



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Tainá Larissa Lubschinski

**Análise do Efeito de Aril-ciclohexanonas Monocarboxiladas sobre a Resposta Imune
Inata (*In vitro*)**

Florianópolis/Santa Catarina

2021

Tainá Larissa Lubschinski

**Análise do Efeito de Aril-ciclohexanonas Monocarboxiladas sobre a Resposta Imune
Inata (*In vitro*)**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Área de Concentração Análises Clínicas, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Santa Catarina, para a obtenção do título de Mestre em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Monguilhott Dalmarco.

Florianópolis/Santa Catarina

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Lubschinski , Tainá Larissa
Análise do efeito de aril-ciclohexanonas
monocarboxiladas sobre a resposta imune inata (In vitro) /
Tainá Larissa Lubschinski ; orientador, Eduardo
Monguilott Dalmarco, 2021.
93 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Farmácia. 3. Imunologia clínica. 4.
Imunomodulação. 5. Aril-ciclohexanonas. I. Dalmarco,
Eduardo Monguilott. II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

Tainá Larissa Lubschinski

**Análise do Efeito de Aril-ciclohexanonas monocarboxiladas sobre a Resposta Imune
Inata (*In vitro*)**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Dra. Izabel Galhardo Demarchi
UFSC - Membro Interno

Profa. Dra. Beatriz Garcia Mendes
UFSC - Membro Externo

Profa. Dra. Ziliani da Silva Buss
UFSC - Suplente

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Farmácia.

Profa. Dra. Thaís Cristine Marques Sincero
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFSC

Prof. Dr. Eduardo Monguilhott Dalmarco
Orientador

Florianópolis, 2021.

Dedico este trabalho à minha família, principalmente aos meus pais, Rubino e Marlene, e ao meu irmão, Luan, por todo o apoio e amor necessários para que eu chegasse até aqui.

AGRADECIMENTOS

A Deus e aos meus mentores espirituais em primeiro lugar, que sempre me conduziram com as devidas lições por toda minha caminhada.

Aos meus pais, Marlene Dietrich Lubschinski e Rubino Lubschinski, que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando e incentivando em toda a minha vida. Obrigada por todo o amor e confiança depositados em mim.

Ao meu irmão, Luan Andrei Lubschinski, que sempre foi uma das minhas maiores alegrias.

A minha madrinha e padrinho, Gerti Lubschinski e Antônio Otacílio Lajus, pelo incentivo e dedicação que sempre tiveram por mim e por todas as alegrias que ainda vamos compartilhar.

Aos meus queridos avós, Helmut Waldomiro Lubschinski e Walter Willy Dietrich, e em memória de Florinda Frank Lubschinski e Edeltraud Dietrich, por todo o amor.

Aos meus amigos, principalmente a Maria Eduarda Mafra e Vinícius Matheus Knihis por toda a caminhada desde a graduação, e por me apoiarem e vibrarem junto comigo em cada conquista.

As professoras, Dra. Izabel Galhardo Demarchi, Dra. Ziliani da Silva Buss, Dra. Iara Fabrícia Kretzer por todo o ensinamento, mesmo em forma remota em tempos de pandemia, vocês foram essenciais. E a Profa. Dra. Beatriz Garcia Mendes Borba pela participação na banca de defesa deste trabalho.

Ao aluno de doutorado Luiz Antonio Escorteganha Pollo e ao Prof. Dr. Louis Pergaud Sandjo pelos compostos sintetizados para este estudo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Eduardo Monguilhott Dalmarco, pela oportunidade e confiança ao longo desta caminhada, além de todo conhecimento e suporte durante o mestrado.

Agradeço imensamente a todos os alunos e companheiros do Laboratório de Pesquisa em Imunologia (LAPI), em especial as colegas Eduarda Talita Bramorski Mohr e Julia Salvan da Rosa, que se tornaram minhas mentoras dentro do laboratório e minha família fora dele, obrigada por tanto.

À CAPES, pelo apoio financeiro, e ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia por todo o suporte.

“In a dark place we find ourselves, and a little more
knowledge lights our way”.

(Mestre Yoda, Star Wars)

RESUMO

Os canabinóides tem se destacado dentre os compostos estudados com potencial efeito imunomodulador e contra afecções autoimunes e inflamatórias. Estes compostos químicos têm a capacidade de se ligar a receptores do sistema endocanabinóide promovendo as mais diversas ações farmacológicas. Eles podem ser denominados de endocanabinóides, quando produzidos endogenamente; fitocanabinóides, presentes naturalmente na planta *Cannabis sp.*, e canabinóides sintéticos, quando obtidos sinteticamente, possuindo similaridade estrutural com os demais. Nesse contexto, dezenove diésteres de aril-ciclohexanonas e seus derivados, compostos sintetizadas com base no esqueleto aril-ciclohexano de fitocanabinóides, como o canabidiol (CBD), quanto à polarização, imunomodulação e potencial anti-inflamatório *in vitro*, utilizando a linhagem celular de macrófagos RAW 264.7. Como teste de triagem, foi realizada a verificação da viabilidade celular e citotoxicidade dos 19 compostos em estudo. Em seguida, calculou-se a CC₁₀ de cada composto (concentração mínima necessária para matar 10% da população celular), utilizada como ponto de corte para o teste posterior, onde foi possível verificar a capacidade inibitória dos compostos sobre a produção de óxido nítrico (NOx). Sendo assim, os compostos que apresentaram efeito sobre este mediador inflamatório, ou seja, que inibiram 50% dos metabólitos do óxido nítrico quando comparados ao controle inflamado (LPS), foram submetidos aos testes de imunomodulação. A atividade anti-inflamatória dos compostos foi mesurada através da capacidade dos compostos em inibir a produção das citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, IL-12p70, MCP-1, TNF- α , IFN- γ) e aumentar a produção de citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-10, IL-13). Diante do resultado apresentado frente a inibição ou produção das citocinas, o melhor composto foi selecionado. Com o composto final, foi avaliada a apoptose e fagocitose celular frente a macrófagos RAW 264.7. Além disso, verificou-se a expressão dos marcadores CD206 (receptor de manose), CD284 (receptor TLR4) e a capacidade do composto em reduzir a fosforilação da subunidade p65 do NF- κ B. Os resultados do primeiro teste de triagem demonstraram que, dos dezenove compostos testados, apenas seis (compostos 1, 2, 4, 7, 10 e 11) não apresentaram citotoxicidade frente a linhagem celular estudada, e consequentemente, mostraram uma alta viabilidade celular. Quando submetidos ao teste do NO, apenas três compostos (1, 4 e 7) inibiram o mediador inflamatório de forma significativa. Avaliando-se a capacidade de reduzir as concentrações das citocinas pró-inflamatórias e aumentar a produção das citocinas anti-inflamatórias o composto 4 (1 μ M) apresentou os melhores resultados. O composto também reduziu a apoptose celular de macrófagos, aumentou a expressão do marcador CD206 (receptor de manose) e ao mesmo tempo diminuiu a expressão de CD284 (receptor TLR4) na superfície destas células. O composto 4 aumentou a capacidade fagocítica dos macrófagos e inibiu significativamente a fosforilação da subunidade p65 da via NF- κ B. Em conclusão, o composto 4, identificado como dietil-4-hidroxi-2-(4-metoxifenil)-4-metil-6-oxociclohexano-1-3-dicarboxilato, da classe de diésteres de aril-ciclohexanonas demonstrou um efeito anti-inflamatório significativo ao mesmo tempo que apresentou a capacidade de transformar fenotipicamente os macrófagos do fenótipo M1 (pró-inflamatório) para o fenótipo M2 (anti-inflamatório), levando-nos a hipotetizar que o principal mecanismo de ação anti-inflamatória desta molécula está ligado à sua capacidade de modulação imunológica.

Palavras-Chave: Inflamação; técnicas *in vitro*; receptores; síntese; dicarboxilatos de aril-ciclohexanonas.

ABSTRACT

Cannabinoids have stood out among the compounds studied with a potential immunomodulatory effect and against autoimmune and inflammatory diseases. These chemical compounds have the ability to bind to receptors of the endocannabinoid system, promoting the most diverse pharmacological actions. They can be called endocannabinoids when produced endogenously; phytocannabinoids, naturally present in the *Cannabis* sp. plant, and synthetic cannabinoids, when obtained synthetically, having structural similarity with the others. In this context, nineteen aryl-cyclohexanones diesters and their derivatives, compounds synthesized based on the aryl-cyclohexane skeleton of phytocannabinoids, such as cannabidiol (CBD), regarding polarization, immunomodulation and anti-inflammatory potential *in vitro*, using the cell line of RAW 264.7 macrophages. As a screening test, the verification of cell viability and cytotoxicity of the 19 compounds under study was carried out. Then, the CC₁₀ of each compound was calculated (minimum concentration necessary to kill 10% of the cell population), used as a cutoff point for the subsequent test, where it was possible to verify the inhibitory capacity of the compounds on the production of nitric oxide (NO_x). Thus, the compounds that showed an effect on this inflammatory mediator, that is, that inhibited 50% of the nitric oxide metabolites when compared to the inflamed control (LPS), were submitted to immunomodulation tests. The anti-inflammatory activity of the compounds was measured through the ability of the compounds to inhibit the production of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-12p70, MCP-1, TNF- α , IFN- γ) and increase the production of anti-inflammatory cytokines (IL-4, IL-10, IL-13). In view of the results presented regarding the inhibition or production of cytokines, the best compound was selected. With the final compound, cellular apoptosis and phagocytosis against RAW 264.7 macrophages were evaluated. Furthermore, the expression of the markers CD206 (mannose receptor), CD284 (TLR4 receptor) and the ability of the compound to reduce the phosphorylation of the p65 subunit of NF- κ B were verified. The results of the first screening test showed that, of the nineteen compounds tested, only six (compounds 1, 2, 4, 7, 10 and 11) did not show cytotoxicity against the cell line studied, and consequently, showed high cell viability. When submitted to the NO test, only three compounds (1, 4 and 7) significantly inhibited the inflammatory mediator. Evaluating the ability to reduce the concentrations of pro-inflammatory cytokines and increase the production of anti-inflammatory cytokines, compound 4 (1 μ M) showed the best results. The compound also reduced macrophage cell apoptosis, increased the expression of the marker CD206 (mannose receptor) and at the same time decreased the expression of CD284 (TLR4 receptor) on the surface of these cells. Compound 4 increased the phagocytic capacity of macrophages and significantly inhibited the phosphorylation of the p65 subunit of the NF- κ B pathway. In conclusion, compound 4, identified as diethyl-4-hydroxy-2-(4-methoxyphenyl)-4-methyl-6-oxocyclohexane-1-3-dicarboxylate, from the class of aryl-cyclohexanones diesters demonstrated an anti-inflammatory while showing the ability to phenotypically transform macrophages from the M1 phenotype (pro-inflammatory) to the M2 phenotype (anti-inflammatory), leading us to hypothesize that the main mechanism of anti-inflammatory action of this molecule is linked to its immune modulation capacity.

Key Words: Inflammation. *In vitro* techniques. Receptors. Synthesis. Aryl-cyclohexanones dicarboxylates.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Eventos celulares que caracterizam uma resposta inflamatória	24
Figura 2 - Polarização de macrófagos em seus fenótipos, pró-inflamatório (M1) e anti-inflamatório (M2).....	26
Figura 3 - Os principais efeitos do NO produzidos durante a liberação das isoformas da NOS no organismo humano.....	29
Figura 4 - Estrutura molecular dos compostos diésteres de aril-ciclohexanonas.....	36
Figura 5 - Viabilidade celular dos macrófagos RAW 264.7 expostos aos compostos estudados nas concentrações de 1 a 1000 μ M.....	48
Figura 6 - Efeitos dos compostos diésteres de aril-ciclohexanonas sobre os níveis de metabólitos do NO _x produzidos por macrófagos RAW 264.7.....	51
Figura 7 - Efeito do composto 4 diéster de aril-ciclohexanonas (1 μ M) sobre os níveis de citocinas IL-1 β , IL-4 e IL-13 produzidas por macrófagos RAW 264.7 utilizando o método imunoenzimático (ELISA).....	55
Figura 8 - Efeito do composto 4 (1 μ M) sobre os níveis de apoptose celular em macrófagos RAW 264.7 por citometria de fluxo.....	57
Figura 9 - Efeito do composto 4 (1 μ M) sobre níveis de fagocitose em macrófagos RAW 264.7.....	58
Figura 10 - Efeito do composto 4 sobre a expressão do receptor de manose (CD206) na superfície de macrófagos RAW 264.7.....	59
Figura 11 - Efeito do composto 4 sobre a expressão do receptor TLR4 (CD284/M2) na superfície de macrófagos RAW 264.7.....	60
Figura 12 - Efeito do composto 4 derivado de diésteres de aril-ciclohexanonas sobre a fosforilação da subunidade p65 da via NF- κ B.....	61
Figura 13 - Representação molecular do procedimento geral para a produção das ciclohexanonas, dos compostos de 1 a 3.....	81
Figura 14 - Representação molecular do composto 1, diéster de aril-ciclohexanona.....	81
Figura 15 - Representação molecular do composto 2, diéster de aril-ciclohexanona.....	82

Figura 16 - Representação molecular do composto 3, diéster de aril-ciclohexanona.....	82
Figura 17 - Representação molecular do procedimento geral para a produção das ciclohexanonas, dos compostos de 4 a 11.....	83
Figura 18 - Representação molecular do composto 4, diéster de aril-ciclohexanona.....	84
Figura 19 - Representação molecular do composto 5, diéster de aril-ciclohexanona.....	84
Figura 20 - Representação molecular do composto 6, diéster de aril-ciclohexanona.....	85
Figura 21 - Representação molecular do composto 7, diéster de aril-ciclohexanona.....	85
Figura 22 - Representação molecular do composto 8, diéster de aril-ciclohexanona.....	86
Figura 23 - Representação molecular do composto 9, diéster de aril-ciclohexanona.....	86
Figura 24 - Representação molecular do composto 10, diéster de aril-ciclohexanona.....	87
Figura 25 - Representação molecular do composto 11, diéster de aril-ciclohexanona.....	87
Figura 26 - Representação molecular do procedimento geral para a produção das ciclohexanonas, dos compostos de 12 a 19.....	88
Figura 27 - Representação molecular do composto 12, diéster de aril-ciclohexanona.....	89
Figura 28 - Representação molecular do composto 13, diéster de aril-ciclohexanona.....	89
Figura 29 - Representação molecular do composto 14, diéster de aril-ciclohexanona.....	90
Figura 30 - Representação molecular do composto 15, diéster de aril-ciclohexanona.....	90

Figura 31 - Representação molecular do composto 16, diéster de aril-ciclohexanona.....	91
Figura 32 - Representação molecular do composto 17, diéster de aril-ciclohexanona.....	91
Figura 33 - Representação molecular do composto 18, diéster de aril-ciclohexanona.....	92
Figura 34 - Representação molecular do composto 19, diéster de aril-ciclohexanona.....	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentrações celulares e volumes utilizados no plaqueamento da linhagem celular de macrófagos RAW 264.7	39
Tabela 2 - Resultados das concentrações citotóxicas para 10% (CC ₁₀) para macrófagos RAW 264.7 de 19 diésteres de aril-ciclohexanonas.....	49
Tabela 3 - Perfil de inibição e expressão de citocinas inflamatórias por diésteres de aril-ciclohexanonas monocarboxiladas produzidas por macrófagos RAW 264.7 utilizando citometria de fluxo.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Δ 9-THC: Δ 9-tetrahydrocannabinol

AIDS: Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

ANOVA: Análise de Variância

Arginase 1: Enzima catalizadora de L-arginina, L-ornitina e uréia

Ca³⁺: Cálcio

BAB/14: Camundongos Knockout

Br: Brometo

CB1: Receptor Canabinóide 1

CB2: Receptor Canabinóide 2

CBA: *Cytometric Bead Array*

CBC: Canabicromene

CBD: Canabidiol

CBDV: Canabidivarina

CBG: Canabigerol

CBN: Canabinol

CC₁₀: Concentração mínima de um composto necessária para matar 10% da população celular em estudo

CC₅₀: Concentração mínima de um composto necessária para matar 50% da população celular em estudo

CCL2: Receptor da proteína quimioatraente para monócitos 1 (MCP-1)

CD206: Receptor de Manose

CD284/MD2 - TLR4: Receptor do tipo Toll 4

Células B: Linfócitos do tipo B

Células NK: Células *Natural Killers*

Células T: Linfócitos do tipo T (CD4, CD8, reguladoras)

Células Th: Células T *helper* (Th-1, Th-2, Th17)

CLR: Receptor de Lectina tipo C

CO₂: Dióxido de Carbono

COx: Ciclooxigenase

COX-2: Ciclooxigenase-2

cREL: Subunidade do Fator Nuclear NF- κ B

DCs: Células Dendríticas

DEXA: Dexametasona

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO: Dimetil Sulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EDTA: Ácido Etilenodiaminotetracético

ELISA: Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

eNOS: Óxido Nítrico Conversor Endotelial

Equiv.: Equivalente

ERK: Proteína Kinase regulada por sinal extracelular

ERNs: Espécies Reativas de Nitrogênio

EROs: Espécies Reativas de Oxigênio

EtOH: Etanol

F: Flúor

FAAH: Amida Hidrolase de Ácido Graxo

FBS: Soro Fetal Bovino

FDA: *Food and Drug Administration*

Formazan: {E,Z-1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-1,3-diphenylformazan}

Griess: Reagente composto por sulfanilamida 1% e Alfa-Naftil-Etilenodiamina 0,1% utilizado no teste de dosagem dos metabólitos do óxido nítrico (NO)

H: Hidrogênio

H₂N: Amina Primária

HRMS: Espectrometria de Massa de Alta Resolução

HU 210: Agonista canabinóide

HU 308: Agonista canabinóide

IC₅₀: Concentração do produto capaz de inibir em 50% os níveis de NO_x

IFN- γ : Interferon-gama

IFNs: Interferons tipo 1

Ig: Imunoglobulina

IgE: Imunoglobulina E (anticorpo IgE)

IgG: Imunoglobulina G (anticorpo IgG1)

IKK β : Subunidade catalítica do complexo IKK (Via NF- κ B)

IL: Interleucina (IL-1, IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-18, IL-23)

iNOS: Óxido Nítrico Sintase Induzida

K₂CO₃: Carbonato de Potássio

LPS: Lipopolissacarídeo

LRRs: Repetições Ricas em Leucina

MO: Macrófagos não polarizados

M1: Macrófagos de células classicamente ativadas, com fenótipo pró-inflamatório

M2: Macrófagos de células alternativamente ativadas, com fenótipo anti-inflamatório

MAGL: Monoaglicérol

MAPK: Proteínas Kinases Ativadas por Mitógenos

MCP-1: Proteína Quimioatraente para Monócitos 1

MTT: (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium])

MyD88: Proteína de codificação de gene: adaptador de transdução de sinal imunológico inato

NEMO: Modulador essencial e ativador da via NF- κ B

NF- κ B: Fator de transcrição nuclear kappa B

NK: Células *Natural killers*

nNOS: Óxido nítrico Conversor Neuronal

NMR: Espectroscopia NMR

NO: Óxido Nítrico

NO₂⁻: Nitrito

NO₂: Dióxido de Nitrogênio

NOS: Óxido Nítrico Sintase

NOS₂: Óxido Nítrico Sintase Induzível

NOx: Metabólitos do Óxido Nítrico

O₂: Oxigênio

OMe: Metoxilo

ONOO⁻: Peroxinitrito

P50: Subunidade do Fator Nuclear NF- κ B

P52: Subunidade do Fator Nuclear NF- κ B

P65/RelA: Subunidade do Fator Nuclear NF- κ B
PAMPS: Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PBS: Solução de Tampão Fosfato Salino
pH: Potencial Hidrogeniônico
PLA2: Enzima Fosfolipase A2
PRRs: Receptores de Reconhecimento de Padrões
R: Radical
RAW 264.7: Linhagem celular de Macrófagos Murinos
RelB: Subunidade do Fator Nuclear NF- κ B
RMN: Ressonância Magnética Nuclear
RNS: Espécies Reativas de Nitrogênio
ROS: Espécies Reativas de Oxigênio
SNC: Sistema Nervoso Central
TIR: Receptor Toll/interneukin-1
TGF- β : Fator de Crescimento Transformador Beta
TLR-4: Receptores tipo Toll-like 4
TLRs: Receptores tipo Toll-like (TLR-1 ao 10)
TNF- α : Fator de Necrose Tumoral alfa
VEGF: Fator de Crescimento Endotelial Vascular
WIN55,212-2: Agonista Canabinóide

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
1.1	<i>Cannabis sp.</i> : PROPRIEDADES MEDICINAIS.....	20
1.1.1	Sistema Endocanabinóide.....	21
1.1.2	Canabinóides Sintéticos.....	22
1.2	PROCESSO INFLAMATÓRIO.....	23
1.3	MACRÓFAGOS.....	25
1.3.1	TLRs e Inflamação.....	28
1.3.2	Receptor de Manose (CD206).....	28
1.4	ÓXIDO NÍTRICO.....	29
1.5	CITOCINAS.....	30
1.5.1	Interleucinas.....	31
1.5.2	Fator de Necrose Tumoral α (TNF-α).....	32
1.5.3	Interferon γ (IFN-γ).....	32
1.5.4	Proteína de Quimioatração de Monócitos (MCP-1).....	33
1.6	VIA NF- κ B.....	34
2	OBJETIVOS	35
2.1	OBJETIVO GERAL.....	35
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
3	MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1	COMPOSTOS SINTÉTICOS	36
3.2	REAGENTES.....	37
3.3	CULTURA CELULAR DE MACRÓFAGOS RAW 264.7	38
3.3.1	Viabilidade Celular pela Técnica de Azul de Tripán	39
3.3.2	Plaqueamento Celular (RAW 264.7)	39
3.4	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE PELA TÉCNICA COLORIMÉTRICA DE MTT.....	40
3.5	DETERMINAÇÃO DE METABÓLITOS DO ÓXIDO NÍTRICO (NO)	40
3.6	QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS (IL-12P70, TNF- α , IFN- γ , MCP-1, IL-6 E IL-10) POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	41
3.7	QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS (IL-1 β , IL-4 E IL-13) POR MÉTODO IMUNOENZIMÁTICO.....	42
3.8	NÍVEIS DE APOPTOSE/NECROSE CELULAR.....	43
3.9	ATIVIDADE FAGOCÍTICA DE MACRÓFAGOS RAW 264.7	44
3.10	EXPRESSÃO DO RECEPTOR DE MANOSE (CD206)	44
3.11	EXPRESSÃO DO RECEPTOR TLR4 (CD284/MD2)	45
3.12	DETERMINAÇÃO DA FOSFORILAÇÃO DA SUBUNIDADE P65 DA VIA NF-KB.....	46
3.13	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	46

4	RESULTADOS	48
4.1	CITOTOXICIDADE CELULAR DE DIÉSTERES DE ARIL-CICLOEXANONAS MONOCARBOXILADAS SOBRE MACRÓFAGOS RAW 264.7.....	48
4.2	DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE METABÓLITOS DO ÓXIDO NÍTRICO (NOX).....	50
4.3	PRODUÇÃO DE CITOCINAS (IL-12P70, TNF-A, IFN- Γ , MPC-1, IL-6, IL-10) POR MACRÓFAGOS RAW 264.7 EXPOSTOS A DIÉSTERES DE ARIL-CICLOHEXANONAS POR CITOMETRIA DE FLUXO	52
4.4	PRODUÇÃO DE CITOCINAS (IL-1B, IL-4 E IL-13) POR MACRÓFAGOS RAW 264.7 EXPOSTOS A DIÉSTERES DE ARIL-CICLOHEXANONAS POR MÉTODO IMUNOENZIMÁTICO.....	54
4.5	APOPTOSE CELULAR DE MACRÓFAGOS RAW 264.7 EXPOSTOS AO COMPOSTO 4	56
4.6	ATIVIDADE FAGOCÍTICA EM MACRÓFAGOS RAW 264.7 EXPOSTOS AO COMPOSTO 4	58
4.7	EXPRESSÃO DO RECEPTOR DE MANOSE (CD206) NA SUPERFÍCIE DE MACRÓFAGOS RAW 264.7	58
4.8	EXPRESSÃO DO RECEPTOR TLR4 (CD284/MD-2) NA SUPERFÍCIE DE MACRÓFAGOS RAW 264.7	60
4.9	FOSFORILAÇÃO DA SUBUNIDADE p65 DA VIA NF-KB	61
5	DISCUSSÃO	62
6	CONCLUSÃO	69
	REFERÊNCIAS	70
	ANEXO 1	81

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Cannabis sp.*: PROPRIEDADES MEDICINAIS

Cannabis sativa é uma das plantas cultivadas mais antigas do mundo, originária do sudeste e centro da Ásia (BONINI et al., 2018). A planta tem sido usada para fins medicinais e psicotrópicos há milhares de anos, sendo um reservatório de compostos com propriedades benéficas (MORALES, HURST E REGGIO, 2017). Até o momento, mais de 500 compostos, como canabinóides, flavonóides, terpenos e ácidos graxos, foram identificados nas folhas e flores da planta (GOULD, 2015).

Os mais de 120 metabólitos secundários terpenofenólicos são chamados de fitocanabinóides, incluindo o Δ 9-tetrahydrocannabinol (THC), o canabidiol (CBD) e o canabigerol (CBG), podendo ser distinguidos dos canabinóides endógenos (endocanabinóides) e sintéticos (ROCK, PARKER, 2021). Dentre os fitocanabinóides, o THC e o CBD são os mais importantes. O THC é o principal composto psicoativo, enquanto o CBD é desprovido de atividade psicotrópica e apresenta inúmeros benefícios farmacológicos (MORALES, HURST E REGGIO, 2017). A planta também contém outros fitocanabinóides, como o canabinol (CBN), o primeiro canabinóide a ser isolado (WOOD, SPIVERY, 1899), o CBG, o canabicromene (CBC) e a canabidivarina (CBDV). Embora esses canabinóides sejam menos estudados, eles também podem ter potencial interesse farmacológico (ALVES et al, 2020).

Os fitocanabinóides presentes na planta atuam ligando-se aos receptores canabinóides, bem como a outros sistemas receptores. A planta e seus constituintes têm sido indicados como compostos terapêuticos em várias condições médicas, como dor, ansiedade, epilepsia, náuseas, vômitos e transtornos de estresse pós-traumático (MORALES, HURST E REGGIO, 2017). Dentre estes, destaca-se o fitocanabinóide mais conhecido da planta, o CBD, que se trata de um composto terpenofenólico de vinte e um carbonos que possui vários alvos moleculares. As evidências de que o CBD tem promessa terapêutica, derivam em grande parte de estudos pré-clínicos com células e roedores, que sugerem que o fitocanabinóide pode ser neuroprotetor, cardioprotetor e anti-inflamatório (ALVES, 2020).

Atualmente, tanto a planta quanto seus fitocanabinóides, isolados ou em combinação, são utilizados em diversas condições patológicas. Já existem medicamentos à base de

canabinóides aprovados, como Nabiximóis (Sativex®), uma mistura 1:1 de THC e CBD para aliviar a rigidez muscular e dor neuropática na esclerose múltipla (KEATING, 2017). Muitos medicamentos sintéticos análogos de THC, como o Dronabinol (Marinol®) e Nabilona (Cesamet®), para controlar vômitos e náuseas em pacientes oncológicos que não respondem aos antieméticos convencionais, são popularmente utilizados (BRAMNESS et al., 2018; URITS et al., 2019). Além disso, o óleo derivado de CBD (Epidiolex®) foi recentemente aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento de algumas condições pediátricas, como as síndromes de Lennox-Gastaut e Dravet, refratárias às terapias convencionais (CHEN, BORGELT E BLACKMER, 2019).

1.1.1 Sistema Endocanabinóide

O sistema endocanabinóide se trata de um importante sistema molecular responsável pelo controle da homeostase do organismo e está se tornando um alvo cada vez mais popular na farmacoterapia. Os endocanabinóides podem se ligar ao sistema endocanabinóide, e pertencem a um grande grupo de compostos com estrutura e atividade biológica semelhantes, que são ésteres, éteres e derivados de amidas de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa, como o ácido araquidônico (BATTISTA et al., 2012).

Os receptores canabinóides (CBRs) CB1 e CB2 pertencem à família acoplada à proteína G, descobertos pela primeira vez em 1990, em cérebros de ratos (PERES et al., 2018). Os receptores canabinóides do tipo 1 são expressos predominantemente no cérebro e no sistema nervoso central (SNC), podendo ser encontrados em níveis mais baixos nos nervos periféricos, tecidos reprodutivos, trato gastrointestinal, rins, fígado, sistema cardiovascular, pulmonar, células imunológicas e demais tecidos (DA SILVA et al., 2018). Em 1993, foi relatado que o receptor canabinóide do tipo 2 (CB2), encontrado predominantemente expresso em células imunes (YANG et al., 2014; HAMMEL et al., 2016). As enzimas metabólicas, os endocanabinóides e os receptores canabinóides constituem o sistema endocanabinóide (ECS), que nos últimos anos tem ganhado ênfase por possuir um papel importante na fisiologia humana, como no apetite, ritmo circadiano, inflamação, estresse, dor e reprodução (V ²² DIERS E LANDAR, 2012; WU, HAN, 2010).

