



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

**Estudo da Interferência de Neolignanas Bioativas Isoladas e do Extrato
Hidroalcoólico de *Piper rivinoides* Kunth (Piperaceae) na
atividade do CYP1A**

Rio de Janeiro

2024

Carlos Henrique Ramos

Estudo da Interferência de Neolignanas Bioativas Isoladas e do Extrato Hidroalcoólico de *Piper rivinoides* Kunth (Piperaceae) na atividade do CYP1A



Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Davyson de Lima Moreira

Coorientadores: Prof. Dr. Francisco Jose Roma Paumgartten

Prof^a. Dra. Nelilma Correia Romeiro

Rio de Janeiro
2024

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC-A

R175 Ramos, Carlos Henrique
 Estudo da interferência de neolignanas bioativas isoladas e do extrato hidroalcoólico de *Piper rivinoides* Kunth (Piperaceae) na atividade do CYP1As/Carlos Henrique Ramos. – 2024.
 94 f.: il.

Orientador: Davyson de Lima Moreira
Coorientadores: : Francisco Jose Roma Paumgarten, Nelilma Correia Romeiro.
Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes.

1. Plantas medicinais - Teses. 2. Piperaceae - Teses. 3. Fitoquímicos - Teses. I. Moreira, Davyson de Lima.. II. Paumgarten, Francisco Jose Roma. III. Romeiro, Nelilma Correia. IV. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. V. Título.

CDU 633.88(81)

Patricia Bello Meijinhos CRB7/5217 - Bibliotecária responsável pela elaboração da ficha catalográfica

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Carlos Henrique Ramos

Estudo da Interferência de Neolignanas Bioativas Isoladas e do Extrato Hidroalcoólico de *Piper rivinoides* Kunth (Piperaceae) na atividade do CYP1A

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 07 de Junho de 2024 Banca

Examinadora:

Prof. Dr. Davyson de Lima Moreira
Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro-IPJB/RJ

Prof. Dr. Flavio José da Silva Dantas
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof^a. Dra. Selma Ribeiro de Paiva
Universidade Federal Fluminense - UFF

Prof^a. Dra. Maria Regina Gomes Carneiro
Escola Nacional de Saúde Pública-Ensp/Fiocruz

Prof. Dr. George Azevedo Queiroz
Universidade do Estado do Rio de Janeiro/Campus Zona Oeste

Prof. Dra. Manuela Leal da Silva
Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ

Rio de Janeiro

2024

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família e minha fê.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me ter dado a vida e saúde até aqui, e peço sabedoria e humildade para continuar minha jornada.

Agradeço a meus pais (*in memoriam*) por toda a educação e por me ensinarem o significado do respeito, da humildade e da autoestima. Espero estar à altura de seus olhares.

Agradeço a minha esposa, Luciana da Costa, por cuidar de mim e por me apoiar sempre em todas as decisões que tomei e venha a tomar, apesar de todas as dificuldades.

Agradeço aos meus irmãos por estarem sempre juntos, sempre querendo o melhor para mim, além de todo o carinho e orgulho.

Agradeço ao meu orientador, professor Dr. Davyson Moreira, por todo o ensinamento, apoio, aprendizado e amizade.

Agradeço ao meu coorientador, professor Dr. Francisco José de Roma Paumgarten, por me receber em seu grupo, por todo o apoio, confiança e por todo o aprendizado.

Agradeço a minha coorientadora, professora Dra. Nelilma Romeiro, por aceitar o desafio de me ensinar toda a parte de *docking* molecular sem mesmo me conhecer pessoalmente, pela qual terei eterna gratidão.

Agradeço à professora Dra. Ana Cecília Amado Xavier de Oliveira, que mesmo aposentada me ofereceu ensinamentos e paciência na interpretação dos resultados bioquímicos. Deixo meu carinho e gratidão.

Agradeço a todos do Laboratório de Toxicologia Ambiental (LTA-ENSP/Fiocruz), por todo o apoio desde meu primeiro dia, em especial a Rosângela, que nunca mediu esforços para me ajudar sempre que recorria ao seu auxílio.

Agradeço a todos os amigos que conquistei nessa jornada, por estarem juntos em momentos difíceis e de descontração.

Agradeço ao programa de pós-graduação em biologia vegetal (PGBV/UERJ) por me acolher como aluno, pelo aprendizado e por permitir o compartilhamento com diferentes profissionais.

Agradeço ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) por permitir a utilização das dependências e equipamentos que foram cruciais para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço à Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pelo incentivo financeiro.

A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.

(Arthur Schopenhauer)

RESUMO

RAMOS, Carlos Henrique. **Estudo da Interferência de Neolignanas Bioativas Isoladas e do Extrato Hidroalcoólico de *Piper rivinoides* Kunth (Piperaceae) na atividade do CYP1A.** 2024. 93 f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

A família Piperaceae, com cerca de 3.600-3.700 espécies, é uma das mais diversas linhagens vegetais, destacando-se o gênero *Piper* L., com aproximadamente 2.000 espécies. Estudos fitoquímicos nas Piperaceae revelaram diversas classes de metabólitos, incluindo as lignanas e neolignanas, que são conhecidas por sua rica diversidade estrutural e atividades biológicas como antiparasitárias e antitumorais. Neolignanas extraídas das folhas de *Piper rivinoides* Kunth exibiram múltiplas atividades biológicas, tais como leishmanicida, antifúngica, antibacteriana e antitumoral. As enzimas do citocromo P450 (CYP450) formam uma extensa família de hemoproteínas essenciais no metabolismo de xenobióticos e endógenos. As famílias CYP1, CYP2 e CYP3 são predominantes na biotransformação oxidativa, capazes de catalisar diversas reações em variados substratos. Este trabalho investigou a interferência das neolignanas isoladas de *Piper rivinoides* e seu extrato hidroalcoólico sobre as enzimas recombinantes humanas *rhCYP1A1* e *rhCYP1A2*. Nos testes *in vitro*, o Eupomatenóide-5 destacou-se pela sua potente atividade inibitória, com CI_{50} de 39,5 μ M. Ensaaios *in vivo* foram realizados em camundongos das linhagens DBA/2 e Swiss. Análises *in silico* foram conduzidas na plataforma SwissADME e o *docking* molecular foi realizado usando o programa GOLD[®] 2022.1 for Windows com o visualizador Hermes. Os resultados *in vitro* mostraram que tanto as neolignanas isoladas quanto o extrato hidroalcoólico inibiram a atividade de *rhCYP1A1* e *rhCYP1A2*. Os ensaios *in vivo* indicaram indução do CYP1A nos camundongos submetidos a tratamento crônico com Eupomatenóide-5. O *docking* molecular revelou que os fragmentos na cavidade CYP1A1/A2 são cruciais para as interações das neolignanas, especialmente com eupomatenóide-5 e eupomatenóide-6, que apresentaram as melhores pontuações e o maior número de interações com resíduos-chave, como Phe123, Phe224 e Phe258 (CYP1A1) e Phe125, Phe226, Gly316, Ala317, Ile386 e Leu497 (CYP1A2). Essas interações favorecem contatos aromáticos π - π , proporcionando um encaixe superior nos sítios ativos comparado ao conocarpano. Tais resultados são relevantes para entender as interações farmacocinéticas entre as neolignanas benzofurânicas e fármacos comercializados.

Palavras-chave: lignóides; inibição; citocromo P-450; *rhCYP1A1/A2*; previsões *in silico*; *docking* molecular.

ABSTRACT

RAMOS, Carlos Henrique. **Interference Study of Bioactive Neolignans Isolated and Hydroalcoholic Extract of *Piper rivinoides* (Piperaceae) in CYP1A activity.** 2024. 93 f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal)– Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

The Piperaceae family, with around 3,600-3,700 species, is one of the most diverse plant lineages, with emphasis on the genus *Piper* L., with approximately 2,000 species. Phytochemical studies in Piperaceae have revealed several classes of metabolites, including lignans and neolignans, which are known for their rich structural diversity and biological activities such as antiparasitic and antitumor. Neolignans extracted from the leaves of *Piper rivinoides* Kunth exhibited multiple biological activities, such as leishmanicidal, antifungal, antibacterial and antitumor. Cytochrome P450 (CYP450) enzymes form an extensive family of hemoproteins essential in the metabolism of xenobiotics and endogenous agents. The CYP1, CYP2 and CYP3 families are predominant in oxidative biotransformation, capable of catalyzing different reactions on different substrates. This work investigated the interference of neolignans isolated from *Piper rivinoides* and its hydroalcoholic extract on the human recombinant enzymes *rhCYP1A1* and *rhCYP1A2*. *In vitro* tests, Eupomatenoid-5 stood out for its potent inhibitory activity, with an IC_{50} of 39.5 μ M. *In vivo* assays were carried out in mice of the DBA/2 and Swiss strains. *In silico* analyzes were conducted on the SwissADME platform and molecular docking was performed using the GOLD© 2022.1 for Windows program with the Hermes viewer. The *in vitro* results showed that both the isolated neolignans and the hydroalcoholic extract inhibited the activity of *rhCYP1A1* and *rhCYP1A2*. *In vivo* assays indicated induction of CYP1A in mice subjected to chronic treatment with Eupomatenoid-5. Molecular *docking* revealed that the fragments in the CYP1A1/A2 cavity are crucial for the interactions of neolignans, especially with eupomatenoid-5 and eupomatenoid-6, which presented the best scores and the highest number of interactions with key residues, such as Phe123, Phe224 and Phe258 (CYP1A1) and Phe125, Phe226, Gly316, Ala317, Ile386 and Leu497 (CYP1A2). These interactions favor aromatic π - π contacts, providing superior docking at the active sites compared to conocarpan. Such results are relevant to understand the pharmacokinetic interactions between benzofuran neolignans and commercialized drugs.

Keywords: lignoids; Inhibition; cytochrome P-450; *rhCYP1A1/A2*; *in silico* predictions; molecular *docking*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	<i>Piper rivinoides</i> Kunth.....	19
Figura 2-	Representação da formação de lignanas e neolignanas.....	21
Figura 3-	Representação do metabolismo de xenobióticos após a administração.....	22
Figura 4-	Contribuição das principais isoformas do CYP para o metabolismo de xenobióticos	24
Figura 5-	Estrutura tridimensional do CYP1A2, complexada com α -naftoflavona.....	25
Figura 6-	Representação tridimensional do grupo HEME.....	26
Figura 7-	Página de submissão <i>SwissADME</i>	33
Figura 8-	Curva padrão do BSA	47
Figura 9-	Curva padrão de resorufina	48
Figura 10-	Determinação do tempo para punção cardíaca pós tratamento	49
Figura 11-	Atividade do CYP1A <i>in vivo</i> na fração microsomal de camundongos DBA/2	50
Figura 12-	Atividade do CYP1A <i>in vivo</i> na fração microsomal de camundongos Swiss	51
Figura 13-	Determinação da concentração do <i>rhCYP1A1</i> (mg) a ser utilizado nas investigações	52
Figura 14-	Determinação da concentração do <i>rhCYP1A2</i> (mg) a ser utilizado nas investigações	53
Figura 15-	Atividade inibitória de neolignanas isoladasdas α -naftoflafona e extrato hidroalcoólico de <i>Piper rivinoides</i> em <i>rhCYP1A1</i>	54
Figura 16-	Atividade inibitória de neolignanas isoladasdas α -naftoflafona e extrato hidroalcoólico de <i>Piper rivinoides</i> em <i>rhCYP1A2</i>	55
Figura 17-	Determinação dos valores CI_{50} para α -naftoflafona e eupomatenóide-5.....	56
Figura 18-	Sobreposições da melhor pose (verde e laranja) <i>versus</i> cristal (branco) nos CYPs 1A1 (A) e 1A2 (B).....	56
Figura 19-	Melhor pose obtida por <i>docking</i> molecular mostrando o modo de ligação proposto e interações do eupomatenóide-5 no sítio ativo do CYP1A1	61
Figura 20	Melhor pose obtida por <i>docking</i> molecular mostrando o modo de ligação	

	proposto e interações do eupomatenóide-6 no sítio ativo do CYP1A1	62
Figura 21-	Melhor pose obtida por <i>docking</i> molecular mostrando o modo de ligação proposto e interações do conocarpano no sítio ativo do CYP1A1	63
Figura 22-	Melhor pose obtida por <i>docking</i> molecular mostrando o modo de ligação proposto e interações da α -naftoflavona, no sítio ativo do CYP1A1	64
Figura 23-	Melhor pose obtida por <i>docking</i> molecular mostrando o modo de ligação proposto e interações do eupomatenóide-5 no sítio ativo do CYP1A2	67
Figura 24-	Melhor pose obtida por <i>docking</i> molecular mostrando o modo de ligação proposto e interações do eupomatenóide-6 no sítio ativo do CYP1A2	68
Figura 25-	Melhor pose obtida por <i>docking</i> molecular mostrando o modo de ligação proposto e interações do conocarpano no sítio ativo do CYP1A2	69
Figura 26-	Melhor pose obtida por <i>docking</i> molecular mostrando o modo de ligação proposto e interações da α -naftoflavona, no sítio ativo do CYP1A2	70

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 – Estruturas químicas das neolignanas isoladas de <i>P. rivinoides</i>	21
Tabela 1 – Substratos típicos de isoenzimas CYP	23
Tabela 2 – Principais famílias CYP metabolizadoras de substâncias em humanos, camundongos e ratos	29
Quadro 2 – Representação 3D do processo de <i>docking</i> molecular	35
Tabela 3 – Concentrações de resorufina e volume de tampão adicionado à cubeta para obtenção da curva padrão.	45
Tabela 4 – Representação da predição de parâmetros ADME para as neolignanas.....	49
Quadro 3 – Interações dos ligantes com resíduos de aminoácidos nos sítios ativos do CYP1A1 e CYP1A2	57
Tabela 5 – Pontuações obtidas de cada ligante em CYP1A1 e CYP1A2	58
Quadro 4 – Esquema das principais interações intermoleculares observadas no sítio ativo do CYP1A1.....	58
Quadro 5 – Esquema das principais interações intermoleculares observadas no sítio ativo do CYP1A2.....	59
Quadro 6 – Melhores poses 3D obtidas por <i>docking</i> molecular demonstrando o modo de ligação e interações no sítio ativo do CYP1A1	65
Quadro 7 – Melhores poses 3D obtidas por <i>docking</i> molecular dos ligantes no sítio ativo do CYP1A2.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

β -NADP	β -Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
ADME	Absorção, Distribuição, Metabolização e Eliminação
AhR	Receptor Aril hidrocarboneto
AhNT	Aril hidrocarboneto Translocador Nuclear
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CYP450	Citocromo P450
DCB	Departamento de Ciências Biológicas
DCF	Diclofenaco
DCFh	Hidroxilação do diclofenaco
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
ENSP	Escola Nacional de Saúde Pública
EROD	Etoxi-resorufina- <i>O</i> -Desetilase
MROD	Metoxi-resorufina- <i>O</i> -Desmetilase
<i>rh</i> CYP	Recombinant Human Cytochrome P450
pmol	Picomol
TRIS	Tris (hidroximetil) aminometano
Ala	Alanina
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Aspartato
Cys	Cisteína
Gly	Glicina
Ile	Isoleucina
Leu	Leucina
Lys	Lisina
Phe	Fenilalanina
Val	Valina
Thr	Treonina

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
×	Multiplicação
β	Beta
H ₂ O	Molécula da água
mL	Mililitro
rpm	Centímetro
α	Alfa
g	gravidade
μ	Micro
μM	Micromolar
mM	Mili molar
n	Nano
DP	Desvio padrão

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	17
1	REVISÃO DA LITERATURA	18
1.1	Família Piperaceae	18
1.2	<i>Piper rivinoides</i> Kunth	19
1.3	Lignoides	20
1.4	Citocromo P450	22
1.4.1	Hemeproteínas	26
1.4.1.1	CYP1A, CYP1A1 e CYP1A2	27
1.5	Proteínas humanas recombinantes (<i>rhCYP</i>)	29
1.6	Interações entre metabólitos especiais e fármacos sintéticos	30
1.6.1	<u>Indução e inibição enzimática</u>	31
1.7	Descritores físico-químicos para a predição de parâmetros ADMET e SAR	32
1.7.1	Estudos de <i>docking</i> molecular	34
	JUSTIFICATIVA	36
2	OBJETIVOS	37
2.1	Geral	37
2.2	Específicos	37
3	MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1	Determinação da atividade enzimática em microsossomos hepáticos de camundongos	38
3.1.1	<u>Preparo da fração microssomal hepática</u>	38
3.1.2	Quantificação de proteínas na fração microssomal e superssomos	38
3.2	Determinação da atividade em <i>rhCYP</i>	38
3.2.1	Atividade de neolignanas isoladas de <i>Piper rivinoides</i> em CYPs	39
3.3	Determinação dos descritores físico-químicos para a predição de parâmetros ADMETox e SAR	39
3.4	Estudo das interações <i>in silico</i>: estudos de modelagem molecular	40
3.5	Substâncias e reagentes utilizados nos ensaios	41
3.5.1	Extrato e partições de <i>P. rivinoides</i> Kunth	42
3.6	Ensaio Enzimáticos	42
3.6.1	<u>Indução da expressão <i>in vivo</i> do CYP1A</u>	42

3.6.1.1	Tratamento 1 – camundongos DBA/2.....	42
3.6.1.2	Tratamento 1 – camundongos <i>Swiss</i>	42
3.7	Eutanásia e remoção do fígado.....	43
3.7.1	<u>Preparação das frações microsossomais hepáticas para avaliação da atividade</u> <u>CYP1A1/1A2</u>	43
3.7.2	<u>Quantificação de Proteínas na Fração Microssomal.....</u>	44
3.7.3	<u>Determinação da atividade do CYP1A na fração microssomal hepática</u>	45
3.7.3.1	Determinação da curva padrão de resorufina	45
3.7.1.2	Determinação da atividade da 7-etoxiresorufina- <i>O</i> -desetilase (EROD) e 7- metoxiresorufina- <i>O</i> -desmetilase (MROD).....	45
3.8	Análise estatística	46
4	RESULTADOS.....	47
4.1	Quantificação de proteínas na fração microssomal de camundongos e dos <i>rhCYP1A1</i> e <i>rhCYP1A2</i>	47
4.2	Curva padrão de resorufina	47
4.3	Descritores físico-químicos para a predição de parâmetros ADME	48
4.4	Determinação do tempo para punção cardíaca pós tratamento.....	49
4.5	Resultados do tratamento <i>in vivo</i> com β-naftoflavona e com eupomatenoide-5	50
4.6	Resultados do tratamento <i>in vivo</i> com β-naftoflavona e com eupomatenoide-5 e com extrato hidroalcólico de <i>Piper rivinoides</i> concomitante à administração de cafeína	50
4.7	Resultados com <i>rhCYP</i>	52
4.8	Resultados de <i>docking</i> molecular	56
5	DISCUSSÃO	72
	CONCLUSÕES	79
	REFERÊNCIAS	80

INTRODUÇÃO

O Brasil possui a maior floresta tropical do mundo, que conta com uma enorme riqueza natural, trazendo consigo uma grande diversidade vegetal que é ambíguo, sendo um tópico atual de discussão na comunidade científica internacional (Leal et al., 2019).

A utilização de plantas medicinais em comunidades tradicionais existe há séculos e realizam-se pelo preparo, por exemplo, de banhos e chás, utilizando folhas, cascas de caule, frutas, óleos, raízes, plantas inteiras, seivas e sementes (Poletto et al., 2020).

Existe uma grande variedade de substâncias derivadas de plantas com diferentes atividades biológicas que estão associadas ao tratamento de diversas doenças. Os efeitos benéficos de substâncias de origem natural ou de semi-síntese representam, aproximadamente, um terço dos medicamentos aprovados nas últimas duas décadas (DI Nardo & Giliard, 2020). A síntese total dessas substâncias é "economicamente impraticável" devido a estereocentros múltiplos é uma generalização que não se aplica a todos os casos. Algumas substâncias com múltiplos estereocentros são sintetizadas em larga escala de maneira econômica. Alguns exemplos incluem morfina, taxol (semi-síntese) e podofilotoxina (Blakemore et al., 2018).

Esse interesse em produtos naturais tem gerado inúmeros resultados, incluindo os avanços baseados em triagem fenotípica e virtual (química computacional), que também favorecem uma série de descobertas notáveis de produtos, tais como antimicrobianos, anti-inflamatórios, anti-helmínticos, antidiabéticos e antitumorais (Teponno, Kusari & Spiteller, 2016; Khan, 2018; Chouna et al., 2021).

No entanto, é preciso que estudos rigorosos sejam feitos para que novas substâncias possam estar disponíveis nas prateleiras das farmácias. Esses estudos incluem, dentre outros, aqueles de interação medicamentosa, que estão dentro da área da toxicologia (Santos et al., 2019). Especificamente, uma vez que os xenobióticos, incluindo os fármacos, são biotransformados por enzimas do complexo citocromo P-450, determinar a interação de candidatos a fármacos nessas enzimas auxilia na previsão de possíveis interações medicamentosas. Assim, essa área da toxicologia é de extrema importância e merece atenção, o que justifica a abordagem deste tema nesta Tese, que trata das neolignanas bioativas isoladas de uma planta medicinal brasileira da família Piperaceae. Essa família de angiospermas basais conta com o gênero *Piper* L. que tem levado à descoberta de substâncias com diferentes atividades biológicas (Koroishi et al., 2008; Santos et al., 2021; Felisberto et al., 2022; Ramos et al., 2023).

1 – REVISÃO DA LITERATURA

1.1 - Família Piperaceae

A família Piperaceae é uma linhagem extremamente diversa de angiospermas que habita regiões tropicais em todo o mundo, sendo considerada um modelo para estudar ecologia, história evolutiva e diversificação. É formada por cinco gêneros (*Piper* L., *Peperomia* Ruiz & Pav., *Manekia* Trel., *Zippelia* Blume, *Verhuellia* Miq.) e cerca de 4.300 espécies. Dessas, somente os gêneros *Piper*, *Peperomia* e *Manekia* ocorrem no Brasil. O gênero *Piper* L. tem grande relevância na família Piperaceae e o segundo maior gênero das angiospermas (ca. 2.170 espécies) (Jaramillo & Manos 2001; APGIV, 2016; Perigo et al., 2016; Simmonds et al., 2021; Valentin-Silva, 2020). Possui espécies de reconhecido uso na medicina tradicional e como condimento, tais como *Piper nigrum* L. (pimento-do-reino), *Piper mollicomum* Kunth (pimenta-de macaco), *Piper aduncum* L. (pimenta de macaco), *Piper betle* L. (pimenta betel) e *Piper methysticum* G. Forst. (kava-kava) (Kamboj & Sharma, 2011; Simmonds et al., 2021; de Luna et al., 2024).

Além de sua importância para os humanos como condimento e medicamento, inúmeras espécies de Piperaceae neotropicais coevoluíram com insetos, incluindo mariposas, abelhas e besouros que realizam sua polinização. Ainda, a coevolução com mamíferos (morcegos) e aves garante a dispersão das sementes (de Brito-Machado et al., 2022; Strutzenberger et al., 2017; Wilson et al., 2012).

Várias substâncias isoladas de espécies de *Piper* e de *Peperomia* demonstram atividades biológicas diversas, incluindo antifúngica, antimicrobiana e inseticida (Bernuci et al., 2016; Gaia et al., 2021; Amorim et al., 2021; Peixoto et al., 2021).

Investigações fitoquímicas de espécies de Piperaceae têm apresentado uma gama enorme de substâncias pertencentes a diferentes classes de metabolitos especiais, incluindo derivados de ácidos benzoicos (prenilados, lignanas, neolignanas, flavonoides, alcaloides, amidas e cromenos (Moreira et al., 2016).

1.2 – *Piper rivinoides* Kunth

Espécies do gênero *Piper* L. são fontes ricas de lignoides, metabolitos especiais característicos deste gênero. Em 2022, um total de 275 lignanas foram isoladas de plantas do gênero *Piper* L.. Muitos exibiram uma ampla gama de propriedades farmacológicas e atividades inibitórias dos CYP1A e CYP3A, por exemplo (Santos et al., 2021; Fan et al., 2023). A espécie *P. rivinoides* (Figura 1) é rica em neolignanas que apresentam propriedades inseticidas, bactericidas e fungicidas (Moreira et al., 2016; Leal et al., 2019).

Dentre as neolignanas isoladas de *P. rivinoides* destacam-se as benzofurânicas eupomatenóide-5, eupomatenóide-6 e conocarpano que demonstraram importante atividade leishmanicida e contra *Candida albicans* (Moreira et al., 2016). Além disso, essas neolignanas também apresentaram importante atividade citotóxica (Fonseca et al., 2020). Essas atividades biológicas relevantes justificam um estudo mais aprofundado das neolignanas benzofurânicas de *P. rivinoides*.

Figura 1 - *Piper rivinoides* Kunth



Fonte: Moreira, 2019.

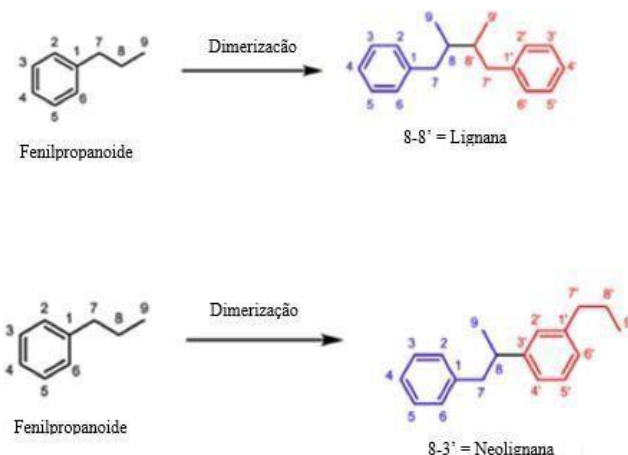
1.3 - Lignoides

Lignanas e neolignanas são importantes agentes biodinâmicos com diversidade estrutural. São metabolitos especializados amplamente distribuídos em quase todas as plantas. Biossinteticamente, são derivados da via do ácido chiquímico (via do chiquimato) envolvendo o acoplamento oxidativo de dois grupos fenilpropanoides (C_6-C_3). Existem, também, lignoides formados pelo acoplamento de mais de duas unidades C_6-C_3 (Kumar et al., 2014; Teponno, Kusari, & Spiteller, 2016; Shao et al., 2018). Lignanas e neolignanas demonstram atividades biológicas, tais como antioxidante, antineoplásica, neuroprotetora, antimalárica, antitubercular (anti-TB) e antiviral (Zálešáka, Jean-yves & Pospíšil, 2019).

