

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PIAUÍ

CENTRO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**ESTUDO *ONE-POT* DA APLICAÇÃO DO
CATALISADOR DE GRUBBS DE PRIMEIRA
GERAÇÃO EM METÁTESE DA PIPERINA E
EUGENOL E ATIVIDADE CARCINOGENICA**

ANA KARINA BORGES COSTA

ORIENTADOR(A): PROF. DRA. FRANCIELE ALLINE MARTINS

COORIENTADOR(A): PROF. DR. JOSÉ LUIZ SILVA SÁ

Teresina – PI
2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PIAUÍ

CENTRO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**ESTUDO *ONE-POT* DA APLICAÇÃO DO
CATALISADOR DE GRUBBS DE PRIMEIRA
GERAÇÃO EM METÁTESE DA PIPERINA E
EUGENOL E ATIVIDADE CARCINOGENICA**

ANA KARINA BORGES COSTA

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

Orientador(a): Prof.^a Dra. Francielle Aline Martins

Coorientador (a): Prof. Dr. José Luiz Silva Sá

Teresina – PI

2021

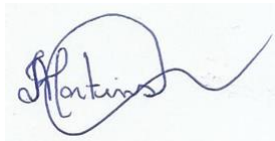
**ESTUDO ONE-POT DA APLICAÇÃO DO CATALISADOR DE GRUBBS
DE PRIMEIRA GERAÇÃO EM METÁTESE DA PIPERINA E
EUGENOL E ATIVIDADE CARCINOGENICA**

ANA KARINA BORGES COSTA

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

Aprovado em 20 de dezembro de 2021.

Membros da Banca:



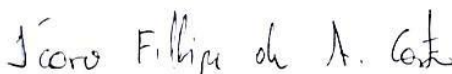
Profa. Dra. Francielle Alline Martins
(Presidente da Banca – UESPI)



Prof. Dr. José Luiz Silva Sá
(Membro Titular – UESPI)



Prof. Dr. Janildo Lopes Magalhaes
(Membro Titular – UFPI)



Prof. Dr. Ícaro Fillipe de Araújo Castro
(Membro Titular – IFPI)

Prof. Dr. Benedito dos Santos Lima Neto
(Membro Suplente – USP-IQSC)

Prof. Dr. Pedro Marcos de Almeida
(Membro Suplente – UESPI)

Teresina – PI

2021

Dedico a pessoa mais importante da minha vida, minha mãe, Maria Aparecida.

AGRADECIMENTOS

- ❖ A Deus “fonte de toda ciência, sabedoria e poder”, por todo amor incondicional que tens derramado sobre mim.
- ❖ A minha mãe, Maria Aparecida, minha maior fonte de inspiração, força e coragem. Obrigada por me apoiar tanto, por me amar tanto e por abdicar de tantas coisas por mim. E ao meu pai Antônio Nilson (*in memoriam*).
- ❖ Ao meu irmão José Wagner, minha cunhada e irmã Jaira e meus amados sobrinhos José Guilherme e João Miguel por todo amor, carinho, apoio e compreensão.
- ❖ Ao meu namorado e melhor amigo, Hisley Meneses, por todas as vezes em que você não me deixou desistir, pela paciência infinita, por todo cuidado, preocupação, companheirismo e torcida.
- ❖ A minha comadre Joseane, ao meu afilhado Álvaro e a D. Deusimar por somarem tanto comigo nesse período e vibrarem tanto por mim. E ao Srº Ivoneuton (*in memoria*), por sempre acreditar e torcer pelos nossos sonhos, o senhor foi em vida um incentivador.
- ❖ A TODOS os meus amigos, obrigada pela compreensão e motivação, em especial (Vera, Thiago, Sabrina, Carlos, Renata, Larissa, Aline, Alba, Sônia e Thallyson).
- ❖ Aos companheiros de jornada, com os quais pude compartilhar as alegrias e tristezas durante esses anos, Kerlane Fernandes, Ana Gabriele, João Paulo, Antônio Neto, Maciel e Gabriel, sem dúvidas vocês são enormes conquistas e fizeram cada momento ser mais leve e divertido, construindo inúmeras memórias felizes.
- ❖ A todos do grupo de pesquisa (Cat. Homogênea e genética), Aline Aparecida, Alexandre, Sâmia e Raquel, obrigada pela parceria e ensinamentos durante esse período.
- ❖ Ao prof. Dr. José Luiz Silva Sá, por toda orientação, cuidado, amizade e parceria durante esse mestrado. Você sempre nos ensina muito sobre química e com suas ações nos ensina mais ainda como sermos pessoas melhores.
- ❖ A prof.^a Dra Francielle Aline Martins também pela orientação, paciência, cuidado e pela amizade desenvolvida nesses anos. Você é um exemplo a ser seguido nos âmbitos acadêmico e sobretudo pessoal.

- ❖ Aos professores que participaram da banca de qualificação e defesa, os professores: Dr. Walkimar, Dr. Janildo Lopes Magalhães, Dr. Ícaro por todas as contribuições e correções que foram valiosíssimas.
- ❖ A todos os professores do programa de pós-graduação da UESPI. Em especial a Prof^a Dra Valdiléia Teixeira Uchoa, por inspirar-me a entrar no mestrado.
- ❖ A UESPI por ceder o GERATEC e LABGENE, juntamente com todo o material, que tornaram possível o desenvolvimento desse trabalho.
- ❖ Ao Prof. Dr. Benedito pela contribuição nas discussões do trabalho.
- ❖ Ao Instituto de São Carlos (IQSC- USP) por análises químicas que contribuíram para este estudo.

“Nunca perca de vista o seu ponto de partida”

(Santa Clara de Assis)

RESUMO

COSTA, A. K. B. **Estudo *one-pot* da aplicação do Catalisador de Grubbs de Primeira Geração em metátese da piperina e eugenol e atividade carcinogênica.** 2021. 70 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual do Piauí. Teresina.

A síntese de novos compostos a partir da metátese de olefinas vem sendo amplamente estudada no meio científico para realizar modificações moleculares com o propósito de obter moléculas com maior atividade biológica quando comparadas às de ocorrência natural. A piperina (PIP) e o eugenol (EUG) são moléculas abundantes na natureza com atividades biológicas e farmacológicas bem conhecidas. Assim, o objetivo deste estudo foi obter novos compostos a partir da reação via metátese de olefinas da PIP e do EUG, bem como avaliar a carcinogenicidade e anticarcinogenicidade das moléculas por meio do teste de detecção de tumor epitelial (ETT) em *Drosophila melanogaster*. Reações de homometátese e metátese-cruzada da PIP e EUG foram realizadas a 50°C, por 24, 48 e 96h e razão catalisador:substrato de Ru:PIP:EUG de 1:0,5:0,5 e 1:5:5 mol. Os produtos foram caracterizados por espectrômetro de massa acoplado ao cromatógrafo a gás (CG-MS) e discutidos em relação às características eletrônicas e estéricas do catalisador e às propriedades estruturais dos substratos. Para o ETT, larvas de terceiro estágio do cruzamento entre fêmeas virgens *wts/TM3, Sb¹* com machos *mwh/mwh* foram transferidas para frascos contendo 2g de purê de batata instantâneo, com as diferentes concentrações (60, 120, 180 e 360mg/kg de purê de batata) de PIP ou EUG. Para o ensaio carcinogênico e anticarcinogênico as preparações foram umedecidas com 7mL de água destilada e 7mL de metanossulfonato de metila (MMS - 3mM) ou doxorubicina (DXR - 0,125mg/mL), respectivamente. Os adultos emergentes foram fixados em etanol 70% e analisados quanto a ocorrência de tumores. Comparações entre a frequência de tumores nos tratamentos e controles foram realizadas por meio do teste de qui-quadrado, a 5% de probabilidade. Observou-se uma espécie dimérica de eugenol para a metátese de olefinas do EUG, na proporção Ru:PIP:EUG de 1: 0,5: 0,5 mol, em todos os tempos estudados e em um experimento adicional a 70 °C por 48h. Quando a razão Ru:PIP:EUG foi de 1:5:5 mol, este produto não foi observado. Processos de isomerização também foram observados em todas as temperaturas e proporção catalisador: substratos. O aumento da quantidade de substratos aumentou o rendimento das reações. Em *D. melanogaster*, a PIP não foi letal e apresentou atividade carcinogênica nas concentrações de 180 e 360mg/kg de purê. Em co-tratamento, efeito inibidor aos danos induzidos pelo MMS foram observados para as concentrações de PIP 60, 120 e 180mg/kg. O EUG apresentou potencial tóxico em todas as concentrações avaliadas e efeito carcinogênico foi observado em EUG 120, 180 e 360 mg/kg. Contudo, o EUG, em

todas as concentrações, apresentou efeito modulador, inibindo a carcinogênese induzida pela DXR, em co-tratamento. Este estudo demonstrou que, nas condições reacionais avaliadas não houve reação de metátese cruzada, possivelmente devido ao efeito quelante por dupla coordenação da PIP. Os ensaios biológicos revelaram efeito protetor da PIP nas concentrações de 60 e 120mg/kg de purê, sendo essas promissoras para estudos futuros com vistas ao tratamento de neoplasias. Já para o EUG, efeito protetor não foi evidenciado, visto que o mesmo foi tóxico e carcinogênico, embora tenha apresentado atividade inibitória quando associado à DXR.

Palavras-chave: Piperina. Eugenol. ETT. Metátese de Olefina. Carcinogênese.

ABSTRACT

COSTA, A. K. B. **One-Pot Study of the application of first-generation Grubbs catalyst in piperine and eugenol metathesis and carcinogenic activity.** 2021. 70 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual do Piauí. Teresina.

The synthesis of new compounds from olefin metathesis has been widely studied in scientific circles to carry out molecular modifications with the purpose of obtaining molecules with greater biological activity when compared to naturally occurring. Piperine (PIP) and eugenol (EUG) are abundant molecules in nature with biological and pharmacological activities well-known. Thus, the aim of this study was to obtain new compounds from the reaction by metathesis of PIP and EUG olefins, as well as to evaluate the carcinogenicity and anticarcinogenicity of these molecules through the epithelial tumor detection test (ETT) in *Drosophila melanogaster*. Self-metathesis and cross-metathesis reactions of PIP and EUG were carried out at 50°C, for 24, 48 and 96 h and ratio catalyst:substrate of Ru:PIP:EUG of 1:0.5:0.5 and 1:5:5 mol. The products were characterized by a gas chromatograph-coupled mass spectrometer (GC-MS) and discussed in relation to the physical and steric characteristics of the catalyst and the properties of the substrates. For the ETT, third-stage larvae from the crossing between virgin females *wts/TM3, Sb¹* with males *mwh/mwh* were transferred to flasks containing 2g of instant mashed potato, with different concentrations (60, 120, 180 and 360mg/kg of mashed potato) of PIP or EUG. For the carcinogenic and anticarcinogenic assay, the preparations were moistened with 7mL of distilled water and 7mL of methyl methanesulfonate (MMS - 3mM) or doxorubicin (DXR - 0.125mg/mL), respectively. Emerging adults were fixed in 70% ethanol and analyzed for the occurrence of tumors. Comparisons between the frequency of tumors in treatments and controls were performed using the chi-square test, at 5% probability. A dimeric eugenol species was observed for the metathesis of EUG olefins, in a Ru:PIP:EUG ratio of 1:0.5:0.5 mol, at all times studied and in an additional experiment at 70°C for 48 h. When the ratio Ru:PIP:EUG was 1:5:5 mol, this product was not observed. Isomerization processes were also observed at all temperatures and catalyst: substrate ratio. Increasing the amount of substrates increased the yield of reactions. In *D. melanogaster*, PIP was not toxic and showed carcinogenic activity at concentrations of 180 and 360mg/kg of puree. In co-treatment, inhibitory effect to damage induced by MMS was observed for the concentrations of PIP 60, 120 and 180mg/kg. The EUG showed toxic potential at all concentrations evaluated and a carcinogenic effect was observed at EUG 120, 180 and 360 mg/kg. However, EUG, in all concentrations, had a modulating effect, inhibiting

DXR-induced carcinogenesis in co-treatment. This study demonstrated that, under the evaluated reaction conditions, there was no cross-metathesis reaction, possibly due to the chelation effect of the double coordination of PIP. Biological tests revealed a protective effect of PIP at concentrations of 60 and 120mg/kg of puree, which are promising for future studies aimed at the treatment of neoplasms. As for the EUG, a protective effect was not evidenced, as it was toxic and carcinogenic, although it showed an inhibitory activity when associated with DXR.

Keywords: Piperine. Eugenol. ETT. Olefin metathesis. Carcinogenesis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1.** Mecanismo para a reação de metátese de olefina onde [M] representa o metal do catalisador, R' e R'' grupos alquenos distintos..... 21
- Figura 2.2.** Principais classes de reações de metátese de olefinas. Homometátese - SM (Self-Metathesis), Metátese cruzada - CM (Cross-Metathesis), Polimerização via metátese em dienos acíclicos - ADMET (Acyclic Diene Metathesis), Metátese por fechamento de anel - RCM (Ring Closing Metathesis), Abertura de anel via metátese - ROM (Ring Opening Metathesis) e Polimerização via metátese por abertura de anel - ROMP (Ring Opening Metathesis Polimerization)..... 22
- Figura 2.3.** Reação de metátese cruzada: formação do produto desejado e os produtos indesejados (homometátese)..... 23
- Figura 2.4.** A: Esquema geral da reação de homometátese. B: Mecanismo geral das reações de homometátese. I - Coordenação da olefina ao centro metálico metal-carbeno e formação do intermediário metalociclobutano. II - Troca entre os grupos do substrato e grupo metal-carbeno no intermediário metalociclobutano e formação de uma nova olefina e um novo metal-carbeno. III – Reação entre o novo metal-carbeno com outra olefina formando novamente um intermediário metalociclobutano IV - formação uma nova olefina e regeneração do complexo metal-carbeno 25
- Figura 2.5.** Catalisadores de Ru para reações de metátese de olefinas..... 27
- Figura 2.6.** Detalhes da planta *Piper nigrum* e o fruto seco da pimenta do reino. 28
- Figura 2.7.** Estrutura química da piperina. 28
- Figura 2.8.** Óleo de cravo da índia e o botão seco da flor da família das mirtáceas. 30
- Figura 2.9.** Estrutura química do eugenol..... 30
- Figura 2.10.** Casal de *Drosophila melanogaster*, dimorfismo sexual. 31
- Figura 2.11.** Representação do cruzamento realizado entre as linhagens *multiple wing hairs* (*mwh*) e a linhagem *warts* (*wts*) e seus descendentes..... 33
- Figura 3.1.** Ilustração esquemática da síntese para as reações de metátese. 35
- Figura 3.2.** Ilustração dos produtos esperados para a reação de metátese cruzada da piperina com o eugenol. A piperina foi dividida em 4 fragmentos (A, B, C e D) de acordo com a possibilidade da reação acontecer pela ligação dupla próxima ao grupo amida com fração carbonil α - β -insaturada e pela ligação dupla próxima ao grupo 1,3-benzodioxol. E o eugenol como (E). A) Ilustração dos produtos AE e BE pela reação com as ligações duplas próximas ao grupo amida da piperina com o eugenol. B) Ilustração dos produtos CE e DE pela reação com a ligação dupla próxima ao grupo benzodioxol da piperina com o eugenol. 36
- Figura 3.3.** A) Ilustração dos produtos esperados para a reação de homometátese da piperina. B) Ilustração da equação da reação de homometátese do eugenol para a formação do produto esperado.. 37

Figura 3.4. Ilustração esquemática do teste de detecção de tumor epitelial (ETT) em <i>Drosophila melanogaster</i>	40
Figura 4.1. Cromatogramas da reação de metátese cruzada da piperina com o eugenol. As concentrações catalisador:substratos foram de 1:1 ou 1:10 mol, nos tempos reacionais de 48 ou 96 h em temperatura de 50°C. Eug (eugenol); Dm-Eug (dímero do eugenol); PCy ₃ (tricliclohexilfosfina); O=PCy ₃ (tricliclohexilfosfina oxidada); Iso-Eug (isômero do eugenol); Pip (piperina); e Iso-Pip (isômero da piperina).....	42
Figura 4.2. Cromatogramas da reação de homometátese da piperina. As concentrações catalisador:substratos foram de 1:1 ou 1:10 mol, no tempo reacional de 48 h em temperatura de 50°C. PCy ₃ (tricliclohexilfosfina); O=PCy ₃ (tricliclohexilfosfina oxidada); Pip (piperina); e Iso-Pip (isômero da piperina).....	45
Figura 4.3. Cromatogramas da reação de homometátese do eugenol. As concentrações catalisador:substratos foram de 1:1 ou 1:10 mol, no tempo reacional de 48 h em temperatura de 50°C. Eug (eugenol); Dm-Eug (dímero do eugenol); PCy ₃ (tricliclohexilfosfina); O=PCy ₃ (tricliclohexilfosfina oxidada); Iso-Eug (isômero do eugenol).....	46
Figura 4.4. Cromatogramas da reação de metátese cruzada da piperina com o eugenol. Razão catalisador:substratos de 1:1 mol, por 48h a 70 °C. Eug (eugenol); Dm-Eug (dímero do eugenol); PCy ₃ (tricliclohexilfosfina); O=PCy ₃ (tricliclohexilfosfina oxidada); Iso-Eug (isômero do eugenol).....	47
Figura 4.5. Espectro de massas (EM) do produto da reação de metátese de EUG catalisado por G1. Condições reacionais: razão Ru:substrato de 1:1 mol, 50 °C por 48 h.....	48
Figura 4.6. Proposta de fragmentação do produto de metátese: (E)-4,4'-(but-2-ene-1,4-diyl)bis(2-methoxyphenol).....	49
Figura 4.7. Mecanismo de formação da espécie inerte, incapaz estericamente de promover a formação do ciclometalobutano.	50
Figura 4.8. Estrutura química do metanossulfonato de metila.....	54
Figura 4.9. (A) Metilação da base guanina a partir do MMS; (B) Metilação da base adenina a partir do MMS.....	54
Figura 4.10. Estrutura química da doxorubicina.....	57

LISTA DE TABELAS

- Tabela 4.1.** Resultados observados a partir das variações das condições reacionais da metátese cruzada da piperina com o eugenol. 41
- Tabela 4.2.** Rendimentos relativos dos compostos na mistura (em porcentagem), variando a razão catalisador;substrato de 1:1 ou 1:10 mol, o tempo reacional de 48 ou 96h e a temperatura de 50 ou 70 °C. % (Rendimento relativo ao composto); Eug (eugenol); Dm-Eug (dímero do eugenol); PCy3 (tricliclohexilfosfina); O=PCy3 (tricliclohexilfosfina oxidada); Iso-Eug (isômero do eugenol); Pip (piperina); e Iso-Pip (isômero da piperina)..... 44
- Tabela 4.3.** Rendimentos relativos dos compostos na mistura, considerando apenas eugenol e seus produtos. % (Rendimento relativo ao composto); Eug (eugenol); Dm-Eug (dímero do eugenol); Iso-Eug (isômero do eugenol) 43
- Tabela 4.4.** Taxas de sobrevivência de *D. melanogaster* no Teste de Tumor Epitelial (ETT) após exposição a diferentes concentrações de piperina (PIP) e eugenol (EUG) individualmente ou em associação com os controles positivos, CP1 - Metanossulfonato de Metila (MMS-3mM) e CP2 - doxorrubicina (DXR - 0,125mg/mL), respectivamente e controle negativo Tween 20 - 2% e óleo de soja.. 51
- Tabela 4.5.** Frequência de clones de tumores com o Teste de Tumor Epitelial (ETT) em *D. melanogaster* para o gene supressor de tumor *wts* tratadas com piperina (PIP) isolada ou em associação com o metanossulfonato de metila (MMS 3mM). 53
- Tabela 4.6.** Frequência de clones de tumores com o Teste de Tumor Epitelial (ETT) em *D. melanogaster* para o gene supressor de tumor *wts* tratadas com eugenol (EUG) isolado ou em associação com a Doxorrubicina (DXR 0,125mg/mL) e o óleo de soja como controle negativo..... 56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PIP – Piperina;

EUG – Eugenol;

ETT – *Epithelial Tumor Test* (Teste de Tumor Epitelial);

G1- Catalisador 1ª geração de Grubbs- $[\text{RuCl}_2(\text{PCy}_3)_2(=\text{CHPh})]$

G2- Catalisador de Grubbs segunda geração

HG1 – Catalisador de Hoveyda-Grubbs de primeira geração

HG2 – Catalisador de Hoveyda-Grubbs de segunda geração

ADMET- Acyclic Diene Metathesis Polimerization

RCM – Ring- Closing Metathesis

ROM- Ring Opening Metathesis

ROMP- Ring-Opening Metathesis Polymerization

SM– Self-Metathesis

CM– Cross-Metathesis;

CG-EM- Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas

O=PCy₃ – Triciclohexilfosfina oxidada

PCy₃ – Triciclohexilfosfina

DM-EUG – Dímero de Eugenol

ISO-EUG – Isômero de Eugenol

ISO-PIP – Isômero de Piperina

WARTS – Verrugas ou tumor epitelial

WTS – Gene supressor de tumor

DXR – Cloridrato de Doxorubicina

MMS – Metanossulfonato de metila

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO	17
1.1 Objetivos.....	17
1.1.1 Gerais	19
1.1.2 Específicos	19
CAPÍTULO 2 – REFERENCIAL TEÓRICO	34
2.1 Aspectos Gerais da Catálise e Metátese de Olefina	20
2.2 Metátese Cruzada	34
2.3 Homometátese	24
2.4 Catalisadores utilizados nas Reações de Metátese de olefina	26
2.5 Piperina.....	27
2.6 Eugenol.....	29
2.7 Teste para detecção de tumores epiteliais em <i>Drosophila melanogaster</i>	30
CAPÍTULO 3 – METODOLOGIA EXPERIMENTAL	34
3.1 Materiais e Reagentes.....	34
3.1.1 Materiais e Reagentes.....	34
3.1.2 Reações de Metátese.....	34
3.1.3 Análise de Cromatografia acoplada ao Espectômetro de Massas (CG-EM).....	36
3.2 Teste de detecção de tumores epiteliais em <i>Drosophilas melanogaster</i> (ETT)	38
3.2.1 Linhagens <i>D. melanogaster</i>	38
3.2.2 Ensaio Biológico.....	38
3.2.3 Análise do material biológico.....	39
CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1 Reações de Metátese.....	42
4.2 Teste para Detecção de Tumores epiteliais (ETT)	51
CAPÍTULO 5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	60
CAPÍTULO 6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

Considerado como “Pai da Medicina”, Hipócrates, defendia a utilização dos alimentos como tratamento de doenças a partir da alimentação, utilizando seus potenciais de cura tanto para tratar as enfermidades, quanto para a prevenção. Essa filosofia era à base da medicina grega da época [1]. A fitoterapia como ferramenta auxiliar na medicina humana é uma prática antiga e bem difundida no mundo inteiro [2].