As evidências de que o sistema endocanabinóide apresenta efeitos imunomoduladores geraram a teoria de que os canabinóides exógenos e sintéticos também podem ter efeitos

imunossupressores, sendo uma potencial terapia para doenças autoimunes e inflamatórias (CABRAL, STAAB, 2005; KUMAR et al., 2001; BERDYSHEV, 2000). Desde então, vários estudos sobre esta associação estão sendo realizados, onde foi demonstrado que os canabinóides exógenos exercem suas propriedades imunossupressoras por meio da indução de apoptose, inibição da proliferação celular, inibição de citocinas pró-inflamatórias, produção de citocinas, quimiocinas e indução de células T reguladoras (CABRAL, STAAB, 2005; KUMAR et al., 2001; BERDYSHEV, 2000; WU et al., 2012). Além disso, demais estudos demonstraram que canabinóides exógenos e seus derivados podem regular a diferenciação de fenótipos de macrófagos do tipo 1 (M1) em macrófagos do tipo 2 (M2) (MONTECUCCO, BURGER E MACH, 2008; WALTER et al., 2003).

1.1.2 Canabinóides Sintéticos

Os derivados canabinóides podem ser classificados em três tipos: Canabinóides derivados da planta *Cannabis Sativa L.*; Canabinóides endógenos, produzidos pelo próprio organismo, como a anandamida e o 2-araquidonoilglicerol; e os canabinóides sintéticos (DA SILVA et al., 2018). Todos esses derivados canabinóides tem a capacidade de se ligar a receptores endocanabinóides acoplados à proteína G, os receptores CB1 e CB2 (YANG et al., 2014). Os canabinóides sintéticos são um grupo heterogêneo de compostos desenvolvidos com estrutura molecular similar aos canabinóides derivados da planta e endocanabinóides, que tem a capacidade de sondar o sistema endocanabinóide endógeno e apresentam potencial terapêutico (WALL et al., 2012).

A descoberta da relevância terapêutica do sistema endocanabinóide levou à identificação de várias substâncias sintéticas cannabinóides. Estratégias para o desenvolvimento de canabinóides sintéticos incluem compostos que ativam ou bloqueiam seletivamente CB1 e CB2, moléculas que podem atuar como moduladores alostéricos ou agonistas tendenciosos desses receptores, inibidores das enzimas metabólicas (amida hidrolase de ácido graxo – FAAH; ou monoaglicerol – MAGL), bem como o desenvolvimento de compostos que atuam em receptores canabinóides periféricos (MORALES, JAGEROVIC, 2018).

Desta forma, os compostos sintéticos em estudo, conhecidos como diésteres de aril-ciclohexanonas monocarboxiladas, tratam-se de estruturas moleculares similares aos

canabinóides conhecidos, possuindo em sua estrutura um grupamento cíclico de seis carbonos com um grupo funcional principal, cetona. Segundo Honório e colaboradores (2006), a cadeia lateral de uma estrutura canabinóide pode ter seu comprimento lateral ligado ao anel carbônico modificado sem perda de atividade e ramificações nesta cadeia aumentam a potência. A adição de cadeias laterais ao anel carbônico também pode ser realizada via um átomo de oxigênio (formando um éter) sem perda de atividade (HONÓRIO et al., 2006).

Esses compostos sintéticos visam fornecer efeitos terapêuticos otimizados e perfil farmacocinético imunomodulatório, ao mesmo tempo em que reduzem ações colaterais indesejáveis. Como exemplo de um canabinóide sintético, temos a Nabilona (Cesamet®), um análogo de dimetilheptilo do THC, que foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) em 1985, mas começou a ser comercializado nos Estados Unidos apenas 2006. Este canabinóide é aprovado e usado principalmente para o tratamento de náuseas e vômitos induzidos por quimioterapia para pacientes que não respondem aos antieméticos convencionais; e para anorexia e perda de peso em pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). Além disso, estudos sugeriram que a Nabilona em pacientes com fibromialgia é capaz de reduzir a dor e melhorar a qualidade de vida (SKRABEK et al., 2008).

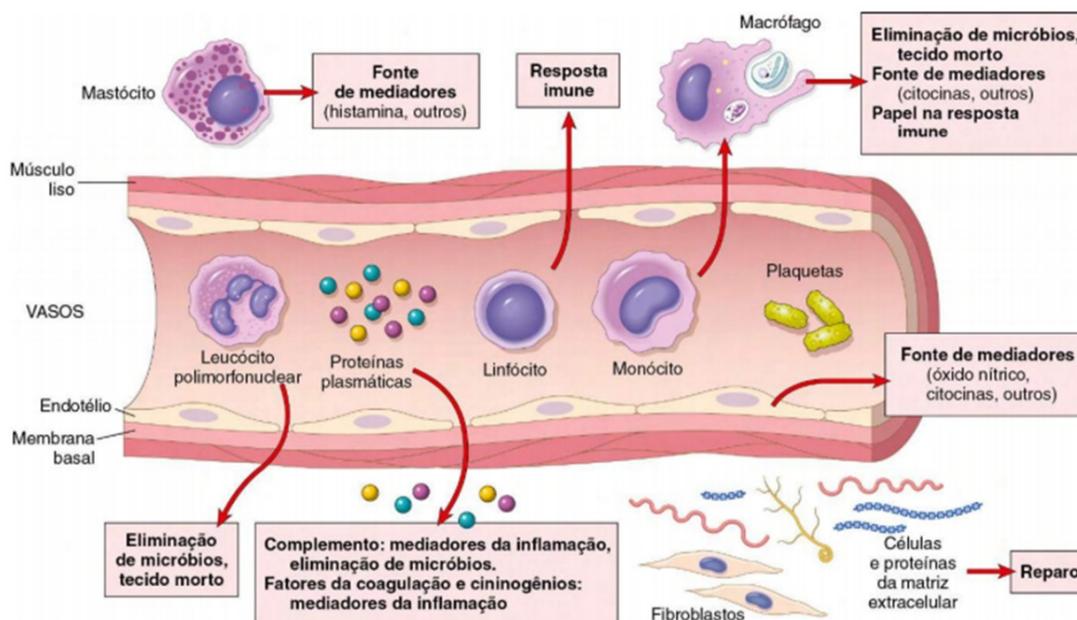
1.2 PROCESSO INFLAMATÓRIO

O processo inflamatório é uma resposta protetora contra diversos fatores que desequilibram a homeostasia do organismo. As respostas inflamatórias locais e sistêmicas visam eliminar o agente lesivo, promovendo a reparação e estabelecendo memória imunológica (FULLERTON E GILROY, 2016). Além disso, protege os tecidos contra infecções, estresse tecidual e injúrias diversas, tais como produção de citocinas e eicosanóides, que induzem uma miríade de acontecimentos biológicos (KOTAS, MEDZIHITOV, 2015). A inflamação é, portanto, um mecanismo de defesa vital para a saúde (NATHAN E DING, 2010).

A inflamação envolve uma rede complexa de cascatas de sinalização celular e molecular direcionadas para o reparo, regeneração e homeostasia do tecido ou órgão (KUMAR, 2017). De forma clássica, os eventos celulares e moleculares envolvidos na resposta inflamatória são bem conhecidos e tipicamente caracterizados por aumento do fluxo sanguíneo, dilatação capilar, infiltração de leucócitos, produção de mediadores químicos que resultam nos sinais cardinais da inflamação: Rubor, dor, calor, edema e a perda de função (PUNCHARD,

WHELAN E ADCOCK, 2004). A resolução inadequada deste processo gera quadros de inflamação crônica, dano tecidual irreversível e desregulação da capacidade cicatricial do órgão atingido (SUGIMOTO et al., 2016).

Figura 1 - Eventos celulares que caracterizam uma resposta inflamatória.



Componentes da resposta inflamatória, aguda e crônica e suas principais funções. Recrutamento celular e seus eventos que caracterizam uma resposta inflamatória e consequentemente geram os sinais típicos da inflamação:

Vasodilatação com aumento do fluxo sanguíneo, aumento da permeabilidade, quimiotaxia e proliferação de células inflamatórias com produção de mediadores químicos. FONTE: ABBAS (2019).

O processo inflamatório inicia-se com a produção de mediadores inflamatórios solúveis; como citocinas, radicais livres, aminas vasoativas e eicosanóides, como prostaglandinas; por células residentes, isto é, macrófagos de tecido, células dendríticas (DCs), linfócitos, células endoteliais, fibroblastos e mastócitos no tecido lesado ou infectado (FULLERTON E GILROY, 2016). Simultaneamente, as moléculas de adesão celular são reguladas positivamente nos leucócitos circulantes e nas células endoteliais, promovendo a exsudação de proteínas e o influxo de granulócitos do sangue (Figura 1) (KOTAS et al., 2015).

A resolução da inflamação classicamente ocorre através de uma cascata de processos complexos e rigidamente regulados, onde, primeiramente, os agentes que desencadearam a resposta inflamatória são eliminados. Em seguida, a síntese de mediadores pró-inflamatórios é suspensa, interrompendo o recrutamento de leucócitos e a formação de edema (NATHAN, 2006). Posteriormente, as células imunes são eliminadas do tecido e os leucócitos inflamatórios

podem reentrar na circulação sistêmica, onde muitos polimorfonucleares sofrem apoptose ou necrose local e subsequente eferocitose por macrófagos (BUCKLEY et al., 2013).

Logo, a diferenciação de macrófagos de células classicamente ativadas (M1) para células alternativamente ativadas (M2), o retorno de células não apoptóticas à linfa e, finalmente, o início dos processos de cura, fazem parte da resolução do processo inflamatório (NATHAN, 2006; FULLERTON E GILROY, 2016). Juntos, esses eventos evitam danos excessivos ao tecido e desenvolvimento de inflamação crônica sem resolução, resultando na homeostasia do organismo anteriormente lesado. Sendo assim, a falha de uma ou mais etapas na resolução da inflamação pode estar envolvida na patogênese de várias doenças inflamatórias crônicas humanas (LAWRENCE E GILROY, 2007).

1.3 MACRÓFAGOS

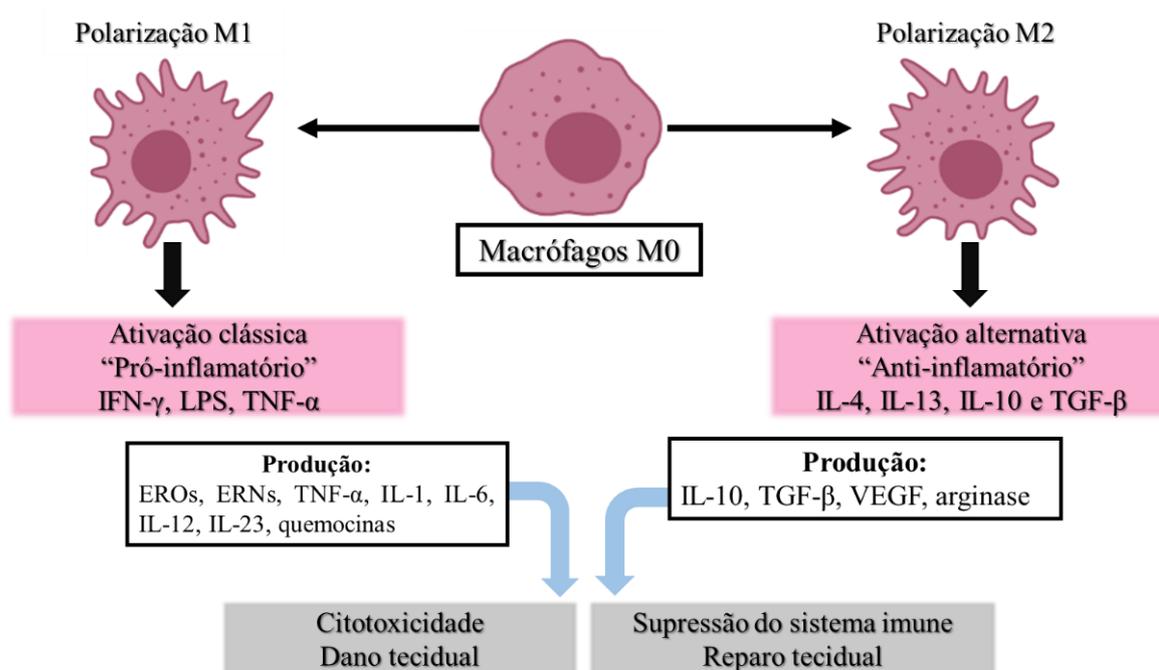
Macrófagos são uma população heterogênea de fagócitos mononucleares, sendo as principais células envolvidas no processo de inflamação (ZHENG et al., 2013). Originários de monócitos produzidos na medula óssea, os macrófagos possuem papel importante em uma variedade de processos celulares, na homeostasia, quimiotaxia e eliminação de detritos celulares, direcionando a ativação de células T e sofrendo polarização de fenótipos pró-inflamatórios a anti-inflamatórios por meio de sua plasticidade (BELCASTRO et al., 2015; WYNN et al., 2013). Quando ocorre o dano a homeostasia do organismo, neutrófilos são as primeiras células imunes recrutadas para o local, agindo por meio de fagocitose celular e liberação de proteases. A medida que sofrem apoptose e eliminam os resíduos celulares, os neutrófilos começam a liberar sinais que recrutam monócitos circulantes e macrófagos residentes no tecido (WRIGHT et al., 2010).

Estas células são as maiores produtoras de mediadores pró-inflamatórios, apresentando a capacidade de responder rapidamente aos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) que incluem lipopolissacarídeos (LPS) liberados pela parede celular de bactérias Gram-negativas. Um dos responsáveis pelo reconhecimento de PAMPs são os receptores do tipo Toll (TLRs), pertencentes à família dos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs). Dentro da família dos receptores do tipo *Toll*, encontram-se os TLR-4, principais responsáveis pelo reconhecimento das moléculas de LPS. Após distinguir este PAMP, os TLR-4 ativam diversas vias, incluindo MyD88 e membros da família IL-1, que

culminam na migração do NF- κ B para o núcleo. Além disso, ocorre a ativação das MAPK e indução da produção de citocinas pró-inflamatórias (KAWAI, AKIRA, 2011).

Embora os macrófagos demonstrem uma grande quantidade de heterogeneidade dentro dos estados de ativação em um processo inflamatório (ELIGINI et al., 2015; LAWRENCE E NATOLI, 2011), eles podem ser classificados através de sua ação pró ou anti-inflamatória, ou seja, macrófagos classicamente ativados (tipo M1 ou pró-inflamatório) e macrófagos ativados alternativamente (tipo M2 ou anti-inflamatórios) (HAMIDZADEH, 2017), como visto na Figura 2.

Figura 2 - Polarização de macrófagos em seus fenótipos, pró-inflamatório (M1) e anti-inflamatório (M2).



Polarização de macrófagos em M1 e M2. Onde a ativação clássica, ou o estado pró-inflamatório compreendem um estado inflamatório, culminando em citotoxicidade e dano tecidual, enquanto a ativação alternativa, ou seja, o fenótipo anti-inflamatório compreende um estado de supressão do sistema imune e reparo tecidual. FONTE: Elaborada e traduzida pela autora, adaptada de MURRAY E WYNN (2011).

Macrófagos pró-inflamatórios, ou do fenótipo M1, tem capacidade reparatória, defendendo o organismo contra diversos patógenos como bactérias, protozoários e vírus. Sendo assim, macrófagos M1 ativados via TLRs passam a expressar altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, além de iniciar a síntese de grandes quantidades de óxido nítrico (GUO et al., 2016). Esses macrófagos polarizados são tipicamente induzidos por citocinas Th1, como IFN-

γ e TNF- α , ou por reconhecimento de lipopolissacarídeo bacteriano (LPS). Esses macrófagos produzem e secretam níveis mais elevados de citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23 e ciclooxigenase-2 (COX-2) e níveis baixos de IL-10 (BROWN et al., 2012). Essas atividades promovem o recrutamento adicional de células imunes para o local da lesão, fornecem resistência inicial contra patógenos e provocam uma resposta pró-inflamatória dependente do tecido onde residem (NATOLI, 2011). Funcionalmente, os macrófagos M1 participam na remoção de patógenos durante a infecção por meio da ativação do sistema de fosfato de dinucleotídeo nicotinamida adenina (NADPH) oxidase, e geração subsequente de espécies reativas de oxigênio (ROS). Portanto, o macrófago M1 tem atividade antimicrobiana e antitumoral robusta e medeia o dano ao tecido induzido, prejudicando a regeneração do tecido e a cicatrização de feridas. Para se proteger contra esse dano tecidual, a resposta inflamatória crônica é inibida por mecanismos reguladores impulsionados pela função anti-inflamatória dos macrófagos M2 (BASHIR et al., 2016; MURRAY, 2016; WANG, LIANG, ZEN, 2014; SICA et al., 2015).

Alternativamente, macrófagos M2 possuem função anti-inflamatória, polarizam por Th2 e citocinas IL-4 e IL-13. Possuem papel regulador no processo de reparação e cicatrização tecidual (MURRAY, WYNN, 2011). Este fenótipo é gerado principalmente durante a fase de resolução da inflamação ou em resposta a IL-4 e IL-13 devido ao seu papel na imunossupressão da resposta imune inflamatória (WRIGHT et al., 2010). Os macrófagos M2 têm um perfil de citocinas anti-inflamatórias, que se caracteriza pela baixa produção de IL-12 e alta produção de IL-10 e TGF- β (KUROWSKA-STOLARSKA et al., 2009; JETTEN et al., 2014). Funcionalmente, os macrófagos M2 têm a capacidade de potencializar a fagocitose, limpar detritos e células apoptóticas, promover o reparo de tecido e a cicatrização de feridas e possuem propriedades pró-angiogênicas e pró-fibróticas (SICA, MANTOVANI, 2012; WANG et al., 2014).

Neste sentido, a linhagem celular de macrófagos murinos RAW 264.7 possui destaque importante na ciência. A linhagem de macrófagos RAW 264.7 foi isolada em 1978, sendo estabelecida a partir de um tumor induzido pelo vírus da leucemia murina de Abelson em camundongos da espécie BAB/14 (RASCHKE et al., 1978). São aderentes e apresentam fácil propagação e multiplicação, além de forte adsorção e fagocitose de antígenos *in vitro* e podem responder à estimulação de antígenos e liberação de mediadores imunomoduladores e anti-

inflamatórios relacionados, como óxido nítrico, citocinas pró e anti-inflamatórias (LEE, LIM, 2008). São utilizadas em diversos modelos pró e anti-inflamatórios, ajudando na predição do potencial efeito de novas substâncias em modelos *in vitro* de culturas de células primárias. A resposta e desempenho destes novos compostos a partir de modelos experimentais com células RAW 264.7 reflete seu potencial para o desenvolvimento de novos medicamentos (MERLY, SMITH, 2017).

1.3.1 TLRs e Inflamação

Os receptores do tipo Toll (TLRs) são expressos por quase todos os tipos de células imunes inatas, incluindo células epiteliais, células endoteliais, células imunes mieloides e linfóides (SCHLEIMER et al., 2007). Os TLRs formam uma família separada de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) compreendendo dois domínios principais caracterizados por repetições ricas em leucina (LRRs) e pelo domínio do receptor *Toll* (TIR) (KAWAI E AKIRA, 2010).

Um total de 10 TLRs funcionais (TLR1-TLR10) (KUMAR, 2018), expressos na superfície celular das células imunes e nas organelas citosólicas, incluindo lisossomas, endossomos, endolisossomos e fagossomos (SCHLEIMER et al., 2007; KUMAR, 2018). TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 e TLR10 são expressos na superfície celular de células imunes inatas normalmente, porém, TLR4 e TLR2 também se expressam intracelularmente em células endoteliais, células epiteliais e DCs (KUMAR, 2018).

A ativação da sinalização dos receptores do tipo TLR se dá na presença de patógenos, sendo eles bactérias, vírus, fungos e parasitas. Onde padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) são reconhecidos pelos receptores, como por exemplo, o lipopolissacarídeo (LPS), ligante do receptor TLR4, que ativa o fator nuclear kappa B (NF- κ B) para iniciar o evento pró-inflamatório induzindo a liberação de várias citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6, TNF- α , dentre outras, e interferons tipo 1 (IFNs) juntamente com a geração de radicais livres, incluindo espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ROS e RNS) (KAWAI E AKIRA, 2010; KUMAR, 2018).

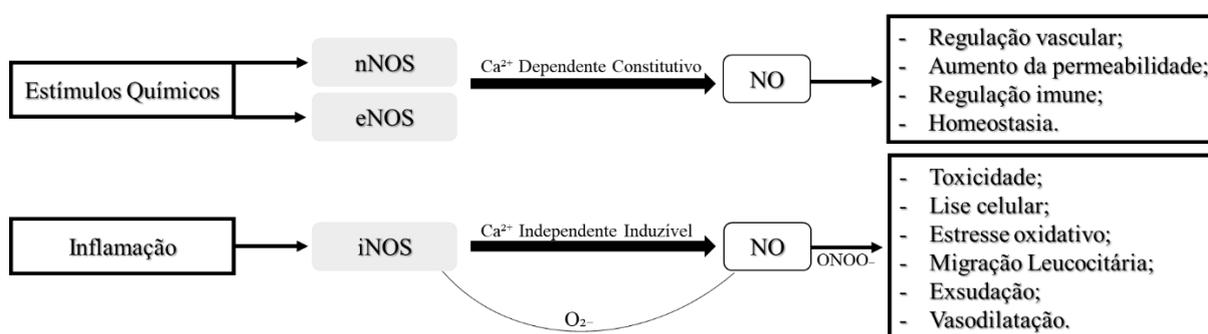
1.3.2 Receptor de Manose (CD206)

O receptor de manose (CD206) é um membro da família de receptores de reconhecimento de padrão inato e um receptor de lectina tipo C (CLR), expresso principalmente na superfície de células de macrófagos polarizados M2, células dendríticas (DCs) e endotélio não vascular (MARTINEZ-POMARES, 2012; DESCH et al., 2016). Os papéis atribuídos a esse receptor são importantes e numerosos, tanto na reconhecimento imune, quanto na resposta imune adaptativa (NIELSEN et al., 2019). Logo, estes receptores são estimulados durante a inflamação e participam da eliminação de moléculas endógenas (fagocitose de bactérias, fungos, parasitas, vírus e alérgenos), promoção da apresentação de antígenos, a modulação da ativação e do tráfego celular (RODGAARD-HANSEN et al., 2014; WEAVER et al., 2006).

1.4 ÓXIDO NÍTRICO

O óxido nítrico (NO) foi inicialmente descrito como um mediador fisiológico do relaxamento das células endoteliais, com papel importante na hipotensão. Se trata de um mensageiro intercelular reconhecido como um dos mais versáteis do sistema imunológico. As células do sistema imunológico inato tais como, macrófagos, neutrófilos e *natural killers* (NK), utilizam de receptores para reconhecer os padrões moleculares associados aos patógenos. Os macrófagos ativados, então, inibem a replicação do patógeno ao liberar uma variedade de moléculas efetoras, incluindo o NO, de extrema importância na defesa do sistema imune (TRIPATHI et al., 2007).

Figura 3 - Os principais efeitos do NO produzidos durante a liberação das isoformas da NOS no organismo humano.



FONTE: Elaborado e traduzido pela autora, adaptado de GUZIK, et al. (2003).

O óxido nítrico é um radical gasoso altamente reativo ao oxigênio, tendo papel fundamental na regulação do tônus muscular, agregação plaquetária, neurotransmissão e vasodilatação (GARCIA-ORTIZ E SERRADOR, 2017). O NO é sintetizado a partir do aminoácido L-arginina por uma família de enzimas durante o processo inflamatório, a óxido nítrico sintase induzida (iNOS), por meio de uma rota metabólica conhecida como via L-arginina-NO (MONCADA, HIGGS, 2012). Como visto na Figura 3, são conhecidas três isoformas de enzimas conversoras: NOS endotelial e neuronal (eNOS e nNOS), que são constitutivas e dependentes de cálcio (Ca^{2+}) e a óxido nítrico sintase induzível (iNOS/NOS2) que é considerada induzível e independente de Ca^{2+} . A enzima iNOS é expressa em grandes quantidades em resposta a estímulos pró-inflamatórios (PRADHAN, 2018). Ainda, a expressão de óxido nítrico induzível (iNOS) ocorre também em condições patológicas, sendo produzida de maneira rápida e contínua. Durante a inflamação por exemplo, a iNOS é considerada como uma enzima prejudicial, responsável por causar danos teciduais, formação de edemas e infiltrado celular (LIND et al., 2017).

1.5 CITOCINAS

O processo inflamatório é controlado por reguladores extracelulares que incluem citocinas e quemocinas, fatores de crescimento, eicosanóides (como as prostaglandinas), complemento e peptídeos, que medeiam tanto o recrutamento de células para o tecido lesionado quanto os mecanismos complexos que controlam a sinalização intracelular que caracterizam respostas inflamatórias (TURNER et al., 2014). Esses eventos extracelulares são combinados por mecanismos de controle de sinalização intracelular igualmente complexos, governados pela capacidade das células de se reunir e desmontar uma matriz complexa de vias de sinalização à medida que passam de funções inativas para funções dedicadas no local da resposta inflamatória (SUGIMOTO et al., 2016). As citocinas possuem a capacidade de se ligar a receptores de células, ocasionando desta forma, uma cascata de sinalizações que modificam e alteram diretamente a função celular, dentre elas, a regulação de genes e seus fatores de transcrição. Dentre as citocinas envolvidas na deflagração e manutenção, bem como resolução do processo inflamatório, destacam-se as interleucinas (IL): IL-1 β , IL-12p70, IL-4, IL-6, IL-10, IL-13; o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), o interferon gama (IFN- γ) e a proteína quimioatraente para monócitos 1 (MCP-1) (TURNER et al., 2014).

1.5.1 Interleucinas

As interleucinas do tipo 1 (IL-1) são expressas por vários tipos celulares, como macrófagos e monócitos (BORASCHI et al., 2011). Dentre as interleucinas do tipo 1, a IL-1 β é uma potente citocina pró-inflamatória com efeito estimulador nas células T CD4+, promovendo a diferenciação em linhagens de células T auxiliares (Th17 e Th1) (SANTARLASCI et al., 2013). A estimulação de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), incluindo receptores TLRs, pode ser induzida por moléculas virais e microbianas, que por sua vez, pode levar à indução da expressão de IL-1 β (BRENNAN, BOWIE, 2010; KAWAI E AKIRA, 2011).

A interleucinas 4 e 13 (IL-4 e a IL-13) são citocinas relacionadas a regulação de muitos aspectos da inflamação alérgica e resposta inflamatória do tipo Th2. Elas desempenham papéis importantes na regulação das respostas de linfócitos, células mieloides e células não hematopoiéticas. Em células T, IL-4 induz a diferenciação de células T CD4+ virgens em células Th2, e em células B, a IL-4 conduz a mudança de classe de imunoglobulina (Ig) para IgG1 e IgE, e em macrófagos, IL-4 e IL-13 induzem ativação alternativa de macrófagos do tipo M2 (JUNTTILA, 2018).

A interleucina 6 (IL-6) é altamente produzida por células do sistema imune e encontrada em altos níveis em tecidos inflamatórios, secretada por células tumorais, células imunológicas e fibroblastos. Produzida em condições normais também auxilia na resposta a infecções e lesões teciduais, contribuindo para a defesa do hospedeiro durante a resposta inflamatória aguda. (SUGIMOTO, 2016). Embora sua produção seja estritamente controlada por mecanismos transcricionais e pós-transcricionais, a síntese contínua e desregulada de IL-6 exerce um efeito patológico durante processos de inflamações crônicas e autoimunes. Desta maneira, concentrações elevadas de IL-6 pode estar associada a uma grande gama de doenças inflamatórias (TANAKA, NARAZANI, KISHIMOTO, 2014).

Já a interleucina 10 (IL-10), possui papel anti-inflamatório e imunossupressor, sendo produzida principalmente por células T reguladoras, células B, macrófagos e células dendríticas (SZIKSZ et al., 2015). A interleucina 12 (IL-12p70), se trata de uma proteína crítica para o início e progressão das respostas do tipo Th1, e tem como alvo antígenos intracelulares, participando da resposta imune a tumores (LI, et al. 2005), parasitas intracelulares, fungos,

bactérias e vírus (POLLARA et al., 2005). A IL-12 é frequentemente a primeira citocina liberada pelas células imunes após a exposição do antígeno no microambiente e é fundamental para o início e polarização da resposta imune (TRINCHIERI, 2003).

1.5.2 Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α)

O fator de necrose tumoral (TNF- α) promove a inflamação via transcrição do fator nuclear κ B (NF- κ B), regulando sua migração para o núcleo intracelular (ZHU et al., 2018). Sua participação no desenvolvimento de diversas patologias é bem conhecida, estando diretamente relacionadas com quadros de sepse, diabetes, câncer, artrite reumatóide e inflamações intestinais. O TNF- α é produzido durante a inflamação por células do sistema imunológico, como macrófagos e monócitos. Está presente na resistência a patógenos, desencadeamento da imunidade antitumoral, até a regulação do sono, afetando esses processos ativando uma variedade de vias, incluindo NF- κ B, Erk, MAPK e PLA2 (IDRISS, NAISMITH, 2000).

