



UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI - URCA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR
MESTRADO ACADÊMICO EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR

CÍCERA JACIELLY DE MATOS CASSIANO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO DO BOWDENOL E
ESPATULENOL ATRAVÉS DE DOCAGEM MOLECULAR**

CRATO – CE

2015

CÍCERA JACIELLY DE MATOS CASSIANO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO DO BOWDENOL E
ESPATULENOL ATRAVÉS DE DOCAGEM MOLECULAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri como requisito para obtenção do título de MESTRE EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR (Área de concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais).

Orientador: Prof. Dr. Diniz Maciel de Sena Junior

CRATO - CE

2015

Cassiano, Cícera Jacielly de Matos.
C345a Avaliação do potencial anti-inflamatório do Bowdenol e
Espatuleno através de docagem molecular/ Cícera Jacielly de Matos
Cassiano. – Crato-CE, 2015
79p.; il.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri –
URCA. Área de concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais.
Orientador: Prof. Dr. Diniz Maciel de Sena Junior

1. Inflamação; 2. Ciclooxigenases; 3. Bowdenol; 4. Espatuleno;
5. Docagem molecular; I. Título.

CDD: 615.32

CÍCERA JACIELLY DE MATOS CASSIANO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO DO BOWDENOL E
ESPATULENOL ATRAVÉS DE DOCAGEM MOLECULAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Bioprospecção Molecular, do Departamento de Química Biológica da Universidade Regional do Cariri, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioprospecção Molecular. Área de concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais.

A citação de qualquer trecho desta dissertação é permitida, de acordo com as normas da ética científica, e esta encontra-se à disposição na biblioteca setorial do referido programa.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 27/02/2015.

Examinadores:

Prof. Dr. Diniz Maciel de Sena Junior - Orientador
Departamento de Química Biológica – URCA



Prof. Dr. Andrei Leitão - Avaliador Externo
Instituto de Química de São Carlos – USP

Prof. Dr. Alexandre Magno Rodrigues Teixeira - Avaliador Interno
Departamento de Química Biológica – URCA

Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes - Suplente
Departamento de Química Biológica – URCA

CRATO – CE

2015

A todos que amo, em especial à memória da minha vovó *Romana Rodrigues de Matos* e de meu padrinho *Francisco Ferreira Duarte*.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, amigo e confidente, pela inteligência, sabedoria, paciência e desejo de acrescentar algo a este mundo como fruto de meu trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Diniz Maciel de Sena Junior, pela tamanha paciência, compreensão, organização e amizade durante a graduação e pós-graduação.

Ao Professor Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes, pela indicação dos compostos trabalhados.

Ao Professor Dr. Alexandre Magno Rodrigues Teixeira, pela amizade e parceria no Laboratório de Bioinformática Avançada.

Ao Professor Dr. Andrei Leitão, por ter aceitado o convite como avaliador externo.

A FUNCAP e CNPq, pelo apoio e auxílio financeiro.

Ao CENAPAD, pela ajuda em cálculos de projetos na graduação e pós-graduação.

Aos meus pais, pelo incentivo e ajuda sem medir esforços. Eles me deram a base para eu voar mais alto.

Ao meu esposo, por acreditar que sonhos são para serem realizados e não apenas acalentados.

Aos meus irmãos e amigos (“Ninguém é um fracasso se tem amigos”) pela torcida e encorajamento frente a minha jornada de vida, representativamente por Andréa, Gil, Hélio Júnior, Ingrid, Jardênia, Mazé, Renata e Vanessa.

Aos colegas do mestrado que tive a honra de conhecer e acrescentar ao número de amigos e todas aquelas pessoas que durante a pós-graduação fiquei mais próxima, em especial a Amanda Ribeiro, Beatriz Gonçalves, Débora Odília, Fernanda Sena, Luciene Lima e Walmir.

Aos coordenadores, professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular e da URCA em geral, especialmente a Fernando, Marcos e seu Luís.

A todos os “ombros gigantes que me apoiem” para chegar até aqui, Obrigada!

**“Na natureza tudo é simples sem deixar de ser complexo e
ser complexo não é ser difícil,
e sim ser perfeito.”**

Jacielly Matos

RESUMO

A inflamação é relevante para o organismo, mas se patológica, compromete a qualidade de vida dos indivíduos. Ciclooxygenases, COX, são enzimas que atuam em processos fisiológicos, constitutivamente, no caso da Ciclooxygenase-1, COX-1, e inflamatórios e/ou patológicos, no caso da Ciclooxygenase-2, COX-2. Plantas da Chapada do Araripe podem conter substâncias ativas com propriedades anti-inflamatórias, como bowdenol e espatulenol, que foram as moléculas escolhidas para este estudo. A docagem molecular consiste de cálculos teóricos que dão suporte a experimentos em áreas biológicas. Docagens com uma e outra macromolécula informam teoricamente como é a interação de certas substâncias com essas proteínas e fornecem dados que podem eleger possíveis candidatos a fármacos. O substrato natural das COX, o ácido araquidônico e os anti-inflamatórios flurbiprofeno e diclofenaco, não seletivos, o meloxicam, com poder de inibição maior sobre a COX-2, e o seletivo celecoxib, denominados de ligantes originais, foram escolhidos para controle deste trabalho. Inicialmente foi feita a redocagem dos ligantes originais nos seus respectivos sítios de ligação. As estruturas dos receptores foram consideradas em três situações: cristalizada, com energia minimizada, e com energia minimizada e resíduos flexíveis. No último caso foi feita ainda a docagem cruzada de cada ligante nos sítios dos demais. Em seguida os cálculos foram repetidos tendo o bowdenol e espatulenol como ligantes. Os valores de RMSD (desvio médio quadrático) entre as estruturas das proteínas antes e após minimização foram baixos, menores que 0,5Å, indicando grande semelhança estrutural entre elas, enquanto que nos ligantes foram abaixo de 2,0Å, com exceção do ácido araquidônico que foi superior a 2,0Å na COX-2. Na docagem cruzada, o desvio médio das energias de ligação foi de $\pm 1,7$ kcal/mol para a COX-1 e $\pm 1,6$ kcal/mol para a COX-2. As energias de ligação obtidas considerando resíduos flexíveis foram, em média, inferiores àquelas que tem como alvo os receptores rígidos (antes ou após minimização de energia). Para uma discussão mais consistente, baseando-se na qualidade das interações observadas, considerou-se no caso da COX-1 os dados da docagem rígida com os receptores relaxados (pós-minimizados). Para a COX-2, foram considerados os dados da docagem flexível e para as moléculas estudadas foram consideradas as médias das energias das docagens flexíveis em cada COX. Bowdenol e espatulenol mostraram-se estatisticamente equivalentes aos ligantes originais em termos de energia de ligação, e assim podem ser considerados como possíveis anti-inflamatórios. Sugere-se que sejam verificados os dados obtidos nesse estudo em comparação com dados de experimentos *in vitro* e/ou *in vivo*.

Palavras-chave: Inflamação, Ciclooxygenases, Bowdenol, Espatulenol, Docagem molecular.

ABSTRACT

Inflammation is an important condition for the body, but if pathological, it can compromise an individual's quality of life. Cyclooxygenases, COX, are enzymes involved in physiological processes, constitutively, in the case of Cyclooxygenase-1, COX-1, and inflammatory and/or pathological, Cyclooxygenase-2, COX-2. Several plants from the Araripe Plateau may contain active substances with anti-inflammatory properties, such as bowdenol and spathulenol, which were chosen for this study. Molecular docking consists of theoretical calculations that support experiments in biological areas. Docking small ligands to macromolecules allows their interaction to be assessed, providing data that helps to spot potential drug candidates. Arachidonic acid, a natural substrate of COX, nonselective anti-inflammatory drugs (flurbiprofen and diclofenac), meloxicam, a stronger COX-2 inhibitor, and celecoxib (a COX-2 selective ligand), namely original ligands, were chosen for this work. Firstly, original ligands were redocked to their respective binding sites, with receptor structures considered under three different conditions: crystallized form, energy minimized geometry, and energy minimized geometry with flexible residues. For the latter condition, cross-docking was also performed for each ligand into each other's sites. Then, docking calculations were carried out again, using bowdenol and spathulenol as ligands. The RMSD (root mean square deviation) values between the structures of proteins, before and after minimization were low, less than 0.5 Å, indicating a high structural similarity. The original ligands showed RMSDs smaller than 2.0Å, with the exception of arachidonic acid in COX-2, when compared to crystal position. In cross-docking experiments the average deviation of the binding energy was $\pm 1,7$ kcal/mol for COX-1 and $\pm 1,6$ kcal/mol for COX-2. On average, the binding energies obtained from docking with flexible residues was lower than when rigid receptors were considered (before and after energy minimization). In order to provide a consistent basis for the discussion, the quality of the binding poses were considered. For COX-1, results from rigid docking of original ligands with minimized receptor were considered, whereas for COX-2, results from flexible docking were preferred, as well as for bowdenol and spathulenol. The original ligands showed a lower binding energy when docked to COX-2, as opposed to COX-1. Bowdenol and spathulenol showed essentially identical binding energies when docked to either COX. Bowdenol and spathulenol are statistically equivalent to the original ligands in terms of binding energy, and can be considered as potential anti-inflammatory drugs. It is suggested that data obtained in this study be checked against data from *in vitro* and/or *in vivo* experiments.

Keywords: Inflammation, Cyclooxygenase, Bowdenol, Spathulenol, Molecular docking.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

3D – Três Dimensões

ACD – Ácido araquidônico

ADT4 – *AutoDockTools4*

AIDS – *Acquired Immunodeficiency Syndrome* – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

AINEs – Anti-Inflamatórios Não-Esteroidais

AM1 – *Austin Model 1*

CCSD (T) – *Coupled Cluster with a full Treatment Singles and Doubles (T)* – Cluster com Agrupamento Acoplado com Tratamento completo de Simples e Duplas por triplas excitações

CEL – Celecoxib

COX – Ciclooxigenase

COX-1 – Ciclooxigenase 1

COX-2 – Ciclooxigenase 2

COX-3 – Ciclooxigenase 3

DII – Doença Inflamatória Intestinal

DIF – Diclofenaco

DNA – *Deoxyribonucleic Acid* – Ácido Desoxirribonucleico

EUA – Estados Unidos da América/Estados Unidos

FDA – *Food and Drug Administration Agency* – Agência de Administração de Alimentos e Drogas

FLP – Flurbiprofeno

G.A.M.E.S.S – *General Atomic and Molecular Structure System* – Sistema Geral de Estrutura Atômica e Molecular

HETEs – *Hydroxy-eicosatetraenoic acids* – Ácidos Hidroxieicosatetraenóicos

HF – *Hartree-Fock*

HIV – *Human Immunodeficiency Virus* – Vírus da Imunodeficiência Humana

iNOS – *Inducible Nitric Oxide Synthase* – Óxido Nítrico Sintase Induzível

IT – Integração termodinâmica

IUPAC – *International Union of Pure and Applied Chemistry* – União Internacional de Química Pura e Aplicada

kcal/mol – Quilocalorias/mol

MM – Mecânica Molecular

MM2 – Mecânica Molecular 2

MP2 – *Møller-Plesset até a segunda ordem*

MXM – Meloxicam

NCE – *New Chemical Entities* – Novas Entidade Químicas

NF- κ B – *Nuclear Factor- κ B* – Fatores de Transcrição Nuclear- κ B

OMS – Organização Mundial da Saúde

PDB – *Protein Data Bank* – Banco de Dados de Proteínas

PEL – Perturbação da energia livre

PG G/H sintase – Prostaglandina G/H Sintase

PGG2 – Prostaglandina G2

PGH2 – Prostaglandina H2

PGHS-2 – Prostaglandina Endoperóxido Sintase-2

PGs – Prostaglandinas

PM3 – *Parameterized Model 3*

PPAR – *Peroxisome Proliferator Activated Receptors* – Receptores Ativados por Proliferador de Peroxissomo

QM/MM – *Quantum Mechanics/Molecular Mechanics* – Mecânica Quântica/Mecânica Molecular

RMSD – *Root Mean Square Deviation* – Desvios médios quadráticos

ROS – *Reactive Oxygen Species* – Espécies Reativas de Oxigênio

TNF- α – *Tumor Necrosis Factor Alpha* – Fator de Necrose Tumoral Alfa

TRL – Teoria de Resposta Linear

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fórmula estrutural (a) e em bola e bastão (b) do Bowdenol.	24
Figura 2 – Fórmula estrutural (a) e em bola e bastão (b) do Epatulenol.	28
Figura 3 – Principais eicosanoides sintetizados pelas vias da COX e LOX.	31
Figura 4 – Diagrama comparando a ação de AINE tradicionais e seletivos da COX.	37
Figura 5 – Fórmulas estruturais dos ligantes originais.	49
Figura 6 – COX-1 com ácido araquidônico cristalizado e na redocagem rígida.	55
Figura 7 – COX-1 com ácido araquidônico cristalizado e na redocagem flexível.	55
Figura 8 – COX-1 com ácido araquidônico cristalizado e bowdenol na docagem rígida.	56
Figura 9 – COX-1 com ácido araquidônico cristalizado e espatulenol na docagem rígida.	57
Figura 10 – COX-2 com ácido araquidônico cristalizado e na redocagem rígida.	59
Figura 11 – COX-2 com ácido araquidônico cristalizado e bowdenol na docagem rígida.	60
Figura 12 – COX-2 com ácido araquidônico cristalizado e espatulenol na docagem rígida.	61
Figura 13 – Energia de ligação, receptores cristalizados. Dados da redocagem para ligantes originais, e média para bowdenol e espatulenol.	64
Figura 14 – Energias de ligação, receptores minimizados. Dados da redocagem para ligantes originais, e média para bowdenol e espatulenol.	65
Figura 15 – Energias médias de ligação, receptores minimizados e resíduos flexíveis.	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1–Identificadores das macromoléculas e seus respectivos ligantes com abreviaturas.	49
Tabela 2 –RMSD da COX-1 e COX-2 Pré e Pós-minimização tendo a estrutura com ácido araquidônico como referência.	53
Tabela 3 – RMSD dos ligantes complexados com a COX- 1 e COX-2 pré, pós minimizada e com resíduos flexíveis.	54
Tabela 4 – Energias de ligação e desvio médio, obtidos da docagem cruzada na COX-1 e COX-2 em kcal/mol.....	63

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS.....	17
2.1 Objetivo geral	17
2.2 Objetivos específicos	17
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
3.1 Plantas Medicinais e seus produtos derivados	18
3.2 Bioprospecção Molecular e medicamentos	19
3.3 Óleos Essenciais.....	21
3.3.1 A substância Bowdenol.....	22
3.3.2 A substância Epatulenol.....	25
3.4 Inflamação e Ciclooxygenases.....	28
3.5 Bioinformática e fármacos	38
3.6 Docagem molecular.....	40
3.7 Química Quântica: Métodos <i>ab initio</i>	43
3.8 Mecânica Molecular.....	45
4 MATERIAL E MÉTODOS	48
4.1 Bowdenol e espatulenol.....	48
4.2 Ligantes originais	48
4.3 Preparação dos arquivos de entrada.....	50
4.4 Cálculos de docagem molecular.....	51
4.5 Análise dos dados	52
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
5.1 Avaliação das estruturas proteicas e dos ligantes	53
5.2 Interações ligantes e proteínas	54
5.2.1 COX-1.....	54
5.2.2 COX-2.....	58
5.3 Energia de Ligação	62
6 CONCLUSÃO	67
7 PERSPECTIVAS	68

REFERÊNCIAS.....69

ANEXO.....79

1 INTRODUÇÃO

Eicosanóides como prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos são autacóides derivados dos lipídios formados a partir de ácidos graxos polinsaturados, principalmente o ácido araquidônico, pela atuação de enzimas como as ciclooxigenases e lipooxigenases. Detectados em quase todos os tecidos e líquidos corporais, eles contribuem para diversos processos fisiológicos e patológicos, incluindo inflamação, homeostasia, trombose, e secreção gastrintestinal (BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L., 2005).

Proteínas como as Ciclooxigenases (COX) são macromoléculas biológicas ou biopolímeros com importantes funções nos organismos. A COX-1, ou constitutiva, foi encontrada em quase todos os tecidos normais (DUBOIS et al., 1998), já a COX-2, denominada indutiva, não foi detectada, ou foi encontrada em baixos níveis, em tecidos normais, apresentando maior expressão em presença de citocinas, fatores de crescimento e estimulantes tumorais (FITZGERALD; PATRONO, 2001).

A inflamação é um processo fisiológico imprescindível para homeostasia do organismo. A superexpressão desse processo pode favorecer o desenvolvimento de várias doenças (HARPUT; GENC; SARACOGLU, 2012) como doenças intestinais inflamatórias, gota, aterosclerose e, possivelmente, câncer.

Os Anti-Inflamatórios Não-Esteroidais (AINEs) são fármacos que inibem de forma variável as duas isoformas, a COX-1 e COX-2. Devido aos efeitos colaterais advindos da inibição da forma constitutiva COX-1, houve uma intensificação no desenvolvimento de fármacos seletivos para COX-2. No entanto persistem os potenciais efeitos adversos na função renal, sintomas gastrointestinais e prováveis consequências cardiovasculares e na fertilidade (KUMMER; COELHO, 2002).

Por serem renováveis e reprodutíveis, os vegetais são fontes de descobertas de princípios ativos. Ao explorar a biodiversidade, a bioprospecção molecular proporciona a investigação desses compostos que podem levar ao desenvolvimento de um fármaco (SACCARO JUNIOR, 2011), tal como, historicamente, substâncias ativas foram obtidas de plantas como protótipo que possibilitou o desenvolvimento de fármacos como o hipnoanalgésico morfina isolada da planta de gênero *Papaver*, em 1805, e o anticoagulante dicumarol isolado do gênero *Melilotus*, em 1941 (ROCHA E SILVA, 1973).

A bioinformática emprega ferramentas computacionais para o estudo de problemas e questões biológicas, compreendendo também aplicações relativas à saúde humana, como o planejamento de fármacos (VERLI, 2014).

A docagem, ou atracamento, molecular faz parte de estudos da bioinformática para a descoberta e desenvolvimento de substâncias de interesse farmacológico. Nela, observa-se a identificação do sítio de ligação na proteína, a determinação da posição e orientação do ligante, e a determinação da afinidade da ligação. (LESK, 2005).

Substâncias como bowdenol e espatulenol estão presentes em óleos essenciais de vegetais encontrados na Chapada do Araripe, sul do Ceará, com características anti-inflamatórias. O extrato etanólico da casca da espécie *Bowdichia virgilioides* apresenta atividade anti-inflamatória comprovada (BARROS et al., 2010). A *Psidium socrateanum* Proença Landrum contém o espatulenol como um dos seus constituintes (PEREIRA, 2010) e é do mesmo gênero da goiaba, a *Psidium guajava*, cujos estudos de atividade anti-inflamatória em animais foi relatada (DUTTA; DAS, 2010).

Métodos computacionais como ferramentas na biologia agrega conhecimento e soma qualidade nas pesquisas experimentais. A docagem molecular elege os melhores ligantes para possíveis alvos farmacológicos (LESK, 2005) ou pode promover modificações estruturais racionais para melhorar a especificidade e potencial de interação de um ligante, possível fármaco (VERLI, 2014).

Assim, procura-se, com esse trabalho, observar o comportamento das substâncias bowdenol e espatulenol no sítio ativo das ciclooxigenases 1 e 2 através do uso de docagem molecular em busca de compostos com expressiva atividade anti-inflamatória.

2 OBJETIVOS

Os objetivos desse trabalho podem ser vistos nas seções subsequentes.

2.1 Objetivo geral

Obter, através da docagem molecular, informações da ação de substâncias no sítio ativo das ciclooxigenases 1 e 2 e conseqüentemente, na inibição do processo inflamatório.

2.2 Objetivos específicos

- Entender, através de docagem molecular, o comportamento das substâncias Bowdenol e Espatulenol nas vias de transdução de sinal relacionadas ao processo inflamatório, para que, dependendo do resultado, seja possível a indicação de compostos a serem testados *in vitro* ou *in vivo*;
- Construir um banco de dados de substâncias com potencial de serem testadas experimentalmente, reduzindo o uso de animais na pesquisa científica que muitas vezes seguem padrões antiéticos;
- Impulsionar o estudo da química computacional para dar suporte a estudos experimentais da bioprospecção molecular por meio da comparação de resultados computacionais com os respectivos dados *in vitro* ou *in vivo*, complementando-os sempre que possível;
- Comprovar ou adicionar ao conhecimento popular, o conhecimento científico que trará benefícios terapêuticos não só para a região local, mas para todas as populações.

3 REVISÃO DE LITERATURA

A fim de demonstrar a importância dos temas relacionados ao desenvolvimento deste trabalho, foi feita uma pesquisa bibliográfica apresentada a seguir.

3.1 Plantas Medicinais e seus produtos derivados

Planta Medicinal, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) é aquele vegetal precursor de fármacos semissintéticos ou que apresenta em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser usadas com finalidade terapêutica (BULLETIN OF THE WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1998). É uma determinada espécie vegetal, sendo ela proveniente de cultivo ou não, utilizada com propósitos terapêuticos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003).

Os vegetais sempre estiveram presentes desde os primórdios da civilização, seja como alimento, vestuário, habitação, defesa e ataque, transporte, utensílios em manifestações artísticas, culturais e religiosas, além do potencial curativo promotor da saúde (SCHENKEL; GOSMANN; PETROVICK, 1999).

É preciso muita atenção e vigilância no uso de produtos naturais, bem como o conhecimento sobre os diferentes termos utilizados nessa área. Fitoterápico é aquele medicamento elaborado apenas por matérias-primas vegetais com finalidade profilática, de cura ou para diagnóstico, caracterizando-se pelo conhecimento da eficácia, segurança, reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Na sua fabricação pode conter adjuvantes farmacêuticos permitidos na legislação vigente, contudo não pode possuir substâncias ativas de outras origens, mesmo sendo de origem vegetal, isoladas ou suas misturas, caso em que se enquadra o fitofármaco, uma substância ativa, isolada de matérias-primas vegetais, ou mesmo mistura de substâncias ativas de origem vegetal (BRASIL, 1995).

Em relação à comercialização popular de plantas medicinais, cuidados são indispensáveis, tais como identificação correta da planta (pelo comerciante e/ou pelo fornecedor), interações entre plantas medicinais e medicamentos alopáticos, efeitos de dosagens elevadas, reações alérgicas ou tóxicas (VEIGA; PINTO; MACIEL, 2005). A toxicidade de substâncias encontradas em plantas é um parâmetro importante em seu uso: substâncias como apiol, safrol e alcaloides pirrolizidínicos, presentes em plantas, podem ter

efeitos hepatotóxicos; componentes tóxicos ou antinutricionais, como o ácido oxálico também se encontram em muitas plantas de consumo comercial (GUIL; RODRIGUEZ-GARCIA; TORIJA, 1997). Da mesma forma, substâncias isoladas de plantas consideradas medicinais possuem citotoxicidade ou genotoxicidade e mostram relação com a incidência de tumores (AMES, 1983), isto demanda cautela em sua utilização e demanda estudos mais detalhados para sua avaliação.

