

**MATHEUS BRUM FELÍCIO**

**FARMACOCINÉTICA, ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA, ANTINOCICEPTIVA  
E ANTIOXIDANTE DO 2-BENZIL-1,3-DIFENIL-1,3-PROPANODIONA: UM  
ENFOQUE NA DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL E NO EDEMA DE PATA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: Marisa Alves Nogueira Diaz

Coorientadores: Fabricio Luciani Valente

Gaspar Diaz Muñoz

Leandro Licursi de Oliveira

Maria do Carmo Gouveia Pelúzio

Virginia Ramos Pizziolo

**VIÇOSA – MINAS GERAIS  
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da  
Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

F314f  
2022 Felício, Matheus Brum, 1992-  
Farmacocinética, atividade anti-inflamatória,  
antinociceptiva e antioxidante do 2-benzil-1,3-difenil-  
1,3-propanodiona: um enfoque na doença inflamatória  
intestinal e no edema de pata / Matheus Brum Felício. -  
Viçosa, MG, 2022.  
1 tese eletrônica (141 f.): il. (algumas color.).

Inclui anexos.

Inclui apêndices.

Orientador: Marisa Alves Nogueira Diaz.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular,  
2022.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.751>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Agentes antiinflamatórios. 2. Estresse oxidativo.  
3. Edema. 4. Intestinos - Doenças. I. Diaz, Marisa Alves  
Nogueira, 1960-. II. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.  
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada.  
III. Título.

CDD 22. ed. 615.329


**MATHEUS BRUM FELÍCIO**

**FARMACOCINÉTICA, ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA, ANTINOCICEPTIVA  
E ANTIOXIDANTE DO 2-BENZIL-1,3-DIFENIL-1,3-PROPANODIONA: UM  
ENFOQUE NA DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL E NO EDEMA DE PATA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.


APROVADA: 31 de agosto de 2022.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente  
 MATHEUS BRUM FELICIO  
Data: 12/12/2022 16:55:45-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

---

Matheus Brum Felício  
Autor

Documento assinado digitalmente  
 MARISA ALVES NOGUEIRA DIAZ  
Data: 12/12/2022 16:27:43-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

---

Marisa Alves Nogueira Diaz  
Orientadora

*Dedico esse trabalho a todas as pessoas  
que fizeram parte da construção dele e a todos  
os quais ele, de alguma forma, poderá ajudar.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a minha orientadora, a professora Marisa Alves Nogueira Diaz, pela confiança em me deixar conduzir uma pesquisa tão importante como essa, pelo carinho, compreensão, conselhos, respeito e por todos os ensinamentos durante esse período de convivência e construção deste trabalho.

Agradeço minha comissão orientadora, os professores Gaspar Diaz Muñoz, Leandro Licursi de Oliveira, Maria do Carmo Gouveia Pelúzio e Virgínia Ramos Pizzolo, por todos os ensinamentos, conselhos e direcionamentos durante o período de construção deste trabalho.

Agradeço ao Laboratório de Química e Bioquímica de Produtos Naturais (BioNat) e as minhas companheiras de laboratório Fernanda, Marcela, Mariá, Gislaine e Mayra por todo auxílio durante os experimentos, bate-papos e risadas durante esses anos.

Agradeço ao Laboratório de Bioquímica Nutricional, ao Laboratório de Nutrição Experimental, ao Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Agentes Infecciosos e Parasitários, ao Laboratório de Imunoquímica e Glicobiologia, ao Laboratório Biofármacos e ao Núcleo de Análises Biomoléculas pela possibilidade de realizar os experimentos e análises desenvolvidas nesse trabalho.

Agradeço a Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada (PPGBQA) pela estrutura de ensino e pesquisa que me foi fornecida.

Agradeço as agências de fomento, em especial à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos que me possibilitou realizar esse trabalho.

Por último, mas não menos importante, agradeço a minha família e meus amigos pelo apoio, carinho e momentos felizes que sempre me auxiliaram nessa caminhada.

## RESUMO

FELÍCIO, Matheus Brum, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2022. **Farmacocinética, atividade anti-inflamatória, antinociceptiva e antioxidante do 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona: um enfoque na doença inflamatória intestinal e no edema de pata.** Orientadora: Marisa Alves Nogueira Diaz. Coorientadores: Fabricio Luciani Valente, Gaspar Diaz Muñoz, Leandro Licursi de Oliveira, Maria do Carmo Gouveia Pelúzio e Virginia Ramos Pizziolo.

Dada a etiologia complexa das doenças inflamatórias, o desenvolvimento de estratégias terapêuticas com diferentes mecanismos de ação se torna importantíssimo. Por isso, esse trabalho buscou determinar a farmacocinética e a atividade anti-inflamatória, antinociceptiva e antioxidante de um derivado sintético do dibenzoilmetano (DBM), o 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona (DPBP) com enfoque na doença inflamatória intestinal e no edema de pata. A síntese do composto DPBP foi realizada por meio de uma reação de alquilação utilizando-se DBM como composto de partida. A mistura reacional foi agitada vigorosamente durante 144h, filtrada, o resíduo obtido da evaporação do solvente foi purificado em cromatografia de camada delgada e a identificação do DPBP foi realizada por ressonância magnética nuclear. A atividade farmacocinética foi avaliada pela administração do DPBP pelas vias intraperitoneal e transdérmica. A atividade anti-inflamatória foi avaliada pela indução do edema de pata com formalina e da concentração tecidual de citocinas anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10) e pró-inflamatórias (IFN- $\gamma$ ), a atividade antinociceptiva foi avaliada pelo tempo que os animais passaram lambendo, sacudindo ou mordendo a pata e pelas contorções abdominais induzidas por injeção peritoneal de ácido acético. A atividade antioxidante foi avaliada pela atividade de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione S-transferase (GST), pela concentração tecidual de malondialdeído (MDA) e óxido nítrico (NO). Após a administração do DPBP por via transdérmica ou intraperitoneal foi possível detectá-lo no soro dos animais por até 12 horas e a passagem do composto pelo fígado aconteceu tardiamente quando administrado na cavidade intraperitoneal e inicialmente quando administrado pela rota transdérmica. O DPBP administrado pela via transdérmica demonstrou atividade antioxidante reduzindo a concentração tecidual de óxido nítrico no intestino delgado de animais com doença inflamatória intestinal, no entanto, não apresentou capacidade de melhorar a arquitetura intestinal destes animais. A administração por via intraperitoneal reduziu o edema de pata e o tempo que os animais passaram lambendo, sacudindo ou mordendo as patas após indução da inflamação e dor pela injeção de formalina, reduziu as contorções abdominais

induzidas por ácido acético e reduziu a infiltração de células de defesa na pata dos animais. Além disso, foi capaz de aumentar a produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-4 e IL-10 e aumentar a atividade de enzimas de defesa antioxidante como SOD e GST. Dessa forma, os resultados apresentados levam a concluir que o DPBP possui atividade anti-inflamatória, antinociceptiva e antioxidante, o que o torna um importante candidato a fármaco para tratamento da inflamação e seus sintomas.

Palavras-chave: Dibenzoilmetano. Beta-dicetonas. Inflamação. Fármacos anti-inflamatórios. Estresse oxidativo.

## ABSTRACT

FELÍCIO, Matheus Brum, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2022. **Pharmacokinetics, anti-inflammatory, antinociceptive and antioxidant activity of 2-benzyl-1,3-diphenyl-1,3-propanodione: a focus on inflammatory bowel disease and paw edema.** Adviser: Marisa Alves Nogueira Diaz. Co-advisers: Fabricio Luciani Valente, Gaspar Diaz Muñoz, Leandro Licursi de Oliveira, Maria do Carmo Gouveia Pelúzio and Virginia Ramos Pizziolo.

Given the complex etiology of inflammatory diseases, the development of therapeutic strategies with different mechanisms of action becomes extremely important. Therefore, this work aimed to determine the pharmacokinetics and anti-inflammatory, antinociceptive and antioxidant activity of a synthetic derivative of dibenzoylmethane (DBM), 1,3-diphenyl-2-benzyl-1,3-propanedione (DPBP) with a focus on inflammatory disease bowel and paw edema. The synthesis of the DPBP compound was carried out through an alkylation reaction using DBM as the starting compound. The reaction mixture was stirred vigorously for 144h, filtered, the residue obtained from solvent evaporation was purified by thin-layer chromatography and the identification of DPBP was carried out by nuclear magnetic resonance. Pharmacokinetic activity was assessed by intraperitoneal and transdermal administration of DPBP. Anti-inflammatory activity was evaluated by formalin-induced paw edema and tissue concentration of anti-inflammatory (IL-4 and IL-10) and pro-inflammatory (IFN- $\gamma$ ) cytokines, antinociceptive activity was evaluated by the time the animals spent licking, shaking or biting the paw and by the abdominal writhing induced by peritoneal injection of acetic acid. Antioxidant activity was evaluated by the activity of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione s-transferase (GST), by tissue concentration of malondialdehyde (MDA) and nitric oxide (NO). After transdermal or intraperitoneal administration of DPBP, it was possible to detect stable serum concentrations for up to 12 hours and the passage of the compound through the liver occurred late when administered in the intraperitoneal cavity and initially when administered by the transdermal route. DPBP administered by the transdermal route demonstrated antioxidant activity by reducing tissue concentration of nitric oxide in the small intestine of animals with inflammatory bowel disease, however, it did not show the ability to improve the intestinal architecture of these animals. Intraperitoneal administration of DPBP reduced paw edema and the time animals spent licking, shaking, or biting the paws after formalin-induced inflammation and pain, reduced the acetic acid-induced abdominal writhing as well, and reduced cell infiltration of defense in the animal's paw. Furthermore, DPBP was

able to increase the production of anti-inflammatory cytokines such as IL-4 and IL-10 and increase the activity of antioxidant defense enzymes such as SOD and GST. Thus, the results presented lead to the conclusion that DPBP has anti-inflammatory, antinociceptive and antioxidant activity, which makes it an important drug candidate for the treatment of inflammation and its symptoms.

**Keywords:** Dibenzoylmethane. Beta-diketones. Inflammation. Anti-inflammatory agents. Oxidative stress.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### CAPÍTULO 1

- Figura 1. Fluxograma de identificação e seleção de artigos incluídos nesta revisão sistemática. .... 30
- Figura 2. Estruturas químicas do dibenzoilmetano e seus derivados sintéticos. .... 32
- Figura 3. Resumo dos riscos de viés de acordo com os julgamentos dos autores. .... 40

### CAPÍTULO 2

- Figura 1. Cromatografia de camada delgada (CCD) da síntese do derivado de dibenzoilmetano P: dibenzoilmetano (DBM); composto alquilado (DPBP). .... 56
- Figura 2. Concentração sérica do 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona após sua administração por via intraperitoneal (A) e transdérmica (B). .... 61
- Figura 3. Concentração hepática do 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona após sua administração por via intraperitoneal (A) e transdérmica (B). .... 62
- Figura 4. Proposta de metabolização do dibenzoilmetano (DBM) por microsossomos hepáticos de ratos. (Adaptado de Lin et al., 2005). .... 63
- Figura 5. Primeira proposta de metabolização do 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona (DPBP) por microsossomos hepáticos de ratos. .... 64
- Figura 6. Segunda proposta de metabolização do 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona (DPBP) por microsossomos hepáticos de ratos. .... 64

### CAPÍTULO 3

- Figura 1. Ganho de peso dos animais durante o tratamento por 28 dias com gel transdérmico contendo dibenzoilmetano (DBM) ou 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona (DPBP). .... 75
- Figura 2. Índice de massa corporal dos animais durante o tratamento por 28 dias com gel transdérmico contendo dibenzoilmetano (DBM) ou 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona (DPBP). .... 75
- Figura 3. Peso dos intestinos dos animais durante o tratamento por 28 dias com gel transdérmico contendo dibenzoilmetano (DBM) ou 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona (DPBP). A) peso do ceco; b) peso do cólon; C) peso do intestino delgado. .... 76
- Figura 4. Proposta de atividade ativadora de enzimas de detoxificação de fase II do 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona (DPBP). .... 78

Figura 5. Efeito do tratamento com gel transdérmico contendo dibenzoilmetano (DBM) ou 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona (DPBP) durante 28 dias na quantificação tecidual das enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) e do óxido nítrico (NO) no intestino delgado. ....	79
Figura 6. Efeito do tratamento com gel transdérmico contendo dibenzoilmetano (DBM) ou 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona (DPBP) durante 28 dias na quantificação tecidual das enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) e do óxido nítrico (NO) no cólon....	80
Figura 7. Medidas histomorfométricas do ceco de animais tratados com gel transdérmico contendo dibenzoilmetano. A) altura da camada muscular ( $\mu\text{m}$ ); B) altura do epitélio na cripta ( $\mu\text{m}$ ); C) diâmetro da cripta ( $\mu\text{m}$ ); D) diâmetro da lâmina própria ( $\mu\text{m}$ ); E) profundidade da cripta ( $\mu\text{m}$ ).....	82
Figura 8. Medidas histomorfométricas do cólon de animais tratados com gel transdérmico contendo dibenzoilmetano. A) altura da camada muscular ( $\mu\text{m}$ ); B) altura do epitélio na cripta ( $\mu\text{m}$ ); C) diâmetro da cripta ( $\mu\text{m}$ ); D) diâmetro da lâmina própria ( $\mu\text{m}$ ); E) profundidade da cripta ( $\mu\text{m}$ ).....	83
Figura 9. Medidas histomorfométricas do intestino delgado de animais tratados com gel transdérmico contendo dibenzoilmetano. A) altura da camada muscular ( $\mu\text{m}$ ); B) altura do epitélio na vilosidade ( $\mu\text{m}$ ); C) altura do epitélio na cripta ( $\mu\text{m}$ ); D) diâmetro da cripta ( $\mu\text{m}$ ); E) diâmetro da vilosidade ( $\mu\text{m}$ ); F) altura da vilosidade ( $\mu\text{m}$ ).....	84
Figura 10. Medidas histomorfométricas do ceco de animais tratados com gel transdérmico contendo 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona (DPBP). A) altura da camada muscular ( $\mu\text{m}$ ); B) altura do epitélio na vilosidade ( $\mu\text{m}$ ); C) altura do epitélio na cripta ( $\mu\text{m}$ ); D) diâmetro da cripta ( $\mu\text{m}$ ); E) diâmetro da vilosidade ( $\mu\text{m}$ ); F) altura da vilosidade ( $\mu\text{m}$ ). ....	86
Figura 11. Medidas histomorfométricas do cólon de animais tratados com gel transdérmico contendo 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona (DPBP). A) altura da camada muscular ( $\mu\text{m}$ ); B) altura do epitélio na vilosidade ( $\mu\text{m}$ ); C) altura do epitélio na cripta ( $\mu\text{m}$ ); D) diâmetro da cripta ( $\mu\text{m}$ ); E) diâmetro da vilosidade ( $\mu\text{m}$ ); F) altura da vilosidade ( $\mu\text{m}$ ). ....	87
Figura 12. Medidas histomorfométricas do intestino delgado de animais tratados com gel transdérmico contendo 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona (DPBP). A) altura da camada muscular ( $\mu\text{m}$ ); B) altura do epitélio na vilosidade ( $\mu\text{m}$ ); C) altura do epitélio na cripta; D) diâmetro da cripta ( $\mu\text{m}$ ); E) diâmetro da vilosidade ( $\mu\text{m}$ ); F) altura da vilosidade ( $\mu\text{m}$ ). ....	88
Figura 13. Histologia representativa das seções do intestino delgado, cólon e ceco dos animais tratados com gel transdérmico contendo dibenzoilmetano ou 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona durante 28 dias.....	89

## CAPÍTULO 4

Figura 1. Efeito do dibenzoilmetano (DBM) e do 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona

(DPBP) nas fases inicial (A) e tardia (B) da dor induzida por injeção intraplantar de formalina em camundongos. ....	108
Figura 2. Efeito do 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona (DPBP) em contorções abdominais induzidas por injeção intraperitoneal de ácido acético em camundongos. ....	109
Figura 3. Quantificação de citocinas teciduais 3h após tratamento com 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona. ....	110
Figura 4. Efeito do dibenzoilmetano (DBM) e do 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona (DPBP) nos marcadores do estresse oxidativo: a) Catalase (CAT); b) Superóxido dismutase (SOD); c) Óxido Nítrico (NO); d) Malondialdeído (MDA); e) Glutathione s-transferase (GST). ....	111
Figura 5. Efeito do dibenzoilmetano (DBM) e do 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona (DPBP) na distância entre a epiderme e músculo.....	112
Figura 6. Histologia das patas dos animais 24h depois da indução da inflamação com formalina. ....	113

## APÊNDICES

Figura 1. Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	123
Figura 2. Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) expansão. ....	124
Figura 3. Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) expansão. ....	125
Figura 4. Espectro de RMN <sup>13</sup> C (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	126
Figura 5. Espectro de RMN <sup>13</sup> C (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) expansão.....	127
Figura 6. Espectro de DEPT 135 (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	128
Figura 7. Espectro de DEPT 135 (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) expansão.....	129
Figura 8. Cromatograma UPLC-MS/MS da 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona (íon: 105). ....	130
Figura 9. Cromatograma UPLC-MS/MS da 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona (íon: 91). ....	131
Figura 10. Cromatograma UPLC-MS/MS da 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona (íon: 77). ....	132
Figura 11. Cromatograma UPLC-MS/MS do plasma dos animais controle negativo (íon: 105). ....	133
Figura 12. Cromatograma UPLC-MS/MS do plasma dos animais que receberam 2-benzil-1,3-	

difenil-1,3-propanodiona por via intraperitoneal (íon: 105). .....	134
Figura 13. Cromatograma UPLC-MS/MS do plasma dos animais que receberam 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona por via transdérmica (íon: 105).....	135
Figura 14. Cromatograma UPLC-MS/MS do fígado dos animais controle negativo (íon: 105). .....	136
Figura 15. Cromatograma UPLC-MS/MS do fígado dos animais que receberam 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona por via intraperitoneal (íon: 105). .....	137
Figura 16. Cromatograma UPLC-MS/MS do fígado dos animais que receberam 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona por via transdérmica (íon: 105).....	138

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

Tabela 1. Evidências *in vivo* dos efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios do dibenzoilmetano e seus derivados. .... 41

Tabela 2. Evidências *in vitro* dos efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios do dibenzoilmetano e seus derivados. .... 42

### CAPÍTULO 3

Tabela 1. Principais características das doenças inflamatórias intestinais. .... 68

### CAPÍTULO 4

Tabela 1. Efeito anti-inflamatório da 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona e do dibenzoilmetano contra o edema de pata induzido por formalina em ratos. .... 108

Tabela 2. Avaliação semiquantitativa da presença de células de defesa nas patas dos ratos. 112

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A293	tipo de linhagem celular imortalizada
A549	tipo celular de carcinoma de pulmão
AA	ácido araquidônico
ARE	elemento de resposta antioxidante
CaCo2	linhagem celular imortalizada de adenocarcinoma colorretal humano
CAT	catalase
CCD	cromatografia de camada delgada
CCl <sub>4</sub>	tetracloroeto de carbono
COX-1	enzima cicloxigenase 1
COX-2	enzima cicloxigenase 2
CU	colite ulcerativa
DBM	dibenzoilmetano
DC	Doença de Crohn
DII	doença inflamatória intestinal
DNA	ácido desoxiribonucleio
DPBP	2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona
ERN	espécies reativas de nitrogênio
ERO	espécies reativas de oxigênio
GPCR	receptor acoplado a proteína G
GSH	glutationa
GST	glutationa s-transferase
HEK-293	tipo celular de rim embrionário humano
HETE	ácido hidroxieicosatetraenóico
HO-1	heme oxigenase-1
IFN- $\gamma$	interferon gama
IL-10	interleucina dez
IL10 <sup>-/-</sup>	knockout de interleucina 10
IL-12	interleucina doze
IL-13	interleucina treze
IL-17	interleucina dezessete
IL-1 $\beta$	interleucina um beta

IL-4	interleucina quatro
IL-6	interleucina seis
iNOS	óxido nítrico sintase induzível
KBM-5	tipo celular de leucemia
Keap 1	proteína 1 associada a ECH do tipo Kelch
LC-MS	sistema de cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas
LOX	enzimas lipo-oxigenases
LPS	lipopolissacarídeo
MCP-1	proteína quimioatrativa de monócitos 1
MDA	malondialdeído
MES-13	tipo celular de células mesengúal
NF-κB	fator nuclear kappa B
NO	óxido nítrico
NOS	óxido nítrico sintases
Nrf2	fator nuclear eritroide 2
PAMP	padrões moleculares associados a patógenos
PBS	tampão fosfato salino
PGD <sub>2</sub>	prostaglandina D2
PGE <sub>2</sub>	prostaglandina E2
PGF <sub>2</sub>	prostaglandina F2
PLA <sub>2</sub>	fosfolipase A dois
PMA	acetato de forbolmiristato
RAW264.7	tipo celular de macrófagos
RMN	ressonância magnética nuclear
SH-SY5Y	tipo celular de neuroblastoma humano
SOD	superóxido dismutase
THP-1	tipo celular de monócitos humanos
TNF-α	fator de necrose tumoral alfa
UPLC/MS-MS	sistema de cromatografia líquida de ultra performance acoplado ao espectrômetro de massas

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	17
CAPÍTULO 1 .....	24
1. INTRODUÇÃO.....	27
2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	28
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	31
4. CONCLUSÃO .....	45
5. REFERÊNCIAS .....	46
CAPÍTULO 2 .....	53
1. INTRODUÇÃO.....	54
2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	55
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	60
4. CONCLUSÃO .....	65
5. REFERÊNCIAS .....	66
CAPÍTULO 3 .....	68
1. INTRODUÇÃO.....	69
2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	71
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	74
4. CONCLUSÃO .....	90
5. REFERÊNCIAS .....	91
CAPÍTULO 4 .....	94
1. INTRODUÇÃO.....	95
2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	96
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	101
4. CONCLUSÃO .....	115
5. REFERÊNCIAS .....	116
CONCLUSÃO GERAL.....	121
APÊNDICES .....	122
ANEXOS .....	139

## INTRODUÇÃO GERAL

### 1. Desafios da descoberta e desenvolvimento de novos medicamentos

O caminho entre o descobrimento, desenvolvimento, aprovação e comercialização de um medicamento é longo, oneroso e passível de falhas. Os custos para se desenvolver um único medicamento podem chegar a até US\$ 2,0 bilhões e pode demorar mais de uma década até que seja finalizado. A fase mais cara do desenvolvimento de medicamentos é a fase dos ensaios clínicos, onde cerca de 50% dos valores investidos são gastos. As taxas de sucesso entre as fases são variáveis, no entanto, apenas 10% dos compostos que iniciam os ensaios clínicos chegam até a fase regulatória (IO, 2018; HARRER et al., 2019; SCHLANDER et al., 2021).

Os custos com as falhas no desenvolvimento de medicamentos envolvem valores consideráveis que podem variar entre US\$ 800 milhões a US\$ 1,4 bilhões (HARRER et al., 2019). Por isso, a indústria farmacêutica, em especial o setor de pesquisa e desenvolvimento, está constantemente buscando estratégias para reduzir os custos e acelerar o todo o processo de desenvolvimento e aprovação de fármacos que sejam realmente promissores. É notável que para atingir esse objetivo existe uma transição dos métodos utilizados para descobrimento e desenvolvimento de medicamentos (BERDIGALIYEV; ALJOFAN, 2020).

Historicamente, a descoberta de medicamentos dependia apenas de produtos naturais como fonte primária de agentes terapêuticos e sua utilização acontecia na forma de plantas inteiras, misturas ou extratos vegetais. As plantas medicinais ainda são uma valiosa fonte de moléculas candidatas a agentes terapêuticos e, evidentemente, várias patologias foram relatadas como tendo sido tratadas com sucesso com formulações naturais ou de origem natural (NEWMAN; CRAGG, 2016). No entanto, por meio dos avanços no processos de identificação, isolamento e purificação de compostos de origem vegetal, dedicou-se atenção a utilização de compostos ativos purificados (THOMFORD et al., 2018; DAVISON; BRIMBLE, 2019).

A pesquisa de novos candidatos a medicamentos a partir de produtos naturais é muitas vezes dificultada pela complexidade das misturas moleculares presentes nessas matrizes. Em geral, a atividade terapêutica dos extratos vegetais acontece por causa da ação sinérgica e simultânea de vários compostos químicos. Dada a natureza complexa desses extratos, não é surpreendente que, em alguns casos, a descoberta de medicamentos à base de um único composto isolado falhe em fornecer o efeito biológico observado pelos extratos (LI; WENG, 2017). O avanço da ciência e da tecnologia ajudou a mudar o foco da descoberta de medicamentos do tradicional processo de descoberta como o uso de plantas medicinais para a

síntese de pequenas moléculas, com relativa estabilidade química e de fácil caracterização de reatividade (THOMFORD et al., 2018)

Nas últimas décadas, percebe-se que a modernização e incorporação de tecnologias computacionais, como a inteligência artificial, e analíticas, como a genômica, proteômica e metabolômica estão contribuindo na triagem e tomada de decisão dos candidatos a agentes terapêuticos que serão testados. Isso se deve principalmente pela possibilidade de predição da atividade, segurança, farmacocinética e toxicidade das moléculas estudadas (THOMFORD et al., 2018; HARRER et al., 2019).

Uma das metodologias aplicadas pela indústria farmacêutica nas fases iniciais dos trabalhos para descobrimento de novos medicamentos é a utilização de um modelo de triagem de fármacos de alto rendimento com base em bibliotecas de moléculas pequenas. O objetivo dessa técnica é efetuar o rastreamento de forma sistemática da atividade de milhares de compostos de baixo peso molecular que modulem algum alvo ou processo biológico, possibilitando analisar as respostas celulares a um fármaco experimental (HO et al., 2012; SANTOS et al., 2017).

Já os métodos de planejamento de fármacos auxiliado por computadores envolvem dois tipos de abordagens: as baseadas na estrutura 3D do alvo terapêutico e as baseadas no ligante (SLIWOSKI et al., 2014) O método baseado na estrutura analisa a estrutura do alvo biológico e identifica os sítios importantes para sua função biológica. Em seguida, *softwares* computacionais auxiliam no desenvolvimento de compostos capazes de interagir com o alvo identificado com o intuito de afetar sua função biológica. Por outro lado, o método baseado no ligante, avalia as propriedades físico-químicas dos ligantes conhecidos para, em seguida, fornecer diferentes opções de novos ligantes com a atividade desejada. Essas técnicas fornecem modelos de compostos com alta probabilidade de serem ativos e com melhores propriedades de absorção, distribuição, metabolismo e toxicidade ((BAJORATH, 2016; ABDOLMALEKI et al., 2017). Dessa forma, podem ser utilizadas até mesmo antes da triagem virtual para filtrar compostos em grandes bibliotecas de moléculas pequenas, reduzindo o número de compostos a serem sintetizados e testados e, conseqüentemente, as despesas com os experimentos (FAVER et al., 2013; MACALINO et al., 2015; OPREA; OVERINGTON, 2015)

O reaproveitamento ou reposicionamento de fármacos também aparece como uma estratégia promissora utilizada pela indústria farmacêutica na intenção de reduzir os custos e o tempo para o desenvolvimento de um medicamento. Essa alternativa consiste na descoberta de novas indicações farmacêuticas para medicamentos já comercializados, reduzindo o tempo de

desenvolvimento de um novo fármaco e todos os custos associados a isso (XUE et al., 2018; GNS et al., 2019; PUSHPAKOM et al., 2019) A descoberta do novo uso terapêutico pode acontecer por acaso, fruto das observações de efeitos colaterais após comercialização dos medicamentos ou utilizando abordagens sistemáticas, como as experimentais ou computacionais (PARVATHANENI et al., 2019).

Alguns medicamentos como o sildenafil, inicialmente desenvolvido para hipertensão, mas atualmente utilizado para o tratamento da disfunção erétil e o metformina, prescrito para o tratamento da diabetes e atualmente prescrito também para tratamento dos sintomas associados a síndrome do ovário policístico são exemplos da aplicação dessa estratégia (ALJOFAN; GAIPOV, 2019; ALJOFAN; RIETHMACHER, 2019; BOOLELL et al., 1996). A combinação dessas tecnologias permite que a indústria farmacêutica descubra, desenvolva e produza medicamentos gastando menos e economizando tempo.

## 2. Vias alternativas de administração de medicamentos anti-inflamatórios

A inflamação é uma resposta imune essencial a estímulos nocivos, como patógenos e danos celulares. Sua principal função é eliminar os agentes agressores e estimular a homeostase tecidual (MEDZHITOV, 2010). Contudo, quando o processo inflamatório não é controlado e a inflamação persiste de uma forma crônica, pode resultar numa série de doenças como artrite reumatóide (ARAKI; MIMURA, 2016), doença inflamatória intestinal (SOUFLI et al., 2016), aterosclerose (STEVEN et al., 2019), Alzheimer, entre outras (HEPPNER; RANSOHOFF; BECHER, 2015).

Atualmente, uma série de medicamentos estão disponíveis para o tratamento da inflamação. A ação desses medicamentos envolve uma diversidade de mecanismos de ação, mas o principal mecanismo utilizado é baseado na inibição da atividade das enzimas cicloxigenases 1 e 2 (COX-1 e COX-2), resultando na redução da produção tecidual de prostaglandinas e conseqüentemente da inflamação e dor. Outros mecanismos de ação também são descritos como as terapias anticitocinas, utilizando-se agentes terapêuticos que reduzem a atividade de citocinas específicas ou de seus receptores; e a inibição da migração de células para o tecido inflamado pela redução da diferenciação celular e produção de moléculas de adesão (DINARELLO, 2010; BRUNE; PATRIGNANI, 2015).

A via de administração oral têm sido a principal rota de entrega de medicamentos com ação terapêutica anti-inflamatória. Essa via de administração apresenta vantagens por ser de fácil administração, pouco invasiva e amplamente aceita pelos pacientes. No entanto, é uma via

que apresenta uma série de limitações que, em alguns casos, fazem com que sua utilização não seja recomendada (HOMAYUN; LIN; CHOI, 2019). Apesar de sua eficácia em graus variados, a utilização crônica desses medicamentos apresentam efeitos colaterais indesejáveis, como sangramento gastrointestinal, lesões hepática e/ou renais e risco cardiovascular (WONGRAKPANICH et al., 2018; AL-AZAYZIH et al., 2020; GUO; LEUNG, 2020).

Vias alternativas para a administração de medicamentos anti-inflamatórios têm sido estudadas e melhoradas. Dentre elas, destaca-se a via transdérmica, que utiliza a pele como porta de entrada de medicamentos até a corrente sanguínea em uma taxa predeterminada e controlada. Existem três formas em que as medicamentos podem penetrar de forma intacta a camada estrato córneo e chegar até a circulação sistêmica, sendo: 1) permeação através das glândulas sudoríparas ou através dos folículos pilosos; 2) permeação intercelular; 3) permeação intracelular, passando pelos corneócitos (KOTLA et al., 2017; RABIEI et al., 2020). As propriedades físico-químicas da molécula administrada e a composição do gel transdérmico vão determinar por qual rota ela será permeada (IACHINA et al., 2019).

Fatores como integridade da pele, idade, hidratação, temperatura e pH da pele podem afetar o sucesso da utilização dessa rota de administração, no entanto, pode-se elencar as seguintes vantagens para utilização da via transdérmica: 1) evita a absorção gastrointestinal e as dificuldades causadas pelo pH gastrointestinal, atividade enzimática e interações medicamentosas com alimentos, bebidas e outros medicamentos administradas por via oral; 2) podem substituir a administração oral de medicação quando essa via é inadequada, como em casos de vômitos e diarreia; 3) evitam o efeito do metabolismo de primeira passagem, já que não acontece a passagem do fármaco pela circulação portal após absorção gastrointestinal, possivelmente evitando sua inativação enzimática por via digestiva e hepática; 4) fornecem a opção de uma terapia estendida com uma única aplicação, melhorando a adesão em relação a outras formas que exigem administração de doses mais frequentes; 5) a terapia medicamentosa pode ser interrompida rapidamente pela remoção de sua aplicação da superfície da pele (RASTOGI; YADAV, 2012; CHEN et al., 2021; DENG; LIU, 2021).

Alguns medicamentos anti-inflamatórios não esteroidais como cetoprofeno, piroxicam, diclofenaco, ibuprofeno, indometacina, etofenamato, felbinac e ácido flufenâmico já vêm sendo utilizados no tratamento local da inflamação e dor e têm demonstrado serem uma alternativa bastante promissora a utilização da via oral, principalmente por reduzir os efeitos adversos do uso crônico desses medicamentos (BARKIN, 2015; LEPPERT et al., 2018). Mais pesquisas envolvendo a descoberta, desenvolvimento e eficácia de novos anti-inflamatórios são

necessárias e é nesse sentido, que a presente tese teve como objetivo avaliar a farmacocinética e atividade anti-inflamatória, antinociceptiva e antioxidante do 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona (DPBP) por via transdérmica e intraperitoneal.

### 3. Referências

ABDOLMALEKI, A; GHASEMI, J. B.; GHASEMI, F. Computer Aided Drug Design for Multi-Target Drug Design: SAR /QSAR, Molecular Docking and Pharmacophore Methods. **Curr Drug Targets**, n. 18, v. 5, p. 556-575, 2017.

AL-AZAYZIH, A. et al. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs Utilization Patterns and Risk of Adverse Events due to Drug-Drug Interactions among Elderly Patients: A Study from Jordan. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 28, n. 4, p. 504–508, abr. 2020.

ALJOFAN, M.; GAIPOV, A. Metformin: A stroke of luck. **Electronic Journal of General Medicine**, v. 16, n. 3, p. em143, 16 maio 2019.

ALJOFAN, M.; RIETHMACHER, D. Anticancer activity of metformin: a systematic review of the literature. **Future Science OA**, v. 5, n. 8, p. FSO410, 1 set. 2019.

ARAKI, Y.; MIMURA, T. The Mechanisms Underlying Chronic Inflammation in Rheumatoid Arthritis from the Perspective of the Epigenetic Landscape. **Journal of Immunology Research**, v. 2016, p. 1–10, 2016.

BAJORATH, J. Computational chemistry and computer-aided drug discovery: Part II. **Future Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 15, p. 1799–1800, out. 2016.

BARKIN, R. L. Topical Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs: The Importance of Drug, Delivery, and Therapeutic Outcome. **American Journal of Therapeutics**, p. 20, 2015.

BERDIGALIYEV, N.; ALJOFAN, M. An overview of drug discovery and development. **Future Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 10, p. 939–947, maio 2020.

BOOLELL, M. et al. Sildenafil: an orally active type 5 cyclic GMP-specific phosphodiesterase inhibitor for the treatment of penile erectile dysfunction. **Int J Impot Res**, v. 8, n. 2, p. 47-52, 1996.

BRUNE; PATRIGNANI, P. New insights into the use of currently available non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Journal of Pain Research**, p. 105, fev. 2015.

CHEN, Y.-C. et al. Local drug delivery systems for inflammatory diseases: Status quo, challenges, and opportunities. **Journal of Controlled Release**, v. 330, p. 438–460, fev. 2021.

DAVISON, E. K.; BRIMBLE, M. A. Natural product derived privileged scaffolds in drug discovery. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 52, p. 1–8, out. 2019.

DENG, Z.; LIU, S. Inflammation-responsive delivery systems for the treatment of chronic inflammatory diseases. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 11, n. 4, p. 1475–1497, ago. 2021.

DINARELLO, C. A. Anti-inflammatory Agents: Present and Future. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 935–950, mar. 2010.

FAVER, J. C. et al. Computer-Aided Drug Design: Using Numbers to Your Advantage. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 4, n. 9, p. 812–814, 12 set. 2013.

GNS, H. S. et al. An update on Drug Repurposing: Re-written saga of the drug's fate. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 110, p. 700–716, fev. 2019.

GUO, C.-G.; LEUNG, W. K. Potential Strategies in the Prevention of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs-Associated Adverse Effects in the Lower Gastrointestinal Tract. **Gut and Liver**, v. 14, n. 2, p. 179–189, 15 mar. 2020.

HARRER, S. et al. Artificial Intelligence for Clinical Trial Design. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 40, n. 8, p. 577–591, ago. 2019.

HEPPNER, F. L.; RANSOHOFF, R. M.; BECHER, B. Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 16, n. 6, p. 358–372, jun. 2015.

HO, H. et al. A high-throughput in vitro model of human embryo attachment. **Fertility and Sterility**, v. 97, n. 4, p. 974–978, abr. 2012.

HOMAYUN, B.; LIN, X.; CHOI, H.-J. Challenges and Recent Progress in Oral Drug Delivery Systems for Biopharmaceuticals. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 3, p. 129, 19 mar. 2019.

IACHINA, I. et al. The nanoscopic molecular pathway through human skin. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1863, n. 7, p. 1226–1233, jul. 2019.

IO, C. Assessing Pharmaceutical Research and Development Costs. p. 3, 2018.

KOTLA, N. G. et al. Biomimetic Lipid-Based Nanosystems for Enhanced Dermal Delivery of Drugs and Bioactive Agents. **ACS Biomater Sci Eng**, v. 10, n. 7, p. 1262–1272, 2017.

LEPPERT, W. et al. Transdermal and Topical Drug Administration in the Treatment of Pain. **Molecules**, v. 23, n. 3, p. 681, 17 mar. 2018.

LI, F.-S.; WENG, J.-K. Demystifying traditional herbal medicine with modern approach. **Nature Plants**, v. 3, n. 8, p. 17109, ago. 2017.

MACALINO, S. J. Y. et al. Role of computer-aided drug design in modern drug discovery. **Archives of Pharmacal Research**, v. 38, n. 9, p. 1686–1701, set. 2015.

MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 771–776, mar. 2010.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629–661, 25 mar. 2016.

OPREA, T. I.; OVERINGTON, J. P. Computational and Practical Aspects of Drug Repositioning. **ASSAY and Drug Development Technologies**, v. 13, n. 6, p. 299–306, jul. 2015.

PARVATHANENI, V. et al. Drug repurposing: a promising tool to accelerate the drug discovery process. **Drug Discovery Today**, v. 24, n. 10, p. 2076–2085, out. 2019.

PUSHPAKOM, S. et al. Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 18, n. 1, p. 41–58, jan. 2019.

RABIEI, M. et al. Nanomaterial and advanced technologies in transdermal drug delivery. **Journal of Drug Targeting**, v. 28, n. 4, p. 356–367, 20 abr. 2020.

RASTOGI, V.; YADAV, P. Transdermal drug delivery system: An overview. **Asian Journal of Pharmaceutics**, v. 6, n. 3, p. 161, 2012.

SANTOS, R. et al. A comprehensive map of molecular drug targets. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 16, n. 1, p. 19–34, jan. 2017.

SCHLANDER, M. et al. How Much Does It Cost to Research and Develop a New Drug? A Systematic Review and Assessment. **PharmacoEconomics**, v. 39, n. 11, p. 1243–1269, nov. 2021.

SLIWOSKI, G. et al. Computational Methods in Drug Discovery. **Pharmacological Reviews**, v. 66, n. 1, p. 334–395, jan. 2014.

SOUFLI, I. et al. Overview of cytokines and nitric oxide involvement in immuno-pathogenesis of inflammatory bowel diseases. **World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics**, v. 7, n. 3, p. 353, 2016.

STEVEN, S. et al. Vascular Inflammation and Oxidative Stress: Major Triggers for Cardiovascular Disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, p. 1–26, 23 jun. 2019.

THOMFORD, N. et al. Natural Products for Drug Discovery in the 21st Century: Innovations for Novel Drug Discovery. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 6, p. 1578, 25 maio 2018.

WONGRAKPANICH, S. et al. A Comprehensive Review of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug Use in The Elderly. **Aging and disease**, v. 9, n. 1, p. 143, 2018.

XUE, H. et al. Review of Drug Repositioning Approaches and Resources. **International Journal of Biological Sciences**, v. 14, n. 10, p. 1232–1244, 2018.

## **CAPÍTULO 1**

ARTIGO DE REVISÃO

## PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES E ANTI-INFLAMATÓRIAS DE DIBENZOILMETANO E SEUS DERIVADOS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA

### RESUMO

O dibenzoilmetano (DBM) é uma  $\beta$ -dicetona com estrutura química similar à da curcumina e suas atividades antioxidante e anti-inflamatória têm sido investigadas atualmente. Contudo, essa é a primeira revisão a investigar tais propriedades do DBM. Essa revisão sistemática foi conduzida no período de março a junho de 2020, de acordo com os critérios estabelecidos pelo PRISMA e está em processo de registro na base de registro de revisões sistemáticas internacionais (PROSPERO). A busca foi realizada nas bases de dados *PubMed*, *Scielo*, *Lilacs* e *Medline*, sem delimitação de data. Para a busca dos artigos, foi utilizada uma combinação entre os termos “*dibenzoylmethane*” e “ *$\beta$ -diketones*” com os termos “*inflammation*”, “*anti-inflammatory agents*” e “*oxidative stress*”. Um total de 115 artigos foi encontrado e, após leitura do título, resumos, avaliação dos critérios de elegibilidade e leitura na íntegra, foram incluídos 12 artigos. Foi possível elencar algumas funções bioativas relacionadas à atividade antioxidante e anti-inflamatórias tanto do dibenzoilmetano, quanto seus derivados. Como exemplos têm-se a modulação de vias de sinalização celular; inibição dos processos de migração, infiltração e diferenciação de células imunes; inibição da expressão de citocinas pró-inflamatórias e a síntese de eicosanoides; e atividade citoprotetora pela inibição do estresse oxidativo. Dessa forma, podemos concluir que o dibenzoilmetano e alguns dos seus derivados sintéticos possuem atividades antioxidantes e anti-inflamatórias importantes.

**Palavras chave:** dibenzoilmetano, beta-dicetonas, inflamação, fármacos anti-inflamatórias, estresse oxidativo.

## **REVIEW ARTICLE**

### ***ANTIOXIDANT AND ANTI-INFLAMMATORY PROPERTIES OF DIBENZOYLMETHANE AND ITS DERIVATES: A SYSTEMATIC REVIEW***

#### **ABSTRACT**

Dibenzoylmethane (DBM) is a  $\beta$ -diketone with a chemical structure analog to curcumin and its antioxidant and anti-inflammatory activity are currently being investigated. However, this is the first review to investigate this properties of DBM. This systematic review was carried out from March to June 2020, according to criteria established by PRISMA and it is in process of being registered in International Prospective Register of Systematic Reviews (PROSPERO). The search was performed in PubMed, Scielo, Lilacs and Medline databases, without date delimiting. To search for articles, a combination of the terms "dibenzoylmethane" and " $\beta$ -diketones" with the terms "inflammation", "anti-inflammatory agents" and "oxidative stress" was used. A total of 115 articles were found and, after reading the title, abstracts, evaluating the eligibility criteria and full reading, 12 articles were included. It was possible to list some bioactive functions related to dibenzoylmethane antioxidant and anti-inflammatory activities and its derivatives. As examples, They act in the modulation of cell signaling pathways; inhibition of migration, infiltration and differentiation process of immune cells; inhibition of pro-inflammatory cytokines expression and eicosanoids production; and cytoprotective activity by inhibiting oxidative stress. Thus, we can conclude that dibenzoylmethane and some of its synthetic derivatives have important antioxidant and anti-inflammatory activities.

**Key words:** dibenzoylmethane, beta-diketones, inflammation, anti-inflammatory agentes, oxidative stress.

## 1. INTRODUÇÃO

Inflamação e o estresse oxidativo são processos biológicos envolvidos na patogênese e progressão de uma série de doenças crônicas não transmissíveis como obesidade, doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas diabetes mellitus, hipertensão e câncer (BISWAS, 2016; CHEN et al., 2018). A relação entre a inflamação e o estresse oxidativo parece ser interdependente e cíclica. Isso porque, uma vez estimuladas, as células inflamatórias liberam uma série de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio no sítio da inflamação exacerbando o estresse oxidativo. Por outro lado, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio podem agir como estímulos para o disparo de cascatas de sinalização celular que vão culminar na expressão gênica de moléculas pró-inflamatórias (CASTELLANI; BALZA; RUBARTELLI, 2014; MITTAL et al., 2014).

Em função da quantidade de células, proteínas e biomoléculas envolvidas no processo de inflamação e estresse oxidativo, a complexidade no tratamento de patologias que têm esses componentes como base é enorme (BISWAS, 2016). A terapêutica envolvida no tratamento de doenças que envolvem a toxicidade pelo estresse oxidativo e inflamação deve levar em consideração a causa da produção exacerbada de espécies reativas de oxigênio/nitrogênio e moléculas pró-inflamatórias, os mecanismos envolvidos, os tecidos que estão sendo afetados e as propriedades farmacológicas dos antioxidantes e anti-inflamatórios que serão utilizados (UMAR et al., 2016; HO et al., 2018; KONTOGHIORGHES; KONTOGHIORGHE, 2019). Tudo isso, a fim de se evitar cair num paradoxo antioxidante (HALLIWELL, 2013).

