

Campus Realengo
Curso de Graduação em Farmácia

Alan Lourenço Bastos Monteiro

**Alcamidas de *Achillea
millefolium* e seu potencial
antinociceptivo: via estudos *in
silico* de interação no sistema
endocanabinoide.**

Rio de Janeiro

2023

ALAN LOURENÇO BASTOS MONTEIRO

**ALCAMIDAS DE *ACHILLEA MILLEFOLIUM* E SEU POTENCIAL
ANTINOCICEPTIVO: VIA ESTUDOS *IN SILICO* DE INTERAÇÃO NO SISTEMA
ENDOCANABINOIDE.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Anne Caroline Candido Gomes e Prof^a. Dr^a. Naomi Kato Simas

Rio de Janeiro

2023

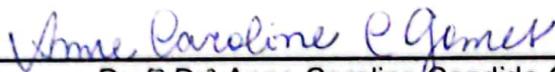
ALAN LOURENÇO BASTOS MONTEIRO

**ALCAMIDAS DA ESPÉCIE *ACHILLEA MILLEFOLIUM*: POTENCIAL
ANTINOCICEPTIVO VIA ESTUDOS *IN SILICO* DE INTERAÇÃO NO
SISTEMA ENDOCANABINOIDE**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto Federal do Rio
de Janeiro, como requisito parcial para a
obtenção do grau de Bacharel em
Farmácia.

Aprovado em: 13/12/2023.

Banca Examinadora



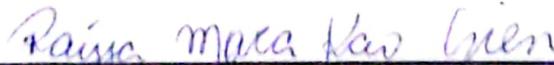
Profª Drª Anne Caroline Candido Gomes
(Orientadora – IFRJ / Campus Realengo)



Profª Drª Naomi Kato Simas
(Coorientadora – PPGCG/UFRJ)



Prof Dr Murilo Marinho de Castro Lima
(Membro Interno - IFRJ / Campus Realengo)



MSc. Raissa Kao Yien
(Membro externo – PPGCF/UFRJ)

Rio de Janeiro
2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Elaborada por Bibliotecária

Monteiro, Alan Lourenço Bastos

Alcamidas de *Achillea millefolium* e seu potencial antinociceptivo via estudo *in silico* de interação no sistema endocanabinoide./ Alan Lourenço Bastos Monteiro, 2023.

63f.

Orientadora: Profa. Dra. Anne Caroline Candido Gomes e Prof^a. Dr^a. Naomi Kato Simas

Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em Farmácia) – Instituto Federal do Rio de Janeiro, 2023.

1. Estudos *in silico*. 2. *Achillea millefolium*. 3. Alcamidas. 4. Receptores endocanabinoides 5. antinocicepção I. Instituto Federal do Rio de Janeiro. Campus Realengo. II. Monteiro, Alan Lourenço Bastos.

COBIB/CReal CDU

MONTEIRO, Alan Lourenço Bastos. Alcamidas de *Achillea millefolium* e seu potencial antinociceptivo: Via estudos *in silico* de interação no sistema endocanabinoide. 63f. Trabalho de Conclusão de Curso. Graduação em Farmácia, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), Campus Realengo, Rio de Janeiro, RJ, 2023.

RESUMO

Achillea millefolium é uma planta da família Asteraceae, originária da Europa e oeste da Ásia, e atualmente distribuída pelo mundo todo. No Brasil, essa planta é encontrada nas regiões de Mata Atlântica. Popularmente são realizadas infusões de suas partes aéreas nas quais são aplicadas em diferentes tratamentos, como, doenças do fígado, problemas respiratórios, dores, entre outros. Essa planta é rica em compostos bioativos, destacando-se as alcamidas, que são formadas biossinteticamente por uma porção ácido graxo e uma porção amino. As alcamidas apresentam grande semelhança com a anandamida, que é um ligante endógeno do sistema endocanabinoide: um sistema complexo, utilizado no tratamento de diversas patologias, como ansiedade, depressão e na percepção da dor. Ele é composto pelos receptores CB1 e CB2, e quatro ligantes endógenos, dentro eles, os mais importantes são: a anandamida e o 2-araquidonilglicerol. O sistema endocanabinoide tem sido de grande importância para o tratamento da dor, haja vista que grande parte dos tratamentos são realizados com opioides, antidepressivos e anticonvulsivantes, que apresentam uma série de efeitos adversos. Com isso, houve o interesse de estudar novos alvos para dor, realizando-se um estudo de *docking* nos receptores CB1 e CB2. Portanto, o objetivo deste trabalho é realizar uma investigação fitoquímica das raízes de *Achillea millefolium*, bem como avaliar suas alcamidas em receptores canabinoides CB1 e CB2 por meio de estudos *in silico* de ancoragem molecular. A partir dos experimentos foram encontradas as alcamidas: isobutilamida do ácido undeca-2*E*-4*E*-dieno-8,10-diinoico; piperidinamida do ácido deca-2*E*,4*E*,dieno-8,10-diinoico, isobutilamida do ácido deca 2*E*,4*E*-8*Z*-triinoico, isobutilamida do ácido deca-2*E*-4*E*-dienoico; piperidinamida do ácido deca 2*E*,4*E*-dienoico na partição em hexano do extrato hidroalcoólico das raízes da *A.millefolium*. Após identificadas, essas alcamidas foram avaliadas em CB1 e CB2 e foi observada interação com aminoácidos Phe268, Cys386, Trp279, Val196, Phe170, Met103, leu359, Phe102, Leu193 importantes para CB1, assim como a anandamida, para CB2 também foram visto interações com os aminoácidos Phe117,Phe183,Phe91, Phe94, His95, Val113, podendo se destacar a alcamida piperidinamida do ácido deca-2*E*,4*E*,dieno-8,10-diinoico que teve a melhor interação com CB1 com energia de -7,5kcal/mol e a piperidinamida do ácido deca-2*E*,4*E*,dieno-8,10-diinoico e a piperidinamida do ácido deca 2*E*,4*E*-dienoico para CB2 com energias de -8,4kcal/mol e -7,9kcal/mol, respectivamente. Diante dos resultados, foi possível detectar as alcamidas por meio da técnica CLAE-ESI-EM e observou-se um potencial nas alcamidas da espécie *Achillea millefolium* para o tratamento da dor. Como perspectivas futuras se pretende dar continuidade na elucidação estrutural, aplicando as técnicas EM-EM e isolamento das alcamidas desta espécie.

Palavras-chave: *Docking*, ancoragem molecular, dor, alquilamidas, nocicepção, canabinoides.

MONTEIRO, Alan Lourenço Bastos. Alkamides from *Achillea millefolium* and their antinociceptive potential: Through in silico interaction studies in the endocannabinoid system. 62p. Undergraduate Thesis. Pharmacy Degree, Federal Institute of Education, Science and Technology of Rio de Janeiro (IFRJ), Realengo *Campus*, Rio de Janeiro, RJ, 2023.

ABSTRACT

Achillea millefolium is a plant from the Asteraceae family, originating in Europe and West Asia, and currently distributed worldwide. In Brazil, this plant is found in the Atlantic Forest regions. Popularly, infusions of its aerial parts are made and applied in various treatments such as liver diseases, respiratory problems, pain, among others. This plant is rich in bioactive compounds, with alkamides being prominent. Alkamides are biosynthetically formed by a fatty acid portion and an amino portion. Alkamides bear a striking resemblance to anandamide, an endogenous ligand of the endocannabinoid system: a complex system used in the treatment of various pathologies such as anxiety, depression, and pain. It consists of CB1 and CB2 receptors and four endogenous ligands, with the most important being anandamide and 2-arachidonoylglycerol. The endocannabinoid system has been of great importance in pain treatment, considering that many treatments involve opioids, antidepressants, and anticonvulsants, which present a series of adverse effects. This led to an interest in studying new targets for pain by conducting a docking study on CB1 and CB2 receptors. Therefore, the objective of this work is to conduct a phytochemical investigation of the roots of *Achillea millefolium*, as well as to evaluate its alkamides on CB1 and CB2 cannabinoid receptors through in silico molecular docking studies. From the experiments, the following alkamides were found in the hexane partition of the hydroalcoholic extract of *A. millefolium* roots: isobutylamide of undeca-2E-4E-dieno-8,10-diynoic acid; piperidinamide of deca-2E,4E-dieno-8,10-diynoic acid; isobutylamide of deca-2E,4E-8Z-trienoic acid; isobutylamide of deca-2E-4E-dienoic acid; piperidinamide of deca-2E,4E-dienoic acid. Once identified, these alkamides were evaluated on CB1 and CB2, showing interactions with amino acids Phe268, Cys386, Trp279, Val196, Phe170, Met103, Leu359, Phe102, Leu193 important for CB1. Similarly, for CB2, interactions were observed with amino acids Phe117, Phe183, Phe91, Phe94, His95, Val113. Notably, the piperidinamide of deca-2E,4E-dieno-8,10-diynoic acid showed the best interaction with CB1 with an energy of -7.5 kcal/mol, and the piperidinamide of deca-2E,4E-dieno-8,10-diynoic acid and piperidinamide of deca-2E,4E-dienoic acid showed energies of -8.4 kcal/mol and -7.9 kcal/mol, respectively, for CB2. Based on these results, alkamides were detected using the CLAE-ESI-EM technique, indicating the potential of *Achillea millefolium* alkamides for pain treatment. Future perspectives include further structural elucidation using EM-EM techniques and isolation of alkamides from this species.

Keywords: Docking; Molecular Docking; Pain; Alkylamides; Nociception; Cannabinoids.

AGRADECIMENTOS

Neste momento gostaria de agradecer primeiramente a Deus, pois tem me dado forças todos os dias para trabalhar e estudar, mesmo nos momentos mais cansativos da minha vida. Segundamente gostaria de agradecer aos meus pais que nunca me deixaram faltar nada, sempre batalharam na vida para me dar uma melhor escola e o melhor conforto e aos meus irmãos João Arley e Alexandre Bastos na qual dedico esse trabalho a eles como fonte de inspiração.

Além disso, ao redigir esse trabalho, me veio lembranças da minha infância, na qual sonhava em ser médico ou cientista e gratamente o universo me escutou, então não posso deixar de prestigiar também as professoras Anne Caroline e Naomi Kato que me deram de presente uma experiência única por meio da iniciação científica, foi através desta oportunidade que ampliou meus conhecimentos e atualmente me fez escrever este trabalho de conclusão de curso.

Agradeço também aos meus amigos e aos meus professores do IFRJ que estiveram comigo nesta jornada, são tantos, mas em especial, a Alcione Maia, Sarah Miqueas, Milene Candido, Rita Mesquita, Milena Figueiredo, Chayene Alencar, Karoline Silva, Layla Cler, pessoas que levarei para a vida toda.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CB1 e CB2	Receptores endocanabinoides
CLAE-ESI-EM	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas ionização <i>eletro-spray</i>
PDB	Banco de Dados de Proteínas
OMS	Organização Mundial de Saúde
UV	Ultravioleta

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Planta <i>Achillea millefolium</i>	13
Figura 2 - Estrutura molecular básica das alcanidas.....	15
Figura 3 - Ilustração da provável rota biossintética das alcanidas.....	16
Figura 4 - Alcanidas no extrato das partes subterrâneas de <i>A. millefolium</i>	17
Figura 5 - Ilustração das etapas da fisiologia da dor.....	19
Figura 6 - Ilustração do esquema farmacológico no tratamento da dor.....	20
Figura 7 - Estrutura química das moléculas endógenas.....	22
Figura 8 - Biossíntese e inativação dos endocanabinoides.....	23
Figura 9 - Modelo simplificado de chave-fechadura proposto por Fisher.....	25
Figura 10 - Esquemas dos modelos de reconhecimento molecular,.....	25
Figura 11 - Fórmula da energia livre de Gibbs.....	26
Figura 12 - Fórmula da constante de associação.....	27
Figura 13 - Cromatograma obtido por CLAE referentes aos picos majoritários da partição em hexano das raízes de <i>Achillea millefolium</i>	33
Figura 14 - Espectros de UV referente a cada pico.....	34
Figura 15 - Espectro de massas no tempo de retenção 15,80 min.....	35
Figura 16 - Estrutura química da isobutilamida do ácido undeca-2 <i>E</i> -4 <i>E</i> -dieno-8,10-diinoico [M+H] 230.....	35
Figura 17 - Espectro de massas no tempo de retenção 19,80 min.....	36
Figura 18 - Estrutura química da piperidinamida do ácido deca-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,dieno-8,10-diinoico.....	36
Figura 19 - Espectro de massas no tempo de retenção 22,69 min.....	37
Figura 20 - Estrutura química da isobutilamida do ácido deca 2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> -8 <i>Z</i> -trienoico.....	37
Figura 21 - Espectro de massas no tempo de retenção 32,10 min.....	38
Figura 22 - Estrutura química da isobutilamida do ácido deca-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> -dienoico.....	38
Figura 23 - Espectro de massas no tempo de retenção 37,34 min.....	39
Figura 24 - Estrutura química da piperidinamida do ácido deca 2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> -dienoico.....	39
Figura 25 - Estrutura química do análogo sintético.....	41

Figura 26 - Reancoragem do ligante cristalográfico (ZDG).....	42
Figura 27 - Ancoragem da anandamida no receptor CB1.....	43
Figura 28 - Estrutura da isobutilamida do ácido undeca-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> -dieno-8,10-diinoico e ancoramentos no receptor CB1.....	44
Figura 29 - Estrutura da piperidinamida do ácido deca-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> -8,10-diinoico e ancoramentos no receptor CB1.....	45
Figura 30 - Isobutilamida do ácido deca 2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> -8 <i>Z</i> - trienoico e ancoramentos no receptor CB1.....	46
Figura 31 - isobutilamida do ácido deca-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> -dienoico e ancoramentos no receptor CB1.....	47
Figura 32 - Piperidinamida do ácido deca 2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> -dienoico e ancoramentos no receptor CB1.....	48
Figura 33 - Estrutura 2D do ligante cristalográfico 9JU.....	50
Figura 34 - Reancoragem do ligante cristalográfico (9JU) (PDB: 5ZTY).....	51
Figura 35 - Ancoragem da anandamida no receptor CB2.....	52
Figura 36 - isobutilamida do ácido undeca-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> -dieno-8,10-diinoico e ancoramentos no receptor CB2.....	53
Figura 37 - piperidinamida do ácido deca-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> -8,10-diinoico e ancoramentos no receptor CB2.....	54
Figura 38 - isobutilamida do ácido deca 2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> -8 <i>Z</i> - trienoico e ancoramentos no receptor CB2.....	55
Figura 39 - isobutilamida do ácido deca-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> -dienoico e ancoramentos no receptor CB2.....	56
Figura 40 - piperidinamida do ácido deca 2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> -dienoico e ancoramentos no receptor CB2.....	57

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Rendimento das partições da <i>A. millefolium</i>	32
---	----

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1 - Portais e programas de acesso para a realização do ancoramento molecular.....	27
--	----

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Espectros de massa das alcanidas da espécie <i>Achillea millefolium</i> e seus respectivos íons pseudomoleculares.....	40
Tabela 2 - Energia de interação entre o ligante cristalográfico, anandamida e alcanidas no receptor CB1 e os aminoácidos envolvidos na interação.....	49
Tabela 3 - Energia de interação entre o ligante cristalográfico, anandamida e alcanidas no receptor CB2 e aminoácidos envolvidos na interação.....	58

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
1.1 A ESPÉCIE <i>ACHILLEA MILLEFOLIUM L.</i>	12
1.1.1 Aspectos de uso medicinal.....	13
1.2 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	14
1.2.1 Alcamidas.....	15
1.3 DOR E TRATAMENTO CONVENCIONAL.....	18
1.4 SISTEMA ENDOCANABINOIDE.....	21
1.5 <i>DOCKING</i> E SUAS APLICAÇÕES.....	24
1.6 OBJETIVOS.....	29
1.6.1 Objetivo Geral.....	29
1.6.2 Objetivos Específicos.....	29
2 DESENVOLVIMENTO.....	30
2.1 METODOLOGIA.....	30
2.1.1 Obtenção da Espécie Vegetal.....	30
2.1.2 Obtenção do extrato bruto.....	30
2.1.3 Realização da partição líquido-líquido.....	30
2.1.4 Monitoramento das alcamidas por CLAE/ESI-EM.....	30
2.1.5 Ancoramento das alcamidas em receptores CB1 e CB2.....	31
2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
2.2.1 Obtenção do extrato das raízes e partições.....	31
2.2.2 Análise por CLAE-ESI-EM.....	32
2.2.3 <i>Docking</i> molecular.....	41
2.2.3.1 Reancoragem do ligante cristalográfico e ancoragem da anandamida e alcamidas em CB1.....	41
2.2.3.2 Reancoragem do ligante cristalográfico e Ancoragem da anandamida e alcamidas em CB2.....	49
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	59
REFERÊNCIAS.....	60

1 INTRODUÇÃO

1.1 A ESPÉCIE *ACHILLEA MILLEFOLIUM* L.

A família Asteraceae possui aproximadamente 1.100 gêneros e 25.000 espécies distribuídas em regiões tropicais, subtropicais e temperadas. No Brasil, existem cerca de 180 gêneros. Essas plantas têm capacidade de crescer tanto em áreas ao nível do mar quanto em altas montanhas, colonizando diversos habitats, exceto os aquáticos, pois são raras as espécies aquáticas. Além disso, são mais comuns em regiões áridas do que em florestas tropicais úmidas (GREGIO, 2006).

Nesta família, destaca-se a espécie *Achillea millefolium*, uma planta nativa da região da Europa e da Ásia, que também pode ser encontrada em várias regiões do planeta, incluindo, as Américas. Sua etimologia “*Achillea*” é advinda do grego, que remete a “Aquiles”, e “*millefolium*” a mil folhas, devido a numerosos segmentos de sua folhagem (KUMAR, 2021; TORRES-MOLINA, 2001).