É um mediador inflamatório potente na ação inflamatória do sistema imunológico inato, incluindo a indução da produção de citocinas, ativação ou expressão de moléculas de adesão e estimulação do crescimento (LOCKSLEY, 2001). Estimula a proliferação de células normais, exerce atividade citolítica ou citostática contra células tumorais e causa efeitos inflamatórios, antivirais e imunorreguladores (GUPTA, 2002). O TNF α também demonstrou realizar uma série de funções adicionais ligadas ao metabolismo lipídico, coagulação, resistência à insulina e função endotelial. De fato, tem se mostrado uma das citocinas mais importantes que medeiam as respostas inflamatórias e imunes (LOBITO et al., 2011).

1.5.3 Interferon γ (IFN- γ)

O interferon γ (IFN- γ) é uma das citocinas derivadas do sistema imunológico nas respostas imunes inatas e adaptativas. Aumentando a ativação inflamatória de macrófagos e a apresentação de antígenos. Ela regula a imunidade contra patógenos intracelulares (antiviral, antiprotozoário e antibacteriana), bem como a transdução de sinal (TANG et al., 2018). Além disso, o IFN- γ é um fator patogênico importante em algumas doenças ósseas imunomediadas, incluindo artrite reumatóide, osteoporose pós-menopausa e síndrome da imunodeficiência adquirida. O IFN- γ participa de muitas funções imunológicas e inflamação (LEES, 2015).

1.5.4 Proteína de Quimioatração de Monócitos (MCP-1)

Monócitos são células versáteis que expressam múltiplos receptores, podendo alterar seu fenótipo funcional em resposta a estimulação ambiental. Após dano ou infecção tecidual são rapidamente recrutados para o tecido, onde podem se diferenciar em macrófagos ou células dendríticas (SUGIMOTO, 2016). Quando ativados trafegam seletivamente para os locais lesionados, produzindo citocinas pró-inflamatórias e contribuindo para a inflamação local e sistêmica. Possuem alta capacidade de infiltração e, quando diferenciados, removem PAMPs e restos celulares (YANG et al., 2014). São classificadas como uma classe de citocinas de baixo peso molecular que controlam a migração de neutrófilos, monócitos e macrófagos para o local da infecção, coordenando seu recrutamento durante a resposta imune. Desta forma, as proteínas de quimioatração de monócitos (MCP-1) são membros da subfamília CC e apresentam potente ação quimiotática para monócitos. Seu principal receptor denomina-se CCL2 e está presente em várias células, constitutivamente ou após indução por estresse oxidativo, citocinas ou fatores de crescimento. A principal fonte de MCP-1 são monócitos e macrófagos e sua atividade é controlada principalmente pela expressão das citocinas IFN- γ , IL-4, IL-10 e IL-13 (YADAV, SAINI, ARORA, 2010).

1.6 VIA NF- κ B (p65)

O fator nuclear kappa B (NF- κ B) é uma família de fatores de transcrição diméricos centrais para a coordenação das respostas inflamatórias, imunidade inata e adaptativa, além da diferenciação, proliferação e sobrevivência celular em quase todos os organismos multicelulares (VALLABHAPURAPU, KARIN, 2009; HAYDEN, GHOSH, 2012; HOFFMANN, BALTIMORE, 2006). O sistema NF- κ B é rigidamente regulado, e sua regulação incorreta pode implicar em uma ampla gama de doenças que vão desde cânceres a distúrbios inflamatórios e imunes. Como resultado, a rede regulatória da via NF- κ B e sua dinâmica oferecem uma infinidade de alvos terapêuticos (BAUD, KARIN, 2009; CHEONG, HOFFMANN, 2008; KEARNS, HOFFMANN, 2009).

A via NF κ B consiste em monômeros de proteínas de membros da família (p65/RelA, RelB, cRel, p50 e p52) que formam homodímeros ou heterodímeros que se ligam ao DNA diferencialmente (HOFFMANN, LEUNG, BALTIMORE, 2003; LEUNG, HOFFMANN,

BALTIMORE, 2004; SANJABI et al., 2005) e são regulados por duas vias: Canônica (NEMO) dependente via e a via não canônica, independente de NEMO. Essas vias controlam rigidamente os níveis e a dinâmica do repertório de dímero NFκB transcricionalmente ativo, constitutivamente e em resposta a estímulos por meio do recrutamento de coativadores ou interação com outros fatores de transcrição (HOFFMANN, NATOLI, GHOSH, 2006; SHIH et al., 2011).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos de dezenove compostos sintéticos com estrutura molecular similar a canabinóides, denominados diésteres de aril-ciclohexanonas monocarboxiladas, quanto sua ação na resposta imune inata *in vitro*, investigando o potencial efeito anti-inflamatório e seus mecanismos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

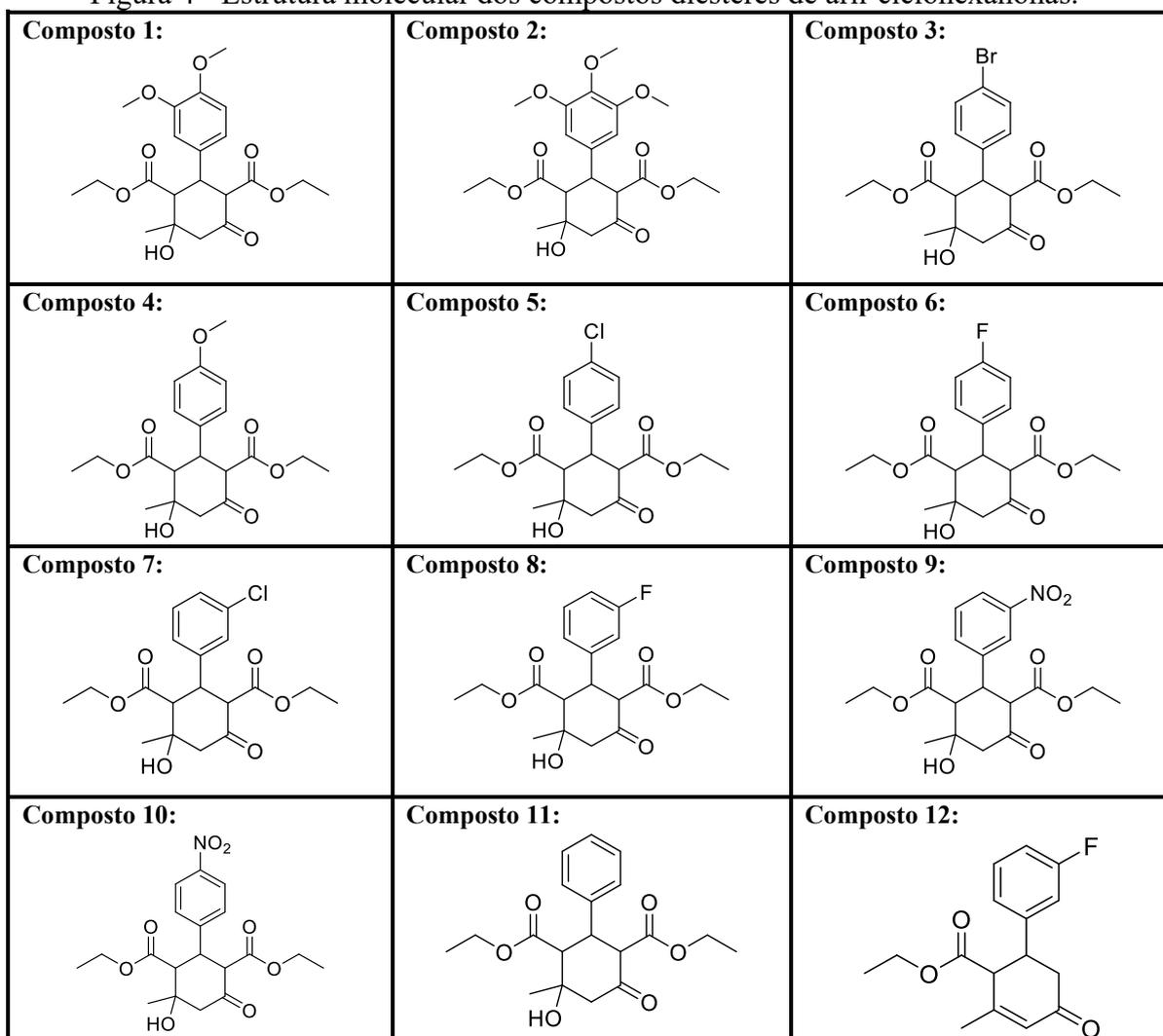
- I. Avaliar a ação dos diésteres de aril-ciclohexanonas monocarboxiladas sintéticas em macrófagos RAW 264.7, quanto a viabilidade celular e citotoxicidade;
- II. Avaliar o efeito dos compostos sobre a produção dos metabólitos do óxido nítrico (NOx) em macrófagos RAW 264.7, estimulados com LPS;
- III. Avaliar o efeito dos compostos sobre a produção das citocinas IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-13, TNF α , IFN- γ , MCP-1 em macrófagos RAW 264.7, estimulados com LPS;
- IV. Investigar o efeito do composto sintético 4 sobre a apoptose/necrose em macrófagos RAW 264.7, estimulados com LPS;
- V. Avaliar o efeito do composto sintético 4 sobre a atividade fagocítica em macrófagos RAW 264.7, estimulados com LPS;
- VI. Investigar a interferência do composto sintético 4 na expressão do receptor de manose CD206 na superfície de macrófagos RAW 264.7, estimulados com LPS;
- VII. Investigar a interferência do composto sintético 4 sobre a expressão do receptor de TLR4 (CD284/MD2) na superfície de macrófagos RAW 264.7, estimulados com LPS;
- VIII. Avaliar o efeito do composto sintético 4 sobre a fosforilação da subunidade p65 da via do NF- κ B em macrófagos RAW 264.7, estimulados com LPS.

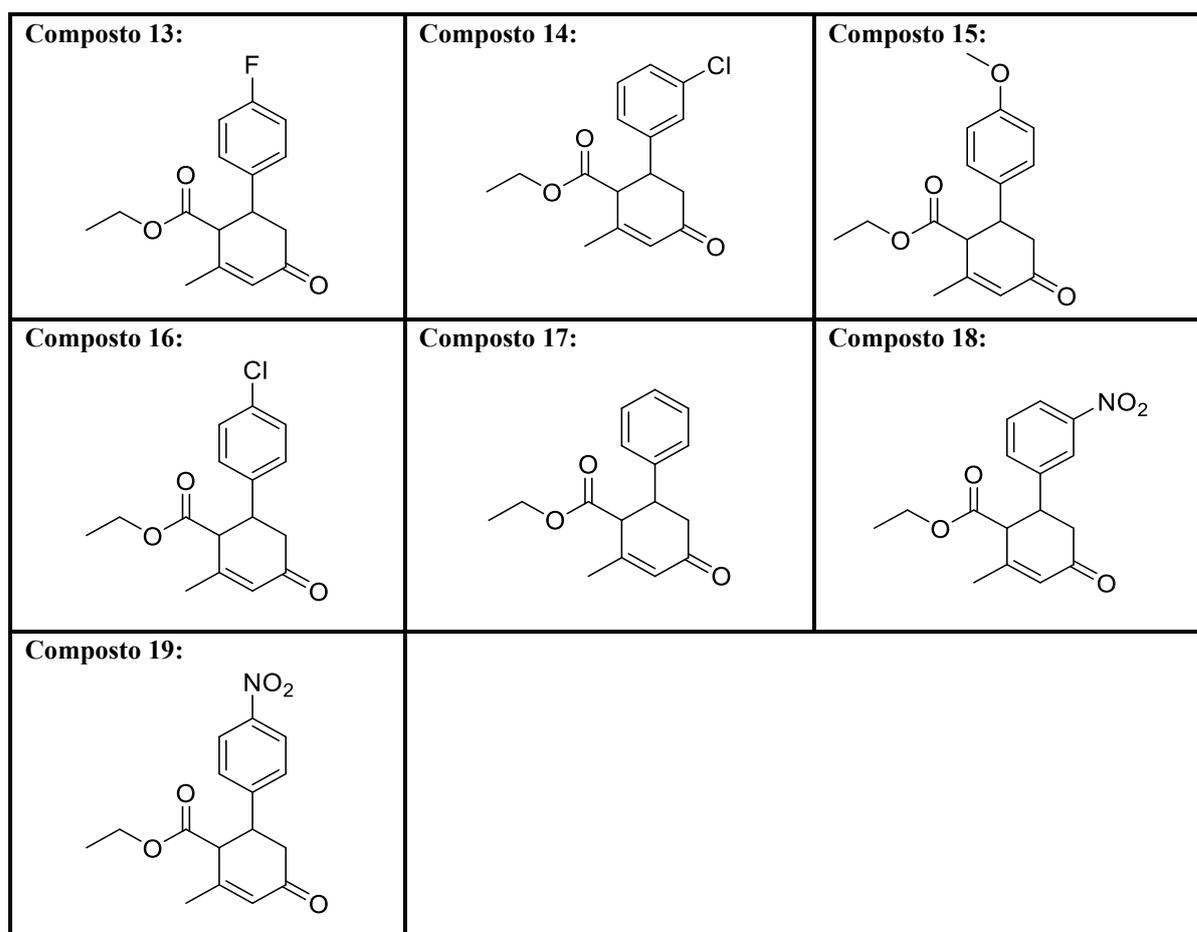
3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 COMPOSTOS SINTÉTICOS

Os compostos sintéticos denominados diésteres de aril-ciclohexanonas utilizados neste estudo foram sintetizados e fornecidos pelo aluno de doutorado do curso de graduação em Farmácia, Luiz Antonio Escorteganha Pollo, e pelo professor do Departamento de Química, Dr. Louis Pergaud Sandjo, da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os dezenove compostos utilizados (Figura 4) neste estudo foram sintetizados com base no esqueleto aril-ciclohexano de fitocanabinóides, como o canabidiol (CBD), sua síntese pode ser observada no Anexo 1.

Figura 4 - Estrutura molecular dos compostos diésteres de aril-ciclohexanonas.





Estrutura molecular dos compostos diésteres de aril-ciclohexanonas sintetizados com base no esqueleto aril-ciclohexano de fitocanabinóides, como o canabidiol (CBD). Os compostos possuem as seguintes nomenclaturas:

1: Dietil 4-hidroxi-2-(3,4-dimetoxifenil)-4-metil-6-oxociclohexano-1,3-dicarboxilato; **2:** Dietil 4-hidroxi-2-(3,4,5-trimetoxifenil)-4-metil-6-oxociclohexano-1,3-dicarboxilato; **3:** Dietil 4-hidroxi-2-(4-bromofenil)-4-metil-6-oxociclohexano-1,3-dicarboxilato; **4:** Dietil 4-hidroxi-2-(4-metoxifenil)-4-metil-6-oxociclohexano-1,3-dicarboxilato; **5:** Dietil 4-hidroxi-2-(4-clorofenil)-4-metil-6-oxociclohexano-1,3-dicarboxilato; **6:** Dietil 4-hidroxi-2-(4-fluorofenil)-4-metil-6-oxociclohexano-1,3-dicarboxilato; **7:** Dietil 4-hidroxi-2-(3-clorofenil)-4-metil-6-oxociclohexano-1,3-dicarboxilato; **8:** Dietil 4-hidroxi-2-(3-fluorofenil)-4-metil-6-oxociclohexano-1,3-dicarboxilato; **9:** Dietil 4-hidroxi-2-(3-nitrofenil)-4-metil-6-oxociclohexano-1,3-dicarboxilato; **10:** Dietil 4-hidroxi-2-(4-nitrofenil)-4-metil-6-oxociclohexano-1,3-dicarboxilato; **11:** Dietil 4-hidroxi-2-fenil-4-metil-6-oxociclohexano-1,3-dicarboxilato; **12:** Etil 2-(3-fluorofenil)-4-metil-6-oxo-4-ciclohexeno-3-carboxilato; **13:** Etil 2-(4-fluorofenil)-4-metil-6-oxo-4-ciclohexeno-3-carboxilato; **14:** Etil 2-(3-clorofenil)-4-metil-6-oxo-4-ciclohexeno-3-carboxilato; **15:** Etil 2-(4-metoxifenil)-4-metil-6-oxo-4-ciclohexeno-3-carboxilato; **16:** Etil 2-(4-clorofenil)-4-metil-6-oxo-4-ciclohexeno-3-carboxilato; **17:** Etil 2-fenil-4-metil-6-oxo-4-ciclohexeno-3-carboxilato; **18:** Etil 2-(3-nitrofenil)-4-metil-6-oxo-4-ciclohexeno-3-carboxilato; **19:** Etil 2-(4-nitrofenil)-4-metil-6-oxo-4-ciclohexeno-3-carboxilato.

3.2 REAGENTES

Os seguintes fármacos e reagentes utilizados foram obtidos em: *BD Biosciences* (San Diego, Califórnia, EUA): Kits IL-1 β , IL-4 e IL-13 ELISA; Marcador Celular Anexina V-FITC; PE Rat/IgC_{2a}; K Isotipo Control; PE Rat/Anti-Mouse; CD284/MD-2 (Marcador Celular de

TLR-4); 7-AAD (Iodeto de Propídeo); Cytometric Bead Array - CBA Mouse Inflammation Kit; Anti-CD206 (Marcador Celular de Manose); Reagente Folin; Reagente Fenol de Ciocalteu. *Gibco* (Grand Island., New York, EUA): Meio de Cultura Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM); DMEM (Sem fenol); Soro Fetal Bovino (FBS); Penicilina-estreptomicina (10.000 U/ml); Versene® (2g EDTA/Na₄); Corante Azul Tripán. *LaborClin* (Pinhais, Paraná, Brasil): Solução Salina Tamponada com Fosfato. *Invitrogen* (Bedford, Massachusetts, EUA): Vermelho Neutro; MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólico]). *Cell Signaling Technology* (Bedford, Massachusetts, EUA): Kit de ELISA NF-κB p65. *LabSynth* (Diadema, São Paulo, Brasil): Etanol. *Sigma-Aldrich Co.* (St. Louis, Missouri, EUA): Lipopolissacarídeo 0111: B4 (*E. coli*); Dexametasona (98% HPLC); α-naftiletilenodiamida (2% HCl); Fenol; Sulfanilamida; Nitrito; Paclitaxel. *Vetec* (Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil): Dimetil Sulfoxido; Polissorbato-20 (5%); Tween (20%). *Alphatec* (São José dos Pinhais, Paraná, Brasil): Ácido Clorídrico (37%). *Dinâmica Química Corporadora Ltda.* (Indaiatuba, São Paulo, Brasil): Ácido Acético. Os demais reagentes usados e não listados foram obtidos de fontes comerciais alternativas.

O LPS utilizado como indutor inflamatório e controle negativo nos experimentos foi diluído em uma concentração de 1 µg/mL e 5 µg/mL, diluído em PBS estéril. Da mesma forma, o controle positivo utilizado, dexametasona (DEXA), foi utilizada em uma concentração de 7 µM, diluída em PBS estéril.

3.3 CULTURA CELULAR DE MACRÓFAGOS (RAW 264.7)

A linhagem celular de macrófagos murinos RAW 264.7 (ATCC TIB-71) foi utilizada nos experimentos. As células foram fornecidas pela Professora Dr^a. Cláudia Maria Oliveira Simões do Laboratório de Virologia Aplicada (LVA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), originárias do Banco de Células do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil). As células utilizadas foram mantidas em estufa com ambiente controlado a 5% CO₂ e temperatura de 37°C. O meio de cultura utilizado para manutenção, descongelamento e passagens celulares foi composto por DMEM, suplementado com 10% de SBF e 1% de antibiótico penicilina-estreptomicina (10.000 U/ml). Todo o material utilizado foi devidamente esterilizado e armazenado em local apropriado, livre de microrganismos contaminantes.

3.3.1 Viabilidade Celular pela Técnica de Azul de Tripán

Para a condução dos experimentos de imunomodulação e atividade anti-inflamatória, previamente, foi verificada a viabilidade celular da linhagem de macrófagos RAW 264.7. A quantificação das células viáveis se deu através da técnica utilizando o corante azul de Tripán, que se baseia na capacidade que o corante apresenta em atravessar o citoplasma de células mortas, corando-as de azul. Antes de cada plaqueamento, as células foram descoladas das garrafas com ajuda de rodo próprio e Versene, centrifugadas e ressuspendidas em 5 mL de meio de cultura. Uma alíquota desta suspensão foi separada em um microtubo acrescido do corante azul de Tripán, em uma diluição 1:2. Após homogeneização, 10 μ L foram transferidos para uma câmara de Neubauer. Todas as células não coradas (viáveis) foram contadas nos 4 quadrantes com o auxílio de um microscópio óptico comum (aumento de 400 vezes). A densidade celular foi calculada a partir do número de células por mL de suspensão.

3.3.2 Plaqueamento Celular (RAW 264.7)

Após a determinação prévia da viabilidade celular dos macrófagos RAW 264.7, entre a 3^a e a 7^a passagem com confluência celular de aproximadamente 80%. O plaqueamento foi realizado de acordo com o número de poços de cada placa necessárias por experimento, sendo que a concentração celular é proporcional a área de cada poço. Sendo assim os plaqueamentos se seguiram de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1 - Concentrações celulares e volumes utilizados no plaqueamento da linhagem celular de macrófagos RAW 264.7.

Número de Poços	Concentração de Células por Poço	Densidade Celular (células/mL)	Volume Utilizado
6	5×10^5	100 000 células/mL	5 mL
24	1×10^5	100 000 células/mL	1 mL
96	5×10^4	500 000 células/mL	100 μ L

Valores utilizados no plaqueamento celular, de acordo com o número de poços (6, 24 e 96) e suas respectivas concentrações celulares e volume de suspensão celular.

Após o plaqueamento, as placas foram mantidas por 24 horas em estufa com ambiente controlado com temperatura a 37°C e CO₂ à 5%.

3.4 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE PELA TÉCNICA COLORIMÉTRICA DE MTT

A viabilidade celular, bem como a citotoxicidade em macrófagos RAW 264.7 foi mensurada após o tratamento dos mesmos com as dezenove formulações de diésteres de aril-ciclohexanonas. Para isto, utilizou-se do teste colorimétrico de MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium]). O ensaio baseia-se em um composto amarelo que, ao entrar em contato com mitocôndrias ativas tem seu anel tetrazólico clivado pelas desidrogenases mitocondriais, transformando-se em um composto de coloração azul escuro, denominado formazan {E,Z-1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-1,3-diphenylformazan} (MOSMANN, 1983).

Neste experimento, utilizou-se uma densidade celular de 500 000 células/mL em uma placa de 96 poços, onde, as células foram tratadas com as concentrações estipuladas para cada um dos dezenove compostos, sendo elas: 1000, 300, 100, 30, 10, 3 e 1 μ M. Uma nova incubação de 24 horas foi realizada em estufa a temperatura de 37°C e CO₂ à 5%. Em sequência, o sobrenadante foi descartado e os poços foram lavados duas vezes com 200 μ L de PBS estéril a temperatura de 37°C, e 100 μ L da solução de MTT (0,5 mg/mL, ou seja, 5 mg de MTT em 1 mL de PBS estéril) foi adicionada aos poços. Decorridas duas horas de incubação em estufa (37°C, 5% de CO₂ e ausência de luz), o MTT foi retirado e os cristais formados foram ressuspensos com 100 μ l de DMSO. As placas foram agitadas por aproximadamente 5 minutos, para a leitura da densidade óptica em 540 nm em leitor de microplacas, modelo ELISA MB-580 (HEALES, Gouwei Road, SZN, CN).

Concentrações de CC10 de cada composto, ou seja, a concentração do composto que mata 10% das células, e conseqüentemente mantém uma viabilidade de 90%, foi calculada a partir do teste de viabilidade celular. Estas concentrações foram calculadas por regressão não linear utilizando o logaritmo da concentração em função da resposta normalizada (porcentagem da viabilidade celular), com auxílio do programa GraphPad Prism® versão 6.0 (San Diego, CA, EUA).

3.5 DETERMINAÇÃO DE METABÓLITOS DO ÓXIDO NÍTRICO (NO)

A produção de NO foi mensurada indiretamente, utilizando a formação de seu metabólito nitrito (NO_2^-), a partir reação de Griess (GREEN et al., 1982). Os reagentes empregados na reação apresentam a capacidade de reagir com o nitrito, e então produzir um composto de tonalidade rósea que representa a quantidade de metabólitos presentes na amostra (DIRSCH et al., 1998).

Para este experimento foi utilizada uma densidade celular de 500 000 células/mL em placas de 96 poços, onde os macrófagos foram pré-tratados com as concentrações definidas abaixo da CC_{10} de cada composto, sendo elas: 1, 3, 10, 30 e 100 μM ; além disso, branco (veículo, tratado com DMSO), controle negativo (tratado com DMSO) e controle positivo (tratado com dexametasona 7 μM), foram utilizados. Após 30 minutos dos tratamentos, todas as células (exceto o grupo celular denominado branco) foram estimulados com LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), e incubados em estufa (5% de CO_2 e temperatura de 37°C) pelo período de 24 horas. Em sequência, 50 μl de sobrenadante foram coletados para a realização da dosagem dos metabólitos do óxido nítrico.

O reagente de Griess utilizado neste experimento consistiu em uma concentração de 1:2 (Griess 1 + Griess 2), sendo que o Griess 1 é composto por sulfanilamida 1% (0,1 g em 10 mL de HCL 5%), e o reagente Griess 2 é composto por Alfa-Naftil-Etilenodiamina 0,1% (0,003 g em 30 mL de água deionizada). Logo, em uma placa de ELISA, foram adicionados 50 μl do sobrenadante de células coletado e 50 μl do reagente de Griess, seguidos de 40 minutos de incubação ao abrigo de luz, para a leitura da densidade óptica em 540 nm em leitor de ELISA MB-580 (HEALES, Gouwei Road, SZN, CN).

Além da mensuração da quantidade de óxido nítrico, neste teste foi possível determinar a IC_{50} de cada composto testado, ou seja, a concentração do produto capaz de inibir em 50% os níveis de NO_x comparados ao controle inflamado, tratado com LPS. Este valor foi obtido através de uma análise de regressão não linear utilizando o logaritmo da concentração em função da resposta normalizada (porcentagem da inibição de NO_x), calculados com auxílio do programa GraphPad Prism® versão 6.0 (San Diego, CA, EUA).

3.6 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS (IL-12p70, TNF- α , IFN- γ , MPC-1, IL-6 E IL-10) POR CITOMETRIA DE FLUXO

Para a quantificação de citocinas por citometria de fluxo, foi utilizada uma densidade celular de 500 000 células/mL em placas de 96 poços, onde os macrófagos foram pré-tratados com o valor estipulado de IC₅₀, ou seja, 1 µM. Para este experimento, foram utilizados além dos compostos, os grupos: branco (veículo), controle negativo (LPS), controle positivo (Dexametasona 7 µM). Após 30 minutos dos tratamentos, todos os grupos (exceto o branco) foram estimulados com LPS (1 µg/mL), pelo período de 24 horas. Após o período de incubação em estufa (5% de CO₂ e temperatura de 37°C), todo o sobrenadante foi coletado para a determinação das concentrações das citocinas pesquisadas (IL-12p70, TNF-α, IFN-γ, MCP-1, IL-6 e IL-10).

A quantificação das citocinas foi mensurada por citometria de fluxo utilizando o kit *Cytometric Bead Array* (CBA) - Cell Inflammation kit (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA). O kit utilizado apresenta seis beads (esferas marcadas) de populações e intensidade de fluorescência diferentes, marcadas com anticorpos de captura específicos para cada citocina a ser pesquisada. Desta forma, uma alíquota de 25 µL do sobrenadante celular coletado foi utilizada para mensurar todas as citocinas desejadas, sendo elas: IL-12p70, TNF-α, INF-γ, MCP-1, IL-6 e IL-10. O sobrenadante foi adicionado as beads e aos anticorpos de detecção, seguido de incubação ao abrigo da luz e temperatura ambiente durante 3 horas. Decorrido o tempo de incubação, as amostras foram lavadas com solução de “Wash Buffer” e lidas em Citometro de Fluxo FACSVerse (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA). A intensidade da fluorescência formada ao longo do processo de conjugação da amostra com o anticorpo, revela a concentração final de cada citocina pesquisada. Para a quantificação de cada uma das citocinas foi utilizado o software FCAP Array® (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA) e, os valores foram expressos em pg/mL.

3.7 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS (IL-1B, IL-4 E IL-13) POR MÉTODO IMUNOENZIMÁTICO

As citocinas IL-1β, IL-4 e IL-10 quantificadas pelo método imunoenzimático foram mensuradas com o sobrenadante celular coletado após o tratamento e indução por LPS (1 µg/mL). Todas as citocinas foram mensuradas com kits comerciais ELISA, seguindo as instruções do fabricante. Nestes protocolos, foram utilizados anticorpos monoclonais específicos para cada citocina, sendo que suas concentrações foram estimadas através da

interpolação da curva padrão de cada kit. Para verificar os níveis de IL-1 β , IL-4 e IL-13, os kits de escolha foram Murine IL-1 β Standart ABTS ELISA Development Kit, Murine IL-4 Standart ABTS ELISA Development Kit e Murine IL-13 Standart ABTS ELISA Development Kit (Peprotech, Rocky Hill, NJ, EUA), respectivamente. As densidades óticas foram determinadas em comprimento de onda de 450 nm em leitor de microplaca MB-580 (HEALES, Gouwei Road, SZN, CN) e os resultados para cada citocina foram expressos em pg/mL.

