

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ**

**MARIA VITÓRIA DE OLIVEIRA RODRIGUES**

**ESTUDO DA POTENCIALIDADE FARMACÊUTICA DE ÁCIDOS CINÂMICOS E  
DE CINAMATOS DE ZINCO**

**CAMPO MOURÃO**

**2022**

**MARIA VITÓRIA DE OLIVEIRA RODRIGUES**

**ESTUDO DA POTENCIALIDADE FARMACÊUTICA DE ÁCIDOS CINÂMICOS E  
DE CINAMATOS DE ZINCO**

**Study of the Pharmaceutical Potential of Cinnamic Acids and Zinc Cinnamates**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito para obtenção do título de Licenciada em Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rafaelle Bonzanini Romero.

Coorientador: Prof. Dr. Adriano Lopes Romero.

**CAMPO MOURÃO**

**2022**



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, para fins não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es) e que licenciem as novas criações sob termos idênticos. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

**MARIA VITÓRIA DE OLIVEIRA RODRIGUES**

**ESTUDO DA POTENCIALIDADE FARMACÊUTICA DE ÁCIDOS CINÂMICOS E  
DE CINAMATOS DE ZINCO**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado  
como requisito para obtenção do título de Licenciada em  
Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
(UTFPR).

Data de aprovação: 11/fevereiro/2022

---

Rafaelle Bonzanini Romero  
Doutora  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR)

---

Adriano Lopes Romero  
Doutor  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR)

---

Estela dos Reis Crespan  
Doutora  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR)

---

Stênio Cristaldo Heck  
Doutor  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR)

**CAMPO MOURÃO**

**2022**

Dedico este trabalho à minha família,  
Valquíria, César e Anthony.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, que sempre lutaram para que eu tivesse uma formação de qualidade – mesmo com todas as adversidades financeiras e obstáculos que apareceram no meio do caminho. Em especial à minha mãe, que me apoiou em momentos difíceis e acreditou no meu potencial, quando até mesmo eu pensei que não seria possível.

Agradeço à minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rafaelle Bonzanini Romero e ao meu coorientador Prof. Dr. Adriano Lopes Romero, pela paciência e sabedoria com que me guiaram nesta trajetória.

Gostaria de deixar registrado meu reconhecimento àqueles que foram fundamentais em minha vida acadêmica e pessoal, me acompanhando nos momentos felizes e nas dificuldades: Julio Fávaro, Andrea Rocha e Everton Koloche. Aos meus amigos Rebeca Rufo, Erasmo Costa, Ernandes dos Reis e Vitor Issamo, que me acompanharam da educação infantil ao fim da graduação. Obrigada por tanto, guardo todos vocês em um lugar especial no meu coração.

Não poderia deixar de agradecer aos meus professores, por todo o aprendizado que me proporcionaram nesta jornada. Especialmente às professoras Natalia Deimling, Estela Crespan e Rafaelle Bonzanini Romero, mulheres fortes e inteligentes, que sigo como exemplo pessoal e profissional.

Por fim, presto meus agradecimentos a todos os que contribuíram para a realização desta pesquisa.

## RESUMO

Devido à resistência da *Helicobacter pylori* aos antibióticos utilizados no tratamento convencional de patologias gastroduodenais, diversas pesquisas tem sido desenvolvidas atualmente com foco na erradicação dessa bactéria. Dentre as possíveis terapias alternativas, destacam-se as que utilizam o ácido cinâmico, um composto que pode atuar no mecanismo de defesa da *H. pylori* por meio da inibição da enzima urease. Nesse contexto, no presente trabalho avaliou-se a potencialidade farmacêutica dos ácidos cinâmico e 4-metoxicinâmico e seus complexos de zinco correspondentes, cinamato de zinco [Zn(CI)<sub>2</sub>] e 4-metoxicinamato de zinco [Zn(MCI)<sub>2</sub>]. Para isso, avaliou-se, por meio do uso de várias ferramentas computacionais, as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas dos compostos mencionados, assim como o potencial de inibição *in vitro* da enzima urease. Em relação à forma farmacêutica, avaliou-se o uso de sistema polimérico de encapsulamento, baseado no polímero quitosana, para realização da liberação controlada das substâncias bioativas em pH gástrico. As propriedades farmacocinéticas indicaram que os compostos possuem propriedades de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME), condizentes com substâncias bioativas candidatas à fármacos; o potencial de inibição da enzima urease foi confirmado por meio de avaliações *in silico* e *in vitro* e a potencialidade de encapsulamento e de liberação controlada foi confirmada pelo uso do fluido de simulação gástrico. Além disso, confirmou-se que os compostos não são citogênicos e genotóxicos. Os resultados apresentados indicam que as quatro substâncias avaliadas possuem potencial para serem utilizados como fármacos para a erradicação de *H. pylori*.

Palavras-chave: *helicobacter pylori*; fenilpropanóides; potencialidade farmacêutica; liberação controlada.

## ABSTRACT

Due to the resistance of *Helicobacter pylori* to antibiotics used in the conventional treatment of gastroduodenal pathologies, several researches have been developed currently focusing on the eradication of this bacterium. Among the possible alternative therapies, those that use cinnamic acid, a compound that can act on the defense mechanism of *H. pylori* by inhibiting the urease enzyme, stand out. In this context, the present work evaluated the pharmaceutical potential of cinnamic and 4-methoxycinnamic acids and their corresponding zinc complexes, zinc cinnamate [ $\text{Zn}(\text{CI})_2$ ] and zinc 4-methoxycinnamate [ $\text{Zn}(\text{MCI})_2$ ]. For this purpose, the pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of the mentioned compounds were evaluated, through the use of several computational tools, as well as the *in vitro* inhibition potential of the urease enzyme. Regarding the pharmaceutical form, the use of a polymeric encapsulation system, based on chitosan polymer, was evaluated for the controlled release of bioactive substances at gastric pH. The pharmacokinetic properties indicated that the compounds have ADME properties consistent with bioactive drug candidates; the urease enzyme inhibition potential was confirmed by means of *in silico* and *in vitro* evaluations and the encapsulation and controlled release potential was confirmed by the use of gastric simulation fluid. In addition, the compounds were confirmed are not cytogenic and genotoxic. The results presented indicate that the four substances evaluated have the potential to be used as drugs for the eradication of *H. pylori*.

Keywords: *helicobacter pylori*; phenylpropanoids; pharmaceutical potential; controlled release.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>91</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo Geral.....</b>	<b>91</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos Específicos .....</b>	<b>91</b>
<b>3</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>12</b>
<b>3.1</b>	<b>Cinamatos: uma importante classe de substâncias bioativas .....</b>	<b>12</b>
3.1.1	Complexos de zinco: uma alternativa para otimizar as propriedades de cinamatos 15	
<b>3.2</b>	<b>Algumas considerações sobre P&amp;D de Fármacos.....</b>	<b>17</b>
3.2.1	Urease, um alvo de pesquisa farmacêutica .....	19
3.2.2	Atividade toxicológica, uma indispensável etapa da P&D de medicamentos....	22
3.2.3	Estudos <i>in silico</i> , um importante aliado na P&D de medicamentos.....	25
3.2.4	Encapsulamento e liberação controlada de fármacos .....	26
<b>3.4</b>	<b>Forma de administração oral, o ideal para o contexto da pesquisa.....</b>	<b>27</b>
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>32</b>
<b>4.1</b>	<b>REAGENTES.....</b>	<b>32</b>
<b>4.2</b>	<b>SÍNTESE DE COMPLEXOS CINAMATOS DE ZINCO .....</b>	<b>32</b>
<b>4.3</b>	<b>CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS .....</b>	<b>32</b>
<b>4.4</b>	<b>ESTUDOS IN SILICO .....</b>	<b>33</b>
<b>4.5</b>	<b>AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS .....</b>	<b>37</b>
<b>4.5.1</b>	<b>AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE INIBIDORA DE UREASE .....</b>	<b>37</b>
<b>4.5.2</b>	<b>AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE EM <i>ALLIUM CEPA</i> .....</b>	<b>38</b>
<b>4.6</b>	<b>ESTUDO DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DAS SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS.....</b>	<b>39</b>
<b>4.6.1</b>	<b>ENCAPSULAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS EM MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA .....</b>	<b>39</b>
<b>4.6.2</b>	<b>ESTUDOS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DAS SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS.....</b>	<b>40</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>42</b>
<b>5.1</b>	<b>CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS .....</b>	<b>42</b>
<b>5.2</b>	<b>AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES MOLECULARES E BIOATIVIDADES.....</b>	<b>58</b>
<b>5.3</b>	<b>AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS .....</b>	<b>76</b>



<b>5.4</b>	<b>ESTUDO DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DAS SUBSTÂNCIAS</b>	
	<b>BIOATIVAS.....</b>	<b>80</b>
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>85</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>86</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os produtos naturais são utilizados pela humanidade desde tempos antigos e ainda hoje são base para o desenvolvimento de fármacos (VIEGAS; BOLZANI; BARREIRO, 2006). Muitas espécies de plantas medicinais são estudadas na busca pelo entendimento de seus mecanismos de ação e do isolamento dos princípios ativos, uma vez que as informações acerca de suas atividades biológicas e farmacológicas podem ser úteis para a pesquisa e desenvolvimento (P&D) de novos fármacos (CARVALHO *et al.*, 2021; GUIMARÃES *et al.*, 2021; MORAES; SOUZA, 2021; OLIVEIRA; SANTOS, 2021).

As plantas possuem a capacidade de biossintetizar diversos tipos de compostos com estruturas moleculares diversificadas, devido seus metabolismos primário e secundário. O metabolismo primário é responsável pela manutenção da vida da planta e o secundário é essencial para a sobrevivência da espécie no ecossistema. Uma das características importantes do metabolismo secundário é que ele está diretamente relacionado com a produção de metabólitos, que podem ser utilizados no desenvolvimento de fármacos devido suas propriedades terapêuticas (CATAPAN; BRAZ, 2021).

Dentre as classes de metabólitos com características terapêuticas, destacam-se os fenilpropanóides, que possuem diversas propriedades bioativas, como atividade antibacteriana (PARANHOS; OLIVEIRA, 2021), antiviral (SONG *et al.*, 2021), antifúngica (TSUKUDA *et al.*, 2021), antidepressiva (CALIXTO *et al.*, 2021), antioxidante e antidiabética (LI *et al.*, 2019). Além disso, alguns fenilpropanóides apresentam potencialidade para o desenvolvimento de fármacos com propriedade anti-inflamatória e antialérgica, como o ácido cinâmico (ACI) (AYOUB *et al.*, 2021), e antitumoral, como o ácido 4-metoxicinâmico (AMCI) (GUNASEKARAN; VENKATACHALAM; NAMASIVAYAM, 2019; GUNASEKARAN *et al.*, 2014).

Devido suas propriedades, os fenilpropanóides, como os ácidos cinâmico e 4-metoxicinâmico, podem atuar no tratamento de patologias gastroduodenais causadas pela bactéria *Helicobacter pylori* (SAAD *et al.*, 2016). Uma dessas patologias é o câncer gástrico e o maior fator de risco para o surgimento desse carcinoma é a infecção crônica causada pela bactéria *H. pylori*. Esse é um tema de grande importância no contexto da saúde pública, tendo extrema relevância estudar os esquemas terapêuticos da erradicação da infecção por essa bactéria (ALIPOUR, 2020). De acordo com Robinson e Atherton (2021), após décadas de colonização persistente e inflamação crônica da mucosa, a *H. pylori* causa ulceração gástrica e

duodenal, adenocarcinoma gástrico e linfoma do Tecido Linfoide Associado à Mucosa (MALT, do inglês *Mucosa Associated Lymphoid Tissue*).

Além do uso dos ácidos cinâmico e 4-metoxicinâmico, pode-se destacar a aplicação de íons de zinco no tratamento de patologias gastroduodenais causadas por *H. pylori*. Em estudos feitos sobre complexos de zinco com diversos fármacos, como carnosina (MATSUUMATSUYAMA *et al.*, 2008), acexamato (RODRÍGUEZ; DÍAZ, 1994), diclofenaco (FIORUCCI; DISTRUTTI, 2011) e naproxeno (JAROSZ *et al.*, 2017), observou-se que a utilização de zinco tornou possível a redução das lesões gástricas sem alterar a atividade anti-inflamatória dos fármacos. Além disso, foi capaz de limitar reações adversas, aumentar a seletividade para certas doenças, acelerar a cicatrização de feridas e reduzir a dose do fármaco para desempenhar a mesma ação farmacológica. Sendo assim, sínteses de complexos de zinco em contextos idealizando melhores desempenhos das substâncias bioativas têm sido realizadas, a fim de se obter novos candidatos a fármacos com efeitos terapêuticos otimizados.

No que diz respeito ao processo de Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) de novos fármacos, as propriedades farmacocinéticas, farmacodinâmicas e possibilidade de forma farmacêutica são importantes e devem ser consideradas para estudos em Química Medicinal. Em relação aos estudos farmacocinéticos e farmacodinâmicos, ferramentas computacionais aliadas a testes *in vitro* permitem evidenciar a potencialidade farmacêutica e limitações de uso da substância em desenvolvimento. Em relação à forma farmacêutica, também é importante considerar a forma de liberação das substâncias bioativas. A partir dessa perspectiva, os sistemas de liberação controlada são uma boa alternativa, pois apresentam efeitos colaterais reduzidos, resolvem problemas inerentes à utilização do fármaco em concentrações elevadas e demonstram maior eficácia quando comparados aos sistemas convencionais de administração de medicamentos (HENRIQUE; FALCARE; LOPES, 2006).

Nesse contexto, no presente trabalho avaliou-se a potencialidade farmacêutica dos ácidos cinâmico e 4-metoxicinâmico e seus complexos de zinco correspondentes, cinamato de zinco  $[Zn(CI)_2]$  e 4-metoxicinamato de zinco  $[Zn(MCI)_2]$ . Para isso, avaliou-se, por meio do uso de várias ferramentas computacionais, as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas dos compostos mencionados, assim como o potencial de inibição *in vitro* da enzima urease. Em relação à forma farmacêutica, avaliou-se o uso de sistema polimérico de encapsulamento, baseado no polímero quitosana, para realização da liberação controlada das substâncias bioativas em pH gástrico.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Estudar a potencialidade farmacêutica dos ácidos cinâmico e 4-metoxicinâmico e dos zincatos correspondentes.

### 2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Sintetizar e caracterizar os compostos cinamato de zinco (II) e 4-metoxicinamato de zinco (II);
- ✓ Avaliar, *in silico*, as propriedades farmacocinéticas dos ácidos cinâmico e 4-metoxicinâmico e dos zincatos correspondentes;
- ✓ Avaliar, *in vitro* e *in silico*, o potencial de inibição da enzima urease dos ácidos cinâmico e 4-metoxicinâmico e dos zincatos correspondentes;
- ✓ Avaliar, *in vivo*, a citogenicidade e a genotoxicidade dos ácidos cinâmico e 4-metoxicinâmico e dos zincatos correspondentes;
- ✓ Avaliar a potencialidade de encapsulamento e de liberação controlada dos ácidos cinâmico e 4-metoxicinâmico e dos zincatos correspondentes.

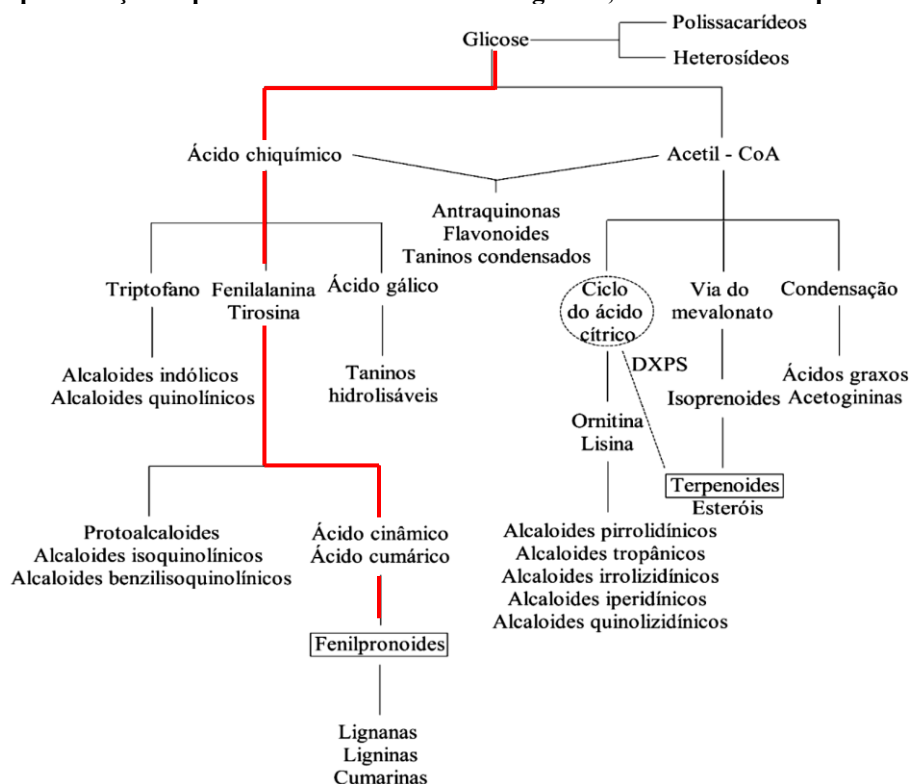
### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Cinamatos: uma importante classe de substâncias bioativas

Os cinamatos são produtos naturais pertencentes a classe dos fenilpropanóides, que estão presentes em plantas e são mediadores-chave de resistência das plantas a herbívoros, principalmente insetos. Além de agirem como indicadores que geram respostas de acordo com o estresse das plantas, atuam como antibióticos, protetores ultravioleta (UV), repelentes de insetos, fornecem os recursos bioquímicos para uma reprodução bem-sucedida e funcionam como constituintes poliméricos complexos de estruturas de superfície e suporte, como suberina, lignina e outros componentes da parede celular (VOGT, 2010; FRANCA *et al.*, 2001; HAHLBROCK; SCHEEL, 1989).

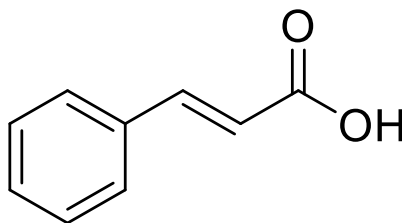
A produção dos fenilpropanóides se dá por meio da via biossintética do ácido chiquímico (Figura 1), que é gerado por um metabólito da glicose, denominado fosfoenolpiruvato. Quando o ácido chiquímico se une a uma molécula de fosfoenolpiruvato é formado o ácido corísmico, que dá origem a aminoácidos aromáticos, como a fenilalanina. Por fim, a enzima fenilalanina amonioliase catalisa a desaminação da fenilalanina, produzindo o ácido cinâmico, que forma compostos fenólicos simples denominados fenilpropanóides (PEREIRA *et al.*, 2018; SIMÕES *et al.*, 2017).

**Figura 1 – Representação esquemática do metabolismo da glicose, vias do ácido chiquímico e acetil-CoA**



O ácido cinâmico (ACI, Figura 2) é um ácido carboxílico aromático que tem baixa toxicidade e faz parte da constituição de várias plantas, o que torna sua presença recorrente na alimentação humana, podendo ser encontrado em cervejas, manjericão, canela, folhas de cacau, morango, conhaque, carambola, nêspera, mel e grãos integrais. Além disso, tem sido frequentemente usado em produtos de limpeza e em fragrâncias de cosméticos, xampus, sabonetes e outros produtos de higiene pessoal (CHANDRA *et al.*, 2019; YILMAZ; SOVA; ERGÜN, 2018).

**Figura 2 - Representação estrutural do ácido cinâmico**



Fonte: Autoria própria (2022)

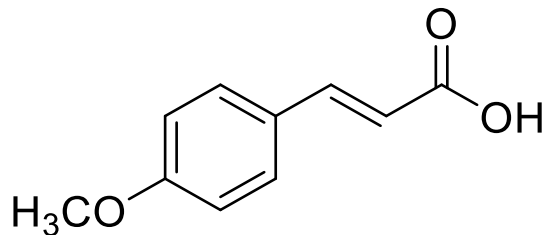
Além de formar produtos estáveis por doar elétrons que reagem com radicais, a presença de um grupo ácido acrílico substituído no anel confere ao ácido cinâmico uma configuração *cis* ou *trans*, sendo a forma *trans* mais comum (YILMAZ; SOVA; ERGÜN,

2018; RUWIZHI; ADERIBIGBE, 2020). O ácido cinâmico atua na defesa de plantas contra microrganismos e insetos (CANSIAN *et al.*, 2021), possui atividade antimicrobiana (MAHMOOD *et al.*, 2021), anti-inflamatória (HASSAN *et al.*, 2019) e antitumoral (SOLTANIAN *et al.*, 2018).

De acordo com Płowuszynska e Gliszczynska (2021), o número de publicações focadas na pesquisa de ácido cinâmico e seus derivados aumentou de 341 em 2003 para 2226 em 2021. Isso comprova que compostos naturais desse grupo estão chamando cada vez mais a atenção de pesquisadores. Além disso, as autoras afirmam que, nas últimas duas décadas, um dos fenilpropanóides mais estudados tem sido o ácido 4-metoxicinâmico (AMCI).

O ácido 4-metoxicinâmico (Figura 3) é um ácido fenólico derivado do ácido cinâmico, que pode ser encontrado em grãos de arroz integral, farelo de arroz, café, amendoim, trigo, folhas de abacaxi e banana (PŁOWUSZYNSKA; GLISZCZYNSKA, 2021). Dentre as atividades de interesse farmacológico apresentadas pelo ácido 4-metoxicinâmico destacam-se os benefícios no estresse oxidativo hepático (PAIM *et al.*, 2020), efeito antimicrobiano, antidiabético (PŁOWUSZYNSKA; GLISZCZYNSKA, 2021), anti-inflamatório, anticancerígeno (GUNASEKARAN; VENKATACHALAM; NAMASIVAYAM, 2019) e a redução do colesterol total e dos níveis de triglicerídeos, podendo ser benéfico no tratamento da hiperlipidemia e aterosclerose (FILHO *et al.*, 2017).

**Figura 3 - Representação estrutural do ácido 4-metoxicinâmico**



**Fonte: Autoria própria (2022)**

O ácido cinâmico e seus derivados, incluindo o ácido 4-metóxicinâmico, são encontrados naturalmente em baixas concentrações, o que dificulta seu uso em larga escala. Nesse contexto, a síntese orgânica permite a produção de grandes quantidades de substâncias inspiradas em produtos da natureza, o que contribui para o desenvolvimento de um interessante nicho de mercado. Além disso, devido à estrutura simples e versátil, a Química Medicinal pode contribuir para entender o mecanismo de ação do ácido cinâmico e seus derivados, gerando diversos estudos sobre sua atividade. Dessa forma, os ácidos cinâmicos se tornam bons candidatos para o desenvolvimento de fármacos, com diversas potencialidades

terapêuticas (FRANÇA *et al.*, 2021). Além disso, estudos visando a otimização estrutural de substâncias bioativas têm sido amplamente valorizados durante o processo de novos fármacos, uma vez que permite a obtenção de substâncias mais potentes e com menores efeitos indesejados. Nessa linha de pesquisa, destacam-se os estudos focados na produção de híbridos (PROTTI *et al.*, 2020) e de complexos de íons metálicos (OLIVEIRA *et al.*, 2020).

### 3.1.1 Complexos de zinco: uma alternativa para otimizar as propriedades de cinamatos

Alguns fármacos podem causar sérios efeitos colaterais, por isso, diversas pesquisas visam desenvolver novos agentes terapêuticos utilizando a complexação de fármacos com íons metálicos, tais como os de zinco, tornando o medicamento mais eficaz e causando menos danos à saúde humana (MARTINS; SILVA, 2008).

Dentre essas pesquisas, pode-se destacar o estudo desenvolvido por Núñez *et al.* (2014), que sintetizou complexos de íons metálicos, incluindo Zn (II), com o anti-inflamatório ácido  $\alpha$ -metil-4-(2-metilpropil)benzeno acético, comercialmente conhecido como ibuprofeno. O resultado da pesquisa indica que os complexos metálicos se mostraram significativamente mais eficazes do que o medicamento ibuprofeno.

O estudo de Martins e Silva (2008) aponta que os fármacos anti-inflamatórios não esteroides (FAINES) podem causar ulceração gastrointestinal e graves hemorragias. Como estratégia para minimizar esses riscos, foi realizada a complexação dos FAINES com íons de metais de transição, dentre eles o Zn (II). Os resultados mostraram que os complexos podem apresentar maior atividade biológica e atuar na redução da ulceração gástrica.

Além de contribuir para tornar os medicamentos mais eficazes por meio de complexação com fármacos, o zinco desempenha outras funções importantes no corpo humano. Exemplo disso são as enzimas que dependem de íons zinco para funcionar em diversos sistemas biológicos, como as polimerases de DNA e RNA, que são cruciais para o reparo tecidual, afetando diretamente a proliferação celular e a síntese de proteínas. Sendo assim, a deficiência de zinco no corpo humano pode afetar o processo de cicatrização de feridas na pele e interromper a restauração de patologias gastroduodenais, gerando distúrbios gastroenterológicos (LIM *et al.*, 2009).

Considerando a influência do zinco no que diz respeito aos distúrbios gastroenterológicos, alguns estudos apontam que os íons zinco possuem propriedades que são capazes de prevenir as patologias gastroduodenais observadas em infecção por *H. pylori* (GOEPP, 2008; SANTOS *et al.*, 2004). Matsuu-Matsuyama *et al.* (2008) investigaram a



atividade anti-úlcera da carnosina de zinco, um derivado da carnosina produzido artificialmente. Nesse caso, o composto apresentou a prevenção de lesões na mucosa gástrica, estando o zinco e a carnosina ligados em uma proporção de um para um, fornecendo uma estrutura polimérica.

A pesquisa desenvolvida por Rodríguez e Díaz (1994) analisou o efeito do acexamato de zinco - um derivado do ácido acexâmico, uma substância que possui efeito cicatrizante - em 276 pacientes com histórico de úlcera péptica ou intolerância a anti-inflamatórios não-esteróides (AINE), mas que necessitavam de tratamento com esses medicamentos. Constatou-se que a incidência de úlceras gástricas e duodenais diminuiu em 92%, quando comparada ao placebo. Além disso, a partir do uso desse zincato, a gravidade das lesões foi reduzida sem alterar a atividade anti-inflamatória do fármaco. Vale ressaltar que o acexamato de zinco parece estimular a produção de PGE<sub>2</sub>, o que melhora o fluxo de sangue na mucosa e estimula a produção de muco. Além disso, tem sido sugerido um efeito inibitório sobre a *H. pylori* (LORENZO *et al.*, 1991; GOEPP, 2008).

Outros estudos foram feitos a partir da formação de complexo de zinco com diversos fármacos, como a indometina (DILLON *et al.*, 2003), ibuprofeno (JAROSZ *et al.*, 2017), diclofenaco (FIORUCCI; DISTRUTTI, 2011; SANTOS *et al.*, 2004) e naproxeno (JAROSZ *et al.*, 2017). Os resultados das pesquisas evidenciaram que, após a complexação dos fármacos, foi possível reduzir a gravidade das lesões gástricas sem alterar a atividade anti-inflamatória, reduzir a dosagem, limitar reações adversas, aumentar a seletividade para certas doenças e acelerar a cicatrização de feridas.

Com relação à complexação de fenilpropanóides e zinco, foi encontrado o estudo de Hosomi, Ohba e Ito (2000), que apresentam a resolução estrutural dos cristais que possuem íons zinco como centro metálico e o ácido cinâmico como ligante. Esse composto foi investigado por Zelenák, Vargová e Györyová (2007), que identificaram a estrutura desse e de outros compostos por espectroscopia no infravermelho. O efeito dos íons zinco na estrutura eletrônica do ácido cinâmico foi analisado por Kalinowska, Świsłocka e Lewandowski (2011), utilizando espectroscopia no infravermelho, espectroscopia Raman, ressonância magnética nuclear (RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C) e cálculos de mecânica quântica. As pesquisas publicadas sobre o complexo cinamato de zinco (II) buscaram estudar a estrutura do composto, logo as potenciais atividades biológicas e/ou farmacológicas, assim como as atividades toxicológicas são não conhecidas. Vale ressaltar que não foram encontrados estudos a respeito do complexo de 4-metoxicinamato de zinco (II) na literatura.

### 3.2 Algumas considerações sobre P&D de Fármacos

A população da Terra está aumentando e envelhecendo. Alguns dos principais desafios da saúde, como muitos tipos de câncer e doenças infecciosas, diabetes e doenças neurodegenerativas, precisam de medicamentos inovadores. Apesar desse desafio, o desenvolvimento rápido e acessível de medicamentos é uma visão que contrasta com o estado atual do processo de P&D de medicamentos.

A P&D de medicamentos é um processo demorado que leva cerca de 10 a 15 anos e custa até cerca de 2,5 bilhões de dólares para um medicamento chegar ao mercado. É um processo de várias etapas, tais como: identificação e validação do alvo farmacêutico, escolha e otimização de substâncias bioativas, e estudos pré-clínicos e clínicos. Estima-se que de cada 10.000 substâncias testadas, apenas uma se torna um medicamento que será comercializado (GURUNG *et al.*, 2021).

O processo de P&D de um novo fármaco passa obrigatoriamente por duas grandes fases: (1) Pesquisa experimental ou fase pré-clínica: Antes de começar os testes em seres humanos, os pesquisadores realizam testes em células e em animais; (2) Pesquisa clínica: Nesta fase o objetivo principal é testar a segurança e a eficácia do novo medicamento em seres humanos. As fases clínicas necessárias para a P&D de um novo medicamento estão descritas no Quadro 1.

**Quadro 1 - Fases clínicas envolvidas na P&D de um novo medicamento**

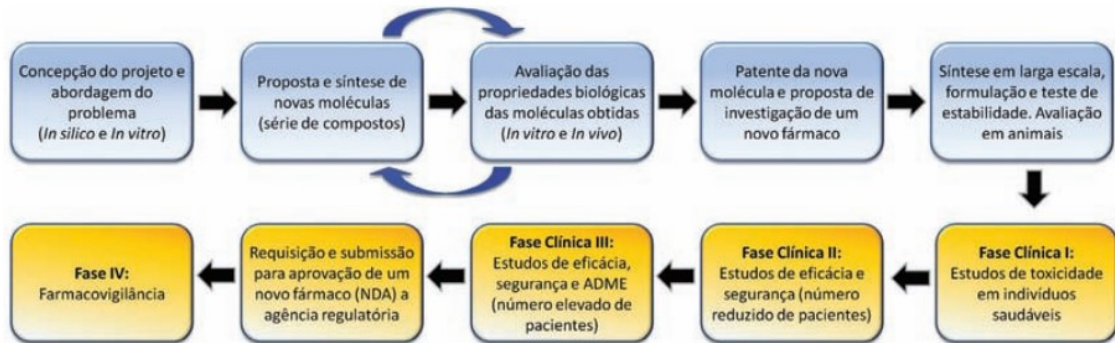
Fases	Número de participantes de pesquisa	Tempo de duração	Objetivos
I	Pequenos grupos de participantes de pesquisa (20-100)	Vários meses	Segurança, avaliação preliminar.
II	Número limitado de participantes de pesquisa	Vários meses até 2 anos	Eficácia, definição da dose eficaz. Em paralelo, a segurança.
III	Grandes e variados grupos de participantes de pesquisa	1 a 4 anos	Segurança, eficácia comparativa, risco/benefício. Aumenta-se o número de pacientes. Tem a intenção de registrar o novo medicamento.
IV	Milhares de participantes de pesquisa	Vários anos	Farmacovigilância. Promover experiência com o produto, avaliar novas indicações para os mesmos.

Fonte: Instituto Nacional do Câncer (2021)

Em um processo de P&D de fármacos, os estudos de reconhecimento molecular em sistemas biológicos assumem grande importância, pois constituem as bases fundamentais para

o entendimento de propriedades como potência, afinidade e seletividade. A Figura 4 esquematiza as duas grandes fases envolvidas no processo de P&D de novos fármacos.

**Figura 4 - Etapas envolvidas no processo de P&D de medicamentos**

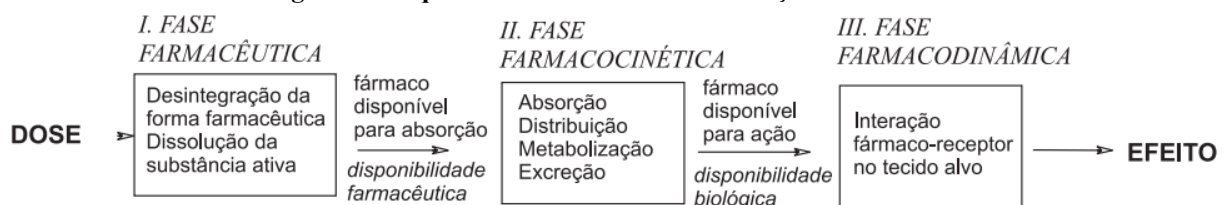


Fonte: Guido, Andricopulo e Oliva, (2010, p. 82)

Nos estágios iniciais, as pesquisas se concentram geralmente na identificação e otimização de moléculas pequenas capazes de representar novas entidades químicas (NCE, do inglês *New Chemical Entities*) com potencial de desenvolvimento clínico. A validação do alvo molecular selecionado é fundamental por uma série de razões que envolvem desde o estabelecimento de sua relevância no processo fisiopatológico em estudo até a caracterização do impacto de sua modulação seletiva no tratamento ou na cura de doenças ou disfunções em humanos (GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010).

A ação de um fármaco, quando administrado a humanos ou animais, pode ser dividida em três fases (Figura 5).

**Figura 5 - Esquema indicando três fases da ação de fármacos**



Fonte: Pereira (2007, p. 1)

Na fase farmacêutica, ocorre a desintegração da forma farmacêutica (medicamento), seguida da dissolução da substância ativa. Na fase farmacocinética ocorrem os processos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME), ou seja, “o que o organismo faz com o fármaco”. Na fase farmacodinâmica ocorre a interação do fármaco com seu alvo (receptor, enzima, entre outros) e a consequente produção do efeito terapêutico, e pode ser entendida como “o que o fármaco faz no organismo” (PEREIRA, 2007).

Entre as fases de ação do fármaco, a fase farmacocinética tem grande impacto sobre o efeito farmacológico, uma vez que os processos de ADME determinam a concentração e o tempo despendido das moléculas do fármaco no seu local de ação. Tradicionalmente, a P&D de novos fármacos concentra seus esforços iniciais na fase farmacodinâmica utilizando, por exemplo, triagens preliminares em modelos *in vitro*, tais como enzimas, receptores ou tecidos, para obter a relação entre os novos compostos e sua potência agonista ou antagonista. A partir desses estudos, triagens secundárias e terciárias frequentemente são realizadas com administração do composto em animais, por via oral ou intravenosa, para observação do efeito farmacológico. Entretanto, muitos dos compostos que se mostram promissores nos testes *in vitro* não apresentam boa atividade em animais. Essa falha de correlação, muitas vezes associada a problemas farmacocinéticos dos compostos, como baixa biodisponibilidade, duração de ação (muito curta ou muito longa), ou a presença de metabólitos ativos, pode levar a estudos clínicos malsucedidos. Dessa forma, a previsão dos processos de ADME, logo nos estágios iniciais da P&D de novos fármacos, é de extrema importância. A otimização dessas propriedades, por meio de modificações moleculares de compostos promissores, é essencial na seleção de compostos candidatos com maiores probabilidades de não serem abandonados, mais adiante, na fase clínica. O fracasso na fase clínica representa grandes perdas de tempo e dinheiro (PEREIRA, 2007).