O dibenzoilmetano (DBM) é uma beta-dicetona com estrutura química análoga a da curmina (diferoilmetano), composto químico constituinte do açafrão que têm sua atividade antioxidante e anti-inflamatória demonstrada em estudos desde células até ensaios clínicos com humanos (HEWLINGS; KALMAN, 2017; TABRIZI et al., 2019). As atividades fotoprotetoras (HUBAUD et al., 2008; KARLSSON et al., 2009; PURI et al., 2017) e anti-tumorais (NASCIMENTO et al., 2018; JACKSON et al., 2019) do DBM e seus derivados têm sido bastante investigadas. Além disso, suas atividades anti-inflamatória e antioxidante também têm chamado atenção por envolverem mecanismos de ação semelhantes aos anti-inflamatórios não esteroidais (CAO et al., 2017; LEE et al., 2019). Até o presente momento não há revisões que tenham abordado o tema das atividades antioxidantes e anti-inflamatórias do dibenzoilmetano ou qualquer um de seus derivados sintéticos. É nesse sentido, que a presente revisão sistemática teve como objetivo reunir as evidências das atividades antioxidantes e anti-inflamatórias do dibenzoilmetano e seus derivados sintéticos.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Identificação e seleção dos estudos

Esta revisão sistemática se orientou pela seguinte pergunta: “Quais as propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias do dibenzoilmetano e seus derivados?”. O presente artigo foi desenhado no período de Março a Junho de 2020, de acordo com os critérios estabelecidos pelo *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses* (PRISMA) (MOHER et al., 2015) e está em processo de registro na base de registros de revisões sistemáticas internacionais *International Prospective Register of Systematic Reviews* (PROSPERO).

A busca foi realizada nas bases de dados *Pubmed*, *Scielo*, *Lilacs* e *Medline*. Não houve delimitação de datas para a publicação dos artigos, porém, deveriam ser escritos em língua inglesa. Utilizou-se em combinação com os descritores “ *$\beta$ -diketone*” e “*dibenzoylmethane*” os seguintes descritores: “*inflammation*”; “*anti-inflammatory agent*” e “*oxidative stress*”.

Foi desenvolvido pelos autores um protocolo para identificação e seleção dos artigos originais (Figura 1). As publicações foram analisadas e selecionadas manualmente e independentemente por dois autores. Em caso de dúvidas, os autores avaliaram em conjunto os artigos até que se obtivesse consenso. A busca resultou num total de 115 artigos que, após leitura de título e resumo e avaliação dos critérios de elegibilidade, 12 foram incluídos.

### 2.2 Critérios de elegibilidade

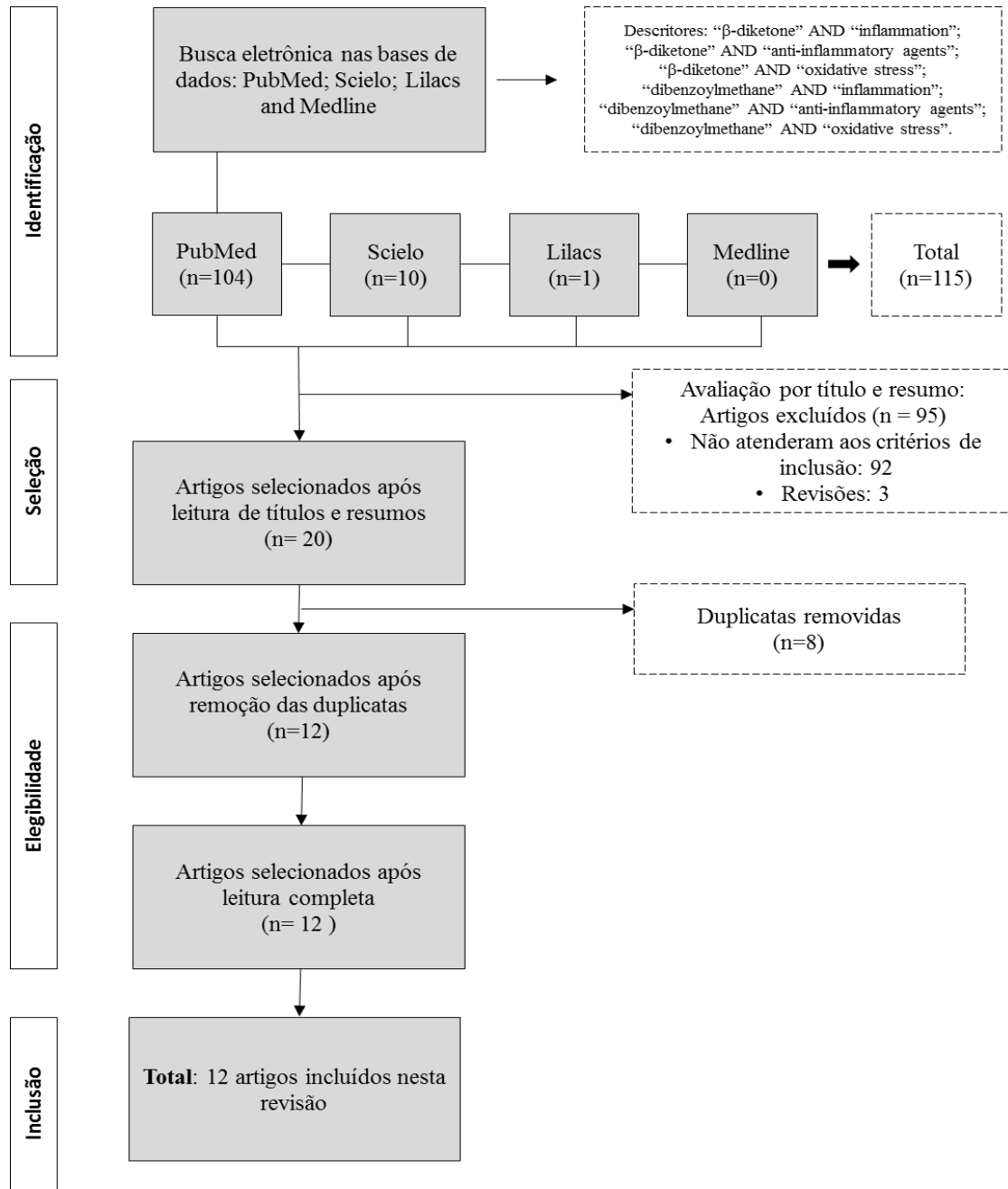
Foram definidos como critérios de inclusão: artigos originais; escritos em inglês; já publicados; com modelo experimental animais ou células; e que tivessem avaliado propriedades antioxidantes e/ou anti-inflamatórias do dibenzoilmetano ou algum de seus derivados sintéticos. Por outro lado, foram definidos como critérios de exclusão/não inclusão: estudos conduzidos com humanos; artigos não publicados; artigos duplicados; artigos de revisão; monografias; teses; dissertações; capítulos de livros; livros; resumos; estudos que não apresentassem resultados relacionados à propriedade antioxidante ou anti-inflamatória do dibenzoilmetano e/ou seus derivados.

### 2.3 Extração dos dados dos artigos

Os dados extraídos dos estudos avaliados foram: autor; ano de publicação; desenho experimental (modelo animal ou tipo celular, n amostral, tratamento, doses utilizadas, período de tratamento, via de administração); biomarcadores relacionados à atividade antioxidante e/ou anti-inflamatória avaliados; e efeito do tratamento sobre esses biomarcadores.

### 2.4 Risco de viés

Para avaliar os riscos de viés foi utilizada a ferramenta para avaliação de viés em estudos de intervenção com animais chamada *Systematic Review Centre for Laboratory Animal Experimentation* (SYRCLE) que é baseada na *Cochrane Collaboration RoB Tool* (HOOIJMANS et al., 2014). Os estudos incluídos nessa revisão foram avaliados considerando-se 10 perguntas relacionadas a elementos individuais de cinco domínios (seleção, desempenho, atrito, relatório e outros) e utilizadas três categorias de julgamento de risco de viés para cada domínio definidas como alto, baixo e pouco claro.



**Figura 1.** Fluxograma de identificação e seleção de artigos incluídos nesta revisão sistemática.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Descrição dos estudos

Após todos os processos de identificação, seleção e elegibilidade, 12 artigos publicados entre os anos de 1998 e 2019 foram incluídos nesta revisão. Destes, 2 estudos utilizaram modelos *in vivo* e *in vitro*, 4 utilizaram apenas de modelos *in vivo* e 6 utilizaram apenas de modelo *in vitro* para avaliar a atividade antioxidante e/ou anti-inflamatória do dibenzoilmetano ou algum de seus derivados sintéticos (Tabelas 1 e 2).

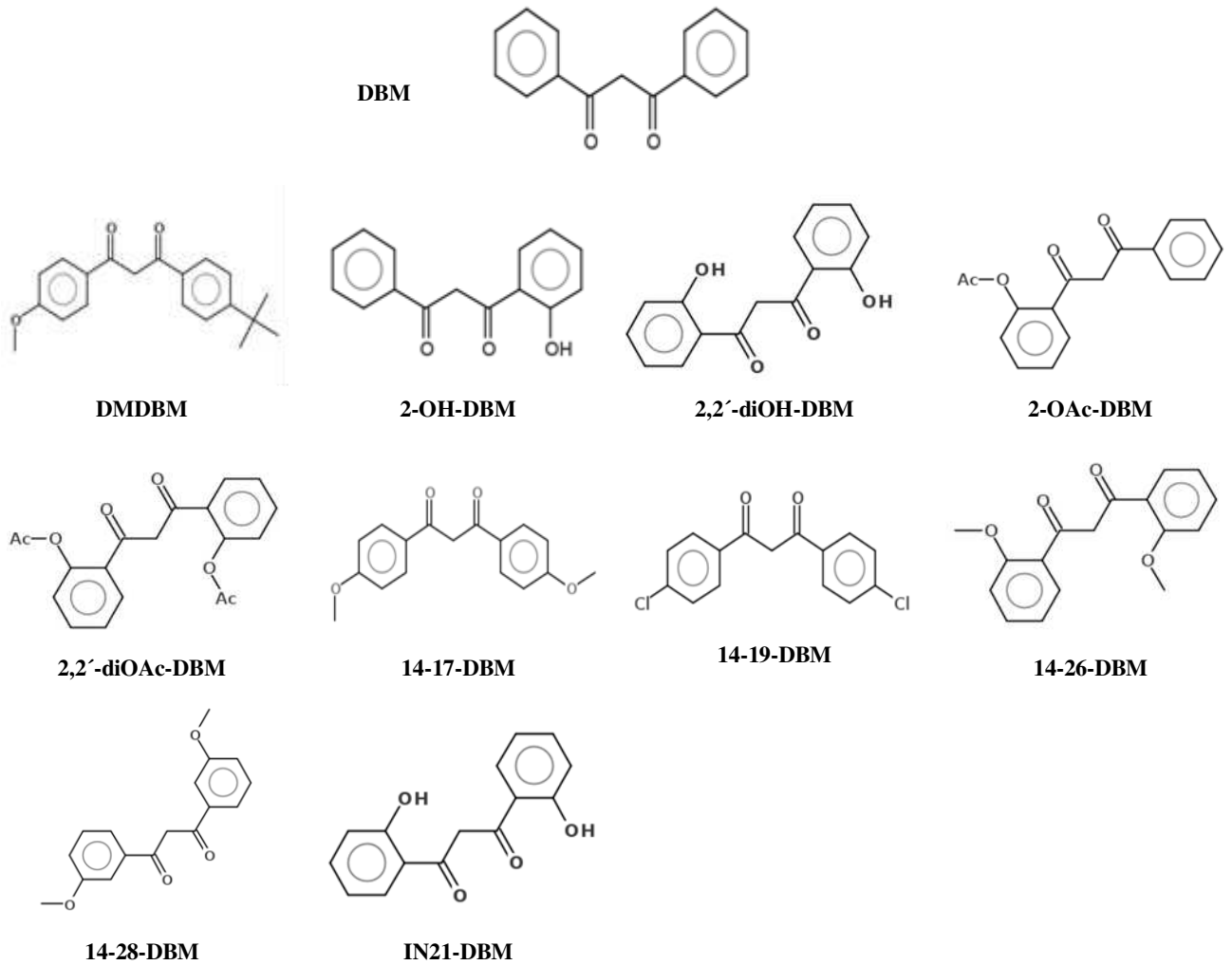
Todos os estudos utilizando-se de modelo animal foram estudos experimentais com modelos murinos como camundongos C57BL/6 (n=3), CD-1 (n=1) e ratos Lewis (n=1) e Sprague-Dawley (n=1). O número de animais por grupo variou de 4 a 20 e as doses testadas de 10 a 500 mg/kg/dia administradas por via oral (n=3), tópica (n=2) ou intraperitoneal (n=1) por um período de 3 dias a 20 semanas (Tabela 1).

Já os estudos *in vitro* utilizaram as seguintes linhagens celulares: RAW264.7 (n=3), MES-13 (n=1), THP-1 (n=1), HEK-293 (n=1), KBM-5 (n=1), A549 (n=1), Jukart (n=1), A293 (n=1), Astrócitos (n=1), SH-SY5Y (n=1) expostas a diferentes agentes indutores de inflamação como: LPS (n=4), PMA (n=1), BFA (n=1) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (n=2) e tratadas com dibenzoilmetano e/ou um de seus derivados sintéticos (1 a 100µM) durante 5 minutos até 48 horas (Tabela 2).

#### 3.2 Dibenzoilmetano e seus derivados sintéticos

O dibenzoilmetano é uma β-dicetona com estrutura análoga a curcumina, importante composto antioxidante e anti-inflamatório. A figura 2 apresenta a estrutura química dos doze diferentes derivados sintéticos do DBM utilizados pelos artigos incluídos nesta revisão. As alterações estruturais realizadas nos derivados sintéticos do DBM aconteceram pela adição de grupamentos OH, OMe, Cl, OAc e (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C em diferentes quantidades e posições na molécula. Em relação a esses derivados sintéticos, eles foram utilizados em cinco artigos. Destes, três não utilizaram o DBM como tratamento e avaliaram a atividade anti-inflamatória e/ou antioxidante exclusivamente de seus derivados sintéticos.

Após análise minuciosa dos artigos, foi possível elencar algumas funções bioativas relacionadas à atividade antioxidante e anti-inflamatórias tanto do dibenzoilmetano, quanto seus derivados. Como exemplos têm-se a modulação de vias de sinalização celular; inibição dos processos de migração, infiltração e diferenciação de células imunes; inibição da expressão de citocinas pró-inflamatórias e síntese de eicosanoides; e atividade citoprotetora pela inibição do estresse oxidativo.



**Figura 2.** Estruturas químicas do dibenzoilmetano e seus derivados sintéticos.

### 3.3 Modulação de vias de sinalização celular

O processo de sinalização celular é uma forma complexa que as células possuem de se comunicar com o micro e o macro ambiente em que estão inseridas (WU, 2014). Diversas são as vias de sinalização celular envolvidas com a transdução de sinais de resposta inflamatória e antioxidante (NEWTON; DIXIT, 2012). Em resumo, a transdução do sinal se inicia com o reconhecimento de um estímulo por um receptor, desencadeando uma série de reações de fosforilação que vão culminar na translocação de fatores de transcrição para o núcleo. Assim, acontece a ativação da transcrição de genes e tradução em moléculas específicas que, por fim, irão gerar algum efeito celular (NEWTON; DIXIT, 2012; LIU et al., 2017). Esta revisão

identificou duas vias de sinalização celular onde o dibenzoilmetano e/ou seus derivados sintéticos podem agir como moduladores.

### 3.4 Via Keap1/Nrf2/ARE

Nrf2 é um fator de transcrição nuclear composto por 605 resíduos de aminoácidos que possui sete domínios funcionais (Neh 1-7) envolvidos em sua regulação de sua estabilidade e atividade transcricional (STEFANSON; BAKOVIC, 2014). Em condições fisiológicas normais, Nrf2 está ligado ao homodímero Keap1 em dois sítios. Essa ligação ocorre em função da presença dos motivos de ligação com alta afinidade por ETGE contidos no domínio Neh2 da cauda N-terminal de Nrf2 (HAST et al., 2013; TONG et al., 2007). A interação entre Keap1-Nrf2 faz com que o Nrf2 seja sequestrado do citosol, ubiquitinado e destinado para degradação proteossomal. Assim, o Nrf2 perde a capacidade de se translocar para o núcleo e ativar a transcrição de genes alvo (KANG et al., 2004; VELICHKOVA; HASSON, 2003).

No entanto, perante situações de estresse endógeno e exógeno, essa ligação é desfeita e o Nrf2 atua de forma importante na regulação dos mecanismos de defesa com objetivo de se manter a homeostase celular (KENSLER; WAKABAYASHI; BISWAL, 2007). A ruptura da interação entre Nrf2-Keap1 é o gatilho suficiente para sua translocação nuclear, heterodimerização com Maf e formação do complexo Nrf2/Maf/ARE (BELLEZZA et al., 2018). Este complexo desencadeia a expressão gênica de uma série de moléculas com atividade antioxidante, anti-inflamatória, detoxificação, autofagia e proteolítica. Como exemplo, expressão de heme oxigenase-1 (HO-1) que é induzida em sob diversas condições de estresse e inflamação. (BELLEZZA et al., 2018; TU et al., 2019).

Cao et al., 2017 estimulou tais condições em camundongos normais e knockout em Nrf2 utilizando tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>) e os tratou por via oral com doses de 200 ou 500 mg/kg de DBM durante 3 dias consecutivos. O tratamento com DBM induziu fortemente a expressão de HO-1 nos tipos selvagens, no entanto, essa expressão foi diminuída nos animais knockout. No mesmo sentido, (CHEUNG et al., 2010) observou aumento da indução da transcrição de Nrf2 relacionada a expressão de enzimas detoxificantes de fase II em animais que receberam dieta enriquecida com 1% de DBM durante 20 semanas.

De forma similar, em estudos *in vitro* utilizando-se de linhagens celulares de macrófagos RAW264.7 (KANG et al., 2018; LEE et al., 2019) e linhagens de células de rim embrionário humano HEK293 (CAO et al., 2017) estimuladas com LPS e tratadas com DBM apresentaram melhora na defesa antioxidante e anti-inflamatória pela modulação da expressão gênica de Nrf2.

### 3.5 Via Nrf2/NF- $\kappa$ B

O NF- $\kappa$ B é uma família de fatores de transcrição nucleares amplamente expressos em células imunes. Eles regulam a expressão de genes ligados à produção de citocinas inflamatórias, quimiocinas, bem como moléculas de adesão, proliferação, apoptose, morfogênese e diferenciação celular (LIU et al., 2017; OECKINGHAUS; GHOSH, 2009). A ativação do NF- $\kappa$ B acontece de forma canônica e não canônica. Na primeira, um estímulo, seja ele citocinas, fatores de crescimento, mitógenos, componentes microbianos ou agentes estressantes, se liga ao seu respectivo receptor e estimula a fosforilação do complexo IKK que, posteriormente, fosforila I $\kappa$ B. I $\kappa$ B é ubiquitinado e direcionado para degradação no proteassomal, enquanto o NF- $\kappa$ B se transloca para o núcleo e ativa os genes alvo (SUN; CHANG; JIN, 2013).

Por outro lado, a via de ativação não canônica não depende da degradação de I $\kappa$ B e parece ter evoluído como um eixo suplementar que coopera com a via canônica (SUN, 2011). Nela, a via NF- $\kappa$ B é ativada de forma seletiva por um grupo de estímulos específicos. A fosforilação de p100 mediada pela ativação da proteína NIK (NF- $\kappa$ B-inducing kinase) em cooperação com IKK $\alpha$  resulta em sua ubiquitinação e processamento. O processamento de p100 envolve a degradação de sua cauda C-terminal, resultando na geração do NF- $\kappa$ B maduro e posterior translocação nuclear (SUN, 2012).

Assim como Nrf2, a família NF- $\kappa$ B está relacionada à regulação da expressão de diversos genes de resposta ao estresse oxidativo e inflamação (WARDYN; PONSFORD; SANDERSON, 2015). Em função disso, existe um cross-talk complexo e dinâmico entre essas vias de sinalização celular. Os mecanismos ainda estão sendo elucidados, no entanto, estudos elencam cinco maneiras diferentes de interação entre Nrf2 e NF- $\kappa$ B (BELLEZZA et al., 2018).

São elas: 1) Nrf2 compete com NF- $\kappa$ B pela ligação com a proteína co-ativadora de transcrição CBP/P300 no núcleo (BELLEZZA; MIERLA; MINELLI, 2010); 2) NF- $\kappa$ B recruta HDAC3 e gera uma hip-acetilação local diminuindo a sinalização celular mediada por Nrf2 (WANG et al., 2012); 3) Nrf2 é ativado indiretamente por compostos anti-inflamatórios que suprimem a atividade de NF- $\kappa$ B (BURTON; KENSLER; GUILARTE, 2006); 4) NF- $\kappa$ B se liga a elementos responsivos a  $\kappa$ B na região promotora do gene de Nrf2, assim, induzindo sua expressão (RUSHWORTH et al., 2012); 5) Indução de Rac1 por NF- $\kappa$ B induz a expressão gênica de Nrf2, conseqüente produção de HO-1 e posterior supressão de NF- $\kappa$ B mediada por HO-1 (CUADRADO et al., 2014).

O aumento na ativação de Nrf2 e da expressão de HO-1 associado à redução da fosforilação de efetores upstream da via de ativação de NF- $\kappa$ B como os complexos IKK e I $\kappa$ B, em função do tratamento com dibenzoilmetano demonstrado *in vitro* e *in vivo* pelos autores Cheung et al., 2010; Cao et al., 2017; Kang et al., 2018 resultou na redução de sua translocação de NF- $\kappa$ B para o núcleo e conseqüente menor ativação da transcrição de genes alvo.

### 3.6 Propriedades anti-inflamatórias do dibenzoilmetano e seus derivados

#### 3.6.1 Inibição da migração, infiltração e diferenciação de células imunes

Os processos celulares de migração, infiltração e diferenciação de células imunes são importantíssimos no desenvolvimento da resposta imune estimulada por infecções ou danos teciduais (FANG et al., 2018). A depender do estímulo inflamatório, diferentes tipos celulares como granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos), monócitos, mastócitos e linfócitos podem ser recrutados (PAVILLON; SMITH, 2019). O processo de recrutamento de células imunes é complexo e depende da expressão e secreção de interleucinas, quimiocinas e moléculas de adesão (LUSTER; ALON; VON ANDRIAN, 2005).

A capacidade de migração e infiltração celular de macrófagos RAW264.7 foi avaliada em estudo *in vitro* conduzido por Lee et al. 2019. A estimulação das células com LPS (100 ng/mL) ou ácido palmítico (250  $\mu$ M) seguida do tratamento com dibenzoilmetano (20  $\mu$ M), resultou na inibição da capacidade de migração e infiltração destas células. Kang et al. 2018 além de utilizar macrófagos, utilizou monócitos THP-1 estimulados com LPS (1  $\mu$ g/mL) ou PMA (50 ng/mL) tratados com concentrações de até 50 $\mu$ M de dibenzoilmetano. Neste estudo, a maior concentração de dibenzoilmetano foi capaz de inibir até 80% da diferenciação celular dos monócitos THP-1.

#### 3.7 Inibição de citocinas pró-inflamatórias

As citocinas são uma superfamília de pequenas proteínas (<40 kDa) secretadas por uma série de células do sistema imune (PALOMINO; MARTI, 2015), fibroblastos (KENDALL; FEGHALI-BOSTWICK, 2014), células estromais (LEUNING et al., 2018), endoteliais (MANCINI et al., 2018) e adipócitos (KANG et al., 2016). Elas atuam na resposta imune controlando o processo de migração, infiltração e diferenciação celular, além de, induzir a produção e liberação de outros mediadores inflamatórios, incluindo outras citocinas (LAWRENCE, 2009).

O termo citocina se refere tanto as interleucinas, como quimiocinas, fatores de crescimento, entre outras estruturas moleculares similares (CHARO; RANSOHOFF, 2006).

Essas moléculas são secretadas em resposta a estímulos provenientes de padrões moleculares associados a patógenos e danos celulares (PAMPs e DAMPs, respectivamente) e sua atividade pode ser autócrina e/ou parácrina (FRANK et al., 2016; GONG et al., 2020).

De modo geral, as citocinas estimulam receptores presentes na membrana plasmática de células alvo e disparam cascatas de sinalização celular via MAPK, JAK-STAT e NF- $\kappa$ B, que culminam com a transcrição de genes alvos (FRANCHI et al., 2009; TAKEUCHI; AKIRA, 2010; CHEN et al., 2018). Diferentes células podem secretar as mesmas citocinas, no entanto, o efeito de cada citocina poderá diferir de acordo com a célula alvo (KANY; VOLLRATH; RELJA, 2019).

A resposta inflamatória celular é, em partes, orquestrada por citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$ , IL6, TNF- $\alpha$  e MCP-1 (TURNER et al., 2014). Dibenzoilmetano apresenta atividade anti-inflamatória interferindo na via de sinalização de NF- $\kappa$ B e reduzindo sua capacidade de translocação para o núcleo e ativação de genes alvos relacionados com tais citocinas pró-inflamatórias (KANG et al., 2018; LEE et al., 2019). Assim, atua de forma importante como anti-inflamatório, já que essas moléculas são proteínas pleiotrópicas que regulam o processo de morte celular nos tecidos inflamados (ENGLAND et al., 2014), modificam a permeabilidade vascular endotelial (SPRAGUE; KHALIL, 2009), recrutam células inflamatórias para os tecidos inflamados (SZOLLOSI et al., 2018) e induzem a produção de proteínas de fase aguda (RAJAMANICKAM et al., 2017).

### 3.8 Inibição da produção de eicosanóides

Prostaglandinas, prostaciclina, leucotrienos e ácidos hidroxieicosatetraenóico (HETE) são eicosanóides produzidos a partir de um ácido graxo insaturado de cadeia longa (C 20:4), o ácido araquidônico (AA). Em condições fisiológicas normais, os níveis destes eicosanóides são muito baixos, no entanto, sob estímulos inflamatórios sua síntese é drasticamente aumentada (RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011a).

Para isso, o AA é liberado da membrana plasmática por ação de fosfolipases (A e C). Em seguida, é destinado a via das ciclo-oxigenases (COX) e assim ciclizado pelas enzimas COX-1 ou COX-2. Depois sofre ação de isomerases presentes em tecidos específicos e os produtos finais dessas vias são diferentes prostaglandinas, troboxanos e prostaciclina (HAMMOND; O'DONNELL, 2012).

Por outro lado, quando o ácido araquidônico é direcionado para via das lipo-oxigenases (LOX) o produto final das reações são os leucotrienos e a maioria dos HETEs (POWELL;

ROKACH, 2015; SASAKI; YOKOMIZO, 2019). Apenas uma pequena parte dos HETE podem ser sintetizados pela via das ciclo-oxigenases (POWELL; ROKACH, 2015).

As funções dos eicosanoides relacionadas aos processos inflamatórios vão depender do tipo de molécula e da célula alvo em que irá atuar. Além disso, a síntese destas moléculas é totalmente dependente da atividade das vias COX ou LOX (HAMMOND; O'DONNELL, 2012). Por essa razão, a maioria dos anti-inflamatórios não esteroidais possui como mecanismo de ação a inibição por competição da atividade destas enzimas e conseqüentemente inibição da resposta inflamatória (ZARGHI; ARFAEI, 2011; SHAHBAZI et al., 2016). Anand et al., 2011 e Kang et al., 2018 identificaram *in vitro* que dibenzoilmetano age de forma diferente, atuando na redução da expressão de COX-2 pela supressão da ativação de NF- $\kappa$ B em estímulo a TNF- $\alpha$  ou LPS, respectivamente.

O dibenzoilmetano também demonstrou mais uma parte de seu potencial anti-inflamatório *in vitro* principalmente modulando o metabolismo do ácido araquidônico e, assim, conseqüentemente inibindo a produção de prostaglandinas (PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>), ácidos hidroxi-eicosatetraenóicos (15-HETE, 11-HETE) e o leucotrieno (LTB<sub>4</sub>). A diminuição da produção destes compostos aconteceu principalmente em função da redução na fosforilação da fosfolipase A2 (PLA<sub>2</sub>) (HONG, 2004a).

*In vivo*, Lin et al., 2011 induziu inflamação na orelha de camundongos CD-1 fêmeas com TPA e ácido araquidônico, as tratou com DBM e mais quatro de seus derivados sintéticos (OH-DBM; diOH-DBM; OAc-DBM e diOAc-DBM) e avaliou a produção de PGE<sub>2</sub> e o percentual de inibição do edema gerado por esses compostos. Em relação à produção de PGE<sub>2</sub>, todos os compostos tratados foram capazes de reduzir sua produção quando a mesma foi induzida por TPA, no entanto, somente diOH-DBM e diOAc-DBM foram capazes de reduzir a produção de PGE<sub>2</sub> quando a inflamação foi induzida com ácido araquidônico. Conseqüentemente, o mesmo perfil de inibição foi encontrado no edema de orelha.

Atarashi et al., 2012 também encontrou atividade de inibição de edema, neste caso, de pata, em ratos Lewis machos tratados topicamente com outro derivado sintético do DBM, o DMDBM. Esses resultados demonstram que tanto o DBM quanto alguns de seus derivados sintéticos apresentam atividades anti-inflamatórias importantes.

### 3.9 Propriedades antioxidantes do dibenzoilmetano e seus derivados

#### 3.9.1 Inibição do estresse oxidativo

A produção de radicais livres sejam eles espécies reativas de oxigênio (radicais superóxido, hidroxil e peróxido de hidrogênio) ou nitrogênio (radical livre óxido nítrico e

peroxinitrito), consistem num processo contínuo e fisiológico que cumpre funções biológicas importantes (BARDAWEEL et al., 2018). Durante os processos metabólicos, esses radicais atuam como mediadores para transferência de elétrons nas várias reações bioquímicas (KATANO; HONDA; SUZUKI, 2018).

O óxido nítrico é um conhecido regulador e mediador das respostas inflamatórias. Sua produção é catalisada por uma família de enzimas conhecidas como óxido nítrico sintases (NOS), entre elas, a óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (AKTAN, 2004). Em condições de inflamação, a expressão de iNOS é aumentada e, conseqüentemente, a síntese de óxido nítrico (CINELLI et al., 2020). Dessa forma, em conjunto com outros radicais livres, o óxido nítrico contribui para o desenvolvimento do estresse oxidativo (LUBOS, 2008).

Estudos com linhagens celulares de RAW264.7, A549 e Jukart estimuladas com moléculas inflamatórias demonstraram que o DBM possui capacidade de reduzir a expressão de iNOS e a produção de óxido nítrico (KANG et al., 2018), assim, revelando sua capacidade citoprotetora (HEGEDŰS et al., 2013). Resultados similares, também foram encontrados para o derivado sintético 2,2'-dimetoxidibenzoilmetano (14-26-DBM) (TAKANO et al., 2007, 2011)

NOX-2 e NOX-4 são duas das sete isoformas de subunidades catalíticas presentes nas enzimas NADPH oxidases que catalisam a produção de espécies reativas de oxigênio em diferentes patologias relacionadas aos processos inflamatórios (YOU et al., 2013; SCHRÖDER; WEISSMANN; BRANDES, 2017). Lee et al. (2019) demonstrou que o tratamento com dibenzoilmetano atua reduzindo a expressão de dessas duas isoformas *in vitro* em macrófagos estimulados por LPS.

Na tentativa de neutralizar os radicais livres, os organismos produzem e/ou ingerem defesas antioxidantes enzimáticas (superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, entre outros) e não enzimáticas ( $\beta$ -caroteno, ácido ascórbico,  $\alpha$ -tocoferol, minerais cofatores de enzimas antioxidantes, resveratrol, catequinas, entre outros fitoquímicos) (BIRBEN et al., 2012; TEIXEIRA et al., 2019). Três estudos com modelos animais, dois com camundongos C57BL/6 machos (CHEUNG et al., 2010; CAO et al., 2017) e outro com ratos Sprague-Dawley fêmeas (SINGLETARY et al., 1998), demonstram que existe aumento na expressão de defesas antioxidantes enzimáticas como glutathione (GSH) e glutathione s-transferase (GST e GSTM1) quando os animais são tratados com dibenzoilmetano por via oral.

O desbalanço gerado pelo aumento produção de radicais livres e redução das defesas antioxidantes caracteriza o estresse oxidativo (BARDAWEEL et al., 2018). Como consequência, acontece a oxidação de lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, o que pode resultar

em danos e até morte celular (SCHIEBER; CHANDEL, 2014). O malondialdeído (MDA) é um dos marcadores de produtos da oxidação lipídica (DEL RIO; STEWART; PELLEGRINI, 2005; GUTTERIDGE, 1995). Em estudo com animais, sob estímulo oxidativo, o tratamento com DBM foi capaz de reduzir a peroxidação lipídica a níveis próximos aos encontrados em estados fisiológicos (CAO et al., 2017).

### 3.10 Avaliação do risco de viés

Em relação aos artigos que utilizaram modelo animal (n = 6) incluídos nesta revisão, nenhum apresentou risco alto de viés (Figura 3). Resultado importante para a confiança nas conclusões provenientes das análises dos dados. Ainda que a produção de revisões sistemáticas com modelos de experimentação animal sejam bem menos comuns do que as que utilizam ensaios clínicos com humanos, atualmente, estudos com essa abordagem estão emergindo cada vez mais (SANDERCOCK; ROBERTS, 2002). A avaliação desse tipo de estudo é desafiadora em função da heterogeneidade das metodologias empregadas. No entanto, quando bem conduzidas, as revisões sistemáticas que avaliam os riscos de viés em estudos com animais auxiliam na tomada de decisão baseada em evidências direcionando os ensaios clínicos com humanos (SANDERCOCK; ROBERTS, 2002; HOOIJMANS et al., 2012).

Lee et al. (2019)	Cao et al. (2017)	Atarashi et al. (2012)	Lin et al. (2011)	Cheung et al. (2010)	Singletary et al. (1998)	
Alto risco	Baixo risco	Pouco risco	Pouco risco	Pouco risco	Pouco risco	Geração de sequência aleatória(viés de seleção)
Pouco risco	Alto risco	Pouco risco	Pouco risco	Pouco risco	Pouco risco	Características iniciais (viés de seleção)
Alto risco	Alto risco	Alto risco	Alto risco	Alto risco	Alto risco	Ocultação da alocação (viés de seleção)
Alto risco	Alto risco	Alto risco	Alto risco	Alto risco	Alto risco	Acondicionamento aleatório (viés de desempenho)
Pouco risco	Pouco risco	Pouco risco	Pouco risco	Pouco risco	Pouco risco	Cegamento de tratadores/pesquisadores (viés de desempenho)
Pouco risco	Pouco risco	Pouco risco	Pouco risco	Pouco risco	Pouco risco	Avaliação de resultados aleatórios (vies de detecção)
Pouco risco	Alto risco	Pouco risco	Pouco risco	Pouco risco	Pouco risco	Cegamento do avaliador de resultados (vies de detecção)
Alto risco	Alto risco	Alto risco	Alto risco	Alto risco	Alto risco	Resultados incompletos (vies de atrito)
Alto risco	Alto risco	Alto risco	Alto risco	Alto risco	Alto risco	Apresentação seletiva de resultados (vies de relatório)
Alto risco	Alto risco	Alto risco	Alto risco	Alto risco	Alto risco	Outras fontes de vies (Outros viés)

**Figura 3.** Resumo dos riscos de viés de acordo com os julgamentos dos autores.

**Tabela 1.** Evidências *in vivo* dos efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios do dibenzoilmetano e seus derivados.

Autor (ano)	Desenho experimental	Biomarcador	Efeito
Lee et al. (2019)	Camundongos C57BL/6 machos (n=10/grupo), inflamação induzida por dieta com alta quantidade de gordura e tratados por via oral com DBM (100mg/kg/dia) durante 12 semanas.	Infiltração de macrófagos Migração celular	↓ ↓
Cao et al. (2017)	Camundongos C57BL/6 e C57BL6 knockout de Nrf2 machos (n = 6-8/grupo), inflamação induzida por CCl <sub>4</sub> e tratados por via intraperitoneal com DBM (200 ou 500 mg/kg) durante três dias consecutivos.	Malondialdeído GSH GSH/GSSG Ativação de Nrf2 Expressão de HO-1 Ativação de JNK Ativação de AMPK Sinalização de Ca	↓ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑
Atarashi et al. (2012)	Ratos Lewis machos (n = 4/grupo), inflamação induzida por injeção de 0,1 mL contendo 1% de <i>Mycobacterium butyricum</i> e tratado por via tópica com formulação contendo 2% de BMDDBM durante 7 dias.	Edema de pata	↓
Lin et al. (2011)	Camundongos CD-1 fêmeas (n = 5/grupo), inflamação induzida por injeção contendo ácido araquidônico (1,25nmol) ou TPA (1,25nmol) e tratados por via tópica com DBM (1 µmol); 2-OH-DBM (1 µmol); 2-Oac-DBM (1 µmol); 2,2'-diOH-DBM (1 µmol); 2,2'-diOAc-DBM (1 µmol).	Produção de PGE <sub>2</sub> Edema de orelha	↓ ↓
Cheung et al. (2010)	Camundongos C57BL/6 machos (n = 15 – 20/grupo), inflamação induzida por AOM/DSS e tratados por via oral com dieta contendo 1% de DBM 1 semana antes e 1 semana depois da indução da inflamação durante 20 semanas.	Expressão de Nrf2 Expressão de HO-1 Expressão de GSTM1 Transcrição NQO1	↑ ↑ ↑ ↑
Singleton et al. (1998)	Ratos Sprague-Dawley (n = 6/grupo), inflamação induzida por DMBA-DNA e tratadas por via oral com dieta contendo 0,2% e 1% de DBM durante 14 dias.	Expressão de GST	↑

DBM - dibenzoilmetano; GSH – glutatona; GST – glutatona s-transferase; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - peróxido de hidrogênio; HO-1 - heme oxigenase-1;

**Tabela 2.** Evidências *in vitro* dos efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios do dibenzoilmetano e seus derivados.

Autor (ano)	Desenho experimental	Biomarcador	Efeito
Lee et al. (2019)	Experimento 1: Macrófagos RAW264.7 foram estimulados com LPS (100 ng/mL) e tratados com DBM (20 µM)	CD68 MCP-1; NOX2 NOX4	↓ ↓ ↓ ↓
	Experimento 2: Células MES-13 foram estimuladas com ácido palmítico (250 µM) ou LPS (100 ng/mL) e tratadas com DBM (20 µM)	Ativação de Nrf2 Expressão de HO-1 p-p38 p-IKK cinase Degradação de IκB Fosforilação de NFκB	↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓
Kang et al. (2018)	Macrófagos RAW264.7 ou monócitos THP-1 foram estimulados com LPS (1µg/mL) ou PMA (50ng/mL) 2 horas antes da incubação com DBM (12.5; 25; 50 µM) durante 5 minutos até 48 horas.	Diferenciação de THP-1	↓
		CD11β	↓
		CD36	↓
		Produção de óxido nítrico	↓
		COX-2	↓
		iNOS	↓
		Fosforilação de IκB	↓
		NFκB nuclear	↓
		NFκB citosólico	↓
		Nrf2 nuclear	↑
		Nrf2 citosólico	↓
		Keap-1	↓
		HO-1	↓
TNF-α	↓		
IL-1β	↓		
IL-6	↓		
MCP-1	↓		
Cao et al. (2017)	Células HEK293 superexpressando GFP-Nrf2 ou dominant-negative Nrf2 foram tratadas com DBM (30µM) durante 6 horas.	Ativação de Nrf2 Expresão de HO-1	↑ ↑
Hegedus et al. (2013)	Células A549 ou Jukart foram pré-tratadas com quarto derivados sintéticos de DBM 100µM) seguido por estimulação com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (800µM) por 15 minutos.	Citoproteção	↑
		p-ERK1/2 p-p38	↓ ↔

**Tabela 2. Continuação.**

Autor (ano)	Desenho experimental	Biomarcador	Efeito
Anand et al. (2011)	Experimento 1: Células KBM-5 foram pré-incubadas com DBM (50, 100, 150, 200µM), DBA (10, 20, 30, 40, 50µM) e DBP (5, 10, 25, 50, 100µM) por 4h e depois tratadas com TNF- $\alpha$ (0,1nM) por 30 minutos.	Ativação de NF $\kappa$ B Expressão de COX-2 Expressão de ciclina D1 Expressão de VEGF	↓ ↓ ↓ ↓
	Experimento 2: Células A293 foram infectadas transitoriamente com plasmídeo contendo NF $\kappa$ -B ligado ao gene SEAP e or co-transfectadas com o plasmídeo do gene TAK1/TAB1 juntamente com o plasmídeo contendo NF $\kappa$ -B e SEAP, depois foram tratadas com DBM (200µM), DBA (50µM), DBP (100µM) por 4h.		
Takano (2011)	Experimento 1: Ativação de astrócitos induzida por LPS (1µg/mL) e pré-tratadas ou simultaneamente tratadas com DBM 14-26 (2,2'-dimetoxidibenzoilmetano – 100 µM) por 24 horas.	Citoproteção Produção de EROs Produção de óxido nítrico Expressão de iNOS Ativação de NF $\kappa$ B	↑ ↓ ↓ ↓ ↓
	Experimento 2: Estresse oxidativo induzido em astrócitos expostos a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (100 µM ) e tratados com 14-26-DBM (2,2'-dimetoxidibenzoilmetano – 1, 10 or 100 µM) por 6 horas.		
Takano et al. (2007)	Experimento 1: Células SH-SY5Y foram incubadas com tunicamicina (0.75 – 2.0 µg/mL) e brefeldin A (1.0 µg/mL) na presença ou ausência de cinco derivados sintéticos do dibenzoilmetano (4,4'-dimetoxidibenzoilmetano; 4,4'-diclorodibenzoilmetano; 2,2'-dimetoxidibenzoilmetano; 3,3'-dimetoxidibenzoilmetano; 2,2'-dihidroxidibenzoilmetano – 10 a 60 µM) durante 6, 12 or 24h para indução de estresse no retículo endoplasmático.	Produção de EROs	↓
	Experimento 2: Células SH-SY5Y foram pré-incubadas com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (44µM) ou 6-hidroxidopamina (30 or 75µM) na presença ou ausência de cinco derivados sintéticos do dibenzoilmetano (4,4'-dimetoxidibenzoilmetano; 4,4'-diclorodibenzoilmetano; 2,2'-dimetoxidibenzoilmetano; 3,3'-dimetoxidibenzoilmetano; 2,2'-dihidroxidibenzoilmetano – 10 a 60 µM) durante 24h para indução do estresse oxidativo.		
Hong et al. (2004)	Macrófagos RAW264.7 foram incubados com LPS (2 µg/mL), ácido araquidônico (20 µM) e DBM (10 µM) durante 30 minutos até 18 horas.	PGD <sub>2</sub> PGE <sub>2</sub> PGF <sub>2</sub> HHT 15-HETE 11-HETE LTB <sub>4</sub> Fosforilação de PLA <sub>2</sub>	↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓

CCl<sub>4</sub> - tetracloreto de carbono; DBM - dibenzoilmetano; DBA, - dibenzoilidenocetona; DBP - 1,3-dibenzoilpropano; HO-1 - heme oxigenase-1; IL-1 $\beta$  - interleucina-1 beta; IL-6 - interleucina-6; LPS - lipopolissacarídeo; MCP-1 - proteína quimioatrativa de monócitos-1; PMA - forbol-12-miristato-13-acetato; TNF- $\alpha$  - fator de necrose tumoral alfa; TPA - 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato.

#### 4. CONCLUSÃO

Tendo em vista os aspectos observados, podemos destacar que o dibenzoilmetano possui atividade antioxidante por apresentar atividade citoprotetora inibindo o processo de estresse oxidativo gerado pelo desbalanço em favor da produção de espécies reativas de oxigênio. Para isso, o DBM inibe a expressão de iNOS, NOX-2 e NOX-4 resultando na redução da produção de óxido nítrico e outras espécies reativas de oxigênio, assim, reduzindo a peroxidação de lipídeos. Além disso, é capaz de estimular o aumento da expressão de enzimas de defesa antioxidante como glutatona e glutatona s-transferase.

No que diz respeito a sua atividade anti-inflamatória, o dibenzoilmetano se mostrou capaz de inibir processos migração, infiltração e diferenciação celular; inibir a expressão de citocinas como IL-1 $\beta$ , IL6, TNF- $\alpha$  e MCP-1 e a síntese de eicosanoides pela inibição da expressão de COX-2 e redução da fosforilação de PLA<sub>2</sub>. Em resumo, as atividades antioxidantes e anti-inflamatórias apresentadas pelo dibenzoilmetano são decorrentes de sua capacidade de modular vias de sinalização celular importantes para a transdução de sinais em resposta a estímulos de estresse e inflamação mediadas por Nrf2 e NF- $\kappa$ B.

