano, que se decompõe formando uma nova olefina e um novo metal-carbeno, que continua a reação, como mostrado na Figura 2.5 [22].



**Figura 2.5.** Mecanismo geral da reação de metátese de olefinas [35].

O ciclo catalítico da reação de metátese de olefinas está ilustrado na Figura 2.6. Essa reação é catalisada por compostos de metais de transição apresentando um alquilideno na esfera de coordenação representado por  $M=CH_2$  (a). Inicialmente ocorre a coordenação da olefina a esse complexo, formando um intermediário metalociclobutano (b) (etapa I). Este intermediário forma uma nova olefina e um novo metal-carbeno (c) (etapa II). Na etapa III esse novo metal-carbeno reage com

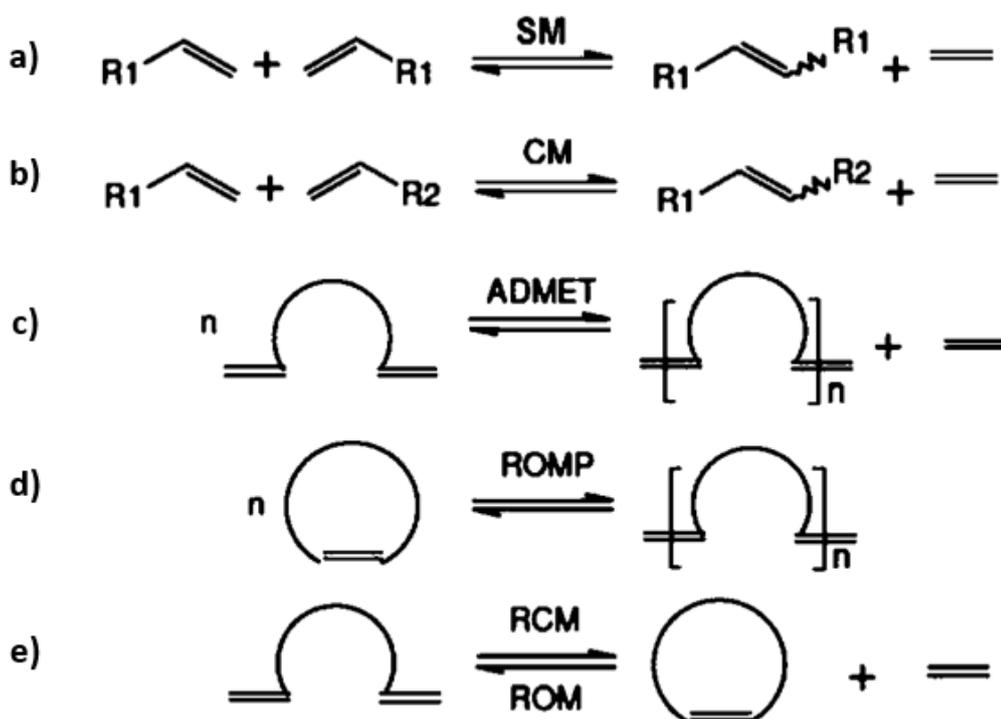
outra olefina formando novamente um intermediário metalciclobutano (d) que na 6 etapa (IV) forma uma nova olefina e regenera o complexo-metal carbeno (a) ( $M=CH_2$ ) para reiniciar o ciclo catalítico.



**Figura 2.6.** Mecanismo da reação de metátese de olefinas [37].

O complexo metal-carbeno têm um papel chave na metátese de olefinas, sua existência e a capacidade de realizar a reação de metátese foram confirmadas por Katz, que propôs a possibilidade de isolar estes complexos e utiliza-los para iniciar a reação de metátese [38-39]. Com isso, a compreensão do mecanismo de reação possibilitou não somente o desenvolvimento de novos catalisadores, mas também a ampliação das aplicações das reações de metátese.

A metátese de olefinas é uma reação química fundamental para sínteses orgânicas. Devido a sua versatilidade em poder ser utilizada para unir, romper, fechar um anel, abrir um anel ou polimerizar moléculas olefínicas [33], as reações de metátese podem ser divididas nos seguintes subtipos: a autometátese (*Self-Metathesis* ou SM), a metátese cruzada (*Cross-Metathesis* ou CM), a polimerização via metátese de dienos acíclicos (*Acyclic Diene Metathesis Polymerization* ou ADMET), a polimerização via metátese por abertura do anel (*Ring-Opening Metathesis Polymerization* ou ROMP), a metátese com fechamento de anel (*Ring-Closing Metathesis* ou RCM), a metátese com abertura de anel (*Ring-Opening Metathesis* ou ROM) (Figura 2.7) [32-34].



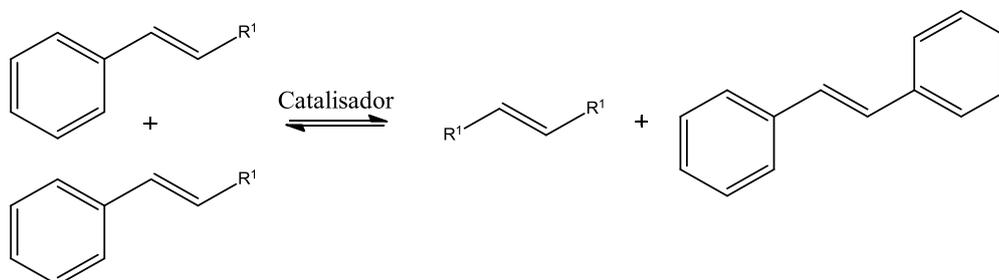
**Figura 2.7.** Tipos de reações de metátese de olefinas [Adaptada de 32].

A autometátese (SM) é a reação entre duas olefinas iguais (Figura 2.7 (a)). A metátese cruzada (CM) é a reação entre duas olefinas distintas (Figura 2.7 (b)). Reações de polimerização por reações de metátese podem ocorrer entre dienos acíclicos (ADMET) (Figura 2.7 (c)) ou entre alcenos cíclicos, através do processo de abertura de anel por metátese (ROMP) (Figura 2.7 (d)). A reação inversa a RCM é a metátese com abertura de anel (ROM), nesta reação ocorre abertura do anel de olefinas cíclicas, formando dienos não conjugados (Figura 2.7 (e)).

### 2.3.1 Autometátese

A síntese de moléculas via metátese de olefinas com finalidade de obter um novo composto, vem estabelecendo-se nas duas últimas décadas como uma poderosa ferramenta para formação de moléculas insaturadas, cujo preparo por qualquer outro método é frequentemente muito difícil, por isso a metátese de olefinas tem sido amplamente utilizada em sínteses orgânicas, na química medicinal e na química de polímeros [29]. Dentre os tipos de metátese utilizada a auto metátese permite a produção de olefinas altamente funcionalizadas de cadeias maiores a partir da formação de ligações duplas entre moléculas de alquenos

idênticos que podem ser catalisadas com o uso de um metal-carbeno catalisador de metal de transição [22-21].



**Figura 2.8.** Reação de autometátese.

Fonte: Própria do autor.

O emprego de óleos vegetais e derivados em aplicações finais ou como ingredientes para formulações de produtos atraiu recentemente muita atenção devido ao seu fornecimento renovável, baixo custo, versatilidade e sua química verde [32-40].

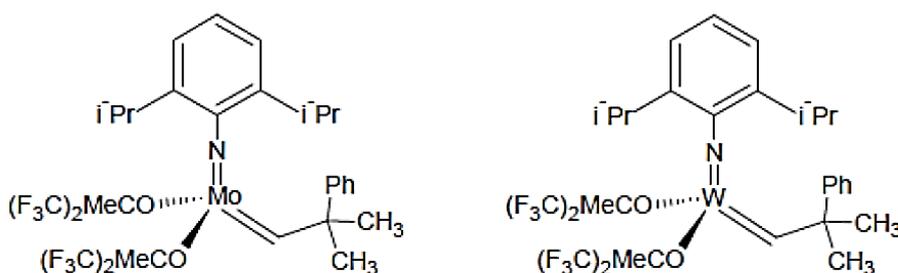
A autometátese é muito aplicada a ácidos graxos e seus derivados como rota para produção industrial de óleos vegetais [32]. Tunzun e colaboradores (2016) realizaram estudo que estende-se à autometátese de compostos renováveis derivados de ácidos graxos para produzir monômeros de  $\alpha,\omega$ -bis-benzoxazina com os espaçadores alifáticos, que são óleos ou sólidos facilmente processáveis que dão origem a filmes de polibenzoxazina com diferentes durezas, flexibilidade e graus de polaridade de superfície [41-45]. A autometátese também foi utilizada por Mutlu et al. (2013), realizou a síntese de diésteres alifáticos de cadeia longa e seus poliésteres, a partir de ésteres metílicos de ácidos graxos empregando autometátese [42]. Thomas e Marvey (2016), também usaram a autometátese e a etenólise do oleato de metila e do ricinoleato de etila, a fim de examinar a utilização de solventes verdes promissores na metátese cruzada como uma alternativa aos solventes orgânicos voláteis [43].

### 2.3.2. Catalisadores usados em Metátese de Olefinas

Inicialmente desde seu descobrimento e até o final da década de 80, a aplicação das reações de metátese de olefinas era reduzida devido à limitação

quanto à sensibilidade dos catalisadores utilizados [38]. Os catalisadores necessitavam de um cocatalisador para iniciarem a reação, conhecidos como catalisadores de 1ª Geração, a espécie metal-carbeno era gerada *in-situ*. Após a década de 80 começaram a surgir compostos de metais de transição do tipo metal-carbeno ( $M=CHR$ ) formados *ex-situ*, denominados de 2ª Geração, no qual podemos destacar como principais tipos de catalisadores os desenvolvidos por Schrock e Grubbs [30].

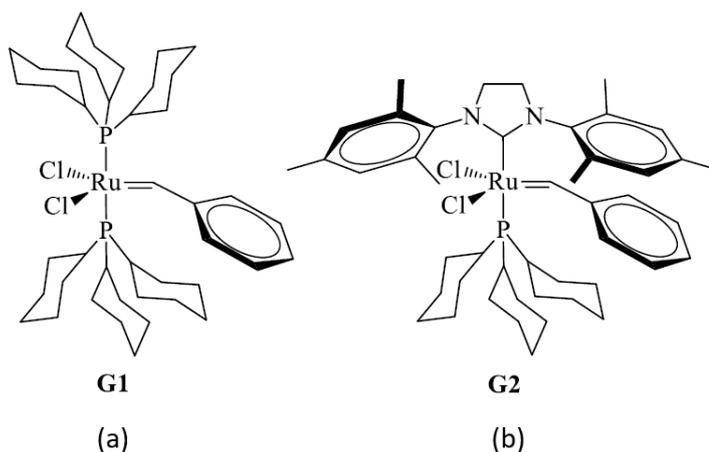
Em 1990 Schrock desenvolveu os primeiros metal-carbenos bem definidos e altamente ativos em metátese, utilizando complexos de tungstênio (W) e Molibidênio (Mo) (Figura 2.9). Entretanto, esses catalisadores mostram acentuada sensibilidade frente a grupos funcionais polares, umidade, oxigênio e impurezas presentes em solventes e reagentes, o que limitou bastante o seu uso [38,46-47].



**Figura 2.9.** Catalisadores de Schrock [48].

O primeiro complexo carbênico a base de rutênio para reação de metátese de olefina foi desenvolvido por Grubbs em 1992. Este foi obtido a partir da reação entre o  $[RuCl_2(PPh_3)_4]$  e o difenilciclopropeno, formando um complexo bastante estável na presença de solventes próticos, porém apresentou atividade apenas para metátese de olefinas ricas em elétrons e tensionadas. Com a troca do ligante trifenilfosfina ( $PPh_3$ ) pela tricicloexilfosfina ( $PCy_3$ ), esse complexo passou a promover as mesmas reações catalisadas pelos complexos de Mo e W de Schrock, e apresentou melhor desempenho catalítico e maior tolerância a grupos funcionais. Esses catalisadores são conhecidos como de catalisadores de “1ª Geração (G1)” de Grubbs (Figura 2.10 (a)) [46, 22]. Os experimentos sobre a troca entre as diferentes fosfinas, demonstraram que aquelas com maior efeito estérico ( $\theta$ , ângulo de cone) e maior caráter doador  $\alpha$  ( $pK_a$  como parâmetro utilizado), desempenharam melhores resultados [49].

Em 1999 surgiu o catalisador de “2ª Geração (G2)” de Grubbs (Figura 2.10 (b)), no qual uma das fosfinas  $\text{PCy}_3$  foi substituída por um carbeno N-heterocíclico de Arduengo (*NHC-N-heterocyclic carbene*), com maior ângulo de cone e maior caráter doador  $\alpha$  [22]. Esse catalisador apresentou maior estabilização à espécie catalítica rutênio-fosfina, o que beneficia a formação metalociclobutano [50] e mostrou-se mais ativo para olefinas tri e tetrasubstituídas quando comparados aos complexos da primeira geração, os quais possuíam apenas fosfinas [22].



**Figura 2.10.** Catalisadores de Grubbs de primeira (a) e segunda (b) geração.

Fonte: Própria do autor.

Vários outros complexos, cuja estrutura é geralmente baseada nos catalisadores de Grubbs, foram desenvolvidos e podem apresentar vantagens para determinados tipos de aplicações. Como exemplo, os catalisadores de Hoveyda-Grubbs de primeira geração e segunda geração, que foram sintetizados pela substituição da tricicloexilfosfina do catalisador de Grubbs primeira e segunda geração pelo benzilideno contendo um grupo alcoxi na posição orto [51-35].

## 2.4 Teste de Mutação e Recombinação Somática – SMART

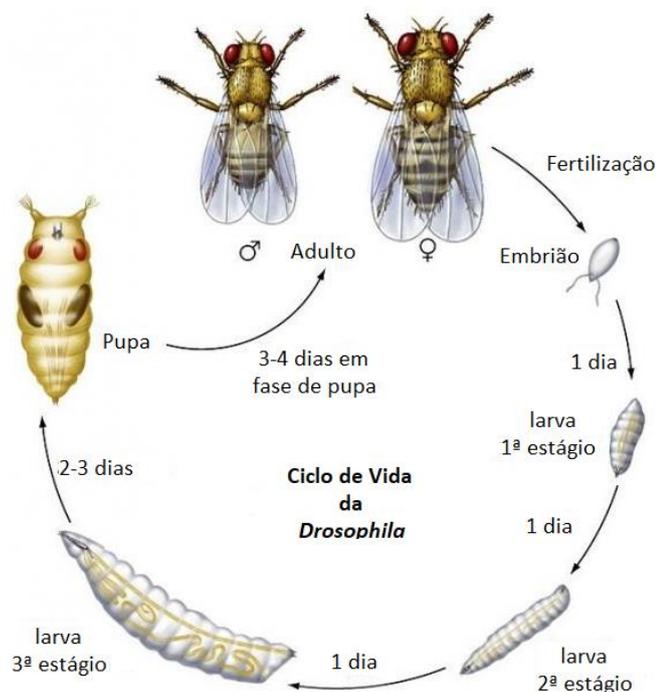
Desenvolvido pelos pesquisadores Graf et al. (1984), o teste para detecção de mutação e recombinação somática (Somatic Mutation and Recombination Test - SMART) utiliza como organismo vivo experimental a *Drosophila melanogaster* (Figura 2.11). Pertencente à família Drosophilidae, composta por mais de 4.200

espécies, conhecida como mosca da fruta, a *D. melanogaster* é um organismo eucariótico que apresenta quatro pares de cromossomos, sendo três pares autossômicos e um par de cromossomos sexuais. Contêm aproximadamente 13.600 genes, praticamente a metade do número de genes conhecidos em humanos, o que evidencia considerável homologia entre humanos e *D. melanogaster* [45-52]. Além disso, estudos mostram que cerca de 70% dos genes implicados em cânceres humanos têm equivalência a genes da *D. melanogaster* [54-55].