Até o início do século XIX, a maioria dos medicamentos era constituída por plantas medicinais e seus extrativos. Tempo depois, os recursos vegetais começaram a ser estudados por meios científicos e assim estabeleceu-se a tendência da utilização de substâncias ativas isoladas, os “princípios ativos”, o que agregava vantagens relativas à reprodutibilidade dos efeitos por apresentar constância em sua composição, uma maior eficácia, segurança e qualidade dos produtos gerados, uma vez que se torna mais fácil o estabelecimento de especificações para uma única substância em relação a uma mistura complexa (SCHENKEL et al., 1999). Sabe-se, por exemplo, que adulterações em certos óleos vegetais, como no óleo de copaíba, agente anti-inflamatório, podem trazer malefícios na sua utilização, como efeito potencializador do processo inflamatório (VEIGA et al., 2001).

3.2 Bioprospecção Molecular e medicamentos

Considerando que os fármacos podem ser desenvolvidos a partir de moléculas, a bioprospecção molecular proporciona esse desenvolvimento através do conhecimento dessas moléculas. É uma das formas de se explorar economicamente a biodiversidade. Uma busca sistemática por organismos, genes, enzimas, compostos, processos e partes provenientes de seres vivos com potencial econômico, podendo levar ao desenvolvimento de um produto (SACCARO JUNIOR, 2011). Refere-se à pesquisa de material biológico que proporciona o fortalecimento do uso sustentável, utilização de estratégias de conservação, distribuição justa e igualitária dos benefícios provenientes de sua utilização, além da promoção e regulamentação de novas tecnologias, pois este material biológico é um recurso que obteve valor de mercado (AZEVEDO, 2003).

Considerando que o medicamento é composto por uma ou mais substâncias ativas e seus adjuvantes, os vegetais são fontes de matérias-primas farmacêuticas importantes, seja pela dificuldade de se obter sinteticamente moléculas com a mesma estereoquímica ou pela

inviabilidade econômica. Há casos em que as substâncias do medicamento não ocorrem na natureza, mas sua síntese é possível através de precursores naturais (SCHENKEL et al., 1999). Em relação aos adjuvantes, o entendimento no seu modo de atuação levou à elaboração de derivados semissintéticos, em que foram salientadas certas propriedades das moléculas originais por modificações estruturais, como nos derivados da celulose (LIMA NETO; PETROVICK, 1997).

A procura por substâncias que apresentassem a cura de enfermidades ou atividade anti-inflamatória, antipirética, antimicrobiana, dentre outras, sempre esteve presente na pesquisa científica e não são poucos os exemplos de estudos com plantas para esses fins com resultados interessantes. Observou-se que flavonoides, esteroides, polifenóis, cumarinas, alcaloides e terpenos possuem inúmeras aplicações que incluem atividades anti-inflamatória, analgésica e antipirética (SHUKLA et al., 2010). Dentre eles, os triterpenos apresentaram atividade anti-inflamatória, com estrutura semelhante aos esteroides e sem seus efeitos colaterais. (GUPTA et al., 1969). Ainda em relação aos triterpenos, os pentacíclicos como o lupeol e linoleato de lupeol, cujo espectro de atividade anti-inflamatória parece ser diferente dos AINEs clássicos, possuem a vantagem de não apresentar efeitos indesejáveis, como o desenvolvimento de úlcera gástrica (GEETHA; VARALAKSHMI, 2001). Em outro caso, a mistura do β -sitosterol e estigmasterol, constituintes da planta *Sidastrum paniculatum*, mostrou uma promissora atividade anti-inflamatória (SOBRAL CAVALCANTE et al., 2010).

A descoberta da atividade de certas substâncias ultrapassa sua utilização, sendo importante para identificação de uma nova possibilidade de intervenção terapêutica. Historicamente, substâncias ativas obtidas de vegetais e utilizadas como protótipos para o desenvolvimento de fármacos, como o hipnoanalgésico morfina em 1805, proveniente do gênero *Papaver*, o anticolinérgico atropina em 1833, obtido do gênero *Atropa*, e o adrenérgico efedrina em 1887, do gênero *Ephedra* (ROCHA E SILVA, 1973) foram imprescindíveis para o desenvolvimento da terapêutica atual (SCHENKEL et al., 1999).

Existe uma diferença clara na exploração dos recursos biológicos de países desenvolvidos e subdesenvolvidos, seja pelo avanço tecnológico desigual ou por pouco investimento político em pesquisa. Quando se conduz temas como “conservação ambiental” é notório observar que termos como biotecnologia, bioprospecção, recursos genéticos, patentes e biopirataria são relacionados, mostrando assim o quanto é importante conhecer o potencial

biológico de uma nação para conservar a fonte de riqueza existente, que se traduz por um maior conhecimento e desenvolvimento de um país (AZEVEDO, 2003).

3.3 Óleos Essenciais

O metabolismo secundário vegetal se constitui de reações químicas (por enzimas, coenzimas e organelas) capazes de originar, transformar e acumular várias substâncias, não necessariamente relacionadas diretamente à manutenção da vida da planta, mas que apresenta vantagens para sua sobrevivência e perpetuação da espécie em seu ecossistema. Esse metabolismo possui elevada capacidade biossintética em termos de substâncias produzidas e diversidade numa mesma espécie. Sendo fatores de interação entre organismos, seus produtos apresentam atividades biológicas de interesse comercial como nas áreas de alimentação, agronomia, perfumaria e farmacêutica. Quanto a este último, o interesse deriva principalmente do enorme número de novas moléculas que podem ser farmacologicamente úteis ao homem (SANTOS, 1999).

Os óleos essenciais ou voláteis são compostos naturais complexos e derivados do metabolismo secundário vegetal. Conhecidos por seu potencial antisséptico natural (bactericida, fungicida e virucida) e inseticida, são utilizados para conservação de alimentos, além de apresentar propriedades medicinais como atividade analgésica, sedativa e anti-inflamatória. São extraídos de plantas aromáticas, geralmente situadas em países de clima temperado a tropical. Normalmente são líquidos, voláteis, límpidos e raramente coloridos. Lipossolúveis, possuem densidade menor do que a água e podem ser sintetizados em todos os órgãos da planta (brotos, flores, folhas, caules, galhos, sementes, frutas, raízes) (BAKKALI et al., 2008). Seus constituintes variam desde hidrocarbonetos terpênicos, álcoois, aldeídos, cetonas, éteres, óxidos, furanos, cumarinas, até compostos com enxofre. Seus compostos podem estar em diferentes concentrações, existindo os componentes majoritários e minoritários que podem variar dependendo da espécie, isto é, um componente pode ser majoritário em uma espécie e apresentar-se em baixíssimas concentrações em outras. Quimicamente, a grande maioria dos óleos voláteis é composta de derivados fenilpropanóides ou preponderantemente, de terpenóides (SPITZER; SIMÕES, 1999), metabólitos secundários com diversas atividades biológicas (SARAC et al., 2014; ZWENGER; BASU, 2008). É importante salientar que quando se fala de óleo essencial, sua composição e atividade

biológica podem variar conforme o clima, área geográfica, estações do ano, condições do solo, período de safra e técnica de extração (CARVALHO FILHO et al., 2006).

Os óleos essenciais são fontes de produtos naturais ativos biologicamente (BAKKALI et al., 2008; BURT, 2004) e são expressivos por suas atuações na etnomedicina, culinária, e aplicações cosméticas. Dentre as atividades biológicas, são agentes antibacterianos, antifúngicos, antivirais, inseticidas, antioxidantes e anticâncer (BURT, 2004; KORDALI et al., 2005).

Fazendo parte da composição de óleos essenciais, substâncias como o safrol tem importância na síntese de fármacos. Ele é um dos mais abundantes dentre os principais componentes de óleos voláteis brasileiros, e é encontrado, por exemplo, no óleo de sassafrás (*Ocotea sp.*) obtido de espécies de canelas brasileiras do sul do Brasil (RIZZINI, C.T.; MORS, 1976). O uso do safrol para síntese de fármacos forneceu novos análogos de prostaglandinas, tromboxanas, AINEs, protótipos de inibidores de Prostaglandina Endoperóxido Sintase-2 (PGHS-2) ou COX2, e de amidas naturais bioativas (BARREIRO; FRAGA; ARAÚJO JR, 1999).

3.3.1 A substância Bowdenol

Bowdenol é uma substância que pode ser encontrada na *Bowdichia virgilioides* Kunth, um vegetal arbóreo conhecido popularmente como sucupira-preta, sucupira-do-cerrado, sucupira-açu, sucupira-do-campo e paricarana. Pertence à família Fabaceae e tem ampla dispersão pelo Brasil, com maior incidência nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste. Embora apresente uma distribuição uniforme, ocorre com baixa densidade populacional (ALMEIDA, S. P. et al., 1998; LORENZI, 1992). É uma planta decídua, heliófita e xerófita, peculiaridades comuns em plantas do cerrado e na sua transição para floresta semidecídua. Sua floração em tons arroxeados ocorre entre os meses de agosto e setembro, com a planta quase totalmente sem folhas. Seus frutos, de coloração avermelhada, se caracterizam por serem legumes, indeiscentes, achatados, contendo pequenas sementes com 3 a 5 mm de comprimento (LORENZI, 1992; RIZZINI, C. T. , 1990). Essa árvore possui porte variável, entre pequena e mediana, conforme o terreno em que se encontre, e tronco reto ou contorcido coberto de casca grossa e cinzenta em que emana uma seiva castanho-clara que seca ao entrar em contato com o ar (BRAGA, R. , 1953). Muito utilizada

em arborização, ela se adapta a terrenos secos e pobres podendo ser usada em plantios de áreas degradadas de preservação permanente (APP) (LORENZI, 1992). Várias partes da *B. virgilioides* são usadas na medicina popular para tratar de artrite, diabetes, reumatismo, diarreia, gota, inflamações e úlceras (CONCEIÇÃO, 1980; FRIESE, 1934).

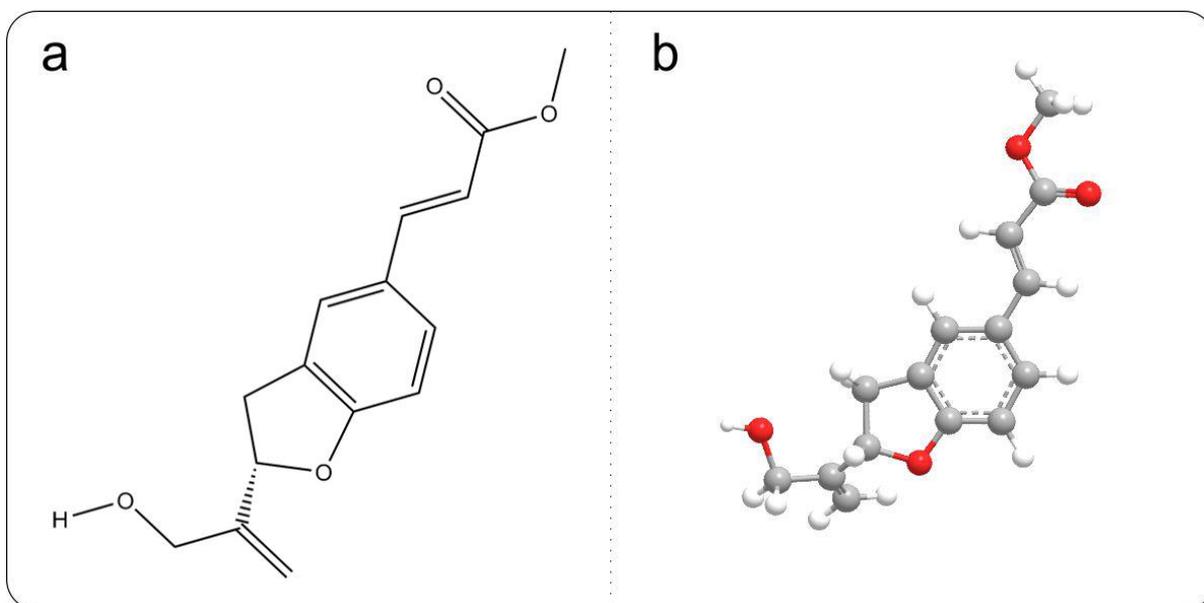
As cascas do tronco deste vegetal são utilizadas na medicina popular em casos de diarreia crônica e purificação do sangue (BRAGA, R. , 1960) enquanto as sementes são utilizadas no tratamento de reumatismo, artrite e doenças de pele (CRUZ, 1965; PIO-CORRÊA, 1984).

O extrato etanólico da sua casca da espécie *B. virgilioides* foi testado e a atividade anti-inflamatória comprovada. A triagem fitoquímica evidenciou a presença de triterpenóides, taninos, flavonoides, alcaloides e antraquinonas, contudo sendo necessários mais estudos para evidenciar compostos responsáveis pela propriedade investigada (BARROS et al., 2010). Cascas e folhas também foram testadas para atividades antinociceptiva, anti-inflamatória e antioxidante e tiveram resultados que confirmaram essas atividades. Na triagem fitoquímica do estudo, observou-se uma grande quantidade de flavonoides, taninos e triterpenos e uma menor quantidade de saponinas. A identificação e isolamento dos componentes bioativos estariam sendo realizados, que elucidariam as propriedades analgésicas e anti-inflamatórias da *B. virgilioides* (THOMAZZI et al., 2010). Outras atividades biológicas como antimalária (DEHARO et al., 2001), hipoglicemiante (OLIVEIRA; SAITO, 1989) e antinociceptiva (SILVA et al., 2010) da sucupira também foram relatadas. Em algumas plantas do cerrado de Mato Grosso, dentre as quais a *B. virgilioides*, os extratos em hexano, diclorometano, acetato de etila e etanol das entrecascas da referida planta mostrou atividade antimicrobiana (SILVA JUNIOR et al., 2009). Potente atividade cicatrizante, particularmente pelas suas propriedades antimicrobianas foi observada com o extrato aquoso da casca do caule de *B. virgilioides* (AGRA et al., 2013). Já em outro estudo, a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *B. virgilioides* apresentou fraca atividade contra alguns microrganismos testados (ALMEIDA, J. R. G. D. S. et al., 2006).

Triterpenos (ARRIAGA et al., 2000; TORRENEGRA et al., 1985; VELOZO et al., 1999), flavonoides, especialmente isoflavonóides (TORRENEGRA et al., 1985; VELOZO et al., 1999) e óleos essenciais (ARRIAGA et al., 1998) fazem parte das classes químicas de substâncias encontradas na *B. virgilioide*. Dentre as substâncias dessa espécie que já foram isoladas, tais como o odoratin 7-*O*- β -D-glucopiranosídeo (VELOZO et al., 1999) e a 7,8,4-trimetoxisoflavona (JUCKY et al., 2006), está o derivado benzofurano, o 3-di-

hidrobenzofurano denominado bowdenol (MELO et al., 2001), cuja nomenclatura IUPAC é metil-3-[2-(1-hidroximetilvinil)-2,3dihidrobenzo[b]furan-5-il]-(E)-2-propenoato. O bowdenol é um derivado fenilpropanóide que apresenta um anel furânico em sua estrutura. Sua fórmula molecular é $C_{15}H_{16}O_4$ e sua estrutura e imagem em bola e bastão podem ser visualizadas na Figura 1.

Figura 1 – Fórmula estrutural (a) e em bola e bastão (b) do Bowdenol.



Fonte – autora.

O bowdenol, composto já sintetizado (GUTIERREZ, 2007), tem a Plicatina B como seu precursor biogenético (MANN, 1994). A Plicatina B apresenta atividades antimutagênicas (MENON et al., 1999) e possui o grupo fenil orto-prenilato que exibe uma larga gama de atividades farmacológicas incluindo anti-inflamatória, antifúngica e antibacteriana (DINTZNER et al., 2004).

A sucupira-preta vem sofrendo redução sensível em sua quantidade devido à exploração comercial desordenada e, também, pela ocorrência de dormência tegumentar em suas sementes, que dificulta sua propagação e o estabelecimento de novos indivíduos (TAO, 1992) o que contribui para importância de estudos que tragam informações científicas para subsidiar planos de ação de manejo e conservação da diversidade biológica (BARBEDO; BILIA; FIQUEREDO RIBEIRO, 2002).

3.3.2 A substância Epatulenol

A substância espatulenol faz parte da composição do óleo essencial de diversas plantas. Popularmente, espécies do gênero *Psidium* são usadas como cicatrizantes, por causa de suas propriedades adstringentes e também em diarreias (COELHO DE SOUZA et al., 2004; SOUZA; FELFILI, 2006). A *Psidium soubreleanum* Proença Landrum, popularmente conhecida como araçá de veado, uma espécie presente na Chapada do Araripe, no sul do Ceará, contém o espatulenol como um dos seus constituintes, em torno de 8,8% de sua composição química (PEREIRA, 2010). O gênero *Psidium* é o mesmo que o da goiaba, a *Psidium guajava*, cujos estudos de atividade anti-inflamatória em animais foi relatada (DUTTA; DAS, 2010). Espécies do gênero *Protium*, mais precisamente a *Protium strumosum* e *Protium hebetatum*, que demonstraram atividade anti-inflamatória, apresentaram em seu óleo essencial o espatulenol (SIANI et al., 1999). Em um outro estudo com o *Eucalyptus citriodora*, para identificação de substâncias que tivessem uma ação antituberculose via inalação, o espatulenol também fazia parte do percentual de frações do óleo do vegetal (ALVARENGA et al., 2014).

O óleo essencial de *Cinnamomum osmophloeum* mostrou comprovada atividade anti-inflamatória indicando que os principais componentes, como o 1,8-cineol, trieno santolina, espatulenol, e óxido de cariofileno, podem ter um papel importante na regulação da resposta imune mediada por células (CHAO et al., 2005).

Em outro trabalho, o óleo volátil da casca da fruta de *Garcinia brasiliensis*, constituído principalmente por sesquiterpenos, entre eles o espatulenol, apresentou uma atividade anti-inflamatória (MARTINS et al., 2008).

O óleo essencial extraído de folhas e caule da *Piper aleyreanum* mostrou que tem potencial para o desenvolvimento de fitomedicamentos seguros com efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios e propriedades gastroprotetoras. A análise química da amostra de óleo essencial identificou 35 compostos, o que representa 81,7% do conteúdo total do óleo. Óxido de cariofileno (11,5%), β -pineno (9%), espatulenol (6,7%), canfeno (5,2%), β -elemeno (4,7%), mirtenal (4,2%), verbenona (3,3%) e pinocarvona (3,1%) foram consideradas principais constituintes (LIMA et al., 2012).

Em óleos essenciais de quatro espécies de *Teucrium*, relatou-se forte atividade anti-inflamatória e citotóxica contra três linhas de células tumorais humanas testadas, devido

parcialmente à presença de sesquiterpenos como o espatulenol, δ -cadineno, cariofileno, óxido cariofileno, α -humuleno, e torreiol. No geral, 150 componentes foram identificados nesses óleos e em todos eles demonstrou-se grande quantidade de sesquiterpenos (50,1-55,8%), sendo o espatulenol e δ -cadineno os principais componentes do óleo da *Teucrium brevifolium*oil (MENICHINI et al., 2009).

O óleo essencial de folhas de *Casearia sylvestris* foi estudado e os resultados demonstraram uma atividade anti-inflamatória juntamente com atividade antiulcerogênica. Compostos terpênicos presentes no óleo podem ser responsáveis por essa atividade. Dentre os componentes, o espatulenol é um deles (ESTEVEES et al., 2005).

O espatulenol está presente também nas espécies *Myrciaria tenella* e *Calycorectes sellowianus*, em cujo óleo essencial de suas folhas demonstrou atividade anti-inflamatória. A presença de β -cariofileno pode ser responsável pelo potente efeito anti-inflamatório do óleo das folhas de *M. tenella*, já que é seu componente principal e que já tem sido testado para esta atividade na sua forma pura, entretanto, deve-se considerar a sinergia entre os diferentes componentes do óleo, que também podem contribuir para o efeito observado (APEL et al., 2010).

No gênero *Thecocarpus* representado na flora do Irã, exclusivamente pela espécie *Thecocarpus meifolious* Boiss (MOZAFFARIAN, 1996; RECHINGER, 1987) que apresentou atividade antimicrobiana e antioxidante (TAHERKHANI, M. et al., 2014), foram identificados quarenta compostos no óleo da parte aérea da planta, estando o espatulenol entre os componentes majoritários, com maior percentual, 30,8%, seguido do óxido de cariofileno (11,1%) (TAHERKHANI, MAHBOUBEH; MASOUDI; RUSTAIYAN, 2012).

Agastache é um pequeno gênero de Lamiaceae que compreende 22 espécies de plantas medicinais aromáticas. O perfil fitoquímico de todas as espécies de *Agastache* estudadas até o momento é normalmente semelhante, consiste de duas classes principais de metabólicos: fenilpropanóides e terpenóides. Nos óleos essenciais relativamente variáveis, a maioria das populações de diferentes espécies de *Agastache* contém mais de 50% do composto estragol, além de outros compostos não-voláteis e voláteis (metil-eugenol, pulegona, mentona, isomentona e espatulenol) que foram relatados em várias proporções. A bioatividade *in vitro* e *in vivo* de vários extratos ou compostos individuais dessas espécies incluem antimicrobiana, atividade antiviral e antimutagênicas, anti-inflamatória,

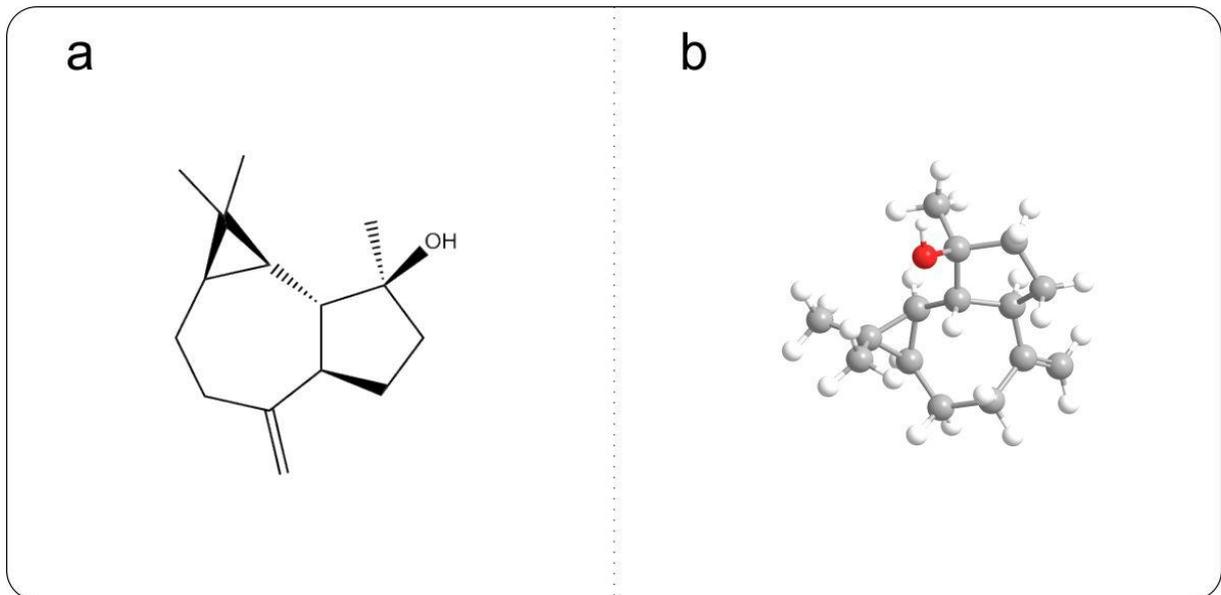
antiaterogênico, antioxidantes, bem como a atividade biocida de várias pragas de alimentos (ZIELINSKA; MATKOWSKI, 2014).