Dentre a ampla gama de fitoterápicos existentes, a piperina e o eugenol se destacam por evidenciarem enorme potencial medicinal. A piperina, ((2E,4E)-5-(1,3-benzodioxol-5-yl)-1-piperidin-1-ylpenta-2,4-dien-1-one), é um alcaloide nitrogenado que apresenta em sua estrutura três subunidades, sendo elas: função amida constituída por um anel piperidina com fração carbonil α - β -insaturada, uma cadeia de butadieno e um grupo 1,3-benzodioxol, também chamado de núcleo piperonal [3-4]. Considerada como principal metabólito secundário extraído dentro do gênero *Piper*, é um composto natural da classe dos alcaloides encontrados nos frutos das pimentas pertencentes a família Piperaceae, principalmente na pimenta preta (*P. nigrum*) e pimenta longa (*P. longum* L.) [4-6].

Recentemente, França et al., (2021) em seus estudos utilizando técnicas de prospecção científica e tecnológica, demonstraram que as propriedades biológicas e farmacológicas da piperina têm sido amplamente investigadas por diversos pesquisadores [7]. As principais propriedades da piperina consistem em atividades antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral, antimicrobiana, tratamento da doença de chagas e tratamento da leishmaniose [1, 3-9].

O Eugenol (2-methoxy-4-prop-2-enylphenol) é um composto fitoquímico fenólico oriundo de óleos essenciais, isolado pela primeira vez a partir do cravo-da-índia, seu nome deriva do nome científico da espécie, *Eugenia aromaticum*, e é também encontrado em outras plantas aromáticas como *Cinnamomum verum*, *Ocimum basilicum*, *Cinnamomum tamala*, *Illicium anisatum*, *Melissa officinalis*, *Ocimum tenuiflorum* e *Myristica fragrans* [10-11].

Dentre os compostos fenólicos voláteis, o eugenol vem despertando interesse dos cientistas por possuir notáveis propriedades tais como: elevada lipossolubilidade, baixa

toxicidade, antipirética, analgésica, anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana, anticâncer, ação central e neuroprotetora [10,12-14].

O Brasil é um dos países mais biodiversos do planeta, entretanto apenas cerca de 10% das plantas existentes são exploradas de forma científica, por pesquisas químicas e farmacêuticas. 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 [15, 16]. Entre os tipos de reações de metátese, temos a homometátese, que permite a produção de olefinas altamente funcionalizadas de cadeias maiores a partir da formação de ligações duplas entre moléculas iguais e são catalisadas por compostos carbênicos de metais de transição, e a metátese cruzada que segue o mesmo princípio com a utilização de duas olefinas distintas [17].

Além do grande interesse em sintetizar novos compostos a partir dessas moléculas que poderão apresentar maior atividade biológica, o estudo toxicogenético destes compostos é de suma importância, pois para se ter a comercialização de um medicamento ou derivado a base de plantas, é necessário que seus efeitos sejam comprovados e, sobretudo, que não provoque intoxicação, com isso, estudos na área de toxicologia tornam-se fundamentais para a utilização segura desses produtos naturais e derivados na prevenção e tratamento de patologias [15-18].

Nesse sentido, as moscas-da-fruta (*Drosophila melanogaster*) são consideradas organismos modelos para estudos em eucariontes, pois apresentam vantagens quando comparadas a outros organismos, tais como: curto período de geração, elevado número de progênie, fácil manutenção, pequena quantidade de cromossomos e capacidade de metabolizar compostos semelhantes aos dos mamíferos, sendo assim apresentada como método alternativo ao uso desses em pesquisas científicas de diversas naturezas [19, 20].

Em relação aos genes supressores de tumores, a *D. melanogaster* apresenta um número significativo desses genes, podendo destacar o *warts (wts)*, homólogo ao gene *LATS1* em humanos [21]. O Teste de detecção de clones de Tumor Epitelial (*Epithelial Tumor Test - ETT*) faz uso de uma linhagem que possui o gene marcador *wts*, no cromossomo três da *D. melanogaster*, quando em homozigose é letal para o zigoto, sendo necessário a presença do *Third multiple three (TM3)* um balanceador cromossômico. Quando há a perda da heterozigose nas células do disco imaginal, há a formação de clones homozigotos com manifestações de tumores (verrugas) na mosca adulta [22]. A similaridade entre os genes da *D. melanogaster* e os genes humanos permite a avaliação de compostos quanto ao seu

potencial carcinogênico ou modulador de tumores pela presença de tumores epiteliais nas moscas após o tratamento [23].

O presente trabalho propôs à reação de metátese cruzada da piperina com o eugenol, e a homometátese dos substratos separados utilizando o catalisador 1^a geração de Grubbs- [RuCl₂(PCy₃)₂(=CHPh)] (G1) com intuito de obter novos compostos, bem como a avaliação da carcinogenicidade e anticarcinogenicidade por meio do teste de detecção de tumor epitelial (ETT) no organismo modelo *D. melanogaster* em associação ou não com agentes carcinogênicos.

1.1 Objetivo

1.1.1. Objetivo geral

Realizar a síntese de novas moléculas a partir da reação de metátese do eugenol e piperina, bem como testá-las quanto ao seu potencial carcinogênico e anticarcinogênico.

1.1.2. Objetivos específicos

1. Realizar a metátese cruzada da piperina com o eugenol utilizando o catalisador 1^a geração de Grubbs- [RuCl₂(PCy₃)₂(=CHPh)];
2. Realizar a homometátese da piperina e a homometátese do eugenol utilizando o catalisador 1^a geração de Grubbs- [RuCl₂(PCy₃)₂(=CHPh)];
3. Caracterizar os produtos obtidos nos itens 1 e 2 utilizando CG-EM e otimizar o processo catalítico por modificações nas condições reacionais como temperatura, razão substrato/catalisador, tempo e solvente;
4. Discutir os resultados baseados nas características eletrônicas e estéricas dos catalisadores;
5. Investigar o potencial carcinogênico e anticarcinogênico da piperina e do eugenol em diferentes concentrações por meio do teste de detecção de clones de tumores epiteliais em *D. melanogaster*;
6. Comparar o desempenho das drogas Metanossulfonato de metila e Cloridrato de Doxorrubicina, utilizadas como agente indutor de tumores.

Capítulo 2

REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos Gerais da Catálise e Metátese de Olefina

Os processos catalíticos são amplamente difundidos e utilizados na indústria química afim de viabilizar a produção dos mais diversos produtos, principalmente a gasolina e os fármacos. Com isso, mais de 80% de todos os produtos são oriundos de algum processo catalítico. A catálise consiste em uma reação mediada pela presença de um catalisador, uma substância capaz de aumentar a velocidade da reação química sem ser consumido durante o processo, alterando substancialmente a cinética química das reações termodinamicamente possíveis, mas não sendo capaz de gerar alterações na energia livre de Gibbs da reação global, embora seja capaz de modificar o mecanismo reacional [24-26].

As reações de catálise podem ser divididas em dois tipos: a catálise homogênea e a heterogênea, e a principal diferença entre elas consiste na fase dos catalisadores utilizados. Na catálise homogênea, o catalisador e os reagentes encontram-se na mesma fase, viabilizando o processo de difusão de calor e transporte de massa dentro do meio reacional. Na catálise heterogênea o catalisador e os reagentes apresentam-se em fases distintas, o que facilita o processo de separação do catalisador, entretanto dificulta o transporte de massa e a difusão de calor no meio. A catálise homogênea apresenta vantagens em relação a heterogênea por processar-se em condições mais brandas de temperatura e pressão e por apresentar maior seletividade que a heterogênea [26-27].

Nos últimos anos, as reações de metátese de olefina, exemplo de catálise homogênea, vêm configurando-se como importante ferramenta para obtenção de novas rotas industriais para a aquisição de importantes produtos petroquímicos, poliméricos, farmacêuticos e produtos químicos em gerais. Essa reação consiste no rearranjo dos átomos de carbono das olefinas na presença de um catalisador [27-29].

A palavra metátese, diz respeito a “troca de posição” referindo-se a troca de ligação covalente entre duas olefinas (alcenos) ou entre alceno e alcino. Segundo Frederico et al., (2005) na química de olefina acontece a redistribuição do esqueleto carbônico, onde as ligações duplas carbono-carbono são rearranjadas na presença de um complexo organometálico de metal-carbeno, conforme descrito na Figura 2.1 [28-30].

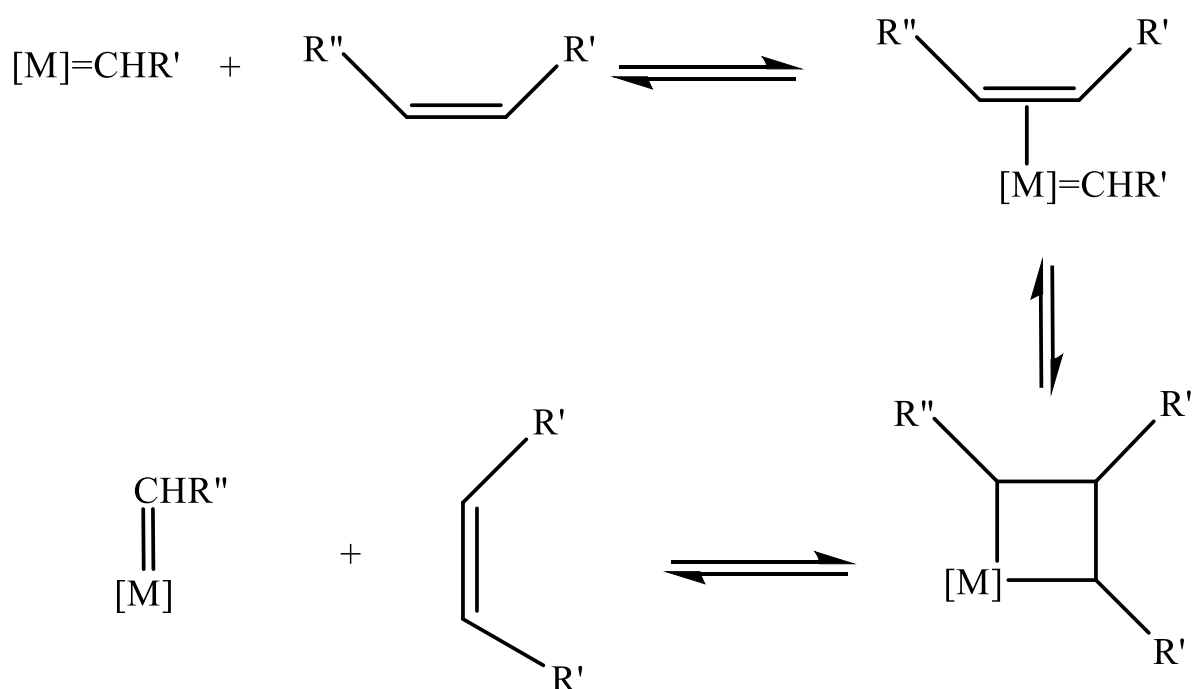


Figura 2.1. Mecanismo para a reação de metátese de olefina onde: $[M]$ representa o metal do catalisador; R' e R'' representa grupos alquenos distintos [31].

A reação de metátese de olefinas foi descoberta pela primeira vez na década de 50 e teve maior aperfeiçoamento na década de 90 com o descobrimento de catalisadores mais eficientes pelos grupos de pesquisa de Schöck e Grubbs [31]. Essas reações destacam-se pela versatilidade, podendo ser utilizadas para diversos fins, tais quais: unir moléculas idênticas na homometátese (Self-Methathesis SM), unir moléculas distintas na metátese cruzada (Cross-Methathesis CM), polimerizar dienos acíclicos (Acyclic Diene Metathesis Polymerization ADMET), na polimerização via metátese por abertura do anel da olefina (Ring-Opening Metathesis Polymerization ROMP), no fechamento de anel por metátese (Ring-Closing Metathesis RCM) ou na abertura de anel por metátese (Ring-Opening Metathesis ROM), onde os mecanismos simplificados estão descritos na Figura 2.2 [31-34].

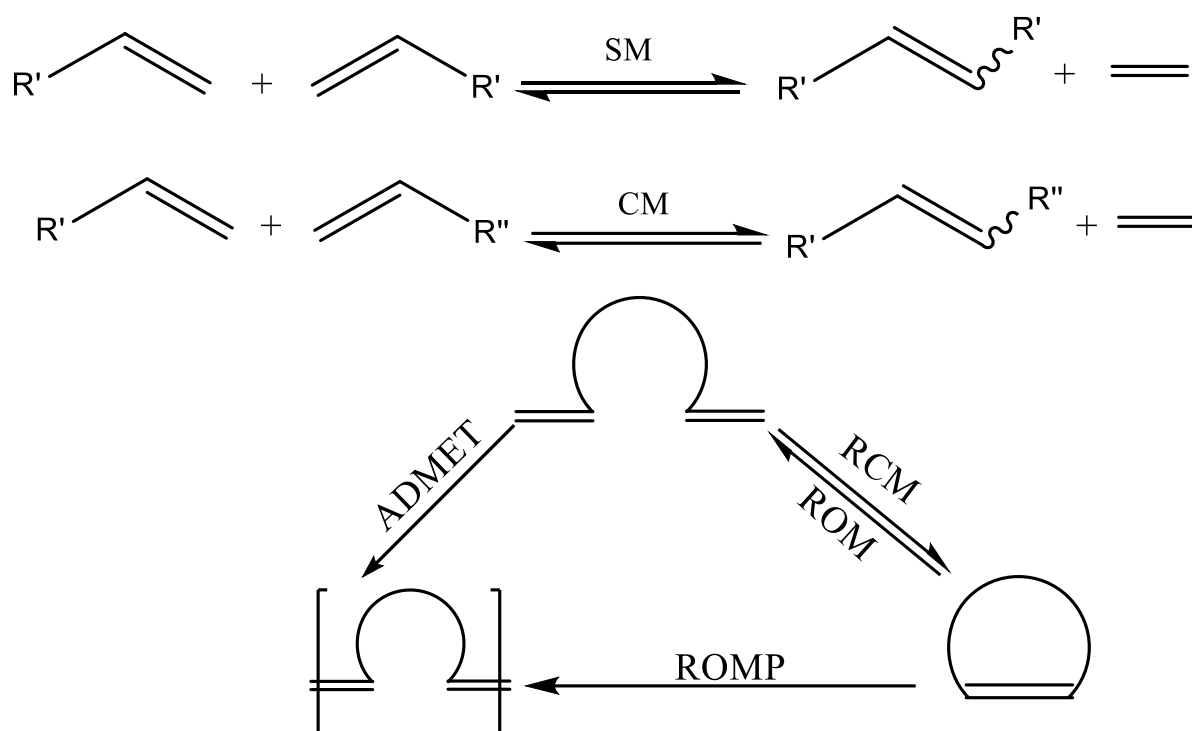


Figura 2.2. Principais classes de reações de metátese de olefinas. Homometátese - SM (Self-Metathesis), Metátese cruzada - CM (Cross-Metathesis), Polimerização via metátese em dienos acíclicos - ADMET (Acyclic Diene Metathesis), Metátese por fechamento de anel - RCM (Ring Closing Metathesis), Abertura de anel via metátese - ROM (Ring Opening Metathesis) e Polimerização via metátese por abertura de anel - ROMP (Ring Opening Metathesis Polimerization) [31].

2.2 Metátese Cruzada

As reações de metátese cruzada consistem na reação com olefinas distintas e são amplamente utilizadas por apresentarem diversas possibilidades de material de partida. Esse tipo de reação permite, por exemplo, o aumento ou a redução da cadeia carbônica, e até a introdução de grupos funcionais nas moléculas [35].

A metátese cruzada com o objetivo de funcionalizar a cadeia carbônica, consiste em reagir duas olefinas distintas, a ligação dupla C-C pode ser obtida por uma reação sintética com a etenólise, por exemplo, seguido da funcionalização por meio da metátese cruzada. Por meio dessa reação pode-se originar o produto desejado, oriundo das duas olefinas distintas e iniciais e dois produtos indesejados através da homometátese das olefinas de partida (Figura 2.3) [35, 36].

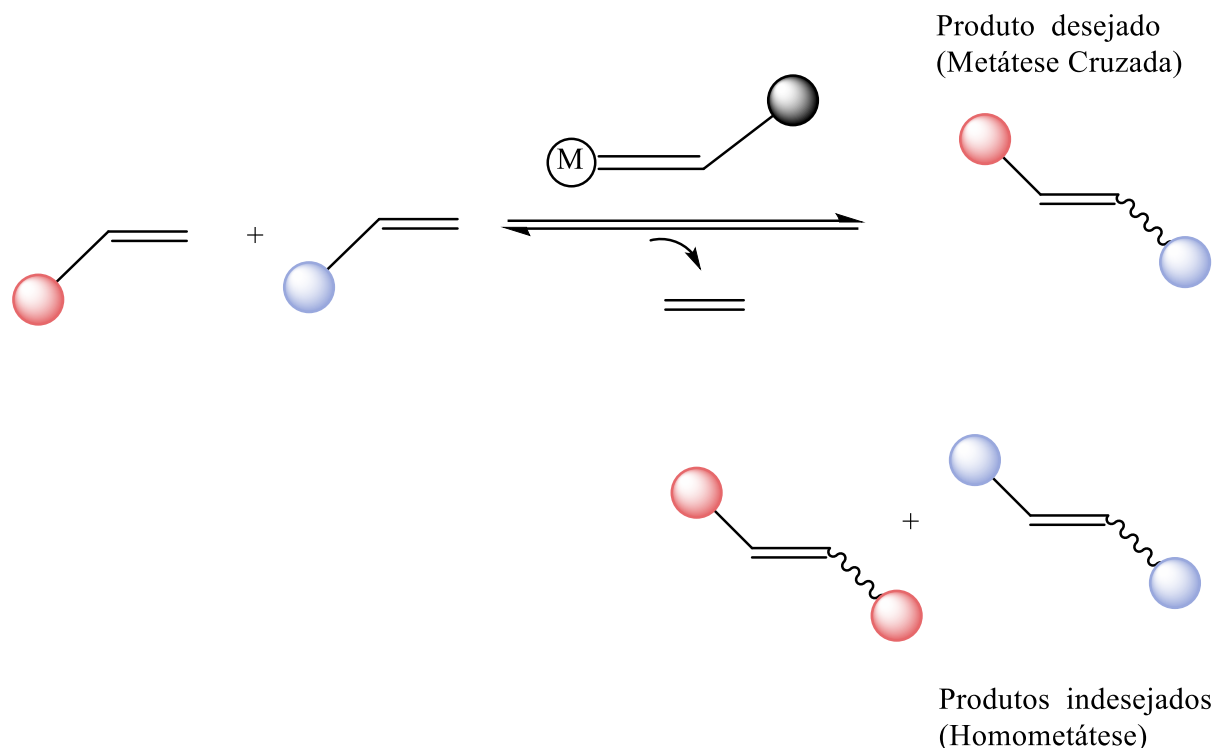


Figura 2.3. Reação de metátese cruzada: formação do produto desejado e os produtos indesejados (homometátese) [35, 36].

A reação de metátese cruzada foi utilizada para produzir novos terpenóides e melhorar a rota da síntese de terpenóides conhecidos, utilizando citronelal, citronelol e citral com os pares de metátese acrilato de metila e metacrilato de metila catalisados por rutênio, neste estudo a reação de metátese cruzada foi muito eficiente para terpenóides mono-insaturados, ao passo em que os terpenóides com mais ligações duplas apresentaram maior dificuldade e reações colaterais [37].

Outros estudos sobre a metátese cruzada de terpenóides são reportados na literatura, onde a funcionalização dos terpenos β -pineno e limoneno utilizando fumarato de dimetila, maleato de dimetila, fumaronitrila e 1,4-diacetoxibut-2-eno como pares de metátese contendo ligações duplas internas foram investigadas para a metátese cruzada na presença de catalisadores de rutênio, observando-se que estas foram muito eficientes [38]. Fernandes et al., (2021) realizaram a metátese cruzada de β -pineno e limoneno com outras olefinas internas, 2-metilbut-2-eno e 1,4-diclorobut-2-eno e observaram a formação de produtos – *E* com alta estereosseletividade e ao utilizarem as moléculas carvona e trans-limoneno1,2-epóxido que contém os grupos funcionais oxigenados cetona e epóxido, respectivamente,

observaram que a reação de metátese cruzada não foi inibida em nenhum dos casos, obtendo assim novos compostos que devem ter suas propriedades avaliadas [39].

