



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

JULIANA SANTA ARDISSON

**ESTUDO DO EFEITO DE NAFTOPIRANONAS DE ESPÉCIES DE
PAEPALANTHUS SP SOBRE *HELICOBACTER PYLORI*,
MACRÓFAGOS ATIVADOS E LINHAGEM CELULAR DE
ADENOCARCINOMA GÁSTRICO**

VITÓRIA - ES

2018



Juliana Santa Ardisson

**ESTUDO DO EFEITO DE NAFTOPIRANONAS DE ESPÉCIES DE
PAEPALANTHUS SP SOBRE *HELICOBACTER PYLORI*,
MACRÓFAGOS ATIVADOS E LINHAGEM CELULAR DE
ADENOCARCINOMA GÁSTRICO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, do Programa de Pós-Graduação em ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Rezende Kitagawa

Coorientador: Dr. Ricardo Pereira Rodrigues

VITÓRIA - ES

2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do
Espírito Santo, ES, Brasil)
Bibliotecário: Rafael Lima de Carvalho – CRB-6 MG-002926/O

A676e Ardisson, Juliana Santa, 1993 -
Estudo do efeito de naftopiranoas de espécies de *paepalanthus sp*
sobre *Helicobacter pylori*, macrófagos ativados e linhagem celular de
adenocarcinoma gástrico / Juliana Santa Ardisson - 2018.
87 f. : il.

Orientador: Rodrigo Rezende Kitagawa.
Coorientador: Ricardo Pereira Rodrigues.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. *Helicobacter pylori*. 2. Neoplasias Gástricas. 3. Óxido nítrico sintase.
I. Kitagawa, Rodrigo Rezende. II. Rodrigues, Ricardo Pereira. III.
Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV.
Título.

CDU: 61

Juliana Santa Ardisson

**ESTUDO DO EFEITO DE NAFTOPIRANONAS DE ESPÉCIES DE
PAEPALANTHUS SP SOBRE *HELICOBACTER PYLORI*,
MACRÓFAGOS ATIVADOS E LINHAGEM CELULAR DE
ADENOCARCINOMA GÁSTRICO**

Trabalho de Dissertação de Mestrado aprovado em 19/03/2018 para obtenção
do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Ciências
Farmacêuticas, da Universidade Federal do Espírito Santo

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Ricardo Pinto Schuenck / UFES



Prof. Dr. Marcio Fronza / UVV



Prof. Dr. Rodrigo Rezende Kitagawa (orientador) / UFES

Vitória/ES

2018

AGRADECIMENTOS

Início meus agradecimentos a DEUS, já que Ele colocou pessoas tão especiais ao meu lado, sem as quais certamente não teria conseguido!

Aos meus pais Carlindo e Deuza, meu infinito agradecimento. Sempre acreditaram em minha capacidade e me acharam a melhor de todas, mesmo não sendo. Isso só me fortaleceu e me fez tentar, não ser a melhor, mas a fazer o melhor de mim. Obrigada pelo amor incondicional!

A minha irmã Lidiana, meu agradecimento especial, pois, a seu modo, sempre se orgulhou de mim e confiou em meu trabalho. Obrigada pela confiança!

Ao meu querido noivo André, por ser tão importante na minha vida. Sempre a meu lado, me pondo para cima e me fazendo acreditar que posso mais que imagino. Devido a seu companheirismo, amizade, paciência, compreensão, apoio, alegria e amor, este trabalho pôde ser concretizado.

Aos meus colegas do laboratório de Triagem Biológica de Produtos Naturais, pelos momentos divididos juntos, especialmente os do mestrado Angélica, Augusto, Brena, Jessyca, Milena e o ICs Fran, Julia, Luiza, Mateus. Todos vocês são responsáveis por tornar mais leve nosso trabalho... Obrigada por dividir comigo as angústias e alegrias. Foi bom poder contar com vocês!

Ao laboratório LUCCAR, por todo auxílio oferecido para realização das imagens de microscopia eletrônica de varredura.

Agradeço também à disponibilidade dos membros da banca de defesa, muito obrigada pelo tempo oferecido para avaliação deste trabalho.

Agradeço à professora Rita de Cassia por toda a orientação e apoio durante todo o mestrado.

Agradeço ao meu coorientador Ricardo Pereira Rodriguês, por toda a paciência e tempo dedicado para me orientar.

Agradeço ao meu orientador professor Rodrigo Rezende Kitagawa, muito obrigada por todo o conhecimento e experiência que me ofertou. Agradeço também pela confiança em me orientar mesmo sem me conhecer, sempre estando disponível e disposto a ajudar, querendo que eu aproveitasse cada segundo dentro do mestrado para absorver algum tipo de conhecimento. Muito obrigada!

Agradeço, também, à CAPES pelo apoio financeiro.

Finalmente, gostaria de agradecer à Universidade Federal do Espírito Santo e ao Programa de pós graduação em Ciências Farmacêuticas.

OBRIGADA A TODOS!

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca vencer obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis”.

José de Alencar

RESUMO

As naftopiranonas, paepalantina e 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina isoladas de *Paepalanthus* sp demonstraram, em estudos anteriores, potencial antioxidante, anti-inflamatório, antitumoral e antibacteriano, inclusive contra *Helicobacter pylori*. A infecção por *H. pylori* é uma das principais causas de câncer gástrico, por provocar excessiva resposta inflamatória através da estimulação da infiltração de neutrófilos e macrófagos, aumentando a liberação de espécies reativas e induzindo a produção de mediadores pró-inflamatórios. No ambiente gástrico, *H. pylori* expressa a enzima urease, capaz de aumentar o pH do meio através da formação de amônia. Neste sentido, buscamos avaliar o efeito das naftopiranonas sobre *H. pylori*, imunomodulação em macrófagos e ação citotóxica sobre linhagem tumoral gástrica e confirmar as interações destas substâncias sobre as enzimas urease e iNOS através de estudos de modelagem molecular. A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) das naftopiranonas para *H. pylori* foi realizada através da técnica de microdiluição em caldo para posterior verificação da atividade sinérgica com o metronidazol e para análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A avaliação da inibição da urease pelas naftopiranonas foi realizada *in vitro* e *in silico*. Avaliou-se também a atividade imunomoduladora das naftopiranonas através da detecção de óxido nítrico e citocinas (TNF- α , IL-1 β , e IL-6) liberadas por macrófagos e foi estudado *in silico* o potencial de interação das naftopiranonas com a enzima iNOS. Além disso, foi avaliado a redução da patogenicidade de *H. pylori* em macrófagos após tratamento com concentrações sub-inibitórias das naftopiranonas. Por fim, avaliou-se a atividade citotóxica em células de adenocarcinoma gástrico (AGS) pelo método de MTT. A 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina demonstrou atuar sinergicamente com o metronidazol sobre *H. pylori* (cepa resistente a metronidazol), reduzindo a CIM deste para 8 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados da avaliação morfológica de *H. pylori* por microscopia eletrônica de varredura, evidenciaram que as naftopiranonas alteram a morfologia de *H. pylori*, indicando possível atuação sobre as *Penicillin-binding proteins* (PBP's) da parede celular bacteriana. Foi verificado também que *H. pylori* cultivada com concentrações sub-inibitórias de naftopiranonas provoca a redução da ativação de macrófagos através da inibição da produção de NO, $60,21 \pm 1,8\%$ para paepalantina e $47,50 \pm 0,6\%$ para 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina. Em relação à urease, não foi verificada atividade inibitória significativa das amostras e nem interações favoráveis com os principais resíduos de aminoácidos no sítio ativo desta enzima. As amostras demonstraram potencial imunomodulador ao inibir as citocinas pró-inflamatórias produzidas por macrófagos estimulados com LPS (TNF- α : $36,07 \pm 2,63\%$ e $60,19 \pm 0,12\%$ e IL-6 : $36,91 \pm 0,57\%$ e $92,35 \pm 0,15\%$ para paepalantina e 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina, respectivamente, ambas na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$) e o NO ($99,5 \pm 5,31\%$ para paepalantina e $76,9 \pm 4,11\%$ para 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina na concentração de 12,5 $\mu\text{g/mL}$), demonstrando também, potencial de interação no sítio ativo da enzima iNOS. Além disso, as naftopiranonas demonstraram significativa atividade citotóxica sobre AGS, com IC₅₀ de $24,56 \pm 2,3 \mu\text{g/mL}$ para paepalantina e $17,45 \pm 1,6 \mu\text{g/mL}$ para 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina. De modo geral, as naftopiranonas demonstram potencial para emprego futuro no tratamento e prevenção da infecção por *H. pylori* bem como das doenças relacionadas com esta infecção, principalmente o câncer gástrico.

Palavras chave: Paepalantina, 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina, *Helicobacter pylori*, urease, óxido nítrico sintase, *docking* molecular, câncer gástrico.

ABSTRACT

The naphthopyranones paepalantine and 5-methoxy-3,4-dehydroxanthomegnin were isolated from *Paepalanthus* sp and showed antioxidant, anti-inflammatory, antitumor and antimicrobial potential, including anti-*H. pylori*. *H. pylori* infection is one of the main causes of gastric cancer. The infection causes an excessive inflammatory response through the neutrophils and macrophages infiltration, increasing the release of reactive species and inducing the production of pro-inflammatory mediators. In the gastric environment, *H. pylori* expresses the urease enzyme, increasing the pH of the medium through ammonia production. In this context, our aim was to evaluate the activity of naphthopyranones in *H. pylori*, immunomodulation in macrophages and cytotoxic action in gastric adenocarcinoma cell line and to confirm the potential of interaction of these substances in the urease and iNOS binding sites through molecular *docking* studies. The determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) of the naphthopyranones for *H. pylori* was performed by broth microdilution technique for further analysis of the synergistic activity with metronidazole and for morphological analysis by scanning electron microscopy (SEM). The evaluation of the urease inhibition by the naphthopyranones was performed *in vitro* and *in silico*. The immunomodulatory activity of naphthopyranones was evaluated detecting the nitric oxide and cytokines (TNF- α , IL-1 β , and IL-6) released by macrophages, and the interaction potential of the naphthopyranones within iNOS binding site was studied *in silico*. The reduction of the pathogenicity of *H. pylori* in macrophages was investigated after treatment with sub-inhibitory concentrations of the naphthopyranones. Finally, cytotoxic activity in gastric adenocarcinoma cells (AGS) was evaluated by the MTT assay. 5-methoxy-3,4-dehydroxanthomegnin is shown to inhibit *H. pylori* (metronidazole resistant strain) synergistically with metronidazole, reducing its MIC to 8 $\mu\text{g/mL}$. The results of the scanning electron microscopy, that evaluated the *H. pylori* morphology, evidenced that the naphthopyranones alter the *H. pylori* morphology, indicating a possible role on the Penicilin-binding protein (PBPs) due to the bacterial cell wall modifications. It was also verified that *H. pylori* grow under naphthopyranones sub-inhibitory concentrations causes reduction of the activation of macrophages by inhibition of NO production in $60.21 \pm 1.8\%$ for paepalantine and $47.50 \pm 0.6\%$ for 5-methoxy-3,4-dehydroxanthomegnin. Regarding urease inhibition, no significant inhibitory activity of the samples and no favorable interactions with the major aminoacid residues in the active site of this enzyme was observed. The samples demonstrated immunomodulatory potential by inhibiting the proinflammatory cytokines produced by LPS stimulated macrophages (TNF- α inhibition of $36.07 \pm 2.63\%$ and $60.19 \pm 0.12\%$ and IL-6 inhibition of $36.91 \pm 0.57\%$ and $92.35 \pm 0.15\%$ of paepalantine and 5-methoxy-3,4-dehydroxanthomegnin respectively, both at 25 $\mu\text{g/mL}$) and NO ($99.5 \pm 5.31\%$ for paepalantine and $76.9 \pm 4.11\%$ for 5-methoxy-3,4-dehydroxanthomegnin at a concentration of 12.5 $\mu\text{g/mL}$) and also demonstrated interaction potential in the active site of the iNOS enzyme. In addition, naphthopyranones demonstrated satisfactory cytotoxic activity in AGS, with IC₅₀ of $24.56 \pm 2.3 \mu\text{g/mL}$ for paepalantine and $17.45 \pm 1.6 \mu\text{g/mL}$ for 5-methoxy-3,4-dehydroxanthomegnin. In general, the naphthopyranones demonstrate potential for future use in the treatment and prevention of *H. pylori* infection as well as the diseases related to this infection, especially gastric cancer.

key words: Paepalantine, 5-methoxy-3,4-dehydroxanthomegnin, *Helicobacter pylori*, urease, nitric oxide synthase, molecular docking, gastric cancer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química da cumarina	18
Figura 2 - Estrutura química básica das quinonas.....	18
Figura 3 - Estrutura química 9,10-dihidroxi-5,7-dimetoxi-1H-nafto (2,3c) piran-1-ona - paepalantina.....	19
Figura 4 - Estrutura química de 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina	19
Figura 5 - <i>Paepalanthus bromelioides</i> Silv. e <i>Paepalanthus latipes</i> Silv.	20
Figura 6 - Estrutura básica das naftopiranonas	20
Figura 7 - Imagem em 3D de <i>Helicobacter pylori</i>	23
Figura 8 - Micrografias de <i>H. pylori</i> com diferentes tratamentos	43
Figura 9 - Validação do modelo de <i>docking</i> por <i>redocking</i> no sítio da urease	48
Figura 10 - Estrutura química dos inibidores da enzima urease.....	48
Figura 11 - Diagrama em <i>sticks</i> do sítio ativo da enzima urease	49
Figura 12 - Aminoácidos mais frequentes nas interações dos inibidores no sítio ativo da enzima urease	50
Figura 13 - Resultado de <i>docking</i> das naftopiranonas	51
Figura 14 - Validação do modelo de <i>docking</i> por <i>redocking</i> no sítio da iNOS.	61
Figura 15 - Estrutura química dos inibidores da enzima iNOS.	62
Figura 16 - Diagrama em <i>sticks</i> do ligante cristalográfico 1PM601 no sítio ativo da enzima iNOS.	63
Figura 17 - Diagrama em <i>sticks</i> do inibidor 1400W no sítio da enzima iNOS..	64
Figura 18 - Diagrama em <i>sticks</i> do inibidor L-NAME no sítio da enzima iNOS	64
Figura 19 - Resultado de <i>docking</i> de paepalantina no sítio da enzima iNOS..	66
Figura 20 - Resultado de <i>docking</i> de 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina com as principais interações no sítio ativo da enzima iNOS.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de CIM e CBM das substâncias e em associação com metronidazol testadas em <i>H. pylori</i>	45
Tabela 2 - Aminoácidos mais frequentes nas interações com diferentes inibidores de urease.	50
Tabela 3 - Resultados in vitro e in silico das estruturas analisadas para enzima urease	52
Tabela 4 - Aminoácidos mais frequentes nas interações com diferentes inibidores de iNOS	65
Tabela 5 - Resultados in vitro e in silico das estruturas analisadas para enzima iNOS.....	67
Tabela 6 - Índice de seletividade para as naftopiranonas e cisplatina	71

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Efeito de concentrações crescentes de paepalantina, 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina e metronidazol sobre <i>H. pylori</i>	40
Gráfico 2 - Relação concentração-resposta da interação metronidazol e naftopiranonas (32 µg/mL) no crescimento de <i>H. pylori</i>	45
Gráfico 3 - Atividade da paepalantina e 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina sobre a enzima urease.....	46
Gráfico 4 - Atividade inibitória do ácido hidroxâmico e outros inibidores sobre a enzima urease.....	47
Gráfico 5 - Efeito de concentrações sub-inibitórias das naftopiranonas sobre a redução da ativação de macrófagos por <i>H. pylori</i>	53
Gráfico 6 - Atividade citotóxica de paepalantina e 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina em macrófagos murinos RAW 264.7..	55
Gráfico 7 - Indução da produção da citocina IL-10 pela paepalantina e 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina	56
Gráfico 8 - Efeito das naftopiranonas sobre a produção de TNF- α	58
Gráfico 9 - Efeito da paepalantina e 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina sobre a produção da citocina IL-6	57
Gráfico 10 - Efeito da paepalantina e 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina na produção de óxido nítrico em macrófagos	59
Gráfico 11 - Efeito da paepalantina e 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina na captura direta de óxido nítrico por ensaio químico.	60
Gráfico 12 - Efeito da paepalantina e 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina na produção do ânion superóxido em macrófagos.....	69
Gráfico 13 - Efeito da paepalantina e 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina no sequestro do ânion superóxido.....	68
Gráfico 14 - Efeito da paepalantina, 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina e cisplatina em cultura celular de adenocarcinoma gástrico (AGS).	71

LISTA DE ABREVIATURAS

1400W - *N*-(3-aminometil)benzil) acetamidina

1PM601 - N-[(1,3-benzodioxol-5-il)metil]-1-[2-(1H-imidazol-1-il)pirimidin-4-il]-4-(metoxicarbonil) -piperazina-2-acetamida

AGS - Adenocarcinoma Gástrico

ALA - Alanina

APCs - Células apresentadoras de antígenos

ARG - Arginina

ASP - Asparaginina

ATCC - *American Type Culture Collection*

BHI - *Brain heart infusion*

CH₄N₂O – Ureia

CagA - *Citotoxin associated gene A*

CBM - Concentração bactericida mínima

CE₅₀ - Concentração efetiva 50%

CIM - Concentração inibitória mínima

CLSI - *Clinical & Laboratory Standards Institute*

CYS – Cisteína

DMEM - *Dulbecco's modified eagle medium*

DPPH - Radical 1,1-difenil-2-picrilidrazilo

ERNs - Espécies reativas de nitrogênio

EROs - Espécies reativas de oxigênio

EUCAST - *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

GLY – Glicina

GLU – Glutamina

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

HIS – Histidina

HOCl - Ácido hipocloroso

HP-NAP - Proteínas de ativação de neutrófilo de *H. pylori*

HUP - Urease de *Helicobacter pylori*

IC₅₀ - Índice citotóxico 50%

ICAM-1 - Molécula de adesão intercelular

IFN-γ - Interferon-γ

IL-1 β - Interleucina 1 β

IL-10 - Interleucina 10

IL-6 - Interleucina 6

IL-8 - Interleucina 8

iNOS - Óxido nítrico sintase induzíveis

IS - Índice de seletividade

LEU - Leucina

L-NAME - *N ω* -Nitro-L-arginina metil ester

LPS - Lipopolissacarídeo

MET – Metioninas

MEV - Microscopia eletrônica de varredura

MTT-tetrazólio - *Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide*

MTZ - Metronidazol

NADH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADPH - Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

NaNO₂ - Nitrito de sódio

NBT - *Nitrotetrazolium blue chloride*

NH₂Cl - Monocloramina

NH₃ - Amônia

NO - Óxido nítrico

NO₂⁻ - Nitrito

NOS - Óxido nítrico sintase

NPS - Nitroprussiato de sódio

O₂⁻ - Ânion superóxido

•OH - Radical hidroxil

ONOO⁻ - Peroxinitrito

PAMP - Padrões moleculares associados a patógenos

PBPs - Proteínas de ligação à penicilina

PDB - *Protein Data Bank*

PHE – Fenilalanina

PMS - Metasulfato de fenazina

PRO – Prolina

RMSD - *Root mean square deviation*

SFB - Soro fetal bovino

TLRs - Receptores tipo *toll like*

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

TRP – Triptofano

TYR – Tirosina

VacA - *Vacuolating cytotoxin A*

VAL – Valina

VCAM-1 - Proteína de adesão de célula vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	30
2.1	GERAL	30
2.2	ESPECÍFICOS	30
3	MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1	OBTENÇÃO DA PAEPALANTINA E 5-METOXI-3,4-DIIDROXANTOMEGNINA	31
3.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI- <i>H. PYLORI</i>	31
3.2.1	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)	31
3.2.2	AVALIAÇÃO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE NAFTOPIRANONAS E METRONIDAZOL SOBRE <i>H. PYLORI</i>	32
3.2.3	ANÁLISES MICROSCÓPICAS	32
3.3	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE SOBRE A ENZIMA UREASE	33
3.4	ENSAIO COM MACRÓFAGOS	34
3.4.1	MANUTENÇÃO DA CULTURA CELULAR DE MACRÓFAGOS	34
3.4.2	INFLUÊNCIA DAS NAFTOPIRANONAS SOBRE <i>H. PYLORI</i> NA ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS	34
3.4.3	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA	35
3.5	ENSAIOS ANTIOXIDANTES	36
3.5.1	AVALIAÇÃO DA CAPTURA DIRETA DO ÓXIDO NÍTRICO	36
3.5.2	INIBIÇÃO DO ÂNION SUPERÓXIDO ($O_2^{\cdot-}$)	36
3.6	ESTUDOS ENZIMÁTICOS <i>IN SILICO</i> DAS ENZIMAS UREASE E Inos.	37
3.6.1	<i>DOCKING</i> MOLECULAR	37
3.6.2	VALIDAÇÃO DO <i>DOCKING</i>	37
3.7	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE EM LINHAGEM CELULAR DE ADENOCARCINOMA GÁSTRICO (AGS)	38
3.7.1	ÍNDICE DE SELETIVIDADE	38
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1	ATIVIDADE ANTI- <i>H. PYLORI</i>	40
4.2	ATIVIDADE SOBRE A ENZIMA UREASE	46
4.3	ANÁLISE DO SÍTIO ATIVO DA ENZIMA UREASE DE <i>H. pylori</i>	47
4.3.1	ANÁLISE DAS PRINCIPAIS INTERAÇÕES DE INIBIDORES DE UREASE REPORTADOS NA LITERATURA	48
4.3.2	ANÁLISE DOS MODOS DE LIGAÇÃO DAS NAFTOPIRANONAS NO SÍTIO ATIVO DA ENZIMA UREASE	50

4.4 EFEITO DE <i>H. PYLORI</i> PÓS-TRATAMENTO COM CONCENTRAÇÕES SUB-INIBITÓRIAS DAS NAFTOPIRANONAS NA ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS.....	53
4.5 ATIVIDADE IMUNOMODULADORA	54
4.5.1 CITOTOXICIDADE EM MACRÓFAGOS MURINOS RAW 264.7.....	54
4.5.2 ATIVIDADE IMUNOMODULADORA EM MACRÓFAGOS MURINOS RAW 264.7	55
4.5.3 ATIVIDADE INIBITÓRIA DAS NAFTOPIRANONAS SOBRE O ÓXIDO NÍTRICO	59
4.6 ANÁLISE DO SÍTIO ATIVO DA ENZIMA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE INDUZÍVEL (iNOS)	60
4.6.1 ANÁLISE DAS PRINCIPAIS INTERAÇÕES DE INIBIDORES DE iNOS REPORTADOS NA LITERATURA POR DOCKING MOLECULAR. 62	
5.6.2 ANÁLISE DOS MODOS DE LIGAÇÃO DAS NAFTOPIRANONAS NO SÍTIO ATIVO DA ENZIMA iNOS	65
4.7 REDUÇÃO DA PRODUÇÃO DE SUPERÓXIDO ($O_2^{\bullet-}$).....	68
4.8 ATIVIDADE CITOTÓXICA SOBRE LINHAGEM CELULAR DE ADENOCARCINOMA GÁSTRICO (AGS).....	71
5 CONCLUSÕES	73
6 REFERÊNCIAS.....	74
7 APÊNDICE	86

1 INTRODUÇÃO

A utilização e o conhecimento de plantas medicinais têm revelado, desde a antiguidade, seu grande potencial no tratamento de doenças, representando muitas vezes, o único recurso terapêutico de determinadas populações (BANERJI, 1992; MACIEL et al., 2002).

No início do século 19, os avanços na ciência levaram a obtenção de compostos bioativos puros, ou metabólitos secundários, principalmente provenientes de plantas, tornando-se uma das principais fontes de diversidade química de matérias-primas para o desenvolvimento de medicamentos (CRAGG; GROTHAUS; NEWMAN, 2014).

Visto a grande quantidade de metabólitos secundários presentes nas plantas e seu potencial biológico, suas aplicações para o homem são diversas, principalmente na área farmacêutica (PHILLIPSON; ANDERSON, 1989; BALUNAS; KINGHORN, 2005).

Entre os metabolitos secundários estão as cumarinas (Figura 1), classe de substancias fenólicas derivadas da via do ácido chiquímico, e as quinonas, compostos orgânicos derivados da oxidação de fenóis produzidas pela via do acetato-malonato e, algumas vezes, pela rota do ácido chiquímico (SIMÕES et al., 2010). Ambos os metabólitos são amplamente distribuídos na natureza e constituem uma classe importante de compostos que podem ser encontrados em bactérias, fungos e principalmente, plantas (CANEDO et al., 1997; SIMÕES et al., 2010).

Inúmeras atividades biológicas estão relacionadas às cumarinas, como ação vasorelaxante (CAMPOS-TOIMIL et al., 2002), antioxidante (ANDRADE et al., 2013; SHEN et al., 2017), anti-inflamatória (PAYA et al., 1994), antifúngica (COWAN, 1999), citotóxica, antitumoral (ANDRADE et al., 2013; DOMRACHEVA et al., 2017; KOSTOVA, 2005; ZLABINGER, 1994) e antimicrobiana (D'ALMEIDA et al., 2017; RAHMAN; GRAY, 2002).

Esse amplo espectro de atividades biológicas tem despertado interesse na indústria farmacêutica, resultando no desenvolvimento de medicamentos como a warfarina, empregada como anticoagulante (GUSTAFSSON et al., 2004; HOULT; PAYÁ, 1996) e dos antibióticos novobiocina, coumermicina A1 e clorobiocina que possuem espectro de ação para bactérias Gram-positivas, tais como *Staphylococcus aureus* (LAURIN et al., 1999).

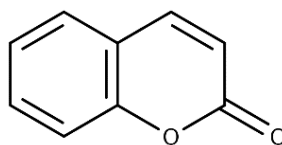


Figura 1 - Estrutura química da cumarina

As cumarinas possuem várias classes de compostos relacionados, a exemplo as isocumarinas, que possuem estrutura semelhante as cumarinas, mas com o anel lactônico invertido. Este grupo de metabólitos secundários também apresenta diversas atividades farmacológicas, como ação antitumoral, antileucêmica, antiviral, antimicrobiana e imunomoduladora (CANEDO et al., 1997; KITAGAWA et al., 2011; KUMAGAI et al, 1994; OKAMOTO; KOBAYASHI; YOSHIDA, 2005; WHYTE et al., 1996).

As quinonas, por sua vez, possuem em sua estrutura dois grupos cetona em um anel insaturado, sendo classificadas de acordo com o sistema aromático que sustenta o anel quinoidal: benzoquinonas, naftoquinonas e antraquinonas (Figura 2) (SIMÕES et al., 2010).