O gênero *Croton*, Euphorbiaceae, é encontrado de forma geral na região Nordeste do Brasil, principalmente na caatinga (vegetação semiárida) e apresenta um perfil de atividades biológicas e uso popular. Várias atividades biológicas, incluindo anti-inflamatória, antinociceptiva, e gastroprotetora, do óleo essencial obtido a partir deste gênero foram relatadas em vários modelos animais (BIGHETTI et al., 1999;CAVALCANTI et al., 2012;COELHO DE SOUZA et al., 2013;SIQUEIRA et al., 2006). O óleo essencial da espécie *Croton argyrophyllus* apresenta atividade anti-inflamatória, que por sua vez pode estar relacionada à sua capacidade antioxidante. Dentre os seus quarenta e dois componentes, o biciclogermacreno (14,60%) e espatulenol (8,27%) eram os mais abundantes (RAMOS et al., 2013). Entretanto a atividade anti-inflamatória desses componentes é desconhecida, mas o potencial anti-inflamatório de terpenos tem sido descrito (BASTOS et al., 2011;BENTO et al., 2011;CHAVAN et al., 2010;FERNANDES et al., 2007;PEANA et al., 2002;RIELLA et al., 2012).

Normalmente as atividades biológicas dos óleos essenciais são apresentadas pelos seus componentes principais, porém os componentes minoritários podem modular essa atividade (BASTOS et al., 2011;BENTO et al., 2011;CHAVAN et al., 2010;FERNANDES et al., 2007;PEANA et al., 2002;RAMOS et al., 2013;RIELLA et al., 2012).

O espatulenol é um sesquiterpenóide oxigenado, com fórmula molecular $C_{15}H_{23}O$. Sua fórmula estrutural e imagem em modelo de bola e bastão podem ser visualizadas na Figura 2.

Figura 2 – Fórmula estrutural (a) e em bola e bastão (b) do Epatulenol.



Fonte – autora.

3.4 Inflamação e Ciclooxygenases

Farmacologicamente, o entendimento de cada elemento de transdução de sinal de circuitos integrados que controlam crescimento, sobrevivência e diferenciação celular mostra potenciais alvos para fármacos que seletivamente possam atuar em estados patológicos. Nesses casos, esses elementos sinalizadores estão frequentemente modificados ou superexpressos, como no caso da inflamação patológica. Para se verificar a complexidade das redes de sinalização é preciso o entendimento da integração de receptores, efetores, alvos e proteínas estruturais e, dessa forma se poderá compreender o fundamento de alvos terapêuticos que podem ser modificados com fármacos (KESTER; VRANA; KARPA, 2012).

A inflamação, um processo imprescindível para manutenção da homeostase do organismo, correlaciona-se com o processo oxidante, principalmente porque compartilha caminhos semelhantes (KUNSCH; MEDFORD, 1999). Alterações como superexpressão nesses mecanismos podem favorecer o desenvolvimento de várias doenças que podem estar relacionadas com o câncer, distúrbios isquêmicos e demência (HARPUR et al., 2012). O uso de produtos vegetais com conhecidas propriedades anti-inflamatórias e/ou antioxidantes pode ser de grande importância na terapêutica dos anti-inflamatórios (RAMOS et al., 2013).

A capacidade de desencadear uma resposta inflamatória é essencial para a sobrevivência em vista do combate aos patógenos e da reparação de lesões, embora, em algumas situações e doenças, a resposta inflamatória possa ser exagerada e duradoura, não trazendo qualquer benefício aparente (BRUNTON, L.L; LAZO, J.S; PARKER, K.L. , 2005). A reação inflamatória aguda refere-se aos eventos desencadeados nos tecidos por uma resposta imune ou traumas mecânicos. Embora sejam respostas protetoras, se desenvolvidas inapropriadamente tornam-se prejudiciais. Muitas das doenças que precisam de tratamento farmacológico envolvem os processos inflamatórios que para serem combatidos necessitam de uma compreensão da reação inflamatória patológica (RANG et al., 2011).

Para enfrentar a invasão por um patógeno, o organismo apresenta respostas de defesa e é a organização dessas respostas para combater o causador da doença que constitui a reação inflamatória/imunológica aguda. Na diminuição dessas defesas (como por exemplo, na síndrome da imunodeficiência adquirida, AIDS), certos organismos, que normalmente não são patógenos, podem causar doenças, as chamadas infecções oportunistas. Contudo, em alguns casos, essas reações de defesa também podem ser desencadeadas por substâncias químicas, calor, etc. Em outras circunstâncias, podem atuar inapropriadamente contra substâncias inócuas externas ao corpo (como o pólen) ou contra os próprios tecidos do corpo (em distúrbios autoimunes). Quando esse fato acontece, as próprias respostas podem provocar lesão e, na verdade, podem passar a constituir parte do processo mórbido (de forma aguda, como na anafilaxia, ou cronicamente, como na artrite reumatoide, na asma ou na aterosclerose). Agentes anti-inflamatórios ou imunossupressores são utilizados para esses tipos de condições. A compreensão dos mecanismos de ação e dos usos clínicos dos fármacos que afetam a resposta inflamatória e imunológica depende de um estudo da maneira segundo o qual as células e os mediadores interagem entre si, uma vez que essas respostas de defesa do hospedeiro são controladas ou moduladas por uma diversidade de mediadores químicos (RANG et al., 2011).

A inflamação em pequena escala restaura o equilíbrio homeostático, combate doenças e estimula as reações de cicatrização. Entretanto, a inflamação em escala maior leva ao desenvolvimento de patologias, como doenças intestinais inflamatórias, gota, aterosclerose e, possivelmente, câncer. A compreensão dos mecanismos segundo os quais os mediadores inflamatórios regulam o dano tecidual levou à identificação de alvos farmacológicos para o desenvolvimento de fármacos que poderiam combater a inflamação. Para tratamento de

desordens inflamatórias são utilizados fármacos pertencentes a uma das seguintes categorias: antihistamínicos; AINEs e anti-inflamatórios esteroidais (glicocorticoides) (KESTER et al., 2012).

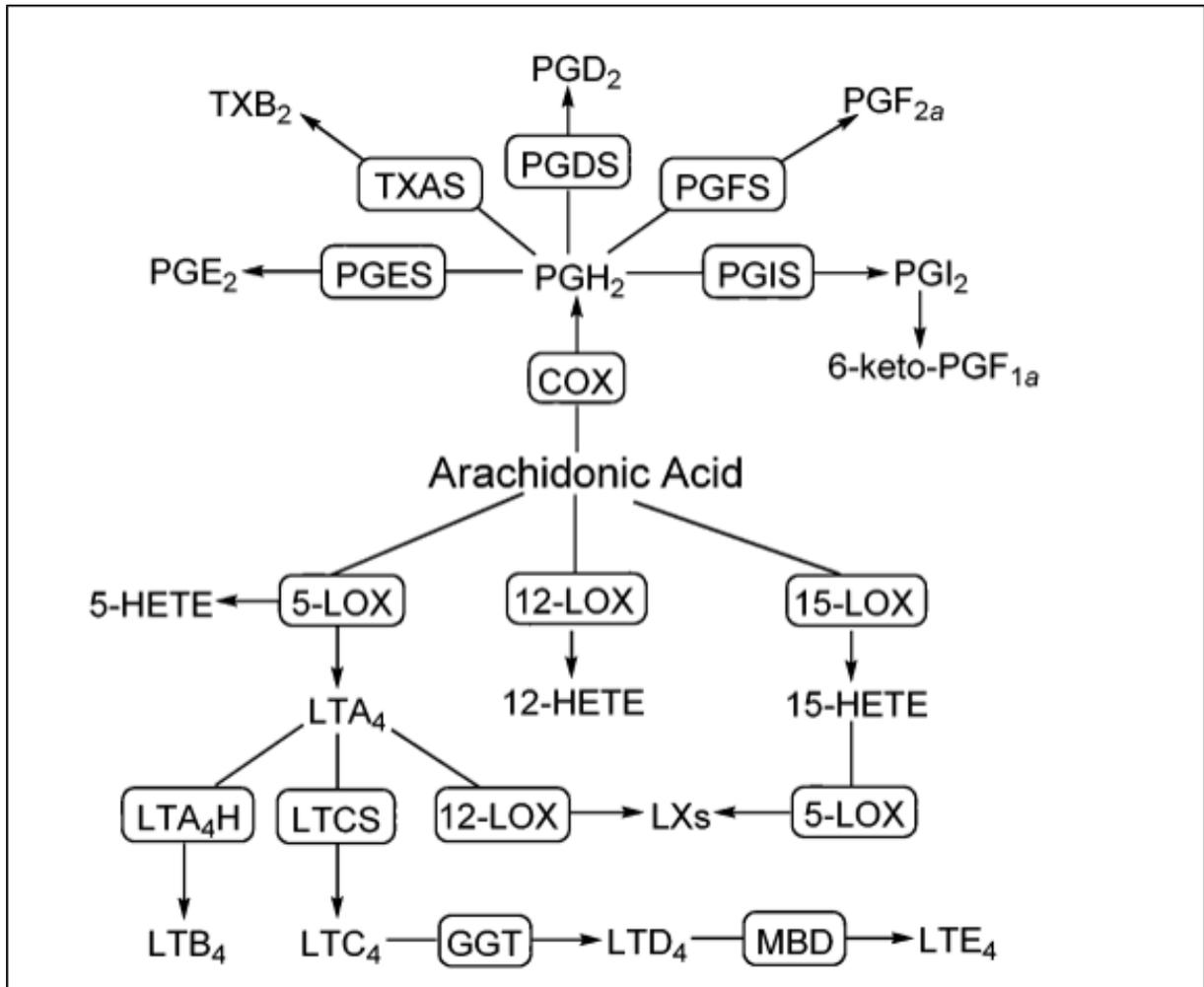
O dano tecidual causado pela inflamação gera vasodilatação, assim como outras alterações características, como aumento na permeabilidade capilar e acúmulo de células inflamatórias no local da lesão. Células de defesa, como os leucócitos, desempenham um papel central no desencadeamento dos processos inflamatórios. Mesmo assim é necessária a interação de uma variedade vasta de mediadores (p. ex., histamina, cininas, neuropeptídeos, citocinas e derivados do ácido araquidônico) para manter a resposta inflamatória. Inflamações agudas e inespecíficas são mediadas, primeiramente, por neutrófilos e macrófagos, enquanto linfócitos, basófilos e eosinófilos estão geralmente associados com respostas inflamatórias específicas e mais crônicas. Em circunstâncias normais, a inflamação se localiza em uma região, não é duradoura e se reverte espontaneamente, todavia uma inflamação persistente indica um estado patológico continuado (KESTER et al., 2012).

A inflamação é um fator de risco para inúmeras doenças, como a doença inflamatória intestinal (DII), asma crônica, artrite reumatoide, esclerose múltipla e psoríase. Bloqueá-la torna-se indispensável para o controle dessas doenças. Produtos naturais apontam para a supressão dessa inflamação, controlando a DII. Estudos *in vivo* e/ou *in vitro* mostram que esses efeitos anti-inflamatórios dos produtos naturais acontecem pela supressão da expressão de citocinas pró-inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral α (*Tumor Necrosis Factor Alpha*, TNF- α), moléculas de adesão intercelular e mediadores pró-inflamatórios, tais como o óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e COX-2, fatores de transcrição nuclear-kB (NF-kB), espécies reativas de oxigênio (*Reactive Oxygen Species*, ROS), além de melhorar a atividade antioxidante (DEBNATH; KIM; LIM, 2013).

O ácido araquidônico é um ácido graxo com 20 átomos de carbono liberado a partir de fosfolípidios da membrana celular em decorrência da ação da enzima fosfolipase A2, que pode ser ativada por estímulos diversos, como químico, inflamatório ou traumático (BRUNTON, L.L et al., 2005) (KUMMER; COELHO, 2002). A enzima Prostaglandina G/H sintase (PG G/H sintase) ou COX possui dois sítios catalíticos que origina compostos distintos. O sítio ciclooxygenase converte o ácido araquidônico em Prostaglandina G₂ (PGG₂) que é reduzida em Prostaglandina H₂ (PGH₂) pelo sítio peroxidase, que não apresenta inibição pelos AINEs (BROOKS et al., 1999). A PGH₂ é convertida pelas isomerases específicas dos

tecidos em vários prostanóides (tromboxanos e prostaglandinas) (DUBOIS et al., 1998). O ácido araquidônico, precursor de eicosanoides, também pode ser metabolizado por lipoxigenases, além da COX, produzindo leucotrienos, ou por epoxigenases produzindo ácidos hidroxieicosatrienóicos (HETEs) (KESTER et al., 2012). Na Figura 3 observam-se os principais eicosanoides sintetizados pelas vias da COX e LOX.

Figura 3 – Principais eicosanoides sintetizados pelas vias da COX e LOX.



Legenda: COX= ciclooxigenase; GGT= g-glutamyl transpeptidase; LTA₄= leucotrienes A₄; LTA₄H= leucotriene A₄ hydrolase; LTB₄= leucotriene B₄; LTC₄= leucotriene C₄; LTCS= leucotriene C₄ synthase; LTD₄= leucotriene D₄; LTE₄= leucotriene E₄; LXs = lipoxins; MBD= membrane-bound dipeptidase; PGD₂= prostaglandin D₂; PGDS= prostaglandin D synthase; PGE₂= prostaglandin E₂; PGES= prostaglandin E synthase; PGF_{2α}= prostaglandin F_{2α}; PGFS= prostaglandin F reductase; PGH₂= prostaglandin H₂; PGI₂= prostacyclin; PGIS= prostaglandin I synthase; TXAS= thromboxane A synthase; TXB₂= thromboxane B₂; 6-ketoPGF_{1α}= 6-keto-prostaglandin F_{1α}; 5-LOX= 5-lipoxygenase; 12-LOX= 12-lipoxygenase; 15LOX= 15-lipoxygenase; 5-HETE= 5-hydroxyeicosatetraenoic acid; 12-HETE= 12-hydroxyeicosatetraenoic acid; 15-HETE= 15-hydroxyeicosatetraenoic acid.

Fonte – (HE et al., 2012).

As PGs podem atuar de modo parácrino ou autócrino através das classes de receptores de membrana ligados à proteína G e os receptores nucleares PPAR (*Peroxisome Proliferator Activated Receptors*) (DUBOIS et al., 1998) e é por essa variedade de receptores específicos que se tem a diversidade clínica de ação das PGs, na inflamação, mas também na coagulação do sangue, metabolismo ósseo, função renal e respostas imunes, dentre outras atuações. Por causa desse papel importante nos processos fisiológicos, não são de surpreender os inúmeros efeitos colaterais de terapias à base de AINEs (KUMMER; COELHO, 2002) e da importância de se isolar ou sintetizar compostos que tenham atividade semelhante aos AINEs sem os seus efeitos colaterais característicos.

Os AINEs apresentam um amplo espectro de indicações terapêuticas, tais como analgesia, anti-inflamação, antipirese e profilaxia contra doenças cardiovasculares (DUBOIS et al., 1998). Vane, importante farmacologista, foi quem primeiro propôs que os efeitos, tanto terapêuticos quanto colaterais, dos AINEs eram resultantes da inibição da COX por estes compostos (VANE, 1971). Dessa forma, reduziriam a formação de prostaglandinas, diminuindo a intensidade da inflamação (DAHL;RAEDER, 2000;YAKSH et al., 2001).

Tempos depois da identificação da COX é que se teve uma maior compreensão de suas funções (VANE, 1971). Esse impulso na pesquisa está relacionado à comprovação da eficácia dos AINEs em diversas indicações terapêuticas, porém com importantes efeitos colaterais, principalmente os gastrointestinais (KUMMER; COELHO, 2002). Esse termo COX relaciona-se ao seu proposto mecanismo de ação resultar em produtos como peróxidos bicíclicos (endoperóxidos) a partir da oxigenação de ácidos graxos polinsaturados (MARNETT et al., 1999). Há duas isoformas homólogas da COX, a COX-1 e a COX-2 (JONES, R., 2001). A COX-1, ou constitutiva, foi encontrada em quase todos os tecidos normais (DUBOIS et al., 1998), já a COX-2, denominada indutiva, não foi detectada, ou foi encontrada em baixos níveis, em tecidos normais, apresentando maior expressão em presença de citocinas, fatores de crescimento e estimulantes tumorais (FITZGERALD; PATRONO, 2001).

Mesmo com um percentual de 60% homólogas, com mesmo peso molecular de 70KD e semelhantes mecanismos de metabolização do ácido araquidônico (SCHONBECK et al., 1999), essas enzimas apresentam diferenças tais como: sequência genética distinta para cada isoforma, apesar da reação enzimática catalisada por elas ser idêntica (DUBOIS et al., 1998;REDDY;HERSCHMAN, 1996); o sítio de ligação do agente inibidor da COX-2 é

estruturalmente cerca de 25% maior que o da COX-1 (BROOKS et al., 1999), além de conter dois locais de ligação, o sítio catalítico e um local de ligação secundário, permitindo assim o desenvolvimento de agentes que bloqueiam especificamente a COX-2 em concentrações que apresentam mínimos efeitos sobre a COX-1 (LIPSKY et al., 2000).

Os detalhes da ligação dos AINEs ao sítio ativo da COX-1 e COX-2 têm sido esclarecidos através da cristalografia de raios-x (DUGGAN et al., 2010; KURUMBAIL et al., 1996; LOLL; PICOT; GARAVITO, 1995; ROWLINSON et al., 2003; SELINSKY et al., 2001). Assim observa-se que os AINEs clássicos comumente ligam-se à COX por interações iônicas entre o grupo carboxilato dos AINEs e a cadeia lateral de Arg-120 e por meio de interações de ligação de hidrogênio com a cadeia lateral de Tyr-355, resíduos esses situados na base do sítio ativo da enzima (KURUMBAIL et al., 1996; LOLL et al., 1995). Em contrapartida, as ligações de hidrogênio pelo carboxilato do diclofenaco são feitas com o resíduo Tyr-385, bem como com Ser-530, no ápice do sítio ativo. Tanto o primeiro, quanto o segundo modo de ligação são visualizados na interação do ácido araquidônico no sítio ativo da COX-2 (ROWLINSON et al., 2003).

Fisiologicamente, a COX-1 tem bastante expressividade no trato gastrointestinal, na geração da PG E2 citoprotetora, dentre outras funções. Ela está envolta em inúmeras condições patológicas, como a trombose e a aterosclerose, além de ser o alvo de um dos mais eficazes fármacos clínicos antitrombóticos para prevenção de eventos cardiovasculares, a aspirina. Pesquisas como a síntese, caracterização farmacológica e análise por docagem de uma família de diaril-isoxazóis, mostra a importância da pesquisa por agentes antitrombóticos para prevenção de patologias cardiovasculares (VITALE et al., 2013).

Ao surgimento de um quadro inflamatório, a atividade da isoforma COX-1 não parece ser alterada ou apresenta um aumento discreto de 2 a 4 vezes na sua expressão (DUBOIS et al., 1998). Em menores quantidades, a COX-2 encontra-se em determinados tecidos como o cérebro, intestinos, testículos, rins (BEEJAY; WOLFE, 1999) e diante de uma inflamação, sua expressão é aumentada cerca de 20 vezes ou até mais (KUMMER; COELHO, 2002). Ela é capaz de atuar no metabolismo do ácido araquidônico e de outras substâncias tais como o ácido linolênico e ácido linoleico (SCHONBECK et al., 1999).

Foi proposta a existência de uma terceira isoforma desta família de enzimas, a COX-3, que diferentemente das isoformas anteriores, não produziria prostanóides pró-inflamatórios,

mas sim substâncias anti-inflamatórias (WILLOUGHBY; MOORE; COLVILLE-NASH, 2000).

De maneira geral, os AINEs inibem, de forma variável, as duas isoformas COX-1 e COX-2, em dosagens terapêuticas. Assim passaram a ser caracterizados conforme sua capacidade de inibição da COX-1 e COX-2. Contudo, se um determinado anti-inflamatório inibe somente a COX-2, ele é chamado de agente inibidor seletivo da COX-2, sem interferência na COX-1. Para esses agentes foi usada a denominação coxibs, uma esperança de melhor eficácia com menos efeitos colaterais. Entretanto persistem os potenciais efeitos adversos na função renal, sintomas gastrointestinais e prováveis consequências cardiovasculares e na fertilidade (KUMMER; COELHO, 2002).

Os AINEs têm aplicação clínica principal como anti-inflamatórios no tratamento dos distúrbios musculoesqueléticos, como artrite reumatoide, osteoartrite e espondilite anquilosante, entretanto, em geral, eles proporcionam somente alívio sintomático da dor e inflamação associados à enfermidade e não interrompem o desenvolvimento da lesão patológica tecidual (BRUNTON, L.L et al., 2005).

Diclofenaco, flurbiprofeno, meloxicam e celecoxib são exemplos de AINEs. Diclofenaco e flurbiprofeno são fármacos que atuam em ambas as COX, portanto inibidores reversíveis não seletivos ou não específicos da COX (BRUNTON, L.L et al., 2005). São fármacos não específicos que ao inibir a atividade da COX impedem a formação tanto de prostaglandinas quanto de tromboxanos (KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2009), já o meloxicam e o celecoxib são fármacos seletivos da COX (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2011).

O flurbiprofeno, juntamente com outros fármacos, ibuprofeno e naproxeno, são um grupo semelhante de fármacos, derivados do ácido propiônico, úteis e eficazes, mas que compartilham junto com outros AINEs efeitos indesejáveis. São utilizados, por exemplo, para artrite reumatoide e osteoartrite. O ibuprofeno foi o primeiro AINE derivado desse ácido a ser aprovado para uso geral. Todos os fármacos citados são eficazes na inibição da COX, embora apresente diferença em termos de potência. Todos podem causar toxicidade gástrica, contudo são efeitos menos graves do que os do ácido acetilsalicílico.

Todos os AINEs apresentam eficácia semelhante salvo algumas exceções, dessa forma tendem a ser diferenciados pela sua toxicidade e custo (KATZUNG et al., 2009). Em um estudo observou-se, por exemplo, que o índice de toxicidade de fármacos como o

ibuprofeno e aspirina são menores do que o da indometacina (FRIES, 1993) que é um derivado indólico usado em condições reumáticas, gota e espondilite anquilosante. Foi constatado também ser o ibuprofeno tão eficaz quanto à indometacina para esta última indicação, com a vantagem de apresentar uma menor toxicidade (KATZUNG et al., 2009).

A aspirina foi o fármaco padrão segundo o qual se era comparado todos os AINEs até o surgimento do ibuprofeno, de baixo custo, tão eficaz quanto à aspirina e mais seguro que ela (KATZUNG et al., 2009).

O diclofenaco apresenta atividade antipirética, analgésica e anti-inflamatória, sendo um poderoso inibidor da COX, mais potente do que o naproxeno. Apesar de seus efeitos colaterais (principalmente relacionados a problemas gastrointestinais), o diclofenaco é utilizado nos EUA para tratamento em longo prazo da artrite reumatoide ou osteoartrite (BRUNTON, L.L et al., 2005). Já o flurbiprofeno, sua farmacologia, terapêutica e efeitos adversos, se comparados ao de outros anti-inflamatórios, são semelhantes aos derivados do ácido propiônico (BRUNTON, L.L et al., 2005). Ele é comumente utilizado para tratar a dor aguda e crônica (SULTAN et al., 2009) restaurando a função mitocondrial e protegendo as células de lesão de isquemia/reperfusão hepática (FU et al., 2012).