Na química de polímeros, a metátese cruzada também pode ser empregada. A utilização dessa reação para a síntese de nanobastões de paligorsquita enxertada com polímero anfifílico foi realizada pela primeira vez por Liu e Pan (2021), onde nanobastões de paligorsquita modificada com vinil e borracha de acrilonitrila-butadieno foram utilizados na reação de metátese cruzada e após a reação os nanobastões resultantes adquiriram propriedades anfifílicas, podendo ser bem dispersos em água e tolueno, incorporando assim as propriedades anfifílicas, resultante das propriedades das moléculas do polímero com os grupos hidrofóbicos e hidrofílicos dos nanobastões de argila, apresentando possibilidades promissoras de aplicação como agente nano-reforçador em nanocompósitos à base de polímeros e adsorvente autodissolvente para tratamento de águas residuais [40].

A reação de metátese cruzada é utilizada na produção de diversas moléculas, a preparação de éster dienoato, estruturalmente análogo à piperovatina, foi realizado através da reação de metátese cruzada do estragol com sorbato de metila, utilizando o catalisador de Grubbs de 2ª Geração, levando a formação de produto desejado (6-(4-metoxifenil)hexa-2,4-dienoato de metila) como produto principal e produtos secundários através da homometátese e isomerização do estragol [41].

2.3 Homometátese

A reação de homometátese consiste na reação entre duas moléculas simétricas, alquenos idênticos, havendo a formação de uma nova molécula a partir das iniciais, essa reação permite a produção de olefinas altamente funcionalizadas de cadeias maiores e são catalisadas por um catalisador de metal de transição contendo um alquilideno na esfera de coordenação [42-43] (Figura 2.4).

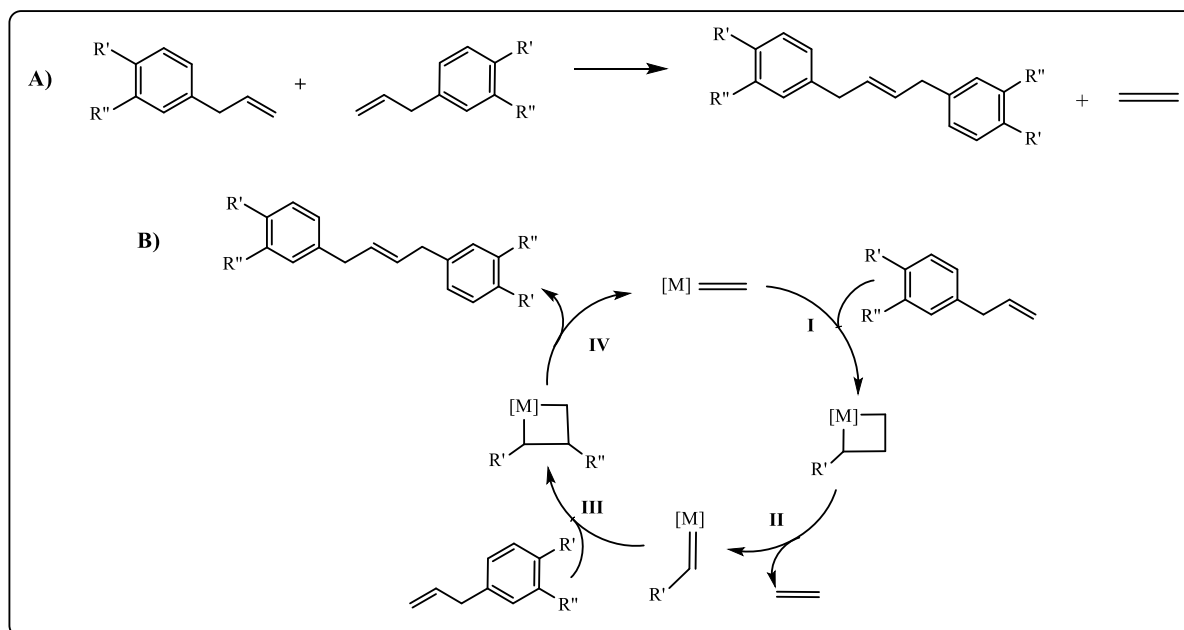


Figura 2.4. A: Esquema geral da reação de homometátese. B: Mecanismo geral das reações de homometátese. I - Coordenação da olefina ao centro metálico metal-carbeno e formação do intermediário metalociclobutano. II - Troca entre os grupos do substrato e grupo metal-carbeno no intermediário metalociclobutano e formação de uma nova olefina e um novo metal-carbeno. III – Reação entre o novo metal-carbeno com outra olefina formando novamente um intermediário metalociclobutano IV - formação uma nova olefina e regeneração do complexo metal-carbeno [adaptado de 44].

Essas reações apresentam ampla variedade de possibilidade de utilização, reações de homometátese de ésteres metílicos e ácidos graxos para a síntese de diésteres como o 9-octadeceno-1,18-dioato (9-OD) foram uma das primeiras reações estudadas em oleoquímica, tendo em vista que diésteres insaturados são intermediários valiosos em diversos setores industriais tal como a indústria polimérica e de produtos químicos finos [45, 46]. A reação de homometátese do propeno e a sua reação reversa (metátese cruzada do eteno com o 2-buteno para a produção do propeno) também são exemplos amplamente conhecidos da utilização dessas reações [47-49].

Zelin et al., (2013) realizaram a homometátese do oleato de metila, utilizando complexos Hoveyda-Grubbs suportados em sílica comercial para produzir 9-octadeceno-1,18-dioato e 9-octadeceno, reportando que os catalisadores utilizados foram altamente ativos e seletivos para a metátese do oleato de metila [46]. Guo et al., (2019), propuseram uma nova rota de síntese para a produção do eteno e hexeno, que são olefinas de valor agregado, utilizando a homometátese de 1-buteno e assim conseguiram produzir o 3-hexeno e eteno com altos rendimentos [29].

A reação de homometátese também é utilizada na obtenção de precursores importantes, o produto da homometátese do óleo de soja (Óleo de Soja Autometatizado) contendo cerca de 80% de oligômeros de triacilglicerol foi utilizado em reações de epoxidação e hidroxilação *one-pot* para conversão em polióis. As estruturas oligoméricas da mistura de poliol herdadas do Óleo de Soja Autometatizado, sua fonte original, afetou favoravelmente seu desempenho, o que permitiu a preparação de uma seleção de espumas flexíveis de poliuretano com recuperação de deformação aprimorada sem impactar adversamente outras propriedades mecânicas importantes [50].

2.4 Catalisadores utilizados nas Reações de Metátese de olefina

A ação dos catalisadores nas reações de metátese de olefina é fator primordial na reatividade das reações, visto que vários metais de transição utilizado na formação dos complexos apresentam afinidade por grupos funcionais ou por moléculas presentes no meio, sendo importante a utilização de catalisadores que reajam preferencialmente com a olefina do substrato [51,52].

Os catalisadores utilizados podem ser divididos em: catalisadores de 1^a geração, onde estes necessitam de um co-catalisador para iniciarem a reação, na qual a espécie ativa metal-carbeno ($M=CHR$) é gerada *in situ* e os catalisadores de 2^a geração que já possui a espécie ativa na esfera de coordenação, sendo a espécie metal-carbeno formada *ex situ* [53, 54].

Nesse sentido, destacam-se os catalisadores de Schrock que são complexos moleculares metálicos de molibdênio e tungstênio [55]. E os catalisadores de Grubbs a base de rutênio [56], sendo estes um pouco menos ativos que os de Schrock, mas em contrapartida menos sensíveis a impurezas e a grupos funcionais, o que se configura como maior vantagem desses [55-57].

Os catalisadores de Grubbs de Ru são amplamente utilizados por apresentarem tolerância a grupos funcionais, baixa sensibilidade para umidade e oxigênio, assim possibilitando a reação de metátese com uma infinidade de substratos, bem como compostos naturais e bioativos, [31,52,59] (Figura 2.5).



Figura 2.6. Detalhes da planta *Piper nigrum* e o fruto seco da pimenta do reino [2].

A piperina (1-piperonil-piperidina) é um alcaloide nitrogenado considerado como principal metabólito secundário extraído dentro do gênero *Piper*, foi isolada pela primeira vez em 1819 por Oerstedt, e apenas em 1894 a sua fórmula estrutural foi determinada por Landenburg e Scholtz [61]. É um composto natural, da classe dos alcaloides encontrados nos frutos das pimentas pertencentes a família Piperaceae, principalmente nas pimentas pretas (*Piper nigrum*), pimenta longa (*P. longum*), e em algumas outras espécies de plantas pertencentes ao mesmo gênero [04,05].

A piperina apresenta em sua estrutura três subunidades, sendo elas: (a) função amida constituída por um anel piperidina com fração carbonil α - β -insaturada, (b) uma cadeia de butadieno e (c) o grupo 1,3-benzodioxol [03, 04] (Figura 2.7).

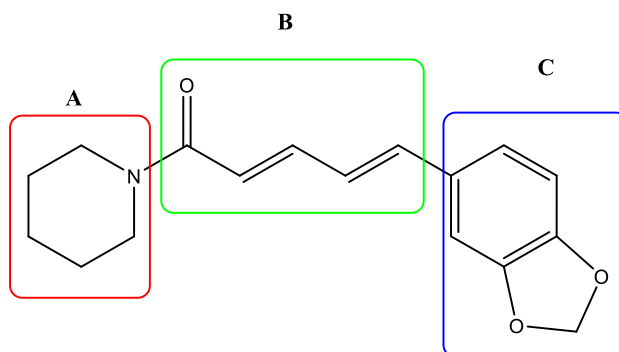


Figura 2.7. Estrutura química da piperina. A: Função amida com fração carbonil α - β -insaturada, B: cadeia de butadieno e C: grupo 1,3-benzodioxol [03, 04].

A piperina possui função cáustica capaz de produzir um efeito vasodilatador similar a capsaicina, principal princípio ativo das pimentas do gênero *Capsicum*, mas de modo quimicamente diferente. Além dos princípios ativos citados, as pimentas apresentam grande variedade de vitaminas A, E e C, além de ácido fólico, zinco e potássio. Conferindo assim, diversas propriedades interessantes, como atividade antioxidante evitando diversos danos provocados pelos radicais livres, e protetora do DNA celular devido a presença de bioflavonóides e carotenoides [1].

O potencial anti-inflamatório da piperina foi uma das primeiras atividades biológicas a serem investigadas [62]. A piperina apresenta atividade antimicrobiana contra as principais bactérias resistentes a medicação [63], atividade antifúngica [64], efeito neuroprotetor do sistema nervoso [05], capacidade antidiabética [65], antioxidante [65, 66] e bio-potenciador de fármacos [67-69].

O potencial anticâncer da piperina também vem sendo amplamente investigado, sendo relatado seus efeitos antiproliferativos *in vitro* com potencial antimetabólico capaz de reduzir o crescimento de tumores da linhagem Sarcoma 180 [70], como supressor do crescimento tumoral e inibição da metástase em carcinoma mamário de camundongos [71] e potencial citotóxico e apoptótico em células A549 de câncer de pulmão humano [72].

2.6 Eugenol

O eugenol (4-allyl-2-methoxyphenol), é um monoterpene volátil da classe dos fenilpropanoides que se apresenta como um líquido de incolor a amarelo claro, pouco solúvel em água e fotossensível), volátil, cheiro forte, sabor ardente e picante e aromático de cravo [73,74] (Figura 2.8). É um composto oriundo de óleos essenciais de plantas, extraído de diversas partes delas (folhas, botões florais, frutos, ramos finos), por meio de destilação por arraste de vapor d'água [75]. Foi isolado pela primeira vez a partir do cravo-da-índia, *Syzygium aromaticus*, pertencente à família Myrtaceae e é também encontrado em outras plantas aromáticas como *Cinnamomum verum*, *Ocimum basilicum*, *C.tamala*, *Illicium anisatum*, *Melissa officinalis*, *O. tenuifloruma* e *Myristica fragran* [10, 76].



Figura 2.8. Óleo de cravo da índia e o botão seco da flor da família das mirtáceas.

O eugenol apresenta fórmula molecular $C_{10}H_{12}O_2$ (Figura 2.9). Dentre os compostos fenólicos voláteis, o eugenol vem despertando interesse dos cientistas por possuir elevada lipossolubilidade, baixa toxicidade, antipirética, analgésica, antiinflamatória, antioxidante, antimicrobiana, anticâncer, ação central e neuroprotetora [10, 12-14].

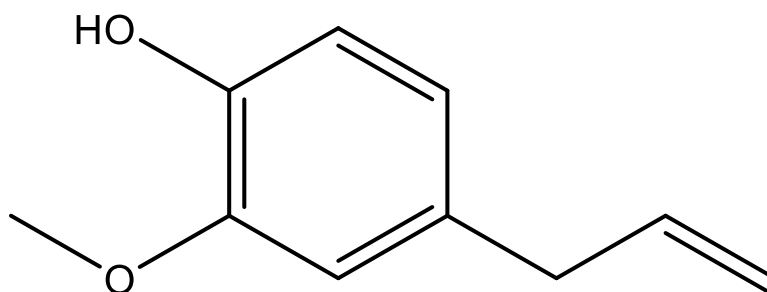


Figura 2.9. Estrutura química do eugenol.

2.7 Teste para detecção de tumores epiteliais em *Drosophila melanogaster*

O Teste de Detecção de Tumor Epitelial (*Epithelial Tumor Test - ETT*) utiliza a *Drosophila melanogaster* como organismo vivo experimental (Figura 2.10). O organismo modelo *D. melanogaster*, pertencente à família Drosophilidae, ao qual 4.200 espécies fazem parte. É popularmente conhecida como mosca da fruta e é um organismo eucariótico que apresenta quatro pares de cromossomos, sendo três pares autossômicos e um par de

cromossomos sexuais, embora seja reduzido o número de cromossomos, as moscas das frutas apresentam praticamente a metade do número de genes conhecidos em humanos, o que evidencia considerável homologia entre ambos organismos [77,78].

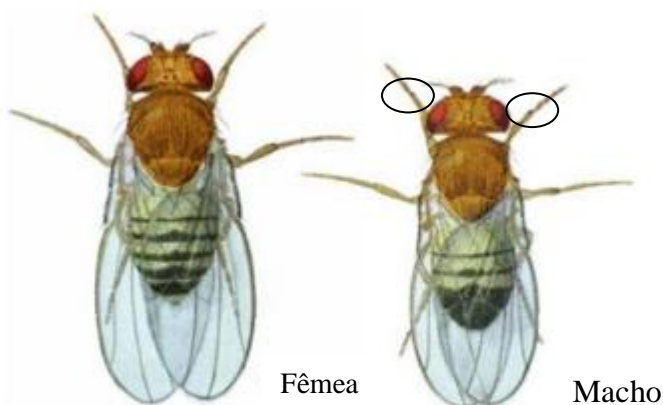


Figura 2.10. Casal de *Drosophila melanogaster*, dimorfismo sexual, marcado pelo pente sexual masculino (destacado nos círculos) [79].

A conservação evolutiva de genes supressores de tumor entre *D. melanogaster* e mamíferos tem motivado diversos estudos de indução e desenvolvimento de tumores em *Drosophila*, a fim de melhor entender o mecanismo de ação dos tumores em seres humanos [80-82]. Cerca de 70% dos genes implicados em cânceres humanos tem equivalência em *D. melanogaster* [83,84]. Mamíferos e *D. melanogaster* partilham homologia com numerosos proto-oncogenes e genes supressores de tumores [85].

Os principais genes de supressões de tumor em *D. melanogaster* foram caracterizados e mapeados, e 08 deles tem ação no desenvolvimento embrionário dos indivíduos, 12 no desenvolvimento do cérebro, 19 na expressão das células dos discos imaginários, 25 no desenvolvimento hematopoiético, e 10 nas gônadas adultas [86] dentre esses, destaca-se o gene *wts*.

Justice et al. (1995) inicialmente caracterizaram o gene *wts*, relatando que a expressão do alelo recessivo está diretamente relacionada com a formação de células invasivas, o que resulta na formação de uma massa tecidual áspera, de cor escura e semelhante a uma verruga (*Warts*) que podem ser detectados nos diversos tecidos epiteliais do inseto (cabeça, olhos, corpo, pernas, asas e halteres). O gene *wts* foi então identificado e caracterizado como gene supressor de tumor [86, 87].

A família de proteínas quinase governam o ciclo celular e são basicamente constituídas por duas subunidades, sendo as ciclinas regulatória e as proteínas quinase dependente da ciclina (CDK) catalítica, as quais em conjunto forma um heterodímero. Nas células somáticas existem pelo menos quatro tipo de ciclinas (A, B, C, D) e pelo menos oito tipo de CDK (CDK1- CDK8) [86, 87]. Nas larvas de *D. melanogaster* os discos imaginais são formados por uma única camada de células, que durante a metamorfose se desenvolve nas estruturas da mosca adulta. As células desse disco possuem o controle do ciclo celular bastante similar ao de células somáticas em mamíferos, e a progressão do ciclo celular é controlada por ciclinas e quinases [85].

Em humanos há um gene homólogo ao gene *wts* das *D. melanogaster*, este gene é o LATS1. A introdução desse gene humano em *D. melanogaster* impede a formação de tumores, apoiando o seu desenvolvimento saudável da mosca, o que demonstra que as funções desse gene são as mesmas em ambos os organismo, pois a proteína codificadora desse gene nas *D. melanogaster* possui domínio catalítico muito similar em humanos, e esse domínio é importante na progressão do ciclo celular [88], sendo assim, o LATS1 se constitui como verdadeiro homólogo de verrugas em *D. melanogaster* apresentando funções importantes na regulação do crescimento celular [87-89].

Quando em homozigose, o gene *wts* é letal, sendo mantido na linhagem estoque com a presença de um balanceador cromossômico (*TM3, Sb^l*). Para a avaliação do potencial carcinogênico, o ETT, utiliza o cruzamento realizado por meio das linhagens *Multiple wing hairs (mhw/mhw)* com a linhagem (*wts/TM3, Sb^l*), sendo obtidas duas progênes: Progênie trans-heterozigoto marcado (*wts+/+mwh*) e Progênie trans-heterozigoto balanceado (*TM3,Sb^l+/+mwh*) (Figura 2.11). As moscas de pelos grossos progênie trans-heterozigoto balanceado (*TM3,Sb^l+/+mwh*) não apresentam o marcador *wts* e por isso são descartadas enquanto que as moscas de pelos normais (lisos) progênie trans-heterozigoto marcado (*wts +/+mwh*) são analisada, e a diferenciação entre ambas se dá pela expressão fenotípica dos pelos no corpo da mosca [81-82,85]. A perda da heterozigose do disco imaginal das *D. melanogaster* ocasiona a formação de clones homozigotos da larva, levando a manifestação de tumores na mosca adulta [82,90].

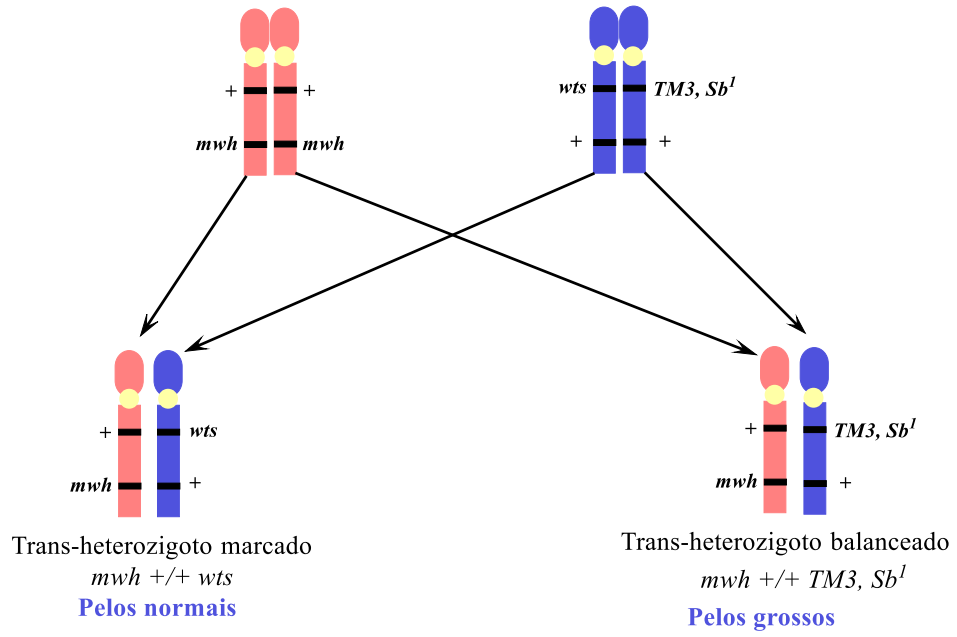


Figura 2.11. Representação do cruzamento realizado entre as linhagens *multiple wing hairs* (*mwh*) e a linhagem *warts* (*wts*) e seus descendentes.

Capítulo 3

METODOLOGIA EXPERIMENTAL

3.1 Reações de Metátese

3.1.1 Materiais e Reagentes

- Catalisador 1^o geração de Grubbs- $[\text{RuCl}_2(\text{PCy}_3)_2(=\text{CHPh})]$ (99%), Sigma-Aldrich;
- Piperina (99%), Sigma-Aldrich;
- Eugenol (99%), Sigma-Aldrich;
- Etil Vinil Éter, Sigma-Aldrich;
- Clorofórmio (CHCl_3), Dinâmica;
- Nitrogênio, 5.0 de pureza da W. Martins;
- Hélio, 5.0 de pureza da W. Martins.

Todos os reagentes foram utilizados conforme obtidos, não passando por nenhum processo de tratamento.

3.1.2 Reações de Metátese

As reações de metátese cruzada ocorreram em um balão de fundo redondo (100 mL), os substratos piperina e eugenol foram solubilizados em 10 mL de clorofórmio e em seguida o sistema foi acondicionado por atmosfera de gás. Então, adicionou-se 100 mg do catalisador de Grubbs de 1^a geração (G1) e o sistema permaneceu sob refluxo em banho de óleo termostático com temperatura controlada sob agitação magnética constante (Figura 3.1).