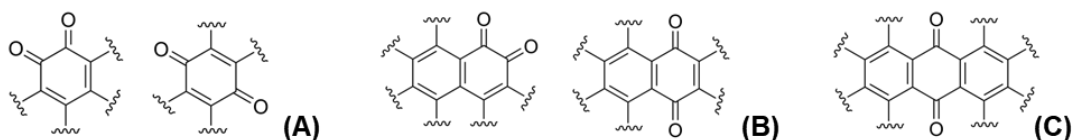


Figura 2 - Estrutura química básica das quinonas. (A): *orto* e *para*-benzoquinona; (B): *orto* e *para*-naftoquinona; (C): Antraquinona

Nos últimos anos tem-se constatado o crescimento de estudos sobre as atividades biológicas destes compostos, destacando-se atividades como anticâncer (SUBRAMANIAN; FERREIRA; TRSIC, 1998; ZAKHAROVA et al., 2011), tripanossomicida (DA SILVA et al., 2012; FERREIRA et al., 2006), fungicida (GAFNER et al., 1996; IBIS et al., 2011), moluscicida (SILVA et al., 2005), leishmanicida (KAYSER et al., 2000) entre outras potenciais atividades.

Alguns medicamentos derivados de substâncias com função quinona são empregados como agentes quimioterápicos, como a mitomicina C (IYENGAR et al., 1986), a doxorrubicina e daunorrubicina (GALM et al., 2005; WOLKENBERG; BOGER, 2002).

Na década de 90, Vilegas et al. (1990) isolaram a partir do extrato diclorometano dos capítulos florais de *Paepalanthus bromelioides* (Figura 5A) a isocumarina, 9,10 - dihidroxi-5,7-dimetoxi-1H-nafto(2,3c) piran-1-ona, denominada paepalantina (Figura 3), a qual demonstrou potencial antibacteriano para diversas bactérias Gram-positivas, como *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*.

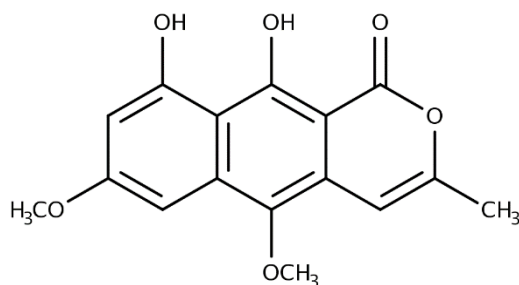


Figura 3 - Estrutura química 9,10-dihidroxi-5,7-dimetoxi-1H-nafto(2,3c)piran-1-ona - paepalantina

Posteriormente, foram isoladas outras isocumarinas de *P. bromelioides* como o dímero 8,8' - paepalantina e a vioxantina (COELHO et al., 2000). Estudos com outra espécie do gênero *Paepalanthus* conduziram ao isolamento de uma substância inédita, a 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina (Figura 4) estruturalmente semelhante à 1,4-naftoquinona com acentuado índice citotóxico, obtida da fração diclorometano dos capítulos florais de *Paepalanthus latipes* (Figura 5B) (KITAGAWA et al., 2004).

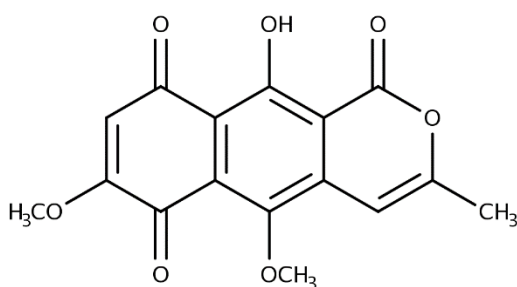


Figura 4 - Estrutura química de 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina

A família *Eriocaulaceae* possui cerca de 1.200 espécies com distribuição pantropical, sendo *Paepalanthus* o maior gênero dessa família, com aproximadamente 500 espécies, dentre as quais, mais de 400 ocorrem no Brasil (GIULIETTI; HENSOLD, 1990).

As espécies do gênero *Paepalanthus* tem como principal característica o desenvolvimento de capítulos com agrupamento de pequenas flores, essa espécie é

popularmente conhecida como “sempre-vivas”, pois tem a capacidade de conservar sua cor e forma, por anos, mesmo após o corte (GIULIETTI; HENSOLD, 1990).

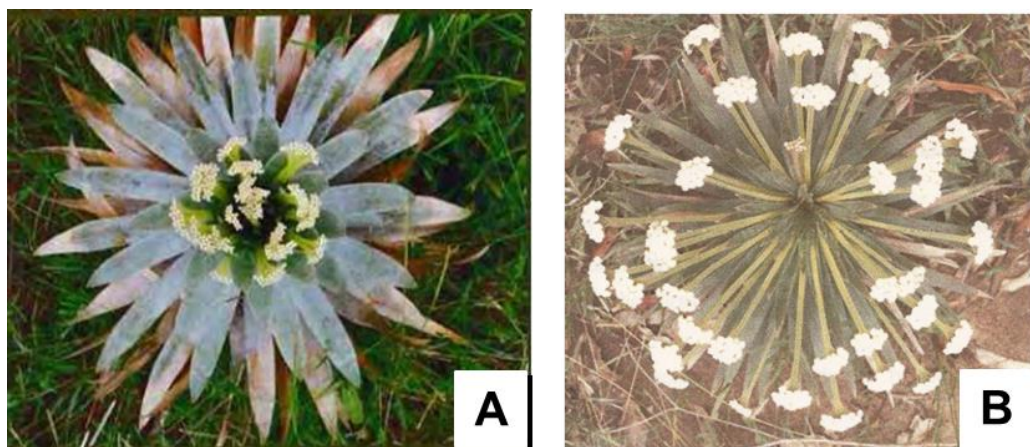


Figura 5 - (A): *Paepalanthus bromelioides* Silv.; (B): *Paepalanthus latipes* Silv. (Imagens cedidas pelo Prof. Dr. Wagner Vilegas)

O gênero *Paepalanthus* demonstra ser uma fonte de diversos metabólitos secundários, incluindo metabólitos com estruturas químicas semelhantes ao esqueleto naftopiranona. A estrutura básica das naftopiranonas é um sistema tricíclico constituído da fusão de anéis naftaleno e δ -lactona como pode ser observado na Figura 6. Este esqueleto básico abrange a estrutura da paepalantina e da 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina, que diferem-se quanto a oxigenação e grupos funcionais (DONNER, 2014).

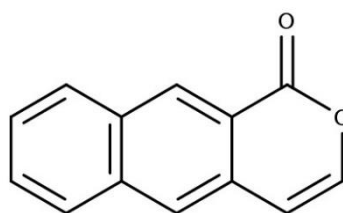


Figura 6 - Estrutura básica das naftopiranonas

Após o isolamento das naftopiranonas (paepalantina e 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina), aumentou-se o interesse em avaliar as propriedades biológicas de substâncias isoladas de plantas do gênero *Paepalanthus*, uma vez que já haviam relatos etnofarmacológicos da utilização de rizomas e flores de muitas espécies da família *Eriocaulaceae* no tratamento de infecções bacterianas, úlceras da epiderme e hanseníase (HOEHNE, 1939).

Diversas atividades biológicas da paepalantina começaram a ser investigadas. O potencial antioxidante da paepalantina foi verificado sobre espécies reativas de oxigênio (EROs) como ácido hipocloroso (HOCl), radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e inibição da mieloperoxidase através de ensaios de quimiluminescência em neutrófilos ativados (KITAGAWA et al., 2003).

Posteriormente, Devienne e colaboradores (2007) demonstraram também a atividade antioxidante da paepalantina através de ensaios com mitocôndrias isoladas de fígado de rato e sistemas não mitocondriais em comparação com o flavonoide quercetina.

Além da atividade antioxidante, a paepalantina também demonstrou ser eficaz na prevenção e tratamento da colite ulcerativa *in vivo*, tanto em aspectos histológicos quanto bioquímicos, com doses até cinco vezes menores que a dose efetiva de sulfassalazina, medicamento de escolha para o tratamento. O efeito anti-inflamatório foi associado a atividade antioxidante, além disso, houve inibição da atividade das enzimas fosfatase alcalina, mieloperoxidase e óxido nítrico sintase (DI STASI et al., 2004).

O potencial antimicrobiano e a relação estrutura-atividade da paepalantina e seus análogos (estruturas com substituições das hidroxilas das posições 9 e 10 por grupamentos acil e metil) foi avaliado para cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. faecalis*. Entre os compostos testados, apenas a paepalantina mostrou-se ativa contra estes microrganismos, demonstrando que sua atividade antimicrobiana pode ser atribuída às hidroxilas nas posições 9 e 10, as quais permitem a formação de pontes de hidrogênio intramolecular (DEVIENTE et al., 2005).

Foi demonstrado também o potencial antineoplásico da paepalantina através da avaliação da sua capacidade de permear a membrana mitocondrial e em promover apoptose em mitocôndrias isoladas de células hepáticas de ratos. O estímulo à apoptose pode ser favorável para o desenvolvimento de um fármaco antitumoral, já que a falta de apoptose celular tem sido implicada na etiologia do câncer (CÁLGARO-HELENA et al., 2006).

Apesar da paepalantina não demonstrar efeito clastogênico (TAVARES et al., 1999), foi verificada que a mesma possui potencial mutagênico ao aumentar significativamente a frequência de aberrações cromossômicas nas células testadas, o que pode estar relacionada à ligação dupla no carbono 3 do anel da paepalantina,

tornando-a altamente reativa e passível de gerar radicais epóxidos eletrofílicos reativos que podem causar mutações no ácido desoxirribonucleico (DNA) (VARANDA et al., 1997).

Em 2016 Damasceno avaliou os efeitos da paepalantina sobre *Helicobacter pylori* e espécies reativas de oxigênio envolvidas no *burst* oxidativo de neutrófilos. A paepalantina também demonstrou ter ação anti-*H. pylori*, com concentração inibitória mínima (CIM) de 128 µg/mL e concentração bactericida mínima (CBM) de 256 µg/mL.

Alterações morfológicas também foram observadas por microscopia eletrônica de varredura em *H. pylori* cultivadas em concentrações sub-inibitórias de paepalantina (DAMASCENO et al., 2017).

Em relação aos estudos para avaliação das atividades biológicas de 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina, foi observado pronunciada atividade citotóxica em células McCoy, demonstrando ter índice citotóxico mais acentuados que a cisplatina, substância citotóxica de referência utilizada para terapia antineoplásica (KITAGAWA et al., 2004). Quando associada com ácido ascórbico resultou em um índice citotóxico sete vezes menor quando comparada com a substância sem associação (KITAGAWA et al., 2008).

Esta naftoquinona demonstrou atividade promissora para o tratamento de câncer de mama e pulmão através de ação antiproliferativa dessas células e por via imunomoduladora através da inibição significativa na geração de óxido nítrico (NO) por macrófagos estimulados (KITAGAWA et al., 2011).

Seu efeito antitumoral torna-se ainda mais expressivo quando verificado que não provoca mutações ao DNA através de substituição, adição ou deleção de bases nitrogenadas. Além disso, foi demonstrado que sua citotoxicidade em células McCoy com sistema de ativação metabólica através da adição da fração S9 não é alterada, evidenciando que o composto não é modificado metabolicamente pelo sistema enzimático (KITAGAWA et al., 2015).

Foi relatado também que 5-metoxi-3,4-desidroxantomegnina possui pronunciado efeito na inibição do crescimento de *H. pylori* além de atividade antioxidante através da inibição do *burst* oxidativo de neutrófilos, possivelmente através de interferências no sistema enzimático responsável por gerar as espécies reativas (KITAGAWA et al., 2012).

Em resumo, os estudos já realizados sobre ações biológicas da paepalantina e 5-metoxi-3,4-desidroxantomegnina demonstram potencial antioxidante, citotóxico e antimicrobiano. Em função disto, estas substâncias mostram-se promissoras para estudos mais aprofundados sobre atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e antineoplásica, especialmente sobre a bactéria *H. pylori* e os agravos causados pela infecção, como inflamação e neoplasia. Além disso, este microrganismo possui incidência mundial e taxas de resistência aos antimicrobianos, em geral, alarmantes.

A prevalência da infecção por *H. pylori* é muito elevada na maioria dos países, podendo chegar a um terço dos adultos em países desenvolvidos e mais da metade da população em países subdesenvolvidos, o que demonstra estreita relação entre a epidemiologia da infecção e as condições socioeconômicas do país (EUSEBI; ZAGARI; BAZZOLI, 2014).

H. pylori (Figura 7) é um bacilo Gram-negativo microaerófilo, morfologicamente espiralado em formato de S, com largura de 0,5-0,9 μm , comprimento de 2-4 μm e possuem até seis flagelos (GOODWIN, AMSTRONG, CHILVERS, 1989; OWEN, 1998).

Essa bactéria coloniza o estômago humano podendo permanecer na mucosa por muitos anos sem a ocorrência de consequências adversas. No entanto, a infecção persistente pode levar ao desenvolvimento de lesões progressivas na mucosa gástrica e provocar a ocorrência de doenças gastroduodenais, como gastrite crônica, úlcera péptica e câncer gástrico, (MARSHALL; WARREN, 1984; PLUMMER et al., 2015).

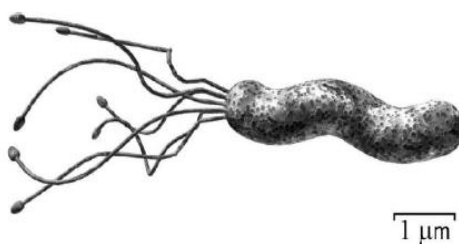


Figura 7- Imagem em 3D de *Helicobacter pylori* (MARSHALL, 2002)

Atualmente as doenças gastroduodenais acometem um grande número de indivíduos. O câncer gástrico representa quase 7% de todos os diagnósticos de neoplasias, além de ser a terceira causa de óbito por câncer no mundo, com aproximadamente 700.000 mortes por ano. No Brasil, está entre os 10 tipos de câncer que mais acometem a população. O desenvolvimento do câncer de

estômago é multifatorial, podendo estar associado ao estresse, consumo de álcool, ao fumo, elevado consumo de sal, ingestão de anti-inflamatórios não-esteroidais e infecções por *H. pylori*, sendo que 75% dos casos são mediados pela infecção (FERLAY et al., 2015; GLOBAL BURDEN OF DISEASE CANCER COLLABORATION, 2015; POLK; PEEK, 2010; SUGANO et al., 2015).

Em 1994 a Organização Mundial da Saúde, através da Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer declarou que havia evidências suficientes quanto a carcinogênese de *H. pylori*, classificando desta forma como um carcinógeno do grupo I (IARC, 1994; MOSS, 2017).

A infecção por *H. pylori* faz que o organismo do indivíduo desenvolva na região colonizada intenso processo inflamatório, caracterizado pela infiltração de células de defesa com consequente liberação de citocinas e espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs), provocando lesões na mucosa gástrica e o desenvolvimento de gastrite, que pode evoluir para um processo de ulceração (WROBLEWSKI; PEEK; WILSON, 2010; YAMAOKA, 2012).

A inflamação crônica da mucosa estomacal provoca aumento progressivo nas lesões gástricas, podendo levar a evolução das úlceras a metaplasia, uma condição pré-cancerosa, no qual ocorre substituição das células da mucosa gástrica normal por células epiteliais semelhantes à mucosa do intestino delgado. A partir da metaplasia intestinal, pode ocorrer desenvolvimento da displasia gástrica, que é o crescimento anormal do tecido através de danos no DNA das células estomacais, processo este, precursor do adenocarcinoma gástrico que pode levar a morte (ERNST; PEURA; CROWE, 2006; WROBLEWSKI; PEEK; WILSON, 2010).

Para *H. pylori* sobreviver ao ambiente gástrico e romper a barreira mucoprotetora, desenvolveu a capacidade de modular a resposta imunológica do hospedeiro a partir dos seus fatores de virulência. Para possibilitar motilidade em soluções viscosas como o muco que cobre as células gástricas epiteliais, possui 2 a 6 flagelos unipolares (O'TOOLE; LANE; PORWOLLICK, 2000).

H. pylori também produz proteases e fosfolipases, enzimas que ajudam na degradação da camada de muco e sua aderência à superfície epitelial. Para o início da colonização e sua consequente sobrevivência é essencial que ocorra resistência ao pH estomacal. Desta forma, há inibição da acidez do suco gástrico pela produção da enzima urease, uma proteína de alto peso molecular, que está principalmente

localizada no citoplasma bacteriano e uma pequena quantidade é encontrada na superfície da célula (HONG et al., 2003). Esta enzima catalisa a hidrólise da ureia ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$) gerando amônia (NH_3) e dióxido de carbono (CO_2), promovendo assim um ambiente neutro ao redor da bactéria (ARMIN, 2017; WEEKS; SACHS, 2001; WROBLEWSKI; PEEK; WILSON, 2010).

Foi demonstrada a importância da enzima urease para a colonização bacteriana, já que cepas mutantes de *H. pylori* urease-negativa possuem dificuldades na colonização gástrica, não causando gastrite, indicando desta forma que a inibição da atividade da urease poderia estar relacionada à inibição do crescimento e diminuição da patogenicidade de *H. pylori* (JADHAV et al., 2013).

A enzima urease também pode ser relacionada ao desenvolvimento de câncer gástrico, já que o excesso de NH_3 produzido por ela, pode reagir com EROs, como o ácido hipocloroso liberado pela mieloperoxidase de neutrófilos ativados, gerando monoclaramina (NH_2Cl), que por sua vez induz a toxicidade nas células da mucosa gástrica devido suas propriedades lipofílicas, podendo atravessar livremente as membranas biológicas e causar danos nos componentes intracelulares (SUZUKI et al., 1997).

Além da urease, outros fatores de virulência também facilitam o desenvolvimento da bactéria e a promoção de lesões gástricas, como é o caso das proteínas de ativação de neutrófilo de *H. pylori* (HP-NAP), responsáveis por promover a quimiotaxia de neutrófilos e monócitos, estimular a produção de EROs e promover a adesão destes nas células endoteliais (EVANS et al., 1995). Estas proteínas induzem a liberação de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos, como o fator de necrose tumoral alfa ($\text{TNF-}\alpha$), interleucina 6 (IL-6) e interleucina 8 (IL-8). A produção de EROs e citocinas induzem a inflamação e degeneração da mucosa do estômago, assim, HP-NAP desempenha importante papel na patogênese da infecção por *H. pylori* (WANG et al., 2008).

Diversos outros fatores de virulência estão relacionados com a patogênese de *H. pylori*, como proteínas *CagA* (citotoxin associated gene A) e *VacA* (vacuolating cytotoxin A) (AMIEVA; EL-OMAR, 2008; ILVER et al., 1998), e enzimas como, catalase e superóxido dismutase, que promovem proteção da bactéria contra o estresse oxidativo através da estabilização de espécies reativas formadas em moléculas inertes (SUZUKI et al., 2011; WANG et al., 2008).

A proteína *CagA* conduz ao agravamento da infecção por *H. pylori*, sendo fortemente associada ao risco para desenvolvimento de câncer gástrico (ARMIN, 2017; PEEK et al., 1999). Estudos demonstraram que indivíduos infectados por cepas de *H. pylori* que expressam o gene *CagA* apresentam risco de 5 a 8 vezes maior de desenvolver câncer gástrico em relação aos infectados com cepas *CagA*⁻ (PARSONNET et al., 1997). Durante a infecção ocorre a fosforilação da proteína *CagA*, promovendo a desregulação da via das proteínas quinases, o que consequentemente induz a hiperproliferação e transformação celular, iniciando a transformação neoplásica (TSUTSUMI et al., 2003).

Essa proteína é codificada pela ilha de patogenicidade *cag*-PAI e é responsável por injetar moléculas efetoras da bactéria nas células estomacais, possibilitando que *H. pylori* atue modulando o metabolismo da célula hospedeira (COVACCI et al., 1999). As cepas *CagA*⁺ induzem o aumento da expressão de citocinas, ocasionando intensa resposta inflamatória e a produção de radicais livres (BLASER; BERG, 2001).

Dentre as citocinas pró-inflamatórias liberadas, destacam-se o TNF- α e as interleucinas 1 β , 6 e 8. A IL-1 β , importantes fatores de iniciação e amplificação da resposta inflamatória que atuam diretamente nas células parietais do estômago inibindo a secreção ácida através da inibição da bomba de prótons, o que promove intensificação da inflamação por facilitar a colonização por *H. pylori*. Além disso pode causar atrofia gástrica e aumentar o risco de desenvolver adenocarcinoma gástrico distal em comparação com as pessoas com genótipos que limitam a expressão dessas citocinas (EL-OMAR et al., 2003; SINGH; GHOSHAL, 2006).

A IL-8 aumenta a ativação e quimiotaxia de neutrófilos para as células epiteliais da mucosa gástrica, provocando aumento na produção de EROs, estando seu nível de expressão gênica relacionado à intensidade da gastrite e ocorrência de câncer gástrico (MAEDA et al., 2001; NAITO; YOSHIKAWA, 2002).

A IL-6 possui a função de induzir a maturação final de células B, promover recrutamento de macrófagos e neutrófilos, além de ser um dos principais condutores do estado de inflamação crônica para o desenvolvimento de câncer, estando associada ao crescimento, progressão e reincidência tumoral no processo carcinogênico (RINCON, 2012).

Por outro lado, macrófagos ativados também podem expressar IL-10, que é uma citocina anti-inflamatória que pode estar relacionada com a redução do risco de ocorrer lesões gástricas que possam provocar úlceras e câncer gástrico, porém, algumas células apresentam polimorfismo, tendo a expressão de IL-10 reduzida (EL-OMAR et al., 2003).

Paralelamente, o processo inflamatório provocado por *H. pylori*, que induz a expressão de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α , IL-1 β , IL-6 estimula em macrófagos a atividade da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), ocasionando maior liberação de NO, que em excesso pode lesar o tecido e agravar a inflamação (BONACORSI et al., 2009; WILSON et al., 1996).

Ainda, pelo fato do NO ter propriedades mutagênicas, a exposição celular à altas concentrações por longos períodos durante a inflamação crônica, pode ter um papel ativo na carcinogênese (LALA; CHAKRABORTY, 2001).

Assim como os macrófagos, neutrófilos são recrutados após a instalação de *H. pylori* no estômago para combater a bactéria através do *burst* oxidativo, com a produção de grandes quantidades de EROs, como O₂⁻, o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), radical hidroxil ($\bullet$ OH) e o HOCl. No entanto, a ação dessas espécies reativas são moduladas ou inibidas por mecanismos de defesa desenvolvidos por *H. pylori* (NAITO; YOSHIKAWA, 2002).

Nos macrófagos e neutrófilos, a enzima NADPH oxidase, essencial para a transferência de elétrons da NADPH para o oxigênio extracelular, promove a conversão catalítica do oxigênio dimolecular em ânion superóxido (ALLEN et al., 2005).

Apesar da bactéria induzir neutrófilos ao *burst* oxidativo, *H. pylori* possui a capacidade de modular a NADPH-oxidase para que a liberação do O₂⁻ não ocorra dentro dos fagossomos, contendo a bactéria, e sim, no meio extracelular. Desta forma a bactéria permanece protegida, já que ocorre inibição do acúmulo dos complexos da NADPH-oxidase funcionais e geração de EROs intrafagossomais. Porém, o excesso de espécies reativas no meio extracelular promove agressão ao tecido do hospedeiro, ocasionando danos em diversas estruturas celulares (ALLEN et al., 2005; BONACORSI et al., 2013).

As EROs são subprodutos de metabolismos celulares, mas a grande concentração destes no tecido pode gerar distúrbios no sistema antioxidante, morte

celular ou ainda gerar danos ao DNA, estando este associado à carcinogênese, e no caso da infecção por *H. pylori*, ao câncer gástrico (OBST et al., 2000; SMOOT et al., 2000).

O tratamento clínico padrão para combater a infecção por *H. pylori* é uma terapia tripla, que combina o uso de dois antibióticos como amoxicilina ou metronidazol e claritromicina, com um inibidor de bomba de prótons. Esta terapia é realizada em um período que varia de 7 a 14 dias, duas vezes por dia (GRAHAM; LU; YAMAOKA, 2007). Estudos demonstram que a eficácia na erradicação da infecção por *H. pylori* por terapias triplas com duração de 7 dias varia entre 70 a 77%, enquanto que a administração por 14 dias tem sucesso em 80 - 84% dos casos (O'CONNOR et al., 2017). Em todo o mundo as taxas de erradicação de *H. pylori* têm diminuído, enquanto a prevalência de taxas de resistência a antibióticos aumentaram (MALFERTHEINER et al., 2017).

Alguns dos problemas que reduzem a eficácia do tratamento é o elevado número de medicamentos e o alto custo da terapia, além disso amoxicilina e claritromicina são degradados pelo ácido gástrico, necessitando o uso de doses mais elevadas para alcançarem doses efetivas, porém, promovem diversos efeitos colaterais, ocasionando a dificuldade na adesão ao tratamento e o aumento do número de cepas resistentes (KIM; CHOI; CHUNG, 2015).

Uma alternativa para o problema de adesão e resistência microbiana ao tratamento é a busca de protótipos de substâncias de origem vegetal. A paepalantina e 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina já demonstraram possuir ação anti-*H. pylori*, revelando-se promissora para o emprego na terapia. Além disso, essas naftopiranonas demonstraram potencial antitumoral e antioxidante, as quais podem atuar sinergicamente no combate à *H. pylori* e ao câncer gástrico. Tendo em vista o potencial patogênico de *H. pylori* no desenvolvimento de gastrites, úlceras e câncer gástrico, é importante investigar novos agentes, com ação antibacteriana, imunomoduladora e antineoplásica, ocasionando redução dos agravos da infecção por *H. pylori*.

Neste sentido, o emprego das técnicas de bioinformática aplicada à farmacognosia é uma metodologia eficiente e menos dispendiosa para a busca de metabólitos com potencial bioativo, pois permite utilizar de forma mais racional toda a etapa experimental, minimizando o uso dos metabólitos isolados, proporcionando

assim uma busca mais extensiva em seu espectro de atividade. Esta abordagem ainda proporciona a diminuição de custos de pesquisas, tais como solventes orgânicos, drogas e reagentes, os quais são empregados para o isolamento e purificação de substâncias e realização de bioensaios (LARSSON; BACKLUND; BOHLIN, 2008).

Além de otimizar a descoberta de substâncias ativas, possibilita investigar as afinidades que determinado ligante teria frente a determinado alvo biológico, utilizando para isso ferramentas de análise de modos de ligação e interações no sítio receptor do alvo desejado (GU et al., 2013; NEWMAN; CRAGG, 2012). Para esta finalidade, a técnica mais utilizada é o *docking* molecular.

O *docking* molecular ou ancoragem é uma técnica utilizada para prever as interações entre um ligante e o sítio ativo de um receptor, selecionando as melhores energias de ligação bem como sua geometria. Os programas de *docking* possuem o objetivo de chegar a uma ou mais possibilidades de modos de encaixe no sítio receptor.

Assim, estudos *in vitro* associados a métodos *in silico* podem contribuir para o esclarecimento possíveis proposta nas formas de ação das naftopiranonas sobre alvos enzimáticos relacionados com *H. pylori* e conseqüentemente a progressão da infecção.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Realizar o estudo dos efeitos das naftopiranonas paepalantina e 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina, sobre *Helicobacter pylori*, avaliar a atividade imunomoduladora em macrófagos e ação citotóxica sobre linhagem tumoral gástrica. Confirmar as interações destas substâncias sobre alvos enzimáticos através de estudos de modelagem molecular.