### 3.2.1 Urease, um alvo de pesquisa farmacêutica

A *Helicobacter pylori* é uma bactéria Gram-negativa, que possui vários flagelos que facilitam sua fixação no estômago, responsável por diversas patologias gastroduodenais. O primeiro estudo capaz de identificar a bactéria *H. pylori* foi feito por Marshall e Warren (1984), tornando-a foco de muitos estudos microbiológicos, histológicos, epidemiológicos, imunológicos, ecológicos e clínicos. Isso possibilitou avanços do conhecimento na área, o que revolucionou a prática médica de clínicos gastroenterologistas que buscam o tratamento de patologias gastroduodenais causadas por *H. pylori* (BRITO *et al.*, 2019). Dentre essas patologias podemos destacar o câncer gástrico (CARLOSAMA-ROSETO *et al.*, 2021), linfoma MALT (SALAR, 2019), gastrite (STAHL *et al.*, 2020), úlcera péptica (LANAS-GIMENO; DOMINGO; GOMOLLÓN, 2020) e refluxo gastroesofágico (ARAUJO; CARVALHO; SERRA, 2016).

O mecanismo de defesa dessa bactéria no ambiente ácido do estômago é auxiliado pela urease, uma enzima produzida por este microrganismo que catalisa a degradação da

uréia, produzindo amônia e dióxido de carbono. A excreção de amônia neutraliza parcialmente a acidez do estômago, o que confere a *H. pylori* resistência à acidez gástrica (PÉREZ-PÉREZ; BLASER, 1996).

De acordo com Barbosa e Schinonni (2011) os flagelos, com cerca de 3 µm de comprimento, ajudam na penetração do muco, até chegar na superfície das células epiteliais gástricas. Sua adesão ao muco e às células epiteliais ocorre por meio da produção de adesinas. A produção da amônia e a liberação de proteases, catalases e fosfolipases pela *H. pylori* são responsáveis pela ação agressora às células epiteliais gástricas.

Atualmente, existem diversos métodos para detectar as infecções por *H. pylori* e são divididos em invasivos, baseados em endoscopia, e não invasivos. Os métodos não invasivos incluem teste respiratório com ureia, teste de antígeno fecal, sorologia e métodos moleculares. Em contrapartida, os métodos invasivos são feitos por meio de imagens endoscópicas, teste rápido da urease, histologia, cultura e métodos moleculares. Considerando a variedade de métodos disponíveis, a escolha para cada paciente deve levar em consideração a condição clínica, acessibilidade, vantagem, desvantagem, bem como custo-benefício (HUH; KIM, 2018).

Entre as formas de transmissão da *H. pylori*, destacam-se as contaminações oral-oral e fecal-oral. De acordo com Urita *et al.* (2013), o modo predominante de transmissão é por via oral-oral entre membros da família, na maioria das vezes pelo compartilhamento de utensílios entre pais, filhos, irmãos e avós. Para Goh *et al.* (2011), a infecção por via fecal-oral se dá pela disseminação da bactéria em água potável tratada, indicando a condição de vida precária como um dos fatores de risco para o contágio por *H. pylori*. Além disso, Burucoa e Axon (2017) apontam que as taxas de infecção são frequentemente mais altas em comunidades economicamente desfavorecidas, minorias étnicas e refugiados.

A *Helicobacter pylori* é um Gram-negativo neutralófilo que adquiriu um conjunto de genes (cluster de genes ure) que, na presença de ureia, permite que a bactéria sobreviva em pH extremamente ácido. Explorando essa capacidade única, estima-se que o *H. pylori* colonize os estômagos de aproximadamente metade da população mundial, causando um amplo espectro de doenças que vão desde gastrite e úlceras gástricas até câncer de estômago. O câncer gástrico é a terceira causa mais comum de morte por câncer em todo o mundo e mais de 90% dos casos são atribuíveis à infecção crônica por *H. pylori* (CUNHA *et al.*, 2021).

O cluster de genes ure é composto por sete genes, dois dos quais codificam uma urease dependente de níquel (ureA e ureB) que hidrolisa a ureia em NH<sub>3</sub> e CO<sub>2</sub>, um para um canal de ureia dependente de pH (ureI) que fornece ureia gástrica do hospedeiro para o

citoplasma bacteriano e quatro para proteínas acessórias citoplasmáticas envolvidas no processamento de níquel. Além disso, outras proteínas, como uma  $\alpha$  anidrase carbônica periplasmática, também são necessárias para a colonização do estômago humano (CUNHA *et al.*, 2021).

O canal de ureia presente na membrana plasmática e a urease citoplasmática são fatores de virulência essenciais para a sobrevivência da *H. pylori* no estômago. O canal detecta o pH periplasmático e, enquanto fechado em pH neutro, abre-se após a acidificação para permitir a difusão da ureia do suco gástrico para a urease citoplasmática, que compreende cerca de 10% da proteína bacteriana total. Uma vez no citoplasma, a ureia é hidrolisada rapidamente pela urease em amônia e dióxido de carbono, tamponando o citoplasma e o periplasma mesmo no suco gástrico em níveis de acidez abaixo de pH 2 (CUNHA *et al.*, 2021).

As ureases (EC 3.5.1.5) são amidohidrolases encontradas em bactérias, algas, plantas e fungos com um sítio ativo composto por uma lisina carbamilada (KCX) coordenando um centro contendo dois íons níquel. Em variantes raras, o sítio ativo contém dois cátions de ferro em vez de níquel, presumivelmente para superar as condições de baixo teor de níquel, produzindo uma enzima menos ativa. Na década de 1920, a urease do feijão-de-porco foi a primeira enzima a ser cristalizada, porém, só em 1995 foi relatada a primeira estrutura de urease tridimensional, pertencente a *Klebsiella aerogenes*. No estado nativo da enzima, um ânion hidróxido se liga aos dois íons níquel, ativando-os para o ataque nucleofílico no substrato durante a hidrólise (CUNHA *et al.*, 2021).

Numerosos inibidores de urease foram relatados, que podem tanto suprimir o crescimento de vários patógenos humanos, bem como inibir ureases do solo que causam danos ambientais e econômicos quando a ureia é utilizada como fertilizante. As três classes principais são (1) compostos sulfidríla, incluindo  $\beta$ -mercaptoetanol, (2) derivados de ácido hidroxâmico, como ácido acetohidroxâmico, e (3) amidas e ésteres de ácido fosfórico, como fluorofamida, que são pensados para representar análogos do estado de transição. A fluorofamida mostrou-se promissora em modelos animais, mas não conseguiu erradicar *H. mustelae* em furões, presumivelmente devido à instabilidade do composto em condições ácidas. Identificamos um conjunto de inibidores de urease de *H. pylori* usando triagem in vitro de alto rendimento de uma biblioteca diversificada de ~ 200.000 compostos, quase todos derivados do ácido hidroxâmico (CUNHA *et al.*, 2021).

A erradicação atual, chamada de terapia tripla, envolve a ingestão de um inibidor da bomba de prótons e dois antibióticos de amplo espectro, porém, a resistência aos antibióticos

claritromicina e metronidazol é geralmente superior a 25% e crescente. Essa resistência resultou na inclusão da *H. pylori* na Lista de Prioridades Globais da OMS de Bactérias Resistentes a Antibióticos, ressaltando a necessidade urgente de um medicamento direcionado e de alta especificidade para erradicação da *H. pylori* (CUNHA *et al.*, 2021).

Devido à resistência da *H. pylori* aos antibióticos utilizados no tratamento convencional, atualmente tem sido desenvolvidas diversas pesquisas que visam a erradicação dessa bactéria. Dentre as terapias alternativas, destaca-se o tratamento com nanopartículas de ferro revestidas de ouro, com potencial antioxidante significativo e taxas máximas de inibição de urease (AL-RADADI, 2022); o uso de pepsinogênio como marcador não invasivo confiável para gastrite não atrófica relacionada à *H. pylori* (MÁRIO *et al.*, 2022) e a vacinação profilática, com vacina à base de urease, eficiente em diminuir a infecção através da mobilização de linfócitos T auxiliares (VAILLANT *et al.* 2022).

Outros estudos importantes apontam alguns extratos naturais que se mostraram eficientes no combate à *H. pylori*, como: o extrato de Qing Guo, fruto da espécie de árvore *Canarium album*, efetivo na inibição de urease (YAN *et al.*, 2022); extratos de *Syzygium aromaticum* (cravo da Índia), com capacidade de destruir a estrutura bacteriana e regular a expressão de genes de virulência (PENG *et al.*, 2022) e o extrato de nimbolide, um fitoquímico encontrado em árvores da espécie *Azadirachta indica* A. Juss, que apresenta atividade bactericida significativa contra *H. pylori*, matando as células bacterianas (WYLIE *et al.*, 2022).

Esses estudos confirmam a demanda de terapias alternativas para a erradicação da *H. pylori*, sendo cada vez mais necessária a busca por compostos com propriedades farmacológicas e biologicamente relevantes, ideais para um potencial novo agente.

### 3.2.2 Atividade toxicológica, uma indispensável etapa da P&D de medicamentos

O sucesso da P&D de novos medicamentos é um processo arriscado, custoso, demorado e que envolve profissionais de várias áreas do conhecimento. Em relação à pesquisa pré-clínica, além dos estudos de farmacologia (farmacocinética e farmacodinâmica), uma extensa gama de estudos toxicológicos (toxicidade aguda, subaguda e crônica, efeitos sobre a reprodução, carcinogênese e teratogênese) são necessários para atestar a segurança de uma substância química resultante de um processo de P&D de medicamentos. Para isso, a substância em avaliação é submetida a testes de toxicidade a curto e longo prazo em animais, para que suas propriedades farmacológicas possam ser definidas dentro de uma relação dose-

resposta (FERREIRA *et al.*, 2009). O Quadro 2 apresenta alguns dos testes de segurança realizados para avaliação da toxicidade de substância resultante de um processo de P&D de novo medicamento.

**Quadro 2 - Testes de segurança realizados em modelos animais**

Segurança	Modelo do teste	Duração da dose
Toxicidade aguda/imediata	Rato, camundongo e cão	1-14 dias
Toxicidade de curto-prazo	Rato, camundongo, cão e macaco	30-90 dias
Toxicidade de longo-prazo	Rato, camundongo, cão e macaco	6-12 meses
Carcinogenicidade (tempo de vida da toxicidade)	Rato e camundongo	24 meses
Carcinogenicidade (mecanismo de ação)	Modelos de cultura de células/in vitro	Dias
Teratologia/anomalias congênitas	Camundongo, rato e coelho	Meses- duas gerações
Fertilidade	Teste de mobilidade do esperma in vitro	Dias
Fertilidade e comportamento reprodutivo	Rato e coelho	Dias-meses
Perfil fisiológico/farmacológico	Rato, camundongo e cão	Dias
Absorção-distribuição-metabolismo- eliminação (ADME)	Rato, camundongo e cão ou macaco	Dias-meses

Fonte: Lima *et al.* (2003, p. 228)

No Brasil, segundo a Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012, “as pesquisas que utilizam metodologias experimentais na área biomédica”, tais como os estudos clínicos previstos no processo de P&D de medicamentos, deve “estar fundamentadas na experimentação prévia, realizada em laboratórios, utilizando-se animais ou outros modelos experimentais e comprovação científica” (BRASIL, 2012). Sendo assim, observa-se que a legislação brasileira permite o uso de dados oriundos de experimentação com modelos experimentais diferentes de animais, ampliando as possibilidades indicadas no Quadro 2.

No contexto ambiental, o uso de modelos experimentais diferentes de animais é mais frequente do que no contexto farmacêutico, muitos tipos de organismos são utilizados como bioindicadores da avaliação de possíveis efeitos de contaminação natural ou de origem antropogênica. Em ambientes aquáticos, moluscos, vermes bênticos, esponjas, anfíbios e peixes têm sido utilizados como biomonitores de substâncias tóxicas. Plantas, particularmente *Tradescantia zebrina*, *Allium cepa* e *Vicia faba*, têm sido utilizadas para a avaliação da poluição presente na água, no solo e na atmosfera.

Bioensaios com plantas têm sido considerados mais sensíveis e mais simples quando comparados com bioensaios que utilizam animais. Esses organismos-teste têm sido validados em estudos de colaboração internacional entre o Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (UNEP, do inglês *United Nations Environmental Program*), Organização Mundial da Saúde (WHO, do inglês *World Health Organization*) e Agência de Proteção Ambiental dos



EUA (USEPA, do inglês *US Environmental Protection Agency*), que provaram a eficiência desses organismos para o monitoramento de mutagenicidade causada por poluentes ambientais (MENKE *et al.*, 2001; GRANT, 1999). Os vegetais, por serem receptores biológicos diretos de agrotóxicos, constituem, portanto, um importante material para testes genéticos e de monitoramento desses contaminantes (MA *et al.*, 1995).

Devido ao risco do uso indiscriminado de medicamentos, é necessária a aplicação de alguns testes laboratoriais que podem ser usados para a identificação de danos, dentre eles, o teste de *Allium cepa*, o ensaio cometa e o ensaio de letalidade com *Artemia salina*. O teste *A. cepa* é utilizado para a detecção de genotoxicidade, citotoxicidade e mutagenicidade, além de fornecer informações importantes para avaliar os mecanismos de ação de agentes clastogênicos e/ou aneugênicos (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

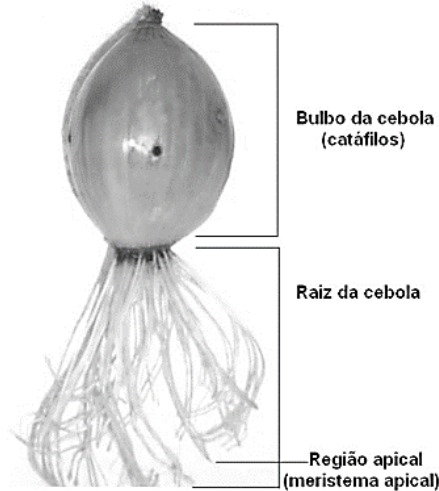
Dentre os bioensaios mais utilizados para avaliação de toxicidade, a cebola (*Allium cepa* L.) é considerada uma excelente espécie para esse fim (MAZZEO *et al.*, 2015), tendo sua aplicação validada pelo Programa Internacional de Segurança Química (PISQ) e Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (PNUMA) (GROVER; KAUR, 1999), além de padrão ouro para avaliação de cito e genotoxicidade (FERETTI *et al.*, 2007; PARVAN *et al.*, 2020).

A cebola se destaca pela facilidade de cultivo, disponibilidade durante todo o ano, exposição direta à amostra, incluindo misturas complexas, sem a necessidade de realizar procedimentos de extração ou pré-tratamento, alta sensibilidade, boa correlação com outros sistemas, incluindo mamíferos, número reduzido de cromossomos ( $2n=16$ ), e possibilidade de testar aspectos macro e microscópicos (KURÁS *et al.*, 2006; MATSUMOTO *et al.*, 2006; RANK; NIELSEN, 1998; GRANT, 1982).

Como algumas células se dividem lentamente ou não se dividem, deixando a fase  $G_1$  da interfase em um estado de inércia  $G_0$ , onde não estão se preparando para a divisão e apenas desempenham suas funções (RAVEN *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2013). É importante que se trabalhe com células de rápida divisão para a visualização dos resultados, e a espécie proporciona isso com seus meristemas, tecidos de intensa atividade ou proliferação celular localizados no extremo das raízes (Figura 6), que ainda se espalham facilmente pelas lâminas e contribuem para a leitura no microscópio (SOLANO *et al.*, 2015).

Para Fiskesjö (1985), cuja metodologia serviu de base neste estudo, o emprego de séries de cebolas para cada concentração de substância testada permite considerações estatísticas e, a partir das curvas de crescimento, obter valores de efeito-concentração que são valiosos alertas de risco.

**Figura 6 - Principais estruturas de um bulbo de cebola**



Fonte: Rodrigues *et al.* (2010, p. 5)

### 3.2.3 Estudos *in silico*, um importante aliado na P&D de medicamentos

Várias ferramentas computacionais têm sido empregadas, durante a fase pré-clínica, para otimizar o tempo e o sucesso do processo de P&D de novos medicamentos. Algumas abordagens que têm sido utilizadas para essa finalidade estão relacionadas ao Planejamento de Fármacos Auxiliado por Computador (CADD, do inglês *Computer-Assisted Drug Design*), que envolvem abordagens computacionais para descobrir, desenvolver e analisar fármacos e moléculas bioativas com propriedades bioquímicas semelhantes. As principais abordagens utilizadas são: modelagem por homologia, *docking molecular*, triagem virtual ou virtual triagem de alto rendimento, Relações Quantitativas Estrutura-Atividade (QSAR, do inglês *Quantitative Structure-Activity Relationships*) (SABE *et al.*, 2021).

Até o momento, o processo de P&D de mais de 70 novos fármacos incluíram alguma forma de técnica computacional. Tal fato justifica o uso de recursos computacionais, seja no processo de P&D de novos fármacos ou em pesquisas acadêmicas, para produzir mais conhecimentos acerca da potencialidade de uso de ferramentas computacionais já existentes, assim como desenvolver novos algoritmos que permitam calcular novas propriedades de interesse farmacológico e/ou toxicológico.

Apesar dos altos investimentos e tempo incorridos na P&D de novos medicamentos, a taxa de sucesso por meio de ensaios clínicos é de apenas 13%. Na maioria dos casos (40-60%), a falha do fármaco em um estágio avançado da P&D de novos medicamentos foi relatada devido à falta de propriedades farmacocinéticas adequadas na absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADME). O uso técnicas de Planejamento de Fármacos

Auxiliado por Computador em estudos preliminares pelas principais empresas farmacêuticas e grupos de pesquisa tem ajudado a agilizar o processo de P&D de medicamentos, minimizando os custos e as falhas na fase final (GURUNG *et al.*, 2021).

A aplicação do desenho racional de fármacos como parte integrante do CADD fornece informações úteis para a compreensão da afinidade de ligação e interação molecular entre a proteína alvo e o ligante. Além disso, a identificação de alvos na pesquisa farmacêutica foi facilitada pela disponibilidade de instalações de supercomputadores, processamento paralelo e programas avançados, algoritmos e ferramentas computacionais (GURUNG *et al.*, 2021). Além disso, avanços recentes em métodos de inteligência artificial e aprendizado de máquina ajudaram muito na análise, aprendizado e explicação de grande conjunto de dados relacionados a produtos farmacêuticos utilizados no processo de P&D de medicamentos (CAMPOS; VASCONCELOS, 2021).

#### 3.2.4 Encapsulamento e liberação controlada de fármacos

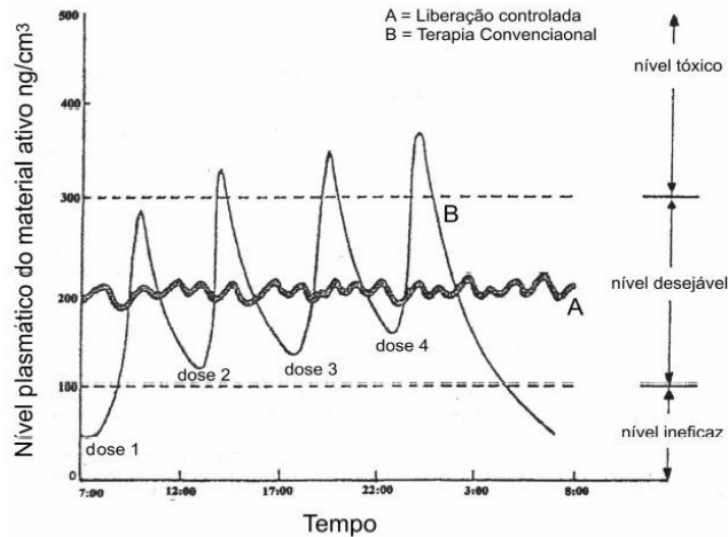
Outra importante etapa na P&D de medicamentos se refere ao estudo da forma farmacêutica adequada para que o fármaco desempenhe sua ação da melhor forma possível. Entre os vários sistemas de administração de fármacos, os sistemas de liberação controlada, quando comparados aos sistemas convencionais, apresentam diversas vantagens, tais como efeitos colaterais reduzidos, resolvem problemas inerentes à utilização do fármaco em concentrações elevadas e evidenciam maior eficácia. Nos sistemas de liberação controlada, o fármaco está ligado a um transportador responsável por contornar as propriedades físico-químicas limitantes dos fármacos encapsulados, permitindo a potencialização do efeito terapêutico, a redução da toxicidade local e sistêmica, o aumento do controle da absorção e da distribuição tecidual dos mesmos (ABREU, 2008; HENRIQUE; FALCARE; LOPES, 2006).

Em terapias convencionais de administração, a concentração de fármaco na corrente sanguínea aumenta até atingir o nível máximo de dissolução (pico) e então declina, sendo necessária a administração de nova dose para manter os níveis de concentração. Concentrações do fármaco acima da faixa terapêutica podem conduzir a toxicidade, enquanto concentrações abaixo da faixa terapêutica são ineficazes e podem, em alguns casos, causar resistência ao fármaco, assim como mostra a Figura 7 (BIZERRA; SILVA, 2016).

Com o propósito de minimizar os efeitos indesejados observados na administração convencional, os sistemas de liberação controlada tornaram possível modular a liberação do fármaco na faixa terapêutica por tempo prolongado e diminuir a dosagem. Vale ressaltar que a

dose eficaz de um fármaco pode variar de acordo com a forma farmacêutica e a via de administração (BIZERRA; SILVA, 2016; LOYD; POPOVICH; ANSEL, 2013).

**Figura 7 - Comparação das variações de concentração de fármacos administrados por diferentes métodos: liberação controlada (A) e terapia convencional (B)**



Fonte: Graham (1978, p. 1)

Os sistemas de liberação podem ser desenvolvidos como sistemas monolíticos ou multiparticulados, empregando-se tecnologias como matrizes poliméricas, sistemas reservatórios ou bombas osmóticas. O fármaco ou a substância bioativa podem ser liberados por meio de nanocápsulas, microcápsulas, sistemas transdérmicos, pró-fármacos, entre outros. Cada tipo de sistema possui uma via de administração diferente, podendo ser oral, retal, sublingual, cutânea e nasal (PEZZINI; SILVA; FERRAZ, 2007; HENRIQUE; FALCARE; LOPES, 2006; LOPES; LOBO; COSTA, 2005).

### 3.4 Forma de administração oral, o ideal para o contexto da pesquisa

Os medicamentos são utilizados com finalidade profilática, terapêutica ou diagnóstica. Podem conter uma ou mais substâncias ativas que devem ser administradas ao paciente por meio de uma das vias possíveis, veiculadas em uma forma farmacêutica sólida, semissólida ou líquida. A via de administração oral tem sido alvo de diversos estudos farmacêuticos que visam o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos ou substâncias bioativas. Essa via de administração também é a preferida para o tratamento de doenças do trato gastrointestinal, pois coloca o agente terapêutico no local de ação ou

próximo a ele (PRIMO, 2015; WESTON; YEBOAH, 2013; PEZZINI; SILVA; FERRAZ, 2007).

A via oral de administração de medicamentos possui diversas vantagens, como o fato de ser relativamente simples, não precisar de equipamentos adicionais para administração do paciente, como é o caso dos agentes injetáveis ou inalados e, geralmente, é a opção mais barata para o fabricante e o paciente. Além disso, é tipicamente o caminho mais seguro para introduzir um medicamento no corpo, uma vez que diminui o risco de transmissão de doenças, pois não é necessário perfurar superfícies ou membranas da pele. Devido a essas e outras vantagens, a maioria dos fármacos utilizados atualmente são formulados e administrados oralmente (WESTON; YEBOAH, 2013).

A desvantagem que afeta a eficiência da via oral de administração é o tempo de permanência da formulação do medicamento no local de ação desejado, pois a absorção de fármacos é frequentemente limitada pela rápida lavagem dos agentes no corpo e pelo curto tempo de contato entre a formulação e a membrana de absorção. Nesse sentido, a liberação controlada é desenvolvida para modular a liberação do fármaco, retardando ou prolongando a sua dissolução. Isso permite liberar o medicamento após um período definido de tempo, ou em um sítio específico do trato gastrointestinal, e prolongar o efeito farmacológico (WESTON; YEBOAH, 2013; PEZZINI; SILVA; FERRAZ, 2007).

Alguns fármacos podem ser rapidamente absorvidos no estômago, onde sua liberação é imediata e com um perfil fora da faixa terapêutica, se tornando tóxico e gerando um resultado indesejável. Por isso, é importante que sejam formulados em sistemas de liberação controlada, buscando manter a concentração sistêmica do medicamento dentro da faixa terapêutica por tempo prolongado (VARUM *et al.*, 2008).

Outro órgão do trato gastrointestinal importante, no que diz respeito à biodisponibilidade, é o intestino, sendo que o intestino delgado é considerado o principal local de absorção de fármacos. A taxa e a extensão da absorção a partir do intestino delgado podem ser influenciadas pelo tempo de permanência do medicamento ou forma de dosagem, onde o tempo de trânsito através do intestino delgado é 3 a 4 horas, o que torna importante a utilização de sistemas de liberação prolongada de fármacos absorvidos nessa região (FADDA *et al.*, 2009; VARUM *et al.*, 2008).

Entre os vários sistemas de liberação controlada, optamos, no presente trabalho, pelo uso de sistemas poliméricos que permitem a encapsulação de fármacos. A tecnologia para o produção desses sistemas surgiu por volta dos anos de 1960 com o desenvolvimento da microencapsulação, técnica que transformava os líquidos poliméricos ou de outras substâncias em pós com tamanho de partículas

micrométricas, cujos tamanhos variam entre 1 e 1000  $\mu\text{m}$ . Atualmente, essa técnica é bastante utilizada nas indústrias alimentícia, têxtil, farmacêutica e cosmética por permitir a proteção de substâncias. A microencapsulação serviu de modelo e inspiração para o desenvolvimento de técnicas mais sofisticadas de obter esferas, só que agora em escala nanométrica, permitindo o desenvolvimento de nanopartículas (PIMENTEL *et al.*, 2007).

Nanopartículas são estruturas de tamanhos que variam de 1 a 100 nm e possuem, geralmente, propriedades físico-químicas e biológicas otimizadas por causa de seu tamanho. São absorvidas mais facilmente pelas células do que partículas maiores, por isso sistemas baseados em nanopartículas vêm sendo utilizados como, ferramenta para liberação de compostos bioativos no organismo. Nanopartículas são partículas poliméricas esféricas que podem estar na forma de reservatório (cápsulas) ou matricial (matriz polimérica), nas quais o fármaco está encapsulado ou adsorvido na malha polimérica (WILCZEWSKA *et al.*, 2012).

Entre as vantagens que os nanossistemas ou microssistemas podem oferecer destacam-se: a proteção do fármaco no sistema terapêutico contra possíveis instabilidades no organismo, permitindo a manutenção de níveis plasmáticos em uma concentração constante; a liberação progressiva e controlada do fármaco por estímulos do meio em que se encontram, pois podem ser sensíveis a variação de pH e/ou de temperatura; a diminuição expressiva da toxicidade pela redução de picos de concentração; a diminuição da instabilidade e decomposição de fármacos sensíveis; a possibilidade de direcionamento a alvos específicos; a possibilidade de incorporação tanto de substâncias hidrofílicas quanto lipofílicas nos dispositivos; a diminuição da dose terapêutica e do número de administrações e aumento da aceitação da terapia pelo paciente (WILCZEWSKA *et al.*, 2012).

Alguns fármacos que apresentam baixa biodisponibilidade, ou quando a substância ativa tem um efeito colateral de irritação local podem ter esses problemas solucionados quando preparados em formulações multiparticuladas com matriz polimérica que proporciona uma liberação controlada (PALMIERI *et al.*, 2002; SJOBLÖM, 2004). Quando uma mistura consistindo de um fármaco pouco solúvel em água e um veículo inerte, altamente solúvel, é dissolvida em um meio aquoso, o veículo se dissolve rapidamente liberando cristais muito finos do fármaco. A extensa área de superfície resulta em um aumento da taxa de dissolução e portanto melhora a biodisponibilidade do fármaco (ZHU, 2002). Logo, as propriedades físico-químicas do fármaco, principalmente solubilidade e permeabilidade (ZHU, 2002), e como ele pode ser melhor absorvido pelo organismo também tem bastante importância para a escolha do polímero da formulação (RIOS, 2005). Os sistemas de liberação poliméricos são principalmente aplicados para se conseguir um controle temporal ou espacial da liberação do

fármaco (LI; VERT, 1999) e são ferramentas de grande importância para a tecnologia farmacêutica.

A melhora no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada depende estritamente da seleção de um agente polimérico apropriado, ou seja, que seja capaz de controlar a liberação do fármaco, sustentar a ação terapêutica ao longo do tempo e liberar o fármaco em um determinado tecido ou órgão alvo. Para isto é importante que o polímero seja inerte em meios aquosos.

Materiais poliméricos farmacêuticos com pequena ou nenhuma toxicidade podem ser utilizados como membranas ou matrizes nas quais o ingrediente ativo é disperso ou dissolvido. Polímeros também funcionam como veículos e podem ser adicionados aos ingredientes ativos. Esses carreadores podem ser usados para liberar uma grande variedade de fármacos em uma taxa controlada no trato gastrointestinal (ZHU, 2002). Devido as suas diversas aplicações e funcionalidades, especialmente em terapias de liberação controlada de fármaco, os polímeros estão dentre os excipientes mais utilizados para a obtenção de formas farmacêuticas (RIOS, 2005).

Polímeros naturais e sintéticos são usados na preparação de sistemas de liberação de fármacos. Entretanto, nas últimas décadas, muitos pesquisadores têm buscado produzir sistemas de liberação de fármacos a partir de polímeros naturais derivados de sistemas biológicos, incluindo proteínas, ácido desoxirribonucléico e polissacarídeos (MOURA *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2008). Essa tendência é impulsionada não apenas pelas excelentes propriedades dos polímeros naturais em termos de biocompatibilidade, biodegradabilidade e similaridade tecidual, mas também pelo crescente interesse em substituir polímeros sintéticos derivados do petróleo por produtos ecológicos e sustentáveis.

Dentre os polissacarídeos mais investigados como sistemas de liberação de fármacos, a quitosana se destaca por suas características de biocompatibilidade, biodegradabilidade e atoxicidade (DZIADKOWIEC *et al.*, 2017; MORGADO *et al.*, 2017; MOURA *et al.*, 2016; CHOI; NAM; NAH, 2016; LIU *et al.*, 2008). Ademais, a quitosana apresenta propriedades cicatrizante, hemostática, antimicrobiana, angiogênica e analgésica (SUDHA *et al.*, 2017; MOURA *et al.*, 2016; SZYMAŃSKA; WINNICKA, 2015; ALSARRA, 2009). Pode ser degradada *in vivo* por várias enzimas, principalmente pela lisozima, e os produtos da degradação são oligossacarídeos não tóxicos (SUDHA *et al.*, 2017; BERGER *et al.*, 2004). Outra característica importante é que, devido à sua carga positiva no pH fisiológico, a quitosana é bioadesiva, o que aumenta a retenção no local de aplicação (BERGER *et al.*, 2004).

Dentre as inúmeras aplicações do biopolímero quitosana, encontra-se também a sua ação como agente flocculante em tratamentos de efluentes líquidos e como resina quelante na remoção de metais pesados. Esse polissacarídeo vem sendo usado como sistema de liberação de fármacos, tais como prednisolona, albumina e melatonina (RAO *et al.*, 2006). A biocompatibilidade da quitosana já foi comprovada em implantes como biomaterial em tecidos vivos e a sua baixa toxicidade foi verificada em animais ( $DL_{50}$  em ratos de 16 g/Kg). Essas propriedades permitiram o emprego da quitosana em formas farmacêuticas. Comprimidos encapsulados por quitosana se comportam como géis em soluções de baixo pH e são adequados para a liberação de fármacos em água. Isto porque a quitosana mantém forma de gel em pH baixos sendo a liberação do agente bioativo retardada nesta condição, podendo haver uma liberação constante (RONQUI; CRUZ; INNOCENTINI-MEI, 2005). Outros trabalhos descrevem que as formulações orais revestidas do biopolímero quitosana flutuam e intumescem gradualmente em solução de pH 1,2, o que a torna ideal para a liberação de substâncias para o tratamento de *H. pylori* (JOSUÉ *et al.*, 2000).

Além disso, a quitosana e seus derivados apresentam algumas vantagens importantes com relação às atividades farmacológicas, atuando como antiácido, antiúlcera, protegendo a mucosa gástrica e inibindo a adesão de bactérias nas células epiteliais bucais e vaginais. Todos esses méritos somados ao baixo custo de produção e a abundância de matéria-prima (fonte renovável), fazem da quitosana um biopolímero adequado para administração de vários fármacos e macromoléculas (LIU *et al.*, 2008).



## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Reagentes

Todos os reagentes utilizados apresentam pureza analítica. O bicarbonato de sódio, sulfato de zinco hepta-hidratado, ácido cinâmico foram adquiridos da Êxodo Científica, o hidróxido de sódio e ácido clorídrico da Proquímios e o ácido 4-metoxicinâmico da Sigma-Aldrich. A quitosana foi adquirida da Sigma-Aldrich, com grau de desacetilação de 75-85%.

### 4.2 Síntese de Complexos Cinamatos de Zinco

*Síntese do cinamato de zinco (II), Zn(ACI)<sub>2</sub>*: De acordo com a metodologia de Jarosz *et al.* (2017), foram dissolvidos 0,01 mol de hidróxido de sódio em 30 mL de água destilada, com aquecimento (~ 60 °C). Para esta solução, 0,01 mol de ácido cinâmico foi adicionado com agitação constante. Após a dissolução completa do ácido cinâmico, adicionou-se a solução 0,007 mol de sulfato de zinco heptaidratado dissolvido em 10 mL de água destilada com agitação constante. O precipitado complexo de zinco/ácido cinâmico foi filtrado e lavado com solução de bicarbonato de sódio e depois com água destilada para remover o ácido que não reagiu.

*Síntese do 4-metoxicinamato de zinco (II), Zn(MCI)<sub>2</sub>*: De acordo com a metodologia de Jarosz *et al.* (2017), foram dissolvidos 0,01 mol de hidróxido de sódio em 30 mL de água destilada, com aquecimento (~ 60 °C). Para esta solução, 0,01 mol de ácido 4-metoxicinâmico foi adicionado com agitação constante. Após a dissolução completa do ácido cinâmico, adicionou-se a solução 0,007 mol de sulfato de zinco heptahidratado dissolvido em 10 mL de água destilada com agitação constante. O precipitado complexo de zinco/ácido cinâmico foi filtrado e lavado com solução de bicarbonato de sódio e depois com água destilada para remover o ácido que não reagiu.