Transcorrido o tempo de reação, foi adicionado ao sistema 3 μL de etilvinil éter, para a desativação do catalisador e finalização da reação. O produto da síntese foi analisado por CG-EM. Inicialmente as reações aconteceram à temperatura ambiente (TA), com relações equivalentes de catalisador:substrato e tempo de 24h. Em outros ensaios, houve a variações das condições reacionais em relação a temperatura, tempo de reação e proporção catalisador/substrato.

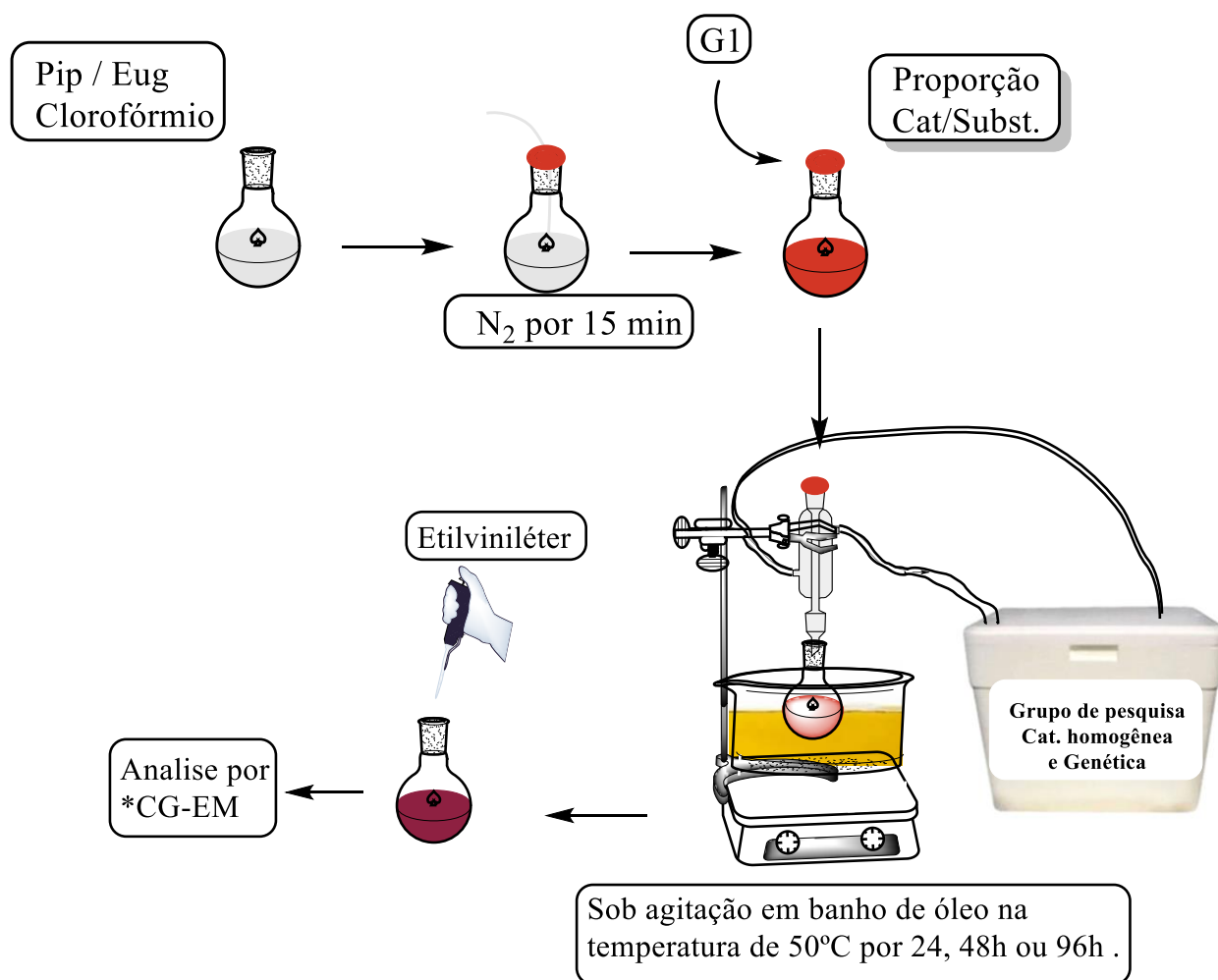


Figura 3.1. Ilustração esquemática da síntese para as reações de metátese.

A seguir estão dispostos os principais produtos esperados para a reação de metátese cruzada da piperina com o eugenol, baseados no mecanismo de reação de metátese (Figura 3.2).

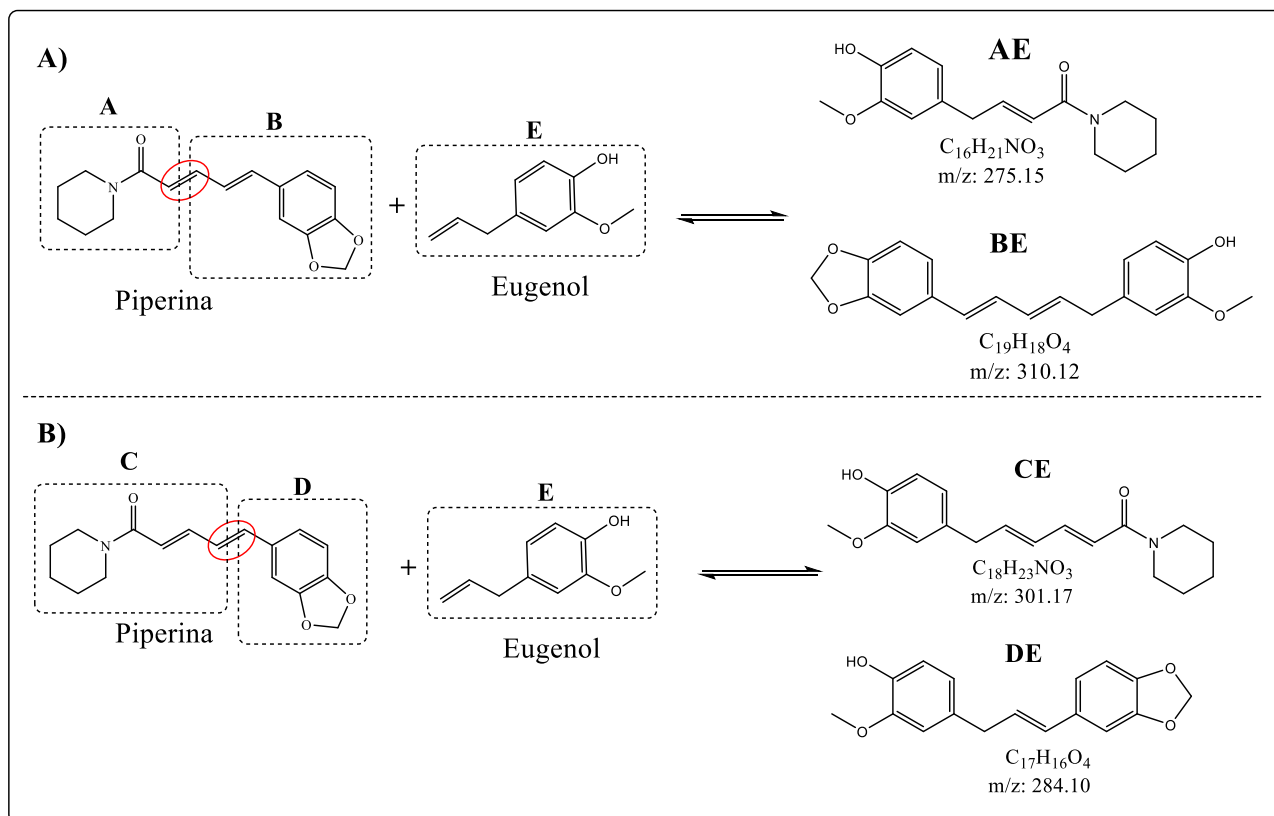


Figura 3.2. Ilustração dos produtos esperados para a reação de metátese cruzada da piperina com o eugenol. A piperina foi dividida em 4 fragmentos (A, B, C e D) de acordo com a possibilidade da reação acontecer pela ligação dupla próxima ao grupo amida com fração carbonil α - β -insaturada e pela ligação dupla próxima ao grupo 1,3-benzodioxol. E o eugenol como (E). A) Ilustração dos produtos AE e BE pela reação com a ligações duplas próxima ao grupo amida da piperina com o eugenol. B) Ilustração dos produtos CE e DE pela reação com a ligação dupla próxima ao grupo benzodioxol da piperina com o eugenol.

As reações de homometátese foram realizadas para cada um dos substratos de partida (piperina e eugenol) utilizando os mesmos passos conforme descritos para a reação de metátese cruzada (Figura 3.1). Os principais produtos esperados para a reação de homometátese da piperina e do eugenol, baseados no mecanismo de reação de metátese estão dispostos abaixo (Figura 3.3).

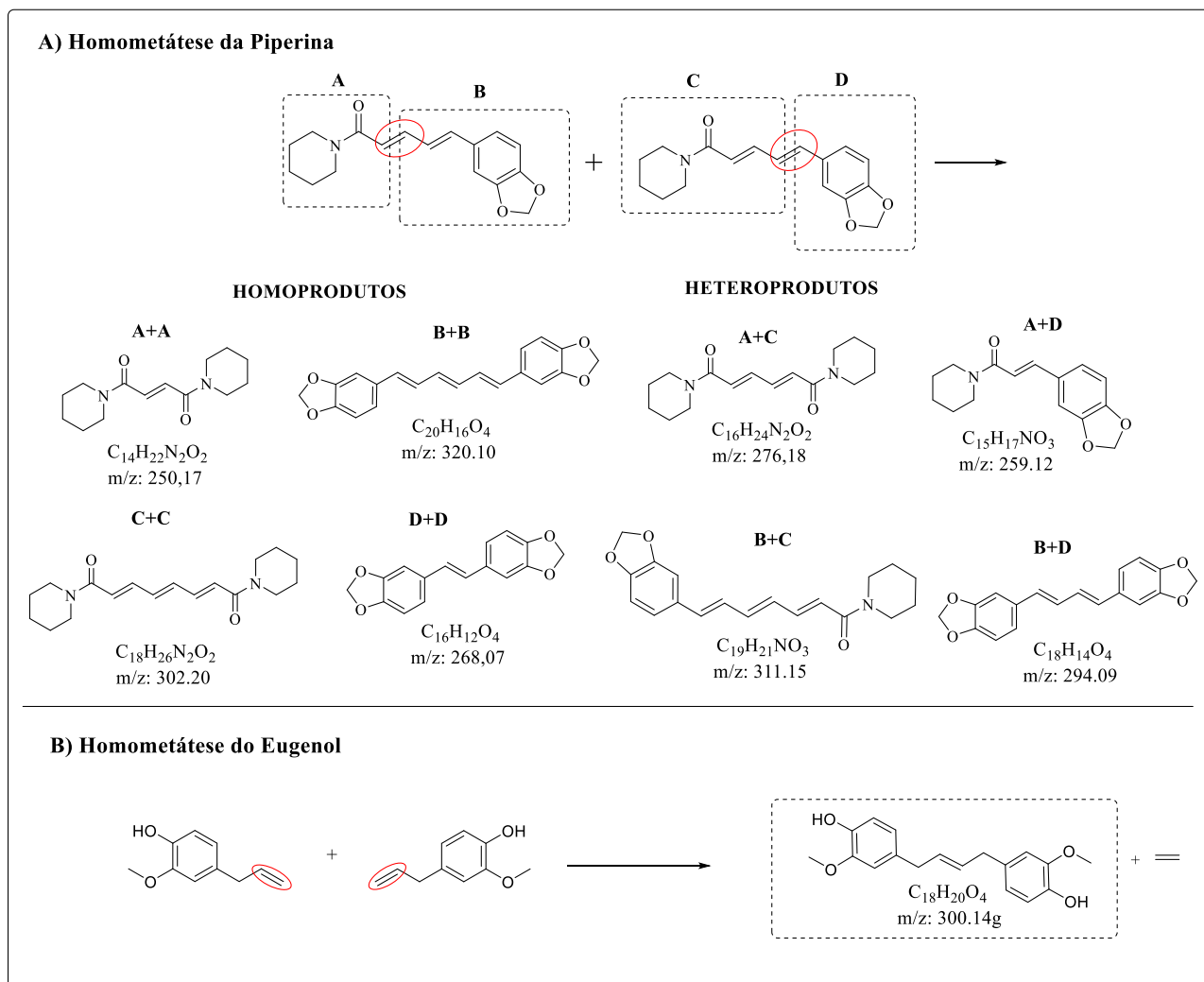


Figura 3.3. A) Ilustração dos produtos esperados para a reação de homometátese da piperina. B) Ilustração da equação da reação de homometátese do eugenol para a formação do produto esperado.

3.1.3 Análise de Cromatografia Gasosa Acoplada ao Espectômetro de Massas (CG-EM)

As análises das sínteses utilizando o CG-EM foram conduzidas utilizando um equipamento GCMS-QP2010, fabricado pela Shimadzu, acoplado com uma coluna RTZ®-5MS (30m x 0.25mm x 0.25 µm). A temperatura iniciou-se em 80° C e a foi aumentando até 100° C.

Foram realizadas duas rampas de aquecimento: (1) a temperatura 10 °C mantida por 1 min; (2) a temperatura aumentava 4 °C/ min durante 10 min, até chegar 250 °C. A análise ocorreu por 60 min, com fluxo de coluna total de 1,0 mL. min⁻¹ e a razão split de 1,0.

O espectrômetro de massas é acoplado a cromatografia gasosa. As moléculas fragmentadas são detectadas pelo equipamento Shimadzu GCMS-QP2010, onde estas entram na fonte de

ionização por impacto eletrônico com energia cinética de 70 eV. O equipamento utilizado é pertencente a Universidade Estadual do Piauí (UESPI), no laboratório GERATEC.

3.2 Teste de detecção de tumor epiteliais em *Drosophila melanogaster* (ETT)

3.2.1 Linhagens de *D. melanogaster*

Para a realizar o bioensaio de detecção de clones de tumores epiteliais foram utilizadas duas linhagens de *D. melanogaster*: linhagem *multiple wing hairs* (*mwh*, 3-0,3) e a linhagem *warts* (*wts*, 3-100).

1) Linhagem *multiple wing hairs* (*mwh*, 3-0,3): mantida em homozigose recessiva para o marcador *mwh*, que se encontra localizado no cromossomo 3, na posição distal ao centrômero (*mwh*, 3-0,3). Ao ser expresso em homozigose recessiva o gene *mwh*, apresenta fenótipo de pelos múltiplos nas asas das moscas, diferentemente do fenótipo selvagem que apresenta um único pelo por célula.

2) Linhagem *warts* (*wts*, 3-100): possui o marcador *wts* no cromossomo 3, que é conservado em homozigose na presença do balanceador cromossômico TM3, Sb¹. O marcador *wts*, quando expresso em condição selvagem, atua como um gene supressor de tumor.

Ambas as linhagens foram mantidas em estoques, em frascos contendo 250 mL com meio de cultura (820 ml de água destilada, 156 g de banana, 25 g de fermento biológico, 11 g de ágar e 1 g de metilparabeno – nipagin) e armazenadas em incubadora bioquímica de demanda de oxigênio SL-224/364 - n°. 17-000 (Solab- Fabricante de Equipamentos para Laboratório, São Paulo) a 25 ± 1 ° C sob fotoperíodo de 12:12 h.

3.2.2 Ensaio biológico

O cruzamento foi realizado entre machos da linhagem *mwh* e fêmeas virgens da linhagem *wts*, para o ensaio de carcinogenicidade. Larvas em terceiro estágio de desenvolvimento (± 72 horas), provenientes deste cruzamento foram lavadas em água corrente e coletadas usando peneiras de malha fina com auxílio de pincel fino. As larvas foram contadas e distribuídas em frascos (200 larvas/frasco) contendo 2 g de purê de batata instantâneo (Yoki® Alimentos SA, Brasil) preparado com as diferentes concentrações de piperina ou eugenol.

No ensaio para avaliação da carcinogenicidade 1,2, 2,4, 3,6, 4,8 mg de piperina foram solubilizadas em 2 mL do controle negativo 1 (CN1 - solução de Tween 20 a 2%), em seguida, cada uma dessas soluções foi misturada à 20g de purê com auxílio de um liquidificador doméstico. Essas preparações foram distribuídas nos frascos devidamente identificados, cujas concentrações de piperina/ Kg de purê de batata foram estimadas em 60, 120, 180 e 360 mg/kg, respectivamente.

No ensaio para avaliação da carcinogenicidade do eugenol 1,1, 2,2, 3,35 e 6,7 μ L do óleo foram solubilizados em 2 mL do controle negativo 2 (CN2 – óleo de soja comercial), em seguida, cada uma dessas soluções foi misturada à 20g de purê com auxílio de um liquidificador doméstico. Essas preparações foram distribuídas nos frascos devidamente identificados, cujas concentrações de eugenol/ Kg de purê de batata foram estimadas em 60, 120, 180 e 360 mg/kg, respectivamente. Em ambos os ensaios, as preparações foram umedecidas com 7mL de água destilada.

Nos ensaios de anticarcinogênese, os frascos foram preparados assim como já descrito no ensaio de carcinogênese para cada uma das moléculas, no entanto, cada uma das preparações foram umedecidas com 7mL do controle positivo, ao final. Para os ensaios com a piperina o controle positivo utilizado foi o metanossulfonato de metila (CP1 – MMS (3mM)) e para os ensaios com o eugenol utilizou-se o cloridrato de doxorubicina (CP2 - DXR (0,125mg/mL)).

As moscas emergentes foram contadas e conservadas em etanol 70% para serem analisadas posteriormente. O cruzamento produziu dois tipos de descendentes, cada qual fenotipicamente distintos devido ao marcador Sb^1 : (i) balanceador heterozigoto (BH) $mwh +/+ TM3, Sb^1$ (com cabelos curtos e grossos) e (ii) marcador trans-heterozigoto (MH) $mwh +/+ wts$ (com cabelos longos e finos) [86]. Todo o experimento foi realizado em duplicata.

3.2.3 Análise do material biológico

Após o término do processo, apenas os indivíduos que apresentaram o marcador wts foram analisados em microscópio (lupa) estereoscópio binocular com aumento de 50x e avaliados em relação a quantidade de tumores presentes no corpo e apêndices. No total, 200 indivíduos foram analisados por tratamento no ensaio carcinogênico e 180 indivíduos foram analisados no anticarcinogênico, de modo que a quantidade de indivíduos obtidos no anticarcinogênico não chegou a 200 indivíduos. Os resultados desta análise foram registrados em um diagrama padrão expressando os números de tumores observados em cada parte do corpo das moscas, como: cabeça, olhos, corpo, pernas, asas e halteres, separadamente para cada tratamento. A seguir tem-se o esquema ilustrativo deste processo (Figura 3.4).

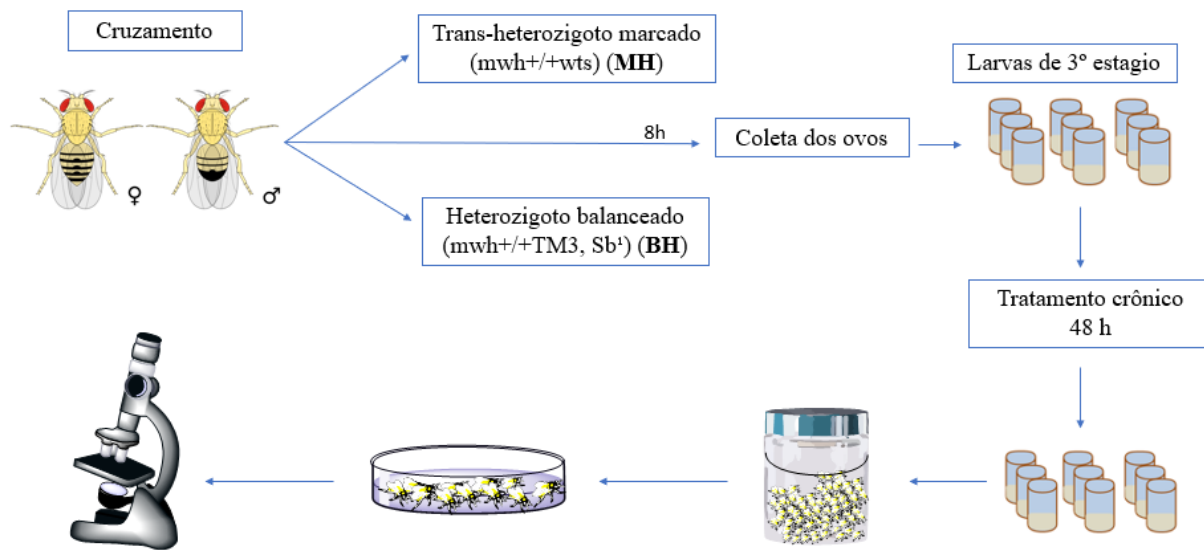


Figura 3.4. Ilustração esquemática do teste de detecção de tumor epitelial (ETT) em *Drosophila melanogaster*.

As diferenças estatísticas entre a taxa de sobrevivência e as frequências de tumores das concentrações testadas e os controles (positivo e negativo), foram calculadas por meio do teste de qui-quadrado, empregando o nível de significância $\alpha=0,05$.

Capítulo 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Metátese Cruzada

A reação de metátese cruzada da piperina com o eugenol foi realizada utilizando o Catalisador 1ª Geração de Grubbs- $[\text{RuCl}_2(\text{PCy}_3)_2(=\text{CHPh})]$. Os substratos foram misturados em clorofórmio, na razão catalisador:substratos (sendo substratos a soma de eugenol e piperina) de 1:1 ou 1:10 mol (também podendo ser expresso pela razão catalisador:eugenol:piperina de 1:0,5:0,5 ou 1:5:5 mol). Os resultados das análises por CG-EM são apresentados na Figura 4. Na Tabela 1 estão resumidos os resultados dos rendimentos dos principais produtos. Os produtos esperados para esse tipo de reação estão dispostos na figura 3.2 com as fórmulas moleculares e as respectivas massas.