Neolignanas constituem um subgrupo dimérico de fenilpropanoides (C_6-C_3) formadas por uma ligação $\beta-\beta'$ entre duas unidades, sendo que essas unidades se originam do metabolismo da *L*-fenilalanina e podem diferir no grau de oxidação das cadeias laterais (C_7-C_9) e na substituição do anel aromático (C_1-C_6) (Nagumo et al., 2019). Substâncias que contêm dois monômeros de fenilpropanoides (C_6-C_3) ligados por carbonos C8 e C8' formam o subgrupo das lignanas. Sendo assim, a falta dessa ligação C8-C8' e a substituição por qualquer outro tipo de carbono são referidos como neolignanas (Figura 2) (Zálešáka, Jean-yves & Pospíšil, 2019). A descrição das classificações de neolignanas e lignanas é um pouco confusa e não segue uma terminologia padrão. Há menção de classificações propostas por Gottlieb et al. (1973), mas não fica claro como isso se relaciona com as classificações modernas ou se essas classificações ainda são relevantes.

É comum que as hidroxilas das lignanas/ neolignanas estejam protegidas por metilação e, mais raramente, por glicosilação (Macedo et al., 2017). O acoplamento de várias unidades de lignanas formam as ligninas. Esses polímeros naturais fornecem sustentação ao vegetal e, junto com a celulose favorecem seu crescimento (Zálešáka, Jean-yves, & Pospíšil, 2019; Weng & Chapple, 2010).

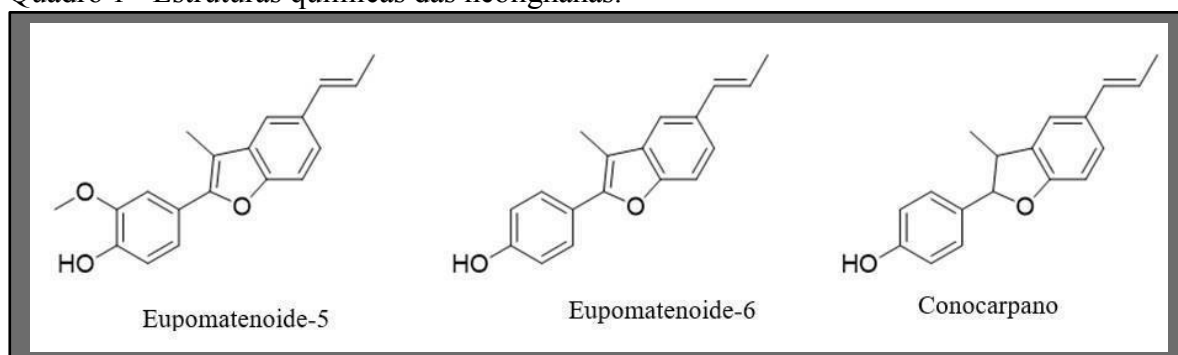
Figura 2 - Representação da formação de lignanas e neolignanas.



Fonte: Adaptado de Zálešák, Jean-yves & Pospíšil (2019).

As neolignanas deste estudo (eupomatenóide-5, eupomatenóide-6 e conocarpano) foram isoladas de folhas de *P. rivinoides* por Moreira e colaboradores (2016), que apresentam uma variedade de atividades biológicas, como antifator de ativação de plaquetas (PAF), leishmanicida, antifúngica, antibacteriana, inseticida, bem como atividade tripanocida e citotóxica (Vendrametto et al., 2010; Lazarin-bidoia et al., 2013; Moreira et al., 2016; Fonseca et al., 2020). Estudos de Longato e colaboradores (2015) também descrevem a atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* do eupomatenóide-5. Os resultados publicados mostraram que esta substância apresentou relevante atividade antiproliferativa *in vitro* para linhagens de células tumorais de câncer de mama, ovário e próstata. O quadro 1 apresenta as estruturas das neolignanas investigadas neste estudo.

Quadro 1 - Estruturas químicas das neolignanas.



Fonte: O autor, 2023.

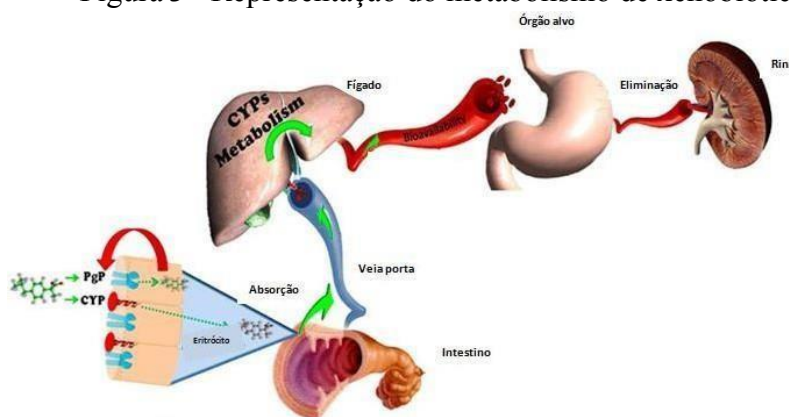
Légenda: Representação das estruturas das neolignanas, construídas no programa de estruturação molecular ACD/ChemSketch versão 2015.

1.4 - Citocromo P450

As enzimas do citocromo P450 (CYPs) representam uma grande família de hemoproteínas envolvidas no metabolismo de diversas substâncias endógenas e xenobióticas, sendo a principal fonte de variabilidade na farmacocinética destas substâncias (Chhonker et al., 2018; Mcmillan & Tyndale, 2018). Em geral, o processo de metabolização envolve a modificação química de substâncias (por exemplo, medicamentos) em produtos que sejam mais solúveis em água para facilitar a excreção renal e/ou hepática. Esse processo pode ser dividido em três fases: fase I (solubilização), fase II (conjugação) e fase III (excreção). Reações de fase I são estudadas de forma mais intensiva. A regulação dos CYPs pode ocorrer de várias maneiras, como variação genética e indução e repressão xenobiótica e endógena, visto que a maioria das enzimas é controlada multifatorialmente, incluindo polimorfismos adicionais em transgenes regulatórios e fatores não genéticos do hospedeiro, incluindo sexo, idade, doença, influências hormonais e outros fatores, por exemplo, as variantes de perda de função podem levar à redução da depuração e ao aumento das concentrações plasmáticas, enquanto as variantes de ganho de função levam a um aumento da depuração e a concentrações mais baixas de determinado fármaco (Zanger & Schwab, 2013; David et al., 2013).

As famílias CYP1, CYP2 e CYP3 representam o sistema predominante para a biotransformação oxidativa, levando a conversão de fármacos em metabólitos com características mais hidrofílicas, podendo assim ser mais facilmente excretado do corpo (Figura 3). Tais famílias juntas, são capazes de metabolizar quase 75% de todos os medicamentos no mercado (Toselli et al., 2016), porém alguns CYPs atuam na homeostase de ácidos graxos, vitamina D, esteroides e ácidos biliares (Zanger & Schwab, 2013).

Figura 3 - Representação do metabolismo de xenobióticos após a administração.



Fonte: Adaptado de León-Cachón *et al.* 2012.

O metabolismo de fármacos ocorre predominantemente no fígado, sendo que o metabolismo mediado por CYPs representa uma enorme fonte de variação na resposta aos medicamentos (Miksys & Tyndale, 2013).

A Tabela 1 demonstra substratos típicos de isoenzimas dos principais CYP no metabolismo de fármacos e xenobióticos.

Tabela 1 - Substratos típicos de isoenzimas CYP.

CYPs	Substratos
1A2	Closapina, Cafeína, Paracetamol, R-varfarina, Teofilina, Fenacetina
2C9	Diclofenaco, Hexobarbital, Zidovudina, Losartana, Fenitoína, S-varfarina
2C19	Omeprazol, Pantoprazol, Fenitoína, S-mefenitoína, Diazepam
3A4	Alprazolam, Testosterona, Atorvastatina, Lidocaína, Eritromicina, Ciclosporina

Fonte: Adaptado de SYCHEV *et al.*, 2018.

Os CYPs são capazes de catalisar uma série de reações em uma grande variedade de substratos, sendo que uma série de medicamentos do arsenal terapêutico, usados na atualidade são metabolizados por CYPs (Zhou *et al.*, 2020).

Baseado em sua similaridade de sequência de aminoácidos, as enzimas são categorizadas em famílias que compartilham 40% de identidade, indicadas por um numeral arábico, enquanto as subfamílias mostram 55% de identidade, indicadas por uma letra. Nos seres humanos, há 18 famílias CYP, contendo um total de 57 genes funcionais (Machalz *et al.*, 2021). Além disso, 58 pseudogenes são codificados por diversos grupos de genes distribuídos em vários cromossomos autossômicos. Em contraste, os camundongos possuem 108 genes funcionais e 88 pseudogenes (Nelson *et al.*, 2004). A maioria dos genes humanos, que são agrupados de acordo com sua sequência semelhante em 18 famílias e 44 subfamílias, têm funções endógenas específicas, incluindo a biossíntese de hormônios esteroídicos, prostaglandinas e ácidos biliares (Zanger & Schwab, 2013).

A especificidade de cada substrato é uma característica inerente de isoenzimas CYP, assim, eles têm a capacidade de se ligar e transformar substâncias com forma, carga e características hidrofílicas e/ou hidrofóbicas específicas (Roy, 2011; Sirim *et al.*, 2010). Algumas das isoenzimas CYP têm estereoespecificidade do substrato como o CYP2C9 que

metaboliza S-varfarina, enquanto a R-varfarina é metabolizada pelos CYP1A2 e CYP3A4 (Sychev et al., 2018).

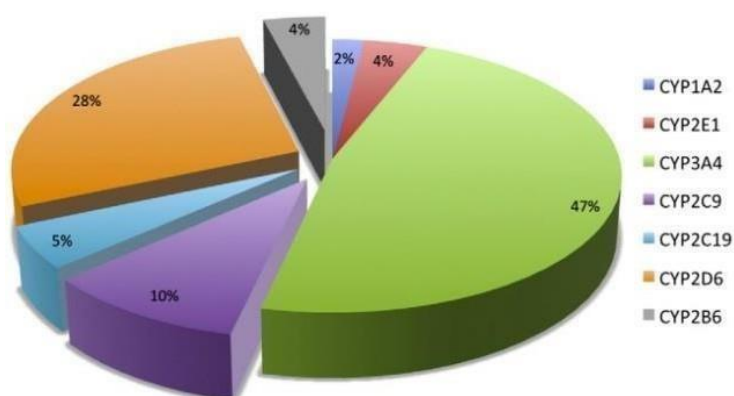
A variação nos genes CYP resulta em fenótipos classicamente definidos como metabolizadores ultrarrápidos, extensos, intermediários e fracos, que podem levar ao aumento ou redução do risco da resposta de determinado fármaco (Ingelman-sundberg & Sim, 2010).

Os CYPs são caracterizados por uma ampla inter- e intra- variabilidade individual em sua atividade catalítica, em que as principais fontes de diferenças na atividade enzimática são fatores ambientais, como a inibição ou indução de enzimas por xenobióticos, incluindo fármacos e substâncias presente em alimentos; fatores biológicos que incluem sexo, hormônios ou estado de doença e variabilidade genética (Haidukevich et al., 2018).

Os polimorfismos nos CYPs afetam a resposta individual do fármaco, que pode levar a diferenças na depuração, meia-vida ou concentração plasmática máxima que pode resultar em reações adversas graves (Kirchheiner & Seeringer, 2007). O avanço do estudo dos polimorfismos genéticos na personalização da medicina revela que os impactos, em relação aos eventos adversos a medicamentos (EAM), podem afetar a farmacocinética e a farmacodinâmica dos medicamentos, por conta das respostas individuais a medicamentos, tais como ambientais ou fisiológicos, fatores genéticos (por exemplo, etnia e polimorfismo) (Gummadi & Guddati, 2021).

Sabe-se que a maioria da variabilidade na atividade do CYP-450 é devido ao polimorfismo de nucleotídeo único no gene CYP (Martiny & Miteva, 2013). Os CYPs, portanto, são polimórficos, de forma que as mais importantes são CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4/5 (Figura 4).

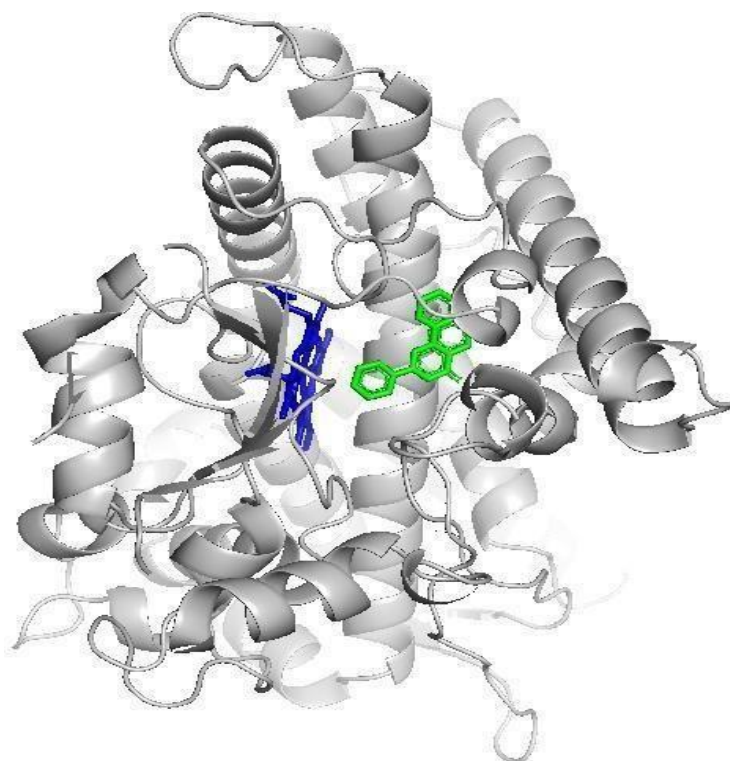
Figura 4 - Contribuição das principais isoformas do CYP-450 para o metabolismo de xenobióticos em humanos.



Fonte: Pinto & Dolam, 2011.

As estruturas de todos os CYPs compartilham vários elementos, que são organizadas em uma série semelhante de hélices e dobras, onde as dobras são predominantemente α -helicoidais com uma pequena proporção de β -folhas. Suas doze hélices são designadas de A a L e são nomeadas em ordem alfabética a partir do *N*-terminal (Yasukochi & Satta, 2015; Tietz *et al.*, 2017). Sequências de reconhecimento de substrato incluem (a) uma I-hélice altamente conservada com um aminoácido treonina, que desempenha um papel essencial nos processos catalíticos, (b) alça F/G e as hélices F e G, junto com a alça B/C, que formam uma 'tampa' sobre a cavidade do sítio ativo. O sítio ativo está profundamente incluído na estrutura e acoplado à região externa por meio de uma rede complexa de canais de acesso e abriga um cofator protoporfirina IX, que está conectado ao domínio catalítico CYP por uma ligação Fe-S ao grupo tiolato de uma cisteína altamente conservada (Figura 5) (Kuban & Daniel, 2021).

Figura 5 - Estrutura tridimensional do CYP1A2 complexada com α -naftoflavona.



Fonte: O autor, 2022.

Legenda: Imagem obtida pelo Pymol Molecular Graphics versão 1.4.1.

Grupo heme em azul, ligante α -naftoflavona em verde.

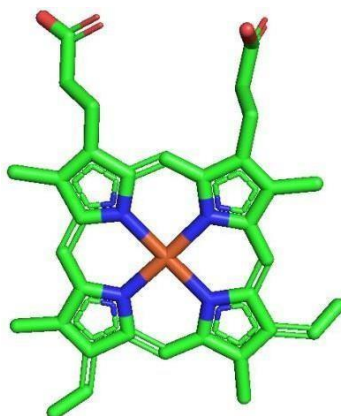
1.4.1 - Hemeproteínas

Proteínas heme, ou hemoproteínas, são um grupo de proteínas que transportam heme como o grupo prostético. As proteínas heme são onipresentes em sistemas biológicos e exibem diversas atividades biológicas. Estes incluem as funções clássicas de transporte e/ou armazenamento de gás e transferência de elétrons, sendo elemento chave da atividade catalítica das enzimas (Li, Bonkovsky & Guo, 2011). Estruturalmente, o grupo heme é composto por um átomo de ferro coordenado com 4 anéis pirrólicos, sistema conhecido como a porção protoporfirina (Figura 6). O ferro do grupo heme está ligado a um resíduo de histidina da cadeia de globina e ao oxigênio que se liga em outra posição coordenada de ferro (Tsiftoglou, Tsamadou & Papadopoulou, 2006).

O Heme contém Fe^{+2} ou Fe^{+3} protoporfirina IX em seus sítios ativos, e esses grupos são ligados a uma estrutura polipeptídica via resíduos de histidina, tirosina, metionina, cisteína ou lisina, sendo essencial para todas as células, funciona como o grupo prostético de diversas hemoproteínas, como hemoglobina, mioglobina, citocromos respiratórios, CYPs, catalase, peroxidase, triptofano pirrolase e óxido nítrico sintase (Gebicka, 2020).

O grupo heme é sintetizado no fígado, sendo necessário, principalmente, para formação dos CYPs, que são localizados principalmente no retículo endoplasmático, onde rapidamente oxidam a uma variedade de produtos químicos, incluindo fármacos, esteroides endógenos, vitaminas, ácidos graxos e prostaglandinas (Phillips, 2019).

Figura 6 - Representação tridimensional do grupo HEME.



Fonte: O autor, 2022.

Legenda: Figura obtida utilizando o Pymol Molecular Graphics versão 1.4.1.

1.4.1.1 - CYP1A, CYP1A1 e CYP1A2

A família CYP1, um membro da superfamília CYP, inclui três proteínas: CYP1A1, CYP1A2 e CYP1B1. O CYP1A1, em humanos, é encontrado principalmente em tecidos extra-hepáticos: pâncreas, timo, útero e intestino delgado. Participa do metabolismo de um grande número de xenobióticos. A sequência de aminoácidos do CYP1A1 (40% de identidade), é altamente conservado entre humanos, ratos e camundongos (Bruno & Njar, 2007; Nebert & Karp, 2008; Go, Hwang & Choi, 2015). As diferenças de atividades das duas isoformas da CYP1A (CYP1A1 e CYP1A2) são, com base em comparações de seus valores de afinidade, capacidade e depuração intrínseca. Notoriamente, CYP1A1 e CYP1A2 humanos são considerados facilitadores mais eficientes desta biotransformação do que suas homólogas no rato (modelo animal altamente estudado em farmacocinética). Embora a expressão de CYP1A2 pareça estar limitada ao fígado, já o CYP1A1 é expressado normalmente no pulmão, placenta, rins e intestino, com a atividade sendo intensificada em resposta aos indutores (Elsherbiny & Brocks, 2010).

A subfamília CYP1A expressada nos rins apresenta atividade enzimática relativamente baixa. A atividade do CYP1A pode ser induzida por xenobióticos e produtos químicos ambientais, tais como fenobarbital, 3-metil-metilcolantreno, piridina, cafeína e nicotina. O CYP1A1 é um dos CYPs mais ativos no metabolismo de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP) (Chandrashekar & Mehvar, 2020), enquanto o CYP1A2 é ativo em aminas aromáticas e substâncias heterocíclicas.

O CYP1A é uma das enzimas metabólicas de fármaco de fase I, e participa da biotransformação de cerca de 9% dos fármacos clínicos, como analgésicos, antipiréticos, antipsicóticos, antidepressivos e anti-inflamatórios. Além de medicamentos, o CYP1A também está envolvido na ativação ou desativação biológica de muitos poluentes do meio ambiente. Mais importante ainda, o CYP1A é um importante contribuinte para a biotransformação de muitas substâncias endógenas, incluindo melatonina, progesterona e estradiol (Lu et al., 2020).

Em suma, o CYP1A1 é expressado em baixos níveis em todas as espécies, já o CYP1A2, é altamente expresso no fígado, é mais variável dependendo da espécie. Em geral, CYP1A é indutível em roedores e não roedores (Martignoni, Groothuis & Kanter, 2006), porém existem muitos indutores fracos de CYP1A1, como algumas vitaminas e flavonoides,

atenuam a ativação de 308 genes dependentes de receptor de hidrocarbonetos arila (AhR) por hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP) e arilaminas (Perepechaeva et al.; 2017). A primeira estrutura cristalina do CYP1A1 foi descrita com resolução de 2,6 Å, complexada com a α -naftoflavona, fornecendo uma ferramenta útil na busca de candidatos a inibidores potentes para essa enzima nos estudos *in silico* (Walsh, Szklarz & Scott, 2013). O CYP1A1 desempenha um importante papel no metabolismo de substratos endógenos e exógenos. Embora o CYP1A1 desempenhe um papel na biotransformação de xenobióticos, ele está mais associado à biotransformação de HAP (Badal & Degola, 2014). A transcrição da família CYP 1 é regulada pelo receptor de hidrocarbonetos arila (AhR), que é responsável por regular a atividade da família CYP1 como fator de transcrição ativado por ligante (Nebert & Karp, 2008; Go, Hwang & Choi, 2015).

Em humanos, o CYP1A2 representa aproximadamente 13% do conteúdo total do CYPs no fígado, e metaboliza cerca de 20% dos medicamentos em uso clínico, como a fenacetina, isoniazida, teofilina, clozapina, além de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP) e derivados de imidazoquinolina (Pan et al., 2014; Guo et al., 2021).

A atividade do CYP1A2 pode variar de indivíduo para indivíduo e ser afetada por diversos fatores como o tabagismo, fármacos e genéticos (polimorfismos). Sua expressão no fígado é regulada por AhR e outras vias metabólicas, incluindo a degradação do mRNA e da proteína CYP1A2, ativação *cis* e *trans* de fatores de transcrição, fusões alternativas, estabilidade do RNA, microRNAs reguladores e epigenética (Djordjevic et al., 2008; Ghotbi et al., 2009).

Estudos de modelagem, como de Zhou e colaboradores (2009) observaram que a maioria dos substratos do CYP1A2 são hidrofóbicos com altos valores de Log P, sugerindo que as interações hidrofóbicas desempenham um papel importante em sua ligação ao CYP1A2. Os substratos CYP1A2 geralmente contêm um anel planar que pode se encaixar no sítio ativo da enzima (Sansen et al., 2007). Algumas substâncias naturais podem inibir o CYP1A1/2, como a rutaecarpina, evodiamina e desidroevodiamina que são alcaloides quinazolinocarbolínicos, isolados de *Evodia rutaecarpa*, usada na medicina tradicional chinesa para o tratamento de distúrbios gastrointestinais, dores de cabeça e hipertensão (Qiu et al., 2008). A tabela 2 apresenta as principais famílias CYP metabolizadoras de substâncias em humanos, camundongos e ratos.

Tabela 2 - Principais famílias CYP metabolizadoras de substâncias em humanos, camundongos e ratos.

Família	Subfamília	Humanos	Camundongos	Ratos
CYP1	A	1A1, 1A2	1A1, 1A2	1A1, 1A2
	B	1B1	1B1	1B1
CYP2	A	2A6, 2A7, 2A13	2A4, 2A5, 2A12, 2A22	2A1, 2A2, 2A3
	B	2B6, 2B7	2B9, 2B10	2B1, 2B2, 2B3
	C	2C8, 2C9, 2C18, 2C19	2C29, 2C37, 2C38, 2C39, 2C40, 2C44, 2C50, 2C54, 2C55	2C6, 2C7, 2C11, 2C12*, 2C13*, 2C22, 2C23
	D	2D6, 2D7, 2D8	2D9, 2D10, 2D11, 2D12, 2D13, 2D22, 2D26, 2D34, 2D40	2D1, 2D2, 2D3, 2D4, 2D5, 2D18
	E	2E1	2E1	2E1
CYP3	A	3A4, 3A5, 3A7, 3A43	3A11, 3A13, 3A16, 3A25, 3A41, 3A44	3A1/3A23, 3A2, 3A9, 3A18, 3A62

Fonte: Adaptado de Martignoni *et al.*, 2006.

1.5 - Proteínas Humanas Recombinantes (*rhCYP*)

Os modelos de uso experimental com CYPs obtidas de microsossomos hepáticos de roedores tem sido empregado com êxito, porém, como mencionado anteriormente, os CYPs obtidos conservam similaridade parcial com a dos humanos. Para garantir que uma determinada substância interfira com um CYP humano, por lógica, devem ser usados sistemas que reproduzem o máximo possível o que acontece no organismo humano (Zou, Spencer & Sun, 2022).

A produção de proteínas recombinantes é de grande importância para a pesquisa terapêutica e biomédica, pois vários sistemas de expressão, incluindo bactérias, leveduras, plantas, insetos e células de mamíferos estão disponíveis para esta finalidade (Zou, Spencer & Sun, 2022).

O uso de sistemas bacterianos na expressão recombinantes fornece um método poderoso para a produção de proteínas CYPs que contorna a necessidade de obter proteínas de fontes animais ou humanas (Zelasko, Palaria & Das, 2013). As enzimas CYPs humanas recombinantes (*rhCYP*) têm se mostrado úteis para pesquisas sobre o metabolismo de drogas. Dessa forma, muitos sistemas de expressão de CYP heterólogos foram desenvolvidos (Ahn & Yun, 2004). Os sistemas com expressão em bactérias, sobretudo *Escherichia coli*, têm sido utilizados para a produção de proteínas recombinantes de várias

CYPs. Nesses sistemas, a expressão e o rendimento chegam a 30%. Proteínas como insulina, eritropoietina, hormônio de crescimento, entre outros, podem ser produzidas por sistema usando bactérias (Ahn & Yun, 2004; Espejo-mojica. et al., 2015; Quehl et al., 2016).