### 4.3 Caracterização dos materiais

*Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)*: A caracterização estrutural dos ácidos cinâmico e 4-metoxicinâmico e dos zincatos correspondentes foram realizadas por meio de um espectrofotômetro Perkin Elmer Frontier, na região de 4000-650 cm<sup>-1</sup>. As amostras foram analisadas no modo de aquisição de

Reflectância Total Atenuada Eco-ATR, equipado com cristal ZnSe ATR de alta capacidade para análise de pó. Oito varreduras foram realizadas com resolução de  $2 \text{ cm}^{-1}$ .

*Difratometria de Raios X (DRX):* Os ácidos cinâmico e 4-metoxicinâmico e os zincatos correspondentes foram caracterizados por difratometria de raios X em um difratômetro de raios X da Bruker, modelo D2Phaser, cátodo de cobre ( $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ ), potencial de 30 kV, corrente de 10 mA, faixa entre  $2^\circ$  e  $90^\circ$  ( $2\theta$ ) e incremento de  $0,2^\circ/\text{s}$ .

*Análise termogravimétrica (TG):* A análise termogravimétrica dos ácidos cinâmico e 4-metoxicinâmico e dos zincatos foi realizada em um analisador térmico Perkin Elmer, STA 6000, (STA/TG-DSC). Foi utilizado uma taxa de aquecimento de  $10^\circ\text{C}/\text{min}$ , na faixa de temperatura de 30 a  $780^\circ\text{C}$ , utilizando panela de alumina, em atmosfera de nitrogênio com vazão média de  $40 \text{ mL}/\text{min}$ .

*Estudo da estabilidade em diferentes pHs:* O estudo da estabilidade dos complexos foi feita pela solubilização e manutenção, em banho Maria a  $37^\circ\text{C}$ , dos complexos em diferentes pHs (2, 4, 6, 8, 10, 12 e 14), por 1 semana. Alíquotas foram recolhidas, em intervalos de tempo (0 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 1 dia, 2 dias e 1 semana) e leituras de absorção foram realizadas em Espectrofotômetro UV-Vis T70+, *PG Instruments*. As leituras realizadas em diferentes pHs foram plotadas em função do tempo, para verificar em quais pHs os cinamatos de zinco permaneceram estáveis.

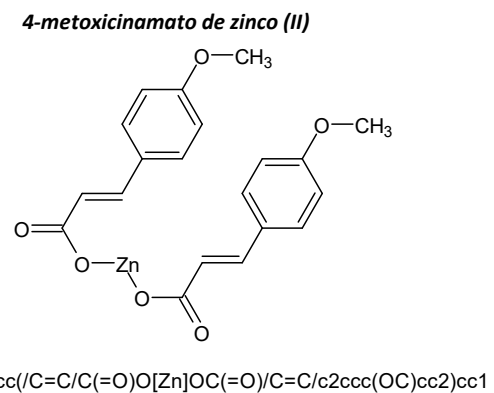
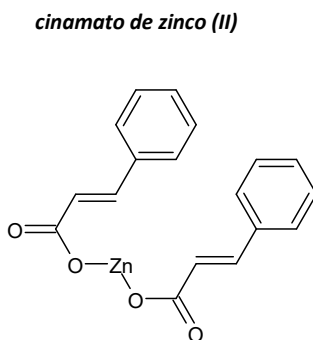
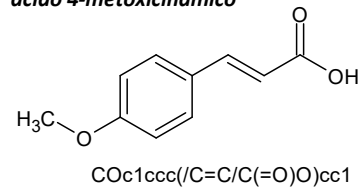
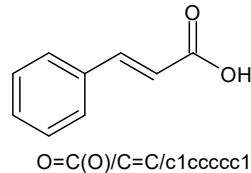
#### 4.4 Estudos *in silico*

*ACD/Chem Sketch* (ferramenta *offline* e gratuita, desenvolvida e disponibilizada pela empresa Advanced Chemistry Development, <https://www.acdlabs.com/resources/freeware/chemsketch>): utilizada para desenhos estruturais, gerar códigos SMILES (do inglês *Simplified Molecular Input Line Entry System*, Sistema de Entrada de Linha de Dados Moleculares Simplificado), e determinar as estruturas tridimensionais de substâncias químicas.

*Molinspiration* (ferramenta *online* e gratuita, desenvolvida e disponibilizada pela empresa Molinspiration Cheminformatics, <https://www.molinspiration.com/>): utilizada para avaliar propriedades moleculares associadas à biodisponibilidade oral, cuja probabilidade de ocorrência é indicada pela regra dos cinco de Lipinski a partir da avaliação de cinco parâmetros: a) Coeficiente de partição octanol-água (LogP) que deve ser menor ou igual a 5; b) Massa molar (MM) que deve ser menor ou igual a  $500 \text{ g}/\text{mol}$ ; c) Área de superfície topológica polar (TPSA) que deve ser menor ou igual a  $140 \text{ \AA}^2$ ; d) Número de grupos

receptores de ligação de hidrogênio (nALH) que deve ser menor ou igual a 10; e) Número de grupos doadores de ligação de hidrogênio (nDLH) que deve ser menor ou igual a 5 (LIPINSKI *et al.*, 2001). Além disso, avaliou-se a potencialidade dos ácidos cinâmicos e dos zincatos correspondentes atuarem como ligante GPCR, modulador de canal iônico, inibidor de quinase, ligante de receptor nuclear, inibidor de protease e inibidor de enzima. O método utilizado para calcular a potencialidade de uma substância possuir uma das bioatividades mencionadas, usa estatísticas Bayesianas sofisticadas para comparar estruturas de ligantes ativos no alvo, em particular com estruturas de moléculas inativas, e identificar características da subestrutura (que por sua vez determinam propriedades físico-químicas típicas de moléculas ativas) (RATHGEBER; ZÜCHNER; BURCHARDI, 1996).

**Figura 8 - Representação estrutural e código SMILES das substâncias avaliadas**



Fonte: Autoria própria (2022)

*AdmetSAR 2.0* (ferramenta *online* e gratuita, <http://lmmd.ecust.edu.cn/admetsar2>): utilizada para prever parâmetros farmacocinéticos relacionados à absorção, distribuição, metabolismo e toxicidade de substâncias químicas (YANG *et al.*, 2018).

*iGEMDOCK* (ferramenta *offline* e gratuita): utilizada para realizar o estudo de ancoragem molecular frente a enzima urease (PDB 6ZJA) disponível no banco de dados *Protein Data Bank*. Trata-se de uma ferramenta que permite estudar as interações farmacológicas, que são úteis para entender os mecanismos de ligação de ligantes à um alvo terapêutico. Segundo estudos realizados pelos desenvolvedores da ferramenta, a taxa de sucesso do *iGEMDOCK* é de 78% e considerando as moléculas de água é de 85%,

considerando uma amostra de 305 complexos de proteínas e seus respectivos ligantes cristalográficos retirados do banco de dados *Protein Data Bank* (YANG; CHEN, 2004; YANG *et al.*, 2018).

*UCSF Chimera 1.15* (ferramenta *offline* e gratuita, <https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>): utilizada para avaliar visualmente as interações enzima-ligantes resultantes de estudos de ancoragem molecular (PETTERSEN *et al.*, 2004).

O *ROSC-Pred* (ferramenta *online* e gratuita, <http://www.way2drug.com/ROSC/>): utilizada para a previsão de carcinogenicidade específica para órgãos de roedores considerando a espécie (ratos, camundongos), sexo e especificidade do tecido a partir da fórmula estrutural dos compostos a serem avaliados. A previsão é baseada na tecnologia Previsão de Espectros de Atividade para Substâncias (PASS, do inglês *Prediction of Activity Spectra for Substances*) e conjuntos de treinamento criados com base em dados do Banco de Dados de Potência Carcinogênica (CPDB, do inglês *Carcinogenic Potency Database*). Os dados CPDB estão disponíveis na Rede de Banco de Dados de Estrutura Distribuída e Toxicidade Pesquisável (DSSTox, do inglês *Distributed Structure-Searchable Toxicity*) da US EPA. A ferramenta utiliza código SMILES, arquivo MOL ou miniaplicativo MarvinSketch para a entrada da estrutura que representa a substância química a ser avaliada (LAGUNIN *et al.*, 2017).

*MetaTox* (ferramenta *online* e gratuita, <http://www.way2drug.com/mg>): utilizada para previsão do metabolismo de xenobióticos e cálculo da toxicidade de metabólitos com base na fórmula estrutural de produtos químicos conhecidos. *MetaTox* prevê metabólitos, que são formados por nove classes de reações (hidroxilação alifática e aromática, *N*- e *O*-glucuronidação, *N*-, *S*- e *C*-oxidação e *N*- e *O*-desalquilação). O cálculo da probabilidade para os metabólitos gerados é baseado em análises das relações “estrutura-biotransformação” e “estrutura modificada dos átomos” usando uma abordagem bayesiana. A previsão dos valores de dose-letal mediana ( $DL_{50}$ ) é realizada pelo software GUSAR para o composto original e cada um dos metabólitos gerados usando modelos quantitativos de relação estrutura-atividade (QSAR) criados para toxicidade aguda em ratos com o tipo de administração intravenosa (RUDIJK *et al.*, 2017).

*General Unrestricted Structure-Activity Relationships* (GUSAR) (ferramenta *online* e gratuita, <http://www.way2drug.com/>): foi desenvolvido para análise QSAR e para a construção de modelos QSAR com base em conjuntos de treinamento contendo informações sobre estrutura e características quantitativas de atividade (concentração inibitória mediana  $CI_{50}$ , concentração efetiva  $CE_{50}$ , dose letal mediana  $DL_{50}$ , entre outras) de substâncias

químicas. O programa GUSAR utiliza os descritores "Quantitative Neighborhoods of Atoms" (QNA) que descrevem a molécula como um conjunto de tuplas (estrutura de dados) compostas por valores reais  $\langle P, Q \rangle$ . Os valores P e Q são calculados para cada átomo em uma molécula em análise usando a matriz de conectividade e os valores padrão do potencial de ionização da molécula e as afinidades eletrônicas dos átomos na molécula (POROIKOV *et al.*, 2019).

A ferramenta GUSAR classifica as substâncias avaliadas de acordo com as categorias do Sistema Harmonizado Global (GHS) da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) levando em consideração valores contínuos de  $DL_{50}$ , usando os seguintes limites (em mg/kg):  $\leq 5$ , categoria 1;  $> 5$  e  $\leq 50$ , categoria 2;  $> 50$  e  $\leq 300$ , categoria 3;  $> 300$  e  $\leq 2000$ , categoria 4;  $> 2000$ , categoria 5 (LUNGHINI *et al.*, 2019).

*Pimephales promelas*. Determina a concentração na água que mata metade de uma população de peixinhos gordos (*Pimephales promelas*) em 4 dias (96 h). Para o desenvolvimento do algoritmo foram utilizados 823, sendo 659 para treinamento e 164 para validação. Os dados experimentais são representados por  $-\text{Log}_{10}(\text{CL}_{50} [\text{mol/L}])$  e variaram de 37 a 9261 no conjunto de compostos avaliados.

*Daphnia magna*. Determina a concentração na água que mata metade de uma população de *Daphnia magna* (uma pulga d'água) em 48 h. Para o desenvolvimento do algoritmo foram utilizados 353, sendo 283 para o treinamento e 70 para validação. A propriedade modelada é  $-\text{Log}_{10}(\text{CL}_{50} [\text{mol/L}])$  e variou de 117 a 10064 no conjunto de compostos avaliados.

*Tetrahymena pyriformis*. Determina a concentração inibitória de crescimento para 50% do organismo *T. pyriformis* (um protozoário ciliado) após 40 h. Para o desenvolvimento do algoritmo foram utilizados 1.792, sendo 1.434 para treinamento e 358 para validação. A propriedade modelada é  $-\text{Log}_{10}(\text{CIC}_{50} [\text{mol/L}])$  e variou de 334 a 6360 no conjunto de compostos avaliados.

*Fator de bioconcentração*. O fator de bioconcentração (BCF) é definido como a razão entre a concentração química na biota como resultado da absorção pela superfície respiratória e aquela na água em estado estacionário. Para o desenvolvimento do algoritmo foram utilizados 676 compostos, 541 para treinamento e 135 para validação. A propriedade modelada é  $\text{Log}_{10}(\text{BCF})$  e variou de -1700 a 5694 no conjunto de compostos avaliados (ZAKHAROV *et al.*, 2014).

*PoseView* integrada ao servidor *Proteins Plus* (ferramenta online e gratuita, <https://proteinsplus.zbh.uni-hamburg.de/#dogsites>), que cria automaticamente diagramas

bidimensionais de complexos proteínas-ligantes de acordo com as convenções de desenho químico. A geração de diagramas de estrutura e suas modificações de layout são baseadas na biblioteca 2Ddraw. As interações entre as moléculas são estimadas por um modelo de interação embutido que é baseado em tipos de átomos e critérios geométricos simples (FRICKER; GASTREICH; RAREY, 2004; STIERAND; MAAß; RAREY, 2006; TACHOUA *et al.*, 2020).

#### 4.5 Avaliação de atividades biológicas

##### 4.5.1 Avaliação de atividade inibidora de urease

A determinação da atividade inibidora da urease seguiu a metodologia de Weatherburn (1967). Para avaliar *in vitro* a inibição de urease, foi necessário o preparo do extrato de urease e das soluções A, B, ACI, AMCI,  $Zn(Cl)_2$  e  $Zn(MCl)_2$ .

*Preparação do extrato de urease:* Inicialmente, 10 gramas de soja (adquirida em mercado local em Campo Mourão, Paraná) foram trituradas em um liquidificador com 100 mL de água destilada por 5 minutos. Após a trituração, o extrato foi filtrado em papel filtro e diluído em um fator de 500, sendo esse o extrato final obtido para as análises.

*Preparação das soluções A e B:* Para a solução A, foram dissolvidos 2,5 gramas de fenol e 12,5 mg de nitroprussiato de sódio em 250 mL de água destilada. A solução B foi preparada dissolvendo 1,25 gramas de hidróxido de sódio e 1,05 mL de hipoclorito de sódio (10%) em 250 mL de água destilada.

Para o teste *in vitro* de determinação da atividade inibidora da urease, foram colocados em tubos de ensaio 200  $\mu$ L de extrato de urease e 200  $\mu$ L das soluções acetônicas de ACI, AMCI,  $Zn(Cl)_2$  e  $Zn(MCl)_2$ , cada uma nas concentrações  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  e  $10^{-7}$  mol/L, mantidos em banho-maria à 37 °C por 20 minutos. Em seguida, foram adicionados 200  $\mu$ L de ureia (6 g/L), mantendo os tubos de ensaio por mais 20 minutos em banho-maria. Após o tempo indicado, foram adicionados 1000  $\mu$ L do reagente A e 1000  $\mu$ L do reagente B, sendo mantidos novamente por 20 minutos em banho-maria. Para o controle, foram adicionados 200  $\mu$ L de acetona no lugar das soluções de ACI, AMCI,  $Zn(Cl)_2$  e  $Zn(MCl)_2$ , repetindo todos os procedimentos descritos anteriormente. O padrão de inibição utilizado foi a tiouréia, nas concentrações  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  e  $10^{-7}$  mol/L. Ao término dos procedimentos, foi realizado leituras em um espectrofotômetro UV-Vis (PG Instruments, modelo T70+) no comprimento de onda de

630 nm. Os valores de absorção foram convertidos em percentual de inibição de urease, utilizando a Equação 1:

$$I(\%) = 100 - \left[ \frac{(A_{amostra})}{(A_{controle})} * 100 \right] \quad (1)$$

Sendo:

$A_{amostra}$ : Valor da absorção apresentado no teste com os compostos ACI, AMCI,  $Zn(Cl)_2$  e  $Zn(MCl)_2$ .

$A_{controle}$ : Valor da absorção apresentado no teste com o controle.

#### 4.4.2 Avaliação de citotoxicidade e genotoxicidade em *Allium cepa*

Para obter considerações estatísticas com valores de efeito-concentração, foi empregada a metodologia de Fiskesjö (1985), que utiliza séries de cebolas para cada concentração de substância testada. Cerca de 580 sementes de cebola ou 2,0 g (290 sementes/g), variedade padrão 071 - Baia Periforme, livres de agrotóxicos e transgênicos, foram adquiridas em casa de agropecuária em Campo Mourão, todas do mesmo lote 135132-003, com germinação de 98%, pureza de 99,8%, safra 17/18 e validade estipulada para julho de 2022. Os bulbos, devido à decomposição do material orgânico, foram incorporados conforme necessidade, preferencialmente de hortas orgânicas em cultivos também livres de agroquímicos.

Para analisar a citotoxicidade e a genotoxicidade dos ácidos cinâmicos e cinamatos de zinco, soluções acetônicas de diferentes concentrações ( $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  e  $10^{-7}$  mol/L) foram preparadas para cada uma dessas substâncias. Como controle positivo foi usado metilmetanossulfonato (MMS), uma substância sabidamente citotóxica e genotóxica para a *Allium cepa*, na concentração de  $4 \cdot 10^{-4}$  mol/L, e acetona, para observar possíveis impactos do solvente sobre o organismo-teste.

Os bulbos de cebola foram mantidos submersos em água por 30 minutos e lavados com água corrente para remoção de quaisquer impurezas retidas em sua superfície. Em seguida, passaram pela remoção dos catáfilos secos, retirada das raízes envelhecidas e desobstrução dos poros para o novo desenvolvimento radicular. Os bulbos foram distribuídos em copos descartáveis preenchidos com água destilada, de forma que os poros estivessem em contato com o líquido, que era trocado diariamente. Quando as raízes estavam em bom tamanho e quantidade, foi realizada a primeira coleta (0 h), de duas raízes por bulbo. A água

foi removida e substituída pela solução a ser testada, também em quintuplicata, incluindo os grupos controle. Outras duas coletas foram realizadas no período de 24 e 48 h.

O preparo das lâminas seguiu a metodologia de Guerra e Souza (2002): após a retirada das raízes, as mesmas foram submersas em solução fixadora Carnoy 3:1 (álcool etílico:ácido acético), onde permaneceram de um dia para o outro. Passado esse período, as raízes foram lavadas três vezes em água destilada, submersas em ácido clorídrico por 15 minutos e lavadas novamente. Essa etapa consiste na limpeza das células que podem atrapalhar a visualização no microscópio, como parede celular e organelas, mantendo somente os cromossomos.

As raízes foram depositadas nas lâminas para extrair a região meristemática de interesse, coradas com orceína acética 2% e maceradas com bisturi, de forma a serem reduzidas em partes ainda menores. Os macerados foram distribuídos pelo vidro e receberam lamínula e esmalte, com o objetivo de impedir a desidratação e torná-las legíveis por mais tempo. Por fim, foram guardadas em uma caixa fechada para conservação.

As lâminas foram lidas em microscópio óptico ajustado na objetiva de aumento de 40x, movimentando o charriot de modo que a platina, base sobre a qual estavam inseridas, percorresse linhas contínuas de uma extremidade à outra. Foram contabilizadas 1.000 células por lâmina, seguido da identificação de acordo com a etapa do ciclo celular correspondente, com auxílio de contadores mecânicos.

Quanto aos cálculos, a citotoxicidade foi obtida pelo índice mitótico (IM), que considera o quociente entre o total de células em divisão (fase M) pelo total de células observadas. A genotoxicidade e a apoptose foram analisadas pelo índice de alterações cromossômicas (IAC), que relaciona o total de células alteradas pelo total de células observadas, ambos expressos em porcentagem e preconizados por Fiskesjö (1983).

## **4.6 Estudo de liberação controlada das substâncias bioativas**

### **4.6.1 Encapsulação das substâncias bioativas em micropartículas de quitosana**

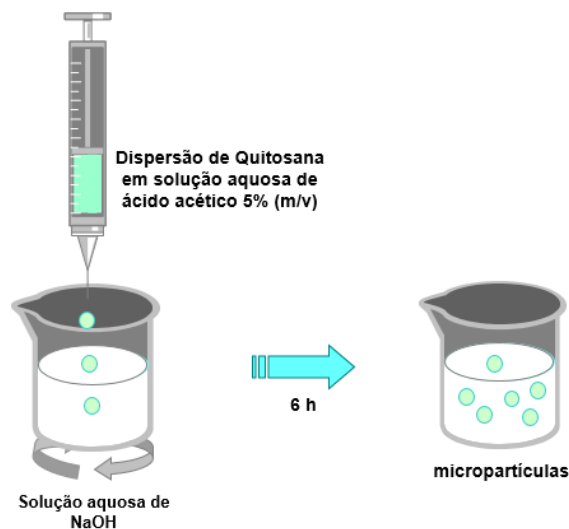
As micropartículas foram produzidas de acordo com a metodologia de Primo (2015), utilizando o método de coagulação em meio alcalino. Cerca de 2 g de quitosana foram dissolvidas em 100 mL de solução de ácido acético 3% (v/v). A mistura foi mantida sob agitação constante durante 12 horas à temperatura ambiente. Após esse período, a dispersão obtida, foi gotejada manualmente com o auxílio de uma seringa em uma solução de hidróxido



de sódio (1,0 mol/L), formando as esferas instantaneamente. As microesferas permaneceram em agitação por 6 horas na solução de hidróxido de sódio 1,0 mol/L e, posteriormente, foram lavadas com água destilada até atingirem pH neutro. A Figura 9 apresenta um esquema para obtenção das micropartículas.

Os ácidos cinâmicos e 4-metoxicinâmico e seus zincatos correspondentes foram encapsulados nas micropartículas de quitosana pelo método descrito anteriormente. Cerca de 2 g de quitosana foram dissolvidas em 100 mL de solução de ácido acético 3% (v/v). A mistura foi mantida sob agitação constante durante 12 horas à temperatura ambiente. Após esse período, 50 mg das substâncias avaliadas foram adicionada a dispersão de quitosana. A mistura foi mantida sob agitação constante por 6 horas à temperatura ambiente. Após esse período, a mistura quitosana/substância avaliada foi gotejada manualmente, com o auxílio de uma seringa, em uma solução de hidróxido de sódio (1,0 mol/L), formando as esferas instantaneamente. As microesferas permaneceram em agitação por 6 horas na solução de hidróxido de sódio 1,0 mol/L e, posteriormente, foram lavadas com água destilada até atingirem pH neutro.

**Figura 9 - Esquema para obtenção das micropartículas**



**Fonte: Autoria própria (2022)**

#### 4.6.2 Estudos de liberação controlada das substâncias bioativas

A liberação das substâncias avaliadas foi feita de acordo com a metodologia descrito por Primo (2015), pela imersão das partículas obtidas em fluido de simulação gástrico. O fluido de simulação gástrica foi preparado de acordo com a Farmacopeia Brasileira (2010). Uma solução tampão ácida foi preparada utilizando 2,0 g de cloreto de sódio em 100 mL de

água. Foram adicionados 7,0 mL de ácido clorídrico e feita uma diluição para 1000 mL. Posteriormente, o pH foi ajustado para 1,2. Para verificar se houve a incorporação dessas substâncias, bem como o tempo e a forma (rápida/lenta) de liberação, as soluções foram mantidas em banho-maria, sob agitação constante e com temperatura controlada de 37 °C. Aliquotas de 3 mL foram recolhidas, em intervalos de tempo variando de 5 min até 24 horas e, em seguida, leituras de absorção foram realizadas em Espectrofotômetro UV-Vis da marca Red Tide USB650UV Ocean Optics. O perfil das substâncias bioativas liberadas foi determinado a partir de um gráfico, correlacionando absorbância em função do tempo.

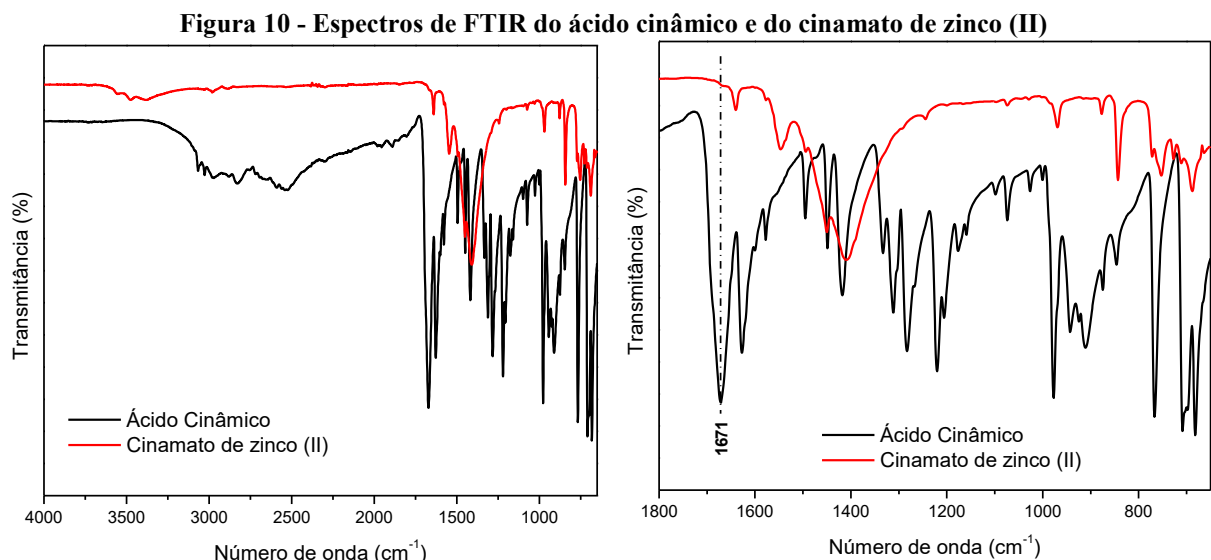
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Caracterização dos materiais

Algumas evidências da obtenção dos complexos desejados são: (i) precipitação de sólido branco no meio reacional, enquanto os reagentes são solúveis; (ii) mudança de solubilidade em relação aos ácidos cinâmico e 4-metoxicinâmico.

#### *Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)*

Os espectros de FTIR do ácido cinâmico, 4-ácido metoxicinâmico, cinamato de zinco (II) e 4-metoxicinamato de zinco (II) foram obtidos por detector de Reflectância Total Atenuada (ATR). As atribuições das principais bandas (Figura 10) para o ácido cinâmico são apresentadas na Tabela 1, e comparadas com os dados descritos para o ácido cinâmico na literatura (NOLASCO; AMADO; RIBEIRO-CLARO, 2008; (SANTOS, 2019; HANAI *et al.*, 2001).



**Fonte: A autoria própria (2022)**

A maioria dos modos vibracionais podem ser afetadas pela ligação de hidrogênio O–H ··· O, podendo ser deslocadas em até 50 cm<sup>-1</sup>. No entanto, a deformação fora do plano O–H,  $\gamma$ O–H, experimenta um efeito maior de dimerização, que está de acordo com trabalhos na literatura (NOLASCO; AMADO; RIBEIRO-CLARO, 2008; NANDI; HAZRA; CHAKRABORTYA, 2005). A banda  $\gamma$ O–H do monômero é prevista em 567 cm<sup>-1</sup>, mas pode deslocar para 353 cm<sup>-1</sup>. Nolasco, Amado e Ribeiro-Claro (2008) relatam que observaram essa

banda em  $944\text{ cm}^{-1}$ . Para o espectro de FTIR do ácido cinâmico, essa deformação fora do plano O–H também é observada em  $943\text{ cm}^{-1}$ .

A banda forte em  $999\text{ cm}^{-1}$  é atribuída a deformação CCC do anel benzênico monossustituído,  $\alpha\text{CCC}$ . As deformações no plano de ligações C–H aromáticas,  $\beta\text{C–H}_{ar}$ , são atribuídas em  $1176$  e  $1159\text{ cm}^{-1}$ . O estiramento  $\text{C}_1\text{–C}_7$  é observado como um par de bandas em  $1205$  e  $1220\text{ cm}^{-1}$ . Uma vez que não são esperados outros modos nesta região, assume-se que esses múltiplos componentes podem resultar de interações de ressonância de Fermi (NOLASCO; AMADO; RIBEIRO-CLARO, 2008).

**Tabela 1 - Atribuições das principais bandas de IR para o ácido cinâmico e comparação com dados da literatura**

Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ )		Modo vibracional** (grupo funcional)
Dados experimentais	Dados da literatura*	
3068	3067	$\nu(\text{C–H})_{ar}$
3028	3026	$\nu(=\text{C–H})$
2980	2978	$\nu(\text{O–H})$
1671	1684	$\nu_{as}(\text{C=O})$
1627	1631	$\nu(\text{C=C})$
1577	1577	$\nu(\text{C–C})_{ar}$
1494	1495	$\nu(\text{C–C})_{ar}$
1448	1448	$\nu(\text{C–C})_{ar}$
1419	1422	$\beta(\text{O–H})$
1333	1333	$\beta(\text{C–H})_{ar}$
1311	1312	$\beta(=\text{C–H})$
1285	1286	$\nu(\text{C}_9\text{–OH})$
1266	1267	$\beta(=\text{C–H})$
1205 e 1220	1206 e 1223	$\nu(\text{C}_1\text{–C}_7)$
1176	1176	$\beta(\text{C–H})_{ar}$
1159	1160	$\beta(\text{C–H})_{ar}$
1076	1074	$\beta(\text{C–H})_{ar}$
1026	1027	$\beta(\text{C–H})_{ar}$
999	1000	$\alpha(\text{CCC})$
976	980	$\gamma(=\text{C–H})$
969	969	$\gamma(\text{C–H})_{ar}$
943	944	$\gamma(\text{O–H})$
924	926	$\nu(\text{C}_8\text{–C}_9)$
911	916	$\gamma(\text{C–H})_{ar}$
875	876	$\gamma(\text{C–H})_{ar}$
846	848	$\gamma(=\text{C–H})$
-	814	$\gamma(\text{C–H})_{ar} + \nu(\text{C–C})_{ar}$
767	769	$\gamma(\text{C–H})_{ar}$
709	711	$\delta(\text{CC})$
681	683	COOH tesoura

\*NOLASCO; AMADO; RIBEIRO-CLARO (2008); KALINOWSKA; ŚWISŁOCKA; LEWANDOWSKI (2011). \*\* $\nu$  = estiramento;  $\beta$  = deformação no plano;  $\gamma$  = deformação fora do plano;  $\alpha$  = deformação no plano do anel;  $\delta$  = deformação fora plano do anel;  $s$  = simétrico,  $as$  = assimétrico e  $ar$  = aromático.

Fonte: Autoria própria (2022)

A presença da ligação de hidrogênio afetou significativamente o estiramento C<sub>9</sub>-OH e a deformação no plano O-H. Com base nessa informação, é possível atribuir as bandas em 1285 e 1419 cm<sup>-1</sup> que eram esperadas em 1296 e 1422 cm<sup>-1</sup>, respectivamente.

Em relação à região de 1550-800 cm<sup>-1</sup>, quatro modos são esperado: dois modos para anel benzênico, νC-C, um modo para νC<sub>7</sub>=C<sub>8</sub> e outro modo para νC<sub>9</sub>=O. Os modos para anel benzênico, ν(C-C)<sub>ar</sub>, são observados em 1577 cm<sup>-1</sup>.

No espectro de IR, observa-se uma banda de intensidade média, característico ao estiramento C=C, νC=C, em 1627 cm<sup>-1</sup>. A banda forte em 1671 cm<sup>-1</sup> é atribuída as vibrações de estiramento assimétrico da carbonila, ν<sub>as</sub>(C=O), no ATR essa banda possui uma menor frequência.

Na região de 2500-2700 cm<sup>-1</sup>, as bandas mais fracas observadas em 2531 cm<sup>-1</sup> são atribuídas as sobreposições (*overtones*) e combinações das bandas perto de 1419 e 1285 cm<sup>-1</sup>, aumentadas pela ressonância de Fermi com a banda νC<sub>9</sub>-OH. As bandas em 2980 cm<sup>-1</sup> e 3028 foram atribuídas ao estiramento O-H e C-H vinílico, respectivamente.

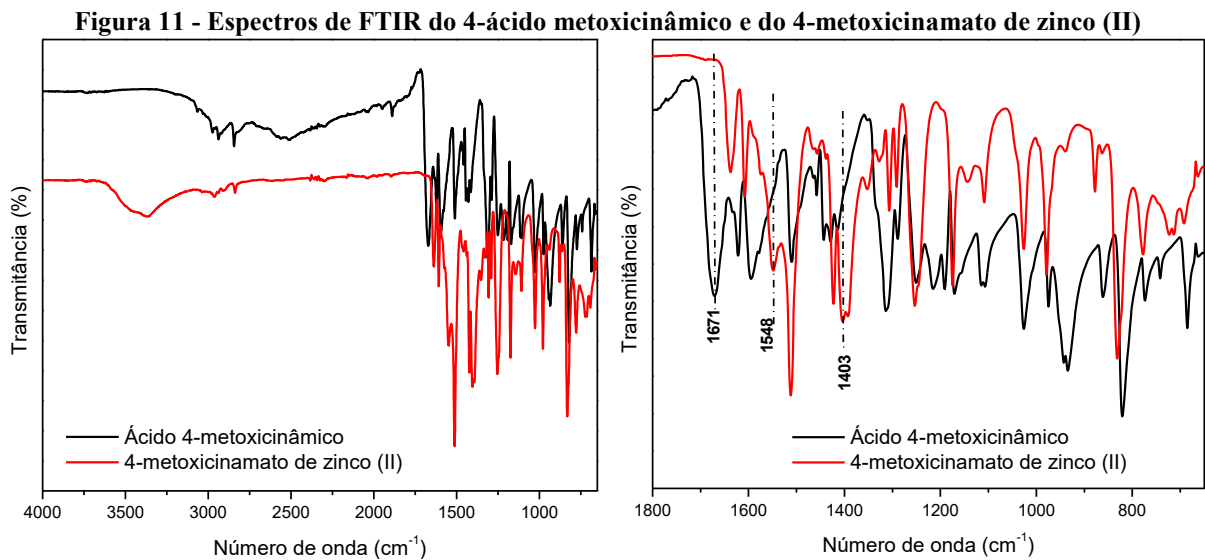
De maneira geral, os dados de FTIR obtidos neste trabalho, para o ácido cinâmico, quando comparados com os apresentados por Nolasco, Amado, Ribeiro-Claro (2008) são semelhantes, indicando que o mesmo está de acordo com os dados da literatura.

Esse tipo de comparação descrito anteriormente foi realizada para o ácido 4-metoxicinâmico, a Figura 11 apresenta o espectro de IR e a Tabela 2 apresenta as atribuições das principais bandas de infravermelho do ácido 4-metoxicinâmico. O espectro de IR mostra uma forte banda de absorção em 1671 cm<sup>-1</sup> atribuída ao grupo C=O. As bandas atribuídas às vibrações assimétricas do grupo CH<sub>3</sub> foram identificadas em 2971-2935 cm<sup>-1</sup>, enquanto as simétricas se encontram em 2845-2820 cm<sup>-1</sup>.