O processo catalítico das reações de sínteses foi realizado utilizando diferentes modificações na temperatura de reação, razão catalisador:substrato, substrato:substrato e tempo, a fim de avaliar todas as possibilidades de otimização da reação (Tabela 4.1).

Tabela 4.1. Resultados observados a partir das variações das condições reacionais da metátese cruzada da piperina com o eugenol.

Catalisador/ Substrato	Substrato/ substrato	Temperatura	Tempo	Produto de metátese	Produto de Isomerização
1:1	1:1	50°C	24h	--	--
			48h	Dimerização Eugenol	--
			96h	--	Isomerização Piperina
1:10	1:1	50°C	24h	--	--
			48h	Dimerização Eugenol	--
			96h	--	Isomerização Piperina
1:1	1:1	50°C	48h	Dimerização Eugenol	Isomerização Piperina
		70°C	48 h	Dimerização Eugenol	Isomerização Piperina

Os resultados das análises por CG-EM são apresentados nas Figuras 4.1 e 4.2. Na Tabela 4.2. estão resumidos os resultados dos rendimentos dos principais produtos. Em nenhuma das condições de síntese realizada foi possível observar a formação de produtos de metátese cruzada. No tempo de 24 h não houve a formação de produto de isomerização em nenhuma das proporções ou temperaturas estudadas para piperina ou eugenol.

Por 48 h, na proporção catalisador:substratos de 1:1 mol, observou-se formação de produto de metátese do eugenol, denominado dímero de eugenol, de razão $m/z = 300 \text{ g.mol}^{-1}$, com pico aparecendo em cerca de 5 min de tempo de retenção (Figura 4.1.A). O produto da isomerização do eugenol também foi notado, com pico relativo em torno de 22 min de tempo de retenção. O dímero de eugenol e o isômero do eugenol estão presentes com 6 e 17% na mistura total, respectivamente.

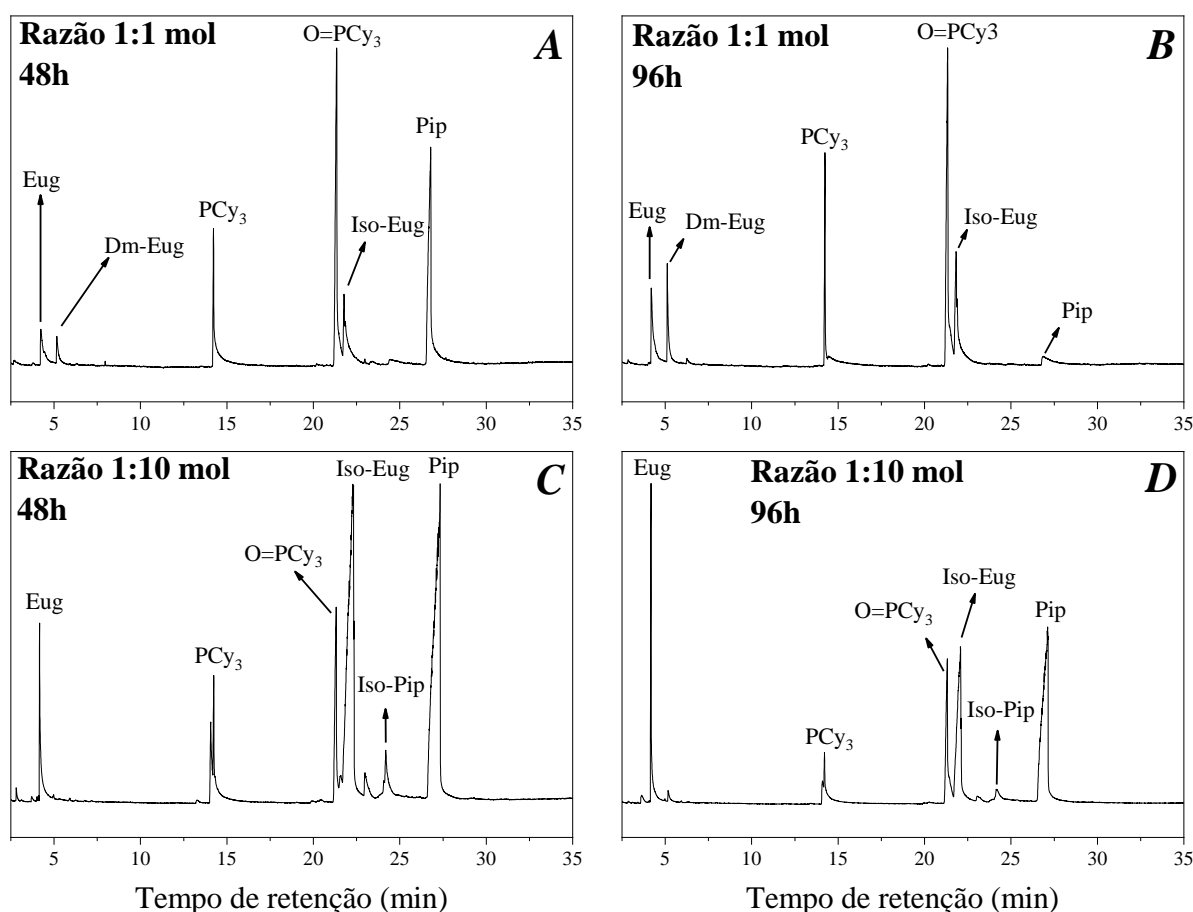


Figura 4.1. Cromatogramas da reação de metátese cruzada da piperina com o eugenol. As concentrações catalisador:substratos foram de 1:1 ou 1:10 mol, nos tempos reacionais de 48 ou 96 h em temperatura de 50°C. Eug (eugenol); Dm-Eug (dímero do eugenol); PCy₃ (triciclohexilfosfina); O=PCy₃ (triciclohexilfosfina oxidada); Iso-Eug (isômero do eugenol); Pip (piperina); e Iso-Pip (isômero da piperina).

Ainda nesta análise, observou-se picos referentes à triciclohexilfosfina (PCy_3), triciclohexilfosfina oxidada (O=PCy_3) e picos relativos aos dois substratos da mistura (rendimento resumido na Tabela 4.2).

Relacionando-se apenas o eugenol e seus produtos, as porcentagens na mistura são 30% de substrato, 14,6% do dímero, e 56,5% do isômero (Tabela 4.3). Destaca-se que nenhum destes produtos foram observados em experimentos sem adição do catalisador, em qualquer tempo, temperatura ou razão catalisador:substratos. Por 48 h na proporção catalisador:substratos de 1:1 mol nenhum produto de reação, seja metátese de olefinas seja de isomerização, ocorreu com a piperina nas reações de metátese cruzada.

Aumentando o tempo reacional para 96 h, mantendo-se razão catalisador:substratos de 1:1 mol, observou-se perfil similar ao cromatograma para o experimento realizado por 48 h (Figura 4.1.B). Nenhum produto de metátese cruzada, metátese de olefinas ou isomerização da piperina foram observados. Mas houve aumento do rendimento de dímero de eugenol e eugenol isomerizado para cerca de 10 e 20% de rendimento, respectivamente. Relacionando eugenol e seus produtos, têm-se 28,2% de substrato, 18,5% do dímero e 53,3% do isômero do eugenol na mistura. Com rendimentos muito próximos aos obtidos nos experimentos realizados por 48 h (Tabela 4.3).

Tabela 4.3. Rendimentos relativos dos compostos na mistura, considerando apenas eugenol e seus produtos. % (Rendimento relativo ao composto); Eug (eugenol); Dm-Eug (dímero do eugenol); Iso-Eug (isômero do eugenol).

Resultados quantitativo (%)			
	Eug	Dm-Eug	Iso-Eug
1:1 48h (50°C)	28,9	14,6	56,5
1:1 96h (50°C)	28,2	18,5	53,3
1:10 48h (50°C)	12,7	--	87,3
1:10 96h (50°C)	31,8	--	68,2
1:1 48h (70°C)	--	100	--

Tabela 4.2. Rendimentos relativos dos compostos na mistura (em porcentagem), variando a razão catalisador;substrato de 1:1 ou 1:10 mol, o tempo reacional de 48 ou 96h e a temperatura de 50 ou 70 °C. % (Rendimento relativo ao composto); Eug (eugenol); Dm-Eug (dímero do eugenol); PCY₃ (tricliclohexilfosfina); O=PCY₃ (tricliclohexilfosfina oxidada); Iso-Eug (isômero do eugenol); Pip (piperina); e Iso-Pip (isômero da piperina).

Metátese Cruzada (Piperina + Eugenol) Resultados quantitativo									
1:1 48h (50°C)		1:1 96h (50°C)		1:10 48h (50°C)		1:10 96h (50°C)		1:1 1h (70°C)	
Compostos	Rendimento	Compostos	Rendimento	Compostos	Rendimento	Compostos	Rendimento	Compostos	Rendimento
Eug	11,4	Eug	13,6	Eug	5,1	Eug	11,4	Dm-Eug	20,4
Dm-Eug	5,8	Dm-Eug	10,0	PCY ₃	8,3	PCY ₃	6,9	PCY ₃	27,0
PCY ₃	21,5	PCY ₃	10,2	O=PCY ₃	6,2	O=PCY ₃	12,4	O=PCY ₃	31,6
O=PCY ₃	22,2	O=PCY ₃	37,4	Iso-Eug	35,3	Iso-Eug	24,6	m/z 205	21,0
Iso-Eug	16,9	Iso-Eug	19,9	m/z 229	2,9	Iso-Pip	4,0		
Pip	22,2	Pip	8,9	Iso-Pip	4,5	Pip	40,7		
				Pip	37,7				

Na reação por 48 h, com razão catalisador:substratos 1:10 mol, não foi observado dímero de eugenol, nem outros produtos previstos de metátese da piperina ou de metátese cruzada (Figura 4.1.C). Porém, a piperina foi isomerizada nesta reação com rendimento relativo de 4,5%. O mais notável foi o aumento do rendimento do isômero do eugenol de cerca de 17%, nas reações por 48h com razão catalisador:substratos 1:1 mol, para cerca de 35% com razão catalisador:substratos 1:10 mol. Relacionando apenas o eugenol e seu isômero, têm-se na mistura 12% para eugenol e 87,3% para o iso-eugenol. No mesmo tempo de reação, mas com razão catalisador:substratos 1:1 mol, a porcentagem do isômero foi de 56,5%. Ainda para esta relação, no experimento por 96 h e razão catalisador:substratos 1:10 mol (Figura 4.1.D), observou-se na mistura 31,8% para eugenol e 68,2% para o iso-eugenol (Tabela 4.3). Em relação ao tempo de 48 h, não houve variação considerável de porcentagem na mistura para iso-piperina (Tabela 4.2).

A reação de metátese cruzada não aconteceu quando eugenol e piperina são misturados com G1 como catalisador, nas condições estudadas. Evidenciando que, neste sistema, há preferência pela ligação dupla terminal do eugenol. Praticamente sem impedimento estérico nesta molécula, a metátese de olefinas do eugenol foi observada. De fato, observou-se que G1 não foi capaz de promover a metátese de olefinas da piperina.

Reações de homometátese foram realizadas para os substratos isolados. Nenhum produto foi notado por 48h nas razões catalisador:substratos 1:1 e 1:10 mol para a piperina (Figura 4.2).

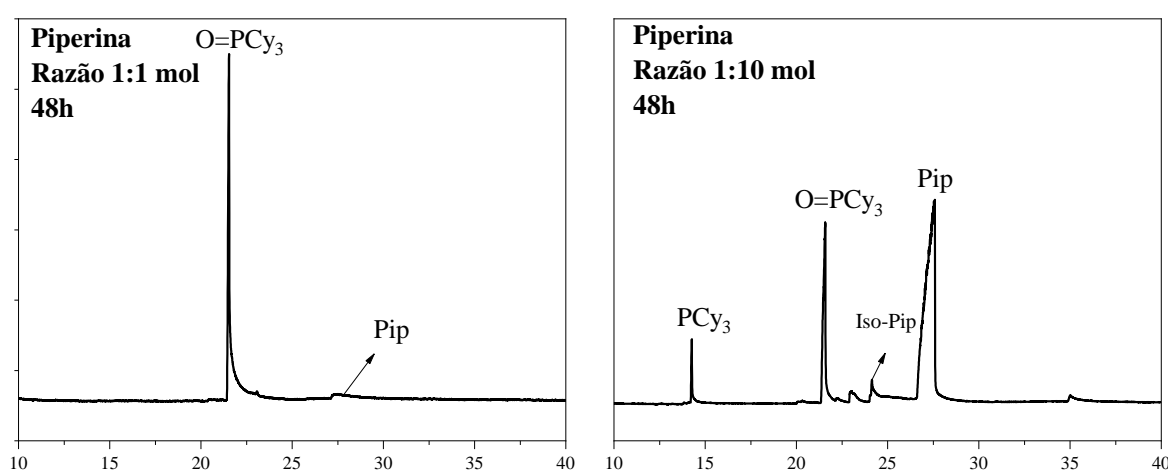


Figura 4.2 Cromatogramas da reação de homometátese da piperina. As concentrações catalisador:substratos foram de 1:1 ou 1:10 mol, no tempo reacional de 48 h em temperatura de 50°C. PCy₃ (triciclohexilfosfina); O=PCy₃ (triciclohexilfosfina oxidada); Pip (piperina); e Iso-Pip (isômero da piperina).

E realizando a homometátese para o eugenol (Figura 4.3) nas mesmas condições de razões catalisador:substratos 1:1 e 1:10 mol foi observado a formação do dímero do eugenol. O que parece evidenciar ainda mais a necessidade da existência de uma ligação dupla olefínica terminal.

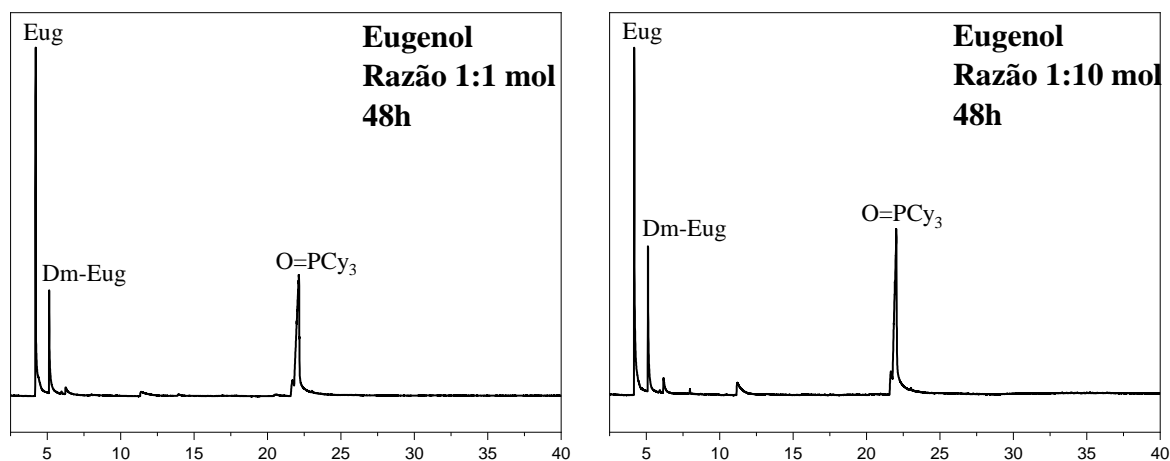


Figura 4.3. Cromatogramas da reação de homometátese do eugenol. As concentrações catalisador:substratos foram de 1:1 ou 1:10 mol, no tempo reacional de 48 h em temperatura de 50°C. Eug (eugenol); Dm-Eug (dímero do eugenol); PCy₃ (triciclohexilfosfina); O=PCy₃ (triciclohexilfosfina oxidada); Iso-Eug (isômero do eugenol);

O estímulo para realização das reações de metátese cruzada do eugenol e piperina advém de estudos descritos na literatura, com metil-eugenol (ME) [91], álcool cinamílico (AC) e acetato cilamílico (ACM) [92], catalisados por catalisadores de Grubbs de primeira geração (G1), segunda geração (G2) e pré-catalisadores [RuCl₂(PPh₃)₂piperidina] (LN-1) e [RuCl₂(PPh₃)₂peridrozepina] (LN-2). Mesmo sem ligação dupla olefínica terminal, AC e ACM sofreram reação de metátese. Além disso, em todos os casos houve reações sucessivas que geraram novas espécies ativas a partir da coordenação inicial do substrato. Assim, esperava-se que a coordenação inicial com o eugenol gerasse uma espécie ativa capaz de promover a metátese da piperina [91,92].

A reação de metátese do eugenol utilizando o catalisador de Grubbs de 2^a geração foi realizada e é descrita na literatura com a formação do dímero com $m/z = 300 \text{ g.mol}^{-1}$, corroborando assim com a proposta de produto desse trabalho e que a reação de homometátese do eugenol é favorável [93]. O produto da dimerização do eugenol também foi sintetizado através da reação de metátese com o catalisador de Hoveyda-Grubbs suportado com SBA-15 e analisado quanto a atividade antioxidante no teste de DPPH, apresentando

maior atividade antioxidante quando comparado ao eugenol associado a melhor capacidade do dímero na eliminação de radicais livres [94].

Já em relação à formação do dímero do eugenol, produto de homometátese do eugenol, a partir da mistura dos dois substratos, o aumento da razão catalisador:substratos de 1:1 para 1:10 mol suprimiu a sua formação. Não se descarta a possibilidade da coordenação de duas moléculas de eugenol, uma vez que é conhecido que G1 perde a fosfina durante o processo reacional. Esta reação de caráter associativo, deve dificultar a formação do intermediário ciclometalobutano, impedindo a metátese de olefinas, mas favorece a isomerização dos substratos, inclusive da piperina.

A fim de confirmar a tendência de favorecimento do processo de metátese de olefina nos experimentos com catalisador:substratos de 1:1 mol, ensaios nesta razão por 48h, em 70 °C foram realizados (Figura 4.4). Houve o consumo total do eugenol, formação de dm-eugenol com cerca de 20% na mistura. E relacionando apenas eugenol e dm-eugenol, 100% deste último foi notado. A 70 °C e 48h, nenhuma transformação ocorreu com a piperina.

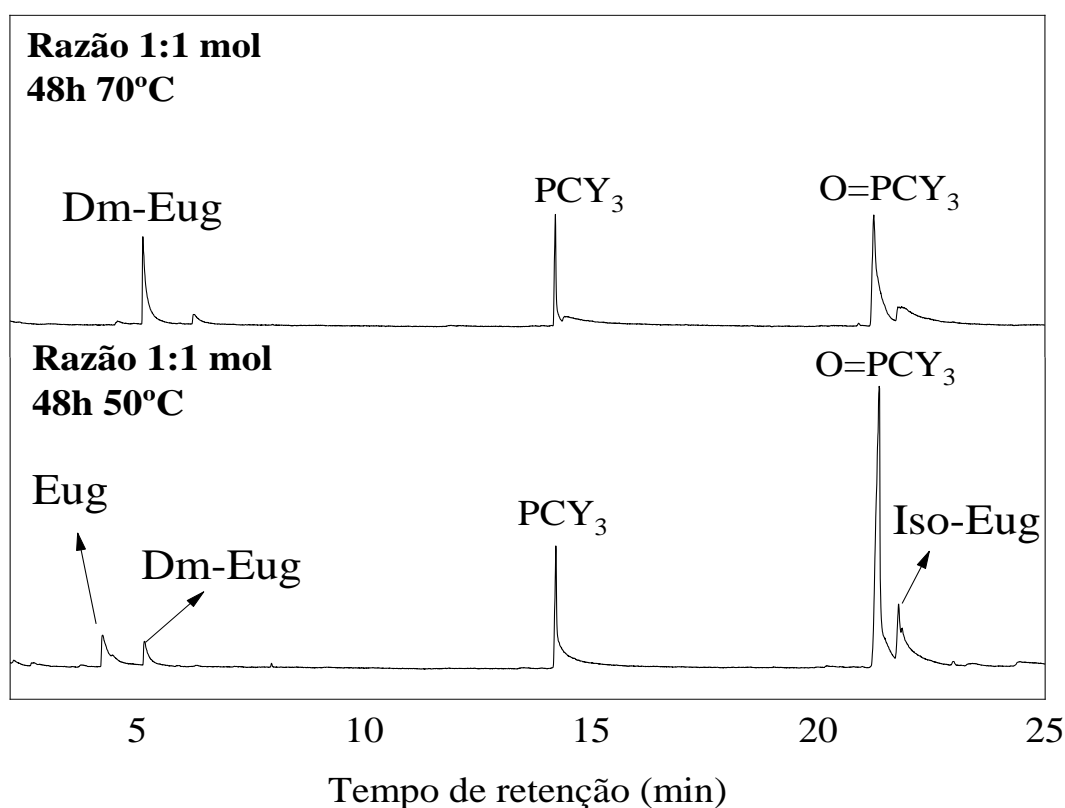


Figura 4.4. Cromatogramas da reação de metátese cruzada da piperina com o eugenol. Razão catalisador:substratos de 1:1 mol, por 48h a 70 °C. Eug (eugenol); Dm-Eug (dímero do eugenol); PCY₃ (triciclohexilfosfina); O=PCY₃ (triciclohexilfosfina oxidada); Iso-Eug (isômero do eugenol).

Para a complementação das análises de Cromatografia Gasosa, utilizou-se os espectros de massas do produto da reação de metátese do eugenol (Figura 4.5). E realizou-se a proposta para o mecanismo de fragmentação do dímero de eugenol formado (Figura. 4.6). A proposta de fragmentação foi baseada em trabalhos de estudo a comparação do espectro de massas do estilbeno com o de outras [95].