2.2 ESPECÍFICOS

1. Avaliar a atividade da associação das naftopiranonas com metronidazol sobre *H. pylori*;
2. Estudar os efeitos das naftopiranonas sobre *H. pylori* através de:
 - a. Possíveis alterações morfológicas de *H. pylori* após tratamento a partir de análise por microscopia eletrônica de varredura;
 - b. Ativação de macrófagos por *H. pylori* pós-tratamento com concentrações sub-inibitórias das substâncias;
3. Avaliar a inibição da enzima urease *in vitro* e *in silico*;
4. Avaliar o efeito em macrófagos estimulados através de ensaios de:
 - a. Inibição da produção de TNF- α , IL-6;
 - b. Indução da produção de IL-10;
 - c. Inibição da produção de óxido nítrico *in vitro* e análise *in silico* dos modos de ligação no sítio ativo da enzima iNOS;
 - d. Inibição da produção do ânion superóxido;
5. Avaliar o efeito citotóxico sobre linhagem celular de adenocarcinoma gástrico humano;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DA PAEPALANTINA E 5-METOXI-3,4-DIIDROXANTOMEGNINA

As substâncias teste (paepalantina e 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina) utilizadas neste estudo foram obtidas conforme descrito por Vilegas e colaboradores (1990) e Kitagawa e colaboradores (2008) respectivamente. Ambas as substâncias demonstraram pureza superior à 90%.

3.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-*H. PYLORI*

3.2.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)

A atividade sobre o crescimento bacteriano foi avaliada através da concentração inibitória mínima (CIM), pela técnica de microdiluição em caldo, e concentração bactericida mínima (CBM) de acordo com a norma estabelecida por *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI) (M7-A6, 2003) com modificações (CLSI, 2003). Os ensaios foram realizados com *Helicobacter pylori* cepa ATCC 43504 (amoxicilina sensível e metronidazol resistente), cultivada inicialmente em placas contendo Agar Columbia suplementado com 5% de sangue de carneiro com incubação por 72 horas a 37 °C, em atmosfera contendo 10 % de CO₂. Posteriormente as colônias foram repicadas para caldo *Brain heart infusion* (BHI) (Merck Millipore cod. 110493, Darmstadt, Alemanha) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SIGMA cod.F2561; St. Louis, MO, USA), e incubadas sob as mesmas condições.

Para o ensaio de CIM, a cada poço da microplaca de 96 orifícios foram adicionados 100 µL de diferentes concentrações das amostras e o mesmo volume da suspensão bacteriana (diluição 1:20 da escala 0,5 McFarland) em BHI suplementado. Para o controle de crescimento bacteriano, foram adicionados a suspensão bacteriana e meio BHI e para o controle negativo, somente amostras e meio BHI suplementado. A inibição do crescimento foi determinada através da diferença de absorbância em 620 nm obtida antes e após incubação por 72 horas a 37 °C, em atmosfera contendo 10 % de CO₂. A CIM foi definida, graficamente, como

sendo a menor concentração das amostras que induziram a um brusco declínio no valor da absorbância (90% de inibição).

A CBM foi determinada pela menor concentração das amostras capaz de inibir a formação de colônias em placas de Agar Columbia contendo sangue de carneiro 5% (incubada a 37°C/CO₂ 10% por 72h), as concentrações testadas foram às correspondentes aos poços da microplaca do teste de CIM sem crescimento aparente.

Para os ensaios foram utilizados os antibióticos amoxicilina (SIGMA cod. A8523; St. Louis, MO, USA) e metronidazol (SIGMA cod. M3761; St. Louis, MO, USA), como padrões para o controle anti-*H. pylori*, nas concentrações variando de 0,078 – 5 µg/mL e 0,25 - 512 µg/mL respectivamente. As concentrações de paepalantina e 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina utilizadas variaram de 8 – 512 µg/mL, e a partir dos resultados de CIM, foi determinado à concentração para a avaliação de associação das naftopiranonas com o metronidazol.

3.2.2 AVALIAÇÃO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE NAFTOPIRANONAS E METRONIDAZOL SOBRE *H. PYLORI*

A avaliação da associação entre as naftopiranonas com metronidazol foi realizada de acordo com o item 3.2.1, onde os testes foram realizados na concentração sub-inibitória de paepalantina e 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina (32 µg/mL), juntamente com variações nas concentrações de metronidazol (0,25 - 512 µg/mL). As microplacas foram incubadas nas mesmas condições já descritas.

3.2.3 ANÁLISES MICROSCÓPICAS

Após a determinação da CIM de paepalantina e 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina para *H. pylori*, as concentrações sub-inibitórias (1/2 de CIM) e controle (*H. pylori* sem tratamento) foram submetidas a análises morfológicas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) a fim de avaliar as possíveis alterações na célula bacteriana. Amoxicilina foi utilizada como padrão.

3.2.3.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A metodologia utilizada foi adaptada de Chakraborti et al., (2013), Claverie-Martin, Diaz-torres e Geoghegan (1988); Fischer et al., (2013). Após o período de

incubação da bactéria (controle de crescimento e concentrações sub-inibitórias de paepalantina, 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina e amoxicilina), foram aliquotadas e submetidas a centrifugação (1000 rpm por 10 minutos). Após a retirada do sobrenadante, aos *pellets* celulares foi adicionado tampão cacodilato 0,1M acrescido de glutaraldeído (2,5%) para a fixação das células, incubando-se por 2 horas à temperatura ambiente e *overnight* em temperatura de 2-4°C. Após a fixação, os *pellets* foram lavados em tampão cacodilato 0,1M por 3 vezes durante 30 minutos cada.

As amostras também foram submetidas ao processo de pós-fixação com tetróxido de ósmio (OsO₄), com incubação por 1 hora ao abrigo de luz e temperatura ambiente. Em seguida as amostras passaram novamente por processo de lavagem com tampão cacodilato e água ultrapura durante 30 minutos cada. Posteriormente as amostras foram desidratadas gradualmente com série de álcool (30, 50, 70, 90 e 100%), e processadas em ponto crítico de CO₂ (Tousimis Autosamdri® 815 Series A, USA). Após secagem, o material foi metalizado (Desk V, Denton Vacuum) e submetido a visualização em microscópio eletrônico de varredura JEOL®, JSM-6610LV (Tóquio, JAPÃO), com uma tensão de aceleração de 20 kV e filamento de tungstênio.

3.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE SOBRE A ENZIMA UREASE

A avaliação da atividade de inibição da urease foi determinada pela produção de amônia através da conversão de ureia catalisada pela enzima urease de acordo com o método descrito por Tanaka; Kawase e Tani (2004), com modificações. Em microplaca foram adicionados 25 µL da enzima urease (4U) (Jack Bean urease, Sigma cod. U1500; St. Louis, MO, USA) dissolvida em tampão PBS (100 mM e pH 6,8) e 25 µL das substâncias testes (paepalantina, 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina, ácido acetohidroxâmico, ácido hidroxioctanamida e ácido benzohidroxâmico) em diferentes concentrações (concentrações decrescentes a partir 1024 µg/mL), em seguida, incubou-se a 37°C por 2 horas. Após o período de incubação foram adicionados: 200 µL de uréia (100 mM) e 25 µL de vermelho de fenol (concentração final de 0,002%). A cinética da reação foi avaliada através de leituras espectrofotométricas em 540 nm do tempo 0 minutos até o tempo 40 minutos, com intervalo de 10 minutos entre cada leitura.

3.4 ENSAIO COM MACRÓFAGOS

3.4.1 MANUTENÇÃO DA CULTURA CELULAR DE MACRÓFAGOS

A linhagem celular utilizada neste ensaio foi macrófagos murinos RAW 264.7 (ATCC TIB 71™), provenientes do banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ Cod. 0212) e cedidas pelo Professor Doutor Marcio Fronza/Universidade Vila Velha.

Para a manutenção da cultura, as células foram mantidas em garrafas de plástico estéreis em meio DMEM (*Dulbecco's modified eagle medium*) (Vitrocell cod. 02037, São Paulo, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (v/v) e incubados em estufa a 37°C com atmosfera contendo 5 % de CO₂. Decorridos 3 – 4 dias de incubação, após as células apresentarem confluência de 70-90%, foram removidas das garrafas com o auxílio de *cell scraper*, homogeneizadas em meio DMEM completo e contadas em câmara de Neubauer para obtenção dos valores de concentração celular e posterior passagem para outras garrafas.

3.4.2 INFLUÊNCIA DAS NAFTOPIRANONAS SOBRE *H. PYLORI* NA ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS

Para determinar se as naftopiranonas atuam alterando ou inibindo a síntese de estruturas fundamentais de *H. pylori* para a manutenção da ativação da resposta inflamatória, foi avaliado se a bactéria cultivada em concentrações sub-inibitórias teria a mesma capacidade de induzir a produção de NO em cultura celular de macrófagos comparado a *H. pylori* cultivada sem tratamento.

H. pylori cultivada com concentrações sub-inibitórias de paepalantina e 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina, conforme descrito no item 3.2.1, foi centrifugado a 4000 rpm durante 10 minutos, para a retirada do sobrenadante, sendo o *pellet* formado, lavado 3 vezes com PBS estéril para total remoção das naftopiranonas. Após a lavagem das células bacterianas, foi preparado um inóculo com concentração determinada por densidade óptica (UDO₆₂₀ 0,20).

Após o preparo do inóculo de *H. pylori*, foram adicionados a cada poço da microplaca de 96 orifícios, 200 µL da suspensão de macrófagos contendo 5 x 10⁵ células/mL em meio DMEM suplementado e incubados por 3 horas (37°C/5%CO₂) para a aderência celular. Posteriormente, o sobrenadante foi desprezado e adicionado o inóculo bacteriano.

Em seguida as placas foram incubadas nas mesmas condições *overnight* e posteriormente centrifugadas à 4000 rpm por 10 minutos para posterior coleta do sobrenadante para a quantificação de NO pelo método de Griess.

3.4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA

3.4.3.1 AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO E INDUÇÃO DAS CITOCINAS E NO

Para realização dos testes, as células foram distribuídas em placas de 96 orifícios na concentração aproximada de 2×10^6 macrófagos/mL (IL-6 e IL-10) e 5×10^5 macrófagos/mL (NO e TNF- α) de meio DMEM completo. Após 2-3h de incubação (5% de CO₂ a 37°C) para adesão celular, o sobrenadante foi descartado e as células foram estimuladas com Lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS) (SIGMA cod. L2630; St. Louis, MO, USA) na concentração de 1 µg/mL, recebendo, ao mesmo tempo, diferentes concentrações das substâncias (0,78 - 25 µg/mL). Para o ensaio de indução de citocinas, as células não foram tratadas com LPS, apenas com as substâncias teste. As placas foram incubadas *overnight* (5% de CO₂ a 37°C). Após esse período, os sobrenadantes das culturas foram coletados para a detecção e quantificação das citocinas (TNF- α , IL-10 e IL-6) pelo método imunoenzimático (eBioscience, San Diego, CA, USA) e do óxido nítrico pelo método de Griess (GREEN et al., 1982). Para os ensaios com citocinas os dados foram apresentados em concentração de citocina em pg/mL utilizando uma curva padrão com citocina purificada (APÊNDICE A, B e C). Para os ensaios de NO, os dados foram apresentados em concentração de nitrito (NO₂⁻) (mM), utilizando curva padrão de nitrito de sódio (NaNO₂). Após o ensaio foi avaliado a viabilidade celular através da técnica de MTT-tetrazólio (MOSMANN, 1983).

3.4.3.2 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DO ÂNION SUPERÓXIDO

Previamente determinada as concentrações das substâncias que não causam redução na viabilidade celular através da técnica de MTT-tetrazólio, foi realizada a avaliação do efeito inibitório das substâncias sobre a produção do O₂⁻ (CHOI et al., 2006; STURROCK et al., 2006). Para isso, 200 µL de suspensão de macrófagos contendo 8×10^4 células/mL foram plaqueadas e cultivada durante 24 h (5% de CO₂ a 37°C). Posteriormente as células foram tratadas com diferentes concentrações das substâncias e estimuladas com LPS 1 µg/mL e incubadas *overnight* (5% de CO₂ a

37°C). Após incubação o sobrenadante foi removido e foram adicionados 50 µL de NBT (*nitrotetrazolium blue chloride*) (1 µg/mL) e novamente incubadas por 2 h (5% de CO₂ a 37°C). Após a incubação as células foram lavadas com PBS e metanol e incubadas a 37°C durante 20 minutos para secar. Posteriormente os cristais de formazana formados foram solubilizados com 120 µL hidróxido de potássio (KOH) 2M durante 5 minutos e posteriormente 140 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) por mais 5 minutos. A leitura da densidade óptica foi realizada em comprimento de onda de 620 nm (CHOI et al., 2006; STURROCK et al., 2006).

3.5 ENSAIOS ANTIOXIDANTES

3.5.1 AVALIAÇÃO DA CAPTURA DIRETA DO ÓXIDO NÍTRICO

A avaliação do potencial das substâncias teste em capturar o NO• foi realizada de acordo com metodologia adaptada de Marcocci et al. (1994) e Bates et al. (1991). Inicialmente, na ausência de luz, foram adicionados aos poços da microplaca 50 µL do NPS (1,25 mM) (Neon comercial cod. 02232; São Paulo, Brasil) preparado em tampão fosfato (0,1 M e pH 7,0) e 50 µL de amostras em diferentes concentrações e incubados por 1 hora a temperatura ambiente com exposição à luz. Após a incubação foram adicionados 100 µL de reagente de Griess (1% p/v de sulfanilamida, 0,1% p/v de naftiletilenodiamina e 2,5% v/v de ácido orto-fosfórico) (Neon comercial cod. 02179, 01874 e 00232, respectivamente, São Paulo, Brazil) e a mistura reacional foi lida em 540 nm. Foi realizado ainda, curva de calibração com NaNO₂ para representação dos dados em concentração de NO₂⁻ formado (APÊNDICE D).

3.5.2 INIBIÇÃO DO ÂNION SUPERÓXIDO (O₂^{•-})

A formação do O₂^{•-} ocorre a partir da reação oxigênio molecular com PMS (metasulfato de fenazina) que é reduzido pela atuação do NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo). O₂^{•-} formado provoca a redução do NBT (*nitrotetrazolium blue chloride*), e leva a formação de formazana com absorção que intensifica a leitura do sistema em 540nm. Foram adicionados aos poços da microplaca 225 µL de tampão fosfato (PBS) (50 mM com pH 7,4), 30 µL de diferentes concentrações das amostras, 7,5 µL de PMS (0,5 mM) (SIGMA cod. P9625; St. Louis, MO, USA) e 30 µL de NBT (0,045 mM). (SIGMA cod. 74032; St. Louis, MO, USA). Após dois

minutos, foram adicionados 7,5 µL de NADH (0,125 mM) (SIGMA cod. N8129; St. Louis, MO, USA). Após incubação de 10 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz, foi realizada leitura espectrofotométrica em 540 nm. Para este ensaio, ácido gálico foi utilizado como substância antioxidante padrão. Adaptado de Suzumura e colaboradores (1999).

3.6 ESTUDOS ENZIMÁTICOS *IN SILICO* DAS ENZIMAS UREASE E iNOS

3.6.1 DOCKING MOLECULAR

Estudos de interações no sítio ativo das enzimas urease de *Helicobacter pylori* (HUP) e da enzima iNOS de macrófagos murinos bem como possíveis modos de ligação das substâncias avaliadas foram realizados por meio de cálculos de *docking* molecular utilizando-se o software GOLD (VERDONK et al., 2003). Utilizou-se como referência para urease o complexo cristalográfico de código 1E9Y e 1DD7 para a enzima iNOS, ambos depositados no banco de dados de proteínas, *Protein Data Bank* (PDB) (KIRCHMAIR et al., 2008; MCMILLAN et al., 2000). A partir do eixo central do respectivo ligante presente no interior destes complexos cristalográficos, foi delimitada uma esfera de raio = 10 Å para os cálculos de *docking*. Os ligantes cristalográficos presentes no interior das enzimas urease e iNOS foram, respectivamente, o ácido acetihidroxiâmico e N-[(1,3-benzodioxol-5-il)metil]-1-[2-(1H-imidazol-1-il)pirimidin-4-il]-4-(metoxicarbonil)-piperazina-2-acetamida (1PM601).

Foi utilizada a função de escore *ChemScore* para a classificação das melhores poses no sítio ativo, utilizando-se a opção de 100% de eficiência para os cálculos e flexibilidade do ligante. As melhores soluções (poses de *docking*) para cada ligante foram separadas e analisadas por meio de inspeção visual e propostos modos de ligação das naftopiranonas no sítio ativo das enzimas estudadas.

3.6.2 VALIDAÇÃO DO DOCKING

A capacidade do programa de *docking* de gerar adequadamente as poses no sítio ativo foi validada pelo processo de *redocking*, cuja medida é dada por meio do desvio médio quadrático (*root mean square deviation* - RMSD), aceitando-se um desvio de até 2Å a partir do ligante cristalográfico de referência (YUSUF et al., 2008).

3.7 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE EM LINHAGEM CELULAR DE ADENOCARCINOMA GÁSTRICO (AGS)

A cultura celular de adenocarcinoma gástrico humano (ATCC CRL -1739) foi mantida em garrafas contendo meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e incubada à 37°C em atmosfera contendo 5 % de CO₂. Após 3 dias de incubação, as células foram submetidas à tripsinização (2 mL de solução de tripsina 0,2% + Versene 0,02%, Instituto Adolfo Lutz) para desagregação celular. Estas foram contadas em câmara de Neubauer para o ajuste da concentração celular. Posteriormente, 200 µL da suspensão celular contendo aproximadamente 6 x 10⁴ células/mL foram distribuídos em microplacas (96 orifícios) e novamente incubadas a 37°C/5% CO₂ para adesão celular. Decorrido 24 horas, o meio foi removido e cada orifício tratado com diferentes concentrações de paepalantina, 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina e do padrão cisplatina (quimioterápico padrão) e incubadas por 48 horas.

Após incubação, o sobrenadante foi desprezado e foram adicionados 200 µL da solução de MTT-tetrazólio (1 mg/mL) (SIGMA cod. M2128; St. Louis, MO, USA) em DMEM (não suplementado) e incubados nas mesmas condições por 3 horas.

Após o período de incubação o sobrenadante foi desprezado e 200 µL de DMSO foram adicionados a cada orifício para solubilizar os cristais de formazana formados pelas células viáveis. A leitura da absorbância foi realizada em comprimento de onda de 540 nm com filtro de referência em 620nm. Os testes foram acompanhados de crescimento controle, realizados em triplicata e repetidos no mínimo 3 vezes (MOSMANN, 1983).

3.7.1 ÍNDICE DE SELETIVIDADE

O índice de seletividade (IS) indica a seletividade de uma substância entre células neoplásicas e não neoplásicas, e é determinado pela relação dos valores obtidos de IC₅₀ destas linhagens. A relação é obtida através da seguinte fórmula:

$$IS = \frac{IC_{50} \text{ célula não neoplásica}}{IC_{50} \text{ célula neoplásica}}$$

* Células não neoplásicas: RAW 264.7 e células neoplásicas: AGS

O IS indica o potencial destas substâncias para testes pré-clínicos *in vivo* e clínicos. É considerado significativo valor de IS maior ou igual a 2,0 demonstrando que a substância é mais ativa em células neoplásicas (BADISA et al., 2011)

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os ensaios foram realizados por no mínimo três vezes em triplicata. Os resultados foram expressos como média dos ensaios realizados $\pm$ desvio padrão. A interpretação dos resultados foi realizada através da análise de variância (ANOVA) de duas vias com teste *post-hoc* de Bonferroni, onde o nível de significância estabelecido foi de $p \leq 0,05$.

A curva dose-efeito (concentração x absorbância) para determinação do IC₅₀ e CE₅₀, concentração do agente que reduz em 50% a absorbância espectrofotométrica, foi obtida através de análise de regressão linear e não linear.

Para realização da análise de dados, foi utilizado o programa estatístico *GraphPad Prism 5* (versão 5.01 CA, USA, 2000).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ATIVIDADE ANTI-*H. PYLORI*

Os resultados de atividade anti-*H. pylori* das naftopiranonas e metronidazol são apresentados no Gráfico 1. As CIMs encontradas para paepalantina e 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina foram de 128 e 64 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, como relatado em estudos anteriores (DAMASCENO et al., 2017; KITAGAWA et al., 2012). A maior concentração do metronidazol testada (512 $\mu\text{g/mL}$) não apresentou CIM para *H. pylori*, confirmando a resistência desta cepa para este fármaco. As CBMs encontradas foram de 256 $\mu\text{g/mL}$ para paepalantina e 128 $\mu\text{g/mL}$ para 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina conforme já relatado em estudos anteriores (DAMASCENO et al., 2017; KITAGAWA et al., 2012).

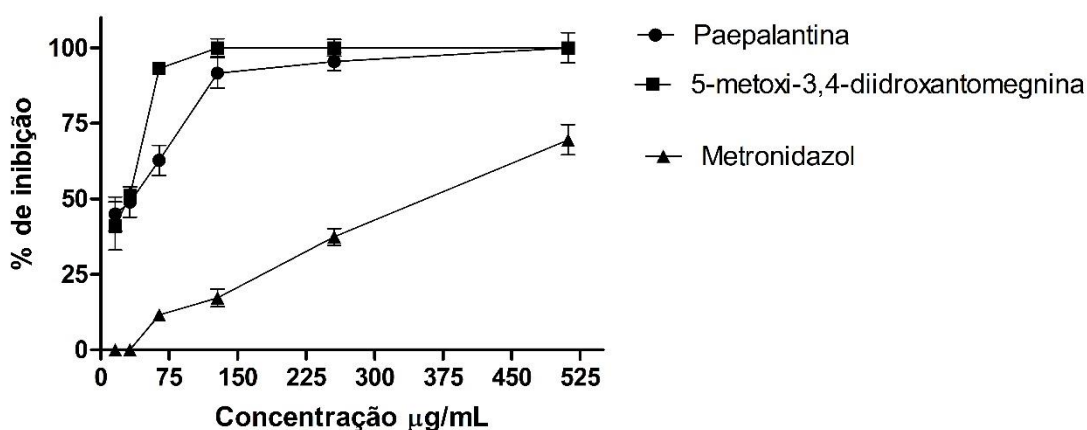


Gráfico 1 - Efeito de concentrações crescentes de paepalantina, 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina e metronidazol sobre *H. pylori*. Resultados expressos em percentual de inibição $\pm$ desvio padrão.

H. pylori foi a primeira bactéria a ser considerada como carcinógeno tipo I (nível máximo), pois é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de câncer gástrico, que é a terceira causa de morte por câncer no mundo (FLOCH; MÉGRAUD; LEHOURS, 2017; NAUMANN; SOKOLOVA, 2017). O conhecimento da associação da infecção por *H. pylori* com o desenvolvimento de câncer e outras doenças gástricas, como gastrites e úlceras gástrica, facilita o delineamento de estratégias de prevenção, aumentando a necessidade da busca por substâncias eficientes para reduzir e/ou eliminar a infecção e os mecanismos envolvidos na patogenicidade de *H. pylori*.

Neste sentido, o uso de substâncias de origem vegetal são importantes aliados para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas auxiliares para minimizar

as elevadas taxas de falhas na erradicação da infecção, principalmente ocasionada pela facilidade deste microrganismo desenvolver resistência aos principais antimicrobianos utilizados na terapia padrão, como é o caso de claritromicina e metronidazol (MASCELLINO; POROWSKA; ANGELIS, 2017).

O potencial antimicrobiano, antioxidante e antitumoral de produtos naturais é amplamente relatado e associado com diversas classes de metabólitos secundários, inclusive cumarinas e quinonas (KATSORI; HADJIPAVLOU-LITINA, 2014; NAYSMITH et al., 2017). Dentre os representantes destas classes estão paepalantina e 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina, objeto do presente estudo.

Apesar de não haver consenso sobre a classificação de CIMs consideradas relevantes para substâncias de origem natural, principalmente quando comparados com antimicrobianos de uso padrão, alguns autores consideram como forte potencial de inibição substâncias com CIM até 100 µg/mL, atividade moderada de 100 - 500 µg/mL, atividade fraca de 500 - 1000 µg/mL e inativos maiores que 1000 µg/mL (ALIGIANNIS et al., 2001; AYRES et al., 2008; DOMINGUES et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2008).

Desta forma, a paepalantina apresenta, de maneira geral, moderada atividade inibitória, enquanto 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina demonstrou ter forte potencial para inibição de *H. pylori*.

A relação estrutura-atividade da ação antimicrobiana da paepalantina parece estar ligada com os grupos fenólicos na posição 9 e 10 do anel aromático. Estes grupos fenóis permitem a formação de pontes intra-moleculares de hidrogênio, o que possibilita melhor interação da substância com a parede celular bacteriana (DEVIENCE et al., 2005).

Além disso, paepalantina possui estrutura molecular planar, que sinergicamente à seu caráter lipofílico facilita a difusão passiva através da membrana celular da bactéria (KAYSER; KOLODZIEJ, 1999), que também é auxiliada pela ausência de grupos volumosos na cadeia lateral da molécula (RAUCKMAN et al., 1989). Desta forma, é provável que o modo de ação desta isocumarina possa ser atribuído pelo menos em parte, às interações com a membrana celular bacteriana.

Em relação à atividade anti-*H. pylori* de 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina, o efeito antimicrobiano pode estar relacionado com o fato de quinonas sofrerem ciclo

redox e consequentemente causarem estresse oxidativo e danos às células bacterianas através do aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, como peróxido de hidrogênio, radical hidroxil e ânion superóxido. Com isso, pode ser causado desarranjo estrutural e mudanças fisiológicas no citoplasma bacteriano (CAPE; BOWMAN; KRAMER, 2006; PEREIRA et al., 2006).

O potencial antimicrobiano dessas substâncias pode ainda estar relacionado à capacidade de complexar-se irreversivelmente a aminoácidos nucleofílicos, levando muitas vezes a inativação de proteínas e perda de função. As adesinas expostas à superfície da célula bacteriana, assim como polipeptídeos da parede celular e enzimas ligadas à membrana podem ser alvos de quinonas, além do seu potencial em tornar-se substratos indisponíveis para o microrganismo (COWAN, 1999).

As hipóteses sobre a atuação da paepalantina e 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina na parede celular bacteriana foram reforçadas através das alterações morfológicas observadas em *H. pylori* cultivadas com concentrações sub-inibitórias de amoxicilina, paepalantina e 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina através de avaliação por microscopia eletrônica de varredura (Figura 8). A partir da imagem A1 que representa a morfologia de *H. pylori* sem alterações, torna-se evidente a influência dessas substâncias sobre sua morfologia, a qual apresentou diversas deformações na superfície celular.

No tratamento com amoxicilina (B1) é possível observar a presença de extravasamento do conteúdo intracelular (B1-1), bolhas nas extremidades (B1-2) além de protuberâncias na superfície celular (B1-3). Nas micrografias do tratamento com paepalantina observa-se a mudança da forma bacteriana bacilar para cocoide (C1-4) e protuberâncias na superfície (C1), alongamento da célula bacteriana (C2-5) além de bolhas na extremidade celular (C3). No tratamento com 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina observa-se alongamento celular com formação de bolhas nas extremidades e aparecimento de protuberâncias ao longo da célula (D1 e D3). Na imagem D2 observa-se alongamento na estrutura célula e uma célula em transformação para a forma coicoide (11).