O meloxicam é um derivado dos ácidos enólicos (oxicans) que, com base em estudos *in vitro*, foi sugerido ser um inibidor mais seletivo da COX-2. Foram observados, clinicamente, menos efeitos colaterais gastrintestinais com o meloxicam que com os inibidores não-seletivos da COX. Em conjunto, a extensão da inibição da COX-1 pelo meloxicam representa uma função da dose e variabilidade interpessoal dos níveis do fármaco (BRUNTON, L.L et al., 2005).

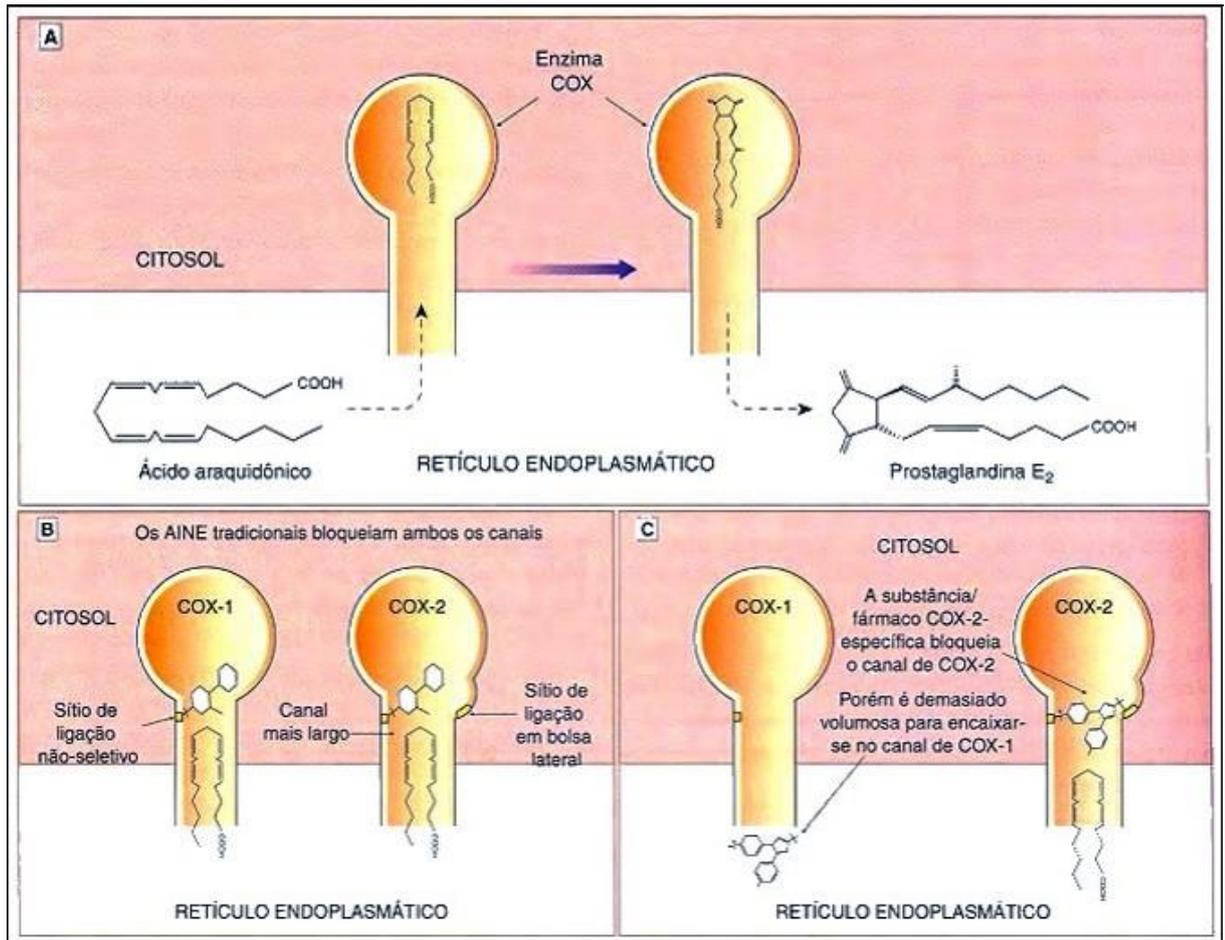
A busca de uma estratégia terapêutica mais segura levou ao desenvolvimento de inibidores COX-2 seletivos (KHANNA et al., 1997) e ao reconhecimento fármacos, que também possuem alto grau de seletividade para inibição COX-2 e toxicidade gástrica muito baixa, como etodolaco e nimesulida (BRUNTON, L.L et al., 2005).

Celecoxib é um derivado pirazólico pertencente à classe dos 1,2-difenil-heterocíclicos, primeiro dos coxibs a ser aprovado pela *Food and Drug Administration* FDA (WHELTON, 2001) e que não apresenta nenhum dano tóxico para a mucosa intestinal (FORNAI et al., 2014). Dentre os coxibs, o celecoxib é o único aprovado nos EUA, enquanto que o etoricoxibe é aprovado em vários países e o rofecoxibe e valdecoxibe foram retirados de circulação em todo o mundo (BRUNTON et al., 2011).

O SC-558 é uma substância que demonstra a importância do planejamento de fármacos seletivos. SC-558 é o 1-fenilsulfonamida-3-trifluormetil-5-parabromofenilpirazol (LESK, 2005), um derivado pirazólico pertencente à mesma classe do celecoxib e diferindo dele apenas por um átomo de bromo que possui a mais em sua molécula (KURUMBAIL et al., 1996). É um inibidor diaril-heterocíclico com uma seletividade de 1.900 vezes para a COX-2 em relação a COX-1. Ele apresenta-se com um anel pirazol central e um substituinte sulfonamida ligado a um dos anéis aril. A sulfonamida do SC-558 se estende para dentro de uma fenda do sítio de ligação da COX-2, interagindo com His- 90, Gln-192 e Arg-513 da COX-2. Há, contudo, uma fenda semelhante em COX-1, mas não sendo acessível pela substituição da Val-523 pelo Ile-523, que é mais volumoso, ou seja, não pode inibir a COX-1 por impedimento estérico com a cadeia lateral da isoleucina, que corresponde à valina na COX-2 (LESK, 2005). Esse mesmo local do sítio da COX-2 não é ocupado no complexo COX-2 e inibidores não-seletivos (KURUMBAIL et al., 1996). O SC-558 mostra ser um eficaz anti-inflamatório em modelos de inflamação crônica, como o de edema de pata induzido por carragenina (SEIBERT et al., 1994), não apresentando ulceração gástrica mesmo em doses elevadas (VANE; BOTTING, 1995).

A Figura 4 esquematiza a ação de AINE tradicionais e seletivos. Na parte 'A' da figura, o ácido araquidônico penetra no canal da enzima COX e é convertido em Prostaglandina E₂. Na parte 'B' da figura, o flurbiprofeno bloqueia ambos os canais de COX-1 e COX-2. Em 'C', um agente seletivo é eficaz no bloqueio do canal COX-2, entretanto exerce pouco efeito sobre COX-1.

Figura 4 – Diagrama comparando a ação de AINE tradicionais e seletivos da COX.



Legenda: COX= ciclooxigenase; COX-1 e COX-2= ciclooxigenases 1 e 2.

Fonte – adaptado de (RANG et al., 2011), citado por (HAWKEY, 2001).

Uma complexa rede de sinalização com receptores, efetores, alvos e proteínas estruturais levam a séries de respostas biológicas, como coagulação sanguínea, função neuronal, secreção de prótons no estômago ou inflamação, em um organismo. A farmacodinâmica refere-se ao modo como um fármaco liga-se a um alvo específico, um receptor, que podem ser receptores citosólicos ou membranares, transportadores ou enzimas como a COX, ativando-o ou inativando suas funções e alterando suas respostas biológicas. As propriedades farmacêuticas definem a forma como os fármacos irão interagir com alvos seletivos. As companhias farmacêuticas, em um planejamento racional, utilizam-se dessas propriedades para identificar, validar, aperfeiçoar e testar os fármacos (KESTER et al., 2012). Esses últimos caracterizam-se por sua afinidade, eficácia, especificidade e potência. A afinidade refere-se à capacidade do fármaco para interagir ou ligar-se ao seu alvo, a eficácia, determinada pelas propriedades do fármaco e seu sistema receptor-efetor (BRUNTON et al.,

2011), é a capacidade de o fármaco interagir com seu alvo e proporcionar uma resposta biológica, a seletividade está relacionada à interação de um fármaco com seu receptor, a especificidade, à interação preferencial com uma classe ou único subtipo de receptor e a potência compara a eficácia de fármacos que atuam através do mesmo receptor, isto é, aquele fármaco que alcança o mesmo efeito biológico com uma menor concentração é o mais potente (KESTER et al., 2012).

Quanto maior a afinidade, mais intensa é a ligação do fármaco ao receptor. Essa afinidade é medida pela constante de dissociação do complexo fármaco-receptor, ou seja, quanto menor a constante de dissociação do fármaco, maior é a afinidade do fármaco para seu receptor (KESTER et al., 2012). A capacidade inibitória de um ligante pode ser expressa pela constante inibitória (K_i) que é a constante de equilíbrio de dissociação do complexo Enzima-Inibidor (NOWICKI; SCATTON, 2008). Quanto mais potente o inibidor, menor será seu K_i e mais afinidade terá. Os inibidores considerados potentes apresentam valores de K_i na ordem de 10^{-9} M, embora sejam mencionados casos de até 10^{-15} M (BUTINI et al., 2008; LEWIS et al., 2002). É justamente essa afinidade que é observada no processo de docagem molecular.

3.5 Bioinformática e fármacos

A bioinformática é uma ciência aplicada que surgiu com a união entre biologia e ciência da computação onde, utilizando-se de programas de computador, se faz inferências a partir de dados provenientes da biologia molecular moderna, conexões entre eles, e deriva previsões relevantes (LESK, 2005). Ela pode ser dividida em bioinformática tradicional ou clássica, que abrange problemas relacionados a sequências de nucleotídeos e aminoácidos, e a estrutural, incluindo a maior parte das técnicas compreendidas pela química computacional ou modelagem molecular. Essa ciência moderna emprega ferramentas computacionais para o estudo de problemas e questões biológicas, compreendendo também aplicações relativas à saúde humana, como o planejamento de fármacos (VERLI, 2014).

O grande momento para a bioinformática foi em 1950, onde várias contribuições imprescindíveis para a compreensão de moléculas biológicas e suas funções surgiram, como o trabalho da estrutura em hélice da molécula de Ácido desoxirribonucleico (DNA) por Watson e Crick (WATSON; CRICK, 1953), o que permitiu entender como as sequências de letras do código genético se organizam tridimensionalmente. Além desse, outros trabalhos foram

importantes para elucidação da estrutura tridimensional de proteínas. Atualmente, o que se entende por bioinformática se deve, dentre outros autores, a Dra. Dayhoff com a sistematização do conhecimento sobre a estrutura tridimensional das proteínas. Ela foi uma das pioneiras do uso de computadores para o estudo de biomoléculas. Em relação a essas últimas, é importante destacar que os ácidos nucleicos e proteínas receberam maior atenção em termos de alvos na bioinformática tradicional, entretanto as diferentes biomoléculas (membranas e carboidratos, por exemplo) são importantes na informação genética, servindo como alvo na modulação farmacológica ou emprego biotecnológico, e estão se tornando um alvo da bioinformática (VERLI, 2014).

A cada ano, problemas cada vez mais complexos são abordados de uma forma melhor, além de haver uma constante atualização e renovação dos procedimentos computacionais. Unindo-se à bioinformática, a biologia molecular favorece o desenvolvimento de medidas terapêuticas ou de prevenção em combate a agentes infecciosos ou tumores (LESK, 2005; VOIT; RADIVOYEVITCH, 2000). Avanços na manipulação e terapia gênica possibilitam a identificação detalhada de novos genes bem como da forma como são regulados contribuindo para a área médica (HERZEL et al., 2001). Com o projeto genoma humano e de outros organismos criou-se inúmeras sequências de genes em que suas relações evolutivas e funcionais necessitam de elucidação para, por exemplo, a terapêutica. Assim, organismos evolutivamente bastante distantes dos humanos, como bactérias e plantas, podem ser candidatos a receptor alvo de fármacos (VERLI, 2014).

As etapas para obtenção de novos fármacos é um processo longo e de alto custo. É dividido em duas grandes fases: descoberta (pré-clínica ou pesquisa básica) e desenvolvimento (ou clínica) (LOMBARDINO; LOWE, 2004). Inicialmente, as pesquisas se concentram geralmente na identificação e otimização de moléculas pequenas capazes de representar Novas Entidades Químicas (*New Chemical Entities*, NCE) com potencial de desenvolvimento clínico. A validação do alvo molecular selecionado é indispensável por uma porção de motivos que vão desde o estabelecimento de sua relevância no processo fisiopatológico alvo do estudo até a caracterização do impacto de sua modulação seletiva no tratamento ou na cura de doenças ou disfunções em humanos (GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010).

A identificação de um ou mais compostos líderes (substância que apresenta atividade biológica) é um dos objetivos no princípio do desenvolvimento de fármacos. Uma das

maneiras de se obter esses compostos é através da triagem e planejamento computacional. A computação e o encontro rápido de informações contribuem nos diversos passos dos projetos de descobrir e desenvolver fármacos como a identificação da molécula-alvo e melhoramento de ligantes (LESK, 2005).

3.6 Docagem molecular

Docagem constitui um termo usado em metodologias computacionais que tentam prever a estrutura do complexo intermolecular, um receptor e seu ligante (SOUSA; FERNANDES; RAMOS, 2006). A docagem, ou atracamento, molecular assim como a modelagem molecular fazem parte de estudos da bioinformática para a descoberta e desenvolvimento de substâncias de interesse farmacológico. Na docagem observa-se a identificação do sítio de ligação na proteína, a determinação da posição e orientação do ligante, e a determinação da afinidade da ligação. A docagem de pequenas moléculas exige o ajuste do ligante em uma região de uma proteína de estrutura conhecida. A região ou sítio de ligação deve ser conhecida, senão será preciso testar muitos modos de ligação diferentes entre ligante e proteína para a predição do melhor sítio de ligação (LESK, 2005).

As metodologias computacionais de docagem molecular se baseiam no modelo de chave-fechadura, proposto por Fischer em 1894 (FISCHER, 1894), em que a proteína ou receptor proteico é a fechadura e o ligante é a chave que irá ou não interagir com a proteína. É importante salientar que essa fechadura não é rígida e no meio biológico, tanto o ligante quanto a proteína são flexíveis, podendo alterar sua conformação durante a formação do complexo receptor-ligante. O reconhecimento proteína-ligante se dá através de características físico-químicas e estruturais das moléculas que fazem interação (VERLI, 2014)

A base da docagem molecular é o conhecimento da complementaridade em tamanho, forma, distribuição de carga, polaridade e potencial para interações iônicas, hidrofóbicas e ligações de hidrogênio. O que pode complicar é a possibilidade de ambas as partes serem flexíveis, o que torna melhor o trabalho com estruturas moleculares dotadas de anéis. Outra dificuldade também são moléculas de água nas interfaces, pois podem fazer parte da complementaridade da superfície e realizar interações entre a proteína alvo e o ligante por meio de ligações de hidrogênio. Outro aspecto importante de se observar é que várias proteínas mudam sua conformação em face da ligação com o ligante, assim a estrutura

experimental de uma proteína não-ligada não deve ser considerada como um alvo flexível para a docagem. Como é difícil prever as afinidades absolutas, a docagem molecular comparativa pode dar informações sobre as afinidades relativas de ligantes e/ou do ligante a várias proteínas podendo cogitar a especificidade da interação (LESK, 2005).

O reconhecimento molecular proteína-ligante é regido pela combinação de efeitos entálpicos e entrópicos estimados pela energia de ligação de Gibbs. Essa energia pode ser obtida por meio de métodos teóricos como o de Perturbação da energia livre (PEL) e o de Integração termodinâmica (IT), em que é calculada a diferença entre energias livres de ligação entre ligantes similares. Um estudo de reconhecimento molecular exige que seja preparado o sistema, isto é, a proteína e o ligante. É necessária a obtenção das coordenadas das estruturas tridimensionais das moléculas que fazem parte do complexo e a observação da localização do sítio ativo da enzima estudada (VERLI, 2014).

Da década de 80 em diante foram desenvolvidos algoritmos de docagem rígida, onde tanto o ligante quanto o receptor funcionavam como corpos rígidos e apenas seis graus de liberdade rotacionais e translacionais eram explorados. Posterior a esses primeiros algoritmos, vieram a ser desenvolvidos os algoritmos de docagem flexível, apresentando o ligante flexível e receptor rígido, de acordo com a teoria da chave-fechadura, além de novos graus de liberdade, os conformacionais, acrescido dos dois citados anteriormente para os algoritmos de docagem rígidos. Em seguida, vieram os algoritmos que tratavam o ligante como flexível e o receptor podendo ser parcialmente ou completamente flexível, de acordo com a teoria do encaixe induzido. Para que na docagem, os algoritmos de simulação promovam a investigação de uma complexa superfície possibilitando a previsão da orientação e conformação do ligante no sítio de ligação do receptor, há a utilização de uma função de busca (GANI, 2007; KITCHEN et al., 2004).

Há diversos programas de docagem molecular como o *EADock DSS* e *AutoDock* e esses se diferenciam principalmente pelo método de busca e pela função de avaliação de afinidade utilizada. Os métodos de busca dos programas de docagem molecular podem ser classificados em três categorias: métodos de busca sistemáticos, determinística e estocástica. No primeiro, um conjunto de valores é estabelecido para cada grau de liberdade. No segundo método de busca, um mesmo estado inicial de entrada resulta sempre no mesmo resultado de saída. Métodos de simulação por dinâmica molecular e métodos clássicos de minimização de energia são exemplos de métodos de busca determinística. Já no terceiro tipo de método de

busca, a estocástica, no processo de otimização há movimentos aleatórios associados aos graus de liberdade que implica na possibilidade de originar diferentes resultados como saída para um mesmo estado inicial de entrada. Monte Carlo e Algoritmos Evolucionistas (inspirados no processo biológico evolucionista de populações e abrangem vários tipos de algoritmos incluindo Algoritmos Genéticos, Estratégias de Evolução e Evolução Diferencial. Os Algoritmos Genéticos baseiam-se no princípio biológico de sobrevivência dos mais adaptados proposto por Darwin em sua teoria da evolução. Nele, trabalha-se com uma população de indivíduos, onde cada indivíduo ilustra uma possível solução para o problema trabalhado. A cada nova geração, novos indivíduos são originados por meio de recombinações e mutações, processo repetido até que a população evolua para as melhores soluções ou mínimo global de energia. No entanto, essas melhores soluções podem ficar presas em mínimos locais) são exemplos desse último tipo de busca mais usados por programas como *Prodock* e *Autodock*. A utilização dos métodos de busca resulta em inúmeras conformações do ligante. As funções de avaliação combinadas a esses métodos avaliam a qualidade dessas conformações, ordenando-as conforme sua afinidade pelo receptor. As funções de avaliação ou pontuação na docagem molecular receptor-ligante podem ser de três tipos: baseadas em campo de força, empíricas e baseadas em conhecimento. Com a finalidade de se avaliar a eficácia das funções de busca estratégica e pontuação são feitas docagem de validação, ou *redocking*, onde o ligante de um complexo ligante-receptor é removido da estrutura cristalográfica obtida experimentalmente e os dois são submetidos à docagem. Com os desvios médios quadráticos (*Root Mean Square Deviation*, RMSD) do ligante obtido quando comparado ao ligante cristalográfico da estrutura utilizada é avaliada a eficácia da função de busca, sendo consensual que um RMSD inferior a 2 Å é necessário para a validação da metodologia utilizada. (PLEWCZYNSKI et al., 2011; VERLI, 2014).

Em termos de programas de docagem, vários trabalhos já foram publicados em relação a avaliação comparativa de funções de busca e/ou de pontuação, dentre eles, um que avaliou sete programas de docagem sobre 1300 complexos, relatando que os programas que utilizam o algoritmo genético na busca, *GOLD* (JONES, G. et al., 1997) e *AutoDock* demonstraram ter mais habilidade que os outros no posicionamento do ligante no sítio, entretanto as funções de pontuação dos programas em geral apresentaram desempenho ruim (PLEWCZYNSKI et al., 2011).

Em busca de acelerar o processo de desenvolvimento de fármacos, as empresas farmacêuticas investem na geração de algoritmos de simulação para testar milhares de ligantes sobre a estrutura do alvo em um intervalo de tempo pequeno e custo reduzido. A docagem (ancoramento) molecular é o método que busca prevê a geometria e energia do encaixe do ligante no sítio ativo do receptor utilizando algoritmos de simulação (KITCHEN et al., 2004). A flexibilidade da proteína é um aspecto de relevância no planejamento racional de fármacos com base na estrutura do receptor biológico e um desafio para quem trabalha com docagem molecular devido à grande quantidade de graus de liberdade que precisam ser considerados, principalmente relacionados aos graus de liberdade dos movimentos peptídicos e das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos da proteína (VERLI, 2014).

Docagem molecular e caracterização de fluorescência de uma classe de inibidores da COX-2 demonstraram que alguns derivados de benzotieno-[3,2-d]-pirimidina podem ser relevantes para imagens de fluorescência das células cancerosas que por sua vez, expressam a enzima COX-2. (BARONE et al., 2014). O estudo experimental do potencial anti-inflamatório do ácido graxo alfa-linolênico em inibição à COX-2 teve o uso de docagem molecular como um apoio aos métodos experimentais (ANAND; KAITHWAS, 2014), o que demonstra a importância de estudos de docagem molecular com a COX.

3.7 Química Quântica: Métodos *ab initio*

A química é uma ciência experimental que, aliada a métodos teóricos, pode fornecer informações não disponíveis experimentalmente, e/ou que servem de apoio na análise e interpretação de dados experimentais. A química teórica é dividida em quântica, com os métodos *ab initio* e semiempírico, e clássica, com a mecânica ou dinâmica molecular, por exemplo (MORGON, 2001; MORGON et al., 1995; MORGON et al., 2000). A química teórica tem estado em crescente expansão e os fenômenos químicos vem sendo cada vez mais investigados por metodologias computacionais, seja pelo avanço dos métodos teóricos, ou pelos avanços de tecnologia da informática (ARROIO et al., 2005; RIBEIRO; GRECA, 2003).

A parceria entre química experimental e teórica é observada em vários ramos da química, como na bioquímica, onde se tem a análise conformacional de grandes sistemas biológicos moleculares: macromoléculas, o estudo dos complexos enzima-substrato, além do

planejamento racional de fármacos. Cálculos de interesse químico em sistemas médios que utilizam metodologias de alto nível tais como *ab initio* e funcional da densidade refletem em acréscimo de qualidade ao trabalho experimental (MORGON, 2001).