A expressão de *rhCYP* é importante na identificação de rotas metabólicas e na quantificação da contribuição dos CYPs individuais no metabolismo total de substâncias candidatas a novos fármacos (Kitsati, Mantzaris & Galaris, 2012; Roy. et al., 2013). As *rhCYP* são de fácil aquisição no mercado e de grande reprodutibilidade experimental, o que promove uma alta procura para estudos *in vitro*. Recentemente, tem havido crescente interesse na utilização dos *rhCYPs*, como alternativa aos Microsomas Hepáticos Humanos (MHH) e cultura de hepatócitos, na extrapolação *in vitro-in vivo* (IVIVE), para estimar a dimensão da depuração hepática *in vivo* de substâncias químicas (Kudugunti et al., 2010; Prasad et al., 2011). Além disso, para alcançar atividade máxima catalítica, bem como expressão proteica são empregadas várias estratégias (Ahn & Yun, 2004).

Outra questão a se considerar é a escolha da quantidade de enzima recombinante a ser utilizada na reação, podendo variar de acordo com a estratégia experimental empregada, pois os supersomos podem produzir atividades, em geral, mais altas que o microsomo hepático quando da avaliação de uma determinada isoforma de CYP (BD Bioscience, 2009).

1.6 - Interações entre metabolitos especiais naturais e fármacos sintéticos

Os medicamentos são essenciais no tratamento médico, mas a resposta clínica a eles pode variar de forma significativa entre os pacientes e levar a eventos adversos causando, em alguns casos, resultados indesejados. A caracterização das isoenzimas é importante para prevenir ou evitar efeitos adversos ou falta de resposta do tratamento a um paciente que faz uso de vários fármacos, devido à capacidade de inibição ou indução de CYPs por várias substâncias (Bohnert et al., 2016).

A inibição e a indução de CYPs são mecanismos centrais que resultam em interações medicamentosas clinicamente significativas (DDIs). As características e os fatores reguladores de várias enzimas CYP já foram elucidados e os detalhes dos mecanismos de inibição foram descobertos por estudos em enzimas isoladas ou expressas em frações de tecidos. Receptores nucleares como importantes fatores de transcrição de detecção de xenobióticos e como reguladores da indução do CYP foram elucidados (Hakkola et al., 2020).

Alimentos e medicamentos são freqüentemente de uso concomitante, no entanto, certos alimentos podem criar uma interação, alterando a biodisponibilidade de certos medicamentos (Bailey, 2010). Substâncias de origem vegetal podem influenciar a eficácia terapêutica de medicamentos, alterando suas características de absorção por meio de interações com sistemas enzimáticos. As interações entre alimentos e medicamentos podem ser definidas como modificações na farmacocinética ou farmacodinâmica de um medicamento (Ötles & Senturk, 2014), assim como modificações no estado nutricional, causadas pela ingestão de um medicamento, ou como resultado de fatores físicos, químicos, fisiológicos ou fisiopatológicos na relação entre um medicamento e um nutriente (Amadi & Mgbahurike, 2017).

Notoriamente, estamos expostos a um grande número de substâncias químicas, seja pela dieta, uso de cosméticos, locais de trabalho, poluentes ambientais, entre outros. Muitos desses produtos químicos são inibidores ou indutores de enzimas CYP e, por isso, o estudo de interação medicamentosa é tão importante (Pelkonen et al., 2020).

1.6.1 - Indução e inibição enzimática

Interações farmacocinéticas (PK) representam um dos principais contribuintes para o fracasso de determinada terapia medicamentosa, ao passo que sua compreensão aumentou muito nas últimas três décadas, principalmente, devido à disponibilidade de técnicas moleculares e analíticas que avançaram no conhecimento da bioquímica do metabolismo e transporte de substâncias. Dessa forma, muitos fármacos têm sido identificados como inibidores ou indutores de enzimas metabolizadoras de xenobióticos, sobretudo os CYPs (Polasek, 2011).

A inibição e indução das enzimas CYP envolvem mecanismos centrais, que pode resultar em interações. Vários estudos de interações elucidam características e fatores regulatórios de diversas CYPs em grande extensão, onde os mecanismos detalhados de inibição já foram evidenciados por estudos sobre enzimas e frações teciduais isoladas ou expressas, relacionando os receptores nucleares como importantes fatores de transcrição com sensibilidade xenobiótica e como reguladores da indução (Zanger & Schwab 2013; Hakkola et al., 2020). Para evitar potenciais interações medicamentosas é desejável fármacos que não sejam inibidores ou indutores potentes do CYP. Entretanto, as interações medicamentosas causadas por inibição mútua são quase inevitáveis, porque o metabolismo

mediado pelo CYP representa uma importante via de eliminação de muitos medicamentos e porque a mesma enzima CYP pode metabolizar uma série de substâncias (Lin & Lu, 1998).

1.7 - Descritores físico-químicos para a predição de parâmetros ADME e SAR

Parâmetros de Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção (ADME) podem ser avaliados separadamente por métodos dedicados. Tem sido demonstrado que a estimativa precoce de ADME na fase de descoberta de um novo fármaco reduz drasticamente a fração de falhas relacionadas à farmacocinética nas fases clínicas (Hay et al., 2014). Modelos computacionais têm sido promovidos como uma alternativa válida aos procedimentos experimentais para predição de ADME, especialmente nas etapas iniciais de estudo, quando as estruturas químicas investigadas são numerosas, mas a disponibilidade de substâncias é escassa (Daina, Michielin & Zoete, 2017).

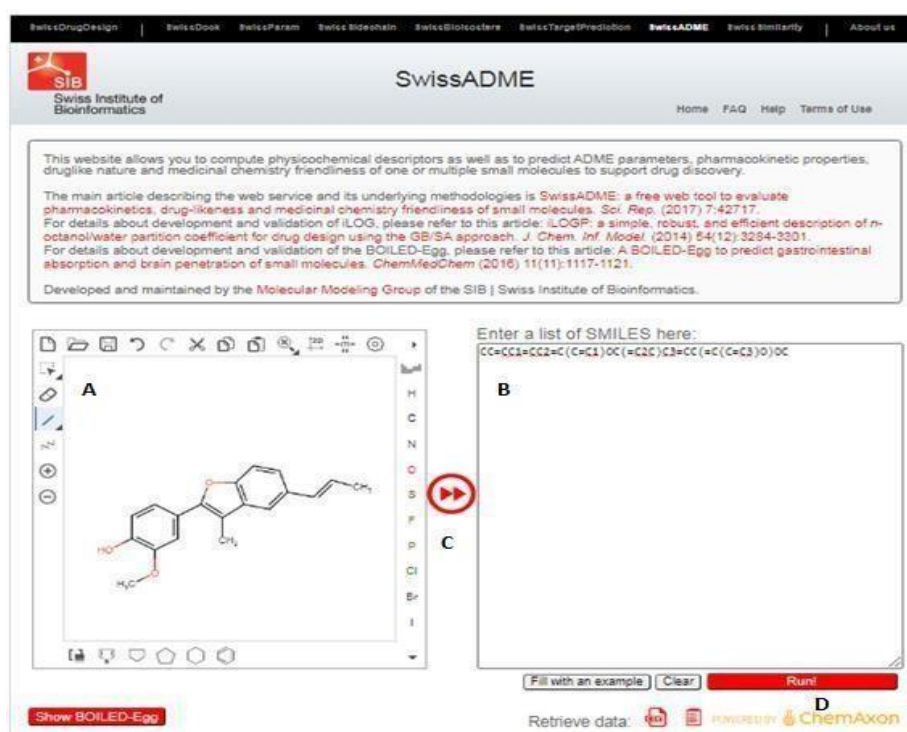
No início dos anos 60s ocorreu um grande avanço no planejamento racional de bioativos, em especial de fármacos, com o início dos estudos de QSAR (do inglês, *Quantitative Structure-Activity Relationships*, tradução: Relações Quantitativas entre Estrutura química e Atividade biológica). No entanto, somente em 1964, as relações entre estrutura química e atividade biológica passaram a ser descritas de forma quantitativa, sendo este considerado o ano de nascimento do QSAR (Piccirillo & Amaral, 2018).

A rapidez no desenvolvimento da síntese combinatória e técnicas de triagem de alto rendimento permitem uma maior capacidade de gerar e avaliar centenas de milhares de substâncias contra alvos biológicos relevantes em um tempo relativamente curto. Dessa forma, a perspectiva era que o surgimento e a aplicação dessas novas técnicas pudessem aumentar muito a eficiência da descoberta de novos fármacos (Daina, Michielin & Zoete, 2017). No entanto, as altas falhas de transformação de candidatos em novos fármacos são causadas principalmente por perfis indesejáveis de ADME e falta de eficiência (Tian et al., 2015).

Uma grande variedade de métodos *in silico* compartilham o objetivo de prever parâmetros de ADME a partir da estrutura molecular (Daina, Michielin & Zoete, 2017). O trabalho pioneiro de Lipinski e colaboradores (1997) que examinou substâncias ativas por via oral para definir faixas físico-químicas, atualmente, a “Regra dos 5” de Lipinski é amplamente difundida na área da Química Medicinal, sendo usada rotineiramente nos protocolos de descoberta de fármacos (Piccirillo & Amaral, 2018).

A maioria das ferramentas ADME *in silico* estão disponíveis gratuitamente, de modo que o *SwissADME* permite a estimativa de que uma substância química seja substrato da glicoproteína P (P-gp) ou inibidor de isoenzimas CYP. Cálculos de propriedades físico-químicas moleculares são importantes de modo que as clássicas disponíveis são: o número de aceptores e doadores de ligações de hidrogênio, Log de P, área de superfície topológica polar e peso molecular (Cheng et al., 2012). A figura 7 apresenta a página de submissão do *swissADME*.

Figura 7 - Página de submissão *SwissADME*.



Fonte: O autor, 2022.

Legenda: (A) Importação de banco de dados, abrindo um arquivo local ou desenhando uma estrutura química 2D; (B) Introdução de SMILES; (C) Transferência para a lista; (D) Executar.

Como citado anteriormente, é sabido que as substâncias naturais apresentam várias atividades biológicas, sobretudo as neolignananas por suas propriedades evidenciadas em diversos estudos. Em face disso, é de grande relevância pesquisas de interações, tornando-se fundamental identificar potenciais interferências de substâncias com atividades biológicas sobre as atividades dos CYPs. Para alcançar essa meta com as neolignananas pode-se realizar estudos iniciais de predição *in silico*, além de estudos *in vivo* e *in vitro* para assegurar sua utilização com segurança como um possível fitomedicamento.

1.7.1 - Estudos de *docking* molecular

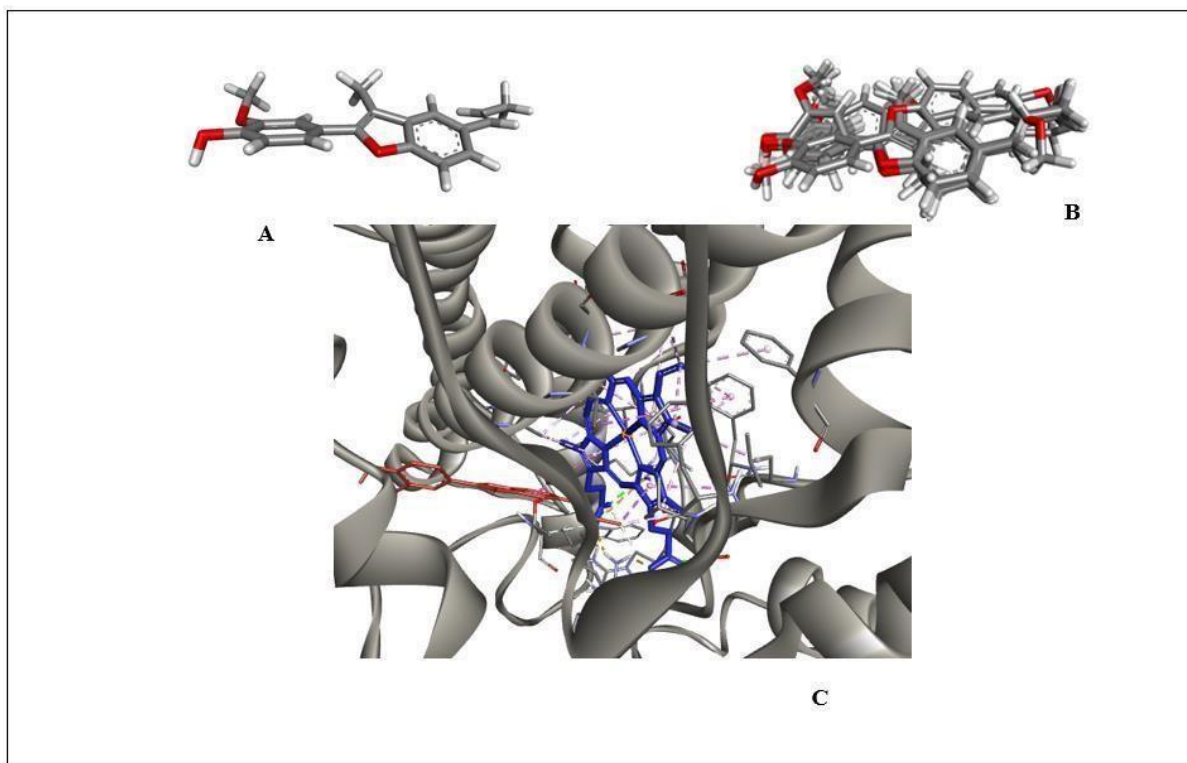
A modelagem computacional e os procedimentos de ancoragem fornecem informações adicionais sobre o mecanismo de inibição da enzima no nível molecular, tornando possível a análise das orientações de interação de ligantes (p.ex. inibidores) ao sítio ativo da macromolécula (enzima), ferramenta útil no entendimento da relação estrutura- atividade que são empregados para verificação de hipótese baseada em resultados experimentais (Mikstacka et al., 2012).

O uso de informações estruturais tridimensionais coletadas de alvos biológicos representam um componente proeminente da química medicinal moderna. O *docking* molecular, ou triagem virtual baseada em estrutura e dinâmica molecular, estão entre as estratégias mais frequentemente utilizadas, devido à sua ampla gama de aplicações na análise de eventos de reconhecimento molecular, tais como energia de ligação, interações moleculares e mudanças conformacionais induzidas (Ferreira et al., 2015).

O *docking* molecular é um dos métodos mais frequentemente utilizado, devido à sua capacidade de prever, com um grau substancial de precisão, a conformação de ligantes de moléculas pequenas dentro do local de ligação alvo apropriado (Meng et al., 2011). O quadro 2 fornece a representação do processo de *docking* molecular.

A estrutura enovelada de todas as enzimas do CYP-P450 apresentam a mesma conformação, embora a identidade das sequências em toda a superfamília seja inferior a 20%. A estrutura tridimensional consiste em 12 α -hélices, numeradas de A a L, que formam a maior parte da proteína, e quatro folhas β . O cofator heme é alojado dentro da hélice-L e da altamente conservada hélice-I, que é perpendicular ao segmento F/G, compreendendo a hélice-F, *loop*-F/G e a hélice-G (Sridhar et al., 2017).

Quadro 2: Representação 3D do processo de *docking* molecular.



Fonte: O autor, 2023.

Legenda: (A) Ligante; (B) Conformações exploradas do ligante; (C) Conformação de ligação de melhor pose e as interações intermoleculares correspondentes identificadas no receptor.

JUSTIFICATIVA

As neolignanas benzofurânicas isoladas em grande quantidade de uma espécie medicinal brasileira, *P. rivinoides*, têm sido estudadas pelo grupo há quase 15 anos. Essas neolignanas têm demonstrado interessantes atividades, tais como antitumoral (Fonseca *et al.*, 2020), leishmanicida e fungicida (Moreira *et al.*, 2016) e, por isso, vimos envidando esforços significativos para explorar o potencial dessas substâncias, inclusive, desenvolvemos e validamos um método de quantificação para análise do eupomatenoide-5, eupomatenoide-6 e do conocarpano por CLAE-DAD-UV (Felisberto *et al.*, 2021). No sentido de acompanhar a produção dessas neolignanas, vislumbramos a possibilidade de transformá-las em fitofármacos (isoladas) ou fitocomplexo (em combinação) para seguir em testes *in vivo*. Ao pensar em um novo fitofármaco ou fitocomplexo é de fundamental importância o conhecimento das interferências em CYPs dessas neolignanas, em especial o eupomatenoide-5 que é biossintetizado em maior quantidade por *P. rivinoides*, tais interferências podem levar a desfechos não benéficos, como reações adversas importantes. Esses testes iniciais *in vitro* em preparações microsossomais hepáticas de roedores são de extrema importância pela homologia na sequência de aminoácidos permitem resultados robustos, seguido por testes em enzimas recombinantes humanas, testes em modelo *in vivo* em roedores e, por fim, estudos de *docking* molecular permitem o conhecimento das interações entre essas neolignanas benzofurânicas e as subfamílias de CYPs. Assim, será possível a previsão de interações medicamentosas que são fundamentais para ajustes de doses.

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo Geral:

Investigar as interferências entre sistemas de expressão de CYP humana recombinante (*rhCYP*) com neolignanas bioativas isoladas e do extrato hidroalcoólico de *Piper rivinoides* Kunth.

2.2- Objetivos Específicos

- ✓ Investigar as eventuais diferenças cinéticas, *in vivo*, entre microsossomos hepáticos de camundongos tratados com eupomatenóide-5 e o extrato hidroalcoólico de *Piper rivinoides*;
- ✓ Investigar as interferências, *in vitro*, entre sistemas de expressão de *rhCYP* com neolignanas isoladas e o extrato hidroalcoólico de *P. rivinoides*, utilizando a reação de EROD como marcador da atividade da sub-família CYP1A e a reação de MROD como marcador da atividade da isoforma CYP1A2;
- ✓ Investigar as interações, *in silico*, entre isoenzimas CYP (CYP1A2, CYP2C9 e CYP3A4) e neolignanas isoladas *P. rivinoides* por estudos de predição no programa Swiss ADME;
- ✓ Realizar estudos de *docking* molecular, entre isoenzimas CYP1A1 e CYP1A2 com neolignanas isoladas de *P. rivinoides*, bem como os tipos de interação *in silico*.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Determinação das atividades enzimáticas em microsossomos hepáticos de camundongos

As reações para avaliação das atividades dos CYPs 1A, 2B, 2C, 2E e 3A foram padronizadas no Laboratório de Toxicologia Ambiental (LTA) da Escola Nacional de Saúde Pública da Fundação Oswaldo Cruz (ENSP/ FIOCRUZ): Para o CYP1A foram realizadas por reações de 7-etoxioresorufina-*O*-desetilase (EROD) e 7-metoxioresorufina-*O*-desmetilase (MROD). A especificidade das reações é maior quando os animais são previamente tratados com indutores de CYP1A, como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (Lubet et al., 1985; Burke et al., 1995). Para os CYPs 2B, 2C, 2E e 3A, foram realizadas reações Benziloxioresorufina-*O*-desbenzilase (BROD) e Pentoxioresorufina-*O*-despentilase; Hidroxilação do diclofenaco (DCFh); *p*-nitrofenol-hidroxilase (PNPh, marcador do CYP2E1) e *N*-eritromicina-desmetilase (ERMd), respectivamente. O Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FIOCRUZ autorizou esses estudos e tem o número LW-12/19.

3.1.2- Preparo da fração microsossomal hepática

A fração microsossomal dos tecidos hepáticos de ratas previamente tratados com os indutores encontram-se criopreservadas em nitrogênio líquido. A fração microsossomal foi preparada segundo De-Oliveira e colaboradores (1997).

3.1.3- Quantificação de proteínas na fração microsossomal e superssomas

A concentração total de proteínas nas amostras de fração microsossomal dos ratos e dos superssomas (*rhCYP*) foi determinada por espectrofotometria pelo método de Bradford (1976), que se baseia na ligação do corante azul de Coomassie (Reagente de Bradford) à proteína.

3.2- Determinação de atividade em *rhCYP*

As atividades de *rhCYP* foram padronizadas no LTA durante a presente Tese. Para tal foram utilizados os *rhCYP1A1* e *rhCYP1A2* expressas em células de inseto infectadas com

baculovirus contendo inserções de cDNA para o CYP450 redutase, seguindo o protocolo do fabricante (Sigma®), com algumas modificações. Cada *kit* adquirido continha 0,5 nmol de isoenzima CYP450 e foram diluídos em 0,5 ml de potássio 100 mM fosfato, pH 7,4 (em banho de gelo) e distribuídas para tubos de criogenia contendo 40 uL por tubo, preservados em nitrogênio líquido (NL) até o momento do uso. De maneira resumida, as reações com os *kits* foram feitas em triplicatas, ocorreram em tempo real em cubeta de quartzo e foram medidas em espectrofluorímetro Shimadzu RF-5301PC, adaptado a banho-maria com termostatização para manter a temperatura estável em 37 °C.

3.2.1- Atividade de neolignanas isoladas de *Piper rivinoides* em CYPs

As neolignanas foram isoladas de *P. rivinoides* segundo Moreira et al., 2016, pelo pesquisador Dr. Andre Mesquita Marques de Farmanguinhos/ FIOCRUZ. Essas substâncias foram avaliadas, inicialmente, na concentração de 100 µM frente os diferentes CYPs recombinantes e o perfil de inibição foi realizado com concentrações decrescentes das neolignanas e usadas para compor a curva de inibição e obtenção da concentração inibitória média (CI₅₀).

3.3- Determinação dos descritores físico-químicos para a predição de parâmetros ADMETox e SAR

Os descritores físico-químicos, toxicológicos e de biodisponibilidade foram realizados para as estruturas químicas das neolignanas usando os servidores e programas *Molinsiration Cheminformatics* version 2016.10 server, *SwissADME* (*Swiss Institute of Bioinformatics*) e *Osiris Data Warrior* (Actelion Pharmaceuticals Ltd), *OSIRIS DataWarrior*.

Os cálculos foram realizados para a determinação dos descritores físico-químicos, tais como lipofilicidade, solubilidade, aceitor e doador de hidrogênio, topologia da área de superfície polar, *Druglikness*, *Drug-score*, riscos para efeitos toxicológicos, potencial para atravessar barreira hematoencefálica (BHE) e placentária, absorção no trato gastrointestinal (GI), inibição das CYPs 1A2, 2C19, 2C9, 2D6 e 3A4, além do estudo de inibição da P-gp e predição da bioatividade como modulador de canal de íons e inibidor de protease.

3.4- Estudos das interações *in Silico*: estudos por modelagem molecular

As interações das neolignanas com CYP1A1 e CYP1A2 foram analisadas por estudos de *docking* molecular. Para tal, foi utilizada a estrutura de raios-X do cristal de CYP1A1 humano (código PDB: 4I8V) e CYP1A2 humano (código PDB: 2HI4), adquiridas no Banco de Dados de Proteínas (PDB, *The Protein Data Bank*) (Berman et al., 2002).

As estruturas tridimensionais (3D) das neolignanas isoladas foram construídas durante a Tese de Rafael de Oliveira Santos (2021) no programa Spartan' 10 (Wavefunctin Inc. Irvine, CA), e as geometrias foram otimizadas pelo método de mecânica molecular com o campo de força MMFF, utilizando o estado fundamental (*ground state*). Em seguida, foi utilizada a função de busca *conformer distribution* para as análises conformacionais. Finalmente, foi utilizado o método semiempírico RM1 para realizar a otimização das conformações obtidas com a finalidade de encontrar as estruturas com menor energia (Santos *et al.*, 2021). Para o *docking* molecular, foi utilizado o programa GOLD[®] 2022.1 (Genetic Optimization for Ligand Docking) para Windows e o visualizador Hermes[®], que é parte integrante da interface GOLD[®].

Para a análise das interações entre as neolignanas, CYP1A1 e CYP1A2, foi utilizado o programa *Discorevy Studio* 2021 (BIOVIA, 2021). Este programa oferece ao usuário quatro funções de pontuação distintas, como GoldScore, ChemScore, ASP e ChemPLP (Liebeschuetz, Cole & Korb, 2012). Funções de pontuação pelos algoritmos genéricos (GA), atribuem *scores* para as posições dos ligantes no sítio ativo e as possíveis interações que podem acontecer entre ligante-receptor. Assim, a busca por candidatos a ligantes dos alvos estudados ocorre de forma mais rápida e fácil (Neudert & Klebe, 2011).

O GA é um programa de computador que simula o processo da evolução, manipulando uma coleção de estruturas de dados estruturas chamadas cromossomos. Cada uma dessas estruturas codifica uma possível solução, ou seja, uma possível orientação do ligante dentro do sítio de ligação de determinada proteína. Assim pode ser atribuída uma pontuação de aptidão com base sobre o mérito relativo dessa solução (Jones et al., 1997).

A capacidade de reproduzir a orientação experimental de ligantes em relação aos modos de ligação observados em complexos com estrutura resolvida (validação do método) é a parte mais importante do cálculo de docagem. É estabelecida bem-sucedida, quando o desvio médio quadrático ("*Root Mean Square Deviation*", RMSD) obtido for $\leq 2,0$ Å entre a

orientação cristalográfica (experimental) e a orientação obtida durante o cálculo (Rodrigues et al., 2012).

Na definição da região de ligação foram utilizadas coordenadas x, y, z, onde para o CYP1A1 (x = -16,713571; y = 36,600762; z = -28, 736762) e para o CYP1A2 (x = 2,487286; y = 17,834048; z = 20,154810) para especificar o espaço de busca (20 Å). As simulações de *docking* foram realizadas usando algoritmo genético, onde o GoldScore foi selecionado para determinação da função *fitness*. O arquivo de parâmetros da função de pontuação heme (chemscore.p450_csd.params), foi utilizado por demonstrar melhor desempenho no acoplamento de ligantes a proteínas que contém grupo heme.

Durante o estudo de *docking*, as estruturas das enzimas foram mantidas rígidas, enquanto os ligantes foram deixados totalmente flexíveis.

3.5- Substâncias e reagentes utilizados nos ensaios

Solventes:

Foram utilizadas os seguintes solventes nos testes: dimetilsulfóxido (DMSO, 802912, Merck), tris(hidroximetil)aminometano (TRIS, 8382Z012709, Merck), sacarose (040291, Isifar), fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄, A0185473030, Merck), fosfato de potássio dibásico (K₂HPO₄, A0114401049, Merck), cloreto de potássio (KCl, K41042236032, Merck), glicerol (K37512592727, Merck), ácido etilenodiamino tetra- acético (EDTA, 040M0046V, Sigma-Aldrich), formaldeído (K46701403, Merck), fluconazol (Fluco, BP1174, Sigma-Aldrich).