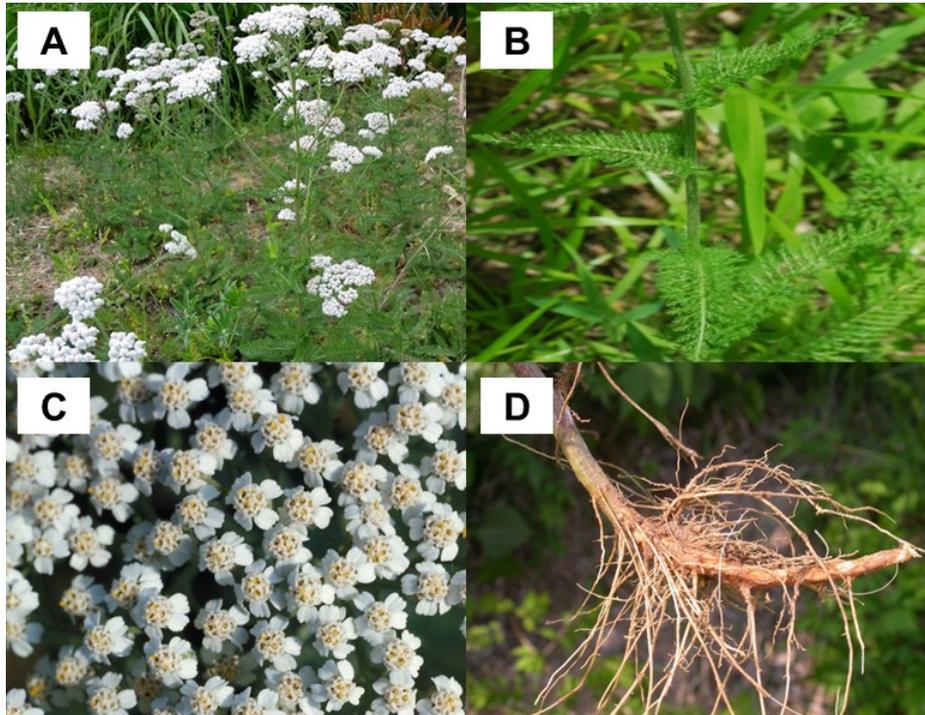
No Brasil, é encontrada nas regiões sudeste e sul, mais especificamente em regiões de Cerrado, Mata atlântica e Pampas, sendo chamada de diversos nomes, tais como: Erva-dos-carpinteiros; Feiteirinha; Erva de cortaduras; Novalgina; pronto-alívio; Milefólio; Mil-folhas (FERNANDES, 2023).

No que diz respeito à sua macro-morfologia, a *Achillea millefolium* é caracterizada como uma erva ou subarbusto perene (FERNANDES, 2023), com tamanho variando entre 0,5 a 1,0 metros. Suas raízes, em geral, são rizomatosas, fibrosas e finas (GREGIO, 2006), enquanto os caules podem ser eretos, ramificados ou simples. As folhas, com comprimento entre 5 a 20 centímetros (LAKSHMI, 2011), podem ser sésseis, dispostas de maneira distal, levemente fechadas ou gradualmente reduzidas, ou então pecioladas, ou seja, próximas umas das outras.

As flores estão dispostas em formato de discos com raios ínfimos, nas cores brancas, levemente rosadas ou arroxeadas, com aproximadamente 2 milímetros de comprimento (TROCK, 1753). As pétalas são densamente agrupadas em cachos achatados (LAKSHMI, 2011), enquanto os receptáculos possuem palha seca, fina e membranácea, com terminais corimbosas, situando-se no mesmo plano (TROCK, 1753). A planta desenvolve frutos secos e duros de sabor amargo, contendo apenas uma semente (GREGIO, 2006).

A figura 1 mostra a espécie *Achillea millefolium*, destacando detalhes de suas partes aéreas, caule, raízes.

Figura 1 - Planta *Achillea millefolium*.



Legenda: A) Visão geral (BRAGA, 2018); B) Folhas e caule (TURNER, 2015); C) Vista superior de flores brancas (ATSKEVICH, 1985); D) Raízes (DAVIDSE, 2007).

1.1.1 Aspectos de uso medicinal

Os produtos naturais desempenharam um papel crucial como fontes de agentes medicinais ao longo da história, e a medicina moderna continua a se apoiar no conhecimento tradicional para abordar as doenças humanas. Terapias tradicionais, como a Medicina Tradicional Chinesa, a Medicina Indiana (Ayurvédica) e o uso de plantas medicinais nas Américas, têm demonstrado ser fontes valiosas de compostos biologicamente ativos e possíveis medicamentos inovadores (SETZER, 2018).

Nesse contexto, *Achillea millefolium* é mencionada desde a Antiguidade, em que era utilizada por Aquiles na Guerra de Troia, conforme descrito na obra na *Ilíada* de Homero, para tratar as feridas dos soldados. Além disso, os persas também a empregavam como agente tônico, anti-inflamatório, antiespasmódico, sudorífero,

diurético, estimulante menstrual, tratamento para pneumonias e dores reumáticas e cicatrização de feridas (SAEIDNIA, 2011).

Estudos recentes têm demonstrado diversas propriedades farmacológicas de *Achillea millefolium*, corroborando com o uso tradicional da espécie. Destaca-se um estudo clínico conduzido por Jenabi (2015), que demonstrou que o chá elaborado a partir do pó das flores aliviou a intensidade da dor em mulheres com dismenorreia primária. Outro trabalho evidenciou que extratos da planta mostraram eficácia em produtos para cicatrização da pele (STRZEPEK-GOMÓLKA *et al*, 2021).

No Brasil, a RDC nº 10 de 2010 da ANVISA preconiza o uso da infusão das partes aéreas de *Achillea millefolium* para condições como falta de apetite, dispepsia, febre, inflamações e cólicas, sendo adequado tanto para adultos quanto para crianças (BRASIL, 2010). Além disso, o Formulário de Fitoterápicos, Segunda Edição, indica a utilização dessa planta na forma de preparação extemporânea e tintura, para alívio de sintomas dispépticos, com efeitos colerético, antiflatulento, antiespasmódico, anti-inflamatório, contribuindo também para o alívio de cólicas menstruais leves e tratamento local de pequenas lesões cutâneas superficiais (BRASIL, 2021).

1.2 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

O metabolismo é caracterizado como um conjunto de reações químicas que ocorrem dentro das células. Nos vegetais, as enzimas presentes nesta unidade desempenham um papel fundamental nas rotas metabólicas, que podem ser classificadas em primárias e secundárias. As primárias utilizam nutrientes para sustentar as funções celulares, como a produção de energia e a síntese de macromoléculas essenciais para a sobrevivência (SIMÕES *et al*, 1999). Por outro lado, as rotas metabólicas secundárias são responsáveis pelo processo de defesa química dos organismos e podem variar entre as espécies, sendo sintetizadas em pequena escala (CARVALHO, 1994).

Na família Asteraceae, observa-se grande heterogeneidade na produção de metabólitos secundários, tornando-se particularmente interessante para a descoberta de novos compostos ativos com potencial atividade biológica. Dentre os

metabólitos secundários mais comuns nessa família estão as cumarinas, flavonoides e sesquiterpenos (BIZÃO, 2002).

Na espécie *Achillea millefolium* foram relatados como constituintes químicos: sesquiterpenos lactonas (aquilina, aquilicina), lignanas e cumarinas lignanas (Fraxidina) (CZECH, 2023; IVANOVIC, 2022; LAKSHMI, 2011; RAUCHENSTEINER, 2004).

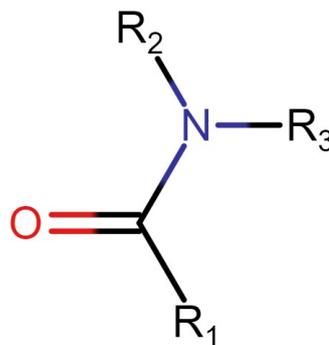
1.2.1 Alcamidas

As alcamidas, também conhecidas como N-alquilamidas, constituem um grupo de compostos naturais bioativos que têm despertado considerável interesse devido às suas diversas atividades biológicas, tais como ação antimicrobiana, antiviral, larvicida, diurética, analgésica, imunomoduladora e canabinomimética (MOLINA-TORRES, 2001), apresentando potencial para serem aplicadas em alimentos funcionais e produtos cosméticos.

A diversidade estrutural das alcamidas é ampla, sendo identificadas em mais de 25 famílias botânicas, entre as quais se destacam Asteraceae, Piperaceae, Rutaceae, Brassicaceae, Euphorbiaceae, Aristolochiaceae, Menispermaceae e Poaceae (BOONNEN *et al*, 2012; GREGER, 2015).

Estruturalmente, as N-alquilamidas são, essencialmente, amidas de ácidos graxos (Fig. 2) e são classificadas com base no tipo de ligação entre carbonos que possuem, dividindo-se em olefínicas (contendo ligações duplas) e acetilênicas (com pelo menos uma ligação tripla). Além disso, essas substâncias podem apresentar anéis homocíclicos ou heterocíclicos (SANTOS, 2015).

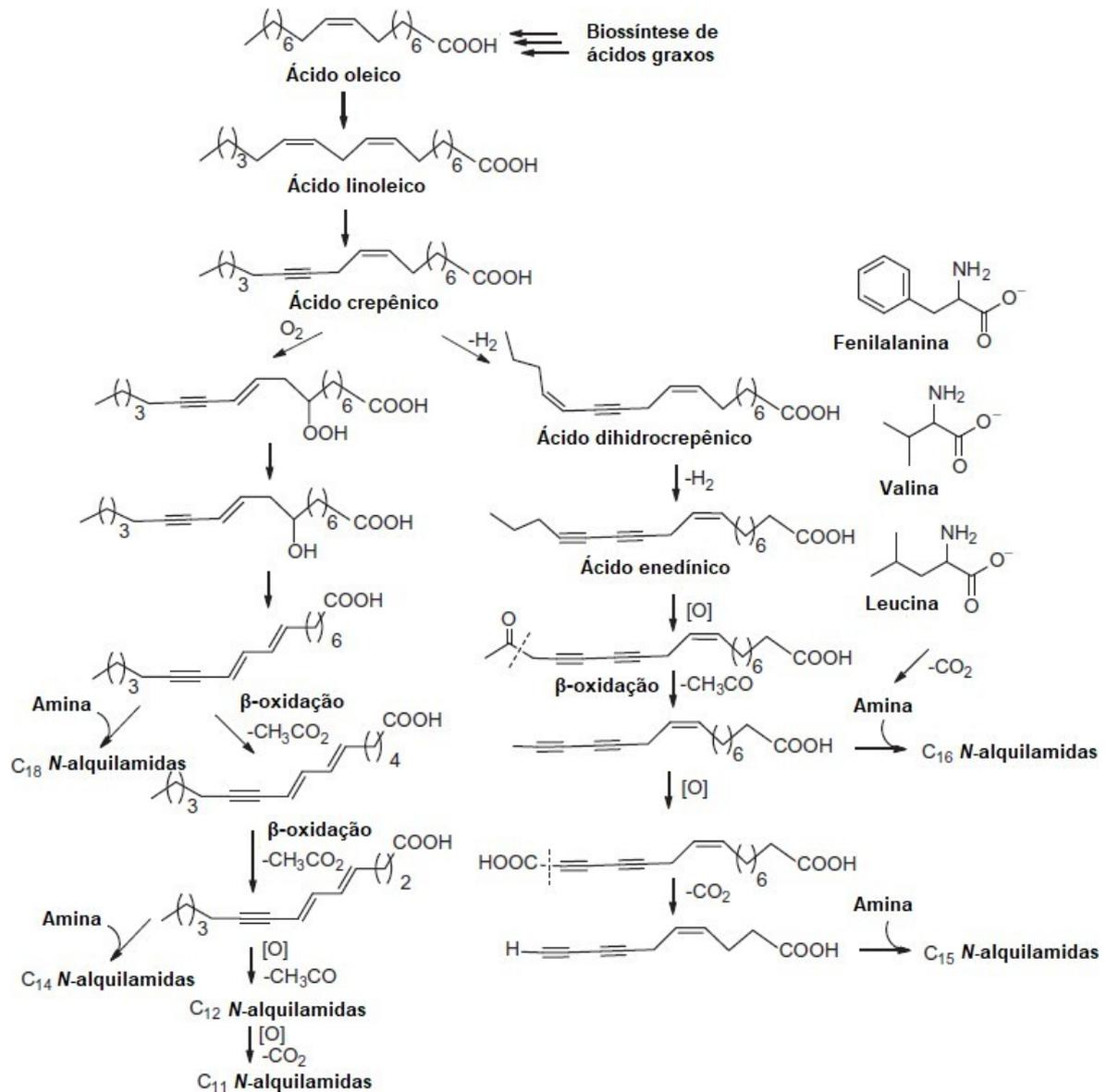
Figura 2 - Estrutura molecular básica das alcamidas.



Legenda: R₁ - cadeia ácida graxa; R₂ - porção aminoácido residual ou derivado; R₃ - H/CH₃/OH.
Fonte: Adaptado de BOONNEN *et al* (2012).

Essas estruturas são provavelmente originadas da condensação de uma cadeia de ácido graxo e um aminoácido descarboxilado (STEIN, 2020), como demonstrado na figura 3.

Figura 3 - Ilustração da provável rota biossintética das alcanidas.



Fonte: STEIN,2020(adaptado de RIOS e OLIVO, 2014).

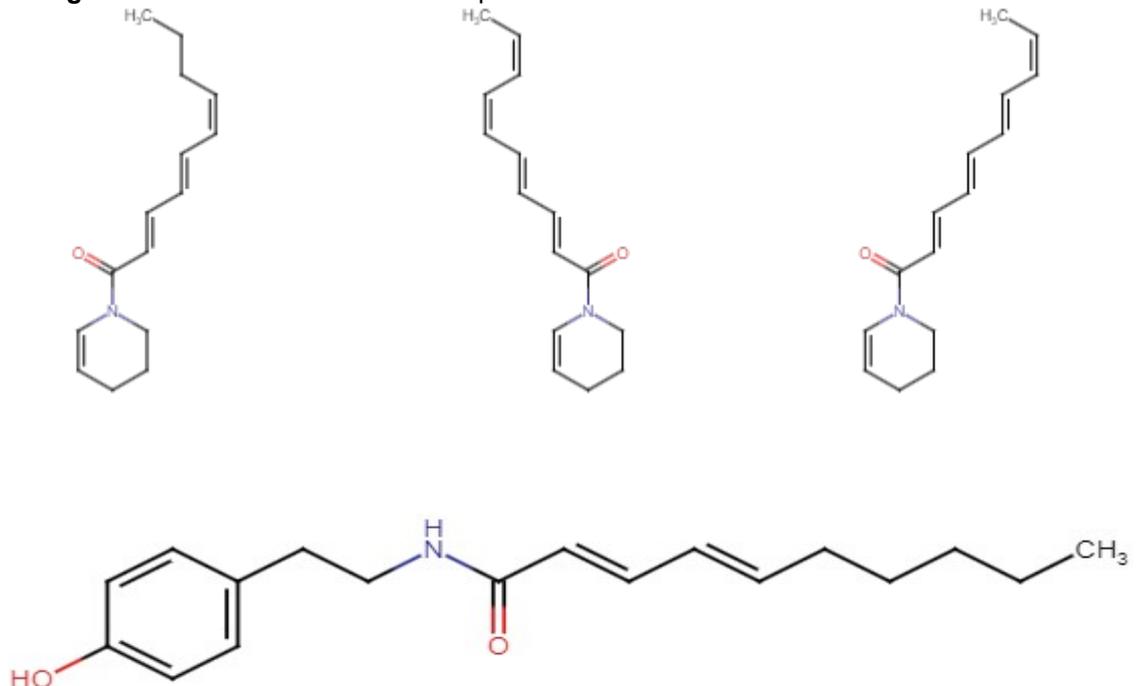
Os ácidos graxos precursores mais frequentes na biossíntese das alcanidas são oleicos (18:1), linoleico (18:2), linolênico (18:3), láurico (12:0), mirístico (14:0) e palmítico (16:0). Desidrogenações e desidratações sucessivas, geralmente acompanhadas de isomerizações, levam ao surgimento das estruturas olefínicas e acetilênicas características de cada alcanida. Além disso, diferentes processos

oxidativos contribuem para o encurtamento da cadeia e formação de epóxidos (DEWICK *et al.*, 2002; GREGER, 1984).

A porção amida é originada a partir de descarboxilação de diferentes aminoácidos. Valina, isoleucina, fenilalanina, tirosina e leucina são precursores de isobutil-, metilbutil-, feniletil-, 4-hidroxifeniletil- e isopentilamina, respectivamente. Enquanto, as aminas piperidina e 2,3-desidro-piperidina surgem a partir de reações de ciclização e descarboxilação dos aminoácidos lisina ou cadaverina (BOONEN *et al.*, 2012; GREGER, 1984). A formação da amida ocorre através de transferases específicas, que condensam o tioéster do ácido graxo com a porção amina.

Greger e colaboradores (1989 e 1990) identificaram algumas alcanidas no extrato das partes subterrâneas de *A. millefolium* (Fig. 4). Dentre elas, destacam-se a 2,3-desidropiperidinamida do ácido deca-2*E*,4*E*,6*Z*-trienoico (Fig. 4A), 2,3-desidropiperidinamida do ácido deca-2*E*,4*E*,6*Z*,8*Z*-tetraenoico (Fig. 4B), 2,3-desidropiperidinamida do ácido deca-2*E*,4*E*,6*E*,8*Z*-tetraenoico (Fig. 4C), tiramida do ácido deca-2*E*,4*E*-dienoico (Fig. 4D) e seu derivado metilado (Fig. 4E).

Figura 4 - Alcanidas no extrato das partes subterrâneas de *A. millefolium*.



Fonte: Adaptado de GREGER *et al.* (1989, 1990).

1.3 DOR E TRATAMENTO CONVENCIONAL

A Associação Internacional para o Estudo da Dor (do inglês *International Association for the Study of Pain - IASP*) define a dor como uma “experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano tecidual atual ou potencial” (IASP, 2020).