No método *ab initio*, a energia é obtida segundo a resolução da Equação de Schrödinger partindo de um determinado conjunto de funções de bases e fazendo uso do Hamiltoniano correto sem o envolvimento de quaisquer dados experimentais, a não ser as constantes físicas fundamentais. No princípio, as funções de base eram funções de ondas semelhantes àsquelas de átomos de hidrogênio, uma vez que, neste caso, a equação de Schrödinger pode ter uma solução exata matematicamente fazendo uso de equações diferenciais. Contudo, para certos átomos e sistemas moleculares, essa equação não encontra resultados exatos e as aproximações só são conseguidas numericamente, por computador, sendo que sua qualidade ainda depende do modelo químico trabalhado, isto é, do método teórico e bases utilizadas. Esse método é limitado de modo computacional na medida em que o aumento no sistema eletrônico, na quantidade de átomos na molécula, ou no número atômico, resulta em um tempo maior para realizar um cálculo, pois aumenta o número de integrais a serem resolvidas, o que não é viável em cálculos de sistemas moleculares maiores, como sistemas enzimáticos (LEAL et al., 2010).

Para execução de um cálculo *ab initio* é preciso escolher o tipo de método ou nível de teoria e um conjunto de funções-base necessárias para o cálculo desejado. Dessa forma, é possível prever estruturas moleculares através do cálculo da energia total do sistema. Vários trabalhos utilizam-se desse método. A hidrólise neutra da formamida em solução aquosa foi investigada por métodos *ab initio* com níveis CCSD(T) (*Coupled cluster with a full treatment singles and doubles*) Cluster com Agrupamento Acoplado com tratamento completo de Simples e Duplas /6-31G(d) e MP2(Møller-Plesset de 2ª ordem) /6-311+G(2df, 2p) (ALMERINDO; PLIEGO JR, 2007). A geometria da ureia também foi estudada por métodos *ab initio*, empregando-se os conjuntos de base 6-31G e 6-311G, em nível HF (*Hartree-Fock*) e MP2 (CIRINO; BERTRAN, 2002). Cálculos por métodos *ab initio* com comparação de bases são estudados, como no trabalho do perfil de excitação Raman do anion esgarato, $C_4O_4^{-2}$, calculado por métodos *ab initio* no nível de teoria HF e Teoria de Resposta Linear (TRL) para seis frequências de excitação, com um total de cinco conjuntos de funções de base (6-31G, 6-31+G, cc-pVDZ, aug-cc-pVDZ e bases de Sadlej), objetivando comparar a funcionalidade da base 6-31G, em relação à convergência numérica dos resultados e custo

computacional, com os dos outros conjuntos de base. A base 6-31G, nesse trabalho, apresentou, em média, desempenhos similares nos resultados numéricos dos conjuntos de bases maiores, contudo com custo computacional menor, sendo apropriada em estudos teóricos dos derivados e complexos do esquarato (MIRANDA; VAZQUEZ, 2002).

Métodos clássicos e quânticos são utilizados dependendo do que, e qual a finalidade a ser trabalhada, mas também há estudos com ambos os métodos, tal como, na análise estrutural de ciclodextrinas onde, as geometrias da α , β e γ ciclodextrinas foram otimizadas com o método de Mecânica Molecular (MM2), cujo arquivo de saída serviu como arquivo de entrada para outras otimizações realizadas por métodos quânticos semiempíricos [AM1(*Austin Model 1*) e PM3(*Parameterized Model 3*)] e *ab initio* (HF/3-21G). Esse trabalho avaliou a qualidade das geometrias resultantes desses cálculos anteriores, para descrição estrutural das moléculas mencionadas (BRITTO; NASCIMENTO; SANTOS, 2004).

3.8 Mecânica Molecular

Mecânica molecular (MM) ou de Campo de Força Empírico é um método que historicamente teve início avaliando compostos orgânicos, e posteriormente inorgânicos. Seus cálculos utilizam várias equações derivadas experimentalmente para a superfície de Born-Oppenheimer e baseiam-se matematicamente em um modelo de estrutura molecular da mecânica clássica (COELHO et al., 1999).

Nesse método, empregado na modelagem molecular, calcula-se a estrutura e energia das moléculas considerando os movimentos dos núcleos, tendo os elétrons uma distribuição conforme as posições assumidas pelos núcleos, e assim, não sendo considerados diretamente nesse caso. Na aproximação de Born-Oppenheimer os núcleos, mais pesados, se movem de forma mais lenta que os elétrons. Assim, podem ser estudados de forma dissociada seus movimentos, ao tratar vibrações e rotações moleculares. Como os elétrons se movem mais rápido que o núcleo, eles assumirão conformações de acordo com o movimento dos núcleos (RODRIGUES, 2001).

A superfície de Born-Oppenheimer, ou superfície de energia potencial, é multidimensional. Ela possui mínimos locais segundo uma ou algumas conformações moleculares estáveis, onde primeiramente, a estrutura correspondente à molécula relaciona-se ao mínimo global da superfície potencial (COELHO et al., 1999).

O número ou tipos de funções de energia potencial a serem usadas segue as propriedades moleculares que se deseja reproduzir. De acordo com a função de energia potencial pode-se executar: cálculos das propriedades geométricas, das geométricas e vibracionais; geométricas e termodinâmicas; ou geométricas, vibracionais e termodinâmicas. As expressões da energia potencial podem ser originadas, basicamente, de Campos de Força Central, Campo de Força de Valência Geral e Campo de Força de Urey-Bradley (COELHO et al., 1999).

A docagem molecular faz uso da mecânica molecular na medida em que os métodos quânticos não trabalham com grandes sistemas moleculares como proteínas e produzem uma infinidade de dados que precisam ser computados (VERLI, 2014). Na MM considera-se a molécula como um modelo de esferas ligadas por molas, sendo as esferas, os núcleos, e as molas, as ligações entre os átomos das moléculas. A energia e geometria molecular são calculadas pelo campo de força, que é preparado de forma a conter um arranjo de diferentes tipos de átomos, de parâmetros para comprimento e ângulos de ligação, por exemplo, e equações para os cálculos de energia. Essa energia, que é a energia total, pode ser desmembrada em diversas partes, as forças potenciais, como as energias associadas com a deformação do comprimento, ângulo de ligação ou torção, e são calculadas independentemente (RODRIGUES, 2001).

A MM é um método de utilização das leis da física clássica e de resultados experimentais em estudos de estrutura molecular e propriedades químicas em sistemas grandes, incorporando indiretamente informações eletrônicas e por isso possuindo resultados teóricos limitados (LEAL et al., 2010).

O estudo de compostos de coordenação por mecânica molecular apresenta obstáculos, como previsão da constante de força metal-ligante que não modifique as características químicas específicas do metal e do ligante, e uma modelagem mais precisa da ligação entre o metal e o ligante. Cálculos *ab initio* e de mecânica molecular podem ser observados envolvendo os compostos de coordenação e com ótima concordância entre valores calculados e experimentais (ALMEIDA, C. H. F.; MACHUCA HERRERA; MACHADO, 2002).

Para o sucesso de um cálculo, um método pode completar outro, dessa forma, métodos de química quântica e mecânica molecular podem ser uma parceria vantajosa conhecida por QM/MM (*Quantum Mechanics/Molecular Mechanics*) Mecânica Quântica/Mecânica

Molecular, ou métodos híbridos. Em propriedades que envolvem elétrons, como a quebra e formação de ligações químicas, os métodos de mecânica molecular são falhos, o que não ocorre com métodos que fazem uso de mecânica quântica, mas por outro lado, são vantajosamente úteis no tratamento de sistemas moleculares grandes, em que não se utiliza a química quântica (COELHO et al., 1999). Em um dado estudo sobre a reação de polimerização do eteno, catalisada através de um complexo catiônico volumoso do tipo Ni(II)-a-diimina, empregou-se a combinação da teoria do funcional de densidade (DFT) e MM (FERREIRA et al., 2011).

4 MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia empregada no estudo, bem como o material utilizado para o mesmo são descritos a seguir.

4.1 Bowdenol e espatulenol

Bowdenol e espatulenol foram as substâncias escolhidos para este estudo, considerando a disponibilidade das substâncias na região do Cariri; as propriedades relatadas na literatura; a escassez/inexistência de estudos de docagem molecular com as mesmas; além de serem estruturalmente interessantes. O bowdenol por ser uma estrutura com mais ligações rotacionáveis, dessa forma mais flexível no sítio ativo da proteína, e o espatulenol por ser uma substância com poucas ligações rotacionáveis e, portanto mais rígido.

4.2 Ligantes originais

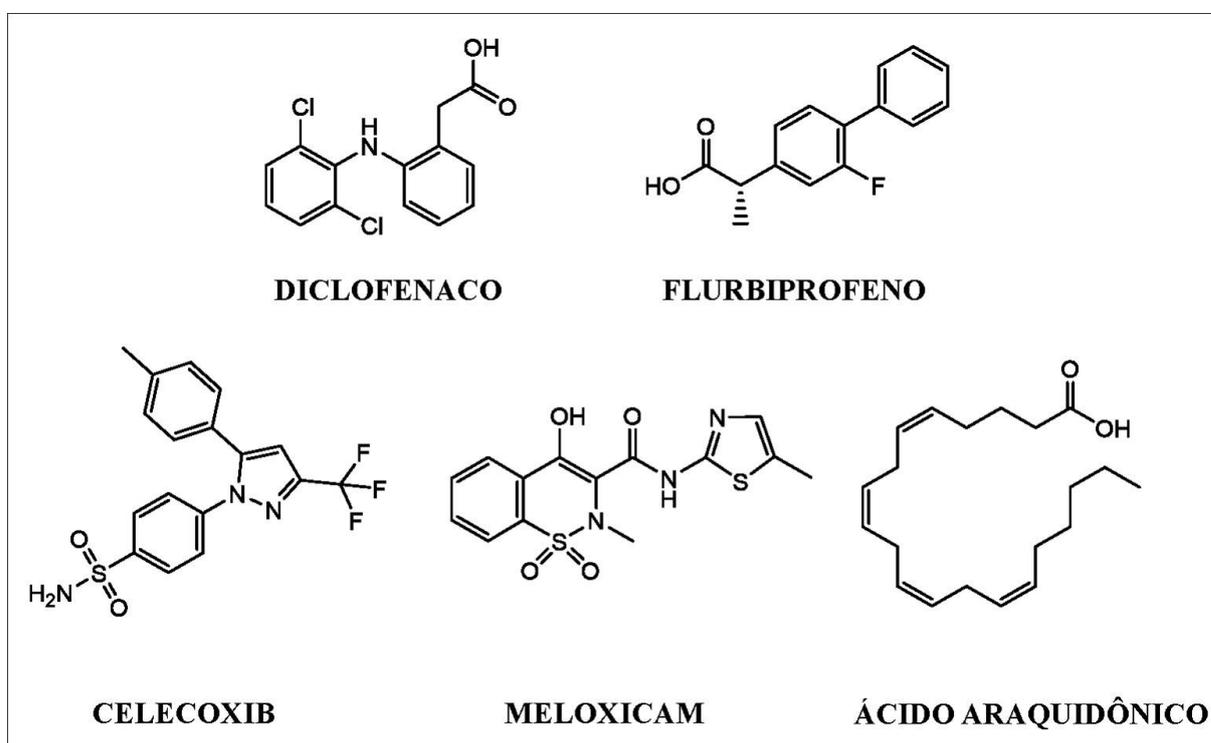
Foram selecionadas cinco estruturas de cada ciclooxigenase considerando sua disponibilidade no repositório *Protein Data Bank* (www.pdb.org), com resolução mínima de 3,0 Å, e contendo o mesmo ligante cristalizado com COX-1 e COX-2. Os identificadores (códigos pdb) das estruturas contendo os receptores, os ligantes, suas abreviaturas e resoluções estão listados na Tabela 1 e suas estruturas químicas na Figura 5. Com exceção do ácido araquidônico, que é um substrato natural das COX, todos os outros ligantes são AINEs.

Tabela 1–Identificadores das macromoléculas e seus respectivos ligantes com abreviaturas.

RECEPTOR COX-1	RECEPTOR COX-2	LIGANTE	ABREVIATURA	RESOLUÇÃO COX-1/COX-2
1DIY	3HS5	Ácido Araquidônico	ACD	3,0 Å / 2,1 Å
1EQH	3PGH	Flurbiprofeno	FLP	2,7 Å / 2,5 Å
3KK6	3LN1	Celecoxib	CEL	2,75 Å / 2,4 Å
3N8Y	1PXX	Diclofenaco	DIF	2,6 Å / 2,9 Å
4O1Z	4M11	Meloxicam	MXM	2,4 Å / 2,45 Å

Fonte – autora.

Figura 5 – Fórmulas estruturais dos ligantes originais.



Fonte – autora.

4.3 Preparação dos arquivos de entrada

Os arquivos de entrada foram preparados com o auxílio de vários *softwares*: *UCSF Chimera* (PETTERSEN E.F, 2004); *Simulaid* (MEZEI, 2010), *Swiss PDB Viewer* (GUEX; PEITSCH, 1997); *ChemBioOffice Ultra 14* (KERWIN, 2010); *G.A.M.E.S.S.* (SCHMIDT, 1993) e *AutoDockTools 4.2* (MORRIS, 2009).

Utilizando o *UCSF Chimera*, os arquivos das estruturas proteicas foram processados de modo a excluir as cadeias repetidas (no caso, B, C e D), e todos os demais resíduos que não o ligante. Arquivos separados da proteína e do ligante foram salvos. Estes arquivos foram processados pelo programa *Simulaid* para retirar resíduos em posições alternativas e corrigir resíduos faltantes na proteína.

Os ligantes que acompanham as proteínas, bem como os selecionados neste trabalho (bowdenol e espatulenol), tiveram suas geometrias otimizadas no nível de teoria da Perturbação de Møller-Plesset até a segunda ordem (MP2) (MØLLER; PLESSET, 1934), utilizando a base 6-31G(d,p), implementado no pacote *G.A.M.E.S.S. (General Atomic and Molecular Structure System)* (SCHMIDT, 1993) para que as posições dos hidrogênios, inexistentes nas estruturas determinadas por raios-x (estruturas cristalizadas), fossem calculadas corretamente.

A estrutura da COX-2 com diclofenaco (1PXX) contém dados incompletos dos resíduos da cadeia, e foi a única estrutura a ser corrigida utilizando o *software SwissPDBViewer*, que executa a ação apropriada no momento em que o arquivo é aberto. Feito isso, todas as proteínas foram processadas no *UCSF Chimera* utilizando a função Dock Prep, que adiciona hidrogênios; calcula cargas parciais para resíduos padrão com campo de força empírico AMBER ff14SB e para demais resíduos com o método semi-empírico AM1-BCC; e adiciona contra-íons para neutralização de carga. Neste estado as proteínas estão prontas para a docagem inicial. Em seguida, as proteínas tiveram suas estruturas relaxadas através de minimização de energia por mecânica molecular com todos os parâmetros padrão do programa, com exceção do número de passos, aumentado para 300. Neste ponto temos as proteínas prontas para a segunda etapa da docagem, feita com as estruturas minimizadas.

Os arquivos para a docagem molecular foram preparados utilizando a suíte *AutoDockTools 4.2*. Aqui a estrutura do ligante e da proteína (receptor) são formatados em um padrão específico para ser lido pelo *AutoDock4* (arquivos contendo além das coordenadas

atômicas, as cargas parciais). Os ligantes recebem cargas parciais de Gasteiger e tem suas ligações rotacionáveis selecionadas. No caso das proteínas, optou-se por manter as cargas calculadas pelo *UCSF Chimera*, em etapa anterior, uma vez que o campo de força AMBER foi designado primariamente para a simulação de biomoléculas (SALOMON-FERRER; CASE; WALKER, 2013). Uma grade cúbica, com espaçamento de 0,375 Å, é determinada com centro no ligante original, e dimensões suficientes para acomodar os ligantes e permitir sua rotação no sítio demarcado. Nesta grade serão calculados os mapas de energia baseados nos tipos de átomos dos ligantes. O algoritmo de docagem escolhido foi o Algoritmo Genético Lamarckiano, e as condições de cálculo foram: 50 corridas, com população inicial de 300 indivíduos, e 25.000.000 de avaliações de energia (exceto para o ácido araquidônico, que por ter muitas ligações rotacionáveis, esse valor era de 30.000.000). Estes valores demonstraram ser adequados, apresentando bons resultados na literatura (HETENYI; VAN DER SPOEL, 2002).

Na docagem flexível, os resíduos flexíveis foram ARG 120, SER 530, TYR 355 e TYR 385 para todos os ligantes com exceção do celecoxib, cujos resíduos na COX-1 foram o GLN 192 e LEU 352 e na COX-2 foram o ARG 513, GLN 192, LEU 352 e SER 353. Estes aminoácidos foram escolhidos porque apareceram com mais frequência nas interações dos ligantes originais com as proteínas, geralmente formando ligação de hidrogênio.

4.4 Cálculos de docagem molecular

A docagem molecular foi executada da seguinte forma:

1ª Redocagem dos ligantes originais nos respectivos sítios de ligação das proteínas rígidas antes e após minimização de energia, bem como considerando os resíduos flexíveis;

2ª Docagem cruzada de cada ligante original nos sítios dos demais, considerando os resíduos flexíveis (docagem flexível);

3ª Em seguida o bowdenol e espatulenol foram docados nas proteínas antes e após minimização de energia, assim como considerando os resíduos flexíveis.

4.5 Análise dos dados

Na análise dos dados, os parâmetros observados foram: energia de ligação, resíduos próximos e RMSD das proteínas e ligantes.

A energia de ligação foi utilizada para avaliar o grau de afinidade dos ligantes bowdenol e espatulenol em relação aos ligantes originais e essa avaliação foi feita da seguinte forma: para a redocagem e docagem nos sítios das proteínas rígidas, antes e após minimização de energia, foram utilizados os desvios médios da docagem cruzada obtidas para COX-1 e COX-2, já para redocagem e docagem com os resíduos flexíveis foram utilizadas os desvios de cada ligante original para COX-1 ou COX-2, mas para o bowdenol e espatulenol foram considerados os desvios médios tal como ocorreu na docagem rígida. Em relação aos valores das energias de ligação, para o bowdenol e o espatulenol considerou-se a média simples das energias de ligação obtidas com cada uma das cinco estruturas de cada ciclooxigenase, e para os demais ligantes, foram considerados os valores obtidos em cada cálculo de docagem.

As interações dos ligantes com a proteína foram avaliadas visualmente através dos diagramas de resíduos próximos, considerando a ocorrência de formação de ligações de hidrogênio, e comparando com as interações observadas para os ligantes originais na estrutura cristalizada.

Os valores de RMSD das proteínas foram calculados pelo *UCSF Chimera* comparando as proteínas antes e após minimização de energia, tomando como referência a estrutura correspondente cristalizada com ácido araquidônico (1DIY, COX-1; 3HS5, COX-2). No caso dos ligantes, o cálculo foi feito pelo programa *Chemcraft 1.8* (ZHURKO; ZHURKO) comparando as posições da redocagem com a dos ligantes cristalizados.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do trabalho são apresentados e discutidos a seguir, separados por tópicos.

5.1 Avaliação das estruturas proteicas e dos ligantes

Os valores do RMSD das estruturas das ciclooxygenases mostra que elas são equivalentes, com valores de RMSD abaixo de $0,5\text{\AA}$, como demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2 – RMSD da COX-1 e COX-2 Pré e Pós-minimização tendo a estrutura com ácido araquidônico como referência.

RMSD da COX-1 e COX-2 Pré e Pós-minimização					
COX-1	Pré	Pós	COX-2	Pré	Pós
1DIY	0,000	0,182	3HS5	0,000	0,124
3N8Y	0,428	0,386	1PXX	0,305	0,301
4O1Z	0,399	0,360	4M11	0,321	0,320
1EQH	0,428	0,410	3PGH	0,402	0,391
3KK6	0,485	0,435	3LN1	0,286	0,285

Fonte – autora.

Os valores de RMSD dos ligantes são mostrados na Tabela 3. Assim verifica-se que esses RMSD redocados ficaram abaixo de $2,0\text{\AA}$ tanto na COX-1 quanto na COX-2, com exceção do ácido araquidônico, que foi superior a $2,0\text{\AA}$ na COX-2, justificado por se tratar de uma molécula bastante flexível.

Tabela 3 – RMSD dos ligantes complexados com a COX- 1 e COX-2 pré, pós minimizada e com resíduos flexíveis.

Ligantes	RMSD					
	COX-1			COX-2		
	Pré	Pós	Flex	Pré	Pós	Flex
ACD	1,135	1,837	1,345	2,462	2,766	2,098
CEL	0,37	0,59	0,548	0,736	0,435	0,55
DIF	0,832	0,165	0,658	0,213	0,214	1,283
FLP	1,127	1,087	0,276	1,113	1,085	1,122
MXM	0,245	0,247	0,98	0,892	0,151	0,125

Fonte – autora.

5.2 Interações ligantes e proteínas

O bowdenol apresenta seis ligações rotacionáveis, enquanto que o espatulenol apresenta apenas uma, o que possibilita o bowdenol ter um maior número de posições alternativas dentro do sítio ativo das COX.

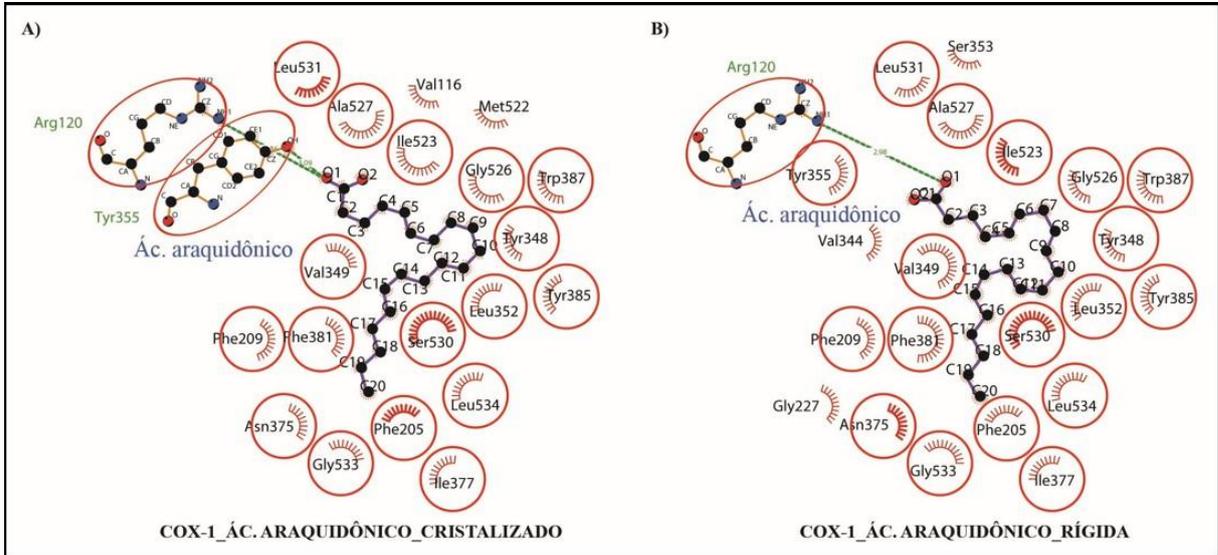
Nas figuras abaixo, visualiza-se na COX-1 e COX-2 os resíduos do sítio ativo próximos aos ligantes cristalizados na parte ‘A’ de cada figura, com os resíduos do sítio ativo próximos aos ligantes da docagem rígida com a proteína minimizada ou da docagem flexível, na parte ‘B’ de cada figura. Os resíduos coincidentes em cada lado da figura aparecem circulos, aqueles que fazem ligação de hidrogênio (tracejadas) apresentam-se na cor verde, e os que participam de interações hidrofóbicas, com um semi-círculo raiado. Os ligantes estudados, bowdenol e espatulenol ocupam o lugar no sítio ativo das proteínas dos respectivos ligantes originais redocados.