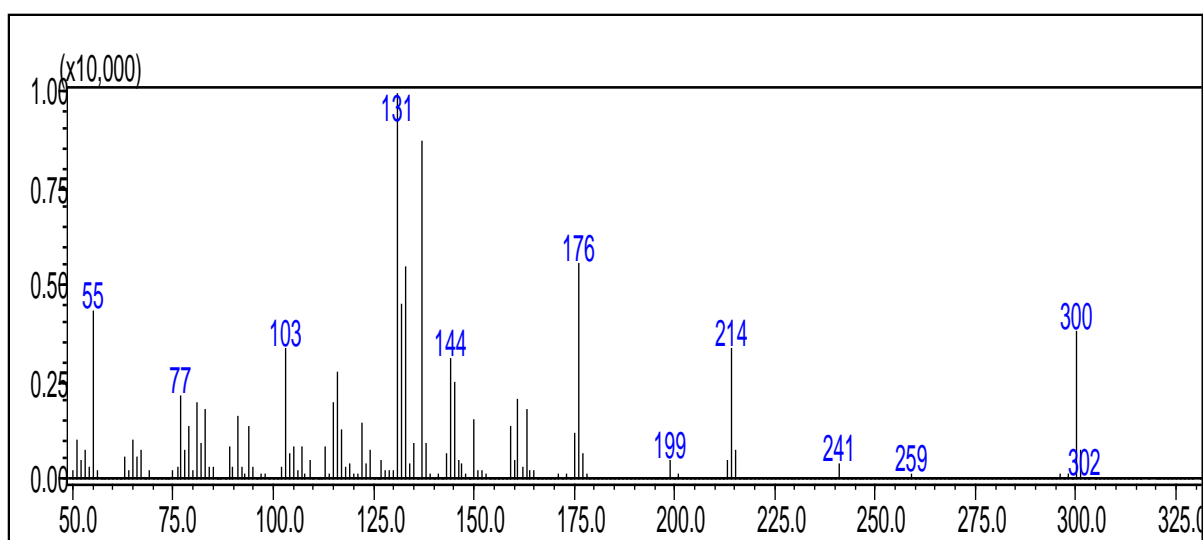


Figura 4.5. Espectro de massas (EM) do produto da reação de metátese de EUG catalisado por G1. Condições reacionais: razão Ru:substrato de 1:1 mol, 50° C por 48 h.

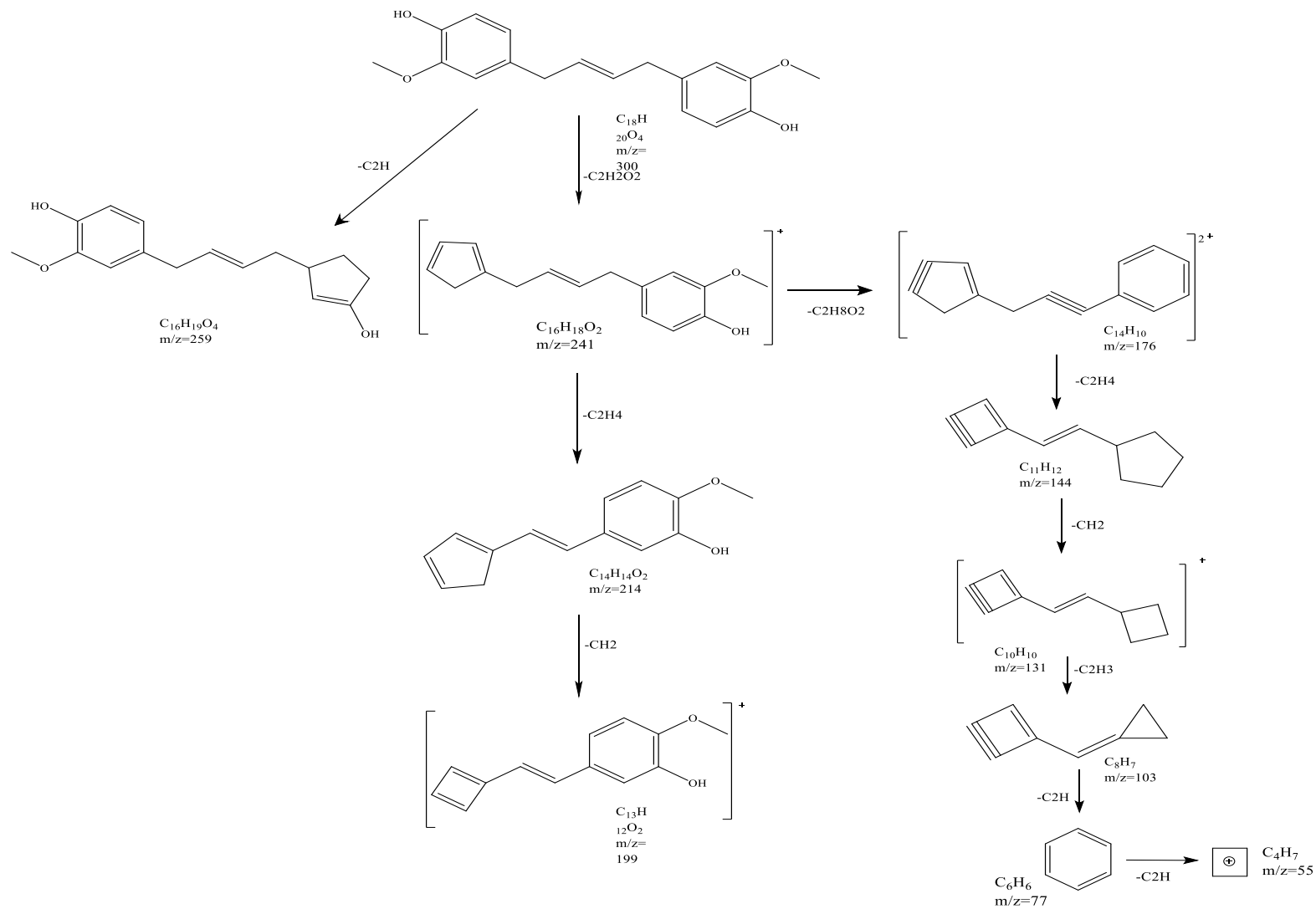


Figura 4.6. Proposta de fragmentação do produto de metátese: (E)-4,4'-(but-2-ene-1,4-diyl)bis(2-methoxyphenol).

De fato, a coordenação da piperina ao centro metálico de Ru ocorreu, uma vez que observou-se a formação de iso-piperina (Figura 4.1C,4.1D). É provável que a coordenação tenha formado uma espécie inerte, incapaz estericamente de promover a formação do ciclometalobutano; intermediário dos processos de metátese.

A principal proposta para a inércia de moléculas como a piperina, que possuem mais de uma ligação dupla olefínica, ou mesmo heteroátomos como oxigênio com hibridação sp^2 é a coordenação dupla [91,96] (Figura 4.7). O efeito quelante estabiliza o complexo, dificultando a mobilidade necessária para formação dos intermediários reacionais. Com o acetato cinâmico, a coordenação dupla do oxigênio e da ligação dupla olefínica também dificultaram o processo de metátese [91]. Outro exemplo foi a observação da coordenação dupla das duas ligações duplas olefínicas do norbornadieno nas reações de polimerização via metátese, comparando com o similar norborneno, com apenas uma ligação dupla olefínica, há uma diminuição do rendimento de polimerização [96].

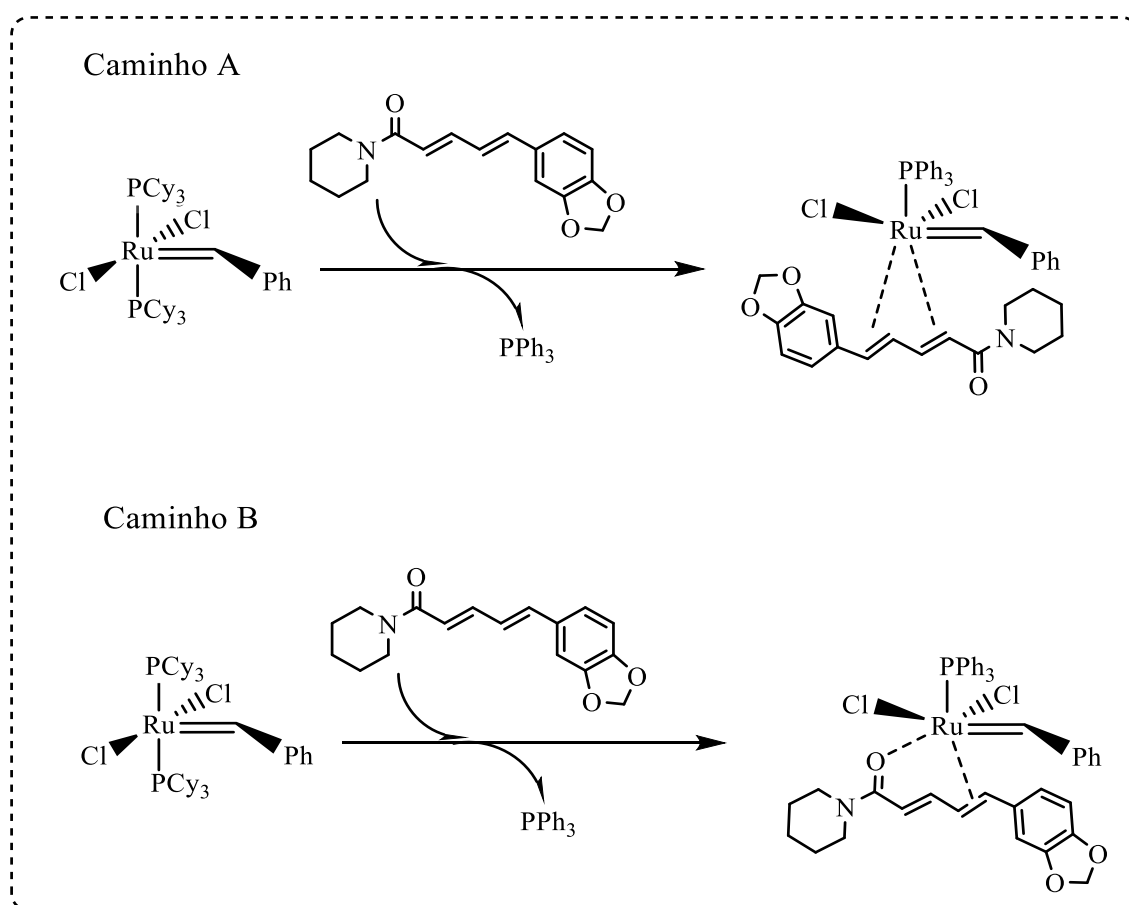


Figura 4.7. Mecanismo de formação da espécie inerte, incapaz estericamente de promover a formação do ciclometalobutano

4.2 Teste para Detecção de Tumores Epiteliais (ETT)

A toxicidade, o efeito carcinogênico e anticarcinogênico da piperina (PIP) e do eugenol (EUG) foram avaliados neste estudo por meio do Teste de Tumor Epitelial (*Epithelial Tumor Test - ETT*) em *D. melanogaster* submetidas à tratamento crônico em diferentes concentrações (60, 120, 180 e 360 mg/Kg de purê), via exposição oral e tópica, individualmente ou em associação com os controles agentes cancerígenos.

No ensaio de toxicidade, a partir da descendência gerada no cruzamento *mwh* x *wts*, não foram observadas diferenças nas taxas de sobrevivência entre as larvas tratadas com piperina (PIP) nas diferentes concentrações e o controle negativo (CN1 - Tween 20 – 2%). Desta forma, a PIP quando administrada isoladamente não afetou o processo de metamorfose e conseqüente a formação de indivíduos adultos de *D. melanogaster*. No entanto, a combinação PIP + CP1 (MMS) foi tóxica nas concentrações 180 e 360 mg/Kg de purê, uma vez que as taxas de sobrevivência nesses tratamentos foram 76,1 e 77,7%, inferiores ao CP1 (92,9%) quando administrado isoladamente (Tabela 4.4).

Tabela 4.4 Taxas de sobrevivência de *D. melanogaster* no Teste de Tumor Epitelial (ETT) após exposição a diferentes concentrações de piperina (PIP) e eugenol (EUG) individualmente ou em associação com os controles positivos, CP1 - Metanossulfonato de Metila (MMS-3mM) e CP2 - doxorubicina (DXR - 0,125mg/mL), respectivamente e controle negativo Tween 20 - 2% e óleo de soja

	Tratamento	PIP	EUG
Ensaio	Controle negativo	78,9	100
	Controle positivo	92,9	92,1
Carcinogênico	60 mg/ Kg	85,3	64,0*
	120 mg/ Kg	85,1	42,7*
	180 mg/ Kg	100*	68,7*
	360 mg/ Kg	71,6	45,5*
Anticarcinogênico	60 mg/ Kg	81,5	53,4 [#]
	120 mg/ Kg	82,7	75,8
	180 mg/ Kg	76,1 [#]	57,3 [#]
	360 mg/ Kg	77,7 [#]	65,7 [#]

*, # Valores significativos pelo teste de qui-quadrado quando comparados aos controles negativo e positivo, respectivamente.

A baixa toxicidade da piperina ou ausência de toxicidade foi demonstrada em estudos *in vitro* em células ovarianas de hamster chinês e descobriram que a piperina não é genotóxica [96] em estudos *in vivo*, Sunila; Kuttan, (2004) observaram aumento significativo na taxa de

sobrevivência de 58,8% em camundongos com carcinoma ascítico de Ehrlich (EAC) tratados com PIP na concentração de 1,14 mg/dose/animal [97]. Também em camundongos, Dogra et al., (2004) demonstraram que a PIP na dose 1,12 mg/kg do animal pode ser considerada uma dose imunologicamente segura de nenhum nível de efeito adverso observado [98].

Já a toxicidade do eugenol (EUG) foi evidenciada pela diminuição da taxa de sobrevivência em *D. melanogaster*. O número de larvas que completaram o ciclo foi inferior a 70% em todos os tratamentos. As combinações EUG + CP2 (DXR) também foram tóxicas, com exceção da concentração 120 mg/Kg de purê. Atividade inseticida já foi relatada em estudos com besouros (*Acanthoscelides obtectus*) em contato direto com o EUG [99] e em moscas brancas (*Bemisia tabaci*) expostas ao vapor do óleo [100]. Essa atividade inseticida tem atraído atenção para o uso do EUG no controle de pragas na agricultura [101, 102], o que reforça a necessidade de avaliação dos efeitos tóxicos deste óleo sobre organismos não-alvos.

A toxicidade do EUG também foi relatada em outros organismos tais como: microcrustáceo (*Daphnia magna*), bactéria (*Aliivibrio fischeri*), alga (*Desmodesmus subspicatus*) [103] e ratas Wistar prenhes [104]. Todos esses achados corroboram com o presente estudo sobre a toxidade do EUG, e o estresse oxidativo oriundo a partir da via de metabolização do EUG resultando em compostos citotóxicos é apontado como a causa da toxidade desse composto [104].

No entanto, estudo *in silico* sobre a toxidade do eugenol utilizando o software GUSAR demonstrou que nas vias de administração intravenosa, oral e subcutânea o eugenol foi indicado como pouco tóxico, já na via intraperitoneal como atóxico, levantando questionamentos não explicados sobre a toxidade dessa substância [105].

Uma vez realizada a separação dos indivíduos adultos de acordo com o fenótipo dos pelos em longos e finos (portadores do gene *wts*) ou curtos e grossos procedeu-se com a avaliação da ocorrência de tumores (verrugas-*warts*), sendo os indivíduos de pelos curtos e grosso descartados e apenas portadores do marcador *wts* avaliados. No total, foram analisadas 200 moscas adultas para o tratamento carcinogênico e 180 para o tratamento anticarcinogênico.

A frequência total de tumores observada nos descendentes heterozigotos marcados (MH) tratados com PIP isoladamente nas concentrações de 180 e 360 mg/kg de purê de batata foram maiores quando comparadas a frequência observada no CN1 (Tabela 4.5). Assim, os resultados indicam potencial carcinogênico da PIP nessas duas concentrações em *D. melanogaster*.

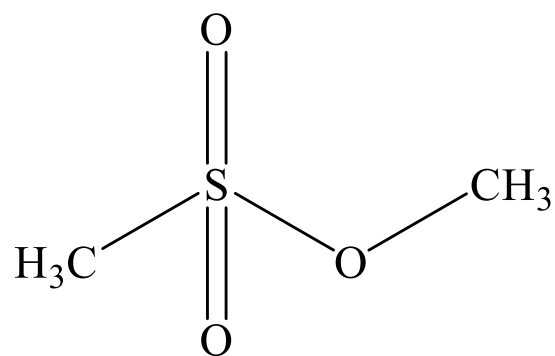
Tabela 4.5. Frequência de clones de tumores com o Teste de Tumor Epitelial (ETT) em *D. melanogaster* para o gene supressor de tumor *wts* tratadas com piperina (PIP) isolada ou em associação com o metanossulfonato de metila (MMS 3mM)

Tratamentos		Números de moscas analisadas	Número de tumores analisados							Total	Frequência (nº de tumores/moscas)
MMS (mg/mL)	PIP (µg/mL)		Olho	Cabeça	Asa	Corpo	Perna	Halteres			
0	0	200	0	0	1	1	0	0	2	0,010	
0	60	200	0	0	3	2	0	0	5	0,025	
0	120	200	0	1	0	3	0	0	4	0,020	
0	180	200	0	3	3	3	1	0	10	0,050*	
0	360	200	0	0	3	7	1	0	11	0,055*	
3	0	180	0	0	14	8	1	1	24	0,133*	
3	60	180	0	0	3	7	1	0	11	0,061#	
3	120	180	0	0	6	2	0	1	9	0,050#	
3	180	180	0	0	2	5	0	0	7	0,039#	
3	360	180	0	0	4	7	1	1	13	0,072	

Diagnóstico estatístico por meio do teste de qui-quadrado para amostras independentes. Nível de significância $p=0,05$. *Valores considerados diferentes do controle negativo e #valores considerados diferentes do controle positivo.

Em células somáticas de *Allium cepa* a PIP nas concentrações 50, 100 e 200µM bloqueou o progresso do ciclo celular ainda em prófase, o que reduziu significativamente o índice mitótico nas células avaliadas [106]. No entanto, no presente estudo, observou-se a indução da proliferação celular na forma de verrugas, que no ETT, é controlada pela presença do gene *wts*, um gene supressor de tumor, onde as mutações pontuais nesse gene podem levar a perda de função e conseqüentemente a proliferação celular na forma de tumores [23]. A perda do gene *wts* por mutação induzida pela PIP é reforçada ainda pelas observações de Dias et al. (2021) que também relataram a ocorrência de micronúcleos e brotos nucleares em *A. cepa* aos quais foram relacionados a um efeito genotóxico da PIP.

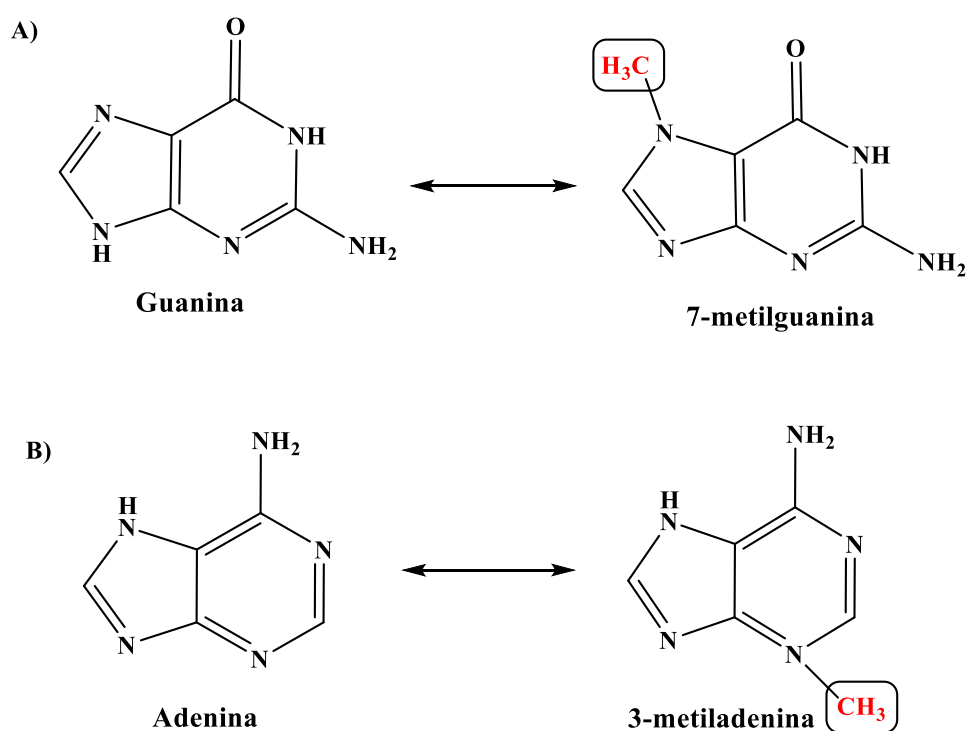
O agente indutor de danos utilizado no experimento de anticarcinogênese para avaliar o potencial da PIP foi o metanossulfonato de metila (CP1 - MMS - 3mM) (Figura 4.8). O número de tumores induzidos pelo MMS foi maior que o número de tumores no CN1 demonstrando que, além do potencial mutagênico já bem descrito do MMS em ensaios de genotoxicidade [107] e mutagenicidade [108] o mesmo pode ser usado também em ensaios como indutor de tumores em *D. melanogaster* [23,109].



Metanossulfonato de metila

Figura 4.8. Estrutura química do metanossulfonato de metila.