Substâncias:

Foram utilizadas as seguintes substâncias nos testes: β-nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (β-NADP, 051M7000V, Sigma-Aldrich), glicose-6-fosfato (097KS167, Sigma-Aldrich), glicose-6-fosfato-desidrogenase (SLBC6437V, Sigma- Aldrich), cloreto de magnésio (MgCl₂, 1058331000, Merck), resorufina (2301545, Sigma- Aldrich), etoxiresorufina (1004611, Boehringer Mannheim),β-naftoflavona (N182, Ega- Chemie) α-naftoflavona (N180, Ega-Chemie). As neolignanas conocarpano, eupamotenoide- 5 e eupamotenoide-6 foram obtidas a partir de isolamento da fração em *n*-hexano do extrato de *P. rivinoides*, de acordo com Moreira e colaboradores (2016). A pureza cromatográfica dessas neolignanas foi

determinada por CLAE-UV, e demonstrou ser > 98%. Também foi utilizada α -naftoflavona (086K1428, Sigma-Aldrich) como controle positivo, enquanto inibidor conhecido da CYP1A.

3.5.1- Extrato e partições de *P. rivinoides* Kunth

Folhas de *P. rivinoides* foram secas à temperatura ambiente e fragmentadas em moinho de facas rendendo 230 g. O extrato foi preparado por maceração estática com uma mistura de etanol: água (9:1, v/v) em temperatura ambiente, filtrado e concentrado sob vácuo a 40 °C. O extrato hidroalcoólico obtido foi então liofilizado rendendo 20 g de um resíduo sólido verde amorfo. O procedimento de extração foi realizado em Farmanguinhos/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil. O extrato etanólico obtido das folhas por maceração estática foi particionado com *n*-hexano, diclorometano (DCM) e acetato de etila. O extrato etanólico foi avaliado em preparações microssomais contendo CYP1A. O extrato foi diluído em DMSO 1% (p/v), tampão Tris 20mM (pH 7,5) e tampão K₂HPO₄ 100 mM (pH 7,8). Esse estudo foi cadastrado no SisGen sob o código AE4E953.

3.6- Ensaaios Enzimáticos:

3.6.1 – Indução da expressão *in vivo* do CYP1A

3.6.1.1- Tratamento 1– camundongos DBA/2

Após sete dias de aclimatização, o tratamento dos animais foi iniciado, de acordo com Rodrigues e Prough (1991), com adaptações. Os animais, separados por grupos (n=3), foram tratados por 4 dias consecutivos por via intraperitoneal (i.p.), em dose única diária da seguinte forma: Grupo 1 Controle (óleo de milho) recebeu doses de óleo de milho (i.p.) (MKBF2096V, Sigma-Aldrich) por 4 dias consecutivos, caracterizado como grupo controle para comparar o potencial de indução do CYP1A nos roedores. O grupo 2 (n=3) tratado com β -naftoflavona em suspensão de óleo de milho (MKBF2096V, Sigma-Aldrich) 50 mg/kg/i.p de peso corporal; Grupo 3 (n=3) tratado por 4 dias consecutivos com eupomatenoide-5 50 mg/kg de peso corporal em suspensão de óleo de milho (MKBF2096V, Sigma-Aldrich).

3.6.1.2 - Tratamento 2 – Camundongos *Swiss*

O tratamento dos animais seguiu conforme a metodologia de Rodrigues e Prough (1991), da seguinte forma: Grupo 1 (n=3) tratado com β -naftoflavona em suspensão de óleo de milho (MKBF2096V, Sigma-Aldrich) por 4 dias consecutivos e por via intraperitoneal (i.p.). Foram administradas diariamente dose única de 80 mg/kg de peso corporal, no período da manhã. O Grupo 2 (n=3) recebeu doses de óleo de milho i.p. pelo mesmo período, caracterizado como grupo controle para comparar o potencial de indução do CYP1A nos roedores. Grupo 3 (n=3) foi tratado com eupomatenoide-5 em suspensão de óleo de milho, diariamente, por 4 dias, dose única de 80 mg/kg de peso corporal i.p. Grupo 4 (n=3) foi tratado com extrato hidroalcoólico de *P. rivinoides* 80 mg/kg de peso corporal i.p. O tratamento foi realizado para verificar seu comportamento na atividade *in vivo* do CYP1A. 24 h após a última dose, todos os grupos receberam uma solução aquosa de cafeína 20 mg/kg de peso corporal (i.p.) A cafeína foi utilizada nesse tratamento por ser metabolizada pela isoforma CYP1A2. Durante a Dissertação de Mestrado de Rafael Santos Oliveira (2017), os resultados demonstraram que a concentração máxima da cafeína no plasma de camundongos é atingida em 30 min. A partir dessa informação, nossa investigação na atividade do CYP1A *in vivo* determinaria um aumento ou diminuição da concentração de cafeína durante o tratamento.

3.7- Eutanásia e remoção dos Órgãos

Todos os animais de ambos os tratamentos foram mortos por deslocamento cervical no quinto dia após jejum de 24 h a contar da última dose. Imediatamente após a eutanásia, foi feita uma ampla incisão longitudinal e outra transversal no abdômen do animal, sendo o fígado rapidamente retirado, resfriado em banho de gelo e pesado. Os fígados foram embalados individualmente em papel alumínio, congelados e armazenados em nitrogênio líquido até o momento da preparação da fração microsomal.

3.7.1- Preparação das frações microsossomais hepática para avaliação da atividade CYP1A1/A2

As frações microsossomais hepáticas das ratas (item 2.2) e controles foram obtidas segundo De-Oliveira e colaboradores (1997). Os fígados foram retirados do nitrogênio líquido e imediatamente transferidos para o banho de gelo para descongelar. A partir de

então, todo o procedimento e suas etapas subsequentes se seguiram em temperatura igual ou inferior à 4 °C. Os fígados foram pesados, lavados com solução de sacarose 250 mM e secos com papel de filtro. Em seguida, os órgãos foram homogeneizados em solução tampão Tris 100 mM com KCl 150 mM (pH 7,4), usando homogeneizador de vidro (capacidade de 50 mL) e pistilo de teflon, a uma velocidade aproximada de 1.200 x g. O volume da solução tampão correspondeu a quatro vezes o peso do órgão. Em seguida, o homogeneizado hepático foi levado à centrifugação em ultracentrífuga Beckman® XL-90 (rotor 70.1 Ti, gentilmente autorizado pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS/ FIOCRUZ) a 4 °C e a 9.000 x g por 30 min. Após centrifugação, o sedimento contendo núcleo, mitocôndrias e restos celulares foi desprezado. O sobrenadante obtido foi filtrado em gaze e centrifugado a 100.000 x g a 4 °C por 1 h na ultracentrífuga Beckman®. Após a segunda ultracentrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento contendo as enzimas ligadas ao retículo endoplasmático liso (microssomos) foi homogeneizado em tampão fosfato de potássio dibásico 100 mM com 20% de glicerol e EDTA 1 mM (pH 7,4), a uma velocidade de aproximadamente 250 x g. Os microssomos, obtidos foram distribuídos em tubos para criogenia e congelados em nitrogênio líquido, até o momento de uso. O motor do homogeneizador usado para a preparação microssomal foi da Novatécnica® (Agitador Mecânico 110v modelo NT136 50W – 0,5A 60Hz).

3.7.2 - Quantificação de proteínas na fração microssomal

A concentração total de proteínas nas amostras de fração microssomal das ratas controles e tratadas foi determinada, separadamente, usando o método de Bradford (1976), que se baseia na ligação do corante azul de Coomassie (Reagente de Bradford, SLBP3810V, Sigma-Aldrich) à proteína, sendo a intensidade da cor do corante proporcional à concentração de proteínas da amostra.

Para a obtenção da curva padrão para quantificação, foram adicionados 250 µL do Reagente de Bradford aos poços contendo 5 µL das diferentes concentrações de albumina sérica bovina (SLBK9549V, Sigma-Aldrich): 0,28, 0,56, 0,84 e 1,4 mg/mL. A formação do complexo proteína-corante é rápida e estável no período de 5 a 60 min e, por tal, foi adotado um intervalo constante de 30 min entre a adição do reagente às proteínas diluídas e a leitura de absorvância, realizada por espectrofotometria a 595 nm, em leitora de microplacas EZ Read 2000 Biochrom®. Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

A concentração total de proteínas nas amostras foi expressa em mg/ mL. Os resultados representam a média de três leituras das concentrações do padrão e das amostras.

3.7.3- Determinação da atividade da CYP1A na fração microsomal hepática

3.7.3.1 - Determinação da curva padrão de resorufina

A curva padrão de resorufina foi constituída de diferentes quantidades de resorufina obtidas a partir de uma solução-mãe de resorufina 1 μM em tampão K_2HPO_4 100 mM (pH 7,8). Volumes diferentes da solução estoque de resorufina foram levadas à cubeta de quartzo e o volume final de 2 mL foi obtido com solução de tampão K_2HPO_4 100 mM (pH 7,8), de acordo com a tabela 3. Todas as determinações foram realizadas em triplicata para cada ponto da curva.

Tabela 3 - Concentrações de resorufina e volume de tampão adicionado à cubeta para obtenção da curva padrão.

Volume de Resorufina 1 μM μL (pmoles)	Volume de Solução Tampão K_2HPO_4 100 mM (pH 7,8) μL
0 (0)	2000
10 (10)	1990
20 (20)	1980
50 (50)	1950
100 (100)	1900

Fonte: O autor, 2022.

3.7.1.2 - Determinação das atividades de 7-etoxiresorufina-*O*-desetilase (EROD) e 7-metoxiresorufina-*O*-desmetilase (MROD)

A etoxiresorufina e a metoxiresorufina são metabolizadas preferencialmente por isoenzimas CYP1A1 e CYP1A2, respectivamente. Esta reação leva à formação da resorufina, cujo acúmulo pode ser medido pela intensidade da fluorescência avaliada por um espectrofluorímetro (Nerurkar et al., 1993; Parkinson, 2001).

A determinação da atividade EROD e MROD na fração microsomal hepática foi realizada como descrito por Burke e colaboradores (1985), exceto pela substituição do NADPH (fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido) por um sistema regenerador de NADPH que funciona como co-fator para várias reações de biotransformação (DE Oliveira et al., 1999). As reações ocorreram em tempo real em cubeta de quartzo e foram medidas em espectrofluorímetro Shimadzu RF-5301PC, adaptado a banho-maria com termostatização para manter a temperatura estável em 37 °C, cuja leitura foi realizada com excitação de 550 nm e emissão de 582 nm. Os dados foram manipulados no programa RF- 530 XPC. Inicialmente foram adicionados à cubeta de quartzo solução tampão de K₂HPO₄ 100 mM (pH 7,8) em quantidade necessária para completar o volume final de 2000 µL e pré- incubação por 3 min a 37 °C. Após o tempo de pré-incubação, foram adicionados 1 mg/mL (preparação microsomal) 0,042 mg/ mL (rhCYP1A1) ou 0,020 mg/ mL (rhCYP1A2) em solução tampão K₂HPO₄ 100 mM pH (7,8) para fornecer 0,5 mg de proteína na cubeta; substrato específico (EROD = etoxiresorufina 1mM em DMSO 1% p/v ou MROD = metoxiresorufina 1mM em DMSO 1% p/v) para uma concentração final de 5 µM na cubeta. Após 2 min, a reação teve início com a adição de sistema regenerador de NADPH (glicose- 6- fosfato 5 mM; β-NADP 0,25 mM; solução de MgCl₂ 2,5 mM; glicose- 6-fosfato- desidrogenase 0,5 U/mL). A reação ocorreu durante 60 s e o produto resorufina, substância fluorescente, foi quantificado em tempo real.

Os valores de fluorescência obtidos foram convertidos para quantidade de resorufina produzida pela curva padrão e expresso em picomoles (pmol) de resorufina/ mg de proteína/ min da reação. Todas as reações foram realizadas em triplicata.

3.8– Análise estatística

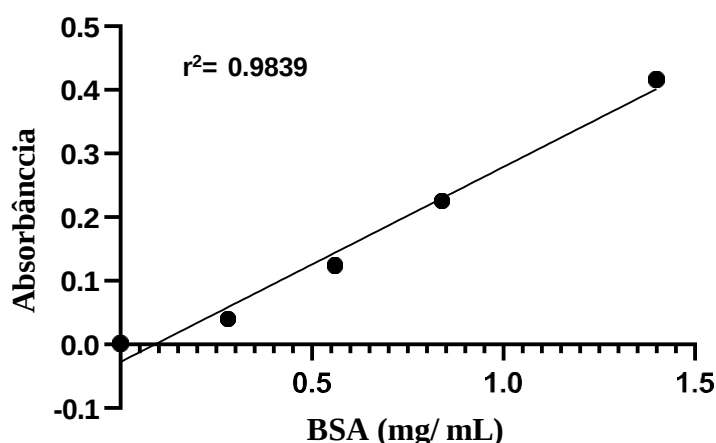
Para testar os dados paramétricos e a distribuição normal das variáveis, a comparação estatística das médias foi realizada pela análise de variância de uma via (ANOVA) seguido de pós teste de Bonferroni, quando aplicável. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. O programa usado para construir os gráficos e fazer as análises estatísticas foi o Graphpad prism9[®].

4 - RESULTADOS

4.1 - Quantificação de proteínas na fração microsomal de camundongos e dos *rhCYP1A1* e *rhCYP1A2*

A curva padrão para quantificação de proteínas na fração microsomal de camundongos e em *rhCYP1A1/A2* apresentou um coeficiente de correlação maior que 0,98 ($r^2 = 0,9839$) e, portanto, foi utilizada para quantificação de proteínas. Os resultados são fornecidos em mg/mL, onde y = absorbância; x = concentração em mg/mL equivalente a BSA (Figura 8).

Figura 8 - Curva padrão para quantificação de proteínas.

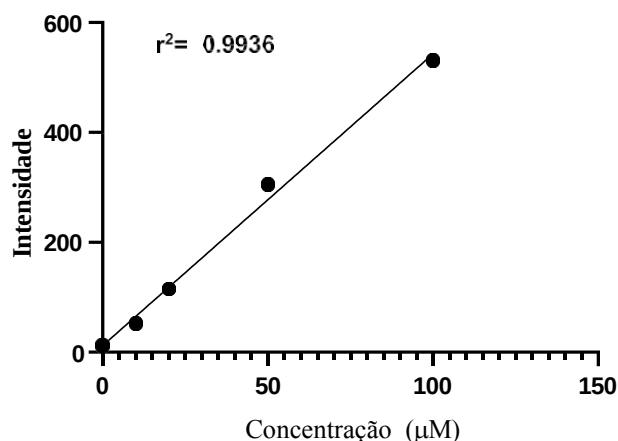


Legenda: A leitura de absorbância das diferentes concentrações do padrão BSA(0,28, 0,56, 0,84 e 1,4 mg/mL) foi realizada por espectrofotometria a 595 nm na leitora de microplacas EZ Read 2000 Biochrom®, expressados em mg/ mL.

4.2 - Curva padrão de resorufina

Para a determinação da atividade do CYP1A foi construída uma curva padrão de resorufina a partir de uma solução-mãe de resorufina 1 μ M em tampão K_2HPO_4 100 mM (pH 7,8) para obtenção da equação de cálculo da fluorescência em diferentes concentrações. A curva padrão ($r^2 = 0,9936$) para quantificação de resorufina é representada na figura 9.

Figura 9 - Curva padrão de resorufina para quantificação da atividade do CYP1A.



Legenda: Realizada em espectrofluorímetro de cubeta (Shimadzu RF-5301PC) acoplado ao banho-maria FANEM®.

4.3 - Descritores físico-químicos para a predição de parâmetros ADME

Os descritores físico-químicos, toxicológicos e de biodisponibilidade foram realizados para as neolignanas usando o *SwissADME* (*Swiss Institute of Bioinformatics*) que necessita apenas da estrutura química otimizada ou seu SMILES. A estrutura química otimizada, ou seja, na conformação de menor energia foi obtida no Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Os cálculos realizados para a determinação desses descritores físico-químicos, tais como lipofilicidade, solubilidade, acceptor e doador de hidrogênio, topologia da área de superfície polar, *Druglikeness*, *Drug-score*, riscos para efeitos toxicológicos, potencial para atravessar barreira hematoencefálica (BHE) e placentária, absorção no trato gastrointestinal (GI), inibição das CYPs 1A2, 2C19, 2C9, 2D6 e 3A4, além de inibição da glicoproteína- P (P-gp) estão representados na Tabela 4.

Tabela 4 - Representação da predição de parâmetros ADME para as neolignanas.

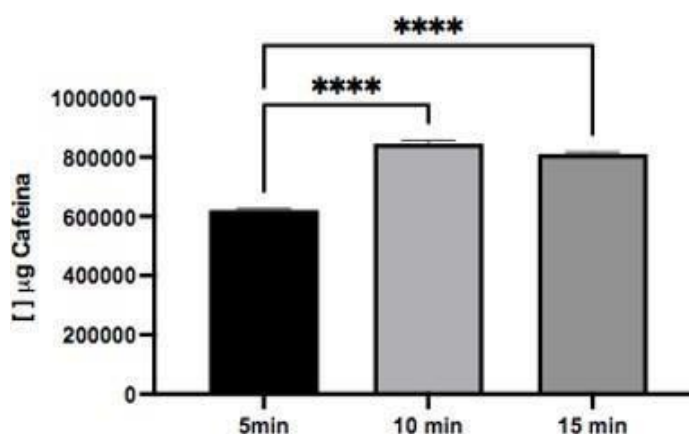
Neolignanas	GI	BHE	P-gp	CYP1A2	CYP2C19	CYP2C9	CYP2D6	CYP3A4
Eupomatenoide-5	Alto	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Não
Eupomatenoide-6	Alto	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não
Conocarpano	Alto	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Não

Legenda: Predição de parâmetros físico-químicos executados no *swiss* ADME das neolignanas, demonstrando absorção gastrointestinal (GI), permeabilidade pela barreira hemato-encefálica (BHE), ligação com a proteína P-gp (P-gp) e interação com os CYPs 1A2, 2C19, 2C9, 2D6 e 3A4.

4.4 - Determinação do tempo para punção cardíaca pós-tratamento

Foram testadas administrações de solução de cafeína (i.p.) em diferentes tempos para determinar o melhor tempo de coleta via punção cardíaca após o tratamento. Como resultado, optou-se pelo tempo de 15 min por não haver diferença estatística da concentração plasmática da cafeína quanto ao regime de doses (Figura 10).

Figura 10 - Determinação do tempo para a punção cardíaca pós-tratamento.

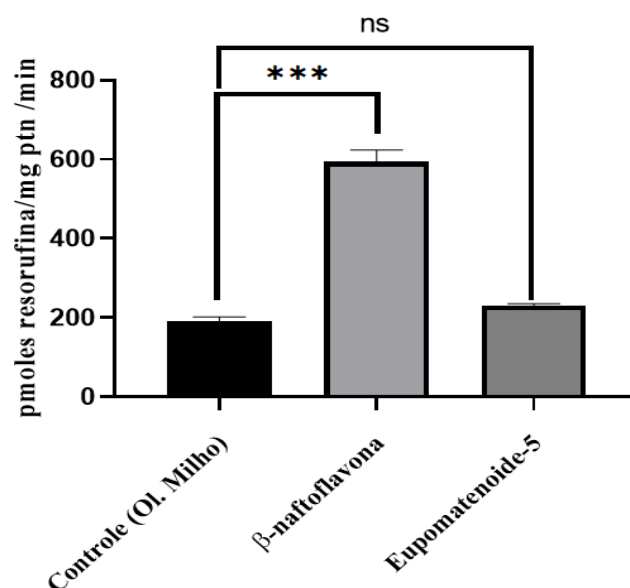


Legenda: Concentração plasmática em µg/mL de cafeína após administração via intra-peritoneal, (média ± DP, triplicata).

4.5 - Resultados do tratamento *in vivo* com β -naftoflavona e com eupomatenoide-5

Os camundongos DBA-2 ($n = 3$) foram tratados com administrações de β - naftoflavona 50 mg/kg de peso animal (grupo 1) ou eupomatenoide-5 50 mg/kg de peso animal (grupo 2) durante 4 dias. O grupo controle ($n=3$) recebeu apenas óleo de milho. O resultado demonstrou que o tratamento *in vivo* com β -naftoflavona aumentou a expressão do CYP1A em, aproximadamente, 3,0 vezes quando comparado ao controle. O tratamento com eupomatenoide-5 demonstrou uma indução com cerca de 1,2 vezes, quando comparado ao controle, não sendo significativo ($p > 0,05$) (Figura 11).

Figura 11 - Atividade do CYP1A *in vivo* na fração microsomal de camundongos DBA/2



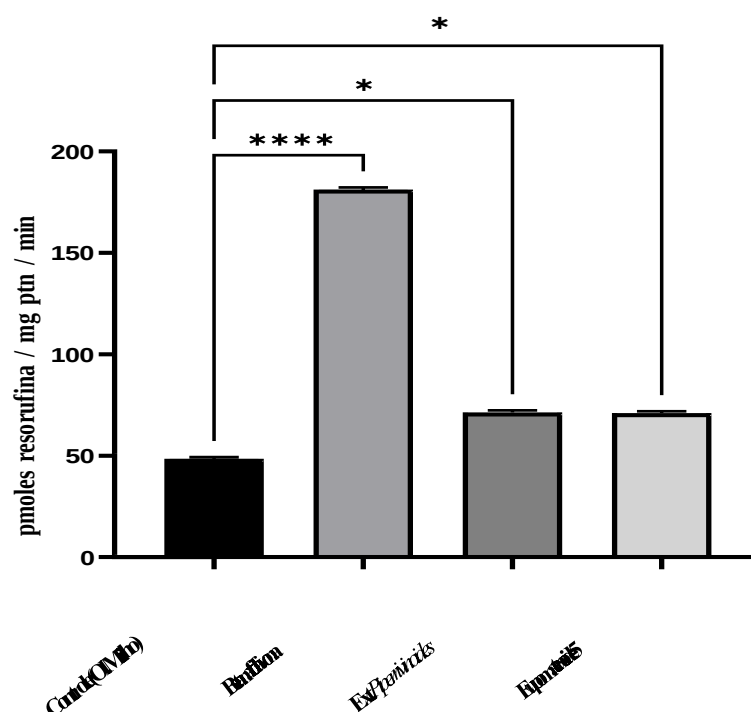
Legenda: Camundongos controle vs. tratados (média $\pm$ DP, triplicata). Os dados foram analisados por ANOVA, seguidos de pós teste de Bonferroni. Os valores que diferiram estatisticamente do controle estão assinalados *** para $p < 0,0003$, e assinalados ns, sem diferença estatística ($p > 0,05$).

4.6 - Resultados do tratamento *in vivo* com β -naftoflavona, eupomatenoide-5 e com extrato hidroalcoólico de *Piper rivinoides* concomitante à administração de cafeína

Os camundongos *Swiss* foram tratados durante quatro dias com óleo de milho via por via i.p. (grupo controle, $n=3$), ou β -naftoflavona 80 mg/kg/ i.p. de peso corporal (grupo 1)

em suspensão em óleo de milho ou eupomatenóide-5 80 mg/kg/ i.p. (grupo 2) e o extrato hidroalcoólico de *P. rivinoides* 80 mg/kg de peso animal/ i.p. (grupo 3), concomitante a administração de suspensão de cafeína em óleo de milho 20 mg/ kg i.p. 16 h. A eutanásia foi realizada 15 min após a administração da cafeína. O resultado demonstrou uma indução significativa, quando comparado ao grupo controle, de 3,8 vezes (377%) para a β - naftoflavona ($p < 0,03$) e de aproximadamente 1,49 vezes (cerca de 47%) para o eupomatenóide-5 ($p < 0,03$) e o extrato hidroalcoólico de *P. rivinoides* ($p < 0,03$) (Figura 12).

Figura 12 - Atividade do CYP1A *in vivo* na fração microsomal de camundongos *Swiss*.

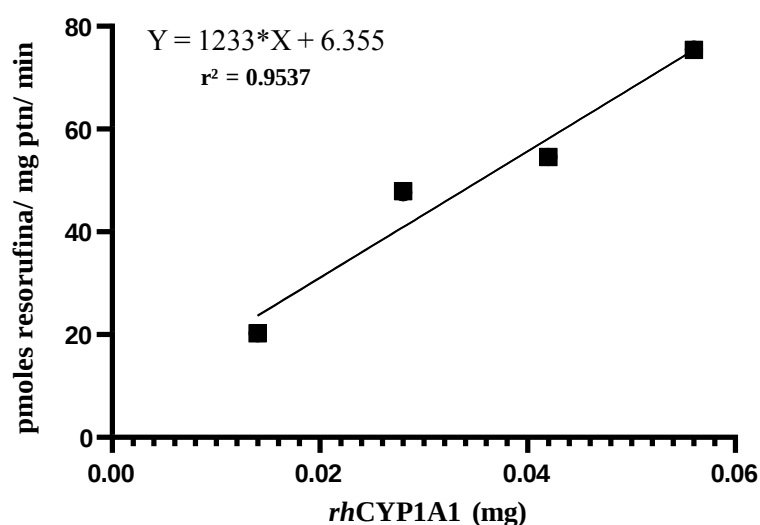


Legenda: Camundongos controle vs. tratados (média±DP, triplicata). Os dados foram analisados por ANOVA, seguidos de pós teste de Bonferroni, os valores que diferiram estatisticamente do controle ($p < 0,05$) são assinalados com *, para ($p < 0,0003$) são assinalados com (***).

4.7 – Resultados com *rhCYP*

Concentrações de proteína (mg/mL) variando de 0,014 a 0,056 mg/ 2 mL foram testadas para investigações com *rhCYP1A1*, e 0,042 mg de proteína (correspondente a 21 µg de *rhCYP1A1*/ mL) foi selecionado para a reação EROD. Esta reação é usada para investigações da atividade CYP1A1 (Figura 13).