## 5. REFERÊNCIAS

- AKTAN, F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. **Life Sciences**, v. 75, n. 6, p. 639–653, jun. 2004.
- ANAND, P. et al. Suppression of pro-inflammatory and proliferative pathways by diferuloylmethane (curcumin) and its analogues dibenzoylmethane, dibenzoylpropane, and dibenzylideneacetone: Role of Michael acceptors and Michael donors. **Biochemical Pharmacology**, v. 82, n. 12, p. 1901–1909, dez. 2011.
- ATARASHI, K. et al. Addition of UVA-absorber butyl methoxy dibenzoylmethane to topical ketoprofen formulation reduces ketoprofen-photoallergic reaction. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 113, p. 56–62, ago. 2012.
- BARDAWEEL, S. K. et al. Reactive Oxygen Species: the Dual Role in Physiological and Pathological Conditions of the Human Body. **The Eurasian Journal of Medicine**, v. 50, n. 3, p. 193–201, 16 nov. 2018.
- BELLEZZA, I. et al. Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1865, n. 5, p. 721–733, maio 2018.
- BELLEZZA, I.; MIERLA, A. L.; MINELLI, A. Nrf2 and NF- $\kappa$ B and Their Concerted Modulation in Cancer Pathogenesis and Progression. **Cancers**, v. 2, n. 2, p. 483–497, 13 abr. 2010.
- BIRBEN, E. et al. Oxidative Stress and Antioxidant Defense: **World Allergy Organization Journal**, v. 5, n. 1, p. 9–19, jan. 2012.
- BISWAS, S. K. Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox? **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 1–9, 2016.
- BURTON, N. C.; KENSLER, T. W.; GUILARTE, T. R. In vivo modulation of the Parkinsonian phenotype by Nrf2. **NeuroToxicology**, v. 27, n. 6, p. 1094–1100, dez. 2006.
- CAO, M. et al. Dibenzoylmethane Protects Against CCl<sub>4</sub>-Induced Acute Liver Injury by Activating Nrf2 via JNK, AMPK, and Calcium Signaling. **The AAPS Journal**, v. 19, n. 6, p. 1703–1714, nov. 2017.
- CASTELLANI, P.; BALZA, E.; RUBARTELLI, A. Inflammation, DAMPs, Tumor Development, and Progression: A Vicious Circle Orchestrated by Redox Signaling. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 20, n. 7, p. 1086–1097, mar. 2014.
- CHARO, I. F.; RANSOHOFF, R. M. The Many Roles of Chemokines and Chemokine Receptors in Inflammation. **New England Journal of Medicine**, v. 354, n. 6, p. 610–621, 9 fev. 2006.
- CHEN, L. et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. **Oncotarget**, v. 9, n. 6, p. 7204–7218, 23 jan. 2018.
- CHEN, Y.-F. et al. Antinociceptive activity of Paederosidic Acid Methyl Ester (PAME) from the n-butanol fraction of *Paederia scandens* in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 93, n. 2, p. 97–104, ago. 2009.

**CHEMINFORMATICS, M. (2020).** <<https://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>>

CHEUNG, K. L. et al. Differential in vivo mechanism of chemoprevention of tumor formation in azoxymethane/dextran sodium sulfate mice by PEITC and DBM. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 5, p. 880–885, 1 maio 2010.

CINELLI, M. A. et al. Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition. **Medicinal Research Reviews**, v. 40, n. 1, p. 158–189, jan. 2020.

CUADRADO, A. et al. Transcription Factors NRF2 and NF- $\kappa$ B Are Coordinated Effectors of the Rho Family, GTP-binding Protein RAC1 during Inflammation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 22, p. 15244–15258, 30 maio 2014.

DEL RIO, D.; STEWART, A. J.; PELLEGRINI, N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 15, n. 4, p. 316–328, ago. 2005.

ENGLAND, H. et al. Release of Interleukin-1 $\alpha$  or Interleukin-1 $\beta$  Depends on Mechanism of Cell Death. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 23, p. 15942–15950, 6 jun. 2014.

FANG, P. et al. Immune cell subset differentiation and tissue inflammation. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 11, n. 1, p. 97, dez. 2018.

FRANCHI, L. et al. Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. **Immunological Reviews**, v. 227, n. 1, p. 106–128, jan. 2009.

FRANK, M. G. et al. The danger-associated molecular pattern HMGB1 mediates the neuroinflammatory effects of methamphetamine. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 51, p. 99–108, jan. 2016.

GONG, T. et al. DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. 2, p. 95–112, fev. 2020.

GUTTERIDGE, J. M. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. **Clinical Chemistry**, v. 41, n. 12, p. 1819–1828, 1 dez. 1995.

HALLIWELL, B. The antioxidant paradox: less paradoxical now?: The antioxidant paradox. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 75, n. 3, p. 637–644, mar. 2013.

HAMMOND, V. J.; O'DONNELL, V. B. Esterified eicosanoids: Generation, characterization and function. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1818, n. 10, p. 2403–2412, out. 2012.

HAST, B. E. et al. Proteomic Analysis of Ubiquitin Ligase KEAP1 Reveals Associated Proteins That Inhibit NRF2 Ubiquitination. **Cancer Research**, v. 73, n. 7, p. 2199–2210, 1 abr. 2013.

HEGEDŰS, C. et al. Cytoprotective dibenzoylmethane derivatives protect cells from oxidative stress-induced necrotic cell death. **Pharmacological Research**, v. 72, p. 25–34, jun. 2013.

HEWLINGS, S.; KALMAN, D. Curcumin: A Review of Its' Effects on Human Health. **Foods**, v. 6, n. 10, p. 92, 22 out. 2017.

HO, K. Y. et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in chronic pain: implications of new data for clinical practice. **Journal of Pain Research**, v. Volume 11, p. 1937–1948, set. 2018.

HONG, J. Modulation of arachidonic acid metabolism by curcumin and related  $\alpha$ -diketone derivatives: effects on cytosolic phospholipase A2, cyclooxygenases and 5-lipoxygenase. **Carcinogenesis**, v. 25, n. 9, p. 1671–1679, 1 abr. 2004.

HOOIJMANS, C. R. et al. An initiative to facilitate well-informed decision-making in laboratory animal research: report of the First International Symposium on Systematic Reviews in Laboratory Animal Science. **Laboratory Animals**, v. 46, n. 4, p. 356–357, out. 2012.

HOOIJMANS, C. R. et al. SYRCLE's risk of bias tool for animal studies. **BMC Medical Research Methodology**, v. 14, n. 1, p. 43, dez. 2014.

HUBAUD, J.-C. et al. Synthesis and spectroscopic examination of various substituted 1,3-dibenzoylmethane, active agents for UVA/UVB photoprotection. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 92, n. 2, p. 103–109, ago. 2008.

JACKSON, K. M. et al. Recent advances in the licorice root constituent dibenzoylmethane as a potential therapeutic option for cancer. In: **Studies in Natural Products Chemistry**. [s.l.] Elsevier, 2019. v. 63p. 1–19.

KANG, B. et al. Dibenzoylmethane, a Component of Licorice, Suppresses Monocyte-to-Macrophage Differentiation and Inflammatory Responses in Human Monocytes and Mouse Macrophages. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 41, n. 8, p. 1228–1236, 1 ago. 2018.

KANG, M.-I. et al. Scaffolding of Keap1 to the actin cytoskeleton controls the function of Nrf2 as key regulator of cytoprotective phase 2 genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 7, p. 2046–2051, 17 fev. 2004.

KANG, Y. E. et al. The Roles of Adipokines, Proinflammatory Cytokines, and Adipose Tissue Macrophages in Obesity-Associated Insulin Resistance in Modest Obesity and Early Metabolic Dysfunction. **PLOS ONE**, v. 11, n. 4, p. e0154003, 21 abr. 2016.

KANY, S.; VOLLRATH, J. T.; RELJA, B. Cytokines in Inflammatory Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 23, p. 6008, 28 nov. 2019.

KARLSSON, I. et al. Photodegradation of Dibenzoylmethanes: Potential Cause of Photocontact Allergy to Sunscreens. **Chemical Research in Toxicology**, v. 22, n. 11, p. 1881–1892, 16 nov. 2009.

KATANO, K.; HONDA, K.; SUZUKI, N. Integration between ROS Regulatory Systems and Other Signals in the Regulation of Various Types of Heat Responses in Plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 11, p. 3370, 28 out. 2018.

KENDALL, R. T.; FEGHALI-BOSTWICK, C. A. Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators. **Frontiers in Pharmacology**, v. 5, 27 maio 2014.

KONTOGHIORGHES, G. J.; KONTOGHIORGHE, C. N. Prospects for the introduction of targeted antioxidant drugs for the prevention and treatment of diseases related to free radical pathology. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 28, n. 7, p. 593–603, 3 jul. 2019.

LAWRENCE, T. The Nuclear Factor NF- B Pathway in Inflammation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 1, n. 6, p. a001651–a001651, 1 dez. 2009.

LEE, E. S. et al. Dibenzoylmethane ameliorates lipid-induced inflammation and oxidative injury in diabetic nephropathy. **Journal of Endocrinology**, p. 169–179, fev. 2019.

LEE, K. L. et al. Discovery of Ecopladib, an Indole Inhibitor of Cytosolic Phospholipase A<sub>2</sub>  $\alpha$ . **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, n. 6, p. 1380–1400, mar. 2007.

LIN, C.-C. et al. Inhibitory effects of 1,3-bis-(2-substituted-phenyl)-propane-1,3-dione,  $\beta$ -diketone structural analogues of curcumin, on chemical-induced tumor promotion and inflammation in mouse skin. **Food Funct.**, v. 2, n. 1, p. 78–83, 2011.

LIU, T. et al. NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 2, n. 1, dez. 2017.

LUBOS, E. Role of oxidative stress and nitric oxide in atherothrombosis. **Frontiers in Bioscience**, v. Volume, n. 13, p. 5323, 2008.

LUSTER, A. D.; ALON, R.; VON ANDRIAN, U. H. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. **Nature Immunology**, v. 6, n. 12, p. 1182–1190, dez. 2005.

MANCINI, S. J. et al. Canagliflozin inhibits interleukin-1 $\beta$ -stimulated cytokine and chemokine secretion in vascular endothelial cells by AMP-activated protein kinase-dependent and -independent mechanisms. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 5276, dez. 2018.

MITTAL, M. et al. Reactive Oxygen Species in Inflammation and Tissue Injury. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 20, n. 7, p. 1126–1167, mar. 2014.

MOHER, D. et al. Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (PRISMA-P) 2015 statement. **Systematic Reviews**, v. 4, n. 1, p. 1, dez. 2015.

NASCIMENTO, F. R. et al. New antineoplastic agent based on a dibenzoylmethane derivative: Cytotoxic effect and direct interaction with DNA. **Biophysical Chemistry**, v. 239, p. 1–6, ago. 2018.

NEWTON, K.; DIXIT, V. M. Signaling in Innate Immunity and Inflammation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, n. 3, p. a006049–a006049, 1 mar. 2012.

OECKINGHAUS, A.; GHOSH, S. The NF- B Family of Transcription Factors and Its Regulation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 1, n. 4, p. a000034–a000034, 1 out. 2009.

PALOMINO, D. C. T.; MARTI, L. C. Chemokines and immunity. **Einstein (São Paulo)**, v. 13, n. 3, p. 469–473, set. 2015.

PAVILLON, N.; SMITH, N. I. Immune cell type, cell activation, and single cell heterogeneity revealed by label-free optical methods. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 17054, dez. 2019.

POWELL, W. S.; ROKACH, J. Biosynthesis, biological effects, and receptors of hydroxyeicosatetraenoic acids (HETEs) and oxoeicosatetraenoic acids (oxo-ETEs) derived

from arachidonic acid. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1851, n. 4, p. 340–355, abr. 2015.

PURI, A. et al. Development and evaluation of topical microemulsion of dibenzoylmethane for treatment of UV induced photoaging. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 37, p. 1–12, fev. 2017.

RAJAMANICKAM, A. et al. Microbial Translocation Associated with an Acute-Phase Response and Elevations in MMP-1, HO-1, and Proinflammatory Cytokines in Strongyloides stercoralis Infection. **Infection and Immunity**, v. 85, n. 1, p. e00772-16, e00772-16, jan. 2017.

RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G. A. Prostaglandins and Inflammation. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 31, n. 5, p. 986–1000, maio 2011.

RUSHWORTH, S. A. et al. The high Nrf2 expression in human acute myeloid leukemia is driven by NF- $\kappa$ B and underlies its chemo-resistance. **Blood**, v. 120, n. 26, p. 5188–5198, 20 dez. 2012.

SANDERCOCK, P.; ROBERTS, I. Systematic reviews of animal experiments. **The Lancet**, v. 360, n. 9333, p. 586, ago. 2002.

SASAKI, F.; YOKOMIZO, T. The leukotriene receptors as therapeutic targets of inflammatory diseases. **International Immunology**, v. 31, n. 9, p. 607–615, 23 ago. 2019.

SCHIEBER, M.; CHANDEL, N. S. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. **Current Biology**, v. 24, n. 10, p. R453–R462, maio 2014.

SCHRÖDER, K.; WEISSMANN, N.; BRANDES, R. P. Organizers and activators: Cytosolic Nox proteins impacting on vascular function. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 109, p. 22–32, ago. 2017.

SHAHBAZI, S. et al. Drug Targets for Cardiovascular-Safe Anti-Inflammatory: In Silico Rational Drug Studies. **PLOS ONE**, v. 11, n. 6, p. e0156156, 3 jun. 2016.

SINGLETERY, K. et al. Effect of the  $\beta$ -diketones diferuloylmethane (curcumin) and dibenzoylmethane on rat mammary DNA adducts and tumors induced by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. p. 5, 1998.

SPRAGUE, A. H.; KHALIL, R. A. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. **Biochemical Pharmacology**, v. 78, n. 6, p. 539–552, set. 2009.

STEFANSON, A.; BAKOVIC, M. Dietary Regulation of Keap1/Nrf2/ARE Pathway: Focus on Plant-Derived Compounds and Trace Minerals. **Nutrients**, v. 6, n. 9, p. 3777–3801, 19 set. 2014.

SUN, S.-C. Non-canonical NF- $\kappa$ B signaling pathway. **Cell Research**, v. 21, n. 1, p. 71–85, jan. 2011.

SUN, S.-C. The noncanonical NF- $\kappa$ B pathway: The noncanonical NF- $\kappa$ B signaling pathway. **Immunological Reviews**, v. 246, n. 1, p. 125–140, mar. 2012.

SUN, S.-C.; CHANG, J.-H.; JIN, J. Regulation of nuclear factor- $\kappa$ B in autoimmunity. **Trends in Immunology**, v. 34, n. 6, p. 282–289, jun. 2013.

SZOLLOSI, D. E. et al. Current and novel anti-inflammatory drug targets for inhibition of cytokines and leucocyte recruitment in rheumatic diseases. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 70, n. 1, p. 18–26, jan. 2018.

TABRIZI, R. et al. The effects of curcumin-containing supplements on biomarkers of inflammation and oxidative stress: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials: Curcumin intake and inflammation. **Phytotherapy Research**, v. 33, n. 2, p. 253–262, fev. 2019.

TAKANO, K. et al. A dibenzoylmethane derivative protects against hydrogen peroxide-induced cell death and inhibits lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in cultured rat astrocytes. **Journal of Neuroscience Research**, v. 89, n. 6, p. 955–965, jun. 2011.

TAKANO, K. et al. A dibenzoylmethane derivative protects dopaminergic neurons against both oxidative stress and endoplasmic reticulum stress. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 293, n. 6, p. C1884–C1894, dez. 2007.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 805–820, mar. 2010.

TEIXEIRA, K. R. C. et al. Night workers have lower levels of antioxidant defenses and higher levels of oxidative stress damage when compared to day workers. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 4455, dez. 2019.

TONG, K. I. et al. Different Electrostatic Potentials Define ETGE and DLG Motifs as Hinge and Latch in Oxidative Stress Response. **Molecular and Cellular Biology**, v. 27, n. 21, p. 7511–7521, 1 nov. 2007.

TU, W. et al. The Anti-Inflammatory and Anti-Oxidant Mechanisms of the Keap1/Nrf2/ARE Signaling Pathway in Chronic Diseases. **Aging and disease**, v. 10, n. 3, p. 637, 2019.

TURNER, M. D. et al. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1843, n. 11, p. 2563–2582, nov. 2014.

UMAR, A. et al. Mechanisms of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in cancer prevention. **Seminars in Oncology**, v. 43, n. 1, p. 65–77, fev. 2016.

VELICHKOVA, M.; HASSON, T. Keap1 in adhesion complexes. **Cell Motility and the Cytoskeleton**, v. 56, n. 2, p. 109–119, out. 2003.

WANG, B. et al. Histone deacetylase inhibition activates transcription factor Nrf2 and protects against cerebral ischemic damage. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 52, n. 5, p. 928–936, mar. 2012.

WARDYN, J. D.; PONSFORD, A. H.; SANDERSON, C. M. Dissecting molecular cross-talk between Nrf2 and NF- $\kappa$ B response pathways. **Biochemical Society Transactions**, v. 43, n. 4, p. 621–626, 1 ago. 2015.

YOU, Y.-H. et al. Role of Nox2 in diabetic kidney disease. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 304, n. 7, p. F840–F848, 1 abr. 2013.

ZARGHI, A.; ARFAEI, S. Selective COX-2 Inhibitors: A Review of Their Structure-Activity Relationships. p. 30, 2011.

## CAPÍTULO 2

SÍNTESE E FARMACOCINÉTICA DO 2-BENZIL-1,3-DIFENIL-1,3-PROPANODIONA

## 1. INTRODUÇÃO

O processo inflamatório faz parte do mecanismo fisiopatológico não somente das doenças inflamatórias, mas de diversas doenças como as cardiovasculares, câncer e obesidade (KARCZEWSKI et al., 2018; QU; TANG; HUA, 2018; STEVEN et al., 2019). Nas últimas décadas, compostos com atividade anti-inflamatória vêm sendo descobertos, estudados e até mesmo disponibilizados ao mercado consumidor mundial, no entanto, todo esse processo é complexo e rigoroso (VANE; BOTTING, 1995; BRUNE; PATRIGNANI, 2015).

Os principais entraves envolvidos no processo de pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos envolvem os custos e o longo tempo gasto até sua aprovação para utilização. Estima-se que entre a descoberta do possível fármaco e sua efetiva chegada ao mercado são necessários entre 10 e 15 anos de trabalho. Isso porque, para que um medicamento seja comercializado, ele precisa obedecer a regulamentos rigorosos que são estabelecidos pelas diferentes agências reguladoras dos locais onde se pretende vendê-los (PAMMOLLI; MAGAZZINI; RICCABONI, 2011).

Mesmo lançando mão da utilização de métodos computacionais como as abordagens *in silico* para o auxílio no descobrimento de novos medicamentos (RAO; SRINIVAS, 2011; WADOOD et al., 2013; LEELANANDA; LINDERT, 2016), estima-se que mundialmente são gastos entre US\$ 161 milhões e US\$ 4,54 bilhões de dólares em pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos. Somente nos Estados Unidos, entre os anos de 2009 e 2018, foram gastos valores que variam entre US\$ 314 milhões e US\$ 2,8 bilhões de dólares (WOUTERS; MCKEE; LUYTEN, 2020; SCHLANDER et al., 2021).

Nesse período, chegaram ao mercado 355 diferentes tipos de agentes terapêuticos. Destes, 271 são agentes farmacológicos direcionados principalmente para áreas terapêuticas como oncologia, metabolismo e endocrinologia, cardiologia, doenças autoimunes e inflamatórias. Em sua maioria, as vias de administração desses novos medicamentos, são a via oral (53%), seguida da via intramuscular e subcutânea (25%) e a via intravenosa (12%). As demais vias de administração de medicamentos ocuparam apenas 10% dos novos registros (WOUTERS; MCKEE; LUYTEN, 2020).

Quando se administra um fármaco, o principal objetivo é que ele seja absorvido, transportado pela corrente sanguínea, exerça sua ação no tecido ou célula alvo e seja excretado. Portanto, sua via de administração é um fator determinante de sua farmacocinética, farmacodinâmica e toxicidade e a forma como um medicamento será oferecido é definida não somente por conveniência, mas de acordo com as características farmacológicas e físico-químicas (KUMAR; SURAPANENI, 2001; ZHANG; TANG, 2018).

Existem diferentes rotas para administração de medicamentos em humanos, são exemplos, a enteral (oral, sublingual e retal); parenteral (intravenosa, intramuscular e subcutânea); tópica (epidérmica, transdérmica), intranasal, inalatória e intravaginal. Em alguns casos, uma característica desejável para uma via de administração de um medicamento é evitar que ele sofra ação do metabolismo de primeira passagem (HOMAYUN; LIN; CHOI, 2019b). O metabolismo de primeira passagem é definido como um processo enzimático onde medicamentos podem ser metabolizados em tecidos específicos podendo inativar ou comprometer a ação dos medicamentos por reduzir a concentração do princípio ativo no seu sítio de ação ou até mesmo na corrente sanguínea. Essa metabolização acontece principalmente no fígado, mas pode ocorrer em outros tecidos metabolicamente ativos como pulmão e trato gastrointestinal (WU et al., 2011; DAI et al., 2019; FRANCO et al., 2020).

Algumas vias de administração apresentam vantagens pois evitam que o fármaco sofra ação do metabolismo de primeira passagem após ser absorvido, resultando no aumento de sua biodisponibilidade (TANNER; MARKS, 2008). Uma das opções de rota de entrega que apresenta essa capacidade é a via transdérmica, que utiliza a pele como caminho para absorver medicamentos até a circulação sistêmica. Além disso, a via transdérmica representa uma rota não invasiva e segura para entrega de medicamentos, apesar de ainda representar uma pequena parcela das vias utilizadas para entrega de medicamentos (RASTOGI; YADAV, 2012; GAIKWAD, 2013; LEPPERT et al., 2018).

É nesse sentido que o presente capítulo tem como objetivo apresentar a síntese e a farmacocinética do 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona administrado por via transdérmica e intraperitoneal com foco na sua absorção e distribuição tecidual.

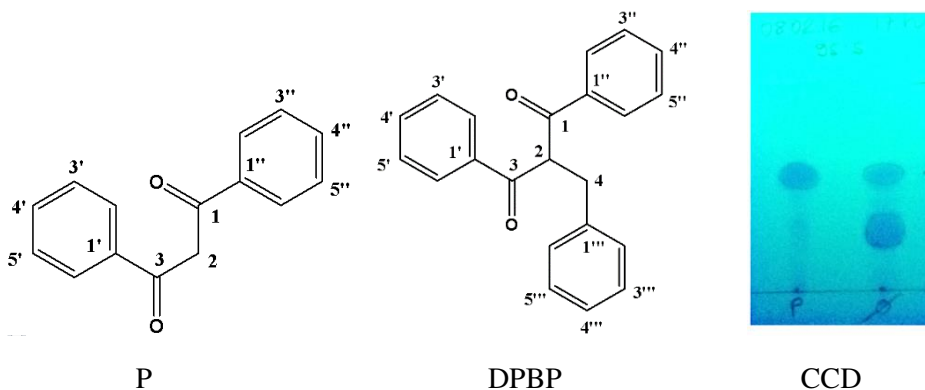
## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. Síntese, isolamento e identificação do 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona (DPBP)**

A síntese do composto 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona (DPBP), anteriormente nomeado de 1,3-difenil-2-benzil-1,3-propanodiona, foi realizada por meio de uma reação de alquilação conforme metodologia descrita por Nascimento et al., 2018. Para isso, em um balão redondo de 50mL, foi adicionado 1,34 mmol de DBM, 4,02 mmol de carbonato de potássio ( $K_2CO_3$ ) e 15 mL de acetona ( $(CH_3)_2CO$ ). A mistura foi deixada sob agitação durante 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 1,34 mmol de brometo de benzila e a mistura reacional foi agitada vigorosamente durante 144h e, então, foi filtrada para remoção dos sólidos em suspensão e o solvente evaporado.

A reação foi acompanhada por meio de cromatografia de camada delgada (CCD),

utilizando-se cromatofolhas de alumínio sílica gel (G F254 0,2 nm Art. 1.05554 Merck), solventes hexano/acetato de etila (4:1, v/v) como fase móvel e revelador lâmpada de UV nos comprimentos de onda 254 e 366 nm. O resíduo obtido foi purificado em coluna cromatográfica (CC, hexano/acetato de etila, 95:5, v/v), fornecendo o produto alquilado desejado (DPBP), Figura 1.



**Figura 1.** Cromatografia de camada delgada (CCD) da síntese do derivado de dibenzoilmetano P: dibenzoilmetano (DBM); composto alquilado (DPBP).

A identificação dos compostos foi realizada por ressonância magnética nuclear (RMN). Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , DEPT, foram obtidos em espectrômetros 400 da Bruker no Departamento de Química da UFMG. Os solventes utilizados foram clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) e água deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ), usando-se como referência interna o tetrametilsilano (TMS) (APÊNDICE).

## 2.2 Preparo da formulação transdérmica

A formulação transdérmica foi obtida incorporando-se o dibenzoilmetano ou 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona em uma base transdérmica comercial (Pentrvan<sup>®</sup>). Após a incorporação dos ativos, seguindo as boas práticas de fabricação, estes foram acondicionados em potes, previamente higienizados e armazenados na geladeira até o momento de uso.

## 2.3 Propriedades farmacocinéticas da 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona: estudo *in silico*

O estudo *in silico* para verificação das propriedades farmacocinéticas do composto DPBP foi realizado com o auxílio dos *softwares* online *Molinspiration Cheminformatics* e *pkCSM*. Com o primeiro, foi possível desenhar a molécula, prever sua bioatividade (capacidade de ser ligante de receptor acoplado a proteína G (GPCR), inibidor de cinases e modulador de canais iônicos e/ou receptores nucleares) e gerar o arquivo SMILES. Em

seguida, este arquivo foi carregado no *software* online pkCSM para predição de suas propriedades farmacocinéticas como absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade.

## 2.4 Farmacocinética da 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona: estudo in vivo

### 2.4.1 Desenho experimental

#### 2.4.1.1 Animais

Os protocolos experimentais foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Viçosa (ANEXOS) com processo número: 76/2016. Foram utilizados ratos (machos, *Wistar*, 6 animais/grupo, pesando entre 250 e 300g) fornecidos pelo Biotério do Central da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa (MG).

Até o início dos experimentos, os animais foram mantidos em caixas de polietileno, consumindo ração comercial (Presence/InVivo® Nutrição Animal) e água destilada *ad libitum*. A temperatura da sala de experimentação foi controlada em  $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e ciclo claro/escuro de 12 horas. O esquema de randomização dos animais foi gerado utilizando-se o software online Reserch Randomizer® disponível no site < <https://www.randomizer.org/>>. Média de peso dos animais semelhantes entre os grupos experimentais foi utilizada para avaliar a eficácia da randomização.

#### 2.4.1.2 Grupos experimentais

Para este experimento, foram utilizados 6 animais/grupo experimental. As vias de administração intraperitoneal e transdérmica foram utilizadas como forma de entrega do 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona. Para via intraperitoneal, o DPBP foi diluído em dimetilsulfóxido a 5% e os animais receberam uma injeção intraperitoneal contendo 1mg de DPBP/kg de peso. Já a administração por via transdérmica contou com a utilização do veículo transdérmico Pentravan® ao qual o DPBP foi incorporado e a dose administrada foi de 2mg/kg de peso dos animais foi administrada na pata dos ratos. Em seguida, os animais foram eutanasiados de acordo com os grupos experimentais e tempos descritos abaixo:

G1 – controle negativo intraperitoneal (água destilada + dimetilsulfóxido 5%);

G2 – 0,5h intraperitoneal (DPBP – 1mg/Kg de peso do animal);

G3 – 1h intraperitoneal (DPBP – 1mg/Kg de peso do animal);

G4 – 2h intraperitoneal (DPBP – 1mg/Kg de peso do animal);

- G5 – 3h intraperitoneal (DPBP – 1mg/Kg de peso do animal);
- G6 – 6h intraperitoneal (DPBP – 1mg/Kg de peso do animal);
- G7 – 12h intraperitoneal (DPBP – 1mg/Kg de peso do animal);
- G8 – 24h intraperitoneal (DPBP – 1mg/Kg de peso do animal);
- G9 – 48h intraperitoneal (DPBP – 1mg/Kg de peso do animal);
- G10 – controle negativo transdérmico (Pentravan<sup>®</sup>);
- G11 – 0,5h transdérmico (Pentravan<sup>®</sup> + DPBP – 2mg/Kg de peso do animal);
- G12 – 1h transdérmico (Pentravan<sup>®</sup> + DPBP – 2mg/Kg de peso do animal);
- G13 – 2h transdérmico (Pentravan<sup>®</sup> + DPBP – 2mg/Kg de peso do animal);
- G14 – 3h transdérmico (Pentravan<sup>®</sup> + DPBP – 2mg/Kg de peso do animal);
- G15 – 6h transdérmico (Pentravan<sup>®</sup> + DPBP – 2mg/Kg de peso do animal);
- G16 – 12h transdérmico (Pentravan<sup>®</sup> + DPBP – 2mg/Kg de peso do animal);
- G17 – 24h transdérmico (Pentravan<sup>®</sup> + DPBP – 2mg/Kg de peso do animal);

Ao final de cada tempo de administração, os ratos foram anestesiados com a utilização de Isoflurano 100% (Isoforine, Cristália<sup>®</sup>), em aparelho de anestesia inalatória conforme resolução 714, de 20 de julho de 2002 e submetidos à eutanásia por punção cardíaca.

#### 2.4.2 Preparo da curva padrão

A solução estoque foi preparada solubilizando-se o DPBP em acetona (300ng/mL). Para construção da curva padrão, foram utilizadas diluições dessa solução estoque correspondentes a: 1ng/mL; 10ng/mL; 19ng/mL; 75ng/mL e 150ng/mL. As diluições foram injetadas automaticamente em sistema UPLC-MS/MS e uma equação da reta foi estabelecida ( $y = 198,98x + 831,99$ ;  $r^2 = 0,9995$ ).

#### 2.4.3 Condições cromatográficas e padronização do método

Para identificação e quantificação sérica e hepática do 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona, foi utilizado sistema de cromatografia líquida acoplado ao espectrômetro de massa triplo quadrupolo modelo 6430 (LC-MS QqQ), constituído por um cromatógrafo líquido de Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC), modelo 1200 Infinity series e detector

UV. As separações cromatográficas foram realizadas em temperatura de  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$  utilizando-se uma coluna Zorbax Eclipse Plus C18 (1,8  $\mu\text{m}$ , 2,1m x 50mm) e uma coluna de guarda Zorbax SB-C18, 1,8  $\mu\text{m}$  (Agilent). A fase móvel foi constituída por A (água ultrapura) e B (acetonitrila). As condições de análise empregadas foram: volume de injeção de 5 $\mu\text{L}$ ; vazão de 0,250 mL/min; tempo de corrida de 20 minutos; eluição por gradiente com os solventes variando de 0 a 5min A-80% e B-20%, 5 a 13min A-60% e B-40%, 13 a 17min A-5% e B-95% e 18 a 20 min A-80% e B-20%.

#### 2.4.4 Processamento das amostras

O sangue foi coletado em tubos para coleta de sangue a vácuo com gel separador, foi centrifugado em centrífuga refrigerada a 3500rpm durante 15 minutos e o soro foi armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  até as análises. Uma alíquota de 200 $\mu\text{L}$  do soro foi adicionada a 800 $\mu\text{L}$  da solução de acetato de etila/metanol (95:5 v/v), agitada em vórtex e centrifugada a 10.000 G durante 15 minutos. O sobrenadante foi filtrado em filtro de nylon 0,22 $\mu\text{m}$  e as amostras foram injetadas automaticamente no sistema UPLC-MS/MS.

O fígado foi coletado e armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  até as análises. Uma porção de 100mg do fígado foi pesada, foi adicionado 1000 $\mu\text{L}$  da solução de acetato de etila/metanol (95:5 v/v) e processada em homogeneizador de tecidos celulares tipo Potter (modelo NT-136, com pistilo em PTFE). O homogenato de fígado foi centrifugado a 10.000 G durante 30 minutos. Em seguida, o sobrenadante da primeira centrifugação foi coletado, transferido para outro eppendorf e centrifugado mais uma vez por 30 minutos. Por fim, o sobrenadante foi filtrado em filtro de nylon 0,22 $\mu\text{m}$  e as amostras foram injetadas automaticamente no sistema UPLC-MS/MS.

#### 2.4.5 Quantificação do 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona

O cálculo da área abaixo da curva foi realizado com auxílio do software *Skyline* e a quantificação do 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona se deu por meio da conversão da área abaixo da curva de cada pico de maior intensidade na concentração plasmática e hepática de DPBP.

#### 2.4.6 Análises estatísticas

Os dados foram organizados com auxílio do *software* Excel, versão 2016 e as análises estatísticas foram realizadas com auxílio dos *softwares* Stata, versão 13.0 e GraphPad Prism, versão 7. A igualdade de variâncias das variáveis foi verificada pelo teste de Barlet e a análise de variância com um fator (One-way ANOVA) seguida pelo post-hoc de Tukey foi utilizada para identificar diferenças estatísticas entre os grupos experimentais. Foi adotado como nível de significância estatística um  $\alpha$  de 0,05.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Propriedades farmacocinéticas da 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona

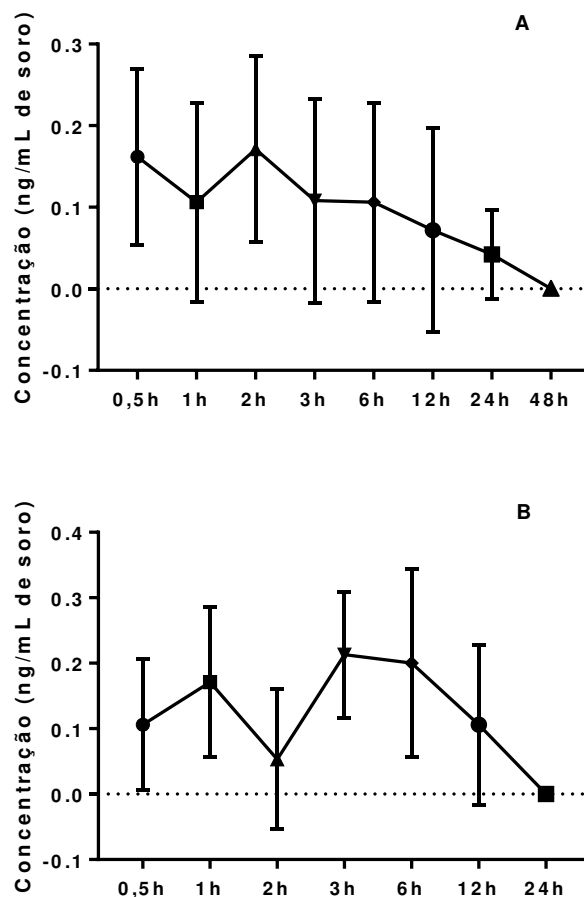
As análises *in silico* estimaram que o produto sintético possui peso molecular de 314,4 g/mol, baixa solubilidade em água (0,565  $\mu\text{mol/L}$ ), porém, apresenta alta absorção intestinal em humanos (98,7%) pela permeabilidade a células CaCo2. A toxicidade oral aguda para roedores (LD50) é de 2,933 mols/kg enquanto a toxicidade oral crônica (LOAEL) é de 2,431 mols/kg/dia. Os dados indicam que o composto possui atividade hepatotóxica, no entanto, estudos realizados anteriormente pelo grupo de pesquisa não revelaram tais características (NASCIMENTO et al., 2018, 2022).

Em relação à bioatividade do composto, valores de *score* calculados pelo programa *Molinspiration Cheminformatics* maiores que 0,0 sugerem que a atividade da molécula é maior contra aquele determinado alvo. Valores entre -5,0 e 0,0 apontam que a atividade é moderada, enquanto valores ainda menores que -5,0 indicam inatividade da molécula (CHEMINFORMATICS, 2020). Os resultados indicam que o composto pode possuir alta atividade contra alvos de medicamentos como ligantes de receptores acoplados a proteína G (GPCR) (0,03), ligantes de receptores nucleares (0,01), inibidores de proteases (0,04), inibidores de enzimas (0,01) e atividade moderada como modulador de canais iônicos (-0,01) e inibidores de cinases (-0,17). Além disso, não viola nenhum dos critérios estabelecidos pela regra dos 5 de Lipinski.

### 3.2 Farmacocinética da 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona

Os resultados das análises realizadas por UPLC-MS/MS confirmaram a pureza e presença do composto 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona no soro e fígado dos animais (APÊNCIDES – Figuras 36 a 44) e as figuras 2 e 3 apresentam as concentrações séricas e hepáticas deste composto, respectivamente, após sua administração por via intraperitoneal e transdérmica.

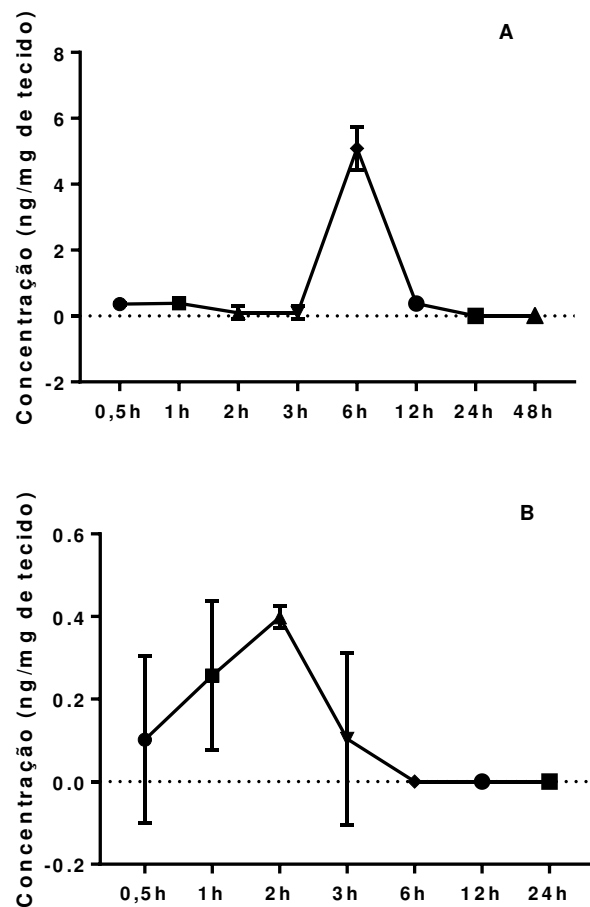
No que diz respeito a concentração sérica do DPBP, não se obteve diferença estatisticamente significativa entre os tempos avaliados em nenhuma das vias de administração. Esse resultado demonstra que as concentrações séricas do DPBP se mantêm detectáveis durante 24h para administração por via intraperitoneal e por 12h para administração por via transdérmica até não serem mais identificadas nos tempos 48h e 24h, respectivamente (figura 2).



**Figura 2.** Concentração sérica do 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona após sua administração por via intraperitoneal (A) e transdérmica (B).

Por outro lado, em relação as concentrações hepáticas após a administração do DPBP por via intraperitoneal, percebe-se que os valores encontrados são baixos na maioria dos tempos

avaliados. No entanto, no tempo de 6h foi possível encontrar um aumento estatisticamente significativo na quantidade do composto no tecido. Porém, 6h depois (tempo de 12h após a administração) as concentrações voltam a serem baixas até que não são mais detectáveis [F (7, 24) = 189,8;  $p < 0,0001$ ]. Já a via de administração transdérmica, apresenta um aumento da concentração hepática gradativo até as primeiras 2h pós administração até que deixa de ser detectada a partir do tempo de 6h [F (6, 21) = 5,532;  $p < 0,001$ ].



**Figura 3.** Concentração hepática do 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona após sua administração por via intraperitoneal (A) e transdérmica (B).

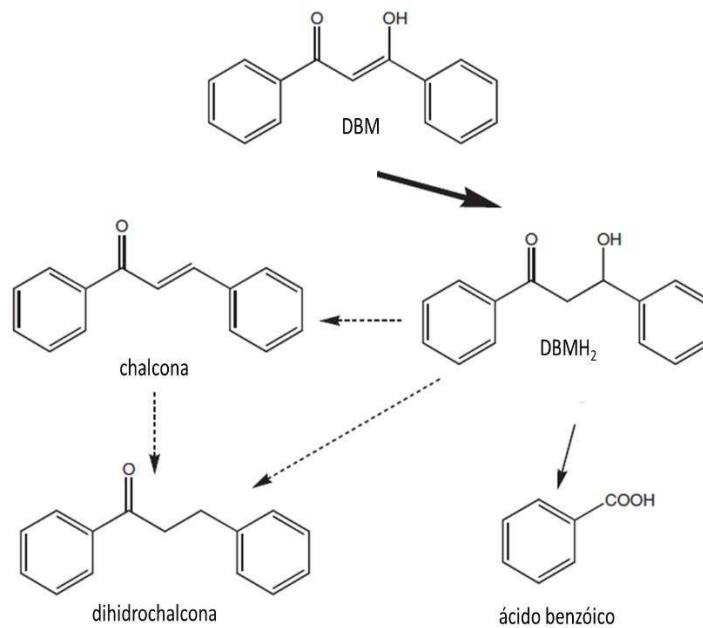
Ao se administrar uma molécula pela via intraperitoneal, a depender do seu peso molecular, espera-se que ela seja absorvida por capilares ou vasos linfáticos peritoneais e transportada até a circulação sistêmica por meio da veia porta. Dessa forma, assim como medicamentos administradas pela via oral, presume-se que ao ser absorvida, essa molécula passará pelo fígado e será metabolizada, podendo se tornar ativa, inativa, pouco ativa e até mesmo ser direcionada para excreção (AL SHOYAIB; ARCHIE; KARAMYAN, 2020). Por outro lado, quando se lança mão da rota transdérmica, essa metabolização será evitada ou

retardada, uma vez que a formulação administrada não passará inicialmente pelo trato gastrointestinal ou fígado (ITA; UKAOMA, 2022).

Este é o primeiro trabalho que avalia a farmacocinética e distribuição tecidual do DPBP e, diferentemente do esperado, os resultados apresentados na figura 3 evidenciam que quando o DBBP foi administrado por via intraperitoneal sua passagem pelo fígado foi mais tardia, acontecendo 6h após a injeção. Em contrapartida, quando administrado por via transdérmica, teve uma passagem nos momentos iniciais (até 3h após administração).

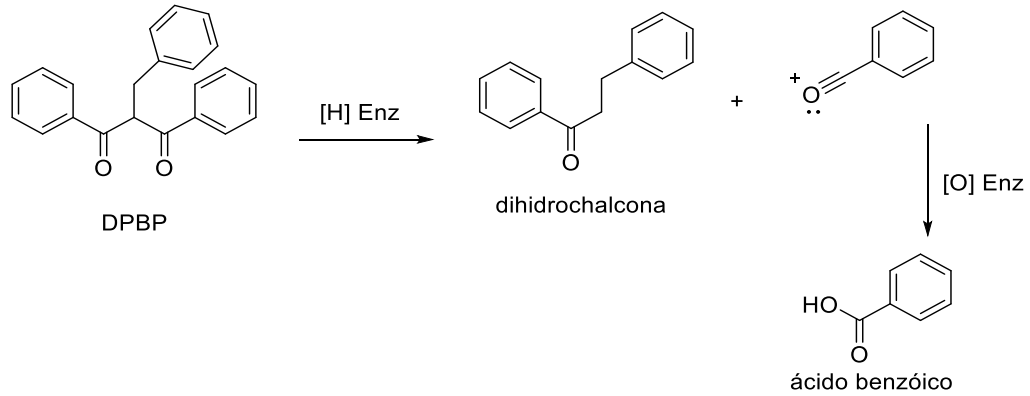
Essa diferença no tempo em que a molécula demora para ser detectada no fígado pode influenciar nas suas propriedades farmacológicas, reduzindo sua disponibilidade e até mesmo sua atividade biológica. Não foi possível investigar *in vivo* a rota de metabolização do 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona, no entanto, baseando-se na rota metabólica do dibenzoilmetano observada por Lin et al. (2005), foram construídas duas propostas de rotas de metabolização do DPBP por microsossomos hepáticos.

Nos achados descritos por Lin et al. (2005) o DBM inicialmente é reduzido a 1,3-difenil-3-hidroxi-1,3-propanona (DBMH<sub>2</sub>), seu principal metabolito. Em seguida, DBMH<sub>2</sub> pode seguir três caminhos: 1) sofrer desidratação e formar chalcona e posteriormente sofrer redução formando dihidrochalcona; 2) sofrer desidratação e formar dihidrochalcona; e 3) sofrer uma clivagem oxidativa e formar ácido benzóico (figura 4).