3.8 NÍVEIS DE APOPTOSE/NECROSE CELULAR

Neste experimento, foi utilizada uma densidade celular de 100 000 células/mL em placas de 24 poços e os macrófagos foram tratados com a concentração de 1 μ M do composto escolhido. Além disso, para a mensuração dos níveis de apoptose celular, as seguintes condições foram testadas: Branco (veículo), Anexina positiva (Taxol e marcador Anexina V FITC), Anexina negativo (marcador Anexina V FITC), 7AAD positivo (células expostas a -180°C durante 30 minutos para indução de necrose, e marcadas com 7AAD), 7AAD negativo (células viáveis marcadas com 7AAD), controle negativo (LPS 1 μ g/mL), controle positivo (Dexametasona 7 μ M). Após 30 minutos do tratamento, todas as células (exceto as células denominadas de grupo branco) foram estimuladas com LPS (1 μ g/mL), durante 24 horas. Após a incubação em estufa (5% de CO₂ e temperatura de 37°C), as células foram descoladas com auxílio de Versene e coletadas para a determinação dos níveis de apoptose celular.

Para a determinação dos níveis de apoptose celular foi utilizado o Kit *FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit* (BD Biosciences, São José, CA, EUA). O experimento foi conduzido seguindo o protocolo e as instruções fornecidas pelo kit, as células coletadas foram centrifugadas para que o *pellet* formado com o concentrado celular fosse analisado. O mesmo foi ressuspendido com 300 μ L de PBS e centrifugado para lavagem. Após, foram adicionados 300 μ L de tampão de ligação e 2,5 μ L de Anexina V-FITC em cada amostra, seguido de uma incubação de 15 minutos a temperatura ambiente e abrigo da luz. Em seguida, foi adicionado 2,5 μ L do marcador 7AAD, seguido de 200 μ L de tampão de ligação. As amostras foram submetidas ao citometro de fluxo FACSVerse (BD Biosciences, São José, CA, EUA). Os quatro quadrantes foram avaliados para necrose celular, células basais/vivas, apoptose e apoptose tardia. Os resultados foram expressos em porcentagem de células marcadas pela sonda fluorescente.

3.9 ATIVIDADE FAGOCÍTICA DE MACRÓFAGOS RAW 264.7

A atividade fagocítica de macrófagos RAW 264.7 foi mensurada a partir da técnica de vermelho neutro. Se trata de um corante eurodina utilizado como constraste em combinação com outros corantes e para muitos métodos de coloração. Sua formulação é $C_{15}H_{17}ClN_4$, apresenta massa molecular de 288.8 g/mol e solubilidade em água e etanol. Pode ser utilizado como reagente para experimento de fagocitose em macrófagos. Trata-se de um teste colorimétrico, que se baseia na capacidade dos macrófagos fagocitarem o corante após tratamento com o controle positivo, dexametasona, e os compostos estudados. Macrófagos de fenótipo M2 apresentam maior capacidade de fagocitar o corante, apresentando maior coloração após a lise celular (XUEJING et al., 2020).

Para o teste de fagocitose por vermelho neutro, foi utilizada a densidade celular de 500 000 células/mL em placas de 96 poços, os macrófagos foram pré-tratados com a concentração de 1 μ M do composto escolhido. Além disso, os grupos analisados foram: branco (veículo), controle negativo (LPS 1 μ g/mL), controle positivo (dexametasona 7 μ M). Após 30 minutos do tratamento, todos os grupos (exceto o branco) foram estimulados com LPS (1 μ g/mL), durante 24 horas.

Após a incubação de 24 horas em estufa (5% de CO_2 e temperatura de 37°C), o meio de cultura foi descartado e adicionou-se 100 μ L/poço da solução corante de vermelho neutro (0,075%, solubilizado em meio de cultura DMEM). As placas foram incubadas durante 1 hora (37°C). Em seguida, a solução de vermelho neutro foi descartada e as células foram lavadas com 200 μ L da solução de PBS estéril. Adicionou-se 200 μ L/poço do tampão de lise celular (1% de ácido acético glacial, 50% etanol, 49% água deionizada) e incubou-se a placa por mais 1 hora (temperatura ambiente). A leitura da absorbância foi realizada em leitor de microplaca MB-580 (HEALES, Gouwei Road, SZN, CN) a 540 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem de aumento dos níveis de fagocitose celular dos macrófagos expostos aos compostos sintéticos comparados aos controles.

3. 10 EXPRESSÃO DO RECEPTOR DE MANOSE (CD206)

O receptor de manose CD206 é uma lectina tipo C presente principalmente na superfície de macrófagos e células dendríticas. Quando um macrófago sofre polarização para o

fenótipo M2, ocorre uma alta expressão deste marcador em sua superfície. As linhagens de macrófagos podem ser induzidas com IL-4 (fenótipo M2) ou com LPS (fenótipo M1) para observar a possível ação imunomodulatória dos compostos. Para avaliar a expressão do receptor de manose na superfície dos macrófagos, foi utilizada uma densidade celular de 100 000 células/mL em placas de 24 poços, os macrófagos foram pré-tratados com a concentração de 1 μ M do composto escolhido. Os grupos avaliados foram: branco (veículo), controle negativo (LPS 1 μ g/mL), controle positivo (dexametasona 7 μ M). Após decorrida 1 hora dos tratamentos, todos os grupos celulares (exceto o branco) foram estimulados com LPS (5 μ g/mL), durante 24 horas.

Após a incubação em estufa (5% de CO₂ e temperatura de 37°C), o meio de cultura foi descartado e as células foram descoladas com Versene® e coletadas ao final. Estas células foram lavadas com 300 μ L de PBS estéril e após o descarte do sobrenadante, adicionado 300 μ L albumina 1%, seguida de incubação durante aproximadamente 1 hora e 30 minutos. Em sequência a este procedimento, as células foram novamente lavadas com 300 μ L de PBS estéril e ressuspendidas com tampão de ligação. Foi adicionado a cada amostra 2,5 μ L do marcador CD206-FITC, seguido de uma incubação de 15 minutos ao abrigo da luz. As amostras foram lidas em citometro de fluxo FACSVerse (BD Biosciences, São José, CA, EUA), sendo observada na leitura o percentual de células positivas para o marcador CD206, visualizadas no histograma (FACSuite®, BD Biosciences, São José, CA, EUA).

3.11 EXPRESSÃO DO RECEPTOR TLR4 (CD284/MD2)

A ativação da sinalização dos receptores do tipo *Toll* se dá na presença de patógenos, onde padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) são reconhecidos pelos receptores, como o LPS ligante do receptor TLR4, que ativa o fator nuclear kappa B (NF- κ B) para iniciar o evento pró-inflamatório (KAWAI; AKIRA, 2010; KUMAR, 2018). Para avaliar a expressão do receptor de TLR4 (CD284-MD2) na superfície dos macrófagos, foi utilizada uma densidade celular de 100 000 células/mL em placas de 24 poços, os macrófagos foram pré-tratados com a concentração de 1 μ M do composto escolhido. Os grupos avaliados foram: branco (veículo), controle negativo (LPS 1 μ g/mL), controle positivo (Dexametasona 7 μ M). Após decorrida 1 hora dos tratamentos, todos os grupos (exceto o branco) foram estimulados com LPS (5 μ g/mL), durante 24 horas.

Após a incubação em estufa (5% de CO₂ e temperatura de 37°C), o meio de cultura foi descartado e as células foram descoladas com Versene e coletadas ao final. As células foram lavadas com 300 µL de PBS estéril e após o descarte do sobrenadante, adicionado 300 µL albumina 1% diluída em PBS estéril gelado, seguida de incubação durante aproximadamente 2 horas. Em seguida, as células foram novamente lavadas com 300 µL de PBS estéril e ressuspendidas com 300 µL de tampão de ligação. Foi adicionado a cada amostra 2,5 µL do marcador CD284/MD-2, seguido de uma incubação de 10 minutos ao abrigo da luz. As amostras foram lidas em citometro de fluxo FACSVerse (BD Biosciences, São José, CA, EUA), sendo observada na leitura o percentual de células positivas para o marcador TLR4, visualizadas no histograma (FACSuite®, BD Biosciences, São José, CA, EUA).

3.12 DETERMINAÇÃO DA FOSFORILAÇÃO DA SUBUNIDADE p65 DA VIA NF-κB

Para a determinação da fosforilação da subunidade p65 da via NF-κB, foram utilizadas densidades celulares de 100 000 células/mL em placas de 6 poços. A linhagem de macrófagos RAW 264.7 foi tratada com a concentração do composto, 1 µM, utilizada com base nos resultados obtidos. As condições testadas foram: branco (veículo), controle negativo (LPS 1 µg/mL), controle positivo (dexametasona 7 µM). Após decorrida 1 hora dos tratamentos, todos os grupos celulares (exceto o branco) foram estimulados com LPS (5 µg/mL), durante 24 horas.

Após o período de incubação em estufa (5% de CO₂ e temperatura de 37°C), as células foram descoladas com Versene® e coletadas em microtubos. Em seguida, foram lavadas com PBS estéril. As células foram transferidas para microplacas contendo anticorpos monoclonais específicos contra a proteína p65 fosforilada. O protocolo experimental foi realizado seguindo as orientações do fabricante do Kit de ELISA NF-κB p65 (*Cell Signaling Technology*, Massachusetts, EUA). A leitura da absorbância foi realizada em leitor de microplacas MB-580 (HEALES, Gouwei Road, SZN, CN) a 540 nm.

3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os experimentos foram realizados em forma de triplicada e com repetições em dias diferentes para maior confiabilidade dos resultados. Todos os resultados foram analisados no programa GraphPad Prism® versão 6.0 (San Diego, CA, EUA), onde as análises estatísticas

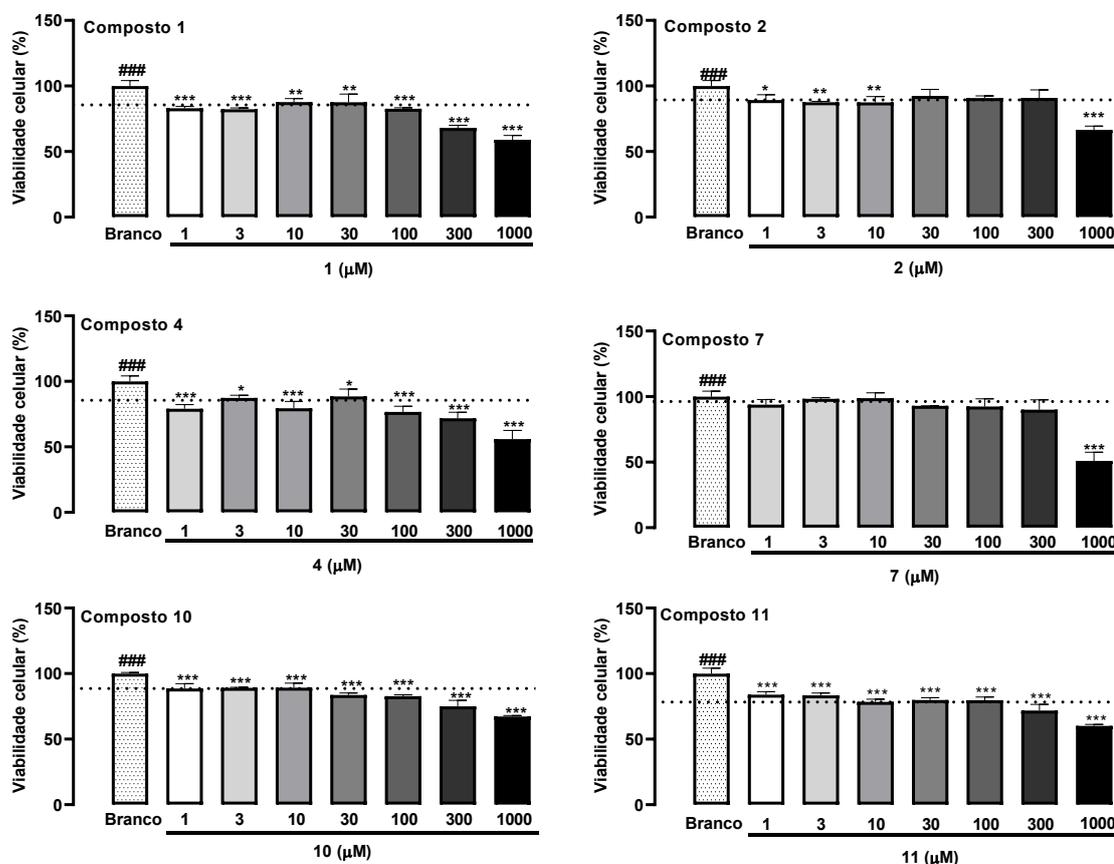
com um valor de p menor que 0,05 foram consideradas significativas. Para os testes de dosagem de metabólitos do óxido nítrico e mensuração das citocinas (IL-12p70, TNF- α , INF- γ , MCP-1, IL-6 e IL-10, IL-4 e IL-13), níveis de apoptose, e fagocitose, expressão gênica do receptor de manose (CD206) e TLR4 (CD284-MD2) e fosforilação da subunidade p65 da via NF- κ B, as diferenças dos parâmetros analisados entre os grupos controles e grupos tratados foram realizados por meio da análise de variância ANOVA de uma via (one-way ANOVA) complementada pelo pós-teste de Tukey. Os resultados dos parâmetros foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m).

4 RESULTADOS

4.1 CITOTOXICIDADE CELULAR DE DIÉSTERES DE ARIL-CICLOHEXANONAS MONOCARBOXILADAS SOBRE MACRÓFAGOS RAW 264.7

Dos dezenove compostos testados, apenas seis apresentaram uma alta viabilidade celular comparadas ao controle negativo (branco), ou seja, apresentaram baixa citotoxicidade na linhagem celular estudada. Na Figura 5, pode-se observar que os compostos 1, 10 e 11 apresentaram alta viabilidade celular até a dose de 100 μM , aumentando sua citotoxicidade nas maiores doses, de 300 e 1000 μM . Os compostos 2 e 7 por sua vez, demonstraram alta viabilidade celular entre as concentrações testadas de 1 a 300 μM , com uma diminuição da viabilidade e citotoxicidade apenas na maior concentração, 1000 μM . O composto 4 apresentou uma diminuição da viabilidade celular em comparação com o controle branco, na dose de 100 μM .

Figura 5 - Viabilidade celular dos macrófagos RAW 264.7 expostos aos compostos estudados nas concentrações de 1 a 1000 μM .



Avaliação da viabilidade celular da linhagem de macrófagos RAW frente aos compostos testados. As células foram tratadas com as concentrações de 1, 3, 10, 30, 100, 300 e 1000 μM : Composto 1; Composto 2; Composto 4; Composto 7; Composto 10 e Composto 11. Branco: Células tratadas somente com solução de tampão de fosfato estéril (PBS, pH 7,6). Após a incubação por 24 horas com os tratamentos, foi verificada a viabilidade celular a partir do método colorimétrico MTT. As colunas representam a média \pm e e.p.m de experimentos realizados em triplicata e, os asteriscos as diferenças estatísticas (Tukey e/ou Teste t de Student). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em comparação com o grupo basal (branco).

Os resultados mostraram que a partir dos cálculos do CC_{10} , de todas as dezenove formulações sintéticas testadas, apenas seis delas apresentaram alto índice de viabilidade celular e proporcionalmente, baixa citotoxicidade frente a linhagem celular RAW 264.7, quando comparadas ao controle negativo (branco) sem tratamento (Tabela 2).

Tabela 2 - Resultados das concentrações citotóxicas para 10% (CC_{10}) para macrófagos RAW 264.7 quando submetidos aos 19 diésteres de aril-ciclohexanonas.

Compostos	CC_{10} (μM)	Interpretação
<i>1</i>	<i>106</i>	Composto Selecionado
<i>2</i>	<i>231</i>	Composto Selecionado
<i>3</i>	<i>38</i>	Composto Eliminado
<i>4</i>	<i>114</i>	Composto Selecionado
<i>5</i>	<i>30</i>	Composto Eliminado
<i>6</i>	<i>18</i>	Composto Eliminado
<i>7</i>	<i>161</i>	Composto Selecionado
<i>8</i>	<i>45</i>	Composto Eliminado
<i>9</i>	<i>80</i>	Composto Eliminado
<i>10</i>	<i>156</i>	Composto Selecionado
<i>11</i>	<i>110</i>	Composto Selecionado
<i>12</i>	<i>31</i>	Composto Eliminado
<i>13</i>	<i>31</i>	Composto Eliminado
<i>14</i>	<i>18</i>	Composto Eliminado
<i>15</i>	<i>15</i>	Composto Eliminado
<i>16</i>	<i>5</i>	Composto Eliminado
<i>17</i>	<i>58</i>	Composto Eliminado
<i>18</i>	<i>43</i>	Composto Eliminado
<i>19</i>	<i>35</i>	Composto Eliminado

CC_{10} dos compostos diésteres de aril-ciclohexanonas, calculados por análise de regressão não linear usando o log da concentração versus a resposta normalizada (porcentagem de viabilidade celular). Executado com o programa GraphPad Prism® versão 6.0 (San Diego, CA, EUA).

Observando os valores de CC_{10} dos compostos testados, estipulou-se uma concentração de 100 μM máxima nos experimentos posteriores, como a forma de garantir a viabilidade significativa das células. Desta forma, compostos que apresentaram uma CC_{10}

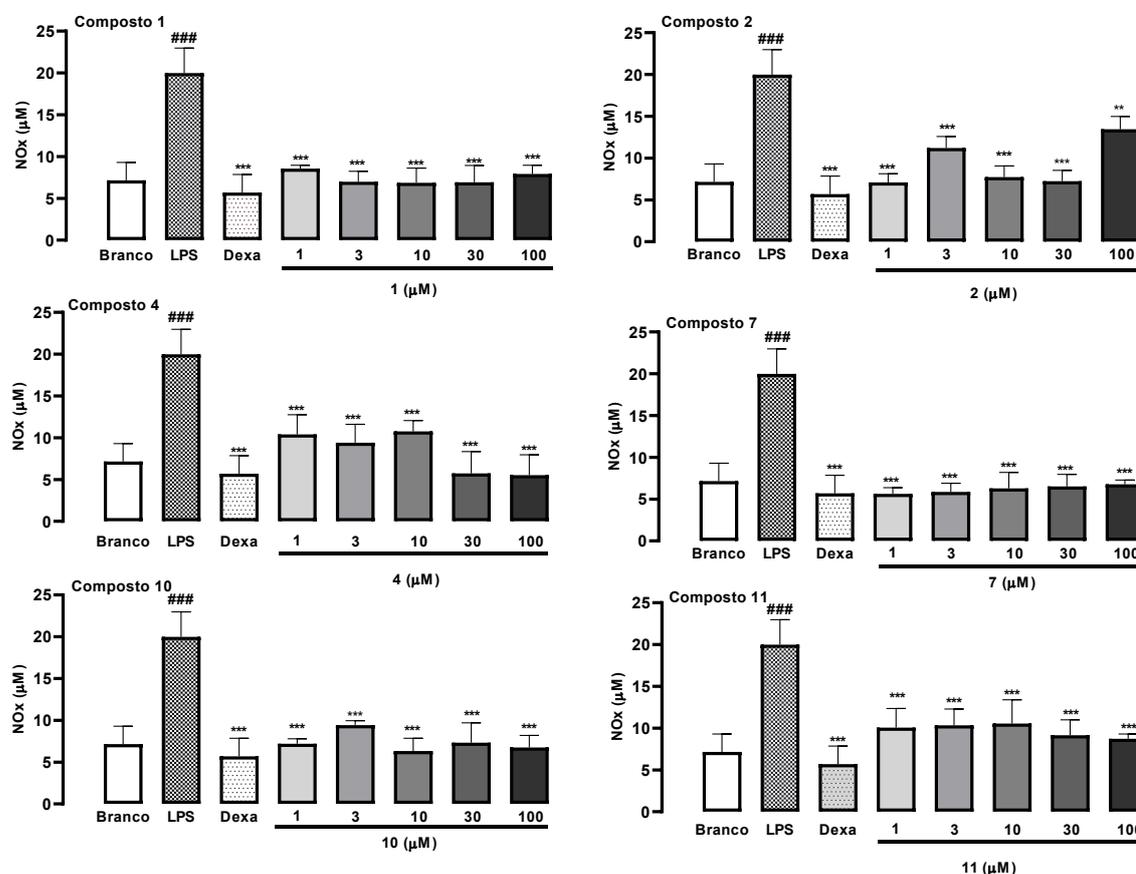
abaixo de 100 μM não foram testados nos experimentos, garantindo altas taxas de viabilidade celular, e consequentemente baixa toxicidade com todos os compostos utilizados.

4.2 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE ÓXIDO NÍTRICO (NO_x)

Os compostos em estudo, juntamente com o fármaco dexametasona (controle positivo), demonstraram uma redução na produção de metabólitos do óxido nítrico, quando comparados aos resultados de LPS (controle negativo) ($p < 0,05$). Os compostos nas concentrações testadas apresentaram uma redução significativa de NO_x quando comparado ao controle negativo, juntamente com o fármaco de referência ($p < 0,001$).

Os compostos 1, 4, 7 e 10 apresentaram uma significativa redução dos metabólitos do óxido nítrico em todas as suas concentrações testadas, quando comparados aos controles positivo e negativo. O composto 1 em todas as concentrações testadas mostrou uma redução significativa nos níveis de NO_x (% de inibição: Dose 1 μM : $57,2 \pm 1,1\%$; Dose 3 μM : $65,0 \pm 2,8\%$; Dose 10 μM : $62,4 \pm 8,4\%$; Dose 30 μM : $68,9 \pm 5,2\%$; Dose 100 μM : $64,2 \pm 4,3\%$) ($p < 0,001$) (Figura 6 Composto 1); assim como o composto 4, que apresentou o melhor percentual de inibição na dose de 1 μM , de 80% (% de inibição: 1 μM : $80,0 \pm 2,0\%$; 3 μM : $52,9 \pm 5,4\%$; 10 μM : $46,2 \pm 3,7\%$; 30 μM : $71,3 \pm 6,5\%$; 100 μM : $72,4 \pm 5,5\%$) ($p < 0,001$) (Figura 6 Composto 4); o composto 7 em concentrações superiores e iguais a 3 μM reduziu os níveis de nitrito em mais de 60% (% de inibição: 1 μM : $45,2 \pm 8,1\%$; 3 μM : $63,2 \pm 6,7\%$; 10 μM : $74,8 \pm 7,2\%$; 30 μM : $67,3 \pm 3,2\%$; 100 μM : $66,1 \pm 1,1\%$) ($p < 0,001$) (Figura 6 Composto 7) e o composto 10 (% de inibição: 1 μM : $64,0 \pm 1,4\%$; 3 μM : $52,8 \pm 1,3\%$; 10 μM : $68,3 \pm 3,4\%$; 30 μM : $63,4 \pm 5,3\%$; 100 μM : $66,2 \pm 3,6\%$) ($p < 0,001$) (Figura 6 Composto 10). Por sua vez, os compostos 2 e 11 também apresentaram uma redução de NO_x , porém, com menor significância quando comparados ao controle positivo. Onde o composto 2 apresentou redução de NO_x (% de inibição: 1 μM : $73,4 \pm 9,1\%$; 3 μM : $43,9 \pm 3,4\%$; 10 μM : $71,0 \pm 10,0\%$; 30 μM : $63,7 \pm 2,8\%$; 100 μM : $32,6 \pm 4,3\%$) ($p < 0,01$) (Figura 6 Composto 2); e, finalmente, o composto 11 (% de inibição: 1 μM : $46,7 \pm 5,3\%$; 3 μM : $48,2 \pm 4,8\%$; 10 μM : $47,2 \pm 7,1\%$; 30 μM : $54,2 \pm 4,5\%$; 100 μM : $56,4 \pm 1,4\%$) ($p < 0,001$) (Figura 6 Composto 11).

Figura 6 - Efeitos dos compostos diésteres de aril-ciclohexanonas sobre os níveis de metabólitos do NO α produzidos por macrófagos RAW 264.7.



Macrófagos RAW 264.7 foram tratados por 24 horas com os compostos diésteres de aril-ciclohexanonas nas doses de 1, 3, 10, 30, 100 µM: Composto 1; Composto 2; Composto 4; Composto 7; Composto 10 e Composto 11, e estimulados com LPS (1 µg/mL). Os níveis de metabólitos do óxido nítrico (NO α) foram determinados pelo método colorimétrico de Griess. Branco representa células tratadas apenas com os veículos (DMSO e PBS estéril), LPS representa células tratadas apenas com LPS (1 µg/mL) e DMSO (1%) e Dexa representa o grupo pré tratado com dexametasona (7 µM). As colunas representam a média \pm e.p.m de experimentos realizados em triplicata e, os asteriscos as diferenças estatísticas (Tukey e/ou Teste t de Student). ** p < 0,01 e *** p < 0,001 em comparação com os grupos negativo (LPS) e positivo (dexametasona).

A partir dos dados de redução de NO α , pode-se calcular os valores de IC₅₀ de cada composto testado através de análise de regressão não linear, utilizando o logaritmo da concentração em função da resposta normalizada (porcentagem de inibição do NO α). As concentrações de IC₅₀ encontradas para cada composto sintéticos foram: < 1 µM para os compostos 1, 4 e 7; 4 µM para o composto 10; 36 µM para o composto 11 e 59 µM para o composto 2 (Figura 6). A partir destes resultados, considerou-se que os compostos com IC₅₀ inferior a 1 µM apresentaram potencial efeito anti-inflamatório e/ou imunomodulador. Com

isso, estipulou-se a concentração de 1 μ M para a continuidade dos experimentos com os compostos 1, 4 e 7.

4.3 PRODUÇÃO DE CITOCINAS (IL-12p70, TNF- α , IFN- γ , MCP-1, IL-6, IL-10) POR MACRÓFAGOS RAW 264.7 EXPOSTOS A DIÉSTERES DE ARIL-CICLOHEXANONAS POR CITOMETRIA DE FLUXO

A quantificação das citocinas através da citometria de fluxo foi realizada com a melhor dose (1 μ M) dos compostos 1, 4 e 7, definidos a partir dos valores de IC₅₀. A Tabela 3 abaixo demonstra os resultados de percentual de inibição, média \pm erro padrão dos três compostos testados na melhor concentração, assim como os valores de significância. Pode-se observar que, os compostos testados obtiveram uma redução estatisticamente significantes das citocinas pró-inflamatórias IL12p-70, TNF- α , IFN- γ , MCP-1 (Tabela 3), quando comparados aos controles negativo (LPS) e positivo (dexametasona 7 μ M). Da mesma forma, os três compostos foram capazes de promover um aumento na citocina anti-inflamatória IL-10 (* p < 0,05; ** p < 0,01 e *** p < 0,001) em células RAW 264.7, quando comparados ao controle negativo (Tabela 3). Uma vez que o composto 4 reduziu a citocina pró-inflamatória IL-6 se comparado ao controle negativo (LPS) (*p < 0,05) (Tabela 3). Considerando que em macrófagos RAW 264.7, o composto 4 na concentração de 1 μ M foi capaz de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL12p-70, IL-6, TNF- α , IFN- γ , MCP-1) e aumentar a citocina anti-inflamatória (IL-10), os demais experimentos foram conduzidos com o composto 4 na dose de 1 μ M.

Tabela 3 - Perfil de inibição e expressão de citocinas inflamatórias por diésteres de aril-ciclohexanonas produzidas por macrófagos RAW 264.7 utilizando citometria de fluxo.