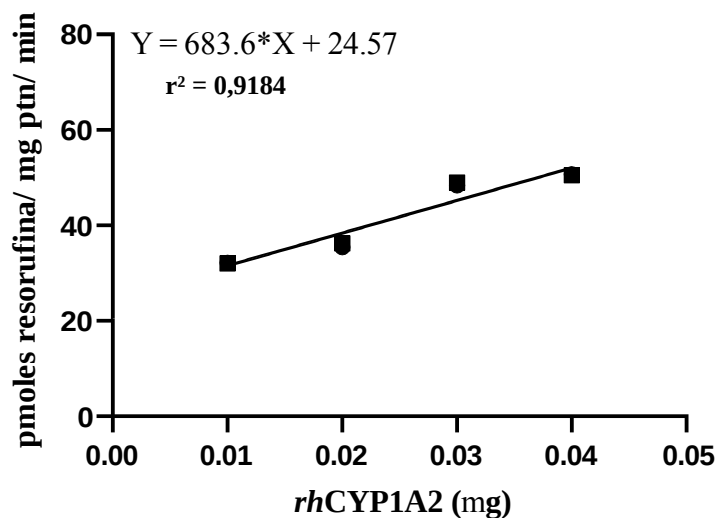
Figura 13 - Determinação da quantidade de *rhCYP1A1* (mg) a ser usada nos ensaios EROD.



Legenda: Atividades EROD (pmoles resorufina/ mg ptn/ min) com diferentes quantidades de *rhCYP1A1*: 0,014; 0,028; 0,042 e 0,056 mg (Média de determinação em duplicata)

Para *rhCYP1A2* também foram testadas as concentrações de proteína (mg/mL), variando de 0,010 a 0,040 mg/ 2 mL, e 0,020 mg de proteína (correspondente a 10 µg de *rhCYP1A2*/mL) foi selecionado para a reação MROD. Esta reação é usada para investigações da atividade CYP1A2 (Figura 14).

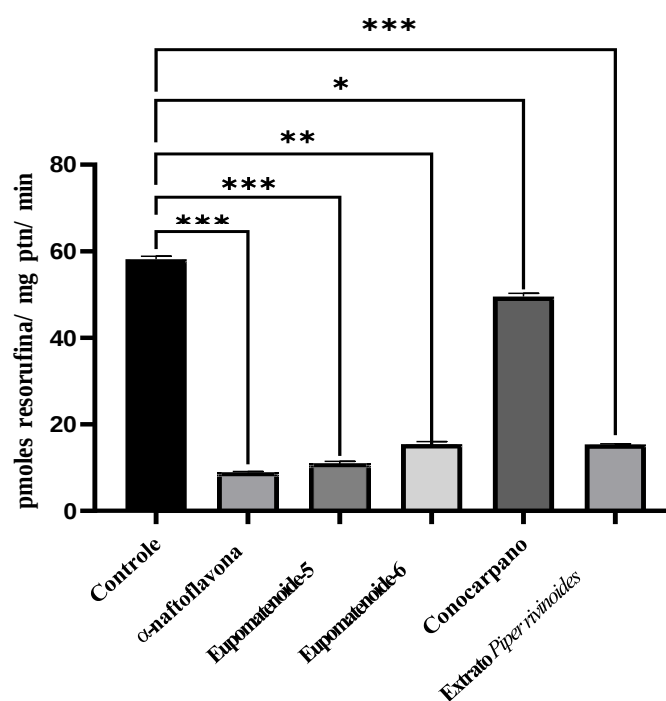
Figura 14 - Determinação da quantidade de *rhCYP1A2* (mg) a ser usada nos ensaios MROD



Legenda: Atividades de MROD (pmoles resorufina/ mg ptn/ min) com diferentes quantidades de *rhCYP1A2*: 0,010; 0,020; 0,030 e 0,040 mg (média de determinação em duplicata).

A atividade das neolignanas isoladas (100 μ M) e extrato hidroalcolico de *P. rivinoides* (100 μ g/mL) em *rhCYP1A1* demonstrou que tanto as substâncias puras quanto o extrato foram capazes de inibir a atividade de *rhCYP1A1*. A inibição da atividade enzimática foi de cerca de 81% para o eupomatenóide-5; 73% o eupomatenóide-6; 14% para o conocarpano e 73% para extrato de *P. rivinoides*. A substância α -naftoflavona (100 μ M), conhecido como um potente inibidor de CYP1A, utilizada como controle positivo, inibiu cerca de 85% da atividade (Figura 4). Esses resultados confirmam a potente interação dessas neolignanas com o CYP1A previamente demonstrados por nosso grupo em fração microssomal hepática de ratos (Santos et al., 2021) (Figura 15).

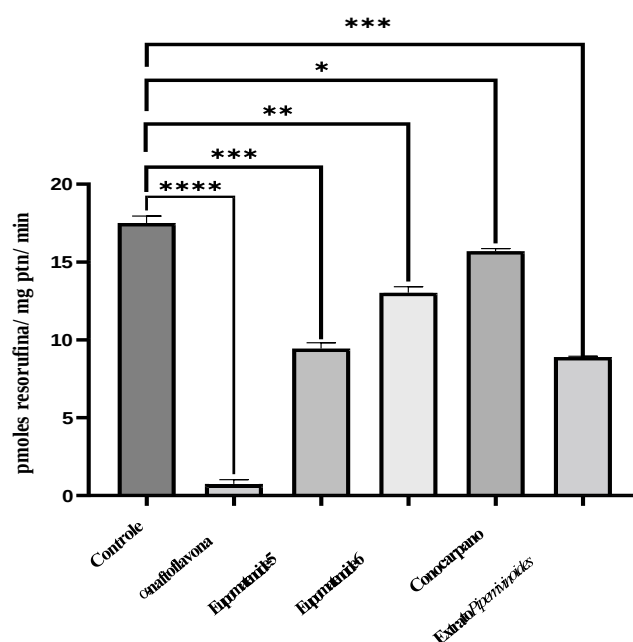
Figura 15 - Atividade inibitória de neolignanas isoladas, α -naftoflavona e extrato de *Piper rivinoides* em *rhCYP1A1*.



Legenda: Atividade EROD (pmoles de resorufina/mg ptn/min, média $\pm$ DP, triplicata) com soluções de 0,042 mg ptn/ 2 mL e 100 μ M das neolignanas isoladas e α -naftoflavona. A concentração do extrato de *P. rivinoides* foi de 100 μ g/mL. Os dados foram analisados por ANOVA, seguido do teste de comparações de Bonferroni e valores que diferiram estatisticamente do controle ($p < 0,05$) marcados (*), para ($p < 0,0003$) marcados (***) e para ($p < 0,0001$), verificadas (****).

Na investigação utilizando a reação MROD, as neolignanas isoladas (100 μ M) e o extrato de *P. rivinoides* (100 μ g/mL) também foram capazes de inibir a atividade de *rhCYP1A2*, em 45,6% para o eupomatenóide-5; 26,4% para o eupomatenóide-6, 11,0% para o conocarpano e 49,7% para o extrato de *P. rivinoides*. Além disso, α -naftoflavona (100 μ M) (controle positivo) inibiu a atividade enzimática em 95,5%. Portanto, dentre as neolignanas testadas, eupomatenóide-5 foi a mais ativa (Figura 16).

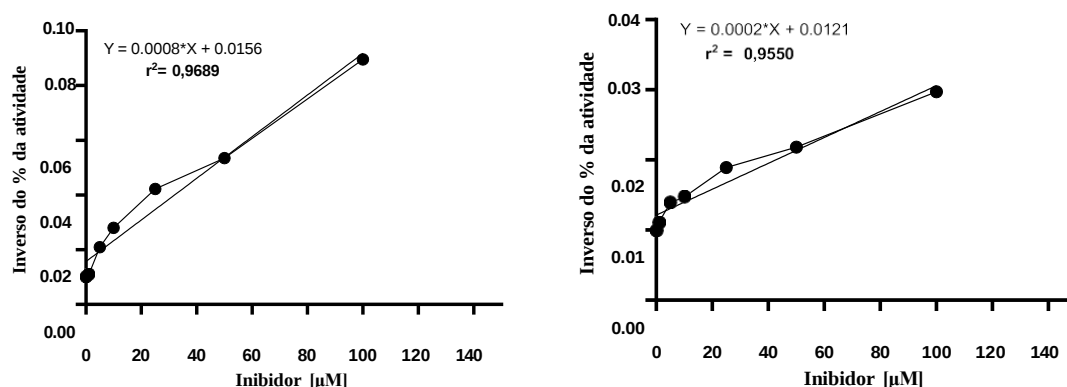
Figura 16 - Atividade inibitória de neolignanas isoladas, α -naftoflavona e extrato de *Piper rivinoides* em rhCYP1A2.



Legenda: Atividade MROD (pmoles de resorufina/mg ptn/min, média $\pm$ DP, triplicata) com soluções de 0,042 mg ptn/ 2 mL e 100 μ M das neolignanas isoladas e α -naftoflavona. A concentração do extrato de *P. rivinoides* foi de 100 μ g/mL. Os dados foram analisados por ANOVA, seguido do teste de comparações de Bonferroni e valores que diferiram estatisticamente do controle ($p < 0,05$) marcados (*), para ($p < 0,0003$) marcados (***) e para ($p < 0,0001$), verificadas (****).

A partir dos resultados demonstrados na figura 16, testou-se diferentes concentrações das substâncias mais ativas para determinação do CI_{50} . A α -naftoflavona demonstrou menor valor de CI_{50} (5,5 μ M), seguido por eupomatenoide-5 (39,5 μ M) (Figura 17).

Figura 17 - Determinação dos valores CI_{50} para α -naftoflavona e eupomatenóide-5.

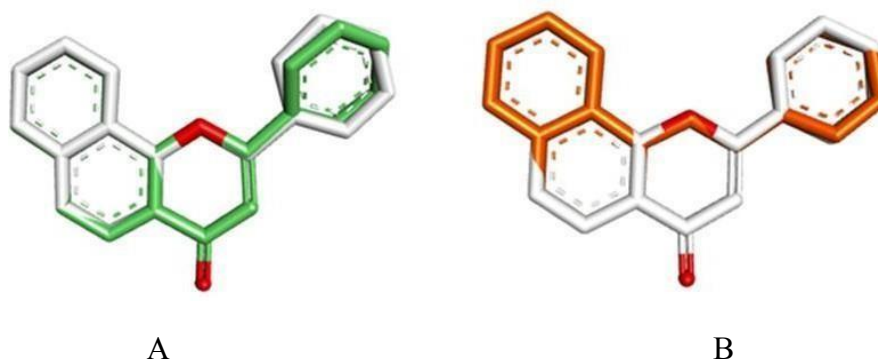


Legenda: Inverso da porcentagem de atividade de inibição da *rhCYP1A2* marcada pela atividade MROD versus concentrações da substância teste em μM . A esquerda α -naftoflavona nas concentrações de 100 μM , 50 μM , 25 μM , 10 μM , 5 μM , 1 μM e 0 μM e a direita o eupomatenóide-5 nas mesmas concentrações.

4.8 - Resultados de *docking* molecular

Para melhor compreensão das interações entre as neolignanas benzofurânicas e CYPs foi realizado um estudo de interação com CYP1A1 e CYP1A2 por *docking* molecular. Após uma etapa de validação do método de *redocking*, foi registrada a sobreposição da melhor posição da α -naftoflavona (**4**), controle positivo, em cada estrutura cristalográfica. Os valores de RMSD obtidos foram 0,27 e 0,21 Å para CYP1A1 e CYP1A2, respectivamente (Figura 18).

Figura 18 - Sobreposições da melhor *pose* (verde e laranja) versus cristal (branco) nos CYPs 1A1 (A) e 1A2 (B).



Legenda: As sobreposições foram visualizadas com o programa BIOVIA® Discovery Studio 2021 para determinação de RMSD. As simulações de *redocking* foram realizadas usando o algoritmo genético GoldScore como função de pontuação, modelo chemscore_p450_cds.

No presente estudo são demonstrados os resíduos de aminoácidos e o tipo de interação entre a melhor *pose* determinada no *docking* molecular dos ligantes com CYP1A1 e CYP1A2. O quadro 3 apresenta as melhores interações das substâncias analisadas com os CYP1A1/ 2.

Quadro 3 - Interações do ligante com resíduos de aminoácidos nos sítios ativos do CYP1A1 e CYP1A2.

Ligantes	Resíduos de aminoácidos/ Interação	
	CYP1A1	CYP1A2
α -naftoflavona	Phe123 (empilhamento π - π em forma de T) – Phe224 (empilhamento π - π) – Gly316 , Ala317 (empilhamento π -Amida) – Ala317 (π -Sigma) – Heme (empilhamento em forma de T π - π)	Phe226 (empilhamento π - π) - Phe125 (empilhamento π - π em forma de T) - Thr124 (ligação de hidrogênio) - Gly316 , Ala317 (empilhamento π -Amida) - Ile386 , Leu497 (π -Alquil) – Heme (π -Cation)
eupomatenóide-5	Phe224 (empilhamento π - π) – Phe258 (empilhamento em forma de T π - π) – Phe224 , Ala317 (π -Sigma) – Ile115 , Leu312 , Val382 , Leu496 (Alquil) – Gly316 , Ala317 (empilhamento π -Amida) – Ala317 (π -Alquil) - Heme (π -Sigma; π -Alquil; Alquil)	Phe226 (empilhamento π - π) - Ile117 , Val227 , Leu382 , Ile386 e Leu497 (Alquil) - Phe125 (empilhamento π - π em forma de T) - Gly316 (empilhamento π -Amida) - Ala317 (π -Sigma) - Asn257 (Carbono -hidrogênio) - Heme (π -Sigma; Alquil)
eupomatenóide-6	Phe123 , Phe258 (empilhamento π - π em forma de T) – Phe224 (empilhamento π - π e π -Sigma) – Ala317 (π -Sigma e π -Alquil) – Gly316 , Ala317 (empilhamento de π -Amida) – Val382 , Leu496 (Alquil) – Heme (empilhamento de forma T π - π ; π -Sigma; π -Alquil; Alquil)	Phe226 (empilhamento π - π) - Phe125 (empilhamento em forma de T π - π) - Gly316 (empilhamento π -Amida) - Val227 , Ala317 (π -Alkyl) - Phe256 , Leu497 (Alkyl) – Phe260 (π -Sigma) - Heme (π -Cation; empilhamento π - π em forma de T)
conocarpano	Ile115 , Leu312 (π -Alquil) – Phe224 , Phe258 (π - π Stacking) – Leu496 (Alquil)	Phe226 , Phe260 (empilhamento π - π) - Ile117 , Ala317 (π -Alquil) - Leu382 , Ile386 , Leu497 (Alquil) - Thr118 (ligação de hidrogênio) - Heme (π -Sigma; Alquil)

Legenda: As interações proteína-ligante foram visualizadas com o programa BIOVIA® Discovery Studio 2021. As simulações de *docking* foram realizadas usando o algoritmo genético GoldScore como uma função de pontuação, modelo chemscore_p450_cds.

As pontuações obtidas pelos estudos de *docking* são apresentadas na tabela 5, de acordo com o grau de interação dos ligantes com os resíduos de aminoácidos no sítio ativo das enzimas. Tais pontuações representam a afinidade teórica de cada ligante nos respectivos sítios ativos dos CYPs (Tabela 5).

Tabela 5 - Pontuações obtidos para cada ligante em CYP1A1 e CYP1A2.

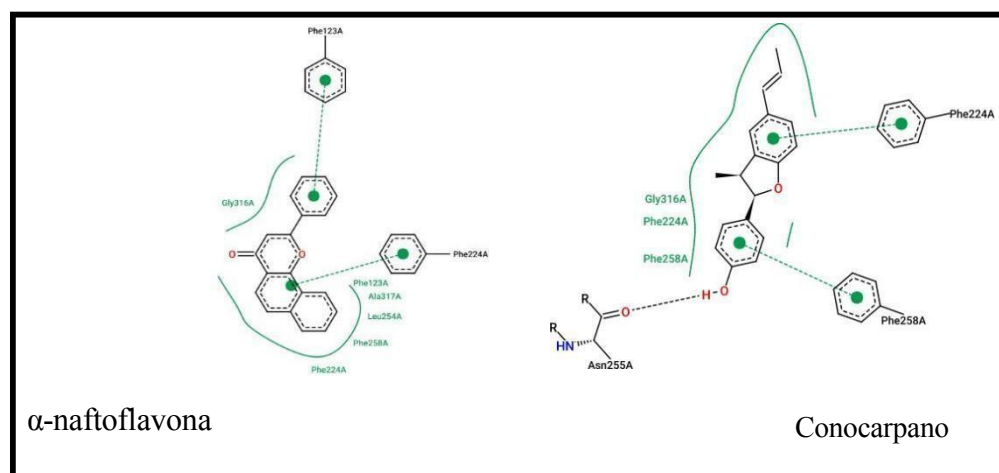
Ligantes	Pontuação	
	CYP1A1	CYP1A2
α -naftoflavona	71,87	69,37
eupomatenóide-5	69,58	62,07
eupomatenóide-6	64,97	61,98
conocarpano	64,30	56,12

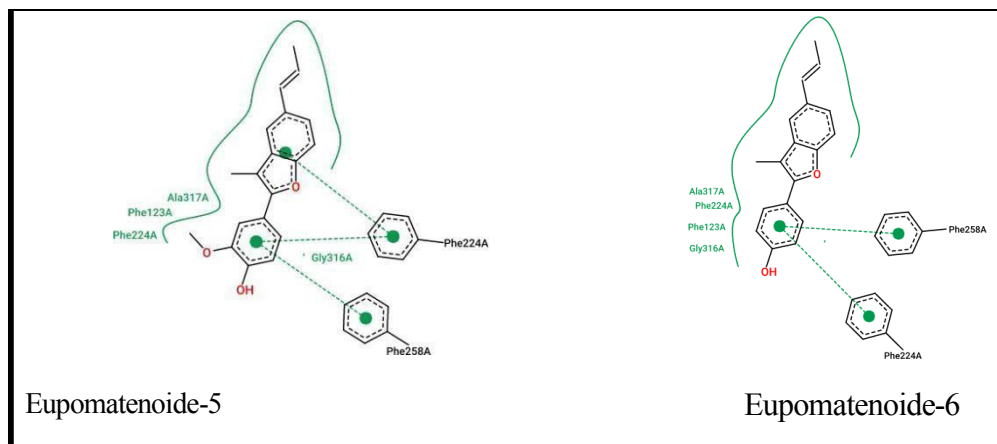
Fonte: O autor, 2023.

Legenda: Simulações de *docking* molecular foram realizadas usando o algoritmo genético GoldScore como uma função de pontuação, modelo chemscore_p450_cds.

Foi possível observar que as interações π - π no sítio ativo da CYP1A1 envolvendo os resíduos Phe123, Phe224 e Phe258 foram fundamentais, permitindo que as moléculas se encaixem na região do sítio ativo, tanto para α -naftoflavona quanto para as neolignananas investigadas (Quadro 4).

Quadro 4 - Esquema das principais interações intermoleculares observadas no sítio ativo do CYP1A1.



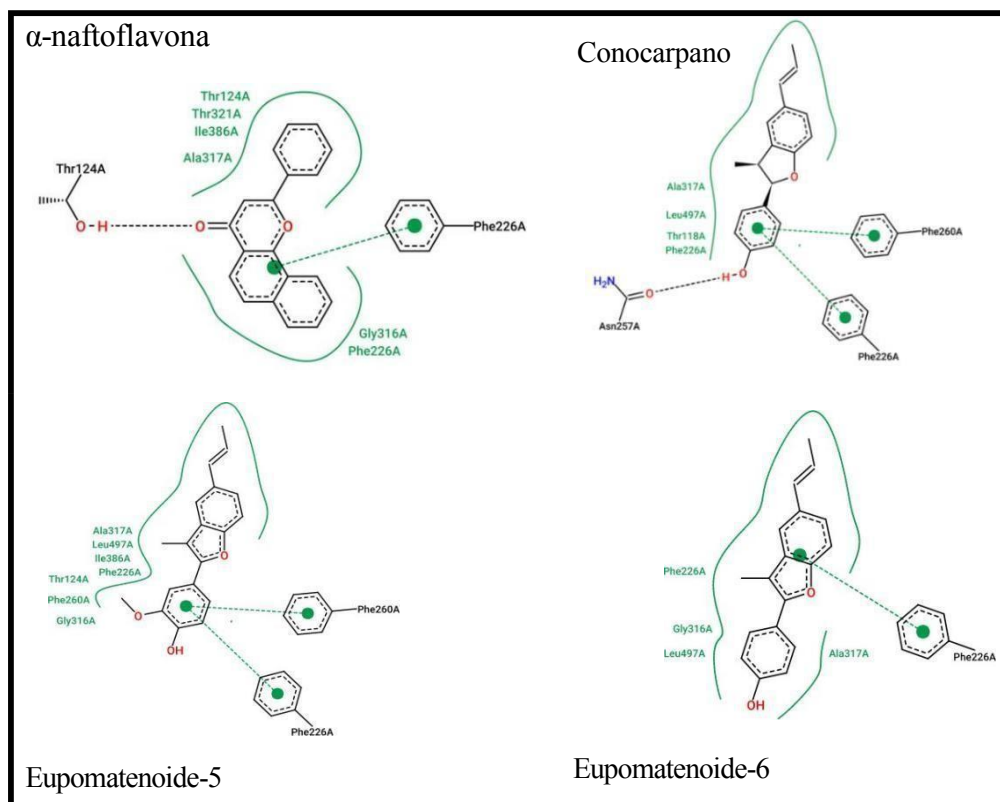


Fonte: O autor, 2023.

Legenda: As interações ligante-resíduos de aminoácidos foram visualizadas com o sistema PoseView-Center for Bioinformatics (ZBH) da Universidade de Hamburgo.

Em relação ao CYP1A2, o quadro 5 apresenta os resíduos de aminoácidos envolvidos nas interações no sítio ativo, principalmente os resíduos Phe125, Phe226, Gly316, Ala317, Ile386 e Leu497, que favorecem a estabilidade da interação, conforme descrito na literatura (Sridhar et al., 2017).

Quadro 5 - Esquema das principais interações intermoleculares observadas no sítio ativo do CYP1A2.



Fonte: O autor, 2023.

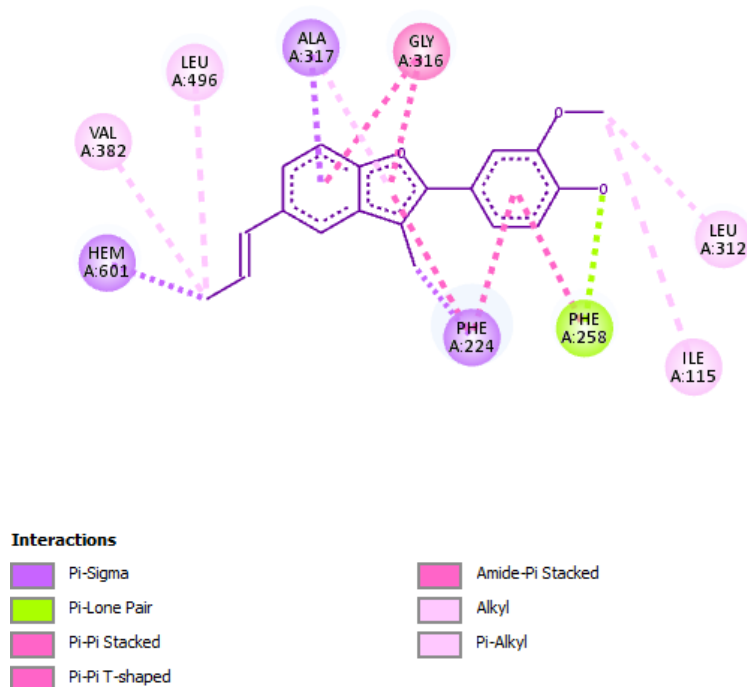
Legenda: As interações ligante-resíduos de aminoácidos foram visualizadas com o sistema PoseView-Center for Bioinformatics (ZBH) da Universidade de Hamburgo.

As interações observadas entre o eupomatenóide-5 (**1**) e CYP1A1 envolveram principalmente os sistemas π da enzima ou do ligante (Figura 19). O anel benzofurano realizou interações de empilhamento π - π com o anel fenila da cadeia lateral de Phe224 e interações π -alquil envolvendo o grupo 3-metil. Além disso, o Ala317 também realizou interações π -alquil envolvendo sua cadeia lateral de hidrocarboneto e o anel benzofurano, enquanto o Gly316 interagiu *via* empilhamento π de amida. O anel 2-fenil do eupomatenóide-5 está relacionado com interações em forma de π - π T com a cadeia lateral fenil de Phe258, que também interagiu com o átomo de oxigênio do grupo 5'-metoxila pela interessante interação de pares π -solitários.

O grupo HEME interagiu com o grupo propenila por interações π -alquil, envolvendo seus anéis pirrólicos. Ile115, Ser116 e Leu312 cercaram a metila do grupo 5'-metoxila do anel fenila do eupomatenóide-5, realizando interações do tipo alquil, assim como Val382, Leu497 e grupo HEME, que interagiram por suas cadeias de hidrocarbonetos com o grupo 5-propenila do eupomatenóide-5. Finalmente, o Asn255 interagiu por uma ligação carbono- hidrogênio fraca entre o oxigênio carbonílico de sua cadeia lateral e um átomo de hidrogênio do metil no grupo 5'-metoxila. Interações de Van der Waals com outros resíduos de aminoácidos também estavam presentes, incluindo Phe123 (Figura 19).

As interações dos ligantes investigados no sítio ativo do CYP1A1. Observamos que os resíduos Phe123, Phe224 e Phe258 foram considerados essenciais para a interação no sítio ativo do CYP1A1 com o eupomatenóide-5 (**1**), eupomatenóide-6 (**2**), conocarpano (**3**) e α -naftoflavona (**4**) (Figs. 19-22).

Figura 19 - Melhor *pose* obtida por *docking* molecular mostrando o modo de ligação proposto e interações do eupomatenoide-5 no sítio ativo do CYP1A1.