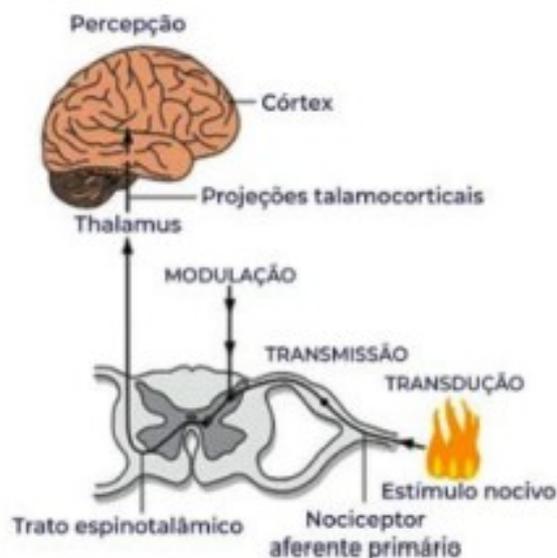
Além dessa definição, há uma série de seis notas explicativas que complementam esse conceito, em que se destaca que a experiência da dor varia de pessoa para pessoa, dependendo de fatores biológicos, psicológicos e sociais. Além disso, ressaltam a distinção entre dor e nocicepção, indicando que a dor não pode ser completamente explicada apenas pelas atividades dos neurônios sensitivos. Também salientam que as pessoas aprendem a reconhecer o que é dor e que os relatos de dor devem ser respeitados como uma expressão legítima da experiência individual. As notas também apontam que a dor pode apresentar alterações na função psicossocial e enfatizam que o relato verbal é apenas um dos meios de expressar a dor (DESANTANA *et al*, 2020).

A dor pode ser classificada de diversas maneiras, no entanto, de forma elucidativa, pode ser apontada quanto à duração e à fisiopatologia. (FERNANDES, 2023). Quanto a duração, pode ser classificada em aguda ou crônica. A dor aguda manifesta-se de forma limitada e surge em resposta a um estímulo nocivo, como traumas, intervenções cirúrgicas ou processos inflamatórios, servindo como um alerta para o organismo (KRAUS, 2017). Por outro lado, a dor crônica perdura por mais de três meses e muitas vezes está associada a condições patológicas, como câncer, doenças reumáticas, e alterações na estrutura muscular, esquelética e nas estruturas nervosas (FUCHS, 2017).

Em relação à fisiopatologia, a dor pode ser categorizada como nociceptiva, neuropática ou psicogênica. A dor nociceptiva tem origem na ativação dos nociceptores, que respondem a estímulos térmicos, mecânicos ou químicos (KRAUS, 2017). A dor neuropática surge devido a uma lesão ou disfunção no sistema nervoso central ou periférico, frequentemente associada a condições como lesões traumáticas, pós-amputação, esclerose múltipla, tumores cerebrais e doença de Parkinson (VARANDAS, 2013). Por fim, a dor psicogênica não pode ser definida ou localizada pelo paciente, e não é aliviada por analgésicos, sendo frequentemente associada a fatores psicológicos (FUCHS, 2017; KRAUS, 2017).

Para compreender a fisiologia da dor, é necessário que se conheça o intervalo entre o estímulo inicial e a manifestação da dor propriamente dita. Nesse contexto, a algesia pode ser resumida em quatro fases: transdução, transmissão, modulação e percepção (Fig. 5).

Figura 5 - Ilustração das etapas da fisiologia da dor.



Fonte: FERNANDES (2023).

Na primeira fase, denominada transdução, ocorre a conversão de estímulos químicos ou físicos na periferia em sinais elétricos, resultando na alteração do potencial da membrana dos neuroreceptores, que são sensíveis a estímulos que possam causar danos reais ou potenciais. A partir disto, as terminações nervosas são estimuladas gerando um gatilho no neurônio sensorial, e, uma vez disparado, esse impulso percorre até o centro de processamento no sistema nervoso central, resultando na percepção da dor (FERNANDES, 2023; VARANDAS, 2013).

Após isso, na fase de transmissão, a informação da dor é codificada e transmitida da periferia até a medula espinhal, alcançando o tronco encefálico e, por fim, estabelecendo conexões entre o tálamo e os centros corticais superiores, responsáveis pelo controle da percepção e resposta à dor (VARANDAS, 2013).

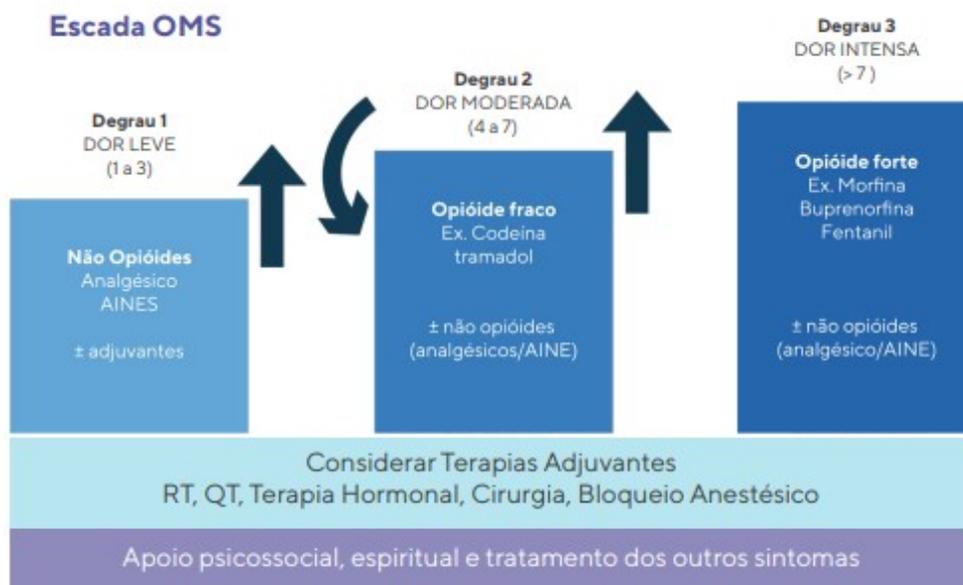
A terceira fase, conhecida como modulação, desempenha o papel de anular a sensação de dor em situações de lesão ou ameaça. Este processo ocorre no corno

dorsal da medula, onde vários neurotransmissores, neuropeptídeos e aminoácidos são liberados pelos terminais aferentes primários. Essa etapa é crucial na dor crônica, demonstrando um valor adaptativo (KRAUS, 2017).

Por fim, a quarta fase, a percepção, representa o impulso que se transforma na sensação de dor, mediado pelos estímulos nocivos nas áreas corticais e no sistema límbico (FERNANDES, 2023).

No tratamento convencional, a Organização Mundial da Saúde (OMS) desenvolveu uma escala em forma de degraus para orientar o controle farmacológico da dor (VARANDAS, 2013). A representação a seguir (Fig. 6) oferece uma visão visual desse processo.

Figura 6 - Ilustração do esquema farmacológico no tratamento da dor.



Fonte: Adaptado de GONÇALVES *et al.* (2007)

Analgésicos não opioides, como AINES (anti-inflamatórios não esteroidais), incluindo ácido acetilsalicílico e dipirona, e o paracetamol, são amplamente utilizados no tratamento de dores agudas e crônicas (FUCHS, 2017). Os AINES atuam inibindo a enzima ciclo-oxigenase, responsável pela síntese de prostaglandinas e tromboxanos, implicados na inflamação e sensibilização do sistema nervoso central (RANG, 2016). No entanto, seu uso requer precaução devido a efeitos adversos potenciais, como úlceras digestivas, sangramentos,

distúrbios na coagulação, hepatopatias, retenção de líquidos e alterações neurológicas e metabólicas (BISSON, 2021).

Os opioides agem ativando receptores opioides (κ , σ , δ , μ) na membrana celular, desencadeando eventos intracelulares que reduzem a excitabilidade dos neurônios, resultando na inibição da dor (KOPF, 2009). No entanto, tanto opioides fracos quanto fortes apresentam efeitos colaterais, incluindo tolerância, dependência, náuseas e constipação. A administração racional de opioides fortes é crucial para evitar depressão respiratória (VARANDAS, 2013).

Além destes, tem-se os anticonvulsivantes, como, carbamazepina, hidantoína e o valproato de sódio, que são usados no tratamento de dores associadas a estímulos, incluindo dores neuropáticas periféricas e centrais. No entanto, sua eficácia analgésica é restrita nas dores musculoesqueléticas (BISSON, 2021). Os antidepressivos também são utilizados para dor neuropática, porém, apesar da eficácia estabelecida desses tratamentos, a resposta pode ser limitada devido à necessidade de ajuste da dose e à presença de diversos efeitos colaterais (KRAUS, 2017).

1.4 SISTEMA ENDOCANABINOIDE

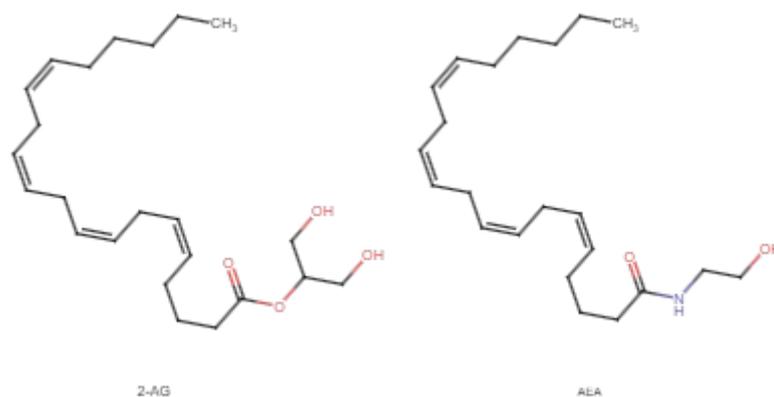
O sistema endocanabinóide desempenha um papel fisiológico na regulação do equilíbrio energético e no metabolismo de lipídios e carboidratos. Este sistema de sinalização é composto pelos receptores CB1 e CB2, acoplados à proteína G, pelos agonistas endógenos, com destaque para a anandamida e o 2-araquidonoil-glicerol (2-AG), e pelo aparato enzimático responsável pela formação e degradação dessas substâncias (ROCHA, 2023).

Os receptores CB1 são amplamente encontrados no cérebro, distribuindo-se na região do hipocampo associada à memória, no cerebelo ligado à função motora, no hipotálamo responsável pelo controle da fome e temperatura corporal, na substância nigra e nas vias dopaminérgicas. Além do cérebro, esses receptores estão presentes nos neurônios pré-sinápticos, atuando na inibição de liberação de transmissores nos tecidos periféricos, como células endoteliais, adipócitos e nervos periféricos (RANG, 2016).

Os receptores CB2, por outro lado, estão mais intimamente relacionados ao sistema imunológico periférico, desempenhando um papel na analgesia ao modificar o perfil de citocinas e prevenir efeitos adversos no Sistema Nervoso Central. Esses receptores são encontrados em células gliais e neurônios, contribuindo para o alívio da dor, predominando no tecido linfoide, incluindo órgãos como baço, tonsilas e timo, além de estar presente em linfócitos, monócitos e mastócitos (RANG, 2016; REZENDE, 2023).

No que diz respeito aos agonistas endógenos, como a anandamida (AEA) e o 2-araquidonoil-glicerol (2-AG) (Figura 7), trata-se de moléculas altamente lipofílicas que não são armazenadas em vesículas. A síntese dessas substâncias ocorre em resposta ao aumento de cálcio intracelular, ativando fosfolipases dependentes de cálcio. O transporte em meios aquosos do corpo não é compreendido, sugerindo-se que possam se ligar à albumina sérica, uma proteína solúvel no sangue (CARUSO, 2019).

Figura 7 - Estrutura química das moléculas endógenas.



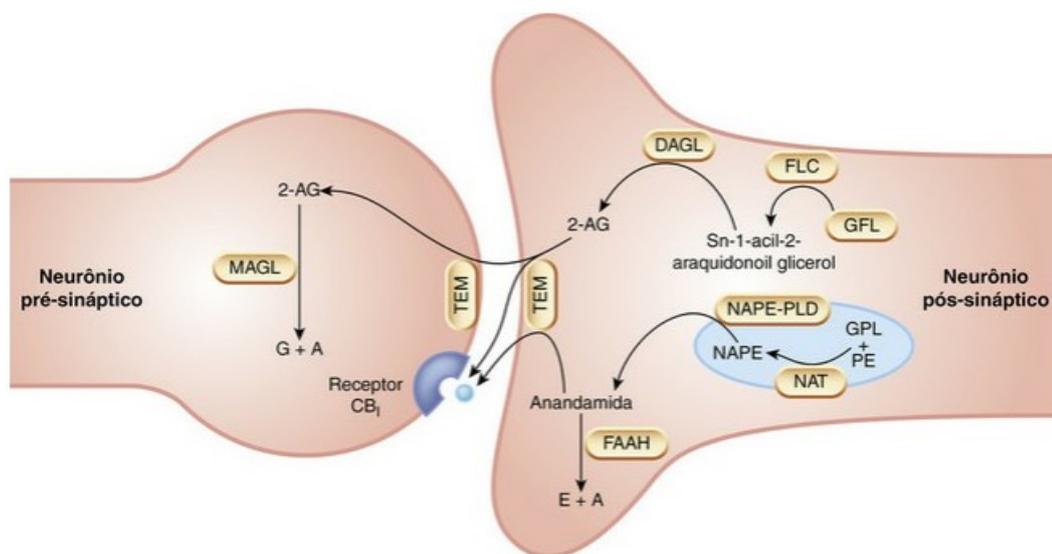
Legenda: AEA, anandamida; 2-AG, 2-araquidonoil-glicerol. **Fonte:** REZENDE (2023).

A formação da anandamida e do 2-AG ocorrem no neurônio pós-sináptico (ROCHA,2023), a sua via de formação ocorre quando a enzima N-araquidonoil fosfatidil etanolamina é hidrolisada por uma fosfolipase D específica (NAPE-PLD), liberando assim, a anandamida e ácido fosfatídico. O precursor mais provável do 2-AG, são os diacilgliceróis, sintetizados por duas isoenzimas diacilglicerol lipase (DAG L α e β). Os DAGs podem também ser produzidos a partir de um fosfatidil inositol, hidrolisado pela fosfolipase C, ou a partir da hidrólise de ácido fosfatídico, por meio de uma enzima fosfohidrolase (CARUSO, 2019; DASRAM, 2022).

A degradação desses compostos, é realizado da seguinte forma: anandamida é metabolizada principalmente pela enzima amida hidrolase de ácido graxo (FAAH), e 2-AG é um substrato da monoacilglicerol lipase (MAGL), que produz ácido araquidônico (AA) e glicerol (REZENDE, 2023).

A seguir (Fig. 8) a ilustração da biossíntese e a degradação da formação da Anandamida e do 2-Araquidonoil-glicerol.

Figura 8 - Biossíntese e inativação dos endocanabinoides.



Legenda: 2-AG, 2-araquidonoil glicerol; A, ácido araquidônico; DAGL, diacilglicerol lipase; E, etanolamina; TEM, transportador endocanabinoide de membrana; FAAH, ácido graxo amida hidrolase; GFL, glicerofosfolípideo; MAGL, monoacilglicerol lipase; NAPE, N-acil-fosfatidiletanolamina; NAPE-PLD, fosfolipase D específica da N-acil-fosfatidiletanolamina; NAT, N-acil-transferase; FE, fosfatidiletanolamina; FLC, fosfolipase C; G, glicerol. **Fonte:** RANG (2016).

Supõe-se que uma das vias de ação do canabidiol (CBD) seja a interação com o sistema endocanabinóide, através da inibição da enzima FAAH que gera um aumento na disponibilidade de anandamida no organismo. O CBD parece atuar como agonista parcial dos receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A}, elevando os níveis de serotonina associados à modulação da ansiedade e depressão. Além disso, é capaz de ativar os receptores vaniloides TRPV1, que desempenham papel na regulação da dor e na modulação da liberação de glutamato. O tetrahydrocannabinol, por sua vez, tem baixa afinidade pelos receptores CB₁ e age como agonista inverso nos receptores CB₂ (ROCHA, 2023).

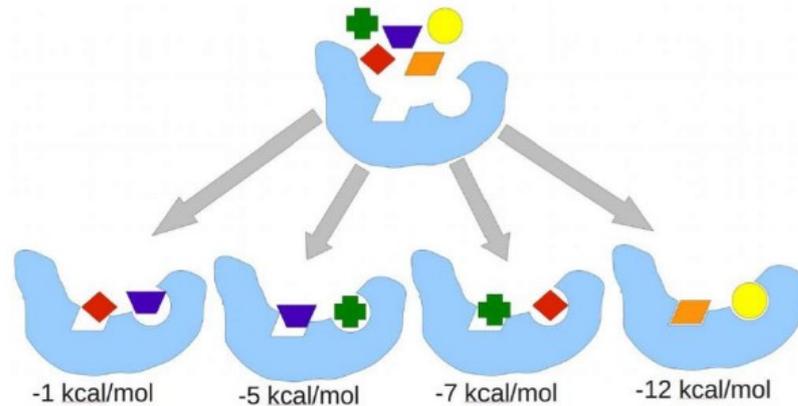
O sistema endocanabinóide é uma via de grande interesse, já que as terapias existentes são atreladas a muitos efeitos adversos graves, principalmente úlceras, depressão cardiorrespiratória e dependência, ademais, age no controle da dor através de todos os seus componentes: receptores, agonistas e enzimas (OLIVEIRA, 2017). Estudos *in silico* e *in vivo* feito por Yien *et al.* (2023) têm demonstrado a efetividade desse sistema, o que mostra que alcaloides presentes em *Acmella olerácea* possuem um efeito antinociceptivo que podem ser promovidos por meio de um efeito central e periférico diretamente nos nociceptores.

1.5 DOCKING E SUAS APLICAÇÕES

A compreensão da maioria dos mecanismos dos processos celulares requer a identificação e entendimento das interações entre ligantes e receptores. Esses ligantes são geralmente moléculas pequenas, que podem atuar como agonistas, antagonistas ou inibidores de substratos em processos fisiológicos específicos. Dessa forma, o conhecimento das modalidades de interação entre ligantes e receptores é crucial para o planejamento racional de fármacos (VERLY, 2014).