**Figura 2.11.** A esquerda, fêmea trans-heterozigoto marcado (asa borda lisa); a direita, macho heterozigoto balanceado (asa borda serrilhada) de *D. melanogaster*. Fonte: Própria do autor.

Dentre as vantagens inerentes ao trabalho com *D. melanogaster*, compreende-se o ciclo de vida curto, cerca de 10-12 dias (Figura 2.12), prole com grande número de indivíduos, baixo custo para manutenção das linhagens em laboratório, linhagens mutantes bem caracterizadas geneticamente e apresentar sistema enzimático que permite a metabolização de xenobióticos (CYP450) capaz de ativar promutágenos e procarcinógenos [56-19]. Essas vantagens tornam a *D. melanogaster* excelente organismo experimental para avaliar a atividade genotóxica e antígenotóxica de compostos químicos.



**Figura 2.12.** Ciclo de vida da *D. melanogaster*.

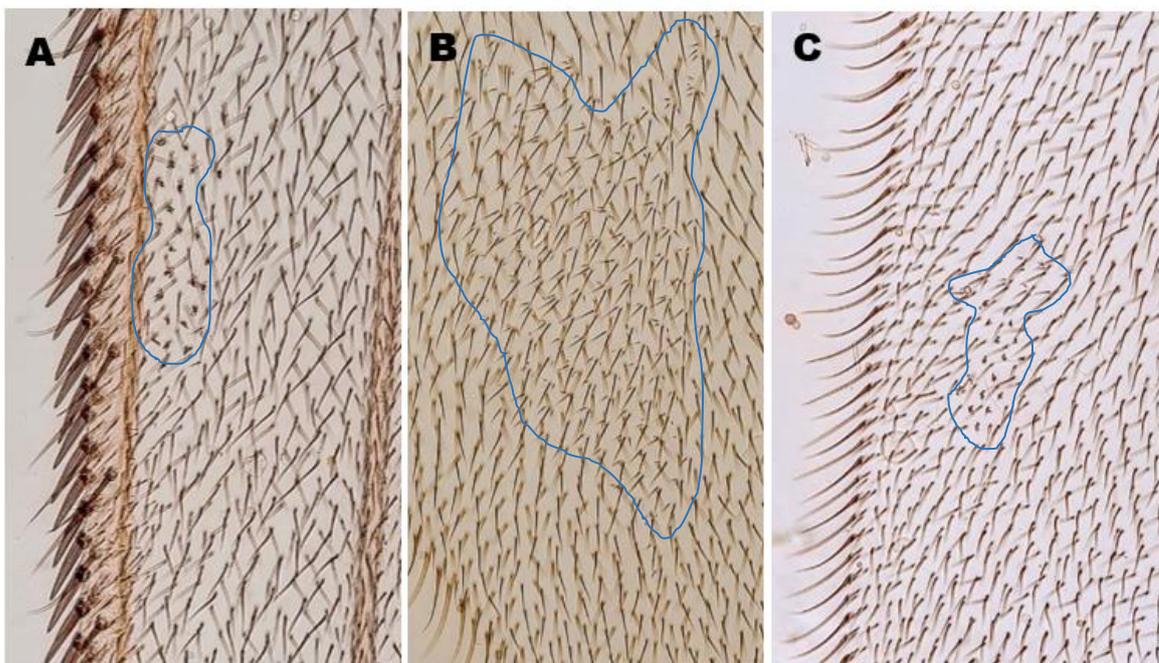
Fonte: Adaptado de <http://skenderianscience.weebly.com>.

Por meio do SMART é possível investigar a redução dos efeitos mutagênicos e recombinogênicos de compostos, bem como atividade mutagênica e antimutagênica, e assim detectar indiretamente mutações de ponto, deleções, alterações cromossômicas (como perda cromossômica, não-disjunção e translocação), recombinação mitótica e conversão de gene; como também pode detectar a ativação de promutágenos [20-57].

O SMART em asas de *D. melanogaster* fundamenta-se na detecção da perda da heterozigose em genes marcadores, que alteram o fenótipo dos pelos existentes na asa da mosca. Durante o desenvolvimento larval, as células do disco imaginal vão se dividir mitoticamente, para iniciar a formação das asas, caso ocorra alterações genéticas como deleções, alterações cromossômicas ou recombinação mitótica, ocorrerá o aparecimento de manchas mutantes que expressão fenotipicamente os genes marcadores *mwh* (*multiple wing hairs* - pelos múltiplos) e *flr<sup>3</sup>* (*flare-3* - pelo em formato chama de vela) [20,57-58].

As alterações genéticas são avaliadas quanto ao número e tipos manchas que se manifestam nas asas. Manchas simples (Figura 2.13 A e B), expressam pelos *mwh* ou *flr<sup>3</sup>*, indicam que as alterações são originárias de mutações gênicas,

alterações cromossômicas ou recombinação; manchas gêmeas (Figura 2.13 C), apresentam os dois genes marcadores, que são originadas exclusivamente por recombinação somática [58].



**Figura 2.13.** Mancha simples com pelos *flr<sup>3</sup>* (A) e *mwh* (B) e mancha gêmea *mwh* e *flr<sup>3</sup>* (C) observadas em microscópio óptico (aumento de 400x).

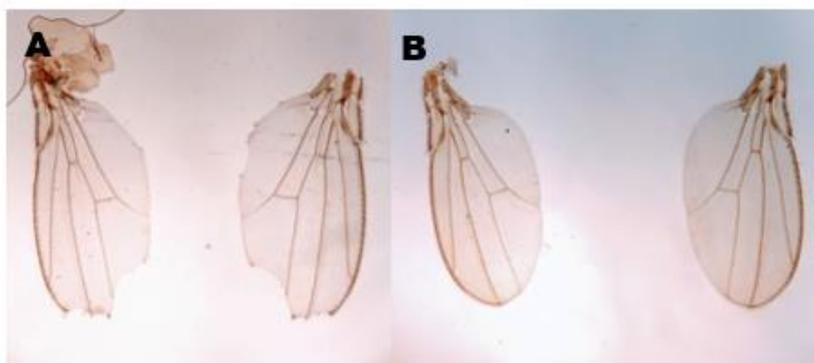
Fonte: Própria do autor.

#### 2.4.1 Linhagens de *D. melanogaster* no SMART

Para realização do SMART são utilizadas três linhagens de *D. melanogaster*:

- **Linhagem “multiple wing hair” (*mwh*- constituição genética *mwh/mwh*;** indivíduos dessa linhagem possuem o gene marcador *mwh* no cromossomo nº 3 (3-0,3), sua alteração fenotípica é característica da presença de três ou mais pelos por célula e apresenta a borda da asa lisa (Figura 2.14 B) [56-57].
- **Linhagem “flare-3” (*flr<sup>3</sup>*) - constituição genética *flr<sup>3</sup>/ln(3LR)TM3, ri p<sup>p</sup> sep l(3)89Aa bx<sup>34e</sup> e Bd<sup>S</sup>***: indivíduos dessa linhagem possuem o gene marcador *flr<sup>3</sup>* localizado no cromossomo 3 (3-38,8), possui aspecto fenotípico com pelo que tem formato de uma “chama de vela”. O gene *flr<sup>3</sup>* é letal quando em homozigose, devido a isso, essa linhagem possui um balanceador cromossômico *TM3, Bd<sup>S</sup>*, que caracteriza a borda da asa serrilhada a essa linhagem (Figura 2.14 A) [20].

- Linhagem “Oregon-flare-3” (*ORR;flr<sup>3</sup>*) - constituição genética *ORR/ORR; flr<sup>3</sup>/In(3LR)TM3, ri p<sup>p</sup> sep I(3)89Aa bx<sup>34e</sup> e Bd<sup>S</sup>* : indivíduos pertencentes a essa linhagem possuem a mesma constituição genética dos indivíduos da linhagem *flr<sup>3</sup>*, porém apresentam os cromossomos 1 e 2 provenientes da linhagem “Oregon R” resistente ao DDT, com alta expressividade das enzimas citocromo P450 [56-57].



**Figura 2.14.** Pares de asas de *D. melanogaster*; asas com bordas serrilhadas (A) e com bordas lisas (B).

Fonte: Própria do autor.

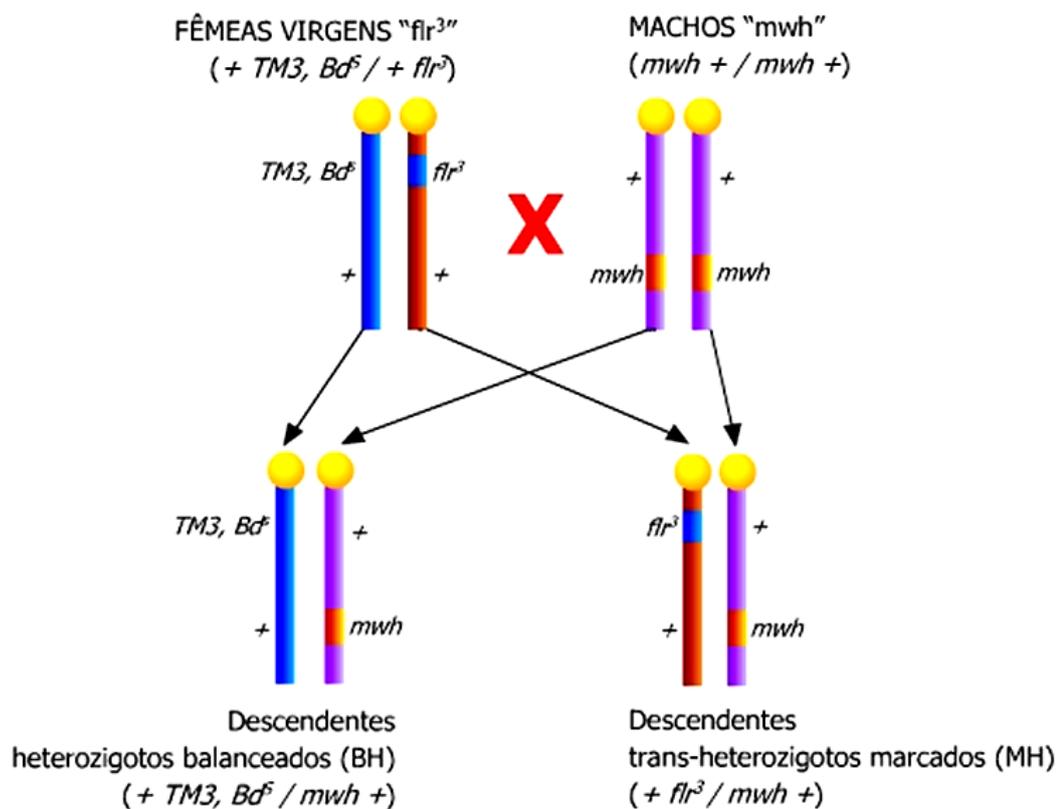
### 2.4.2 Cruzamentos

Dois cruzamentos são utilizados para a realização do SMART:

- **Cruzamento Padrão (ST- Standard Cross):** esse cruzamento é usado para detecção de agentes mutagênicos diretos, machos “*mwh*” são cruzados com fêmeas virgens “*flr<sup>3</sup>*” [59].
- **Cruzamento de Alta Capacidade de Bioativação (HB - High Bioactivation Cross):** esse cruzamento é útil para detecção de agentes genotóxicos indiretos, ou promutágenos que necessitam de ativação metabólica para induzir efeitos mutagênicos. Machos “*mwh*” são cruzados com fêmeas virgens “*ORR; flr<sup>3</sup>*” [56].

A partir desses cruzamentos são obtidos dois tipos de descendentes: trans-heterozigotos marcados - MH (*mwh +/+ flr<sup>3</sup>*), caracterizados por apresentarem pelos normais e asas de bordas lisas, e heterozigotos balanceados – BH (*mwh +/+*

*TM3, Bd<sup>S</sup>*), apresentam pelos normais e asas com bordas serrilhadas [57]. Os indivíduos MH podem expressar manchas simples e manchas gêmeas que são originadas de mutações de ponto, aberrações cromossômicas ou recombinação, ocorridas no *locus mwh* ou *flr<sup>3</sup>*. Já os descendentes BH, por possuírem o cromossomo balanceador *TM3/Bd<sup>S</sup>*, apresentam múltiplas inversões, que impossibilitam o desenvolvimento de eventos recombinogênicos, logo expressam apenas manchas simples do tipo *mwh*, resultantes de mutação, aberrações cromossômicas ou não-disjunção [20,57-58].



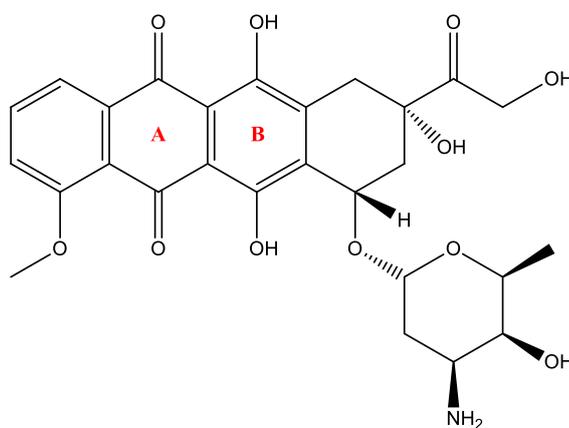
**Figura 2.15.** Representação do cruzamento padrão (ST): fêmeas virgens *flr<sup>3</sup>* cruzadas com machos *mwh* dão origem a indivíduos trans-heterozigotos marcados (MH) e heterozigotos balanceados (BH) [60].