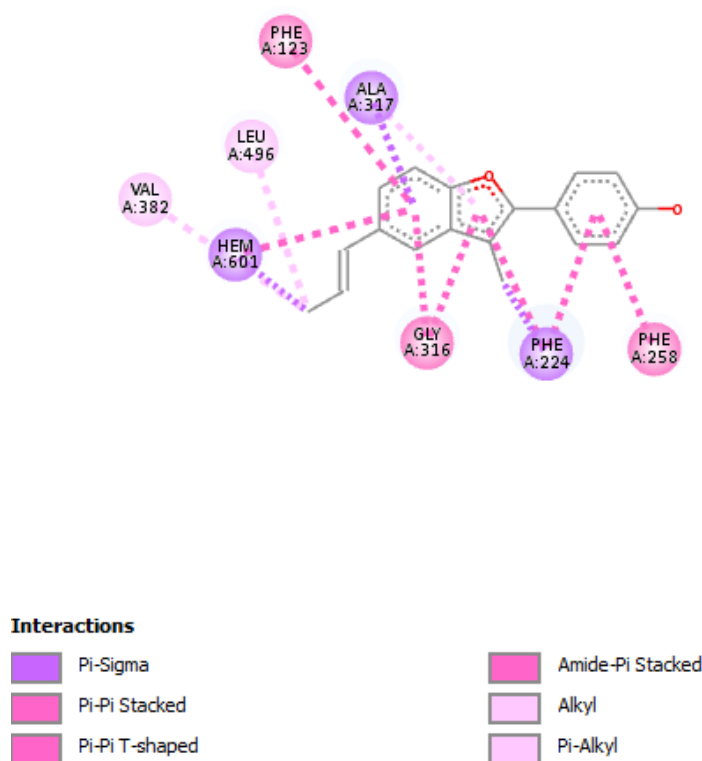


Fonte: O autor, 2023.

Legenda: Pose 2D gerado com programa BIOVIA® Discovery Studio 2021.

O Eupomatenoide-6 (**2**) apresentou quase todas as interações que foram observadas para o eupomatenoide-5 (**1**) com o CYP1A1, exceto aquelas com Leu312, Ser116 e Asn255 e a interação do par π -lone com Phe258. No entanto, estavam presentes interações em forma de π - π T entre a cadeia lateral fenila de Phe123 e a porção benzila do anel benzofurano do eupomatenoide-6, bem como entre Phe258 e o anel 2-fenol. Finalmente, como foi observado para o eupomatenoide-5 (**1**), também estavam presentes interações de Van der Waals com outros resíduos de aminoácidos (Figura 20).

Figura 20 - Melhor *pose* obtida por *docking* molecular mostrando o modo de ligação proposto e interações do eupomatenoide-6 no sítio ativo do CYP1A1.



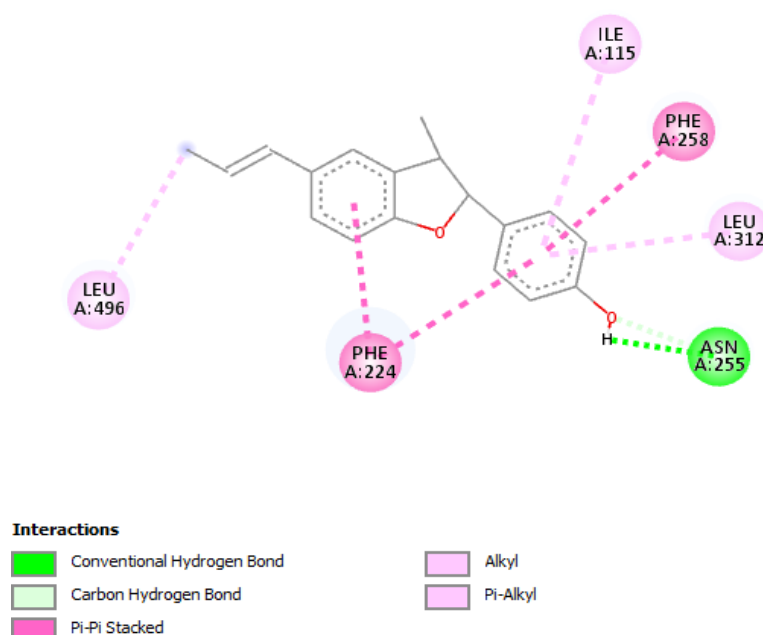
Fonte: O autor, 2023.

Legenda: Pose 2D gerado com programa BIOVIA® Discovery Studio 2021.

A análise do conocarpano (**3**) e CYP1A1 também mostrou interações de empilhamento π - π envolvendo o anel benzofurano e o anel 2-fenol e as cadeias laterais aromáticas de Phe224 (ambas as interações) e Phe258 (apenas com o anel fenílico). As cadeias laterais de hidrocarbonetos de Ile115 e Leu312 interagiram *via* π -alkyl com o anel 2-fenol, enquanto Leu496 realizou interações alkyl envolvendo sua cadeia lateral de hidrocarboneto e o grupo 5-propenila do conocarpano. Além disso, foi observada ligação de hidrogênio convencional entre o átomo de oxigênio da carbonila da estrutura principal do Asn255 e o átomo de hidrogênio da hidroxila fenólica do conocarpano, além de uma ligação carbono-hidrogênio fraca envolvendo o átomo de hidrogênio do carbono α e o átomo de oxigênio de o grupo hidroxila do ligante. Diante desta análise, pode-se levantar a hipótese de

que a ausência de planaridade do conocarpano (**3**) a estrutura do grupo HEME coloca essa neolignana mais perto do fundo do sítio ativo, o que pode estar relacionado à sua menor atividade demonstrada por cálculos e por dados experimentais apresentados nessa Tese. Além disso, há menos interações com o sítio ativo em comparação com as outras duas lignanas (Santos et al., 2021). Finalmente, também estavam presentes interações adicionais de Van der Waals com outros resíduos de aminoácidos (Figura 21).

Figura 21 - Melhor *pose* obtida por *docking* molecular mostrando o modo de ligação proposto e interações do conocarpano no sítio ativo do CYP1A1.

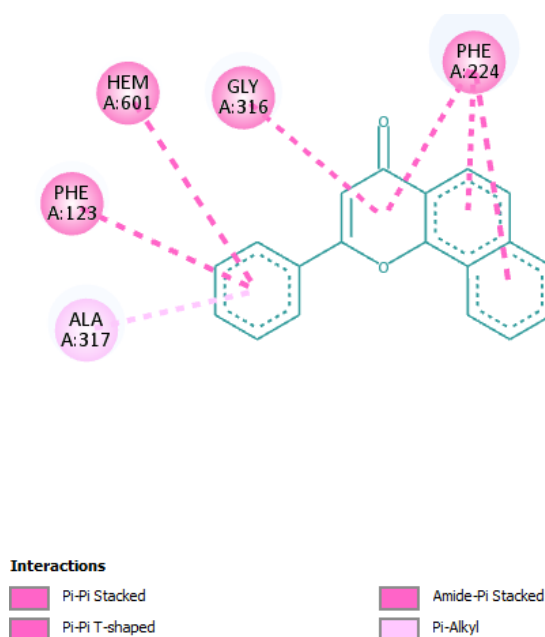


Fonte: O autor, 2023.

Legenda: Pose 2D gerado com programa BIOVIA® Discovery Studio 2021.

No geral, em comparação com a α -naftoflavona (**4**), o eupomatenoide-5 (**1**) possui 4 aminoácidos conservados interagindo, enquanto o eupomatenoide-6 (**2**) possui 5 e o conocarpano (**3**) apenas um (Tabela 5). Esta observação pode estar relacionada a uma maior estabilidade de (**1**) e (**2**) no sítio ativo do CYP1A1 em comparação com (**3**) (Figura 22).

Figura 22 - Melhor pose obtida por *docking* molecular mostrando o modo de ligação proposto e interações da α -naftoflavona no sítio ativo do CYP1A1.

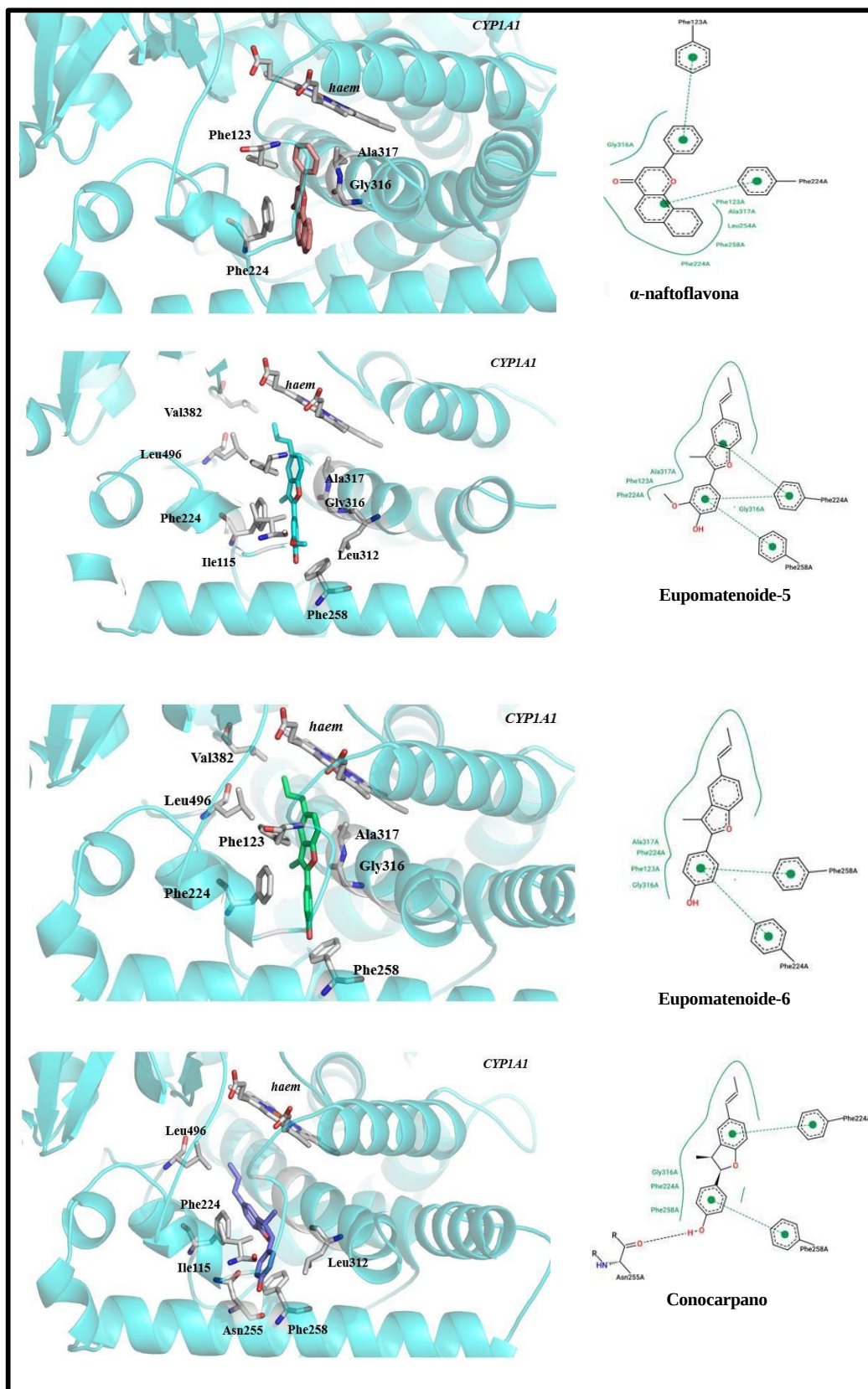


Fonte: O autor, 2023.

Legenda: Pose 2D gerado com programa BIOVIA®
Discovery Studio 2021.

As interações dos ligantes testados com o sítio ativo do CYP1A1 foram examinadas. Como o eupomatenóide-5 (**1**) foi o inibidor mais potente, suas supostas interações 3D são representadas no quadro 6, assim como as principais interações do eupomatenóide-6 (**2**), conocarpano (**3**) e α -naftoflavona (**4**) com o CYP1A1.

Quadro 6 - Melhores poses 3D obtidas por *docking* molecular demonstrando o modo de ligação e interações no sítio ativo do CYP1A1.



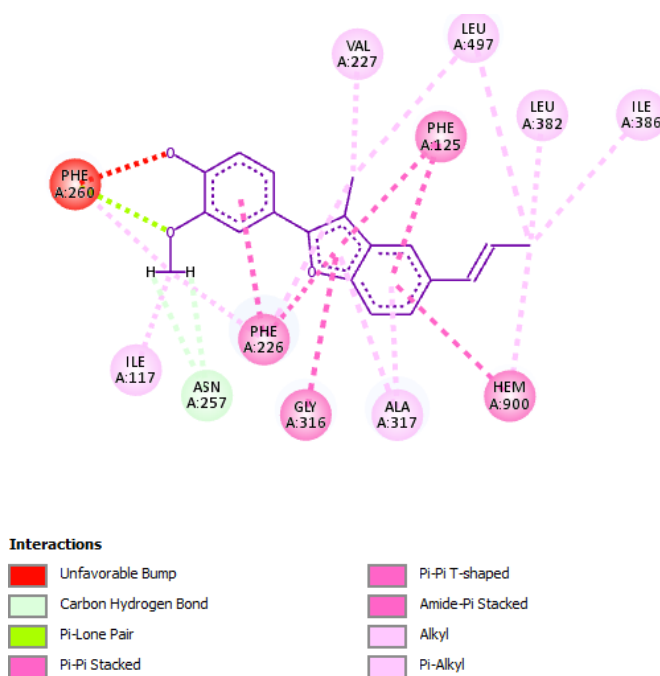
Fonte: O autor, 2023.

Legenda: As interações proteína-ligante foram visualizadas com o programa BIOVIA® Discovery Studio 2021. As simulações de *docking* foram realizadas usando o algoritmo genético GoldScore como uma função de pontuação, modelo chemscore_p450_cds. Imagens: α-naftoflavona (cobre), Eupomatenoide-5 (azul), Eupomatenoide-6 (verde) e Conocarpano (violeta) em relação ao grupo heme (cinza).

Na análise dos ligantes testados e do CYP1A2, o eupomatenóide-5 (**1**), escolhido novamente para representação 3D no sítio ativo, apresentou mais interações putativas em comparação com as outras neolignanas. O anel benzofurano interagiu via empilhamento π - π com a cadeia lateral aromática de Phe226, além de Phe125, via empilhamento em forma de π - π T. O resíduo Phe226 faz interações adicionais de empilhamento π - π com o anel 2-fenila e *via* π -alquila com o metil do grupo 5'-metoxila, bem como com o 3-metil do anel benzofurano.

Além disso, o núcleo pirrol HEME interage com o anel benzila do benzofurano por do empilhamento π - π . Interações do tipo π -alquila ocorreram entre Ala317 e o anel benzofurano. O grupo HEME pirrólico e o grupo 5-propenila, Phe260 com o grupo 5'-metoxila e também do tipo π -par solitário com o oxigênio desta última função. Phe260 também apresentou interação desfavorável com o átomo de oxigênio da 4'-hidroxila. Interações do tipo alquila também foram observadas entre as cadeias laterais de hidrocarbonetos de Val227, Leu497 e 3-metil. Leu382, Ile386, Leu497 e Thr498 circundam o grupo 2-propenila, realizando também interações do tipo alquila. Além disso, Ile117 interage da mesma forma, mas com o metil do grupo 5'-metoxila do anel fenílico, bem como Gly316 interage pelo empilhamento de π -amida com a porção furanila do anel benzofurano. Finalmente, Asn257 realiza uma ligação carbono-hidrogênio entre o átomo de oxigênio da estrutura carbonila e um hidrogênio do metil no substituinte metoxila. Foram observadas interações adicionais de Van der Waals (Figura 23).

Figura 23 - Melhor *pose* obtida por *docking* molecular mostrando o modo de ligação proposto e interações do eupomatenoide-5 no sítio ativo do CYP1A2.



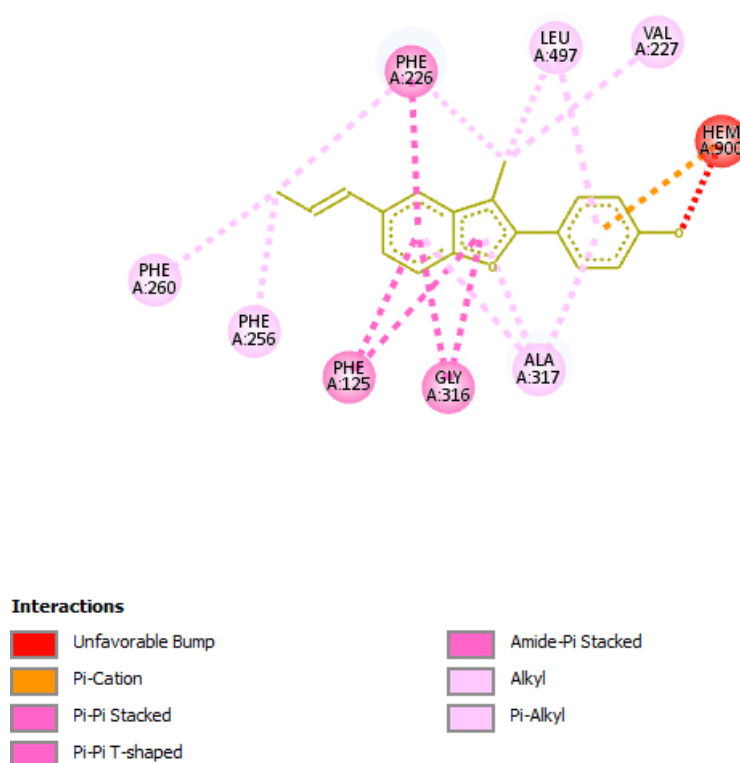
Fonte: O autor, 2023.

Legenda: Pose 2D gerado com programa BIOVIA® Discovery Studio 2021.

A análise visual do eupomatenoide-6 (**2**) e do CYP1A2 mostra uma conformação preferida invertida em comparação com o que foi observado para o eupomatenoide-5 (**1**). Aqui, o anel 2-fenílico está orientado para o grupo HEME enquanto a cadeia 5-propenila está na parte inferior do sítio ativo. Interações do tipo π -cátion envolvendo o íon Fe^{3+} do grupo HEME e o anel 4'-fenílico foram observadas juntamente com o empilhamento em forma de π - π T entre um dos anéis pirrólicos e o anel 4'-fenol do eupomatenoide-6, como também foi observado com Phe125. Além disso, foi observado empilhamento π - π entre a cadeia lateral aromática de Phe226 e a porção benzila do anel benzofurano. Phe226 também contribuiu para duas interações do tipo alquila entre sua cadeia lateral aromática, 3-metila (o mesmo com Val227) e o substituinte 2-propenila. Além disso, interações π -alquila envolvendo a cadeia lateral de hidrocarboneto de Ala317, os anéis 2-fenílico e benzofurano do eupomatenoide-6 estavam presentes, enquanto Phe256, Phe260 e Leu497 (mais uma interação do tipo alquila) interagiram da mesma forma com o 2-propenila. Finalmente, o

Gly316 interagiu por empilhamento de π -amida com o anel benzofurano. É importante notar também que foi observada uma interação desfavorável entre um dos carbonos do grupo HEME e o oxigênio da 4'-hidroxila. Interações adicionais de van der Waals estavam presentes (Figura 24).

Figura 24 - Melhor *pose* obtida por *docking* molecular mostrando o modo de ligação proposto e interações do eupomatenóide-6 no sítio ativo do CYP1A2.



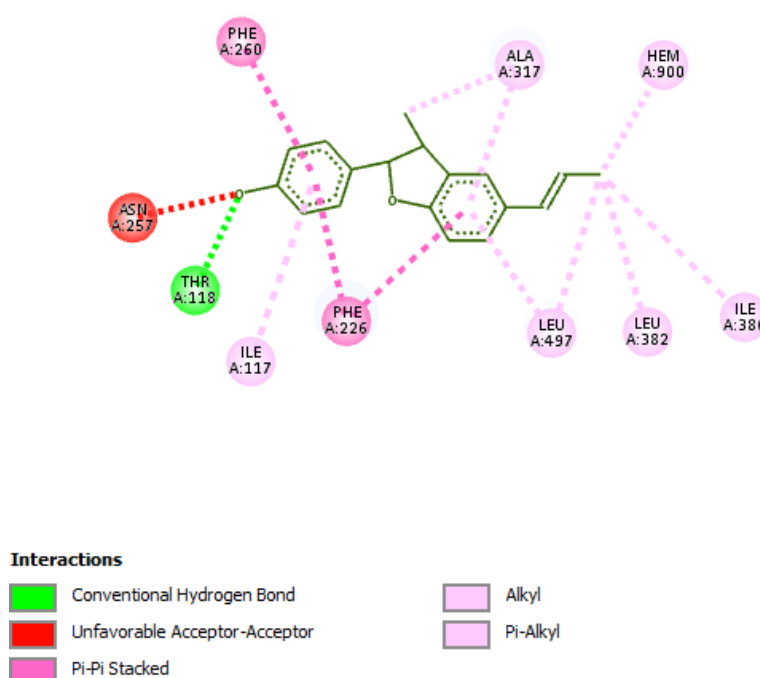
Fonte: O autor, 2023.

Legenda: Pose 2D gerado com programa BIOVIA® Discovery Studio 2021.

Finalmente, na posição de acoplamento superior do conocarpano (**3**) e CYP1A2, o anel benzofurano interagiu via empilhamento π - π com a cadeia lateral aromática de Phe226, que também interagiu da mesma forma com o 2-fenol. Esta última interação também foi compartilhada por Phe260. Interações do tipo π -alquila foram observadas entre a cadeia lateral hidrocarbonada de Ile117 e o anel 2-fenol, enquanto Ala317 realizou a mesma interação, mas com a parte benzila do anel benzofurano e por interações do tipo alquila com 3-metila. Leu382, Ile386 e Leu497 interagiram por interações do tipo alquila com a porção

2-propenila do conocarpano. Além disso, o hidrogênio Thr118 ligou-se ao conocarpan pelo átomo de hidrogênio da estrutura -NH e do átomo de oxigênio da 4'-hidroxila do anel 2- fenol. Finalmente, foi observada uma interação desfavorável envolvendo o oxigênio da carbonila da cadeia lateral do Asn255 e o átomo de oxigênio da hidroxila fenólica do conocarpano. Interações adicionais de van der waals estavam presentes (Figura 25).

Figura 25 - Melhor *pose* obtida por *docking* molecular mostrando o modo de ligação proposto e interações do conocarpano no sítio ativo do CYP1A2.

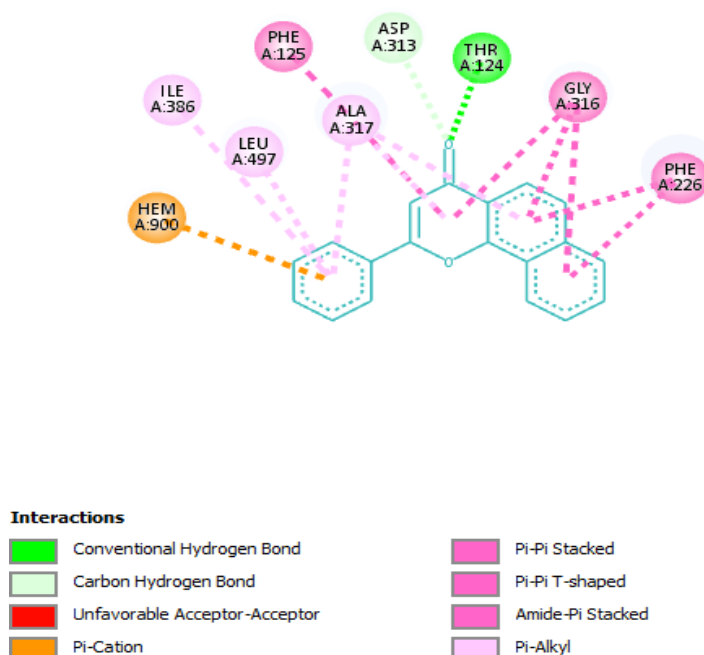


Fonte: O autor, 2023.

Legenda: Pose 2D gerado com programa BIOVIA®
Discovery Studio 2021.

No geral, em comparação com a α -naftoflavona, o eupomatenóide-5 (**1**), o melhor inibidor experimental, possui 7 aminoácidos conservados de interação, o eupomatenóide-6 (**2**) 6 e o conocarpan (**3**) tinha 5 (Tabela 5). Embora todas as três neolignanais apresentem um tipo de interação desfavorável no sítio ativo do CYP1A2, se considerarmos um ambiente molecular dinâmico, essas saliências provavelmente seriam aliviadas após a ligação (Figura 26).

Figura 26 - Melhor *pose* obtida por *docking* molecular mostrando o modo de ligação proposto e interações da α -naftoflavona no sítio ativo do CYP1A2.



Fonte: O autor, 2023.