O MMS é um agente alquilante, que transfere grupos alquil para moléculas biológicas como o DNA, bastante conhecido por suas propriedades neoplásicas, carcinogênicas e mutagênicas, que atua no DNA por meio da metilação, transformando as bases guanina em 7-metilguanina e adenina para 3-metiladenina [110], causando, respectivamente, o pareamento incorreto de bases e bloqueio dos blocos de replicação [111] (Figura 4.9).

**Figura 4.9.** (A) Metilação da base guanina a partir do MMS; (B) Metilação da base adenina a partir do MMS (adaptado de [112]).

Naturalmente, a 7-metilguanina não possui quaisquer propriedades mutagênicas ou citotóxicas, mas é propensa à depuração espontânea para formar um localapurínico que é tóxico e mutagênico. Em contrapartida, a lesão causada por 3-metiladenina é altamente citotóxica, pois pode bloquear a maioria das DNA polimerases e, dessa forma, inibir a síntese de DNA [113].

Nas moscas tratadas com PIP nas concentrações de 60, 120 e 180 mg/kg de purê de batata em associação com o MMS observou-se redução na frequência de tumores quando comparadas com o CP1 (Tabela 4.5). Nessas concentrações a PIP modulou a atividade carcinogênica do MMS, diminuindo o número de tumores de forma concentração-dependente.

A modulação da PIP aos danos induzidos pelo MMS ao DNA também foi estudada em modelo vegetal por Dias *et al.* (2021), no entanto, os autores não observaram qualquer efeito indutor ou inibidor da piperina sobre a citotoxicidade do MMS seja nos protocolos de pré, simultâneo ou pós-tratamento. A diminuição no número de alterações cromossômicas observada em *A. cepa* foi atribuída ao efeito citotóxico apresentado pela PIP, também avaliado no estudo, e não a um possível efeito protetor.

Já no presente estudo, a redução significativa no número total de tumores nas concentrações de 60, 120 e 180 mg/kg de PIP em associação com MMS utilizando bioensaio ETT em *D. melanogaster* pode ser atribuída a um efeito protetor da PIP em co-tratamento com o MMS. Como o MMS não requer ativação metabólica, a PIP pode interagir diretamente com os grupos radicais metila do MMS e inativá-los por reação química [108]. Esses dados corroboram com as observações de Selvendiran *et al.* (2004) que demonstraram potencial efeito protetor da piperina contra a carcinogênese induzida por químicos e aflotoxina B1 em ratos [114].

Em camundongos fêmeas transplantadas com Sarcoma 180 a PIP inibiu o desenvolvimento do tumor sólido em até 56% após 7 dias de tratamento, no entanto a atividade antitumoral foi relacionada a efeitos tóxicos no fígado e nos rins, embora esses sejam reversíveis [70].

Lai *et al.* (2012) avaliaram o efeito da PIP no crescimento tumoral e metástase de carcinoma mamário de camundongo 4T1 altamente maligno *in vivo* e *in vitro* utilizando o ensaio de redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) e verificaram que a PIP pode inibir o crescimento do tumor induzindo a apoptose celular e o bloqueio do ciclo celular em G2/M. Também pode suprimir o crescimento do tumor 4T1 e metástases *in vivo* [71].

O potencial citotóxico e apoptótico da PIP também foi relatado em células A549 de câncer de pulmão humano, um dos tipos de câncer mais recorrentes, contou-se que a PIP pode induzir a parada do ciclo celular mediada pela proteína p53, através da ativação das cascatas das caspase-3 e caspase-9 e consequente indução de apoptose [72].

As frequências de tumores encontrados nos diferentes segmentos do corpo das *D. melanogaster* tratadas com concentrações isoladas de EUG (120, 180 e 360 mg/kg) foram maiores quando comparadas a frequência observada no CN2 evidenciando a presença de efeito carcinogênico nessas concentrações (Tabela 4.6).

Tabela 4.6. Frequência de clones de tumores com o Teste de Tumor Epitelial (ETT) em *D. melanogaster* para o gene supressor de tumor *wts* tratadas com eugenol (EUG) isolado ou em associação com a Doxorrubicina (DXR 0,125 mg/mL) e o óleo de soja como controle negativo

Tratamentos		Números de moscas analisadas	Número de tumores analisados							Frequência (nº de tumores/moscas)
DXR (0,125 mg/mL)	EUG (µg/mL)		Olho	Cabeça	Asa	Corpo	Perna	Halteres	Total	
0	0	200	0	0	0	17	0	0	17	0,09
0	60	200	0	0	3	15	0	3	21	0,11
0	120	200	0	3	3	47	6	0	59	0,30*
0	180	200	0	2	3	27	7	0	39	0,20*
0	360	200	2	0	4	29	0	0	35	0,18*
0,125	0	200	10	3	5	60	4	13	95	0,48*
0,125	60	200	0	4	0	26	1	0	31	0,16#
0,125	120	200	0	0	2	30	0	0	32	0,16#
0,125	180	200	0	1	2	24	0	0	27	0,14#
0,125	360	200	0	1	5	20	1	1	28	0,14#

Diagnóstico estatístico por meio do teste de qui-quadrado para amostras independentes. Nível de significância $p=0,05$. *Valores considerados diferentes do controle negativo e #valores considerados diferentes do controle positivo.

Duas vias de metabolização do eugenol são conhecidas: epoxidação e hidroxilação, a primeira leva a formação do composto 2,3-epoxyeugenol, uma substância caracterizada pela ação mutagênica *in vitro* e como composto carcinogênico *in vivo* [115]. A segunda rota leva ao metabólito 1-hidroxyeugenol, rapidamente transformado em meteto de quinona (MQ) via reação de desidratação mediada pelo citocromo P450. O 1-hidroxyeugenol caracteriza-se como pro-oxidante capaz de induz danos ao DNA por meio da quebra de fitas simples [116].

Em *D. melanogaster* usando o SMART não foi observada ação mutagênica ou recombinação mitótica em cruzamento padrão (ST), no entanto esses danos foram observados em cruzamento de alta bioativação (HB), caracterizando um efeito indireto do EUG nesses organismos [117]. A diferença entre os dois cruzamentos está relacionada com a quantidade

de enzimas metabólicas do complexo CYP450 presentes nos descendentes ST em nível basal e no HB em nível elevado, o que reflete o alto nível de metabolização nesses últimos [118]. O complexo CYP450 é formado por uma família de enzimas cuja principal função é a transformação de substâncias tóxicas em menos tóxicas, com o objetivo de dificultar sua absorção e facilitar sua eliminação do organismo a partir de reações de biotransformação. Porém, esse processo de biotransformação de xenobióticos (agrotóxicos, medicamentos e produtos quimicamente industrializados, aditivos alimentares, poluentes ambientais) e algumas drogas pode ter efeito contrário, alguns metabólitos podem não serem inativados e assim apresentar atividade aumentada ou propriedades tóxicas, incluindo mutagenicidade, teratogenicidade e carcinogenicidade [119].

Ressalta-se que as linhagens utilizadas no ETT neste estudo apresentam níveis basais do complexo CYP450 o que evidencia uma atividade carcinogênica direta do EUG em *D. melanogaster*, além das atividades mutagênicas e carcinogênicas indiretas já relatadas [115-117].

O agente indutor de danos utilizado no experimento de anticarcinogênese para avaliar o potencial do EUG foi a doxorubicina (CP2 - DXR – 0,4mM) (Figura 4.10). O número de tumores induzidos pela DXR foi maior que o número de tumores no CN2 demonstrando que, além do potencial mutagênico já bem descrito da DXR no *Somatic Mutation and Recombination Test* (SMART) a mesma pode ser usada também no ETT como indutor de tumores em *D. melanogaster* [120,121].

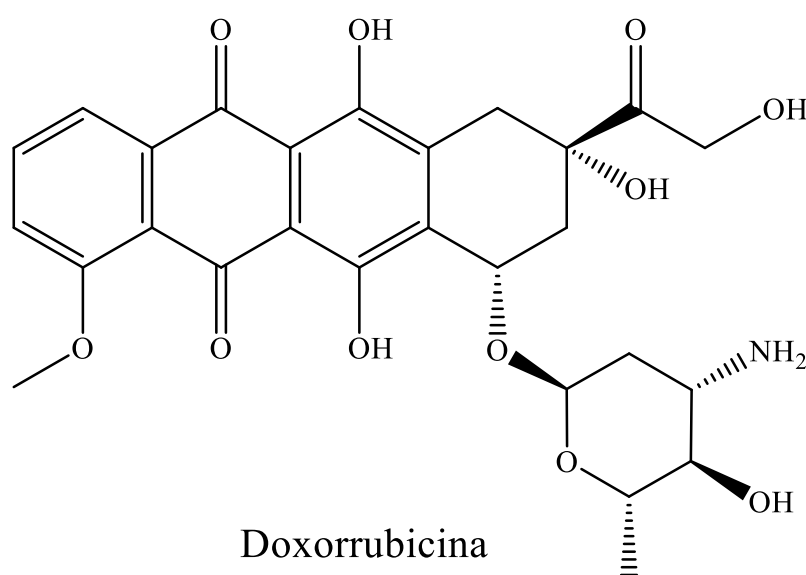


Figura 4.10. Estrutura química da doxorubicina.

A DXR é uma eficiente droga quimioterápica amplamente utilizada no tratamento de algumas doenças oncológicas, como sarcomas, leucemia, pulmão e câncer de mama e doenças hematológicas [122]. A DXR intercala com pares de base de hélices de DNA inibindo a replicação do DNA ao afetar a topoisomerase II [123]. Graças a seu grupo quinona, a DXR também gera radicais livres em tecidos normais e malignos. Para isso, reage com a citocromo P450 redutase na presença de NADPH, formando intermediários de radicais semiquinonas. Estes, por sua vez, reagem com o oxigênio catabolizado pelo ferro, produzindo radicais de ânion superóxido, que gera peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila, ambos são tóxicos para as células [124,125].

Contudo, os resultados dos indivíduos tratados com concentrações de EUG (60, 120, 180 e 360 mg/kg) associadas a DXR apresentaram redução na frequência de tumores quando comparados com os indivíduos tratados apenas com a DXR (CP2) (tabela 4.6).

O potencial quimiopreventivo do eugenol também foi observado *in vitro* em células MCF-7, nas quais o dano ao DNA foi induzido pelo 7,12-dimetilbenz[*a*] antraceno (DMBA). O eugenol inibiu a formação do aduto DMBA-DNA através da forte inibição da atividade das proteínas que catalisam a biotransformação do DMBA (CYP1A1 e CYP1B1) levando a diminuição da ativação do receptor de hidrocarboneto de arila e da ligação ao DNA. O eugenol também inibiu a indução de CYP1A pelo DMBA e aumentou a expressão e atividade da enzima NADPH, que é importante como desintoxicante para DMBA, sendo assim, considerado como um potente quimiopreventivo contra a genotoxicidade através da supressão da ativação do DMBA e da indução de sua desintoxicação [126].

A associação do eugenol com o agente quimioterápico gencitabina, no ensaio MTT em células HeLa, indicou que o eugenol quando testado isoladamente não apresentou efeito citotóxico. E quando em associação com a gencitabina estes induziram a diminuição significativa da viabilidade celular, os resultados indicam que o eugenol exerceu suas atividades via indução do apoptose e das propriedades anti-inflamatórias pela regulação negativa de Bcl-2, COX-2 e IL-1 β [127].

A ação antioxidante do eugenol já é amplamente conhecida e relatada na literatura [128-130]. Estudos de cálculos computacionais e teóricos sobre a estrutura geométricas e eletrônicas do eugenol relataram que ele pode retardar a formação de células cancerígenas ao impedir a deterioração dos radicais livres quando é dissolvido no sangue e interagir com outras moléculas [131]. Estudos complementares apontam que os mecanismos atuantes do eugenol contra células cancerígenas estão na ação de prevenção exercida pelo efeito antioxidante e na morte das células cancerígenas induzidas pelo efeito pró-oxidante [132].

Estudos *in silico* sobre a anticarcinogenicidade do eugenol, obtiveram como resultado diversas atividades biológicas positivas com probabilidade de atividade superior a 0,700 (parâmetro utilizado no *software* PASS) indicando o efeito antimutagênico, estimulante da caspase, tratamento pré neoplásico e agonista do apoptose [105].

Comparando o desempenho das duas drogas utilizadas como agente indutores de tumores nesse estudo, o MMS e a DXR, observou-se que a frequência de tumores induzidos pela DXR (0,48%) foi maior que a frequência induzida pelo MMS (0,13%) no ETT com *D. melanogaster*, esse resultado foi importante para subsidiar tomadas de decisão frente a novos estudos que serão realizados futuramente no Laboratório de Genética da UESPI.

Em ambos os ensaios realizados neste estudo, a maioria dos tumores observados estão concentrados no corpo e nas asas das *D. melanogaster*, sendo que foi possível observar que as moscas geralmente possuíam de 1 a 3 tumores por apêndice. A distribuição de tumores pelo corpo é função da quantidade de células presentes nesses apêndices, visto que a chance da perda de heterozigose do gene *warts* é maior em locais com maior número de células, o que justifica a prevalência de tumores nessas regiões específicas do corpo das moscas [82].

Ademais, a conservação evolutiva de genes supressores de tumor entre *D. melanogaster* e mamíferos tem estimulado mais pesquisas na indução e desenvolvimento de tumores em *Drosophila*, sendo que estes estudos podem contribuir diretamente para o entendimento do câncer em seres humanos, uma vez que numerosos proto-oncogenes e supressores de tumores em mamíferos são bastante conhecidos em *D. melanogaster*. As células dos discos imaginais se desenvolvem formando estruturas da epiderme da mosca adulta, sendo que estas células possuem o controle do ciclo celular similares as células somáticas de mamíferos [85].

Assim, os resultados desse estudo reforçam a interação da PIP com o MMS, modulando o efeito carcinogênico deste, além disso, demonstraram importante atividade quimioprotetora nas duas menores concentrações (60 e 120 mg/kg de purê). Enquanto o EUG, embora não tenha apresentado efeito protetor, visto que foi tóxico em todas as concentrações e carcinogênico para 120, 180 e 360 mg/Kg de purê, demonstrou forte ação moduladora inibindo o efeito carcinogênico da DXR quando em associação em todas as concentrações testadas.

Capítulo 5

CONSIDERAÇÕES FINAIS

No estudo proposto, a metátese cruzada da PIP e EUG não aconteceu nas condições reacionais propostas, o que foi atribuído ao efeito quelante da coordenação dupla da piperina. O catalisador de Grubbs (G1) foi ativo para a metátese do eugenol e inativo para a metátese da piperina. O G1 apresentou preferência pela ligação dupla terminal, praticamente sem impedimento estérico, presente na molécula do eugenol e não foi capaz de promover a metátese da piperina, mesmo tendo ocorrido a coordenação da piperina ao centro metálico de Ru do catalisador, fato confirmado pela observação do isômero da piperina. Processos de isomerização também foram observados para o eugenol, reforçando a ação catalisadora de G1 para esse tipo de reação.

A utilização de *D. melanogaster* como organismo teste para avaliação dos efeitos carcinogênicos e anticarcinogênicos da PIP e do EUG, através do Teste de Tumor Epitelial (ETT), permitiu verificar que a PIP, embora não tenha sido tóxica para esses organismos, foi carcinogênica nas concentrações de 180 e 360 mg/kg de purê de batata, enquanto o EUG apresentou potencial tóxico para esses organismos em todas as concentrações e carcinogênico nas concentrações 60, 120, 180 e 360 mg/kg de purê.

A PIP demonstrou efeito modulador inibitório dose-dependente, nas concentrações 60, 120 e 180 mg/kg de purê, sobre a atividade carcinogênica do MMS (3mM) quando administrada em co-tratamento, desta forma, pode-se dizer que efeito protetor foi observado apenas nas concentrações de PIP 60 e 120 mg/kg de purê de batata, sendo essas consideradas promissoras para estudos futuros com vistas ao tratamento de neoplasias. O EUG apresentou potente efeito modulador inibitório da atividade carcinogênica da DXR em todas as concentrações testadas, no entanto, não podemos dizer que efeito protetor foi observado, visto que o EUG foi considerado tóxico e carcinogênico.

Os resultados deste estudo nortearão pesquisas futuras na área de síntese orgânica e carcinogênese com vistas a obtenção de novos compostos e a investigação do potencial biológicos desses.

REFERÊNCIAS

1. BONTEMPO, M. **Pimenta e seus benefícios à saúde**. São Paulo: Alaúde Editorial, 2007.
2. PASQUALI, G. A. M.; PIMENTA, G. E. M. Aditivos fitogênicos: uma alternativa ao uso de antibióticos promotores de crescimento na alimentação de aves. **Enciclopédia Biosfera**, v.10, n.18; p.148, 2014.
3. AGUIAR, C. P. O.; LOPES, D. C. F.; BORGES, R. S. Influence of piperidine ring on stability and reactivity of piperine. **Chemical Data Collections**, v. 17, n. 18, p. 138–142, 2018.
4. QUIJIA, C. R.; CHORILLI, M. Characteristics, Biological Properties and Analytical Methods of Piperine: A Review. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 50, n. 1, p. 62–77, 2020.
5. HUA, S. et al. Piperine as a neuroprotective functional component in rats with cerebral ischemic injury. **Food Science and Nutrition**, v. 7, n. 11, p. 3443–3451, 2019.
6. PISSINATE, K. **Avaliação citotóxica de *Piper nigrum* e *Struthanthus marginatus*. Estudo preliminar da correlação entre a citotoxicidade e hidrofobicidade da piperina e derivados**. (2006) p. Dissertação de mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica – RJ.
7. FRANÇA, A. A. C. et al. Potencialidades da Piperina: um Estudo Realizado por Meio das Técnicas de Prospecção Científica e Tecnológica. **Revista Virtual de Química**, v. 13, n. 2, p. 310–322, 2021.
8. CHOI, J. W. et al. Piperine ameliorates the severity of fibrosis via inhibition of TGF- β /SMAD signaling in a mouse model of chronic pancreatitis. **Molecular Medicine Reports**, v. 20, n. 4, p. 3709–3718, 2019.
9. SHOBA, G. et al. Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. **Planta Medica**, v. 64, n. 4, p. 353–356, 1998.
10. PRASAD, B.; JABEEN, A.; PARWEEN, N. Eugenol - A Review of a versatile molecule with remarkable pharmacological properties. **Journal of Advanced Scientific Research**, v. 2, n. 2, p. 8–12, 2021.
11. KHALIL, A. A. et al. Essential oil eugenol: Sources, extraction techniques and nutraceutical perspectives. **Royal Society of Chemistry Advances**, v. 7, n. 52, p. 32669–32681, 2017.

12. NEJAD, S. M.; OZGUNES, H.; BASARAN, N. Pharmacological and Toxicological Properties of Eugenol. **Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences.**, v.4, p. 201-206, 2017.
13. VIDAL, L. V. O. et al. Eugenol como anestésico para a tilápia-do-nilo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 8, p. 1069–1074, 2008.
14. BENDRE, S. R. et al. Outlooks on Medicinal Properties of Eugenol and its Synthetic Derivatives. **Natural Products Chemistry & Research**, v. 04, n. 03, 2016.
15. MORAIS, I.C. et al. 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.
16. 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.
17. GRUBBS, R. H. Olefin metathesis. **Tetrahedron**, v. 60, p. 7117-7140, 2004.
18. 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.
19. LIMA, D. C. S. **Avaliação do potencial Genotóxico da Chalcona (E)-1-(2'-Hidroxifenil)-3-(4-metilfenil)-prop-2-en-1-ona) em bactérias, *Drosophila melanogaster* e camundongos**. 2017. 110 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Instituto de Ciências Biológica da Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
20. ROCHA, L. D. L. S. et al. *Drosophila*: um importante modelo biológico para a pesquisa e o ensino de Genética. **Scire Salutis**, v.3, n.1, p.37-48, 2013.
21. NASSIRI-ASL, M.; HOSSEINZADEH, H. Review of the pharmacological effects of *Vitis vinifera* (grape) and its bioactive constituents: an update. **Phytotherapy Research**. v. 30, n. 9, p. 1392-1403, 2016.
22. SIDOROV R.A.; UGNIVENKO E.G.; KHOVANOVA E.M.; BELITSKY G.A. Induction of tumor clones in *Drosophila melanogaster* *wts/wts*+ heterozygotes with chemical carcinogenes. **Mutation Research**, n. 498, p.181-191, 2001.
23. NEPOMUCENO, J. C. Using the *Drosophila melanogaster* to Assessment Carcinogenic Agents through the Test for Detection of Epithelial Tumor Clones (*Warts*). **Advanced Techniques in Biology & Medicine**, v. 3, n. 149, 2015.
24. BERNADO-GUSMÃO, K.; PERGHER, S. B. C.; SANTOS, E. N. DOS. Um panorama da catálise no Brasil nos últimos 40 anos. **Química Nova**, v. 40, n. 6, p. 650–655, 2017.
25. PATRA, S. G.; DAS, N. K. Recent advancement on the mechanism of olefin metathesis by Grubb's catalysts: A computational perspective. **Polyhedron**, v. 200, 2021.
26. SANTOS, A. G. **Produtos da química fina através da metátese de propenilbenzenos de origem vegetal empregando catalisadores Rutênio-Alquilideno**. 2017. Tese

(Doutorado em Ciências - Química) – Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

27. CARVALHAIS, P. L. E. **Solventes bio-renováveis para metátese de propenilbenzenos**. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências - Química) – Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
28. CALDERON, N. The olefin metathesis reaction. **Accounts of Chemical Research**, v. 5, n. c, p. 913–964, 1972.
29. CeGuo et al. Self-metathesis of 1-butene to ethene and hexene over molybdenum-based heterogeneous catalysts. **Chinese Journal of Catalysis**, v.39, p.37-46, 2018.
30. FREDERICO, D.; BROCKSON, U.; BROCKSON, T. J. A reação de metátese de olefinas: reorganização e ciclização de compostos orgânicos. **Química Nova**, vol. 28. 692-702, 2005.
31. BUFFON, R. Catálise por Compostos de Coordenação. **ChemKeys**, Universidade Estadual de Campinas, 2002.
32. 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.
33. CHEN, Y.; ABDELLATIF, M. M.; NOMUR, K. Olefin metathesis polymerization: Some recent developments in the precise polymerizations for synthesis of advanced materials (by ROMP, ADMET). **Tetrahedron**, v.74, p. 619-643, 2018
34. MOL, J. C. Industrial applications of olefin metathesis. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 213, n.1, p. 39–45, 2004.
35. GRANATO, A. V. **Alil-aromáticos como matéria prima renovável para produção de Arilbutenoatos via metátese cruzada de olefinas**. 2014. 117p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte.
36. SOUSA, D. A. **Influência da adição de CuCl₂ e SnCl₂ na relação metátese de olefinas vs isomerização do metil-eugenol usando complexo de Ru do tipo Grubbs Segunda Geração como catalisador**. 2018. 64p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual do Piauí. Teresina.
37. BILEL, H. et al. Cross-metathesis transformations of terpenoids in dialkyl carbonate solvents. **Green Chemistry**, v. 13, n. 6, p. 1448–1452, 2011.
38. FERNANDES, L. S. et al. Functionalization of (-)-β-pinene and (-)-limonene via cross metathesis with symmetrical internal olefins. **Catalysis Communications**, v. 135, p. 105893, 2020.
39. FERNANDES, L. S. et al. Cross metathesis of (-)-β-pinene, (-)-limonene and terpenoids derived from limonene with internal olefins. **Applied Catalysis A: General**, v. 623, 2021.