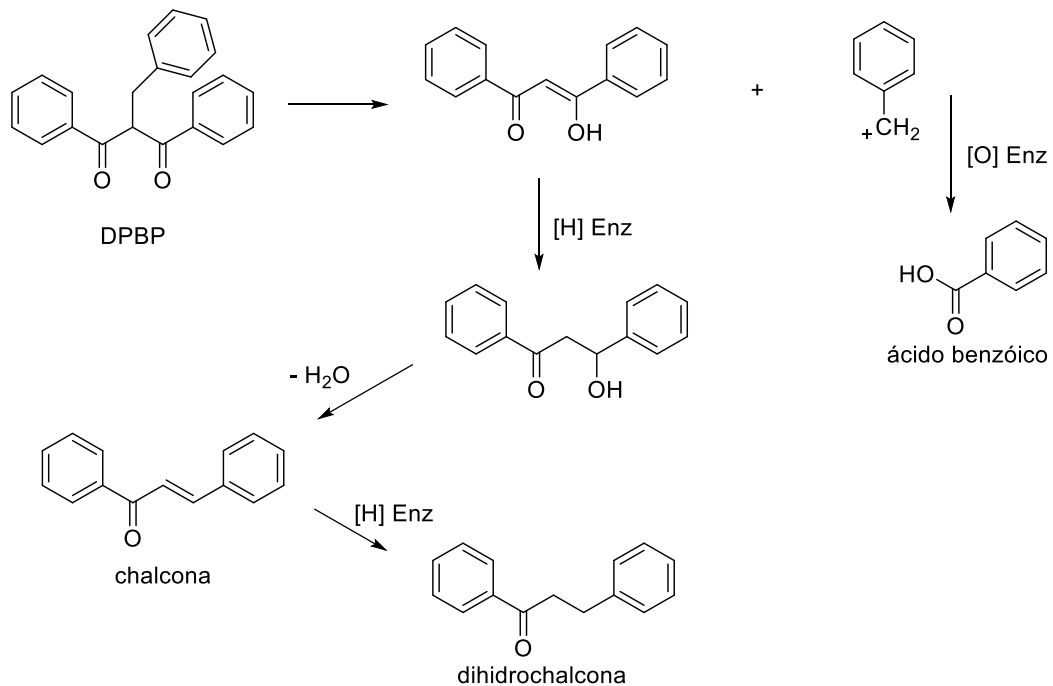
**Figura 4.** Proposta de metabolização do dibenzoilmetano (DBM) por microsossomos hepáticos de ratos. (Adaptado de Lin et al., 2005).

Na primeira proposta de metabolização hepática do DPBP, ele sofreria uma clivagem oxidativa formando dihidrochalcona e ácido benzóico (figura 5).



**Figura 5.** Primeira proposta de metabolização do 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona (DPBP) por microsossomos hepáticos de ratos.

Na segunda proposta, inicialmente o DPBP perderia o grupamento benzila adicionado formando DBM e ácido benzóico. O DBM formado sofreria uma reação de desidratação formando chalcona que, em seguida, seria reduzida a dihidrochalcona (figura 6).



**Figura 6.** Segunda proposta de metabolização do 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona (DPBP) por microsossomos hepáticos de ratos.

#### **4. CONCLUSÃO**

Dessa forma, podemos concluir que as vias de administração do 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona foram eficazes para sua absorção até a corrente sanguínea e seu transporte até o fígado. Independentemente da rota utilizada, a concentração sérica do DPBP se manteve detectável por 12 horas ou mais. No entanto, inesperadamente, as concentrações hepáticas do DPBP foram maiores no momento tardio quando administrado por via intraperitoneal e no momento inicial quando administrado pela via transdérmica.

## 5. REFERÊNCIAS

AL SHOYAIB, A.; ARCHIE, S. R.; KARAMYAN, V. T. Intraperitoneal Route of Drug Administration: Should it Be Used in Experimental Animal Studies? **Pharmaceutical Research**, v. 37, n. 1, p. 12, jan. 2020.

BRUNE; PATRIGNANI, P. New insights into the use of currently available non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Journal of Pain Research**, p. 105, fev. 2015.

DAI, T. et al. Studies on oral bioavailability and first-pass metabolism of withaferin A in rats using LC–MS/MS and Q-TRAP. **Biomedical Chromatography**, v. 33, n. 9, set. 2019.

FRANCO, V. et al. The Interplay Between Liver First-Pass Effect and Lymphatic Absorption of Cannabidiol and Its Implications for Cannabidiol Oral Formulations. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 59, n. 12, p. 1493–1500, dez. 2020.

HOMAYUN, B.; LIN, X.; CHOI, H.-J. Challenges and Recent Progress in Oral Drug Delivery Systems for Biopharmaceuticals. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 3, p. 129, 19 mar. 2019.

ITA, K.; UKAOMA, M. Progress in the transdermal delivery of antimigraine drugs. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 68, p. 103064, fev. 2022.

KARCZEWSKI, J. et al. Obesity and inflammation. **European Cytokine Network**, v. 29, n. 3, p. 83–94, set. 2018.

KUMAR, G. N.; SURAPANENI, S. Role of drug metabolism in drug discovery and development. **Medicinal Research Reviews**, v. 21, n. 5, p. 397–411, set. 2001.

LEELANANDA, S. P.; LINDERT, S. Computational methods in drug discovery. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 12, p. 2694–2718, 12 dez. 2016.

LEPPERT, W. et al. Transdermal and Topical Drug Administration in the Treatment of Pain. **Molecules**, v. 23, n. 3, p. 681, 17 mar. 2018.

LIN, C. C. et al. Metabolic pathway of dibenzoylmethane, a  $\beta$ -diketone analogue of curcumin, by NADPH-dependent cytochrome P450 enzymes in mouse liver microsomes, **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 13, n.3, p. 284–288, 2005.

NASCIMENTO, F. R. et al. Dibenzoylmethane derivative inhibits melanoma cancer in vitro and in vivo through induction of intrinsic and extrinsic apoptotic pathways. **Chemico-Biological Interactions**, v. 351, p. 109734, jan. 2022.

NASCIMENTO, F. R. et al. New antineoplastic agent based on a dibenzoylmethane derivative: Cytotoxic effect and direct interaction with DNA. **Biophysical Chemistry**, v. 239, p. 1–6, ago. 2018.

PAMMOLLI, F.; MAGAZZINI, L.; RICCABONI, M. The productivity crisis in pharmaceutical R&D. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 10, n. 6, p. 428–438, jun. 2011.

QU, X.; TANG, Y.; HUA, S. Immunological Approaches Towards Cancer and Inflammation: A Cross Talk. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 563, 20 mar. 2018.

RAO, V. S.; SRINIVAS, K. Modern drug discovery process: An in silico approach. 5. v. 25, n. 2, p. 6, 2011.

RASTOGI, V.; YADAV, P. Transdermal drug delivery system: An overview. **Asian Journal of Pharmaceutics**, v. 6, n. 3, p. 161, 2012.

RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G. A. Prostaglandins and Inflammation. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 31, n. 5, p. 986–1000, maio 2011a.

SCHLANDER, M. et al. How Much Does It Cost to Research and Develop a New Drug? A Systematic Review and Assessment. **PharmacoEconomics**, v. 39, n. 11, p. 1243–1269, nov. 2021.

STEVEN, S. et al. Vascular Inflammation and Oxidative Stress: Major Triggers for Cardiovascular Disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, p. 1–26, 23 jun. 2019.

TANNER, T.; MARKS, R. Delivering drugs by the transdermal route: review and comment. **Skin Research and Technology**, v. 14, n. 3, p. 249–260, ago. 2008.

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

WADOOD, A. et al. In-silico drug design: An approach which revolutionarised the drug discovery process. **OA Drug Design and Delivery**, v. 1, n. 1, set. 2013.

WOUTERS, O. J.; MCKEE, M.; LUYTEN, J. Estimated Research and Development Investment Needed to Bring a New Medicine to Market, 2009-2018. **JAMA**, v. 323, n. 9, p. 844, 3 mar. 2020.

WU, B. et al. First-Pass Metabolism via UDP-Glucuronosyltransferase: a Barrier to Oral Bioavailability of Phenolics. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 9, p. 3655–3681, set. 2011.

ZHANG, Z.; TANG, W. Drug metabolism in drug discovery and development. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 8, n. 5, p. 721–732, set. 2018.

## CAPÍTULO 3

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO GEL TRANSDÉRMICO CONTENDO  
DIBENZOILMETANO OU 2-BENZIL-1-3-DIFENIL-1,3-PROPANODIONA NA DOENÇA  
INFLAMATÓRIA INTESTINAL

## 1. INTRODUÇÃO

A doença inflamatória intestinal (DII) é caracterizada pela inflamação do trato gastrointestinal que pode se manifestar em dois principais fenótipos: colite ulcerativa (CU) e Doença de Crohn (DC). Tais fenótipos podem ser diferenciados de acordo com a região do trato gastrointestinal afetada; distribuição das lesões; características histológicas; características macroscópicas e sintomatologia. A tabela 3 apresenta as principais diferenças entre a CU e a DC.

**Tabela 1.** Principais características das doenças inflamatórias intestinais.

	<b>Colite ulcerativa</b>	<b>Doença de Crohn</b>
Área afetada	Cólon	Todo o trato gastrointestinal
Distribuição das lesões	Continua	-
Histologia	Mucosa/submucosa Abscesso de criptas Úlceras superficiais	Granulomas transmuralis Úlceras aftóides
Características macroscópicas	Friabilidade da mucosa Pseudopolipos Perda da haustra	Fístulas
Sintomatologia	Diarreia sanguinolenta Dor abdominal Perda de peso	Diarreia Dor abdominal Perda de peso Febre

Fonte: Adaptado de Thoreson; Cullen, 2007

Além de poder atingir todo o trato gastrointestinal, as DII podem ocasionar manifestações extras intestinais capazes de acometer entre 5 e 50% dos pacientes diagnosticados. Entre os principais tecidos e órgãos que podem ser afetados destacam-se: cartilagem (artropatias); ossos (redução da densidade mineral óssea e osteoporose); olhos (uveíte anterior e episclerite); pele (eritema nodoso, pioderma gangrenoso), fígado (colangite esclerosante primária e amiloidose hepática) e pâncreas (pancreatite) (OTT; SCHÖLMERICH, 2013; ANNESE, 2019).

A etiologia das DII em humanos permanece ainda não muito bem esclarecida, todavia, estudos epidemiológicos vêm sugerindo que a susceptibilidade genética é o principal fator que contribui com o desenvolvimento de DII destacando-se o histórico familiar como importante fator de risco. Outros fatores, assim como imunológicos e ambientais (tabagismo e padrão

alimentar), também têm sido relatados como explicações para o aparecimento de tais patologias (BONEN;CHO, 2003; THORESON;CULLEN, 2007).

A fisiopatologia das DII envolve o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) por receptores do tipo toll ou proteínas citoplasmáticas como NOD1 e NOD2. Tal reconhecimento ativa cascatas de fosforilação que vão resultar na ativação e translocação de NF- $\kappa$ B para o núcleo, onde acontecerá a indução da transcrição de genes pró-inflamatórios. Assim, como resposta celular, o sistema imune aumenta a produção de citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), Interferon-gama (INF- $\gamma$ ), Interleucina (IL)-12, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-13 e IL-17 que agirão como os efetores no processo inflamatório característico das DII (NEURATH et al., 2014).

O estresse oxidativo, que sucede de um desequilíbrio entre a geração de compostos oxidantes e a atuação dos sistemas de defesa antioxidante, é outra resposta significativa para o surgimento da doença. Esse desequilíbrio que está envolvido com o aparecimento de sinais e sintomas da DII, incluindo diarreia, megacólon tóxico e dor abdominal (DAMIANI, 2006; BARBOSA et al., 2010). Antioxidantes de origem endógena, como as enzimas superóxido dismutase, glutathiona peroxidase e s-tranferase, e catalase, são capazes de combater o estresse oxidativo na mucosa intestinal. Toda via, o processo inflamatório requer um aumento da demanda por estes importantes antioxidantes, resposta que, nem sempre, é atendida. Como resultado, gera-se uma desigualdade entre os fatores pró-oxidantes e antioxidantes, resultando assim em lesões no epitélio intestinal (TORRES et al., 2011; MANDALARI et al., 2011; MOURA et al., 2015).

Dado a fisiopatologia complexa das DII, o objetivo do tratamento é controlar o processo inflamatório, por meio de terapia medicamentosa ou cirurgia, com vistas em reduzir os sinais e sintomas característicos da doença. A terapia medicamentosa pode envolver o uso de medicamentos anti-inflamatórias; corticosteroides; imunossupressores; antibióticos; anticorpos monoclonais; analgésicos, anticolinérgicos; antidiarreicos; e suplementos de minerais, vitaminas, ácidos graxos ômega-3 e probióticos. Somente quando tais medidas não são eficazes em reverter os sinais e sintomas característicos das DII, o tratamento cirúrgico é indicado (PITHADIA; JAIN, 2011).

A utilização da via oral como rota de administração de medicamentos em pacientes com DII pode ser prejudicada em função das dificuldades de absorção geradas pelo processo inflamatório e da diarreia. Nesse sentido, rotas alternativas para administração da terapia medicamentosa como a transdérmica devem ser exploradas. A utilização da via transdérmica pode ser vantajosa principalmente por evitar a passagem dos medicamentos pelo trato

gastrointestinal, facilitando sua absorção e ação tecidual. Assim, este capítulo tem como objetivo investigar a atividade antioxidante de um gel transdérmico contendo 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona em um modelo animal para doença inflamatória intestinal.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Desenho experimental

#### 2.1.1 Animais

A IL-10 é uma citocina importantíssima para manutenção da homeostase intestinal. Em animais normais, a IL-10 regula a resposta inflamatória mediada por linfócitos Th1 e Th17, no entanto, em animais knockout a ausência da produção dessa interleucina resulta no não contrabalanceamento dessa resposta inflamatória e o desenvolvimento da colite acontece em função do aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias em resposta as bactérias presentes no intestino (KEUBLER et al., 2015). A colite desenvolvida por esses animais se assemelha em aspectos histológicos, fisiológicos e bioquímicos da colite desenvolvida por humanos, fazendo desse modelo animal uma importante ferramenta para experimentos destinados a avaliação das doenças inflamatórias intestinais (KENNEDY et al., 2002).

Foram utilizados 42 camundongos fêmeas (*IL10<sup>-/-</sup>*), recém-desmamadas, com 28 dias de idade, peso médio de 18g, obtidos do Biotério do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa (MG). Os animais, até o final do experimento, ficaram mantidos em caixas de polietileno, consumindo ração comercial (Presence/InVivo® Nutrição Animal) e água destilada *ad libitum*. A temperatura da sala de experimentação foi controlada em 22°C ± 3°C, com ciclo claro/escuro de 12 horas.

#### 2.1.2 Grupos experimentais

Na 16ª semana de vida, os animais foram divididos em 7 grupos experimentais, contendo 6 animais em cada grupo, de forma randomizada, de modo que não houvesse diferença maior que 3,0 g entre as médias dos pesos dos grupos, atendendo à recomendação da AOAC (1997). O esquema de randomização dos animais foi gerado utilizando-se o *software* online Reserch Randomizer® disponível no site < <https://www.randomizer.org/>>. Média de peso dos animais semelhantes entre os grupos experimentais foi utilizada para avaliar a eficácia da randomização. Em seguida, os animais foram tricomizados na região dorsal distal, com auxílio de lâmina cortante, em uma área de 2 cm<sup>2</sup> e as tricomizações subsequentes aconteceram semanalmente.

Foram utilizados os seguintes grupos experimentais: 1) **controle negativo** (veículo via transdérmica - Pentravan<sup>®</sup>); 2) **DBM 2** (veículo + dibenzoilmetano 2 mg/kg via transdérmica); 3) **DBM 4** (veículo + dibenzoilmetano 4 mg/kg via transdérmica); 4) **DBM 8** (veículo + dibenzoilmetano 8 mg/kg via transdérmica); 5) **DPBP 2** (veículo + derivado de dibenzoilmetano 2 mg/kg via transdérmica); 6) **DPBP 4** (veículo + derivado de dibenzoilmetano 4 mg/kg via transdérmica); 7) **DPBP 8** (veículo + derivado de dibenzoilmetano 8 mg/kg via transdérmica);

### 2.1.3 Eutanásia dos animais

Ao final de 4 semanas de experimento, os camundongos foram pesados e ficaram em jejum por 12 horas. Eles foram anestesiados (com a utilização de Isoflurano 100%, Isoforine, Cristália<sup>®</sup>, em aparelho de anestesia inalatória conforme resolução 714, de 20 de julho de 2002) e submetidos à eutanásia por punção cardíaca. Os intestinos dos animais foram retirados e pesados. Amostras dos intestinos foram fixadas em formaldeído tamponado 10% e o restante imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em ultrafreezer à temperatura de -80°C até o início das análises de estresse oxidativo.

### 2.1.4 Medidas biométricas

O ganho de peso dos animais foi analisado pela subtração do peso dos animais ao final do experimento do peso dos animais no início do experimento. O índice de massa corporal foi calculado pela razão entre o peso dos animais ao final do experimento e o quadrado do comprimento naso-anal e o peso de cada fração do intestino foi aferido com uma balança semi-analítica logo após a eutanásia dos animais.

### 2.1.5 Avaliação da atividade antioxidante tecidual

Foram utilizados homogenato de intestinal (côlon e intestino delgado) e realização da atividade antioxidante dos seguintes marcadores:

### 2.1.6 Atividade de catalase (CAT)

A determinação da atividade da enzima catalase é baseada na sua capacidade de clivar o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em água e oxigênio molecular, conforme descrito por AEBI (1984). Em um tubo de polipropileno foram adicionados 50 µL de tampão fosfato 100 mM, (pH 7,2) e 40 µL de água destilada e 10 µL da amostra. A reação foi iniciada pela adição de 900 µL

de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 mM). As absorbâncias foram determinadas a cada minuto, durante três minutos, a 240 nm. Água destilada foi utilizada como branco.

Uma unidade (U) de catalase é equivalente a hidrólise de 1 mol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $\epsilon=39,4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ), por minuto (AEBI, 1984). Usualmente a atividade dessa enzima é representada em  $\mu\text{mol/mL}$  de amostra. A atividade da catalase será calculada segundo a lei de Lambert Beer. A absorbância utilizada para o cálculo é o delta obtido das três absorbâncias lidas (absorbância final – absorbância inicial).

#### 2.1.7 Atividade de superóxido dismutase (SOD)

A quantificação da enzima SOD foi expressa em unidades relativas, sendo uma unidade de SOD definida como a quantidade de enzima que inibe em 50% a velocidade de oxidação do pirogalol. Foram utilizados 20  $\mu\text{L}$  de homogeneizado de intestino, 8  $\mu\text{L}$  de pirogalol 24 mmol/L e 4  $\mu\text{L}$  de catalase 30  $\mu\text{mol/L}$ , completando para 200  $\mu\text{L}$  com tampão Tris-HCl-EDTA 0,01 M (pH 7,4). A leitura da absorvância foi feita a 420 nm, sendo os resultados expressos em U de SOD / mg de proteína (MARKLUND, 1985).

#### 2.1.8 Concentração de Óxido Nítrico (NO)

A análise foi realizada em triplicata em placa de 96 poços. Foi utilizado 50  $\mu\text{L}$  de homogenato de intestino e misturados as soluções A (Sulfanilamida 1% em H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 2,5%) e B (Naftil etileno amida dihydrochloride 0,1% em H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 2,5%) na proporção (1:1) e foi deixada a placa reagir por 10 min no escuro para posterior leitura no espectrofotômetro (Multiskan Go, Thermo Cientific) em comprimento de onda 570 nm.

Para construção da curva padrão foram feitas 8 diluições 1:2 para o padrão (1-Nitrito de Sódio 6,9 mg/400 mL). Foi colocado 50  $\mu\text{L}$  de tris HCl nos poços destinados ao padrão. Acrescentou 50  $\mu\text{L}$  do próprio padrão à primeira duplicata, e continuou a diluição homogeneizando e retirando 50  $\mu\text{L}$  da primeira diluição e passando para a segunda diluição e assim sucessivamente.

#### 2.1.9 Análises histomorfométricas

O cólon e o intestino delgado de cada animal foram fixados em solução de Carnoy durante 24 horas e armazenados em álcool 70%. Os fragmentos dos tecidos foram desidratados em soluções crescentes de etanol e xileno e embebidos em parafina, depois seccionados em micrótomo rotativo semi-automático (Leica ® RM2255) em cortes de 5  $\mu\text{m}$  e corados com hematoxilina e eosina. As análises morfométricas foram realizadas com auxílio do software

Image-Pro Plus (versão 4.0.5.29, Media Cybernetics Inc.), segundo Bastos et al (2016) e Dobrowolski et al., (2012) com modificações. Em cada região do intestino, foram medidos os seguintes parâmetros: a) largura da camada muscular; b) altura do epitélio na vilosidade; c) altura do epitélio na cripta; d) diâmetro da cripta; e) largura da vilosidade; f) comprimento da vilosidade. Todas as medidas foram feitas em 5 pontos diferentes para cada animal. Os resultados para cada animal (repetição) foram apresentados como médias das medidas para o parâmetro em questão.

## 2.2 Análises estatísticas

Foi utilizada a planilha do Excel, Microsoft Office, 2016 para armazenagem dos dados coletados. Os dados foram analisados nos programas Stata, versão 13.0 e GraphPad Prism, versão 7. A igualdade de variâncias das variáveis foi verificada pelo teste de Barlet e a análise de variância com um fator (One-way ANOVA) seguida pelo post-hoc de Tukey foi utilizada para identificar diferenças estatísticas entre os grupos experimentais. Valores de p menores que 0,05 foram adotados como indicadores de diferença estatisticamente significativa.

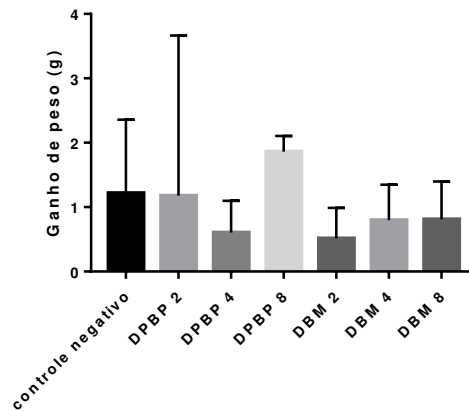
## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Medidas biométricas

Em relação as medidas biométricas avaliadas, os resultados apresentados nas figuras 1, 2 e 3 demonstraram que não houve diferença estatisticamente significativa para o ganho de peso dos animais [ $F(6, 25) = 0,7685$ ;  $p = 0,6018$ ] e para os pesos das porções intestinais referentes ao ceco [ $F(6, 25) = 1,601$ ;  $p = 0,1885$ ] e intestino delgado [ $F(6, 25) = 1,172$ ;  $p = 0,3527$ ]. No entanto, houve diferença estatisticamente significativa para o índice de massa corporal [ $F(6, 25) = 5,797$ ;  $p < 0,001$ ], sendo maior nos animais tratados com gel transdérmico contendo DBM na concentração de 4mg/kg de peso dos animais quando comparado aos animais que receberam gel transdérmico contendo DPBP nas concentrações de 2 e 4 mg/kg de peso dos animais (figura 2). Por outro lado, peso do cólon foi maior nos animais dos grupos DPBP 2 e 8 quando comparados aos animais dos grupos DBM 4 e 8 [ $F(6, 25) = 3,624$ ;  $p < 0,05$ ] (figura 3).

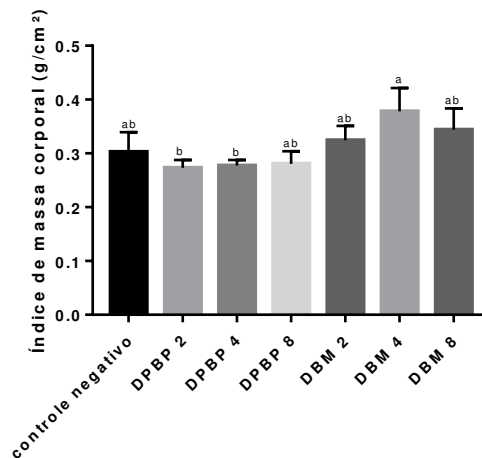
A perda de peso e anemia em função da má absorção gerada pelo processo inflamatório no intestino de animais knockout da interleucina 10 está relacionada com aumento da mortalidade nesses modelos animais (ZURITA-TURK et al., 2020). Apesar das diferenças encontradas entre os grupos experimentais que receberam DBM ou DPBP, percebe-se que o controle negativo obteve médias das variáveis avaliadas similares estatisticamente a todos os

tratamentos, demonstrando que independente do tratamento utilizado por via transdérmica, as variáveis biométricas não foram afetadas no tempo avaliado.



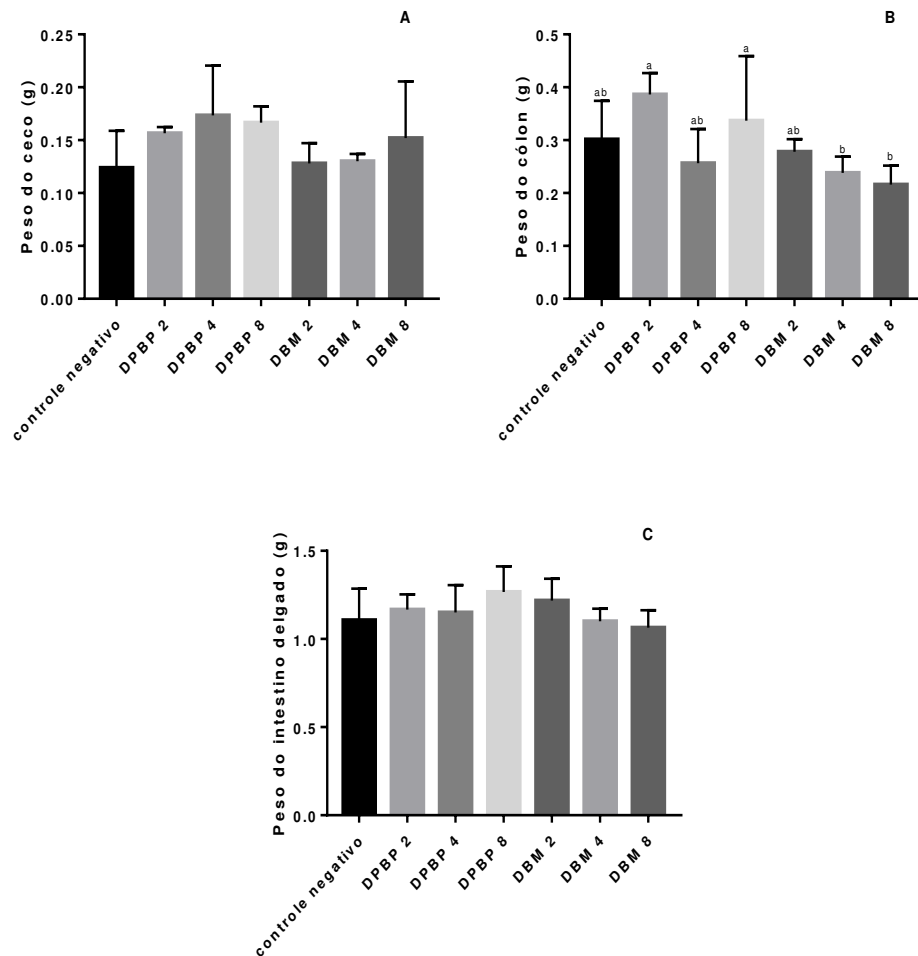
**Figura 1.** Ganho de peso dos animais durante o tratamento por 28 dias com gel transdérmico contendo dibenzoilmetano (DBM) ou 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona (DPBP).

Os resultados representam a média  $\pm$  DP de 6 animais em cada grupo. Letras diferentes representam uma diferença estatística significativa (ANOVA seguida pelo teste post-hoc de Tukey).



**Figura 2.** Índice de massa corporal dos animais durante o tratamento por 28 dias com gel transdérmico contendo dibenzoilmetano (DBM) ou 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona (DPBP).

Os resultados representam a média  $\pm$  DP de 6 animais em cada grupo. Letras diferentes representam uma diferença estatística significativa (ANOVA seguida pelo teste post-hoc de Tukey).



**Figura 3.** Peso dos intestinos dos animais durante o tratamento por 28 dias com gel transdérmico contendo dibenzoilmetano (DBM) ou 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona (DPBP). A) peso do ceco; b) peso do cólon; C) peso do intestino delgado.

Os resultados representam a média  $\pm$  DP de 6 animais em cada grupo. Letras diferentes representam uma diferença estatística significativa (ANOVA seguida pelo teste post-hoc de Tukey).

### 3.2 Atividade antioxidante do gel transdérmico contendo dibenzoilmetano ou 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona no intestino delgado e cólon

A figura 5 apresenta os dados relativos à atividade antioxidante no intestino delgado dos animais que receberam gel transdérmico contendo dibenzoilmetano ou 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona durante 28 dias. Em relação a enzima catalase, os resultados demonstram que o foi possível quantificar uma quantidade menor atividade dessa enzima nos animais do grupo experimental DPBP 4 quando comparados aos animais do controle negativo [F (6, 24) = 2,562;  $p < 0,05$ ]. A quantificação da enzima superóxido dismutase foi maior no grupo DBM 2 quando comparada ao grupo DPBP 4 [F (6, 24) = 3,748;  $p < 0,05$ ] e foi quantificado mais óxido nítrico

tecidual no controle negativo do que todos os grupos experimentais, exceto DBM 4 [F (6, 25) = 3,154;  $p < 0,05$ ].

Diferente do intestino delgado, conforme demonstra a figura 6, a quantificação tecidual da enzima antioxidante catalase no cólon foi maior nos animais do grupo DBM 4 em comparação aos animais controle e do grupo DPBP 8 [F (6, 25) = 4,321;  $p < 0,01$ ]. A enzima superóxido dismutase foi maior no grupo DBM 2 quando comparada ao grupo DPBP 4 [F (6, 24) = 3,748;  $p < 0,05$ ] e a concentração tecidual de óxido nítrico foi similar entre todos os grupos experimentais [F (6, 24) = 0,8798;  $p = 0,5244$ ].

O estresse oxidativo está associado as respostas inflamatórias teciduais e, como tal, tem sido implicado na propagação e exacerbação das doenças inflamatórias intestinais. A infiltração do tecido da mucosa com células imunes ativadas e a geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio tornam o ambiente pró-oxidante, perturbando a homeostase celular e danificando macromoléculas como carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos. Todo esse processo contribui para o desenvolvimento de dano celular e aumento da permeabilidade da barreira mucosa, acelerando e perpetuando a inflamação em curso (ALZOGHAIBI, 2013; TIAN; WANG; ZHANG, 2017).

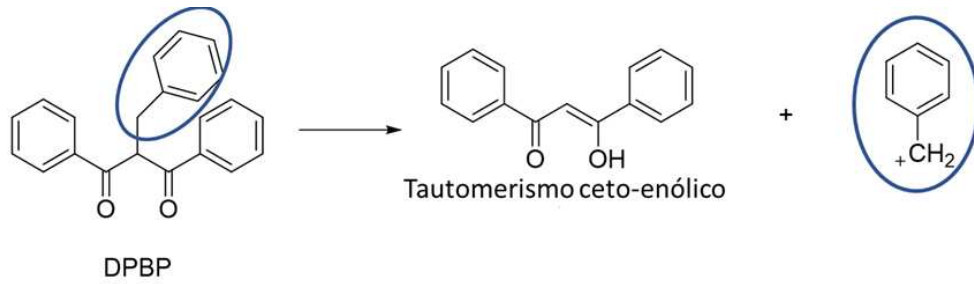
Durante a inflamação na mucosa, em resposta ao estímulo gerado por citocinas pró-inflamatórias, a expressão e atividade da enzima iNOS é aumentada e, como consequência, óxido nítrico é produzido (SOUFLI et al., 2016). Na tentativa de conter os efeitos nocivos causados pelo excesso da produção de EROs e ERNs, as defesas antioxidantes enzimáticas presentes no trato gastro intestinal, tentam manter os níveis dessas moléculas sob controle. No presente estudo foram investigadas a ação da enzima superóxido dismutase, enzima responsável por catalisar a redução de  $O_2^-$  em  $O_2$  e posteriormente em  $H_2O_2$ . (FRIDOVICH, 1997); e da enzima catalase, que catalisa a redução de  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$  (SCHRADER; FAHIMI, 2006). A atividade dessas enzimas está relacionada com a fase da doença inflamatória intestinal. Em geral, durante a fase ativa, a atividade de SOD é aumentada, na fase de remissão ela tende a retornar a níveis fisiológicos e na fase inativa possui menor atividade. Já a enzima catalase tende a possuir menor atividade nas fases ativas e de remissão e maior atividade na fase inativa da doença (DE MORENO DE LEBLANC et al., 2008; MONARI, 2009; LEBLANC et al., 2011; BOUZID et al., 2013)

Percebe-se que o tratamento durante 28 dias com o gel transdérmico contendo dibenzoilmetano apresentou atividade antioxidante reduzindo a quantidade de óxido nítrico no intestino delgado e aumentando a atividade de catalase no cólon. Já o gel transdérmico contendo 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona atuou apenas reduzindo o teor de óxido nítrico no

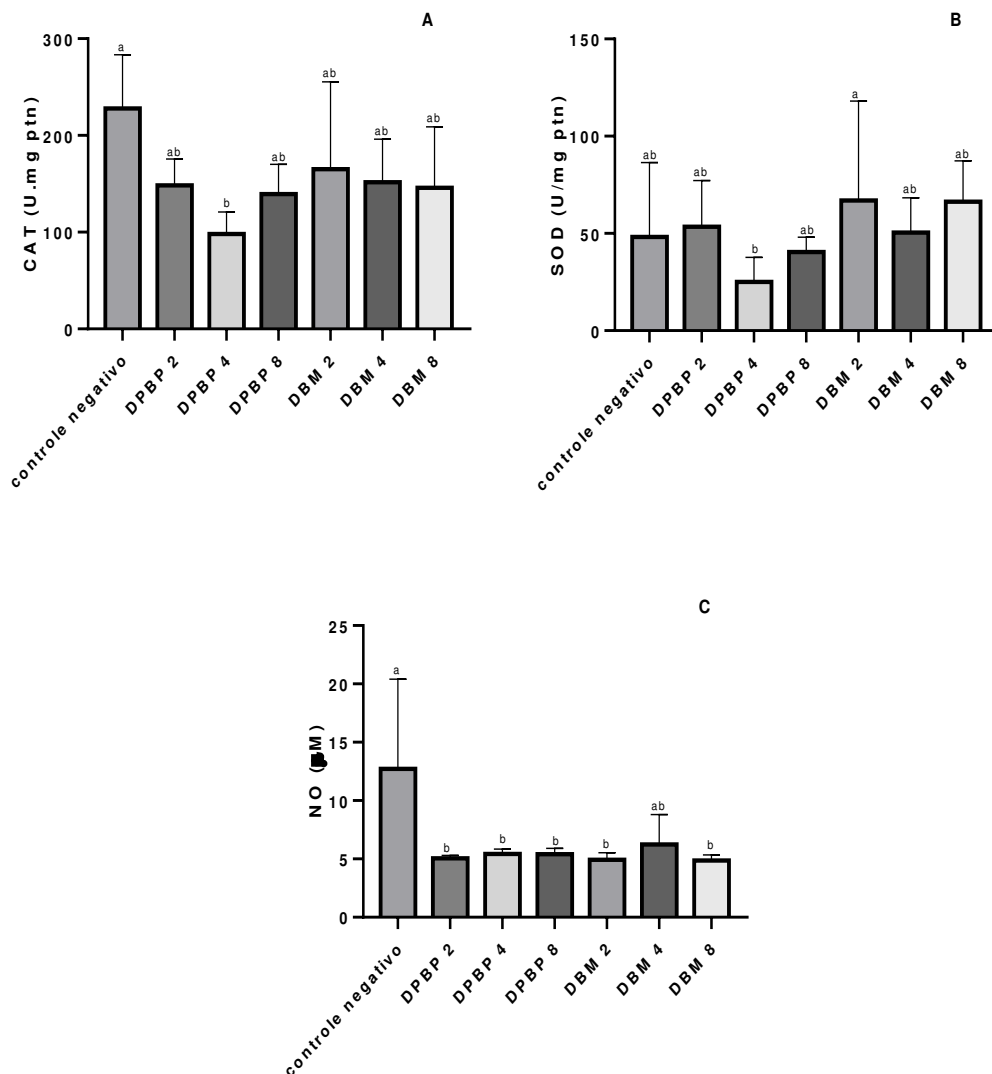
intestino delgado. Considerando-se a fisiopatologia de algumas doenças gastrointestinais como a síndrome do intestino irritável e as doenças inflamatórias intestinais, terapias medicamentosas focadas na inibição do óxido nítrico têm sido estudadas e se mostram promissoras, apesar de ainda não estarem completamente desenvolvidas (WALLACE, 2019).

Estudos anteriores demonstraram a ação do DBM no estresse oxidativo envolvendo a redução da expressão de iNOS e da produção de óxido nítrico e a detoxificação dos tecidos mediada pela ativação de enzimas de fase II induzidas pelo aumento da ligação de Nrf2 ao DNA (THIMMULAPPA et al., 2008; KIM et al. 2018; TAKANO et al., 2018). Nrf2 é um fator de transcrição nuclear que responde a estímulos relacionados ao estresse oxidativo e é fundamental para resposta antioxidante. Quando o nível de radicais livres aumenta na célula gerando um desbalanço entre as moléculas oxidantes e as defesas antioxidantes, Nrf2 transloca rapidamente do citoplasma para o núcleo e inicia a transcrição de genes relacionados a resposta antioxidante, protegendo a célula dos danos oxidativos (ZHU et al., 2005; DONG; SULIK; CHEN, 2008; ZHAN; LI; ZHOU, 2021). Dentre os múltiplos processos biológicos relacionados a resposta antioxidante regulados por Nrf2, incluem-se a transcrição de enzimas relacionadas a detoxificação de espécies reativas de oxigênio e xenobióticos como as das famílias das superóxido dismutases, catalases e glutatonas (ZHU et al., 2005; ZHAN; LI; ZHOU, 2021)

A tautomeria ceto-enol do dibenzoilmetano está relacionada com a sua capacidade de ativação de enzimas de detoxificação de fase II como a quinona redutase (DINKOVA-KOSTOVA; TALALAY, 1999). Percebe-se que desde os primeiros 30 minutos, foi possível encontrar o DPBP no fígado, com maior concentração no tempo de duas horas (Capítulo 2 - figura 6). A passagem pelo fígado pode ter favorecido sua biotransformação em algum metabólito com características similares ao dibenzoilmetano, fornecendo atividade de indutor da ativação de enzimas de detoxificação de fase II. Conforme demonstrado na figura 4, uma das propostas de metabolização hepática do DPBP pode favorecer a atividade de estimulador da ativação dessas enzimas por fornecer ao composto a capacidade de tautomeria ceto-enol após a perda do grupamento benzila adicionado.

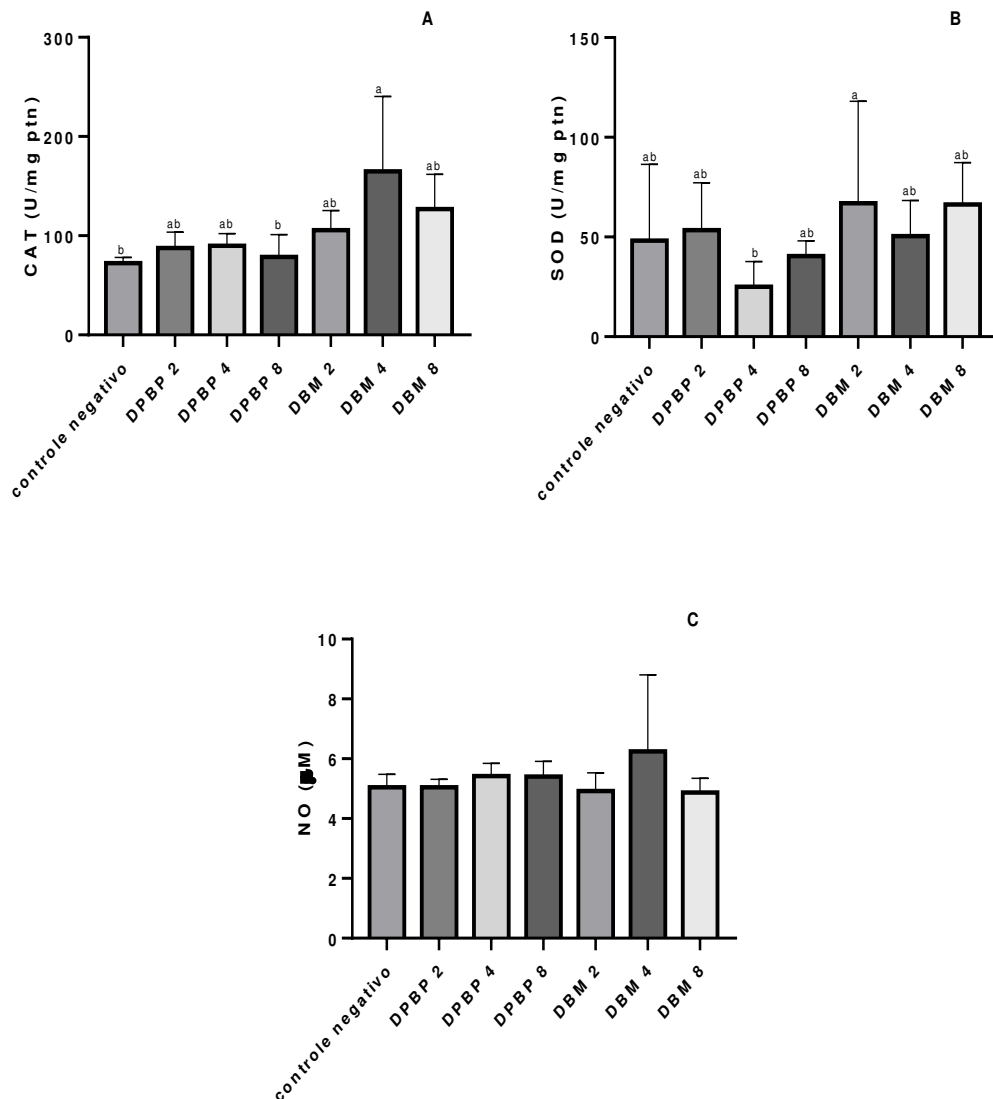


**Figura 4.** Proposta de atividade ativadora de enzimas de detoxificação de fase II do 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona (DPBP).



**Figura 5.** Efeito do tratamento com gel transdérmico contendo dibenzilmetano (DBM) ou 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona (DPBP) durante 28 dias na quantificação tecidual das enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) e do óxido nítrico (NO) no intestino delgado.

Os resultados representam a média  $\pm$  DP de 6 animais em cada grupo. Letras diferentes representam uma diferença estatística significativa (ANOVA seguida pelo teste post-hoc de Tukey).



**Figura 6.** Efeito do tratamento com gel transdérmico contendo dibenzoilmetano (DBM) ou 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona (DPBP) durante 28 dias na quantificação tecidual das enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) e do óxido nítrico (NO) no cólon.

Os resultados representam a média  $\pm$  DP de 6 animais em cada grupo. Letras diferentes representam uma diferença estatística significativa (ANOVA seguida pelo teste post-hoc de Tukey).

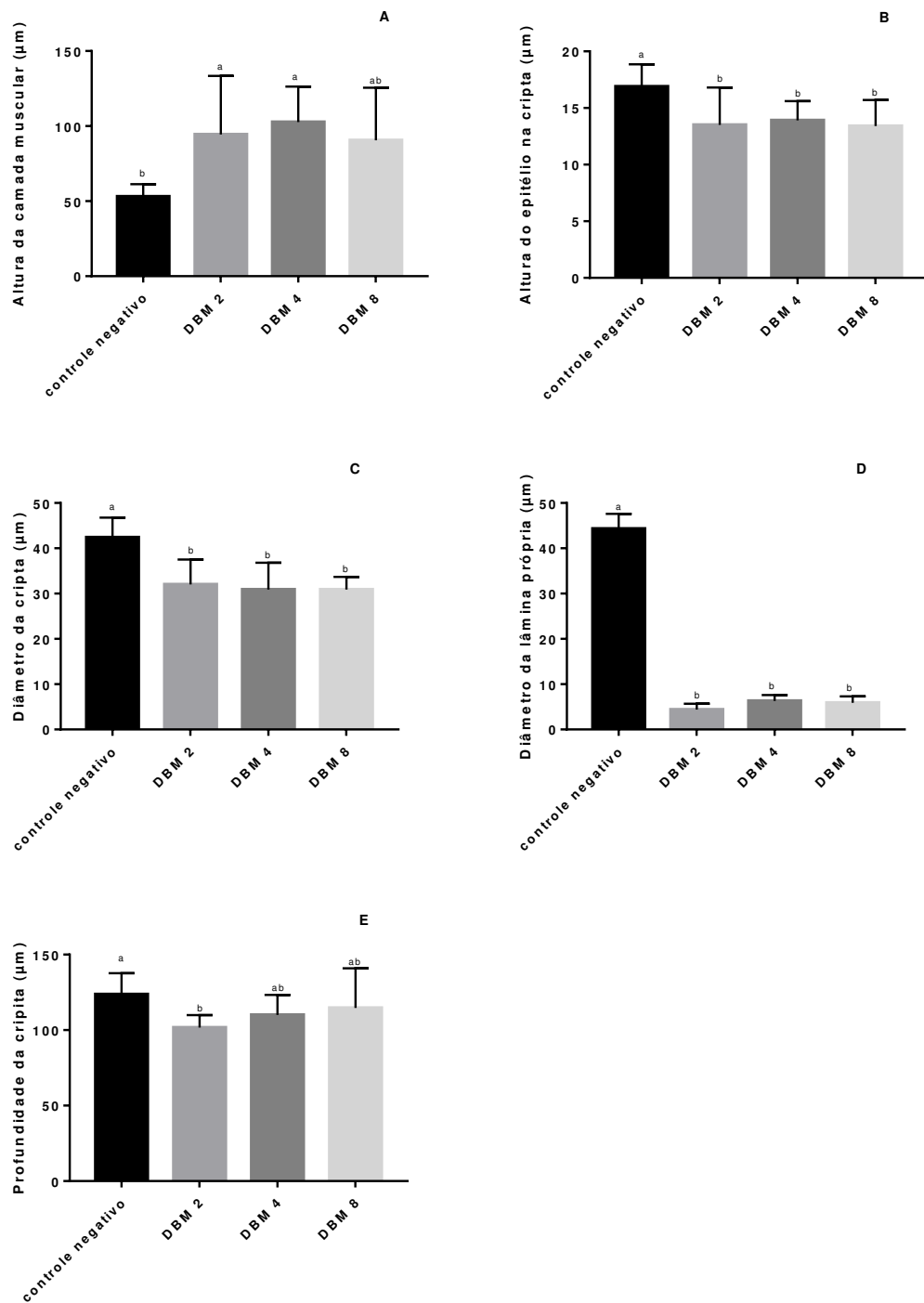
### 3.3 Análises histomorfométricas do ceco, cólon e intestino delgado de animais que receberam gel transdérmico contendo dibenzoilmetano (DBM)

As análises histomorfométricas do ceco dos animais que foram tratados com gel transdérmico contendo DBM demonstraram que, quando comparados aos animais controle, a altura da camada muscular desses animais foi maior nos grupos DBM 2 e DBM 4 [F (3, 47) = 3,671; p < 0,05]; a altura do epitélio na cripta [F (3, 49) = 4,232 p < 0,01], o diâmetro da cripta [F (3, 49) = 12,07; p < 0,0001] e o diâmetro da lâmina própria [F (3, 49) = 1111; p < 0,0001] foram menores em todos os grupos teste e a profundidade da cripta [F (3, 49) = 3,185; p < 0,05] foi menor apenas no grupo DBM 2 (figura 7).