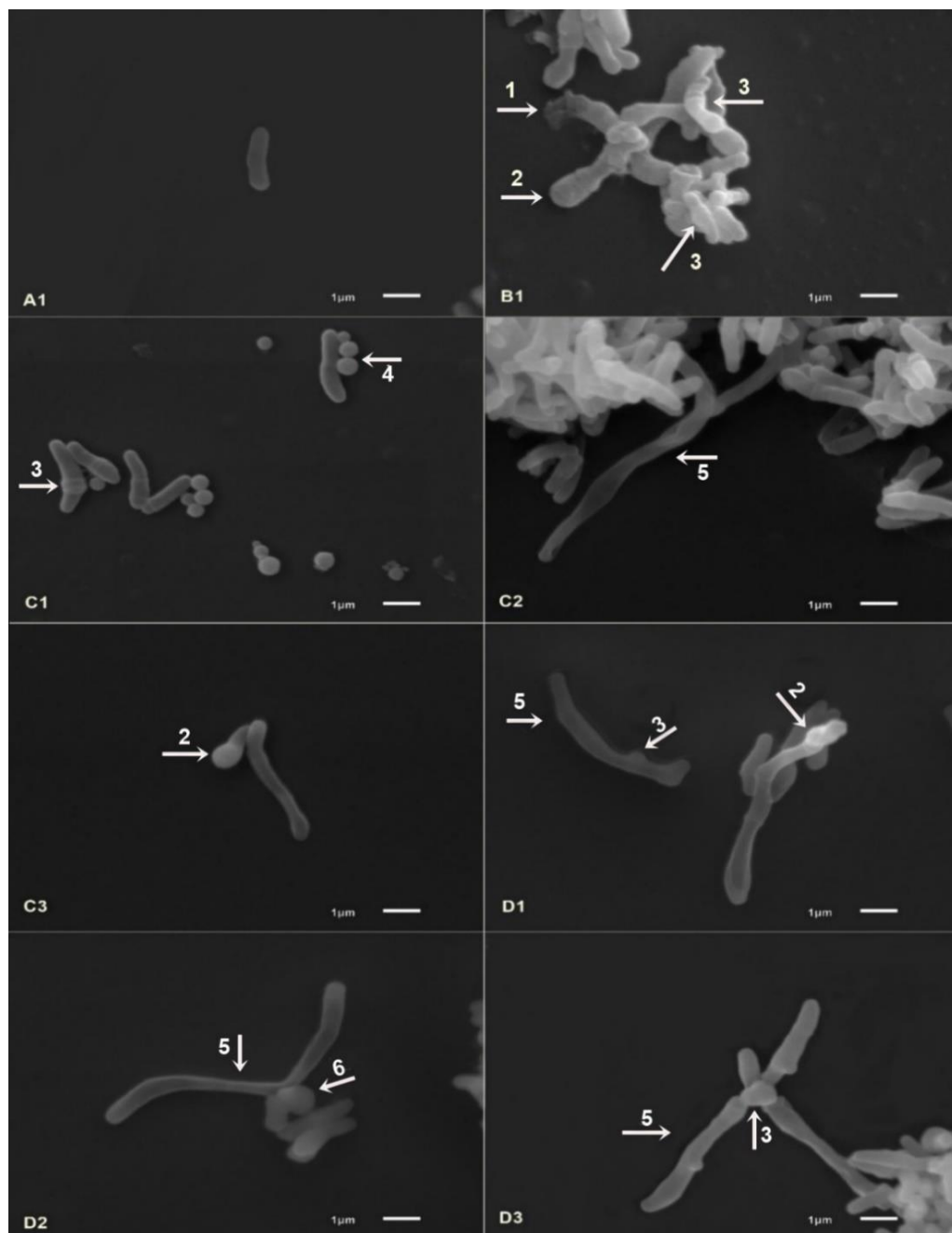


Figura 8 - Micrografias de *H. pylori* (aumento de 10.000x) sobre os diferentes tratamentos. A1: grupo controle sem tratamento; B1: sub-CIM da amoxicilina (0,156 µg/mL); C1, C2 e C3: sub-CIM de paepalantina (64 µg/mL); D1, D2 e D3: Sub-CIM de 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina (32 µg/mL); 1- extravasamento do conteúdo intracelular; 2- bolha na extremidade celular; 3- protuberâncias na superfície celular; 4- forma cocoide; 5- alongamento celular; 6- célula em transformação para a forma cocoide.

Alterações morfológicas em *H. pylori* provocadas por concentrações sub-inibitórias de β -lactâmicos, como a amoxicilina, vem sendo descritas na literatura. Deloney e Schiller (1999) observaram formas alongadas e cocoides de *H. pylori* quando expostas a sub-CIM de diferentes β -lactâmicos e relacionou essas alterações com a inibição das principais proteínas de ligação à penicilina (PBP). A

inibição da PBP1 (66 kDa) parece estar relacionada com a transformação para a forma cocoide (metabolicamente inativa), enquanto a inibição das PBP2 (63 kDa) e PBP-3 (60-kDa) são responsáveis pela formação de células filamentosas.

As alterações morfológicas encontradas neste estudo se assemelham as encontradas por Damasceno e colaboradores (2017) que também observaram em células bacterianas cultivadas com sub-CIM de paepalantina formas esféricas, formação de bolhas na superfície celular e inchaço nas formas bacilares, sugerindo que as alterações encontradas indicam atuação da paepalantina na inibição na síntese de peptídeoglicano, através da inibição das PBPs. Neste mesmo estudo, avaliações *in silico* demonstraram que a pose de encaixe da paepalantina e 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina é semelhante ao do inibidor de referência cefuroxima no sítio de ligação das PBPs, demonstrando o potencial de interação dessas substâncias com essas proteínas da membrana externa de *H. pylori*.

Além das alterações descritas por Damasceno e colaboradores, encontramos células filamentosas nos tratamentos com paepalantina e 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina, demonstrando que possivelmente as formas de ação destas substâncias estão relacionadas com a interação com uma ou mais enzimas envolvidas na biossíntese do peptideoglicano, como as PBPs 60, 63 e 66 o que resulta na desestabilização da estrutura celular e, conseqüentemente, esteja provocando as alterações observadas nas micrografias.

A partir dos resultados de CIM, foram selecionadas as concentrações sub-inibitórias das naftopiranas a serem testadas em associação com metronidazol. Para paepalantina foi escolhida $\frac{1}{4}$ da CIM (32 $\mu\text{g/mL}$) pois $\frac{1}{2}$ da CIM (64 $\mu\text{g/mL}$) ainda apresentava alto valor de inibição ($62,7 \pm 4,9\%$) e poderia provocar falso resultado de inibição no ensaio de avaliação da associação.

Os resultados da associação das concentrações sub-inibitórias das naftopiranas com concentrações crescentes de metronidazol em *H. pylori* são apresentadas no Gráfico 2. Apesar da associação do metronidazol com a paepalantina ter demonstrado ligeiro aumento da inibição do crescimento de *H. pylori* quando comparado com as mesmas concentrações do metronidazol testado sozinho, a associação não apresentou CIM. Enquanto a 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina demonstrou sinergismo com metronidazol, obtendo-se CIM de 8 $\mu\text{g/mL}$.

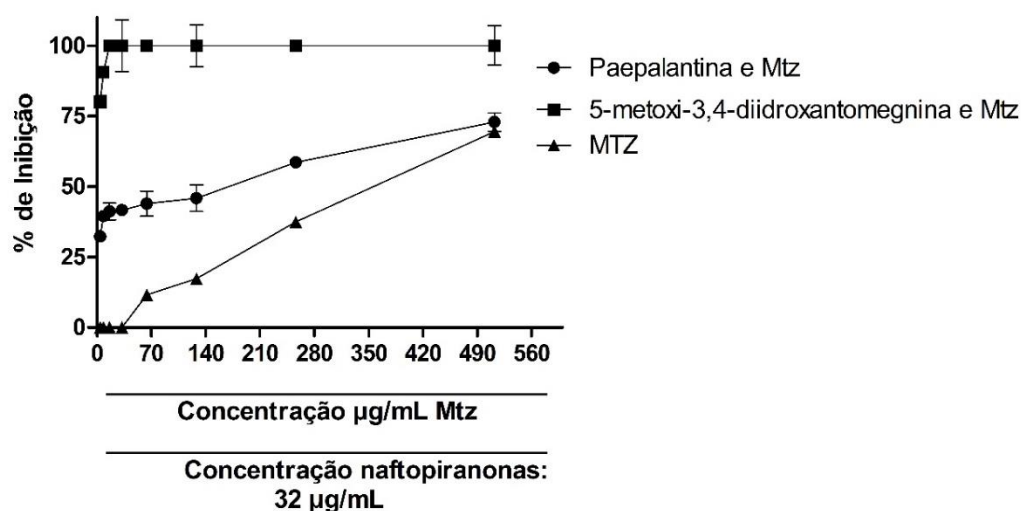


Gráfico 2 - Relação concentração-resposta da interação metronidazol e naftopiranas (32 $\mu\text{g/mL}$) e metronidazol no crescimento de *H. pylori*. Resultados expressos em percentual de inibição $\pm$ desvio padrão.

Encontrar substâncias que possuam atividade sinérgica com antimicrobianos da terapia tradicional é uma ferramenta para reverter o problema de resistência à antimicrobianos. Em relação às substâncias testadas, 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina demonstrou ter notável atividade sinérgica com o metronidazol, fazendo com que o metronidazol esteja clinicamente na faixa de ponto de corte para sensibilidade para *H. pylori* de acordo com *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* – EUCAST, que é de 8 $\mu\text{g/mL}$ (2015).

Os resultados de CIM e CBM das substâncias estão apresentadas de forma resumida na Tabela 1.

Tabela 1 - Valores de CIM e CBM das substâncias e em associação com metronidazol testadas em *H. pylori*

Substância	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CBM ($\mu\text{g/mL}$)
Paepalantina	128	256
5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina	64	128
Amoxicilina	0,31	1,25
Metronidazol (MTZ)	> 512	> 512
MTZ / paepalantina	> 512/32	> 512/32
MTZ / 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina	8/32	512/32

4.2 ATIVIDADE SOBRE A ENZIMA UREASE

A enzima urease é fundamental para *H. pylori* sobreviver ao ambiente gástrico, tornando-se sua principal característica adaptativa e consequentemente seu principal fator de virulência (TALEBI; ABADI, 2017). Por isso, essa enzima é constantemente estudada a fim de buscar substâncias capazes de causar sua inibição e reduzir a sobrevivência e patogenicidade de *H. pylori*.

A atividade das naftopiranonas sobre a enzima urease são mostradas no Gráfico 3. Ambas não demonstraram relevância terapêutica na inibição da enzima urease, não ultrapassando $17,30 \pm 1,80\%$ e $10,62 \pm 1,70\%$ de inibição da atividade enzimática para paepalantina e 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina, respectivamente.

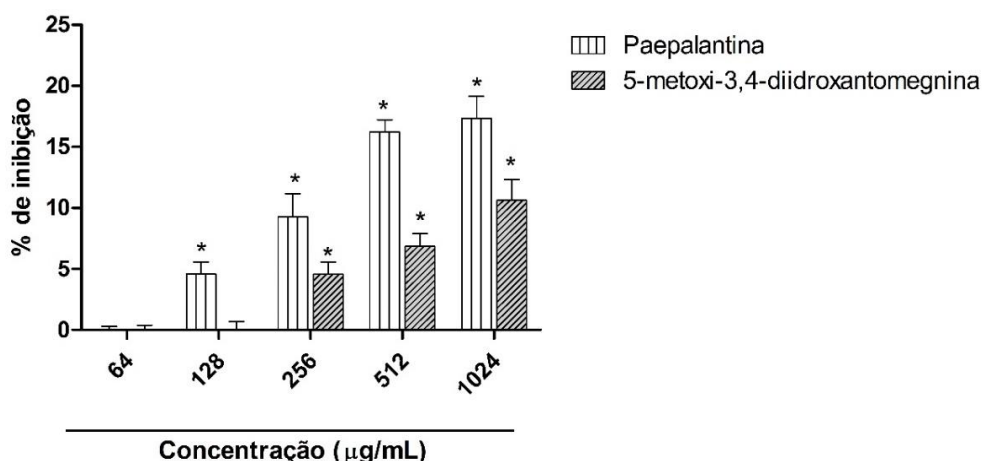


Gráfico 3 - Efeito da paepalantina e 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina sobre a enzima urease. Valores expressos em percentual de inibição $\pm$ desvio padrão. * $p < 0,001$ em relação ao controle positivo do ensaio (equivalente a 0% de inibição).

A partir destes resultados foram buscados na literatura inibidores já descritos e reconhecidos da enzima urease, a fim de buscar estratégias que auxiliassem a compreensão dos mecanismos responsáveis pelos resultados encontrados para as naftopiranonas. Desta forma foi avaliada a atividade anti-urease do ácido acetohidroxâmico e alguns de seus derivados. Além disso, foi realizado o estudo *in silico* destas substâncias no sítio ativo da enzima, possibilitando assim o conhecimento das principais interações necessárias para inibir a atividade da urease.

Os resultados experimentais de inibição de urease do ácido acetohidroxâmico e seus derivados são apresentados no Gráfico 4. As substâncias avaliadas apresentaram expressivos resultados de atividade inibidora, com CE_{50} de $6,32 \pm 0,7$;

7,69 ± 1,3; e 2,58 ± 0,3 µg/mL para os ácidos acetohidroxâmico, benzidroxâmico e hidroxiocetanamida, respectivamente.

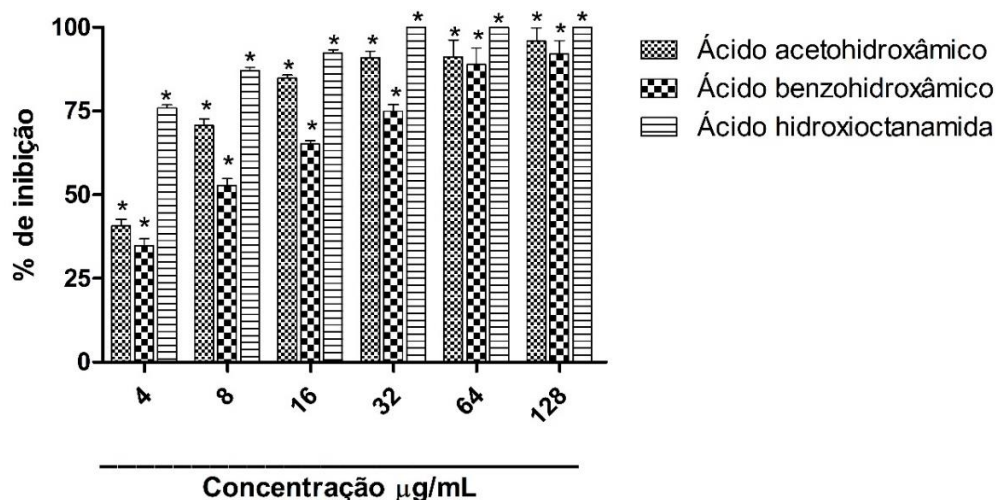


Gráfico 4 - Atividade inibitória do ácido acetohidroxâmico e seus derivados sobre a enzima urease. Valores expressos em percentual de inibição ± desvio padrão. * $p < 0,001$ em relação ao controle positivo do ensaio (equivalente a 0% de inibição).

4.3 ANÁLISE DO SÍTIO ATIVO DA ENZIMA UREASE DE *H. pylori*

A análise *in silico* do sítio ativo da enzima urease foi realizada a partir do complexo cristalográfico de código 1E9Y, depositado no Banco de Dados de Proteínas (PDB). Para avaliar a capacidade de predição correta das poses pelo programa de *docking*, foi realizado o *redocking* do ligante cristalográfico (ácido acetohidroxâmico), cuja orientação e conformação já são conhecidas. Foi comparado a pose obtida no cálculo de *docking* com esta conformação cristalográfica e medindo assim o quanto uma estrutura difere da outra por meio do desvio médio quadrático (RMSD). Dentre as poses de menor energia, os valores de RMSD calculado ficaram abaixo de 1 Å (RMSD = 0,764 Å) sendo que até um valor de 2,0 Å é considerado satisfatório (YUSUF et al., 2008) (Figura 9).

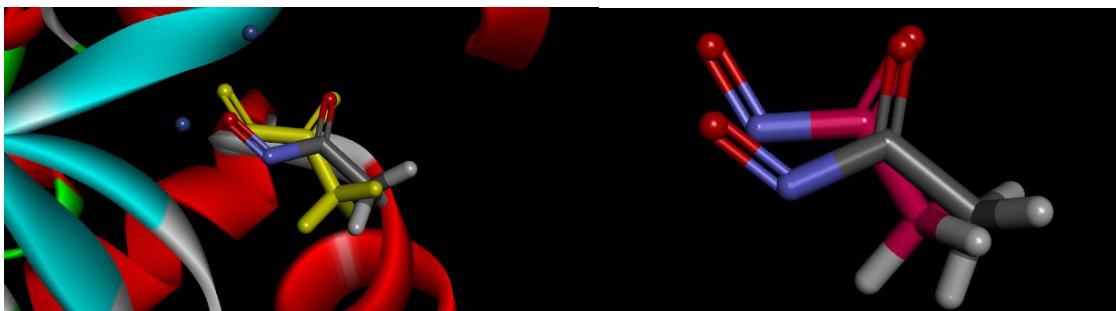
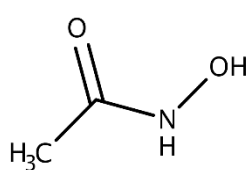


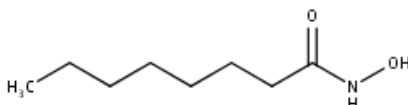
Figura 9 - Validação do modelo de *docking* desenvolvido por *redocking* (RMSD = 0,7641 Å) no sítio ativo da Urease PDB: 1E9Y).

4.3.1 ANÁLISE DAS PRINCIPAIS INTERAÇÕES DE INIBIDORES DE UREASE REPORTADOS NA LITERATURA

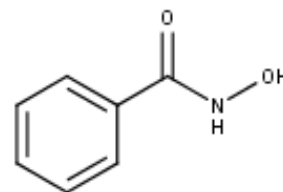
Para a análise das principais interações no sítio ativo da enzima urease, foram avaliados os inibidores ácido acetohidroxinâmico, ácido hidroxiocetanamida e ácido benzidroxâmico (Figura 10).



Ácido acetohidroxâmico



Ácido hidroxiocetanamida



Ácido benzidroxâmico

Figura 10 - Estrutura química dos inibidores da enzima urease reportados na literatura (KOSIKOWSKA; BERLICKI, 2011).

Pela análise da conformação cristalográfica do ácido acetohidroxâmico é possível observar a presença de 3 ligações de hidrogênio com os aminoácidos ASP362, HIS221 e com a cadeia principal do aminoácido alanina (ALA365) a distâncias de 2,5, 3 e 3,1 Å, respectivamente (Figura 11 A). Já o ácido hidroxiocetanamida, apresenta padrão de ligação semelhante ao ligante cristalográfico em sua cadeia principal. Sua cadeia alquílica é estabilizada no sítio ativo por meio de um bolsão hidrofóbico, formado pela cadeia lateral de duas metioninas (MET317 e MET366) e por um resíduo de cisteína (CYS321) (Figura 11 B). Por meio de inspeção visual foi possível observar que esta região do sítio permite acomodar grupos hidrofóbicos um pouco maiores, até 7 Å distantes do eixo central.

Na análise das poses de *docking* do ácido benzohidroxâmico (Figura 11 C), o padrão de ligação na região ao redor dos átomos de níquel se mantém, e além disso, seu anel aromático pode ser estabilizado por contribuições hidrofóbicas com os resíduos de aminoácidos ALA365, HIS248, MET366, CYS321, HIS322 e LEU318.

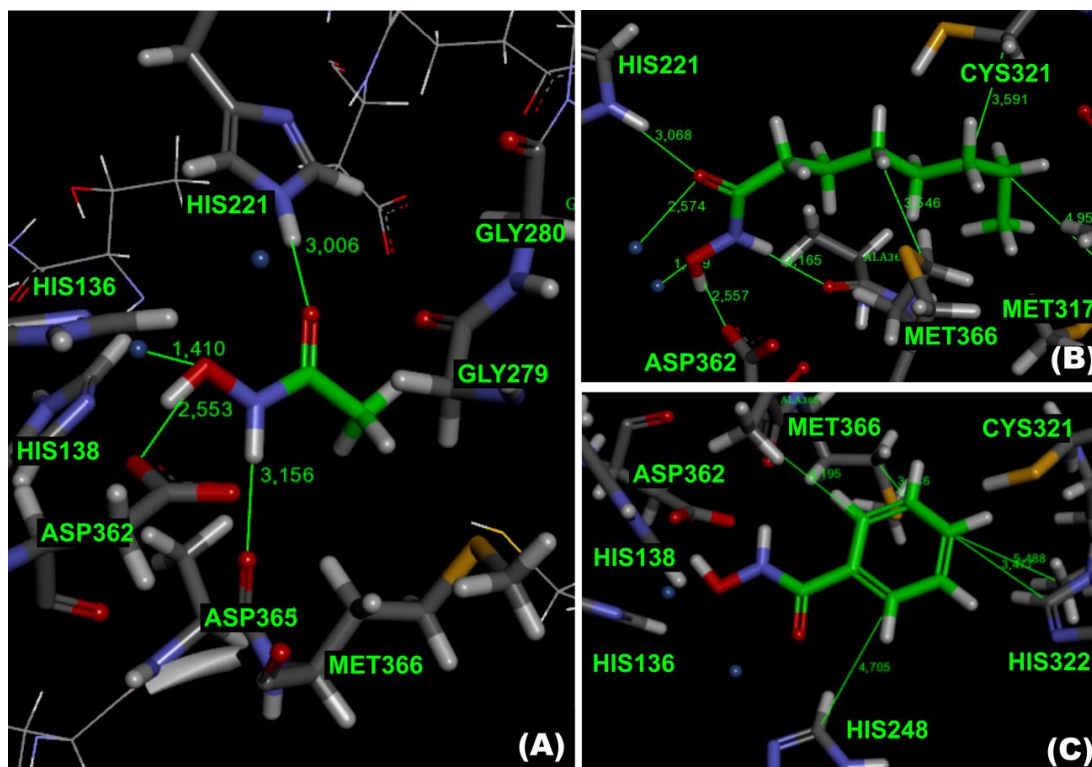


Figura 11 - Diagrama em *sticks* do sítio ativo da enzima urease de *H. pylori*. **(A)** principais interações do ácido acetohidroxâmico com os aminoácidos ASP362, HIS221 e ALA365; **(B)** principais interações do ácido hidroxiocetanamida evidenciando bolsão hidrofóbico formado pelos aminoácidos MET317, MET366 e CYS321; **(C)** principais interações do ácido benzohidroxâmico com os aminoácidos ALA365, HIS248, MET366, CYS321, HIS322 e LEU318.

Por meio dos cálculos de *docking* e posterior análise destas interações no sítio ativo da enzima urease de *Helicobacter pylori* (Tabela 2, Figura 12), foi possível identificar os resíduos de aminoácidos mais frequentes nas interações com os inibidores avaliados, os quais então, são utilizados como referência em análises posteriores de novas estruturas a serem docadas no sítio ativo da enzima urease.

Tabela 2 - Aminoácidos mais frequentes nas interações com diferentes inibidores de urease.

Aminoácido	Distância (Å)
Alanina 169	5,1 – 5,3
Alanina 365	3,1 – 4,6
Asparaginina 362	2,5 – 3,1
Glicina 279	4,9 – 5,3
Histidina 136	3,4 – 3,5
Histidina 138	2,7 – 2,8
Histidina 221	3,0 – 3,1
Histidina 248	4,2 – 4,9
Histidina 274	5,3
Histidina 322	3,4 – 5,0
Metionina 366	4,3 - 5,2

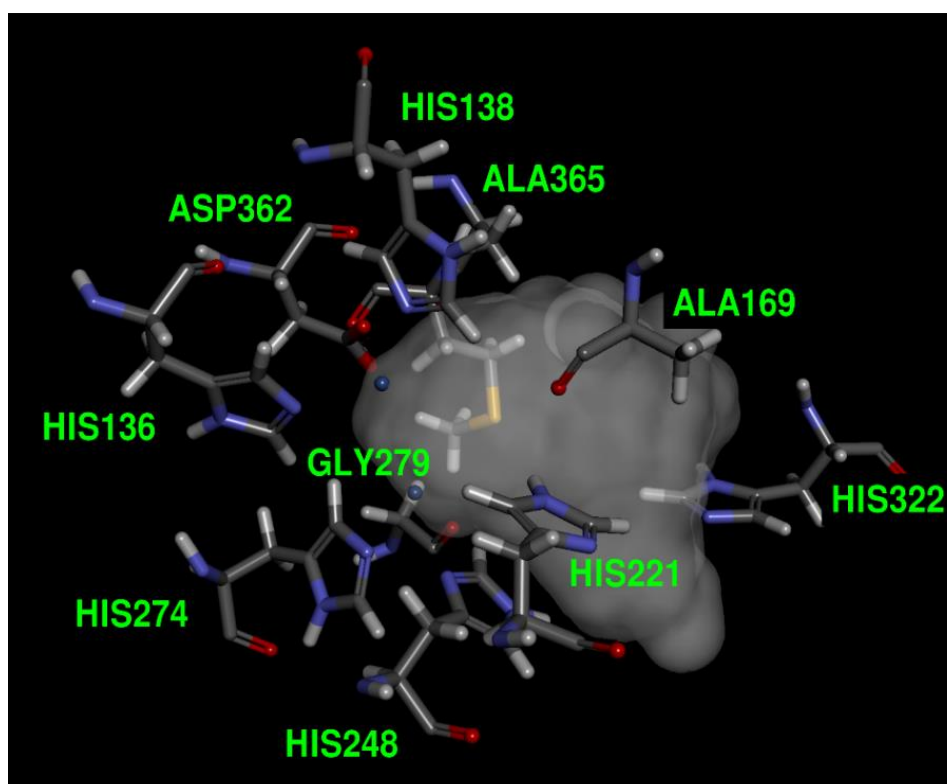


Figura 12 - Resíduos de aminoácidos mais frequentes nas interações dos inibidores no sítio ativo da enzima urease

4.3.2 ANÁLISE DOS MODOS DE LIGAÇÃO DAS NAFTOPIRANONAS NO SÍTIO ATIVO DA ENZIMA UREASE

Na análise das poses de *docking* da paepalantina, é possível observar padrão de ligação distinto dos inibidores de referência (Tabela 2), realizando ligações de hidrogênio com os aminoácidos ASP 168, ALA 169 e ARG 338 e com ausência de interações com alguns aminoácidos importantes, como as histidinas HIS 136, 138 e

221, as quais estabilizam os inibidores via ligações de hidrogênio a distâncias de 2,7 a 3,4 Å. Entretanto, sua cadeia lateral pode realizar interações hidrofóbicas com os aminoácidos ALA 365, GLY 279, HIS 248, estabilizando assim, o restante da estrutura. Em relação às interações de 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina, observam-se ligações de hidrogênio apenas com os resíduos dos aminoácidos ASP 223 e ARG 338, além de realizar algumas contribuições hidrofóbicas na sua cadeia lateral com os resíduos de aminoácidos ALA 365, GLY 279, HIS 322 e MET 366 (Figura 13).