Para realizar o planejamento, uma técnica amplamente utilizada é o *docking* molecular ou *docking* receptor-ligante, conhecido como ancoramento ou atracamento molecular. Essa abordagem surgiu a partir das interações biológicas, onde a energia livre de ligação entre a proteína e o ligante é estimada antes mesmo da síntese dessas moléculas (SOUZA, 2015). O modelo chave-fechadura proposto por Fisher (Fig. 9) em 1894 serviu como base para o desenvolvimento de *softwares* de *docking*, em que o ligante é equiparado a uma chave que se encaixa no sítio ativo específico do receptor, fechadura, para exercer seu efeito (MATTOS, 2021; NUNES, 2015; SOUZA, 2015)

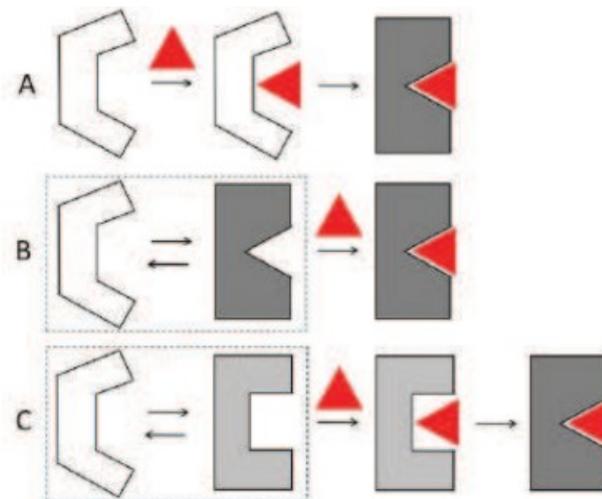
Figura 9 - Modelo simplificado de chave-fechadura proposto por Fisher



Fonte: MATTOS (2021).

Entretanto, ao se tratar de uma proteína e um ligante, deve ser considerado as flexibilidades, levando a um aprimoramento dos estudos para melhor corresponder à realidade (MARION, 2018). Isso foi possível através do modelo de encaixe induzido proposto por Koshland (Fig. 10), que aborda as mudanças na conformação do receptor, explicando como o ligante induz alterações conformacionais para otimizar a interação receptor-ligante (NUNES, 2015).

Figura 10 - Esquemas dos modelos de reconhecimento molecular,



Legenda: A) modelo de encaixe induzido; B) modelo em que há seleção conformacional; e C) seleção conformacional seguido de encaixe induzido. Fonte: NUNES (2015).

Atualmente, uma abordagem inovadora em relação ao ancoramento proteína-ligante considera que a proteína pode assumir diversos estados conformacionais, com estruturas semelhantes e energeticamente equivalentes. Ao interagir com determinada proteína, um ligante selecionará aquela proteína que apresentar uma conformação à qual possui maior afinidade (VERLY, 2014).

As características físico-químicas são essenciais para o reconhecimento molecular, visto que definem o grau de afinidade e especificidade entre a proteína e o ligante. Em relação às interações intermoleculares, podem ser ligações de hidrogênio, van der Waals, interações eletrostáticas, interações hidrofóbicas, interações do tipo cátion- π , π - π e empilhamento-T e coordenação com íons metálicos (NUNES, 2015; VERLY, 2014).

As forças de dispersão envolvem a aproximação de moléculas apolares, resultando na formação de um polo induzido. Geralmente, são ligações fracas e ocorrem devido à polarização transitória de ligações carbono-carbono e carbono-hidrogênio. As interações hidrofóbicas, semelhantes em força às forças de dispersão, geralmente ocorrem solvatadas por água. As ligações de hidrogênio, fundamentais para manter as moléculas em suas conformações bioativas, envolvem heteroátomos eletronegativos, como flúor, oxigênio e nitrogênio. Por fim, as ligações covalentes, difíceis de quebrar e raramente desfeitas, podem levar à inibição irreversível e até inativação do receptor (BARREIRO, 2015).

Além das interações citadas, o reconhecimento molecular proteína-ligante é guiado por efeitos de entropia e entalpia, que são estimados pela energia livre de Gibbs (Figura 11), que está ligado a constante de equilíbrio K_{eq} , na qual pode ser mensurado experimentalmente (VERLY, 2014).

Figura 11 - Fórmula da energia livre de Gibbs.

$$\Delta G_{lig} = \Delta H - T\Delta S = -RT \ln K_{eq}$$

Legenda: ΔG_{lig} , energia livre de ligação de Gibbs; ΔH , variação de entalpia; T, temperatura absoluta, ΔS , variação de entropia; R, constante universal dos gases; e K_{eq} , constante de equilíbrio. **Fonte:** VERLY (2014).

A constante de equilíbrio de ligação é calculada experimentalmente e pode ser representada pela constante de associação abaixo (NUNES,2015) (Fig. 12).

Figura 12 - Fórmula da constante de associação.

$$K_a = \frac{[RL]}{[R][L]}$$

Legenda: K_a , constante de associação; $[R]$ concentração do receptor; $[L]$ concentração do ligante; e $[RL]$ a concentração do complexo receptor-ligante. **Fonte:** NUNES (2015).

Vale ressaltar que para comparar a afinidade de ligantes distintos por um mesmo receptor é necessário obedecer às mesmas condições de temperatura, pressão, pH e força iônica da solução (VERLY, 2014).

Com base no exposto, a execução do ancoramento molecular envolve duas etapas: a previsão da conformação e orientação do ligante em seu sítio de complexação, e a avaliação da afinidade em um complexo receptor-ligante, representada pela energia livre de ligação (função *scoring*) (RODRIGUES, 2014). Atualmente, diversos programas de *docking* molecular estão disponíveis (Quadro 1), variando principalmente no método de busca e na função de avaliação de afinidade utilizada. Além disso, podem diferir na acessibilidade por meio de portais ou *softwares* específicos (VERLY, 2014).

Quadro 1 - Portais e programas de acesso para a realização do ancoramento molecular.

Portal	Programa de atracamento
SwissDock	EADock DSS
DockingServer	AutoDock
DockThor Portal	DockThor
1-Click Docking	MEDock
DOCK Blaster	DOCK
Docking At UTMB	AutoDock Vina
ParDOCK	Método de Monte Carlo
PATCHDOCK	PatchDock
MEDock	

Fonte: Adaptado de VERLY (2014).

É de extrema importância conhecer previamente o sítio de ligação antes de acoplar ligantes, uma vez que isso aumenta significativamente a eficiência do processo de encaixe (RODRIGUES, 2014). Após a identificação do sítio de ligação, é fundamental preparar cuidadosamente os ligantes a serem testados. Essa etapa exige atenção, pois os ligantes devem ser projetados para manter disposições semelhantes aos átomos da molécula original. Esse processo envolve varredura conformacional e alinhamento tridimensional, possibilitando propostas de moléculas aprimoradas (SOUZA, 2015).

Através do ancoramento molecular, diferentes conformações espaciais do ligante podem ser obtidas, permitindo aos analistas definir qual delas tem maior probabilidade de interagir com o receptor alvo. A avaliação é feita com base na energia livre de ligação de cada conformação espacial, sendo considerada a energia mais baixa aquela com maior probabilidade de proporcionar a melhor interação com o receptor (SOUZA, 2015).

Em suma, o descobrimento e o planejamento de novos fármacos é um processo caro e muito vagaroso. Para um novo fármaco ganhar o mercado são necessários milhões de dólares e cerca de 20 anos. Com isto, faz-se necessária a identificação de novas abordagens para o tratamento da dor, considerando os desafios dos tratamentos existentes com efeitos adversos significativos. A similaridade estrutural entre as alcanidas e a anandamida sugere seu potencial como agentes canabinoides, destacando-se como candidatas para o tratamento da dor por meio do sistema endocanabinoide. Atualmente abordagens *in silico* têm o potencial de reduzir esses desafios, prevendo que ferramentas computacionais mais avançadas desempenharão um papel cada vez mais importante nas estratégias de planejamento racional de fármacos no futuro (VERLY, 2014).

1.6 OBJETIVOS

1.6.1 Objetivo Geral

Realizar investigação fitoquímica das raízes de *Achillea millefolium* e avaliar suas alcanidas em receptores CB1 e CB2 por meio de estudos *in silico* de ancoragem molecular.

1.6.2 Objetivos Específicos

- Obter extrato hidroalcoólico (EtOH 70%) das raízes de *Achillea millefolium* e partições líquido-líquido, utilizando solventes orgânicos com um crescente grau de polaridade;
- Verificar as alcanidas na partição mais apolar por meio do perfil cromatográfico;
- Realizar o ancoramento molecular (*docking*) das alcanidas identificadas em receptores canabinoides CB1 e CB2.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 METODOLOGIA

Trata-se de uma pesquisa qualitativa apoiada em experimentos....

2.1.1 Obtenção da Espécie Vegetal

A espécie vegetal *A.millefolium*, foi adquirida da empresa Vita Oliva Garden, situada no município Maria da Fé, em Minas Gerais. A exsicata foi depositada na Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO), sob o número 6894.

2.1.2 Obtenção do extrato bruto

Foram utilizados 661,46 g de raízes secas, que foram conduzidos à maceração estática em solução de etanol:água (7:3, v/v) por aproximadamente 2 semanas. Após esse período, o extrato foi filtrado e conduzido à rotaevaporação para retirada do solvente orgânico, que posteriormente foi liofilizado para retirada da água.

2.1.3 Realização da partição líquido-líquido

O extrato hidroalcoólico (50g) foi submetido à partição líquido-líquido com intuito de separar os grupos de substâncias presentes nesse extrato por diferença de solubilidade e diferentes polaridades dos solventes orgânicos. Esta partição foi feita através de um funil de separação, utilizando os seguintes solventes por ordem de polaridade: hexano, diclorometano e acetato de etila. As partições foram encaminhadas para o rotaevaporador para a eliminação do solvente, sendo a partição em hexano o foco principal deste trabalho, pelo fato das alcamidas possuírem maior lipofilicidade, onde provavelmente estariam mais concentradas.

2.1.4 Monitoramento das alcamidas por CLAE/ESI-EM

Com o intuito de verificar a presença de alcamidas na partição em hexano, obtida do extrato bruto das raízes de *Achillea millefolium*, a análise de CLAE/ESI-EM (Cromatografia líquida acoplada à Espectrometria de massas) foi realizada com

ionização por *electrospray* (ESI) em modo positivo e eluição em gradiente de 1% de ácido fórmico em H₂O (A) e acetonitrila (B), sendo t=0 min: A:B (80:20, v/v) e t=0-150 min: A:B (10:90, v/v), T=150-151 min: A:B (80:20, v/v) e t=151-166 min: A:B (80:20,v/v).

2.1.5 Ancoramento das alcanidas em receptores CB1 e CB2

As estruturas da anandamida e das alcanidas majoritárias da partição em hexano do extrato hidroalcoólico das raízes de *A. millefolium*, foram otimizadas em nível de Teoria do Funcional da Densidade (DFT), com o método B3LYP/6-311++G(d,p), utilizando o software *Gaussian 09*, e em seguida, conduzidas ao *docking* molecular nos receptores CB1 e CB2 através do *software Autodock Vina*.

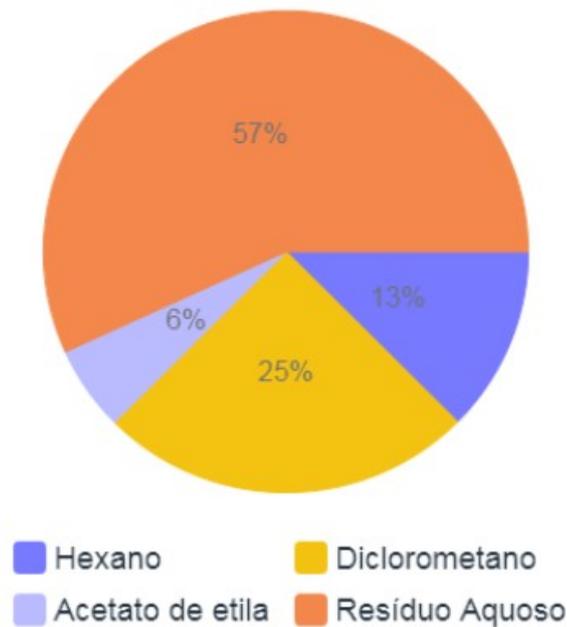
Foi realizada a validação do método a partir da reancoragem do ligante cristalográfico (ZDG) no receptor CB1 (PDB: 5TGZ) e do ligante cristalográfico(9JU) no receptor CB2 (PDB: 5ZTY).

2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.2.1 Obtenção do extrato das raízes e partições

Após a conclusão do processo de obtenção do extrato, a massa do material seco atingiu 106,78 g, resultando em um rendimento de 16%, considerando a quantidade inicial do material de partida (661,46 g de raízes secas). Posteriormente, 50 g do extrato hidroalcoólico foram submetidos à partição líquido-líquido, visando a separação de grupos de substâncias com base em suas diferentes solubilidades em solventes orgânicos de polaridades distintas. O processo foi realizado em um funil de separação, utilizando solventes com polaridades crescentes, como hexano, diclorometano e acetato de etila. O resíduo aquoso foi retido, e os rendimentos estão detalhados no gráfico 1.

Gráfico 1 - Rendimento das partições da *A. millefolium*.



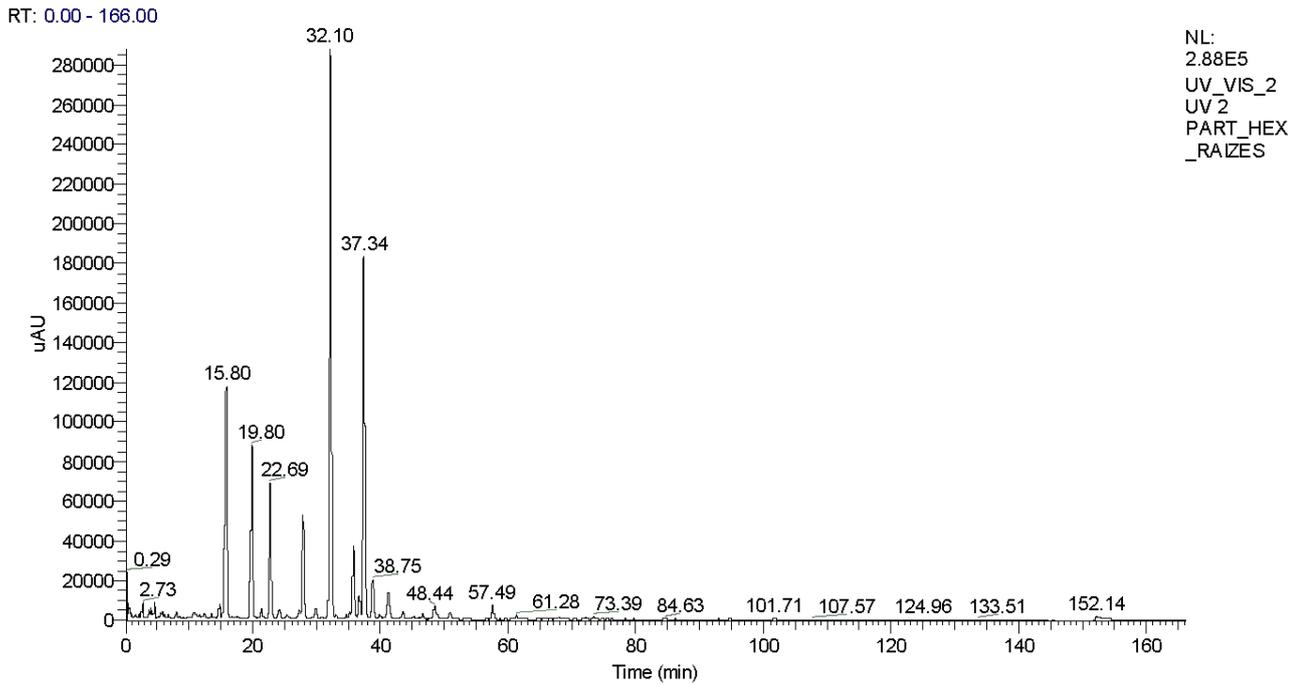
Fonte: O Autor (2023).

2.2.2 Análise por CLAE-ESI-EM

Com o intuito de investigar compostos de natureza lipofílica, como as alcanidas, optou-se por iniciar a análise utilizando a partição com hexano para posterior análise por CLAE-ESI-EM. Em seguida, os resultados do perfil químico obtidos foram comparados com dados disponíveis na literatura.

O cromatograma (Fig. 13) exibe uma resolução satisfatória, evidenciando picos nos tempos de retenção de 15,89 min, 19,80 min, 22,69 min, 32,10 min e 37,34 min.