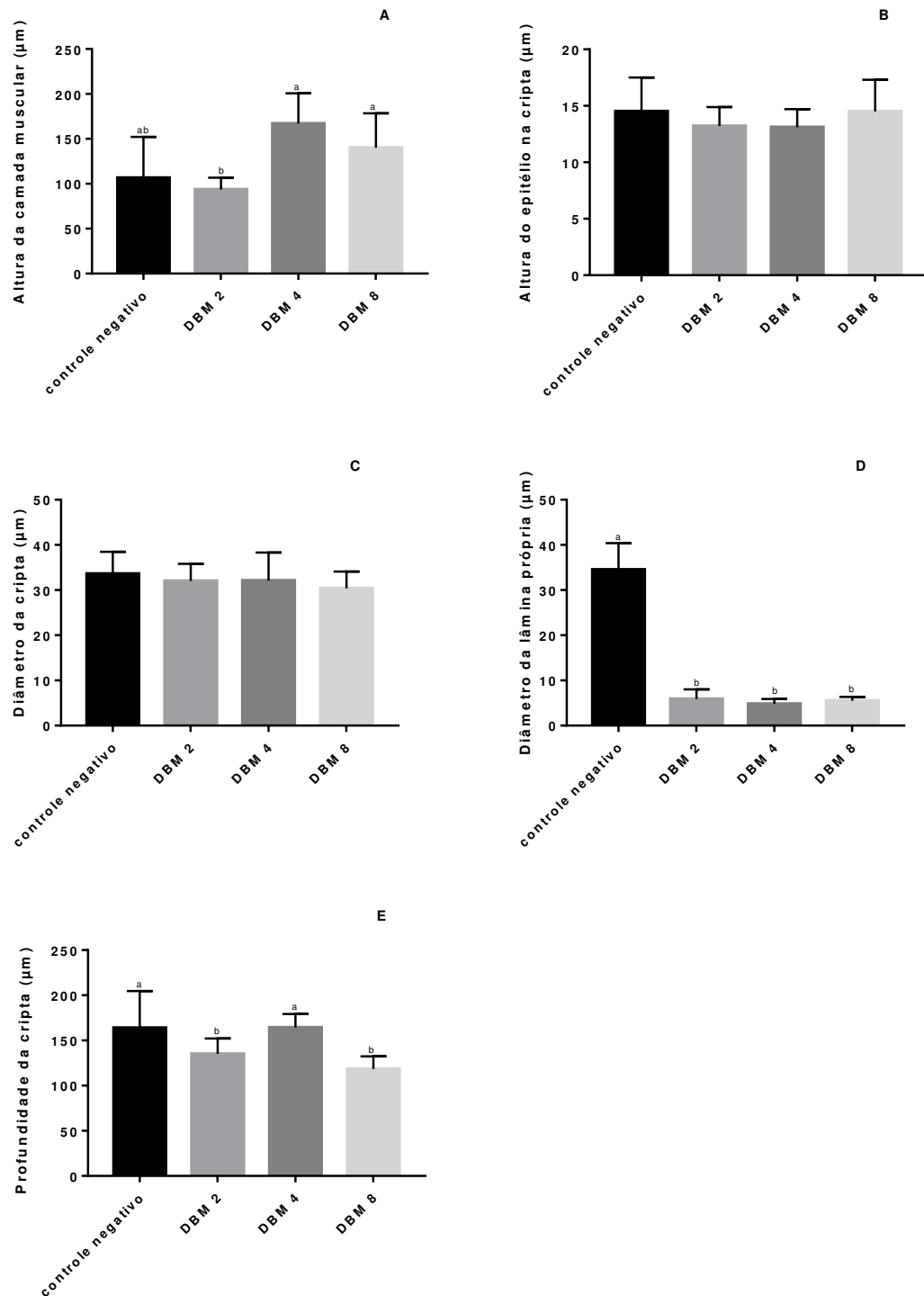
No cólon, a altura da camada muscular foi similar ao controle negativo, porém, diferente entre os grupos teste, sendo maior nos grupos DBM 4 e 8 em comparação ao DBM2 [F (3, 49) = 14,01; p < 0,0001]. O diâmetro da lâmina própria foi maior no grupo controle quando comparado aos demais grupos teste [F (3, 49) = 283; p < 0,0001] e a profundidade da cripta foi maior no grupo controle e DBM 4 em relação aos grupos DBM 2 e DBM 8 [F (3, 49) = 15,28; p < 0,0001]. Por outro lado, altura do epitélio na cripta [F (3, 49) = 1,558; p = 0,2114] e o diâmetro da cripta [F (3, 49) = 0,8512 p = 0,4727] tiveram médias estatisticamente similares entre os animais controle e teste (figura 8).

Quanto ao intestino delgado, a altura da camada muscular foi maior nos grupos teste em relação ao controle [F (3, 49) = 19,04; p < 0,0001], o diâmetro da cripta foi maior no grupo controle em relação ao DBM 4 [F (3, 49) = 4,192; p < 0,01] e a altura da vilosidade foi maior no grupo controle quando comparada a todos os grupos teste [F (3, 49) = 43,55 p < 0,0001]. As medidas dos grupos controle e teste da altura do epitélio da vilosidade F (3, 49) = 2,692; p = 0,0563], altura do epitélio da cripta [F (3, 49) = 2,126; p = 0,1089] e o diâmetro da vilosidade [F (3, 49) = 2,375; p = 0,081] não foram estatisticamente diferentes (figura 9).

As lesões inflamatórias presentes em animais IL-10<sup>-/-</sup> são descontínuas e transmuralis, e incluem hiperplasia epitelial, abscessos de criptas, úlceras, depleção de mucinas e espessamento da parede intestinal com infiltração de linfócitos, plasmócitos, macrófagos, eosinófilos e neutrófilos (VILLANACCI, 2013). Apesar das diferenças estatisticamente significantes apresentadas acima, ao se analisar as fotomicrografias apresentadas na figura 18, percebe-se que o tratamento com gel transdérmico contendo dibenzoilmetano não melhorou de forma significativa a arquitetura intestinal dos animais.

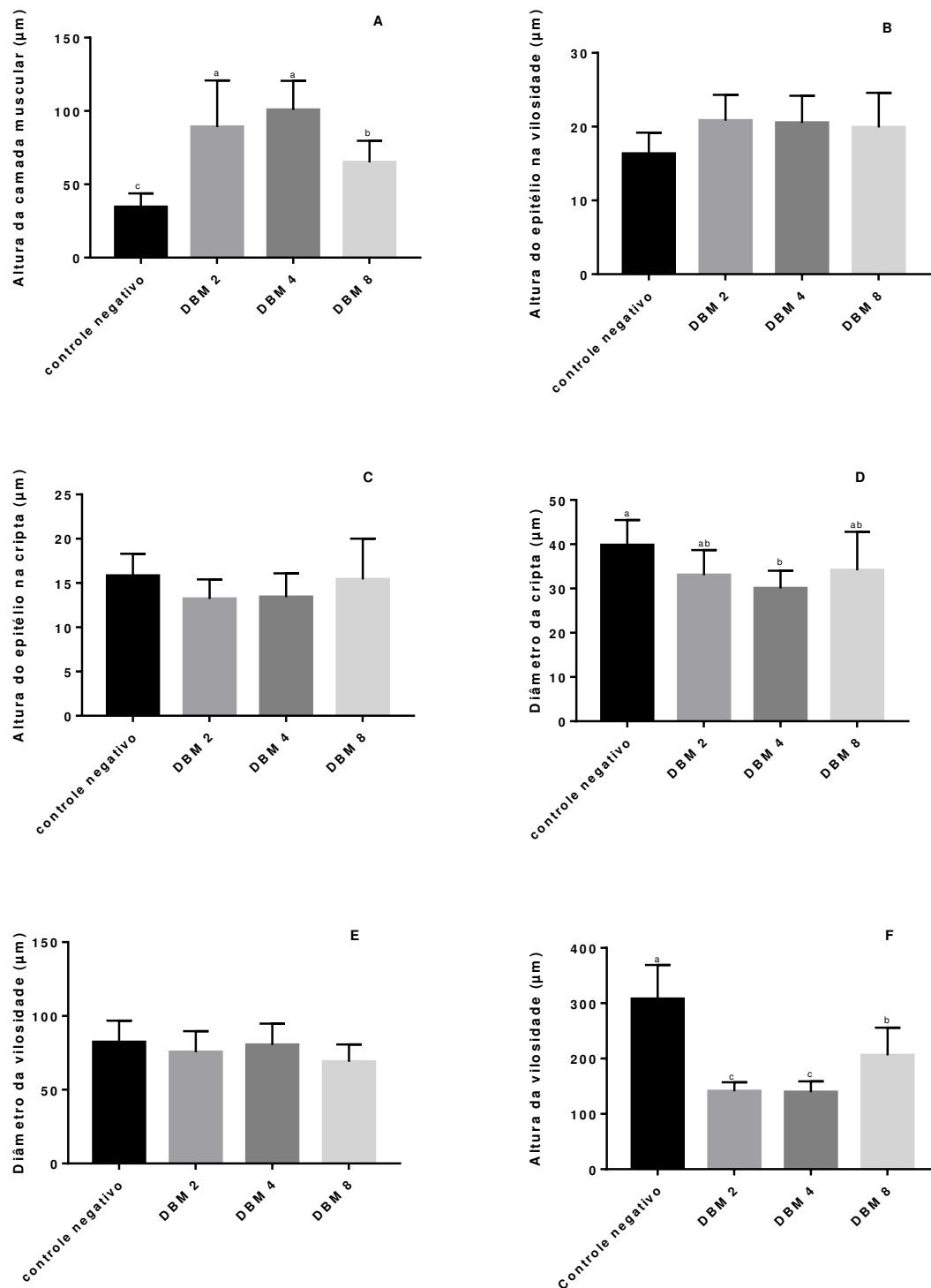


**Figura 7.** Medidas histomorfométricas do ceco de animais tratados com gel transdérmico contendo dibenzoilmetano. A) altura da camada muscular ( $\mu\text{m}$ ); B) altura do epitélio na cripta ( $\mu\text{m}$ ); C) diâmetro da cripta ( $\mu\text{m}$ ); D) diâmetro da lâmina própria ( $\mu\text{m}$ ); E) profundidade da cripta ( $\mu\text{m}$ ). Os resultados representam a média  $\pm$  DP de 6 animais em cada grupo. Letras diferentes representam uma diferença estatística significativa (ANOVA seguida pelo teste post-hoc de Tukey).



**Figura 8.** Medidas histomorfométricas do cólon de animais tratados com gel transdérmico contendo dibenzilmetano. A) altura da camada muscular ( $\mu\text{m}$ ); B) altura do epitélio na cripta ( $\mu\text{m}$ ); C) diâmetro da cripta ( $\mu\text{m}$ ); D) diâmetro da lâmina própria ( $\mu\text{m}$ ); E) profundidade da cripta ( $\mu\text{m}$ ).

Os resultados representam a média  $\pm$  DP de 6 animais em cada grupo. Letras diferentes representam uma diferença estatística significativa (ANOVA seguida pelo teste post-hoc de Tukey).



**Figura 9.** Medidas histomorfométricas do intestino delgado de animais tratados com gel transdérmico contendo dibenzoilmetano. A) altura da camada muscular ( $\mu\text{m}$ ); B) altura do epitélio na vilosidade ( $\mu\text{m}$ ); C) altura do epitélio na cripta ( $\mu\text{m}$ ); D) diâmetro da cripta ( $\mu\text{m}$ ); E) diâmetro da vilosidade ( $\mu\text{m}$ ); F) altura da vilosidade ( $\mu\text{m}$ ).

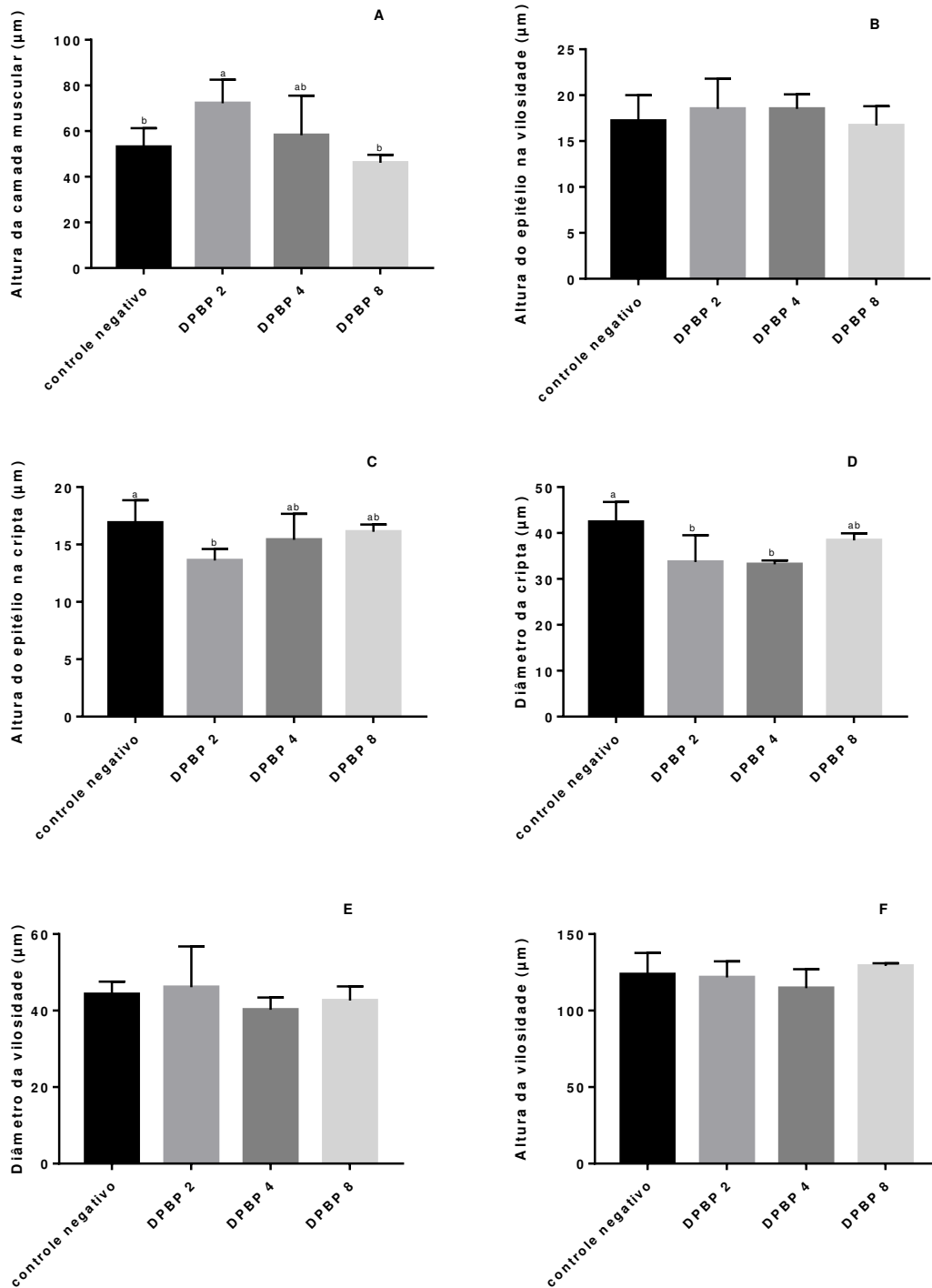
Os resultados representam a média  $\pm$  DP de 6 animais em cada grupo. Letras diferentes representam uma diferença estatística significativa (ANOVA seguida pelo teste post-hoc de Tukey).

### 3.4 Análises histomorfométricas do ceco, cólon e intestino delgado de animais que receberam gel transdérmico contendo 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona (DPBP)

A histomorfometria das porções do intestino dos animais que receberam gel transdérmico contendo DPBP durante 28 dias está representada nas figuras 10, 11 e 12. No que se refere ao ceco, os resultados demonstram que a altura da camada muscular foi maior no grupo DPBP 2 em relação ao grupo controle [F (3, 22) = 7,226; p < 0,001], a altura do epitélio na cripta foi maior no grupo controle em relação ao grupo DPBP 2 [F (3, 22) = 4,818; p = 0,010] e o diâmetro da cripta também foi maior no grupo controle em relação aos grupos DPBP 2 e DPBP 4 [F (3, 22) = 9,058 ; p < 0,001]. As medidas da altura do epitélio na vilosidade [F (3, 22) = 0,7972; p = 0,5086], diâmetro da vilosidade [F (3, 22) = 1,103; p = 0,3690] e altura da vilosidade [F (3, 22) = 1,76; p = 0,1842] foram estatisticamente similares.

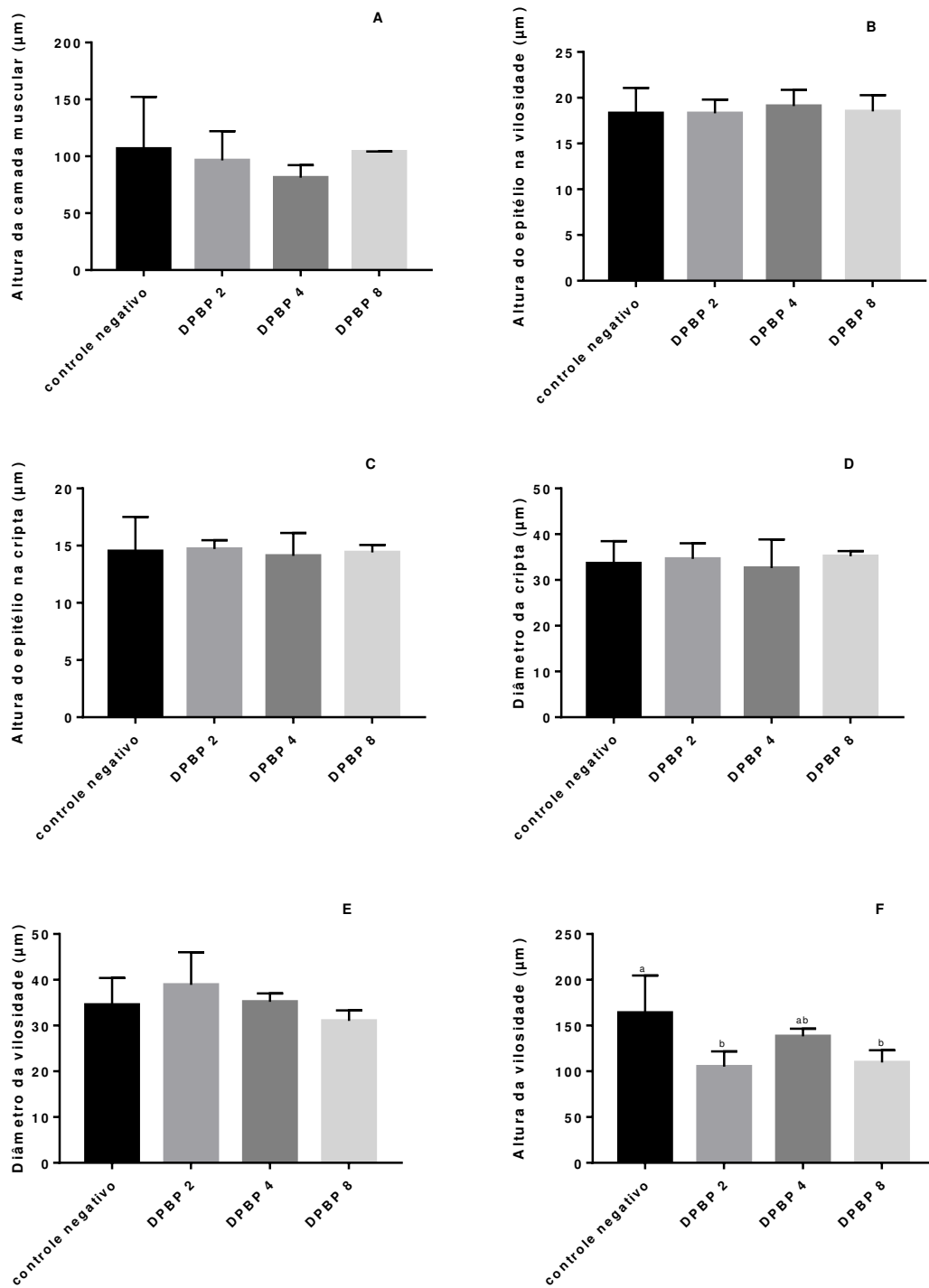
No cólon, apenas as médias da altura da vilosidade apresentaram diferenças estatisticamente significantes, sendo maior no grupo controle em relação aos grupos teste DPBP 2 e DPBP 8 [F (3, 22) = 8,025; p < 0,001]. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre todas as medidas avaliadas no intestino delgado para todos os grupos experimentais.

Assim como os resultados apresentados para os animais tratados com gel transdérmico contendo dibenzoilmetano, o tratamento com gel transdérmico contendo 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona parece não melhorar a arquitetura intestinal dos animais (figura 13). As doenças inflamatórias intestinais possuem uma fisiopatologia complexa, que depende de componentes genéticos, imunológicos e ambientais e seu tratamento depende de uma série de fármacos que atuam por diversos mecanismos de ação (BAUMGART; LE BERRE, 2021). Dessa forma, mais investigações são necessárias para avaliar a utilização do gel transdérmico como um adjuvante no seu tratamento.



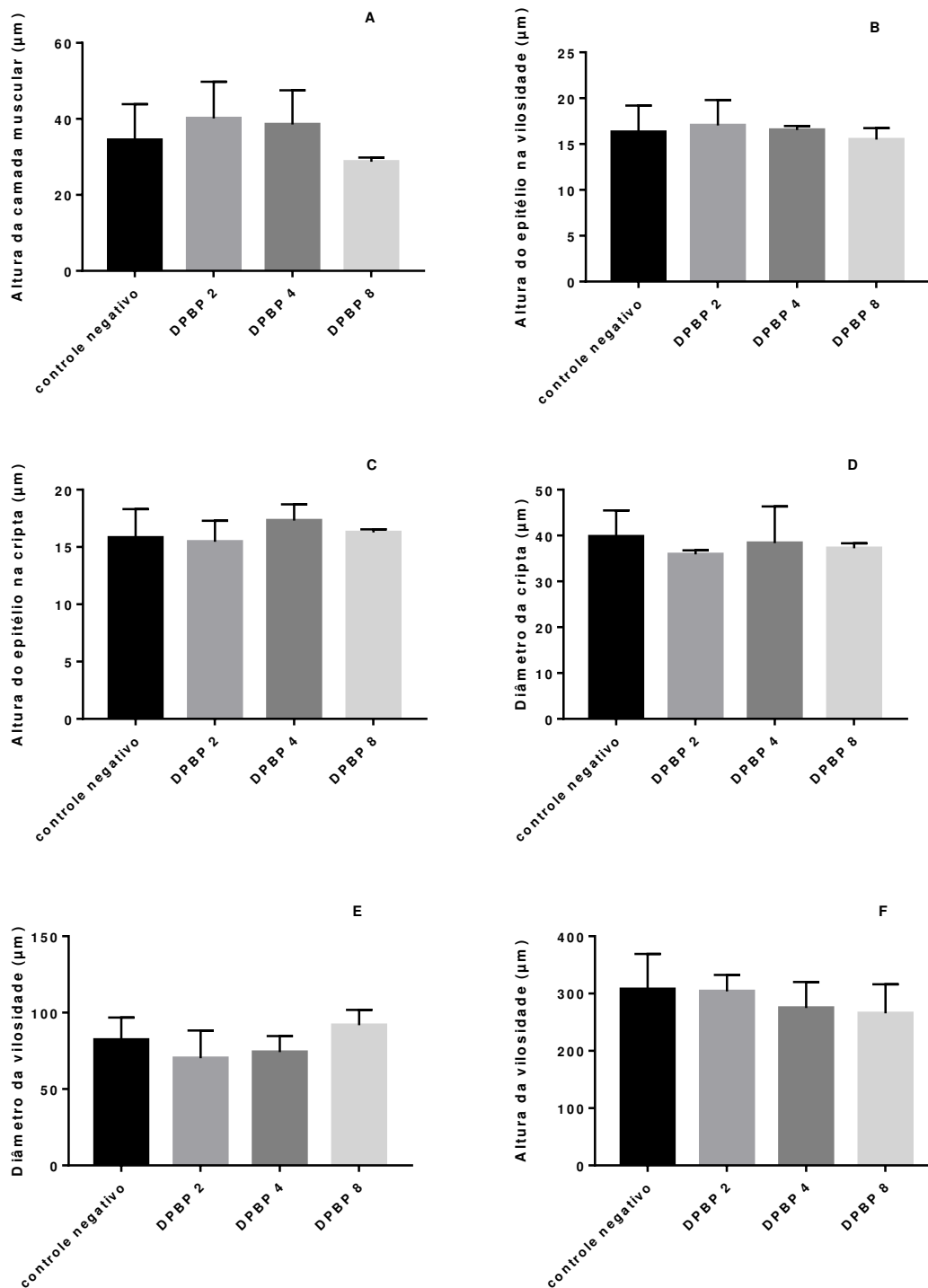
**Figura 10.** Medidas histomorfométricas do ceco de animais tratados com gel transdérmico contendo 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona (DPBP). A) altura da camada muscular ( $\mu\text{m}$ ); B) altura do epitélio na vilosidade ( $\mu\text{m}$ ); C) altura do epitélio na cripta ( $\mu\text{m}$ ); D) diâmetro da cripta ( $\mu\text{m}$ ); E) diâmetro da vilosidade ( $\mu\text{m}$ ); F) altura da vilosidade ( $\mu\text{m}$ ).

Os resultados representam a média  $\pm$  DP de 6 animais em cada grupo. Letras diferentes representam uma diferença estatística significativa (ANOVA seguida pelo teste post-hoc de Tukey).



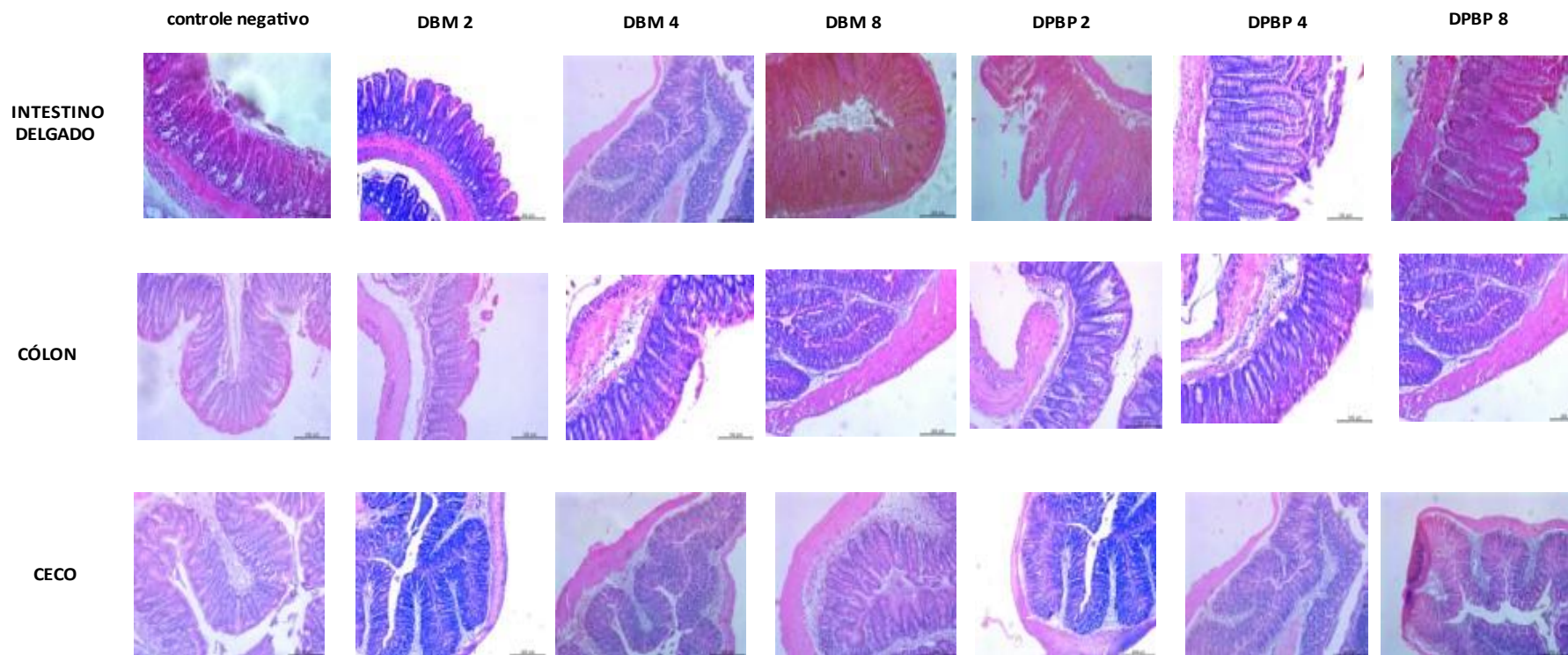
**Figura 11.** Medidas histomorfométricas do cólon de animais tratados com gel transdérmico contendo 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona (DPBP). A) altura da camada muscular (μm); B) altura do epitélio na vilosidade (μm); C) altura do epitélio na cripta (μm); D) diâmetro da cripta (μm); E) diâmetro da vilosidade (μm); F) altura da vilosidade (μm).

Os resultados representam a média  $\pm$  DP de 6 animais em cada grupo. Letras diferentes representam uma diferença estatística significativa (ANOVA seguida pelo teste post-hoc de Tukey).



**Figura 12.** Medidas histomorfométricas do intestino delgado de animais tratados com gel transdérmico contendo 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona (DPBP). A) altura da camada muscular ( $\mu\text{m}$ ); B) altura do epitélio na vilosidade ( $\mu\text{m}$ ); C) altura do epitélio na cripta ( $\mu\text{m}$ ); D) diâmetro da cripta ( $\mu\text{m}$ ); E) diâmetro da vilosidade ( $\mu\text{m}$ ); F) altura da vilosidade ( $\mu\text{m}$ ).

Os resultados representam a média  $\pm$  DP de 6 animais em cada grupo. Letras diferentes representam uma diferença estatística significativa (ANOVA seguida pelo teste post-hoc de Tukey).



**Figura 13.** Histologia representativa das seções do intestino delgado, cólon e ceco dos animais tratados com gel transdérmico contendo dibenzoilmetano ou 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona durante 28 dias.

#### **4. CONCLUSÃO**

Dessa forma, podemos concluir que o tratamento com gel transdérmico contendo DBM ou DPBP não afetou as medidas biométricas ou a arquitetura intestinal dos animais, no entanto, apresentou atividade antioxidante importante principalmente por reduzir os níveis de óxido nítrico no intestino dos animais.

## 5. REFERÊNCIAS

- ALZOGHAIBI, M. A. Concepts of oxidative stress and antioxidant defense in Crohn's disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 19, n. 39, p. 6540, 2013.
- BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 4, n. 23, p.629-643, ago. 2010.
- BASTOS, C. C. C. et al. Use of *Bidens pilosa* L. (Asteraceae) and *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae) to treat intestinal mucositis in mice: Toxicopharmacological evaluations. **Toxicology Reports**, v. 3, p. 279–287, 2016.
- BAUMGART, D. C.; LE BERRE, C. Newer Biologic and Small-Molecule Therapies for Inflammatory Bowel Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 385, n. 14, p. 1302–1315, 30 set. 2021.
- BONEN, D. K.; CHO, J. H. The genetics of inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v. 124, n. 2, p. 521-536, 2003.
- BOUZID, D. et al. Oxidative stress markers in intestinal mucosa of Tunisian inflammatory bowel disease patients. **Saudi Journal of Gastroenterology**, v. 19, n. 3, p. 131, 2013.
- DE MORENO DE LEBLANC, A. et al. Oral administration of a catalase-producing *Lactococcus lactis* can prevent a chemically induced colon cancer in mice. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 100–105, 1 jan. 2008.
- DINKOVA-KOSTOVA, A. T.; TALALAY, P. Relation of structure of curcumin analogs to their potencies as inducers of Phase 2 detoxification enzymes. **Carcinogenesis**, v. 20, n. 5, p. 911–914, maio 1999.
- DOBROWOLSKI, P. et al. Potato fiber protects the small intestinal wall against the toxic influence of acrylamide. **Nutrition**, v. 28, n. 4, p. 428–435, 2012.
- DONG, J.; SULIK, K. K.; CHEN, S. Nrf2-Mediated Transcriptional Induction of Antioxidant Response in Mouse Embryos Exposed to Ethanol *in vivo*: Implications for the Prevention of Fetal Alcohol Spectrum Disorders. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 10, n. 12, p. 2023–2033, dez. 2008.
- FRIDOVICH, I. Superoxide Anion Radical ( $O_2^-$ ), Superoxide Dismutases, and Related Matters. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 30, p. 18515–18517, jul. 1997.
- KENNEDY, R. J. et al. Interleukin 10-deficient colitis: new similarities to human inflammatory bowel disease. **British Journal of Surgery**, v. 87, n. 10, p. 1346–1351, 6 dez. 2002.
- KEUBLER, L. M. et al. A Multihit Model: Colitis Lessons from the Interleukin-10-deficient Mouse. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 21, n. 8, p. 1967–1975, ago. 2015.
- KIM, J. H. et al. Dibenzoylmethane Suppresses Lipid Accumulation and Reactive Oxygen Species Production through Regulation of Nuclear Factor (Erythroid-Derived 2)-Like 2 and Insulin Signaling in Adipocytes. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 41, n. 5, p. 680–689, 1 maio 2018.

KIM, J. U. et al. Dibenzoylmethane Suppresses Lipid Accumulation and Reactive Oxygen Species Production through Regulation of Nuclear Factor (Erythroid-Derived 2)-Like 2 and Insulin Signaling in Adipocytes. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 41, n. 5, p. 680-689, 2018.

LEBLANC, J. G. et al. Use of superoxide dismutase and catalase producing lactic acid bacteria in TNBS induced Crohn's disease in mice. **Journal of Biotechnology**, v. 151, n. 3, p. 287-293, fev. 2011.

MANDALARI, G. et al. International Immunopharmacology Natural almond skin reduced oxidative stress and inflammation in an experimental model of inflammatory bowel disease. **International Immunopharmacology**, v. 11, n. 8, p. 915-924, 2011.

MONARI. Implications of antioxidant enzymes in human gastric neoplasms. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 24, n. 05, 21 set. 2009.

MOURA, F. A. et al. Antioxidant therapy for treatment of inflammatory bowel disease: Does it work? **Redox Biology**, v. 6, p. 617-639, 2015.

NEURATH, M. F. Cytokines in inflammatory bowel disease. **Nature Reviews Immunology**, [s.l.], v. 14, n. 5, p.329-342, 22 abr. 2014.

OTT, C.; SCHÖLMERICH, J. Extraintestinal manifestations and complications in IBD. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol.**, v. 10, n. 10, p. 585-595, 2013.

PERES, ANNE SELIPRANDY et al. Propriedades funcionais da cúrcuma na suplementação nutricional. **Reinpec**, [s.l.], v. 1, n. 2, p.218-229, 10 dez. 2015.

Pithadia AB, Jain S. Treatment of inflammatory bowel disease (IBD). *Pharmacol Rep*. 2011;63(3):629-42. doi: 10.1016/s1734-1140(11)70575-8. PMID: 21857074.

SCHRADER, M.; FAHIMI, H. D. Peroxisomes and oxidative stress. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1763, n. 12, p. 1755-1766, dez. 2006.

SOUFLI, I. et al. Overview of cytokines and nitric oxide involvement in immuno-pathogenesis of inflammatory bowel diseases. **World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics**, v. 7, n. 3, p. 353, 2016.

TAKANO, K. et al. A dibenzoylmethane derivative inhibits lipopolysaccharide-induced NO production in mouse microglial cell line BV-2. **Neurochemistry International**, v. 119, p. 126-131, out. 2018.

THIMMULAPPA, R. K.; RANGASAMY, T.; ALAM, J.; BISWAL, S. Dibenzoylmethane activates Nrf2-dependent detoxification pathway and inhibits benzo(a)pyrene induced DNA adducts in lungs. **Med Chem**, v. 4, n.5, p. 473-481, 2008.

THORESON, R.; CULLEN, J. J. Pathophysiology of inflammatory bowel disease: an overview. **Surg Clin North Am**, v. 87, n. 3, p. 575-585, 2007.

TIAN, T.; WANG, Z.; ZHANG, J. Pathomechanisms of Oxidative Stress in Inflammatory Bowel Disease and Potential Antioxidant Therapies. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p. 1-18, 2017.

TORRES, J. A. P. et al. Doenças inflamatórias intestinais no Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe: manifestações extraintestinais. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, São Cristóvão, v. 31, n. 2, p.115-119, jun. 2011.

VILLANACCI, V. Histological healing in inflammatory bowel disease: A still unfulfilled promise. **World Journal of Gastroenterology**, v. 19, n. 7, p. 968, 2013.

WALLACE, J. L. Nitric oxide in the gastrointestinal tract: opportunities for drug development. **British Journal of Pharmacology**, v. 176, n. 2, p. 147–154, jan. 2019.

ZHAN, X.; LI, J.; ZHOU, T. Targeting Nrf2-Mediated Oxidative Stress Response Signaling Pathways as New Therapeutic Strategy for Pituitary Adenomas. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, p. 565748, 24 mar. 2021.

ZHU, H. et al. Role of Nrf2 signaling in regulation of antioxidants and phase 2 enzymes in cardiac fibroblasts: Protection against reactive oxygen and nitrogen species-induced cell injury. **FEBS Letters**, v. 579, n. 14, p. 3029–3036, 6 jun. 2005.

ZURITA-TURK, M. et al. Attenuation of intestinal inflammation in IL-10 deficient mice by a plasmid carrying *Lactococcus lactis* strain. **BMC Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 38, dez. 2020.

## CAPÍTULO 4

ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA, ANTINOCICEPTIVA E ANTIOXIDANTE DO 2-BENZIL-1,3-DIFENIL-1,3-PROPANODIONA COM ENFOQUE NO EDEMA DE PATA

## 1. INTRODUÇÃO

A inflamação é um processo biológico complexo que envolve a produção de mediadores químicos e recrutamento celular com o objetivo de proteger e recuperar tecidos (CHEN et al., 2018). De modo geral, rubor, calor, dor, edema e perda de função são os sinais clássicos da inflamação (SERHAN; SAVILL, 2005). Essas características são desenvolvidas em função da ação de mediadores inflamatórios como eicosanoides e citocinas que são produzidos e liberados mediante estímulos endógenos e exógenos (CHARO; RANSOHOFF, 2006; RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011a; SASAKI; YOKOMIZO, 2019). A liberação em excesso dessas moléculas pró-inflamatórias pode ser muito perigosa e, se não tratada, sua evolução podem resultar em morte (ROCK; KONO, 2008).

Na tentativa de controlar a inflamação, a dor e a febre, é necessário lançar mão de alguns medicamentos, dentre eles os medicamentos anti-inflamatórias não esteroidais. Como exemplo, a aspirina, o ibuprofeno, o diclofenaco, o naproxeno e a indometacina, aparecem como medicamentos comumente prescritas (MARNETT, 2009). O mecanismo de ação desses medicamentos envolve principalmente a inibição por competição de enzimas relacionadas com a produção de mediadores inflamatórios, como a COX-1 e COX-2 (INOTAI; HANKÓ; MÉSZÁROS, 2010).

A busca por novos anti-inflamatórios é constante e moléculas com capacidade de atuar como inibidores de fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) têm chamado atenção (RAO; KABIR; MOHAMED, 2010; CHINNASAMY et al., 2020). A PLA<sub>2</sub> é uma enzima que catalisa a liberação de ácido araquidônico dos fosfolípídeos de membrana, passo inicial e importante para a síntese de eicosanoides (MURAKAMI et al., 2017). Scutellarin, arespladib, SB-222657, SB-435475 e darapladib são exemplos de moléculas que possuem atividade anti-inflamatória por serem inibidores da PLA<sub>2</sub> (LEE et al., 2007; RAO; KABIR; MOHAMED, 2010; ROSENSEN et al., 2009; SUCKLING, 2009).

Os mecanismos de ação dos agentes terapêuticos descritos acima são bastante importantes para alívio da dor, febre e edema. Porém, a utilização desses medicamentos anti-inflamatórias não esteroidais, podem induzir o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio que, conseqüente, resultam no aumento da oxidação de macromoléculas como lipídeos e a produção de malondialdeído nos tecidos (OZKAN et al., 2007; GHOSH; ALAJBEGOVIC; GOMES, 2015; NAWAZ et al., 2021). Esse efeito celular nem sempre é desejável e, é nesse sentido, que o presente capítulo objetiva avaliar a atividade anti-inflamatória, antinociceptiva e antioxidante do dibenzoilmetano e seu derivado sintético. A

proposta é a de que essas moléculas sejam capazes não somente de inibir a dor e inflamação, mas melhorar a resposta antioxidante em decorrência da inflamação tecidual.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Animais

Os animais utilizados nos experimentos descritos a seguir foram obtidos do Biotério do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa (MG) e, até o final dos experimentos, ficaram mantidos em caixas de polietileno, consumindo ração comercial (Presence/InVivo® Nutrição Animal) e água destilada *ad libitum*. A temperatura da sala de experimentação foi controlada em  $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ , com ciclo claro/escuro de 12 horas.

### 2.2 Atividade anti-inflamatória: edema de pata induzido por formalina

Os ratos *Wistar* foram randomizados utilizando-se o *software* online Reserch Randomizer® disponível no site < <https://www.randomizer.org/> > em dez grupos experimentais (6 animais/grupo) e foram tratados com uma injeção intraperitoneal de: 1) **controle negativo** (veículo – solução salina + dimetilsulfóxido 5%); 2) **controle positivo** (Meloxicam® – 2mg/kg); 3) **DBM 1** (dibenzoilmetano – 1mg/kg); 4) **DBM 5** (dibenzoilmetano – 5mg/kg); 5) **DBM 10** (dibenzoilmetano – 10mg/kg); 6) **DBM 20** (dibenzoilmetano – 20mg/kg); 7) **DPBP 1** (2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona – 1mg/kg); 8) **DPBP 5** (2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona – 5mg/kg); 9) **DPBP 10** (2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona – 10mg/kg); 5) **DPBP 20** (2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona – 20mg/kg). Uma hora depois receberam uma injeção intraplantar contendo 100µL da solução de formalina 2,5% para indução da inflamação na traseira direita.