As bandas de estiramento vibracional C-C aparecem em 1622, 1594, 1510, 1444 e 1026 cm<sup>-1</sup>. A banda de estiramento vibracional C-H se encontra em 1286 cm<sup>-1</sup> e as bandas referente a deformação no plano C-H, ligação -C-O-C- e vibrações de -C=C- em 1190 cm<sup>-1</sup>, 1170 cm<sup>-1</sup> e 1428 cm<sup>-1</sup>, respectivamente. A banda de vibração da cadeia carbônica ocorre em 685 cm<sup>-1</sup>. Esses dados estão de acordo com os valores reportados na literatura (FERENC *et al.*, 2012).

A ausência da ligação de hidrogênio, consequência da substituição do hidrogênio do grupo carboxílico por um íon metálico resulta em mudanças características nos espectros de IR dos cinamatos metálicos em comparação com os espectros dos ácidos cinâmicos. Além disso, o estiramento vibracional OH e deformação no plano OH, as bandas atribuídas aos estiramentos simétricos e assimétrico característicos de ácidos carboxílicos C=O, bem como

as deformações fora do plano C=O do grupo carbonila, presentes nos espectros de IR dos ácidos cinâmicos, não são observadas para os zincatos correspondentes. Em contrapartida, novas bandas são observadas atribuídas as vibrações simétricas e assimétricas do ânion carboxilato COO<sup>-</sup>, assim como, deformações fora do plano simétricas e assimétricas do COO<sup>-</sup>, e o desaparecimento ou mudanças nas posições e intensidades de algumas bandas aromáticas também podem ser observadas (KALINOWSKA; ŚWISŁOCKA; LEWANDOWSKI; 2011).



Fonte: Autoria própria (2022)

**Tabela 2 - Atribuições das principais bandas de IR para o ácido 4-metoxicinâmico e comparação com dados da literatura**

Número de onda (cm <sup>-1</sup> )		Modo vibracional** (grupo funcional)
Dados experimentais	Dados da literatura*	
2971	2972	$\nu_{as}CH_3$
2935	2936	
2845	2844	$\nu_sCH_3$
2820	2820	
1671	1688	$\nu COOH$
1622, 1594, 1510, 1444 e 1026	1624, 1596, 1512, 1444 e 1028	$\nu(C-C)$
1428	1428	$-C=C-$
1414	1416	$\beta(O-H)$
1313	1316	$\beta(=C-H)$
1286	1288	$\nu(C-H)$
1190	1192	$\beta(C-H)$
1170	1172	$-C-O-C-$
975	976	$\gamma(=C-H)$
942	945	$\gamma(O-H)$
935	937	$\nu(C_8-C_9)$
821	828	$\gamma(C-H)_{ar} + \nu(C-C)_{ar}$
773	775	$\gamma(C-H)_{ar}$
685	688	$\gamma(CCH)_{ar}$

\*FERENC *et al.* (2012); SDBS (2022). \*\* $\nu$  = estiramento;  $\beta$  = deformação no plano;  $\gamma$  = deformação fora do plano;  $s$  = simétrico e  $as$  = assimétrico.

Fonte: Autoria própria (2022)

Na Figura 10 é apresentado o espectro de FTIR do cinamato de zinco (II), os resultados obtidos das atribuições das principais bandas foram comparados com dados descritos na literatura e podem ser observados na Tabela 3.

Ao comparar os espectros do ácido cinâmico com o respectivo complexo, observa-se no espectro do cinamato de zinco (II) a ausência da banda em  $1671\text{ cm}^{-1}$ , confirmando que nenhum grupo COOH está presente no zincato e o deslocamento da banda referente ao estiramento C=C ( $\alpha,\beta$ -COOH) para  $1641\text{ cm}^{-1}$ . A banda de absorção na região  $3680\text{-}3115\text{ cm}^{-1}$  indica a presença de moléculas de água. As deformações fora do plano do anel,  $\delta(\text{CCH})$ , são atribuídas em  $1243\text{ cm}^{-1}$ ,  $1199\text{ cm}^{-1}$ ,  $1073\text{ cm}^{-1}$  e  $1028\text{ cm}^{-1}$  e  $1450\text{ cm}^{-1}$ . A deformação fora do plano,  $\gamma(\text{CCH})$ , é atribuída em  $970\text{ cm}^{-1}$ . Por fim, as deformações fora do plano do anel,  $\gamma(\text{CCH})_{ar}$ , são atribuídas em  $771$  e  $687\text{ cm}^{-1}$ .

**Tabela 3 - Atribuições das principais bandas de IR para o cinamato de zinco (II) e comparação com dados da literatura**

Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ )		Modo vibracional** (grupo funcional)
Dados experimentais	Dados da literatura*	
3475	3418	$\nu(\text{O-H})$
3026	3030	$\nu(\text{C-H})_{ar} + \nu(\text{C-H})_{cin}$
2982	3059	$\nu(\text{C-H})_{ar}$
2884	3028	
1641	1641	$\nu(\text{C=C})_{cin}$
1578	1578	$\nu(\text{C=C})_{ar}$
1534	1531	$\nu_{as}(\text{COO}^-)$
1493	1495	$\nu(\text{C=C})_{ar}$
1450	1451	$\delta(\text{CCH})$
1410	1411	$\nu_s(\text{COO}^-)$
1243, 1199, 1073, 1028	1203, 1182, 1073, 1030	$\beta(\text{C-H})_{ar}$
970	978	$\gamma(\text{CCH})_{cin}$
876	876	$\gamma(\text{CCH})_{ar}$
842	857	$\beta_s(\text{COO}^-)$
771	773	$\gamma(\text{CCH})_{ar}$
711	712	$\gamma_s(\text{COO}^-)$
687	685	$\gamma(\text{CCH})_{ar}$
663	592	$\gamma(\text{COO}^-)$
-	566	$\beta_{as}(\text{COO}^-)$

\*ZELEŇÁK; VARGOVÁ; GYÖRYOVÁ (2007); KALINOWSKA; ŚWISŁOCKA; LEWANDOWSKI (2011). \*\* $\nu$  = estiramento;  $\beta$  = deformação no plano;  $\gamma$  = deformação fora do plano;  $\alpha$  = deformação no plano do anel;  $\delta$  = deformação fora plano do anel;  $s$  = simétrico,  $as$  = assimétrico,  $ar$  = aromático e  $cin$  = cinamato.

Fonte: Autoria própria (2022)

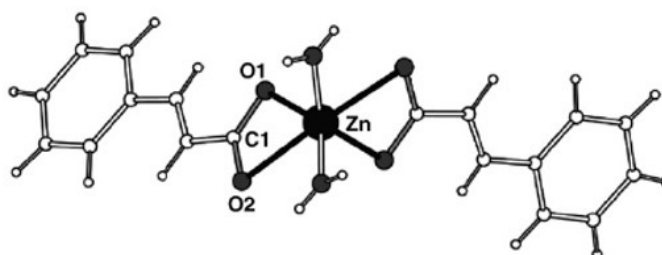
Para o estudo de complexos de metais de transição com ligantes carboxilatos, a espectroscopia na região do infravermelho é uma ferramenta poderosa na identificação dos modos vibracionais de estiramento simétricos e assimétricos, além das vibrações características dos grupos orgânicos. Os íons carboxilatos podem se coordenar a um íon

metálico de modo monodentado ou bidentado. Neste último caso o ligante pode atuar como quelato ou como ponte entre unidades dimetálicas. De modo geral, a estrutura do complexo vai depender das propriedades eletrônicas e estéricas do ligante carboxilato. O modo de coordenação do carboxilato ao metal pode ser identificado pelos valores das diferenças entre as frequências dos modos vibracionais dos estiramentos assimétrico,  $\nu_{as}(\text{COO}^-)$ , e simétrico,  $\nu_s(\text{COO}^-)$ , dos grupos  $(-\text{COO}^-)$  dos ligantes:  $\Delta\nu(\text{COO}^-) = [\nu_{as}(\text{COO}^-) - \nu_s(\text{COO}^-)]$ . Estudos de complexos de Zn(II) com estruturas cristalinas conhecidas mostram que as estruturas em gaiola apresentam valores de  $\Delta\nu(\text{COO}^-)$  na faixa de 170 a 220  $\text{cm}^{-1}$ , enquanto que, complexos do tipo quelato apresentam valores de  $\Delta\nu(\text{COO}^-) < 130 \text{ cm}^{-1}$  (KALINOWSKA; ŚWISŁOCKA; LEWANDOWSKI, 2011; ZHOU *et al.*, 2000).

No presente trabalho, os modos vibracionais de estiramentos simétrico,  $\nu_s(\text{COO}^-)$ , é atribuído em 1410  $\text{cm}^{-1}$  e de estiramentos assimétrico,  $\nu_{as}(\text{COO}^-)$ , é atribuído em 1534  $\text{cm}^{-1}$ , logo o  $\Delta\nu(\text{COO}^-) = 124 \text{ cm}^{-1}$ . De acordo com esse parâmetro, concluímos que o íon cinamato está coordenado ao íon zinco de modo bidentado.

A estrutura cristalina do cinamato de zinco (II) bidentado,  $[\text{Zn}(\text{C}_9\text{H}_7\text{O}_2)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}]$ , foi reportado na literatura e estão apresentadas nas Figuras 12 e 13 (ZELEŇÁK; VARGOVÁ; GYÖRÝOVÁ, 2007; KALINOWSKA; ŚWISŁOCKA; LEWANDOWSKI, 2011; HOSOMI; OHBA; ITO, 2000).

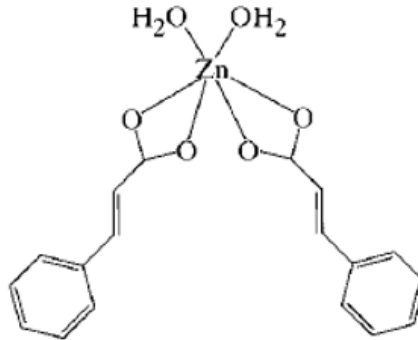
Figura 12 - Representação estrutural do *cis*-diaquobis(*trans*-cinamato-*O,O'*) de zinco (II)



Fonte: Zelenák, Vargová e Györyová (2007, p. 263)



**Figura 13 - Representação estrutural do *cis*-diaquobis(*trans*-cinamato-*O,O'*) de zinco (II)**



**Fonte: Hosomi, Ohba e Ito (2000, p. 123)**

O espectro de FTIR do 4-metoxicinamato de zinco (II) é apresentado na Figura 11, e o resultado obtido das atribuições das principais bandas pode ser observado na Tabela 4. Por se tratar de uma molécula inédita, suas bandas foram discutidas em comparação com os resultados de IR do cinamato de zinco (II) e dos complexos 4-metoxicinamato de Mn(II), Co(II), Ni(II), Cu(II), Cd(II), Nd(III) e Gd(III) (FERENC *et al.*, 2017), devido à inexistência de dados na literatura.

No espectro do 4-metoxicinamato de zinco (II), a inexistência da banda em  $1671\text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu(\text{C}=\text{O})$ , da carbonila indica ausência do ácido 4-metoxicinâmico, enquanto que o surgimento de duas novas bandas intensas, que podem ser atribuídas aos modos vibracionais de estiramento assimétrico em  $1548\text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu_{as}(\text{COO}^-)$ , e simétrico  $1422\text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu_s(\text{COO}^-)$ , do grupo  $-\text{COO}-$ , mostram que ocorreu a coordenação dos ligantes ao metal por meio dos grupos carboxilato. Além disso, a banda de absorção encontrada na região  $3600\text{-}3370\text{ cm}^{-1}$  indica a presença de moléculas de água.

**Tabela 4 - Atribuições das principais bandas de IR para o 4-metoxicinamato de zinco (II)**

Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Modo vibracional**
Dados experimentais	(grupo funcional)
3454, 3365	$\nu(\text{O-H})$
3035	$\nu(\text{C-H})_{ar} + \nu(\text{C-H})_{cin}$
2961	$as\text{CH}_3$
2834	$s\text{CH}_3$
1637	$\nu(\text{C=C})_{cin}$
1608	$\nu(\text{C-C})$
1572	$\nu(\text{C=C})_{ar}$
<b>1548</b>	<b><math>\nu_{as}(\text{COO}^-)</math></b>
1512	$\nu(\text{C-C})$
1465	$\nu(\text{C=C})_{ar}$
1457	$\delta(\text{CCH})$
1422	$-\text{C}=\text{C}-$
<b>1403</b>	<b><math>\nu_s(\text{COO}^-)</math></b>
1327	$\beta(\text{C-H})_{ar}$
1307	$\beta(=\text{C-H})$
1290	$\nu(\text{C-H}) + \rho(\text{CH}_3, \text{CH}_2)$
1252, 1026	$\beta(\text{C-H})_{ar}$
1174	$-\text{C}-\text{O}-\text{C}-$
977	$\gamma(\text{CCH})_{cin}$
877	$\gamma(\text{CCH})_{ar} + \rho(\text{CH}_3, \text{CH}_2)$
829	$\beta_s(\text{COO}^-)$
777	$\gamma(\text{CCH})_{ar}$
713	$\gamma_s(\text{COO}^-)$
691	$\gamma(\text{CCH})_{ar}$
663	Zn-O

\* $\nu$  = estiramento;  $\beta$  = deformação no plano;  $\gamma$  = deformação fora do plano;  $\alpha$  = deformação no plano do anel;  $\delta$  = deformação fora plano do anel;  $s$  = simétrico,  $as$  = assimétrico,  $ar$  = aromático e  $cin$  = cinamato.

Fonte: Autoria própria (2022)

As bandas em 2980-2932 e 2856-2836 cm<sup>-1</sup> são atribuídos as vibrações assimétricas e simétricas do grupo CH<sub>3</sub>. A banda atribuída à vibração assimétrica do grupo CH<sub>3</sub> foi identificada em 2965 cm<sup>-1</sup>, enquanto a simétrica se encontra em 2840 cm<sup>-1</sup>. A banda em 1422 cm<sup>-1</sup> resultam das vibrações  $-\text{C}=\text{C}-$  e aquelas em 1174 cm<sup>-1</sup> são atribuídos a vibrações  $-\text{C}-\text{O}-\text{C}-$ .

As bandas em 560-516 cm<sup>-1</sup> confirmam a ligação entre metal-oxigênio. De acordo com a literatura (FERENC *et al.*, 2017), este tipo de banda pode ser parcialmente acoplado com bandas C-OCH<sub>3</sub>, enquanto os modos vibracionais de estiramento M-O puro podem ocorrer também em frequências mais baixas. Os modos vibracionais de estiramento M-O dos complexos de Mn(II), Co(II), Ni(II) e Cu(II) podem ocorrer na faixa de 685-535 cm<sup>-1</sup>, dependendo da estrutura do complexo de coordenação e do tipo de ligante.

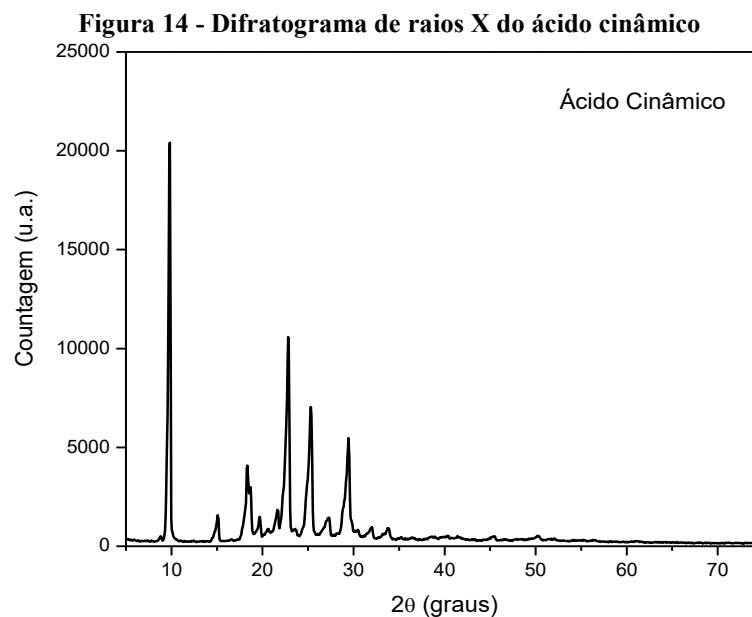
A partir dos dados espectroscópicos, determinou-se a diferença entre as frequências dos modos vibracionais dos estiramentos assimétrico,  $\nu_{as}(\text{COO}^-)$ , e simétrico,  $\nu_s(\text{COO}^-)$ , do 4-metoxicinamato, onde  $\Delta\nu(\text{COO}^-) = [\nu_{as}(\text{COO}^-) - \nu_s(\text{COO}^-)] = 1548 \text{ cm}^{-1} - 1403 \text{ cm}^{-1} = 145 \text{ cm}^{-1}$

<sup>1</sup>. Como a estrutura do complexo depende das propriedades eletrônicas e estéricas do ligante, concluímos que os íons 4-metoxicinamato, devido à disposição dos átomos coordenantes, se coordenam ao íon zinco de modo bidentado.

### *Difratometria de Raios X (DRX)*

Por meio da Difração de Raios X é possível identificar a cristalinidade de determinado composto, pois a partir da estrutura cristalina é possível obter a forma do padrão de difração gerado por ele. Entretanto, na cristalografia é realizado o inverso, obtendo a estrutura cristalina a partir do padrão de difração (FILHO; LOPES, 2013). Para determinação da cristalinidade, alguns fatores influenciam na intensidade relativa e absoluta do DRX, estando eles relacionados à amostra, estrutura e instrumento (FARIAS, 2011).

A Figura 14 apresenta o difratograma de raios X do ácido cinâmico em pó. A Tabela 5 apresenta os ângulos de difração obtidos dos difratograma de raios X das substâncias avaliadas. A partir da análise do difratograma, é possível observar um padrão de difração cristalino característico do ácido cinâmico, com picos de intensidades médias a fortes em  $2\theta$  de  $9,80^\circ$ ,  $15,09^\circ$ ,  $18,30^\circ$ ,  $19,68^\circ$ ,  $21,65^\circ$ ,  $22,82^\circ$ ,  $25,31^\circ$ ,  $27,28^\circ$ ,  $29,45^\circ$ ,  $32,01^\circ$  e  $33,77^\circ$ . Esses picos são concordantes com o padrão de DRX do ácido cinâmico disponível na literatura (SHAYANFAR; ASADPOUR-ZEYNALI; JOUYBAN, 2013; LI, 2016).



Fonte: Autoria própria (2022)

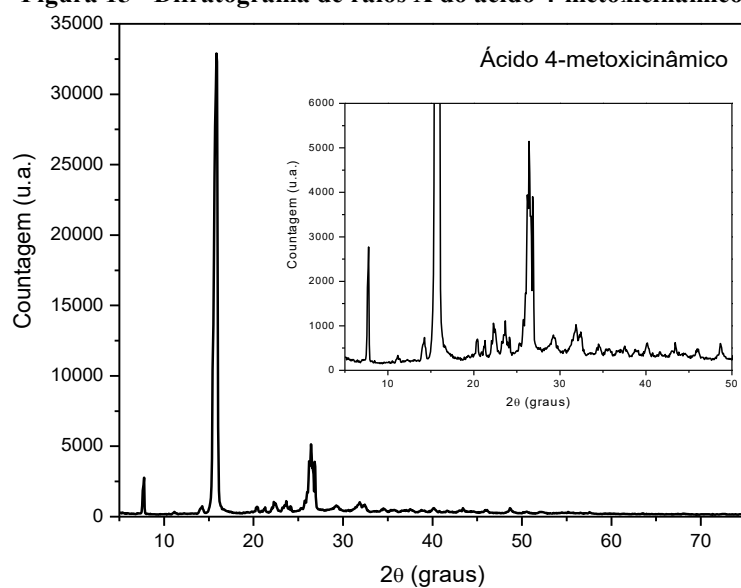
**Tabela 5 - Ângulos de difração obtidos dos difratograma de raios X das substâncias avaliadas**  
**2θ (graus)**

Ácido cinâmico	Ácido 4- metoxicinâmico	Cinamato de zinco (II)		4-Metoxicinamato de zinco (II)	
8,80	7,79	7,97	45,72	6,28	36,22
9,80	14,32	9,11	48,62	8,90	36,64
15,09	15,91	12,87	51,01	9,90	37,05
18,30	20,47	13,77	52,42	11,84	38,68
18,68	21,37	15,78	56,81	12,94	39,37
19,68	22,47	18,26	58,54	14,01	40,23
20,65	23,75	20,20	60,19	15,88	42,37
21,65	24,23	22,41	63,44	18,30	43,41
22,82	26,51	23,24	66,62	19,78	45,79
23,55	29,38	24,20	71,25	21,58	46,27
25,31	31,97	25,93		22,44	48,45
27,28	32,49	30,46		23,69	48,76
29,45	34,67	31,87		24,62	52,25
30,49	35,81	33,18		27,42	52,49
32,01	37,64	35,71		28,11	54,60
33,77	38,88	36,98		31,91	56,05
38,61	40,26	38,75		33,08	56,53
40,30	43,54	39,30		33,91	58,81
41,40	46,10	41,54		34,81	
45,48	48,79	43,65		35,19	

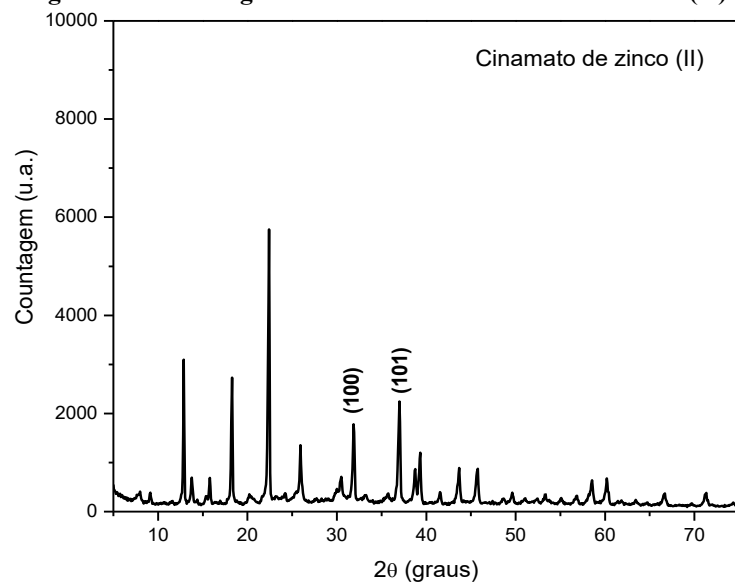
Fonte: Autoria própria (2022)

A Figura 15 apresenta o difratograma de raios X do ácido 4-metoxicinâmico. De modo geral, é possível observar um padrão de difração cristalino, com picos mais intensos em 2θ de 7,79°, 15,91° e 26,51°.

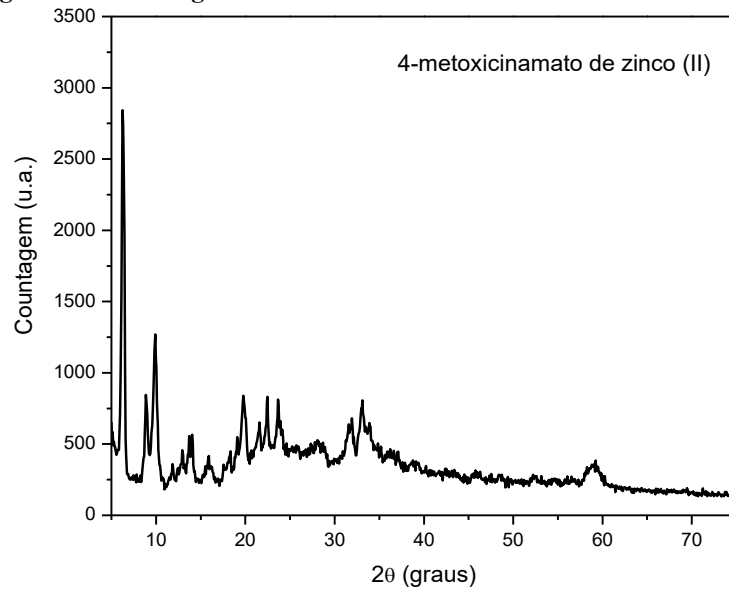
O padrão de difração de raios X do cinamato de zinco (II) (Figura 16) e do 4-metoxicinamato de zinco (II) (Figura 17) apresentam diferenças significativas nas intensidades relativas dos valores dos ângulos de difração e nos deslocamentos dos mesmos. Esses dados podem ser melhor visualizados na Tabela 5, onde os picos característicos dos ácidos cinâmicos não são detectáveis em suas posições, sugerindo que a substância analisada apresenta modificações estruturais. Além disso, é possível observar novos picos de difração, indicando a presença de novas fases cristalinas. Um estudo mais detalhado se faz necessário para determinar a estrutura cristalina dos complexos sintetizados no presente trabalho.

**Figura 15 - Difratoograma de raios X do ácido 4-metoxicinâmico**

Fonte: Autoria própria (2022)

**Figura 16 - Difratoograma de raios X do cinamato de zinco (II)**

Fonte: Autoria própria (2022)

**Figura 17 - Difratoograma de raios X do 4-metoxicinamato de zinco (II)**

Fonte: Autoria própria (2022)

### *Análise Termogravimétrica*

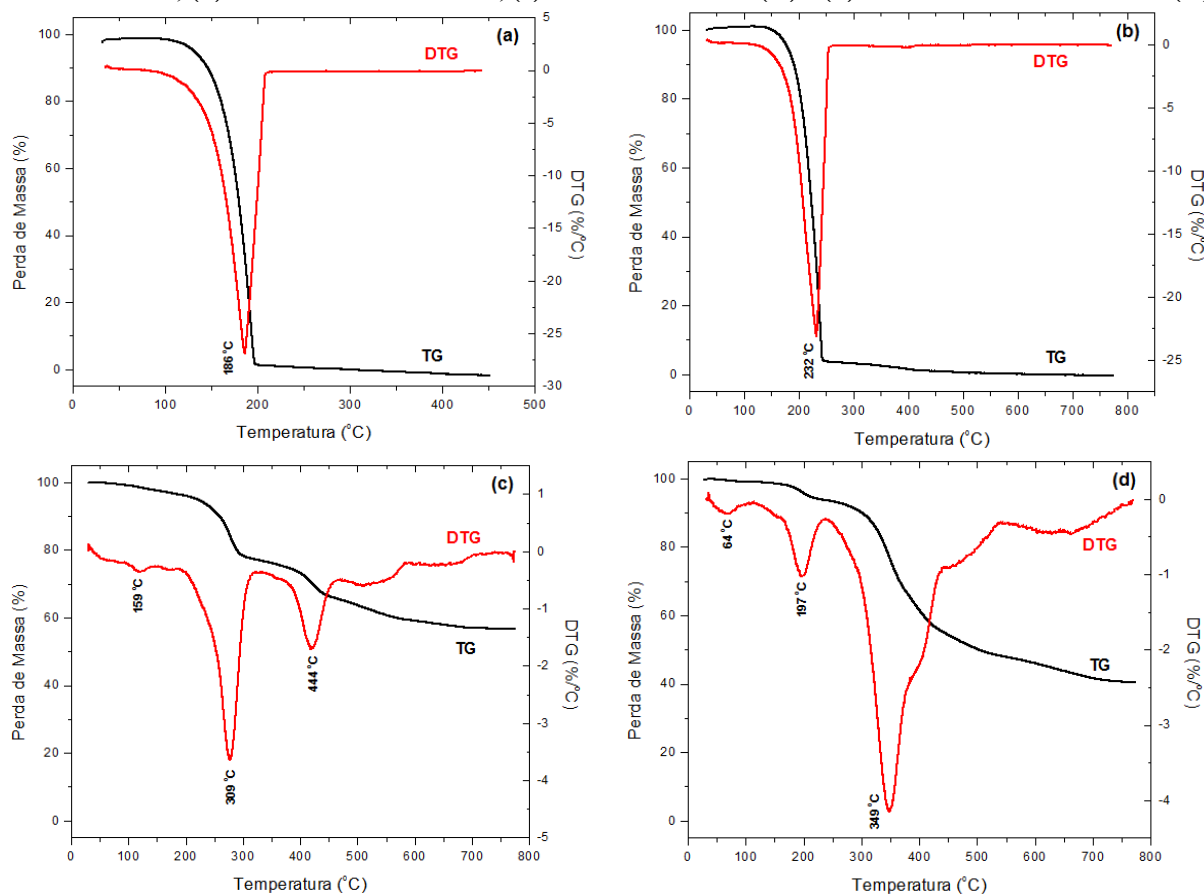
As curvas de perda de massa (TG) e da primeira derivada (DTG) das substâncias avaliadas são apresentadas na Figura 18. As temperaturas iniciais ( $T_i$ ) e finais ( $T_f$ ) de decomposição foram determinadas, assim como porcentagem final de resíduo e estão apresentadas na Tabela 6.

O ácido cinâmico, Figura 18(a), apresenta uma única etapa de decomposição, que inicia-se em 160,3 °C ( $T_i$ ) e termina em 210,7 °C ( $T_f$ ), com perda de 97,5% de massa em 400 °C. Esses resultados são condizentes com os encontrados na literatura, que mostram uma estabilidade térmica do ácido cinâmico até 200 °C, seguida da decomposição que ocorre após o processo de fusão do composto (KUMAR; PRUTHI, 2015). O ácido 4-metoxicinâmico, Figura 18(b), apresenta um perfil de perda de massa semelhante ao ácido cinâmico, com uma única etapa de decomposição, com  $T_i$  em 165,0 °C a  $T_f$  em 253,0 °C, com perda total de 94,5% de massa em 400 °C.

Já na curva de decomposição térmica do cinamato de zinco (II), Figura 18(c), é possível observar três principais estágios de perda de massa. A primeira ocorre entre 139 °C e 181 °C, com uma perda de 3,3% de massa, que pode ser atribuída à perda das moléculas de água não-coordenadas. A segunda etapa ocorre entre 234 e 340 °C, com uma perda de 20,2% de massa, que pode ser relacionada com a decomposição dos ligantes cinamatos. O terceiro

estágio de perda de massa ocorreu entre 405 °C até 478 °C, com uma perda de 11% de massa (KERAMATNIA; SHAYANFAR; JOUYBAN, 2015; STANTON; BAK, 2008).

**Figura 18 -** Curvas de perda de massa (TG) e da primeira derivada (DTG) das substâncias avaliadas: (a) ácido cinâmico; (b) 4-ácido metoxicinâmico, (c) cinamato de zinco (II) e (d) 4-metoxicinamato de zinco (II)



Fonte: Autoria própria (2022)

**Tabela 6 -** As temperaturas iniciais ( $T_i$ ) e finais ( $T_f$ ) de decomposição foram determinadas, assim como porcentagem de massa (%) para cada etapa e a porcentagem de resíduo das substâncias avaliadas

Substâncias avaliadas	Etapas	$T_i$ (°C)	$T_f$ (°C)	$T_{max}$ (°C)	Massa (%)	Resíduo (%)
Ácido cinâmico	(I)	160,3	210,7	185,7	97,5	0,3 (400 °C)
Ácido 4-metoxicinâmico	(I)	165,0	253,0	232,0	94,5	1,4 (400 °C)
Cinamato de zinco (II)	(I)	138,9	181,2	158,6	3,3	57,1 (700 °C)
	(II)	234,1	339,8	308,9	20,2	
	(III)	405,2	478,1	444,1	11,5	
4-Metoxicinamato de zinco (II)	(I)	35,18	98,8	63,6	0,9	58,6 (700 °C)
	(II)	164,2	229,2	196,9	5,4	
	(III)	239,5	543,0	349,0	45,3	

Fonte: Autoria própria (2022)

O 4-metoxicinamato de zinco (II), Figura 18(d), também apresenta três principais estágios de perda de massa. Nesse caso, as moléculas de água são removidos em duas etapas: a primeira ocorre entre 35 °C e 98 °C, com uma perda de 0,9% de massa e a segunda etapa

ocorre entre 164 e 229 °C, com uma perda de 5,4% de massa. O terceiro estágio de perda de massa ocorreu entre 239 °C até 543 °C, com uma perda de 45% de massa. Em seguida, o zinco elimina gradualmente os ligantes orgânicos formando óxido de zinco a 600 °C. Esses resultados são semelhantes aos observados por Ferenc *et al.* (2017), para os complexos do 4-metoxicinamato de Mn (II), Co (II), Ni (II), Cu (II), Cd (II), Nd (III) e Gd (III). Além disso, os zincatos mostram perfil de decomposição mais estável em relação aos seus ácidos correspondente, com perda de 55% de massa em 700 °C.

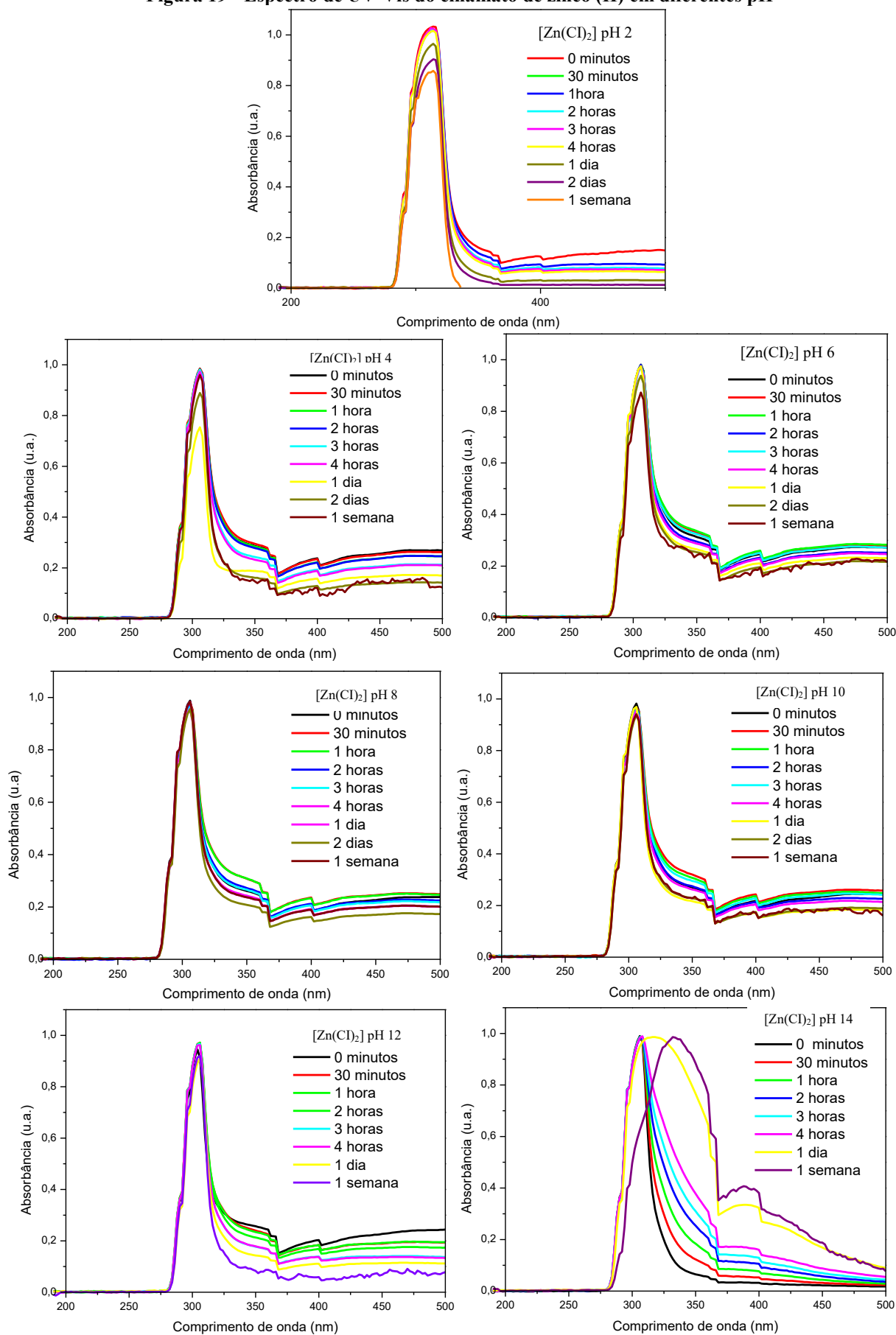
#### *Estudo da estabilidade em diferentes pHs*

A estabilidade do cinamato de zinco (II), em solução aquosa com diferentes condições de pH, foi avaliada por meio do monitoramento, durante uma semana, do espectro de absorção na região do UV-Vis (200-500 nm). Nesse tipo de estudo, deslocamento da banda de absorção característica do composto significa perda da estabilidade. A partir da análise dos espectros apresentados na Figura 19 é possível observar que o composto apresentou absorbância máxima em 310 nm e estabilidade no intervalo de pH 2 - 12. Na condição de pH 14, a estabilidade do composto é observada até 4 horas de contato com a solução.