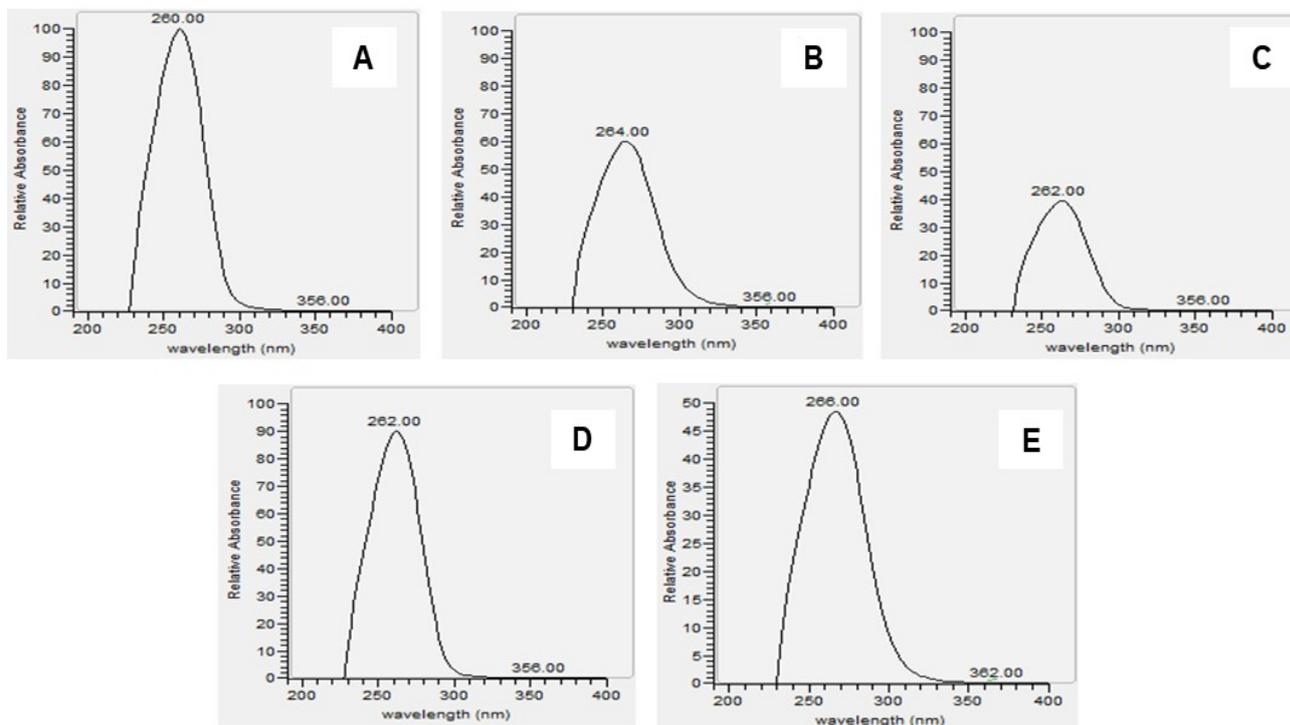
Figura 13 - Cromatograma obtido por CLAE referentes aos picos majoritários da partição em hexano das raízes de *Achillea millefolium*.



Fonte: O Autor (2023).

Os espectros de UV referentes a cada pico apresentaram bandas de absorção entre 262-268nm, característico de alcanidas (GREGER *et al.*, 1989). A seguir são demonstrados os picos de absorção alcançados no espectro UV, relacionados aos diferentes tempos de retenção (Fig. 14)

Figura 14 - Espectros de UV referente a cada pico.



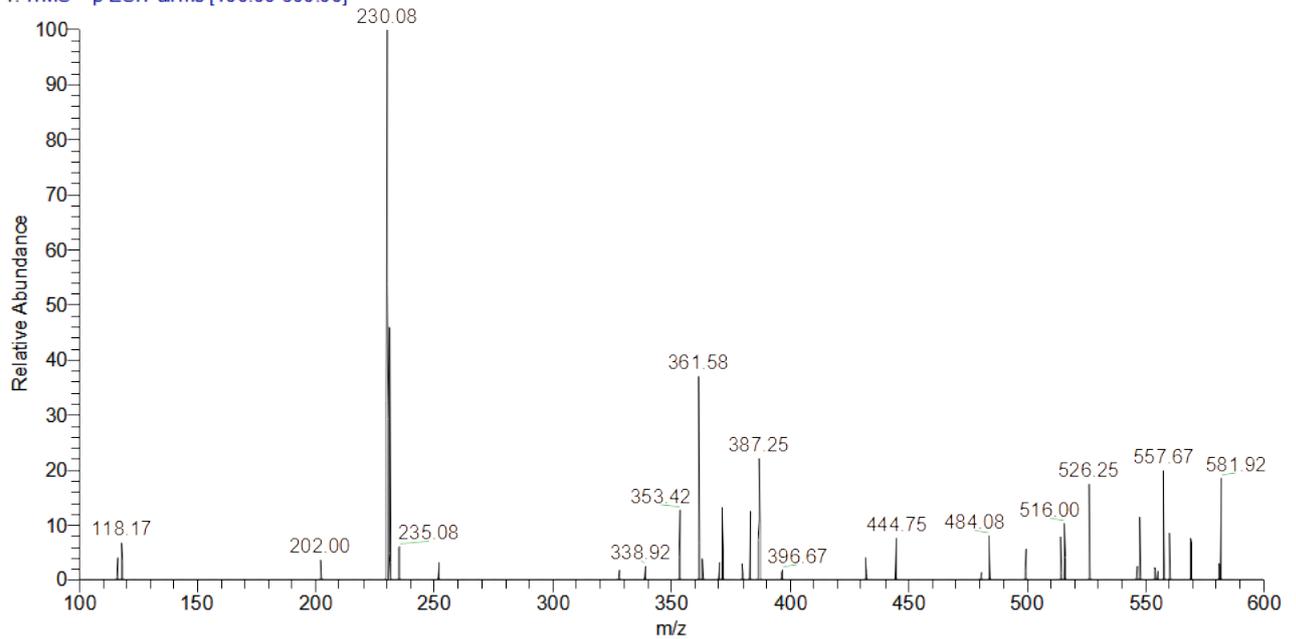
Legenda: A) 15,89 min – 260nm; B) 19,80 min – 264nm; C) 22,69 min – 262nm, D) 32,10 min – 262nm; e E) 37,34 min – 266nm. **Fonte:** O Autor (2023).

Os picos majoritários do cromatograma foram avaliados por ESI-EM em modo positivo e os espectros obtidos revelaram os íons *pseudomoleculares* $[M+H]$ (Fig 15-23).

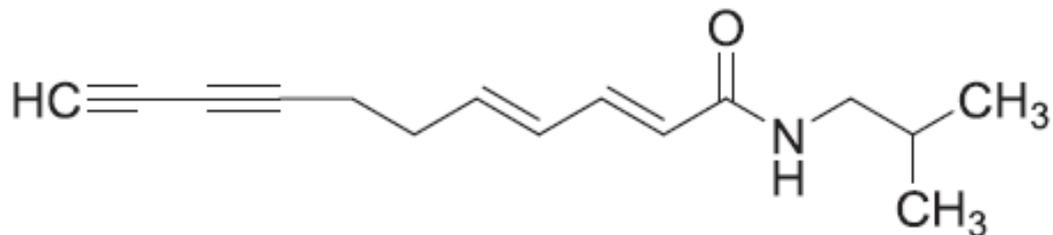
O espectro referente ao tempo de retenção de 15,80 min, revelou um íon intenso $[M+H].230,08$ (Fig. 15). Considerando uma MM = 229 e fórmula molecular $C_{15}H_{19}NO$, é possível sugerir a estrutura da alcanida isobutilamida do ácido undeca-2E-4E-dieno-8,10-diinoico (Fig. 16).

Figura 15 - Espectro de massas no tempo de retenção 15,80 min.

PART_HEX_RAIZES #1347 RT: 15.79 AV: 1 NL: 1.18E2
 T: ITMS + p ESIFull ms [100.00-600.00]



Fonte: O Autor (2023).

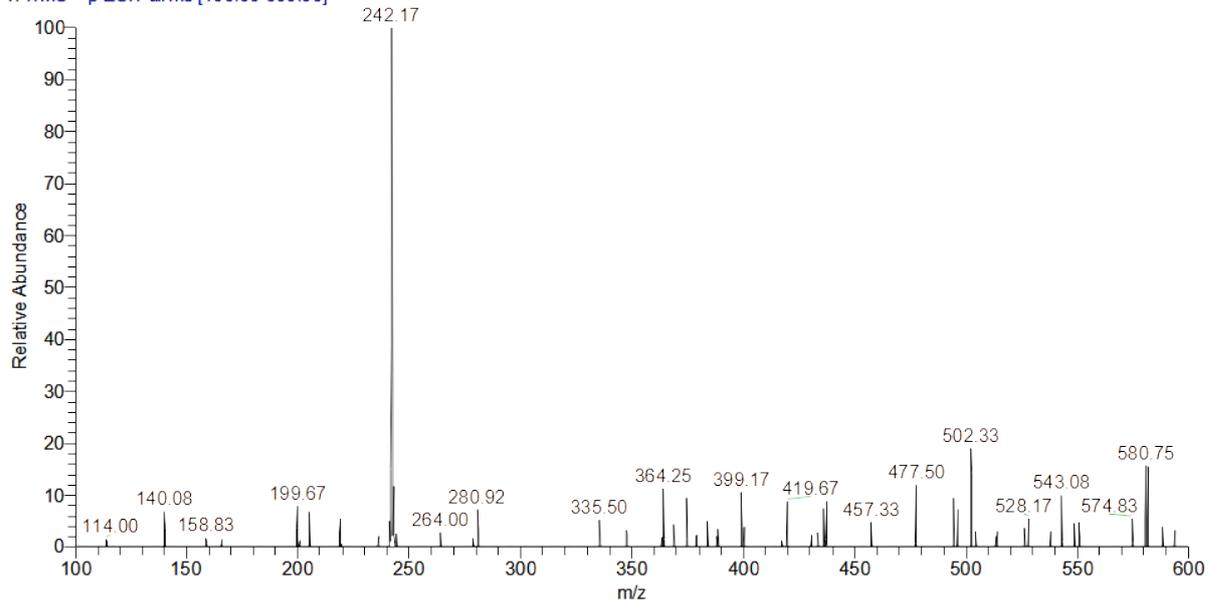
Figura 16 - Estrutura química da isobutilamida do ácido undeca-2*E*-4*E*-dieno-8,10-diinoico [M+H]⁺ 230.

Fonte: O Autor (2023).

O espectro referente ao tempo de retenção de 19,80 min, revelou um íon intenso [M+H]⁺.242,17 (Fig. 17). Considerando uma MM= 241 e fórmula molecular C₁₆H₁₉NO, é possível sugerir a estrutura da alcanamida piperidinamida do ácido deca-2*E*,4*E*,dieno-8,10-diinoico (Fig. 18).

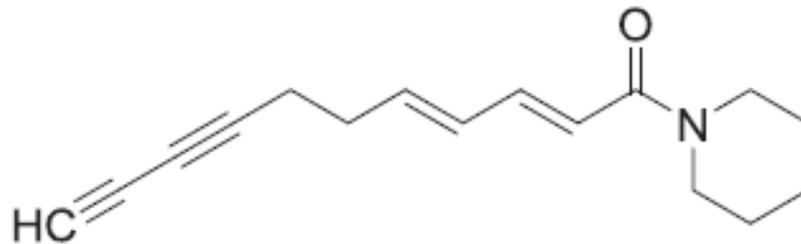
Figura 17 - Espectro de massas no tempo de retenção 19,80 min.

PART HEX_RAIZES #1681 RT: 19.81 AV: 1 NL: 1.87E2
T: ITMS + p ESI Full ms [100.00-600.00]



Fonte: O Autor (2023).

Figura 18 - Estrutura química da piperidinamida do ácido deca-2*E*,4*E*,dieno-8,10-diinoico.

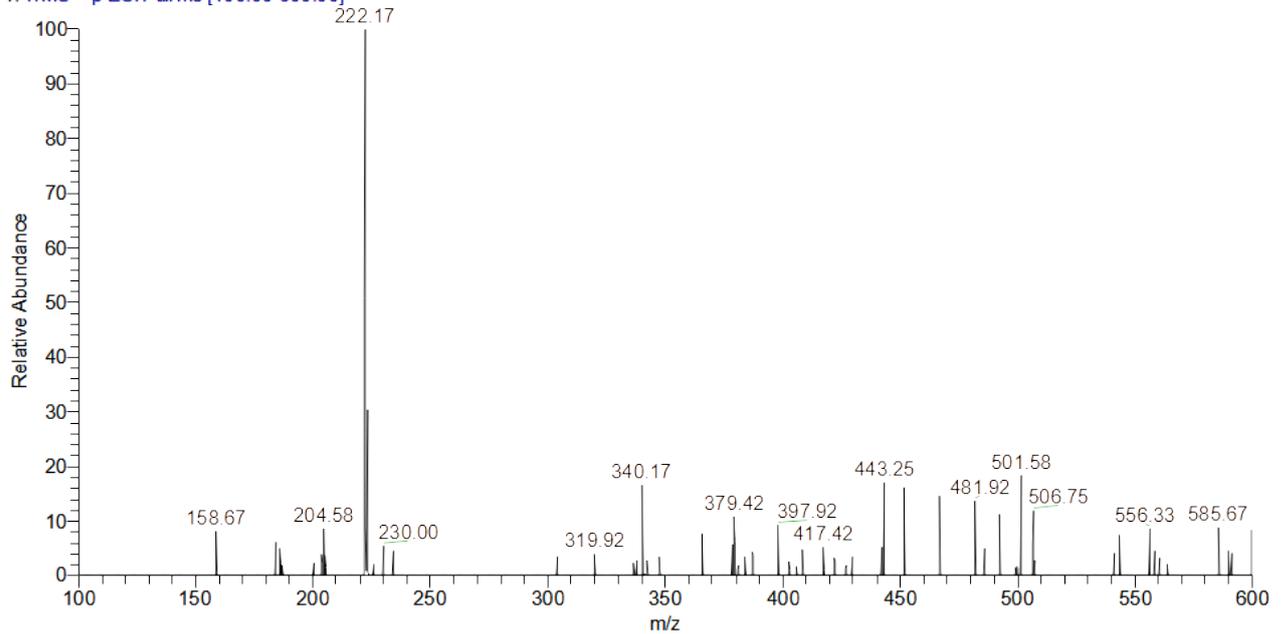


Fonte: O Autor (2023).

O espectro referente ao tempo de retenção de 22,69 min, revelou um íon intenso $[M+H].222,17$ (Fig. 19). Considerando uma $MM= 221$ e fórmula molecular $C_{14}H_{23}NO$, é possível sugerir a estrutura da alcanamida isobutilamida do ácido deca-2*E*,4*E*,8*Z*- trienoico (Fig. 20).

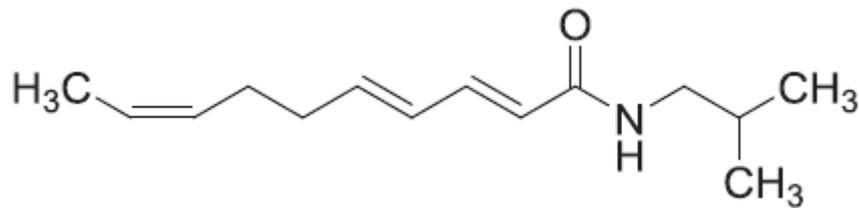
Figura 19 - Espectro de massas no tempo de retenção 22,69 min.

PART_HEX_RAIZES #1915 RT: 22.69 AV: 1 NL: 1.21E2
T: ITMS + p ESIFull ms [100.00-600.00]



Fonte: O Autor (2023).

Figura 20 - Estrutura química da isobutilamida do ácido deca *2E,4E-8Z*-trienoico

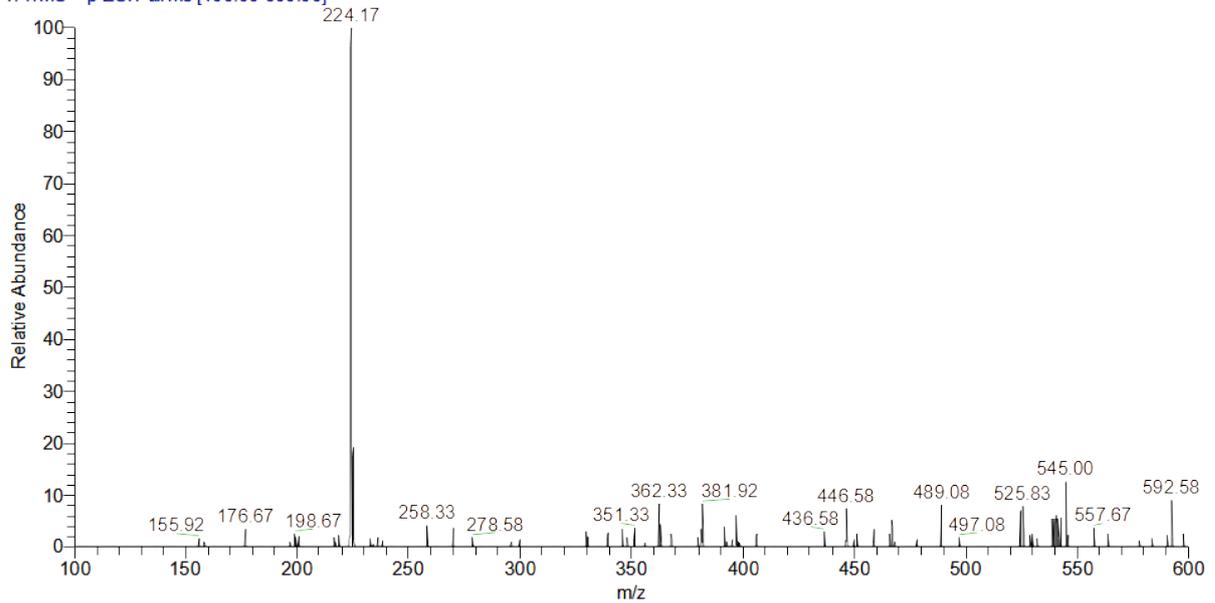


Fonte: O Autor (2023).

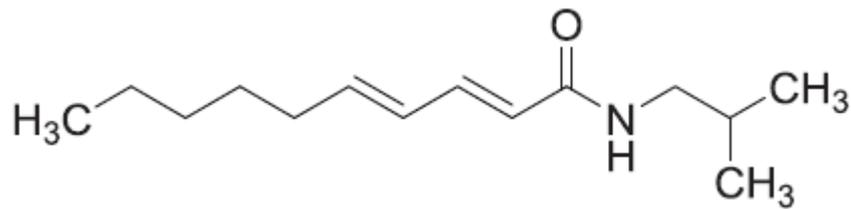
O espectro referente ao tempo de retenção de 32,10 min, revelou um íon intenso $[M+H].224,17$ (Fig. 21). Considerando uma $MM= 223$ e fórmula molecular $C_{14}H_{25}NO$, é possível sugerir a estrutura da alcamida isobutilamida do ácido eca-*2E,4E*-dienoico (Fig. 22).

Figura 21 - Espectro de massas no tempo de retenção 32,10 min.

PART HEX_RAIZES #2679 RT: 32.08 AV: 1 NL: 2.92E2
 T: ITMS + p ESI Full ms [100.00-600.00]



Fonte: O Autor (2023).