### 2.4.3 Doxorrubicina

O quimioterápico doxorrubicina (DXR) é um antibiótico antineoplásico pertencente ao grupo das antraciclínas, produzido por cepas de *Streptomyces peucetius*, contudo, também pode ser obtido por vias sintéticas [61,62-63]. Vários estudos utilizando o SMART têm sido realizados avaliando o potencial

antimutagênico e recombinogênico frente aos danos induzidos ao DNA pela DXR [64, 65, 66, 67-68].

A DXR é um agente tumoral usado desde a década de 60 no tratamento de doenças oncológicas [69-70], entretanto seu uso é limitado devido efeitos colaterais, sendo a cardiotoxicidade seu efeito principal [71-72]. DXR é uma substância lipofílica estruturalmente formada por um amino-açúcar ligado por uma ligação glicosídica a quatro anéis, contendo um anel quinona (A) e outro hidroquinona (B) que permitem a aquisição e perda de elétrons (Figura 2.16) [61-73].



**Figura 2.16.** Estrutura química da doxorubicina [74].

As antraciclinas exercem sua ação a partir dos seguintes mecanismos: 1) intercalação com a molécula de DNA, bloqueando a síntese dos ácidos nucleicos e ruptura das fitas de DNA; 2) inibição da topoisomerase II; 3) ligação às membranas celulares, com alteração de sua fluidez e transporte de íons; 4) produção de radicais livres da semiquinonas e radicais livres de oxigênio [70-73].

A DXR tem como principais mecanismos de ação a intercalação ao DNA, inibindo a atividade da enzima Topoisomerase II e a produção de radicais livres [75]. Segundo McGowan e colaboradores (2017), o efeito citotóxico da DXR dar-se-á devido a sua ação de intercalar-se ao DNA e isoenzimas da topoisomerase II, causando quebras de dupla fita, inibindo a replicação do DNA, e interrompendo o ciclo celular em G1/G2, induzindo a morte celular por apoptose. Acredita-se que a capacidade de produção de radicais livres da DXR esteja envolvida no mecanismo de citotoxicidade da mesma [76].

O anel antraciclina da DXR pode sofrer redução de um elétron formando radicais livres que causam danos oxidativo as membranas celulares [61-73].

Segundo Sousa et al., (2016), algumas quinonas apresentam potencial atividade redox devido sua participação em ciclos redox enzimáticos e não enzimáticos, originando a formação de semiquinonas, que são tóxicas. Entretanto, as semiquinonas podem novamente participar de ciclos redox, como a metabolização pelo CYP450, e formar ânions de radical superóxido, que podem gerar peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila, resultando em estresse oxidativo e consequentemente danos em membranas, proteínas e no DNA, podendo induzir a apoptose [77].

Outro mecanismo de ação de produção de radicais livres pela DXR é quando os radicais semiquinonas atuam em um ciclo redox não enzimático, que envolve a reação com o ferro. Após uma reação redox, o  $\text{Fe}^{3+}$  aceita um elétron, forma-se o complexo  $\text{Fe}^{2+}$  - DXR, que tem capacidade de promover a conversão de superóxido e peróxido de hidrogênio em radicais hidroxil, podendo ocasionar peroxidação lipídica e provocar significativa disfunção mitocondrial [73].

O mecanismo da DXR de indução de quebra de dupla fita de DNA é uma alteração genética que representa a ocorrência de recombinação, essa característica coloca esse quimioterápico como potente agente recombinogênico [75]. Estudos a partir do teste SMART têm sido realizados a fim de desenvolver compostos que diminuam os danos induzidos pela DXR. A utilização de compostos fenólicos e antioxidantes naturais ou sintéticos para redução do estresse oxidativo, tem sido investigada a fim de minimizar a toxicidade deste quimioterápico [62,60,64,78-56].

# Capítulo 3

## METODOLOGIA EXPERIMENTAL

---

### 3.1 Autometátese da Kavain

#### 3.1.1 Materiais e Reagentes

- Catalisador de Grubbs G2, *Sigma-Aldrich*;
- DL-Kavain (99%), *Sigma-Aldrich*;
- Etil Vinil Éter, *Sigma-Aldrich*;
- Clorofórmio (CHCl<sub>3</sub>), *Dinâmica*;
- Nitrogênio, 5.0 de pureza da *W. Martins*;
- Hélio, 5.0 de pureza da *W. Martins*.

#### 3.1.2 Procedimentos Gerais de Síntese

Todas as reações aconteceram em atmosfera de Nitrogênio (N<sub>2</sub>). Em um balão de 50 mL foi adicionado DL-Kavain e solubilizada em clorofórmio PA. Em seguida o sistema foi acondicionado por técnica de Shlenk. Então, adicionou-se o catalisador de Grubbs 2<sup>o</sup> geração (G2). A mistura reacional permanece em agitação constante sob sistema de refluxo num banho de óleo termostátizado. Após determinado tempo, a mesma foi terminada pela adição de etilvinil éter para desativação do catalisador. O produto foi analisado por RMN de <sup>1</sup>H e CG-EM conforme for necessário. Inicialmente as reações aconteceram à temperatura ambiente (TA), com relações equivalentes de catalisador:substrato e tempo de 24 h. Em outros ensaios, houveram variações de condições reacionais.

### 3.1.3 Análises

#### ***Cromatografia Gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (CG-EM)***

As análises de CG-EM foram realizadas em um cromatógrafo Shimadzu QP2010-SE equipado com uma coluna Rtx®-5MS de 30m. Como gás de arraste utilizou-se o Hélio. A análise com o detector de massa foi realizada, com o tempo de aquisição de 40 min, o programa utilizado foi o *GCMS solutions* que possui uma biblioteca para detecção do composto.

#### ***Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)***

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , foram obtidos utilizando o equipamento Bruker DRX- 400 de 9.4 T. Os deslocamentos químicos obtidos foram reportados em PPM relativo ao TMS. As amostras foram preparadas em atmosfera inerte, utilizando clorofórmio deuterado  $\text{CDCl}_3$  como solvente.

## 3.2 Teste de Mutação e Recombinação Somática – SMART

### 3.2.1 Agentes Químicos

A substância testada foi a DL-Kavain, CAS 3155-48-4, Lote n°: BCBQ0529V, fórmula molecular  $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{O}_3$  e peso molecular de 230,26 g/mol, produzida pela Sigma-Aldrich Brasil Ltda. Como controle positivo utilizou-se o fármaco Cloridrato de doxorubicina, Lote n°: A4150116, importada e distribuída por Glenmark Farmacêutica Ltda, São Paulo-SP. As preparações de Kavain (32, 64 e 128  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e Cloridrato de Doxorubicina (DXR - 0,125  $\text{mg}/\text{mL}$ ) foram diluídas em solução de Acetona 2% (Acetona PA; Dinâmica Química Contemporânea Ltda) e água ultrapura, obtida a partir de sistema MilliQ (Millipore, Vimodrone, Milão, Itália).

As concentrações utilizadas neste estudo foram delineadas com base no estudo de Shaik e colaboradores (2009), no qual se observou que a Kavain ( $\text{IC}_{50}$   $32\pm 3$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) inibiu NF- $\kappa\text{B}$ , um fator de transcrição que desempenha um papel essencial no desenvolvimento do câncer e que concentrações superiores a  $\text{IC}_{50}$   $166\pm 14$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Kavain foram tóxicas para linhagem celular Hepa1c1c7 de células hepáticas [79].

### 3.2.2 Linhagens de *D. melanogaster*

As linhagens de *D. melanogaster* utilizadas nesse trabalho encontram-se no Laboratório de Genética da Universidade Estadual do Piauí (LABGENE/UESPI). Foram usadas neste estudo três linhagens:

(1) linhagem “*multiple wing hair*” (*mwh*), com constituição genética *mwh/mwh*; 3-0,3 [16];

(2) linhagem “*flare-3*” (*flr<sup>3</sup>*), com constituição genética *flr<sup>3</sup>/In(3LR)TM3, ri p<sup>o</sup> sep I(3)89Aa bx<sup>34e</sup> e Bd<sup>S</sup>*; 3-38,8 [16];

(3) linhagem “*Oregon-flare-3*” (*ORR;flr<sup>3</sup>*), com constituição genética *ORR/ORR; flr<sup>3</sup>/In(3LR)TM3, ri p<sup>o</sup> sep I(3)89Aa bx<sup>34e</sup> e Bd<sup>S</sup>*; 3-38,8 [16].

As linhagens são conservadas em frascos de vidro com meio de cultura (820 mL de água, 156 g de banana, 17 g de fermento seco, 11 g ágar e 1 g de metilparabeno) e estocadas em câmara tipo B.O.D a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , sobre fotoperíodo alternado de 12 horas.

### 3.2.3 Cruzamentos

Dois cruzamentos foram realizados:

(1) **Cruzamento Padrão (ST)**: fêmeas virgens de constituição *flr<sup>3</sup>* foram cruzadas com machos *mwh* esse cruzamento é caracterizado por conter níveis basais de enzima de metabolização CYP450;

(2) **Cruzamento de Alta Bioativação (HB)**: fêmeas virgens *ORR; flr<sup>3</sup>* foram cruzadas com machos *mwh*. Devido ao alto nível de CYP450 presente nos indivíduos *ORR; flr<sup>3</sup>*, o cruzamento HB possui maior sensibilidade para promutágenos e procarcinógenos.

### 3.2.4 Bioensaio

Ovos de ambos os cruzamentos foram coletados em frascos de vidro e após  $72\text{h} \pm 4\text{h}$ , larvas de terceiro estágio foram lavadas em água corrente e coletadas com ajuda de uma peneira de malha fina e pincel, e em seguida transferidas para frascos descartáveis contendo 2,0 g de purê de batata em flocos (Yoki® Alimentos

S.A., Brasil) e 6 mL de cada concentração de Kavain isolada e em associação com DXR. Foram incluídos também a Acetona 2% e a DXR isolada como controle negativo e positivo, respectivamente. Para cada tratamento, cerca de 300 larvas foram distribuídas em 3 frascos (100 larvas/frasco) e aguardou-se a emergência dos indivíduos adultos que foram coletados e fixados em etanol 70% para posterior análise. Em ambos os cruzamentos, na avaliação da atividade antimutagênica foi utilizado o sistema de co-tratamento, no qual as diferentes concentrações de Kavain foram administradas simultaneamente com a DXR.

As asas das moscas foram removidas cuidadosamente com ajuda de pinça e lupa binocular, dispostas em 10 pares em cada lâmina na presença da solução de Faure (30 g goma arábica, 20 mL glicerol, 50 g hidrato de cloral e 50 mL de água deionizada) e analisadas em microscópio óptico, em aumento de 400X. Foram observadas e registradas as frequências dos pelos mutantes, os tipos de manchas (*mwh* e/ou *flr*<sup>3</sup>), o tamanho e a posição em que se encontravam na asa [57]. Para cada tratamento, 60 indivíduos de ambos os sexos foram analisados. Para avaliar os possíveis efeitos mutagênicos, a frequência de cada tipo de mancha (mancha simples pequena (MSP), mancha simples grande (MSG), mancha gêmea (MG) e total de manchas (TM) para cada tratamento foi comparada ao controle negativo (Acetona 2%) e para a avaliação dos possíveis efeitos indutores ou inibidores da Kavain quando associada à DXR, as frequências de manchas nos tratamentos foram comparadas com o controle positivo (DXR isolada).

### 3.2.5 Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi realizada a partir do teste binomial bicondicional, descrito por Frei e Würigler (1988 e 1995), com níveis de significância de  $p < 0,05$  e quatro tipos de diagnóstico estatístico: negativo, positivo, fraco positivo e inconclusivo [80-81]. Posteriormente, resultados fraco positivo e inclusivos foram analisados pelo teste U não paramétrico de Mann, Whitney and Wilcoxon ( $\alpha = \beta = 0,05$ , unilateral) para excluir falsos positivos [80-81]. A frequência de formação de clones por  $10^5$  células por célula em divisão foi estimada (FC) = total de manchas *mwh*/ número de moscas/ 48.800 (total de células estimado nas asas das moscas). Com base nos valores de FC corrigidos pelo controle, a atividade recombinogênica

foi calculada da seguinte forma: Frequência de mutação (FM) = frequência de clones em moscas BH / frequência de clones em moscas MH. Frequência de recombinação (FR) =  $1 - \text{frequência de mutação (FM)} \times 100$  [65]. A porcentagem de inibição ou indução da Kavain em relação aos danos induzidos pela DXR foi calculada e expressa por:  $[(\text{DXR isolada} - \text{Kavain} + \text{DXR}) / \text{DXR isolada}] \times 100$ , de acordo com Abraham (1994) [82].

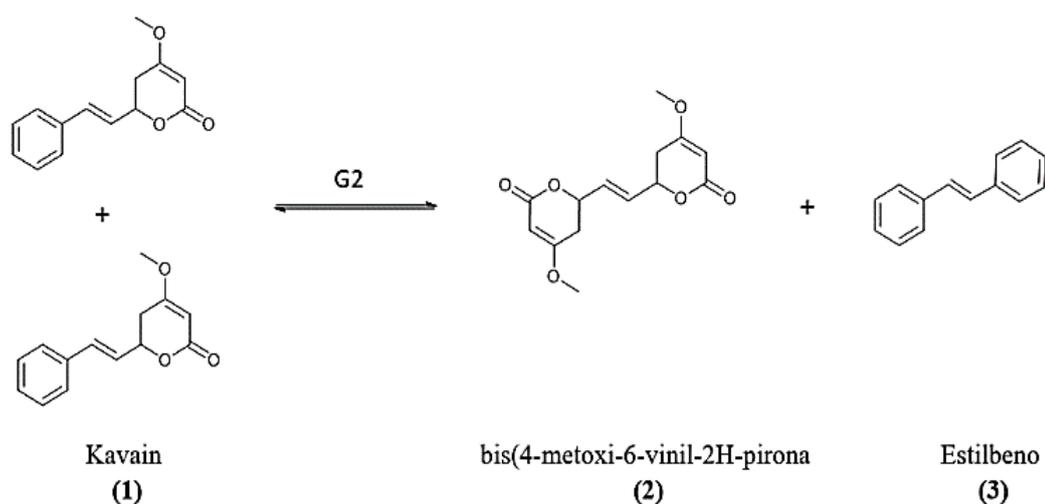
# Capítulo 4

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

### 4.1 Autometátese

A metátese de olefina do DL-Kavain (tratado aqui como Kavain) foi realizada utilizando o catalisador de Grubbs de 2ª geração (G2). Na Figura 4.1 está ilustrada a reação de metátese da Kavain **(1)** e os dois produtos esperados, denominados bis(4-metoxi-6-vinil-2H-pirona) **(2)** e o estilbeno **(3)**.