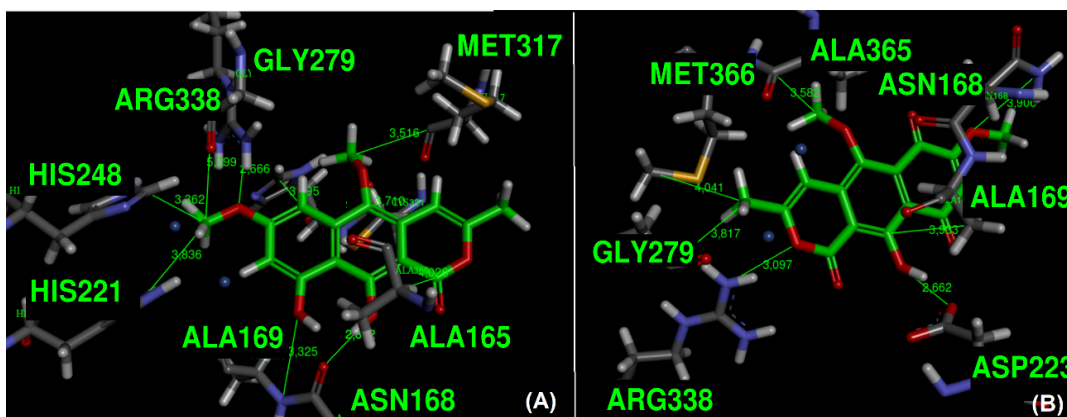


Figura 13 - Resultado de *docking* de paepalantina e 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina: A) principais interações de Paepalantina no sítio ativo da enzima urease de *H. pylori* evidenciando as ligações de hidrogênio com os aminoácidos ASP 168, ALA 169 e ARG 338 e estabilização da cadeia lateral através de ligações hidrofóbicas com os aminoácidos ALA 365, GLY 279, HIS 248; B) principais interações de 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina no sítio ativo da enzima urease de *H. pylori*, no qual observa-se ligações de hidrogênio apenas com os resíduos dos aminoácidos ASP 223 e ARG 338 e algumas contribuições hidrofóbicas na sua cadeia lateral com os resíduos de aminoácidos ALA 365, GLY 279, HIS 322 e MET 366.

Portanto, de acordo com as possibilidades de interação da paepalantina e 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina, é possível inferir que a baixa atividade de inibição frente a enzima urease pode estar relacionada com a maior dificuldade das estruturas de realizarem ligações de hidrogênio a distâncias favoráveis com aminoácidos próximos. Além disso, as estruturas das naftoquinonas apresentam estrutura mais rígida e volumosa se comparadas aos inibidores de referência, o que não permite que estas fiquem bem acomodadas no sítio de ligação, e adicionalmente as cadeias laterais dessas estruturas não são tão bem estabilizadas através de interações hidrofóbicas com aminoácidos quanto os inibidores. Sugere-se então que alguns padrões de interação entre a substância teste e aminoácidos são essenciais para a atividade anti-urease.

Neste sentido, os cálculos de *docking* são bastante úteis para avaliar o potencial de interação de substâncias com os alvos enzimáticos. Como resultado final, tem-se um valor final de escore, onde o software de *docking* classifica as poses mais favoráveis no sítio receptor de acordo com os parâmetros definidos pelo modelo teórico desenvolvido. Nesta situação, estruturas com maior escore indicariam poses mais favoráveis de encaixe no sítio receptor e em contrapartida, substâncias com menor potencial de interação, acabam por possuir um valor de escore mais baixo, pois possuem um somatório de interações favoráveis menor do que uma substância ativa (VERDONK et al., 2003).

Os resultados das análises *in vitro* e *in silico* da enzima urease estão listados na Tabela 3 e observa-se que as substâncias com menores valores de escore são a paepalantina e a 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina, as quais apresentaram-se menos ativos, não demonstrando valores de inibição enzimática significativa quando comparadas com substâncias com valores maiores como é o caso do ácido acetohidroxâmico e seus derivados.

Entretanto, apesar da boa correspondência entre os resultados teóricos e experimental, como observado nos inibidores (ácido acetohidroxâmico, ácido hidroxi-octanamida e ácido benzohidroxinâmico), somente o valor de escore não possibilita definir qual substância terá maior ou menor atividade, apenas traz uma referência se a substância é ou não ativa, principalmente quando os valores são tão próximos (32,37 – 35,79), pois o programa não tem a função de prever a atividade de uma substância e sim de indicar o seu potencial de interação frente ao alvo estudado. Para obtenção de resultados mais precisos, é importante um número maior de dados experimentais e teóricos a fim de abranger o maior número de situações dentro o universo de estruturas químicas.

Tabela 3 - Resultados *in vitro* e *in silico* das estruturas analisadas para enzima urease

Nome	Escore (Chemscore)	CE ₅₀ µg/mL
Ácido acetohidroxâmico	32,37	6,32 ± 0,7
Ácido hidroxi-octanamida	34,19	2,58 ± 0,3
Ácido benzohidroxinâmico	35,79	7,69 ± 1,3
Paepalantina	20,58	>1024
5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina	13,93	>1024

4.4 EFEITO DE *H. PYLORI* PÓS-TRATAMENTO COM CONCENTRAÇÕES SUB-INIBITÓRIAS DAS NAFTOPIRANONAS NA ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS

O efeito das concentrações sub-inibitórias de paepalantina (8, 16, 32, 64 µg/mL) e 5-metoxi-3,4-diidroxi-2-naftopirano (4, 8, 16 e 32 µg/mL) sobre *H. pylori* na ativação de macrófagos foi determinada a partir da produção de óxido nítrico por macrófagos estimulados pela bactéria após cultivo com as referidas concentrações das substâncias em teste. Os resultados obtidos foram expressos no Gráfico 5, sendo possível observar que paepalantina apresentou resultados significativos em quase todas as concentrações testadas quando comparado ao controle positivo, inibindo $60,21 \pm 1,8\%$ a produção de óxido nítrico na maior concentração, enquanto que 5-metoxi-3,4-diidroxi-2-naftopirano inibiu $47,50 \pm 0,6\%$ na maior concentração.

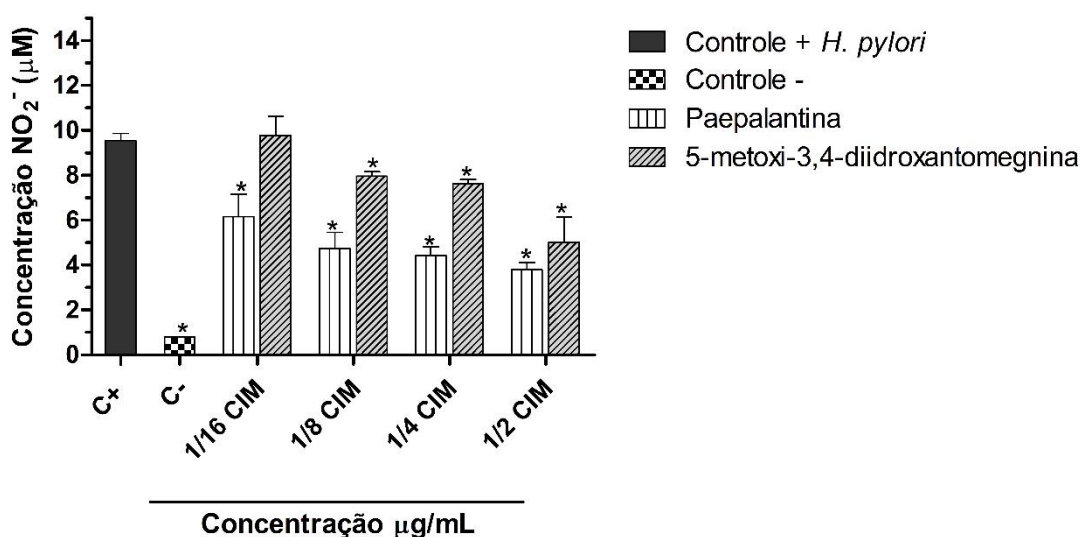


Gráfico 5 - Efeito de concentrações sub-inibitórias de paepalantina e 5-metoxi-3,4-diidroxi-2-naftopirano em *H. pylori* na ativação de macrófagos através da produção de óxido nítrico. Resultados expressos em concentração de nitrito. * $p < 0,001$ em relação ao controle positivo de produção de NO por macrófagos estimulados por *H. pylori* sem tratamento. Controle positivo representa macrófagos estimulados com *H. pylori* sem tratamento.

Na membrana externa de *H. pylori* existem padrões moleculares associados a patógenos (PAMP), que são reconhecidos por receptores tipo *toll like* (TLRs) presentes na superfície de células epiteliais gástricas e apresentadoras de antígenos (APCs), tais como macrófagos e células dendríticas. Estes receptores desempenham um papel importante na defesa contra microrganismos gram-

negativos, através do desencadeamento da resposta imunológica com ativação de diversas vias de sinalização (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

A resposta imunológica por sua vez promove a formação de infiltrado inflamatório caracterizado pela presença de linfócitos T e B, plasmócitos, neutrófilos e macrófagos, os quais liberam mediadores inflamatórios como as citocinas, EROs e ERNs, como o óxido nítrico (ALGOOD; COVER, 2006; NAITO; YOSHIKAWA, 2002).

Destaca-se alguns PAMPs presentes na membrana de *H. pylori* como LPS e peptidoglicano, que são reconhecido por TLR-4 e TLR-2 (TAKEUCHI et al., 1999). As PBPs estão envolvidas na síntese da camada de peptidoglicano que confere rigidez e estrutura à parede celular bacteriana (VOLLMER et al., 2005). Como já foi demonstrado, concentrações sub-inibitórias das naftopiranonas tem a capacidade de alterar a estrutura de *H. pylori*, possivelmente ao atuar inibindo a síntese das PBPs da parede celular.

Desta forma, sugere-se que a redução da patogenicidade de *H. pylori* ao diminuir a produção de óxido nítrico em macrófagos possa estar relacionada com inibição de PAMPs, como a PBP responsável pela síntese de peptidoglicano e ainda da endotoxina LPS.

4.5 ATIVIDADE IMUNOMODULADORA

4.5.1 CITOTOXICIDADE EM MACRÓFAGOS MURINOS RAW 264.7

Para realizar o estudo da atividade imunomoduladora foi previamente feita avaliação da citotoxicidade das naftopiranonas em macrófagos para a determinação das concentrações das substâncias que seriam utilizadas nos ensaios. De acordo com o observado no Gráfico 6 a maior concentração que não interferiu na viabilidade dos macrófagos foi 25 µg/mL para ambas as substâncias, desta forma, esta concentração foi a máxima utilizada para os ensaios subsequentes.

Adicionalmente foram realizados teste de viabilidade através do MTT tetrazólio após todos os experimentos, observando-se a manutenção da viabilidade acima de 90% em todas as concentrações testadas.

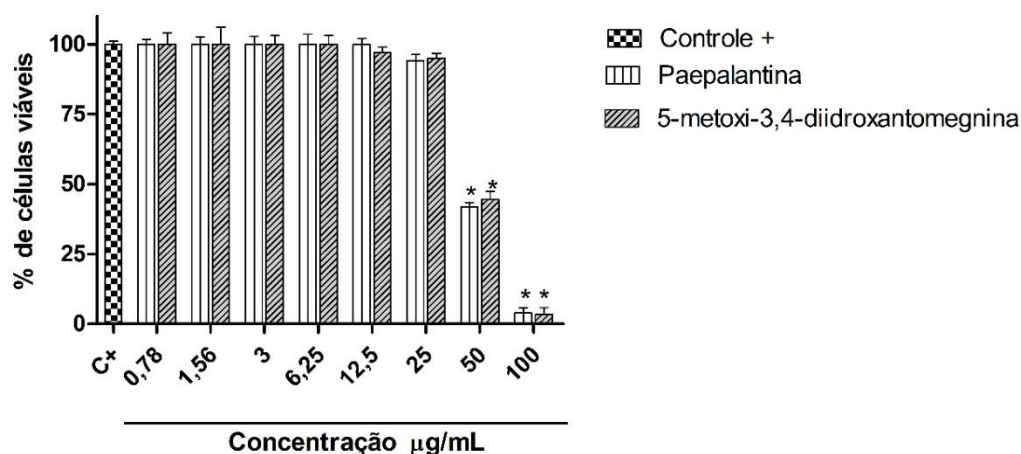


Gráfico 6 - Atividade citotóxica da paepalantina e 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina em linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7. Valores expressos em percentual de células viáveis em comparação com o controle de crescimento (sem tratamento) $\pm$ desvio padrão. * $p < 0,001$.

4.5.2 ATIVIDADE IMUNOMODULADORA EM MACRÓFAGOS MURINOS RAW 264.7

Para verificar a atividade anti-inflamatória de paepalantina e 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina, os seus efeitos sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF- α) foram avaliadas em macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS de *Escherichia coli*, componente da parede celular de bactérias Gram-negativas reconhecidos pelos macrófagos através de receptores *Toll like-4*, que levam ao aumento da produção de citocinas e mediadores pró-inflamatórias incluindo TNF- α , IL-1 β , IL-6 e NO (TAKEUCHI et al., 1999). Foi avaliado também a capacidade das substâncias em induzir em macrófagos não estimulados a produção da citocina anti-inflamatória IL-10.

O resultado encontrado para a indução da IL-10 está apresentado no Gráfico 7. Todas as concentrações testadas da paepalantina induziram a produção desta citocina. Na maior concentração houve um aumento na expressão de mais de 5 vezes e na menor concentração induziu 3 vezes mais quando comparado com o controle negativo. Em relação a 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina não houve indução significativa da citocina.

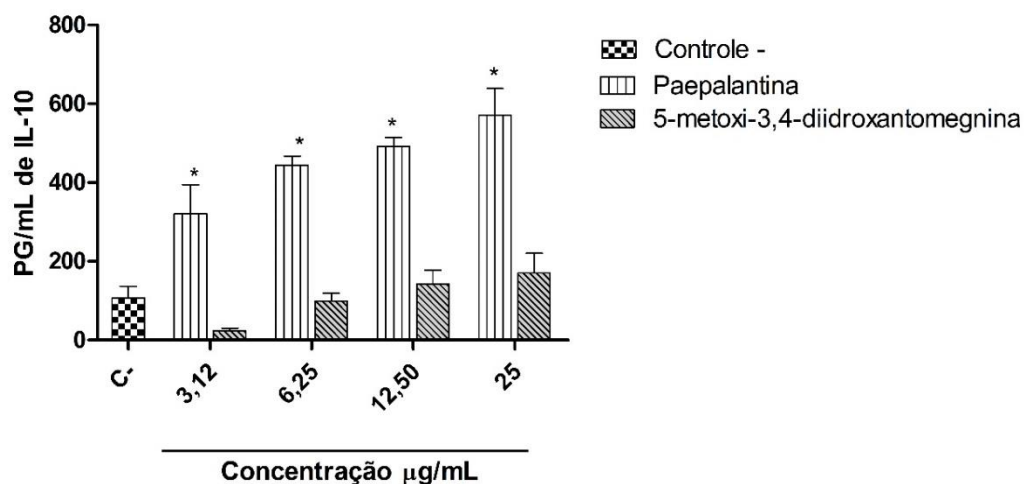


Gráfico 7 - Indução na produção da citocina IL-10 de paepalantina e 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina em macrófagos. * $p < 0,001$ em comparação com o controle sem estímulo (C-).

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória capaz de regular negativamente a produção de outros mediadores que causam aumento na resposta inflamatória, como IL-1 β , TNF- α , Interferon- γ e outras citocinas pró-inflamatórias (RAMIS et al., 2014).

A indução da produção da IL-10 foi um dos responsáveis pelo efeito anticolítico em animais avaliados por Song e colaboradores (2017), demonstrando a importância desta citocina para a atividade anti-inflamatória. Outros estudos demonstram que células com produção deficiente de IL-10 pode resultar em resposta hiper-inflamatória em infecções por, *H. pylori*, e consequentemente promover maiores danos para a mucosa gástrica (RAMIS et al., 2014; YAMAOKA; MIFTAHUSSURUR, 2017).

Neste contexto, a indução que a paepalantina provocou na expressão da IL-10 em macrófagos aponta para o potencial anti-inflamatório desta substância, principalmente quando analisado simultaneamente aos efeitos inibitórios de outros mediadores pro-inflamatórios, importantes liberados na infecção por *H. pylori*, como o TNF- α , IL-6 e NO, que inclusive sofrem interferência da IL-10.

Durante o processo inflamatório mediado por macrófagos também é liberado o TNF- α , que tem papel central nos processos inflamatórios e destrutivos encontrados em várias doenças inflamatórias. A atividade inibidora das naftopiranonas sobre o TNF- α está apresentada no Gráfico 8. É possível observar que em relação ao controle estimulado com LPS ambas as substâncias inibiram a

produção da citocina em $36,07 \pm 2,63\%$ e $60,19 \pm 0,12\%$ na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ de paepalantina e 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina respectivamente.

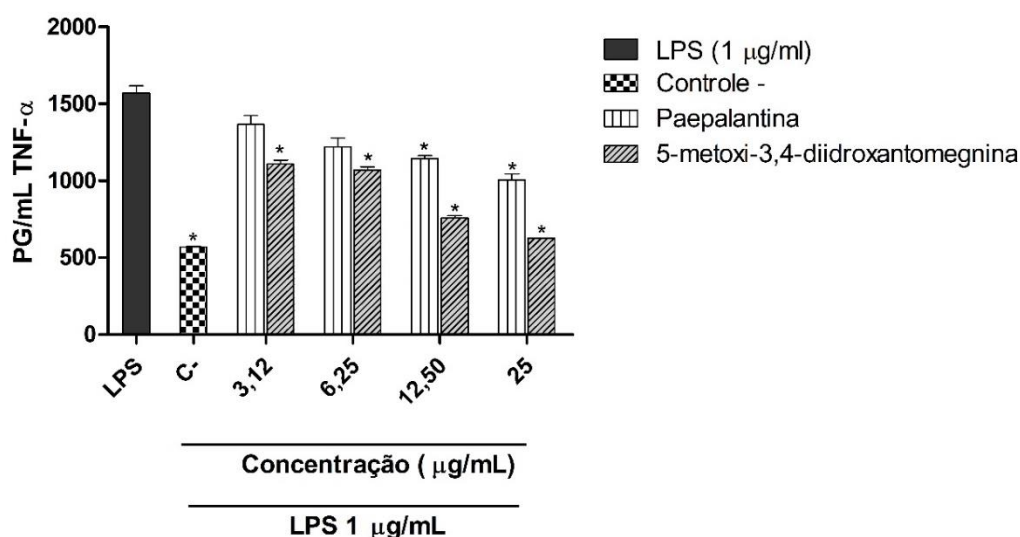


Gráfico 8 - Efeito da paepalantina e 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina na produção de TNF- α em macrófagos estimulados por LPS. * $p < 0,001$ em comparação com o controle estimulado com LPS.

O TNF- α intensifica a resposta inflamatória através da estimulação da expressão de moléculas de adesão, além de estimular a liberação de outros mediadores imunoreguladores e citotóxicos, incluindo IL-1 β , IL-6, prostaglandinas e óxido nítrico, atuando mutuamente com esses mediadores para aumentar a lesão tecidual. Ainda induz a citotoxicidade e apoptose de células epiteliais gástricas em infecções por *H. pylori* (SHIBATA et al., 1999).

Esta citocina também desempenha importante papel na regulação da secreção de ácido gástrico, sendo um dos fatores para o desenvolvimento de úlcera duodenal associado com infecção por *H. pylori* (GYULAI et al., 2004). Além disso, TNF- α tem sido apontado como um mutágeno potente que contribui para a iniciação do tumor através da indução da produção de EROs e promoção de danos ao DNA (CONNOR et al., 2010).

Desta forma a inibição da expressão de TNF- α pelas naftopiranonas é um importante fator que contribui para o processo anti-inflamatório e consequentemente na prevenção do desenvolvimento de câncer.

Em relação à IL-6, ambas as amostras inibiram sua produção em macrófagos estimulado com LPS. O potencial de inibição de 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina foi significativo, $92,35 \pm 0,15\%$ na maior concentração testada e $62,95 \pm 0,5\%$ na menor concentração. Apesar do efeito inibidor da paepalantina não ter sido tão

pronunciado, também demonstrou diferença significativa em relação ao controle com LPS, inibindo na concentração de 25 µg/mL $36,91 \pm 0,57\%$ como pode ser observado no Gráfico 9.

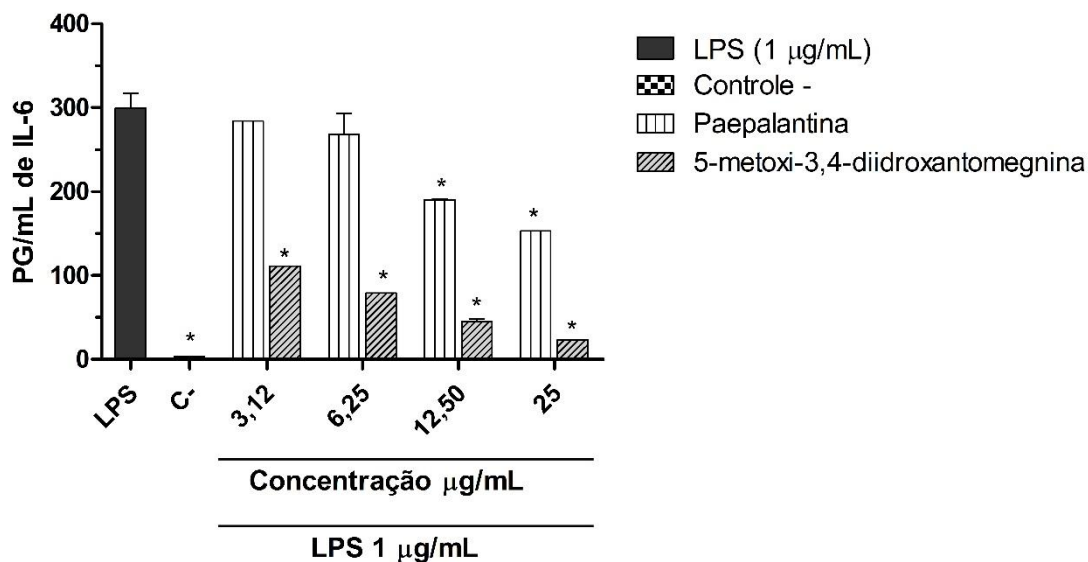


Gráfico 9 - Efeito inibitório da produção da citocina IL-6 para paepalantina e 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina em macrófagos estimulados por LPS. * $p < 0,001$ em comparação com o controle estimulado com LPS.

Entre os mediadores inflamatórios liberados por macrófagos ativados em processos infecciosos está a IL-6, responsável por estimular a produção de IFN- γ , promover a diferenciação e manutenção de células T citotóxicas além de estimular a secreção de imunoglobulina em células B ativadas, resultando em elevado processo inflamatório (CURFS; MEIS; HOOGKAMP-KORSTANJE, 1997; GUTHRIE et al., 2013).

Esta citocina também atua nas células endoteliais, aumentando a expressão de moléculas de adesão celular, como VCAM-1 (proteína de adesão de célula vascular) e ICAM-1 (molécula de adesão intercelular), ocasionando aumento de influxo celular no sítio de infecção e consequentemente agravamento do processo inflamatório (SCHELLER et al., 2011).

A inibição desta citocina pelas naftopiranonas além de ter papel no processo anti-inflamatório, também está relacionada diretamente na redução da progressão de tumores através da diminuição da promoção do crescimento e da atividade anti-apoptótica (YAMAOKA; MIFTAHUSSURUR, 2017).

4.5.3 ATIVIDADE INIBITÓRIA DAS NAFTOPIRANONAS SOBRE O ÓXIDO NÍTRICO

Os resultados das naftopiranonas na inibição do óxido nítrico em macrófagos estimulados por LPS encontram-se no Gráfico 10. De modo geral pode-se notar que as duas substâncias tiveram influência significativa sobre a produção de NO, apresentando CE₅₀ de $1,13 \pm 0,03 \mu\text{g/mL}$ para paepalantina, $6,41 \pm 0,99 \mu\text{g/mL}$ para 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina, enquanto o padrão *N*_ω-Nitro-L-arginina metil ester (L-NAME) demonstra CE₅₀ de $13,55 \pm 0,29 \mu\text{g/mL}$.

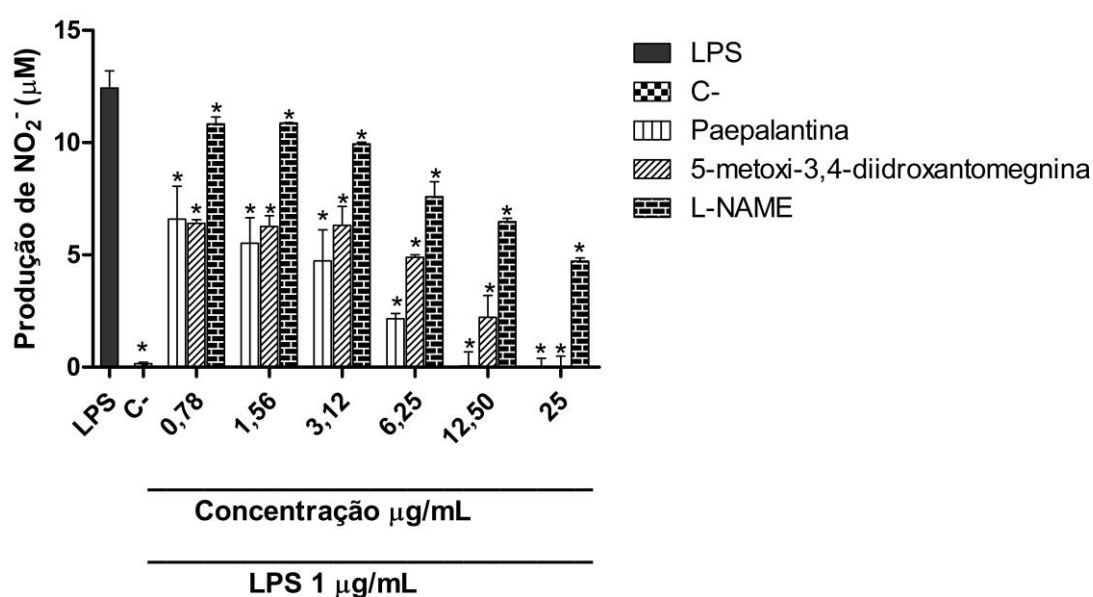


Gráfico 10 - Efeito inibitório da produção de óxido nítrico expresso em concentração de nitrito em μM para paepalantina e 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina em macrófagos estimulados por LPS. * $p < 0,001$ em comparação ao controle de estímulo com LPS.

Em relação à atividade sequestradora de NO avaliada por ensaio químico, paepalantina demonstrou ter melhor atividade, com CE₅₀ de $37,44 \pm 2,48 \mu\text{g/mL}$, próxima ao padrão antioxidante trolox com CE₅₀ de $31,89 \pm 3,27 \mu\text{g/mL}$, enquanto 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina apresentou CE₅₀ de $107,1 \pm 5,51 \mu\text{g/mL}$. As porcentagens de inibição são descritas no Gráfico 11.