Concentrações		IL-12p70 (pg/mL) (% de inibição)	TNF- α (pg/mL) (% de inibição)	IFN- γ (pg/mL) (% de inibição)	MCP-1 (pg/mL) (% de inibição)	IL-6 (pg/mL) (% de inibição)	IL-10 (pg/mL) (% de aumento)
Branco							
LPS	<i>1 μg/mL</i>	23.2 \pm 1.5 ###	189891 \pm 4373 ###	9.5 \pm 0.15 ###	30790 \pm 2491 ###	15048 \pm 481 ###	6.5 \pm 1.3 ###
Dexa	<i>7 μM</i>	12.2 \pm 0.4 (47.6 \pm 1.5%)**	17997 \pm 1311 (90.5 \pm 0.7%)**	6.8 \pm 0.5 (28.2 \pm 5.5%)**	810.3 \pm 78.3 (97.4 \pm 0,2%)**	4842 \pm 1475 (67.8 \pm 9.8%)**	27.3 \pm 1.7 (58.0 \pm 2.6%)**
1	<i>1 μM</i>	15.0 \pm 2.0 (35.7 \pm 8.8%)*	83383 \pm 15724 (56.0 \pm 8.2%)**	7.5 \pm 0.7 (20.5 \pm 7.2%)*	2244 \pm 160 (92.7 \pm 0.5%)**	59029 \pm 9424	27.2 \pm 1.7 (58.2 \pm 2.7%)**
4	<i>1 μM</i>	15.0 \pm 0.6 (36.0 \pm 2.6%)**	69926 \pm 6331 (63.2 \pm 3.3%)**	7.2 \pm 0.3 (23.8 \pm 3.0%)**	874.7 \pm 38.1 (97.1 \pm 0,12%)**	9340 \pm 493.3 (38.0 \pm 3.2%)*	18.0 \pm 1.6 (72.2 \pm 2.5%)**
7	<i>1 μM</i>	7.8 \pm 1.0 (69.3 \pm 4.6%)**	111116 \pm 5986 (46.7 \pm 3.1%)**	7.2 \pm 0.5 (23.6 \pm 5.0%)**	2091 \pm 89.3 (93.2 \pm 0.3%)**	19665 \pm 430.9	17.6 \pm 2.9 (73.0 \pm 4.4%)*

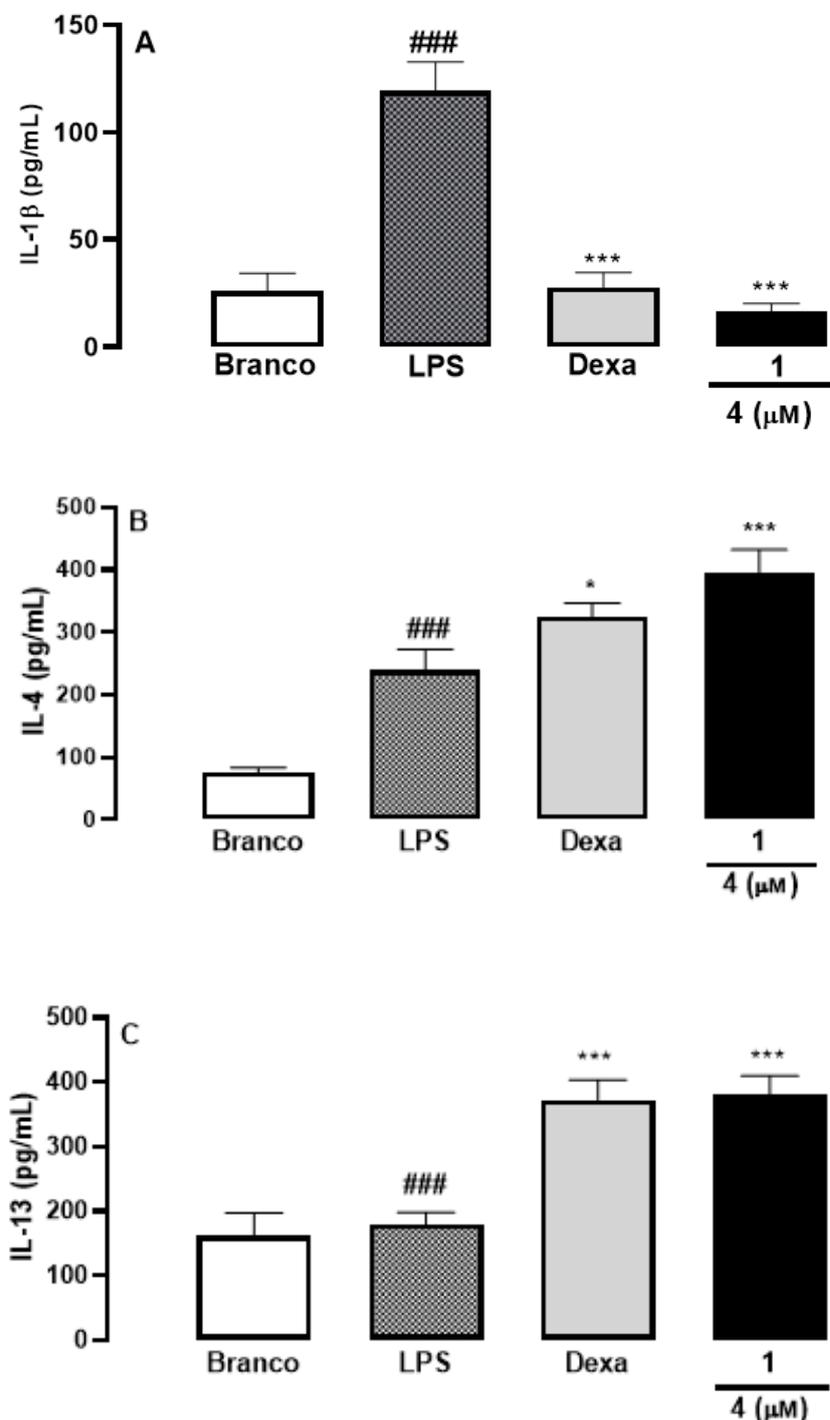
Percentual de inibição (média \pm erro padrão) das citocinas pró-inflamatórias IL-12p70, TNF- α , IFN- γ MCP-1 e IL-6 e anti-inflamatória (IL-10) sobre a linhagem de macrófagos RAW 264.7, avaliadas através de citometria de fluxo, utilizando *Cytometric Bead Array (CBA)* - Mouse Inflammation kit. A linhagem celular foi tratada com os compostos diésteres de aril-ciclohexanonas (compostos 1, 2 e 7) na dose de 1 μ M. Onde: controle negativo, LPS (1 μ g/mL); controle positivo (dexametasona 7 μ M); branco (DMSO). Cálculo do percentual de inibição, com média \pm erro padrão a partir do cálculo de estatística descritiva comparados ao controle negativo LPS na dose de 1 μ g/mL (###). Realizados com o auxílio do programa GraphPad Prism® versão 6.0 (San Diego, CA, EUA), onde: * p < 0,05; ** p < 0,01 e *** p < 0,001.

4.4 PRODUÇÃO DE CITOCINAS (IL-1 β , IL-4 E IL-13) POR MACRÓFAGOS RAW 264.7 EXPOSTOS A DIÉSTERES DE ARIL-CICLOHEXANONAS POR MÉTODO IMUNOENZIMÁTICO

Pode-se observar na Figura 7 (A) os resultados do composto frente a citocina pró-inflamatória IL-1 β , onde o mesmo apresentou uma redução em sua concentração (percentual de redução: média \pm erro padrão do composto 4 (1 μ M): 85,8 \pm 1,5%) assim como o controle positivo Dexametasona (percentual de redução: média \pm erro padrão do controle positivo dexametasona 7 μ M: 76,6 \pm 2,8) ($p < 0,001$) (Figura 7A).

Ao analisarmos a produção da citocina anti-inflamatória IL-4 (Figura 7B), pode-se perceber que o composto na sua concentração de 1 μ M foi capaz de aumentar a expressão da citocina (percentual de aumento composto 4 (1 μ M): 65,6 \pm 8,1%) se comparado ao controle negativo (LPS), obtendo um melhor aumento na sua concentração se comparado ao controle positivo Dexametasona (percentual de aumento dexametasona 7 μ M: 34,0 \pm 6,5%) (Figura 7B) ($p < 0,001$). O composto 4 na sua concentração de 1 μ M foi capaz de aumentar a produção da citocina anti-inflamatória (percentual de aumento composto 4 (1 μ M): 100 \pm 4,7%) quando comparado ao controle negativo (LPS), demonstrando um similar ao controle positivo Dexametasona (percentual de aumento dexametasona 7 μ M: 96,6 \pm 3,3%) (Figura 7C) ($p < 0,001$).

Figura 7 - Efeito do composto 4 diéster de aril-ciclohexanona (1 μM) sobre os níveis das citocina IL-1 β , IL-4 e IL-13 produzidas por macrófagos RAW 264.7 utilizando o método imunoenzimático (ELISA).



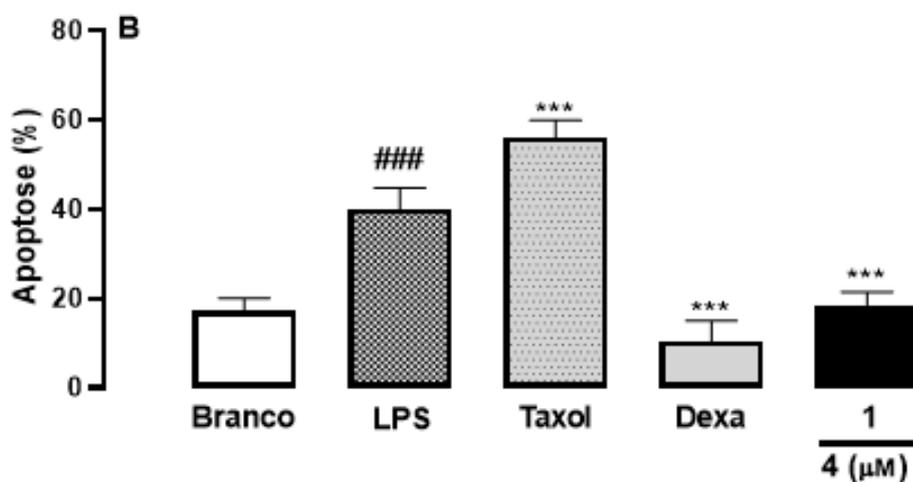
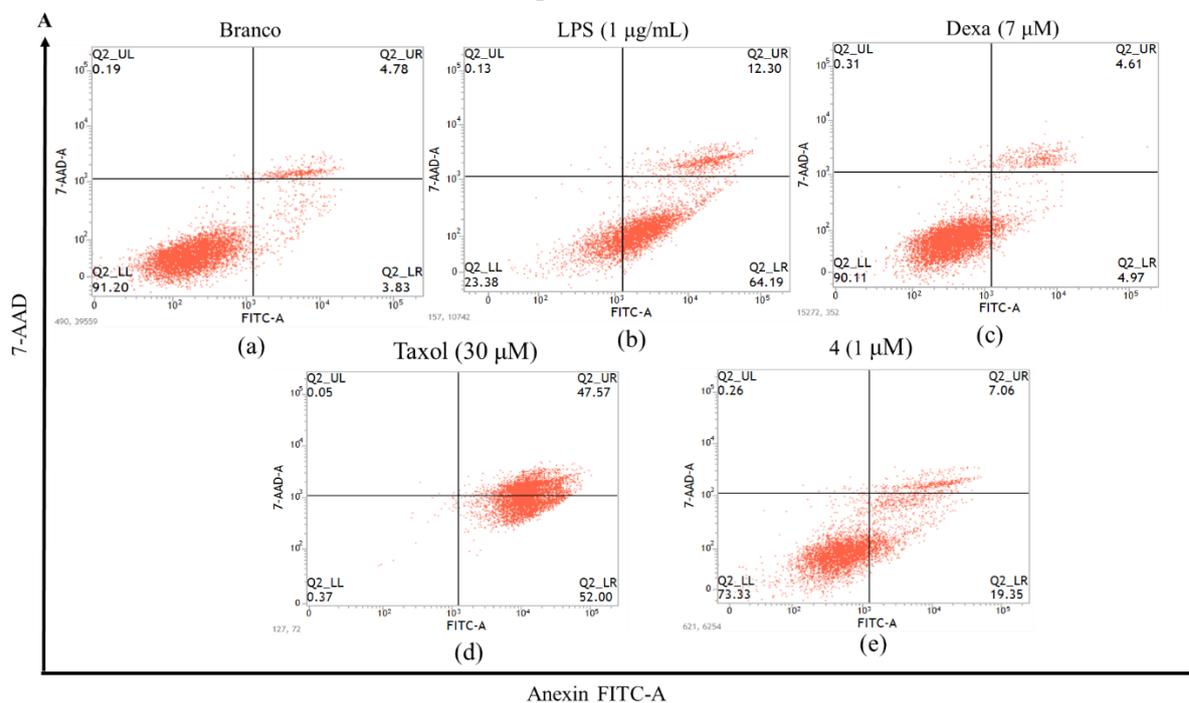
Efeito do composto 4 (1 μM) sob os níveis das citocinas inflamatórias IL-1 β , IL-4 e IL-13. Macrófagos RAW 264.7 foram tratados com o composto 4 por 24 horas, e as citocinas foram mensuradas no sobrenadante utilizando o método ELISA. Branco representa células tratadas apenas com os veículos (DMSO e PBS estéril); LPS representa o controle negativo de células tratadas apenas com LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e DMSO (1%); Dexa

representa o controle positivo pré-tratado com dexametasona (7 μ M). As células foram induzidas após 30 minutos com LPS (exceto o grupo celular branco). As colunas representam a média \pm erro padrão (n=3), os asteriscos as diferenças estatísticas (Tukey e/ou Teste t de Student). * p <0,05 e *** p <0,001 em comparação com os grupos negativo (LPS) e positivo (dexametasona).

4.5 APOPTOSE CELULAR DE MACRÓFAGOS RAW 264.7 EXPOSTOS AO COMPOSTO 4

Na Figura 8B foi possível observar que o composto em estudo induziu a baixos níveis de apoptose celular em macrófagos RAW 264.7 quando comparado ao grupo controle negativo (LPS) (p < 0,001). O composto 4 em estudo apresentou um percentual de inibição de 54,0 \pm 2,7% comparado ao controle negativo (LPS). Na Figura 8A é possível observar a representação gráfica das populações celulares utilizados na avaliação deste parâmetro, onde cada um dos quatro quadrantes representa os grupos celulares avaliados por citometria de fluxo: Linhagens celulares em sua forma basal (Q2_LL), em necrose (Q2_UL), em apoptose (Q2_LR) e em apoptose tardia (Q2_UR). Desta forma, se observa na Figura 8A (a) células tratadas com o veículo, apresentando a maioria de sua população celular no quadrante em Q2_LL, ou seja, em sua forma basal. Já o grupo identificado como controle negativo (Figura 8A (b)), tratado com LPS, apresentou sua população celular no quadrante identificado como apoptose tardia. Quando se observa os grupos controle positivo (Dexa 7 μ M) e composto 4 (1 μ M) nas Figuras 8A (c) e (e), respectivamente, nota-se à similaridade na distribuição das populações celulares nos quadrantes basal e apoptose tardia. O controle de apoptose Taxol (Figura 8A (d)) apresentou o resultado esperado com a presença de seu grupo celular nos quadrante apoptose e apoptose tardia.

Figura 8 - Efeito do composto 4 (1 μ M) sobre os níveis de apoptose celular em macrófagos RAW 264.7 por citometria de fluxo.

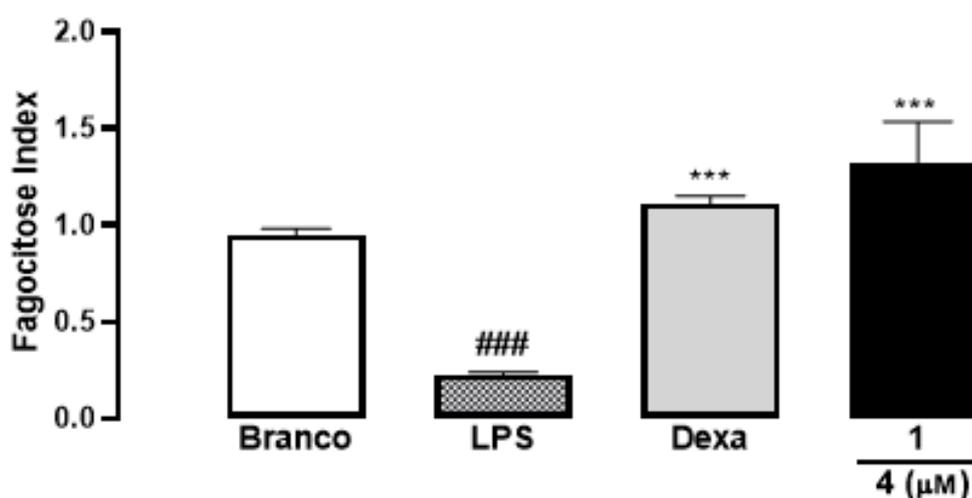


A: Representação gráfica dos grupos celulares em apoptose, no qual cada um dos quatro quadrantes representa os grupos celulares avaliados por citometria de fluxo: Linhagens celulares em sua forma basal (Q2_LL), em necrose (Q2_UL), em apoptose (Q2_LR) e em apoptose tardia (Q2_UR). Em A e B: Branco representa células tratadas apenas com os veículos (DMSO e PBS estéril); LPS representa células tratadas apenas com LPS (1 μ g/mL) e DMSO (1%); Dexa representa o grupo pré-tratado com dexametasona (7 μ M); Taxol representa o grupo tratado com Taxol utilizado como controle de apoptose e Composto 4 tratado com a dose de 1 μ M, induzidos após 30 minutos com LPS (exceto o grupo celular branco). **B:** Representação gráfica dos níveis de apoptose celular. As colunas representam a média \pm erro padrão de experimentos realizados em triplicata e, os asteriscos as diferenças estatísticas (Tukey e/ou Teste t de Student). *** $p < 0,001$ em comparação com os grupos negativo (LPS), positivo (dexametasona) e Taxol.

4.6 ATIVIDADE FAGOCÍTICA EM MACRÓFAGOS RAW 264.7 EXPOSTOS AO COMPOSTO 4

O nível de atividade fagocítica de macrófagos RAW 264.7 aumentou em $482.2 \pm 32,6\%$ quando as células foram tratadas com o composto 4 e comparando-se ao controle negativo ($p < 0,001$) (Figura 9). E apresentou resultados significativos em relação ao controle positivo dexametasona (% de aumento: $388.0 \pm 6.7\%$) ($p < 0,001$).

Figura 9 - Efeito do composto 4 ($1\mu\text{M}$) sobre níveis de fagocitose em macrófagos RAW 264.7.

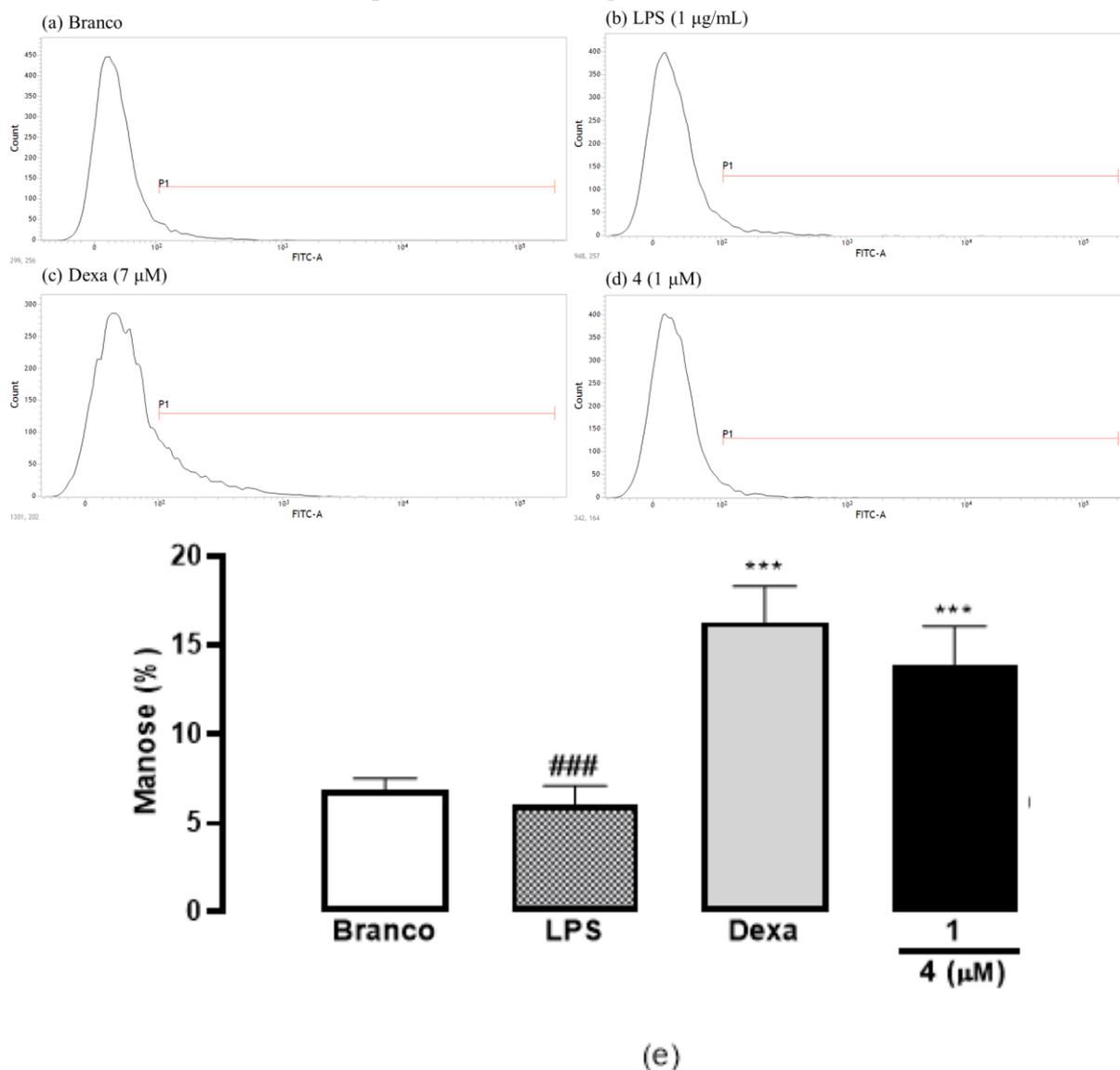


Avaliação dos níveis de fagocitose celular em células RAW 264.7. Branco representa células tratadas apenas com os veículos (DMSO e PBS estéril); LPS representa o controle negativo tratado apenas com LPS ($1\mu\text{g/mL}$) e DMSO (1%); Dexa representa o controle positivo tratado com Dexametasona ($7\mu\text{M}$) e Composto 4 tratado com a melhor dose ($1\mu\text{M}$). As colunas representam a média \pm erro padrão ($n=3$), os asteriscos as diferenças estatísticas (Tukey e/ou Teste t de Student) *** $p < 0,001$ em comparação com os grupos negativo (LPS) e positivo (dexametasona).

4.7 EXPRESSÃO DO RECEPTOR DE MANOSE (CD206) NA SUPERFÍCIE DE MACRÓFAGOS RAW 264.7

Na Figura 10 (e), pode-se observar graficamente os resultados da expressão do receptor de manose, onde o composto 4 ($1\mu\text{M}$) apresentou um aumento da expressão do receptor CD206 (% de aumento: $75.0 \pm 15.31\%$) ($p < 0,001$), assim como o controle positivo dexametasona. Em comparação com o controle negativo (LPS), é observada uma diferença estatística significativa ($p < 0,001$). Pode-se observar que o controle positivo dexametasona ($7\mu\text{M}$) (Figura 10 (c)) e o composto 4 (Figura 10 (d)) apresentaram um pico de expressão do receptor elevado, quando comparados ao controle negativo LPS (Figura 10 (b)).

Figura 10 - Efeito do composto 4 sobre a expressão do receptor de manose (CD206) na superfície de macrófagos RAW 264.7.



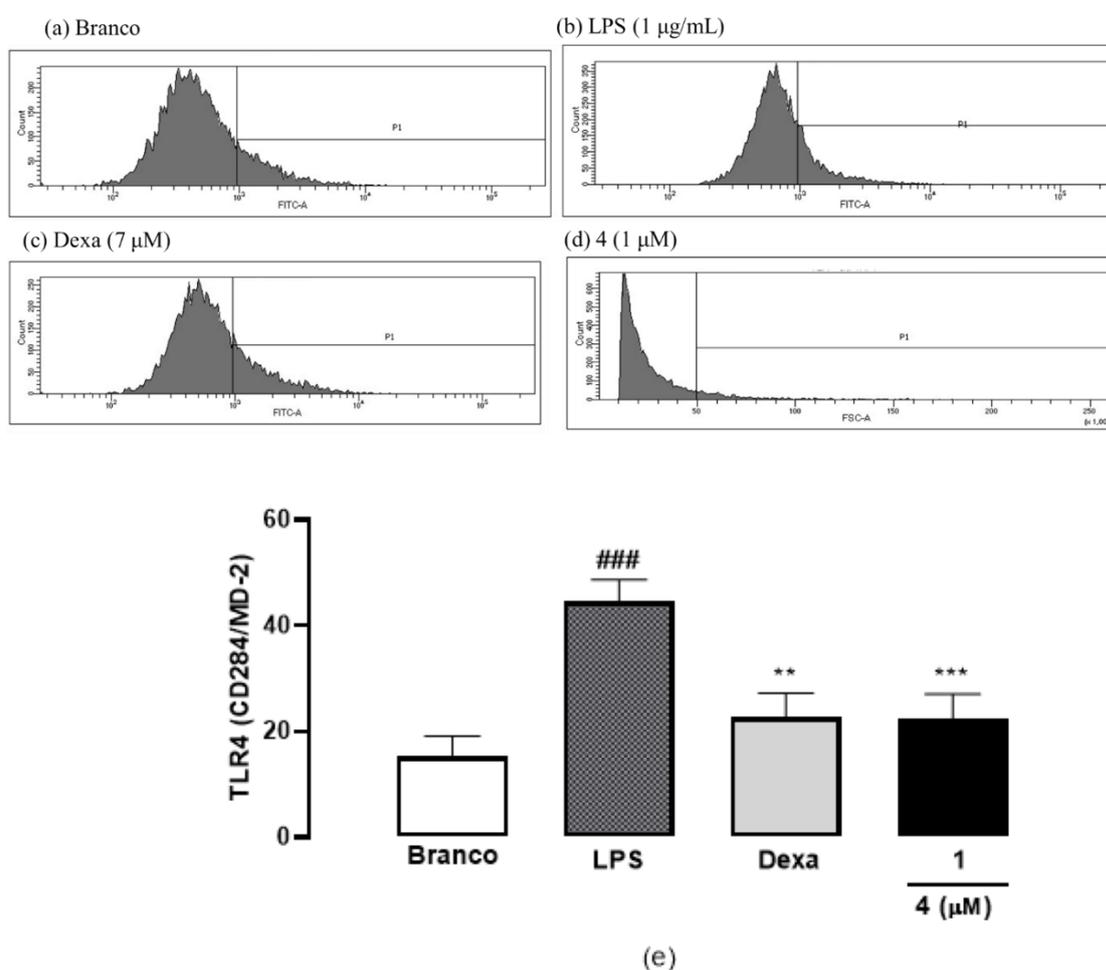
Nos histogramas acima: Branco (a), LPS (b), Dexa (c) e Composto 4 (d) e seus picos de expressão do marcador de manose avaliados por citometria de fluxo. Na Figura 10 (e), observa-se graficamente o resultado da expressão do marcador de manose (CD206), onde: Branco representa células tratadas apenas com os veículos (DMSO e PBS estéril); LPS representa o controle negativo tratado apenas com LPS (1 µg/mL) e DMSO (1%); Dexa representa o controle positivo tratado com Dexametasona (7 µM); e composto 4 tratado com sua melhor dose de 1 µM. As colunas representam a média ± erro padrão (n=3), os asteriscos as diferenças estatísticas (Tukey e/ou Teste t de Student). *** p < 0,001 em comparação com os grupos negativo (LPS), positivo (dexametasona).

4.8 EXPRESSÃO DO RECEPTOR TLR4 (CD284/MD-2) NA SUPERFÍCIE DE MACRÓFAGOS RAW 264.7

O composto 4 (1 µM) e a dexametasona (7 µM) apresentaram um pico de expressão do receptor TLR4 (CD284/MD-2) inferior na linhagem celular de macrófagos RAW 264.7

quando comparados ao controle negativo (LPS) (Figura 11). Na Figura 11 (e), pode-se observar graficamente os resultados desta expressão do receptor de TLR4, onde o composto 4 apresentou baixa expressão do receptor TLR4 (Percentual de inibição composto 4 (1 μ M): $48,0 \pm 5,2\%$), assim como o controle positivo dexametasona (Percentual de inibição Dexametasona (7 μ M): $47,3 \pm 6,0\%$). Em comparação com o controle negativo (LPS), é observada uma diferença estatística significativa ($p < 0,001$).