De forma semelhante, a estabilidade do 4-metoxicinamato de zinco (II) foi avaliada. A partir da análise dos espectros apresentados na Figura 20 é possível observar que o composto é estável nas condições de análise.

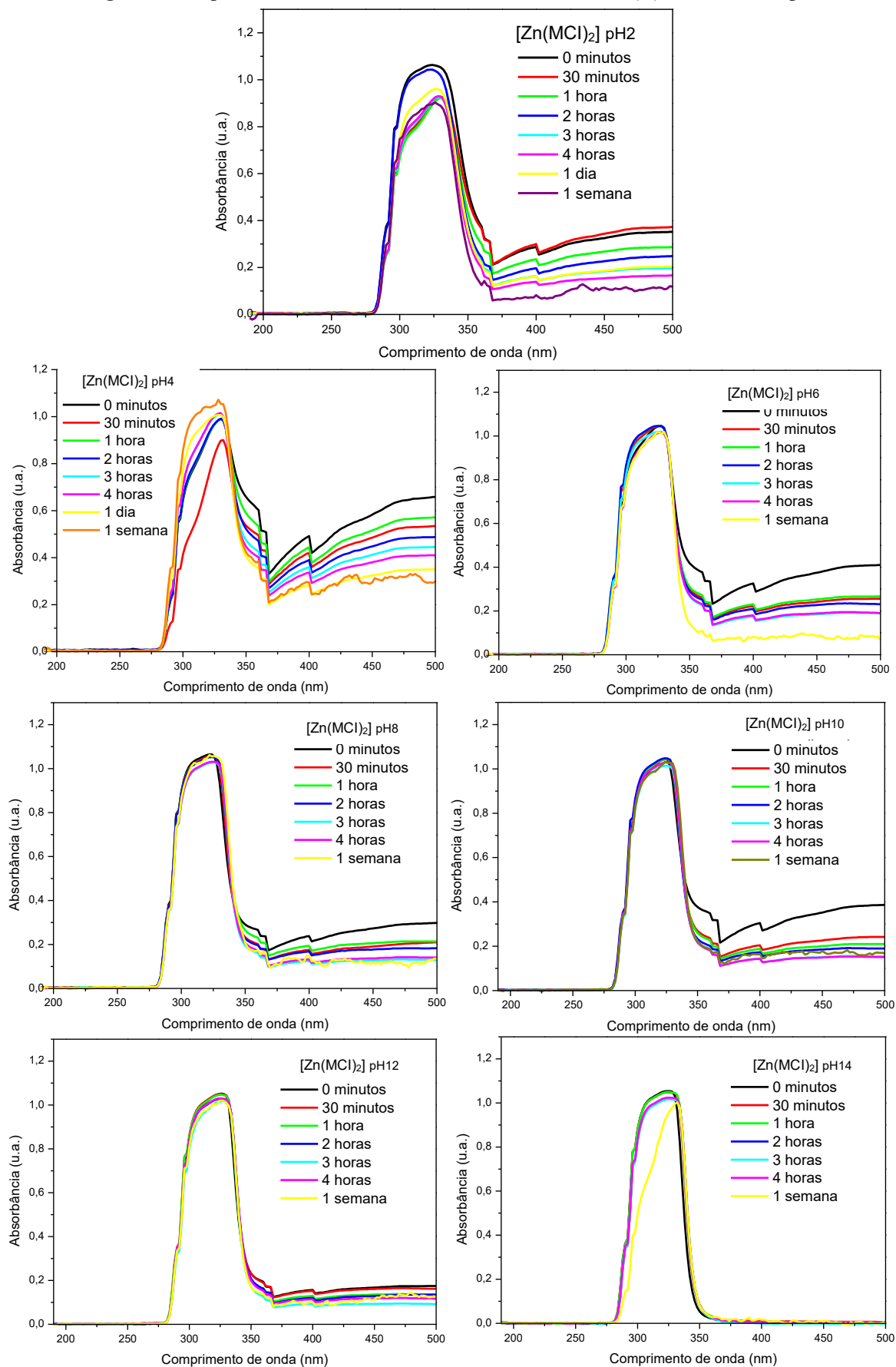


**Figura 19 - Espectro de UV-Vis do cinamato de zinco (II) em diferentes pH**



Fonte: Autoria própria (2022)

Figura 20 - Espectro de UV-Vis do 4-metoxicinamato de zinco (II) em diferentes pH



Fonte: Autoria própria (2022)

## 5.2 Avaliação de propriedades moleculares e bioatividades

As propriedades moleculares dos ácidos cinâmico e 4-metoxicinâmico e dos zincatos correspondentes foram calculadas na ferramenta *Molinspiration* (Tabela 7). Lipinski *et al.* (2001) concluíram que a análise de propriedades moleculares (miLogP, TPSA, MM, nALH, nDLH) é imprescindível para avaliar a biodisponibilidade oral de candidatos a fármacos, visto que esses parâmetros estão associados à permeabilidade dos compostos em membranas celulares.

**Tabela 7 - Propriedades moleculares, determinadas na ferramenta *Molinspiration*, para as substâncias avaliadas**

Substâncias avaliadas	miLogP	TPSA	MM	nALH	nDLH	Nviolations
Ácido Cinâmico	1,91	37,30	148,16	2	1	0
Ácido 4-metoxicinâmico	1,97	46,53	178,19	3	1	0
Cinamato de zinco (II)	4,15	52,61	359,70	4	0	0
4-Metoxicinamato de zinco (II)	4,26	71,08	419,75	6	0	0

**Fonte: Autoria própria (2022)**

A partir da análise dos dados disponíveis na Tabela 7 observa-se que não houve nenhuma violação à regra dos cinco de Lipinski *et al.* (2001), ou seja, para cada composto avaliado, o coeficiente de partição octanol-água (LogP) foi menor que 5; a massa molar (MM) foi menor que 500 g/mol; a área de superfície topológica polar (TPSA) foi menor que 140 Å<sup>2</sup>; nALH (número de grupos receptores de ligação de hidrogênio) foi menor que 10; e) nDLH (número de grupos doadores de ligação de hidrogênio) foi menor que 5. Desse modo, tratando-se dos parâmetros indicados por Lipinski *et al.* (2001) é provável que os compostos avaliados apresentem boa biodisponibilidade oral, uma vez que possuem propriedades moleculares condizentes com fármacos de administração oral.

Na ferramenta *Molinspiration*, realizou-se a predição de bioatividades para as substâncias avaliadas. Considera-se que a atividade biológica é medida pelo escore obtido, categorizado em três faixas diferentes: (i) se o escore de bioatividade for maior que 0,00, a substância avaliada possui atividade biológica considerável; (ii) se o escore de bioatividade for de -0,5 a 0,00, a substância avaliada possui atividade moderada; (iii) se o escore de bioatividade for menor que -0,50, a substância avaliada é inativa (VERMA, 2012). Os resultados de predição de bioatividades para as substâncias avaliadas são apresentados na Tabela 8.

**Tabela 8 - Predição de bioatividades, determinadas na ferramenta *Molinspiration*, para as substâncias avaliadas. Em destaque os melhores resultados**

Substâncias avaliadas	Ligante GPCR	Modulador de canal iônico	Inibidor de quinase	Ligante de receptor nuclear	Inibidor de protease	Inibidor de enzima
Ácido Cinâmico	-0,74	-0,40	-1,14	-0,47	-0,98	-0,30
Ácido 4-metoxicinâmico	-0,60	-0,40	-0,92	-0,28	-0,85	-0,25
Cinamato de zinco (II)	<b>0,00</b>	-0,07	-0,10	<b>0,11</b>	-0,07	<b>0,08</b>
4-Metoxicinamato de zinco (II)	-0,04	-0,13	-0,12	<b>0,09</b>	-0,09	<b>0,02</b>

Fonte: Autoria própria (2022)

A partir dos escores apresentados na Tabela 8 observa-se que os zincatos apresentam escores maiores do que os ácidos cinâmicos, indicando um aumento de potencial farmacológico, principalmente para os modelos de ligante GPCR, receptor nuclear e Inibidor de enzima.

No contexto da presente pesquisa, a bioatividade que se busca justificar é a de inibição enzimática, observada nos testes *in vitro* de inibição de urease. Essa bioatividade foi observada com frequência para as substâncias avaliadas (Tabela 8).

As propriedades farmacocinéticas relacionadas aos processos de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade calculadas para as substâncias avaliadas são apresentadas na Tabela 9.

Quanto ao processo de absorção, observa-se que todas as substâncias avaliadas apresentam resultado positivo para absorção no intestino humano, para o modelo de absorção em células Caco-2 e de biodisponibilidade oral. Ao compararmos esses últimos resultados com os obtidos no *Molinspiration* observa-se que o algoritmo utilizado no admetSAR também indicou todas as substâncias avaliadas como sendo biodisponível.

As células Caco-2 constituem um parâmetro importante de absorção de fármacos no intestino, assim, se a magnitude de permeabilidade dos compostos a essas células for baixa, é improvável a absorção efetiva da molécula (YEE, 1997).

Quanto ao processo de metabolização, observou-se que todas as substâncias avaliadas apresentaram resultado negativo para o modelo de promiscuidade inibitória do citocromo P450. Esse resultado indica que, as substâncias avaliadas não são biotransformadas e podem atuar, sem uma diminuição da concentração plasmática, em bioreceptores no organismo.

Observou-se que nenhuma das substâncias avaliadas apresentaram resultado positivo para o modelo de carcinogenicidade e de mutagenicidade de Ames. Somente os zincatos

apresentaram resultado positivo para o modelo de hepatotoxicidade. Esses resultados sugerem que essas substâncias devem ser consumidos com cautela, uma vez que podem causar efeitos colaterais indesejados.

Quanto aos parâmetros de toxicidade, a toxicidade oral aguda para todas as substâncias avaliadas foram classificados na categoria III ( $500 \text{ mg/kg} \leq \text{LD}_{50} \leq 5000 \text{ mg/kg}$ ). Esses resultados indicam que essas substâncias não possuem toxicidade oral aguda acentuada.

**Tabela 9 - Resultados de propriedades farmacocinéticas (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade) para as substâncias avaliadas, calculados na ferramenta admetSAR**

Parâmetros	Ácido cinâmico	Ácido 4-metoxicinâmico	Cinamato de zinco (II)	4-metoxicinamato de zinco (II)
<b>Absorção</b>				
Absorção no intestino humano	+	+	+	+
Caco-2	+	+	+	+
Biodisponibilidade oral	+	+	+	+
<b>Metabolização</b>				
Inibidor da glicoproteína-P	-	-	-	+
Substrato de glicoproteína-P	-	-	-	-
Substrato CYP3A4	-	-	-	-
Substrato CYP2C9	-	-	-	-
Substrato CYP2D6	-	-	-	-
Inibidor CYP3A4	-	-	-	-
Inibidor CYP2C9	-	-	-	-
Inibidor YP2C19	-	-	-	-
Inibidor YP2D6	-	-	-	-
Inibidor CYP1A2	-	-	+	+
Promiscuidade inibitória de CYP	-	-	-	-
<b>Toxicidade</b>				
Carcinogenicidade	-	-	-	-
Carcinogenicidade (trinário)	Non-required	Non-required	Non-required	Non-required
Corrosão ocular	+	+	-	-
Irritação ocular	+	+	+	-
Mutagenicidade de Ames	-	-	-	-
Hepatotoxicidade	-	-	+	+
Sensibilização da pele	+	-	+	-
Toxicidade respiratória	-	-	-	-
Toxicidade reprodutiva	-	-	-	-
Toxicidade Oral Aguda	III	III	III	III
Toxicidade para abelhas	-	-	-	-
Biodegradação	+	+	-	-
Toxicidade aquática para crustáceos	-	-	+	+
Toxicidade para peixes	+	+	+	+

Fonte: Autoria própria (2022)

#### *Previsão de metabólitos e de efeitos tóxicos/adversos*

A maioria dos xenobióticos sofre conversões metabólicas no corpo humano. A atividade biológica, toxicidade e outras propriedades de tais metabólitos podem diferir significativamente daquelas dos compostos originais. Não apenas os xenobióticos e seus

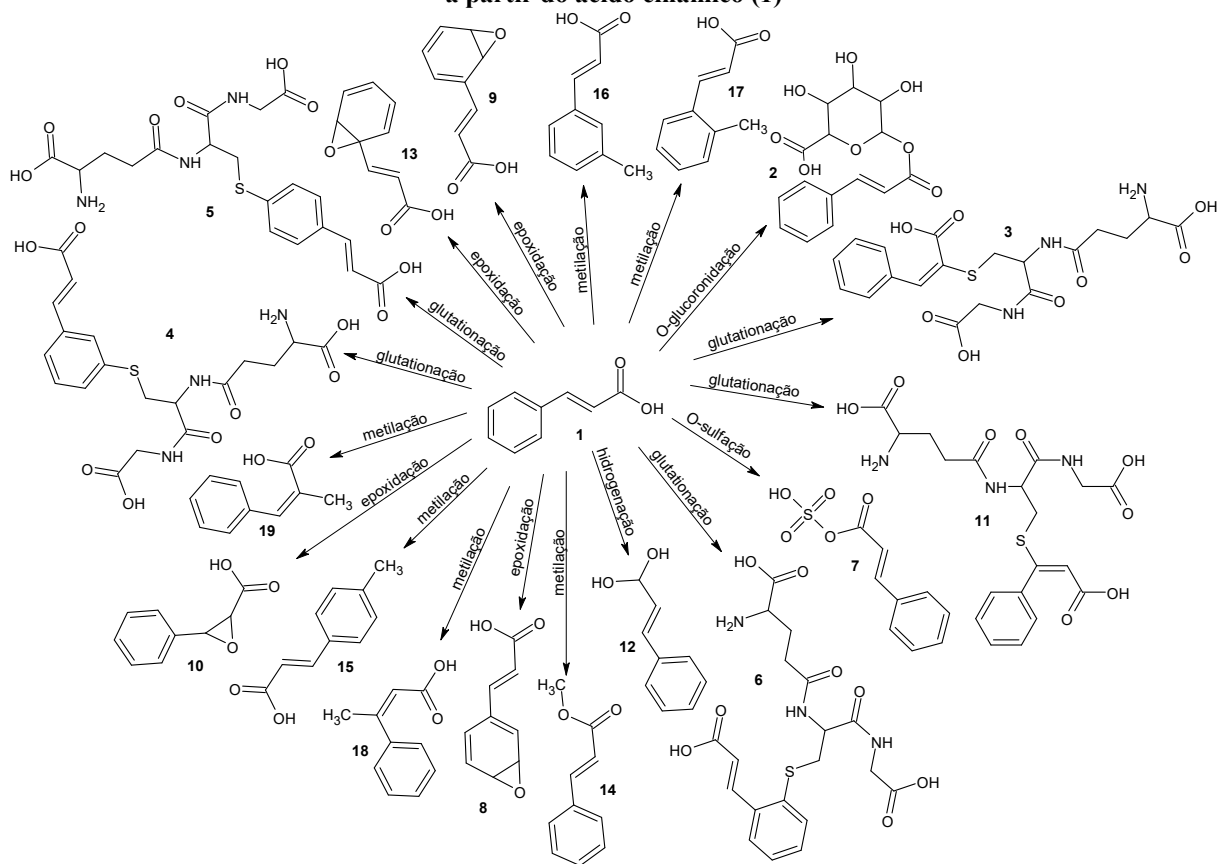
metabólitos finais produzidos em grandes quantidades, mas também os intermediários e metabólitos finais formados em pequenas quantidades, podem causar efeitos indesejáveis (RUDIK *et al.*, 2019).

Os possíveis metabólitos das substâncias avaliadas foram determinados utilizando a ferramenta MetaTox e são apresentados nas Figuras 21-24.

No organismo humano, muitos xenobióticos representados por pequenas moléculas orgânicas são modificados durante a biotransformação, que pode ser classificada em três fases. Normalmente, a fase I ativa as substâncias químicas pela introdução de um grupo funcional reativo e polar, enquanto a fase II conjuga o composto ativado com uma espécie carregada, aumentando o peso molecular, reduzindo a reatividade e melhorando a propriedade de transporte. Durante a fase III, os xenobióticos transformados são eliminados da célula para o meio extracelular. A hidroxilação e a desalquilação são as reações de fase I mais comuns. A maioria das reações de fase I (cerca de dois terços no caso de medicamentos aprovados) são catalisadas pelos citocromos P450. Os citocromos P450 desempenham papéis importantes na desintoxicação e desativação de drogas. No entanto, o P450 também pode transformar o composto original no metabólito mais tóxico (RUDIK *et al.*, 2017).

A fase II é apresentada por reações de conjugação. A glucuronidação é a reação de fase II mais comum. É catalisada por UDP-glucuronosiltransferases. Mais metabólitos polares são formados como resultado de reações de fase II. Esses metabólitos são transportados ativamente através das membranas. Os metabólitos, que são formados durante a biotransformação, podem ser significativamente diferentes do composto original nos perfis de bioatividade, causar maior eficácia ou perda de atividade, induzir interações medicamentosas ou efeitos adversos e tóxicos. Portanto, é importante avaliar as estruturas dos metabólitos nos estágios iniciais de desenvolvimento de fármaco (RUDIK *et al.*, 2017).

**Figura 21 - Representação esquemática de possíveis metabólitos gerados, segundo a ferramenta MetaTox, a partir do ácido cinâmico (1)**

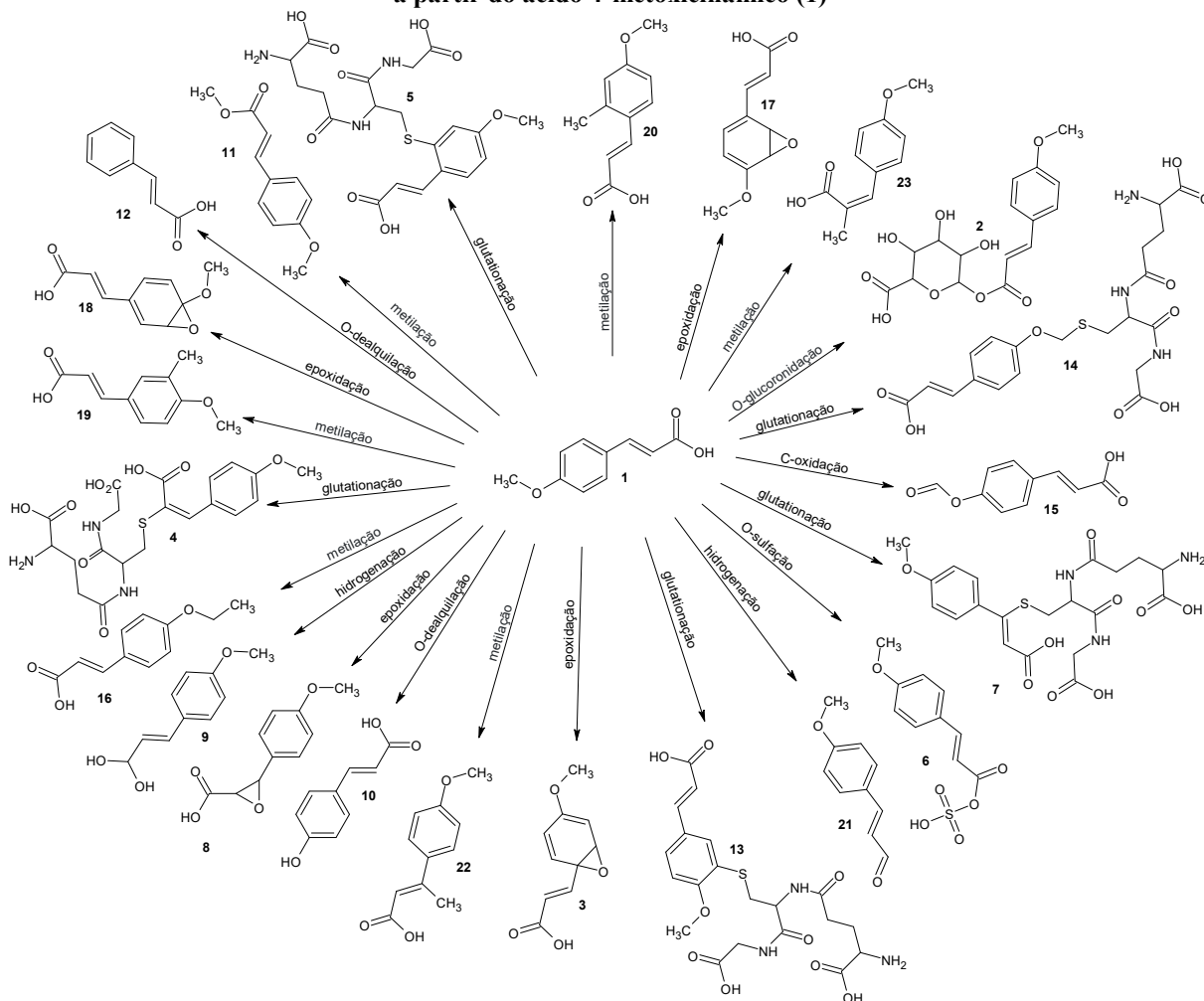


Fonte: Autoria própria (2022)

Para o ácido cinâmico são previstos 19 metabólitos, sendo 6 oriundos de processos de metilação, 5 de glutationação e 4 de epoxidação. Os processos de metilação e epoxidação são reações da fase I da metabolização, enquanto a glutationação é uma reação comum da fase II da metabolização.



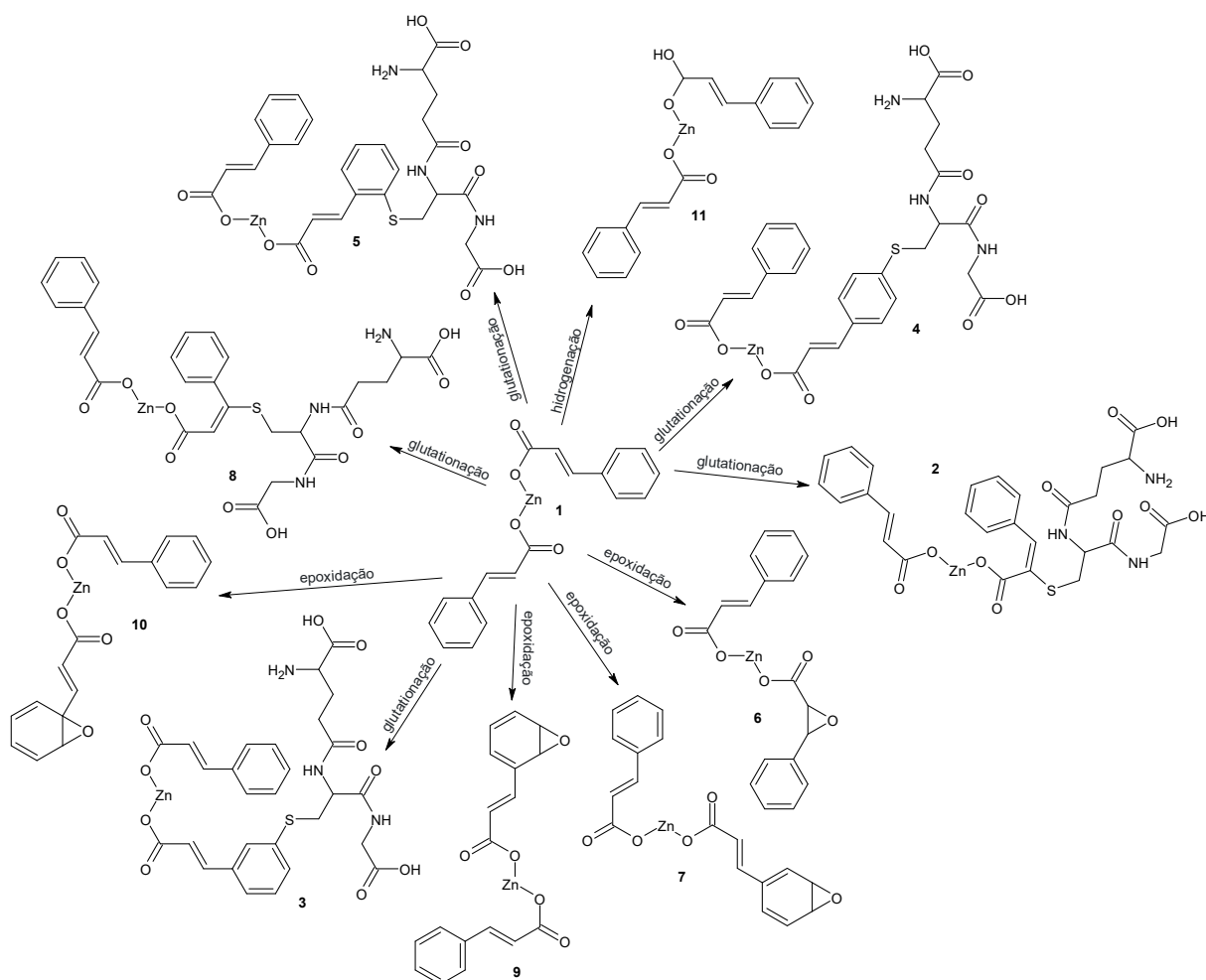
**Figura 22 - Representação esquemática de possíveis metabólitos gerados, segundo a ferramenta MetaTox, a partir do ácido 4-metoxicinâmico (1)**



Fonte: Autoria própria (2022)

Para o ácido 4-metoxicinâmico são previstos 23 metabólitos, sendo 4 oriundos do processo de epoxidação, 5 de glutatonação e 6 de metilação. A metilação e a epoxidação são reações comuns da fase I e a glutatonação ocorre na fase II da metabolização.

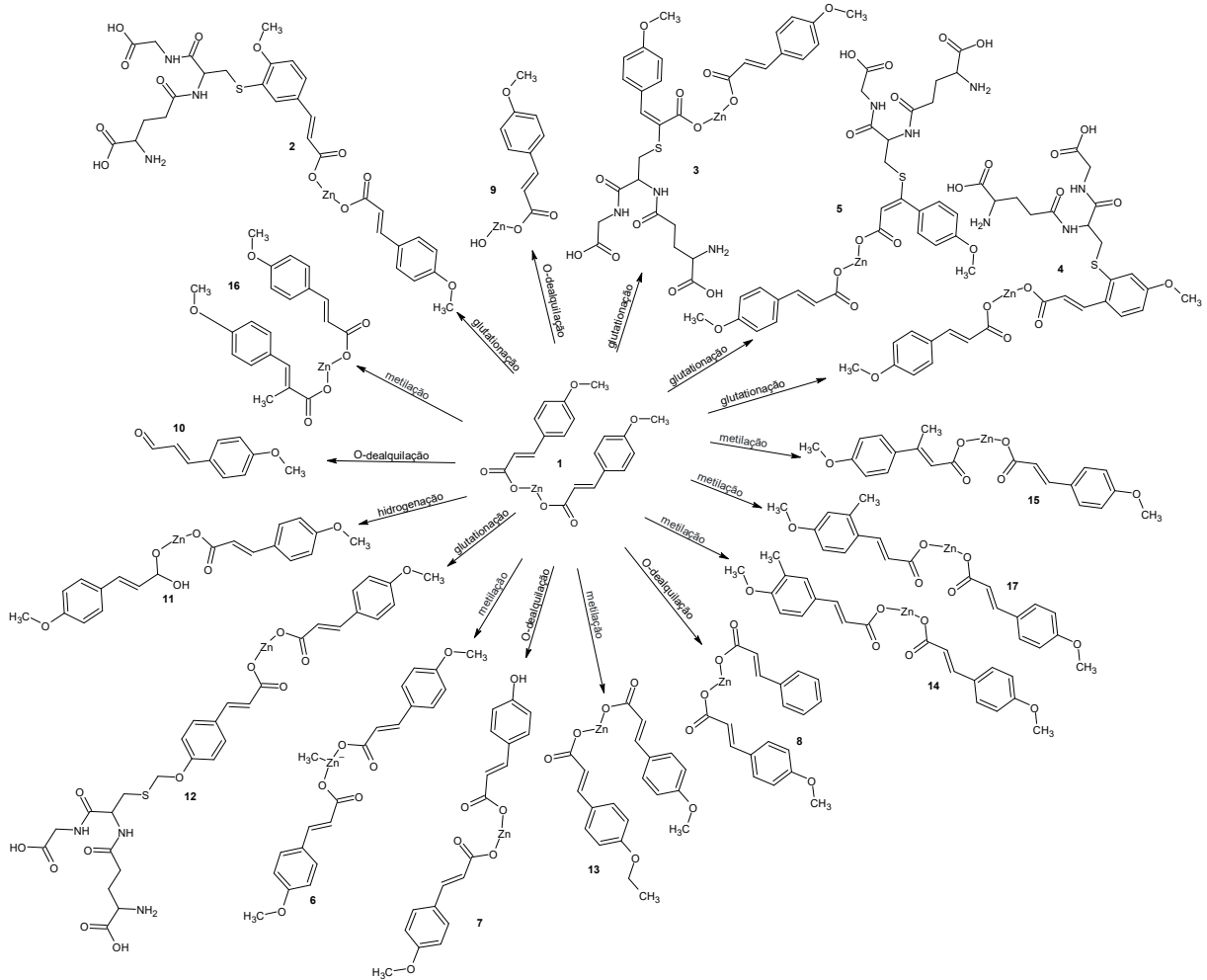
**Figura 23 - Representação esquemática de possíveis metabólitos gerados, segundo a ferramenta MetaTox, a partir do cinamato de zinco (II) (1)**



**Fonte: Autoria própria (2022)**

Para o cinamato de zinco (II) são previstos 11 metabólitos, sendo 4 oriundos de processo de epoxidação e 5 de glutatonação.

**Figura 24 - Representação esquemática de possíveis metabólitos gerados, segundo a ferramenta MetaTox, a partir do complexo 4-metoxicinamato de zinco (II) (1)**



**Fonte: Autoria própria (2022)**

Para o 4-metoxicinamato de zinco (II) são previstos 17 metabólitos, sendo 6 oriundos do processo de metilação, 5 de glutationação e 4 de O-dealquilação. A metilação e a de O-dealquilação são reações que ocorrem na fase I e a glutationação é uma reação que ocorre na fase II da metabolização.

As previsões de efeitos tóxicos/adversos, calculada utilizando a ferramenta computacional MetaTox, para as substâncias avaliadas são apresentadas no Quadro 3.

**Quadro 3 - Previsão de efeitos tóxicos/adversos, calculados na ferramenta MetaTox, para as substâncias avaliadas**

$P_a$	$P_i$	$P_{max}$	Atividade	Metabólito
<b>Ácido Cinâmico</b>				
0,701	0,008	0,778	Sensibilização	17
0,604	0,010	0,746	Estimulante de secreção lacrimal	19
0,516	0,029	0,862	Carcinogênico	2
<b>Cinamato de zinco (II)</b>				
0,801	0,004	0,801	Carcinogênico, mouse, male	
0,757	0,005	0,757	Carcinogênico, mouse	
0,722	0,015	0,733	Carcinogênico	6
0,685	0,012	0,878	Mutagênico	6
0,658	0,022	0,658	Teratogênico	
0,637	0,024	0,637	Embriotóxico	
0,510	0,018	0,510	Estimulante de secreção lacrimal	
<b>Ácido 4-metoxicinâmico</b>				
0,684	0,009	0,715	Sensibilização	2
0,574	0,012	0,626	Ulceração	2
<b>4-Metoxicinamato de zinco (II)</b>				
0,673	0,006	0,806	Carcinogênico, mouse, male	7
0,630	0,007	0,753	Carcinogênico, mouse	7
0,591	0,024	0,738	Carcinogênico	7
0,585	0,018	0,770	Mutagênico	11
0,561	0,032	0,731	Teratogênico	11
0,539	0,034	0,723	Embriotóxico	11

$P_a$  = Probabilidade de ser ativo;  $P_i$  = Probabilidade de ser inativo e  $P_{max}$  = Probabilidade máxima.

Fonte: Autoria própria (2022)

De modo geral, é possível observar que os zincatos estudados apresentam mais previsão de efeitos tóxicos/adversos do que os ácidos cinâmicos. Tais resultados chamam a atenção para o fato do potencial ulcerogênico, geralmente associado a compostos carboxílicos e utilizado como argumento para a produção de derivados com redução/anulação desse efeito indesejado, ter sido previsto apenas para o ácido 4-metoxicinâmico. Assim como esperado, esse efeito indesejado não foi previsto para os zincatos avaliados, no entanto, observou-se a previsão de outros efeitos tóxicos/adversos, que sugerem cautela para o uso desses compostos como fármacos.

Para o composto ácido cinâmico observou-se três potenciais efeitos tóxicos/adversos: (i) sensibilização, que foi relacionado ao metabólito 17, produto gerado pelo processo de metilação no anel aromático (Figura 21); (ii) estimulante de secreção lacrimal, que foi relacionado ao metabólito 19, produto gerado pelo processo de metilação na dupla ligação conjugada ao grupo carboxila (Figura 21), e; (iii) carcinogênico, que foi associado ao metabólito 2, gerado pelo processo de glucoronidação.

Para o composto cinamato de zinco (II) observou-se cinco potenciais efeitos tóxicos/adversos (carcinogênico, mutagênico, teratogênico, embriotóxico e estimulante de

secreção lacrimal), todos relacionados ao metabólito 6 (Figura 23), gerado pelo processo de epoxidação da dupla ligação conjugada ao grupo carboxila.