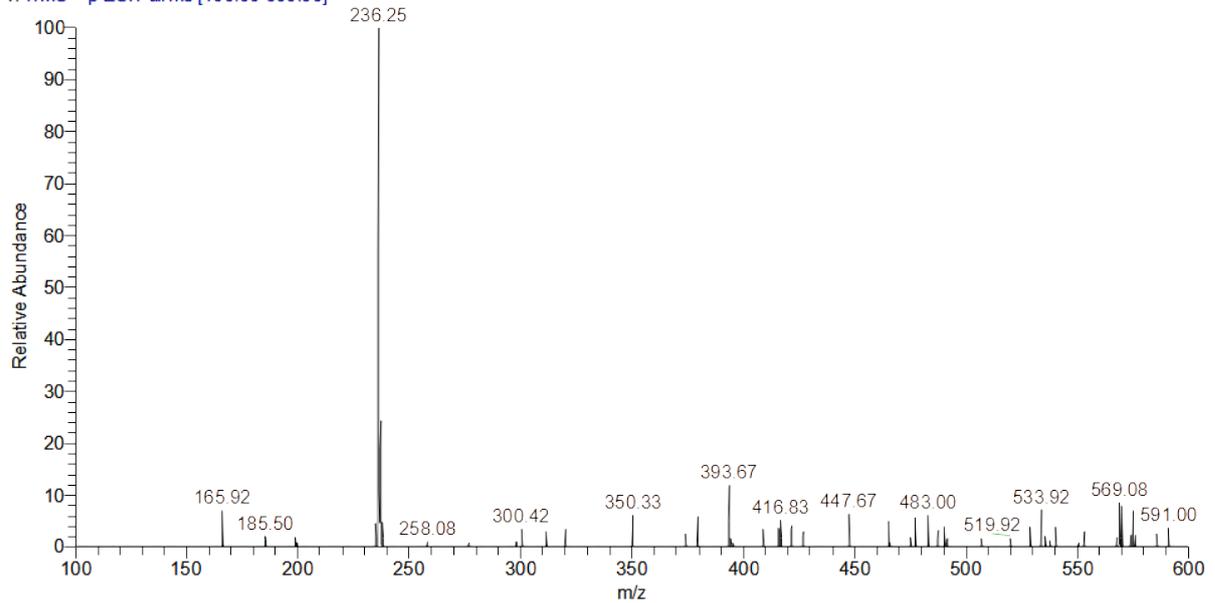
Figura 22 - Estrutura química da isobutilamida do ácido deca-2*E*,4*E*-dienoico

Fonte: O Autor (2023).

O espectro referente ao tempo de retenção de 37,34 min, revelou um íon intenso $[M+H].236,25$ (Fig. 23). Considerando uma $MM= 235$ e fórmula molecular $C_{15}H_{25}NO$, é possível sugerir a estrutura da alcamida piperidinamida do ácido deca 2*E*,4*E*-dienoico (Fig. 24).

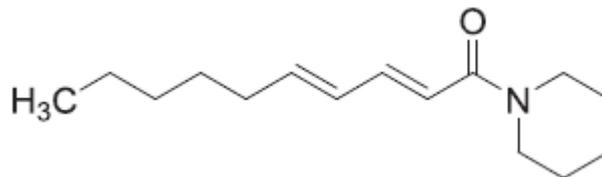
Figura 23 - Espectro de massas no tempo de retenção 37,34 min.

PART HEX_RAIZES #3083 RT: 37.33 AV: 1 NL: 2.95E2
T: ITMS + p ESI Full ms [100.00-600.00]



Fonte: O Autor (2023).

Figura 24 - Estrutura química da piperidinamida do ácido deca *2E,4E*-dienoico



Fonte: O Autor (2023).

Na tabela 1, estão descritas todas as alcamidas com seus respectivos tempo de retenção, espectros de UV, íons pseudomoleculares e suas massas moleculares.

Tabela 1 - Espectros de massa das alcanidas da espécie *Achillea millefolium* e seus respectivos íons pseudomoleculares.

Alcanidas	Tempo de retenção (min.)	Espectros de UV (nm)	Íon pseudomolecular [M+H]	Massa Molecular
isobutilamida do ácido deca 2E-4E-dienoico (Pelitorina)	15,80 min.	260nm	230,08	C ₁₅ H ₁₉ NO
piperidinamida do ácido deca-2E,4E-8,10-diinoico	19,80 min.	264nm	242,17	C ₁₆ H ₁₉ NO
isobutilamida do ácido deca 2E,4E,8Z trienoico	22,69 min.	262nm	222,17	C ₁₄ H ₂₃ NO
isobutilamida do ácido undeca-2E,4E-dieno,8,10 diinoico	32,10 min.	262nm	224,17	C ₁₄ H ₂₅ NO
piperidinamida do ácido deca 2E,4E-dienoico	37,34 min.	266nm	236,25	C ₁₅ H ₂₅ NO

Fonte: O Autor (2023).

Vale ressaltar que as alcanidas encontradas em *Achillea millefolium* também foram relatadas por Veryser (2017). Portanto, trata-se de alcanidas conhecidas na literatura, comprovando que a metodologia proposta se tornou eficiente para a identificação desses compostos. Por fim, destaca-se a diversidade estrutural encontradas entre as alcanidas da espécie, evidenciando a presença de compostos olefínicos, acetilênicos, e derivados de isobutilamidas e do anel piperidinamida.

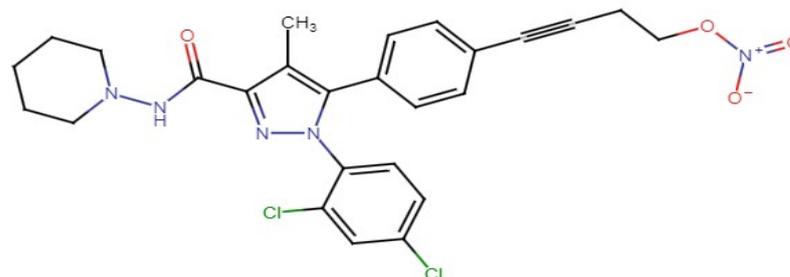
2.2.3 Docking molecular

Tendo em vista que grande parte dos medicamentos utilizados para tratamento de dor aguda e crônica possuem efeitos adversos, houve o interesse em explorar os receptores CB1 e CB2, para o tratamento da dor, uma vez que o sistema endocanabinoide são alvos muito interessantes. Para isso, foram realizados estudos de ancoragem molecular das alcanidas de *A. millefolium* nesses receptores. Até o momento, não há relatos na literatura de estudos *in silico* de alcanidas dessa espécie vegetal.

2.2.3.1 Reancoragem do ligante cristalográfico e ancoragem da anandamida e alcanidas em CB1

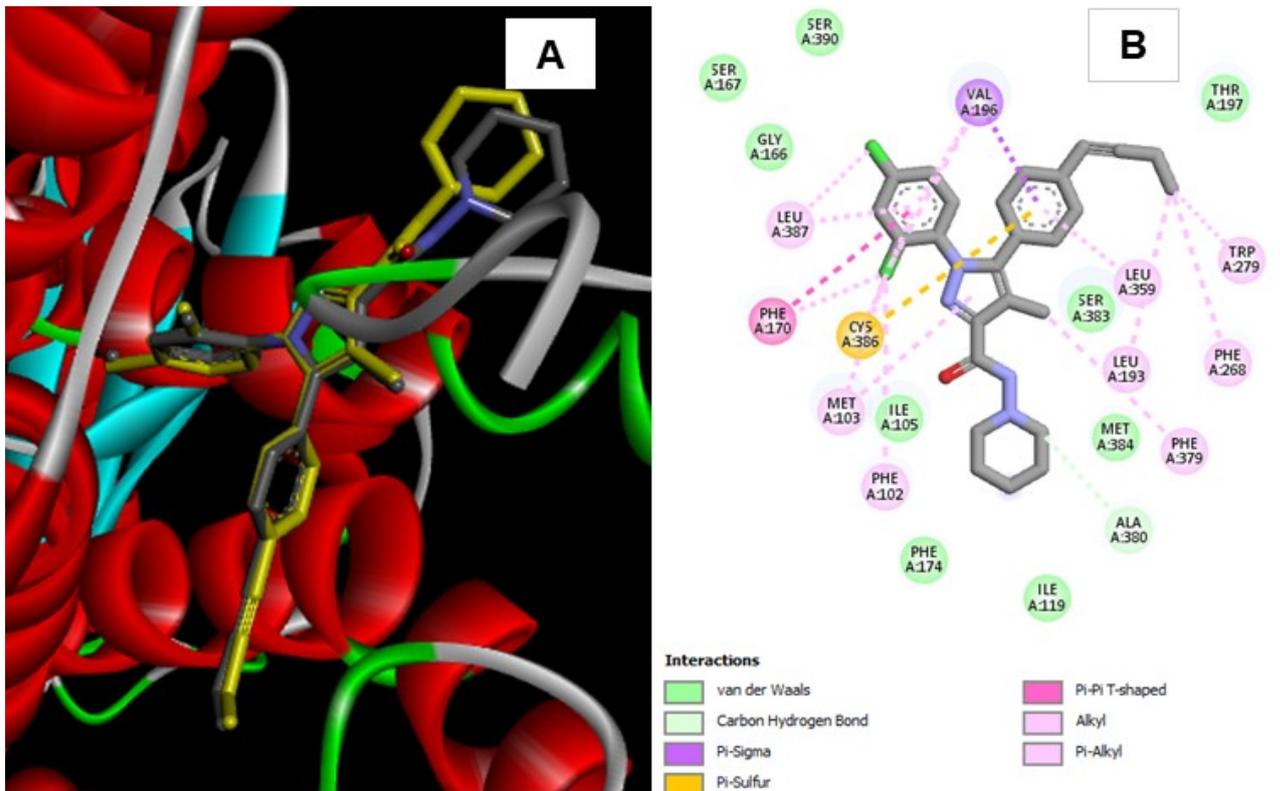
Estudos confirmaram a eficácia do ligante cristalográfico ZDG como o mais eficiente na interação com o receptor CB1. Nesse contexto, a proteína CB1 foi extraída do PDB, com o ligante, um análogo do composto semelhante ao rimonabanto (Fig. 25), reconhecido como um antagonista do CB1 amplamente investigado como potencial alvo terapêutico para distúrbios metabólicos, como obesidade, doenças mentais, fibrose hepática e dependência de nicotina (HUA *et al.*, 2016). Para validar essa abordagem, realizou-se a reancoragem do ligante cristalográfico ZDG no receptor CB1 (PDB: 5TGZ), obtendo uma interação bem-sucedida com uma energia de -12,3 kcal/mol (Fig. 26).

Figura 25 - Estrutura química do análogo sintético.



Fonte: Adaptado de HUA *et al.* (2016).

Figura 26 - Reancoragem do ligante cristalográfico (ZDG).



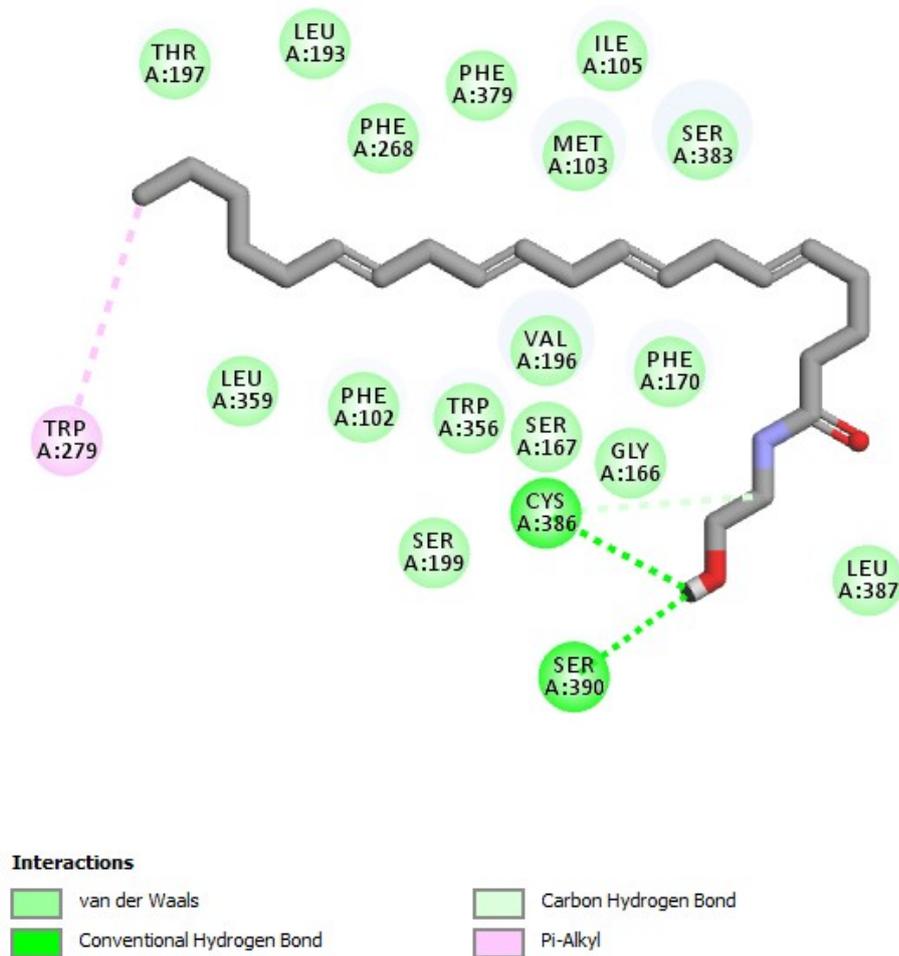
Legenda: A) ZDG em CB1; e B) Diagrama das interações entre ZDG e o receptor CB1. Energia: -12.3 kcal/mol. **Fonte:** O Autor (2023).

O ligante cristalográfico ZDG é composto por três partes distintas: um núcleo de anel pirazol com três grupos funcionais, o anel 2,4-diclorofenil e o anel fenil substituído com uma cadeia alifática de quatro átomos de carbono e o piperidin-1-ilcarbamoil. Essas porções estabelecem interações cruciais com o sítio ativo do receptor CB1. A primeira porção participa de interações π com resíduos importantes como Phe 170, Gly 166 e Ser 167. A segunda porção interage principalmente com Phe 102, Phe 268 e Trp 356, enquanto a terceira porção e o núcleo pirazol apresentam interações menos específicas, destacando-se a interação com Phe 170 (HUA *et al.*, 2016).

Devido à ausência de ancoramento da anandamida no PDB, foi necessário realizar experimentalmente o encaixe no receptor CB1. Ao examinar o ancoramento da anandamida (Fig. 27), observam-se interações com os aminoácidos Cys386 e Trp279, os quais também interagem com o ligante cristalográfico. Além disso, Lys192 emerge como um aminoácido-chave para a afinidade com CB1. A melhor

conformação alcança uma energia de interação de -7,5 kcal/mol, indicando uma afinidade inferior ao ligante cristalográfico. Vale ressaltar que valores mais negativos representam uma maior estabilidade termodinâmica do complexo ligante + receptor, evidenciando a menor afinidade da anandamida pelo receptor CB1 em comparação com o ligante cristalográfico.

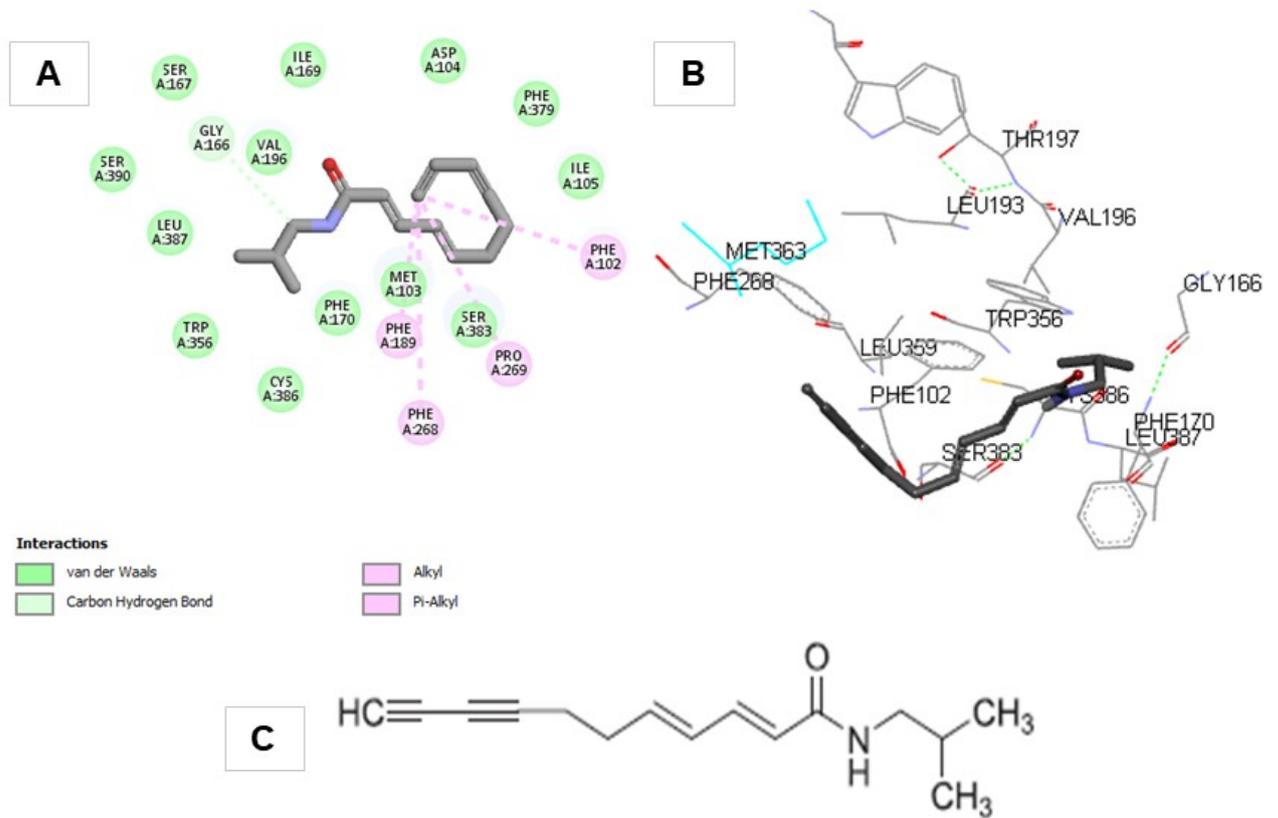
Figura 27 - Ancoragem da anandamida no receptor CB1.