Figura 11 - Efeito do composto 4 sobre a expressão do receptor TLR4 (CD284/M2) na superfície de macrófagos RAW 264.7

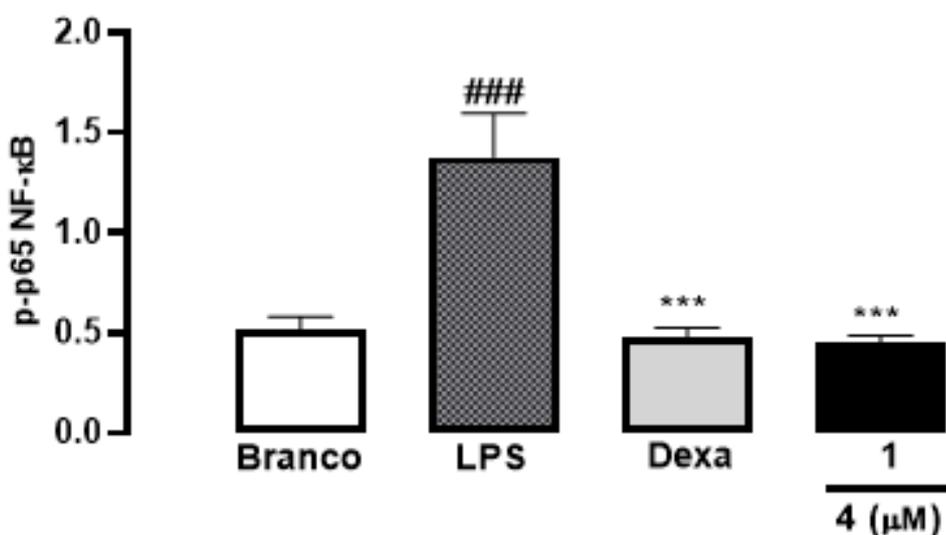


Nos histogramas acima: Branco (a), LPS (b), Dexa (c) e Composto 4 (d) e seus picos de expressão do marcador TLR4 (CD284/MD-2) avaliados por citometria de fluxo. Na Figura 10 (e), observa-se graficamente o resultado da expressão do marcador, onde: Branco representa células tratadas apenas com os veículos (DMSO e PBS estéril); LPS representa o controle negativo tratado apenas com LPS (1 μ g/mL) e DMSO (1%); Dexa representa o controle positivo tratado com dexametasona (7 μ M); e composto 4 tratado com 1 μ M. As colunas representam a média \pm erro padrão (n=3), os asteriscos as diferenças estatísticas (Tukey e/ou Teste t de Student), ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em comparação com os grupos negativo (LPS), positivo (dexametasona).

4.9 FOSFORILAÇÃO DA SUBUNIDADE p65 DA VIA NF- κ B

O composto 4 testado produziu uma redução significativamente a fosforilação da subunidade p65 de NF- κ B (Percentual de inibição composto 4 (1 μ M): $66,3 \pm 2,0\%$), assim como o controle positivo, fármaco de referência Dexametasona, que também reduziu a fosforilação dessa proteína (Percentual de inibição Dexametasona (7 μ M): $64,3 \pm 2,1\%$) ($p < 0,001$) quando comparados ao grupo controle negativo (LPS), que apresentou um aumento na fosforilação da subunidade p65 (Figura 12).

Figura 12 - Efeito do composto 4 derivado de diésteres de aril-ciclohexanonas sobre a fosforilação da subunidade p65 da via NF- κ B.



Fosforilação da subunidade p65 da via NF- κ B. Branco representa células tratadas apenas com os veículos (DMSO e PBS estéril); LPS representa o controle negativo tratado apenas com LPS (1 μ g/mL) e DMSO (1%); Dexa representa o controle positivo tratado com dexametasona (7 μ M) e Composto 4 tratado com a melhor dose (1 μ M). As colunas representam a média \pm erro padrão (n=3), os asteriscos as diferenças estatísticas (Tukey e/ou Teste t de Student), *** $p < 0,001$ em comparação com os grupos negativo (LPS), positivo (dexametasona).

5 DISCUSSÃO

Neste estudo foi evidenciado o potencial anti-inflamatório e imunomodulador de compostos canabinóides sintéticos de aril-ciclohexanonas monocarboxiladas, cuja estrutura molecular apresenta semelhança com fitocannabinóides como o canabidiol (CBD). Um dos primeiros testes de triagem a que um novo protótipo de medicamento deve ser submetido é o teste de viabilidade celular, onde se avalia a proporção de células vivas em uma cultura celular, quando expostas a um novo composto (ADAN et al., 2016). Os resultados demonstraram que os compostos sintéticos avaliados apresentam citotoxicidade na linhagem de macrófagos RAW 264.7 apenas quando utilizados em concentrações elevadas. Desta forma, dos dezoito compostos sintéticos testados, apenas seis apresentaram uma alta taxa de viabilidade celular quando comparados ao grupo branco. Hao e colaboradores (2010) também demonstraram em estudos com a linhagem de macrófagos RAW 264.7, que sintéticos canabinóides possuem baixa citotoxicidade quando avaliados nesta linhagem, corroborando com os resultados obtidos (HAO et al., 2010). Os seis compostos (1, 2, 4, 7, 10 e 11) que apresentaram CC_{10} abaixo de 100 μ M, foram submetidos a sua capacidade em reduzir a produção de metabólitos de óxido nítrico.

Alguns compostos sintéticos quando avaliados com o teste de produção de metabólitos do óxido nítrico, demonstraram que são capazes de inibir significativamente a produção do mesmo. Nesse sentido, a verificação do efeito dos compostos sobre a inibição dos metabólitos do óxido nítrico (NOx) foi realizada com os compostos 1, 2, 4, 7, 10 e 11. A partir dos resultados obtidos, a capacidade de inibir o NOx foi demonstrada de forma mais significativa nos compostos 1, 4 e 7, que tiveram seus valores de IC_{50} calculados e inferiores a 1 μ M. Ou seja, a concentração do composto capaz de inibir em 50% os níveis de NOx, quando comparados ao controle inflamado (LPS). A comprovação da atividade anti-inflamatória de produtos naturais e seus derivados bem como de compostos sintéticos, é inicialmente determinada pela capacidade que estes compostos apresentam em inibir a produção de mediadores inflamatórios importantes no início e manutenção de um processo inflamatório. Para tanto, é importante a verificação do efeito dos compostos em estudo sobre a produção de óxido nítrico, que pode ser produzido pela ação de uma das três isoformas da enzima óxido nítrico sintase (NOS: eNOS, nNOS e iNOS) (VANINNI et al. 2015). A óxido nítrico sintase induzida (iNOS) é a principal responsável pela produção de NOx durante o processo inflamatório e sua síntese é diretamente regulada pelos níveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IFN- γ), endotoxinas (LPS),

estresse oxidativo e presença de hipóxia tecidual produzida durante o processo de inflamação (VANNINI et al., 2015). Após a indução, a iNOS passa a produzir continuamente NOx até que todas as enzimas sejam degradadas, processo que é responsável pelo maior dano tecidual, pelo recrutamento celular contínuo e pela produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (XUE et al., 2018).

Resultados semelhantes foram observados em outros estudos, nos quais compostos canabinóides foram capazes de oferecer proteção contra o estresse oxidativo, considerando que, além de reduzirem a produção de óxido nítrico em macrófagos e astrócitos, demonstraram propriedades antioxidantes *in vitro* (MESTRE et al. 2005). Além disso, em experimentos mais recentes, Cheng e colaboradores (2021) demonstraram que a utilização de um derivado canabinóide seletivo para receptores CB2, inibiu de forma significativa a produção de óxido nítrico via inibição da enzima iNOS, no modelo *ex-vivo* de degeneração invertebral com células do núcleo pulposo estimuladas com peróxido de hidrogênio (CHENG et al., 2021).

Para assegurar uma possível ação anti-inflamatória, novos compostos sintéticos ou naturais, devem apresentar a capacidade de diminuir a expressão das principais citocinas envolvidas neste processo (WEISS et al, 2006). A fim de elucidar os mecanismos de imunomodulação dos sintéticos canabinóides, os três compostos (1, 4 e 7) foram testados na concentração de 1 μ M, quanto a capacidade em modificar a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias. Nestes experimentos, foi possível verificar que todos os canabinóides sintéticos testados apresentaram a capacidade de aumentar a produção da citocina anti-inflamatória IL-10, além de demonstrarem capacidade em inibir a produção das citocinas pró-inflamatórias IL-12p70, TNF- α , IFN- γ e MCP-1. Desta forma, os 3 compostos apresentaram evidências de uma possível atividade anti-inflamatória. Porém, apenas o composto 4 foi capaz de inibir de forma significativa os níveis da interleucina pró-inflamatória 6 (IL-6). Sendo assim, dos três compostos analisados, apenas o composto 4 mostrou uma diferença frente à todas as citocinas avaliadas, em comparação ao controle negativo LPS. Estudos com esta mesma linhagem celular (macrófagos RAW 264.7) já demonstraram que derivados sintéticos do canabidiol inibem a liberação de citocinas IL-1, IL-12, TNF- α e INF- γ e aumentam a produção de citocinas associadas a linfócitos como Th2, IL-4 e IL-10 (WEISS et al., 2006). Além disso, em um modelo animal, Zhang e colaboradores (2021) utilizando o HU308, um agonista de CB2, demonstraram inibição significativa nos níveis das citocinas IL-1 β e a IL-18 quando os animais

foram pré-tratados com o composto no modelo de sepse induzida por ligação/perfuração cecal (ZHANG et al., 2021).

Quando testado frente as demais citocinas inflamatórias pela metodologia imunoenzimática, o composto 4 (1 μM), mostrou-se capaz de aumentar os níveis das citocinas anti-inflamatórias testas (IL-4 e IL-13), assim como foi capaz de diminuir a produção da citocina pró-inflamatória IL-1 β em macrófagos RAW 264.7, evidenciando cada vez mais um possível perfil imunomodulatória com macrófagos em fenótipo M2. Nesse contexto, outros estudos demonstraram que compostos derivados de canabinóides têm a capacidade de induzir a diferenciação de linfócitos T *helper* para o fenótipo Th2, o que leva a uma diminuição nos níveis de IFN- γ e TNF- α , ao mesmo tempo, levando a um aumento nos níveis de IL-4, IL-10, e IL-13 (DINARELLO et al., 2017). Estudos demonstraram que o tratamento de camundongos com o canabidiol (CBD) resultou na redução significativa dos níveis plasmáticos das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e TNF- α . Além disso, a produção de citocinas associadas a Th1 em linhagens de macrófagos tratadas *in vitro* também se apresentou reduzida (WEISS et al, 2006). Os resultados de um estudo utilizando camundongos sensibilizados com *Corynebacterium parvum*, seguido da administração de WIN55,212-2 e HU 210 (todos agonistas canabinóides) tendo os animais recebido a administração caudal de LPS, demonstraram uma redução significativa da produção de TNF- α e IL-12, e um aumento significativo dos níveis de IL-10 no soro dos animais (SMITH et al., 2000).

O composto 4 (1 μM) demonstrou ser capaz de diminuir os índices de apoptose celular na linhagem de macrófagos RAW 264.7. A apoptose é o processo de morte celular programada, que pode ser induzida por fatores intrínsecos, fatores extrínsecos, ou ambos (HENGARTNER, 2000; IGNEY, KRAMMER, 2002). O processo de apoptose visa eliminar células danificadas, prejudiciais e indesejadas, sendo assim significativo em processos morfológicos, incluindo a homeostase (RIEDER et al., 2010). Modelos experimentais *in vitro* demonstraram que os canabinóides podem exercer direto em células imunes, inibindo a proliferação de linfócitos em cultura celular (IGNEY, KRAMMER, 2002; RIEDER et al., 2010). Em concentrações ideais, os canabinóides podem induzir a apoptose nas células do sistema imunológico, aliviando as respostas inflamatórias e protegendo o hospedeiro da inflamação aguda e crônica (SAMSON et al., 2003; ANDREA et al., 2005). A anandamida, um canabinóide endógeno, já demonstrou ser capaz de induzir apoptose em culturas de linfócitos (SCHWARZ et al., 1994). Em

macrófagos murinos e células T, o fitocanabinóide THC também demonstrou a capacidade de desencadear a apoptose em cultura celular desta linhagem (ZHU et al., 1998).

Dentre as células envolvidas no processo inflamatório, os macrófagos são fundamentais como células reguladoras, desempenhando um papel importante na fagocitose de patógenos, tecido necrótico e na secreção de citocinas pró e anti-inflamatórias (MCKALLIP et al., 2002). Os macrófagos possuem características de serem células altamente adaptáveis "plásticas", dependendo do microambiente imunológico. Os extremos desse espectro fenotípico incluem macrófagos classicamente ativados (fenótipo M1, função defensiva pró-inflamatória) e macrófagos ativados alternativamente que acabam por se manterem mais tempo ativos (fenótipo M2, anti-inflamatório e funções de reparo tecidual) (SAMIELLE et al., 2011). As evidências sugerem que um desequilíbrio M1/M2 está associado ao processo de inflamação em muitas doenças, como hiperinsulinemia crônica, nefropatia diabética e fibrose pulmonar induzida por radiação (SALVADOR et al., 2018). Assim, a regulação da polarização de macrófagos pode ser um novo método terapêutico para a superação de doenças inflamatórias, estudos demonstram que a ativação seletiva de CB2 pode atenuar a polarização de macrófagos M1 pró-inflamatórios e aumentar a polarização M2 de anti-inflamatórios (GARCIA-ORTIZ E SERRADOR, 2017).

Com base no teste de fagocitose podemos verificar que o composto 4 (1 μ M) foi capaz de aumentar o índice de fagocitose dos macrófagos RAW 264.7. Este aumento dos níveis de fagocitose juntamente com os demais resultados apresentados, demonstram eventos característicos de uma polarização de macrófagos para seu perfil anti-inflamatório M2 (DURU et al., 2016). A fagocitose celular produzida pelos macrófagos, promovida através da eferocitose está associada a diferenciação dos fenótipos do macrófagos de M1 para M2. Martinez e colaboradores demonstraram que a fagocitose de células apoptóticas desencadeia uma baixa expressão de marcadores associados a um perfil M1 e o aumento da expressão de moléculas associadas ao perfil de macrófagos anti-inflamatórios M2, com associação com a Arginase-1, IL-10 e IL-4 (MARTINEZ et al, 2009).

Além da evidência de que o composto 4 possui a capacidade de modular a polarização de macrófagos para seu fenótipo anti-inflamatório (M2), foi verificada a sua ação sobre o receptor de manose (CD206), de superfície celular. Os resultados obtidos demonstraram um aumento deste marcador na linhagem celular de macrófagos RAW 264.7 estudados. Estudos de inflamação em camundongos demonstraram que um canabinóide com ação no receptor CB2 foi

capaz de atenuar a inflamação reduzindo a polarização de macrófagos M1 e promovendo a polarização de macrófagos anti-inflamatórios M2 (DU et al., 2018).

Além disso, o composto 4 (1 μ M) em estudo apresentou uma diminuição no marcador de superfície celular TLR4 (CD284-MD2). Os receptores *Toll-like* medeiam a inflamação induzida por infecção e a inflamação estéril por moléculas endógenas. Estudos demonstraram que os canabinóides, incluindo os fitocannabinóides, os endocannabinóides endógenos e os compostos canabinóides sintéticos, modificam as respostas imunes inatas via sinalização mediada por TLR em vários tipos de células e tecidos (FITZPATRICK E DOWNER, 2017). Especificamente em termos de TLR4, estudos anteriores mostraram que os fitocannabinóides (THC, CBD), canabinóides sintéticos e canabinóides endógenos (anandamida, N-araquidonoil dopamina) inibem a sinalização induzida por TLR4 em vários tipos de células (FITZPATRICK, DOWNER, 2017; KOZELA et al., 2010).

Os resultados demonstraram que o composto 4 (1 μ M), também inibiu significativamente a fosforilação da subunidade p65 NF- κ B no citosol de células de macrófagos RAW 264.7. O fator de transcrição NF- κ B é um regulador crítico de respostas imunológicas e inflamatórias. Compreende em sua família cinco membros, sendo as proteínas p50, p52, p65 (Rel-A), c-Rel e Rel-B, que são conhecidas como homo ou heterodímeros e permanecem como um complexo inativo com I κ B em células em repouso (BASAK et al., 2012; KARIN, YAMAMMOTO, WANG, 2004). O fator NF- κ B possui duas vias de sinalização distintas, sendo: 1. Via canônica ativada principalmente por patógenos e mediadores inflamatórios e 2. Via não canônica ativada principalmente pela sinalização de receptores específicos. A forma mais abundante da via ativada por estímulos patológicos na via canônica é o heterodímero p65: p50 (CHRISTIAN, SMITH, CARMODY, 2016). O aumento desproporcional de p65 ativado é o estímulo principal de muitas doenças crônicas e inflamatórias. Desta forma, a via de sinalização NF- κ B p65 é uma importante via de estudo para o desenvolvimento de novas substâncias anti-inflamatórias (RAZANI, ZARNEGAR, YTTERBERG, 2010; SHIH, TSUI, CALDWELL, HOFFMANN, 2011). Assim, sabe-se que a expressão de mediadores inflamatórios, como as citocinas, é estritamente controlada pelas vias de sinalização MAPK/NF- κ B (MARTINEZ et al. 2009). Em estados fisiológicos normais após a exposição a estimulantes inflamatórios como o LPS, o NF- κ B é ativado do citosol celular e transmigra para o núcleo, onde se liga a regiões promotoras que induzem a transcrição de muitos genes inflamatórios (WEI et al. 2018). Alaa e colegas (2021) também demonstraram que um

canabinóide sintético, agonista do receptor CB2, foi capaz de suprimir a inflamação e a fibrose ao inibir a subunidade p65 da via do NF- κ B em modelos de inflamação para induzir a fibrose hepática em ratos (ALAA et al. 2021).

Pode-se categorizar os canabinóides como compostos com a capacidade de ativar receptores canabinóides, do tipo 1 (CB1), expresso principalmente no cérebro, ou do tipo 2 (CB2), expresso predominantemente no sistema imune e células hematopoiéticas, ou ambos (BURSTEIN E ZURIER, 2009; HOWLETT et al., 2004). Tratam-se de compostos terpenofenólicos e mediadores lipídicos e podem ser categorizados com base na sua fonte, sendo: fitocanabinóides extraídos na planta *Cannabis sp*; endocanabinóides produzidos endogenamente e canabinóides sintetizados em laboratório com base nos demais (PATIL et al., 2015) podendo produzir efeitos semelhantes aos da planta *Cannabis sp*. (FONSESA et al., 2013). As evidências de que o sistema endocanabinóide apresenta efeitos imunomoduladores levaram aos estudos com canabinóides sintéticos, com foco nos efeitos imunossupressores, sendo atualmente apontados como potencial terapia para tratamento de doenças autoimunes e inflamatórias (BERDYSHEV, 2000). Além disso, há evidências de que os canabinóides também podem regular a diferenciação dos fenótipos de macrófagos M1 ou M2 (MONTECUCCO et al., 2008).

Os macrófagos polarizados com seu fenótipo M2, são caracterizados por uma redução na expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-12p70, IL-6, TNF- α , MCP-1, IFN- γ) e, em contraste, por um aumento na produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-4, IL-10 e IL-13. Eles também mostram a regulação positiva do marcador de manose da superfície celular (CD206) e Arginase-1, e redução na expressão de receptores TLR4 (FITZPATRICK, DOWNER, 2017; KOZELA et al., 2010), corroborando com os resultados obtidos com o composto 4. Os macrófagos polarizados M2 desempenham papéis importantes na proteção do hospedeiro, diminuindo a inflamação e promovendo o reparo do tecido. No desenvolvimento de muitas doenças, há uma mudança do fenótipo M1 para M2, observada principalmente durante a transição do estágio agudo para o crônico, que pode fornecer proteção contra a inflamação descontrolada. Portanto, manter o equilíbrio dos macrófagos do tipo M1-M2 pode ser o ponto chave no tratamento de muitas doenças (GARCIA-ORTIZ, SERRADOR, 2017).

Assim, os resultados obtidos neste estudo mostram que diante de todos os diésteres de aril-ciclohexanonas testados, o composto 4 possui alto potencial anti-inflamatório com características imunomodulatórias. Este composto apresentou baixa citotoxicidade, foi capaz

de diminuir os níveis de óxido nítrico, inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias e aumentar a produção de citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-10 e IL-13), assim como a reduzir a apoptose dos macrófagos. Finalmente, foi capaz de aumentar a expressão na superfície dos macrófagos do receptor de manose (CD206), ao mesmo tempo reduzir a expressão dos receptores *Toll-like* 4 (TLR4) e aumentar o índice fagocítico dos macrófagos, achados característicos do perfil fenotípico de macrófagos M2. Tal derivado canabinóide pode ser um importante achado farmacológico com potencial imunomodulatório de macrófagos, desta forma, é de extrema valia o acréscimo de experimentos envolvendo pesquisa de fatores transcricionais que configurem as vias inflamatórias, estudos *in silico* e *in vivo* com foco no receptor endocanabinóide CB2.

6 CONCLUSÃO

Dos 19 compostos sintéticos de aril-ciclohexanonas monocarboxiladas, o composto 4 apresentou um potencial efeito anti-inflamatório intimamente ligado a um contexto imunomodulador. Uma vez que o composto apresenta achados experimentais típicos atribuídos à mudança dos macrófagos do fenótipo M1 para M2, um possível protótipo para o desenvolvimento futuro de um novo fármaco anti-inflamatório e imunomodulador para tratar doenças inflamatórias onde o contexto de polarização dos macrófagos tenha um papel fundamental.

REFERÊNCIAS

- ALAA, M.; ALI, O.; EL-TAWIL, S.; ASMAA, K.; AL-MOKADDEM, SAHAR, S. EL-RAHMAN, A. Promoted inhibition of TLR4/miR-155/ NFkB p65 signaling by cannabinoid receptor 2 agonist (AM1241), aborts inflammation and progress of hepatic fibrosis induced by thioacetamide”. **Chemical-Biological Interactions**, v. 336, 2021.
- ABBAS, A.K.; PILLAI, S.; LICHTMAN, A.H. Livro: *Imunologia: Celular e Molecular*. 9ª Edição. Rio De Janeiro: Editora Elsevier Ltda, 2019.
- ADAN, A.; KIRAZ, Y.; BARAN, Y. Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 17, p. 1213–1221, 2016.
- ALVES, P.; AMARAL, C.; TEIXEIRA, N.; CORREIA-DA-SILVA, G. Cannabis sativa: Much more Beyond Δ^9 -tetrahydrocannabinol. **Pharmacological Research**, v. 157, n. 104522, 2020.
- ANDREA, L.; SMALL-HOWARD, L.M.; SHIMODA, N.; CHAKER, N.; ADRA, H.T. Anti-inflammatory potential of CB1-mediated cAMP elevation in mast cells. **Biochemistry Journal**, v. 388, n. 2, p. 465-473, 2005.
- BASHIR, S.; SHARMA, Y.; ELAHI, A.; KHAN, F. Macrophage polarization: The link between inflammation and related diseases. **Inflammation Research: Official Journal of the European Histamine Research Society**, v. 65, n. 1, p. 1–11, 2016.
- BATTISTA, N.; DI TOMMASO, M.; BARI, M.; MACCARRONE, M. The endocannabinoid system: An overview. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 6, n. 9, 2012.
- BASAK, S.; BEHAR, M.; HOFFMANN, A. Lessons from mathematically modeling the NF- κ B pathway. **Immunology Reviews**, v. 246, n. 1, p. 221–238, 2012.
- BAUD, V.; KARIN, M. Is NF- κ B a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. **Natural Review Drug Discovery**, v. 8, n. 6, p. 33-40, 2009.
- BELCASTRO, E.; FRANZINI, M.; CIANCHETTI, S.; LORENZINI, E.; MASOTTI, S.; FIERABRACCI, V.; PUCCI, A.; POMPELLA, A.; CORTI, A. Monocytes/macrophages activation contributes to b-gamma-glutamyl transferase accumulation inside atherosclerotic plaques. **Journal of Translational Medicine**, v. 13, n. 325, 2015.
- BERDYSHEV, E.V. Cannabinoid Receptors and the Regulation of Immune Response. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 108, n. 169-90, 2000.
- BONINI, S. A.; PREMOLI, M.; TAMBARO, S.; KUMAR, A.; MACCARINELLI, G.; MEMO, M.; MASTINU, A. *Cannabis sativa*: A Comprehensive Ethnopharmacological Review of a Medicinal Plant with a Long History. **Journal Ethnopharmacol**, v. 227, p. 300–315, 2018.

BORASCHI, D.; LUCCHESI, D.; HAINZL, S.; LEITNER, M.; MAIER, E.; MANGELBERGER, D.; OOSTINGH, G.J.; PFALLER, T.; PIXNER, C.; POSSELT, G.; ITALIANI, P.; NOLD, M.F.; NOLD-PETRY, C.A.; BUFLER, P.; DINARELLO, C.A. IL-37: A new anti-inflammatory cytokine of the IL-1 family. **Cytokine Network**, v. 22, p. 127-147, 2011.

BRAMNESS, J.G.; DOM, G.; GUAL, A.; MANN, K.; WURST, F.M. A survey on the medical use of Cannabis in Europe: A position paper. **European Addiction Research**, v. 24, n. 4, p. 201-205, 2018.

BRENNAN, K.; BOWIE, A.G. Activation of host pattern recognition receptors by viroses. **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, p. 503-507, 2010.

BROWN, B.N.; RATNER, B.D.; GOODMAN, S.B.; AMAR, S.; BADYLAK, S.F. Macrophage polarization: an opportunity for improved outcomes in biomaterials and regenerative medicine. **Biomaterials**, v. 33, p. 3792–3802, 2012.

BUCKLEY, C.D.; GILROY, D.W.; SERHAN, C.N.; STOCKINGER, B.; TAK, P.P. The resolution of inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, p. 59–66, 2013.

BURSTEIN SH, ZURIER RB. Canabinóides, endocannabinóides e análogos relacionados na inflamação. **AAPS J**, v. 11, n.1, p. 109–19, 2009.

CABRAL, G.A; STAAB, A. Effects on the Immune System. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 385, n. 423, 2005.

CHAN, C. et al. Incompatibility of chemical protein synthesis inhibitors with accurate measurement of extended protein degradation rates. **Pharmacology Research & Perspectives**, v. 5, n. 5, p. 1-12, 2017.

CHEN, J.W.; BORGELT, L.M.; BLACKMER, A.B. Cannabidiol: A New Hope for Patients with Dravet or Lennox-Gastaut Syndromes. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 53, n. 6, p. 603-611, 2019.

CHENG, X.; LIN, J.; CHEN, Z.; MAO, Y.; WU, X.; XU, C.; DU, J.; DONG, Z.; YANG, H.; ZHOU, F.; GENG, D. CB2 mediated attenuation of nucleus pulposus degeneration via the amelioration of inflammation and oxidative stress *in vivo* and *in vitro*. **Molecular Medicine**, v. 19, n. 27 (1), p. 92, 2021.

CHEONG, R.; HOFFMANN, A.; LEVCHENKO, A. Understanding NF- κ B signaling via mathematical modeling. **Molecular Systems Biology**, v. 4, n. 7, p. 192-197, 2008.

CHRISTIAN, F.; SMITH, E.; CARMODY, R. The regulation of NF- κ B subunits by phosphorylation. **Cells**, v. 5, n. 12, 2016.

DA SILVA, V.K.; DE FREITAS, B.S.; GARCIA, R.C.L.; MONTEIRO, R.T.; HALLAK, J.E.; ZUARDI, A.W.; CRIPPA, J.A.S.; SCHRÖDER, N. Antiapoptotic effects of cannabidiol in an experimental model of cognitive decline induced by brain iron overload. **Translational Psychiatry**, v. 8, n. 176, 2018.

DESCH, A.N.; GIBBINGS, S.L.; GOYAL, R.; KOLDE, R.; BEDNAREK, J.; BRUNO, T.; SLANSKY, J.E.; JACOBELLI, J.; MASON, R.; ITO, Y.; MESSIER, E.; RANDOLPH, G.J.; PRABAGAR, M.; ATIF, S.M.; SEGURA, E.; XAVIER, R.J.; BRATTON, D.L.; JANSSEN, W.J.; HENSON, P.M.; JAKUBZICK, C.V. Flow Cytometric Analysis of Mononuclear Phagocytes in non-diseased Human Lung and Lung-Draining Lymph Nodes. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 193, n. 6, p. 614-626, 2016.

DINARELLO, C. A. Historical insights into cytokines. **European Journal of Immunology**, v. 37, p. 34-45, 2017.

DIRSCH, V. M.; STUPPNER, H.; VOLLMAR, A. M. The Griess assay: suitable for a bio-guided fractionation of anti-inflammatory plant extracts? **Planta Médica**, v. 64, n. 5, p. 423-426, 1998.

DURU, N.; WOLFSON, B.; ZHOU, Q. Mechanisms of alternative activation of macrophages and non-coding RNAs in the development of radiation-induced pulmonary fibrosis. **World Journal of Biological Chemistry**, v. 7, p.231–9, 2016.

DU, Y.; REN, P.; WANG, Q.; JIANG, S.; ZHANG, M.; LI, J.; WANG, L.; GUAN, D. Cannabinoid 2 receptor attenuates inflammation during skin wound healing by inhibiting M1 macrophages rather than activating M2 macrophages. **Journal of Inflammation**, v. 15, n. 25, 2018.

ELIGINI, S.; BRIOSCHI, M.; FIORELLI, S.; TREMOLI, E.; BANFI, C.; COLLI, S. Human monocyte-derived macrophages are heterogeneous: Proteomic profile of different phenotypes. **Journal Proteomics**, v. 124, p. 112–123, 2015.

FITZPATRICK, J.K.; DOWNER, E.J. Toll-like receptor signaling as a cannabinoid target in multiple sclerosis. **Neuropharmacology**, v. 113, Parte B, p. 618-626, 2017.

FONSECA, B.M.; COSTA, M.A.; ALMADA, M.; CORREIA-DA-SILVA, G.; TEIXEIRA, N.A. Endogenous Cannabinoids Revisited: A Biochemical Perspective. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v. 10, n. 2–103, p. 13–30, 2013.