5.2.1 COX-1

Como observado na Figura 6, o ácido araquidônico cristalizado faz ligação de hidrogênio com os resíduos Arg 120 e Tyr 355 enquanto que na redocagem rígida só foi observada ligação de hidrogênio com Arg 120. Já na redocagem flexível, Figura 7, observa-se

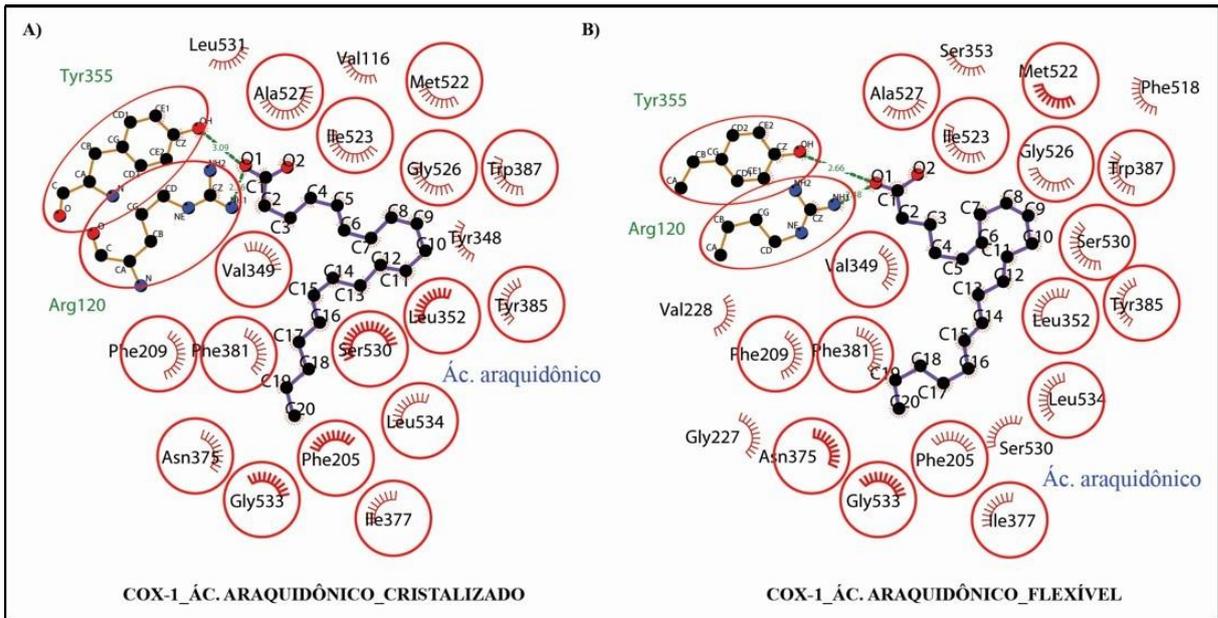
que as interações são as mesmas que as observadas na posição original, assim foi possível a reprodução da posição cristalizada com a redocagem flexível.

Figura 6 – COX-1 com ácido araquidônico cristalizado e na redocagem rígida.



Fonte – autora.

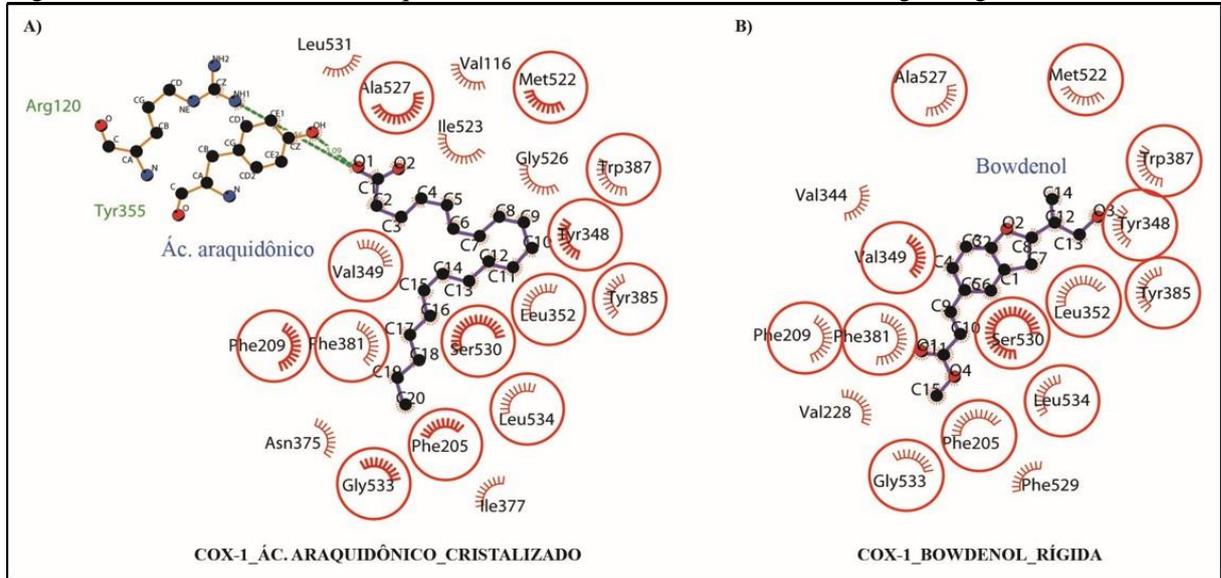
Figura 7 – COX-1 com ácido araquidônico cristalizado e na redocagem flexível



Fonte – autora.

Como observado na Figura 8, o bowdenol, na docagem rígida, não faz nenhuma ligação de hidrogênio. Já na docagem flexível, ele faz ligação de hidrogênio com os resíduos Arg 120, Tyr 355 e Tyr 385, com uma interação a mais que o ligante cristalizado.

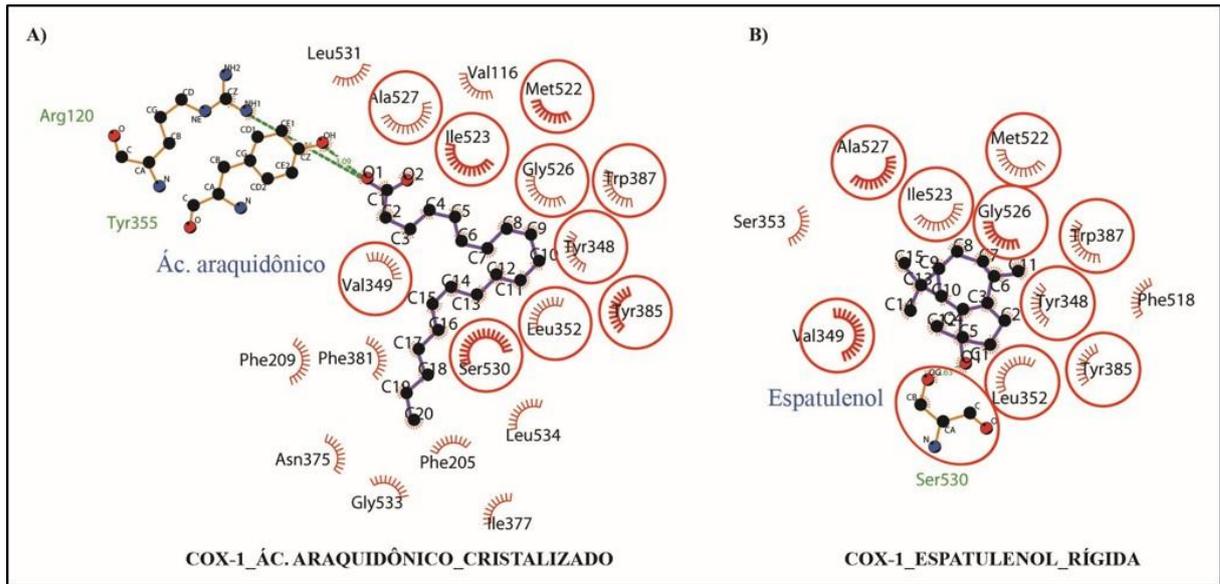
Figura 8 – COX-1 com ácido araquidônico cristalizado e bowdenol na docagem rígida.



Fonte – autora.

Como observado na Figura 9 são observadas as interações do espatulenol com a COX-1 na docagem rígida comparada com as do ácido araquidônico nas mesmas condições. O espatulenol faz ligação de hidrogênio apenas com o resíduo Ser 530. Já na docagem flexível, as interações observadas são praticamente as mesmas que na docagem rígida.

Figura 9 – COX-1 com ácido araquidônico cristalizado e espatulenol na docagem rígida.



Fonte – autora.

Observam-se interações essencialmente iguais do flurbiprofeno com a COX-1 na posição cristalizada e na redocagem rígida e flexível. Quanto ao bowdenol, observa-se que faz ligação de hidrogênio com os resíduos Arg 120, Ser 530 e Tyr 385. Já na docagem flexível, ele faz ligação de hidrogênio com os resíduos Arg 120, Ser 530 e Tyr 355. Nesta última, houve uma troca da interação entre a Tyr 385 para a Tyr 355. Em relação ao espatulenol, em sua docagem rígida, ele não faz nenhuma ligação de hidrogênio, enquanto que na docagem flexível ele faz ligação de hidrogênio com os resíduos Arg 120, Glu 524 e Tyr 355, com dois deles sendo os mesmos que os do flurbiprofeno na posição original.

O celecoxib cristalizado faz ligação de hidrogênio com os resíduos Gln 192 e Leu 352, assim como na redocagem rígida, entretanto, nessa última, ele faz ligação de hidrogênio com dois resíduos a mais, a Phe 518 e Ser 516. Esses mesmos resíduos observados na redocagem rígida são observados na redocagem flexível. Em relação ao bowdenol, na docagem rígida, ele faz ligação de hidrogênio com os resíduos Ala 527, Ile 517, Phe 518 e Ser 516, diferente daqueles que estabilizam o celecoxib na posição cristalizada. Já na docagem flexível, ele faz ligação de hidrogênio com o resíduo Leu 352, mesmo da celecoxib na posição cristalizada. O espatulenol, na docagem rígida não faz ligação de hidrogênio com nenhum resíduo. Já na docagem flexível, ele faz ligação de hidrogênio com o resíduo Ser 530.

O diclofenaco cristalizado e na redocagem rígida faz ligação de hidrogênio com os resíduos Ser 530 e Tyr 385. Já na redocagem flexível, ele faz ligação de hidrogênio com os

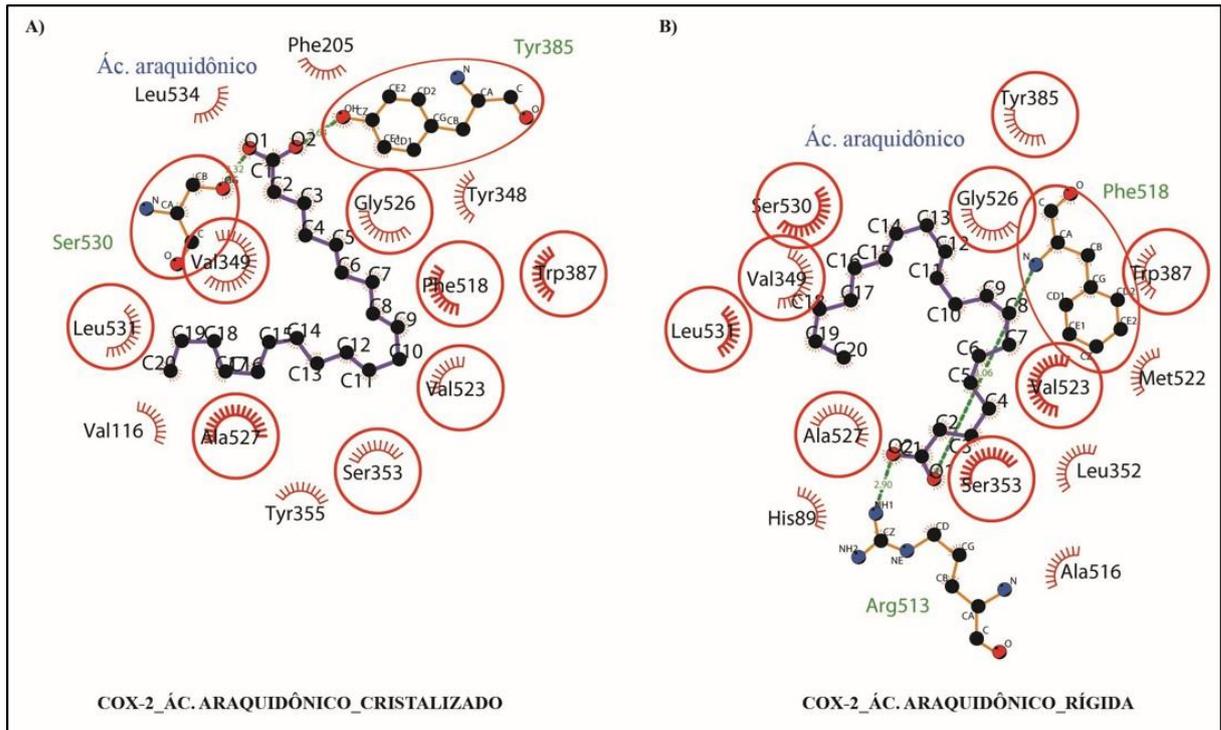
resíduos Arg 120 e Tyr 355, não coincidindo com nenhum resíduo do sítio cristalizado e consequentemente dos resíduos da redocagem rígida. O bowdenol, na docagem rígida faz ligação de hidrogênio com o Met 522, que não coincide com nenhum dos resíduos do ligante cristalizado. Já na docagem flexível ele faz ligação de hidrogênio com os resíduos Arg 120, Ser 530 e Tyr 355, coincidindo com um resíduo do ligante cristalizado. O espatulenol, na docagem rígida, faz ligação de hidrogênio com a Ser 530, coincidindo com um dos resíduos do ligante cristalizado. O mesmo acontece na docagem flexível, ressaltando a importância desse resíduo para a estabilização dos ligantes.

O meloxicam cristalizado faz ligação de hidrogênio com o resíduo Ser 530 e na redocagem rígida com o mesmo resíduo. Já na redocagem flexível são observadas ligações de hidrogênio com os resíduos Arg 120 e Tyr 385, além da Ser 530. O bowdenol, na docagem rígida faz ligação de hidrogênio com a Arg 120, Asp 362 e Tyr 355 que não coincide com nenhum resíduo que interage por ligação de hidrogênio com o ligante cristalizado. Já na docagem flexível ele faz ligação de hidrogênio apenas com os resíduos Arg 120 e Ser 530, coincidindo este último com um dos resíduos que fazem ligação com o ligante cristalizado. O espatulenol, na docagem rígida, faz ligação de hidrogênio com a Ala 527 e Leu 531, que não coincide com nenhum resíduo do ligante cristalizado. Já na docagem flexível ele faz ligação de hidrogênio com os resíduos Ala 527, Leu 531 e Ser 530, coincidindo com um resíduo do ligante cristalizado, o Ser 530, e um dos resíduos da docagem rígida, o Leu 531.

5.2.2 COX-2

Na Figura 10 o ácido araquidônico cristalizado faz ligação de hidrogênio com os resíduos Ser 530 e Tyr 385 e na redocagem rígida faz ligação de hidrogênio com o Arg 513 e Phe 518, que não coincide com nenhum resíduo do ligante cristalizado. Já na redocagem flexível ele faz ligação de hidrogênio com os resíduos Arg 120 e Tyr 355, não coincidindo com nenhum resíduo do ligante cristalizado, nem com os resíduos da docagem rígida.

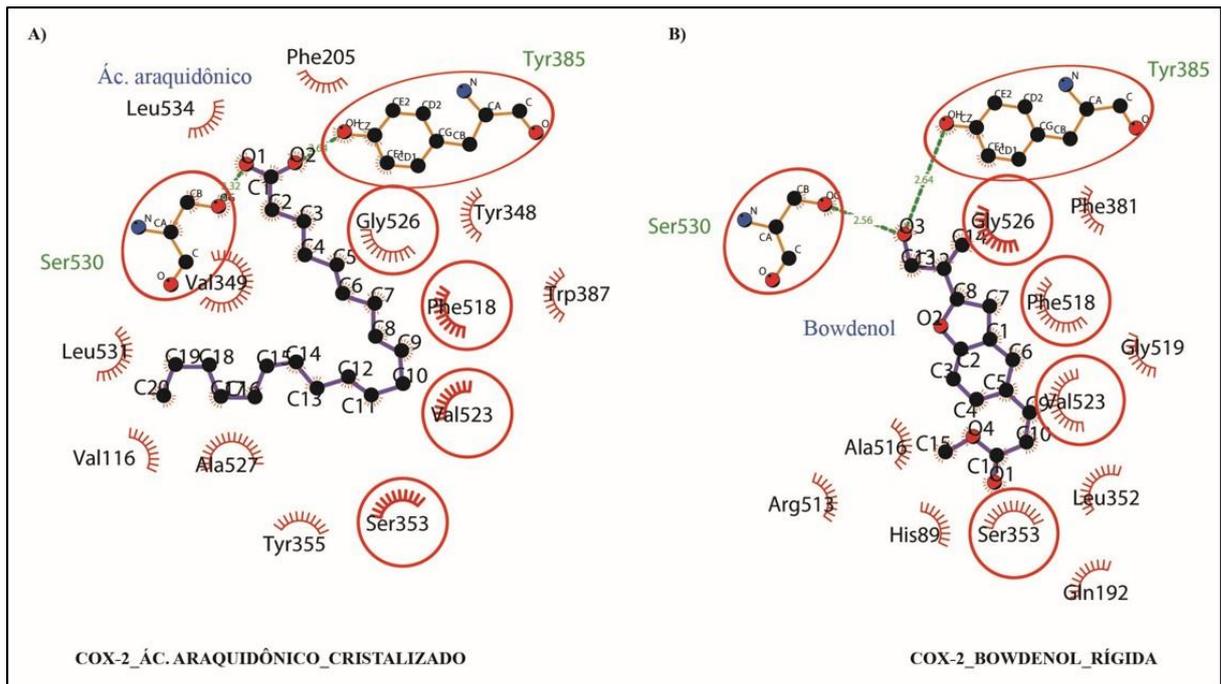
Figura 10 – COX-2 com ácido araquidônico cristalizado e na redocagem rígida.



Fonte – autora.

Na Figura 11, na docagem rígida, o bowdenol faz ligação de hidrogênio com os mesmos resíduos que o ligante cristalizado: Ser 530 e Tyr 385. Já na docagem flexível, ele faz ligação de hidrogênio com os resíduos Arg 120, Gly 526, Ser 530 e Tyr 355, ou seja, mantendo a serina e substituindo a tirosina.

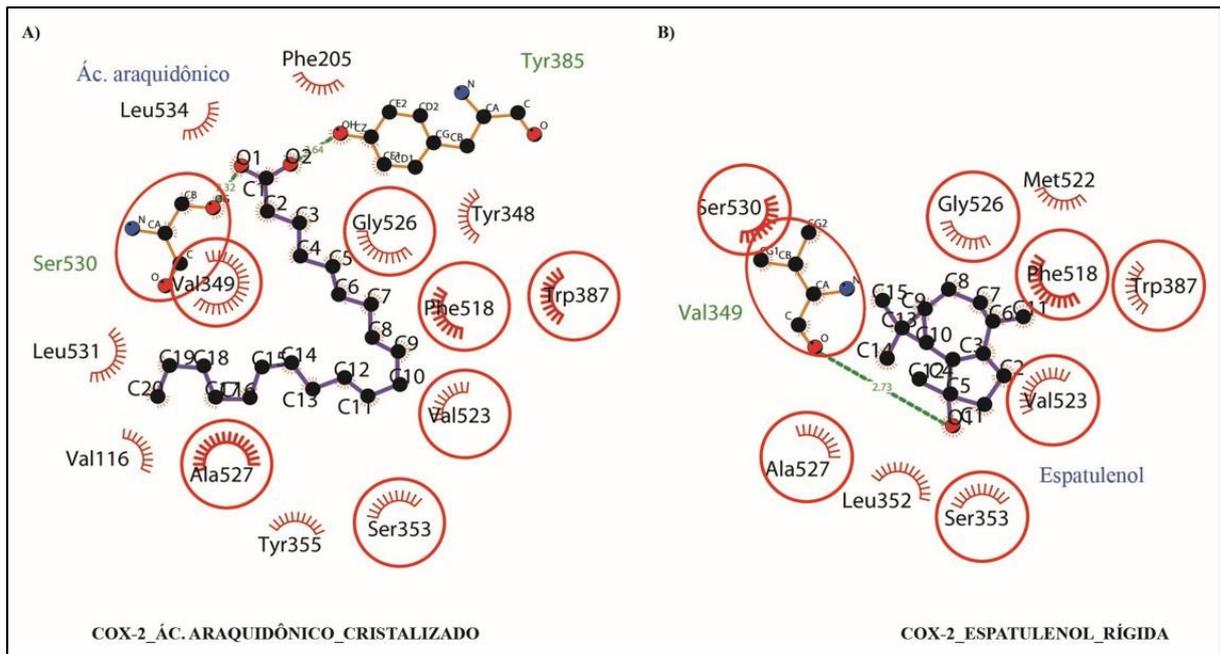
Figura 11 – COX-2 com ácido araquidônico cristalizado e bowdenol na docagem rígida.



Fonte – autora.

Na Figura 12, na docagem rígida, o espatulenol faz ligação de hidrogênio com a Val 349, que não coincide com nenhum resíduo do ligante cristalizado. Já na docagem flexível ele faz ligação de hidrogênio com o resíduo Ser 530, coincidindo com um dos resíduos que interage com o ligante cristalizado.

Figura 12 – COX-2 com ácido araquidônico cristalizado e espatulenol na docagem rígida.



Fonte – autora.

O flurbiprofeno cristalizado faz ligação de hidrogênio com os resíduos Arg 120 e Tyr 355 e na redocagem rígida faz ligação de hidrogênio com o Tyr 355, coincidindo este último resíduo com o ligante cristalizado. Já na redocagem flexível, as interações observadas reproduziram bem aquelas do ligante cristalizado. O bowdenol, na docagem rígida, faz ligação de hidrogênio com His 89, Ser 530 e Tyr 385, que não coincide com nenhum resíduo do ligante cristalizado. Já na docagem flexível, ele faz ligação de hidrogênio com os resíduos Arg 120, Ser 530 e Tyr 355, coincidindo apenas as interações com Arg 120 e Tyr 355 do sítio do ligante cristalizado. O espatulenol, tanto na docagem rígida, quanto na docagem flexível, faz ligação de hidrogênio com a Val 349, diferentemente das interações de hidrogênio que o flurbiprofeno realiza.

O celecoxib cristalizado faz ligação de hidrogênio com os resíduos Arg 513, Gln 192, Leu 352 e Ser 353 e, na redocagem rígida e flexível, faz ligação de hidrogênio com o Gln 192, Leu 352 e Phe 518, coincidindo apenas os primeiro e segundo resíduos com os do sítio do ligante cristalizado. O bowdenol na docagem rígida, faz ligação de hidrogênio com o Phe 518 e Ser 530, que não coincide com nenhum resíduo do ligante cristalizado. Já na docagem flexível, ele faz ligação de hidrogênio com a Ser 353 e Ser 530, o primeiro coincidindo com o resíduo do ligante cristalizado e o último com o ligante da docagem rígida. O espatulenol, na

docagem rígida e flexível, faz ligação de hidrogênio apenas com a Ser 530, que não coincide com nenhum resíduo do ligante cristalizado.