Para o composto ácido 4-metoxicinâmico observou-se dois potenciais efeitos tóxicos/adversos (sensibilização e ulceração) relacionados ao metabólito 2 (Figura 22), gerado pelo processo de glucoronidação.

Para o composto 4-metoxicinamato de zinco (II) observou-se quatro efeitos tóxicos/adversos: (i) carcinogênico, relacionado ao metabólito 7 (Figura 24), gerado pelo processo de *O*-dealquilação de uma das metóxilas fenólicas; (ii) mutagênico, teratogênico e embriotóxico, relacionado ao metabólito 11, gerado pelo processo de hidrogenação de um dos grupos acetato.

#### *Previsão de toxicidade aguda em ratos*

Toxicidade aguda é considerada como os efeitos adversos que ocorrem dentro de um determinado tempo, após uma única exposição a uma substância. O valor de  $DL_{50}$  é uma das características importantes da toxicidade aguda que corresponde à dose que causa 50% de mortalidade em 24 horas após a administração. A toxicidade aguda oral, dérmica e por inalação em roedores são parâmetros importantes para avaliações gerais de risco toxicológico, enquanto a toxicidade aguda oral, intraperitoneal e intravenosa em roedores são importantes para a pesquisa e desenvolvimento de medicamentos. Camundongos e ratos são as principais espécies utilizadas nesses estudos. Há muitos dados de  $DL_{50}$  para camundongos e ratos disponíveis na literatura e em bancos de dados. A necessidade de estimativa *in silico* dos valores de  $DL_{50}$  levou à criação e aplicação de diferentes métodos de SAR e QSAR (LAGUNIN *et al.*, 2011).

As previsões *in silico*, utilizando a ferramenta GUSAR, dos valores de  $DL_{50}$  para ratos considerando quatro tipos de administração (oral, intravenosa, intraperitoneal e subcutânea) são apresentadas na Tabela 10.

**Tabela 10 - Predições, calculadas na ferramenta GUSAR, de toxicidades agudas em ratos e classificações de toxicidade considerando diferentes formas de administração**

Substâncias avaliadas	DL <sub>50</sub> (mg/kg) e classificação de toxicidade			
	Intraperitoneal	Intravenosa	Oral	Subcutânea
Ácido Cinâmico	864,700 (4)	363,500 (4)	2783,000 (5)	333,900 (4)
Ácido 4-metoxicinâmico	539,300 (4)	224,100 (4)	2679,000 (5)	803,400 (4)
Cinamato de zinco (II)	338,500 (4)	84,780 (3)	3601,000 (5)	1805,000 (4)
4-Metoxicinamato de zinco (II)	408,700 (4)	120,300 (4)	2981,000 (5)	1916,000 (4)

Fonte: Aatoria própria (2022)

A partir dos dados apresentados na Tabela 10, é possível observar que, entre as formas de administração avaliadas, a administração oral resultou em maiores valores de DL<sub>50</sub>, cujos valores se enquadram na categoria 5 da OECD. Em relação à toxicidade oral, forma de administração adequada para o tratamento de *H. pylori*, os zincatos apresentam menores toxicidades do que os ácidos cinâmicos.

#### *Previsão de toxicidade em ambientes aquáticos*

As predições de toxicidade ambiental são apresentadas na Tabela 11. Ao comparar os valores de BCF obtidos com o critério de bioacumulação regulado pelo Regulamento (CE) n.º 1907/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho de 18 de Dezembro de 2006 relativo ao Registo, Avaliação, Autorização e Restrição de Produtos Químicos (REACH). A substância avaliada é considerada ser bioacumulativa quando o BCF for maior que 2000 e muito bioacumulativa quando o BCF for maior que 5000 (GURBANOVA *et al.*, 2020). Convertendo para a mesma unidade utilizada pelo GUSAR, Log<sub>10</sub>(BCF), substâncias bioacumulativas apresentam valores de Log<sub>10</sub>(BCF) ≥ 3,3. Sendo assim, as substâncias avaliadas não devem ser bioacumulativas.

**Tabela 11 - Predições, calculadas na ferramenta GUSAR, de toxicidade ambiental**

Modelos avaliados	Substâncias avaliadas			
	Ácido Cinâmico	Ácido 4-metoxicinâmico	Cinamato de zinco (II)	4-Metoxicinamato de zinco (II)
Fator de bioacumulação, Log <sub>10</sub> (BCF)	0,513	0,792	2,045	1,761
<i>D. magna</i> , -Log <sub>10</sub> (CL <sub>50</sub> )	3,832	4,703	5,329	6,545
<i>P. promelas</i> , -Log <sub>10</sub> (CL <sub>50</sub> )	0,974	1,200	3,925	4,610
<i>T. pyriformis</i> , -Log <sub>10</sub> (CIC <sub>50</sub> )	0,289	0,501	2,211	2,407

Fonte: Aatoria própria (2022)

Uma substância cumpre o critério de toxicidade quando a concentração de efeitos não observados a longo prazo para organismos marinhos ou de água doce é inferior a 0,01 mg/L. Dessa forma, com base nesse critério de toxicidade, três das substâncias avaliadas {ácido 4-metoxicinâmico, cinamato de zinco (II) e 4-metoxicinamato de zinco (II)}

apresentam toxicidade para a espécie *D. magna* (Tabela 12). De modo geral, os zincatos apresentam menores valores de concentração letal mediana do que os ácidos cinâmicos correspondentes.

**Tabela 12 - Toxicidades, calculadas na ferramenta GUSAR, para diferentes organismos marinhos**

Modelos avaliados	Substâncias avaliadas			
	Ácido Cinâmico	Ácido 4-metoxicinâmico	Cinamato de zinco (II)	4-Metoxicinamato de zinco (II)
<i>D. magna</i> , CL <sub>50</sub> (mg/L)	2,18.10 <sup>-2</sup>	3,53.10 <sup>-3</sup>	1,69.10 <sup>-3</sup>	1,20.10 <sup>-4</sup>
<i>P. promelas</i> , CL <sub>50</sub> (mg/L)	15,70	11,20	4,28.10 <sup>-2</sup>	1,03.10 <sup>-2</sup>
<i>T. pyriformis</i> , CIC <sub>50</sub> (mg/L)	76,20	56,20	2,21	1,64

Fonte: Autoria própria (2022)

#### *Predição de carcinogenicidade específica para órgãos de roedores*

A identificação de carcinógenos de roedores é uma tarefa importante na avaliação de risco de produtos químicos. Métodos SAR têm sido propostos para reduzir o número de experimentos com animais. No entanto, a maioria desses métodos ignora informações sobre a especificidade do órgão da tumorigênese. O Quadro 4 apresenta predições de carcinogenicidades específicas para órgãos de roedores.

**Quadro 4 - Predições de carcinogenicidades específicas para órgãos de roedores para as substâncias avaliadas**

Substâncias avaliadas	Organismos avaliados e resultados previstos*					
	Rato					
Ácido Cinâmico		Macho			Fêmea	
	$P_a$	$P_i$	Órgãos	$P_a$	$P_i$	Órgãos
	0,902	0,032	Rim	0,769	0,060	Estômago
	0,774	0,042	Estômago	-	-	-
	Camundongos					
		Macho			Fêmea	
$P_a$	$P_i$	Órgãos	$P_a$	$P_i$	Órgãos	
0,837	0,032	Estômago	0,758	0,039	Estômago	
0,732	0,019	Pulmão	0,556	0,131	Ovário	
Ácido 4-metoxicinâmico	Rato					
		Macho			Fêmea	
	$P_a$	$P_i$	Órgãos	$P_a$	$P_i$	Órgãos
	0,937	0,021	Rim	0,831	0,044	Estômago
	0,864	0,030	Estômago	-	-	-
	Camundongos					
	Macho			Fêmea		
$P_a$	$P_i$	Órgãos	$P_a$	$P_i$	Órgãos	
0,828	0,036	Estômago	0,640	0,108	Estômago	
0,592	0,078	Pulmão	-	-	-	
Cinamato de zinco (II)	Ratos					
		Macho			Fêmea	
	$P_a$	$P_i$	Órgãos	$P_a$	$P_i$	Órgãos
	0,822	0,082	Rim	0,634	0,093	Estômago
	0,655	0,062	Estômago	-	-	-
	Camundongos					
	Macho			Fêmea		
$P_a$	$P_i$	Órgãos	$P_a$	$P_i$	Órgãos	
0,828	0,036	Estômago	0,749	0,043	Estômago	
0,655	0,047	Pulmão	0,614	0,108	Ovário	
4-Metoxicinamato de zinco (II)	Ratos					
		Macho			Fêmea	
	$P_a$	$P_i$	Órgãos	$P_a$	$P_i$	Órgãos
	0,871	0,045	Rim	0,784	0,057	Estômago
	0,818	0,036	Estômago	-	-	-
	Camundongos					
	Macho			Fêmea		
$P_a$	$P_i$	Órgãos	$P_a$	$P_i$	Órgãos	
0,820	0,040	Estômago	0,603	0,123	Estômago	
-	-	-	0,517	0,223	bexiga	

\* $P_a$  = probabilidade de ser ativa e  $P_i$  = probabilidade de ser inativa.

Fonte: Autoria própria (2022)

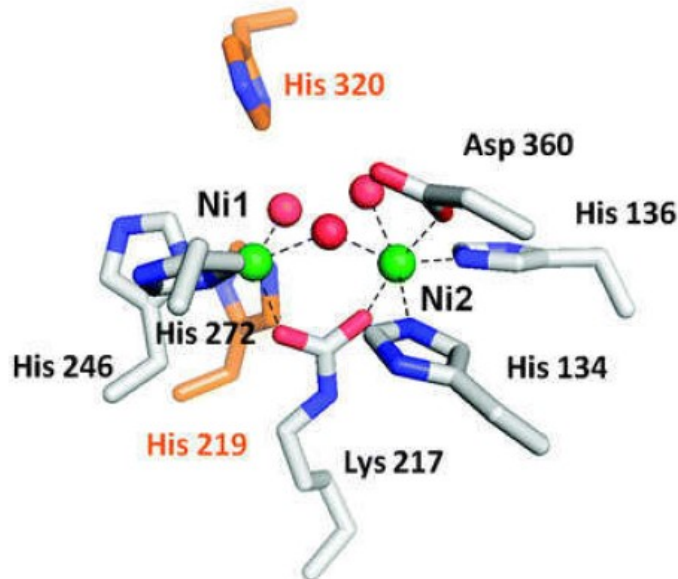
Todas as substâncias avaliadas apresentaram probabilidade de ser ativa ( $P_a$ ) como carcinogêneos, principalmente para o estômago, cuja previsão foi recorrente para as duas espécies e sexo.



*Avaliação in vitro e in silico de inibição de urease*

Utilizou-se, no presente trabalho, os dados disponibilizados no *Protein Data Bank* para a enzima urease (PDB 6ZJA), obtida da espécie *Helicobacter pylori*, cujo ligante cristalográfico é o composto 2- $\{[1-(3,5\text{-dimetilfenil})\text{-}1H\text{-imidazol-}2\text{-il}]\text{sulfanil}\}$ -*N*-hidroxiacetamida (DMJ) (CUNHA *et al.*, 2021). Os principais resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo da urease isolada de *H. pylori* são: His136, His138, Lys219, His248, His274 e Asp362. Esses resíduos interagem com os dois íons níquel, ureia e com uma molécula de água no interior do sítio ativo, sendo o resíduo His322 atuando como base da catálise (Figura 25). Este último ativa uma molécula de água ligada a um íon níquel, enquanto o resíduo His221 auxilia a ureia a se ligar em *O*-coordenação ao outro íon níquel. O resultado é um intermediário tetraédrico ligado em ponte aos dois íons níquel. Com um próton sendo transferido, ocorre a liberação de amônia e carbamato. O último composto resultante se decompõe em amônia e ácido carbônico na presença de água (SILVA, 2015).

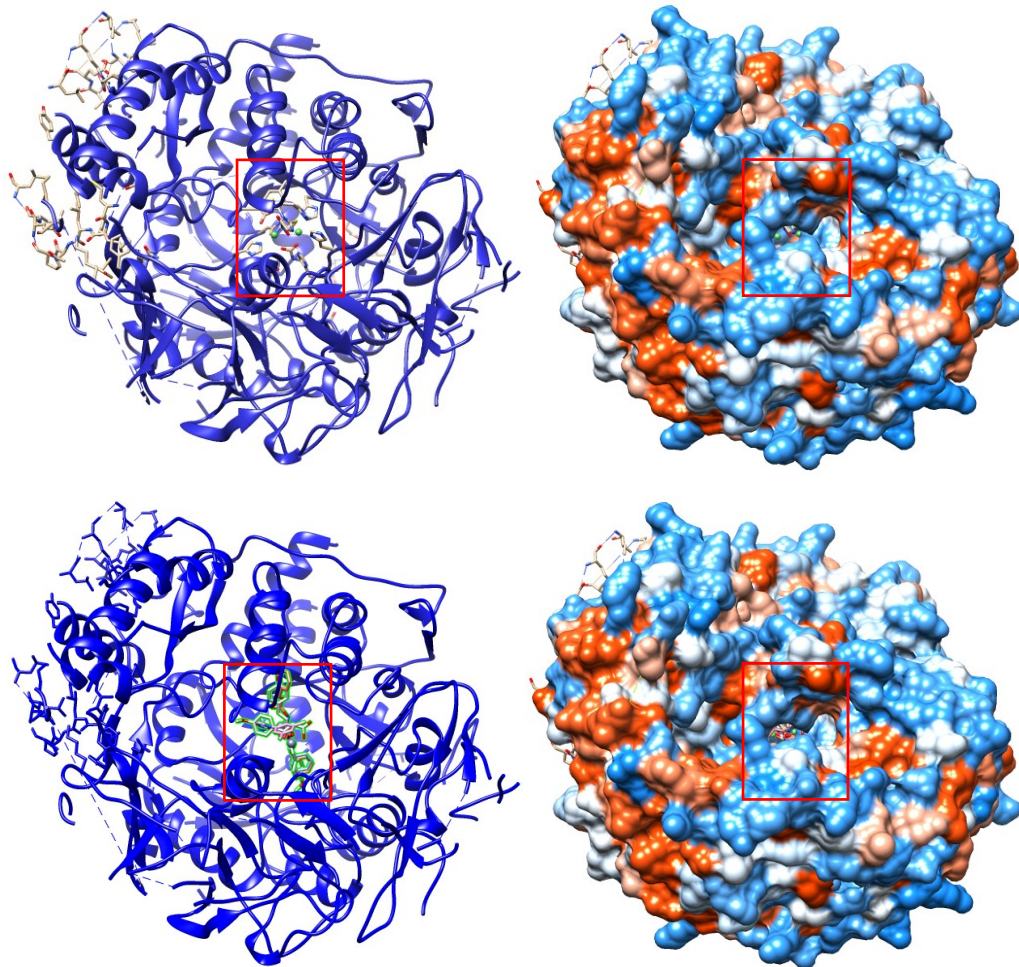
**Figura 25 – Representação do sítio ativo da enzima urease ilustrando os resíduos de aminoácidos envolvidos na hidrólise da ureia**



Fonte: Carter *et al.* (2009, p. 209)

Com base nas imagens obtidas do estudo de ancoragem molecular (Figura 26), é possível observar que as quatro substâncias avaliadas estão ancorados no sítio ativo da urease.

**Figura 26 - Imagens representativas do estudo de ancoragem molecular com a enzima urease (PDB 6ZJA): (a) região de estudo destacando o sítio ativo; (b) superfície molecular da região de estudo; (c) região de estudo com destaque para os compostos ancorados no sítio ativo; (d) superfície molecular da região de estudo com destaque para as substâncias ancoradas no sítio ativo**



Fonte: Autoria própria (2022)

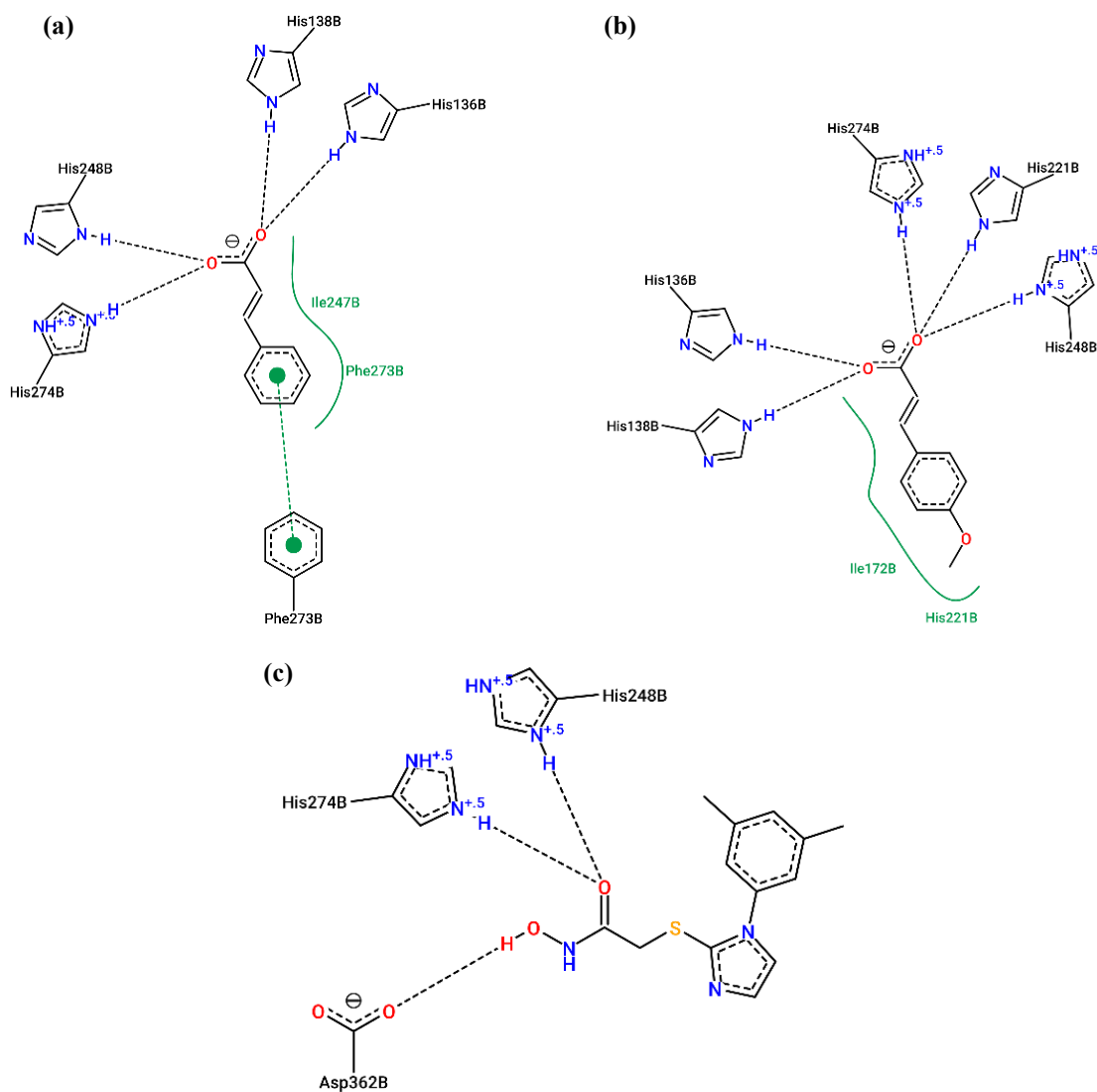
Os diagramas bidimensionais das interações urease-ácido cinâmico, urease-4-ácido metoxicinâmico e urease-ligante cristalográfico são apresentados na Figura 27. A semelhança entre as interações indicam que os ácidos cinâmicos, assim como os cinamatos de zinco, podem atuar como inibidores competitivos do substrato natural da urease.

Na Figura 28 é apresentado o agrupamento hierárquico das interações das substâncias avaliadas com os resíduos de aminoácidos da enzima urease (PDB: 6ZJA), em vermelho são destacados os resíduos de histidina, que são importantes para a atividade catalítica da enzima.

As energias de interação da enzima urease com as substâncias avaliadas são apresentadas na Tabela 13. A partir dos dados apresentados na Tabela 13, é possível observar que todas as substâncias avaliadas apresentaram maiores interações com a enzima urease (PDB 6ZJA) do que o ligante cristalográfico (DMJ). Tais resultados indicam que os

compostos avaliados podem atuar como inibidores de urease e são potenciais substâncias para serem estudadas para a erradicação de *H. pylori*.

**Figura 27 - Representações bidimensionais, produzidas pela ferramenta PoseView, das interações entre os ácidos cinâmico (a), 4-metoxicinâmico (b) e o ligante cristalográfico (c)**



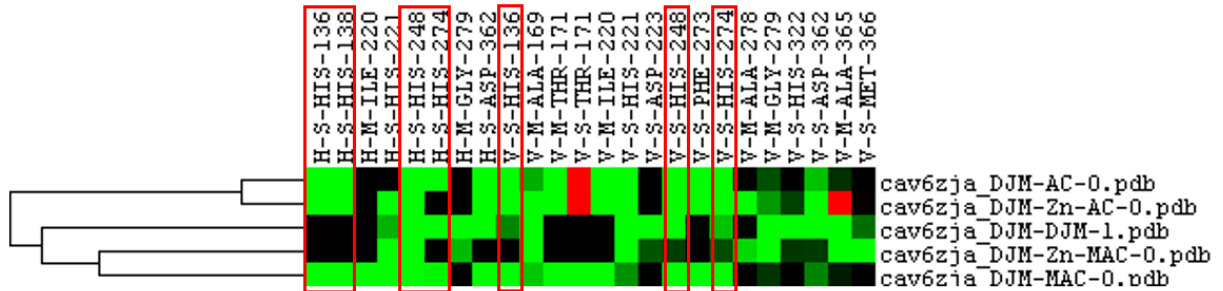
Fonte: Autoria própria (2022)

**Tabela 13 - Energias de interação enzima-ligante, em kcal.mol<sup>-1</sup>, obtidas do estudo de ancoragem molecular**

Substâncias Avaliadas	Energia de interação			
	Total	van der Waals	Ligação de hidrogênio	Eletrônica
Ácido Cinâmico	-98,284	-71,165	-20,584	-6,535
Ácido 4-metoxicinâmico	-109,314	-77,659	-25,184	-6,470
Cinamato de zinco (II)	-98,991	-80,967	-18,023	0,000
4-Metoxicinamato de zinco (II)	-95,457	-73,882	-21,575	0,000
Ligante cristalográfico DMJ	-82,380	-58,670	-23,710	0,000

Fonte: Autoria própria (2022)

**Figura 28 - Agrupamento hierárquico das interações das substâncias avaliadas com os resíduos de aminoácidos da enzima urease (PDB: 6ZJA). Em destaque estão os resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo da enzima**

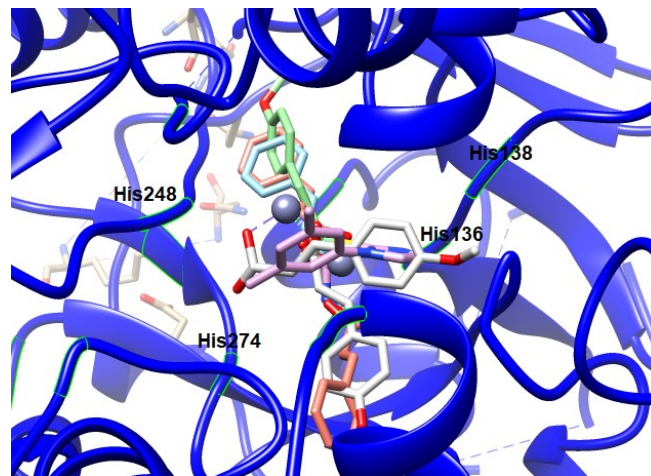


\*H e V representam ligações de hidrogênio e interações de van der Waals, respectivamente. As interações “V” são coloridas em verde quando a energia for menor que  $-4,0$ . As ligações de hidrogênio são coloridas em verde, se a energia for inferior a  $-2,5$ . M e S indicam que o resíduo pertence à cadeia principal ou cadeia lateral, respectivamente.

Fonte: Autoria própria (2022)

As proximidades dos resíduos de aminoácidos His136, His138, His248 e His274, que estão presentes no sítio ativo da urease e são importantes para a atividade catalítica, com as substâncias avaliadas pode ser observada na representação da Figura 29.

**Figura 29 - Representação das histidinas presentes no sítio ativo da enzima**



Fonte: Autoria própria (2022)

Há algumas décadas, vários estudos têm sido reportados na literatura sobre os benefícios de fármacos comerciais complexados com zinco, tais como a redução do efeito ulcerogênico de anti-inflamatórios comerciais (JAIN; SINGH; KULKARNI, 1999; SANTOS *et al.*, 2004; SUKUL *et al.*, 2016; CHU *et al.*, 2019). No entanto, os estudos que descrevem atividades farmacológicas de substâncias químicas, sejam produtos naturais ou derivados sintéticos, negligenciam ou avaliam com menor ênfase os possíveis efeitos tóxicos/adversos. Sendo assim, as descrições de melhoras de atividades farmacológicas são recorrentes na literatura, enquanto os possíveis efeitos tóxicos/adversos acabam sendo conhecidos em menor proporção, geralmente, ao se iniciar estudos clínicos.

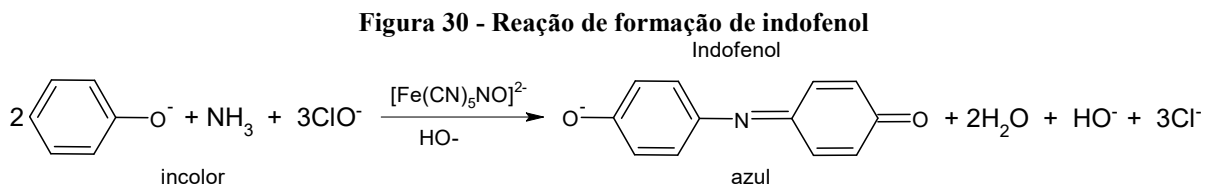
### 5.3 Avaliação de atividades biológicas

#### *Avaliação de atividade inibidora de urease*

As plantas são outras possíveis fontes naturais de urease, sendo a soja (*Glycine max*) uma das mais estudadas até o momento. Estudos apontam que a urease da soja e da *H. pylori* possuem estruturas tridimensionais semelhantes (LAPROTOX, 2014). Lodhi *et al.* (2015) verificou, por exemplo, que a região ao redor do sítio ativo da urease isolada de feijão-deporco (*Canavalia ensiformis*) possui os mesmos resíduos de aminoácidos que a urease de *H. pylori*. Devido a semelhança estrutural entre a urease da soja e da *H. pylori*, optamos por utilizar no presente trabalho a urease extraída da soja.

A avaliação da atividade inibidora de urease pelas substâncias avaliadas foi realizada utilizando a tiourea como padrão, por ser considerada um inibidor de urease. Os testes realizados foram baseados nas pesquisas de Rezaei *et al.* (2010) e Silva *et al.* (2015). A coloração azul observada nas Figuras 31 e 32 é consequência da reação da amônia com fenol e hipoclorito de sódio, formando o produto indofenol, um corante azul que pode ser identificado por análise colorimétrica. Por fim, foi realizada uma leitura da absorção das amostras em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 630 nm.

Os testes de inibição da urease foram realizados utilizando o método indofenol (WEATHERBURN, 1967), este método baseia-se na quantificação do produto de cor azul (indofenol), formado pela reação da amônia com fenol e hipoclorito de sódio, sob catálise de nitroprussiato de sódio (Figura 30). A absorbância da solução, detectada em 630 nm, fornece de forma indireta a quantidade de amônia formada e a porcentagem de inibição da enzima.

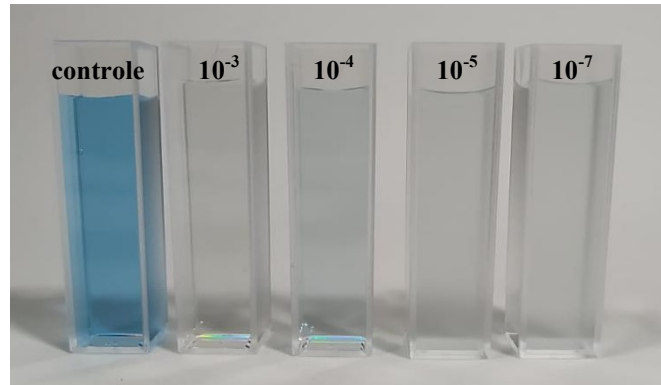


Fonte: Adaptado de Weatherburn (1967, p. 4)

Por meio da intensidade da coloração azul apresentada na solução, é possível realizar uma análise qualitativa de inibição da urease, pois quanto mais intensa a cor, menor é a inibição da urease pela substância avaliada. Além disso, a partir dos dados de absorção no espectrofotômetro, pode-se estudar a porcentagem de inibição de forma quantitativa.

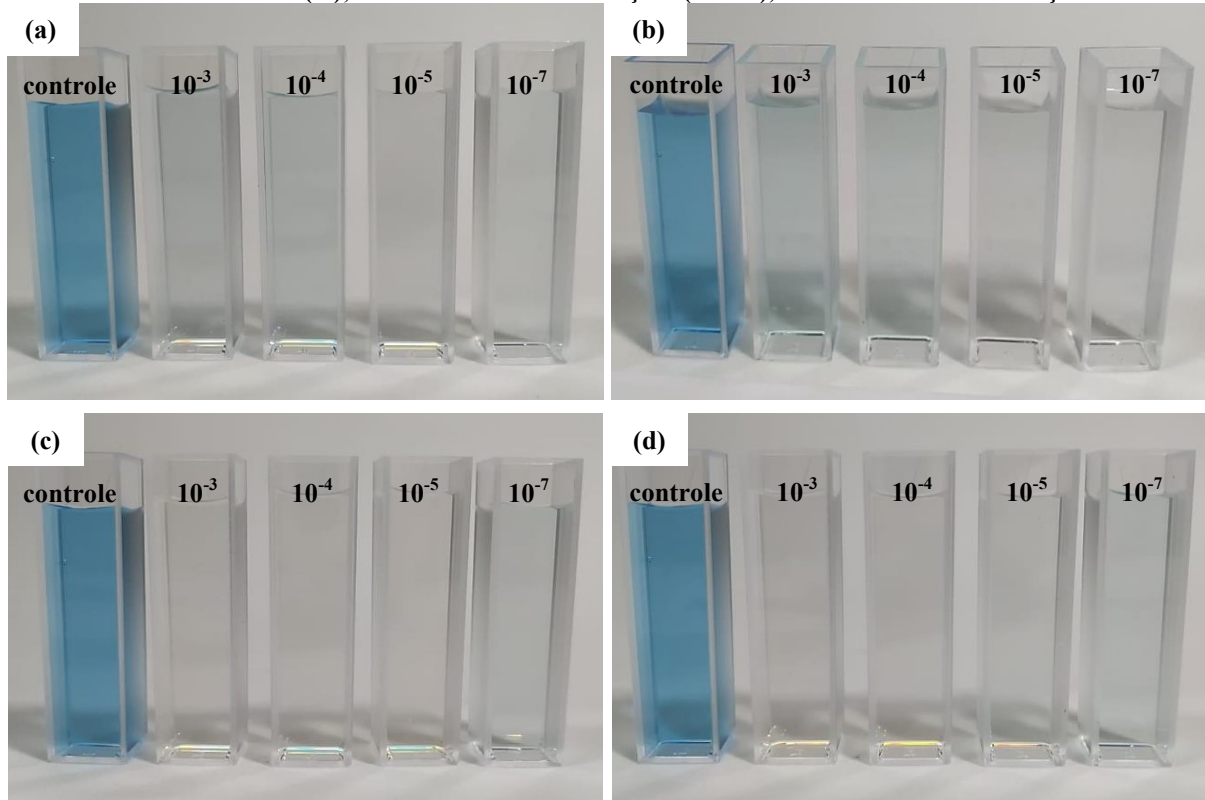
Nas Figuras 31 e 32 são apresentadas análise qualitativa do teste *in vitro* de inibição de urease da tiourea e dos ácidos cinâmico, 4-metoxicinâmico e dos zincatos correspondentes.

**Figura 31 - Avaliação da tiourea, em diferentes concentrações (mol/L), no teste *in vitro* de inibição de urease**



Fonte: Autoria própria (2022)

**Figura 32 - Avaliação do: (a) ácido cinâmico, (b) ácido 4-metoxicinâmico, (c) cinamato de zinco (II) e 4-metoxicinamato de zinco (II), em diferentes concentrações (mol/L), no teste *in vitro* de inibição de urease**



Fonte: Autoria própria (2022)

Visualmente não é possível perceber diferenças em termos de coloração resultante para a faixa de concentração avaliada, para todas as substâncias avaliadas nesse trabalho. Observando os resultados da Tabela 14, verifica-se que as amostras de diferentes

concentrações de tioureia (Figura 31) apresentaram absorção. Estes dados, quando inseridos na Equação 1, fornecem as seguintes porcentagens de inibição da enzima urease: 85%; 80%; 85% e 83%. As porcentagens são condizentes com a observação qualitativa das amostras, em que a coloração azul apresenta-se mais intensa nas soluções com menor inibição, ou seja, para as concentrações de  $10^{-3}$  mol/L,  $10^{-4}$  mol/L,  $10^{-5}$  mol/L e  $10^{-7}$  mol/L, respectivamente.

Os percentuais de inibição de urease obtidos para os zincatos são maiores do que o observado para o inibidor padrão (tioureia), indicando que essa substância é capaz de inibir a enzima urease, em quantidade maior do que no teste com tioureia ou de forma mais eficiente do que essa substância.

**Tabela 14 - Concentração, absorção e porcentagem de inibição de urease pelas substâncias avaliadas**

Substâncias avaliadas	Concentração (mol/L)	Inibição (%)
Tioureia	$10^{-3}$	85,2
	$10^{-4}$	80,1
	$10^{-5}$	85,2
	$10^{-7}$	83,2
Ácido cinâmico	$10^{-3}$	74,9
	$10^{-4}$	74,0
	$10^{-5}$	82,1
	$10^{-7}$	80,7
Ácido 4-metoxicinâmico	$10^{-3}$	70,7
	$10^{-4}$	75,8
	$10^{-5}$	82,1
	$10^{-7}$	80,7
Cinamato de zinco (II)	$10^{-3}$	91,0
	$10^{-4}$	91,3
	$10^{-5}$	92,4
	$10^{-7}$	81,9
4-Metoxicinamato de zinco (II)	$10^{-3}$	89,4
	$10^{-4}$	91,7
	$10^{-5}$	87,9
	$10^{-7}$	80,1

Fonte: Autoria própria (2022)

#### *Avaliação de citotoxicidade e genotoxicidade em Allium cepa*

Na Tabela 15 são apresentados índices mitóticos observados em raízes de *Allium cepa* para as substâncias avaliadas e para controle positivo metilmetanossulfonato (MMS). Com base nos resultados obtidos verifica-se que nenhum dos tratamentos avaliados causaram inibição da divisão celular nas pontas das raízes, mostrando-se não citotóxicos.