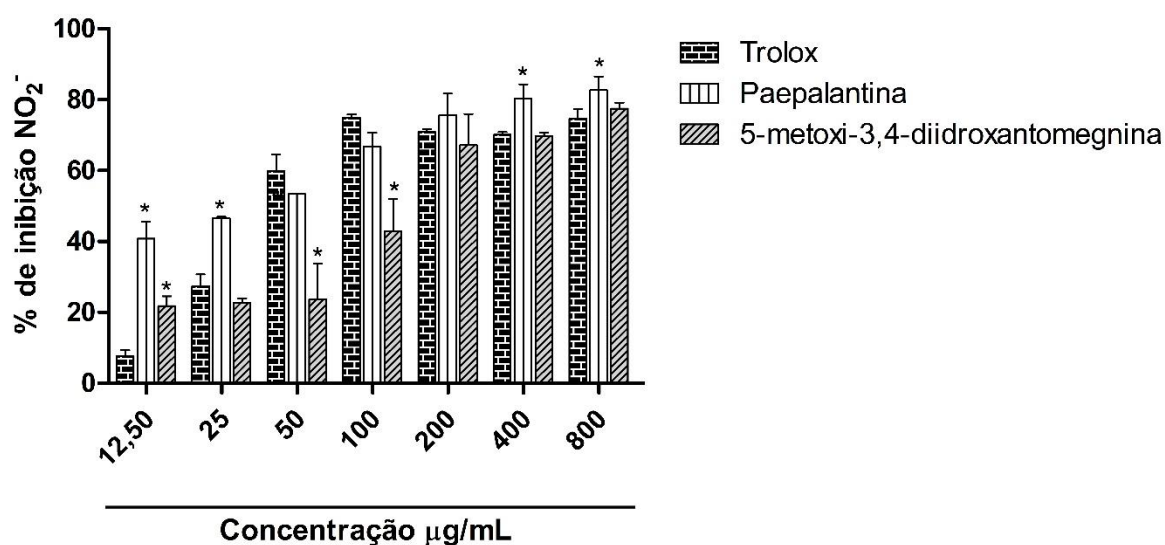


Gráfico 11 - Efeito da paepalantina e 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina na captura direta de óxido nítrico por ensaio químico. Valores expressos em porcentagem de inibição. * $p < 0,001$ em relação ao padrão de inibição trolox.

Observa-se que na concentração de 25 µg/mL o efeito inibitório das naftopiranas para o ensaio de produção de NO em macrófagos foi de aproximadamente 100%, enquanto no ensaio de captura direta do NO a porcentagem de inibição foi de $46,54 \pm 4,84\%$ e $22,68 \pm 2,74\%$ para paepalantina e 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina respectivamente.

Considerando os resultados obtidos nos ensaios com NO em macrófagos e na captura direta (Gráficos 10 e 11), observa-se que a inibição da produção de NO não está totalmente associada a sua captura direta, mas também a inibição da óxido nítrico sintase induzível (iNOS), sendo este, provavelmente seu maior efeito. Tal fato nos conduziu a análise *in silico* das naftopiranas no sítio ativo da enzima.

4.6 ANÁLISE DO SÍTIO ATIVO DA ENZIMA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE INDUZÍVEL (iNOS)

A análise *in silico* do sítio ativo da enzima óxido nítrico sintase induzível de macrófagos murinos foi realizada a partir do complexo cristalográfico de código 1DD7, depositado no banco de dados de proteínas PDB (MCMILLAN et al., 2000).

O modelo de *docking* desenvolvido foi validado realizando-se o *redocking* do ligante cristalográfico N-[(1,3-benzodioxol-5-il)metil]-1-[2-(1H-imidazol-1-il)pirimidin-4-il]-4-(metoxicarbonil)-piperazina-2-acetamida (1PM601) no sítio ativo da referida enzima. Como resultado, foi observada a reprodução da conformação bioativa de

1PM601, obtendo-se valor de RMSD = 1,2073 Å (Figura 14), sendo que um valor de até 2,0 Å é considerado aceitável (YUSUF et al., 2008).

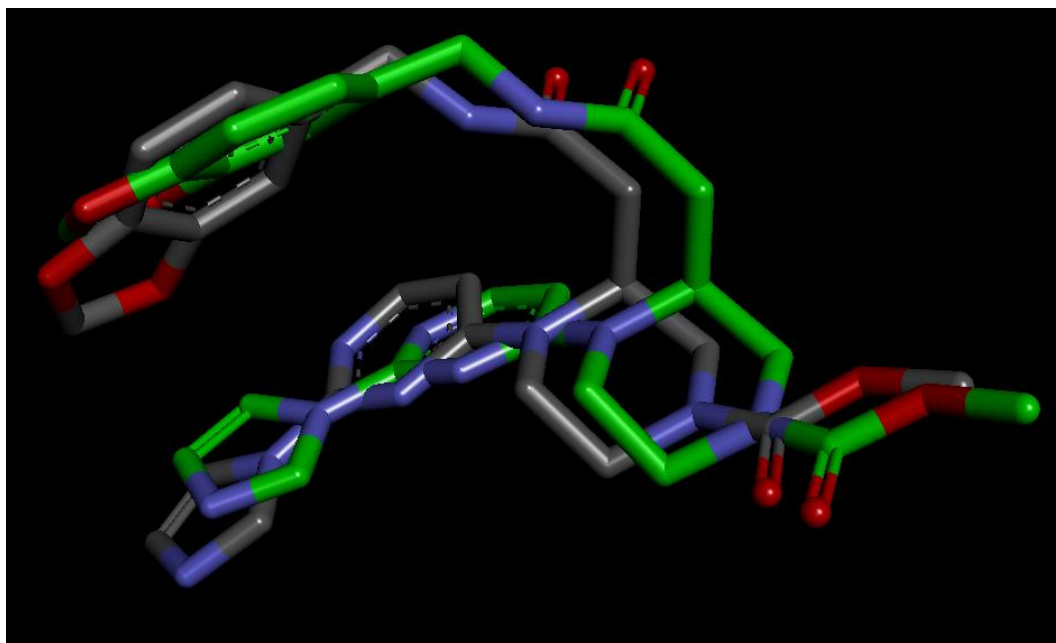


Figura 14 - Validação do modelo de *docking* desenvolvido por *redocking* (RMSD = 1,207 Å) no sítio ativo da iNOS PDB: 1DD7. Ligante cristalográfico (1PM601) representado com átomos de carbono na cor cinza e pose de *docking* com estrutura representada por átomos de carbono na cor verde.

A enzima iNOS produz NO ao ser induzida por citocinas e lipopolissacarídeos através dos substratos L-arginina e oxigênio, tendo como doador de elétrons o NADPH (Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina). Os elétrons são doados para o ferro do heme presente no sítio da iNOS (ALDERTON; COOPER; KNOWLES, 2001).

O ferro do grupo heme é coordenado com o aminoácido cisteína (CYS200) e realiza ligações de van der Waals com as cadeias laterais dos aminoácidos TRP188 e PHE369. No sítio ativo, a L-arginina se encaixa na cavidade do sítio de modo que seu grupo guanidino disponha-se de forma coplanar com o heme, permitindo também realizar duas ligações de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos GLU371 e TRP366, sendo estes pontos críticos de interação para o substrato L-arginina (ALDERTON; COOPER; KNOWLES, 2001).

A isoforma iNOS pode produzir NO em concentrações tóxicas para a célula e tecidos do indivíduo, estando relacionada com o desenvolvimento de diversas patologias, inclusive câncer, fazendo que substâncias capazes de inibir esta enzima obtenham cada vez mais importância clínica (MUNTANÉ et al., 2013).

4.6.1 ANÁLISE DAS PRINCIPAIS INTERAÇÕES DE INIBIDORES DE iNOS REPORTADOS NA LITERATURA POR DOCKING MOLECULAR

Diversas substâncias com capacidade de inibir a produção desta enzima já foram descritas na literatura (FEDOROV et al., 2003; MCMILLAN et al., 2000; PETERSON et al., 1992). Dentre estas, destacam-se o inibidor *N*_ω-Nitro-L-arginina metil ester (L-NAME), *N*-(3-aminometil)benzil) acetamidina (1400W) e o inibidor 1PM601 (Figura 15).

Além da análise das poses de *docking* referentes as principais interações da paepalantina e 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina no sítio ativo da enzima iNOS, foram analisadas também as interações dos inibidores de iNOS reportados na literatura: 1PM601, 1400W e L-NAME.

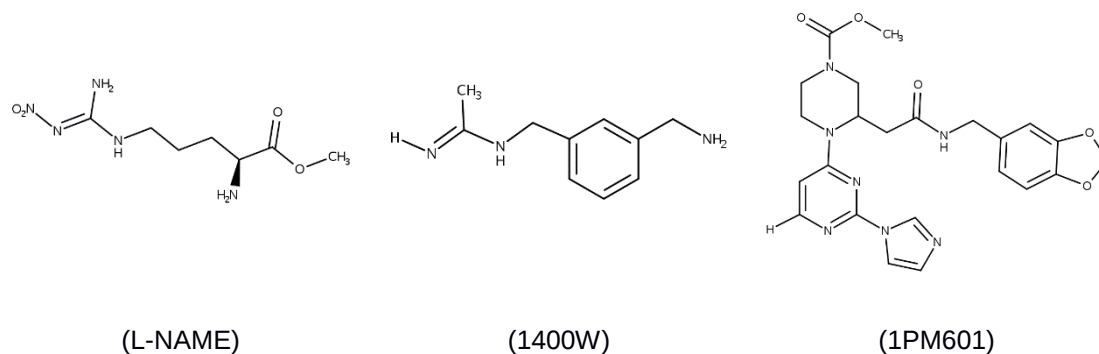


Figura 15 - Estrutura química dos inibidores da enzima iNOS reportados na literatura: L-NAME, 1400W e 1PM601.

L-NAME é um inibidor do tipo não-seletivo das isoformas de NOS e atua inibindo a enzima através da competição com o substrato natural enzimático, a L-arginina (PETERSON et al., 1992). Já os inibidores 1400W e 1PM601 inibem seletivamente a enzima iNOS (FEDOROV et al., 2003; MCMILLAN et al., 2000).

1PM601 é um inibidor altamente seletivo da iNOS e demonstra elevada atividade em comparação à outros inibidores como o 1400W (MCMILLAN et al., 2000). No banco de dados de proteínas PDB, existe depositado complexo cristalográfico deste inibidor no sítio ativo da enzima iNOS em macrófagos murinos, sendo, portanto utilizado como base para o desenvolvimento do modelo de *docking* (MCMILLAN et al., 2000).

A partir da análise do ligante cristalográfico 1PM601 no sítio ativo da enzima iNOS por meio de inspeção visual em seu sitio ativo, é possível observar a presença de uma ligação iônica do inibidor com o grupo heme do sítio enzimático a uma

distância de 2,18 Å, uma ligação de hidrogênio com o resíduo do aminoácido TYR485, além de contribuições hidrofóbicas ao longo da cadeia do inibidor com os resíduos de aminoácido GLN257, VAL346, PHE363, ASP364, GLY365, TRP366 e TYR367, o que possibilita a acomodação e estabilização no sítio ativo da enzima iNOS (Figura 16).

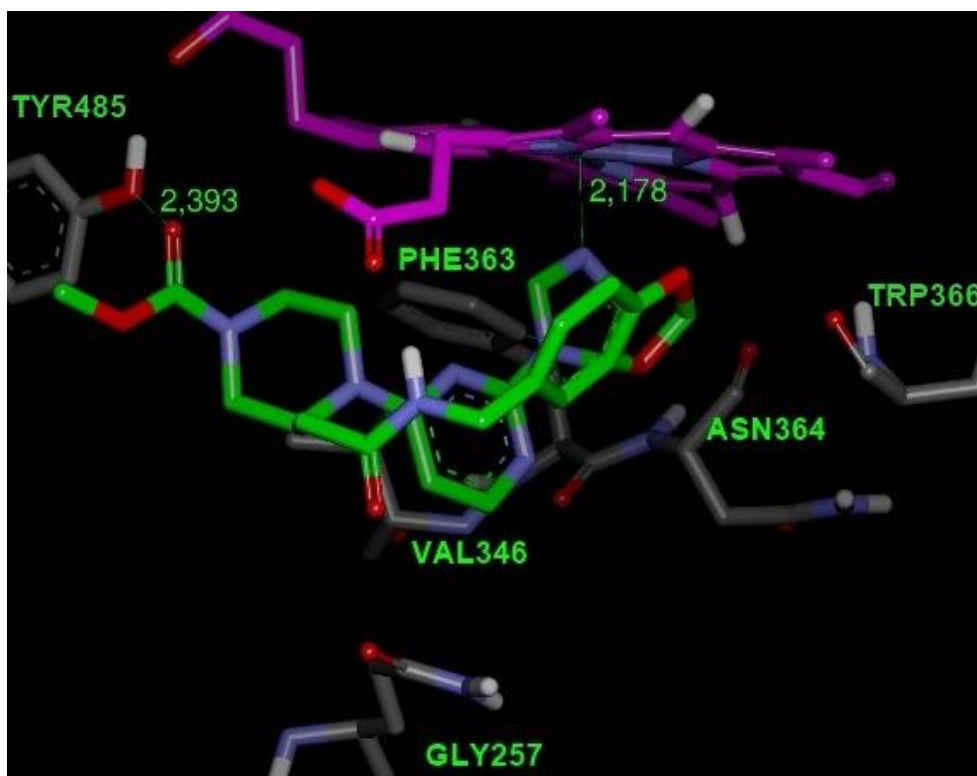


Figura 16 - Diagrama em *sticks* do sítio ativo da enzima iNOS com as principais interações do ligante cristalográfico 1PM601 através de ligação iônica com o ferro do grupo heme, ligação de hidrogênio com o aminoácido e contribuições hidrofóbicas com os aminoácidos VAL346, GLY257, ASP364, PHE363.

Por meio da análise das poses de *docking* do inibidor 1400W (FEDOROV et al., 2003) foi possível observar que este também realiza ligação iônica com o grupamento heme a uma distância favorável (2,08 Å), porém não realiza ligações de hidrogênio com os resíduos de aminoácido do sítio ativo da enzima iNOS. Em contrapartida, assim como o ligante cristalográfico, porém em menor proporção, realiza interações hidrofóbicas principalmente com os resíduos dos aminoácidos metionina (MET368), tirosina (TRY367), triptofano (TRP366), PHE363 e prolina (PRO344) (Figura 17).

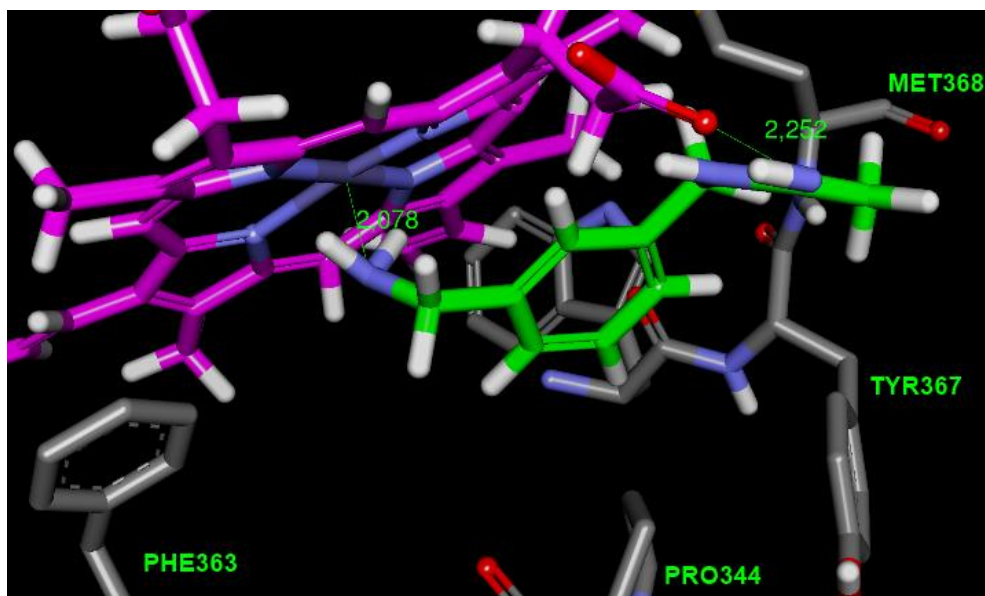


Figura 17 - Diagrama em *sticks* do sítio ativo da enzima iNOS com as principais interações do inibidor 1400W através de ligação iônica com o ferro do grupo heme e contribuições hidrofóbicas com os aminoácidos PHE363, PRO344, TYR367, MET368.

O estudo das poses de *docking* do inibidor L-NAME, indicou que, de forma semelhante ao ligante cristalográfico, interage com o heme do sítio enzimático através de uma ligação iônica com o ferro (1,92 Å) e realiza uma ligação de hidrogênio com o aminoácido PRO344. Porém, se comparado ao ligante cristalográfico e ao inibidor 1400W, L-NAME não é tão bem estabilizado, pois realiza poucas interações hidrofóbicas em sua cadeia lateral, interagindo apenas com os resíduos de aminoácidos ASP364, PHE363 e VAL344 (Figura 18).

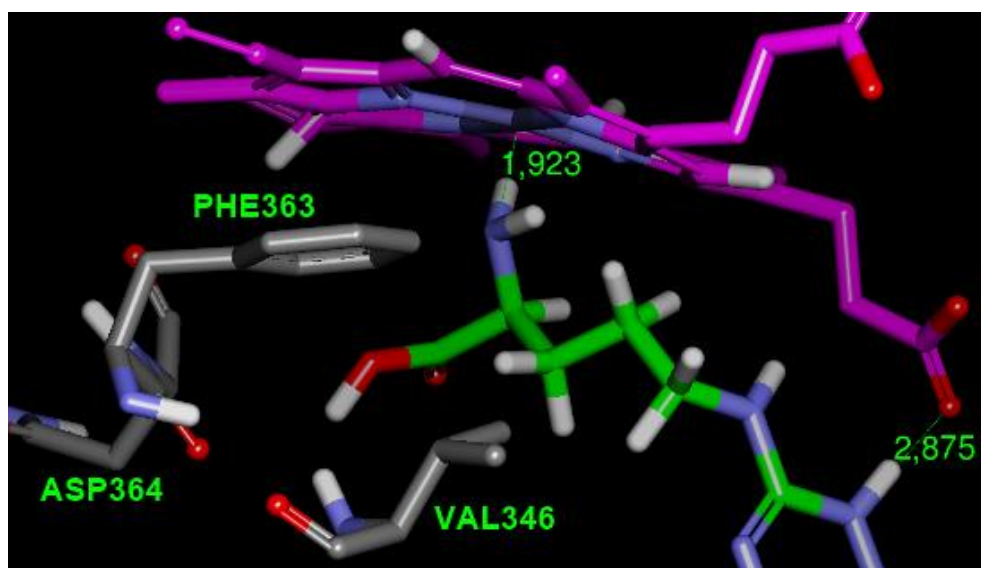


Figura 18 - Diagrama em *sticks* do sítio ativo da enzima iNOS com as principais interações do inibidor padrão L-NAME através de ligação iônica com o ferro do grupo heme, ligação de hidrogênio com o oxigênio do heme e contribuições hidrofóbicas com os aminoácidos PHE363, ASP364, VAL346.

Através das análises de *docking* e das interações dos inibidores da enzima iNOS reportados na literatura (FEDOROV et al., 2003 MCMILLAN et al., 2000), foi possível verificar com quais resíduos de aminoácidos da enzima esses inibidores mais interagem (Tabela 4).

Tabela 4 - Aminoácidos mais frequentes nas interações hidrofóbicas com diferentes inibidores de iNOS, verificados por inspeção visual no sítio ativo da enzima iNOS de macrófagos murinos.

Aminoácido	Distância (Å)
Valina 346	4,772 – 4,828
Fenilalanina 363	4,352 – 4,647
Asparaginina 364	4,292 – 4,461
Triptofano 366	3,829 – 3,967
Tirosina 367	3,969 – 4,466

5.6.2 ANÁLISE DOS MODOS DE LIGAÇÃO DAS NAFTOPIRANONAS NO SÍTIO ATIVO DA ENZIMA iNOS

A análise dos possíveis modos de ligação das naftopiranonas no sítio ativo da enzima iNOS foi realizada por meio de avaliação das poses resultantes dos cálculos de *docking*.

Na análise da paepalantina, é possível observar semelhança com os inibidores padrões da enzima iNOS (Tabela 4) quanto às interações hidrofóbicas realizadas, formando em sua cadeia lateral um bolsão hidrofóbico com os resíduos de aminoácidos VAL346, TYR367, MET368, PHE363 e TYR485. A paepalantina demonstrou também a possibilidade de realizar interações com o grupo heme através de ligação iônica com o ferro a uma distância favorável (2,97 Å) e ligação de hidrogênio com nitrogênio do heme enzimático (2,84 Å). Além disso, é possível observar uma ligação de hidrogênio com o resíduo de aminoácido TRP366 com distância favorável (2,68 Å) (Figura 19), sendo este um aminoácido importante na interação do substrato natural L-arginina com sítio enzimático da iNOS (ALDERTON; COOPER; KNOWLES, 2001).

Estas interações demonstram o forte potencial de interação com a enzima, e, no geral, padrão de ligação semelhante aos inibidores de referência quanto às formas de interação no sítio ativo da enzima iNOS, o que possivelmente reflete nos

resultados experimentais de inibição pela paepalantina na produção de NO em macrófagos ativados (Tabela 5 e Gráfico 10).

Em relação às interações da 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina, de forma semelhante à paepalantina e aos inibidores padrões, observam-se interações hidrofóbicas na cadeia lateral com os resíduos de aminoácido VAL346, PRO344, PHE363, ASP364, TYR367 e TYR485 e ligação iônica com o ferro do grupamento heme enzimático (2,87 Å). Porém não foi observado possibilidade de ligação de hidrogênio em regiões favoráveis com os resíduos de aminoácidos presentes no sítio (Figura 20), o que muito possivelmente, reflete na atividade mais baixa observada nos ensaios experimentais desta naftoquinona em comparação aos resultados demonstrados com a paepalantina (Tabela 5 e Gráfico 10).

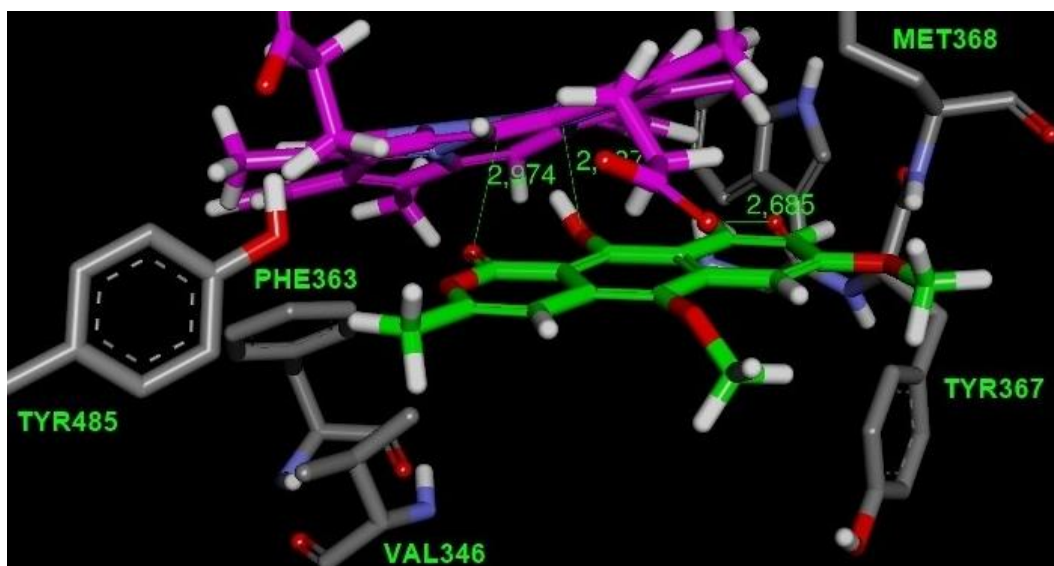


Figura 19 - Resultado de *docking* da paepalantina com as principais interações no sítio ativo da enzima iNOS através de uma ligação iônica com o ferro do grupo heme, uma ligação de hidrogênio com o nitrogênio do heme, uma ligação de hidrogênio com o aminoácido TYR366 e interações hidrofóbicas com os aminoácidos TYR485, PHE363, VAL346, TYR367, MET368.

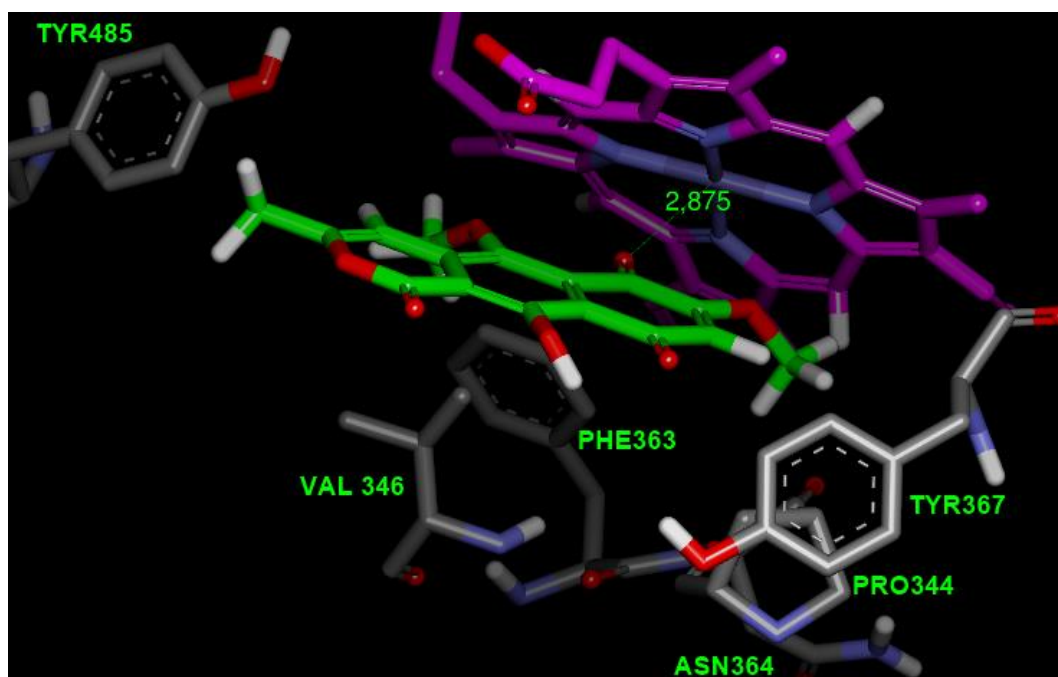


Figura 20 - Resultado de *docking* de 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina com as principais interações no sítio ativo da enzima iNOS através de uma interação iônica com o ferro do grupo heme e interações hidrofóbicas com os aminoácidos TYR485, VAL346, PHE363, ASP364, PRO344, TYR367.

Os resultados das análises *in vitro* e *in silico* estão listados na Tabela 5. Apesar de não ser possível fazer uma correlação direta entre os valores de escores encontrados e das atividades reportadas experimentalmente devido à proximidade de seus valores, observa-se que as substâncias com maiores valores de escore como a paepalantina e 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina, foram aquelas que demonstraram experimentalmente melhor potencial de inibição na produção do óxido nítrico em macrófagos ativados, inclusive quando comparado com o inibidor padrão L-NAME.