O diclofenaco cristalizado e na redocagem rígida faz ligação de hidrogênio com os resíduos Ser 530 e Tyr 385. Já na redocagem flexível, ele faz ligação de hidrogênio com o resíduo Tyr 355. O bowdenol, na docagem rígida, faz ligação de hidrogênio com a Phe 518 e a Ser 530. Já na docagem flexível, ele faz ligação de hidrogênio com os resíduos Arg 120, Ser 530 e Tyr 355. Tanto na docagem rígida, quanto na docagem flexível, há coincidência do resíduo Ser 530 do sítio do ligante cristalizado. O espatulenol, na docagem rígida e flexível, faz ligação de hidrogênio apenas com a Ser 530, o que também é observado para o diclofenaco no sítio ativo.

O meloxicam cristalizado faz ligação de hidrogênio com o resíduo Ser 530 enquanto na redocagem rígida e na flexível, faz ligação de hidrogênio com a Arg 120 e Ser 530, coincidindo o segundo com um dos observados no sítio do ligante cristalizado. O bowdenol, tanto na docagem rígida quanto na flexível, faz ligação de hidrogênio com a Arg 120, Ser 530, Tyr 355 e Tyr 385, coincidindo um deles com um resíduo do ligante cristalizado, o Ser 530. É importante notar que o bowdenol faz ligação de hidrogênio com todos aqueles resíduos tratados como flexíveis, em ambas as docagens. O espatulenol, na docagem rígida faz ligação de hidrogênio com o resíduo Ser 530. Já na docagem flexível, ele faz ligação de hidrogênio com os resíduos Arg 120 e Tyr 355, não coincidindo com nenhum resíduo da docagem rígida e nem do sítio do ligante cristalizado.

Uma observação das interações aqui apresentadas mostrou que: as posições obtidas na docagem rígida para os ligantes originais na COX-1 foram melhores que aquelas obtidas na flexível; na COX-2, as interações observadas, tanto na docagem rígida quanto na flexível foram equivalentes, assim, optou-se por considerar os dados da docagem flexível para análise; por fim, para o bowdenol e espatulenol, tanto na COX-1 quanto na COX-2, observou-se uma melhor interação na docagem flexível.

5.3 Energia de Ligação

No experimento de docagem cruzada o desvio médio da energia de ligação na COX-1 foi de $\pm 1,7$ kcal/mol enquanto que na COX-2 foi de $\pm 1,6$ kcal/mol, tal como observado na Tabela 4. As energias médias de ligação do ácido araquidônico foram as menores e

praticamente iguais na COX-1 e COX-2. O diclofenaco e flurbiprofeno também apresentaram energia de ligação praticamente idênticas em ambas as proteínas, com o flurbiprofeno apresentando uma energia um pouco menor. Celecoxib e meloxicam apresentaram energias semelhantes entre si e menores na COX-2. Em negrito estão os valores de energia dos ligantes originais em suas respectivas proteínas.

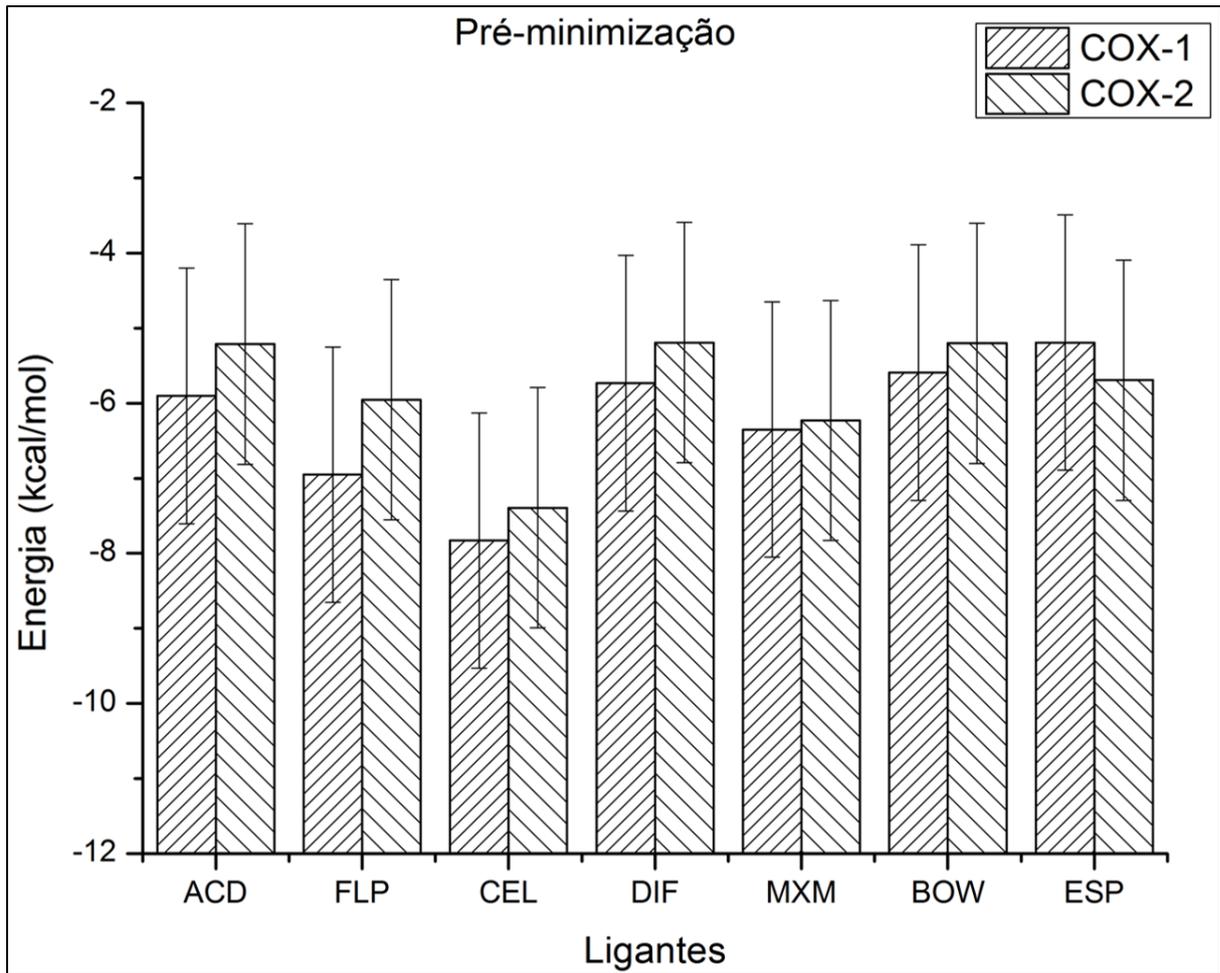
Tabela 4 – Energias de ligação e desvio médio, obtidos da docagem cruzada na COX-1 e COX-2 em kcal/mol.

		COX-1					Média	Desvio
Ligante/ Proteína	1DIY	3KK6	3N8Y	1EQH	4O1Z			
ACD	-7,51	-7,88	-9,36	-8,73	-9,43	-8,58	0,86	
CEL	-4,51	-8,72	-7,33	-5,29	-8,71	-6,91	1,94	
DIF	-4,40	-5,23	-8,24	-7,87	-8,10	-6,77	1,81	
FLP	-5,37	-5,30	-8,27	-8,93	-8,63	-7,3	1,81	
MXM	-3,51	-6,43	-7,61	-6,69	-9,65	-6,78	2,22	
						Desvio Médio:	1,73	
		COX-2						
Ligante/ Proteína	3HS5	3LN1	1PXX	3PGH	4M11			
ACD	-5,92	-6,86	-8,81	-10,37	-9,80	-8,35	1,90	
CEL	-4,86	-8,09	-7,87	-7,78	-8,64	-7,44	1,48	
DIF	-5,10	-6,73	-7,51	-7,56	-7,86	-6,95	1,12	
FLP	-5,31	-5,32	-7,95	-8,92	-8,50	-7,2	1,75	
MXM	-5,37	-6,06	-8,35	-6,92	-9,65	-7,27	1,73	
						Desvio Médio:	1,60	

Fonte: autora.

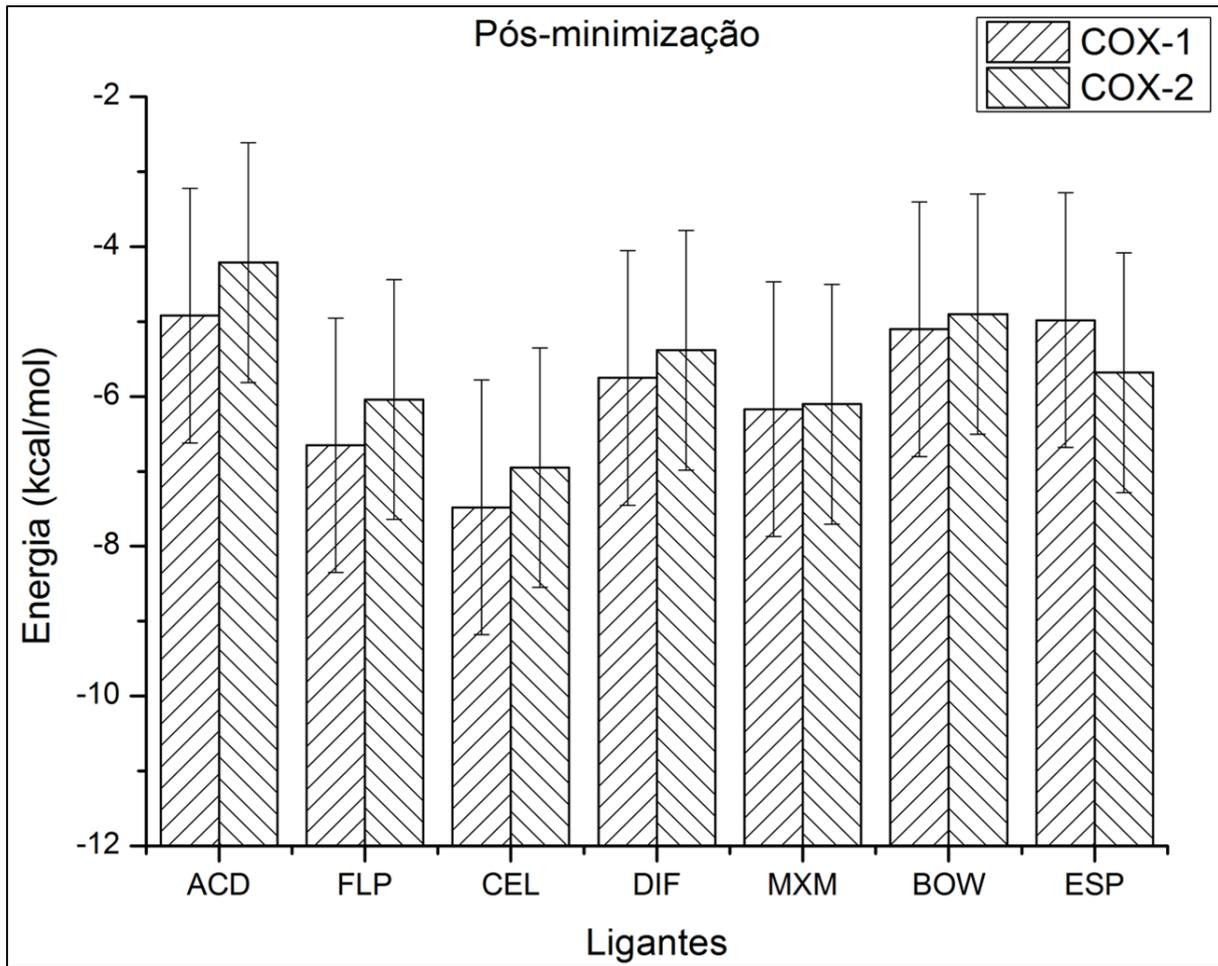
O perfil das energias de ligação obtidas na docagem utilizando os receptores rígidos, mostrados nas Figura 13 (forma cristalizada) e Figura 14 (com energia minimizada) foram bastante semelhantes. Considerando o erro de $\pm 1,7$ kcal/mol para a COX-1 e $\pm 1,6$ kcal/mol para a COX-2, pode-se observar que não há diferença estatisticamente significativa entre os ligantes originais, bowdenol e espatulenol. Já na docagem considerando resíduos flexíveis, as energias de ligação, mostradas na Figura 15, foram em média mais baixas que nos casos anteriores, entretanto, considerando os desvios apresentados, também houve semelhança estatística entre os ligantes originais, bowdenol e espatulenol.

Figura 13 – Energia de ligação, receptores cristalizados. Dados da redocagem para ligantes originais, e média para bowdenol e espatulenol.



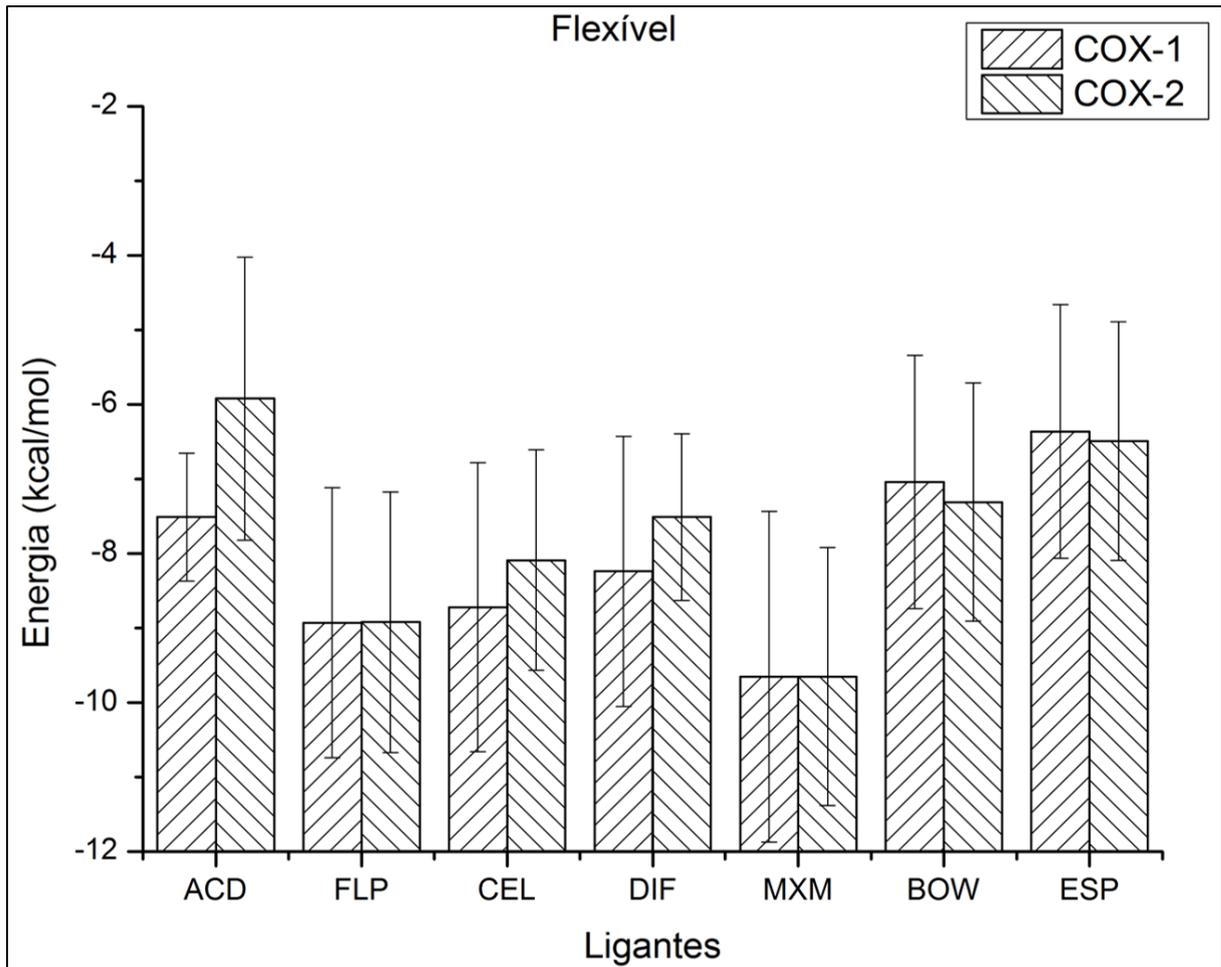
Fonte – autora.

Figura 14 – Energias de ligação, receptores minimizados. Dados da redocagem para ligantes originais, e média para bowdenol e espatulenol.



Fonte – autora.

Figura 15 – Energias médias de ligação, receptores minimizados e resíduos flexíveis.



Fonte – autora.

Tendo em vista uma análise das interações observadas entre os ligantes e os receptores, pode-se definir um cenário consistente para avaliar as energias de ligação da seguinte maneira: no caso da COX-1, serão consideradas as energias de ligação da docagem rígida com os receptores relaxados (pós-minimizadas); já no caso da COX-2, serão consideradas as energias da docagem flexível; e para os ligantes serão consideradas as médias das energias das docagens flexíveis em cada COX. Deste modo, pode-se inferir que os ligantes originais e as substâncias bowdenol e espatulenol são estatisticamente equivalentes em termos de energia de ligação.

6 CONCLUSÃO

Os valores de RMSD entre as estruturas das proteínas antes e após minimização foram baixos, menor que 0,5Å, indicando grande semelhança estrutural entre elas. Quanto aos ligantes, apresentaram um RMSD abaixo de 2,0Å na COX-1 e COX-2, com exceção do ácido araquidônico que foi superior a 2,0Å na COX-2, o que valida a metodologia utilizada.

A docagem cruzada permitiu avaliar o desvio médio das energias de ligação calculadas pelo *autodock* que foi de $\pm 1,7$ kcal/mol para a COX-1 e $\pm 1,6$ kcal/mol para a COX-2.

Os ligantes originais e as substâncias bowdenol e espatulenol são estatisticamente equivalentes em termos de energia de ligação e podem ser capazes de exercer atividade anti-inflamatória.

7 PERSPECTIVAS

- Utilizar os resultados desse trabalho para fortalecer as metodologias de docagem molecular;
- Propor alterações estruturais e funcionais nos ligantes estudados a fim de potencializar sua afinidade e/ou seletividade com a COX-2;
- Verificar os dados obtidos nesse estudo em comparação com dados de experimentos *in vitro* e *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- AGRA, I. K. R. et al. **Evaluation of wound healing and antimicrobial properties of aqueous extract from *Bowdichia virgilioides* stem barks in mice.** Anais Da Academia Brasileira De Ciencias, v. 85, n. 3, p. 945-954, Sep 2013.
- ALMEIDA, C. H. F.; MACHUCA HERRERA, J. O.; MACHADO, S. P. **Metodologia para obtenção de parâmetros de mecânica molecular aplicados a compostos de coordenação.** Quimica Nova, v. 25, n. 6a, p. 957-961, 2002-11 2002.
- ALMEIDA, J. R. G. D. S. et al. **Antimicrobial activity of the essential oil of *Bowdichia virgilioides* Kunt.** Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 16, p. 638-641, 2006-12 2006.
- ALMEIDA, S. P. et al. **Cerrado: espécies vegetais úteis.** Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998.
- ALMERINDO, G. I.; PLIEGO JR, J. R. **Ab initio investigation of the kinetics and mechanism of the neutral hydrolysis of formamide in aqueous solution.** Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 18, n. 4, p. 469-702, 2007 2007.
- ALVARENGA, R. F. R. et al. **Airborne Antituberculosis Activity of *Eucalyptus citriodora* Essential Oil.** Journal of Natural Products, v. 77, n. 3, p. 603-610, Mar 2014.
- AMES, B. N. **Dietary carcinogens and anticarcinogens - oxygen radicals and degenerative diseases.** Science, v. 221, n. 4617, p. 1256-1264, 1983 1983.
- ANAND, R.; KAITHWAS, G. **Anti-inflammatory Potential of Alpha-Linolenic Acid Mediated Through Selective COX Inhibition: Computational and Experimental Data.** Inflammation, v. 37, n. 4, p. 1297-1306, Aug 2014.
- APEL, M. A. et al. **Anti-inflammatory activity of essential oil from leaves of *Myrciaria tenella* and *Calycorectes sellowianus*.** Pharmaceutical Biology, v. 48, n. 4, p. 433-438, Apr 2010.
- ARRIAGA, A. M. C. et al. **Volatile constituents from roots of *Bowdichia virgilioides* Kunt.** Journal of Essential Oil Research, v. 10, n. 2, p. 205-206, 1998.
- AZEVEDO, C. M. A. **Bioprospecção: Coleta de material biológico com a finalidade de explorar os recursos genéticos.** In: ATLÂNTICA, C. N. D. R. D. B. D. M. (Ed.). São Paulo, v.17, 2003.
- BAKKALI, F. et al. **Biological effects of essential oils - A review.** Food and Chemical Toxicology, v. 46, n. 2, p. 446-475, Feb 2008.

BARBEDO, C. J.; BILIA, D. A. C.; FIQUEREDO RIBEIRO, R. C. L. **Tolerância à dessecação e armazenamento de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil), espécie da Mata Atlântica.** Revista Brasileira de Botânica, v. 25, n. 4, p. 431-439, 2002.

BARONE, M. et al. **Molecular docking and fluorescence characterization of benzothieno 3,2-d pyrimidin-4-one sulphonamide thio- derivatives, a novel class of selective cyclooxygenase-2 inhibitors.** Molecules, v. 19, n. 5, p. 6106-6122, May 2014.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M.; ARAÚJO JR, J. X. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 1ª. Porto Alegre/Florianópolis: 1999.

BARROS, W. M. et al. **Anti-inflammatory effect of the ethanolic extract from *Bowdichia virgilioides* HBK stem bark.** Anais Da Academia Brasileira De Ciencias, v. 82, n. 3, p. 609-616, Sep 2010.

BEEJAY, U.; WOLFE, M. M. **Cyclooxygenase 2 selective inhibitors: Panacea or flash in the pan?** Gastroenterology, v. 117, n. 4, p. 1002-1005, Oct 1999.

BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará.** 1953.

BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará.** Fortaleza: Imprensa Oficial,, 1960.

BRASIL. **Portaria nº 6 de 31.01.1995. Regulamenta o registro de fitoterápicos.** SANITÁRIA., M. D. S. S. D. V. Brasil: Diário Oficial da União, 06.02.1995. 1995.

BRITTO, M. A. F. O.; NASCIMENTO, C. S.; SANTOS, H. F. **Structural analysis of cyclodextrins: A comparative study of classical and quantummechanical methods.** Quimica Nova, v. 27, n. 6, p. 882-888, Nov-Dec 2004.

BROOKS, P. et al. **Interpreting the clinical significance of the differential inhibition of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2.** Rheumatology, v. 38, n. 8, p. 779-788, Aug 1999.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics.** 12. New York: McGraw-Hill, 2011.

BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. **Goldman & Gilman. As Bases Farmacológicas da Terapêutica.** . 10. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2005.

BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics.** 11. New York: McGraw-Hill, 2005.

BULLETIN OF THE WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Regulatory situation of herbal medicines. A worldwide review.** 1998.