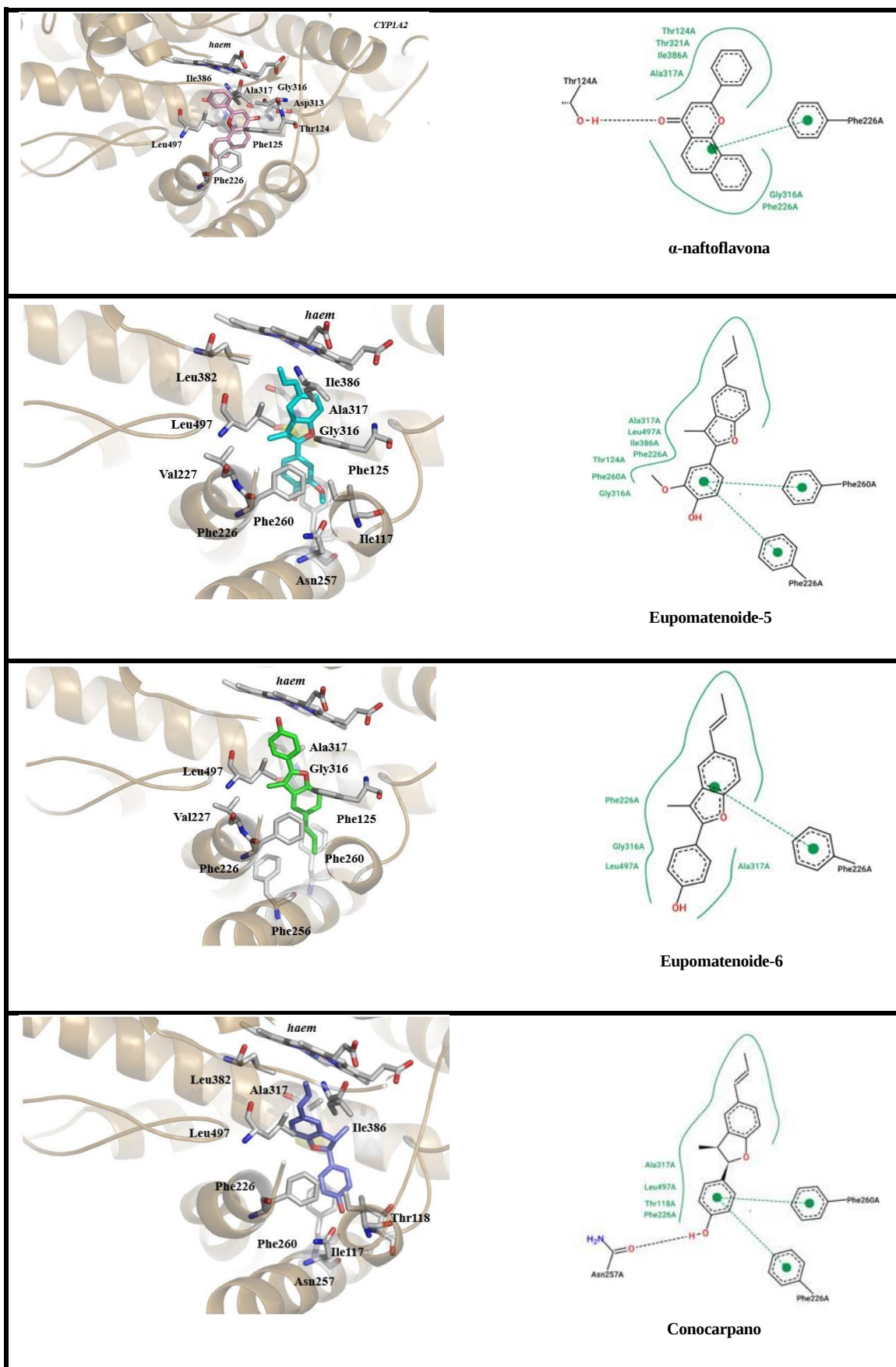
Legenda: Pose 2D gerado com programa BIOVIA®

Discovery Studio 2021.

Em nossa análise, comentamos que as conformações dos ligantes no sítio ativo são próximas ao grupo HEME do CYP1A2. Observamos que os resíduos Phe125, Phe226, Gly316, Ala317, Ile386 e Leu497 foram considerados importantes para a interação do eupomatenóide-5 (**1**), eupomatenóide-6 (**2**), conocarpano (**3**) e α -naftoflavona (**4**) (Figs. 23-26) no sítio ativo do CYP1A2.

Também é demonstrado em nossa investigação que as conformações dos ligantes dentro do sítio ativo estão próximas ao grupo HEME do CYP1A2. O quadro 9 demonstra as interações e o modo de ligação em 3D da α -naftoflavona e neolignanais com os resíduos Phe125, Phe226, Gly316, Ala317, Ile386 e Leu497 no sítio ativo do CYP1A2.

Quadro 7 - Melhores poses 3D obtidas por *docking* molecular demonstrando o modo de ligação e interações no sítio ativo do CYP1A2.



Fonte: O autor, 2023.

Legenda: As interações proteína-ligante foram visualizadas com o programa BIOVIA® Discovery Studio 2021. As simulações de *docking* foram realizadas usando o algoritmo genético GoldScore como uma função de pontuação, modelo chemscore_p450_cds. Imagens: α -naftoflavona (cobre), Eupomatenóide-5 (azul), Eupomatenóide-6(verde) e Conocarpano (violeta) em relação ao grupo heme (cinza).

5 - DISCUSSÃO

A natureza fornece um número extraordinário de substâncias bioativas e a afirmação "esses produtos são considerados mais seguros, pois são consumidos há séculos" é uma generalização que pode ser enganosa, pois a longa história de uso não necessariamente implica segurança sem estudos científicos rigorosos para confirmar tal afirmação (Di Nardo & Giliard, 2020). Entretanto, o uso extensivo somado a diferentes formas de preparação, podem trazer a falta de critérios elegíveis para a segurança e eficácia destas preparações, assim como a deficiência de estudos toxicológicos para uma quantidade considerável de substâncias naturais levantam questões sobre a segurança dessas substâncias (Tugcu, Kirmizibekmez & Aydin, 2020).

As predições dos parâmetros físico-químicos mostraram que eupomatenóide-5, eupomatenóide-6 e conocarpano possuem alta absorção gastrointestinal, permeabilidade para atravessar a barreira hematoencefálica, além de demonstrar que são capazes de inibir o CYP1A2. Além disso, nenhuma violação das regras de Lipinski e nenhuma interação P-gp para essas substâncias foram previstas. Assim, considerando a previsão de PK *in silico*, o eupomatenóide-5 pode ser um grande alvo para o desenvolvimento de um novo fitoterápico. Mesmo assim, esses parâmetros fornecidos pela Swiss ADME precisam de confirmação.

No presente trabalho, os resultados alcançados *in vivo* demonstraram uma discreta indução do CYP1A durante o tratamento com o eupomatenóide-5. Os experimentos realizados *in vivo* apresentam os primeiros resultados com neolignanas benzofurânicas vs. CYP1A, no entanto, no estudo de Pelkonen e colaboradores (1998) é descrito o processo de síntese de novas moléculas enzimáticas pelo resultado do aumento da transcrição do gene CYP1A, de forma que os indutores desse gene interagem com receptor AhR. Portanto, após a interação com o ligante é ativado e translocado para o núcleo como um complexo que inclui a proteína AhNT. Esse complexo se liga a regiões específicas nas áreas reguladoras dos genes do CYP1A levando ao aumento da transcrição e, consequente produção de uma nova proteína CYP1A. Portanto, os resultados obtidos nesta investigação apontam para uma sugestão de como se dá o mecanismo de ação desta neolignana *in vivo*, porém existe a necessidade de maiores investigações devido a alta complexidade de sistemas *in vivo*.

Perepechaeva e colaboradores (2017) realizam um experimento *in vivo* para estudar os efeitos da quercetina (um flavonóide) na atividade e nível de mRNA de CYP1A, nível de mRNA de alguns componentes da via de sinalização dependente de receptor AhR e na atividade de ligação ao DNA de reguladores negativos de AhR e CYP1A em fígado de rato não tratados

e tratados com benzo(a)pireno (BaP). Ratos Wistar com 12 semanas receberam quercetina (80 mg/kg i.p.) ou BaP (5 mg/kg i.p.) ou BaP + quercetina. O grupo controle recebeu óleo vegetal. Os ratos receberam esses agentes uma vez ao dia por 1-3 dias. As amostras foram coletadas 3, 6, 12 e 24 h (administração única) ou 72 h (administração de 3 dias), após o primeiro tratamento. Em animais não tratados, a quercetina não conseguiu influenciar a atividade de CYP1A1 e os níveis de mRNA de CYP1A1 e CYP1A2, mas aumentou a atividade de CYP1A2. O último efeito parece ser mediado por mecanismos pós- transcricionais porque o nível de mRNA de CYP1A2 permaneceu inalterado. Os autores indicam que, possivelmente, o CYP1A2 tenha sido induzido pela quercetina transcricionalmente, mas no 3º dia, o nível de mRNA voltou ao normal, enquanto o nível de proteína permaneceu elevado.

Xie e colaboradores (2020) investigaram o perfil de CYP induzido por schisandrin B e schisandrol B (componentes ativos e identificados em *Schisandra chinensis*) e o papel dos fatores nucleares receptor X de pregnano (PXR) e receptor de androstano constitutivo (CAR). Camundongos receberam schisandrin B e schisandrol B (200 mg/kg/dia para ambos) dissolvidos em óleo de milho (v.o.), duas vezes ao dia durante 5 dias. O schisandrin B induziu o CYP3A11 em 7 vezes, enquanto 112 vezes o CYP2B10, quando comparado ao controle. O schisandrol B induziu o CYP3A11 em 5 vezes e o CYP2B10 em 25 vezes, comparado ao controle.

Liu e colaboradores (2015) investigaram, *in vivo*, o aumento da atividade catalítica dos CYP3A e CYP2C em camundongos tratados com carbamazepina na concentração de 200 mg/kg em suspensão de óleo de milho em dose única diária, via intragástrica (i.g.) por 5 dias e demonstraram que os CYP3A e CYP2C tiveram sua atividade aumentadas de 5 a 10 vezes.

Samuhasaneeto e Yusakul (2021) investigaram os efeitos, *in vivo*, do extrato de Benjakul (formulação tradicional tailandesa que consiste em quantidades iguais de cinco plantas: os frutos de *Piper chaba* Hunter, as raízes de *Piper sarmentosum* Roxb., caules de *Piper interruptum* Opiz., raízes de *Plumbago indica* Linn., além de rizomas de *Zingiber officinale* Roscoe) nas atividades e níveis de expressão mRNA hepático do CYP2C11 e CYP3A1 em ratos Wistar. Os grupos tratados receberam extrato de Benjakul diariamente em doses de 200, 400 ou 600 mg/kg (v.o.) por 28 dias. O tratamento com 400 e 600 mg/kg de Benjakul aumentou significativamente a atividade hepática do CYP2C11 e do CYP3A e aumentou a expressão de CYP3A1 no fígado dos animais.

Huang e colegas (2014) investigaram se a escina (uma saponina) influencia o efeito nas enzimas do CYP-P450 de rato (CYP1A2, CYP2C9, CYP2E1 e CYP3A4) usando mistura de fármacos *in vivo*, contendo fenacetina para CYP1A2, tolbutamida para CYP2C9, de clorzoxazona para CYP2E1 e midazolam para CYP3A4. As doses utilizadas para ratos foram de 0,45 a 1,8 mg/kg/dia (i.v.), após 5 min, uma solução em mistura na dose de 5 mL/kg, contendo fenacetina (20 mg/kg), tolbutamida (5 mg/kg), clorzoxazona (20 mg/kg) e midazolam (10 mg/kg) foi administrada por sonda gástrica. A escina teve o potencial de induzir significativamente a atividade hepática dos CYP1A2, CYP2C9 e CYP3A4 de rato.

Shi e colaboradores (2020) avaliaram o perfil de inibição do CYP2E1 e CYP3A4, utilizando Ratos Sprague Dawley, divididos aleatoriamente em onze grupos tratados com psoralidina (10, 5 e 1 mg/kg), com neobavaisoflavona (10, 5 e 1 mg/kg de peso corporal) e daidzeína (8, 4 e 1 mg/kg), o grupo controle foi tratado com rifampicina (25 mg/kg de peso corporal) por veia caudal por 7 dias consecutivos. Psoralidina, neobavaisoflavona e daidzeína (isoflavonas) inibiram o CYP2E1 e induziram o CYP3A4. Além disso, a isobavachalcona inibiu o CYP2E1 e o CYP3A4.

No caso desse trabalho de Tese observou-se indução relativamente baixa do CYP1A durante o tratamento com o eupomatenóide-5 em camundongos DBA-2 e Swiss. Esses resultados precisam ser confirmados com mais experimentos, uma vez que, como será discutido a seguir, essa neolignana benzofurânica é um potente inibidor do CYP1A1/2 *in vitro*. Porém, considerando que nosso grupo demonstrou que essas neolignanas benzofurânicas são potentes agentes citotóxicos (Fonseca *et al.*, 2020) contra tumor de cavidade oral, há de se especular uma ação em receptores nucleares que pode levar ao aumento *in vivo* da síntese de CYP1A.

Santos e colaboradores (2021) investigaram o efeito inibitório de neolignanas bioativas eupomatenóide-5, eupomatenóide-6 e conocarpano, além de extratos e partições de *P. rivinoides* em CYP1A1 e CYP1A2, usando 7-etoxiresorufina-*O*-deetilase (EROD) e 7-metoxiresorufina-*O*-desmetilase (MROD) como marcadores para a atividade, respectivamente. O estudo *in vitro* com fração microsomal hepática demonstrou que o extrato bruto hidroalcoólico de *P. rivinoides* e suas partições são fortes inibidores da atividade do CYP1A1, particularmente a partição hexânica, da qual as neolignanas foram isoladas. Os achados também confirmam que α -naftoflavona (controle positivo), quercetina e as neolignanas eupomatenóide-5, eupomatenóide-6 e conocarpano são potentes inibidores da atividade do CYP1A1. Para a isoforma CYP1A2 (teste MROD), apenas o eupomatenóide-5 e o eupomatenóide-6 foram ativos na concentração mais alta testada (100

μM). No entanto, esse estudo com fração microsomal hepática de roedores é considerado um *screening* de atividade, pois mesmo realizando a indução de determinados CYPs (por exemplo CYP1A), trata-se de uma mistura que pode conter outros CYPs além dos desejados. Ainda, os CYPs de roedores conservam características com o dos humanos, mas não são totalmente idênticos. Por isso tem-se a necessidade de realizar os mesmos testes com CYPs recombinantes humanos (*rh*), o que foi feito nesta Tese de Doutorado.

No presente estudo foi avaliado a atividade de *rhCYP1A1* para as mesmas neolignanas isoladas (100 μM) e para o extrato hidroalcoólico de *P. rivinoides* (100 $\mu\text{g/mL}$), tendo sido demonstrado que tanto as substâncias isoladas quanto o extrato foram capazes de inibir a atividade de *rhCYP1A1*, com 81,4%, 73,0%, 14,5% e 73,6% para o eupomatenóide-5, eupomatenóide-6, conocarpano e extrato, respectivamente. A α -naftoflavona inibiu cerca de 85% da atividade da enzima, fato que condiz com a literatura por conhecido e potente inibidor do CYP1A (Park et al., 2022). Ainda, investigação com o *rhCYP1A2* com as mesmas substâncias e extrato de *P. rivinoides* nas mesmas concentrações, foi demonstrado que tanto as neolignanas quanto o extrato também foram capazes de inibir a atividade desse CYP recombinante humano. A inibição da atividade enzimática foi de 45,6% para eupomatenóide-5, 26,4% para eupomatenóide-6, 11,0% para conocarpano e 49,7% para o extrato de *P. rivinoides*. A α -naftoflavona inibiu a atividade enzimática em 95,5%. Dentre as neolignanas testadas, o eupomatenóide-5 foi a mais ativa frente o *rhCYP1A2*. Os valores de IC_{50} em *rhCYP1A1* para eupomatenóide-5 e para a α -naftoflavona foram 39,5 μM e 5,5 μM , respectivamente.

Dessa forma, os resultados de inibição *in vitro* com enzimas recombinantes humanas usadas nessa Tese são satisfatórios e concordam com os achados de Santos e colegas (2021), além das respostas *in silico*, assim pode-se considerar que neolignanas benzofurânicas isoladas de *P. rivinoides* se apresentaram-se como inibidores de CYP1A, fato descrito pela primeira vez na literatura.

Diversas substâncias naturais são inibidoras de CYP1A, incluindo flavonoides e lignanas, presentes em alimentos e chás medicinais (Kumar et al., 2014; Lakhera et al., 2021). Porém, como demonstrado por Santos e cols. essas substâncias precisam ter estrutura planar (Santos et al., 2021). Naquele trabalho especulou-se o motivo da planaridade das estruturas para se ligarem ao sítio de ação dos CYP1A1 e CYP1A2, pois foram feitas sobreposições entre as neolignanas e a α -naftoflavona. As estruturas que apresentaram melhor sobreposição à α -naftoflavona foram as mais ativas experimentalmente. Dados da literatura com lignóides não planares demonstram não ser capazes de inibir a CYP1A, como

os de Zhao e colaboradores (2017). Os autores apresentaram resultados de inibição das lignanas não planares gomisina C e gomisina G (isoladas de *Schisandra chinensis*) que inibiram os *rhCYP3A4* e *rhCYP3A5* e não a *rhCYP1A*.

Sridhar e colaboradores (2017) descrevem que as interações e orientações de flavonoides diferiram entre CYP1A1 e CYP1A2. No caso de inibidores potentes, anéis B de flavonoides foram ancorados perto do centro de ferro do grupo HEME de CYP1A2, e o empilhamento π - π do grupo hidroxila do flavonoide orientado favoravelmente para Phe226 foi evidenciado. É ainda destacado que os inibidores menos potentes favoreceram uma orientação diferente dos inibidores potentes para CYP1A2, em que o empilhamento π - π com Phe226 estava ausente. Estudos indicaram que a presença de um grupo 5,7-diidroxila no anel A e um grupo 3-hidroxila no anel C da flavona aumenta o poder de inibição dessas enzimas. Esses estudos também mostraram que a presença de um grupo 3',4'-diidroxila no anel B da flavona pode aumentar a potência de inibição.

Santos e colaboradores (2021) investigaram, ainda, a interferência de flavonoides na atividade do CYP1A de microsossomos de ratos. A quercetina apresentou-se como um potente inibidor desta enzima. Esse flavonoide possui grupos hidroxila e oxigênio nas posições 3, 5, 7, 3' e 4', confirmando que sua quantidade e posição na estrutura são importantes para interação no sítio ativo enzimático. Observou-se, também, no estudo de Zandarashvili e colaboradores (2011) que a planaridade da estrutura parece ser crítica para as interações e que grupos hidroxila na estrutura do flavonoide nas posições 5 e 7 do núcleo benzopiran-4-ona também são importantes para a capacidade de inibição da enzima.

Nessa Tese aprofundamos os estudos para verificar como se dá a interação entre as neolignanas benzofurânicas de *P. rivinoides* e os CYP1A1/A2 por estudos de modelagem molecular. Os resultados demonstram que, de modo geral, as interações dos resíduos Phe123, Phe224 e Phe258 são importantes para a ligação com o sítio ativo do CYP1A1 e que os resíduos Phe125, Phe226, Gly316, Ala317, Ile386 e Leu497 são fundamentais para a ligação com o sítio ativo do CYP1A2, em empilhamento π - π , pois conferem maior estabilidade aos inibidores.

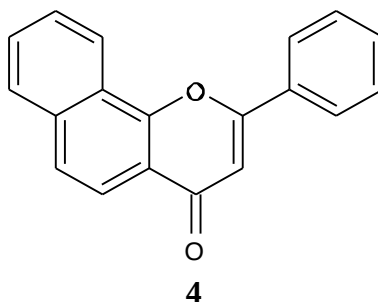
Nossos resultados são consistentes com os achados de Lim et al. (2022), que notaram interações de empilhamento π - π formadas entre catinona e grupos aromáticos de resíduos de aminoácidos Phe226 e Phe260. Além disso, Sousa et al. (2013) observaram que ligações de proteção sólidas e interações de empilhamento π - π com moléculas de flavonoides e os principais resíduos de aminoácidos das enzimas CYP1A2 e CYP2C9 foram meios para as ligações desses ao sítio ativo.

Mena-Ulecia e MacLeod-Carey (2018) realizaram simulações usando *docking* molecular para determinar a interação de derivados de 2-fenil benzotriazole (PBTA) com o centro ativo de CYP1A1. A orientação obtida nos experimentos de *docking* revelou a presença de interações de empilhamento π - π entre o grupo triazol e Phe224, bem como ligações de hidrogênio do terminal NH₂ de PBTAs com os resíduos Asn255 e Ser116.

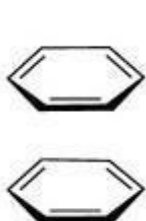
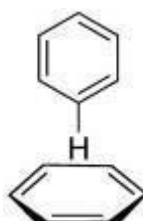
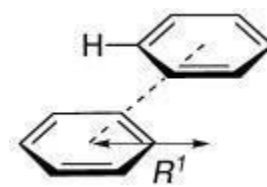
Wauchope e colaboradores (2021) estabeleceram o modo preferencial de ligação do trissulfeto de benzila (DTS; principal ativo da planta *Petiveria alliacea*) com CYP1A1 (código PDB: 4I8V; Walsh et al., 2013), realizando estudos de *docking* com o programa Auto Dock Vina. A caixa da grade foi centralizada no grupo HEME com dimensões de 20 Å nos planos x, y e z e apenas a melhor *pose* de ajuste foi selecionada para CYP1A1. Os resultados demonstraram que, na melhor pose de ligação teórica alcançada, o DTS estava situado dentro do bolso de ligação 4,3 Å de distância do grupo HEME. O grupo benzila mais próximo exibiu uma interação de empilhamento π - π de ponta a face com o resíduo Phe123, bem como interações de empilhamento π - π deslocadas com Phe224 e Phe258, representando características comuns de muitos inibidores de CYP1A.

Gonzales e colaboradores (2012) realizaram estudos de *docking* e QSAR comparativos de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos com CYP1A1 e CYP1B1, onde as estruturas dos CYPs 1A1 e 1B1 foram construídas com princípios de modelagem de homologia, usando a estrutura cristalográfica de CYP1A2 (código PDB: 2HI4; Sansen et al., 2007). A sequência primária de CYP1A1 apresentou 73% de identidade com CYP1A2, enquanto CYP1B1 apresentou 39% de identidade de sequência. A análise de ambas as estruturas 3D revelou sítios ativos muito estreitos, compostos por resíduos hidrofóbicos (principalmente com resíduos Phe) e potenciais resíduos doadores de ligações de hidrogênio, todos incluídos em um dos seis sítios de reconhecimento de substrato das enzimas. O estudo de *docking* revelou que os 32 ligantes mostraram posições semelhantes no sítio de ligação, alinhando seus anéis aromáticos para interagir por empilhamento π - π com resíduos de Phe, mostrando interações face a face com Phe123 em CYP1A1 ou com Phe134 em CYP1B1, e deslocados por interações empilhadas com Phe224 ou Phe258 em CYP1A1 ou Phe231 ou Phe268 em CYP1B1.

Raunio e colaboradores (2015) descrevem que as interações de empilhamento π - π são os determinantes mais essenciais da potência de inibição do CYP1A2 e que sua cavidade de ligação tem um volume estimado de 375 Å. Além disso, concluiu-se que sua cavidade de ligação se ajusta perfeitamente a substâncias planares, como a α -naftoflavona (4).



Zhao e colaboradores (2015) descrevem que interações π - π , ou interações aromáticas, representam forças intermoleculares não covalentes que são importantes para a estabilidade da proteína, pois desempenham um papel fundamental na estabilização do DNA, onde as conformações são representadas por geometrias face a face (5), face a face em forma de T (6) e de conformação empilhada (7).

**5****6****7**

Fonte: Adaptado de Zhao *et al.*, 2015.

No presente estudo foi observado que as interações de empilhamento π - π entre neolignanas e resíduos de aminoácidos de CYP1A1 e CYP1A2 determinam o encaixe dessas no sítio ativo, sendo considerados, portanto, resíduos fundamentais para tais interações. Esse achado está de acordo com estudos anteriores descritos na literatura para substâncias naturais e são inéditos para as neolignanas, bem como corroboram os resultados obtidos nos experimentos *in vitro*.

CONCLUSÕES

- ✓ Os resultados obtidos no estudo *in vivo* sugerem que tanto o eupomatenóide-5 quanto o extrato hidroalcoólico de *P. rivinoides* podem levar a um aumento da expressão de CYP1A em camundongos. Este aumento na expressão pode estar relacionado a interação destas substâncias com receptor AhR, que desencadeia todo o processo do aumento da expressão desta enzima.
- ✓ Quanto as investigações *in vitro*, nossos resultados obtidos para as neolignanas benzofurânicas eupomatenóide-5, eupomatenóide-6, conocarpano, bem como para o extrato hidroalcoólico das folhas de *P. rivinoides* nos ensaios de inibição de *rhCYP1A1* e *rhCYP1A2* são novos e relevantes, uma vez que nosso grupo tem estudado as propriedades biodinâmicas de espécies de Piperaceae e de neolignanas. Essas neolignanas demonstraram ser inibidoras dessas CYPs, exceto o conocarpano (atividade baixa) que não tem estrutura planar. Esses resultados representam um passo importante no conhecimento da PK dessas neolignanas para inferência sobre possíveis interações medicamentosas. Além disso, os *scores* observados pelo estudo de *docking* molecular corroboram os resultados obtidos *in vitro* nos CYP1A1 e CYP1A2, e que foram previstos pelos estudos *in silico* ADME.
- ✓ Os estudos de *docking* molecular, utilizando o algoritmo genético Goldscore como função de pontuação, modelo chemscore_p450_cds, com um raio de busca de 20 Å foram satisfatórias. Assim, foi possível validar o método por *redocking* dos cristais de CYP1A1 e CYP1A2, com valores de RMSD < 2,0 Å, o que favorece futuras investigações em CYP-P450.
- ✓ Os resíduos de aminoácidos presentes na cavidade CYP1A1/A2 desempenham papéis-chave nas interações de neolignanas descritas neste estudo, especialmente interações com eupomatenóide-5 e eupomatenóide-6, pois apresentaram as melhores pontuações e o maior número de interações com resíduos-chave, principalmente, interações com os resíduos Phe123, Phe224 e Phe258 no sítio ativo do CYP1A1 e interações com os resíduos Phe123, Phe224, Phe258, Phe260, Gly316 e Ala317 no sítio ativo do CYP1A2. Ficou demonstrado que as interações tipo empilhamento π - π proporcionam maior estabilidade de ligação.
- ✓ Diante do exposto, nossas investigações *in vivo*, *in vitro* e *in silico* representam um grande achado em se tratando de neolignanas benzofurânicas que apresentam elevado potencial biológico e, portanto, devem ser estudadas.