Tabela 5 - Resultados *in vitro* e *in silico* das estruturas analisadas para enzima iNOS

Nome	Escore (Chemscore)	CE ₅₀ µg/mL
L-NAME	26,47	6,41 ± 0,99
Paepalantina	32,01	1,13 ± 0,03
5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina	29,82	13,55 ± 0,28
1PM601	28,03	*

* Não avaliado no ensaio de inibição na produção de óxido nítrico em macrófagos estimulados por LPS.

Considerando os resultados obtidos nos ensaios de NO celular e captura direta (Gráficos 10 e 11) e o potencial de interação das naftopiranonas no sítio ativo da enzima iNOS observado *in silico*, infere-se que o maior efeito sobre a produção de NO em macrófagos estimulados por LPS está relacionado indiretamente pela inibição da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e em menor efeito pela captura direta do NO, demonstrando atuação sinérgica da inibição enzimática e captura do NO na liberação deste mediador inflamatório.

Durante o processo inflamatório o NO é gerado por células de defesa através da catálise pela iNOS. Este mediador inflamatório desempenha importante papel na eliminação de patógenos, porém, em excesso, é responsável por gerar danos aos tecidos e ao DNA, demonstrando ter papel ativo na carcinogênese (FUKUMURA; KASHIWAGI; JAIN, 2006; HALLIWELL, 1999). Além de danos direto ao DNA, o NO estimula o crescimento e metástase tumoral através do aumento da vascularização, promove inativação de proteínas de reparo ao DNA devido à alta afinidade de espécies de NO reativas para aminoácidos contendo resíduos de tiol (LALA; CHAKRABORTY, 2001).

4.7 REDUÇÃO DA PRODUÇÃO DE SUPERÓXIDO ($O_2^{\bullet-}$)

Os resultados de inibição do $O_2^{\bullet-}$ pelas naftopiranonas em macrófagos estimulados por LPS podem ser observados no Gráfico 12. Os valores de CE_{50} foram $2,22 \pm 0,46 \mu\text{g/mL}$ para paepalantina e $5,31 \pm 0,91 \mu\text{g/mL}$ para 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina. O potencial antioxidante das naftopiranonas também foi observado através da capacidade de sequestro do ânion superóxido formado pela via química (Gráfico 13). Foi observada baixo potencial de captura do $O_2^{\bullet-}$ pela 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina, ($47,41 \pm 4,73\%$ em $100 \mu\text{g/mL}$ e $16,25 \pm 1,57\%$ em $25 \mu\text{g/mL}$). A paepalantina também não demonstrou potencial de captura superior a 50% em nenhuma das concentrações testadas.

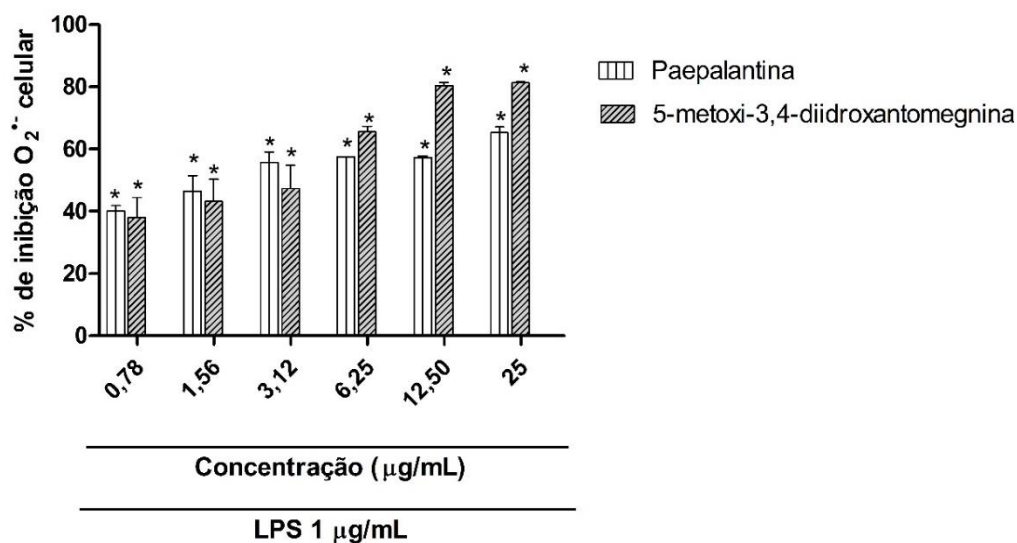


Gráfico 12 - Efeito da paepalantina e 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina na produção do ânion superóxido em macrófagos estimulados por LPS 1 µg/mL. Valores expressos em porcentagem de inibição. * p < 0,001 em relação ao controle positivo do ensaio (equivalente a 0% de inibição)

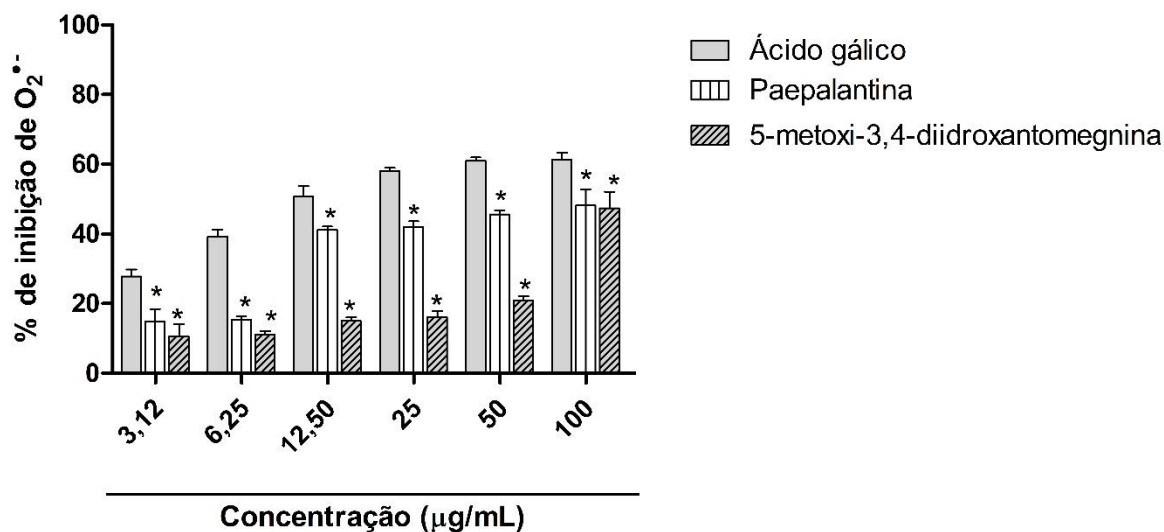


Gráfico 13 - Efeito da paepalantina e 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina no sequestro do ânion superóxido. Valores expressos em porcentagem de inibição. * p < 0,001 em relação ao padrão de inibição ácido gálico.

Observa-se que na concentração de 25 µg/mL o efeito inibitório das naftopiranonas para o ensaio de produção de $O_2^{\bullet-}$ em macrófagos foi de $65,27 \pm 1,88\%$ para a paepalantina e $81,30 \pm 1,20\%$ para 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina. Na mesma concentração, no ensaio de captura direta do $O_2^{\bullet-}$, a porcentagem de inibição foi de $42,03 \pm 1,57\%$ e $16,24 \pm 1,16\%$ para paepalantina e 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina, respectivamente.

A partir da análise dos resultados obtidos nos ensaios celular e químico do $O_2^{\bullet-}$ (Gráficos 12 e 13), é possível inferir que a maior redução na produção deste

radical em macrófagos estimulados por LPS pela 5-metoxi-3,4-diidroxi-6-metil-2-piridina, esteja relacionada à inibição enzimática da NADPH oxidase e em menor efeito pela captura direta do $O_2^{\bullet-}$. Em relação aos resultados obtidos pela paepalantina, é provável que seu potencial de inibição sobre o $O_2^{\bullet-}$ esteja relacionado principalmente pela captura direta desta espécie reativa.

Em estudo anterior, MORA-PALE e colaboradores (2013) propuseram o mecanismo de inibição enzimático de quinonas (*trimer hydroxylated quinone* – IIIHyQ e 1,2 e 1,4-naftoquinonas) sobre NADPH oxidase quanto ao potencial de interação às suas subunidades $p22^{phox}$ e $p47^{phox}$, demonstrando que o principal alvo parece ser os resíduos de cisteína de $p47^{phox}$, sendo este um possível alvo para a naftoquinona 5-metoxi-3,4-diidroxi-6-metil-2-piridina.

A enzima NADPH oxidase está presente nas membranas de células de defesa, e a ativação desta enzima é essencial para o início e progressão do processo inflamatório. Durante um processo infeccioso, após a ativação da resposta imunológica, ocorre a migração de macrófagos e neutrófilos, para iniciar a produção de EROs mediada principalmente pelo complexo enzimático NADPH oxidase, responsável pela produção do $O_2^{\bullet-}$ (CATHCART, 2004; GROEMPING; RITTINGER, 2005).

Este por sua vez reage com outras moléculas levando a formação de diversas outras EROs e ERNs como peróxido de hidrogênio, peroxinitritos e ácido hipocloroso que são altamente tóxicas para células devido sua alta capacidade reativa (CATHCART, 2004; GROEMPING; RITTINGER, 2005).

O peroxinitrito ($ONOO^-$) é formado durante o processo inflamatório a partir da reação do NO com o $O_2^{\bullet-}$. Este é um oxidante poderoso e tóxico que induz o dano oxidativo do DNA, já que é altamente reativo com bases nitrogenadas (FUKUMURA; KASHIWAGI; JAIN, 2006; HALLIWELL, 1999). Devida a inibição demonstrada pelas naftopirranonas tanto na produção do NO quanto do $O_2^{\bullet-}$, consequentemente, ocorre a redução na formação do $ONOO^-$, revelando mais uma vez o potencial protetor e preventivo destas substâncias tanto em relação às lesões teciduais quanto ao desenvolvimento de processo carcinogênico.

4.8 ATIVIDADE CITOTÓXICA SOBRE LINHAGEM CELULAR DE ADENOCARCINOMA GÁSTRICO (AGS)

O efeito citotóxico de paepalantina e 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina em células tumorais de adenocarcinoma gástrico foram bastante significativos quando comparado ao padrão cisplatina, como pode ser observado no Gráfico 14. Todas as concentrações testadas das substâncias apresentaram diferença significativa com o controle de crescimento das células. Os IC₅₀ encontrados foram de 4,35 ± 0,9 µg/ mL, 24,56 ± 2,3 µg/ mL e 17,45 ± 1,6 µg/ mL para cisplatina, paepalantina e 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina, respectivamente.

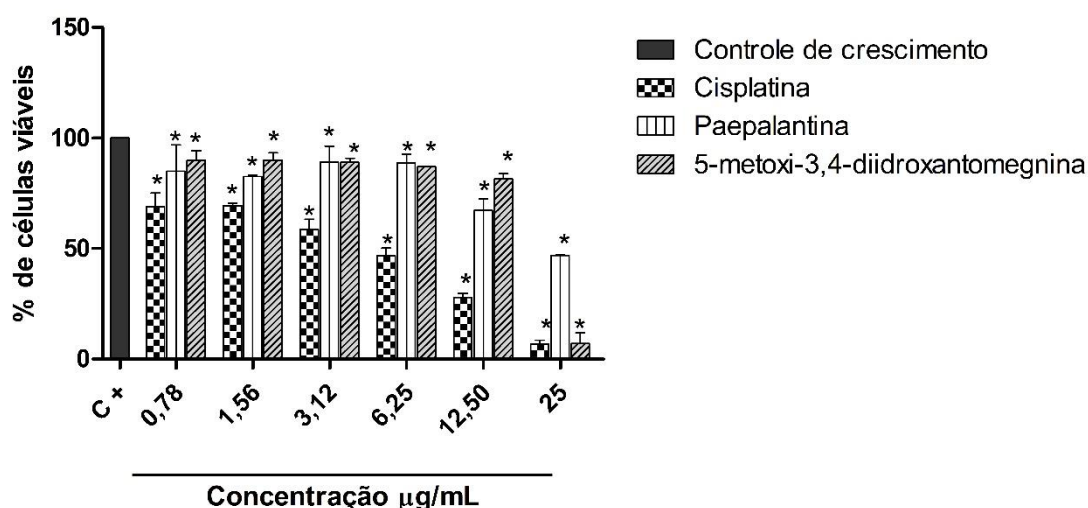


Gráfico 14 - Efeito da paepalantina, 5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina e do padrão cisplatina em cultura celular de adenocarcinoma gástrico (AGS). Resultados expressos em porcentagem de células viáveis. * p < 0,001 em relação ao controle de crescimento.

Além disso, as naftopiranas foram consideradas em média 2 vezes mais seletivas que o medicamento quimioterápico padrão cisplatina (Tabela 6).

Tabela 6 - Índice de seletividade para as naftopiranas e cisplatina

Substância	IC ₅₀ (µg/mL)		
	RAW 264.7	AGS	IS*
Paepalantina	49,57 ± 1,36	24,56 ± 2,3	2,01
5-metoxi-3,4-diidroxantomegnina	41,06 ± 1,02	17,45 ± 1,6	2,35
Cisplatina	4,40 ± 0,53	4,35 ± 0,9	1,01

* Foram considerados seletivos valores maiores ou iguais a dois

Os efeitos citotóxicos da paepalantina podem ser associados à ligação dupla entre o carbono 3 e 4 tornando essa região altamente reativa, além das hidroxilas e a carbonila em sua estrutura, que promovem fortes interações de hidrogênio. Estas características químicas fazem que a molécula de paepalantina tenha forte interação com a estrutura do DNA, fazendo que ocorra até inibição da síntese proteica através de mecanismos de intercalação DNA (VARANDA et al., 1997). A influência da paepalantina no DNA demonstra que esta pode ser uma droga promissora para o tratamento antineoplásico, já que diversos fármacos utilizados para finalidades quimioterápicas interagem com DNA (BURRES et al., 1992; SURAJ et al., 2017).

Possivelmente, a citotoxicidade de 5-metoxi-3,4-diidroxi-6-metil-2-pirone pode estar relacionada com sua capacidade de formar espécies reativas de oxigênio como ânion superóxido e peróxido de hidrogênio através de ciclos redox que sofrem a partir de reações com agentes redutores celulares, além da presença de carbonos eletrofílicos reativos em sua estrutura. Desta forma, assim como diversos agentes quimioterápicos a quinona pode possuir habilidade de induzir apoptose além de causar danos oxidativos ao DNA (KITAGAWA et al., 2004; KITAGAWA et al., 2008).

A citotoxicidade das quinonas também pode estar relacionada com a capacidade que estas possuem em gerar intermediários alquilantes, através da sua redução por flavoenzimas celulares. Estes intermediários formados são agentes biorredutores que podem provocar danos e morte celular (SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2003).

A atividade anticâncer das naftopiranonas demonstrou ser significativa e promissora, principalmente levando em consideração os resultados de imunomodulação e anti-*H. pylori* encontrados. Desta forma, além da atividade direta no combate de células tumorais de adenocarcinoma gástrico, as substâncias demonstram ter ação na prevenção do desenvolvimento do câncer, seja por seu efeito anti-inflamatório e antioxidante ou pela eliminação de uma das principais causas do desenvolvimento do câncer, a infecção por *H. pylori*.

5 CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que:

1. 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina demonstra ter atividade sinérgica com metronidazol para inibição de *H. pylori*;
2. As naftopiranas não demonstraram potencial para inibir *in vitro* a enzima urease;
3. As substâncias Paepalantina e 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina não apresentam padrão de ligação favorável no sítio da enzima urease;
4. Concentrações sub-inibitórias de paepalantina e 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina demonstraram reduzir a patogenicidade de *H. pylori*;
5. Paepalantina induz a produção da citocina antiinflamatória IL-10;
6. Paepalantina e 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina possuem atividade imunomoduladora através da inibição da produção de TNF- α e IL-6;
7. Paepalantina e 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina atuam inibindo NO sinergicamente através da inibição da iNOS e captura direta;
8. As naftopiranas demonstraram potencial de interação no sítio ativo da enzima iNOS;
9. Paepalantina e 5-metoxi-3,4-diidroxi-antomegnina possuem potencial antitumoral para células de adenocarcinoma gástrico e índice de seletividade favorável.

6 REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Imunologia celular e molecular*. 7ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.
- ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **The Biochemical journal**, v. 357, n. Pt 3, p. 593–615, 2001.
- ALGOOD, H. M. S.; COVER, T. L. *Helicobacter pylori* persistence: An overview of interactions between *H. pylori* and host immune defenses. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 4, p. 597–613, 2006.
- ALIGIANNIS, N. et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 49, n. 9, p. 4168–4170, 2001.
- ALLEN, L. A. et al. *Helicobacter pylori* disrupts NADPH oxidase targeting in human neutrophils to induce extracellular superoxide release. **J Immunol**, v. 174, n. 6, p. 3658–3667, 2005.
- AMIEVA, M. R.; EL-OMAR, E. M. Host-Bacterial Interactions in *Helicobacter pylori* Infection. **Gastroenterology**, v. 134, n. 1, p. 306–323, 2008. s
- ANDRADE, M. F. et al. 3-Phenylcoumarin derivatives selectively modulate different steps of reactive oxygen species production by immune complex-stimulated human neutrophils. **International Immunopharmacology**, v. 15, n. 2, p. 387–394, 2013.
- ARMIN, T. B. A. Strategies used by *helicobacter pylori* to establish persistent infection. **World Journal of Gastroenterology**, v. 23, n. 16, p. 2870, 2017.
- AYRES, M. C. C. et al. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 1, p. 90–97, 2008.
- BADISA, R. et al. Selective cytotoxic activities of two novel synthetic drugs on human breast carcinoma MCF-7 cells. **Anticancer Res**, v. 29, p. 2993–2996, 2011.
- BALUNAS, M.J.; KINGHORN, A.D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, p. 431-444, 2005.
- BANERJI, A. Biotechnical potencial of natural products. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 27, p. 105 - 113, 1992.
- BATES, J. N. et al. Nitric oxide generation from nitroprusside by vascular tissue. 104 Evidence that reduction of the nitroprusside anion and cyanide loss are required. **Biochemical Pharmacology**, v. 42, p. 157–165, 1991.
- BLASER, M. J.; BERG, D. E. *Helicobacter pylori* genetic diversity and risk of human

disease. **The Journal of clinical investigation**, v. 107, n. 7, p. 767–73, 2001.

BONACORSI, C. et al. Anti-Helicobacter pylori activity and immunostimulatory effect of extracts from *Byrsonima crassa* Nied. (Malpighiaceae). **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 9, n. 2, p. 1–7, 2009.

BONACORSI, C. et al. Comparison of Brazilian Plants Used to Treat Gastritis on the Oxidative Burst of Helicobacter pylori-Stimulated Neutrophil. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1–8, 2013.

BURRES, N. S. et al. A colorimetric microassay for the detection of agents that interact with DNA. **Journal of Natural Products**, v. 55, n. 11, p. 1582–1587, 1992.

CÁLGARO-HELENA, A. F. et al. Effects of isocoumarins isolated from *Paepalanthus bromelioides* on mitochondria: Uncoupling, and induction/inhibition of mitochondrial permeability transition. **Chemico-Biological Interactions**, v. 161, n. 2, p. 155–164, 2006.

CAMPOS-TOIMIL, M. et al. Synthesis and vasorelaxant activity of new coumarin and furocoumarin derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 12, n. 5, p. 783–786, 2002.

CANEDO, L. M. et al. Agent Produced by a Marine Bacterium by column chromatography on C18 reversed phase using Ocean Salts (Aquarium Systems , Inc .) was inoculated. **the journal of antibiotics**, v. 50, n. 2, p. 175–176, 1997.

CAPE, J. L.; BOWMAN, M. K.; KRAMER, D. M. Computation of the redox and protonation properties of quinones: Towards the prediction of redox cycling natural products. **Phytochemistry**, v. 67, n. 16, p. 1781–1788, 2006.

CATHCART, M. K. Regulation of Superoxide Anion Production by NADPH Oxidase in Monocytes / Macrophages Contributions to Atherosclerosis. 2004.

CHAKRABORTI, S. et al. The Molecular Basis of Inactivation of Metronidazole Resistant Helicobacter pylori Using Polyethyleneimine Functionalized Zinc Oxide Nanoparticles. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, 2013

CHOI, H. et al. A Quantitative Nitroblue Tetrazolium Assay for Determining Intracellular Superoxide Anion Production in Phagocytic Cells. **Journal of Immunoassay and Immunochemistry**, v. 27, n. 1, p. 31–44, 2006.

CLAVERIE-MARTIN, F.; DIAZ-TORRES, M. R.; GEOGHEGAN, M. J. Chemical composition and ultrastructure of wild-type and white mutant *Aspergillus nidulans* conidial walls. **Current Microbiology**, v. 16, n. 5, p. 281–287, 1988.

CLSI, Norma M7-A6: Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico: Norma aprovada, 6ªed, v. 20, n. 2, 2003.

COELHO, R. et al. A new cytotoxic naphthopyrone dimer from *Paepalanthus*

bromelioides. **Fitoterapia**, v. 71, n. 5, p. 497 - 500, 2000.

CONNOR, P. M. O. et al. Mechanisms by Which Inflammation May Increase Intestinal Cancer Risk in Inflammatory Bowel Disease. v. 16, n. 8, p. 1411–1420, 2010.

COVACCI, A et al. Helicobacter pylori virulence and genetic geography. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1328–1333, 1999.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical microbiology reviews**, v. 12, n. 4, p. 564–82, 1999.

CRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. New horizons for old drugs and drug leads. **Journal of Natural Products**, v. 77, n. 3, p. 703–723, 2014.

CURFS, J. H. A. J.; MEIS, J. F. G. M.; HOOGKAMP-KORSTANJE, J. A. A. A primer on cytokines: Sources, receptors, effects, and inducers. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, n. 4, p. 742–780, 1997.

D'ALMEIDA, R. E. et al. Comparison of seven structurally related coumarins on the inhibition of Quorum sensing of Pseudomonas aeruginosa and Chromobacterium violaceum. **Bioorganic Chemistry**, v. 73, p. 37–42, 2017.

DA SILVA, E. N. et al. On the search for potential anti-Trypanosoma cruzi drugs: Synthesis and biological evaluation of 2-hydroxy-3-methylamino and 1,2,3-triazolic naphthoquinoidal compounds obtained by click chemistry reactions. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 52, p. 304–312, 2012.

DAMASCENO, J. P. L. **Estudo de solubilidade e das atividades antioxidante e anti-helicobacter pylori da Isocumarina paepalantina obtida de Paepalanthus latipes silv.** 2016. 81 f, Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2016.

DAMASCENO, J. et al. Anti-Helicobacter pylori Activity of Isocoumarin Paepalantine: Morphological and Molecular *Docking* Analysis. **Molecules**, v. 22, n. 5, p. 786, 2017.

DELONEY, C.; SCHILLER, N. Competition of Various β -Lactam Antibiotics for the Major Penicillin-Binding Proteins of Helicobacter pylori: Antibacterial Activity and Effects on Bacterial Morphology. **ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY**, v. 43, n. 11, p. 2702–2709, 1999.

DEVIIENNE, K. et al. Structure–antimicrobial activity of some natural isocoumarins and their analogues. **Phytomedicine**, v. 12, n. 5, p. 378–381, maio 2005.

DEVIIENNE, K. F. et al. Antioxidant activity of isocoumarins isolated from Paepalanthus bromelioides on mitochondria. **Phytochemistry**, v. 68, n. 7, p. 1075–1080, 2007.

DI STASI, L. C. et al. Intestinal anti-inflammatory activity of paepalantine, an isocoumarin isolated from the capitula of *Paepalanthus bromelioides*, in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. **Planta Medica**, v. 70, n. 4, p. 315–320, 2004.

DOMINGUES, K. et al. Causadores De Infecções No Trato Urinário. p. 427–435, 2015.

DOMRACHEVA, I. et al. Selenopheno quinolinones and coumarins promote cancer cell apoptosis by ROS depletion and caspase-7 activation. **Life Sciences**, v. 186, n. August, p. 92–101, 2017.

DONNER, C. D. Naphthopyranones - isolation, bioactivity, biosynthesis and synthesis. **Natural product reports**, v. 00, p. 1–27, 2014.

EL-OMAR, E. M. et al. Increased risk of noncardia gastric cancer associated with proinflammatory cytokine gene polymorphisms. **Gastroenterology**, v. 124, n. 5, p. 1193–1201, 2003.

ERNST, P. B.; PEURA, D. A.; CROWE, S. E. The translation of *Helicobacter pylori* basic research to patient care. **Gastroenterology**, v. 130, n. 1, p. 188–206, 2006.

EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetro de halos. p. 0–77, 2015.

EUSEBI, L. H.; ZAGARI, R. M.; BAZZOLI, F. Epidemiology of *Helicobacter pylori* Infection. **Helicobacter**, v. 19, n. S1, p. 1–5, set. 2014.

EVANS, D. J. et al. Characterization of a *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 6, p. 2213–2220, 1995.

FEDOROV, R. et al. Structural Basis for the Specificity of the Nitric-oxide Synthase Inhibitors W1400 and NωPropyl-L-Arg for the Inducible and Neuronal Isoforms. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 46, p. 45818–45825, 2003.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 5, p. E359–E386, 2015.

FERREIRA, V. F. et al. Trypanocidal agents with low cytotoxicity to mammalian cell line: A comparison of the theoretical and biological features of lapachone derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 16, p. 5459–5466, 2006.

FISCHER, C. et al. Sphingoid bases are taken up by *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* and induce ultrastructural damage. **Skin pharmacology and physiology**, v. 26, n. 1, p. 36–44, 2013.

FLOCH, P.; MÉGRAUD, F.; LEHOURS, P. *Helicobacter pylori* strains and gastric MALT lymphoma. **Toxins**, v. 9, n. 4, 2017.

FUKUMURA, D.; KASHIWAGI, S.; JAIN, R. K. The role of nitric oxide in tumour progression. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 7, p. 521–534, 2006.

GAFNER, S. et al. Antifungal and antibacterial naphthoquinones from *Newbouldia laevis* roots. **Phytochemistry**, v. 42, n. 5, p. 1315–1320, 1996.

GALM, U. et al. Antitumor antibiotics: Bleomycin, enediynes, and mitomycin. **Chemical Reviews**, v. 105, n. 2, p. 739–758, 2005.

GIULIETTI, A.M.; HENSOLD, N. Padrões de distribuição geográfica dos gêneros de Eriocaulaceae. **Acta Botanica Brasilica**, v. 4, n. 1, p. 133-158, 1990.

GLOBAL BURDEN OF DISEASE CANCER COLLABORATION. Europe PMC Funders Group The Global Burden of Cancer 2013. **JAMA Oncology**, v. 1, p. 505-527, 2015.

GOODWIN CS, AMSTRONG JA, CHILVERS T. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen.nov.as *Helicobacter pylori* comb.nov. and *Helicobacter mustelae* comb.nov., respectively. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 39, n. 4, p. 397–405, 1989.