BUTINI, S. et al. **Exploiting protein fluctuations at the active-site gorge of human cholinesterases: Further optimization of the design strategy to develop extremely potent inhibitors.** Journal of Medicinal Chemistry, v. 51, n. 11, p. 3154-3170, Jun 12 2008.

CARVALHO FILHO, J. L. S. et al. **Influence of the harvesting time, temperature and drying period on basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oil.** Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 16, n. 1, p. 24-30, 2006-03 2006.

- CHAO, L. K. et al. **Study on the antiinflammatory activity of essential oil from leaves of *Cinnamomum osmophloeum***. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 53, n. 18, p. 7274-7278, Sep 7 2005.
- CIRINO, J. J. V.; BERTRAN, C. A. **Estudo da geometria da uréia por métodos *ab initio* e simulação computacional de líquidos**. Quimica Nova, v. 25, n. 3, p. 358-363, 2002-05 2002.
- COELHO DE SOUZA, G. et al. **Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil**. Journal of Ethnopharmacology, v. 90, n. 1, p. 135-143, 2004.
- COELHO, L. W. et al. **Molecular mechanics application in inorganic chemistry**. Quimica Nova, v. 22, n. 3, p. 396-404, May-Jun 1999.
- CONCEIÇÃO, M. **As plantas medicinais no ano 2000**. Brasília: 1980.
- CRUZ, G. L. **Livro Verde das Plantas Mediciniais e Industriais do Brasil** Belo Horizonte: 1965.
- DE ROBERTIS, E. M.; HIB, J. **Biologia Celular e Molecular**. 16^a. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.
- DEBNATH, T.; KIM, D. H.; LIM, B. O. **Natural Products as a Source of Anti-Inflammatory Agents Associated with Inflammatory Bowel Disease**. Molecules, v. 18, n. 6, p. 7253-7270, Jun 2013.
- DEHARO, E. et al. **A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part V. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Tacana Indians**. Journal of Ethnopharmacology, v. 77, n. 1, p. 91-98, Sep 2001.
- DINTZNER, M. R. et al. **Investigation of the Montmorillonite clay-catalyzed 1,3 shift reaction of 3-methyl-2-butenyl phenyl ether**. Tetrahedron Letters, v. 45, n. 1, p. 79-81, Jan 1 2004.
- DUBOIS, R. N. et al. **Cyclooxygenase in biology and disease**. Faseb Journal, v. 12, n. 12, p. 1063-1073, Sep 1998.
- DUGGAN, K. C. et al. **Molecular Basis for Cyclooxygenase Inhibition by the Non-steroidal Anti-inflammatory Drug Naproxen**. Journal of Biological Chemistry, v. 285, n. 45, p. 34950-34959, Nov 5 2010.
- DUTTA, S.; DAS, S. **A study of the anti-inflammatory effect of the leaves of *Psidium guajava* Linn. on experimental animal models**. Pharmacognosy Research, v. 2, p. 313-317, 2010.
- ESTEVES, I. et al. **Gastric antiulcer and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Casearia sylvestris* Sw**. Journal of Ethnopharmacology, v. 101, n. 1-3, p. 191-196, Oct 3 2005.
- FERREIRA, D. A. C. et al. **Quantum Mechanics/Molecular Mechanics Investigation of the Ethene Polymerization Mechanism Catalyzed by a Bulky Diimine-Ni(II) Complex**. Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 22, n. 3, p. 428-436, 2011 2011.

FISCHER, E. **Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme**. Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, v. 27, n. 3, p. 2985-2993, 1894.

FITZGERALD, G. A.; PATRONO, C. **The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2 - Reply**. New England Journal of Medicine, v. 345, n. 23, p. 1709-1709, Dec 6 2001.

FORNAI, M. et al. **NSAID-Induced Enteropathy: Are the Currently Available Selective COX-2 Inhibitors All the Same?** Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, v. 348, n. 1, p. 86-95, January 1, 2014 2014.

FRIES. **The relative toxicity of disease-modifying antirheumatic drugs** Arthritis and Rheumatism, v. 36, n. 6, p. 876-876, Jun 1993.

FRIESE, F. W. **Plantas Mediciniais Brasileiras**. São Paulo: Instituto Agrônômico do Estado de São Paulo, 1934.

GANI, O. A. B. S. M. **Signposts of docking and scoring in drug design**. Chemical Biology & Drug Design, v. 70, n. 4, p. 360-365, Oct 2007.

GEETHA, T.; VARALAKSHMI, P. **Anti-inflammatory activity of lupeol and lupeol linoleate in rats**. Journal of Ethnopharmacology, v. 76, n. 1, p. 77-80, Jun 2001.

GUEX, N.; PEITSCH, M. C. **SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling**. Electrophoresis, v. 18, n. 15, p. 2714-2723, Dec 1997.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. **Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas**. Estudos Avançados, v. 24, n. 70, p. 81-98, 2010 2010.

GUIL, J. L.; RODRIGUEZ-GARCIA, I.; TORIJA, E. **Nutritional and toxic factors in selected wild edible plants**. Plant Foods for Human Nutrition, v. 51, n. 2, p. 99-107, 1997 1997.

GUPTA, M. B. et al. **Anti-inflammatory activity of natural products .i. triterpenoids**. European Journal of Pharmacology, v. 6, n. 1, p. 67-&, 1969 1969.

GUTIERREZ, S. J. C. **Síntese do bowdenol um dihidrobenzofuranoide isolado de *Bowdichia virgilioides* e preparação de derivados da riparina isolada de *Aniba riparia* com potencial atividade biológica**. 2007. 134 (Doutorado). Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

HARPUT, U. S.; GENC, Y.; SARACOGLU, I. **Cytotoxic and antioxidative activities of *Plantago lagopus* L. and characterization of its bioactive compounds**. Food and Chemical Toxicology, v. 50, n. 5, p. 1554-1559, May 2012.

HAWKEY, C. J. **Gastrointestinal toxicity of non-steroid anti-inflammatory drugs**. In: VANE, J. R. e BOTTING, R. M. (Ed.). **Therapeutic roles of selective COX-2 inhibitor**. London: William Harvey Press, 2001. p.355-394.

HE, C. et al. **Dynamic eicosanoid responses upon different inhibitor and combination treatments on the arachidonic acid metabolic network**. Molecular Biosystems, v. 8, n. 5, p. 1585-1594, 2012 2012.

- HERZEL, H. et al. **Extracting information from cDNA arrays**. *Chaos*, v. 11, n. 1, p. 98-107, Mar 2001.
- HETENYI, C.; VAN DER SPOEL, D. **Efficient docking of peptides to proteins without prior knowledge of the binding site**. *Protein Science*, v. 11, n. 7, p. 1729-1737, 2002.
- JONES, G. et al. **Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking**. *Journal of Molecular Biology*, v. 267, n. 3, p. 727-748, Apr 4 1997.
- JONES, R. **Nonsteroidal anti-inflammatory drug prescribing: past, present, and future**. *The American Journal of Medicine*, v. 110, p. 7, 2001.
- JUCKY, D. B. F. et al. **Two new isoflavonoids from *Bowdichia virgilioides***. *Natural Product Research*, v. 20, n. 1, p. 27-30, Jan 2006.
- KATZUNG, B.; MASTERS, S.; TREVOR, A. J. **Basic and Clinical Pharmacology**. 11^a. 2009.
- KERWIN, S. M. **ChemBioOffice Ultra 2010 Suite**. *Journal of the American Chemical Society*, v. 132, n. 7, p. 2466-2467, Feb 24 2010.
- KESTER, M.; VRANA, K. E.; KARPA, K. D. **Integrated Review Pharmacology**. 2. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2012.
- KHANNA, I. K. et al. **1,2-diarylpyrroles as potent and selective inhibitors of cyclooxygenase-2**. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 40, n. 11, p. 1619-1633, May 23 1997.
- KITCHEN, D. B. et al. **Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: Methods and applications**. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 3, n. 11, p. 935-949, Nov 2004.
- KUMMER, C. L.; COELHO, T. C. R. B. **Anti-inflamatórios não esteróides inibidores da ciclooxigenase-2 (COX-2): aspectos atuais**. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, v. 52, n. 4, p. 498-512, 2002-07 2002.
- KUNSCH, C.; MEDFORD, R. M. **Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature**. *Circulation Research*, v. 85, n. 8, p. 753-766, Oct 15 1999.
- KURUMBAIL, R. G. et al. **Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents**. *Nature*, v. 384, n. 6610, p. 644-648, Dec 19 1996.
- LEAL, R. C. et al. **The quantum chemistry in the understanding of theories of organic chemistry**. *Quimica Nova*, v. 33, n. 5, p. 1211-1215, 2010 2010.
- LESK, A. **Introduction to Bioinformatics** 2^a. United States: Oxford University Press Inc., New York, 2005.
- LEWIS, W. G. et al. **Click chemistry in situ: Acetylcholinesterase as a reaction vessel for the selective assembly of a femtomolar inhibitor from an array of building blocks**. *Angewandte Chemie-International Edition*, v. 41, n. 6, p. 1053-+, 2002 2002.

- LIMA, D. K. S. et al. **Evaluation of the antinociceptive, anti-inflammatory and gastric antiulcer activities of the essential oil from *Piper aleyreanum* C.DC in rodents.** Journal of Ethnopharmacology, v. 142, n. 1, p. 274-282, Jun 26 2012.
- LIMA NETO, S. A.; PETROVICK, P. R. **A celulose na farmácia.** Cad. Far., v. 13, n. 1, p. 59-64, 1997.
- LIPSKY, P. E. et al. **Unresolved issues in the role of cyclooxygenase-2 in normal physiologic processes and disease.** Archives of Internal Medicine, v. 160, n. 7, p. 913-920, Apr 10 2000.
- LOLL, P. J.; PICOT, D.; GARAVITO, R. M. **THE STRUCTURAL BASIS OF ASPIRIN ACTIVITY INFERRED FROM THE CRYSTAL-STRUCTURE OF INACTIVATED PROSTAGLANDIN H-2 SYNTHASE.** Nature Structural Biology, v. 2, n. 8, p. 637-643, Aug 1995.
- LOMBARDINO, J. G.; LOWE, J. A. **The role of the medicinal chemist in drug discovery - Then and now.** Nature Reviews Drug Discovery, v. 3, n. 10, p. 853-862, Oct 2004.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas no Brasil.** Nova Odessa: 1992. 368
- MANN, J. **Chemical Aspects of Biosynthesis.** p. 53-61, 1994.
- MARNETT, L. J. et al. **Arachidonic acid oxygenation by COX-1 and COX-2 - Mechanisms of catalysis and inhibition.** Journal of Biological Chemistry, v. 274, n. 33, p. 22903-22906, Aug 13 1999.
- MARTINS, F. T. et al. **Composition, and anti-inflammatory and antioxidant activities of the volatile oil from the fruit peel of *Garcinia brasiliensis*.** Chemistry & Biodiversity, v. 5, n. 2, p. 251-258, 2008 2008.
- MELO, F. N. et al. **Bowdenol, a new 2,3-dihydrobenzofuran constituent from *Bowdichia virgilioides*.** Natural Product Letters, v. 15, n. 4, p. 261-266, 2001 2001.
- MENICHINI, F. et al. **Phytochemical composition, anti-inflammatory and antitumour activities of four *Teucrium* essential oils from Greece.** Food Chemistry, v. 115, n. 2, p. 679-686, Jul 15 2009.
- MENON, S. R. et al. **Structure-antimutagenic activity relationship study of plicatin B.** Journal of Natural Products, v. 62, n. 1, p. 102-106, Jan 1999.
- MEZEI, M. **Simulaid: A Simulation Facilitator and Analysis Program.** Journal of Computational Chemistry, v. 31, n. 14, p. 2658-2668, Nov 15 2010.
- MIRANDA, S. G.; VAZQUEZ, P. A. M. **The raman spectrum of the squarate (C₄O₄²⁻) anion: an *ab initio* basis set dependence study.** Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 13, n. 3, p. 324-331, May-Jun 2002.
- MØLLER, C.; PLESSET, M. S. Phys. Rev, v. 46, n. 618, 1934.

MORGON, N. H. **Computação em química teórica: informações técnicas**. Quimica Nova, v. 24, n. 5, p. 676-682, 2001.

MORRIS, G. M., HUEY, R., LINDSTROM, W., SANNER, M. F., BELEW, R. K., GOODSSELL, D. S. AND OLSON, A. J. **Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility**. J. Computational Chemistry, v. 16, p. 2785-2791, 2009.

MOZAFFARIAN, V. A. **Dictionary of iranian plant names**. Tehran, Iran: Farhang Moaser,, 1996.

NOWICKI, J.-P.; SCATTON, B. Measurement and expression of drug effects in the practice of medicinal chemistry. In: WERMUTH, C. G. (Ed.). **Pratice of Medicinal Chemistry**. 3^a. Burlington: Academic Press 2008. p.73-84.

OLIVEIRA, F.; SAITO, M. L. **Alguns vegetais brasileiros empregados no tratamento da diabetes**. Revista Brasileira de farmácia, v. 2, n. 4, p. 170-196, 1989.

PEREIRA, C. K. B. **ESTUDO QUÍMICO E ATIVIDADES MICROBIOLÓGICAS DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Psidium* (Myrtaceae)**. 2010. 120 (mestre em Bioprospecção Molecular). Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular Universidade Regional do Cariri, Crato.

PETTERSEN E.F, G. T. D., HUANG C.C, COUCH G.S, GREENBLATT, D.M, MENG, E.C, FERRIN, T.E. J Comput Chem, v. 25, n. 13, p. 1605-12, 2004.

PIO-CORRÊA, M. **Dicionário das Plantas Uteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas** Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1984.

PLEWCZYNSKI, D. et al. **Can We Trust Docking Results? Evaluation of Seven Commonly Used Programs on PDBbind Database**. Journal of Computational Chemistry, v. 32, n. 4, p. 742-755, Mar 2011.

RAMOS, J. M. O. et al. **Chemical constituents and potential anti-inflammatory activity of the essential oil from the leaves of *Croton argyrophyllus***. Revista Brasileira De Farmacognosia-Brazilian Journal of Pharmacognosy, v. 23, n. 4, p. 644-650, Jul-Aug 2013.

RANG, H. P. et al. **Pharmacology**. 7^a. 2011.

RECHINGER, K. H. ***Thecocarpus*, in: Flora Iranica, Umbelliferae**. Austria Akademische Druck and Verlagsansalt, Gras, 1987.

RIZZINI, C. T. **Árvores e madeiras úteis do Brasil**. 2^a. São Paulo: Edgard Blucher, 1990.

RIZZINI, C. T.; MORS, W. B. **Botânica Econômica Brasileira**. São Paulo: 1976.

ROCHA E SILVA, M. **Fundamentos da farmacologia e suas aplicações à terapêutica**. 3. Brasília: 1973.

RODRIGUES, C. R. **Processos modernos no desenvolvimento de fármacos: modelagem molecular**. Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola, n. 3, 2001.

ROWLINSON, S. W. et al. **A novel mechanism of cyclooxygenase-2 inhibition involving interactions with Ser-530 and Tyr-385.** Journal of Biological Chemistry, v. 278, n. 46, p. 45763-45769, Nov 14 2003.

SACCARO JUNIOR, N. L. **A regulamentação de acesso a recursos genéticos e repartição de benefícios: disputas dentro e fora do Brasil.** APLICADA, I. D. P. E. Brasília 2011.

SALOMON-FERRER, R.; CASE, D. A.; WALKER, R. C. **An overview of the Amber biomolecular simulation package.** Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science, v. 3, n. 2, p. 198-210, 2013.

SANTOS, R. I. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 1ª. Porto Alegre/Florianópolis: 1999.

SARAC, Z. et al. **Biological activity of Pinus nigra terpenes-Evaluation of FtsZ inhibition by selected compounds as contribution to their antimicrobial activity.** Computers in Biology and Medicine, v. 54, p. 72-78, Nov 1 2014.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 1ª. Porto Alegre/Florianópolis: 1999. 821

SCHMIDT, M. W. B., K. K.; BOATZ, J. A.; ELBERT, S. T.; GORDON, M. S.; JENSEN, J. H.; KOSEKI, S.; MATSUNAGA, N.; NGUYEN, K. A.; SU, S.; WINDUS, T. L.; DUPUIS, M.; MONTGOMERY, J. A. J. *Comput. Chem*, v. 14, p. 1347-1363, 1993.

SCHONBECK, U. et al. **Augmented expression of cyclooxygenase-2 in human atherosclerotic lesions.** American Journal of Pathology, v. 155, n. 4, p. 1281-1291, Oct 1999.

SEIBERT, K. et al. **Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase-2 in inflammation and pain.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 91, n. 25, p. 12013-12017, Dec 6 1994.

SELINSKY, B. S. et al. **Structural analysis of NSAID binding by prostaglandin H-2 synthase: Time-dependent and time-independent inhibitors elicit identical enzyme conformations.** Biochemistry, v. 40, n. 17, p. 5172-5180, May 1 2001.

SHUKLA, S. et al. **Studies on anti-inflammatory, antipyretic and analgesic properties of *Caesalpinia bonducella* F. seed oil in experimental animal models.** Food and Chemical Toxicology, v. 48, n. 1, p. 61-64, Jan 2010.

SIANI, A. C. et al. **Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of *Protium*.** Journal of Ethnopharmacology, v. 66, n. 1, p. 57-69, Jul 1999.

SILVA, J. P. et al. **Antinociceptive Activity of Aqueous Extract of *Bowdichia virgilioides* in Mice.** Journal of Medicinal Food, v. 13, n. 2, p. 348-351, Apr 2010.

SILVA JUNIOR, I. F. et al. **Antimicrobial screening of some-medicinal plants from Mato Grosso Cerrado.** Revista Brasileira De Farmacognosia-Brazilian Journal of Pharmacognosy, v. 19, n. 1B, p. 242-248, Jan-Mar 2009.

SOBRAL CAVALCANTE, J. M. et al. **Steroidal and phenolic compounds from *Sidastrum paniculatum* (L.) fryxell and evaluation of cytotoxic and anti-inflammatory activities.** Quimica Nova, v. 33, n. 4, p. 846-849, 2010 2010.

SOUSA, S. F.; FERNANDES, P. A.; RAMOS, M. J. **Protein-ligand docking: Current status and future challenges.** Proteins-Structure Function and Bioinformatics, v. 65, n. 1, p. 15-26, Oct 1 2006.

SOUZA, C. D.; FELFILI, M. J. **Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás.** Acta Botânica Basílica, v. 20, p. 135-142, 2006.

SPITZER, V.; SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** Porto Alegre/Florianópolis: 1999.

SULTAN, A. et al. **Single dose oral flurbiprofen for acute postoperative pain in adults.** Cochrane Database of Systematic Reviews, n. 3, 2009 2009.

TAHERKHANI, M.; MASOUDI, S.; RUSTAIYAN, A. **Volatile Constituents of the Aerial Parts of *Torilis leptophylla* (L.) Reichenb., *Thecocarpus meifoliosus* Boiss., Leaves of *Xanthogalum purpurascens* Ave. Lall. and Flowers of *Astrodaucus orientalis* (L.) Drude.: Four Umbelliferae Herbs from Iran.** Asian Journal of Chemistry, v. 24, n. 4, p. 1596-1600, Apr 2012.

TAHERKHANI, M. et al. **Chemical Constituents, Antimicrobial Activity, Antioxidant and Total Phenolic Content in the Leaves of *Thecocarpus Meifoliosus* Boiss. Umbelliferae Herbs Growing Wild in Iran.** Pharmaceutical Chemistry Journal, v. 48, n. 1, p. 44-48, Apr 2014.

TAO, K. L. Genetic alteration and germoplasm conservation. In: FU, J. e KHAN, A. A. (Ed.). **Advanced in the science and thecnology of seeds.** : Beijing: Science Press, 1992. p.137-149.

THOMAZZI, S. M. et al. **Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Bowdichia virgilioides* (sucupira).** Journal of Ethnopharmacology, v. 127, n. 2, p. 451-456, Feb 3 2010.

VANE, J. R. **Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs.** Nature-New Biology, v. 231, n. 25, p. 232-&, 1971 1971.

VANE, J. R.; BOTTING, R. M. **New insights into the mode of action of antiinflammatory drugs.** Inflammation Research, v. 44, n. 1, p. 1-10, Jan 1995.

VEIGA, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. **Medicinal plants: Safe cure?** Quimica Nova, v. 28, n. 3, p. 519-528, May-Jun 2005.

VEIGA, V. F. et al. **Phytochemical and antioedematogenic studies of commercial copaiba oils available in Brazil.** Phytotherapy Research, v. 15, n. 6, p. 476-480, Sep 2001.

VELOZO, L. S. M. et al. **Odoratin 7-O-beta-D-glucopyranoside from *Bowdichia virgilioides*.** Phytochemistry, v. 52, n. 8, p. 1473-1477, Dec 1999.

VERLI, H. **Bioinformática da biologia à flexibilidade molecular.** Porto Alegre: 282 p. 2014.

VITALE, P. et al. **Synthesis, pharmacological characterization, and docking analysis of a novel family of diarylisoxazoles as highly selective cyclooxygenase-1 (COX-1) inhibitors.** Journal of Medicinal Chemistry, v. 56, n. 11, p. 4277-4299, Jun 13 2013.

VOIT, E. O.; RADIVOYEVITCH, T. **Biochemical systems analysis of genome-wide expression data.** Bioinformatics, v. 16, n. 11, p. 1023-1037, Nov 2000.

WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C. **Molecular structure of nucleic acids - a structure for deoxyribose nucleic acid.** Nature, v. 171, n. 4356, p. 737-738, 1953 1953.

WHELTON, A. **Renal aspects of treatment with conventional nonsteroidal anti-inflammatory drugs versus cyclooxygenase-2-specific inhibitors.** The American Journal of Medicine, v. 110, n. 3, p. 33-42, 2001.

WILLOUGHBY, D. A.; MOORE, A. R.; COLVILLE-NASH, P. R. **COX-1, COX-2, and COX-3 and the future treatment of chronic inflammatory disease.** Lancet, v. 355, n. 9204, p. 646-648, Feb 19 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, W. H. O. **Guidelines on good agricultural and collection practices (GACP) for medicinal plants.** v. 1, 2003.

ZHURKO, G. A.; ZHURKO, D. A., Disponível em: < <http://chemcraftprog.com> >.

ZIELINSKA, S.; MATKOWSKI, A. **Phytochemistry and bioactivity of aromatic and medicinal plants from the genus *Agastache* (Lamiaceae).** Phytochemistry Reviews, v. 13, n. 2, p. 391-416, Jun 2014.

ZWENGER, S.; BASU, C. **Plant terpenoids: applications and future potentials.** Biotechnol. Mol. Biol. Rev, n. 3, p. 1-7, 2008.

ANEXO

Lista de abreviaturas internacionais dos aminoácidos

Aminoácido	Abreviatura 3 letras	Abreviatura 1 letra
Ácido aspártico	Asp	D
Ácido glutâmico	Glu	E
Histidina	His	H
Lisina	Lys	K
Arginina	Arg	R
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Tirosina	Tyr	Y
Asparagina	Asn	N
Glutamina	Gln	Q
Glicina	Gly	G
Alanina	Ala	A
Valina	Val	V
Leucina	Leu	L
Isoleucina	Ile	L
Cisteína	Cys	C
Prolina	Pro	P
Fenilalanina	Phe	F
Triptofano	Trp	W
Metionina	Met	M

Fonte – (DE ROBERTIS; HIB, 2014)