Para aferição do edema induzido pela formalina foi-se utilizado um paquímetro digital (MTX®, resolução de 0,01mm). As medidas foram realizadas antes da indução da inflamação (T0h) e 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 12h e 24h após a indução da inflamação. Todas as aferições foram realizadas em triplicata por um pesquisador previamente treinado. O percentual de inibição do edema foi calculado de acordo com a equação descrita abaixo, onde: Et = edema no grupo tratado e Ec = média de edema no grupo controle (GOEL et al., 2013; BATISTA et al., 2016).

$$\% \text{ inibição} = 100 \times \left( 1 - \frac{Et}{Ec} \right)$$

Ao final do experimento, os ratos foram anestesiados com a utilização de Isoflurano 100% (Isoforine, Cristália®), em aparelho de anestesia inalatória conforme resolução 714, de 20 de julho de 2002 e submetidos à eutanásia por punção cardíaca. O fígado e a pata direita de parte dos animais foram retirados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenado à temperatura de -80°C até o início das análises de estresse oxidativo e, a pata dos animais restantes, foi fixada em formaldeído tamponado 10% para posterior análise histológica.

### 2.3 Atividade antinociceptiva: teste de nocicepção induzida por formalina

As etapas de indução da inflamação e grupos experimentais deste experimento foram idênticas às realizadas no item 2.2 deste capítulo, no entanto, o modelo animal utilizado foi camundongo C57BL/6 (6 animais/grupo). Sendo assim, uma hora depois de serem tratados com os compostos controles e testes, os animais receberam uma injeção intraplantar de 20µL da solução de formalina 2,5% para indução da inflamação na traseira direita. Em seguida, foi cronometrado o tempo que o animal lambe, sacode ou morde a pata injetada com formalina, no período de 0-5 minutos e de 15-30 minutos após a sua aplicação (GOEL et al., 2013; BATISTA et al., 2016).

Os dados foram avaliados de acordo com a porcentagem de inibição do tempo em que o animal lambe, sacode ou morde a pata injetada com formalina calculada utilizando-se a seguinte fórmula: % inibição =  $(1 - (Lt/Lc)) * 100$ , onde Lt = número de lambidas do grupo tratamento e Lc = média do número de lambidas do grupo controle. Ao final dos 30 minutos, os camundongos foram anestesiados (Isoflurano, Cristália®), em aparelho de anestesia inalatória e submetidos à eutanásia por punção cardíaca.

### 2.4 Atividade antinociceptiva: contorções abdominais induzidas por ácido acético

A dor abdominal foi induzida nos camundongos (6 animais/grupo) por meio de uma injeção intraperitoneal da solução de ácido acético glacial 0,8% (100µL/10g) diluído em salina 0,9% uma hora depois dos animais terem sido tratados com controle negativo (salina + dimetilsulfóxido 5%), controle positivo (diclofenaco de sódio -10mg/kg) e DPBP (5, 10 e 20 mg/kg).

Após a administração do ácido acético, os camundongos foram colocados e colocados em uma caixa acrílica para que o número de contorções geradas fosse observado durante 30 minutos. As contorções abdominais consistiram da contração da musculatura abdominal seguidas de torção do tronco e extensão de uma ou ambas as patas posteriores, produzidas em

resposta a irritação peritoneal e peritonite produzidas por ácidos fracos ou agentes inflamatórios (KOU et al., 2005; NILE; PARK, 2013).

A atividade antinociceptiva foi determinada com base na inibição do número de contorções abdominais nos animais previamente tratados. Ao final dos 30 minutos, os camundongos foram anestesiados (Isoflurano, Cristália<sup>®</sup>), em aparelho de anestesia inalatória e submetidos à eutanásia por punção cardíaca.

## 2.5 Análises de citocinas

A determinação de IL-4, IL-10 e IFN- $\gamma$  foi realizada em sobrenadante de homogenato de pata pelo teste ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*), utilizando o kit comercial BD OptEIA<sup>™</sup> Set Mouse, seguindo as recomendações do fabricante (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA). Para o ensaio, microplacas de 96 poços (Corning<sup>®</sup> High Binding, Costar) foram sensibilizadas com anticorpos de captura Anti-mouse diluídos em Carbonato de Sódio 0,1M ou Fosfato de Sódio 0,2M e incubadas *overnight* a 4°C. Posteriormente, após um ciclo de três lavagens com PBS/Tween-20 0,05%, o bloqueio foi realizado com PBS/Soro Fetal bovino 10% (LGC Biotecnologia) e as placas foram incubadas por uma hora a 37°C.

Em seguida, após outro ciclo de três lavagens, foram adicionadas as amostras e as diluições seriadas da curva padrão. As placas foram incubadas *overnight* a 37°C. Após esse período, as placas foram lavadas novamente e os anticorpos de detecção conjugados à biotina juntamente com Estreptoavidina Peroxidase foram adicionados às placas e incubados por uma hora em temperatura ambiente. Após novas lavagens, o substrato O-fenilenodiamina (OPD, Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, San Luis, Missouri, EUA) foi adicionado e as placas foram incubadas por 30 minutos ao abrigo de luz. A reação foi interrompida pela adição de Ácido Sulfúrico 0,5M. A leitura foi realizada em leitor de microplacas a 492nm.

## 2.6 Avaliação da atividade antioxidante tecidual

### 2.6.1 Preparo do homogenato de tecido

O preparo do homogenato de pata foi realizado com o auxílio de um homogeneizador de tecidos. Para isso, em um tubo de ensaio, foram pesados 100mg de tecido edemaciado e acrescentado 1000 $\mu$ L de PBS. O tecido foi triturado e o conteúdo do tubo de ensaio foi vertido em um eppendorf para ser centrifugado em centrífuga refrigerada (4°C), com velocidade de 10.000G, durante 15 minutos. O sobrenadante foi coletado e utilizado para realização das análises de atividade antioxidante dos seguintes marcadores:

### 2.6.2 Atividade de catalase (CAT)

A determinação da atividade da enzima catalase é baseada na sua capacidade de clivar o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) em água e oxigênio molecular, conforme descrito por AEBI (1984). Em um tubo de polipropileno foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato 100 mM, (pH 7,2) e 40  $\mu\text{L}$  de água destilada e 10  $\mu\text{L}$  da amostra. A reação foi iniciada pela adição de 900  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (5 mM). As absorvâncias foram determinadas a cada minuto, durante três minutos, a 240 nm. Água destilada foi utilizada como branco.

Uma unidade (U) de catalase é equivalente à hidrólise de 1 mol de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $\epsilon=39,4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) por minuto (AEBI, 1984). Usualmente a atividade dessa enzima é representada em  $\mu\text{mol}/\text{mL}$  de amostra. A atividade da catalase foi calculada segundo a lei de Lambert Beer. A absorvância utilizada para o cálculo é o delta obtido das três absorvâncias lidas (absorvância final – absorvância inicial).

### 2.6.3 Atividade de superóxido dismutase (SOD)

A quantificação desta enzima foi dada em unidades relativas, sendo uma unidade de SOD definida como a quantidade de enzima que inibe em 50% a velocidade de oxidação do pirogalol. No meio de reação foram utilizados 20  $\mu\text{L}$  de homogenato de pata, 8  $\mu\text{L}$  de pirogalol 24 mmol/L e 4  $\mu\text{L}$  de catalase 30  $\mu\text{mol}/\text{L}$ , completando para 200  $\mu\text{L}$  com tampão Tris-HCl-EDTA 0,01 M (pH 7,4). A leitura de absorvância foi feita a 420 nm, sendo os resultados expressos em U de SOD / mg de proteína (MARKLUND, 1985).

### 2.6.4 Concentração de óxido nítrico (NO)

A análise foi realizada em triplicata em placa de 96 poços. Foi utilizado 50  $\mu\text{L}$  de homogeneizado e misturados as soluções A (Sulfanilamida 1% em  $\text{H}_3\text{PO}_4$  2,5%) e B (Naftil etileno amida dihydrochloride 0,1% em  $\text{H}_3\text{PO}_4$  2,5%) na proporção (1:1) e foi deixada a placa reagir por 10 min no escuro para posterior leitura no espectrofotômetro (Multiskan Go, Thermo Cientific) em comprimento de onda 570 nm.

Para a montagem da curva padrão foram feitas 8 diluições 1:2 para o padrão (1-Nitrito de Sódio 6,9 mg/400 mL). Foi colocado 50  $\mu\text{L}$  de tris HCl nos poços destinados ao padrão. Acrescentou 50  $\mu\text{L}$  do próprio padrão à primeira duplicata, e continuou a diluição homogeneizando e retirando 50  $\mu\text{L}$  da primeira diluição e passando para a segunda diluição e assim sucessivamente.

### 2.6.5 Concentração de malondialdeído (MDA)

A determinação de MDA foi feita pelo teste de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) (KOHN; LIVERSEDGE, 1944). Em um microtubo foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de homogeneizado e 400  $\mu\text{L}$  de TBARS. Em seguida, as amostras foram agitadas em vortex por 5 segundos e incubadas em banho-maria por 40 minutos, a 90°C. As amostras foram resfriadas em gelo e adicionadas de 600  $\mu\text{L}$  de n-butanol e agitadas por 2 minutos, seguida por centrifugação a 900G por 10 minutos. Foram retiradas 200  $\mu\text{L}$  do sobrenadante e a leitura foi realizada na absorvância de 532nm.

Os valores finais foram calculados por meio de curva-padrão sendo utilizado o reagente N-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidima (TMPO), com a concentração variando de 20  $\mu\text{M}$  a 1,25  $\mu\text{M}$ . Os resultados foram em nmol de MDA por miligramas de proteínas (nMol de MDA/mgPTN). A proteína total do homogeneizado do fígado foi quantificada, segundo o método de Bradford (1976).

### 2.6.6 Atividade de glutathiona s-transferase (GST)

A atividade da enzima glutathiona s-transferase foi determinada pela mensuração da conjugação de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno com a glutathiona, através do monitoramento do aumento da absorvância no comprimento de onda de 340nm (Habig, Pabst and Jakoby, 1976). As leituras de absorvância foram realizadas nos tempos 0, 30, 60 e 90 minutos e o resultado foi expresso em  $\mu\text{mol/g}$  de proteína.

### 2.6.7 Análises histomorfométricas

Para realização das análises histológicas, as patas dos ratos foram fixadas em formaldeído tamponado 10%. Os ossos da pata foram descalcificados em EDTA 10%, pH 7,0. Em seguida, o tecido foi incluído desidratado em álcool (70, 80, 90 e 100%), diafanizados em xilol e embebidos em parafina. Seções de 5 $\mu\text{m}$  foram obtidas por microtomia, coradas com hematoxilina e eosina, e observadas em microscopia de luz. A aquisição das imagens foi feita em microscópio Olympus DP73. As imagens foram avaliadas com auxílio do software *Image Pro-plus* e a distância ( $\mu\text{m}$ ) entre a epiderme e o músculo foi obtida.

Para avaliação da presença de células inflamatórias nas patas, cinco regiões de cada tecido (compreendendo a região de derme) foram avaliadas por animal, utilizando microscópio de luz em aumento de 400x. Alterações histopatológicas foram avaliadas de forma semiquantitativa e atribuídos quatro níveis de quantidade celular, sendo eles: (-) sem células de defesa, (+) discreta quantidade de células de defesa e, portanto, manutenção da arquitetura

tecidual normal do órgão; (++) moderada, quando houve quantidade maior que o normal de células inflamatórias e (+++) severa, quando houve grande quantidade de células inflamatórias nas regiões.

#### 2.6.8 Análises estatísticas

Os dados foram analisados no programa IBM® SPSS Statistics versão 20.0 e Stata® versão 13.0 e os gráficos gerados com o auxílio do *software* GraphPad Prism 7. A igualdade de variâncias das variáveis foi verificada pelo teste de Barlet e a esfericidade pelo teste de Mauchly. Análise de variância com um fator (One-way ANOVA) seguida pelo post-hoc de Tukey ou análise de variância com dois fatores de medidas repetidas (Two-way repeated measures ANOVA) seguida do teste de Bonferroni como teste post-hoc foram utilizados para identificar diferenças estatísticas entre os grupos controle e testes. Foi adotado como nível de significância estatística um  $\alpha$  de 0,05.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Inibição do edema de pata induzido por formalina

O edema de pata induzido por formalina se assemelha a inflamação gerada pela artrite em humanos e é um método amplamente utilizado para triagem de possíveis agentes anti-inflamatórios (BEG et al., 2011). Os resultados apresentados na tabela 1 demonstraram que o tratamento prévio com DPBP produziu significativa inibição do desenvolvimento de edema pelos animais [F (40, 560) = 6,502;  $p < 0,0001$ ]. Quando comparado ao controle negativo, a dose de 5mg de DPBP/kg apresentou inibição do edema de pata em todos os momentos avaliados ( $p < 0,05$ ). As demais doses, 1mg/kg; 10mg/kg e 20 mg/kg apresentaram efeito apenas até 4h ( $p < 0,05$ ), 3h ( $p < 0,05$ ) e 1h ( $p < 0,05$ ) pós indução da inflamação, respectivamente. Em relação à atividade anti-inflamatória do DBM, quando comparado ao controle negativo, foi possível encontrar uma pequena redução do edema 12h após a indução da inflamação com a dose de 1mg/kg ( $p < 0,01$ ) e um ligeiro aumento do edema com a dose de 10mg/kg ( $p < 0,01$ ) [F (40, 560) = 6,840;  $p < 0,0001$ ].

A concentração da formalina utilizada pode influenciar tanto volume de edema produzido, quanto no comportamento dos animais de lambar, sacudir ou morder a pata após sua injeção. Lee & Jeong (2002) investigaram a concentração de formalina que induzia melhor comportamento relacionado a dor e inflamação e encontraram que soluções em concentrações entre 2,5 e 5% de formalina teriam o melhor resultado.

Na fase aguda da inflamação induzida pela administração da formalina na pata dos animais, mediadores químicos induzem vasodilatação e aumentam a permeabilidade vascular permitindo que leucócitos e proteínas plasmáticas migrem para os tecidos extravasculares. Como resultado dessa migração, acontece o aumento da pressão osmótica e consequente efluxo de água para os tecidos, culminando com inchaço característico do edema (CHEN et al. 2018; KUMAR et al., 2018).

Estudos anteriores demonstraram que o dibenzoilmetano é capaz de modular a diferenciação celular e assim podendo alterar o edema gerado pela inflamação induzida por formalina (KANG et al., 2018; KIM et al., 2018). Diferentemente desses estudos, a atividade anti-inflamatória por via intraperitoneal do dibenzoilmetano não foi encontrada. Não foram investigados os mecanismos de ação do DPBP na inibição da migração celular, no entanto, percebe-se que o DPBP possuiu efeito bastante interessante durante todas as horas avaliadas, em especial, quando utilizada a dose de 5mg/kg de peso dos animais, responsável por inibir o edema de pata durante 24h.

### 3.2 Inibição da dor induzida por formalina

A figura 1 apresenta os dados relativos ao tempo que os animais passaram lambendo, sacudindo ou mordendo a pata após a injeção intraplantar de formalina. Esse modelo de indução de dor mostra duas fases de sensibilidade dolorosa e os resultados demonstraram que o tratamento prévio com DPBP ou DBM apresentou efeito antinociceptivo tanto na fase inicial [ $F(9, 50) = 7,356; p < 0,0001$ ], quanto na fase tardia [ $F(9, 50) = 6,367; p < 0,0001$ ].

A fase inicial da dor acontece de 0-5 minutos após a injeção de formalina e é chamada de fase neurogênica. Nela ocorre ativação direta pela formalina de receptores de dor presentes em neurônios nociceptivos aferentes locais. A segunda fase é uma fase mais tardia que representa um tipo de dor inflamatória em resposta a injúria causada no tecido e envolve transmissão sináptica reforçada pela medula espinhal, bem como pela liberação dos mediadores inflamatórios locais, como prostaglandinas, serotonina, histamina e bradicinina (HUNSKAAR; HOLE, 1987; JIMOH et al., 2011). Na fase inicial da dor, todas as concentrações testadas de DPBP ou DBM demonstraram possuir efeito antinociceptivo ( $p < 0,05$ ). No entanto, na fase tardia, apenas as maiores concentrações testadas de DPBP (5, 10 e 20 mg/kg) foram capazes de reduzir o tempo que os animais passaram lambendo, sacudindo ou mordendo a pata quando comparadas ao controle ( $p < 0,05$ ).

### 3.3 Inibição das contorções abdominais induzidas por ácido acético

Contorções abdominais induzidas por ácido acético é um modelo de avaliação preliminar da atividade antinociceptiva de possíveis analgésicos (CHEN et al., 2009). De forma semelhante à fase tardia da indução de dor com formalina, injeções intraperitoniais de ácido acético geram uma resposta nociceptiva através da ativação de nociceptores e consequente produção de mediadores inflamatórios que resultam em hiperalgesia local (ZHENG et al., 2009; LEITE et al., 2012). Neste experimento, o DPBP apresentou efeito dose dependente sobre o número de contorções abdominais geradas pela estimulação com ácido acético [ $F(4,25) = 281,5$ ;  $p < 0,0001$ ]. O pré-tratamento com DPBP nas doses de 5mg/kg inibiu 90% ( $p < 0,0001$ ), 10mg/kg inibiu 83% ( $p < 0,0001$ ) e 20mg/kg inibiu 75% ( $p < 0,0001$ ) das contorções abdominais em comparação com o grupo controle (figura 2).

### 3.4 Quantificação das citocinas anti-inflamatórias teciduais

Em resposta a estímulos gerados por dano celular após a injeção com formalina, uma série de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  são produzidas por células imunes que invadem o tecido afetado. O aumento dos níveis teciduais dessas moléculas resulta na regulação positiva do processo de hiperalgesia induzida pela inflamação. Para prevenir que o processo inflamatório se torne persistente e crônico, além de tentar retornar a homeostase tecidual, citocinas anti-inflamatórias como a IL-4 e IL-10 são produzidas e atuam regulando negativamente a expressão dessas citocinas pró-inflamatórias e de seus receptores nas superfícies celulares, além de atuarem regulando o processo de proliferação e diferenciação de células do sistema imune.

A figura 3 apresenta a quantificação da citocina IFN- $\gamma$  e das interleucinas 4 (IL-4) e 10 (IL-10) na pata dos animais tratados previamente com uma injeção intraperitoneal de uma solução contendo DPBP. Os resultados demonstram que nas patas dos animais que receberam as doses de 1mg/kg (G1) e 5mg/kg (G2) foi possível encontrar uma quantidade maior de IFN- $\gamma$  e de IL-4 quando comparado ao controle negativo ( $p < 0,05$ ). Em relação a IL-10, apenas a dose de 1mg de DPBP/kg foi capaz de induzir a presença uma maior quantidade dessa citocina ( $p < 0,05$ ).

Alguns estudos têm investigado a cooperação entre as citocinas IL-4, IL-10 e IFN- $\gamma$  regulando o processo inflamatório (DA SILVA et al., 2015; KOPITAR-JERALA, 2017; ADEFEGHA et al., 2020). IFN- $\gamma$  e IL-4 são citocinas chave no processo de diferenciação de linfócitos Th1 e Th2, respectivamente. Linfócitos Th1 estão predominantemente envolvidos na imunidade mediada por células para combater patógenos intracelulares, como vírus. Eles são parcialmente caracterizados pela produção da citocinas pró-inflamatórias e IFN- $\gamma$ . Em

contrapartida, linfócitos do tipo Th2 estão envolvidos com imunidade humoral, fornecendo proteção contra patógenos extracelulares, particularmente de origem bacteriana e fúngica. São responsáveis pela produção de citocinas anti-inflamatórias e podem auxiliar linfócitos B na regulação positiva da produção de imunoglobulinas (SHAW, et al., 2017; DONG, 2021).

Na maioria dos estudos, a relação entre IL-4/IFN- $\gamma$  parece ser antagonista, enquanto IFN- $\gamma$  inibe a diferenciação de células Th2 e conseqüentemente a produção de IL-4 pela via sinalização celular JAK/STAT1, IL-4 inibe a diferenciação de linfócitos em favor das células Th1 via JAK/STAT6 (GAJEWSKI et al., 1988; ORISS et al., 1997). No entanto, o tratamento simultâneo com IL-4 e IFN- $\gamma$  parece regular negativamente o processo inflamatório gerando uma redução da expressão gênica de COX-2 induzida por IL-1 $\beta$  e da produção de PGE<sub>2</sub> (MACHADO-CARVALHO; ROCA-FERRER; PICADO, 2019). Na resposta a inflamação aguda, o aumento da expressão de COX-2 resulta no aumento da produção de PGE<sub>2</sub> e conseqüente hiperalgesia, rubor e edema (JAIN et al., 2008; RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011). Estudos avaliando a atividade anti-inflamatória do dibenzoilmetano demonstraram que o reduziu a expressão de COX-2 e PGE<sub>2</sub> demonstrando seu importante papel no processo de homeostase tecidual (HONG, 2004; ANAND et al., 2011).

A IL-10 é reconhecida como uma citocina imunoreguladora com atividade anti-inflamatória que exerce papel crucial na prevenção de patologias inflamatórias e autoimunes. Por isso, possui função antagonista ao IFN- $\gamma$  e é capaz de inibir sua produção pela ativação da via de sinalização celular JAK/STAT3 (IYER; CHENG, 2012). No entanto, assim como acontece com a IL-4, o tratamento com IL-10 em conjunto com IFN- $\gamma$  modulam as respostas celulares inflamatórias suprimindo as funções imunoestimulatórias de células dendríticas reduzindo a expressão de TNF- $\alpha$  e IL-12, além de reduzir a ativação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (YANAGAWA; IWABUCHI; ONOÉ, 2009).

Percebe-se que o tratamento prévio com uma injeção contendo 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona aumentou os níveis de todas as citocinas avaliadas, demonstrando sua atividade anti-inflamatória. Assim, os resultados apresentados no item 3.2 fomentam a hipótese de que o aumento das concentrações teciduais de IL-4, IL-10 e IFN- $\gamma$  melhorem a resposta inflamatória e antinociceptiva em resposta a administração de DPBP por agirem de forma sinérgica modulando toda resposta inflamatória gerada pela administração de formalina na pata dos animais.

### 3.5 Atividade antioxidante tecidual

A figura 4 apresenta os resultados da atividade antioxidante realizada nas patas dos animais. Para atividade da enzima catalase, não foi possível encontrar diferença estatisticamente significativa para nenhum dos compostos teste [F (9, 70) = 0,932; p = 0,503]. Em relação à atividade das enzimas superóxido dismutase [F (9, 70) = 3,747; p < 0,001] e glutatona s-transferase [F (9, 70) = 13,96; p < 0,0001] e da concentração de óxido nítrico [F (9, 70) = 11,45; p < 0,001] e malondialdeído [F (9, 70) = 31,44; p < 0,0001] foi possível encontrar diferenças estatisticamente significativas.

Os resultados demonstraram aumento da atividade da enzima superóxido dismutase em todas as concentrações de DPBP testadas e nas concentrações de 5, 10 e 20mg de DBM/kg (p < 0,05). Somente as menores concentrações de DPBP e DBM (1mg/kg) foram capazes de aumentar a atividade da enzima glutatona s-transferase (p < 0,05). As doses de 5, 10 e 20mg de DBM/kg aumentaram a concentração tecidual de óxido nítrico, enquanto todas as doses testadas de DPBP se mantiveram similares ao controle negativo (p < 0,05). As doses de 5, 10 e 20mg de DPBP/kg e a dose de 5mg de DBM/kg aumentaram a concentração tecidual de MDA (p < 0,05), ao passo que as demais doses tiveram resultados similares ao controle negativo.

O desenvolvimento da inflamação está intimamente relacionado à produção excessiva de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, da depleção do sistema de defesa antioxidante enzimática e não enzimática e do aumento da peroxidação de lipídios de membrana. (LAVETI et al., 2013; MAKNI et al., 2019). Estudos anteriores demonstraram que a geração excessiva de ROS após a injeção de agentes indutores de inflamação, desencadeiam uma resposta inflamatória através da ativação de células imunes e liberação de diferentes mediadores pró-inflamatórios, resultando em lesão tecidual (KIM et al., 2017; ZOUARI BOUASSIDA et al., 2018).

A resposta anti-inflamatória desencadeada pela inflamação periférica é mediada pela ativação do fator de transcrição nuclear Nrf2. Esse fator de transcrição é conhecido por induzir a transcrição de vários genes relacionados a expressão de enzimas antioxidantes e detoxificantes de fase II (TONELLI; CHIO; TUVESON, 2018). A regulação positiva de Nrf2 é conhecida por exercer efeitos anti-inflamatórios na artrite reumatóide. Enquanto o tratamento com dimetilfumarato, um ativador de Nrf2 reduziu o dano oxidativo e inflamação em um modelo animal para artrite, (LAL et al., 2021) animais nocaute de Nrf2 possuem aumento significativo da destruição da cartilagem e da carga oxidativa após indução da inflamação. Esses achados indicam que a ativação da via de sinalização Nrf2 pode servir como uma nova abordagem

terapêutica para o tratamento da artrite reumatóide (WRUCK et al., 2011; KHALID et al., 2018).

Sabe-se que o dibenzoilmetano pode agir aumentando a ativação de Nrf2 durante os processos inflamatórios, melhorando os parâmetros oxidativos teciduais (CAO et al., 2017; KIM et al., 2018; LEE et al., 2019). No entanto, o presente estudo não investigou a atividade do DPBP na ativação de Nrf2. Mesmo assim, percebe-se que a administração de DPBP por via intraperitoneal aumentou a atividade de enzimas antioxidantes expressas em resposta a ativação de Nrf2 como a SOD e a GST, demonstrando uma ação antioxidante por meio da melhora das defesas antioxidantes enzimáticas durante o processo inflamatório.

### 3.6 Histomorfometria

As análises de histomorfometria (figura 5) revelaram que 24h após a indução da inflamação somente a dose de 5mg de DBM/kg aumentou a distância entre a epiderme e o músculo [ $F(9, 40) = 3,674$ ;  $p < 0,01$ ]. Nesse mesmo sentido, a análise semiquantitativa da presença de células inflamatórias no tecido (tabela 2), revelou que nas patas dos animais que receberam DBM houve uma infiltração de células de defesa classificada como de moderada a severa. Por outro lado, independente das concentrações testadas de DPBP, percebe-se que houve apenas uma discreta quantidade de infiltrado inflamatório presente no tecido.

A inibição do processo de migração, invasão e diferenciação celular têm sido características importantes para compostos candidatos a agentes terapêuticos anti-inflamatórios, já que as células imunes orquestraram toda resposta inflamatória tecidual em resposta aos agentes estressantes. Dentre os alvos terapêuticos pesquisados atualmente com enfoque em artrite reumatoide, destacam-se os inibidores de CCR1, CCR5, C5aR, CXCR2 e CCR2 (LUSTER; ALON; VON ANDRIAN, 2005; MACKAY, 2008). Por mais que os tipos celulares das células de defesa que migraram para as patas inflamadas dos animais que receberam DPBP não tenham sido investigados, os resultados apresentados na tabela 2 revelam que o tratamento com esse composto foi importante para inibição da migração celular, demonstrando mais uma vez uma característica desejável para fármacos anti-inflamatórios.

### 3.7 Via de administração intraperitoneal e anti-inflamatória, antinociceptiva e antioxidante do 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona

O peritônio é uma excelente porta de entrada até a circulação sistêmica para diferentes agentes terapêuticos principalmente pela vasta vascularização do tecido e a possibilidade do transporte linfático (FLESSNER, 1991). Apesar de esta via de administração não ser

comumente utilizada em estudos com humanos na fase clínica, em estudos com roedores nas fases pré-clínicas, essa é uma das vias que têm sido amplamente utilizadas (AL SHOYAIB; ARCHIE; KARAMYAN, 2020).

Sua aplicação se justifica principalmente pela facilidade na administração dos fármacos, por ser pouco estressante para os animais e por favorecer a administração de grandes volumes, característica importante quando se pretende testar moléculas pouco solúveis em água. Todavia, por direcionarem as moléculas absorvidas para circulação sistêmica por meio da veia porta, possui como principal limitação a possibilidade da redução da biodisponibilidade do princípio ativo em função da sua passagem pelo fígado e possível metabolização (KIM et al., 2011; ROZEWSKI et al., 2012; MATZNELLER et al., 2018).

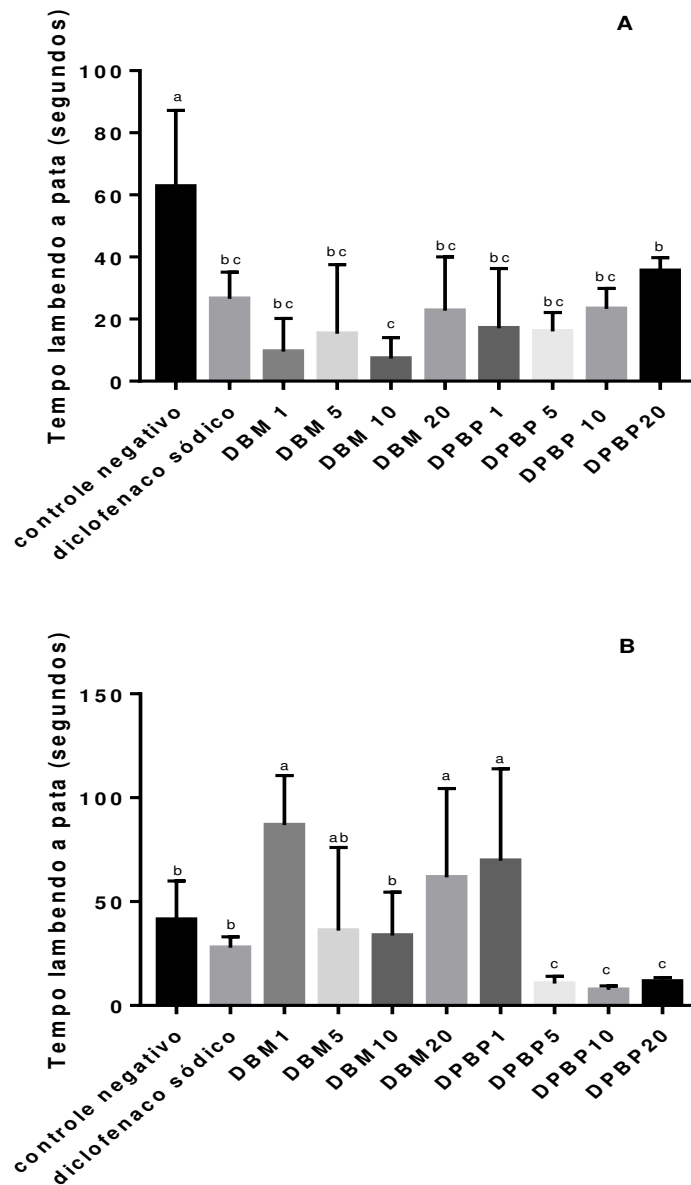
O metabolismo de medicamentos e xenobióticos acontece em diversos tecidos metabolicamente ativos e pode ser dividido em duas fases: uma não sintética, conhecida como fase 1, e outra sintética, conhecida como fase 2. Na primeira, acontecem reações que incluem oxidação, redução, hidrólise e hidroxilação. Na segunda, reações de conjugação com ligantes endógenos como reações de glicuronidação, acetilação e sulfatação. Ambas possuem o mesmo objetivo, tornar as moléculas mais solúveis para facilitar sua excreção (ABU-HIJLEH; HABBAL; MOQATTASH, 1995; YE et al., 2012).

A administração intraperitoneal fornece a molécula administrada uma absorção mais rápida e completa (SANE; MITTAPALLI; ELMQUIST, 2013). Percebe-se que utilizar essa rota de entrega do 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona favoreceu sua atividade anti-inflamatória, antinociceptiva e antioxidante, pois, conforme apresentado no capítulo 2 desta tese, sua passagem pelo fígado aconteceu mais tardiamente.

**Tabela 1.** Efeito anti-inflamatório da 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona e do dibenzoilmetano contra o edema de pata induzido por formalina em ratos.

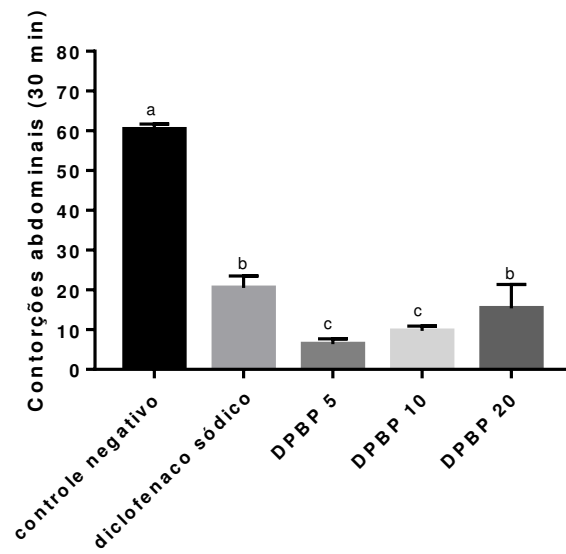
Tratamento	Dose (mg/kg)	Diâmetro da pata traseira (mm)								
		T0h	T1h	T2h	T3h	T4h	T5h	T6h	T12h	T24h
<b>Controle negativo</b>	-	4,65±0,25	7,89±0,50	8,03±0,56	8,33±0,56	8,25±0,59	8,33±0,63	8,51±0,65	8,75±0,47	8,34±0,44
<b>Meloxicam</b>	2	4,45±0,46	7,01±0,58**	7,38±0,65**	7,87±0,52	8,09±0,50	8,21±0,85	8,42±0,64	9,02±0,92	8,46±0,94
<b>DPBP</b>	1	4,42±0,28	6,73±0,46***	6,90±0,51**	7,18±0,61**	7,49±0,76**	7,79±0,71	7,68±0,81	8,61±0,75	8,20±0,67
	5	4,44±0,27	6,37±0,32***	7,23±0,62*	7,39±0,83*	7,56±0,82**	7,66±0,76**	7,94±1,06**	8,23±0,99**	7,22±1,04***
	10	4,19±0,25	6,71±0,45***	7,22±0,34**	7,31±0,36*	7,69±0,47	7,88±0,52	8,09±0,47	8,42±0,32	7,44±0,39**
	20	4,14±0,22	7,07±0,50*	7,46±0,73	7,48±0,66	7,69±0,63	7,73±0,77	8,29±0,65	-	7,88±0,32
<b>DBM</b>	1	4,57±0,26	7,70±0,31	8,08±0,41	8,47±0,16	8,52±0,24	8,63±0,37	8,74±0,46	9,17±0,35	7,94±0,27
	5	4,45±0,49	7,74±0,32	8,26±0,52	8,10±0,33	8,50±0,34	8,48±0,53	8,67±0,42	8,80±0,46	8,00±0,58
	10	4,40±0,37	7,75±0,29	8,24±0,33	8,47±0,19	8,61±0,27	8,72±0,32	8,93±0,44	9,25±0,46**	8,40±0,35
	20	4,66±0,34	7,48±0,49	7,93±0,54	8,17±0,54	8,43±0,59	8,62±0,52	8,95±0,58	9,12±0,47	8,43±0,24

Controle = solução salina + dimetilsulfóxido 5%, DBM = dibenzoilmetano, DPBP = 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona. Os resultados representam a média ± DP de 6 animais em cada tratamento. \* p <0,05, \*\* p <0,01 e \*\*\* p <0,001 representam diferença estatística em relação ao grupo de animais controle (ANOVA com dois fatores de medidas repetidas, seguida pelo teste de Bonferroni).

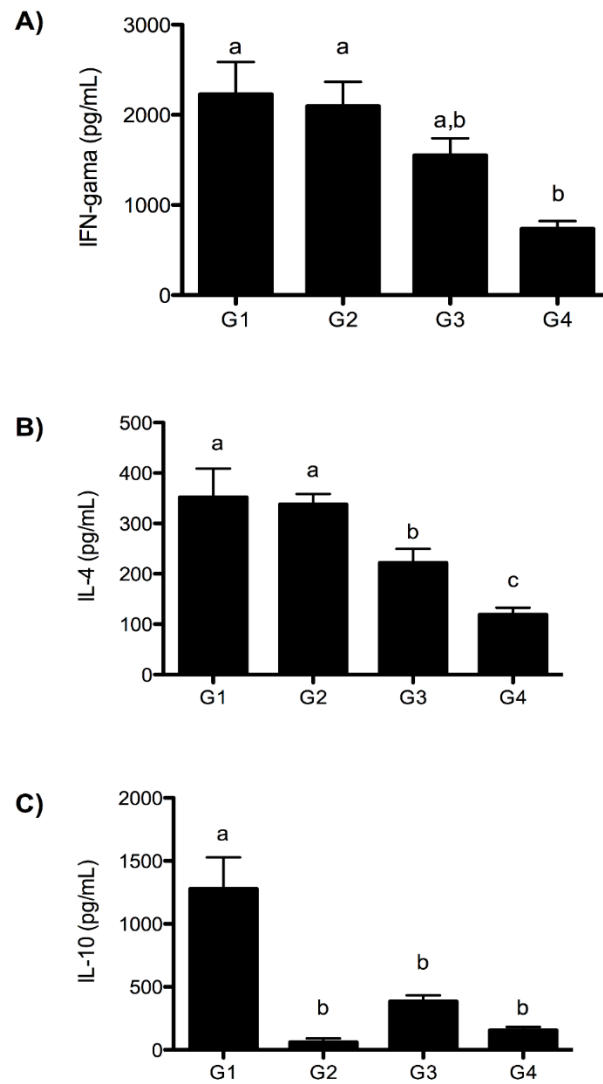


**Figura 1.** Efeito do dibenzoilmetano (DBM) e do 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona (DPBP) nas fases inicial (A) e tardia (B) da dor induzida por injeção intraplantar de formalina em camundongos.

Os resultados representam a média  $\pm$  SEM de 6 animais em cada grupo. Letras diferentes representam uma diferença estatística significativa (ANOVA seguida pelo teste post-hoc de Tukey).

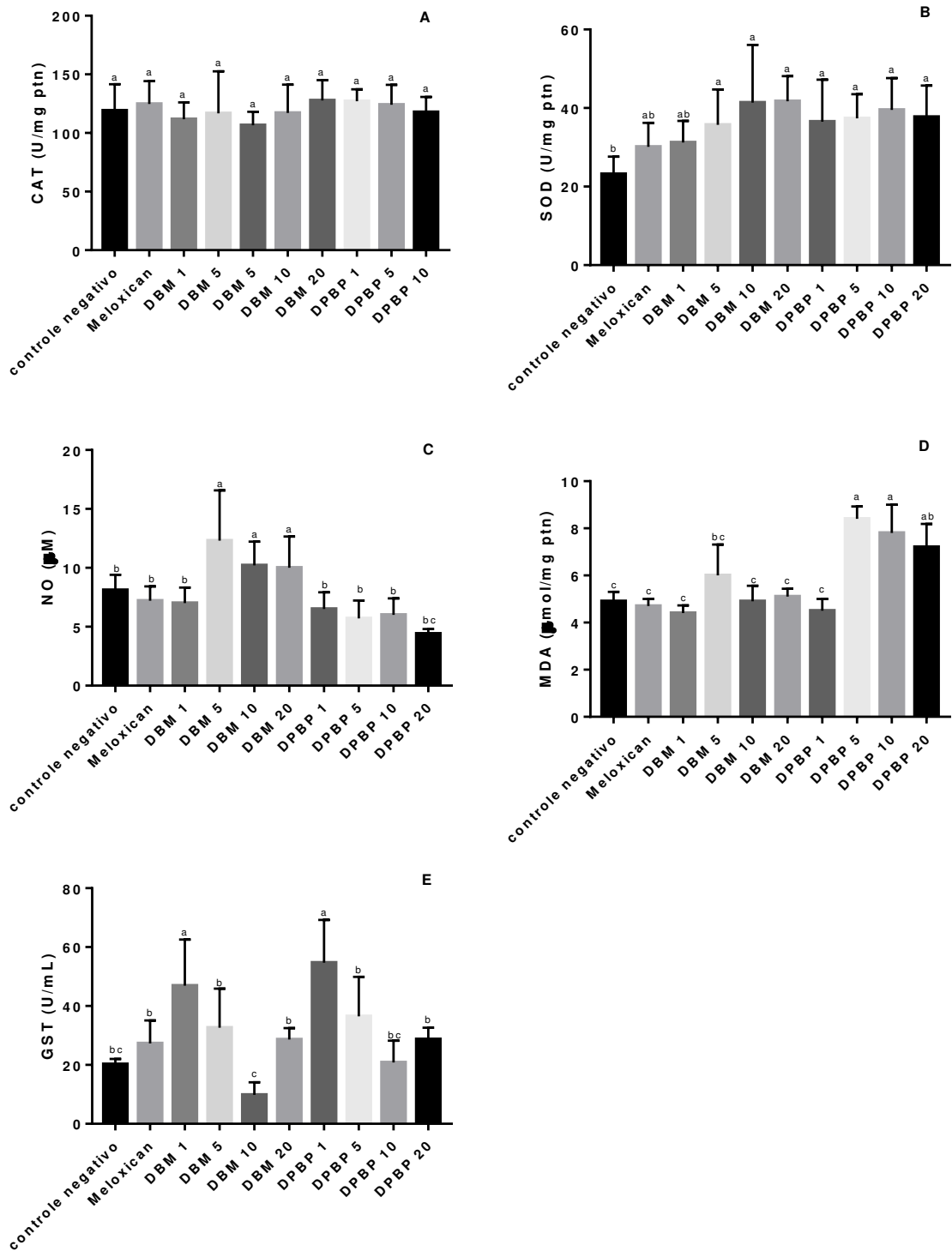


**Figura 2.** Efeito do 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona (DPBP) em controrções abdominais induzidas por injeção intraperitoneal de ácido acético em camundongos. Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão de 6 animais por grupo. Letras diferentes representam diferença estatística (ANOVA seguida pelo teste post-hoc de Tukey).



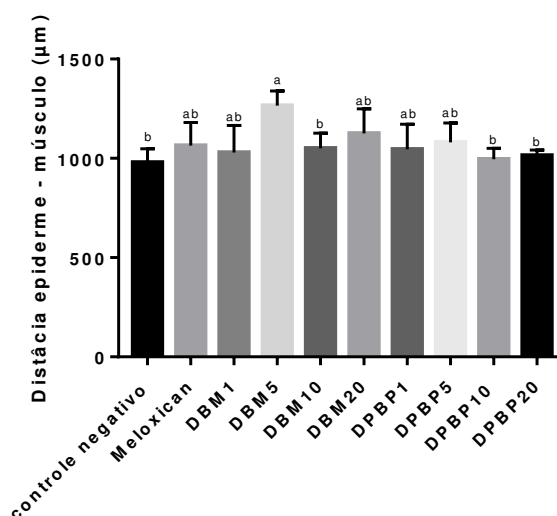
**Figura 3.** Quantificação de citocinas teciduais 3h após tratamento com 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona. G1: DPBP – dose de 1mg/kg; G2: DPBP – dose de 5mg/kg; G3: Meloxicam – dose de 2mg/kg; G4: Controle negativo – água destilada + dimetilsulfóxido 5%.

Os resultados representam a média  $\pm$  DP de 9 animais em cada grupo. Letras diferentes representam uma diferença estatística significativa (ANOVA seguida pelo teste post-hoc de Tukey).



**Figura 4.** Efeito do dibenzoilmetano (DBM) e do 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona (DPBP) nos marcadores do estresse oxidativo: a) Catalase (CAT); b) Superóxido dismutase (SOD); c) Óxido Nítrico (NO); d) Malondialdeído (MDA); e) Glutaciona s-transferase (GST).

Os resultados representam a média ± DP de 6 animais em cada grupo. Letras diferentes representam uma diferença estatística significativa (ANOVA seguida pelo teste post-hoc de Tukey).

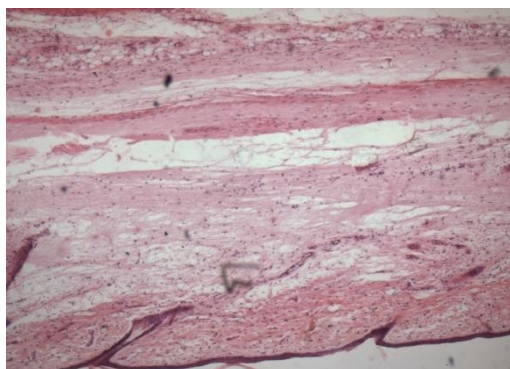


**Figura 5.** Efeito do dibenzoilmetano (DBM) e do 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona (DPBP) na distância entre a epiderme e músculo. Os resultados representam a média  $\pm$  DP de 6 animais em cada grupo. Letras diferentes representam uma diferença estatística significativa (ANOVA seguida pelo teste post-hoc de Tukey).

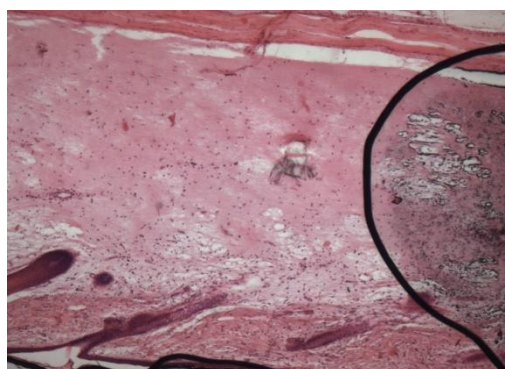
**Tabela 2.** Avaliação semiquantitativa da presença de células de defesa nas patas dos ratos.