GRAHAM, D. Y.; LU, H.; YAMAOKA, Y. A report card to grade *Helicobacter pylori* therapy. **Helicobacter**, v. 12, n. 4, p. 275–278, 2007.

GROEMPING, Y.; RITTINGER, K. Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. **The Biochemical journal**, v. 386, n. Pt 3, p. 401–416, 2005.

GU, J. et al. Use of Natural Products as Chemical Library for Drug Discovery and Network Pharmacology. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. 1–10, 2013.

GUSTAFSSON, D. et al. Case history: A new oral anticoagulant: the 50-year challenge. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 8, p. 649–659, 2004.

GUTHRIE, G. J. K. et al. Does interleukin-6 link explain the link between tumour necrosis, local and systemic inflammatory responses and outcome in patients with colorectal cancer? **Cancer Treatment Reviews**, v. 39, n. 1, p. 89–96, 2013.

GYULAI, Z. et al. Genetic polymorphism of interleukin-8 (IL-8) is associated with *Helicobacter pylori* -induced duodenal ulcer. **European Cytokine Network**, v. 15, n. 4, 2004.

HALLIWELL, B. Oxygen and nitrogen are pro-carcinogens. Damage to DNA by reactive oxygen, chlorine and nitrogen species: Measurement, mechanism and the effects of nutrition. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 443, n. 1-2, p. 37–52, 1999.

HOEHNE, F. C. Outras monocotyledoneas tóxicas ou suspeitas. In: Plantas e substâncias vegetais tóxicas e medicinais. São Paulo: Graphicars, 1939. p. 97.

HONG, W. et al. Medium pH-dependent redistribution of the urease of *Helicobacter*

pylori. **Journal of Medical Microbiology**, v. 52, n. 3, p. 211–216, 2003.

HOULT, J. R. S.; PAYÁ, M. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: Natural products with therapeutic potential. **General Pharmacology**, v. 27, n. 4, p. 713–722, 1996.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Word Health Organization, v. 61, 1994.

IBIS, C. et al. Synthesis and biological evaluation of novel nitrogen- and sulfur-containing hetero-1,4-naphthoquinones as potent antifungal and antibacterial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 12, p. 5861–5867, 2011.

ILVER, D. et al. Helicobacter pylori adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. **Science (New York, N.Y.)**, v. 279, n. 5349, p. 373–377, 1998.

IYENGAR, B. S. et al. Mitomycin C Analogues with Increased Metal Complexing Ability. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 29, n. 9, p. 1760–1764, 1986.

JADHAV, S. G. et al. Inhibition of growth of Helicobacter pylori and its urease by coumarin derivatives: Molecular *docking* analysis. **Journal of Pharmacy Research**, v. 7, n. 8, p. 705–711, 2013.

KATSORI, A.-M.; HADJIPAVLOU-LITINA, D. Coumarin derivatives: an updated patent review (2012-2014). **Expert opinion on therapeutic patents**, v. 24, n. 12, p. 1323–47, 2014.

KAYSER, O. et al. In vitro leishmanicidal activity of monomeric and dimeric naphthoquinones. **Acta Tropica**, v. 76, n. 2, p. 131–138, 2000.

KAYSER, O.; KOLODZIEJ, H. Antibacterial activity of simple coumarins: Structural requirements for biological activity. **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, v. 54, n. 3-4, p. 169–174, 1999.

KIM, S. Y.; CHOI, D. J.; CHUNG, J.-W. Antibiotic treatment for Helicobacter pylori: Is the end coming? **World journal of gastrointestinal pharmacology and therapeutics**, v. 6, n. 4, p. 183–98, 2015.

KIRCHMAIR, J. et al. The Protein Data Bank (PDB), its related services and software tools as key components for in silico guided drug discovery. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, n. 22, p. 7021–7040, 2008.

KITAGAWA, R. R. et al. Effect of the isocoumarin paepalantine on the luminol and lucigenin amplified chemiluminescence of rat neutrophils. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 26, n. 6, p. 905–908, 2003.

KITAGAWA, R. R. et al. A new cytotoxic naphthoquinone from Paepalanthus latipes. **Chemical & pharmaceutical bulletin**, v. 52, n. 12, p. 1487–8, 2004.

KITAGAWA, R. R. et al. Ascorbic acid potentiates the cytotoxicity of the naphthoquinone 5-methoxy-3,4-dehydroxanthomegnin. **Phytochemistry**, v. 69, n. 11, p. 2205–2208, 2008.

KITAGAWA, R. R. et al. Antitumor and immunomodulatory effects of the naphthoquinone 5-methoxy-3, 4- dehydroxanthomegnin. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 6, p. 1084–1088, 2011.

KITAGAWA, R. R. et al. Anti-Helicobacter pylori activity and oxidative burst inhibition by the naphthoquinone 5-methoxy-3,4-dehydroxanthomegnin from Paepalanthus latipes. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, p. 53–59, 2012.

KITAGAWA, R. R. et al. Evaluation of mutagenicity and metabolism-mediated cytotoxicity of the naphthoquinone 5-methoxy-3,4-dehydroxanthomegnin from Paepalanthus latipes. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 25, n. 1, p. 16–21, 2015.

KOSIKOWSKA, P.; BERLICKI, L. Urease inhibitors as potential drugs for gastric and urinary tract infections: a patent review. **Expert Opin Ther Patents**, v. 21, n. 6, p. 945–957, 2011.

KOSTOVA, I. Synthetic and natural coumarins as cytotoxic agents. **Current medicinal chemistry. Anti-cancer agents**, v. 5, n. 10, p. 29–46, 2005.

KUMAGAI, H. et al. Biosynthesis of antitumor antibiotic, cytogenin. **The journal of antibiotics**, v. 47, n. 7, p. 440–446, 1994.

LALA, P. K.; CHAKRABORTY, C. Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumour progression. **The lancet oncology**, v. 2, n. 3, p. 149–156, 2001.

LARSSON, S.; BACKLUND, A.; BOHLIN, L. Reappraising a decade old explanatory model for pharmacognosy. **Phytochemistry Letters**, v. 1, n. 3, p. 131–134, 2008.

LAURIN, P. et al. Synthesis and in vitro evaluation of novel highly potent coumarin inhibitors of gyrase B. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 9, n. 14, p. 2079–2084, 1999.

MACIEL, M. A. M. et al. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Quimica Nova**, v. 25, n. 3, p. 429–438, 2002.

MAEDA, S. et al. cDNA microarray analysis of Helicobacter pylori-mediated alteration of gene expression in gastric cancer cells. **Biochemical & Biophysical Research Communications**, v. 284, n. 2, p. 443–449, 2001.

MALFERTHEINER, P. et al. Management of *Helicobacter pylori* infection—the Maastricht V/Florence Consensus Report. **Gut**, v. 66, n. 1, p. 6–30, 2017.

MARCOCCI, L. et al. The nitric oxide-scavenging properties of Ginkgo biloba extract EGb 761. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 201, n. 2, p. 748–755, 1994.

MARSHALL, B. *Helicobacter pylori*: 20 years on. **Clinical Medicine**, v. 2, n. 2, p. 147–152, 2002.

MARSHALL, B.; WARREN, J. R. Unidentified Curved Bacilli in the Stomach of Patients With Gastritis and Peptic Ulceration. **The Lancet**, v. 323, n. 8390, p. 1311–1315, 1984.

MASCELLINO, M. T.; POROWSKA, B.; ANGELIS, M. DE. Antibiotic susceptibility , heteroresistance , and updated treatment strategies in *Helicobacter pylori* infection. p. 2209–2220, 2017.

MCMILLAN, K. et al. Allosteric inhibitors of inducible nitric oxide synthase dimerization discovered via combinatorial chemistry. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 4, p. 1506–1511, 2000.

MORA-PALE M. et al. Trimer hydroxylated quinone (IIIHyQ) derived from apocynin targets cysteine residues of p47phox preventing the activation of human vascular NADPH oxidase. **Free Radic Biology and Medicine**, v. 52, n. 5, p. 962–969, 2013.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55–63, 1983.

MOSS, S. F. The Clinical Evidence Linking *Helicobacter pylori* to Gastric Cancer. **Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology**, v. 3, n. 2, p. 183–191, 2017.

MUNTANÉ, J. et al. Nitric oxide and cell death in liver cancer cells. **Mitochondrion**, v. 13, n. 3, p. 257–262, 2013.

NAITO, Y.; YOSHIKAWA, T. Molecular and cellular mechanisms involved in *Helicobacter pylori*-induced inflammation and oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 33, n. 3, p. 323–336, 2002.

NAUMANN, M.; SOKOLOVA, O. NF- κ B Signaling in Gastric Cancer. **Toxins**, v. 9, n. 4, p. 119, 2017.

NAYSMITH, B. J. et al. Pyranonaphthoquinones – isolation, biology and synthesis: an update. **Nat. Prod. Rep.**, v. 34, n. 1, p. 25–61, 2017.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 311–335, 23 mar. 2012.

O'CONNOR, A. et al. Treatment of *Helicobacter pylori* infection 2017. **Helicobacter**, v. 22, p. e12410, 2017.

OBST, B. et al. *Helicobacter pylori* causes DNA damage in gastric epithelial cells. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 6, p. 1111–1115, 2000.

OKAMOTO, T.; KOBAYASHI, T.; YOSHIDA, S. Chemical aspects of coumarin compounds for the prevention of hepatocellular carcinomas. **Current medicinal chemistry. Anti-cancer agents**, v. 5, n. 1, p. 47–51, 2005.

OLIVEIRA, A. et al. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. **Memoria do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 277–281, 2008.

O'TOOLE, P.W.; LANE, M.C.; PORWOLLIK, S. *Helicobacter pylori* motility. **Microbes and Infect**, v. 2, n. 10, p. 1207-14, 2000.

OWEN, R. J. *Helicobacter* - species classification and identification From *Campylobacter* to *Helicobacter*. **British Medical Bulletin**, v. 54, n. 1, p. 17–30, 1998.

PARSONNET, J. et al. Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative *Helicobacter pylori* infection. **Gut**, v. 40, p. 297–301, 1997.

PAYA, M. et al. Superoxide scavenging activity in leukocytes and absence of cellular toxicity of a series of coumarins. **Biochemical Pharmacology**, v. 48, n. 3, p. 445–451, 1994.

PEEK, R. M. et al. *Helicobacter pylori* strain-specific genotypes and p53-mediated pathways in modulation of the cell cycle. **cancer research**, v. 59, p. 6124–6131, 1999.

PEREIRA, E. M. et al. *Tabebuia avellaneda* naphthoquinones: activity against methicillin-resistant staphylococcal strains, cytotoxic activity and in vivo dermal irritability analysis. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, v. 5, p. 5, 2006.

PETERSON, D. A. et al. The non specificity of specific nitric oxide synthase inhibitors. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 187, n. 2, p. 797–801, 1992.

PHILLIPSON, J. D.; ANDERSON, L.A. Ethnopharmacology and western medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 25, p. 61 - 72, 1989.

PLUMMER, M. et al. Global burden of gastric cancer attributable to *Helicobacter pylori*. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 136, n. 2, p. 487-490, 2015.

POLK, D.B.; PEEK, R.M. *Helicobacter pylori*: gastric cancer and beyond. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, n. 6, p. 403 - 414, 2010.

RAHMAN, M. M.; GRAY, A. I. Antimicrobial constituents from the stem bark of *Feronia limonia*. **Phytochemistry**, v. 59, n. 1, p. 73–77, 2002.

RAMIS, I. B. et al. Polymorphisms of the IL-6, IL-8 and IL-10 genes and the risk of gastric pathology in patients infected with *Helicobacter pylori*. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, p. 4–10, 2014.

RAUCKMAN, B. S. et al. 2,4-Diamino-5-benzylpyrimidine and Analogues as Antibacterial Agents. 10. 2,4-Diamino-5-(6-quinolylmethyl)- and -[(tetrahydro-6-quinolyl)methyl]pyrimidine Derivatives. Further Specificity Studies. **Journal of medicinal chemistry**, v. 32, n. 8, p. 1927–1935, 1989.

RINCON, M. Interleukin-6: From an inflammatory marker to a target for inflammatory diseases. **Trends in Immunology**, v. 33, n. 11, p. 571–577, 2012.

SHELLER, J. et al. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1813, n. 5, p. 878–888, 2011.

SIMÕES, C. M. O et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6º Ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 2010. 1102p

SHEN, C.-Y. et al. Various Antioxidant Effects Were Attributed to Different Components in the Dried Blossoms of *Citrus aurantium* L. var. *amara* Engl. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 30, p. 6087–6092, 2 ago. 2017.

SHIBATA, J. et al. Regulation of tumour necrosis factor (TNF) induced apoptosis by soluble TNF receptors in *Helicobacter pylori* infection. p. 24–31, 1999.

SILVA, M. N. DA; FERREIRA, V. F.; SOUZA, M. C. B. V. DE. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na beta-lapachona e derivados. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 407–416, 2003.

SILVA, T. M. S. et al. Molluscicidal activity of synthetic lapachol amino and hydrogenated derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 1, p. 193–196, 2005.

SINGH, K.; GHOSHAL, U. C. Causal role of *Helicobacter pylori* infection in gastric cancer: an Asian enigma. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 12, n. 9, p. 1346–1351, 2006.

SMOOT, D. T. et al. Influence of *Helicobacter pylori* on reactive oxygen-induced gastric epithelial cell injury. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 11, p. 2091–2095, 2000.

SONG, J. et al. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cell extracts reduce colitis in mice by re-polarizing intestinal macrophages. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 9412, 25 dez. 2017.

STURROCK, A. et al. Transforming growth factor-beta1 induces Nox4 NADPH oxidase and reactive oxygen species-dependent proliferation in human pulmonary artery smooth muscle cells. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology**, v. 290, n. 290, p. 661–673, 2006.

SUBRAMANIAN, S.; FERREIRA, M. M. C.; TRSIC, M. A structure-activity relationship study of lapachol and some derivatives of 1,4-naphthoquinones against

carcinosarcoma Walker 256. **Structural Chemistry**, v. 9, n. 1, p. 47–57, 1998.

SUGANO, K. et al. Kyoto global consensus report on Helicobacter pylori gastritis. **Gut**, v. 64, p. 1353-1367, 2015.

SURAJ, R. et al. Role of a novel benzoxazine derivative in the chemosensitization of colon cancer. **Apoptosis**, v. 22, n. 8, p. 988–1000, 2 ago. 2017.

SUZUKI, H. et al. Extensive DNA damage induced by monochloramine in gastric cells. **Cancer Letters**, v. 115, n. 2, p. 243–248, 1997.

SUZUKI, H. et al. Roles of oxidative stress in stomach disorders. **J Clin Biochem Nutr.**, v. 49, n. 3, p. 174–181, 2011.

SUZUMURA, K.; YASUHARA, M.; NARITA, H. Superoxide anion scavenging properties of fluvastatin and its metabolites. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 47, n. 10, p. 1477–1480, 1999.

TAKEUCHI, O. et al. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. **Immunity**, v. 11, p. :443–451, 1999.

TALEBI, A.; ABADI, B. Strategies used by helicobacter pylori to establish persistent infection. **World Journal of Gastroenterology**, v. 23, n. 16, p. 2870–2882, 2017.

TANAKA, T.; KAWASE, M.; TANI, S. α -Hydroxyketones as inhibitors of urease. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 2, p. 501–505, 2004.

TAVARES, D. C. et al. Evaluation of the genotoxic potential of the isocoumarin paepalantine in in vivo and in vitro mammalian systems. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 68, n. 1-3, p. 115–120, 1999.

TSUTSUMI, R. et al. Attenuation of Helicobacter pylori CagA SHP-2 signaling by interaction between CagA and C-terminal Src kinase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 6, p. 3664–3670, 2003.

VARANDA, E. A. et al. Mutagenic and cytotoxic activity of an isocoumarin (paepalantine) isolated from Paepalanthus vellozioides. **Teratogenesis Carcinogenesis and Mutagenesis**, v. 17, n. 2, p. 85–95, 1997.

VERDONK, M. L. et al. Improved protein-ligand *docking* using GOLD. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 52, n. 4, p. 609–623, ago. 2003.

VILEGAS, W. et al. Isocoumarin from paepalanthus bromelioides. **Phytochemistry**, v. 29, n. 1, p. 2299-2301, 1990.

VOLLMER, W. et al. Structural and mechanistic basis of penicillin-binding protein inhibition by lactvicins. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30, n. 2, p. 565–569, 2005.

WANG, C. A. et al. Helicobacter pylori neutrophil-activating protein promotes

myeloperoxidase release from human neutrophils. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 377, n. 1, p. 52–56, 2008.

WEEKS, D. L.; SACHS, G. Sites of PH regulation of the urea channel of *Helicobacter pylori*. **Molecular Microbiology**, v. 40, n. 6, p. 1249–1259, 2001.

WHYTE, A. C. et al. Cercophorins A-C: Novel antifungal and cytotoxic metabolites from the coprophilous fungus *Cercophora areolata*. **Journal of Natural Products**, v. 59, n. 8, p. 765–769, 1996.

WILSON, K. T. et al. *Helicobacter pylori* stimulates inducible nitric oxide synthase expression and activity in a murine macrophage cell line. **Gastroenterology**, v. 111, n. 6, p. 1524–1533, 1996.

WOLKENBERG, S. E.; BOGER, D. L. Mechanisms of in situ activation for DNA-targeting antitumor agents. **Chemical Reviews**, v. 102, n. 7, p. 2477–2495, 2002.

WROBLEWSKI, L. E.; PEEK, R. M.; WILSON, K. T. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: Factors that modulate disease risk. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 4, p. 713–739, 2010.

YAMAOKA, Y. Pathogenesis of *helicobacter pylori*-related gastroduodenal diseases from molecular epidemiological studies. **Gastroenterology Research and Practice**, v. 2012, 2012.

YAMAOKA, Y.; MIFTAHUSSURUR, M. *Helicobacter pylori* virulence genes and host genetic polymorphisms as risk factors for peptic ulcer disease, **HHS Public Access**, v. 9, n. 12, p. 1–24, 2017.

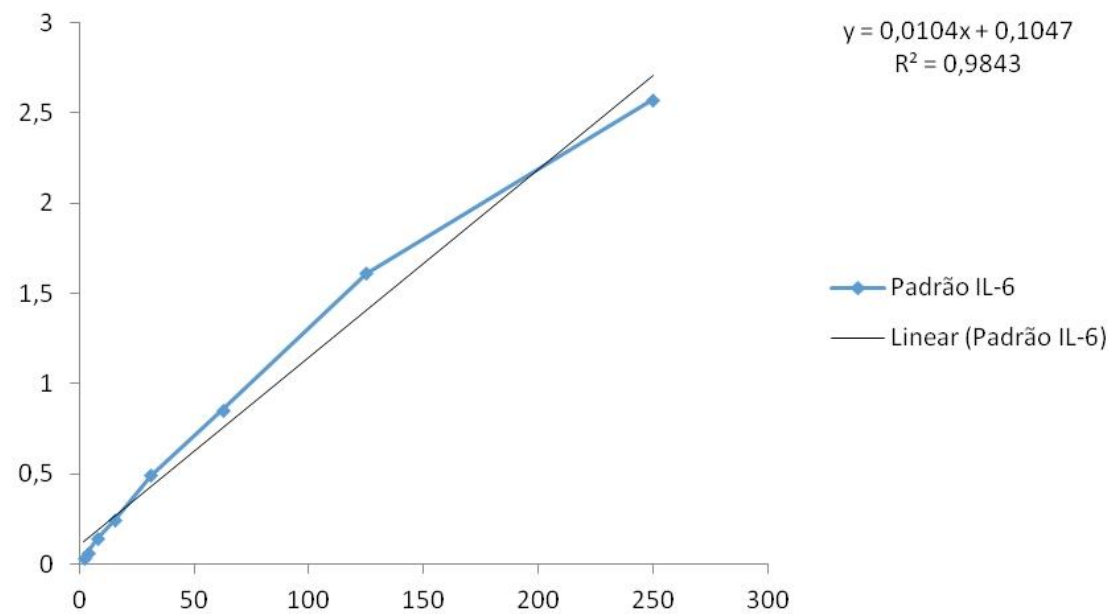
YUSUF, D. et al. An Alternative Method for the Evaluation of *Docking* Performance: RSR vs RMSD. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 48, n. 7, p. 1411–1422, 2008.

ZAKHAROVA, O. D. et al. Cytotoxicity of new polyfluorinated 1,4-naphthoquinones with diverse substituents in the quinone moiety. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 1, p. 256–260, 2011.

ZLABINGER, G. J. Mode of action of coumarin in immune cells. **Cancer Research**, v. 120, n. 8, p. 17–18, 1994.

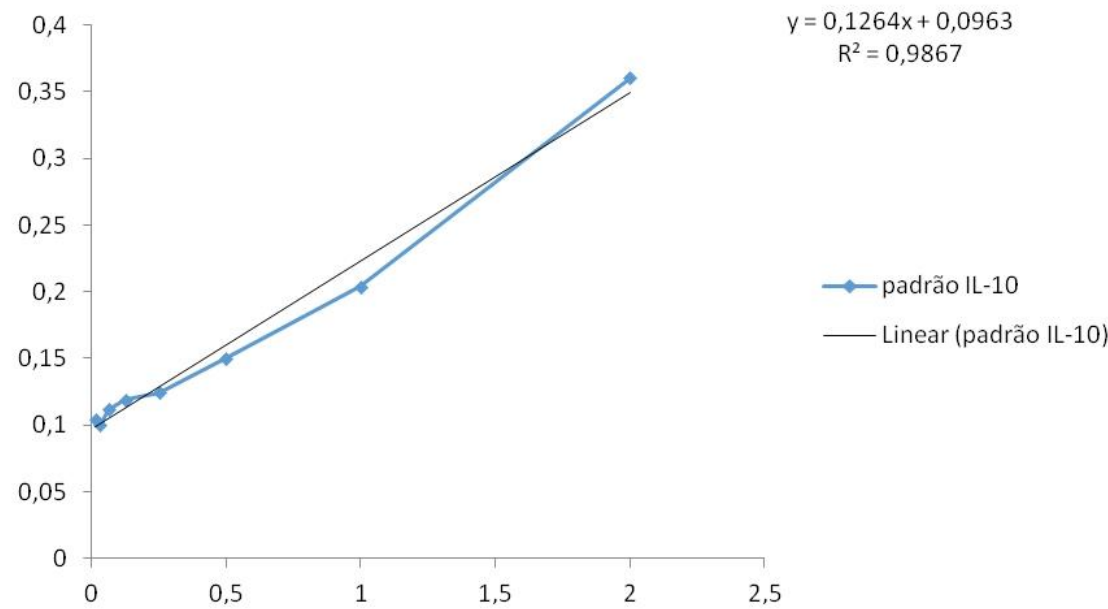
7 APÊNDICE

Padrão IL-6



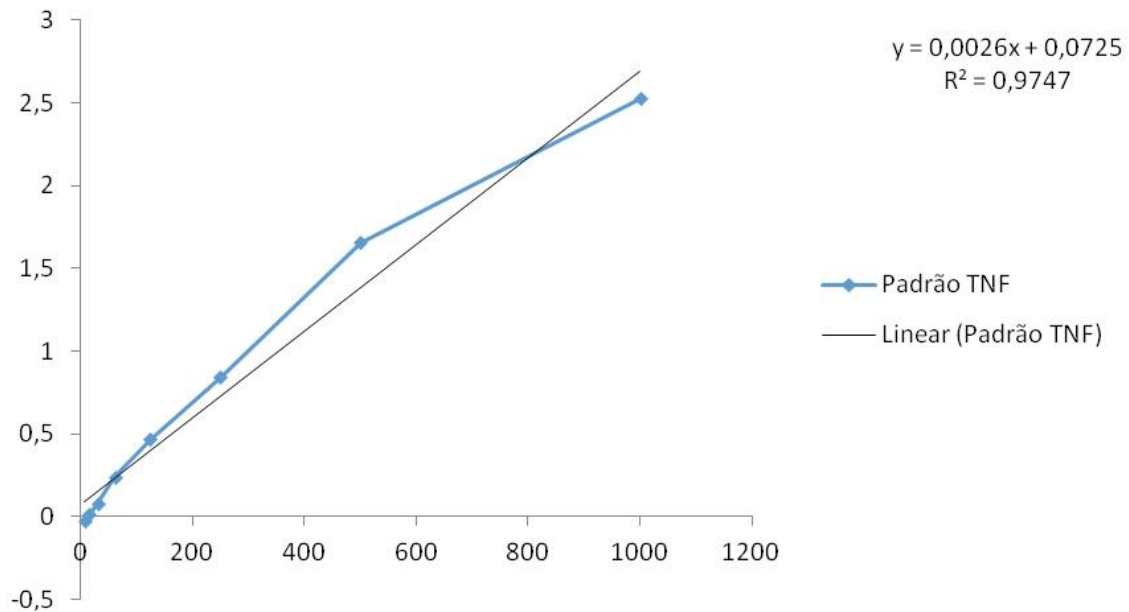
APÊNDICE A: Curva padrão IL-6

Padrão IL-10



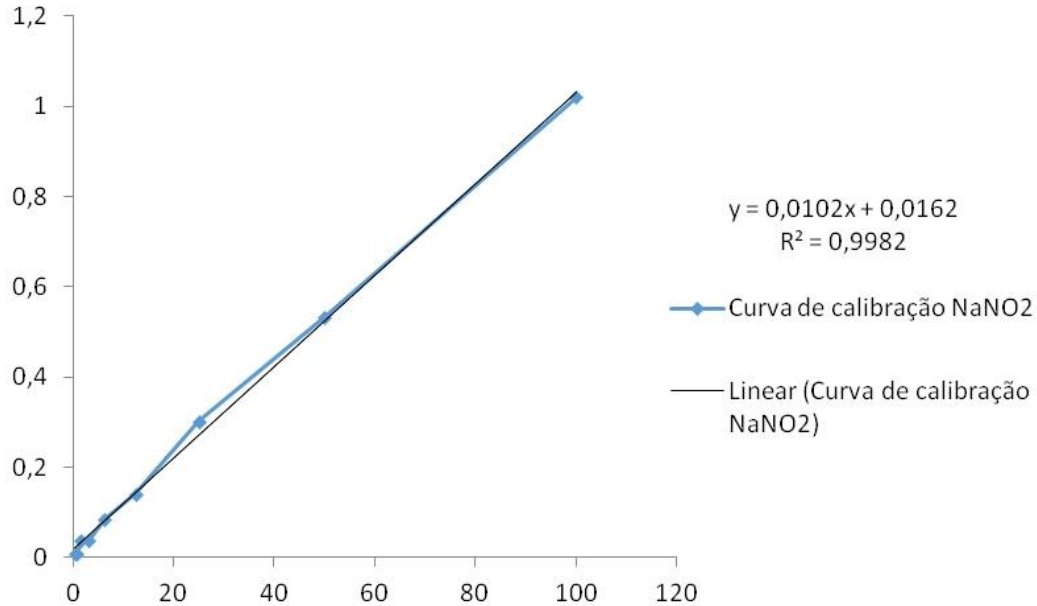
APÊNDICE B: Curva padrão IL-10

Padrão TNF



APÊNDICE C: Curva padrão TNF- α

Curva de calibração NaNO₂



APÊNDICE D: Curva de calibração NaNO₂