40. PAN, C.; LIU, P. Amphiphilic polymer-grafted palygorskite nanorods via surface olefin cross-metathesis for versatile applications. **Applied Clay Science**, v. 200, p. 105889, 2021.
41. FERREIRA, L. A. et al. Spicing up olefin cross metathesis with the renewables estragole and methyl sorbate. **Applied Catalysis A: General**, v. 620, p. 118173, 2021.
42. ZUCCA, P.; LITTARRU, M.; RESCIGNO, A.; SANJUST, E. Cofactor recycling for selective enzymatic biotransformation of cinnamaldehyde to cinnamyl alcohol. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**. v.73, n. 5, p. 1224–6, 2009
43. VIEIRA, V.B. **Impedimento estérico de ligantes ancilares em complexos a base de Ru aplicados em metátese do álcool e acetato cinâmílicos**. 2019. 53 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual do Piauí. Teresina.
44. FONSECA, L.R. et al. Self-Metathesis of 10-Undecen-1-ol with Ru-Amine-Based Complex for Preparing the Soft Segment and Chain Extender of Novel Castor Oil-Based Polyurethanes. **Macromolecular Symposia**. v.368, p. 30–39, 2016
45. GONZALEZ-DE-CASTRO, A. et al. Long-chain α - ω Diols from renewable fatty acids via tandem olefin metathesis-ester hydrogenation. **Green Chemistry**, v. 19, n. 7, p. 1678–1684, 2017.
46. ZELIN, J.; TRASARTI, A. F.; APESTEGUÍA, C. R. Self-metathesis of methyl oleate on silica-supported Hoveyda-Grubbs catalysts. **Catalysis Communications**, v. 42, p. 84–88, 2013.
47. HUANG, S. et al. Effect of Reaction Temperature and Pressure on the Metathesis Reaction between Ethene and 2-Butene to Propene on the $W_0_3/A_1_2O_3$ -HY Catalyst. **Journal of Natural Gas Chemistry**, v.15, p.93–96, 2006.
48. HUANG, S. J. et al. The influence of preparation procedures and tungsten loading on the metathesis activity of ethene and 2-butene over supported WO_3 catalysts. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v.267, p.224–233, 2007.
49. MAZOYER, E. et al. Study of ethylene/2-butene cross-metathesis over W-H/ Al_2O_3 for propylene production: Effect of the temperature and reactant ratios on the productivity and deactivation. **Journal of Catalysis**. v.301, p.1–7, 2013.
50. LI, S.; BOUZIDI, L.; NARINE, S. S. Polyols from self-metathesis-generated oligomers of soybean oil and their polyurethane foams. **European Polymer Journal**, v. 93, p. 232–245, 2017.
51. NICOLAOU, K. C.; BULGER, P. G.; SARLAH, D. Metathesis reactions in total synthesis. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 44, n. 29, p. 4490–4527, 2005.
52. NIENALTOWSKI, T. et al. 4-Methyltetrahydropyran as a Convenient Alternative Solvent for Olefin Metathesis Reaction: Model Studies and Medicinal Chemistry Applications. **American Chemical Society Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 8, n. 49, p. 18215–18223, 2020.

53. BAIBICH, I. M.; GREGÓRIO, J. R. Metátese Catalítica de Olefinas. **Química Nova**, v. 16, n. 2, p. 120–129, 1993.
54. IVIN, K. J.; MOL, J. C.; Olefin metathesis and metathesis polymerization. **Academic Press: New York**, 1997.
55. SCHROCK, R. R.; Recent advances in olefin metathesis by molybdenum and tungsten imido alkylidene complexes. **Journal of Molecular Catalysis. A: Chemical**; v.21, p.213, 2004.
56. NOVAK, B. M.; GRUBBS, R. H. J. The ring opening metathesis polymerization of 7-oxabicyclo[2.2.1]hept-5-ene derivatives: a new acyclic polymeric ionophore. **Journal of the American Chemical Society**. v.110, p.960, 1988.
57. BIELAWSKI, C. W.; GRUBBS, R. H. Living ring-opening metathesis polymerization **Progress in Polymer Science**, v. 32, 2007.
58. SCHROCK, J. J. et al. Synthesis of molybdenum imido alkylidene complexes and some reactions involving acyclic olefins. **Journal of the American Chemical Society**, v. 112, n. 10, p. 3875- 3886, 1990.
59. MATOS, J. M. et al. Metátese de olefinas no Brasil: “Brazil is Romping It!”. **Química Nova**, v. 30, p. 431-435, 2007.
60. ALVES, M. C. **Comparativo entre quantidade e capacidade antioxidante de pimentas orgânicas e não orgânicas**. 2015. 59f. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Química e Bacharelado em Química Industrial) Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis – IMESA, São Paulo.
61. PISSINATE, K. **Avaliação citotóxica de *Piper nigrum* e *Struthanthus marginatus*. Estudo preliminar da correlação entre a citotoxicidade e hidrofobicidade da piperina e derivados**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica – RJ, 2006.
62. MUJAMDAR. A.M. et al. Anti-inflammatory activity of piperine. **Pharmacology e toxicology section**, v.43, p. 95-100, 1990.
63. ALDALY, Z. T. K. Antimicrobial activity of piperine purified from *piper nigrum*. **Jornal of Basrah Researches**, v.36, p. 54-61, 2010.
64. NETA, M. N. S. et al. Avaliação antifúngica da piperina contra as cepas de *Candida*. **Conapesc**, 2019.
65. FILHO, C. A. **Atividade antidiabética, em modelo in vivo, da curcumina administrada em suspensão de iogurte na ausência e na presença de piperina**. (2014). 126p. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual Paulista, Araraquera – SP, 2014
66. SOLÍS, L. M. R.; SÁNCHEZ, R. A.; RESTREPO, J. Encapsulation of the Piperine Present in Piper tuberculatum Species Using Multilamellar Vesicles and Determination of its Antioxidant Power. **Faculdade de Ciências Naturais e exatas**, v. 21, p. 11, 2017.

67. BANO, G. et al. Effect of piperine on bioavailability and pharmacokinetics of propranolol and theophylline in healthy volunteers. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 41, p. 615-617, 1991.
68. VASCONCELLOS, M. L. A. A.; OLIVEIRA, R. G.; FILHO, E. B. A. A influência da piperina na biodisponibilidade de fármacos: Uma abordagem molecular. **Química. Nova**, v. 37. 2013.
69. PATEL, H. B. et al. Effect of piperine and quercetin alone or in combination with marbofloxacin on CYP3A37 and MDR1 mRNA expression levels in broiler chickens. **Research in Veterinary Science**, 2019.
70. BEZERRA, D. P. et al. In vivo growth-inhibition of Sarcoma 180 by pipartine and piperine, two alkaloid amides from piper. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, n. 6, p. 801–807, 2006.
71. LAI, L. et al. Piperine suppresses tumor growth and metastasis *in vitro* and *in vivo* in a 4T1 murine breast cancer model. **Acta farmacológica sinica**, v. 33, p. 523-530, 2012.
72. LIN, Y. et al. Piperine induces apoptosis of lung cancer A549 cells via p53-dependent mitochondrial signaling pathway. **Tumor Biology**, v. 35, n. 4, p. 3305–3310, 2014.
73. ULANOWSKA, M.; OLAS, B. Biological properties and prospects for the application of eugenol—a review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 7, 2021.
74. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemical to humans. **World Health Organization**, v. 36, França, 1985.
75. CRAVEIRO, A. A. et al. **Óleos essenciais de plantas do nordeste**. Fortaleza, CE: Edições UFC, 1981
76. ZHENG, G. Q.; KENNEY, P. M.; LAM, L. K. T. Sesquiterpenes from clove (*eugenia caryophyllata*) as potential anticarcinogenic agents. **Journal of Natural Products**, v. 55, n. 7, p. 999–1003, 1992.
77. TÜZÜN, A. et al. Castor oil-derived benzoxazines: Synthesis, self-metathesis and properties of the resulting thermosets. **European Polymer Journal**, v.75, p.56–66, 2016.
78. SCHWAB P.; GRUBBS R. H.; ZILLER J. W. Synthesis and applications of RuCl₂(CHR)(PR₃)₂: The influence of the alkylidene moiety on metathesis activity. **Journal of the American Chemical Society**, v.118, p. 100–110, 1996.
79. BRITO, J. Apresentação de Genética. 2012. Disponível em: <<https://prezi.com/vhq1i8xz0dck/apresentacao-de-genetica/>>. Acesso em: 27/11/2021.
80. POTTER, C. J.; TURENCHALK, G. S.; XU, T. *Drosophila* in cancer research, an expanding role. **Trends in Genetics**, v. 16, p 33-39, 2000.
81. ORSOLIN, P. C. **Avaliação do potencial mutagênico, recombinogênico e carcinogênico do Orlistat em células somáticas de *Drosophila melanogaster***. 2011.

75p. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) – Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia.

82. SOUSA, F. A. **Avaliação da capacidade carcinogênica do antiparasita ivermectina, pelo teste de detecção de tumor epitelial em células somáticas de *Drosophila melanogaster***. 2015. 54p. Dissertação (Mestrado em Sanidade e Produção Animal) - Universidade de Uberaba. Uberaba.
83. BIER, E. *Drosophila*, the golden bug, emerges as a tool for human genetics. **Nature Reviews Genetics**, v. 6, n.1, p.09-23, 2005.
84. SEPTEL, 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.
85. EEKEN, J. C. J.; KLINK, I.; VEEN, B. L. V.; FERRO, W. Induction of epithelial tumors in *Drosophila melanogaster* heterozygous for the tumor suppressor gene *wts*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 40, p277-282, 2002.
86. JUSTICE, R. W. et al. The *Drosophila* tumor suppressor gene *wart* encodes a homolog of human myotonic dystrophy kinase and required for the control of cell shape and proliferation. **Genes & Development**, v. 9, p. 534-546, 1995.
87. NISHIYAMA, Y. et al. A human homolog of *Drosophila* warts suppressor, h-warts, localized to mitotic apparatus and specifically phosphorylated during mitosis. **Febs Letters**, v. 459, p. 159-165, 1999.
88. KAMIKUBO, Y.; KONDO, A. T.; UCHIYAMA, T.; HORI, T. Inhibition of cell growth by conditional expression of kpm, a human homologue of *Drosophila* warts/lats Tumor Suppressor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 20, p. 17609-17614, 2003.
89. IIDA, S. I. et al. Tumor suppressor warts ensure genomic integrity by regulation both mitotic progression and G1 tetraploidy checkpoint function. **Oncogene**, v. 23, p. 5266-5274, 2004.
90. SIDOROV, R. A.; UGNIVENKO, E. G.; KHOVANOVA, E. M.; BELITSKY, G. A. Induction of tumor clones in *Drosophila melanogaster wts/+* heterozygotes with chemical carcinogens. **Mutation Research**, v. 489, p. 181-191, 2001.
91. VIEIRA, V. B. et al. Influência da adição de CuCl₂ e SnCl₂ na relação metátese de olefinas vs isomerização do metil-eugenol usando complexo de Ru do tipo Grubbs Segunda Geração como catalisador. **Química Nova**, v. 43, n. 1, p. 24–31, 2018.
92. SOUSA, D. A. et al. Application of Amine-based Ru Compounds in the Olefin Metathesis of Methyl Eugenol: A Comparison with Grubbs Catalysts. **Letters in Organic Chemistry**, v. 17, n. 8, p. 596–602, 2019.
93. CAREY, P. J.; CAREY, P. J. Synthesis of novel dienes and cyclic compounds via olefin metathesis reactions catalyzed by the Second-Generation Grubbs catalyst. **Student Research, Creative Works, and Publications**, n. 2015, 2015.
94. BIZZARRI, B. M. et al. Synthesis of stilbene and chalcone inhibitors of influenza A virus by sba-15 supported hoveyda-grubbs metathesis. **Catalysts**, v. 9, n. 12, p. 1–16, 2019.

95. GÜSTEN, H; KLASINC, L; KRAMER, V.; MARSEL, J. Mass spectra of monosubstituted trans-stilbenes. **Organic Mass Spectrometry**, v. 8, p. 323- 334, 1974.
96. THIEL, A. et al. Black pepper constituent piperine: genotoxicity studies *in vitro* and *in vivo*. **Food and Chemical Toxicology**, v.66, p.350-357, 2014.
97. SUNILA, E. S.; KUTTAN, G. Immunomodulatory and antitumor activity of *Piper longum* Linn. and piperine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, n. 2–3, p. 339–346, 2004.
98. DOGRA, R. K. S.; KHANNA, S.; SHANKER, R. Immunotoxicological effects of piperine in mice. **Toxicology**, v.196, p.229-236, 2004.
99. JUMBO, L. O. V. **Atividade inseticida e de repelência de óleos essenciais de cravo e canela sobre o caruncho *Acanthoscelides obtectus* (Say)**. 2013. 57p. Dissertação (Pós-Graduação em Entomologia) Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.
100. RIBEIRO, N. C. **Potencial inseticida de óleos essenciais de espécies do gênero *Citrus* sobre *Bemisia tabaci* (Genn., 1889) biótipo B (Hemiptera : Aleyrodidae)**. 2010. 58p. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife – PE.
101. MOREIRA, L. C. B. et al. Ação nematicida do eugenol em tomateiro. **Pesquisa Agropecuaria Tropical**, v. 43, n. 3, p. 286–291, 2013.
102. OGENDO, J. O. et al. Bioactivity of *Ocimum gratissimum* L. oil and two of its constituents against five insect pests attacking stored food products. **Journal of Stored Products Research**, v.44, n.4, p.328-334, 2008.
103. GUERETZ, J. S.; SOMENSI, C. A. MARTINS, M. L.; SOUZA, A. P. Evaluation of eugenol toxicity in bioassays with test-organisms. **Ciência Rural**, v.47: 12, 2017
104. DA SILVA, J. L. et al. Reproductive Toxicity of Eugenol in Wistar Rats. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 11, n. 16, p. e1864, 2019.
105. OLIVEIRA, N. S.; ARRUDA, E. L. Estudos In silico sobre as atividades anticancerígenas do Eugenol presente no Cravo Da Índia (*Syzygium aromaticum*). **Research, Society and Development**, v. 10, n. 4, p. e27910414165, 2021.
106. DIAS, M. S. et al. Cytogenotoxicity and protective effect of piperine and capsaicin on meristematic cells of *Allium cepa* L. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 93, 2021.
107. KHANAM, S. et al. Protective effect of capsaicin against methyl methanesulphonate induced toxicity in the third instar larvae of transgenic *Drosophila melanogaster* (hsp70-lacZ) Bg9. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 15, n. 4, p. 271–280, 2017.
108. AMKISS, S.; DALOUH, A.; IDAOMAR, M. Chemical composition, genotoxicity and antigenotoxicity study of *Artemisia herba-alba* using the eye and wing SMART assay of *Drosophila melanogaster*. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 14, n. 3, p. 102976, 2021.

109. NEPOMUCENO, J. C. Using the *Drosophila melanogaster* to Assessment Carcinogenic Agents through the Test for Detection of Epithelial Tumor Clones (Warts). **Advanced Techniques in Biology & Medicine**, v. 03, n. 03, 2015.
110. OVEJERO, S.; SOULET, C.; MORIEL-CARRETERO, M. The Alkylating Agent Methyl Methanesulfonate Triggers Lipid Alterations at the Inner Nuclear Membrane That Are Independent from Its DNA-Damaging Ability. **Internacional Journal of Molecular Sciences**, 22, 7461. 2021.
111. FU, D.; CALVO, J. A.; SAMSON, L. D. Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 2, p. 104–120, 2012.
112. COOPER, G.M. (2000). DNA repair. In *The cell: A molecular approach* (2nd ed.). Sunderland, MA: Sinauer Associates. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9900/>. Acesso em: 27 de nov. de 2021.
113. JOHNSON, R. E. et al. A Role for Yeast and Human Translesion Synthesis DNA Polymerases in Promoting Replication through 3-Methyl Adenine. **Molecular and Cellular Biology**, v. 27, n. 20, p. 7198–7205, 2007.
114. SELVENDIRAN, K. et al. Modulatory effect of Piperine on mitochondrial antioxidant system in Benzo(a)pyrene-induced experimental lung carcinogenesis. **Phytomedicine**, v. 11, n. 1, p. 85–89, 2004.
115. DELAFORGE, M.; JANIAUD, P.; DORANGE, J.; MORIZOT, J.P.; PADIEU, P. Metabolic activation of a natural promutagen, eugenol, by replicative cultures of adult rat liver epithelial cells. **Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et de Ses Filiales**, v. 171, p. 100–107, 1977.
116. MIZUTANI, T.; SATOH, K.; NOMURA, H. Hepatotoxicity of eugenol and related compounds in mice depleted of glutathione: structural requirements for toxic potency, **Research communications in chemical pathology and pharmacology**. v. 73, p. 87–95, 1991.
117. MUNERATO, M. C. et al. Genotoxic effects of eugenol, isoeugenol and safrole in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**, v. 582 (1–2), p. 87–94, 2005.
118. 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.
119. SATURNINO, R. S. **Avaliação da atividade Mutagênica e Carcinogênica da Anfotericina B em Células Somáticas de *Drosophila melanogaster***. 2012. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.
120. PERDOMO, R. T. et al. Myricitrin from *Combretum lanceolatum* exhibits inhibitory effect on DNA-topoisomerase type II α and protective effect against in vivo doxorubicin-induced mutagenicity. **Journal of Medicinal Food**, v. 24, p. 273–81, 2020.

121. VASCONCELOS, M. A. et al. Modulating effect of vitamin D3 on the mutagenicity and carcinogenicity of doxorubicin in *Drosophila melanogaster* and in silico studies. **Food and Chemical Toxicology**, v. 143, 2020.
122. CHAHINE, N., AND R. CHAHINE. Protecting mechanisms of saffron extract against doxorubicin toxicity in ischemic heart. **Saffron**, v. 12, p. 141–54, 2020.
123. RENU, K., V. G. ABILASH, P. B. T. P., AND S. ARUNACHALAM. Molecular mechanism of doxorubicin-induced cardiomyopathy update. **European Journal of Pharmacology**, v. 818, p. 241–253, 2018.
124. LUBIENIECKA, J. M. et al. A discovery study of daunorubicin induced cardiotoxicity in a sample of acute myeloid leukemia patients prioritizes P450 oxidoreductase polymorphisms as a potential risk factor. **Frontiers in Genetics**, v. 4, 2013.
125. GAMMELLA, E.; MACCARINELLI, F.; BURATTI, P.; RECALCATI, S.; CAIRO, G. The role of iron in anthracycline cardiotoxicity. **Frontiers in Pharmacology**, v. 5, p. 1–6, 2014.
126. HAN, E. H. et al. Eugenol inhibit 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced genotoxicity in MCF-7 cells: Bifunctional effects on CYP1 and NAD(P)H:quinone oxidoreductase. **FEBS Letters**, v. 581, n. 4, p. 749–756, 2007.
127. HUSSAIN, A. et al. Eugenol enhances the chemotherapeutic potential of gemcitabine and induces anticarcinogenic and anti-inflammatory activity in human cervical cancer cells. **Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals**, v. 26(5), p. 519–527, 2011.
128. KIRAN, B.; LALITHA, V.; RAVEESHA, K. A. *Psoralea corylifolia* L. a potent medicinal plant with broad spectrum of medicinal properties, **Journal of Fundamental and Applied Sciences**, v. 2, p. 20–22, 2013.
129. ITO, M.; MURAKAMI, K.; YOSHINO, M. Antioxidant action of eugenol compounds: role of metal ion in the inhibition of lipid peroxidation, **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 461–466, 2005.
130. GULCIN, I. Antioxidant Activity of Eugenol: A Structure– Activity Relationship Study, **Journal of Medicinal Food**, v. 14, p. 975–985, 2001.
131. GÖKALP, F. A Study on The Chemical Properties of Eugenol and Eugenol Acetate, Clove Essential Oils. **Sigma Journal Engineering and Natural Sciences Sigma**, v. 3, n. 34, p. 407–414, 2006.
132. BEZERRA, D.; MILITÃO, G.; MORAIS, M. D.; SOUSA, D. D. (2017). The Dual Antioxidant/Prooxidant Effect of Eugenol and Its Action in Cancer Development and Treatment. **Nutrients**, v. 9, n. 12, p. 1367–1382, 2017.