**Figura 4.1.** Reação de autometátese da Kavain.

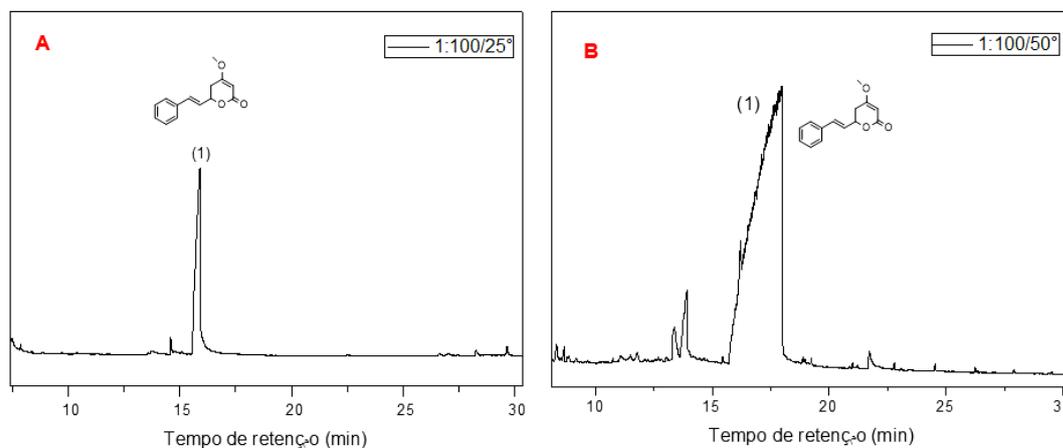
As reações de sínteses foram aperfeiçoadas por modificações no processo catalítico, tais como: temperatura de reação, razão catalisador:substrato, tempo e volume do solvente, assim como mostrado na Tabela 4.1.

**Tabela 4.1.** Variações das condições reacionais e produtos formados.

Catalisador:substrato (mol)	Temperatura	Tempo	Produto formado/ Rendimento %
1:10	25°C	24h	--
	50°C		--
1:100	25°C	24h	--
	50°C		--
	25°C	48h	--
	50°C		--
1:1	25°C	24h	--
	50°C		--
	25°C	48h	--
	50°C		bis(4-metoxi-6-vinil-2H- pirona) / 10% e o estilbeno / 25%
	25°C		--
	50°C	96h	bis(4-metoxi-6-vinil-2H- pirona) / <15% e o estilbeno / 35%

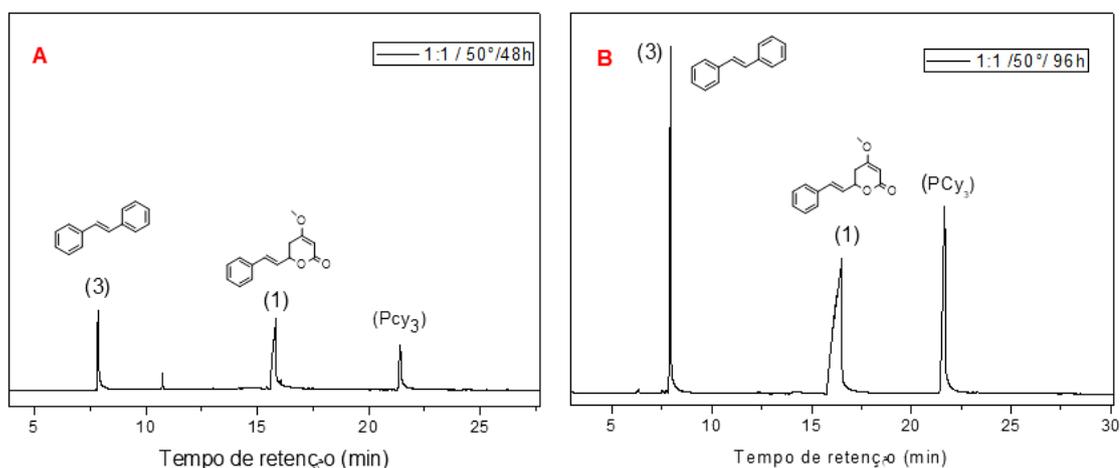
As sínteses realizadas com proporção catalisador:substrato de 1:10 e 1:100 mol não apresentaram picos referentes aos produtos desejados, somente o pico referente ao substrato. Na Figura 4.2 está representado os gráficos referentes às sínteses realizadas com razão 1:100 mol e condições de 25°C e 50°C, ambas por 24h, respectivamente.

Na síntese realizada a 50°C por 48h e razão 1:1 mol, os resultados foram analisados por CG-EM e os cromatogramas estão apresentados na Figura 4.3 (A). Os picos em cerca de 8, 16 e 21 min são referentes ao estilbeno (3), Kavain (1) e triciclohexilfosfina (PCy<sub>3</sub>), respectivamente.



**Figura 4.2.** Cromatograma de CG-EM da mistura resultante a partir da metátese da Kavain, condições de catalisador:substrato 1:100 mol, 25°C (esquerda) e 50°C (direita), por 24h.

A  $\text{PCy}_3$  é um ligante do catalisador G2, que devido seu tamanho exerceu impedimento estérico tal que ocasiona sua descoordenação do centro metálico, gerando um sítio ligante para a coordenação da olefina; iniciando a reação de metátese. Por isso um dos sinais observados no cromatograma é da própria  $\text{PCy}_3$ .

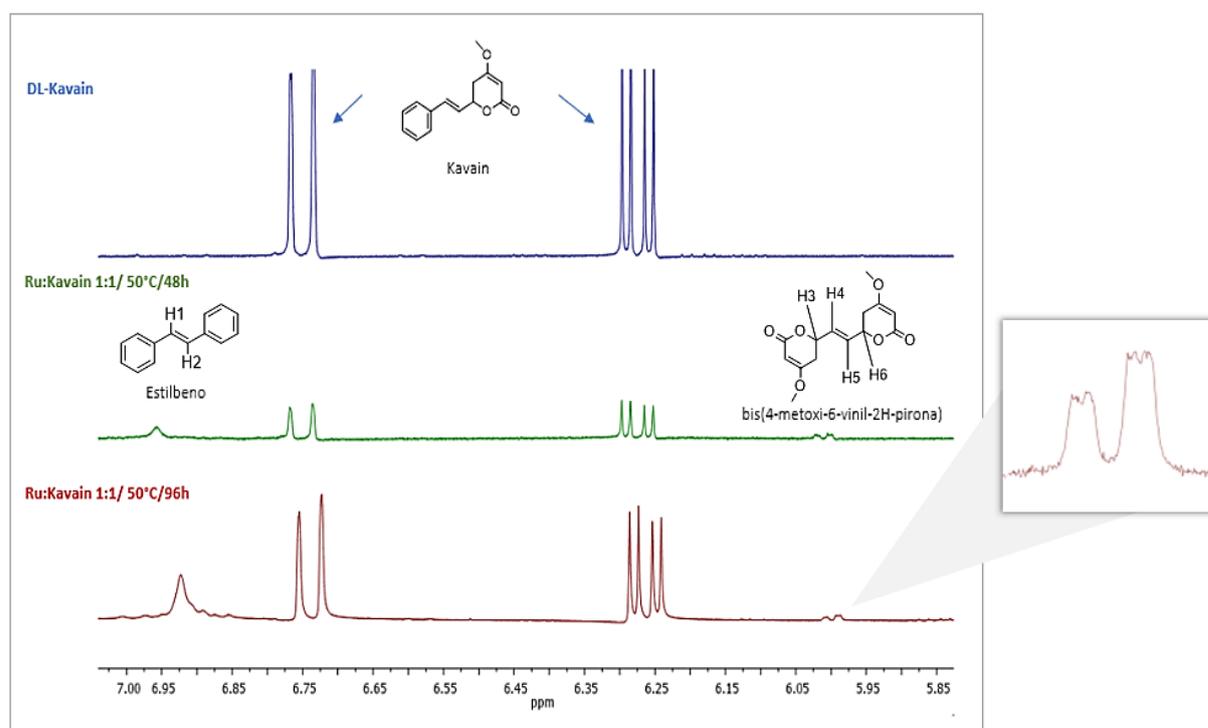


**Figura 4.3.** Cromatograma de CG-EM da mistura resultante a partir da metátese da Kavain, condições de: substrato/catalisador 1:1 mol, 50°C por 48h (A) e 96h (B).

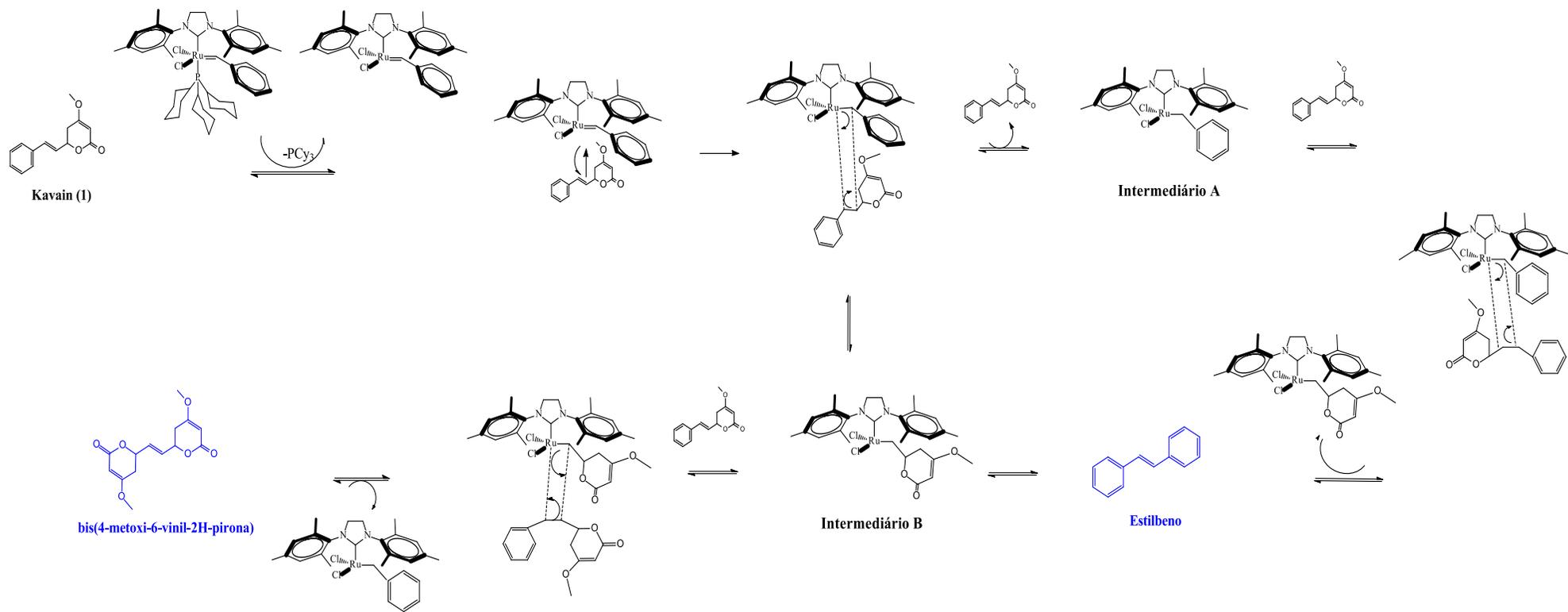
Por 48h, estilbeno (3) apareceu com cerca de 24% e Kavain (1) com cerca de 75% de rendimento. Mantendo-se a temperatura de 50°C e razão de 1:1 mol, nas reações por 96h, pode-se observar que estilbeno (3) e Kavain (1) apareceram com cerca de 32% e 68% na mistura, respectivamente (Figura 4.3 (B)). A análise de CG-

EM da reação de metátese da Kavain a 50 °C e proporção 1:1 mol, por menores tempos reacionais que 48h, não apresentaram picos de nenhum produto.

O produto bis(4-metoxi-6-vinil-2H-pirona) (2) não foi observado nas análises por cromatografia em nenhuma das condições estudadas. Ao observar o esquema do mecanismo de reação de autometátese da Kavain por G2 (Figura 4.4) nota-se que a formação do estilbeno está ligada à metátese da Kavain, a partir do cruzamento da parte referente ao estireno desta molécula. Ou seja, a formação do metal-carbeno a partir da coordenação da parte do estireno da molécula de Kavain produz um intermediário (A) que favorece a continuidade da reação e síntese do estilbeno (3). Para investigar se houve formação do bis(4-metoxi-6-vinil-2H-pirona) (2) nas sínteses ilustradas na Figura 4.3, na qual tivemos a formação do estilbeno (3), foi realizada análise por Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Na Figura 4.4, está representada os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  da Kavain pura (azul), e as sínteses sob condições de catalisador:substrato 1:1 mol e 50°C por 48 h (verde) e 50°C por 96h (vermelho).



**Figura 4.4.** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  da Kavain pura (azul), e da mistura resultante da metátese sob condições de: substrato/catalisador 1:1 mol e 50°C por 48h (verde) e 50°C por 96h (vermelho).



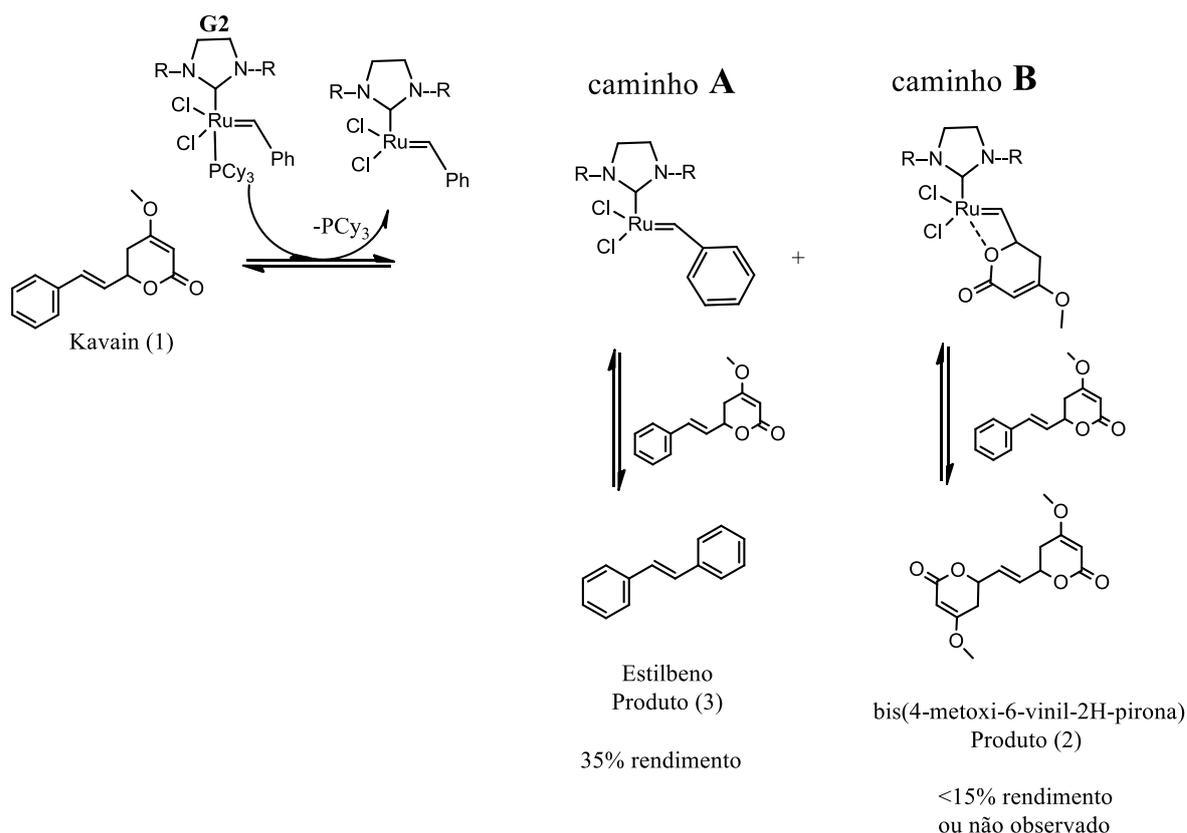
**Figura 4.5.** Esquema reacional da autometátese da Kavain catalisado por G2.