Tratamento	Dose (mg/kg)	Classificação
Controle negativo	-	++
Meloxicam	2	++
DBM	1	++
	5	++
	10	++
	20	+++
	DPBP	1
5		+
10		+
20		+

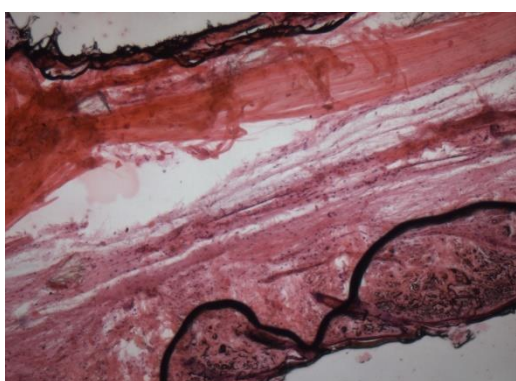
Legenda: (-) sem células de defesa; (+) discreta quantidade de células de defesa; (++) moderada quantidade de células de defesa e (+++) severa quantidade de células de defesa.



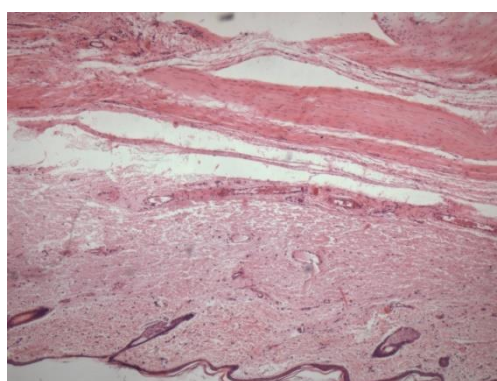
A. Controle negativo (água destilada + dimetilsulfóxido 5%)



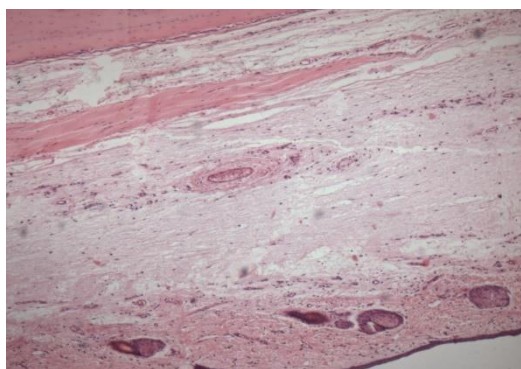
B. Controle positivo (Meloxicam®)



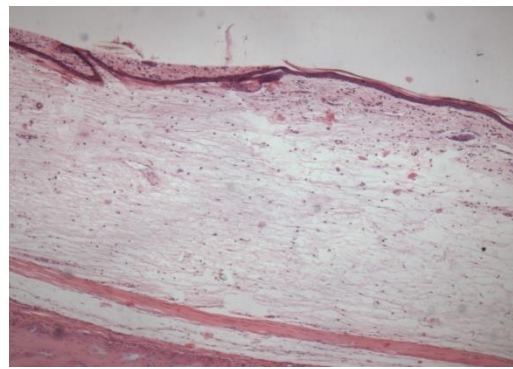
C. DPBP 1 (1mg/kg)



D. DPBP 5 (5mg/kg)

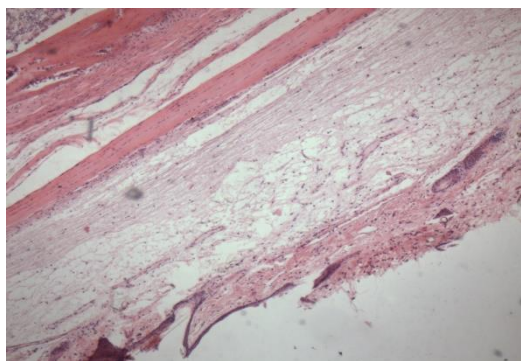


E. DPBP 10 (10mg/kg)

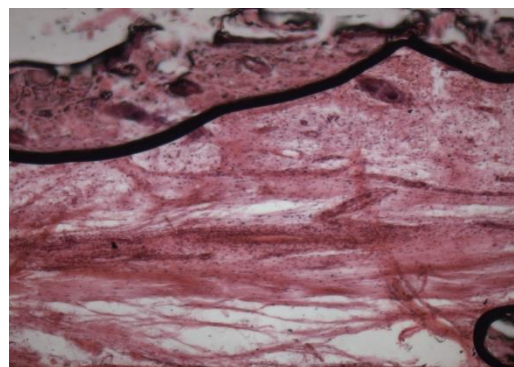


F. DPBP 20 (20mg/kg)

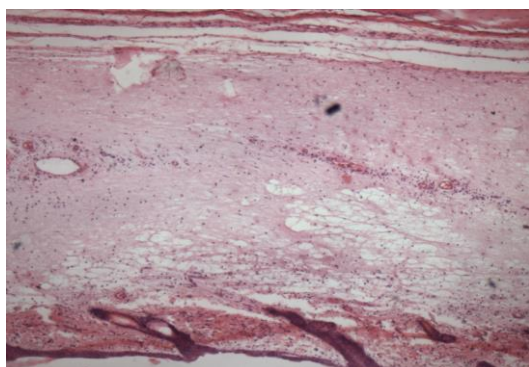
**Figura 6.** Histologia das patas dos animais 24h depois da indução da inflamação com formalina.



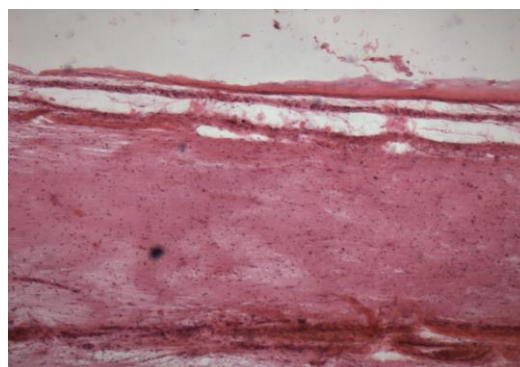
G. DBM 1 (1mg/kg)



H. DBM 5 (5mg/kg)



I. DBM 10 (10mg/kg)



J. DBM 20 (20mg/kg)

**Figura 6.** (continuação)

#### 4. CONCLUSÃO

Diante do exposto, podemos concluir que o tratamento com o derivado sintético de dibenzoilmetano (DPBP) apresenta atividade anti-inflamatória pela inibição do edema de pata induzido por formalina, por aumentar os níveis de citocinas anti-inflamatórias e reduzir a presença de infiltrado inflamatório nas patas dos animais. Apresenta atividade antinociceptiva em função da inibição do tempo que os animais passaram lambendo, sacudindo ou mordendo a pata após injeção com formalina e por reduzir o número de contorções abdominais geradas por injeção de ácido acético. Além de apresentar atividade antioxidante melhorando os níveis das defesas antioxidantes enzimáticas como SOD e GST. Por fim, a dose de 5 mg de DPBP/kg de peso dos animais apresentou os melhores resultados quando todos os testes realizados são avaliados.

## 5. REFERÊNCIAS

ABU-HIJLEH, M. F.; HABBAL, O. A.; MOQATTASH, S. T. The role of the diaphragm in lymphatic absorption from the peritoneal cavity. v. 186, p. 15, 1995.

ADEFEGHA, S. A. et al. Interferon gamma/interleukin-4 modulation, anti-inflammatory and antioxidant effects of hesperidin in complete Freund's adjuvant (CFA)-induced arthritis model of rats. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 42, n. 5, p. 509–520, 2 set. 2020.

AL SHOYAIB, A.; ARCHIE, S. R.; KARAMYAN, V. T. Intraperitoneal Route of Drug Administration: Should it Be Used in Experimental Animal Studies? **Pharmaceutical Research**, v. 37, n. 1, p. 12, jan. 2020.

ANAND, P. et al. Suppression of pro-inflammatory and proliferative pathways by diferuloylmethane (curcumin) and its analogues dibenzoylmethane, dibenzoylpropane, and dibenzylideneacetone: Role of Michael acceptors and Michael donors. **Biochemical Pharmacology**, v. 82, n. 12, p. 1901–1909, dez. 2011.

BATISTA, E. K. F. et al. Atividades antinociceptiva e antiinflamatória do extrato etanólico de *Luehea divaricata*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 2, p. 433–441, jun. 2016.

BEG, S. et al. Systematic review of herbals as potential anti-inflammatory agents: Recent advances, current clinical status and future perspectives. **Pharmacognosy Reviews**, v. 5, n. 10, p. 120, 2011.

CAO, M. et al. Dibenzoylmethane Protects Against CCl<sub>4</sub>-Induced Acute Liver Injury by Activating Nrf2 via JNK, AMPK, and Calcium Signaling. **The AAPS Journal**, v. 19, n. 6, p. 1703–1714, nov. 2017.

CAO, M. et al. Dibenzoylmethane Protects Against CCl<sub>4</sub>-Induced Acute Liver Injury by Activating Nrf2 via JNK, AMPK, and Calcium Signaling. **The AAPS Journal**, v. 19, n. 6, p. 1703–1714, nov. 2017.

CASTELLANI, P.; BALZA, E.; RUBARTELLI, A. Inflammation, DAMPs, Tumor Development, and Progression: A Vicious Circle Orchestrated by Redox Signaling. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 20, n. 7, p. 1086–1097, mar. 2014.

CHARO, I. F.; RANSOHOFF, R. M. The Many Roles of Chemokines and Chemokine Receptors in Inflammation. **New England Journal of Medicine**, v. 354, n. 6, p. 610–621, 9 fev. 2006.

CHEN, L. et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. **Oncotarget**, v. 9, n. 6, p. 7204–7218, 23 jan. 2018.

CHEN, L. et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. **Oncotarget**, v. 9, n. 3, p. 7204–7218, 2018.

CHEN, Y.-F. et al. Antinociceptive activity of Paederosidic Acid Methyl Ester (PAME) from the n-butanol fraction of *Paederia scandens* in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 93, n. 2, p. 97–104, ago. 2009.

CHINNASAMY, S. et al. Combining in silico and in vitro approaches to identification of potent inhibitor against phospholipase A2 (PLA2). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 144, p. 53–66, fev. 2020.

DA SILVA, M. D. et al. IL-10 Cytokine Released from M2 Macrophages Is Crucial for Analgesic and Anti-inflammatory Effects of Acupuncture in a Model of Inflammatory Muscle Pain. **Molecular Neurobiology**, v. 51, n. 1, p. 19–31, fev. 2015.

DONG, C. Cytokine Regulation and Function in T Cells. **Annu Rev Immunol.**, v. 26, n. 39, p. 51-76, 2021

FLESSNER, F. Peritoneal Transport Physiology: Research. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 2, n. 2, p. 14, 1991.

GAJEWSKI, T. F.; FITCH, F. W. Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. I. IFN-gamma inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. **J Immunol.**, v. 140, n. 12, p. 4245-4252, 1988.

GHOSH, R.; ALAJBEGOVIC, A.; GOMES, A. V. NSAIDs and Cardiovascular Diseases: Role of Reactive Oxygen Species. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2015, p. 1–25, 2015.

GOEL, R. et al. Anti-inflammatory activity of two classical formulations of Laghupanchamula in rats. **Journal of Ayurveda and Integrative Medicine**, v. 4, n. 1, p. 23, 2013.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferase AA from rat liver. **Arch Biochem Biophys**, v. 175, n. 2, p. 710-716, 1976.

HENRY, I. K. On a new aerobic metabolite whose production by brain is inhibited by apomorphine, emetine, ergotamine, epinephrine, and menadione. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 82, n. 3, p. 292-300, 1944.

HONG, J. Modulation of arachidonic acid metabolism by curcumin and related -diketone derivatives: effects on cytosolic phospholipase A2, cyclooxygenases and 5-lipoxygenase. **Carcinogenesis**, v. 25, n. 9, p. 1671–1679, 1 abr. 2004.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between. p. 12, 1987.

INOTAI, A.; HANKÓ, B.; MÉSZÁROS, Á. Trends in the non-steroidal anti-inflammatory drug market in six Central-Eastern European countries based on retail information. **Pharmacoepidemiology and Drug Safety**, v. 19, n. 2, p. 183–190, fev. 2010.

IYER, S. S.; CHENG, G. Role of Interleukin 10 Transcriptional Regulation in Inflammation and Autoimmune Disease. **Critical Reviews<sup>TM</sup> in Immunology**, v. 32, n. 1, p. 23–63, 2012.

JAIN, N. K. et al. COX-2 expression and function in the hyperalgesic response to paw inflammation in mice. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 79, n. 6, p. 183–190, dez. 2008.

JIMOH, A. O. et al. Analgesic effects and anti-inflammatory properties of the crude methanolic extract of *Schwenckia americana* Linn (Solanaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 1, p. 543–546, set. 2011.

KANG, B. et al. Dibenzoilmethane, a Component of Licorice, Suppresses Monocyte-to-Macrophage Differentiation and Inflammatory Responses in Human Monocytes and Mouse Macrophages. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 41, n. 8, p. 1228–1236, 1 ago. 2018.

KARIM, N. A. et al. Anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of asparacosin involve selective cyclooxygenase 2 and inflammatory cytokines inhibition: An in-vitro, in-vivo, and in-silico approach. **Front. Immunol**, v. 10, n. 3, p. 581-599, 2019.

KHALID, S. et al. Antihyperalgesic Properties of Honokiol in Inflammatory Pain Models by Targeting of NF- $\kappa$ B and Nrf2 Signaling. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, p. 140, 20 mar. 2018.

KIM, C. et al. Comparison of the Intraperitoneal, Retroorbital and per Oral Routes for F-18 FDG Administration as Effective Alternatives to Intravenous Administration in Mouse Tumor Models Using Small Animal PET/CT Studies. **Nuclear Medicine and Molecular Imaging**, v. 45, n. 3, p. 169–176, set. 2011.

KIM, J. H. et al. Dibenzoilmethane Suppresses Lipid Accumulation and Reactive Oxygen Species Production through Regulation of Nuclear Factor (Erythroid-Derived 2)-Like 2 and Insulin Signaling in Adipocytes. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 41, n. 5, p. 680–689, 1 maio 2018.

KIM, Y.-H. et al. Astragalosin Inhibits Allergic Inflammation and Airway Thickening in Ovalbumin-Challenged Mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 4, p. 836–845, 1 fev. 2017.

KOPITAR-JERALA, N. The Role of Interferons in Inflammation and Inflammasome Activation. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 873, 25 jul. 2017.

KOU, J. et al. Analgesic and Anti-inflammatory Activities of Total Extract and Individual Fractions of Chinese Medicinal Ants *Polyrhachis lamellidens*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 1, p. 176–180, 2005.

LAL, R. et al. Activation of the Nrf2/HO-1 signaling pathway by dimethyl fumarate ameliorates complete Freund's adjuvant-induced arthritis in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 899, p. 174044, maio 2021.

LAVETI, D. et al. Anti-inflammatory treatments for chronic diseases: a review. **Inflamm Allergy Drug Targets**, v. 12, n. 5, p. 349-361, 2013.

LEE, E. S. et al. Dibenzoilmethane ameliorates lipid-induced inflammation and oxidative injury in diabetic nephropathy. **Journal of Endocrinology**, p. 169–179, fev. 2019.

LEE, I. O.; JEONG, Y. S. Effects of different concentrations of formalin on paw edema and pain behaviors in rats. **J Korean Med Sci**, v. 17, n. 1, p. 81-85, 2002

LEE, K. L. et al. Discovery of Ecopladib, an Indole Inhibitor of Cytosolic Phospholipase A<sub>2</sub>  $\alpha$ . **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, n. 6, p. 1380–1400, mar. 2007.

LEITE, J. F. M. et al. Antinociceptive and Anti-inflammatory Effects of a Lectin-Like Substance from *Clitoria fairchildiana* R. Howard Seeds. **Molecules**, v. 17, n. 3, p. 3277–3290, 14 mar. 2012.

LIN, C.-C. et al. Inhibitory effects of 1,3-bis-(2-substituted-phenyl)-propane-1,3-dione,  $\beta$ -diketone structural analogues of curcumin, on chemical-induced tumor promotion and inflammation in mouse skin. **Food Funct.**, v. 2, n. 1, p. 78–83, 2011.

LUSTER, A. D.; ALON, R.; VON ANDRIAN, U. H. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. **Nature Immunology**, v. 6, n. 12, p. 1182–1190, dez. 2005.

MACHADO-CARVALHO, L.; ROCA-FERRER, J.; PICADO, C. IL-4/IFN- $\gamma$  inflammatory cytokine profile induces a deficient regulation of the IL-1 $\beta$ /IL-1RI/EP2/COX-2 pathway in nasal mucosa. **Respiratory Medicine**, v. 150, p. 136–140, abr. 2019.

MACKAY, C. R. Moving targets: cell migration inhibitors as new anti-inflammatory therapies. **Nature Immunology**, v. 9, n. 9, p. 988–998, set. 2008.

MAKNI, S. et al. *Emex spinosa* (L.) Campd. ethyl acetate fractions effects on inflammation and oxidative stress markers in carrageenan induced paw oedema in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 234, p. 216–224, abr. 2019.

MARKLUND, S. L. Product of extracellular-superoxide dismutase catalysis. **FEBS Letters**, v. 184, n. 2, p. 237–239, 1985.

MARNETT, L. J. The COXIB Experience: A Look in the Rearview Mirror. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 49, n. 1, p. 265–290, fev. 2009.

MATZNELLER, P. et al. Pharmacokinetics of the P-gp Inhibitor Tariquidar in Rats After Intravenous, Oral, and Intraperitoneal Administration. **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 43, n. 5, p. 599–606, out. 2018.

MURAKAMI, M. et al. Regulatory Functions of Phospholipase A2. **Regulatory Functions of Phospholipase A2**, v. 37, n. 2, p. 127–195, 2017.

NASCIMENTO, F. R. et al. New antineoplastic agent based on a dibenzoylmethane derivative: Cytotoxic effect and direct interaction with DNA. **Biophysical Chemistry**, v. 239, p. 1–6, ago. 2018.

NAWAZ, H. et al. Chronological effects of non-steroidal anti-inflammatory drug therapy on oxidative stress and antioxidant status in patients with rheumatoid arthritis. **Clinical Rheumatology**, v. 40, n. 5, p. 1767–1778, maio 2021.

NILE, S. H.; PARK, S. W. Optimized Methods for In Vitro and In Vivo Anti-Inflammatory Assays and Its Applications in Herbal and Synthetic Drug Analysis. **Optimized Methods for In Vitro and In Vivo Anti-Inflammatory Assays and Its Applications in Herbal and Synthetic Drug Analysis**, v. 13, n. 1, p. 95–100, 2013.

ORISS, T. B. et al. Crossregulation between T helper cell (Th)1 and Th2: inhibition of Th2 proliferation by IFN-gamma involves interference with IL-1. **J Immunol.**, v. 158, n. 8, p. 3666–3672, 1997.

OZKAN, Y. et al. Oxidative status in rheumatoid arthritis. **Clinical Rheumatology**, v. 26, n. 1, p. 64–68, jan. 2007.

QUINTANA LAZÓPULOS, S. et al. Absorption and Photo-Stability of Substituted Dibenzoylmethanes and Chalcones as UVA Filters. **Cosmetics**, v. 5, n. 2, p. 33, 17 maio 2018.

RAO, P. P. N.; KABIR, S. N.; MOHAMED, T. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs): Progress in Small Molecule Drug Development. **Pharmaceuticals**, v. 3, n. 5, p. 1530–1549, 14 maio 2010.

RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G. A. Prostaglandins and Inflammation. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 31, n. 5, p. 986–1000, maio 2011.

RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G. A. Prostaglandins and Inflammation. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 31, n. 5, p. 986–1000, maio 2011.

ROCK, K. L.; KONO, H. The Inflammatory Response to Cell Death. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 3, n. 1, p. 99–126, fev. 2008.

ROSENSON, R. S. et al. Effects of 1-H-indole-3-glyoxamide (A-002) on concentration of secretory phospholipase A2 (PLASMA study): a phase II double-blind, randomised, placebo-controlled trial. **The Lancet**, v. 373, n. 9664, p. 649–658, fev. 2009.

ROZEWSKI, D. M. et al. Pharmacokinetics and Tissue Disposition of Lenalidomide in Mice. **The AAPS Journal**, v. 14, n. 4, p. 872–882, dez. 2012.

SANE, R.; MITTAPALLI, R. K.; ELMQUIST, W. F. Development and Evaluation of a Novel Microemulsion Formulation of Elacridar to Improve its Bioavailability. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 102, n. 4, p. 1343–1354, abr. 2013.

SASAKI, F.; YOKOMIZO, T. The leukotriene receptors as therapeutic targets of inflammatory diseases. **International Immunology**, v. 31, n. 9, p. 607–615, 23 ago. 2019.

SERHAN, C. N.; SAVILL, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. **Nature Immunology**, v. 6, n. 12, p. 1191–1197, dez. 2005.

SHAW, A. E., et al. Fundamental properties of the mammalian innate immune system revealed by multispecies comparison of type I interferon responses. **PLoS Biol**, v. 15, n. 12, p. 204–220, 2017.

SUCKLING, K. E. Phospholipase A2 inhibitors in the treatment of atherosclerosis: a new approach moves forward in the clinic. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 18, n. 10, p. 1425–1430, out. 2009.

TONELLI, C.; CHIO, I. I. C.; TUVESON, D. A. Transcriptional Regulation by Nrf2. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 29, n. 17, p. 1727–1745, 10 dez. 2018.

WRUCK, C. J. et al. Role of oxidative stress in rheumatoid arthritis: insights from the Nrf2-knockout mice. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 70, n. 5, p. 844–850, 1 maio 2011.

YANAGAWA, Y.; IWABUCHI, K.; ONOÉ, K. Co-operative action of interleukin-10 and interferon- $\gamma$  to regulate dendritic cell functions. **Immunology**, v. 127, n. 3, p. 345–353, jul. 2009.

YE, M. et al. Murine Recombinant Angiotensin-Converting Enzyme 2: Effect on Angiotensin II-Dependent Hypertension and Distinctive Angiotensin-Converting Enzyme 2 Inhibitor Characteristics on Rodent and Human Angiotensin-Converting Enzyme 2. **Hypertension**, v. 60, n. 3, p. 730–740, set. 2012.

ZHENG, C.-J. et al. Bioactivity-guided fractionation for analgesic properties and constituents of *Vitex negundo* L. seeds. **Phytomedicine**, v. 16, n. 6–7, p. 560–567, jun. 2009.

ZHENG, C.-J. et al. Bioactivity-guided fractionation for analgesic properties and constituents of *Vitex negundo* L. seeds. **Phytomedicine**, v. 16, n. 6–7, p. 560–567, jun. 2009.

ZOUARI BOUASSIDA, K. et al. Effects of *Juniperus phoenicea* Hydroalcoholic Extract on Inflammatory Mediators and Oxidative Stress Markers in Carrageenan-Induced Paw Oedema in Mice. **BioMed Research International**, v. 2018, p. 1–11, 9 jul. 2018.

## CONCLUSÃO GERAL

Assim sendo, a revisão sistemática apresentada nos permite compreender como o dibenzoilmetano e alguns de seus derivados sintéticos apresentam atividades antioxidantes e anti-inflamatórias. Essas propriedades bioativas ocorrem em função da capacidade de modulação de vias de sinalização celular; inibição dos processos de migração, infiltração e diferenciação de células imunes; inibição da expressão de citocinas pró-inflamatórias e síntese de eicosanoides; e atividade citoprotetora pela inibição do estresse oxidativo.

Os ensaios de farmacocinética, com enfoque na absorção e distribuição tecidual do 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona demonstraram que as vias de administração intraperitoneal e transdérmica foram capazes de entregar o DPBP até a circulação sistêmica e demonstraram que a passagem hepática do DPBP acontece de forma diferente a depender da via utilizada, sendo mais tardia quando administrado por via intraperitoneal e inicial por via transdérmica.

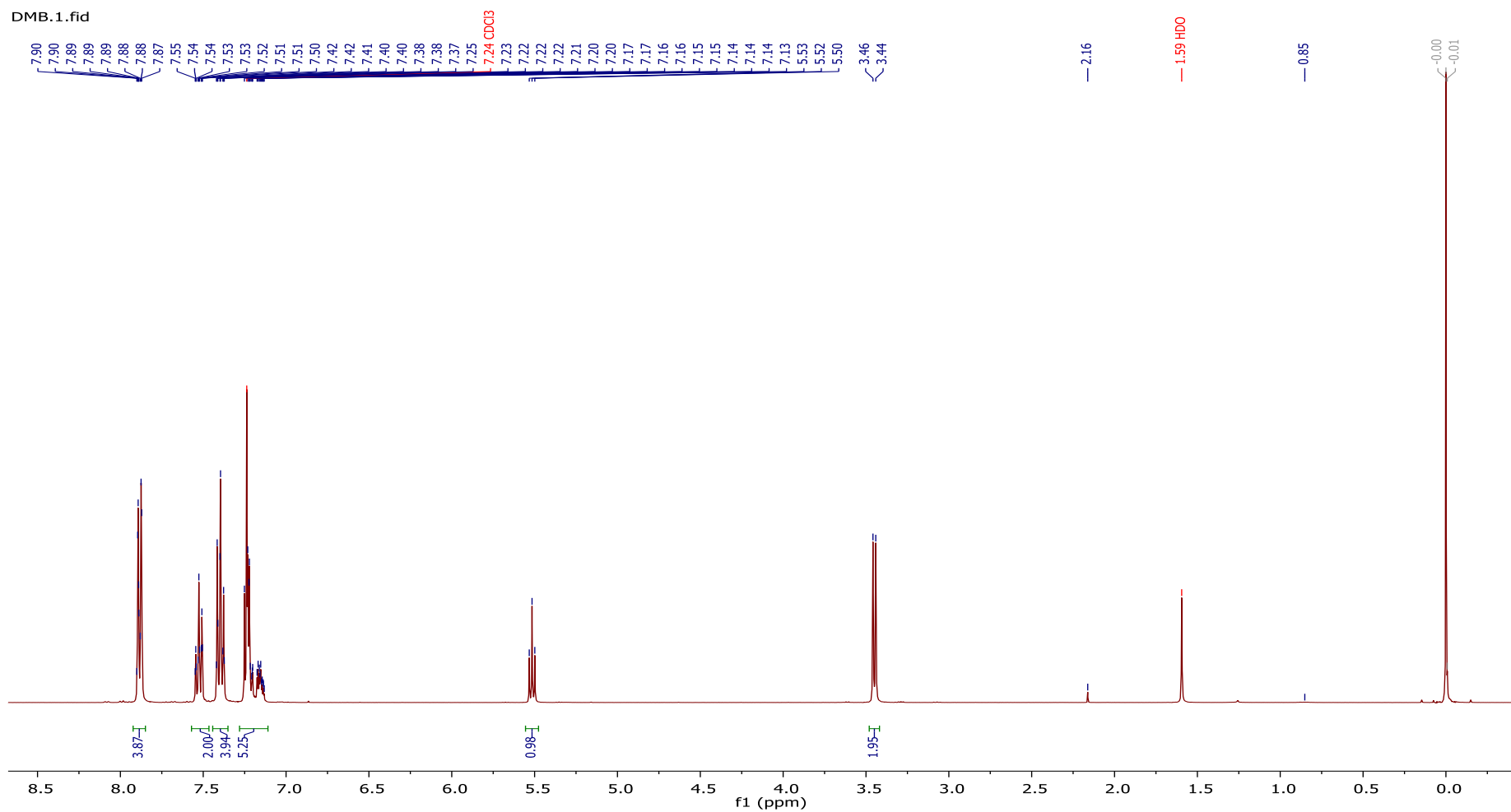
Quando administrado por via transdérmica durante 28 dias, a principal atividade antioxidante do DPBP na doença inflamatória intestinal aconteceu pela da redução dos níveis teciduais de óxido nítrico. Por outro lado, uma única administração intraperitoneal do DPBP demonstrou possuir atividade anti-inflamatória, antinociceptiva e antioxidante no processo inflamatório apresentado no edema de pata induzido por formalina. Dessa forma, esses achados revelam que o DPBP é um agente terapêutico promissor no tratamento de doenças que possuem o processo inflamatório como causa etiológica.

O processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos e medicamentos é longo e trabalhoso, por isso, mais investigações devem ser feitas para elucidar os mecanismos de ação moleculares do DPBP, em especial, com foco nas melhores rotas para sua administração; no processo de biotransformação que pode ocorrer nos diferentes tecidos; e sua relação com respostas celulares produzidas por estímulos a vias de sinalização celular ligadas a Nrf2 e NF- $\kappa$ B.

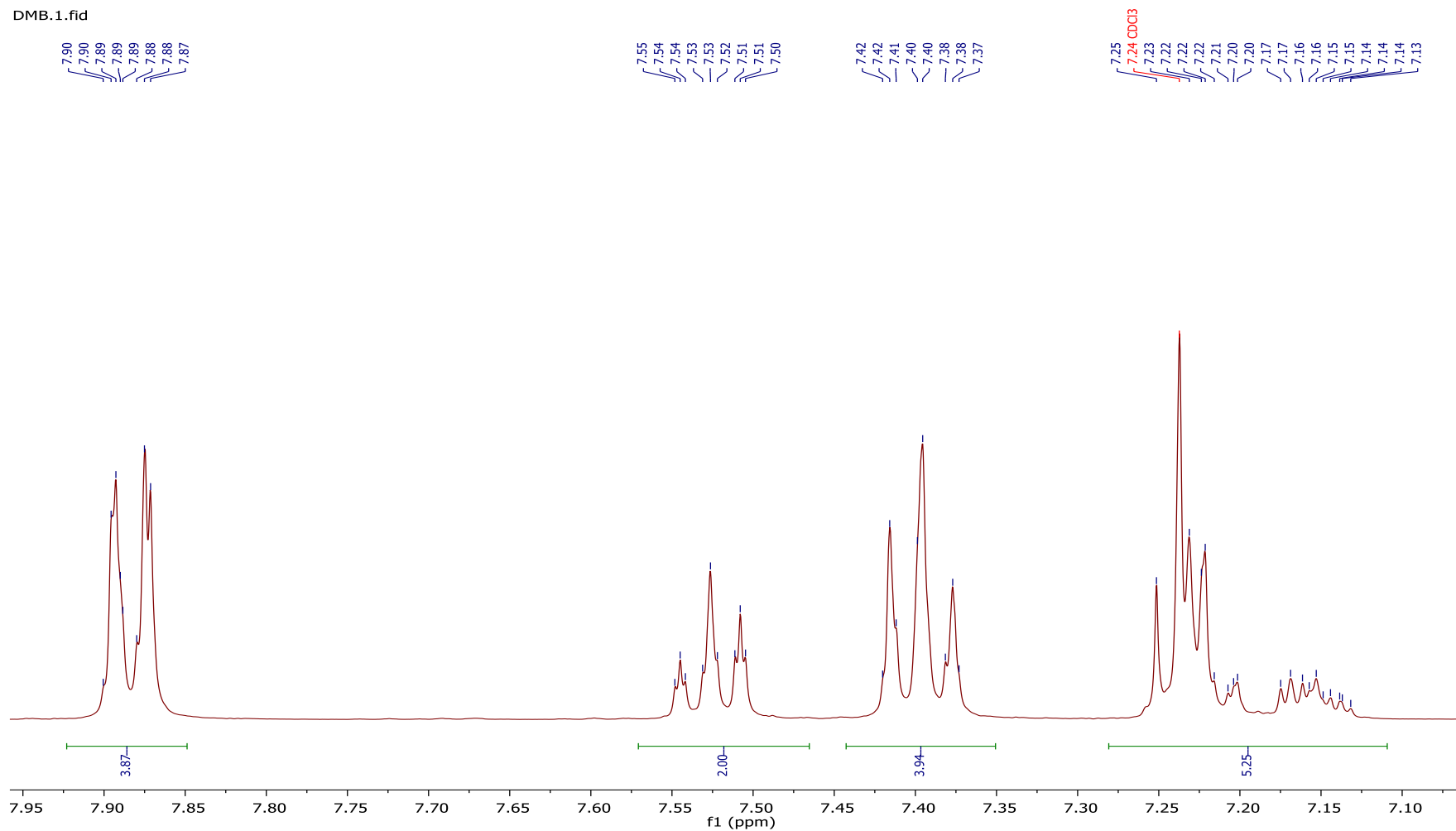
## APÊNDICES

Espectros de ressonância de hidrogênio, carbono e DEPt atestando a síntese e a pureza do composto obtido (2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona - DPBP).

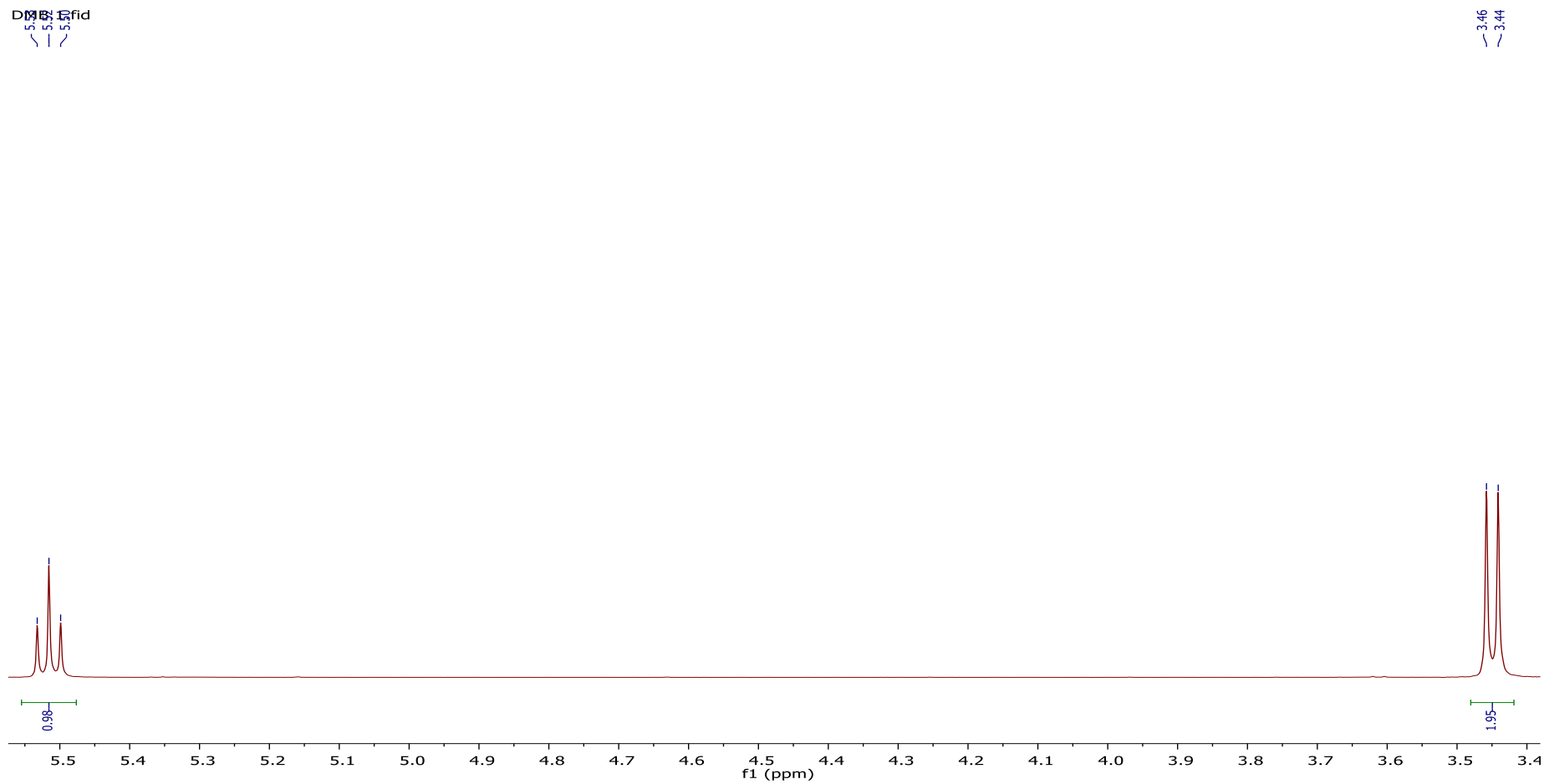
Cromatogramas UPLC-MS/MS atestando a presença do composto 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona (DPBP) no soro e fígado dos animais após administração por via transdérmica e intraperitoneal.



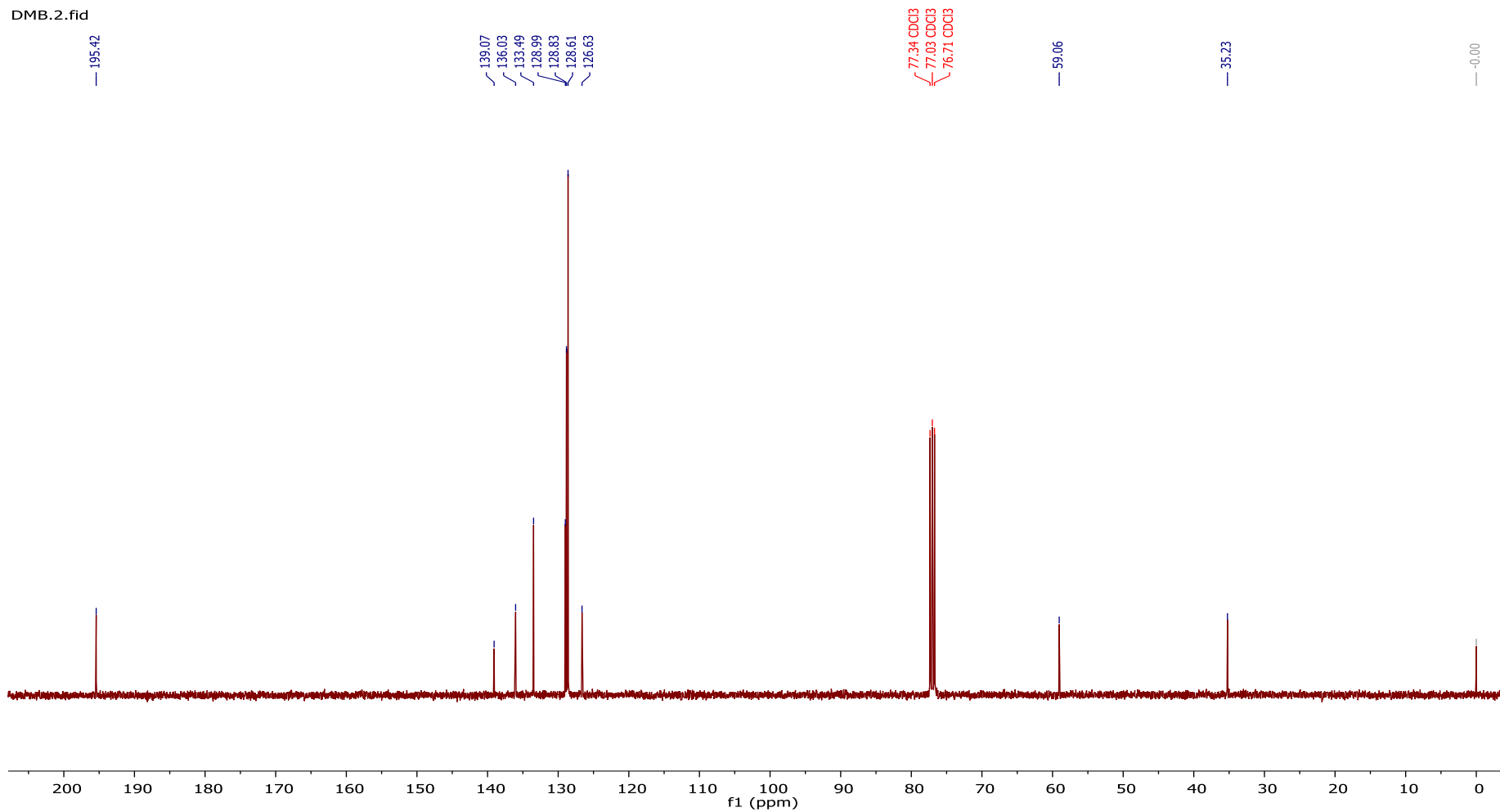
**Figura 1.** Espectro de RMN 1H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



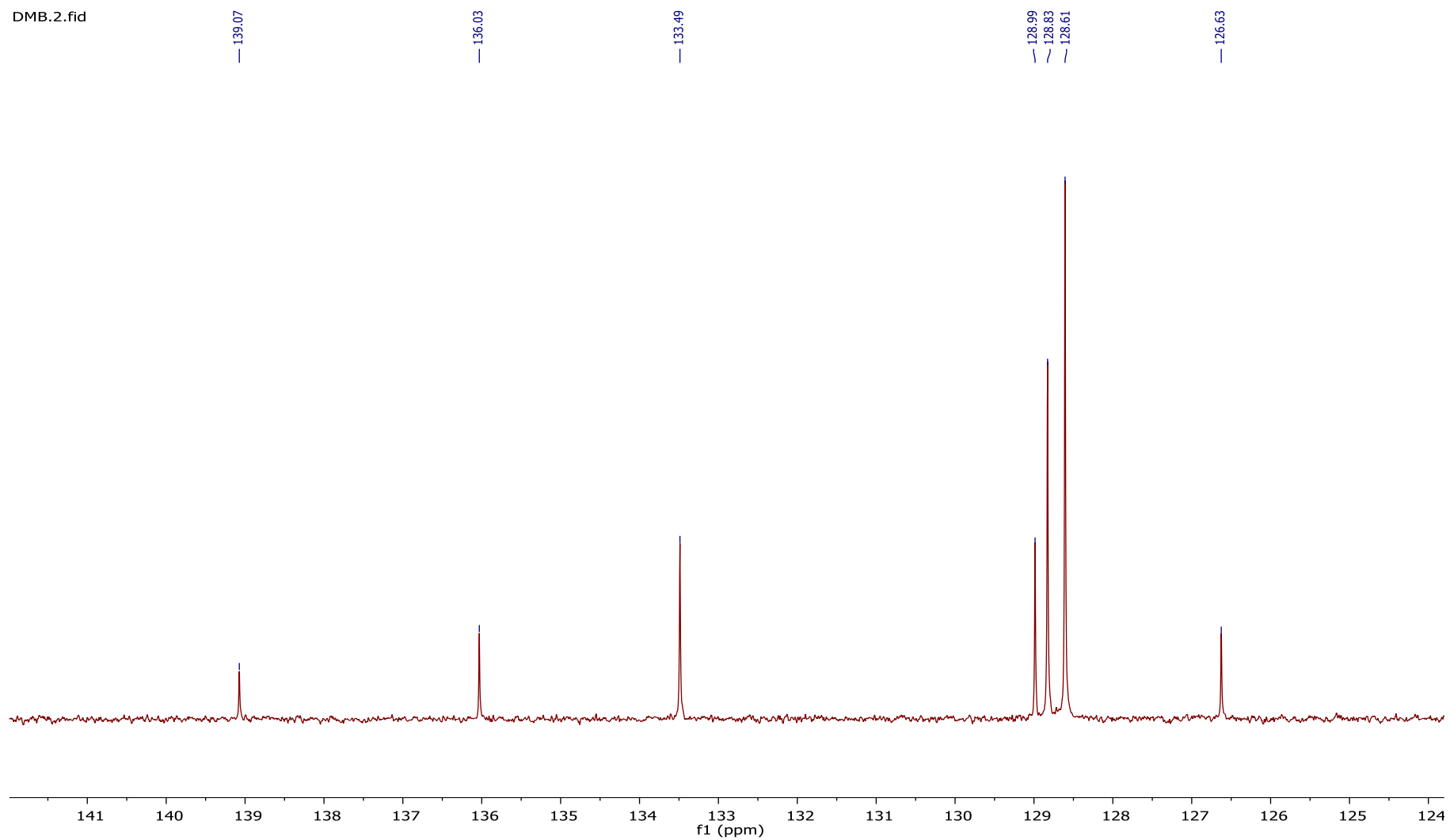
**Figura 2.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) expansão.