Os índices de alterações celulares observados após exposição de células meristemáticas de raízes de *Allium cepa* para as substâncias avaliadas são apresentados na Tabela 16. Os resultados obtidos mostram que os tratamentos analisados não causaram

alterações de fuso mitótico e quebra cromossômico em número significativo e, portanto, são não genotóxicos.

**Tabela 15 - Índices mitóticos observados em raízes de *A. cepa* expostas a diferentes tratamentos e tempos de exposição**

Substâncias Avaliadas	Concentração (mol/L)	Tempo de exposição (h)		
		0	24	48
MMS	10 <sup>-4</sup>	24,3±0,71 <sup>a</sup>	2,21±0,68 <sup>b</sup>	2,01±0,97 <sup>b</sup>
Ácido cinâmico	10 <sup>-4</sup>	17,2±1,71 <sup>a</sup>	22,4±0,90 <sup>a</sup>	19,0±0,39 <sup>a</sup>
	10 <sup>-5</sup>	20,1±0,74 <sup>a</sup>	22,0±0,52 <sup>a</sup>	19,9±0,90 <sup>a</sup>
	10 <sup>-7</sup>	29,9±0,55 <sup>a</sup>	21,0±0,77 <sup>a</sup>	18,0±0,70 <sup>a</sup>
Ácido 4-metoxicinâmico	10 <sup>-4</sup>	25,9±0,55 <sup>a</sup>	19,4±0,97 <sup>a</sup>	15,9±1,18 <sup>a</sup>
	10 <sup>-5</sup>	19,1±0,52 <sup>a</sup>	11,9±0,51 <sup>a</sup>	10,9±0,31 <sup>a</sup>
	10 <sup>-7</sup>	28,9±1,10 <sup>a</sup>	35,1±0,77 <sup>a</sup>	19,4±0,87 <sup>a</sup>
Cinamato de zinco (II)	10 <sup>-4</sup>	24,7±0,84 <sup>a</sup>	24,4±0,92 <sup>a</sup>	15,2±0,70 <sup>a</sup>
	10 <sup>-5</sup>	28,0±0,70 <sup>a</sup>	22,2±1,38 <sup>a</sup>	15,0±1,72 <sup>a</sup>
	10 <sup>-7</sup>	28,9±1,13 <sup>a</sup>	18,5±0,44 <sup>a</sup>	15,1±0,72 <sup>a</sup>
4-Metoxicinamato de zinco (II)	10 <sup>-4</sup>	20,9±0,32 <sup>a</sup>	13,1±0,36 <sup>a</sup>	17,4±0,32 <sup>a</sup>
	10 <sup>-5</sup>	31,4±1,04 <sup>a</sup>	32,4±0,16 <sup>a</sup>	19,2±1,17 <sup>a</sup>
	10 <sup>-7</sup>	23,3±0,91 <sup>a</sup>	19,3±0,23 <sup>a</sup>	15,1±1,09 <sup>a</sup>
Acetona	PA	22,9±2,01 <sup>a</sup>	14,1±0,21 <sup>a</sup>	14,9±1,78 <sup>a</sup>

Letras iguais significam que dentro de um mesmo tratamento os índices mitóticos dos tempos de exposição 24 e 48 horas não diferiram do seu respectivo controle (0h), e também não diferiram entre si. Letras diferentes significam o contrário de letras iguais. Os índices mitóticos dos tratamentos não iguais aos obtidos para o controle com metilmetanossulfonato (MMS). Os índices mitóticos obtidos para os tratamentos foram iguais aos obtidos para a acetona.

Fonte: Autoria própria (2022)

**Tabela 16 - Índices de alterações celulares observados após exposição de células meristemáticas de raízes de *A. cepa* a diferentes tratamentos e tempos de exposição**

Substâncias Avaliadas	Concentração (mol/L)	Tempo de exposição (h)		
		0	24	48
MMS	10 <sup>-4</sup>	0,01±0,31 <sup>a</sup>	7,14±1,25 <sup>b</sup>	9,03±1,17 <sup>b</sup>
Ácido cinâmico	10 <sup>-4</sup>	0,01±1,77 <sup>a</sup>	0,01±0,86 <sup>a</sup>	0,01±0,30 <sup>a</sup>
	10 <sup>-5</sup>	0,01±0,89 <sup>a</sup>	0,01±0,66 <sup>a</sup>	0,01±0,97 <sup>a</sup>
	10 <sup>-7</sup>	0,01±0,53 <sup>a</sup>	0,01±0,28 <sup>a</sup>	0,01±0,28 <sup>a</sup>
Ácido 4-metoxicinâmico	10 <sup>-4</sup>	0,01±0,57 <sup>a</sup>	0,01±1,04 <sup>a</sup>	0,01±1,22 <sup>a</sup>
	10 <sup>-5</sup>	19,1±0,61 <sup>a</sup>	0,01±0,82 <sup>a</sup>	0,01±1,00 <sup>a</sup>
	10 <sup>-7</sup>	0,01±1,17 <sup>a</sup>	0,04±0,70 <sup>a</sup>	0,01±0,92 <sup>a</sup>
Cinamato de zinco (II)	10 <sup>-4</sup>	0,01±0,88 <sup>a</sup>	0,01±1,93 <sup>a</sup>	0,01±0,68 <sup>a</sup>
	10 <sup>-5</sup>	0,01±0,38 <sup>a</sup>	0,01±1,00 <sup>a</sup>	0,01±1,00 <sup>a</sup>
	10 <sup>-7</sup>	0,01±1,34 <sup>a</sup>	18,5±0,45 <sup>a</sup>	0,01±0,45 <sup>a</sup>
4-Metoxicinamato de zinco (II)	10 <sup>-4</sup>	0,01±0,57 <sup>a</sup>	0,01±0,79 <sup>a</sup>	0,01±0,70 <sup>a</sup>
	10 <sup>-5</sup>	0,02±1,13 <sup>a</sup>	0,02±0,61 <sup>a</sup>	0,01±1,19 <sup>a</sup>
	10 <sup>-7</sup>	0,01±0,91 <sup>a</sup>	0,01±1,13 <sup>a</sup>	0,02±0,88 <sup>a</sup>
Acetona	PA	0,01±0,50 <sup>a</sup>	0,05±0,61 <sup>a</sup>	0,07±0,50 <sup>a</sup>

Letras iguais significam que dentro de um mesmo tratamento os índices de alterações celulares (IAC) dos tempos de exposição 24 e 48 horas não diferiram do seu respectivo controle (0h), e também não diferiram entre si. Letras diferentes significam o contrário. Os IAC dos tratamentos não foram iguais aos obtidos para o Controle com metilmetanossulfonato (MMS). Os IAC obtidos para os tratamentos foram iguais aos obtidos para a acetona.

Fonte: Autoria própria (2022)

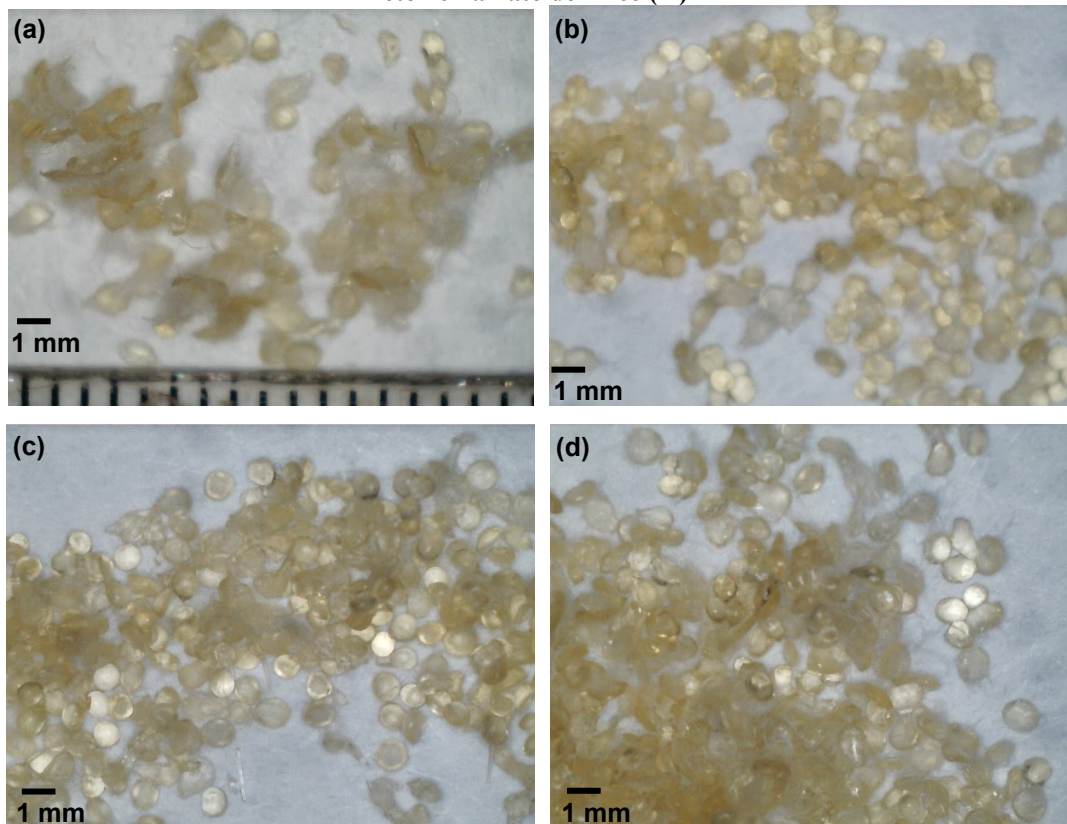


#### 5.4 Estudo de liberação controlada das substâncias bioativas

Os ácidos cinâmico e 4-metoxicinâmico e seus zincatos correspondentes foram encapsulados nas micropartículas de quitosana, utilizando o método de coagulação alcalina, que consiste no gotejamento de uma solução ácida de quitosana, contendo as substâncias avaliadas, em uma solução alcalina de hidróxido de sódio, provocando imediata coagulação do gel em formato esférico. Dessa forma, espera-se que as substâncias avaliadas sejam aprisionadas na matriz polimérica.

As imagens de microscopia óptica das microesferas obtidas estão apresentadas na Figura 33. A partir das imagens é possível observar a presença de micropartículas individualmente dispersas, com tamanho variando de 0,4 mm a 1 mm. Além disso, é possível observar que as micropartículas produzidas por este método apresentaram uma morfologia irregular, com a presença de partículas no formato esférico, de gota e esferas alongadas.

**Figura 33 - Imagens de microscopia óptica das micropartículas de quitosana com as substâncias avaliadas: (a) ácido cinâmico, (b) ácido 4-metoxicinâmico, (c) cinamato de zinco (II) e (d) 4-metoxicinamato de zinco (II)**



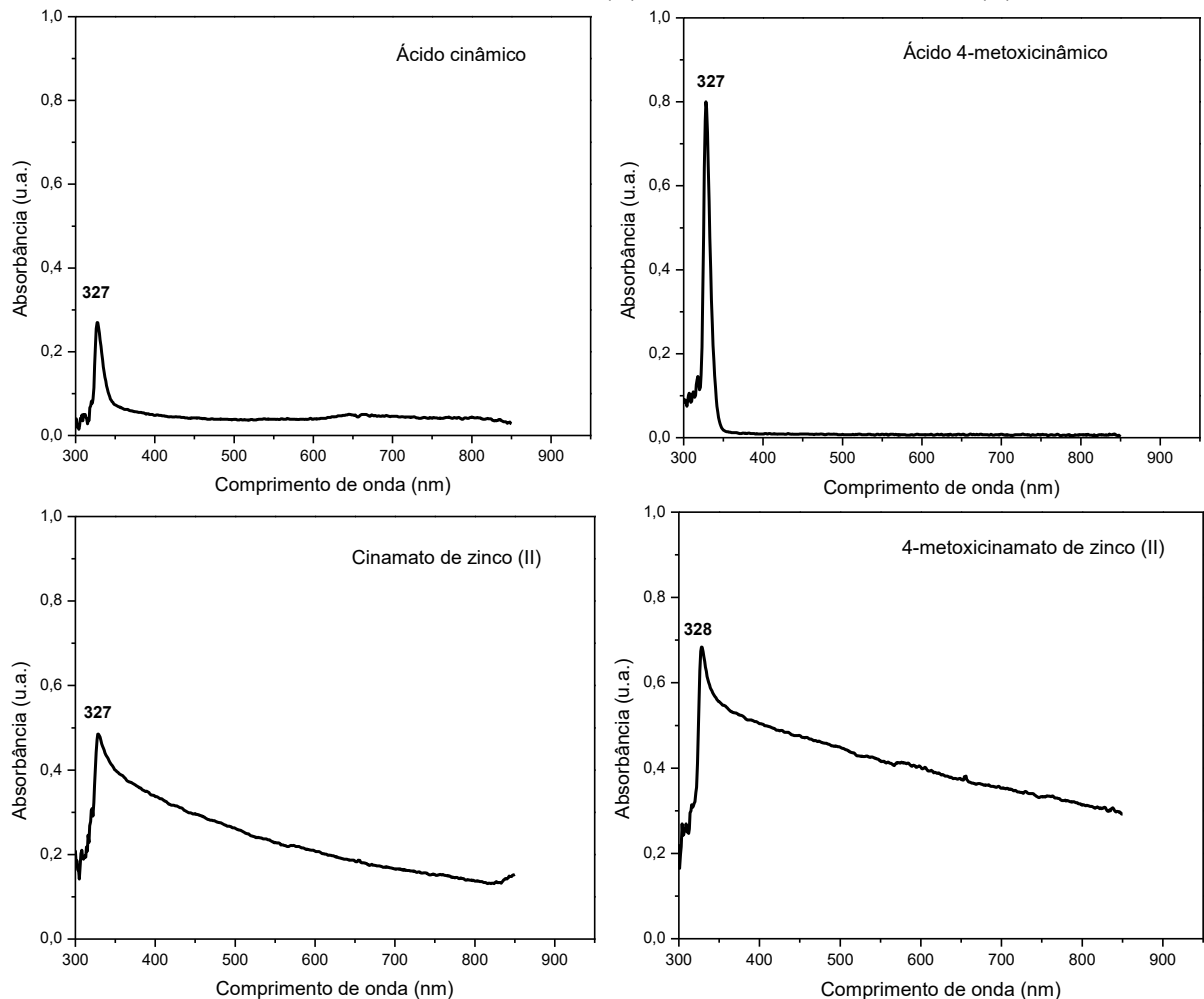
Fonte: Autoria própria (2022)

Com intuito de avaliar se os ácidos cinâmico e 4-metoxicinâmico e seus zincatos correspondentes foram encapsulados nas micropartículas de quitosana, o estudo da liberação

*in vitro* das substâncias incorporadas na quitosana foi realizado utilizando a técnica de espectrofotometria na região do ultravioleta-visível (UV-Vis).

Inicialmente, determinou-se os espectros de absorbância das soluções acetônicas dos ácidos cinâmico e 4-metoxicinâmico, do cinamato de zinco (II) e do 4-metoxicinamato de zinco (II) puros (Figura 34). De modo geral, é possível observar um pico de absorção máxima em 330 nm para todas as substâncias.

**Figura 34 - Espectro de absorbância *versus* comprimento de onda das soluções do ácido cinâmico, ácido 4-metoxicinâmico, cinamato de zinco (II) e 4-metoxicinamato de zinco (II)**

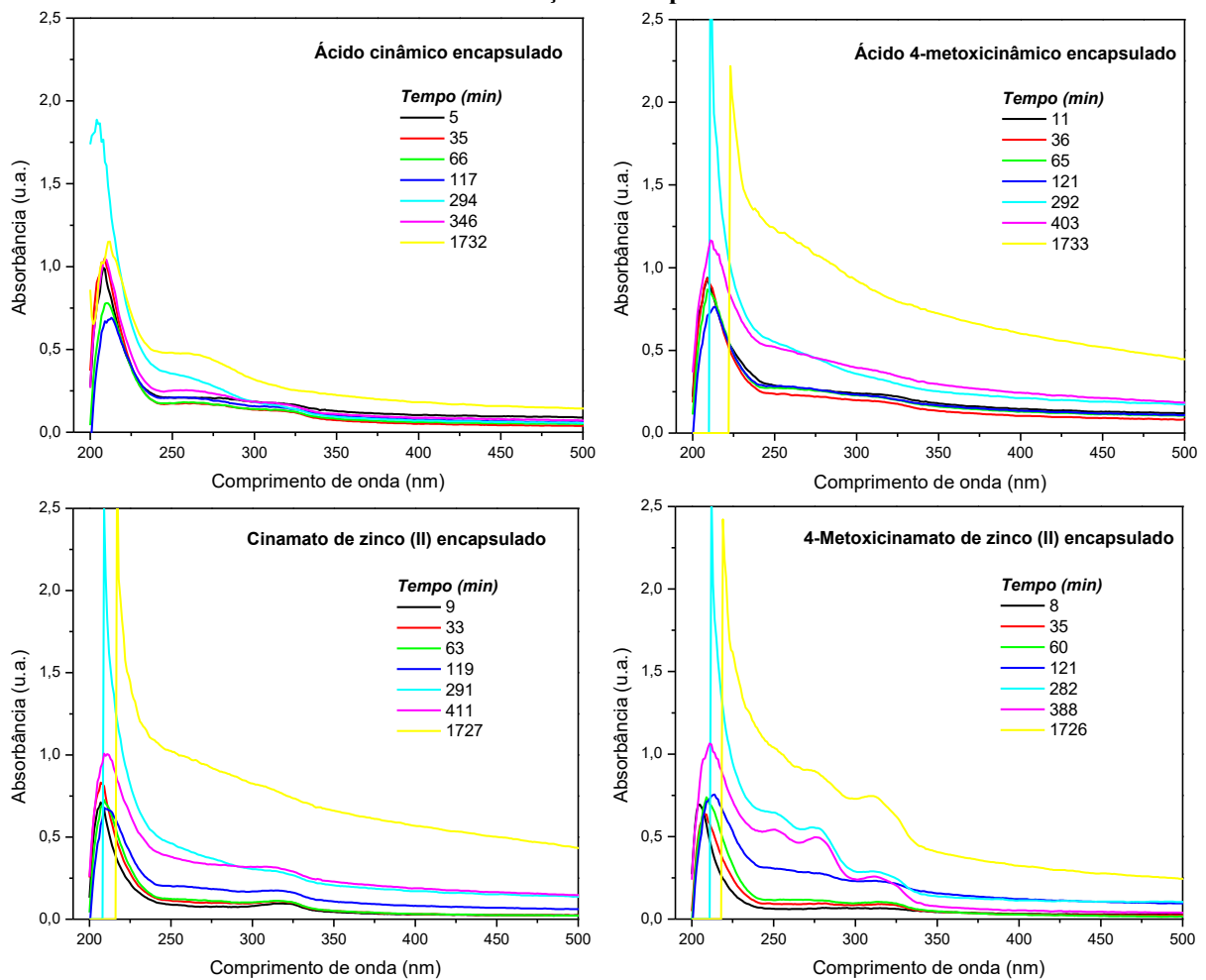


**Fonte: Autoria própria (2022)**

O estudo da liberação *in vitro* das substâncias avaliadas incorporadas nas micropartículas de quitosana foi realizado pela imersão das partículas obtidas em fluido de simulação gástrico, ou seja, em pH 1,2. Os espectros de absorbância *versus* comprimento de onda dos ácidos cinâmico e 4-metoxicinâmico, do cinamato de zinco (II) e do 4-metoxicinamato de zinco (II) encapsulados nas micropartículas de quitosana, em função do tempo, são apresentados na Figura 35. Nos espectros de absorbância é possível observar três

picos de absorção máxima, em 208, 260 e 330 nm. As absorções máximas em 208 e 260 nm são relativas as absorções da quitosana pura (PRIMO, 2015). O pico em 330 nm é referente a absorção máxima dos ácido cinâmico, 4-metoxicinâmico e dos zincatos, como apresentado na Figura 34. Além disso, esses resultados confirmam a encapsulação dos ácidos e dos zincatos nas micropartículas de quitosana.

**Figura 35 - Espectros de absorbância versus comprimento de onda dos ácido cinâmico, ácido 4-metoxicinâmico, cinamato de zinco (II) e 4-metoxicinamato de zinco (II) encapsulados com quitosana, em função do tempo**

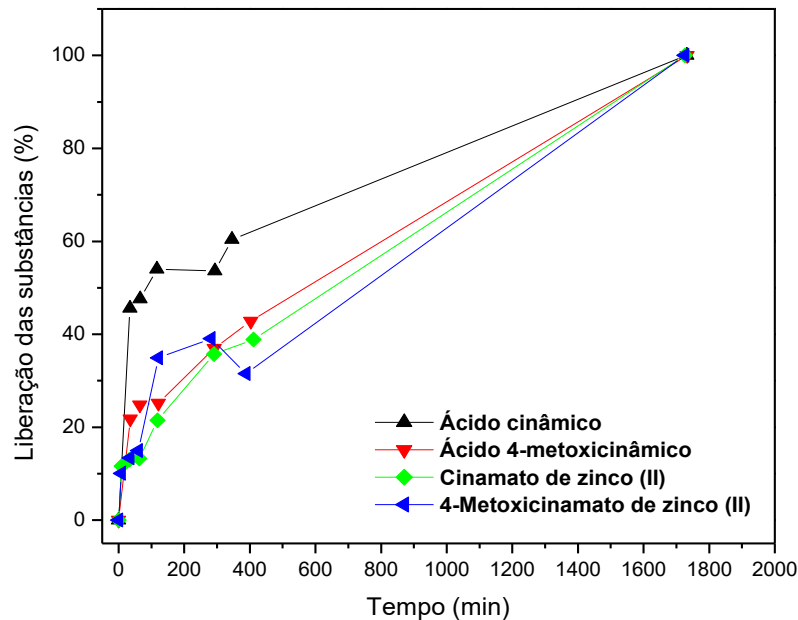


Fonte: Autoria própria (2022)

Na Figura 36 são apresentadas as curvas de liberação das substâncias encapsuladas, que foram construídas a partir dos espectros de absorbância em função do tempo (Figura 36). Os dados de liberação, avaliados por 24 horas em pH 1,2, das substâncias impregnadas nas micropartículas confirmam que, apesar da baixa permeabilidade das micropartículas de quitosana nesse meio, é possível a liberação das substâncias avaliadas em fluido de simulação gástrica. Os resultados mostram que, após 60 minutos em contato com o fluido de simulação gástrica, há liberação de 50% de ácido cinâmico e de 26% para ácido 4-metoxicinâmico. Para

os zincatos há uma liberação mais lenta, com liberação de ~15% de substância bioativa em 60 minutos.

**Figura 36 - Curvas de liberação dos ácido cinâmico, ácido 4-metoxicinâmico, cinamato de zinco (II) e 4-metoxicinamato de zinco (II) encapsulados com quitosana, no comprimento de onda de 327 nm, em fluidos de simulação gástrico**



Fonte: Autoria própria (2022)

O mecanismo de liberação dessas substâncias pode ser entendido levando em consideração que, nas matrizes hidrofílicas, por exemplo a quitosana, a liberação do fármaco incorporada é regulada pelo processo de intumescimento, difusão e erosão. Neste tipo de matriz polimérica, à medida que a água permeia, a superfície do polímero se hidrata e intumescce, fazendo com que o material fique com a camada gelificada e a substância encapsulada seja liberada. A taxa de liberação relativa observada para as substâncias avaliadas pode ser entendida levando em consideração as propriedades coeficiente de partição octanol-água ( $\log P$ ) e solubilidade em água (Tabela 17).

**Tabela 17 - Propriedades físicas relacionadas a solubilidade das substâncias avaliadas**

Substâncias avaliadas	miLogP	Solubilidade em água (mg/mL)
Ácido cinâmico	1,91	0,629
Ácido 4-metoxicinâmico	1,97	0,298
Cinamato de zinco (II)	4,15	$7,49 \cdot 10^{-3}$
4-Metoxicinamato de zinco (II)	4,26	$6,26 \cdot 10^{-3}$

Fonte: Autoria própria (2022)

A partir dos dados apresentados na Tabela 17, é possível entender que os compostos cinamato de zinco (II) e 4-metoxicinamato de zinco (II), incorporados em quitosana, possuem

um perfil de liberação mais controlado do que os ácidos cinâmicos, uma vez que possuem maiores valores de logP (maior interação com ambiente hidrofóbico) e menor solubilidade em água. Entre os ácidos cinâmicos, a taxa de liberação do ácido cinâmico é maior do que a observada para o ácido 4-metoxicionâmico, uma vez que o mesmo possui menor logP e maior solubilidade em água, que favorecem a difusão do mesmo para fora da cápsula de quitosana.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os compostos cinamato de zinco (II) e 4-metoxicinamato de zinco (II) foram sintetizados, utilizando metodologia simples, com bom rendimento. A análise dos compostos obtidos por: (i) FTIR, indica que os ligantes cinamatos se coordenam de forma bidentada aos íons zinco e; (ii) FTIR e Análise Termogravimétrica indicam a presença de água de coordenação, sugerindo que os complexos obtidos são do tipo  $Zn(L)_2 \cdot 2H_2O$ .

As propriedades farmacocinéticas dos ácidos cinâmico e 4-metoxicinâmico e dos zincatos correspondentes, avaliadas *in silico*, indicam que os compostos possuem propriedades ADME condizentes com substâncias bioativas candidatas à fármacos. O potencial de inibição da enzima urease pelos ácidos cinâmico e 4-metoxicinâmico e zincatos correspondentes foi confirmado por meio de avaliações *in silico* e *in vitro*. Avaliações, *in vivo*, utilizando o modelo *Allium cepa*, indicam que os ácidos cinâmico e 4-metoxicinâmico e os zincatos correspondentes não são citogênicos e genotóxicos;

A potencialidade de encapsulamento e de liberação controlada dos ácidos cinâmico e 4-metoxicinâmico e dos zincatos correspondentes foi confirmada utilizando fluido de simulação gástrico. Para essa condição de pH, observa-se que os ácidos cinâmicos possuem taxas de liberação maiores do que os zincatos correspondentes. O mecanismo de liberação dessas substâncias, a partir de cápsulas de quitosana, pode ser entendido utilizando as propriedades coeficiente de partição octanol-água e solubilidade em água.

No presente trabalho combinamos estudos *in silico*, por meio do uso de várias ferramentas computacionais, estudos *in vitro* e *in silico* de inibição de urease e estudos de encapsulamento e liberação de ácidos cinâmicos e cinamatos de zinco, que contemplam parte do esperado em P&D de novos fármacos. Os resultados apresentados indicam que as quatro substâncias avaliadas possuem potencial para serem utilizados como fármacos para a erradicação de *H. pylori*. No entanto, diferente do que esperado segundo indicação da literatura, o balanço entre as propriedades determinadas e avaliadas no presente trabalho indicam que, apesar da perda do efeito ulcerogênico reportado para os ácidos cinâmicos, os cinamatos de zinco não apresentam ganhos significativos em termos de propriedades ADME, além de predição de mais efeitos tóxicos/adversos do que os ácidos cinâmicos.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, Flávia Oliveira Monteiro da Silva. **Síntese e caracterização de hidrogéis biodegradáveis à base de quitosana com morfologia controlada com potencial aplicação como carreadores de fármacos**. 2008. Tese (Doutorado em Engenharia) – Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.
- ALIPOUR, M. Molecular Mechanism of Helicobacter pylori-induced gastric cancer. **Journal of gastrointestinal cancer**, v. 52, n. 1, p. 23-30, 2020.
- AL-RADADI, N. S. Microwave Assisted Green Synthesis of Fe@ Au Core-Shell NPs Magnetic to Enhance Olive oil Efficiency on Eradication of Helicobacter pylori (Life preserver). **Arabian Journal of Chemistry**, p. 103685, 2022.
- ALSARRA, I. A. Chitosan topical gel formulation in the management of burn wounds. **International journal of biological macromolecules**, v. 45, n. 1, p. 16-21, 2009.
- ARAÚJO, J. C.R.; CARVALHO, J. J.; SERRA, H. O. Influence of duodenogastric reflux in the gastric mucosa histological changes of rats infected with Helicobacter pylori. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 43, p. 235-242, 2016.
- AYOUB, I. M.; KORINEK, M.; EL-SHAZLY, M.; WETTERAUER, B.; EL-BESHBISHY, H. A.; HWANG, T.; CHEN, B.; CHANG, F.; WINK, M.; SINGAB, A. N. B.; YOUSSEF, F. Anti-Allergic, Anti-Inflammatory and Anti-Hyperglycemic Activity of Chasmanthe aethiopica Leaf Extract and Its Profiling Using LC/MS and GLC/MS. **Plants**, v. 10, n. 6, p. 1118, 2021.
- BARBOSA, J. A.; SCHINONNI, M. I. Helicobacter pylori: Associação com o câncer gástrico e novas descobertas sobre os fatores de virulência. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 10, n. 3, p. 254-262, 2011.
- BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J. M.; FELT, O.; PEPPAS, N.; GURNY, R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. **European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics**, v. 57, n. 1, p. 19-34, 2004.
- BIZERRA, A.; SILVA, V. Sistemas de liberação controlada: Mecanismos e aplicações. **Revista Saúde e Meio Ambiente**, v. 3, n. 2, p. 1-12, 2016
- BRASIL, Conselho Nacional de Saúde. Resolução Nº 466, de 12 de dezembro de 2012. Incorpora, sob a ótica do indivíduo e das coletividades, referenciais da bioética, tais como, autonomia, não maleficência, beneficência, justiça e equidade. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2012.
- BRAZ, R. F. Convivência com a Química de Produtos Naturais - importância, diversidade estrutural, interdisciplinaridade e contribuição social. *In*: CATAPAN, B. L. S. B. **A Produção do Conhecimento Voltada para a Ciência e Tecnologia**. Curitiba: Editora Reflexão Acadêmica, 2021. p. 57-109.

BRITO, B. B.; SILVA, F. A. F.; SOARES, A. S.; PEREIRA, V. A.; SANTOS, M. L. C.; SAMPAIO, M. M.; NEVES, P. H. M.; MELO, F. F. Pathogenesis and clinical management of *Helicobacter pylori* gastric infection. **World journal of gastroenterology**, v. 25, n. 37, p. 5578, 2019.

BURUCOA, C.; AXON, A. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. **Helicobacter**, v. 22, n. 22, 2017.

CALIXTO, P. S.; ALMEIDA, R. N.; SALVADORI, M. G. S.; MAIA, M. S.; FILHO, J. M. B.; SCOTTI, M. T., SCOTTI, L. In Silico Study Examining New Phenylpropanoids Targets with Antidepressant Activity. **Current Drug Targets**, v. 22, n. 5, p. 539-554, 2021.

CAMPOS, T. C.; VASCONCELOS, T. C. L. Aplicação de algoritmos de machine learning na área farmacêutica: uma revisão. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 15, p. e140101522862-e140101522862, 2021.

CANSIAN, R. L.; STAUDT, A.; BERNARDI, J. L.; PUTON, B. M. S.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V.; GOMES, A. C. C.; ANDRADE, B. C. O. P.; LEAL, I. C. R.; SIMAS, N. K.; ZENI, J.; JUNGUES, A.; DALLAGO, R. M.; BACKES, G. T.; PAROUL, N. Toxicity and larvicidal activity on *Aedes aegypti* of citronella essential oil submitted to enzymatic esterification. **Brazilian Journal of Biology**, v. 83, 2021.

CARLOSAMA-ROSETO, Y. H.; ACOSTA-ASTAIZAB, C. P.; SIERRA-TORRESBY, C. H.; BOLAÑOS-BRAVO, H. J. Genotipos de *Helicobacter pylori* asociados con cáncer gástrico y displasia en pacientes de Colombia. **Revista de Gastroenterología de México**, 2021.

CARTER, E. L.; FLUGGA, N.; BOER, J. L.; MULROONEY, S. B.; HAUSINGER, R. P. Interplay of metal ions and urease. **Metallomics**, v. 1, n. 3, p. 207-221, 2009.

CARVALHO, L. O. L.; REIS, T. S.; QUEMEL, G. K.C.; MOYSÉS, D. A.; GALUCIO, N. C. R.; CORREA, R. M. S. Atenção farmacêutica no uso de plantas medicinais com ação anti-hipertensiva em idosos. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 9, 2021.

CHANDRA, S.; ROY, A.; JANA, M.; PAHAN, K. Cinnamic acid activates PPAR $\alpha$  to stimulate Lysosomal biogenesis and lower Amyloid plaque pathology in an Alzheimer's disease mouse model. **Neurobiology of disease**, v. 124, p. 379-395, 2019.

CHOI, C.; NAM, J. P.; NAH, J. W. Application of chitosan and chitosan derivatives as biomaterials. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 33, p. 1-10, 2016.

CHU, Y. C.; WANG, T. T.; WANG, L. J.; LUO, Q. Y.; JIA, R.; HONG, T. C.; ZHU, H. L. Synthesis, characterization, and biological evaluation of a novel Zn (II)-Naproxen complex. **Polyhedron**, v. 163, p. 71-76, 2019.

CUNHA, E. S.; CHEN; X.; SANZ-GAITERO, M.; MILLS, D. J.; LUECKE, H. Cryo-EM structure of *Helicobacter pylori* urease with an inhibitor in the active site at 2.0 Å resolution. **Nature communications**, v. 12, n. 1, p. 1-8, 2021.



DILLON, C. T.; HAMBLEY, T. W.; KENNEDY, B. J.; LAY, P. A.; ZHOU, Q.; DAVIES, N. M.; BIFFIN, J. R.; REGTOP, H. L. Gastrointestinal toxicity, antiinflammatory activity, and superoxide dismutase activity of copper and zinc complexes of the antiinflammatory drug indomethacin. **Chemical research in toxicology**, v. 16, n. 1, p. 28-37, 2003.

DZIADKOWIEC, J.; MANSA, R.; QUINTELA, A.; ROCHA, F.; DETELLIER, C. Preparation, characterization and application in controlled release of Ibuprofen-loaded Guar Gum/Montmorillonite Bionanocomposites. **Applied Clay Science**, v. 135, p. 52-63, 2017.

FADDA, H. M.; MCCONNELL, E. L.; SHORT, M. D.; BASIT, A. W. et al. Meal-induced acceleration of tablet transit through the human small intestine. **Pharmaceutical research**, v. 26, n. 2, p. 356-360, 2009.

Farmacopéia Brasileira, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, v.1, 2010.

FERENC, W.; CRISTÓVAO, B.; SARZYŃSKI, J.; SADOWSKI, P. Complexes of the selected transition metal ions with 4-methoxycinnamic acid: Physico-chemical properties. **Journal of thermal analysis and calorimetry**, v. 110, n. 2, p. 739-748, 2012.

FERETTI, D.; ZERBINI, I.; ZANI, C.; CERETTI, E.; MORETTI, M.; MONARCA, S. Allium cepa chromosome aberration and micronucleus tests applied to study genotoxicity of extracts from pesticide-treated vegetables and grapes. **Food Additives and Contaminants**, v. 24, n. 6, p. 561-572, 2007.