A fim de monitorar a parte olefínica dos produtos, analisou-se o gráfico na região entre 5 e 7 ppm. Apresentaram-se nos espectros em verde e vermelho, sínteses com proporção 1:1 mol a 50 °C por 48h e 96h, respectivamente. O singlete em 6,95 ppm é referente à molécula de estilbeno, que aparece com uma base mais alargada ocasionada pelo equilíbrio dinâmico cis/trans dos hidrogênios da olefina, e localizada a esquerda do espectro em campo baixo, devido ao efeito anisotrópico causado pelos anéis fenis. O sinal em 6,00 ppm do bis(4-metoxi-6-vinil-2H-pirona), dois duplos dubletos, é referente ao acoplamento do H4 com H3 E H5, e o segundo duplo dubleto é formado pelo acoplamento de H5 com H4 e H6.

A síntese com proporção 1:1 mol a 50 °C, por 48h (verde) apresentou rendimento de 25% e 10% para estilbeno e bis(4-metoxi-6-vinil-2H-pirona), respectivamente. Já a síntese sob condições 1:1 mol a 50 °C por 96h, obteve-se rendimento de 35% e <15% para estilbeno e bis(4-metoxi-6-vinil-2H-pirona), respectivamente. A percentagem do estilbeno foi determinada a partir da intensidade do sinal a 6,95 ppm, bis(4-metoxi-6-vinil-2H-pirona) a partir da intensidade do sinal a 6,00 ppm.

Diante dos resultados vimos que, a conversão de substrato para a formação do estilbeno foi maior que para formação do bis(4-metoxi-6-vinil-2H-pirona); o qual apareceu apenas com traço observados por RMN <sup>1</sup>H. Isso nos leva a sugerir que o intermediário metal-carbeno formado a partir da porção metoxi-pirona (Figura 4.6- B) da molécula de Kavain, parece formar um intermediário mais estável e menos propício à formação do bis(4-metoxi-6-vinil-2H-pirona), produto (2).

Como mostrado na Figura 4.6 – Caminho B, acredita-se que houve coordenação do oxigênio (C-O) ao metal simultaneamente à coordenação da olefina, o que levaria a um sistema estabilizado. A reatividade dos grupos oxigenados da porção metoxi-pirona pode ocasionar um provável efeito quelante, dificultando a metátese de olefinas, uma vez que o sistema perde mobilidade, formando um intermediário mais estável, ocasionando estacionamento na formação do produto (2) [22-31]. Além da dupla coordenação entre oxigênio e catalisador, a isomerização da ligação dupla pode ser outro fator que ocasionou baixo rendimento do bis(4-metoxi-6-vinil-2H-pirona) (Produto 2).



**Figura 4.6.** Esquema reacional para formação do estilbeno (Produto 3) e bis(4-metoxi-6-vinil-2H-pirona) (Produto 2); rendimentos da mistura resultante da síntese sob condições de: substrato/catalisador 1:1 mol e 50°C por 96h.

Em estudos realizados por Tunzun e colaboradores (2016), a reação de metátese de olefina é falha no caso do derivado com cadeia alifática mais curta devido à extensa isomerização da ligação dupla, entretanto para cadeias alifáticas mais longas, à autometátese de olefinas produz os dímeros desejados em excelentes rendimentos [45]. Dessa forma, a estereoquímica do substrato ao se aproximar do metal-carbeno pode influenciar na formação do bis(4-metoxi-6-vinil-2H-pirona) (Produto 2) [40].

Com objetivo de investigar o mecanismo de reação de autometátese da Kavain, estudos computacionais estão sendo realizados a fim de compreender e elucidar a reação e o comportamento termodinâmico através da combinação de efeitos eletrônicos e estéricos de G2 e Kavain (Dados prévios estão presentes no Apêndice A).

## 4.2 Teste de Mutação e Recombinação Somática – SMART

O presente estudo investigou a ação mutagênica e recombinogênica da Kavain, isoladamente, bem como os possíveis efeitos moduladores dessa molécula sobre danos ao DNA induzidos pela DXR em células somáticas de *D. melanogaster*. Embora existam relatos sobre ação farmacológica dessa cavactona, este é o primeiro trabalho que se aplica o SMART na avaliação da mutagenicidade/antimutagênese da Kavain.

Foram realizados os cruzamentos padrão (ST) e de alta bioativação (HB), em que no cruzamento ST os indivíduos possuem níveis basais de CYP450 apresentando baixa biometabolização dos compostos; enquanto no cruzamento HB os indivíduos possuem alta expressividade de CYP450, logo são capazes de metabolizar uma ampla variedade de substratos, podendo assim assemelhar seu sistema metabólico ao de mamíferos [83].

A Tabela 4.2 apresenta os resultados obtidos da frequência de manchas mutantes observadas nos descendentes trans-heterozigotos marcados – MH (*mwh+ / +flr<sup>3</sup>*) e heterozigotos balanceados – BH (*mwh+ / +TM3, Bd<sup>S</sup>*) provenientes do cruzamento ST tratados com Kavain isolada ou simultaneamente com DXR. Nos indivíduos MH não foi observado aumento significativo na frequência de todas as categorias de manchas em nenhuma das concentrações avaliadas quando comparadas ao controle negativo, desta forma, não foi observado efeito mutagênico e/ou recombinogênico.

Na avaliação da atividade antimutagênica, efeito modulador da ação mutagênica da DXR foi observado quando ambas as drogas foram administradas simultaneamente. Na menor concentração de Kavain (DXR + 32 µg/mL) a quantidade de manchas de todas as categorias diminuiu significativamente, quando comparada a DXR isolada, no entanto, efeito antagônico foi observado na maior concentração (DXR + 128 µg/mL), na qual se observou aumento no número de manchas em todas as categorias (Tabela 4.2). A concentração de 32 µg/mL inibiu a ocorrência de dano ao DNA induzida pela DXR, enquanto a maior concentração potencializou o dano ao DNA induzido pela DXR.

**Tabela 4.2.** Resultados observados nos descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) e nos heterozigotos balanceados (BH) de *Drosophila melanogaster* derivados do cruzamento padrão (ST), tratados com de Kavain (KV), Doxorubicina (DXR, controle positivo) e Acetona 2% (controle negativo).

Genótipos/ Tratamentos		Número de moscas (N)	Manchas por indivíduo diagnóstico estatístico <sup>a</sup>				Total de manchas <i>mwh</i> <sup>c</sup> (n)	Frequência de formação de clones/10 <sup>5</sup> células por células em divisão <sup>d</sup>		Recombinação (%)	Inibição (↓) ou indução (↑) (%) <sup>e</sup>
DXR mg/mL	KV µg/mL		Manchas simples pequenas (1-2 células) <sup>b</sup> m=2	Manchas simples grandes (>2 células) <sup>b</sup> m=5	Manchas gêmeas m=5	Total de manchas m=2		Observado	Corrigido pelo controle		
<i>mwh/flr<sup>3</sup></i>											
0	0	60	0,13 (08)	0,15 (09)	0,02 (01)	0,30 (18)	18	0,62			
0	32	60	0,07 (04) -	0,12 (07) -	0,00 (00) -	0,18 (11) -	11	0,38			
0	64	60	0,08 (05) -	0,03 (02) -	0,00 (00) -	0,12 (07) -	7	0,24			
0	128	60	0,27 (16) -	0,00 (00) -	0,00 (00) -	0,27 (16) -	16	0,55			
0,125	0	60	1,97 (118) +	3,80 (228) +	0,78 (47) +	6,55 (393) +	363	12,40	11,78	97,39	
0,125	32	60	0,38 (23) *	1,10 (66) *	0,32 (19) *	1,80 (108) *	101	3,45	2,83	96,39	
0,125	64	60	2,12 (127)	4,40 (264)	1,62 (97) *	8,13 (488)	458	15,64	15,03		
0,125	128	60	2,20 (132) *	4,93 (296) *	1,45 (87) *	8,58 (515) *	477	16,29	15,68	95,64	
<i>mwh/TM3</i>											
0	0	60	0,05 (03)	0,00 (00)	<sup>f</sup>	0,05 (03)	3	0,10			
0,125	0	60	0,18 (11) +	0,02 (01)		0,20 (12) +	12	0,41	0,31		
0,125	32	60	0,05 (03)	0,05 (03)		0,10 (06)	6	0,20	0,10		
0,125	128	60	0,35 (21)	0,03 (02)		0,38 (23) *	23	0,79	0,68		

Moscas trans-heterozigotas marcadas (*mwh/flr<sup>3</sup>*) e heterozigotas balanceadas (*mwh/TM3*) foram analisadas.

<sup>a</sup> Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würgler (1988; 1995): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo;  $p \leq 0,05$  vs. controle negativo (Acetona 2%). \*  $p \leq 0,05$  vs. controle positivo (DXR isolada); m: fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos.

<sup>b</sup> Incluindo manchas simples *flr<sup>3</sup>* raras.

<sup>c</sup> Considerando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas.

<sup>d</sup> Frequência de formação de clone:  $n/N/48.800$  (dados observados).

<sup>e</sup> Calculado como:  $[(DXR \text{ isolada} - DXR + KV)/DXR \text{ isolada}] \times 100$ , de acordo com Abraham (1994).

<sup>f</sup> Apenas manchas simples *mwh* podem ser observadas nos indivíduos heterozigotos *mwh/TM3*, já que o cromossomo balanceador *TM3* não contém o gene mutante *flr3*.

Sobre a potencialização de danos ao DNA causados pela DXR nas concentrações mais elevadas de Kavain efeitos moduladores dependentes de concentração também já foi descrito por Rezende et al. (2011, 2013), o que pode ser atribuído a disponibilização celular do composto, que embora apresente atividade protetora em menores concentrações, quando em maiores quantidades tornam-se tóxicos para a célula, assim como observado por Fedel-Miyasato et al. (2014) [61, 89-90].

A partir da análise dos descendentes BH, de acordo com a frequência de clones induzidos por  $10^5$  células corrigidos pelo controle, estimou-se a frequência de recombinação nos tratamentos e controle, observou-se que em todas as análises esta frequência foi aproximada, ou seja, a Kavain não alterou a atividade recombinogênica da DXR, mas diminuiu em 75,94% a atividade mutagênica quando administrada simultaneamente a esta na concentração de 32  $\mu\text{g/mL}$  e potencializou o efeito mutagênico em 33,04% quando associada na concentração de 128  $\mu\text{g/mL}$  (Tabela 4.2).

No cruzamento HB, diferente do ST, a Kavain foi mutagênica nas concentrações de 64 e 128  $\mu\text{g/mL}$ , observou-se aumento no número de manchas simples pequenas nessas concentrações, o que contribuiu para o aumento no total de manchas (Tabela 4.3). Ao analisar a descendência BH deste cruzamento observou-se também que ocorreu o aumento de manchas simples pequenas e conseqüentemente o aumento do total de manchas. A partir das comparações do número de manchas entre as duas descendências observou-se a ocorrência predominante de efeitos mutagênicos pontuais. A divergência entre os resultados observados nos dois cruzamentos pode ser atribuída à metabolização da Kavain, que está diretamente relacionada com a quantidade de enzimas metabólicas do complexo CYP450 presentes nos descendentes ST e HB em nível basal e elevado, respectivamente [83-56].

O complexo CYP450 é formado por uma família de enzimas que tem como principal função a transformação de substâncias tóxicas em substâncias menos tóxicas a fim de facilitar sua eliminação do organismo a partir de reações de biotransformação [84]. Entretanto, a biotransformação de xenobióticos e algumas drogas pode levar também ao efeito contrário ao não serem inativados. Alguns metabólitos podem apresentar atividade aumentada ou propriedades tóxicas, incluindo mutagenicidade, teratogenicidade e carcinogenicidade [85-91].

Em mamíferos, o metabolismo da Kavain vem sendo estudado a partir da análise de sangue, soro, urina e em linhagem de células humanas hepáticas (Hep-G2), cerca de 18 metabólitos já foram identificados [86, 87-88]. De forma similar, espera-se que a Kavain também seja metabolizada na descendência do cruzamento HB e que possivelmente os metabólitos possam estar presentes nas células desses indivíduos. Adicionalmente, além da ação isolada ou sinérgica desses metabólitos espera-se que interações farmacocinéticas com outras drogas que também são metabolizadas pelo sistema CYP450 possam ocorrer [28], assim como observado quando administrado simultaneamente Kavain e DXR.

A administração simultânea da Kavain com a DXR no cruzamento HB induziu o aumento do número de manchas na concentração 32 µg/mL em 10,28%, no entanto, na concentração 64 µg/mL observou-se a diminuição do número de manchas em todas as categorias e a inibição de 53,66% do dano induzido pela DXR. A análise da descendência BH permitiu estimar a frequência de recombinação, observou-se que independente da concentração de Kavain a frequência de recombinação foi aproximada, novamente a Kavain não alterou atividade recombinogênica da DXR, apenas modulou o efeito mutagênico.

Quando comparados os resultados das Tabelas 4.2 e 4.3 para os indivíduos tratados apenas com DXR observou-se que na descendência HB o número total de manchas mutantes é muito maior, evidenciando assim que a DXR quando metabolizada é mais mutagênica [62]. Este fato deve-se a um segundo mecanismo de ação da DXR, que é a produção de radicais livres, causando estresse oxidativo na célula, e conseqüentemente a instabilidade do DNA, induzindo a ocorrência de mutações durante a replicação. Assim duas formas de inibir esse efeito mutagênico da DXR podem ser consideradas: (1) a inibição da metabolização da DXR ou (2) a redução desses radicais livres por um agente antioxidante [62].