REFERÊNCIAS

- AHN, T.; YUN, C. High-Level Expression of human Cytochrome P450 3A4 by Co-Expression With Human Molecular Chaperone HDJ-1 (Hsp40). Arch Pharm Res. vol 27, n. 3, p. 319 – 323, 2004.
- AMADI, C. N.; MGBAHURIKE, A. A. Selected Food/Herb–Drug Interactions: Mechanisms and Clinical Relevance. American Journal of Therapeutics. p. 1–11, 2017.
- AMORIM, V. L. et al. "Anti-Leishmania activity of extracts from *Piper cabralanum* C.DC. (Piperaceae)" *Zeitschrift für Naturforschung C*, vol. 76, no. 5-6, 2021, pp. 229-241. <https://doi.org/10.1515/znc-2020-0284>
- ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP et al. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. Botanical journal of the Linnean Society, v. 181, n. 1, p. 1-20, 2016.
- BAILEY, D. G. - Fruit juice inhibition of uptake transport: a new type of food-drug interaction. Br J Clin Pharmacol. 70 (5):645-55, 2010.
- BD BIOSCIENCES - Cytochrome P450 Enzyme Mapping in Drug Discovery Using BD Supersomes Enzymes. Application Note #467; Dez, 2009.
- BERNUCI, K. Z. et al. Evaluation of Chemical Composition and Antileishmanial and Antituberculosis Activities of Essential Oils of *Piper* Species. Molecules. (21) 1698, 2016.
- BLAKEMORE, D. C. et al. Organic synthesis provides opportunities to transform drug discovery. Nat. Chem. 10, 383–394, 2018.
- BOHNERT, T. et al. Evaluation of a new molecular entity as a victim of metabolic drug–drug interactions an industry perspective. Drug Metab. Dispos. 44, 1399–1423, 2016.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254, 1976. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

BURKE, M. D. et al. Cytochrome P450 specificities of alkoxyresorufin-*O*-dealkylation in human and rat liver. *Biochem Pharmacol* 48:923–936, 1995. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(94\)90363-8](https://doi.org/10.1016/0006-2952(94)90363-8).

CHANDRASHEKAR, D. V.; MEHVAR, R. UPLC-MS/MS analysis of CYP1A-mediated ethoxyresorufin-*O*-deethylation activity in the rat kidney microsomes. *Journal of Chromatography B*. Vol. 1153, 2020.

CHENG, F. et al. admetSAR: a comprehensive source and free tool for assessment of chemical ADMET properties. *J Chem Inf Model*. 2012 Nov 26;52(11):3099-105. doi: 10.1021/ci300367a. Epub 2012 Nov 1. Erratum in: *J Chem Inf Model*. 2019 Nov 25;59(11):4959. PMID: 23092397.

CHHONKER, Y. S. et al. *In-vitro* metabolism, CYP profiling and metabolite identification of Eand Z- guggulsterone, a potent hypolipidmic agent *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. (160) 202–211, 2018.

CHOUNA, H. S. D. et al. Constituents of *Peperomia vulcanica* Baker & C. H. Wright (Piperaceae) with antiparasitic activity *Phytochemistry Letters*. (41) 14–20, 2021.

DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *SCientific REpOrtS* . 2017.

DAVID, J. P.; ISMAIL, H. M.; CHANDOR-PROUST, A.; PAINE, M. J. I. Role of cytochrome P450s in insecticide resistance: impact on the control of mosquito-borne diseases and use of insecticides on Earth. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* . 368, 2013.

DE BRITO-MACHADO, D. et al. Volatile Chemical Variation of Essential Oils and Their Correlation with Insects, Phenology, Ontogeny and Microclimate: *Piper mollicomum* Kunth,

a Case of Study. *Plants* (Basel). 2022 Dec 15;11(24):3535. doi: 10.3390/plants11243535. PMID: 36559647; PMCID: PMC9785739.

DE LUNA, A.V. et al. UHPLC-HRMS/MS Chemical Fingerprinting of the Bioactive Partition from Cultivated *Piper aduncum* L. *Molecules* **2024**, 29, 1690. <https://doi.org/10.3390/molecules29081690>

De-Oliveira, A. C. A. X.; Fidalgo-Neto, A. A.; Paumgartten, F. J. R. *In vitro* inhibition of liver monooxygenases by β -ionone, 1,8-cineole, (-)-menthol and terpineol. *Toxicology* 135: 33–41, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(99\)00043-8](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(99)00043-8)

DE-OLIVEIRA, A. C. A. X.; RIBEIRO-PINTO, L. F.; PAUMGARTTEN, F. J. R. *In vitro* inhibition of CYP2B1 monooxygenase by β -myrcene and othermonoterpenoid compounds. *Toxicol Lett* 92:39–46., 1997. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(97\)00034-9](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(97)00034-9)

DI NARDO, G.; GILIARD, G. Natural Compounds as Pharmaceuticals: The Key Role of Cytochromes P450 Reactivity. *Trends in Biochemical Sciences*, Vol. 45, No. 6, 2020.

DJORDJEVIC, N. et al. Induction of CYP1A2 by heavy coffee consumption in Serbs and Swedes. *Eur J Clin Pharmacol* 2008; 64: p. 381–385.

ELSHERBINY, M. E.; BROCKS, D. R. - The effect of CYP1A induction on amiodarone disposition in the rat. *Journal of pharmaceutical sciences*, vol. 99, no. 1, 2010.

ESPEJO-MOJICA, Á. J. et al. Human Recombinant Lysosomal Enzymes Produced in Microorganisms. *Mol Genet Metab. Set-Out*, 116(1-2) p.13-23, 2015.

FAN, D. et al. Lignans from the genus *Piper* L. and their pharmacological activities: An updated review. *Fitoterapia* 165 (2023) 105403.

FELISBERTO, J. R. S. et al. *Piper rivinoides* Kunth: A medicinal plant that preserves bioactive chemical substances in its essential oil throughout the seasons. *Journal of Medicinal Plants Research*. Vol. 16(8), pp. 258-268, 2022. doi: 10.5897/JMPR2022.7235

FERREIRA, L.G.; DOS SANTOS, R.N.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A.D. *Moléculas*. 2015 22; 20 (7):13384-421. DOI: 10.3390/molecules200713384. PMID: 26205061.

FONSECA, A. C. C. et al. Cytotoxic effect of pure compounds from *Piper rivinoides* Kunth against oral squamous cell carcinoma. *NATURAL PRODUCT RESEARCH*, p. 1-5, 2020.

GEBICKA, L. Redox reactions of heme proteins with flavonoids *Journal of Inorganic Biochemistry*. Vol. 208, July 2020.

GHOTBI, R. et al. Allele-specific expression and gene methylation in the control of CYP1A2 mRNA level in human livers. *Pharmacogenomics J* 9, 208–217; 2009. <https://doi.org/10.1038/tpj.2009.4>

GO, R. E.; HWANG, K. A.; CHOI, K. C. Cytochrome P450 1 family and cancers. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 147 (2015) p. 24–30. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.11.003>.

GONZALEZ, J.; MARCHAND-GENESTE, N.; GIRAUDÉL, J. L.; SHIMADA, T. *Docking and QSAR comparative studies of polycyclic aromatic hydrocarbons and other procarcinogen interactions with cytochromes P450 1A1 and 1B1*. *SAR QSAR Environ Res* 23: p. 87–109, 2012. <https://doi.org/10.1080/1062936X.2011.636380>

GOTTLIEB, O. R.; AIBA, C. J.; FILHO, R. B. Porosin: A neolignan from *Ocotea porosa*. *Phytochemistry*. v. 12, n. 2, p. 413–416, fev. 1973.

GUMMADI, A. C, GUDDATI, A. K. Genetic Polymorphisms in Pharmaceuticals and Chemotherapy. *World J Oncol*. 2021 Oct;12(5):149-154. doi: 10.14740/wjon1405. Epub 2021 Oct 5. PMID: 34804277; PMCID: PMC8577603.

GUO, J.; ZHU, X.; BADAWEY, S.; IHSAN, A.; LIU, Z.; XIE, C.; WANG, X. Metabolism and Mechanism of Human Cytochrome P450 Enzyme 1A2. *Curr Drug Metab*. 2021;22(1):40-49. doi: 10.2174/1389200221999210101233135. PMID: 33397254.

- HAIDUKEVICH, I. V. et al. Different inhibitory effects of azole-containing drugs and pesticides on CYP2C9 polymorphic forms: An *in vitro* study. *Toxicology in Vitro*. (50) 249–256, 2018.
- HAKKOLA, J.; HUKKANEN, J.; TURPEINEN, M.; PELKONEN, O. Inhibition and induction of CYP enzymes in humans: an update. *Archives of Toxicology*. 2020 94: p. 3671–3722.
- HAY, M. et al. Clinical development success rates for investigational drugs. *Nature Biotechnol.* (32) 40–51, 2014.
- HUANG, Y. et al. Effects of aescin on cytochrome P450 enzymes in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 151 pag. 583–590, 2014.
- INGELMAN-SUNDBERG, M.; SIM. S. C. Pharmacogenetic biomarkers as tools for improved drug therapy; emphasis on the cytochrome P450 system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. (396) 90–94, 2010.
- JARAMILLO, M.A.; MANOS, P.S. Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus *Piper* (Piperaceae). Durham, Inglaterra. *American Journal of Botany*, v. 88, n. 4, p. 706–716, 2001.
- JONES, G. et al. Development and validation of a genetic algorithm for flexible *docking*. *J Mol Biol* 267: p. 727–748, 1997. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0897>
- KHAN, R. A. - Natural products chemistry: The emerging trends and prospective goals. *Saudi Pharmaceutical Journal*. (26) 739–753, 2018.
- KITSATI, N.; MANTZARIS, M. D.; GALARIS, D. Hydroxytyrosol Inhibits Hydrogen Peroxide-Induced Apoptotic Signaling via Labile Iron Chelation. *J. Agric. Food Chem.* 60, p. 7873–7879, 2012.
- KOROISHI, A. M. et al. *In vitro* antifungal activity of extracts and neolignans from *Piper regnellii* against dermatophytes. *Journal of Ethnopharmacology*. (117) 270–277, 2008.

KUBAN, W.; DANIEL, W. A. - Cytochrome P450 expression and regulation in the brain. *Drug Metabolism Reviews*. vol. 53, no. 1, 1–29, 2021.

KUDUGUNTI, S. K. et al. Biochemical Mechanism of Caffeic Acid Phenylethyl Ester (CAPE) Selective Toxicity towards Melanoma Cell Lines. *Chem. Biol. Interact.* 188, p. 1–14, 2010.

KUMAR, B. S. et al. Synthesis of neolignans as microtubule stabilisers. *Bioorg. Med. Chem.* (22) 1342–1354, 2014.

LAKHERA, S.; DEVLAL, K.; GHOSH, A.; RANA, M. *In silico* investigation of phytoconstituents of medicinal herb '*Piper Longum*' against SARS-CoV-2 by molecular docking and molecular dynamics analysis. *Results in chemistry*, 3, 2021. 100199.

LAZARIN-BIDOIA, D. et al. Further evidence of the trypanocidal action of eupomatenoid-5: confirmation of involvement of reactive oxygen species and mitochondria owing to a reduction in trypanothione reductase activity. *Free Radical Biol. Med.* (60) 17–28, 2013.

LEAL, A. L. et al. Chemical identification and antimicrobial potential of essential oil of *Piper rivinoides* kunth (BETIS-WHITE). *Food and Chemical Toxicology* 2019.

LI, T.; BONKOVSKY, H. L.; GUO, J. Structural analysis of heme proteins: implications for design and prediction. *BMC Structural Biology*. 11-13, 2011.

LIEBESCHUETZ, J. W.; COLE, J. C.; KORB, T. Pose prediction and virtual screening performance of GOLD scoring functions in a standardized test. *J Comput Aided Mol Des* 26:7p. 37-748, 2012. <https://doi.org/10.1007/s10822-012-9551-4>

LIM, S. Y. M. et al. *In vitro* and *In silico* studies of interactions of cathinone with human recombinant cytochrome P450 CYP(1A2), CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C19,

CYP2E1, CYP2J2, and CYP3A5. *Toxicol Rep* 9:759–768, 2022.
<https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2022.03.040>

LIN, J.H.; LU, A.Y. Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. *Clin Pharmacokinet*. 1998 Nov;35(5):361-90. doi: 10.2165/00003088-199835050-00003.

LIU, A. et al. *In vivo* induction of CYO in mice by carbamazepine is dependent on PXR. *Pharmacological Reports*. 67: p. 299-304, 2015.

LU, J. et al. New insights of CYP1A in endogenous metabolism: a focus on single nucleotide polymorphisms and diseases *Acta Pharmaceutica Sinica*.10 (1) pags. 91-104, 2020.

LUBET, R. A. et al. Dealkylation of pentoxyresorufin: A rapid and sensitive assay for measuring induction of cytochrome(s) P-450 by phenobarbital and other xenobiotics in the rat. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Vol. 238, Issue 1, April 1985, pag. 43-48.

MACEDO, A. L. et al. An Overview of Neolignans of the Genus Piper L.: Isolation Methods and Biological Activities. *Mini Rev. Med. Chem*. v. 17, n. 8, p. 693–720, abr. 2017.

MACHALZ, D. et al. Structural insights into understudied human cytochrome P450 enzymes. *Drug Discovery Today*, 2021.

MARTIGNONI, M.; GROOTHUIS, G. M. M.; KANTER, R. Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol*. 2 (6), 2006.

MARTINY, V. Y.; MITEVA, M. A. Advances in Molecular Modeling of Human Cytochrome P450 Polymorphism. *J. Mol. Biol.* (425) 3978–3992, 2013.

MCMILLAN, D. M.; TYNDALE, R. F. CYP-mediated drug metabolism in the brain impacts drug response. *Pharmacology and Therapeutics*, Vol. 184, Pag. 189-200, April 2018.

MENA-ULECIA, K.; MACLEOD-CAREY, D. Interactions of 2-phenyl-benzotriazole xenobiotic compounds with human Cytochrome P450-CYP1A1 by means of *docking*, molecular dynamics simulations and MM-GBSA calculations. *Comput Biol Chem* 74: p. 253–262, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2018.04.004>

MENG, X.Y. et al. Molecular *docking*: A powerful approach for structure-based drug discovery. *Curr. Comput. Aided Drug Des.* 2011, 7, 146–157.

MIKSTACKA, R. et al. Design, synthesis and evaluation of the inhibitory selectivity of novel trans-resveratrol analogues on human recombinant CYP1A1, CYP1A2 and CYP1B1. *Bioorg Med Chem.* 2012 Sep 1;20(17):5117-26. doi: 10.1016/j.bmc.2012.07.012. Epub 2012 Jul 17. PMID: 22863525.

MIKSYS, S.; TYNDALE, R. F. - Cytochrome P450-mediated drug metabolism in the brain. *Journal of Psychiatry and Neuroscience.* (38), pp. 152-163, 2013.

MOREIRA, D. L. et al. Bioactive Neolignans from the Leaves of *Piper rivinoides* Kunth (Piperaceae). *Records of Natural Products*, (10) 4724, 2016.

NAGUNO, M. et al. Comparative analysis of stilbene and benzofuran neolignan derivatives as acetylcholinesterase inhibitors with neuroprotective and anti-inflammatory activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* (29) 2475–2479, 2019.

NEBERT, D. W.; KARP, C. L. Endogenous functions of the aryl hydrocarbon receptor (AHR): intersection of cytochrome P450 1 (CYP1)-metabolized eicosanoids and AHR biology, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) p. 36061–36065.

NELSON, D. R. Cytochrome P450 nomenclature. *Methods Mol Biol.* (320), 1–10, 2004.

NERURKAR, P. V. et al. Methoxyresorufin and benzyloxyresorufin: substrates preferentially metabolized by cytochromes P4501A2 and 2B, respectively, in the rat and mouse. *Biochemical pharmacology*, 46(5), 933-943, 1993.

NEUDERT, G.; KLEBE, G. DSX: A knowledge-bases scoring function assement of protein-ligant complexes. *J Chem Inf Model* 51: p. 2731-2745, 2011. <https://doi.org/10.1021/ci200274q>

ÖTLES, S.; SENTURK, A. - Food and drug interactions: A general review. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.* 13(1), 89-102, 2014.

PAN, Y. et al. *In vitro* effect of important herbal active constituents on human cytochrome P450 1A2 (CYP1A2) activity. *Phytomedicine*. 2014. 21, 1645–1650. doi.org/10.1016/j.phymed.2014.08.003.

PARK, E. J. et al. Potent and Selective Inhibition of CYP1A2 Enzyme by Obtusifolin and Its Chemopreventive Effects. *Pharmaceutics*. 1;14(12):2683, 2022. doi: 10.3390/pharmaceutics14122683. PMID: 36559174; PMCID: PMC9786103.

PARKINSON, A. Biotransformation of xenobiotics. In: KLAASSEN, C. D. (Org.). Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. 9a ed. p. 113 – 186, Nova York: McGraw Hill, 2001.

PEIXOTO, J. F. et al. Potential of Piper spp. as a source of new compounds for the leishmaniasis treatment. *Parasitology Research*, 2021.

PELKONEN, O. et al. Inhibition and induction of human cytochrome P450 (CYP) enzymes. *Xenobiótica*, vol. 28, no 12, p. 1203-1253, 1998.

PEREPECHAEVA, M. L. et al. Quercetin Attenuates Benzo-(α)-pyrene-induced CYP1A Expression*. *Biomed Environ Sci*. 30 (4): 308-313, 2017.

PERIGO, C. V. et al. The chemical composition and antibacterial activity of eleven Piper species from distinct rainforest areas in Southeastern Brazil. Industrial Crops and Products. (94) 528–539, 2016.

PHILIPS, J. D. Molecular Genetics and Metabolism. Vol. 128, Issue 3, 164-177, November 2019.

PICCIRILLO, E.; AMARAL, A. T. Busca virtual de compostos bioativos: conceitos e aplicações. Quim. Nova, Vol. 41, No. 6, 662-677, 2018.

PINTO, N.; DOLAN, M. E. Clinically relevant genetic variations in drug metabolizing enzymes. Curr Drug Metab. 12: 487–97, 2011.

POLASEK, T.M. et al. Perpetrators of pharmacokinetic drug-drug interactions arising from altered cytochrome P450 activity: a criteria-based assessment. Br J Clin Pharmacol. 2011 May;71(5):727-36. doi: 10.1111/j.1365-2125.2011.03903

POLETTI, P. et al. Compressed fluids and phytochemical profiling tools to obtain and characterize antiviral and anti-inflammatory compounds from natural sources. Trends in Analytical Chemistry 129, 2020.

QIU, F. et al. Inhibitory Effects of Seven Components of Danshen Extract on Catalytic Activity of Cytochrome P450 Enzyme in Human Liver Microsomes. Drug Metabolism and Disposition, 2008, 36(7), 1308–1314. doi:10.1124/dmd.108.021030.

QUELL, P. et al. Co-expression of Active Human Cytochrome P450 1A2 and Cytochrome P450 Reductase on the Cell Surface of Escherichia coli. Microbial Cell Factories, 15:26, 2016.

RAMOS, Y. J. et al. *Piper robustipedunculum* Yunck.: essential oil profile and chemosystematic insight of this Brazilian native species. Journal of Essential Oil and Plant Composition , v. 1, p. 73-79, 2023.

RAUNIO, H.; KUUSISTO, M.; JUVONEN, R. O.; PENTIKAINEN, O. T. Modeling of interactions between xenobiotics and cytochrome P450 (CYP) enzymes. *Front Pharmacol* 6: p. 1–14, 2015. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00123>.

RODRIGUES, A. D.; PROUGH, R. A. Induction of cytochromes P4501A1 and P4501A2 and measurement of catalytic activities. *Methods Enzymol.* v. 206, p. 423- 431, 1991.

RODRIGUES, R. P. et al. Virtual screening strategies in drug planning. *Rev Virtual Quim* 6: p. 739-776, 2012. <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20120055>

ROY, A. J.; PRINCE, P. S. M. Preventive Effects of p-Coumaric Acid on Lysosomal Dysfunction and Myocardial Infarct Size in Experimentally Induced myocardial Infarction. *European Journal of Pharmacology.* 699, p. 33–39, 2013.

SAMUHASANEETO, S.; YUSAKUL, G. Modulatory effects of Benjakul extract on rat hepatic cytochrome P450 enzymes. *Heliyon* 7 Vol. 7 (11) 01, 2021.

SANSEN, S. et al. Adaptations for the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons exhibited by the structure of human P450 1A2. *J Biol Chem.* 2007;282: p. 14348–14355.

SANTOS, R. O. et al. Interaction of the Medicinal Plant *Piper rivinoides* Ethanolic Extract, Fractions, and Isolated Neolignans with Rat CYP1A Activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia.* p. 1 – 10, 2021.

SHAO, S. Y. et al. An efficient method for determining the relative configuration of furofuran lignans by 1H NMR spectroscopy. *J. Nat. Prod.* (81) 1023–1028, 2018.

SHI, M. et al. CYPs-mediated drug-drug interactions on psoralidin, isobavachalcone, neobavaisoflavone and daidzein in rats liver microsomes. *Food and Chemical Toxicology* 136: p. 1-9, 2020. 111027

SIMMONDS, S. E. et al. Phylogenetics and comparative plastome genomics of two of the largest genera of angiosperms, *Piper* and *Peperomia* (Piperaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution.* 163; 2021. doi:10.1016/j.ympev.2021.107229

SIRIM D, WIDMANN M, WAGNER F, PLEISS J. Prediction and analysis of the modular structure of cytochrome P450 monooxygenases. *BMC Struct Biol.* 10-34, 2010.

SOUSA, M. C. et al. *In silico* metabolism studies of dietary flavonoids by CYP1A2 and CYP2C9. *Food Res Int* 50:102–110, 2013.<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.09.027>

SRIDHAR, J; GOYAL, N; LIU, J; FOROOZESH, M. Review of Ligand Specificity Factors for CYP1A Subfamily Enzymes from Molecular Modeling Studies Reported to-Date. *Molecules.* 2017; 22, 1143. doi:10.3390/molecules22071143.

STRUTZENBERGER, P. et al. Diversification rates, host plant shifts and an updated molecular phylogeny of Andean Eois moths (*Lepidoptera: Geometridae*). *PLoS One* (12) 2017.

SYCHEV, D. A. et al. The cytochrome P450 isoenzyme and some new opportunities for the prediction of negative drug interaction in vivo. *Drug Design, Development and Therapy.* 12, 2018.

TEPONNO, R. B.; KUSARI, S.; SPITELLER, M. Recent advances in research on lignans and neolignans. *Nat. Prod. Rep.* (33) 1044–1092, 2016.

TIAN, S. et al. The application of in silico drug-likeness predictions in pharmaceutical research. *Adv Drug Deliv Rev* 86, 2–10, 2015.

TIETZ, D. R.; COLTHART, A. M.; POCHAPSKY, S. S.; POCHAPSKY, T. C. - Substrate recognition by two different P450s: Evidence for conserved roles in a common fold. *Sci Rep.* 7(1):1–9, 2017.

TOSELLI, F.; DODD, P. R.; GILLAM, E. M. - Emerging roles for brain drug-metabolizing cytochrome P450 enzymes in neuropsychiatric conditions and responses to drugs. *Drug Metabolism Reviews.* (48), pp. 379-404, 2016.

TSIFTSOGLU, A. S.; TSAMADOU, A. I.; PAPADOPOULOU, L. C. Heme as key regulator of major mammalian cellular functions: Molecular, cellular, and pharmacological aspects. *Pharmacology & Therapeutics*. (111) 327–345, 2006.

TUGCU, G.; KIRMIZIBEKMEZ, H.; AYDIN, A. The integrated use of *in silico* methods for the hepatotoxicity potential of *Piper methysticum*. *Food Chem Toxicol*. 2020 Nov; 145:111663. doi: 10.1016/j.fct.2020.111663. Epub 2020 Aug 20. PMID: 32827561.

VALENTIN-SILVA, A. Reproductive biology of *Piper* species (Piperaceae): a review to link the past to the future. *Rodriguésia* 74: e01012022. 2023. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/2175-7860202374030>

VENDRAMETTO, M. C. et al. Evaluation of antileishmanial activity of eupomatenoid-5, a compound isolated from leaves of *Piper regnellii* var. *pallenscens*. *Parasitol. Int.* 59 (2)154-158, 2010.

WALSH, A. A.; SZKLARZ, G. D.; SCOTT, E. E. Human Cytochrome P450 1A1 Structure and Utility in Understanding Drug and Xenobiotic Metabolism. *Journal of Biological Chemistry*. vol 288: (18), 2013. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.452953>.

WAUCHOPE, S. et al. Dibenzyl trisulfide binds to and competitively inhibits the cytochrome P450 1A1 active site without impacting the expression of the aryl hydrocarbon receptor. *Toxicol Appl Pharmacol* 419:115502, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2021.115502>

WENG, J. K. & CHAPPLE, C. The origin and evolution of lignin biosynthesis, *New Phytol.* 187 (2) 273–285, 2010.

WILSON, J. S. et al. Host conservatism, host shifts and diversification across three trophic levels in two Neotropical forests. *J. Evol. Biol.* (25), 532–546, 2012.

XIE, M. et al. Schisandrin B and Schisandrol B induce mouse CYP2b10 associated with CAR not PXR. *Phytochemistry Letters* 35 pag. 164–170, 2020.

YASUKOCHI, Y.; SATTA, Y. Molecular Evolution of the CYP2D Subfamily in Primates: Purifying Selection on Substrate Recognition Sites without the Frequent or Long-Tract Gene Conversion. *Genome Biol Evol.* 7(4):1053–1067, 2015.

ZÁLEŠÁKA, F.; JEAN-YVES, D.; POSPÍŠIL, J. - Lignans and Neolignans: Plant secondary metabolites as a reservoir of biologically active substances. *Pharmacological Research.* (146) 104284, 2019.

ZANGER, U. M.; SCHWAB, M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology and Therapeutics.* (138), pp. 103-141, 2013.

ZELASKO, S.; PALARIA, A.; DAS, A. Optimizations to achieve high-level expression of cytochrome P450 proteins using *Escherichia coli* expression systems. *Protein Expr Purif.* 92:77–87, 2013.

ZHAO, Y. et al. Conformational Preferences of π - π Stacking Between Ligand and Protein, Analysis Derived from Crystal Structure Data Geometric Preference of π - π Interaction. *Interdiscip Sci.* 2015 Sep;7(3):211-20. doi: 10.1007/s12539-015-0263-z. Epub 2015 Sep 14. PMID: 26370211.

ZHOU, S. F. et al. Insights into the substrate specificity, inhibitors, regulation, and polymorphisms and the clinical impact of human cytochrome P450 1A2. *AAPS J.* 2009 Sep;11(3):481-94. doi: 10.1208/s12248-009-9127-y. Epub 2009 Jul 10. PMID: 19590965.

ZHOU, Y. et al. Evaluation of acacetin inhibition potential against cytochrome P450 *in vitro* and *in vivo*. *Chemico-Biological Interactions.* (329) 2020.

ZOU, Z.; SPENCER, M.; SUN, P. D. Developing a secretory AcGFP1-based IRES expression system for efficient production of mammalian recombinant proteins. *Protein Expression and Purification.* (192), 2022.