FERREIRA, F. G.; POLLI, M. C.; OSHIMA F. Y.; FRACETO, L. F. Fármacos: do desenvolvimento à retirada do mercado. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.6, n.1, p.14-24, 2009.

FISKESJÖ, G. The Allium test as a standad in environmental monitoring. **Hereditas**. v. 102, n. 1 p. 99-112, 1985.

FILHO, A.C.V.A.; RODRIGUES, P.A.S.; BENJAMIN, S.R.; PAIM, R.T.T.; HOLANDA, M.O.; SILVA, J.Y.G.; MILO, T.S.; VIEIRA, I.G.P.; QUEIROZ, M.G.R.; GUEDES, M.I.F. Hypolipidemic activity of P-methoxycinnamic diester (PCO-C) isolated from Copernicia prunifera against Triton WR-1339 and hyperlipidemic diet in mice. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 56, p. 198-203, 2017.

FIORUCCI, S.; DISTRUTTI, E. COXIBs, CINODs and H<sub>2</sub>S-releasing NSAIDs: current perspectives in the development of safer non steroidal anti-inflammatory drugs. **Current medicinal chemistry**, v. 18, n. 23, p. 3494-3505, 2011.

FRANÇA, S. B.; CORREIA, P. R. S.; CASTRO, I. B. D.; SILVA, E. F. J.; BARROS, M. E. S. B.; LIMA, D. J. P. Síntese, aplicações e Relação Estrutura-Atividade (REA) de derivados de ácido cinâmico: uma revisão. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 1, 2021.

FRANCA, S. C.; ROBERTO, P. G.; MARINS, M. A.; PUGA, R. D.; RODRIGUES, A.; PEREIRA, J. O. Biosynthesis of secondary metabolites in sugarcane. **Genetics and Molecular Biology**, v. 24, n. 4, p. 243-250, 2001.

FRICKER, P. C.; GASTREICH, M.; RAREY, M. Automated drawing of structural molecular formulas under constraints. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 44, n. 3, p. 1065-1078, 2004.

GOEPP, J. G. Natural Solutions to Chronic Stomach Problems. **LifeExtension**, 2008.

GOH, K.; CHAN, W.; SHIOTA, S.; YAMAOKA, Y. Epidemiology of Helicobacter pylori infection and public health implications. **Helicobacter**, v. 16, p. 1-9, 2011.

GRAHAM, N. B. Polymeric inserts and implants for the controlled release of drugs. **British Polymer Journal**, v. 10, n. 4, p. 260-266, 1978.

GRANT, W. F. Chromosome aberration assays in Allium: A report of the US Environmental Protection Agency gene-tox program. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 99, n. 3, p. 273-291, 1982.

GRANT, W. F. Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations-a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals. **Mutat. Res.**, v. 426, p.107-112. 1999.

GROVER, I.S.; KAUR, S. Genotoxicity of wastewater samples from sewage and industrial effluent detected by the Allium root anaphase aberration and micronucleus assay. **Mutation Research**, v.426, p.183-188, 1999.

GURBANOVA, M.; LOBOICHENKO, V.; LEONOVA, N.; STRELETS, V.; SHEVCHENKO, R. Comparative assessment of the ecological characteristics of auxiliary organic compounds in the composition of foaming agents used for fire fighting. **Bulletin of the Georgian National Academy of Sciences**, v. 14, n. 4., p. 58-66, 2020.

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

GUIMARÃES, B. M.; RAMOS, K. A.; SOUZA, M. C.; FRANCO, M. L.; ALVES, C. C. S.; CARLI, A. P. COQUEIRO, J. M. Práticas terapêuticas com plantas medicinais para o tratamento do Diabetes Mellitus. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 10, 2021.

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. **Ribeirão Preto: FUNPEC**, v. 201, 2002.

GUNASEKARAN, S.; VENKATACHALAM, K.; JEYAVEL, K.; NAMASIVAYAM, N. Protective effect of p-methoxycinnamic acid, an active phenolic acid against 1, 2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis: Modulating biotransforming bacterial enzymes and xenobiotic metabolizing enzymes. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 394, n. 1, p. 187-198, 2014.

GUNASEKARAN, S.; VENKATACHALAM, K.; NAMASIVAYAM, N. Anti-inflammatory and anticancer effects of p-methoxycinnamic acid, an active phenylpropanoid, against 1, 2-dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 451, n. 1-2, p. 117-129, 2019.

GURBANOVA, M.; LOBOICHENKO, V.; LEONOVA, N.; STRELETS, V.; SHEVCHENKO, R. Comparative assessment of the ecological characteristics of auxiliary organic compounds in the composition of foaming agents used for fire fighting. **Bulletin of the Georgian National Academy of Sciences**, v. 14, n. 4, p. 58-66, 2020.

GURUNG, A. B.; ALI, M. A.; LEE, J.; FARAH, M. A.; AL-ANAZI, K. M. An Updated Review of Computer-Aided Drug Design and Its Application to COVID-19. **BioMed Research International**, v. 2021, 2021.

HAHLBROCK, Klaus; SCHEEL, Dierk. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. **Annual review of plant biology**, v. 40, n. 1, p. 347-369, 1989.

HANAI, K.; KUWAE, A.; TAKAI, T.; SENDA, H.; KUNIMOTO, K. K. A comparative vibrational and NMR study of cis-cinnamic acid polymorphs and trans-cinnamic acid. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 57, n. 3, p. 513-519, 2001.

HASSAN, U. H; SHAHZADB, M.; SHABBIRC, A.; JAHAND, S.; SALEEME, M.; BUKHARIF, I. A.; ASSIRIG, A. M. Amelioration of adjuvant induced arthritis in Sprague Dawley rats through modulation of inflammatory mediators by Ribes alpestre Decne. **Journal of ethnopharmacology**, v. 235, p. 460-471, 2019.

HENRIQUE, J. S.; FALCARE, R. S.; LOPES, P. S.. Sistemas de liberação controlada. **Pharmacia Brasileira**, v. 56, p. 22, 2006.

HOSOMI, H.; OHBA, S.; ITO, Y. Cis-Diaquabis (trans-cinnamato-O, O') zinc (II). **Acta Crystallographica Section C: crystal structure communications**, v. 56, n. 4, p. 123, 2000.

HUH, C. W.; KIM, B. Diagnosis of helicobacter pylori infection. **The Korean Journal of Gastroenterology**, v. 72, n. 5, p. 229-236, 2018.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Fases de desenvolvimento de um novo medicamento**, 2021. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/pesquisa/ensaios-clinicos/fases-desenvolvimento-um-novo-medicamento>. Acesso em: 27 de jan. de 2022

JAIN, N. K.; SINGH, A.; KULKARNI, S. K. Analgesic, anti-inflammatory and ulcerogenic activity of a zinc-naproxen complex in mice and rats. **Pharmacy and Pharmacology Communications**, v. 5, n. 10, p. 599-602, 1999.

JAROSZ, M.; SZKARADEK, N.; MARONA, H.; NOWAK, G.; MLYNIEC, K.; LIBROWSKI, T. Evaluation of anti-inflammatory and ulcerogenic potential of zinc-ibuprofen and zinc-naproxen complexes in rats. **Inflammopharmacology**, v. 25, n. 6, p. 653-663, 2017.

JOSUÉ, A.; LARANJEIRA, M.; FÁVERE, V. T.; KIMURA, I. Y.; PEDROSA, R. C. Controlled release of eosin impregnated in microspheres of chitosan/poly (acrylic acid) copolymer. **Polímeros**, v. 10, n. 3, p. 116-121, 2000.

KALINOWSKA, M.; ŚWISŁOCKA, R.; LEWANDOWSKI, W. Zn (II), Cd (II) and Hg (I) complexes of cinnamic acid: FT-IR, FT-Raman, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR studies. **Journal of Molecular Structure**, v. 993, p. 404-409, 2011.

KERAMATNIA, F.; SHAYANFAR, A.; JOUYBAN. Abolghasem. Thermodynamic solubility profile of carbamazepine–cinnamic acid cocrystal at different pH. *Journal of pharmaceutical sciences*, v. 104, n. 8, p. 2559-2565, 2015.

KISI, E. H.; ELCOMBE, M M. U parameters for the wurtzite structure of ZnS and ZnO using powder neutron diffraction. **Acta Crystallographica**, v. 45, n. 12, p. 1867-1870, 1989.

KUMAR, N.; PRUTHI, V. Structural elucidation and molecular docking of ferulic acid from *Parthenium hysterophorus* possessing COX-2 inhibition activity. **3 Biotech**, v. 5, n. 4, p. 541-551, 2015.

KURAŚ, M.; NOWAKOWSKA, J.; ŚLIWIŃSKA, E.; PILARSKI, R.; ILASZ, R.; TYKARSKA, T.; GULEWICZ, K. Changes in chromosome structure, mitotic activity and nuclear DNA content from cells of *Allium Test* induced by bark water extract of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, n. 2, p. 211-221, 2006.

LAGUNIN, A.; RUDIK, A.; FILIMONOV, D.; DRUZHILOVSKY, D.; POROIKOV, V. ROSC-Pred: web-service for rodent organ-specific carcinogenicity prediction. **Bioinformatics**, v. 34, n. 4, p. 710-712, 2017.

LAGUNIN, A.; ZAKHAROV, A.; FILIMONOV, D.; POROIKOV, V. V. QSAR modelling of rat acute toxicity on the basis of PASS prediction. **Molecular Informatics**, v. 30, n. 2-3, p. 241-250, 2011.

LANAS-GIMENO, A.; DOMINGO, S. M.; GOMOLLÓN, F. Tratamiento inicial y del fracaso en la erradicación de la infección por *Helicobacter pylori*. **Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado**, v. 13, n. 2, p. 106-110, 2020.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application. **Mutation research/reviews in mutation research**, v. 682, n. 1, p. 71-81, 2009.

LI, Q.; ZHANG, R.; ZHOU, Z.; SUN, W.; FAN, H.; WANG, Y.; XIAO, J.; SO, K.; YAO, X.; GAO, H. Phenylpropanoid glycosides from the fruit of *Lycium barbarum* L. and their bioactivity. **Phytochemistry**, v. 164, p. 60-66, 2019.

LI, S.; VERT, M. Biodegradable polymers: polyesters. *In: Encyclopaedia of Controlled Drug Delivery*. New York: John Wiley and Sons; v. 1, p. 71-93, 1999.

LI, W.; ZHAO, X.; SUN, X.; ZU, Y.; LIU, Y.; GE, Y. Evaluation of antioxidant ability in vitro and bioavailability of trans-cinnamic acid nanoparticle by liquid antisolvent precipitate. **Journal of Nanomaterials**, v. 2016, 2016.

LIM, Y. J.; LEE, J. S.; KU, Y. S.; HAHM, K. Rescue strategies against non-steroidal anti-inflammatory drug-induced gastroduodenal damage. **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 24, n. 7, p. 1169-1178, 2009.

LIMA, J. S.; REZA, D. L.; TEIXEIRA, S.; COSTA, C. Pesquisa clínica: fundamentos, aspectos éticos e perspectivas. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado do Rio de Janeiro**, v. 16, n. 4, p. 225-233, 2003.

LIU, Z.; JIAO, Y.; WANG, Y.; ZHOU, C.; ZHANG, Z. Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. **Advanced drug delivery reviews**, v. 60, n. 15, p. 1650-1662, 2008.

LIPINSKI, C. A. LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced drug delivery reviews**, v. 23, n. 1, p. 3-25, 2001.

LODHI, M. A. et al. Study of vanadium complexes as novel inhibitors of bacillus pasteurii and canavalia ensiformis urease enzyme. **Journal of the Chemical Society of Pakistan**, v. 37, n. 3, 2015.

LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 2, p. 143-154, 2005.

LORENZO, M. J. V., MARTÍNEZ, L. A.; BERNAL, J. G.; SURROCA, M. J. Comparative study of 3 drugs (aceglutamide aluminum, zinc acexamate, and magaldrate) in the long-term maintenance treatment (1 year) of peptic ulcer. **Revista española de enfermedades digestivas: organo oficial de la Sociedad Española de Patología Digestiva**, v. 80, n. 2, p. 91-94, 1991.

LOYD, A. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL H.C. Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos. 9. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

LUNGHINI, F.; MARCOU, G.; AZAM, P.; HORVATH, D.; PATOUX, R.; VAN MIERT, E.; VARNEK, A. Consensus models to predict oral rat acute toxicity and validation on a dataset coming from the industrial context. **SAR and QSAR in Environmental Research**, v. 30, n. 12, p. 879-897, 2019.

MA, T. H.; XU, Z.; XU, C.; MCCONELL, H.; RABAGO, E. V.; ARREOLA, H.; ZHANG, H. An improved Allium/Vicia root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutation Research**, v. 334, p. 185-195. 1995.

MAHMOOD, M. S.; ASHRAF, A.; ALI, S.; SIDDIQUE, A. B.; ASAD, F.; ABBAS, R. Z.; SIDDIQUE, F.; ASLAM, A.; ASLAM, R.; RAFIQUE. Portrayal of Punica granatum L. peel extract through High Performance Liquid Chromatography and antimicrobial activity evaluation. **Brazilian Journal of Biology**, v. 83, 2021.

MARIO, F.; CRAFA P.; BARCHI, A.; FRANZONI, L.; FRANCESCHI, M.; RUSSO, M.; BRICCA, L.; BROZZI, L.; CASTRO, K. R.; RUGGE, M. Pepsinogen II in gastritis and Helicobacter pylori infection. **Helicobacter**, p. e12872, 2022.

MARTINS, D. J.; SILVA, D. O. Complexos de zinco com os fármacos ibuprofeno e indometacina: Síntese, caracterização e análise do comportamento térmico. In: 31a. Reunião

Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2008, Águas de Lindóia. Anais da 31a. **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**. SP: SBQ, 2008.

MARSHALL, B. J.; WARREN, J. R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. **The lancet**, v. 323, n. 8390, p. 1311-1315, 1984.

MATSUMOTO S. T.; MANTOVANI M. S.; MALAGUTTI M. I. A.; DIAS A. L.; FONSECA I. C.; MARIN-MORALES M. A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 1, p. 148-158, 2006.

MATSUU-MATSUYAMA, M.; SHICHIJO, K.; OKAICHI, K.; NAKAYAMA, T.; NAKASHIMA, M.; UEMURA, T.; NIINO, D. SEKINE, I. Protection by polaprezinc against radiation-induced apoptosis in rat jejunal crypt cells. **Journal of radiation research**, v. 49, n. 4, p. 341-347, 2008.

MAZZEO, D.E.C.; FERNANDES, T.C.C.; LEVY, C.E.; FONTANETTI, C.S.; MARINMORALES, M.A. Monitoring the natural attenuation of a sewage sludge toxicity using the *Allium cepa* test. **Ecol Indic**, v.56, p. 60–69, 2015.

MENKE, M.; CHEN, I. P.; ANGELIS, K. J.; SCHUBERT, I. DNA damage and repair in *Arabidopsis thaliana* as measured by the comet assay after treatment with different classes of genotoxins. **Mutat. Res.**, v. 493, p. 87-93. 2001.

MORAES, J. N.; SOUZA, G. O. Plantas medicinais amazônicas utilizadas na terapêutica de distúrbios do sistema digestório: uma revisão de literatura. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 15, 2021.

MORGADO, P. I.; MIGUEL, S. P.; CORREIA, I. J.; AGUIAR- RICARDO, A. Ibuprofen loaded PVA/chitosan membranes: A highly efficient strategy towards an improved skin wound healing. **Carbohydrate polymers**, v. 159, p. 136-145, 2017.

MOURA, D.; MANO, J. F.; PAIVA, M. C.; ALVES, N. M. Chitosan nanocomposites based on distinct inorganic fillers for biomedical applications. **Science and Technology of advanced MaTerialS**, v. 17, n. 1, p. 626-643, 2016.

NANDI, C. K.; HAZRA, M. K.; CHAKRABORTY, T. Vibrational coupling in carboxylic acid dimers. **The Journal of chemical physics**, v. 123, n. 12, p. 124310, 2005.

NOLASCO, M. M.; AMADO, A. M.; RIBEIRO-CLARO, P. J. A. Effect of hydrogen bonding in the vibrational spectra of trans-cinnamic acid. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 40, n. 4, p. 394-400, 2009.

NÚÑEZ, C.; FERNÁNDEZ-LODEIRO, A.; FERNÁNDEZ-LODEIRO, J.; CARBALLO, J.; CAPELO, J. L.; LODEIRO, C. Synthesis, spectroscopic studies and in vitro antibacterial activity of Ibuprofen and its derived metal complexes. **Inorganic chemistry communications**, v. 45, p. 61-65, 2014.

OLIVEIRA, C. C. A.; SANTOS, J. S. Compostos ativos de capim-cidreira (*Cymbopogon citratus*): uma revisão. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 12, 2021.

OLIVEIRA, M. E. P.; SILVA, W. M. B.; ALVES, D. R.; NETO, J. B. A.; PINHEIRO, S. O. Estudo do complexo inorgânico 2, 2'-bipiridinaquercetinaferro (II) como proposta para atividades biológicas. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 7, p. 51892-51899, 2020.

PAIM, R. T. T.; RODRIGUES, P. S. A.; SILVA, J. Y. G.; PAULA, V. F. J.; SILVA, B. B.; FREITAS, C. A. S.; ORIÁ, R. B.; FLOREAN, O. P. T.; RONDINA, D.; GUEDES, M. I. F. *p*-Methoxycinnamic Acid Diesters Lower Dyslipidemia, Liver Oxidative Stress and Toxicity in High-Fat Diet Fed Mice and Human Peripheral Blood Lymphocytes. **Nutrients**, v. 12, n. 1, p. 262, 2020.

PALMIERI, G. F.; CANTALAMESSA, F.; DI MARTINO, P.; NASUTI, C.; MARTELLI, S. Lonidamine solid dispersions: in vitro and in vivo evaluation. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 28, n. 10, p. 1241-1250, 2002.

PARANHOS, R. O. S.; OLIVEIRA, L. S. Os benefícios medicinais da própolis verde (*Baccharis dracunculifolia* dc), utilizada popularmente através de suas propriedades antiinflamatória e antibacteriana. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**, v. 7, n. 10, p. 1208-1221, 2021.

PARVAN, L. G.; LEITE, T. G.; FREITAS, T. B.; PEDROSA, P. A. A.; CALIXTO, J. S.; AGOSTINHO, L. A. Bioensaio com *Allium cepa* revela genotoxicidade de herbicida com flumioxazina. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 11, p. 10-10, 2020.

PENG, C.; SANG, S.; SHEN, X.; ZHANG, W.; YAN, J.; CHEN, P.; JIANG, C.; YUAN, Y.; ZHU, W.; YAO, M. In vitro anti-*Helicobacter pylori* activity of *Syzygium aromaticum* and the preliminary mechanism of action. **Journal of Ethnopharmacology**, p. 114995, 2022.

PEREIRA, D. G. Importância do metabolismo no planejamento de fármacos. **Química Nova**, v. 30, v. 1, p. 171-177, 2007.

PEREIRA, I. S.; PINA, A.; ANTUNES, L. E. C.; CAMPOS, A. D.; FACHINELLO, J. C. Genotypic differences in cyanogenic glycosides levels of compatible *Prunus persica* P. *persica* and incompatible *P. persica* P. *mume* combinations. **Bragantia**, v. 77, n. 1, p. 1-12, 2018.

PÉREZ-PÉREZ, G. I.; BLASER, M. J. **Campylobacter and Helicobacter - medical microbiology**. 4. ed. Galveston, Texas: University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996.

PETTERSEN, E. F.; GODDARD, T. D.; HUANG, C. C.; COUCH, G. S.; GREENBLATT, D. M.; MENG, E. C.; FERRIN, T. E. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of computational chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605-1612, 2004.

PEZZINI, B. R.; SILVA, M. A. S.; FERRAZ, H. G. Formas farmacêuticas sólidas orais de liberação prolongada: sistemas monolíticos e multiparticulados. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, p. 491-502, 2007.

PIMENTEL, L. F.; JÁCOME JÚNIOR, A. T.; MOSQUEIRA, V. C. F.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 4, p. 503-514, 2007.

PŁOWUSZYŃSKA, A.; GLISZCZYŃSKA, A. Recent Developments in Therapeutic and Nutraceutical Applications of p-Methoxycinnamic Acid from Plant Origin. **Molecules**, v. 26, n. 13, p. 3827, 2021.

POROIKOV, V. V.; FILIMONOV, D. A.; GLORIOZOVA, T. A.; LAGUNIN, A. A.; DRUZHILOVSKIY, D. S.; RUDIK, A. V.; POGODIN, P. V. Computer-aided prediction of biological activity spectra for organic compounds: The possibilities and limitations. **Russian Chemical Bulletin**, v. 68, n. 12, p. 2143-2154, 2019.

PRIMO, J. O. **Estudo Visando à Obtenção de Nanopartículas e Géis de Quitosana para Liberação Controlada de Substâncias Bioativas**. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Licenciatura em Química) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2015.

PROTTI, I. F.; MOREIRA, M. F.; COSTA, Y. F. G.; GARCIA, G. G.; MORAES, W. G.; ALVES, M. S.; MALTAROLLO, V. G.; OLIVEIRA, R. B. **Síntese e avaliação da atividade antibacteriana de análogos híbridos da afn-1252 como potenciais inibidores de enoil-acp-redutase (FABI)**. v. 4, p. 99, 2020.

RANK, J.; NIELSEN, M. H. Genotoxicity testing of wastewater sludge using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 418, n. 2-3, p. 113-119, 1998.

RAO, K. S. V. K.; NAIDU, B. V. K.; SUBHA, M. C. S.; SAIRAM, M.; AMINABHAVI, T. M. Novel chitosan-based pH-sensitive interpenetrating network microgels for the controlled release of cefadroxil. **Carbohydrate Polymers**, v. 66, n. 3, p. 333-344, 2006.

RATHGEBER, J.; ZÜCHNER, K.; BURCHARDI, H. Conditioning of air in mechanically ventilated patients. In: Yearbook of intensive care and emergency medicine. **Springer**, Berlin, Heidelberg, 1996. p. 501-519.

RAVEN, N.; SCHILLBERG, S.; KIRCHHOFF, J.; BRÄNDLI, J.; IMSENG, N.; EIBL, R. Growth of BY-2 suspension cells and plantibody production in single-use bioreactors *In*: EIBL, R.; EIBL, D. **Single-Use Technology in Biopharmaceutical Manufacture**, John Wiley & Sons, 2019.

REZAEI, E. B.; ABEDINIFAR, F.; AZIZIAN, H.; MONTAZER, M. N.; ASADI, M.; HOSSEINI, S.; MAHDAVI, M. Design, synthesis, and evaluation of metronidazole-1, 2, 3-triazole derivatives as potent urease inhibitors. **Chemical Papers**, v. 75, n. 8, p. 4217-4226, 2021.

RIOS, M. Polymers for Controlled Release: Formulation Follows Function. **Pharm. Technol.**, v. 29, n. 6, p. 42-50, 2005.

ROBINSON, K.; ATHERTON, J. C. The Spectrum of Helicobacter-Mediated Diseases. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 16, p. 123-144, 2021.



RODRIGUES, C. C. R.; HELENO, M. A. G.; CHIKUCHI H. A.; GALEMBECK, E. **Preparo de lâmina para observação de mitose de célula vegetal ao microscópio óptico.** Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

RODRÍGUEZ, S. A.; DÍAZ, R. M. Multicenter clinical trial of zinc acexamate in the prevention of nonsteroidal antiinflammatory drug induced gastroenteropathy. **The Journal of Rheumatology**, v.6, n.21, p. 927-933, 1994.

RONQUI, C. L.; CRUZ, M. C. P.; INNOCENTINI-MEI, L. H. Liberação Controlada da Oxitetraciclina no Sistema Quitosana/Alginato/PEG. In: **VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica.** 2005. p. 1-6.

RUDIK, A. V.; BEZHENTSEV, V. M.; DMITRIEV, A. V.; DRUZHILOVSKIY, D. S.; LAGUNIN, A. A.; FILIMONOV, D. A.; POROIKOV, V. V. MetaTox: web application for predicting structure and toxicity of xenobiotics' metabolites. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 57, n. 4, p. 638-642, 2017.

RUDIK, A. V.; DMITRIEV, A. V.; LAGUNIN, A. A.; IVANOV, S. M.; FILIMONOV, D. A.; POROIKOV, V. V. Computer-Aided Xenobiotic Toxicity Prediction Taking into Account their Metabolism in the Human Body. **Biochemistry, Supplement Series B: Biomedical Chemistry**, v. 13, n. 3, p. 228-236, 2019.

RUWIZHI, N.; ADERIBIGBE, B. A. Cinnamic acid derivatives and their biological efficacy. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 16, p. 5712, 2020.

SAAD, G., A.; LÉDA, P. H. O.; SÁ, I. M.; SEIXLACK, A. C.C. **Fitoterapia Contemporânea: tradição e ciência na prática clínica.** 2. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

SABE, V. T.; NTOMBELA, T.; JHAMBHA, L. A.; MAGUIRE, G. E.; GOVENDER, T.; NAICKER, T.; KRUGER, H. G. Current trends in computer aided drug design and a highlight of drugs discovered via computational techniques: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 224, p. 113705, 2021.

SALAR, Antonio. Linfoma MALT gástrico y Helicobacter pylori. **Medicina Clínica**, v. 152, n. 2, p. 65-71, 2019.

SANTOS, L. H.; FERES, C.A.O.; MELO, F.H.; COELHO, M.M.; NOTHENBERG, M.S; OGA S.; TAGLIATI, C.A. Anti-inflammatory, antinociceptive and ulcerogenic activity of a zinc-diclofenac complex in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, p. 1205-1213, 2004.

SANTOS, J. A. B. **Obtenção, caracterização e avaliação físico-química de cocrystal de ácido cinâmico.** 2019. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2019.

SHAYANFAR, A.; ASADPOUR-ZEYNALI, K.; JOUYBAN, A. Solubilidade e taxa de dissolução de um cocrystal de carbamazepina-ácido cinâmico. **Journal of Molecular Liquids**, v. 187, p. 171-176, 2013.

SILVA, D. A. **Screening de produtos naturais com potencialidade para tratamento de doenças ocasionadas por *Helicobacter pylori*: um estudo in vitro e in silico**. 2015.

Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Química), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2015.

SIMÕES, C. M. D. O.; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017.

SJOBLOM, B. Method to obtain microparticles. /US Patent n. 20046753014/ (22 de junho de 2004).

SOLANO, J.; SOARES, J. A.; BORGES, N.; ARAÚJO, D.; KARSBURG, I. Avaliação do efeito mutagênico da solução aquosa de *Hymenea coubaril* L. com uso dos biotestes *Allium cepa* e *Lactuca sativa*. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, v. 11, n. 21, 2015.

SOLTANIAN, S.; RIAHIRAD, H.; PABARJA, A.; JAFARI, E.; KHANDANI, B. K. Effect of Cinnamic acid and FOLFOX in diminishing side population and downregulating cancer stem cell markers in colon cancer cell line HT-29. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 26, n. 1, p. 19-29, 2018.

SONG, D.; GUANG-LU, L.; XUE, M.; QIO, T.; WANG, H.; SHAN, L.; LIU, L. CHEN, J. In vitro and in vivo evaluation of antiviral activity of a phenylpropanoid derivative against spring viraemia of carp virus. **Virus Research**, v. 291, 2021.

STAHL, J. P; BOUTOILLE, D.; SAIDANI, N.; BOTELHO-NEVERS, E.; ALFANDARI, S.; GUIMARD, T; DINH, A.; CHAVANET, P.; LONGSHAW, C.; LOPES, S. Étude CARBAR en France: épidémiologie des pathogènes à Gram négatif. **Médecine et Maladies Infectieuses**, v. 50, n. 6, p. 123, 2020.

STANTON, M, K.; BAK, A. Physicochemical properties of pharmaceutical co-crystals: A case study of ten AMG 517 co-crystals. **Crystal Growth and Design**, v, 8, n, 10, p, 3856–3862, 2008.

STIERAND, K.; MAAß, P. C.; RAREY, M. Molecular complexes at a glance: automated generation of two-dimensional complex diagrams. **Bioinformatics**, v. 22, n. 14, p. 1710-1716, 2006.

SUDHA, P. N.; SARANYA, M.; GOMATHI, T.; GOKILA, S.; AISVERYA, S.; VENKATESAN, J.; ANIL, S. Perspectives of chitin-and chitosan-based scaffolds dressing in regenerative medicine. **Chitosan Deriv Comp Appl**, p. 253-269, 2017.

SUKUL, A.; PODDAR, S, K.; HAQUE, S.; SAHA, S. K.; CHANDRA S.; AL MAHMUD, Z.; RAHMAN, S. M K. Synthesis, Characterization and comparison of local analgesic, anti-inflammatory, anti-ulcerogenic activity of copper and zinc complexes of indomethacin. **Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 3, p. 221-233, 2016.

SZYMAŃSKA, E.; WINNICKA, K. Stability of chitosan—a challenge for pharmaceutical and biomedical applications. **Marine drugs**, v. 13, n. 4, p. 1819-1846, 2015.

TACHOUA, W.; KABRINE, M.; MUSHTAQ, M.; UL-HAQ, Z. An in-silico evaluation of COVID-19 main protease with clinically approved drugs. **Journal of molecular graphics and modelling**, v. 101, p. 107758, 2020.

TSUKUDA, Y.; MIZUHARA, N.; USUKI, Y.; YAMAGUCHI, Y.; OGITA, A.; TANAKA, T.; FUJITA, K. Structure–activity relationships of antifungal phenylpropanoid derivatives and their synergy with n-dodecanol and fluconazole. **Letters in Applied Microbiology**, 2021.

URITA, Y.; WATANABE, T.; KAWAGOE, N.; TAKEMOTO, I.; TANAKA, H.; KIJIMA, S.; KIDO, H.; MAEDA, T.; SUGASAWA, Y.; MIYAZAKI, T.; HONDA, Y.; NAKANISH, K.; SHIMADA, N.; NAKAJIMA, H.; SUGIMOTO, M.; URITA, C. Role of infected grandmothers in transmission of *Helicobacter pylori* to children in a Japanese rural town. **Journal of paediatrics and child health**, v. 49, n. 5, p. 394-398, 2013.

VAILLANT, L.; Oster, P.; McMillan, B.; Fernandez, E. O.; Velin, D. GM-CSF is key in the efficacy of vaccine-induced reduction of *Helicobacter pylori* infection. **Helicobacter**, p. e12875, 2022.

VARUM, F. O.; BASIT, A. W.; SOUSA, J.; VEIGA, F. Estudos de mucoadesão no trato gastrointestinal para o aumento da biodisponibilidade oral de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, p. 535-548, 2008.

VERMA, A. Lead finding from *Phyllanthus debelis* with hepatoprotective potentials. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 3, p. S1735-S1737, 2012.

VIEGAS C. J.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química nova**, v. 29, p. 326-337, 2006.

VOGT, Thomas. Phenylpropanoid biosynthesis. **Molecular plant**, v. 3, n. 1, p. 2-20, 2010.

WEATHERBURN, M. W. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. **Analytical chemistry**, v. 39, n. 8, p. 971-974, 1967.

WESTON, G. S.; YEBOAH, K. G. Site-specific drug delivery to the gastrointestinal tract. **Journal of Molecular Pharmaceutics & Organic Process Research**, v. 1, n. 2, p. 106, 2013.

WILCZEWSKA, A. Z.; NIEMIROWICZ, K.; MARKIEWICZ, K. H.; CAR, H. Nanoparticles as drug delivery systems. **Pharmacological Reports**, v. 64, p. 1020-1037, 2012.

WYLIE, M.R.; WINDHAM, I. H.; BLUM, F. C.; WU, H.; MERRELL, S. In vitro antibacterial activity of nimbolide against *Helicobacter pylori*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 285, p. 114828, 2022.

YAN, J.; PENG, C.; CHEN, P.; ZHANG, W.; JIANG, C.; SANG, S.; ZHU, W.; YUAN, Y.; HONG, Y.; YAO, M. In-vitro anti-*Helicobacter pylori* activity and preliminary mechanism of action of *Canarium album* Raeusch. fruit extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 283, p. 114578, 2022.

YANG, H.; LOU, C.; SUN, L.; LI, J.; CAI, Y.; WANG, Z.; TANG, Y. admetSAR 2.0: web-service for prediction and optimization of chemical ADMET properties. **Bioinformatics**, v. 35, n. 6, p. 1067-1069, 2018.

YANG, J. M.; CHEN, C. C. iGEMDOCK: ageneric evolutionary method for molecular docking. **Protein: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 55, n. 2, p. 288-304, 2004.

YEE, S. In vitro permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict in vivo (small intestinal) absorption in man—fact or myth. **Pharmaceutical research**, v. 14, n. 6, p. 763-766, 1997.

YILMAZ, S.; SOVA, M.; ERGÜN, S. Antimicrobial activity of trans-cinnamic acid and commonly used antibiotics against important fish pathogens and nonpathogenic isolates. **Journal of Applied Microbiology**, v. 125, n. 6, p. 1714-1727, 2018.

ZAKHAROV, A. V.; PEACH, M. L.; SITZMANN, M.; NICKLAUS, M. C. A new approach to radial basis function approximation and its application to QSAR. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 54, n. 3, p. 713-719, 2014.

ZANATTA, C. S. **Preparação e caracterização de óxido de zinco nanoestruturado**. 2009. Dissertação de mestrado - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências, Bauru, 2009.

ZELEŇÁK, V.; VARGOVÁ, Z.; GYÖRYOVÁ, K. Correlation of infrared spectra of zinc (II) carboxylates with their structures. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 66, n. 2, p. 262-272, 2007.

ZHANG, X. L.; CAO, M. A.; PU, L. P.; HUANG, S. S.; GAO, Q. X.; YUAN, C. S.; WANG, C. M. A novel flavonoid isolated from *Sophora flavescens* exhibited anti-angiogenesis activity, decreased VEGF expression and caused G0/G1 cell cycle arrest in vitro. **Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 68, n. 5, p. 369-375, 2013.

ZHU, Yucun. **Properties of polymeric drug delivery systems prepared by hot-melt extrusion**. 2002. Tese de Doutorado - The University of Texas at Austin, 2002.

ZHOU, Q.; HAMBLEY, T. W.; KENNEDY, B. J.; LAY, P. A.; TURNER, P.; WARWICK, B.; REGTOP, H. L. Syntheses and characterization of anti-inflammatory dinuclear and mononuclear zinc indomethacin complexes. Crystal structures of [Zn<sub>2</sub> (indomethacin)<sub>4</sub> (L)<sub>2</sub>](L= N, N-dimethylacetamide, pyridine, 1-methyl-2-pyrrolidinone) and [Zn (indomethacin)<sub>2</sub> (L<sub>1</sub>)<sub>2</sub>](L<sub>1</sub>= ethanol, methanol). **Inorganic Chemistry**, v. 39, n. 17, p. 3742-3748, 2000.