Evidências a cerca da interação do extrato de Kava e das cavalactonas individualmente com enzimas do CYP450 demonstram que essas são inibidores potentes deste complexo enzimático [25,27-26].

**Tabela 4.3.** Resultados observados nos descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) e nos heterozigotos balanceados (BH) de *Drosophila melanogaster* derivados do cruzamento de alto-bioativação (HB), tratados com Kavain (KV), Doxorubicina (DXR, controle positivo) e Acetona 2% (controle negativo).

Genótipos/ Tratamentos		Número de moscas (N)	Manchas por indivíduo diagnóstico estatístico <sup>a</sup>				Total de manchas <i>mwh</i> <sup>c</sup> (n)	Frequência de formação de clones/10 <sup>5</sup> células por células em divisão <sup>d</sup>		Recombinação (%)	Inibição (↓) ou indução (↑) (%) <sup>e</sup>
DXR mg/mL	KV µg/mL		Manchas simples pequenas (1-2 células) <sup>b</sup> m=2	Manchas simples grandes (>2 células) <sup>b</sup> m=5	Manchas gêmeas m=5	Total de manchas m=2		Observado	Corrigido pelo controle		
<i>mwh/flr<sup>3</sup></i>											
0	0	60	0,12 (07)	0,03 (02)	0,03 (02)	0,18 (11)	11	0,38			
0	32	60	0,18 (11)	0,03 (02)	0,02 (01)	0,23 (14)	14	0,48	0,10		
0	64	60	0,48 (29) +	0,02 (01)	0,02 (01)	0,52 (31) +	31	1,06	0,68	-20,00	
0	128	60	0,40 (24) +	0,05 (03)	0,02 (01)	0,48 (29) +	28	0,96	0,58	41,18	
0,125	0	60	5,48 (329) +	3,73 (224) +	1,50 (90) +	10,72 (643) +	585	19,98	19,60	96,86	
0,125	32	60	8,02 (481) *	4,15 (249)	1,05 (63)	13,22 (793) *	644	21,99	21,62	98,74	10,28 ↑
0,125	64	60	3,15 (189) *	1,97 (118) *	0,53 (32) *	5,65 (339) *	277	9,46	9,08	94,36	53,66 ↓
0,125	128	60	5,12 (307)	1,53 (92) *	0,33 (20) *	6,98 (419)	332	11,34	10,96		
<i>mwh/TM3</i>											
0	0	60	0,03 (02)	0,00 (00)	f	0,03 (02)	2	0,07			
0	64	60	0,43 (26) +	0,00 (00)		0,43 (26) +	26	0,89	0,82		
0	128	60	0,18 (11) +	0,02 (01)		0,20 (12) +	12	0,41	0,34		
0,125	0	60	0,25 (15) +	0,08 (05) +		0,33 (20) +	20	0,68	0,61		
0,125	32	60	0,15 (09)	0,02 (01)		0,17 (10)	10	0,34	0,27		
0,125	64	60	0,27 (16)	0,02 (01)		0,28 (17)	17	0,58	0,51		

Moscas trans-heterozigotas marcadas (*mwh/flr<sup>3</sup>*) e heterozigotas balanceadas (*mwh/TM3*) foram analisadas.

<sup>a</sup> Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo; p ≤ 0,05 vs. controle negativo (Acetona 2%). \* p ≤ 0,05 vs. controle positivo (DXR isolada); m: fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos.

<sup>b</sup> Incluindo manchas simples *flr<sup>3</sup>* raras.

<sup>c</sup> Considerando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas.

<sup>d</sup> Frequência de formação de clone: n/N/48.800 (dados observados).

<sup>e</sup> Calculado como: [(DXR isolada - DXR + KV)/DXR isolada] x 100, de acordo com Abraham (1994).

<sup>f</sup> Apenas manchas simples *mwh* podem ser observadas nos indivíduos heterozigotos *mwh/TM3*, já que o cromossomo balanceador *TM3* não contém o gene mutante *flr3*.

Assim, é possível que a Kavain quando associada à DXR tenha inibido as enzimas do CYP450 necessárias à metabolização deste quimioterápico. Como na descendência ST, a quantidade de CYP450 é menor, quantidade menor de Kavain (32 µg/mL) foi o suficiente para se observar a inibição da atividade mutagênica e o efeito protetor. Já na descendência HB, na qual a quantidade de CYP450 é maior, uma quantidade maior de Kavain (64 µg/mL) foi necessária para que o mesmo efeito fosse observado. Outro fato que deve ser considerado é o potencial antioxidante da Kavain já descrito por Wruck et al. (2008) e Sing et al. (2018) [92-18]. O sequestro de radicais livres pode impedir a ocorrência de dano no material genético e assim contribuir para a diminuição da frequência de mutação [93]. No presente estudo, é possível que tanto as atividades de inibição do CYP450 como a atividade antioxidante da Kavain tenham colaborado nos resultados observados.

# Capítulo 5

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

---

Foi utilizado o catalizador de Grubbs de 2<sup>a</sup> geração como iniciador para reação de autometátese da Kavain e avaliação das características do catalisador e substrato, especialmente eletrônicas e estéricas. Os dois produtos esperados da autometátese da Kavain bis(4-metoxi-6-vinil-2H-pirona), e estilbeno foram sintetizados com rendimentos diferentes: <15% e 35%, respectivamente. Este estudo sugere que, o baixo rendimento do bis(4-metoxi-6-vinil-2H-pirona), o principal produto esperado, ocorreu devido a reatividade dos grupos oxigenados da parte metoxi-pirona da Kavain. Essa interação forma um intermediário mais estável e menos favorável a formação do principal produto esperado, dificultando a catálise. Entendemos que a investigação sobre o mecanismo de reação, comportamento termodinâmico, eletrônicos e estéricos é de grande importância para elucidar o mecanismo reacional da autometátese da Kavain. Desta forma, estudos computacionais têm sido realizados por este Grupo de Pesquisa a fim de otimizar as condições reacionais para síntese inédita do bis(4-metoxi-6-vinil-2H-pirona).

Os resultados obtidos com o teste SMART em *D. melanogaster* referente à ação mutagênica da Kavain mostram que essa droga apresenta ação mutagênica indireta na concentração igual ou superior a 64 µg/mL, necessitando de ativação metabólica pelo complexo CYP450. Na associação de DXR e Kavain em co-tratamento foi evidenciado efeito modulador da atividade mutagênica da DXR dependente da concentração de Kavain e da quantidade de CYP450. A Kavain não alterou o perfil recombinogênico da DXR. Esses resultados ressaltam a importância da realização de estudos como o aqui apresentado, além de mais pesquisas e testes genéticos farmacológicos antes de aprovar novos medicamentos, a fim de conhecer sua interação com outros medicamentos e garantir uma administração segura.

# REFERÊNCIAS

---

1. MORAIS, I.C.; SILVA, L. D. G.; FERREIRA, H. D.; PAULA, J. R.; TRESVENZOL, L. M. F. Levantamento sobre plantas medicinais comercializadas em Goiânia; abordagem popular (raizeiros) e abordagem científica (levantamento bibliográfico). **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2, n.1, p. 13-16, 2005.
2. JUSTO, S. C.; SILVA, C. M. *PIPER METHYSTICUM* G. FORSTER (KAVA-KAVA): UMA ABORDAGEM GERAL. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.5, n. 1, 2008.
3. BARBOSA, D. R.; LENARDON, L.; PARTATA, A. K. KAVA-KAVA (*Piper methysticum*): Uma revisão geral. **Revista Científica do ITPAC**, Araguaína, v.6, n.3, 2013.
4. MARTIN, A.C.; JOHNSTON, E.; XING, C.; HEGEMAN, A.D. Measuring the Chemical and Cytotoxic Variability of Commercially Available Kava (*Piper methysticum* G. Forster). **PLOS One**, 2014.
5. SHOWMAN, A. F.; BAKER, J. D.; LINARES, C. NAEOLE, K. C.; BORRIS, R.; JOHNSTON, E.; KONANUI, J.; TURNER, H. Contemporary Pacific and Western perspectives on `awa (*Piper methysticum*) toxicology. **Phytoterapia**, v.100, 2015.
6. SINGH, Y. N.; SINGH, N. N. Therapeutic Potential of Kava in the Treatment of Anxiety Disorders. **CNS Drugs**.v.16, n. 11, 731-743, 2002.
7. CORDEIRO, C. H. G.; CHUNG, M. C.; SACRAMENTO, L. V. S. Interações medicamentosas de fitoterápicos e fármacos: *Hypericum perforatum* e *Piper methysticum*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.3, p.272-278, 2005.
8. TUROLLA, M. S.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, p. 289-306, abr./jun.2006.
9. LEBOT, V.; LÉVESQUE, J. The origin and distribution of Kava (*Piper methysticum* Forst. F., Piperaceae): a Phytochemical approach. **Allertonia**. v.5, n. 2, p. 223-281, 1989.
10. CHUA, H. C.; CHRISTENSEN, E. T.H.; JESEN, K. H.; HARTIADI, L. Y.; RAMZAN, I.; JESEN, A. A., ABSALOM, N. L.; CHEBIB, M. Kavain, the Major Constituent of the Anxiolytic Kava Extract, Potentiates GABAA Receptors: Functional Characteristics and Molecular Mechanism. **PLoS ONE**, v.11, n.6, 2016.

11. KORMANN, E. C.; AMARAL, P. A.; DAVID, M.; LIMA, V. L. E.; FILHO, V. C.; BUZZI, F. C. Kavain analogues as potential analgesic agents. **Pharmacological reports**, v. 64, p. 1419-1426, 2012.
12. SMITH, K. K.; DHARMARATNE, H. R. W.; FELTENSTEIN, M. W.; BROOM, S. L.; ROACH, J. T.; NANAYAKKARA, N. P. D.; KHAN, I. A.; SUFKA, K. J. Anxiolytic effects of kava extract and kavalactones in the chick social separation-stress paradigm. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 155, p. 86-90, 2001.
13. GRUNZE, H.; LANGOSCH, J.; SCHIRRMACHER, K.; BINGMANN, D.; VON WEGERER, J.; WALDEN, J. Kava pyrones exert effects on neuronal transmission and transmembraneous cation currents similar to established mood stabilizers – A review., **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 25, p. 1555—1570, 2001.
14. GLEITZ, J.; BEILE, A.; WILKENS, P.; AMERI, A.; PETERS, T. Antithrombotic Action of the Kava Pyrone (+)-Kavain Prepared from *Piper methysticum* on Human Platelets. **Planta Medica**, v. 63, p. 27-30, 1997.
15. GLEITZ, J.; FRIESE, J.; BEILE, A.; AMERI, A.; PETERS, T. Anticonvulsive action of ( $\pm$ )-kavain estimated from its properties on stimulated synaptosomes and Na<sup>+</sup> channel receptor sites. **European Journal Pharmacology**, 1996.
16. GUO, Q.; CAO, Z.; WU, B.; CHEN, F.; TICKNER, J.; WANG, Z.; QUI, H.; WANG, C.; CHEN, K.; TAN, R.; GAO, Q.; XU, J. Modulating calcium-mediated NFATc1 and mitogen-activated protein kinase deactivation underlies the inhibitory effects of kavain on osteoclastogenesis and bone resorption. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, p. 789-801, 2018.
17. TANG, X.; AMAR, S. Kavain inhibition of LPS-induced TNF- $\alpha$  via ERK/LITAF. **Toxicology Research**, n. 5, p. 188-196, 2016.
18. SINGH, S. P.; HUCK, O.; ABRAHAM, N. G.; AMAR, S. Kavain Reduces *Porphyromonas gingivalis*-Induced Adipocyte Inflammation: Role of PGC-1 $\alpha$  Signaling. **The Journal of Immunology**, v. 201, n. 5, p. 1491-1499, 2018.
19. GRAF, U.; SPANÓ, M. A.; RINCÓN, J. G.; ABRAHAM, S. K.; ANDRADE, H. H. The wing somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila melanogaster* na eficiente tool for the detection of genotoxic activity of purê compounds or complex mixtures as well as for studies on antigenotoxicity. **African Newsletter on Occupational Health and Safety**, n. 6, p. 9-13, 1996.
20. GUZMÁN-RINCÓN, J.; GRAF, U. *Drosophila melanogaster* Somatic Mutation and Recombination Test as a biomonitor., in: Butterworth, E. M.; Corkum, L. D.; Guzmán-Rincón, J. (Eds). *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change*. **Plenum Press**, New York, p. 169–181, 1995.
21. JOHNS, A. M.; AHMED, T. S.; JACKSON, B. W.; GRUBBS, R. H.; PEDERSON, R. L. High *Trans* Kinetic Selectivity in Ruthenium-based Olefin

- Cross Metathesis Through Stereoretention. **Organic Letters**, p. 772-775, 2016.
22. GRUBBS, R. H. Olefin metathesis. **Tetrahedron**, v. 60, p. 7117-7140, 2004.
23. MARTIN, A.C.; JOHNSTON, E.; XING, C.; HEGEMAN, A.D. Measuring the Chemical and Cytotoxic Variability of Commercially Available Kava (*Piper methysticum* G. Forster). **PLOS One**, 2014.
24. EINBONDA, L. S.; NEGRIN, A.; KULAKOWSKIB, D. M.; WUD, H. A.; ANTONETTIB, V.; JALEESB, F.; LAWA, W.; ROLLERE, M.; REDENTIB, S.; KENNELLYB, E. J.; BALICKA, M. J. Traditional preparations of kava (*Piper methysticum*) inhibit the growth of human colon cancer cells *in vitro*. **Phytomedicine**, v. 24, 2017.
25. MATHEWS, J. M.; ETHERIDGE, A, S.; BLACK, S. R. Inhibition of human cytochrome P450 activities by kava extract and Kavalactones. **Drug Metabolism & Disposition**, v. 30, n.11, p.1153–1157, 2002.
26. ZOU, L.; HENDERSON, G. L.; HARKEY, M. R.; SAKAI, Y. LI, A. Effects of Kava (Kava-kava, 'Awa, Yaqona, *Piper methysticum*) on c-DNA-expressed cytochrome P450 enzymes and human cryopreserved hepatocytes. **Phytomedicine**, v. 11, 2004.
27. MATHEWS, J. M.; ETHERIDGE, A, S.; VALENTINE, J. L.; BLACK, S. R.; COLEMAN, D. P.; PATEL, P.; SO, J.; BURKA, L. T. Pharmacokinetics and disposition of the kavalactone kawain: interaction with kava extract and kavalactones in vivo and in vitro. **Drug metabolism and disposition**, v. 33, n.10. 2005.
28. ANKE, J.; RAMZAN, I. Pharmacokinetic and pharmacodynamic drug interactions with Kava (*Piper methysticum* Forst f.). **Journal of Ethnopharmacology**, n. 93, p.153-160, 2004.
29. LIMA, P. S. **Metátese de olefinas com óleos vegetais uma estratégia para o desenvolvimento de biorefinarias**. 2011. 75 f. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade do Rio Grande do Sul, Instituto de Química, Porto Alegre, 2011.
30. IVIN, K. J.; MOL, J. C. **Olefin Metathesis and Metathesis Polymerization**, Academic Press, New York, 1997.
31. GRUBBS, R. H. Olefin-metathesis catalysts for the preparation of molecules and materials (Nobel Lecture). **Angewandte Chemie International Edition**, v. 45, p. 3760-3765, 2006.
32. MOL, J. C. Industrial applications of olefin metathesis. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 213, n.1, p. 39–45, 2004.