Legenda: Energia -7,5 kcal/mol. **Fonte:** O Autor (2023).

A alcamida isobutilamida do ácido undeca-2*E*,4*E*-dieno-8,10-diinoico estabelece uma interação do tipo π -alkyl com Phe 268, vista também no ancoramento da anandamida e o ligante cristalográfico em CB1. Além disso, tem-se interações auxiliares com do tipo π -alkyl com Phe102, Phe189 e alkyl com Pro269 (Fig. 28).

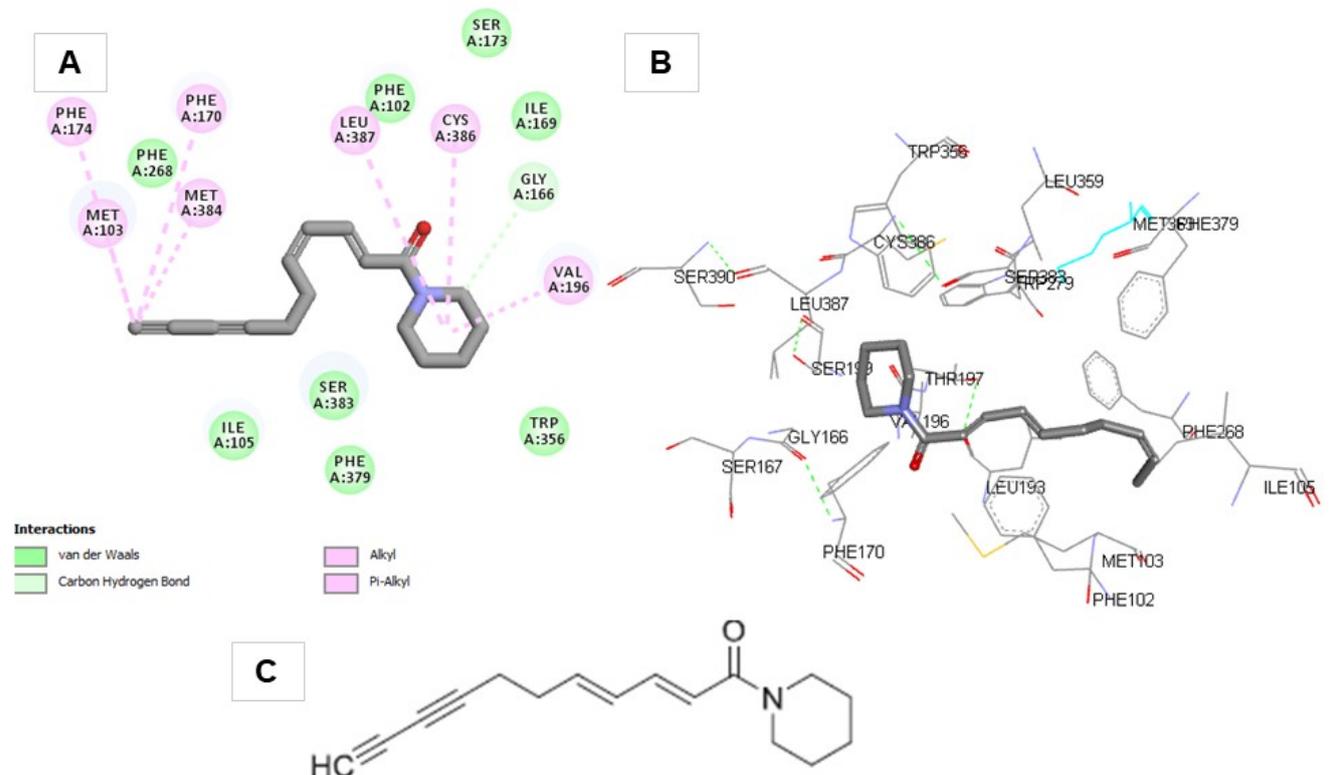
Figura 28 - Estrutura da isobutilamida do ácido undeca-2E,4E-dieno-8,10-diinoico e ancoramentos no receptor CB1.



Legenda: A) Ancoramento 2D; B) Ancoramento 3D; e C) Estrutura. Energia -7,2kcal/mol. **Fonte:** O Autor (2023).

A alcamida piperidinamida do ácido deca-2E,4E-8,10-diinoico estabelece uma interação do tipo π -alquil com Phe174, Phe170, Met103 e Met384, resíduos, que em sua maioria, também foram vistos estabelecendo interações com anandamida e o ligante cristalográfico (Fig. 29).

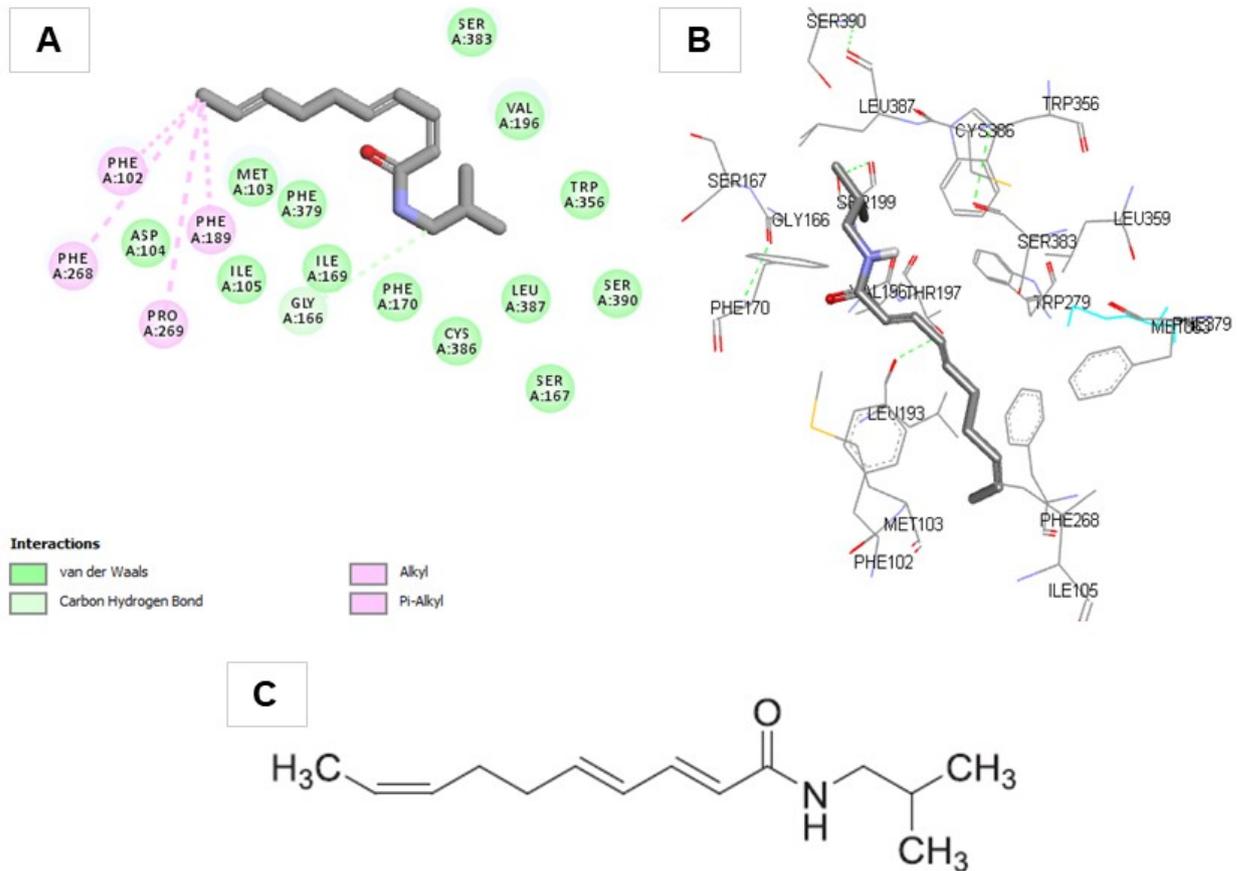
Figura 29 - Estrutura da piperidinamida do ácido deca-2*E*,4*E*-8,10-diinoico e ancoramentos no receptor CB1.



Legenda: A) Ancoramento 2D; B) Ancoramento 3D; e C) Estrutura. Energia -7,5kcal/mol. **Fonte:** O Autor (2023).

Na alcanida isobutilamida do ácido deca 2*E*,4*E*-8*Z*- trienoico é possível observar uma interação do tipo alquil e π -alquil com a Phe268, Phe102, Phe189 e Phe 269 (Fig. 30)

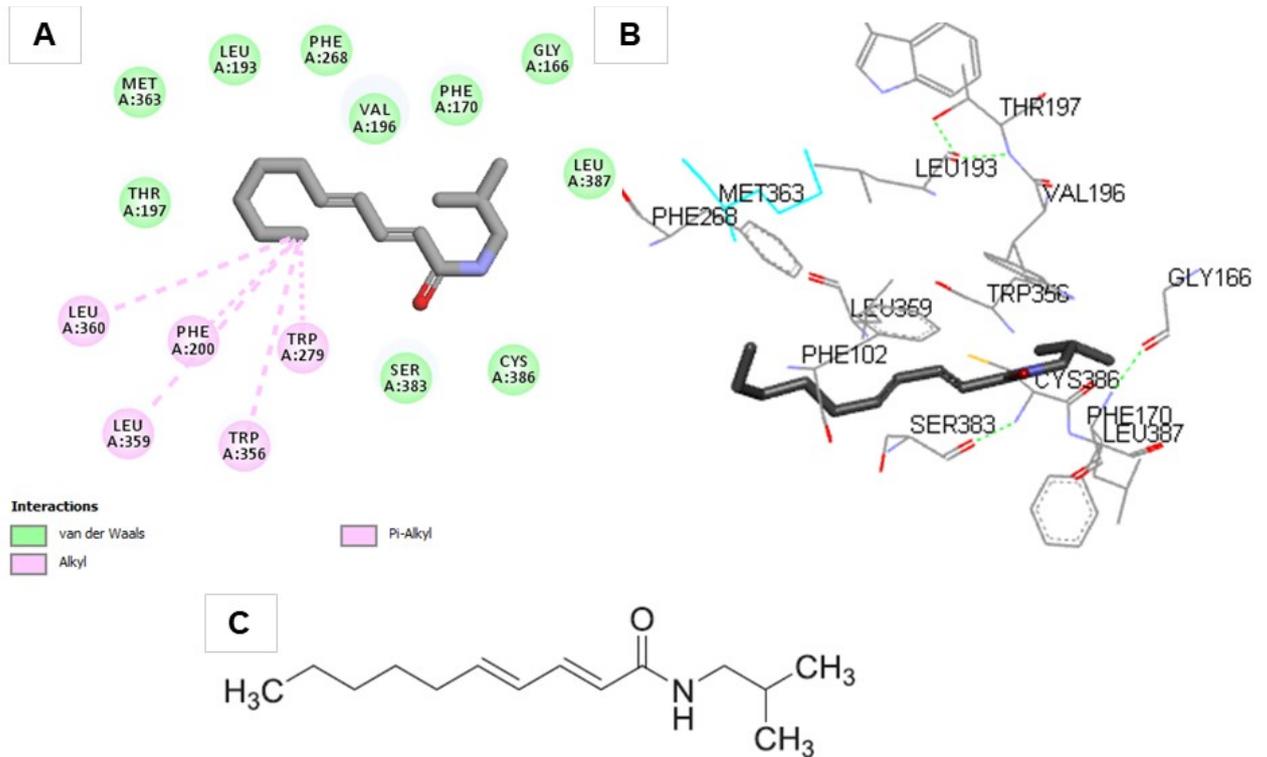
Figura 30 - Isobutilamida do ácido deca *2E,4E*-8*Z*- trienoico e ancoramentos no receptor CB1.



Legenda: A) Ancoramento 2D; B) Ancoramento 3D; e C) Estrutura. Energia -7,0kcal/mol. **Fonte:** O Autor (2023).

Na alcamida isobutilamida do ácido deca-*2E,4E*-dienoico é possível observar interação do tipo π -alquil entre a cadeia carbônica e o resíduo Trp279 (Fig. 31), assim como observado com a anandamida, também foram estabelecidas interações do tipo alquil entre a cadeia carbônica e outros aminoácidos, como Leu360, Leu359. E π -alquil com Phe200 e Trp356.

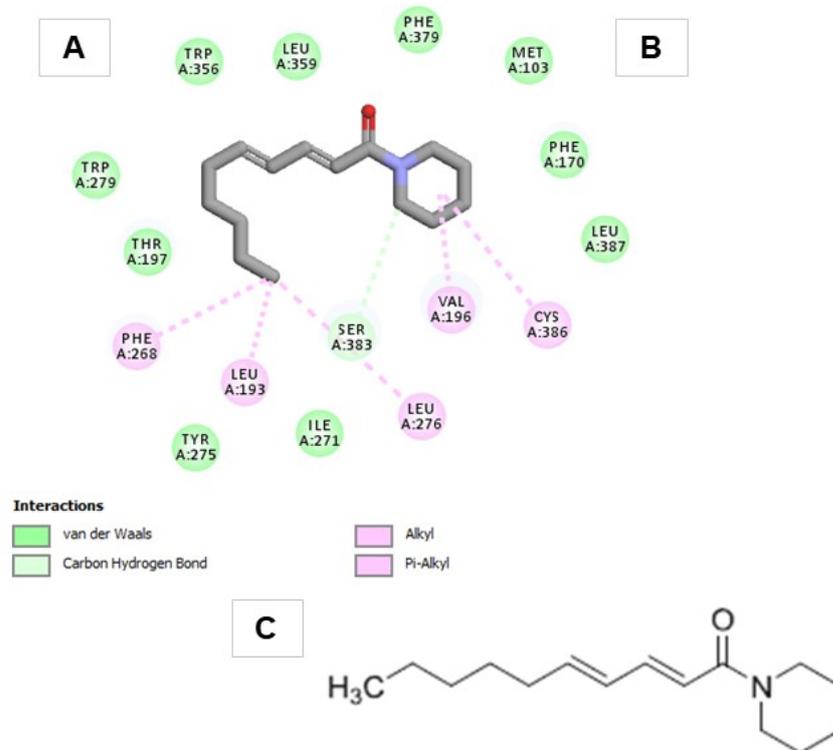
Figura 31 - isobutilamida do ácido deca-2*E*,4*E*-dienoico e ancoramentos no receptor CB1.



Legenda: A) Ancoramento 2D; B) Ancoramento 3D; e C) Estrutura. Energia -6,6kcal/mol. **Fonte:** O Autor (2023).

Na alcamida piperidinamida do ácido deca 2*E*,4*E*-dienoico é possível observar interações do tipo π -alquil com os aminoácidos Cys386; Val196; Interações do tipo alquil com a Phe268; Leu193; Leu27 e ligação carbono hidrogênio com a Ser383 (Fig. 32).

Figura 32 - Piperidinamida do ácido deca *2E,4E*-dienoico e ancoramentos no receptor CB1.



Legenda: A) Ancoramento 2D; B) Ancoramento 3D; e C) Estrutura. Energia -7,3kcal/mol. **Fonte:** O Autor (2023).

Na tabela 2, estão descritas as energias do complexo ligante + proteína e os aminoácidos envolvidos nas interações. Observa-se que as alcanidas estabelecem interações com aminoácidos comuns ao ligante cristalográfico e anandamida, e exibem valores de energia muito semelhantes ao agonista endógeno, como visto para piperidinamida do ácido deca-*2E,4E*-8,10-diinoico cuja energia de interação foi -7,5 kcal/mol, mostrando que essas alcanidas apresentam afinidade pelo receptor canabinoide CB1.

Tabela 2 - Energia de interação entre o ligante cristalográfico, anandamida e alcamidas no receptor CB1 e os aminoácidos envolvidos na interação.

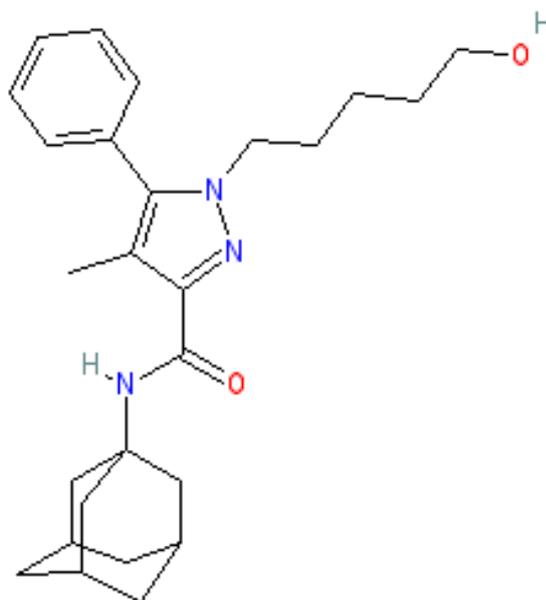
Ligantes	Energia de Interação (kcal/mol)	Aminoácidos
ZDG (ligante cristalográfico)	-12.3	Phe268 ; Phe379; Cys386 ; Trp279 ; Val196 ; Leu387; Phe170 ; Met103 ; Leu359 , Phe102 ; Leu193 .
Anandamida	-7.5	Cys386 ; Ser390; Trp279 .
isobutilamida do ácido deca 2E-4E-dienoico (Pelitorina)	-6,6	Trp379 ; Leu360; Leu359 ; Phe200; Trp 356
piperidinamida do ácido deca-2E,4E-8,10-diinoico	-7,5	Phe268 , Phe102, Phe189, Phe269.
Isobutilamida do ácido deca 2E,4E,8Z trienoico	-7,0	Phe102 ; Phe268 ; Pro269; Phe189
Isobutilamida do ácido undeca-2E,4E-dieno,8,10 diinoico	-7,2	Phe268 ; Phe102 ; Phe189; Pro269
Piperidinamida do ácido deca 2E,4E-dienoico	-7,3	Cys386 ; Val196 ; Phe268 ; Leu193 ; Leu27; Ser386

Fonte: O Autor (2023).