FULLERTON, J.N.; GILROY, D.W. Resolution of Inflammation: A New Therapeutic Frontier. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 15, n. 8, p.551-567, 2016.

GOULD, J. The Cannabis Crop. **Nature**, v. 525, n. 7570, p. 53 – 53, 2015.

GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131-138, 1982.

GUO, X.; XUE, M.; LI, C.J.; YANG, W.; WANG, S.S.; MA, Z.J.; ZHANG, X.N.; WANG, X.Y.; ZHAO, R.; CHANG, B.C.; CHEN, L.M. Protective effects of triptolide on TLR4 mediated autoimmune and inflammatory response induced myocardial fibrosis in diabetic cardiomyopathy. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 193, p. 333–344, 2016.

- GUPTA, S. Tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis in elderly human T cells: a role of TNFR-I and downstream signaling molecules. **Experimental Gerontology**, v. 37, p. 293-299, 2002.
- GUZIK, T.J.; KORBUT, R.; ADAMEK-GUZIK, T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 54, p. 469-487, 2003.
- HAMIDZADEH, K. et al. Macrophages and the recovery from acute and chronic inflammation. **The Annual Review of Physiology**, v. 79, p. 567-592, 2017.
- HAMMELL, D.C.; ZHANG, L.P.; MA, F.; ABSHIRE, S.M.; MCILWRATH, S.L.; STINCHCOMB, A.L.; WESTLUND, K.N. Transdermal cannabidiol reduces inflammation and pain-related behaviors in a rat model of arthritis. **European Journal of Pain**, v. 20, p. 936-948, 2016.
- HAO, M.; JIANG, L.; FANG, N.; PU, J.; HU, L.; SHEN, L.; SONG, W.; HE, B. The cannabinoid WIN55,212-2 protects against the inflammatory response induced by oxidized LDL in murine macrophages. **Journal Lipid Research**, v. 51, n. 8, p. 2181- 2190, 2010.
- HAYDEN, M.S.; GHOSH, S. NF- κ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. **Genes**, v. 26, n. 4, p. 203-234, 2012.
- HENGARTNER, M.O. The Biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, p. 770-776, 2000.
- HOFFMANN, A.; BALTIMORE, D. Circuitry of nuclear factor κ B signaling. **Immunology Review**, v. 210, p. 171-186, 2006.
- HOFFMANN, A.; LEUNG, T.H.; BALTIMORE, D. Genetic analysis of NF- κ B/Rel transcription factors defines functional specificities. **EMBO Journal**, v. 22, n. 12, p. 5530–5539, 2003.
- HOFFMANN, A.; NATOLI, G.; GHOSH, G. Transcriptional regulation via the NF- κ B signaling module. **Oncogene**, v. 25, n. 16, p. 6706–6716, 2006.
- HONÓRIO, K. M.; ALBÉRICO, A. A.; FERREIRA DA SILVA, B. Therapeutical aspects of compounds of the plant *Cannabis sativa*. **Química Nova**, v. 29, n. 2, 2006.
- HOWLETT, A.C.; BREIVOGEL, C.S.; CHILDERS, S.R.; DEADWYLER, S.A.; HAMPSON, R.E. PORRINO, L.J. Fisiologia e farmacologia dos canabinóides: 30 anos de progresso. **Neuropharmacology**, v. 47, p. 345-58, 2004.
- IDRISS, H.T.; NAISMITH, J.H., TNF- α and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). **Microscopy Research and Technique**, v. 50, p. 184–195, 2000.
- IGNEY, F.H.; KRAMMER, P.H. Death and anti-death: tumor resistance to apoptosis. **Nature Reviews**, v. 2, p. 277-288, 2002.

JETTEN, N.; VERBRUGGEN, S.; GIJBELS, M.J.; POST, M.J.; DE WINTHER, M.P.; DONNERS, M.M. Anti-inflammatory M2, but not pro-inflammatory M1 macrophages promote angiogenesis *in vivo*. **Angiogenesis**, v. 17, n. 1, p. 109–118, 2014.

JUNTTILA, I.S.; Tuning the Cytokine Responses: An Update on Interleukin (IL)-4 and IL-13 Receptor Complexes. **Frontiers Immunology**, v. 9, p. 888, 2018.

KARIN, M.; YAMAMOTO, Y.; WANG, Q.M. The IKK NF-kappa B system: a treasure trove for drug development. **Natural Review Drugs and Discovery**, v. 3, n. 1, p.17–26, 2004.

KAWAI, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors, and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. **Cell Press - Immunity**, v. 34, n. 5, p. 637-650, 2011.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity update on Toll-like receptors. **Nature Immunology**, v. 11, n. 5, p. 373-384, 2010.

KEARNS, J.D.; HOFFMANN, A. Integrating computational and biochemical studies to explore mechanisms in NF- κ B signaling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, p. 5439–5443, 2009.

KEATING, G.M. Delta-9-Tetrahydrocannabinol/Cannabidiol oromucosal spray (Sativex®): a review in multiple sclerosis-related spasticity. **Drugs**, v. 77, n. 5, p. 563-574, 2017.

KOTAS, M.; MEDZHITOV, R. Homeostasis, inflammation, and disease susceptibility. **Cell**, v. 160, n. 5, p. 816-827, 2015.

KOZELA, E.; PIETR, M.; JUKNAT, A.; RIMMERMAN, N.; LEVY, R.; VOGEL, Z. Cannabinoids Delta 9 -Tetrahydrocannabinol and Cannabidiol Differentially Inhibit the Lipopolysaccharide-activated NF-B and Interferon-/STAT Proinflammatory Pathways in BV-2 Microglial Cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 3, p. 1616-1626, 2010.

KUMAR, R.N.; CHAMBERS, W.A.; PERTWEE, R.G. Pharmacological actions and therapeutic uses of cannabis and cannabinoids. **Anaesthesia**, v. 56, n.1059, p. 68, 2001.

KUMAR, V. Toll-like receptors in immunity and inflammatory diseases: past, pre-sent, and future. **International Immunopharmacology**, v. 59, p. 391-412, 2018.

KUROWSKA-STOLARSKA, M.; STOLARSKI, B.; KEWIN, P.; MURPHY, G.; CORRIGAN, C.J.; YING, S.; LIEW, F.Y. IL-33 amplifies the polarization of alternatively activated macrophages that contribute to airway inflammation. **Journal of Immunology**, v. 183, n. 10, p. 6469–6477, 2009.

LAWRENCE, T.; GILROY, D.W. Chronic inflammation: a failure of resolution? **International Journal of Experimental Pathology**, v. 88, n. 2, p.85–94, 2007.

LAWRENCE, T.; NATOLI, G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. **Natural Reviews of Immunology**, v. 11, p. 750–761, 2011.

LEE, J.; LIM, K.T. Phytoglycoprotein inhibits interleukin-1beta and interleukin-6 mitogen-activated protein kinase in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. **Naunyn Schmiedeberg's Archive Pharmacology**, v. 377, n.1, p. 45-54, 2008.

LEES, J.R. Gamma interferon in autoimmunity: a tricky player on a complex stage. **Cytokine**, v. 74, n. 1, p. 18–26, 2015.

LEUNG, T.H.; HOFFMANN, A.; BALTIMORE, D. One nucleotide in a κ B site can determine cofactor specificity for NF- κ B dimers. **Cell**, v. 118, p. 453–464, 2004.

LI, Q.; CARR, A. L.; DONALD, E.L; SKITZKI, J.J; OKUYAMA, R.; STOOLMAN, L.M.; CHANG, A.E. Synergistic effects of IL-12 and IL-18 in skewing tumor-reactive T cell responses toward a type 1 pattern. **Cancer Research**, v. 65, p. 1063, 2005.

LIND, M. et al. Inducible nitric oxide synthase: Good or bad? **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 93, p. 370–375, 2017.

LOBITO, A.A.; GABRIEL, T.L.; MEDEMA, J.P.;KIMBERLY, F.C. Diseases that cause mutations in the TNF and TNFR superfamilies: focus on the molecular mechanisms that lead to the disease. **Trends in Molecular Medicine**, v. 17, p. 494-505, 2011.

LOCKSLEY, R.M.; KILLEEN, N.; LENARDO, M.J. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. **Cell**, v. 104. P. 487-501, 2001.

MARTINEZ-POMARES, L. The mannose receptor. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 92, n. 6, p. 1177-1186, 2012.

MARTINEZ, F.O.; HELMING, L.; GORDON, S. Alternative activation of macrophages: an immunological functional perspective. **Annual Review of Immunology**, v. 27, p. 451-483, 2009.

MCKALLIP, R.J.; LOMBARD, C.; MARTIN, B.R.; NAGARKATTI, M.; NAGARKATTI, P.S. Delta(9)-tetrahydrocannabinol-induced apoptosis in the thymus and spleen as a mechanism of immunosuppression *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Pharmacology Experimental Therapy**, v. 302, n. 2, p. 451–65, 2002.

MERLY, L.; SMITH, S. L. Murine RAW 264.7 cell line as an immune target: Are we missing something. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 39, n.2, p.55-58, 2017.

MESTRE, L.; CORREA, F.; ARÉVALO-MARTIN, A.; MOLINA-HOLGADO, E.; VALENTI, M.; ORTAR, G.; DI, M.; DI MARZO, V.; GUAZA, C. Pharmacological modulation of the endocannabinoid system in a viral model of multiple sclerosis. **Journal Neurochemistry**, v., 92, p. 1327–133, 2005.

MORALES, P.; GOYA, P.; JAGEROVIC, N. Emerging strategies targeting CB2 cannabinoid receptor: biased agonism and allosterism. **Biochemistry Pharmacology**, v. 57, p. 8–17, 2018.

MORALES, P.; HURST, D.P.; REGGIO, P.H. Molecular Targets of the Phytocannabinoids: A Complex Picture. Em: KINGHORN, A.; FALK, H.; GIBBONS, S.; KOBAYASHI, J. Edição: Phytocannabinoids. **Progress in the Chemistry of Organic Natural Products**, v. 103, p. 103-131, 2017.

MONCADA, S.; HIGGS, A. The L-arginine–nitric oxide pathway. **New England Journal of Medicine**, n. 329, 2012.

MONTECUCCO, F.; BURGER, F.; MACH, F. Agonista do receptor de canabinoide CB2 JWH-015 modula a migração de monócitos humanos através defisinalização intracelular. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 294: H1145-55, 2008.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MURRAY, P. J. Macrophage polarization. **Annual Review of Physiology**, v. 79, p. 541-566, 2016.

MURRAY, P.J.; WYNN, T.A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. **Natural Review of Immunology**, v. 11, p. 723–737, 2011.

NATHAN, C. Neutrophils, and immunity: challenges and opportunities. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 3, p. 82-173, 2006.

NATHAN, C.; DING, A. Nonresolving inflammation. **Cell**, v. 140, p. 871-822, 2010.

PERES, F.F.; LIMA, A.C.; HALLAK, J.E.C.; CRIPPA, J.A.; SILVA, R.H.; ABÍLIO, V.C. Cannabidiol as a Promising Strategy to Treat and Prevent Movement Disorders? **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. 482, 2018.

NATOLI, G.; SAEIJ, J.P.; SCHULTZE, J.L.; SHIREY, K.A.; SICA, A.; SUTTLES, J.; UDALOVA, I.; VAN GINDERACHTER, J.A.; VOGEL, S.N.; WYNN, T.A. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. **Immunity**, v. 41, p. 14–20, 2014.

NIELSEN, M.C.; ANDERSEN, M.N.; RITTIG, N.; RODGAARD-HANSEN, S.; GRONBAEK, H.; MOESTRUP, S.K.; MOLLER, H.J.; ETZERODT, A. The macrophage-related biomarkers sCD163 and sCD206 are released by different shedding mechanisms. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 106, n. 5, p. 1129-1138, 2019.

PATIL, K.R.; GOYAL, S.N.; SHARMA, C.; PATIL, C.R.; OJHA, S. Phytocannabinoids for cancer Therapeutics: recent updates and future perspectives. **Current Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 30, p. 3472–501, 2015.

PRADHAN, A. A.; BERTELS, Z.; AKERMAN, S. Targeted nitric oxide synthase inhibitors for migraine. **Neurotherapeutics**, v. 15, n. 1, p. 1-11, 2018.

- POLLARA, G.; KWAN, A.; NEWTON, P.J.; HANDLEY, M.E.; CHAIN, B.M; KATZ, D.R. Dendritic cells in viral pathogenesis: protective or defective? **International Journal of Experimental Pathology**, v. 86, p. 187, 2005.
- PUNCHARD, A. N.; WHELAN, J. C.; ADCOCK, I. **The Journal of Inflammation. Editorial**, n.1,v.1, 2004.
- RASCHKE W.C. et al. Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. **Cell**, v. 15, p. 261-267, 1978.
- RAZANI, B.; ZARNEGAR, B.; YTTERBERG, A.J. et al. Negative feedback in noncanonical NF-kappa B signaling modulates NIK stability through IKK alpha-mediated phosphorylation. **Science Signaling**, v. 3, n. 123, 2010.
- RIEDER, S.A.; CHAUHAN, A.; SINGH, U.; NAGARKATTI, M.; NAGARKATTI, P. Cannabinoid-induced apoptosis in immune cells as a pathway to immunosuppression. **Immunobiology**, v. 215, p. 598-605, 2010.
- ROCK, E.M.; PARKER, L.A. Constituents of *Cannabis Sativa* . Em: MURILLO-RODRIGUEZ, E.; PANDI-PERUMAL, S.R.; MONTI, J.M. Edição: Cannabinoids and Neuropsychiatric Disorders. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1264, 2021.
- RODGAARD-HANSEN, S.; RAFIQUE, A.; CHRISTENSEN, P.A.; MANIECKI, M.B.; SANDAHL, T.D.; NEXO, E.; MOLLER, H.J. A soluble form of the macrophage-related mannose receptor (MR/CD206) is present in human serum and elevated in critical illness. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 52, n. 3, p. 453-461, 2014.
- SAMIELLE, K.; BRANCATO, J.; ALBINA, E. Wound Macrophages as Key Regulators of Repair: Origin, Phenotype, and Function. **The American Journal of Pathology**, v. 178, n. 1, p. 19-25, 2011.
- SAMSON, M.T.; SMALL-HOWARD, A.; SHIMODA, L.M.; KOBLAN-HUBERSON, M.; STOKES, A.J.; TURNER, H. Differential roles of CB1 and CB2 cannabinoid receptors in mast cells. **Journal Immunology**, v. 170, p. 4953–62, 2003.
- SANJABI, S.; WILLIAMS, K.J.; SACCANI, S.; ZHOU, L.; HOFFMANN, A.; GHOSH, G.; GERONDAKIS, S.; NATOLI, G.; SMALE, S.T. A c-Rel subdomain responsible for enhanced DNA-binding affinity and selective gene activation. **Genes**, v. 19, p. 2138–2151, 2005.
- SANTARLASCI, V.; COSMI, L.; MAGGI, L.; LIOTTA, F.; ANNUNZIATO, F. IL-1 and T Helper Immune Responses. **Frontier in Immunology**, v. 4, p. 182, 2013.
- SALVADOR, R.; MORÓN-CALVENTE, V.; TORIBIO-CASTELLÓ, S.; PLAZA-DÍAZ, J.; ABADÍA-MOLINA, A.C.; ROJAS-BARROS, D.I.; BEUG, S.T.; LACASSE, E.C.; MACKENZIE, A.; KORNELUK, R.; ABADÍA-MOLINA, F. Inhibitor of apoptosis proteins, NAIP, cIAP1 and cIAP2 expression during macrophage differentiation and M1/M2 polarization. **Plos One**, v. 13, n. 3, 2018.

SCHLEIMER, R.P.; KATO, A.; KERN, R.; KUPERMAN, D.; AVILA, P.C. Epithelium: at the interface of innate and adaptive immune responses. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 120, n. 6, p. 1279-1284, 2007.

SCHWARZ, H.; BLANCO, F.J.; LOTZ, M. Anandamide, an endogenous cannabinoid receptor agonist inhibits lymphocyte proliferation and induces apoptosis. **Journal of Neuroimmunology**, v. 55, n. 1, p. 107–115, 1994.

SHIH, V.F.; TSUI, R.; CALDWELL, A.; HOFFMANN, A. A single NF κ B system for both canonical and non-canonical signaling. **Cell Research**, v. 21, p. 86–102, 2011.

SICA, A.; ERRENI, M.; ALLAVENA, P.; PORTA, C. Macrophage polarization in pathology. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 21, p. 4111–412, 2015.

SICA, A.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and polarization. **In vivo veritas**, v. 122, n. 3, p. 787-795, 2012.

SMITH, S.R.; TERMINELLI, C.; DENHARDT, G. Effect of cannabinoid receptor agonist and antagonist ligands on production of inflammatory cytokines and anti-inflammatory interleukin-10 in endotoxemic mice. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, Journal of Pharmacology**, v. 193, p. 136-150, 2000.

SKRABEK, Q.; GALIMOVA, L.; ETHANS, K.; PERRY, D. Nabilone for the treatment of pain in fibromyalgia. **Journal of Pain**, v.9, n. 2, p. 164–173, 2008.

SZIKSZ, E., et al. Fibrosis related inflammatory mediators: role of the IL-10 cytokine family. **Mediators Inflamm**, v. 2015, 2015.

TANAKA, T.; NARAZAKI, M.; KISHIMOTO, T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 6, n. 10, p. 1-17, 2014.

TANG, M.; TIAN, L.; GUOJING, L.; XIJIE, Y. Interferon-Gamma-Mediated Osteoimmunology. **Laboratory of Biotherapy/Collaborative Innovation Center of Biotherapy and Cancer Center**, v. 9, p. 1508, 2018.

TRIPATHI, P.; TRIPATHI, P.; KASHYAP, L.; SINGH, V. The role of nitric oxide in inflammatory reactions. **Immunology Medicinal Microbiology**, v. 51, p. 443-445, 2007.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, p. 133, 2003.

TURNER, M. D. et al. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signaling and inflammatory disease. **Biochemical et Biophysical Acta**, v. 1843, n. 11, p. 2563-2582, 2014.

URITS, I.; BORCHART, M.; HASEGAWA, M.; KOCHANSKI, J.; ORHURHU, V.; VISWANATH, O. An update of current cannabis-based pharmaceuticals in pain medicine. **Pain and Therapy**, v. 8, n. 1, p. 41-51, 2019.

- VALLABHAPURAPU, S.; KARIN, M. Regulation, and function of NF- κ B transcription factors in the immune system. **Annual Review of Immunology**, v. 27, n. 3, p. 693-733, 2009.
- VANNINI, F.; KASHFI, K.; NATH, N. The dual role of iNOS in cancer. **Redox Biology**, v. 6, p. 334–343, 2015.
- WALL, S.B.; OH, J.Y.; DIERS, A.R.; LANDAR, A. Oxidative Modification of Proteins: An Emerging Mechanism of cell Signaling. **Frontiers in Physiology**, v. 3, n. 369, 2012.
- WALTER, L.; FRANKLIN, A.; WITTING, A.; WADE, C.; XIE, Y.; KUNOS, G.; et al. Cannabinoid receptors regulate microglial cell migration. **Journal of Neuroscience**, v. 23, p. 1398-405, 2003.
- WANG, N.; LIANG, H.; ZEN, K. Molecular mechanisms that influence the macrophage M1-M2 polarization balance. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. 614, 2014.
- WEAVER, L.K.; HINTZ-GOLDSTEIN, K.A.; PIOLI, P.A.; WARDWELL, K.; QURESHI, N.; VOGEL, S.N.; GUYRE, P.M. Pivotal advance: activation of cell surface Toll-like receptors causes shedding of the hemoglobin scavenger receptor CD163. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 80, n. 1, p. 26-35, 2006.
- WEI, D.; DAI, B.; ZHENG, N.N.; CHI, Z.H.; XIN, N.; MA, T.X.; ZHENG, L.Y.; SUMI, R.; SUN, L. *Coccomyxa gloeobotrydiformis* polysaccharide inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW 264.7 macrophages. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 51, n. 6, p. 2523-2535, 2018.
- WEISS, L.; ZEIRA, M.; REICH, S.; HAR-NOY, M.; MECHOULAM, R.; SLAVIN, S.; et al. Cannabidiol reduces the incidence of diabetes in non-obese diabetic mice. **Autoimmunity**, v. 39, n. 2, p. 51-143, 2006.
- WOOD, T.B.; SPIVEY, W.T.N.; EASTERFIELD III, T.H. Cannabinol. **Journal of the Chemical Society Transactions**, v. 75, p. 20-36, 1899.
- WRIGHT, H.L.; MOOTS, R.J.; BUCKNALL, R.C.; EDWARDS, S.W. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. **Rheumatology**, v. 49, p. 1618–1631, 2010.
- WU, H.Y.; HAN, T.R. Cannabidiol hydroxyquinone-induced apoptosis of splenocytes is mediated predominantly by thiol depletion. **Toxicology Letters**, v. 195, p. 68-74, 2010.
- WU, H.Y.; GOBLE, K.; MECHA, M.; WANG, C.C.; HUANG, C.H.; GUAZA, C.; JAN, T.R. Cannabidiol-induced Apoptosis in murine microglial cells through lipid raft. **Glia**, v. 60, p. 1182–1190, 2012.
- WYNN, T.A.; CHAWLA, A.; POLLARD, J.W. Macrophage biology in development, homeostasis, and disease. **Nature**, v. 496, p. 445–455, 2013.
- XUE, Q. et al. Regulation of iNOS on immune cells and its role in diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 12, p. 1-13, 2018.

XUEJING, J.; ZHANG, C.; BAO, J.; WANG, K.; TU, Y.; WAN, J.; HE, C. Flavonoids from *Rhynchosia minima* root exerts anti-inflammatory activity in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells via MAPK/NF- κ B signaling pathway. **Inflammopharmacology**, v. 28, p. 289-297, 2020.

YANG, L.; ROZENFELD, R.; WU, D.; DEVI, L.A.; ZHANG, Z.; CEDERBAUM, A. Cannabidiol protects liver from binge alcohol-induced steatosis by mechanisms including inhibition of oxidative stress and increase in autophagy. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 68, p. 260-267, 2014.

YADAV, A.; SAINI, V.; ARORA, S. MCP-1: Chemoattractant with a role beyond immunity: A review. **Clinical Chemical Acta**, v. 411, n. 22, p. 1570-1579, 2010.

ZHANG, B.; ZHENG, F.; LIU, A.; LI, Z.; ZHENG, F.; LIU, Q.; YANG, L.; CHEN, K.; WANG, Y.; ZHANG, Z.; HE, Q.; ZHAN, J. Activation of CB2 receptor inhibits pyroptosis and subsequently ameliorates cecal ligation and puncture-induced sepsis. **International Immunopharmacology**, v. 99, 2021.

ZHENG, Y. et al. Lipopolysaccharide regulates biosynthesis of cystathionine γ -lyase and hydrogen sulfide through toll-like receptor4/p38 and toll-like receptor-4/NF- κ B pathways in macrophages. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal**, v. 49, p. 679– 688, 2013.

ZHU, K. et al. Necroptosis promotes cell-autonomous activation of proinflammatory cytokine gene expression. **Cell Death & Disease**, v. 9, n. 500, p. 1-16, 2018.

ANEXO 1

SÍNTESE DOS COMPOSTOS DIÉSTERES DE ARIL-CICLOHEXANONAS

PROCEDIMENTO GERAL PARA A PRODUÇÃO DE CICLOHEXANONAS (1 - 3)

Foi adicionado a um frasco de fundo redondo o respectivo benzaldeído substituído com aril (1 equiv.) e etanol o suficiente para fazer uma solução de 0,9 mol/L, em seguida, foi adicionado acetoacetato de etil (2 equiv.). Posteriormente, n-butilamina (1 equiv.) foi adicionada. A mistura foi agitada constantemente e aquecida a 60°C durante 16 horas. Após o resfriamento, o solvente foi removido a vácuo, e a mistura foi então suspensa em hexanos. O precipitado branco formado foi filtrado e submetido a cromatografia em coluna de gel de sílica em um gradiente de 0 a 80% de acetato de etila em hexanos, os rendimentos dos produtos são demonstrados em cada caso específico (Figura 13).

Figura 13 - Representação molecular do procedimento geral para a produção das ciclohexanonas, dos compostos de 1 a 3.

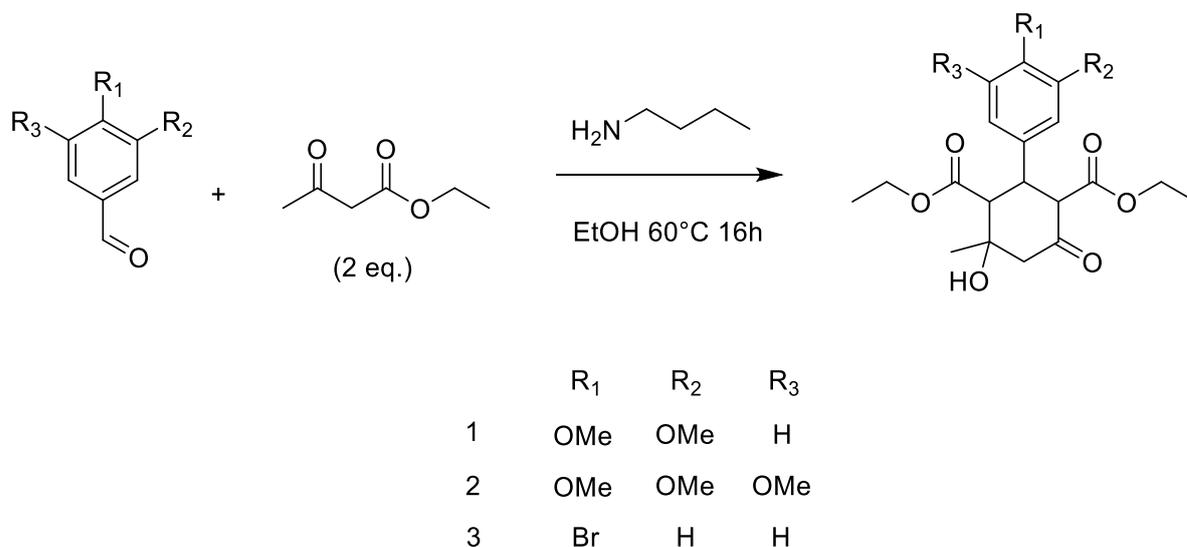
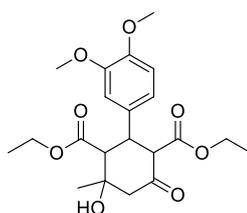


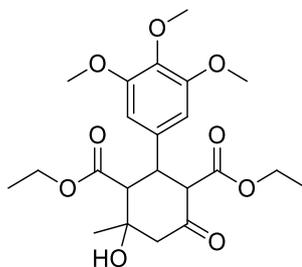
Figura 14 - Composto 1: *Dietil 4-hidroxi-2-(3,4-dimetoxifenil)-4-metil-6-oxociclohexano-1,3-dicarboxilato.*



Representação molecular do composto 1, diéster de aril-ciclohexanona.

Rendimento isolado: 91%. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 6.79 (s, 2H), 6.72 (s, 1H), 4.12 to 3.97 (m, 3H), 9.94 (d, J 6.2 Hz, 1H), 3.90 (d, J 3.9 Hz, 2H), 3.78 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 3.62 (d, J 12.6 Hz, 1H), 3.00 (d, J 12.1 Hz, 1H), 2.71 (d, J 14.3 Hz, 1H), 2.48 (d, J 14.3 Hz, 1H), 1.34 (s, 3H), 1.08 (t, J 7.1 Hz, 3H), 0.89 (t, J 7.1 Hz, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 201.3, 173.9, 167.7, 148.8, 148.5, 130.7, 120.2, 111.3, 111.2, 72.9, 62.8, 61.1, 57.2, 56.0, 55.9, 52.7, 44.8, 28.6, 14.0, 13.8. HRMS calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{O}_8$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 409.1857, encontrado m/z 409.1875.

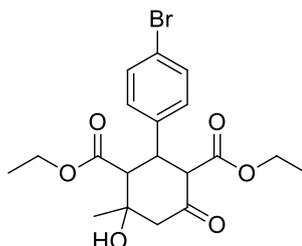
Figura 15 - Composto 2: *Dietil 4-hidroxi-2-(3,4,5-trimetoxifenil)-4-metil-6-oxociclohexano-1,3-dicarboxilato*.



Representação molecular do composto 2, diéster de aril-ciclohexanona.

Rendimento isolado: (94%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 6.67 (s, 2H), 6.50 (s, 1H), 4.04 to 3.95 (m, 4H), 3.81 (s, 6H), 3.68 (s, 3H), 3.44 (d, J 11.4 Hz, 1H), 2.84 (s, 2H), 2.80 (d, J 7.4 Hz, 1H), 2.47 (d, J 14.4 Hz, 1H), 1.33 (s, 3H), 1.06 (t, J 7.1 Hz, 3H), 0.92 (t, J 7.2 Hz, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 201.3, 173.8, 167.3, 153.2, 137.4, 133.9, 105.1, 72.9, 68.8, 62.4, 61.1, 60.8, 56.9, 56.2, 52.7, 45.4, 28.6, 14.0, 13.7. HRMS calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{31}\text{O}_9$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 439.1963, encontrado m/z 439.2023.