33. SCHRODI, Y.; PEDERSON, R.L. Evolution and Applications of Second-Generation Ruthenium Olefin Metathesis Catalysis. **Aldrichimica Acta**, v. 40, n. 2, p. 45-52, 2007.
34. RYBAK, A.; FOKOU, P. A.; MEIER, M. A. R. Metathesis as a versatile tool in oleochemistry. **European Journal Lipid Science Technology**, v.110, p. 110, 797, 2008.
35. FREDERICO, D.; BROCKSOM, U.; BROCKSOM, T.M. A Reação de Metátese de Olefinas: Reorganização e Ciclização de Compostos Orgânicos. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 692-702, 2005.
36. CALDERON, N.; CHEN, H.Y.; SCOTT, K.W. **Tetrahedron Lett.**, v.2, p. 3327, 1967.
37. DA SILVA, C. P.; LIMA, F. das C. A.; LEAL, R. C.; NETO, J. M. N. Investigação do mecanismo de catálise romp do norborneno utilizando métodos de funcional de densidade. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p 1444-1448, 2010.
38. BAIBICH, I. M.; GREGÓRIO, J. R. Metátese Catalítica de Olefinas. **Química Nova**, v. 16, n. 2, 1993.
39. REFVIK, M. D.; LAROCK, R. C. The chemistry of metathesized soybean oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.76, n. 1, p.99–102, 1999.
40. BURDETT, K.A.; HARRIS, L.D.; MARGL, P.; MAGHON, B.R.; MOKHTAR-ZADEH, T.; SAUCIER, P.C.; WASSERMAN, E.P. Renewable monomer feedstocks via olefin metathesis: fundamental mechanistic studies of methyl oleate ethenolysis with the first generation Grubbs catalyst. **Organometallics**, v.23, n.9, p.2027- 2047, 2003.
41. CONNON, S. J.; DUNNE, A. M.; BLECHERT, S. A Self-Generating, Highly Active, and Recyclable Olefin-Metathesis Catalyst. **Angewandte Chemie International Edition**, v.41, n.20, p.3835–3838, 2002
42. MUTLU, H.; HOFSSÄß, R.; MONTENEGRO, R. E.; MEIER, M. A. R. Self-metathesis of fatty acid methyl esters: full conversion by choosing the appropriate plant oil. **RSC Advances**, v.3, n.15, p.4927, 2013.
43. THOMAS, P.A.; MARVEY, B.B. Room Temperature Ionic Liquids as Green Solvent Alternatives in the Metathesis of Oleochemical Feedstocks. **Molecules**, v.21, n.184, 2016.
44. MARVEY, B.B.; SEGAKWENG, C. K.; VOSLOO, M. H. Ruthenium Carbene Mediated Metathesis of Oleare-Type Fatty Compounds. **International Journal of Molecular Sciences**, v.9, p.615-625, 2008.

45. TÜZÜN, A.; LLIGADAS, G.; RONDA, J. C.; GALIÀ, M.; CÁDIZ, V. Castor oil-derived benzoxazines: Synthesis, self-metathesis and properties of the resulting thermosets. **European Polymer Journal**, v.75, p.56–66, 2016.
46. SCHWAB P.; GRUBBS R. H.; ZILLER J. W. Synthesis and applications of  $\text{RuCl}_2(\text{CHR}')(\text{PR}_3)_2$ : The influence of the alkylidene moiety on metathesis activity. **Journal of the American Chemical Society**, v.118, p. 100–110, 1996.
47. HOLDER, S.; BLECHERT, S. Concise synthesis of coronafacic acid *via* ring closing olefin metathesis. **Accounts and Rapid Communications in Synthetic Organic Chemistry**, v. 6, p. 505–506, 1996.
48. NICKEL, A.; UNG, T.; MKRTUMYAN, G.; UY, J.; LEE, C.W.; STOIANOVA, D.; PAPAZIAN, J. et. al. A Highly Efficient Olefin Metathesis Process for the Synthesis of Terminal Alkenes from Fatty Acid Esters. **Topics Catalysis**, v. 55, p. 518–523, 2012.
49. DIAS E. L.; NGUYEN S. T.; GRUBBS R. H. Well-Defined Ruthenium Olefin Metathesis Catalysts: Mechanism and Activity, **Journal of the American Chemical Society**, v.119, n. 17, p. 3887-3897, 1997.
50. THOMAS, P.A.; MARVEY, B.B. Room Temperature Ionic Liquids as Green Solvent Alternatives in the Metathesis of Oleochemical Feedstocks. **Molecules**, 21, 184, 2016.
51. GARBER, S.T.; KINGSBURY, J.S.; GRAY, B.L.; HOVEYDA, A.H. Efficient and Recyclable Monomeric and Dendritic Ru-Based Metathesis Catalysts. **Journal of the American Chemical Society**, v. 122, n. 34, p. 8168–8179, 2000.
52. ADAMS, M.D. et al. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. **Science**, v. 287, p. 2185-2195, 2000.
53. OBOH, G.; ADEMILUYI, A.; ADEMOSUM, A. O.; OGUNSUYI, O. B.; OLADUN, F. L. **Fruit Fly (*Drosophila melanogaster*): A Viable Model for Screening Tropical Functional Foods for Neuroprotective Properties**. In: **Alzheimer's Disease & Treatment**, cap 4, 2018.
54. BIER, E. *Drosophila*, the golden bug, emerges as a tool for human genetics. **Nature Reviews Genetics**, v. 6, n.1, p.09-23, 2005.
55. SEPEL, L. M N; LORETO, E. L S. UM SÉCULO DE DROSOPHILA NA GENÉTICA. **Genética na Escola**, Ribeirão Preto, v. 2, n. 5, p. 42-47, 2010.
56. GRAF, U.; SCHAIK, N. Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis Related Subjects**, v.271, p.59-67, 1992.

57. GRAF, U.; WURGLER, F.E.; KATZ, A.J.; FREI, H.; JUON, H.; HALL, C.B.; KALE, P.G. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Environmental Mutagenesis**, v.6, n.2, p.153-188, 1984.
58. GRAF, U.; ABRAHAM, S.K.; GUZMÁN-RINCÓN, J.; WÜRGLER, F.E. Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**, v.402, p.203-209, 1998.
59. GRAF, U.; FREI, H.; KAGI, A. J.; WURGLER, F. E. Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. **Mutation Research**, v. 222, p. 359-373, 1989.
60. VALADARES, B. L. B. **Avaliação de derivados sintéticos da testosterona pelo teste de mutação e recombinação somática (SMART) em *Drosophila melanogaster***. 2007. 112f. Tese de doutorado- Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, 2007.
61. SINGAL, P.K.; LI, T.; KUMAR, D.; DANELISEN, I.; ILISKOVIC, N. Adriamycin-induced heart failure: mechanism and modulation. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.20, p.77–86, 2000.
62. COSTA, W. F.; NEPOMUCENO, J. C. Protective effects of a mixture of antioxidante vitamins and minerals on the genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 47, p. 18-24, 2006.
63. KOSOKO, A.M.; OLURINDE, O. J.; AKINLOYE, O.A. Doxorubicin induced neuro- and cardiotoxicities in experimental rats: Protection against oxidative damage by Theobroma cacao Sterm bark. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 10, p. 303-317, 2017.
64. FRAGIORGE, E. J.; SPANO, M. A.; ANTUNES, L. M. G. Modulatory effects of the antioxidant ascorbic acid on the direct genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Genetic and Molecular Biology**. v.30, n.2, p.449-455, 2007.
65. DE REZENDE, A. A. A.; E SILVA, M. L. A.; TAVARES, D. C.; CUNHA, W. R.; REZENDE, K. C. S.; BASTOS, J. K.; SPANÓ, M. A. The effect of the dibenzylbutyrolactolic lignan (-)-cubebin on doxorubicin mutagenicity and recombinogenicity in wing somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Food and Chemical Toxicology**, v.49, n.6, p.1235–1241, 2011.
66. ORSOLIN, P. C.; SILVA-OLIVEIRA, R. G.; NEPOMUCENO, J. Modulating effect of synthetic statins against damage induced by doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 81, p.111–119, 2015.
67. SATURNINO, R. S.; MACHADO, N. M.; LOPES, J. C.; NEPOMUCENO, J. C. Assessment of the mutagenic, recombinogenic, and carcinogenic potential of amphotericin B in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Drug and Chemical Toxicology**, v.41, n.1, p.9–15, 2017.

68. LOPES, J. C.; GUIMARÃES, L. M. M.; NEPOMUCENO, J. C.; MORELLI, S.; JUNIOR, R. J. O. Recombinogenic Effect of the Ternary Complex of Copper(II) with Doxycycline and 1,10-Phenanthroline on Somatic Cells of *Drosophila melanogaster*. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 6, p. 531-540, 2018.
69. XU, M. F.; TANG, P. L. *et al.* Effects by doxorubicin on the myocardium are mediated by oxygen free radicals. **Life Sciences**, v.68, n.8, Jan 12, p.889-901. 2001.
70. NASCIMENTO, M. C. M. O.; MARTINS, A. S. Cardiomiopatia induzida pela adriamicina: uma revisão. **Arquivos de Ciências e Saúde**, São José do Rio Preto v. 12, n. 2, p.111-115, 2005.
71. CARVALHO, F. S.; BURGEIRO, A.; GARCIA, R.; MORENO, A. J.; CARVALHO, R. A.; OLIVEIRA, P. J. Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity: From Bioenergetic Failure and Cell Death to Cardiomyopathy. **Medicinal Research Reviews**, v.34, n.1, p.106–135, 2018.
72. DU, Y.; XIA, L.; JO, A.; DAVIS, R. M.; BISSEL, P.; EHRICH, M. F.; KINGSTON, D. G. I. Synthesis and Evaluation of Doxorubicin-Loaded Gold Nanoparticles for Tumor-Targeted Drug Delivery. **Bioconjugate Chemistry**, v. 29, n. 2, p. 420–430, 2018.
73. MINOTTI, G.; MENNA, P.; SALVATORELLI, E.; CAIRO, G.; GIANNI, L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. **Pharmacological Reviews**, v. 56, p.185–229, 2004.
74. TREVISAN, M. G.; POPPI, R. J. Determination of doxorubicin in plasma by excitation-emission matrix fluorescence and multi-way analysis. **Analytica Chimica acta**, v. 493, p. 69-81, 2003.
75. LEHMANN, M.; FRANCO, A.; VILAR, K. S. P.; REGULY, L. M.; ANDRADE, H. H. R. Doxorubicin and two of its analogues are preferential inducers of homologous recombination compared with mutational events in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**, v.539, n.1-2, p.167-75, 2003.
76. MCGOWAN, J. V.; CHUNG, R.; MAULIK, A.; PIOTROWSKA, I.; WALKER, J. M.; YELLON, D. M. Anthracycline Chemotherapy and Cardiotoxicity. **Cardiovascular Drugs and Therapy**, v. 31, p. 63-75, 2017.
77. SOUSA, E. T.; LOPES, W. A.; ANDRADE, J. B. Fontes, formação, reatividade e determinação de quinonas na atmosfera. **Química nova**, v. 39, n. 4, p. 486-495, 2016.
78. DIAS, C. D.; ARAUJO, B. C.; DUTRA, E. S.; NEPOMUCENO, J. C. Protective effects of  $\beta$ -carotene against the genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of

- Drosophila melanogaster*. **Genetics and Molecular Research**, v. 8, n. 4, p. 1367-1375, 2009.
79. SHAIK, A. A.; HERMANSON, D. L.; XING, C. Identification of methysticin as a potent and non-toxic NF- $\kappa$ B inhibitor from kava, potentially responsible for kava's chemopreventive activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.19, p.5732–5736, 2009.
80. FREI, H.; WURGLER, F.E. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assay indicate a positive, negative, or inconclusive result. **Mutation Research**, v.203, n.4, p.297-308, 1988.
81. FREI, H.; WURGLER, F.E. Optimal experimental design and sample size for the evaluation of data from somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila*. **Mutation Research**, v.334, n.2, p.247-258, 1995.
82. ABRAHAM, S.K. Antigenotoxicity of coffee in the *Drosophila* assay for somatic mutation and recombination. **Mutagenesis**, v.9, n.4, p.383-386, 1994.
83. FLOLICH, A.; WURGLER, F.E. New tester strains with improved bioactivation capacity for the *Drosophila* wing-spot test. **Mutation Research**, v.216, p.179-187, 1989.
84. GOLAN, D. E.; TASHJIAN, J. R.; ARMEN, H.; ARMSTRONG, E. J.; ARMSTRONG, A. W. **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.
85. OSHIMA-FRANCO, Y.; FRANCO, L.M. Biotransformação: importância e toxicidade. **Saúde em Revista**, p. 69-76, 2003.
86. KÖ P P E L, C.; TE N C Z E R, J. Characterization of urinary metabolites of D,L-kavain. **Journal of Chromatography**, v. 591, p. 207–211, 1991.
87. TARBAH, F. A.; MAHLER, H.; TEMME, O.; DALDRUP, T. Mass spectral characterisation of hepatic cell metabolites of D,L-Kavain using HPLC and GC/MS systems. **Problems of Forensic Sciences**, p.173–180, 2000.
88. TARBAH, F.; MAHLER, H.; KARDEL, B.; WEINMANN, W.; HAFNER, D.; DALDRUP, TH. Kinetics of kavain and its metabolites after oral application. **Journal of Chromatography B**, v.789, p.115-130, 2003.
89. DE REZENDE, A. A. A.; MUNARI, C. C.; DE OLIVEIRA, P. F.; FERREIRA, N. H.; TAVARES, D. C.; ANDRADE E SILVA, M. L.; REZENDE, N. H.; SPANÓ, M. A. A comparative study of the modulatory effects of (-)-cubebin on the mutagenicity/recombinogenicity induced by different chemical agents. **Food and Chemical Toxicology**, v.55, p.645- 652, 2013.
90. FEDEL-MIYASATO, L.E.S.; FORMAGIO, A.S.N.; AUHAREK, S.A.; KASSUYA, C.A.L.; NAVARRO, S.D.; CUNHA-LAURA, A.L.; MONREAL, A.C.D.; VIEIRA, M.C.; OLIVEIRA, R.J. Antigenotoxic and antimutagenic effects of *Schinus*

*terebinthifolius* Raddi in *Allium cepa* and Swiss mice: a comparative study. **Genetics and Molecular Research**, v.13, n.2, p.3411-3425, 2013.