**Figura 3.** Espectro de RMN 1H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) expansão.

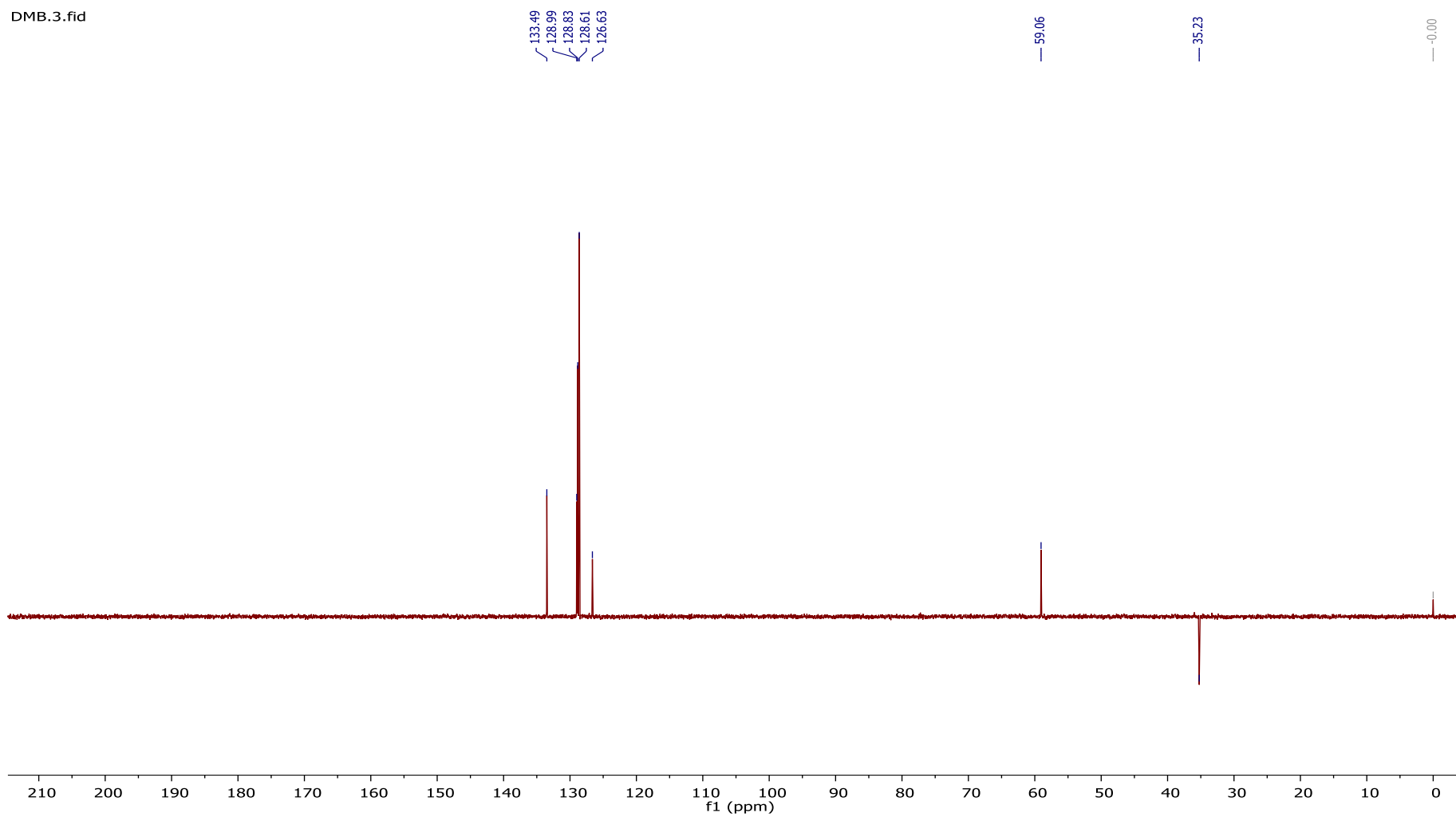


**Figura 4.** Espectro de RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

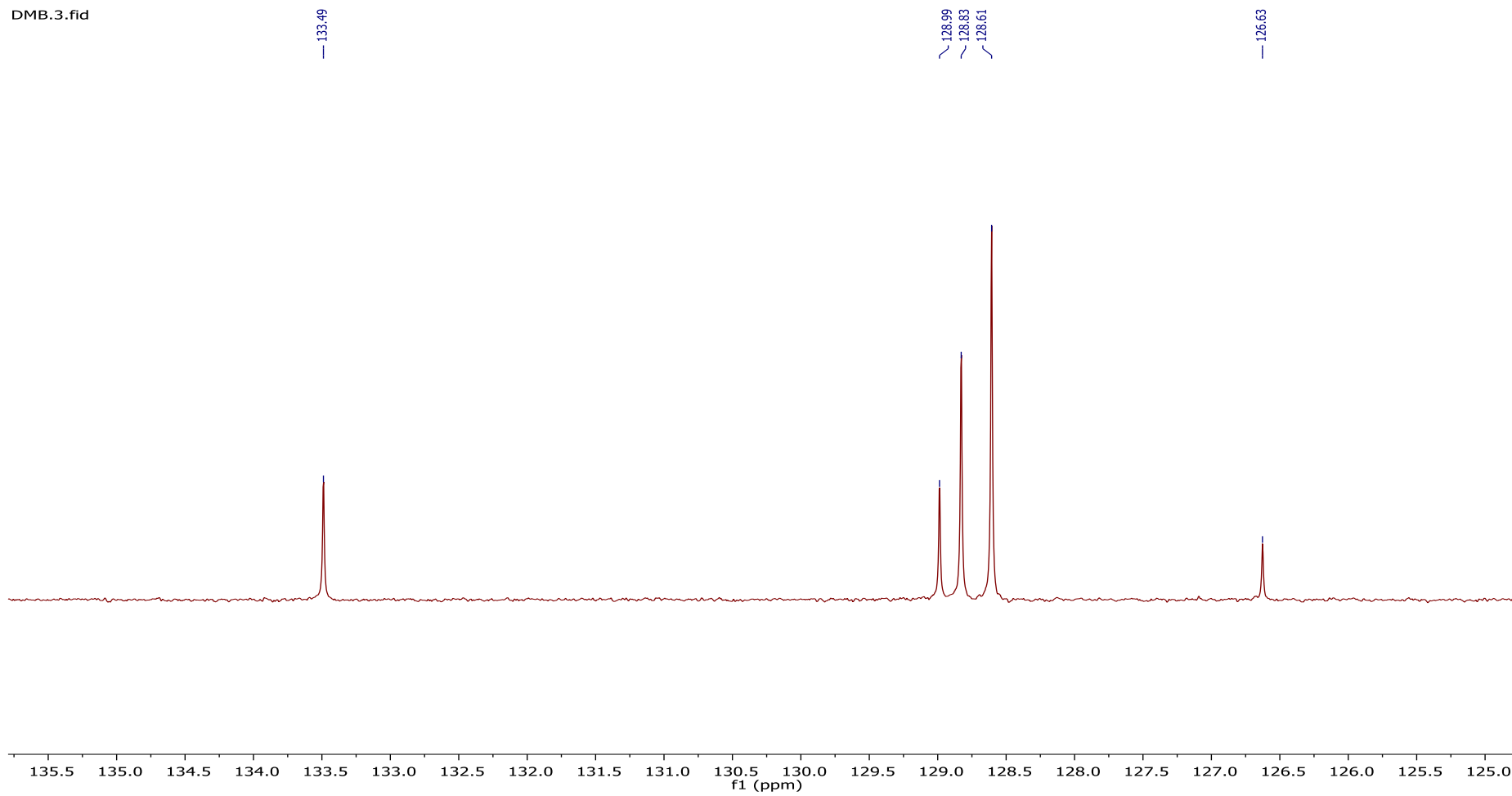


**Figura 5.** Espectro de RMN 13C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) expansão

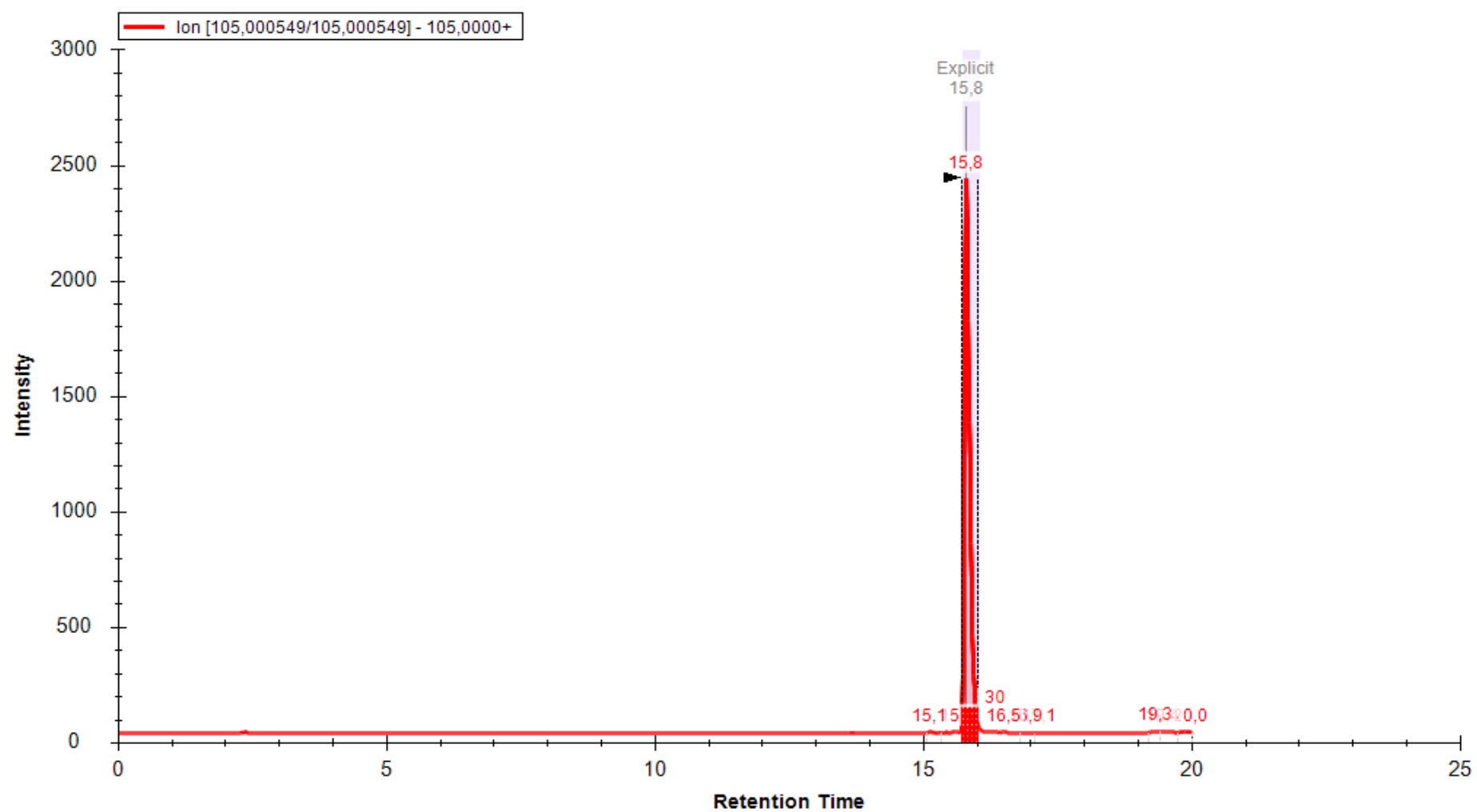
DMB.3.fid



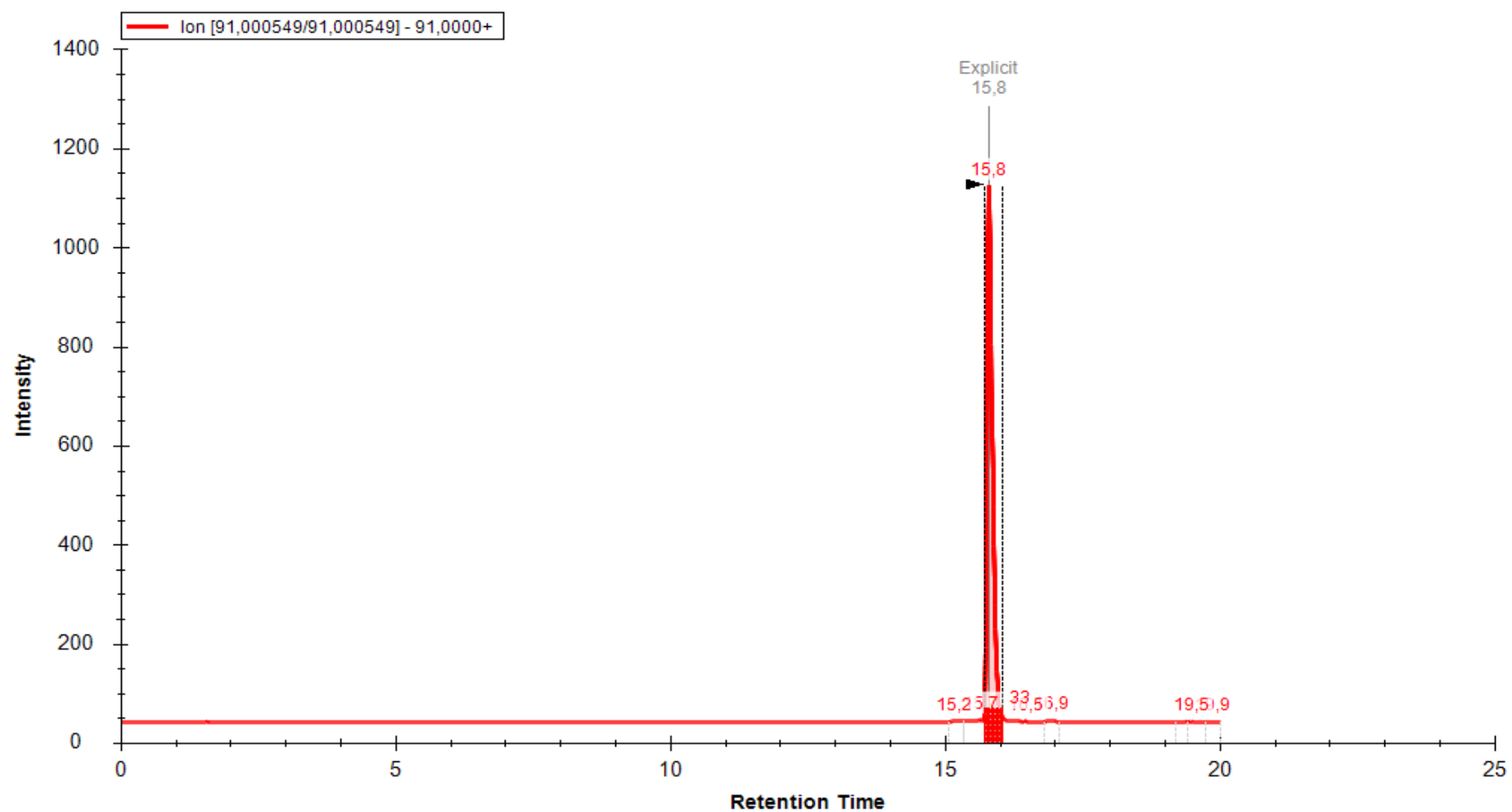
**Figura 6.** Espectro de DEPT 135 (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



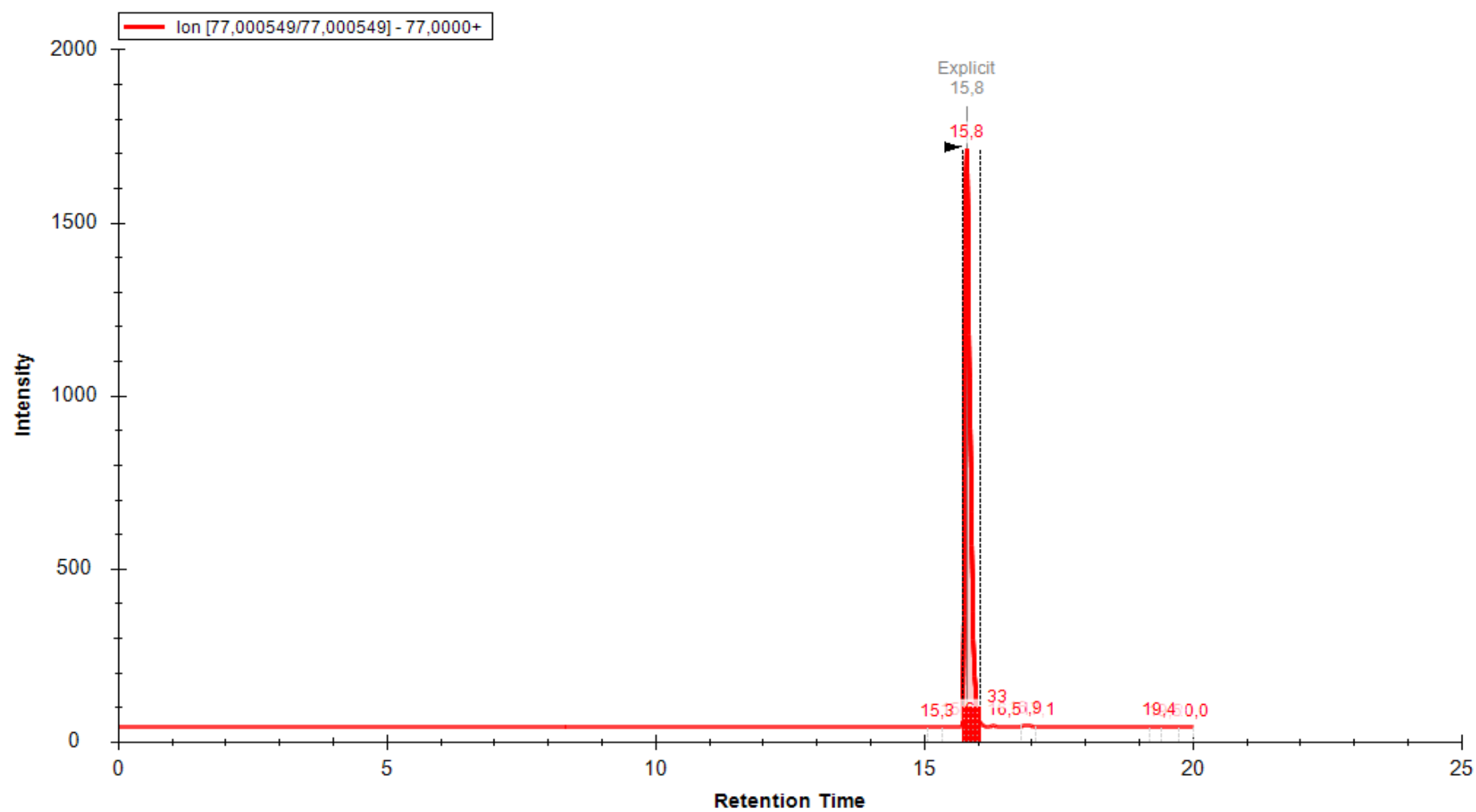
**Figura 7.** Espectro de DEPT 135 (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) expansão.



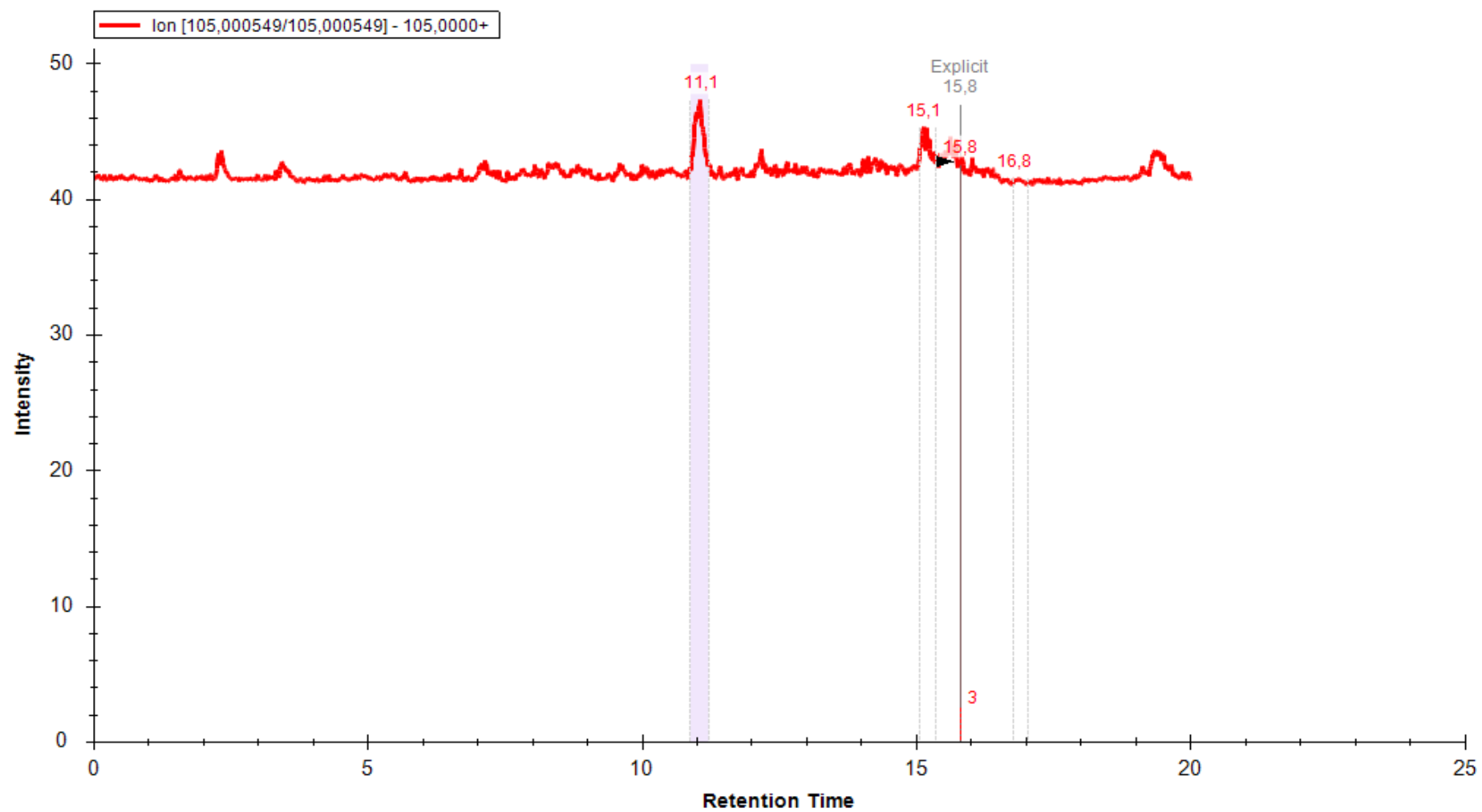
**Figura 8.** Cromatograma UPLC-MS/MS da 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona (íon: 105).



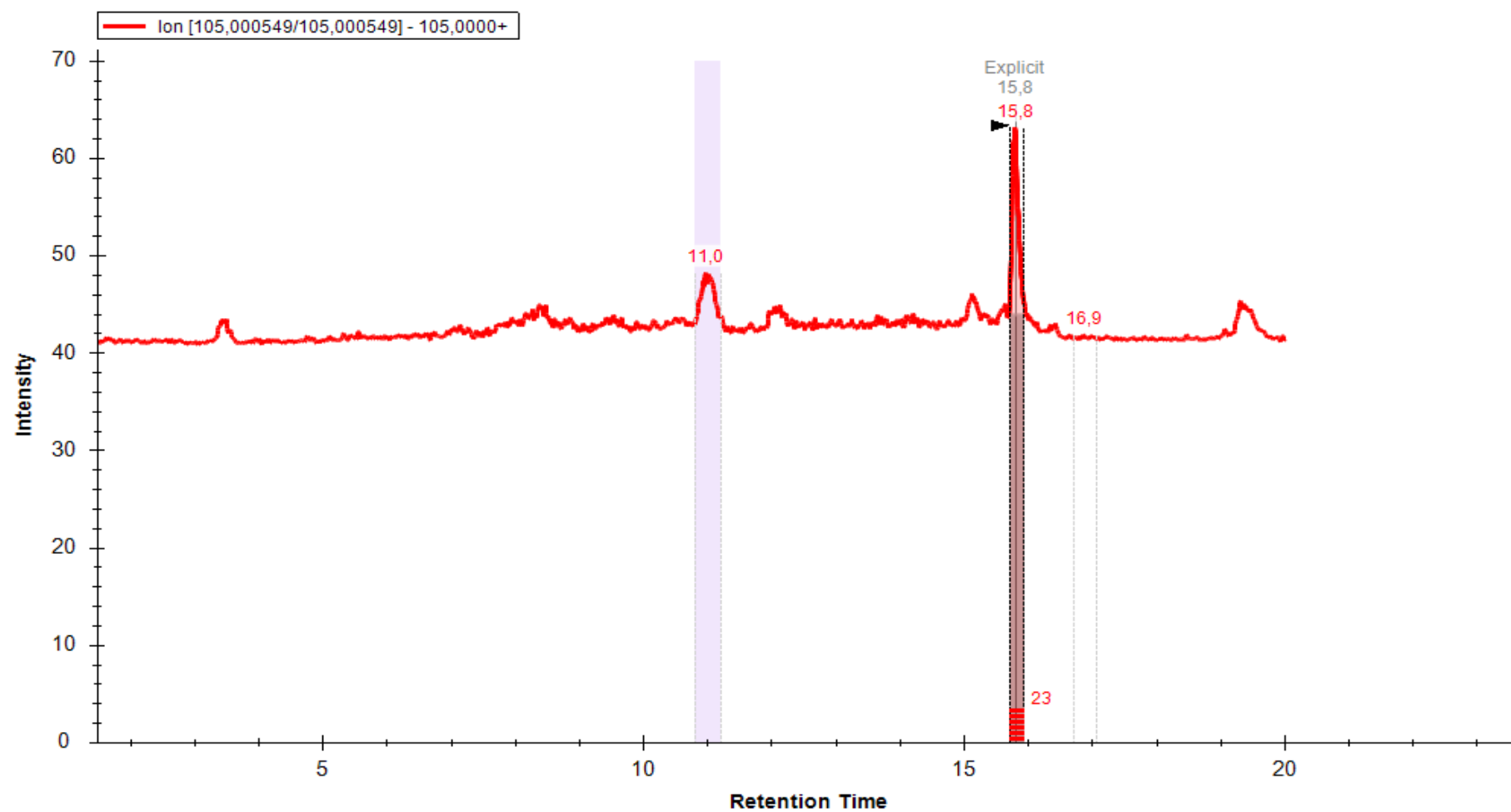
**Figura 9.** Cromatograma UPLC-MS/MS da 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona (íon: 91).



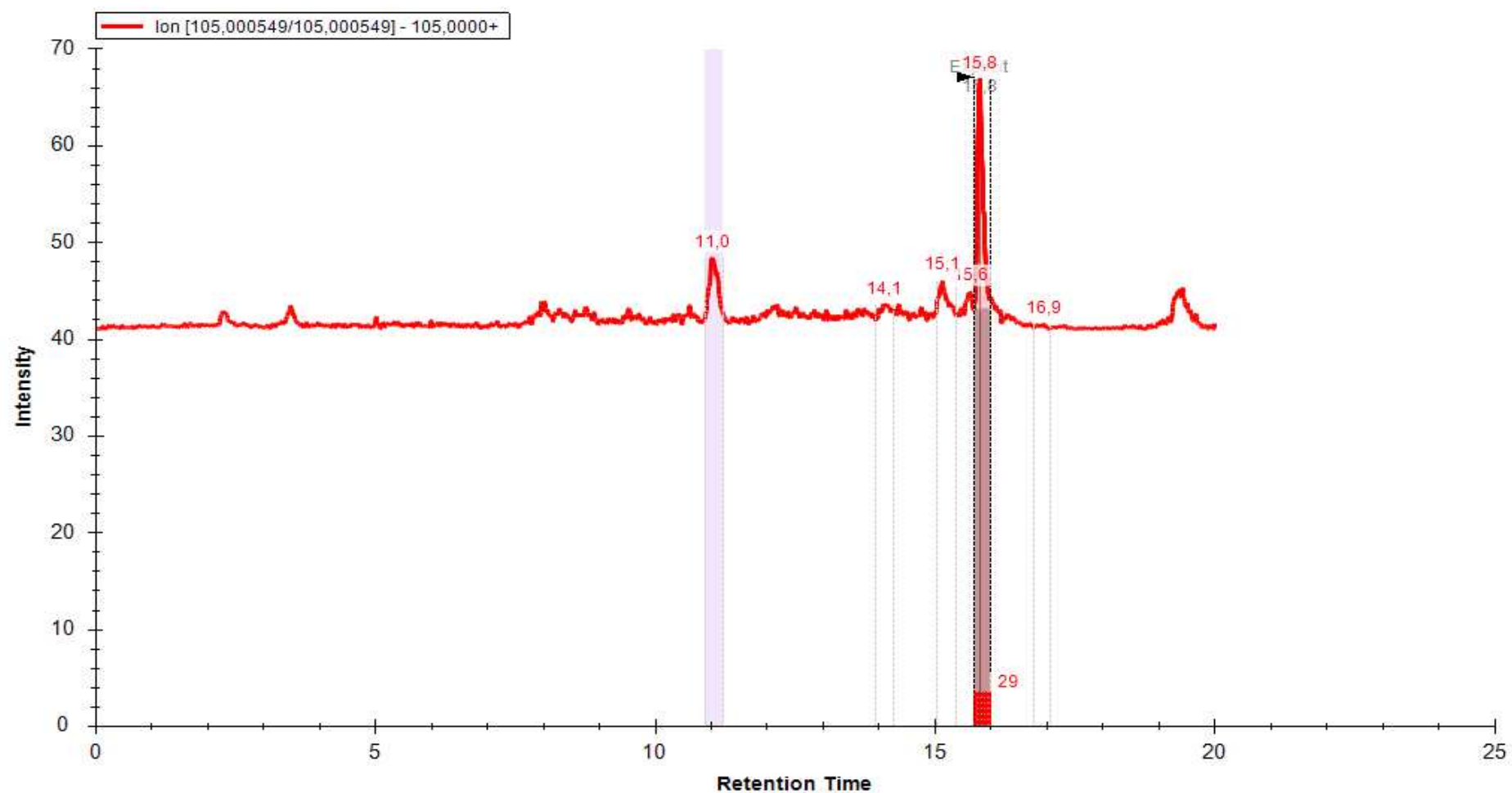
**Figura 10.** Cromatograma UPLC-MS/MS da 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona (íon: 77).



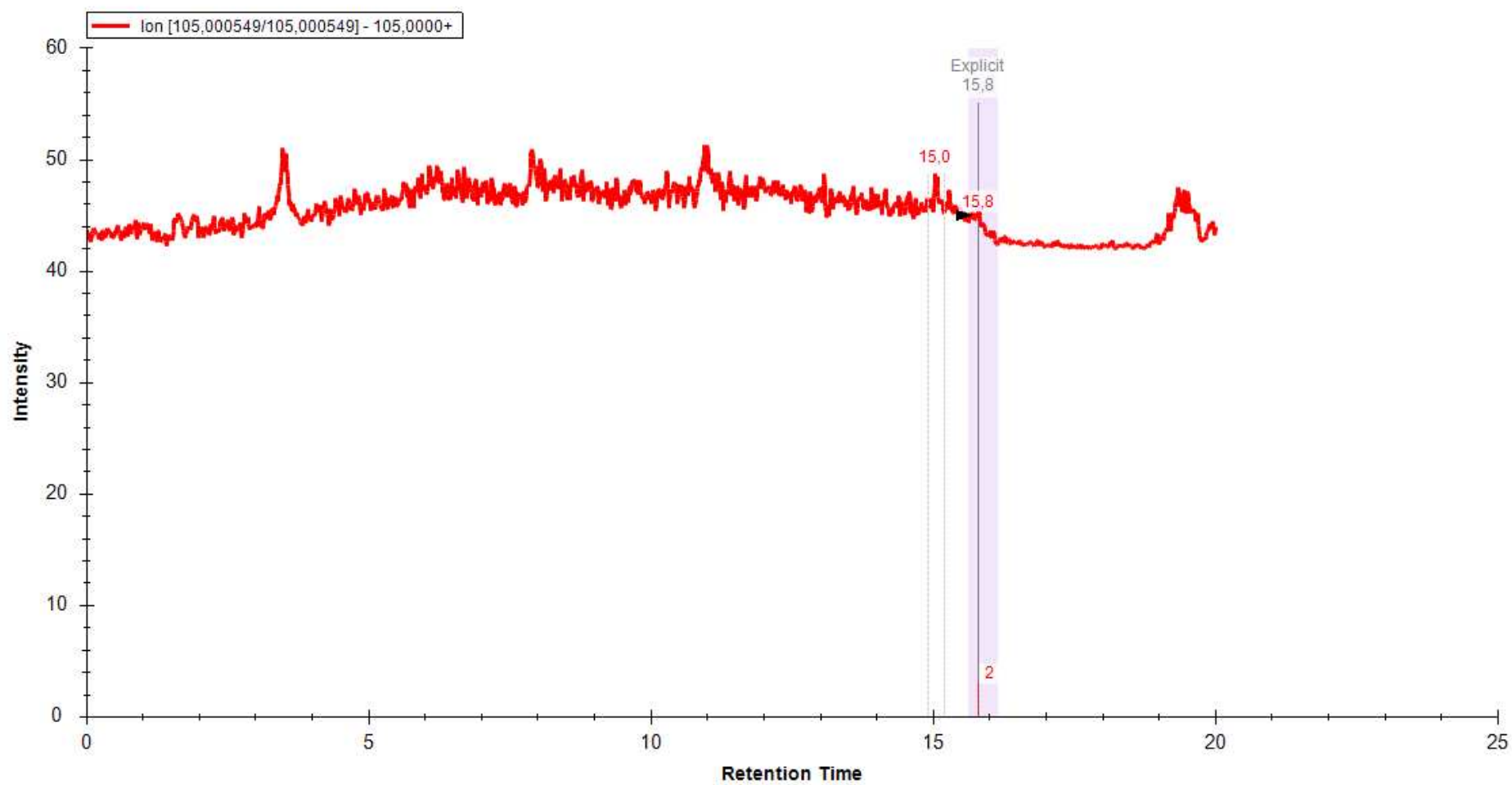
**Figura 11.** Cromatograma UPLC-MS/MS do plasma dos animais controle negativo (íon: 105).



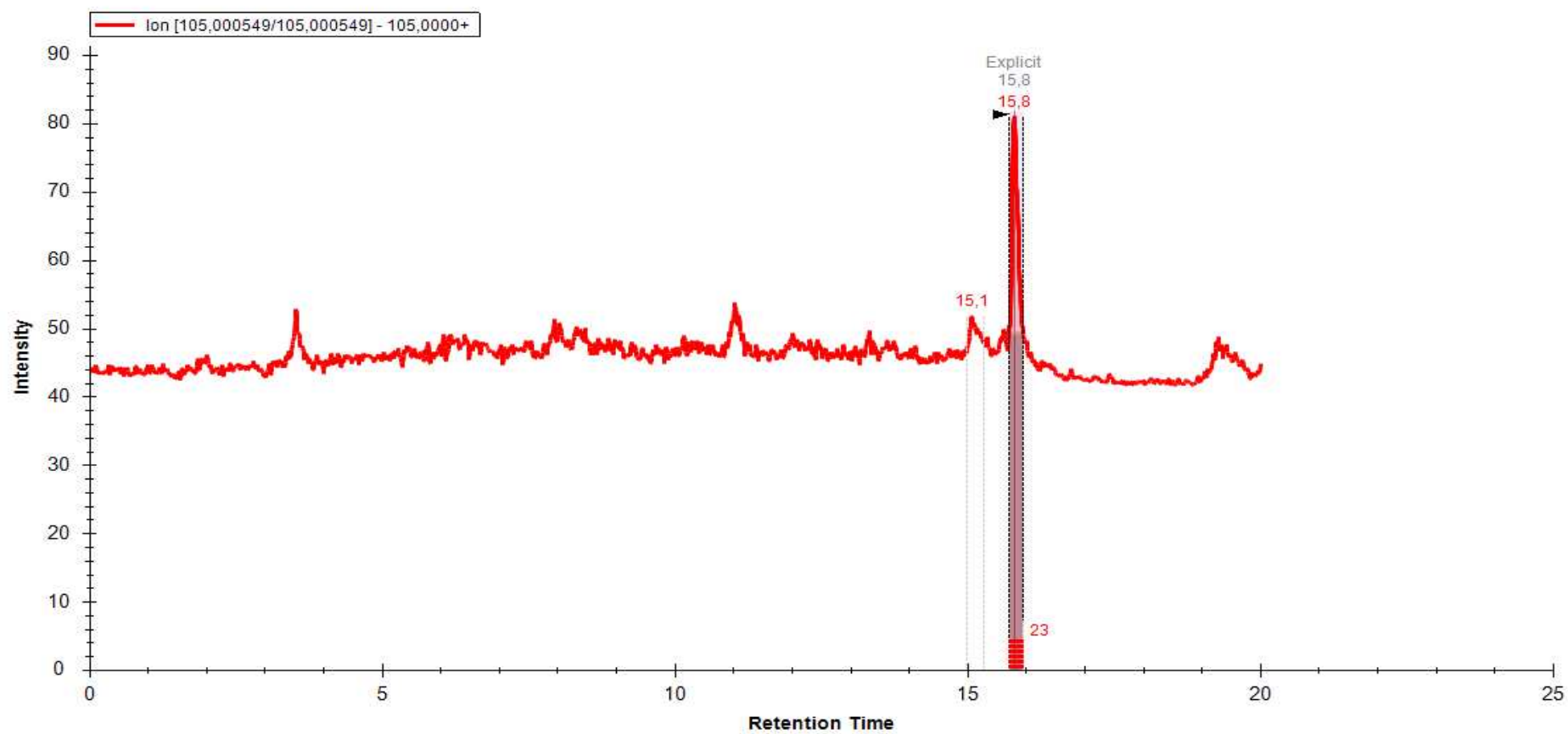
**Figura 12.** Cromatograma UPLC-MS/MS do plasma dos animais que receberam 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona por via intraperitoneal (íon: 105).



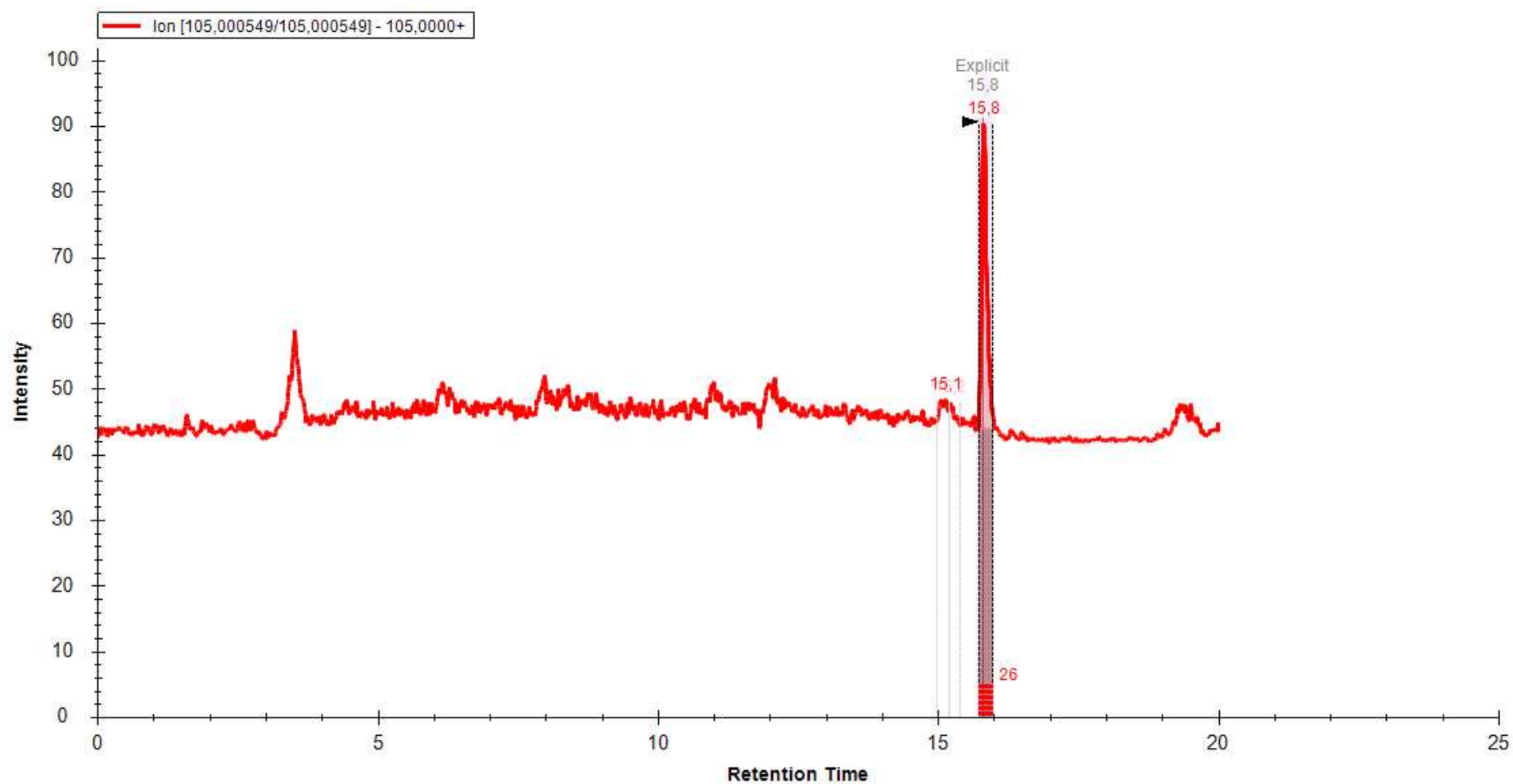
**Figura 13.** Cromatograma UPLC-MS/MS do plasma dos animais que receberam 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona por via transdérmica (íon: 105).



**Figura 14.** Cromatograma UPLC-MS/MS do fígado dos animais controle negativo (íon: 105).



**Figura 15.** Cromatograma UPLC-MS/MS do fígado dos animais que receberam 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona por via intraperitoneal (íon: 105).



**Figura 16.** Cromatograma UPLC-MS/MS do fígado dos animais que receberam 2-benzil-1,3-difenil-1,3-propanodiona por via transdérmica (íon: 105)

## ANEXOS

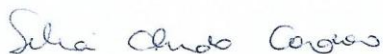
Aprovação Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais - CEUA

### CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV certifica que o processo nº 41/2019, intitulado “**Avaliação da atividade anti-inflamatória e antioxidante de derivado sintético de dibenzoilmetano e da curcumina em modelos para doença inflamatória intestinal**”, coordenado pela professora Marisa Alves Nogueira Diaz do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, está de acordo com a Legislação vigente (Lei Nº 11.794, de 08 de outubro de 2008), as Resoluções Normativas editadas pelo CONCEA/MCTI, a DBCA (Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos) e as Diretrizes da Prática de Eutanásia preconizadas pelo CONCEA/MCTI, portanto sendo aprovado por esta Comissão em 02/12/2019, com validade de 12 meses.

### CERTIFICATE

The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 41/2019, named “**Evaluation of anti-inflammatory and antioxidant activity of synthetic dibenzoylmethane derivative and turmeric in models for inflammatory bowel disease**”, is in agreement with the a actual Brazilian legislation ( Lei Nº 11.794, 2008), Normative Resolutions edited by CONCEA/MCTI, the DBCA (Brazilian Practice Guideline for the Care and Use of Animals for Scientific Purposes and Teaching) and the Guidelines of Practice the Euthanasia recommended by CONCEA/MCTI therefore being approved by the Committee on December 02, 2019 valid for 12 months.



Prof.ª Silvia Almeida Cardoso

Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV

## CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV certifica que o processonº 76/2016, intitulado “**Farmacocinética e distribuição tecidual de derivado dibenzoilmetano em camundongos**”, coordenado pela professora Marisa Alves Nogueira Diaz do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, está de acordo com a Legislação vigente (Lei Nº 11.794, de 08 de outubro de 2008), as Resoluções Normativas editadas pelo CONCEA/MCTI, a DBCA (Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos) e as Diretrizes da Prática de Eutanásia preconizadas pelo CONCEA/MCTI, portanto sendo prorrogado por mais 12 meses por esta Comissão em 06/03/2018.

## CERTIFICATE

The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 76/2016, named “**Pharmacokinetics and tissue distribution in mice dibenzoylmethane derivative**”, is in agreement with the a ctual Brazilian legislation ( Lei Nº 11.794, 2008), Normative Resolutions edited by CONCEA/MCTI, the DBCA (Brazilian Practice Guideline for the Care and Use of Animals for Scientific Purposes and Teaching) and the Guidelines of Practice the Euthanasia recommended by CONCEA/MCTI therefore being extended for 12 months by the Committee on March 06, 2018.



Prof. Atima Clemente Alves Zuanon

Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV



UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMISSÃO PERMANENTE DE PROPRIEDADE INTELECTUAL  
NÚCLEO DE INOVAÇÃO TECNOLÓGICA



## Declaração

A Comissão Permanente de Propriedade Intelectual (CPPI), Núcleo de Inovação Tecnológica (NIT), da Universidade Federal de Viçosa (UFV), por meio da sua presidente professora Andréa de Oliveira Barros Ribon, com competências delegadas pela Portaria nº 0300/2022 e ato nº 0012/2022/PPG, declara, para os devidos fins, que a Professora Marisa Alves Nogueira Diaz, vinculada ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, encaminharam ao NIT a documentação necessária para o depósito de pedido de patente inicialmente intitulado “**Uso do composto 1,3-difenil-2-benzil-1,3-propanodiona como agente anti-inflamatório**” junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI). O pedido de patente veio acompanhado de Relatório descritivo com a busca de anterioridades, Figuras, Reivindicações, Contrato de inventores autores e Questionário para conhecimento da invenção. No momento, o processo passará pelo crivo dos analistas do NIT para eventuais correções e assim, dar início ao depósito junto ao INPI.

Viçosa, 23 de junho de 2022.

Andréa de Oliveira Barros Ribon