Figura 16 - Composto 3: *Dietil 4-hidroxi-2-(4-bromofenil)-4-metil-6-oxociclohexano-1,3-dicarboxilato*.



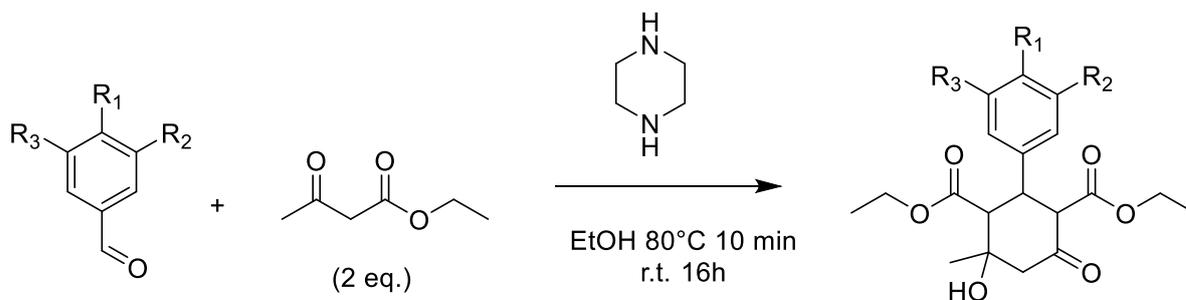
Representação molecular do composto 3, diéster de aril-ciclohexanona.

Rendimento isolado: (46%). ^1H NMR (300 MHz, Acetone- D_6) δ 7.49 (d, J 8.4 Hz, 2H), 7.33 (d, J 8.4 Hz, 2H), 4.03 to 3.94 (m, 4H), 3.91 (q, J 7.2 Hz, 2H), 3.42 (dd, J , 1.7/10.2 Hz, 1H), 2.91 (dd, J 1.9/14.0 Hz, 1H), 2.49 (d, J 14.0 Hz, 1H), 1.35 (s, 3H), 1.04 (t, J 7.15 Hz, 3H), 0.9 (t, J , 7.1 Hz, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, Acetone- D_6) δ 201.5, 172.3, 167.7, 139.2, 131.3, 130.6, 120.7, 72.9, 72.8, 61.9, 60.3, 60.1, 56.3, 53.1, 44.5, 13.5, 13.2. HRMS calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{BrO}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 427.0751, encontrado m/z 427.0765.

PROCEDIMENTO GERAL PARA A PRODUÇÃO DE CICLOHEXANONAS (4-11)

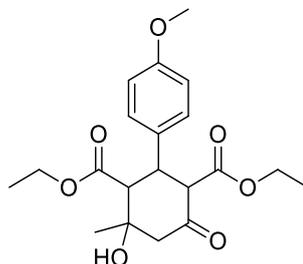
A um balão de fundo redondo foi adicionado o respectivo benzaldeído substituído com aril (1 equiv.) e etanol suficiente para fazer uma solução de 0,7 mol/L. Em seguida, foi adicionado acetoacetato de etil (2 equiv.). Posteriormente piperazina (0,5 equiv.) para a mistura. Após a dissolução de cada componente, a mistura foi aquecida ao refluxo durante 10 minutos e permaneceu sob agitação constante. Após arrefecimento e permanência durante a noite à temperatura ambiente, o precipitado sólido branco formado foi filtrado e recristalizado em etanol várias vezes até atingir a pureza. Os rendimentos dos produtos são demonstrados em cada caso específico.

Figura 17 - Representação molecular do procedimento geral para a produção das ciclohexanonas, dos compostos de 4 a 11.



	R ₁	R ₂	R ₃		R ₁	R ₂	R ₃
4	OMe	H	H	8	H	F	H
5	Cl	H	H	9	H	NO ₂	H
6	F	H	H	10	NO ₂	H	H
7	H	Cl	H	11	H	H	H

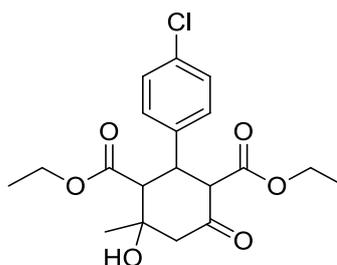
Figura 18 - Composto 4: *Dietil 4-hidroxi-2-(4-metoxifenil)-4-metil-6-oxociclohexano-1,3-dicarboxilato*.



Representação molecular do composto 4, diéster de aril-ciclohexanona.

Rendimento isolado: (47%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.16 (d, J 8.7 Hz, 2H), 6.83 (d, J 8.7 Hz, 2H), 4.10 to 3.97 (m, 3H), 3.97 to 3.91 (m, 1H), 3.89 (dd, J 2.7/7.3 Hz, 1H), 3.78 (s, 3H), 3.62 (d, J 12.5 Hz, 1H), 3.01 (d, J 12.2 Hz, 1H), 2.71 (d, J 14.2 Hz, 1H), 2.49 (d, J 14.2 Hz, 1H), 1.34 (s, 3H), 1.01 (t, J 7.1 Hz, 3H), 0.87 (t, J 7.2 Hz, 3H) ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 201.4, 173.9, 167.7, 159.0, 130.1, 129.1, 114.0, 72.9, 62.8, 61.0, 57.2, 55.3, 52.7, 44.5, 28.7, 14.0, 13.7. HRMS calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{O}_7$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 379.1751, encontrado m/z 379.1748.

Figura 19 - Composto 5: *Dietil 4-hidroxi-2-(4-clorofenil)-4-metil-6-oxociclohexano-1,3-dicarboxilato*.

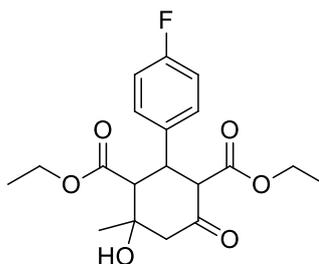


Representação molecular do composto 5, diéster de aril-ciclohexanona.

Rendimento isolado: (42%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.28 (d, J 8.3 Hz, 2H), 7.19 (d, J 8.3 Hz, 2H), 4.13 to 4.00 (m, 2H), 4.00 to 3.93 (m, 1H), 3.89 (ddd, J , 2.4/7.1/9.5 Hz, 2H), 3.02 (d, J 12.2 Hz, 1H), 2.72 (d, J 14.4 Hz, 1H), 2.51 (d, J 14.4 Hz, 1H), 1.35 (s, 3H), 1.08 (t, J , 7.2 Hz, 3H), 0.87 (t, J , 7.1 Hz, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 200.9, 173.6, 167.5,

136.8, 133.6, 129.5, 128.8, 73.0, 62.3, 56.8, 52.7, 44.5, 28.6, 14.0, 13.7. HRMS calculado para $C_{19}H_{24}ClO_6$ $[M+H]^+$ m/z 383.1256, encontrado m/z 383.1276.

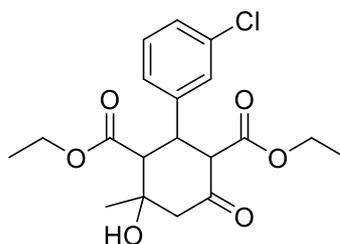
Figura 20 - Composto 6: *Dietil 4-hidroxi-2-(4-fluorofenil)-4-metil-6-oxociclohexano-1,3-dicarboxilato*.



Representação molecular do composto 6, diéster de aril-ciclohexanona.

Rendimento isolado: (31%). 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.27 to 7.21 (m, 2H), 7.05 to 6.95 (m, 2H), 4.11 to 3.96 (m, 4H), 3.90 (dd, J 2.5/7.3/9.6 Hz, 2H), 3.63 (d, J , 12.6 Hz, 1H), 3.02 (d, J 12.1 Hz, 1H), 2.73 (d, J 14.4 Hz, 1H), 2.51 (d, J 14.4 Hz, 1H), 1.36 (s, 3H), 1.07 (t, J , 7.1 Hz, 3H), 0.87 (t, J , 7.1 Hz, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 200.9, 173.6, 167.5, 133.9, 133.6, 129.7 (d, J 8.13 Hz), 128.9, 115.7, 115.4, 73.0, 62.6, 61.1, 57.9, 57.0, 52.7, 44.4, 28.6, 13.9, 13.7. HRMS calculado para $C_{19}H_{24}FO_6$ $[M+H]^+$ m/z 367.1551, encontrado m/z 367.1574.

Figura 21 - Composto 7: *Dietil 4-hidroxi-2-(3-clorofenil)-4-metil-6-oxociclohexano-1,3-dicarboxilato*.

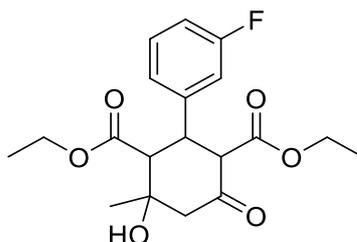


Representação molecular do composto 7, diéster de aril-ciclohexanona.

Rendimento isolado: (28%). 1H NMR (300 MHz, Acetone- D_6) δ 7.33 (dd, J 0.6/6.4 Hz, 1H), 7.31 (dd, J 2.1/7.1 Hz, 1H), 7.27 (dd, J 1.9/4.8 Hz, 1H), 4.04 to 3.95 (m, 4H), 3.91 (ddd, J 0.8/7.1/14.1 Hz, 2H), 3.45 (dd, J 3.4/8.6 Hz, 1H), 2.91 (dd, J 1.8/14.1 Hz, 1H), 2.84 (s, 1H), 2.80 (sl, 1H), 2.50 (d, J 14.0 Hz, 1H), 1.36, (s, 3H), 1.04 (t, J 7.1 Hz, 3H), 0.90 (t, J 7.1

Hz, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, Acetone- D_6) δ 201.4, 167.7, 142.2, 133.5, 129.9, 128.5, 127.3, 127.2, 72.9, 61.8, 60.2, 60.1, 56.2, 53.1, 44.7, 13.5, 13.2. HRMS calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{ClO}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 293.0939, encontrado m/z 293.0992.

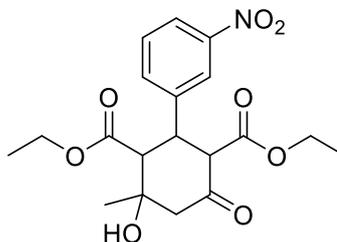
Figura 22 - Composto 8: *Dietil 4-hidroxi-2-(3-fluorofenil)-4-metil-6-oxociclohexano-1,3-dicarboxilato*.



Representação molecular do composto 8, diéster de aril-ciclohexanona.

Rendimento isolado: (42%) ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.26 to 7.21 (m, 3H), 7.18 to 7.11 (m, 1H), 4.16 to 3.80 (m, 5H), 3.62 (d, J 12.6 Hz, 1H), 3.01 (d, J 12.2 Hz, 1H), 2.72 (d, J 12.3 Hz, 1H), 2.50 (d, J 14.4 Hz, 1H), 1.34 (s, 3H), 1.08 (t, J 7.3 Hz, 3H), 0.86 (t, J 7.05 Hz, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 200.7, 173.5, 167.4, 140.3, 134.5, 129.9, 128.3, 128.0, 126.4, 73.0, 62.2, 61.2, 56.7, 52.7, 44.8, 28.6, 14.0, 13.7. HRMS calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{FO}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 367.1551, encontrado m/z 367.1535.

Figura 23 - Composto 9: *Dietil 4-hidroxi-2-(3-nitrofenil)-4-metil-6-oxociclohexano-1,3-dicarboxilato*.

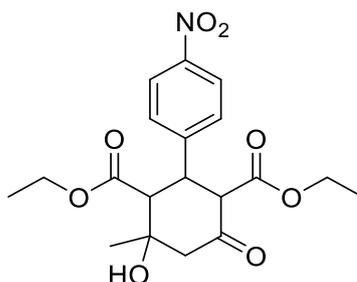


Representação molecular do composto 9, diéster de aril-ciclohexanona.

Rendimento isolado: (13%) ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.20 (s, 1H), 8.14 (d, J 8.1 Hz, 1H), 7.61 (d, J 7.6 Hz, 1H), 7.50 (t, J 7.7 Hz, 1H), 4.18 (t, J 12.4 Hz, 1H), 4.12 to 3.92 (m, 2H), 3.88 (q, J 7.16 Hz, 2H), 3.69 (d, J 12.5 Hz, 1H), 3.13 (d, J 12.2 Hz, 1H), 2.76 (d, J 14.3

Hz, 1H), 2.57 (d, J 14.3 Hz, 1H), 1.37 (s, 3H), 1.08 (t, J 7.1 Hz, 3H), 0.83 (t, J 7.1 Hz, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 200.1, 173.1, 167.2, 148.4, 140.7, 135.0, 129.7, 122.9, 122.7, 73.1, 62.0, 61.4, 61.3, 56.5, 52.7, 44.7, 28.5, 14.0, 13.7. HRMS calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{NO}_8$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 394.1496, encontrado m/z 394.1499.

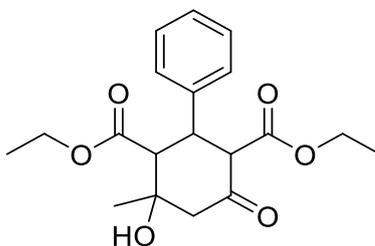
Figura 24 - Composto 10: *Dietil 4-hidroxi-2-(4-nitrofenil)-4-metil-6-oxociclohexano-1,3-dicarboxilato*.



Representação molecular do composto 10, diéster de aril-ciclohexanona.

Rendimento isolado: (55%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.19 (d, J 8.6 Hz, 2H), 7.47 (d, J 8.6 Hz, 2H), 4.20 (dd, J 2.8/11.0 Hz, 1H), 4.15 to 3.95 (m, 3H), 3.89 (ddd, J 3.3/7.2/14.3 Hz, 2H), 3.09 (d, J 12.1 Hz, 1H), 2.76 (d, J 14.3 Hz, 1H), 2.57 (d, J 14.1 Hz, 1H), 1.37 (s, 3H), 1.09 (t, J 7.1 Hz, 3H), 0.87 (t, J 7.2 Hz, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 200.1, 173.1, 170.5, 147.5, 145.9, 129.3, 123.9, 73.1, 61.8, 61.4, 61.3, 56.4, 52.8, 44.8, 28.5, 14.0, 13.8. HRMS calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{NO}_8$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 394.1496, encontrado m/z 394.1581.

Figura 25 - Composto 11: *Dietil 4-hidroxi-2-fenil-4-metil-6-oxociclohexano-1,3-dicarboxilato*.



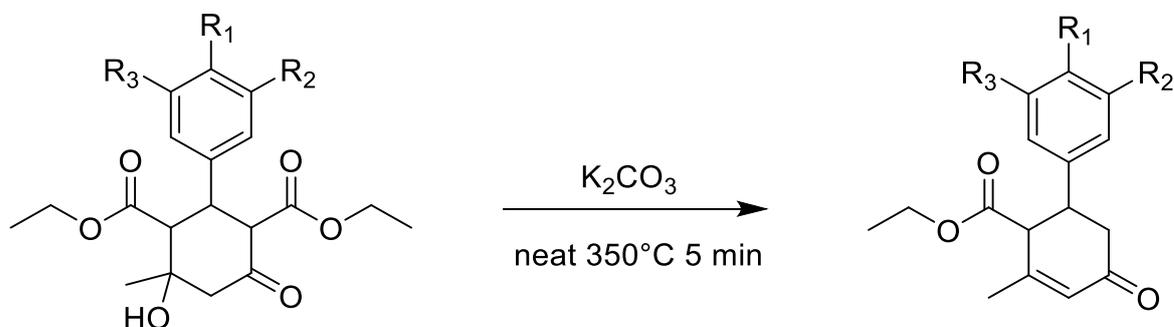
Representação molecular do composto 11, diéster de aril-ciclohexanona.

Rendimento isolado: (14%). $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.32 to 7.19 (m, 5H), 4.09 to 3.94 (m, 2H), 4.00 (dd, J 12.6/12.2 Hz, 1H), 3.91 to 3.79 (m, 2H), 3.69 (d, J 12.6 Hz, 1H), 3.04 (d, J 12.2 Hz, 1H), 2.71 (d, J 14.3 Hz, 1H), 2.51 (d, J 14.3 Hz, 1H), 1.34 (s, 3H), 1.03 (t, J 7.1 Hz, 3H), 0.79 (t, J 7.1 Hz, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 201.4, 173.9, 167.7, 138.1, 128.6, 128.1, 127.8, 73.1, 62.5, 61.0, 57.0, 52.7, 45.3, 28.6, 13.9, 13.6. HRMS calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 349.1646, encontrado m/z 349.1657.

PROCEDIMENTO GERAL PARA A PRODUÇÃO DE CICLOHEXANONAS (12 - 19)

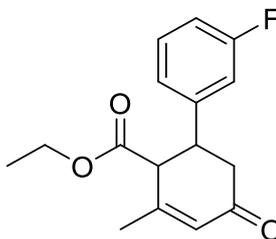
A um frasco resistente ao calor de 10 mL foi adicionado a respectiva ciclohexanona substituída com aril preparada nos métodos anteriores (1 equiv.) e carbonato de potássio (1 equiv.). O frasco foi selado e após um fluxo constante de gás argônio ter sido estabelecido, o frasco foi aquecido a 350°C com uma pistola de calor até o material de partida derreter completamente e parar de borbulhar (aproximadamente 5 minutos). O material resultante foi diluído com acetato de etila e submetido a cromatografia em coluna de sílica gel em gradiente de 10 a 20% de acetona em hexanos, resultando em produtos oleosos com leve coloração amarela. Os rendimentos dos produtos são demonstrados em cada caso específico.

Figura 26 - Representação molecular do procedimento geral para a produção das ciclohexanonas, dos compostos de 12 a 19.



	R ₁	R ₂	R ₃		R ₁	R ₂	R ₃
12	H	F	H	16	Cl	H	H
13	F	H	H	17	H	H	H
14	H	Cl	H	18	H	NO ₂	H
15	OMe	H	H	19	NO ₂	H	H

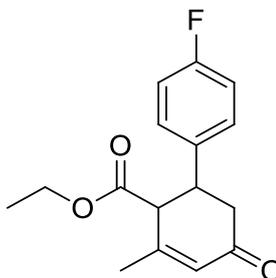
Figura 27 - Composto 12: *Etil 2-(3-fluorofenil)-4-metil-6-oxo-4-ciclohexeno-3-carboxilato*.



Representação molecular do composto 12, diéster de aril-ciclohexanona.

Rendimento isolado: (23%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.26 (dd, J 7.8/14.6 Hz, 1H), 6.98 (d, J 7.8 Hz, 1H), 6.95 to 6.88 (m, 2H), 6.03 (sl, 1H), 4.05 (q, J 7.1 Hz, 2H), 3.69 to 3.58 (m, 1H), 3.54 (d, J 9.4 Hz, 1H), 2.69 (dd, J 4.7/16.7 Hz, 1H), 2.58 (dd, J 11.1/16.7 Hz, 1H), 1.96 (s, 3H), 1.07 (t, J 7.1 Hz, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 196.7, 171.1, 156.1, 143.5, 143.4, 130.3 (d, J 8.2 Hz), 128.4, 122.9 (d, J 2.7 Hz), 114.4 (d, J 10.1 Hz), 114.1 (d, J 10.1 Hz), 61.3, 54.0, 43.7, 42.5, 22.3, 13.9. HRMS calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{F}\text{O}_3$ $[\text{M}^+ \text{Na}]^+$ m/z 299.1054, encontrado m/z 299.1050.

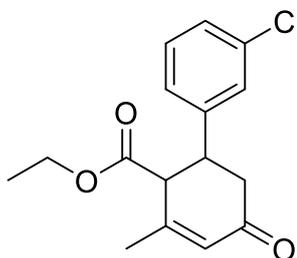
Figura 28 - Composto 13: *Etil 2-(4-fluorofenil)-4-metil-6-oxo-4-ciclohexeno-3-carboxilato*.



Representação molecular do composto 13, diéster de aril-ciclohexanona.

Rendimento isolado: (17%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.18 (dd, J 8.5/5.4 Hz, 2H), 7.95 to 6.94 (m, 3H), 6.03 (sl, 1H), 4.04 (q, J 7.1 Hz, 2H), 3.68 to 3.53 (m, 1H), 3.52 (d, J 9.5 Hz, 1H), 2.68 (dd, J 4.8/16.6 Hz, 1H), 2.61 (dd, J 5.4/16.6 Hz, 1H), 1.96 (sl, 3H), 1.07 (t, J 7.1 Hz, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 197.0, 171.2, 156.3, 136.6 (d, J 3.2 Hz), 128.8 (d, J 8.15 Hz), 115.7, 115.5, 61.2, 54.4, 43.4, 42.9, 22.3, 14.0. HRMS calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{F}\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 277.1234, encontrado m/z 277.1228.

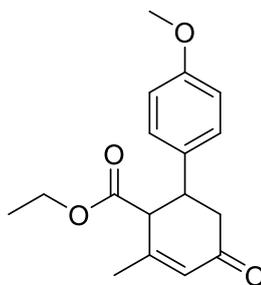
Figura 29 - Composto 14: *Etil 2-(3-clorofenil)-4-metil-6-oxo-4-ciclohexeno-3-carboxilato*.



Representação molecular do composto 14, diéster de aril-ciclohexanona.

Rendimento isolado: (47%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.26 to 7.20 (m, 3H), 7.14 to 7.01 (m, 1H), 6.07 (t, J 1.3 Hz, 1H), 4.09 (q, J 7.2 Hz, 2H), 3.65 (ddd, J 4.8/9.4/11.4 Hz, 1H), 3.54 (d, J 9.6 Hz, 1H), 2.72 (dd, J 4.7/16.6 Hz, 1H), 2.61 (dd, J 11.2/16.5 Hz, 1H), 1.99 (t, J 1.1 Hz, 3H), 1.12 (t, J 7.1 Hz, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 196.7, 171.0, 156.0, 134.6, 130.1, 128.4, 127.7, 127.6, 125.5, 61.4, 54.1, 43.7, 42.5, 22.4, 14.0. HRMS calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{ClO}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 293.0939, encontrado m/z 293.0957.

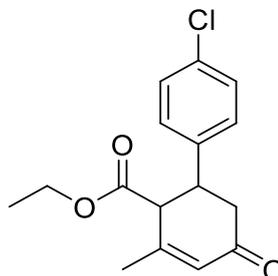
Figura 30 - Composto 15: *Etil 2-(4-metoxifenil)-4-metil-6-oxo-4-ciclohexeno-3-carboxilato*.



Representação molecular do composto 15, diéster de aril-ciclohexanona.

Rendimento isolado: (32%) ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.15 (d, J 8.6 Hz, 2H), 6.85 (d, J 8.6 Hz, 2H), 6.06 (t, J 1.5 Hz, 1H), 7.07 (q, J 7.2 Hz, 2H), 2.71 (dd, J 4.6/16.6 Hz, 1H), 2.64 (d, J 10.9 Hz, 1H), 1.99 (t, J 1.1 Hz, 3H), 1.61 (s, 3H), 1.12 (t, J 7.2 Hz, 3H), ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3) δ 197.5, 171.4, 158.8, 156.4, 133.0, 128.4, 128.3, 114.1, 61.2, 55.3, 54.7, 43.1, 22.4, 14.0. HRMS calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 289.1434, encontrado m/z 289.1457.

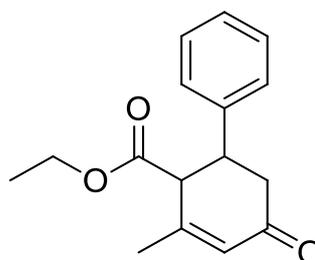
Figura 31 - Composto 16: *Etil 2-(4-clorofenil)-4-metil-6-oxo-4-ciclohexeno-3-carboxilato*.



Representação molecular do composto 16, diéster de aril-ciclohexanona.

Rendimento isolado: (6%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.31 (d, J 8.4 Hz, 2H), 7.17 (d, J 8.4 Hz, 2H), 6.07 (t, J 1.3 Hz, 1H), 4.08 (q, J 7.2 Hz, 2H), 3.66 (ddd, J 4.8/9.6/11.4 Hz, 1H), 3.54 (d, J 9.6 Hz, 1H), 2.72 (dd, J 4.8/16.6 Hz, 1H), 2.60 (dd, J 11.4/16.6 Hz, 1H), 2.00 (t, J 1.1 Hz, 3H), 1.31 (t, J 7.2 Hz, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 196.8, 171.1, 156.1, 139.4, 133.2, 129.0, 128.6, 128.4, 61.4, 54.2, 43.4, 42.7, 22.4, 14.0. HRMS calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{ClO}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 293.0939, encontrado m/z 293.0992.

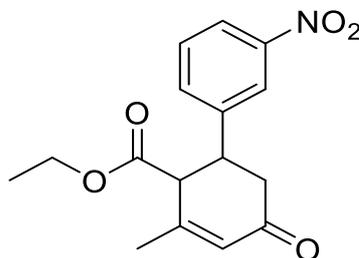
Figura 32 - Composto 17: *Etil 2-fenil-4-metil-6-oxo-4-ciclohexeno-3-carboxilato*.



Representação molecular do composto 17, diéster de aril-ciclohexanona.

Rendimento isolado: (52%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.28 to 7.16 (m, 5H), 5.99 (t, J 1.4 Hz, 1H), 3.97 (q, J 7.1 Hz, 2H), 3.58 (dd, J 5.5/9.7 Hz, 1H), 3.54 (d, J 9.0 Hz, 1H), 2.62 (d, J 5.5 Hz, 1H), 2.60 (dd, J 1.7/9.0 Hz, 1H), 1.91 (s, 3H), 0.99 (t, J 7.1 Hz, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 197.2, 171.3, 156.4, 140.9, 128.7, 127.4, 127.2, 127.1, 61.1, 54.2, 44.1, 42.8, 22.3, 13.9. HRMS calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 259.1329, encontrado m/z 259.1338.

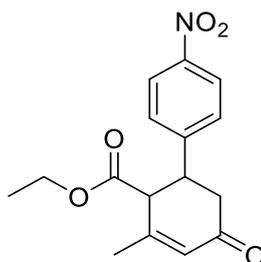
Figura 33 - Composto 18: *Etil 2-(3-nitrofenil)-4-metil-6-oxo-4-ciclohexeno-3-carboxilato*.



Representação molecular do composto 18, diéster de aril-ciclohexanona.

Rendimento isolado: (50%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.17 to 8.12 (m, 2H), 7.6 to 7.5 (m, 2H), 6.09 (t, J 1.5 Hz, 1H), 4.09 (q, J 7.2 Hz, 2H), 3.81 (dd, J 5,6/10,1 Hz, 1H), 3.67 (d, J 9.3 Hz, 1H), 2.76 (dd, J 5.6/16.6 Hz, 1H), 2.69 (dd, J 10.1/16.6 Hz, 1H), 2.02 (t, J 1.2 Hz, 3H), 1.12 (t, J 7.2 Hz, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 196.1, 170.8, 155.9, 148.4, 143.0, 133.7, 129.9, 128.4, 122.6, 122.2, 61.5, 53.7, 43.5, 42.3, 22.3, 13.9. HRMS calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{NO}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 304.1179, encontrado m/z 304.1205.

Figura 34 - Composto 19: *Etil 2-(4-nitrofenil)-4-metil-6-oxo-4-ciclohexeno-3-carboxilato*.



Representação molecular do composto 19, diéster de aril-ciclohexanona.

Rendimento isolado: (54%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.12 (d, J 8.8 Hz, 2H), 7.39 (d, J 7.39 Hz, 2H), 6.01 (t, J 1.7 Hz, 1H), 4.02 (dq, J 2.5/7.1 Hz, 2H), 3.80 to 3.72 (m, 1H), 3.59 (d, J 9.3 Hz, 1H), 2.68 (dd, J 5.4/16.7 Hz, 1H), 2.60 (dd, J 10.6/16.7 Hz, 1H), 1.95 (t, J 1.2 Hz, 3H), 1.05 (t, J 7.1 Hz, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 196.0, 170.7, 155.9, 148.3, 147.2, 128.4, 124.0, 123.7, 61.5, 53.5, 43.7, 42.1, 22.3, 13.9. HRMS calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{NO}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 304.1179, encontrado m/z 304.1205.

CARACTERIZAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS PRODUZIDAS (1-19)

Uma vez isoladas, todas as substâncias obtidas foram caracterizadas por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Espectrometria de Massa de Alta Resolução (HRMS). Os dados de NMR foram obtidos usando um Fourier-300® da Bruker (Ettlingen, Baden-Württemberg, Alemanha), operando a 300MHz para hidrogênio e 75MHz para o carbono, os dados de NMR obtidos foram processados usando o software Topspin® v.4.0.9 da Bruker (Ettlingen, Baden-Württemberg, Alemanha). O HRMS foi obtido usando um Xevo-G2S-QToF® da Waters, operando no modo positivo na faixa de 150 a 1500Da. Usando leu-encefalina como massa de bloqueio. Os dados HRMS obtidos foram processados no software Mass Lynx® V4.2 da Waters.