91. OLSEN, L.; OOSTENBRINK, C.; JORGENSEN, F. S. Prediction of cytochrome P450 mediated metabolism. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.23, n.86, p.61-71, 2015.
92. WRUCK, C. J.; GOTZ, M. E.; HERDEGEN, T.; VAROGA, D.; BRANDENBURG, L. O.; PUFE, T. Kavalactones Protect Neural Cells against Amyloid Peptide-Induced Neurotoxicity via Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2-Dependent Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2 Activation. **Molecular Pharmacology**, v.73, n.6, p.1785–1795, 2008.
93. LOBO, V.; PATIL, A.; PHATAK, A.; CHANDRA, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacognosy Reviews**, v.4, p.118-126, 2010.

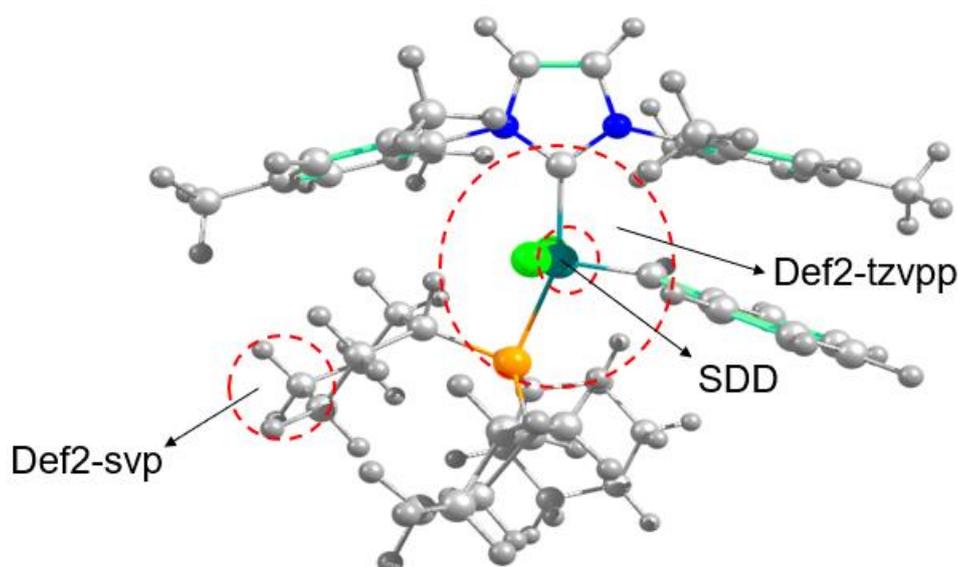
# Apêndice A\*

## CÁLCULOS COMPUTACIONAIS

---

### METODOLOGIA

Todos os cálculos realizados na investigação teórica foram executados no pacote computacional gaussian 09 e utilizou-se como interface gráfica, para a modelagem das moléculas bem como os resultados, o programa GaussView 5.0. As otimizações estruturais e os cálculos de frequências vibracionais foram obtidos a nível de Teoria do Funcional da Densidade (DFT – Density Functional Theory). Primeiramente foram otimizadas as estruturas do: catalisador, Kavain, produtos esperados (estibeno e bis(4-metoxi-6-vinil-2H-pirona), catalisador sem fosfina e a fosfina. O funcional empregado foi o M06L com o conjunto de bases: Def2tzvpp para os átomos de rutênio, cloro, fósforo e demais átomos ligados ao metal ou que irá interagir com o mesmo; Def2svp para todos os átomos não ligados ao rutênio (Figura 1). Para melhor representar os elétrons de caroço do átomo de Rutênio também foi utilizado o pseudopotencial relativístico SDD.



**Figura 1.** Representação do conjunto de bases empregadas na otimização estrutural: Def2-tzvpp para o átomo de Ru e demais átomos ligados ao metal; Def2-svp para átomos não ligados e pseudopotencial SDD para o rutênio.

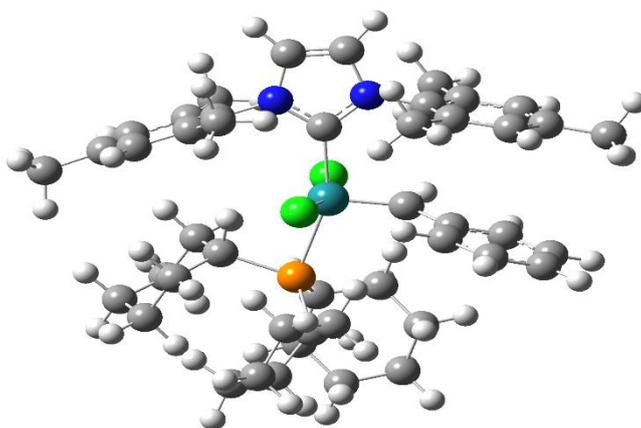
A investigação da interação da Kavain com o catalisador mostrou-se um processo demasiadamente custoso em tempo de cálculo, portanto, foi realizada uma pré-otimização estrutural para direcionar as próximas etapas do mecanismo. Nesta fase, empregou-se o funcional B3LYP e o conjunto de bases 3-21G, com o supracitado pseudopotencial. A investigação teve como foco parâmetros termodinâmicos, como: entalpia ( $\Delta H$ ) e energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ). As energias de dissociação foram obtidas a partir das estruturas otimizadas, seguindo a fórmula geral:

$$(1) \quad \Delta H(diss) = \Sigma \Delta H(produtos) - \Sigma \Delta H(reagentes)$$

$$(2) \quad \Delta G(diss) = \Sigma \Delta G(produtos) - \Sigma \Delta G(reagentes)$$

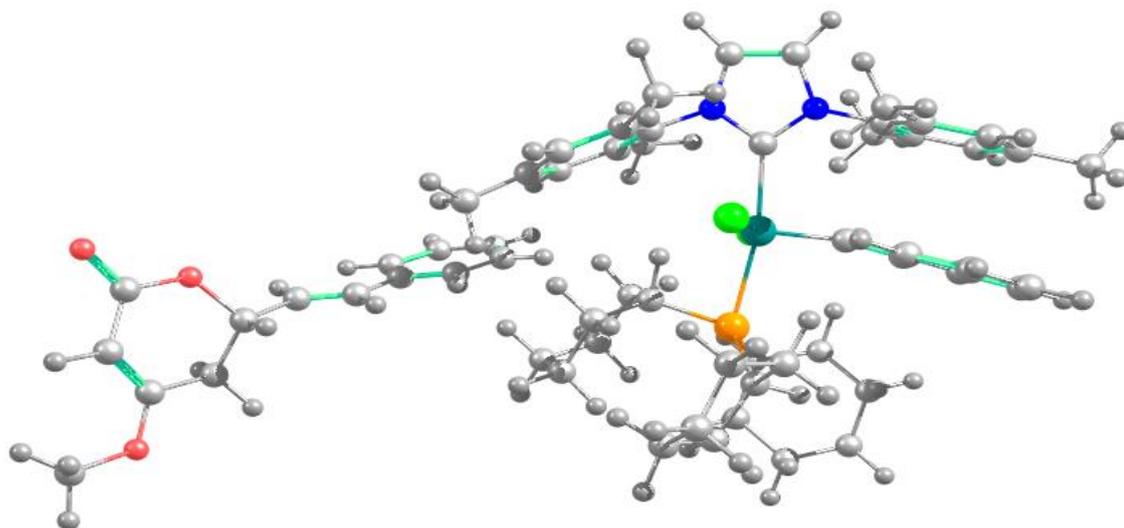
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A estrutura otimizada do catalisador de Grubbs de 2<sup>o</sup> geração apresentou geometria bipirâmide trigonal com dois ligantes ocupando a posição axial em um arranjo trans e três ligantes ocupando a região equatorial (Figura 2), conforme dados reportados na literatura. Entretanto, há uma distorção no ângulo C – Ru – P de aproximadamente 20,54° em relação ao ângulo característico para esta geometria (180°). Devido ao volume do grupo Pcy e conseqüentemente repulsão do ligante com o grupo = Ph, há uma distorção no ângulo da estrutura de energia mínima para diminuir os efeitos repulsivos e estéricos no catalisador.



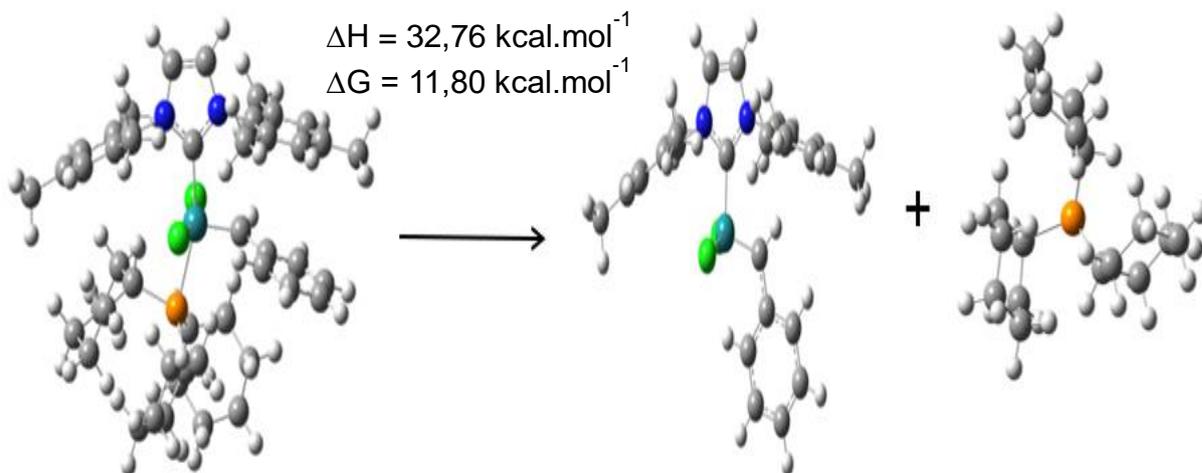
**Figura 2.** Estrutura otimizada do catalisador de Grubbs de 2<sup>o</sup> geração.

Estudos relacionados a mecanismos de reação de metáteses, com catalisadores organometálicos a base de rutênio, têm mostrado que há prévia dissociação de uma fosfina para ativar a catálise. No entanto, foi realizada uma tentativa de interação da Kavain com o catalisador (ambos otimizados) sem a dissociação da fosfina (Figura 3), onde a cada passo de otimização, o mesmo deveria se aproximar em 0,1 Å (angstrom) do átomo de rutênio. A coordenação da Kavain não foi possível devido ao impedimento estérico do grupo triciclohexilfosfina coordenado ao fósforo e do ligante N-heterocíclico, sendo necessário portanto, a dissociação da fosfina (Figura 4).



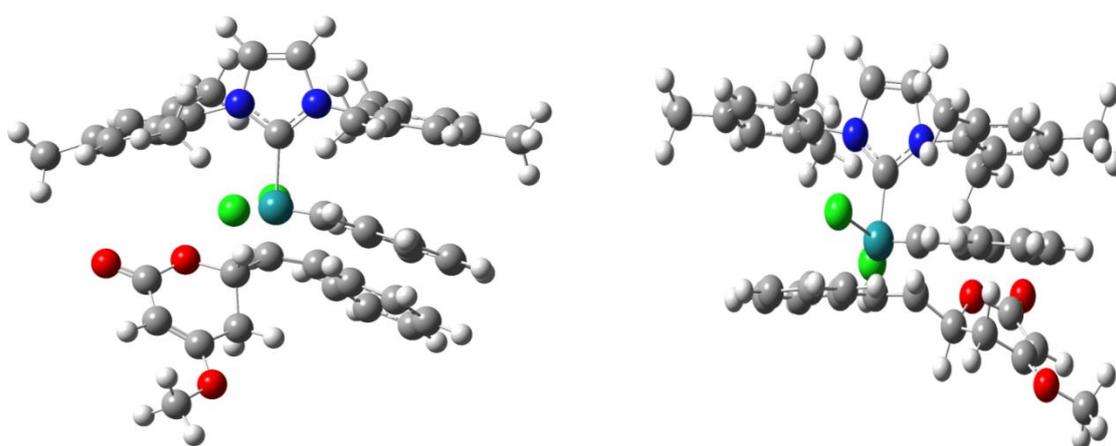
**Figura 3.** Interação da Kavain com o catalisador de Grubbs de 2<sup>o</sup> geração.

A saída da fosfina se mostrou um processo endotérmico, que ocorre com absorção de energia na ordem de 32,76 kcal.mol<sup>-1</sup> e uma variação de energia livre de Gibbs de 11,80 kcal.mol<sup>-1</sup>. Apesar de não ser um processo espontâneo, há um favorecimento da reação devido ao aumento da entropia do sistema, já que o mesmo sai de um estado mais organizado com uma estrutura única para um estado mais desorganizado com duas novas moléculas sendo geradas. A reação experimental ocorre em condição de temperatura de 50°C e em análise por CG-EM foi detectado pico referente a Pcy dissociada, tornando a porção remanescente da reação ativa para a catálise. Observou-se também que ao manter a temperatura constante por períodos mais longos (96h), este pico apresenta maior intensidade, revelando o caráter endotérmico da dissociação do ligante.



**Figura 4.** Dissociação do ligante triciclohexilfosfina e valores de variação de entalpia e energia livre de Gibbs para a reação direta.

Posteriormente, com a vacância de um novo sítio de coordenação no catalisador, a molécula de Kavain consegue melhor se aproximar do átomo de rutênio. Existem duas possibilidades de interação da Kavain com o catalisador. A primeira se daria através da interação da parte aromática Kavain e do C=Ph do catalisador; e a segunda ocorreria através da interação do grupo oxigenado do Kavain com a porção C=Ph do catalisador. Na Figura 5, encontra-se representada as estruturas de partida para a duas prováveis interações.



**Figura 5.** Possíveis formas de coordenação da Kavain ao catalisador: interação dos grupos aromáticos de ambos compostos e interação do grupo oxigenado com grupo aromático do catalisador, respectivamente.

De acordo com o mecanismo elucidado por Chauvin para reações de metátese, para que a mesma ocorra é necessária a presença de duplas ligações que incidirá na formação de um intermediário metalociclobutano e conseqüentemente a obtenção de novos produtos. Logo, a coordenação do ligante se dará pelas ligações duplas [22].