2.2.3.2 Reancoragem do ligante cristalográfico e Ancoragem da anandamida e alcamidas em CB2.

O ligante cristalográfico 9JU (Fig.38) é um composto sintético que possui um anel pirazol e forma interações do tipo π - π com o aminoácido Phe183. Além disso, possui uma cadeia 5-hidroxipentil que forma interações hidrofóbicas com os aminoácidos Phe183, Ile186 e Trp194, além de um grupo adamantil que faz interações principalmente com os aminoácidos Phe183 (Li *et al.*, 2019).

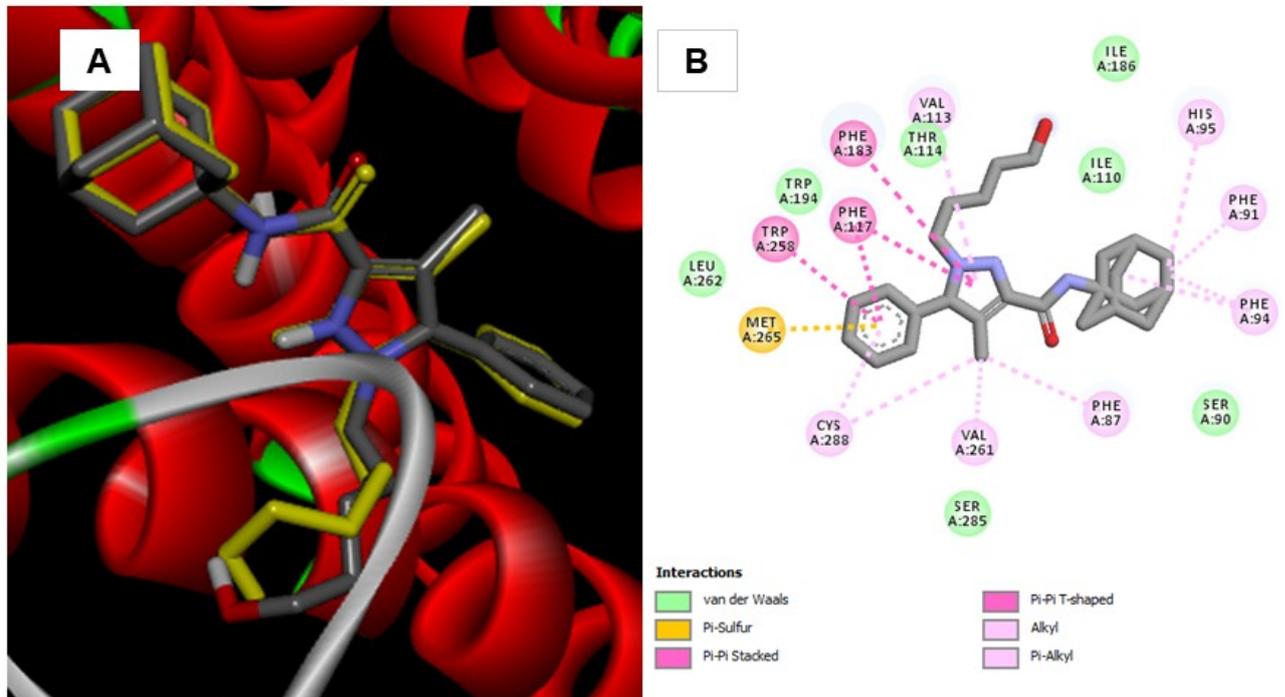
Figura 33 - Estrutura 2D do ligante cristalográfico 9JU.



Fonte: Adaptado de LI *et al.* (2019).

Estudos demonstraram que o ligante cristalográfico 9JU é altamente eficaz na interação com o receptor CB2. A validação do método por meio da reancoragem desse ligante cristalográfico no receptor CB2 (PDB: 5ZTY) foi bem-sucedida, resultando em uma energia de interação de -11,6 kcal/mol (Fig.34).

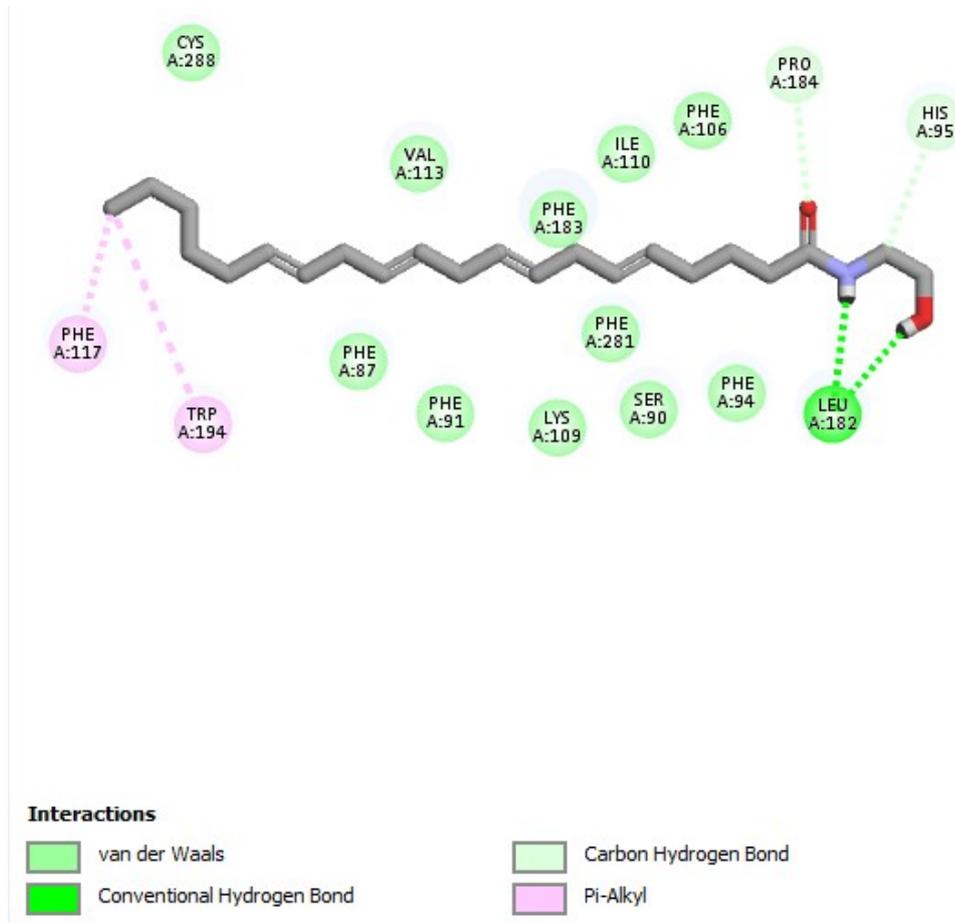
Figura 34 - Reancoragem do ligante cristalográfico (9JU) (PDB: 5ZTY)



Legenda: A) 9JU em CB2 à esquerda; e B) Diagrama das interações entre 9JU e o receptor CB2. Energia -11,6kcal/mol. **Fonte:** O Autor (2023).

Dado a ausência de ancoramento da anandamida no PDB para o receptor CB2, foi necessário realizar experimentalmente. A partir desse processo, observou-se uma ligação de hidrogênio entre o NH amídico e His95, além de interações do tipo π -alquil entre a cadeia carbônica e os resíduos Phe117 e Phe94. Esses resíduos também estão envolvidos em interações com a anandamida e o ligante 9JU. Como resultado, obteve-se uma energia de interação de -7,7 kcal/mol (Fig. 35).

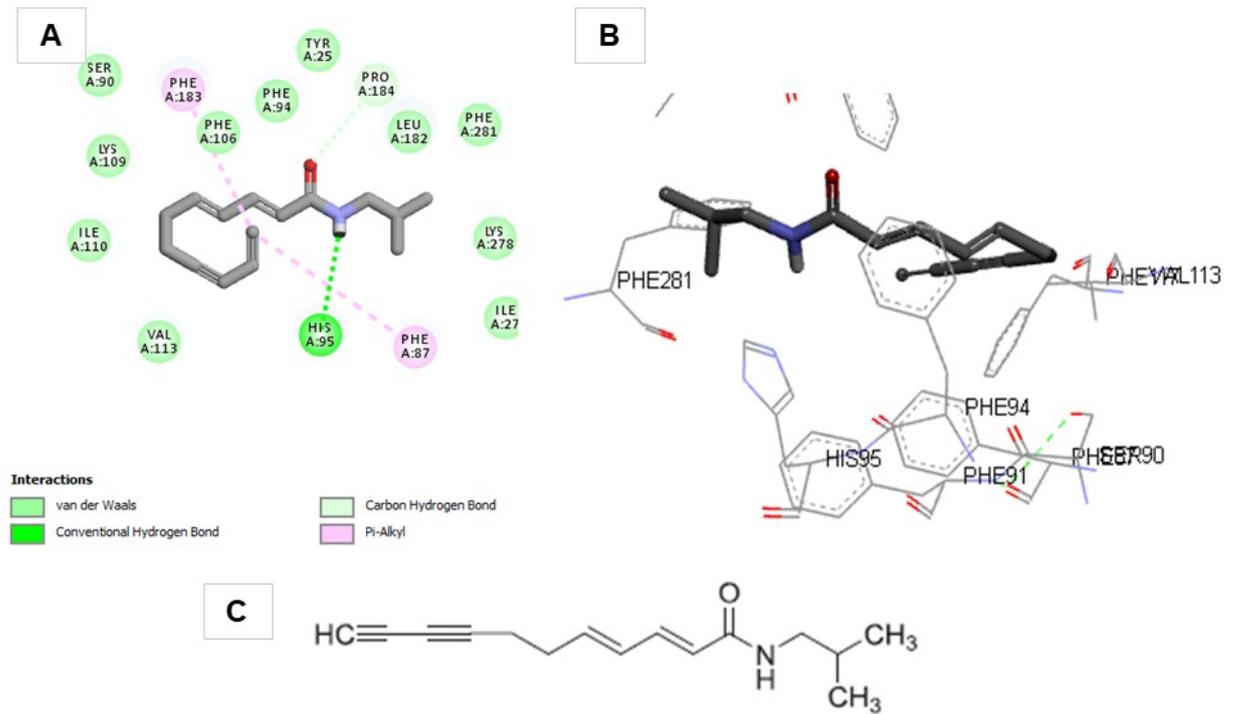
Figura 35 - Ancoragem da anandamida no receptor CB2.



Legenda: Energia -7,7kcal/mol. **Fonte:** O Autor (2023).

Na alcamida isobutilamida do ácido undeca-2*E*,4*E*-dieno-8,10-diinoico é possível observar interações do tipo π -alquil com os aminoácidos Phe183 e Phe87, além de ligação de hidrogênio entre NH amídico e His95 (Fig. 36)

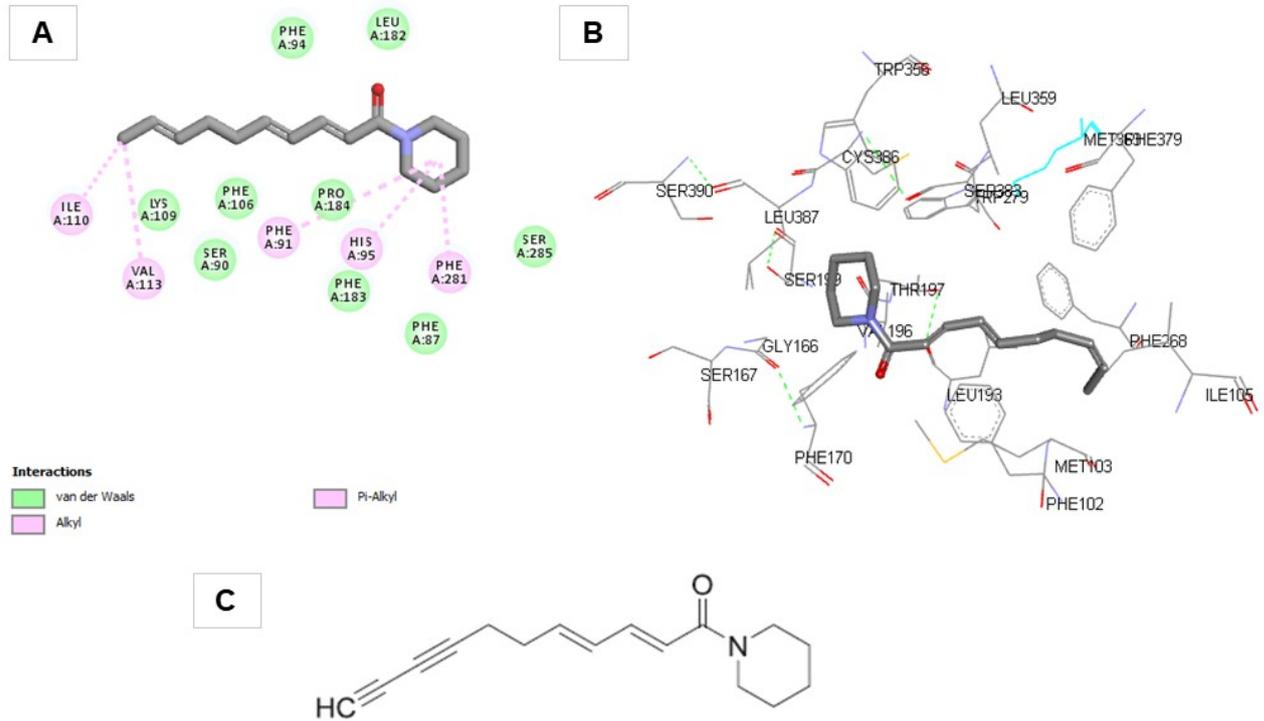
Figura 36 - isobutilamida do ácido undeca-2*E*,4*E*-dieno-8,10-diinoico e ancoramentos no receptor CB2.



Legenda: A) Ancoramento 2D; B) Ancoramento 3D; e C) Estrutura. Energia -7,6kcal/mol. **Fonte:** O Autor (2023).

Na alcamida piperidinamida do ácido deca-2*E*,4*E*-8,10-diinoico é visto ligações do tipo π -alquil e alquil com os aminoácidos Ile110 e Val113, Phe91, His95 e Phe281 (Fig. 37).

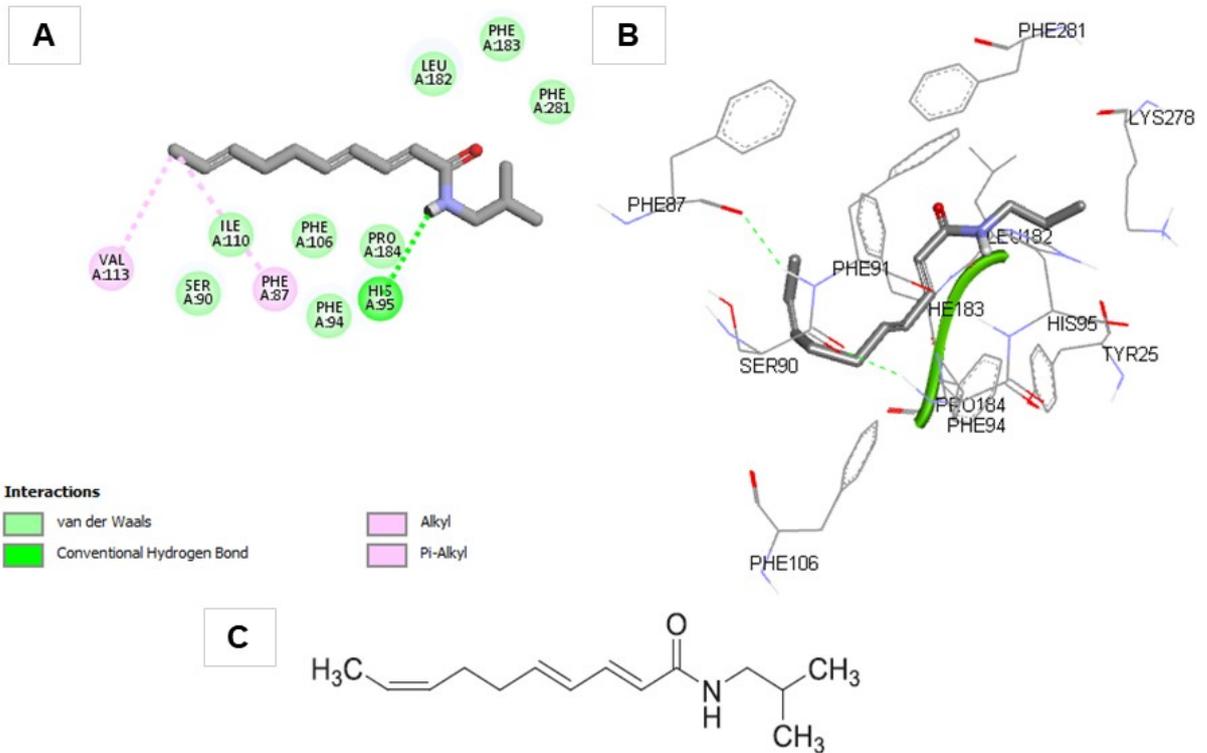
Figura 37 - piperidinamida do ácido deca-2*E*,4*E*-8,10-diinoico e ancoramentos no receptor CB2.



Legenda: A) Ancoramento 2D; B) Ancoramento 3D; e C) Estrutura. Energia -8,4kcal/mol. **Fonte:** O Autor (2023).

Na alcanida isobutilamida do ácido deca 2*E*,4*E*-8*Z*- trienoico é possível observar interações do tipo ligação de hidrogênio entre NH amídico e o aminoácido His95 e ligações do tipo alquil com Val113 e Phe87 (Fig. 38).

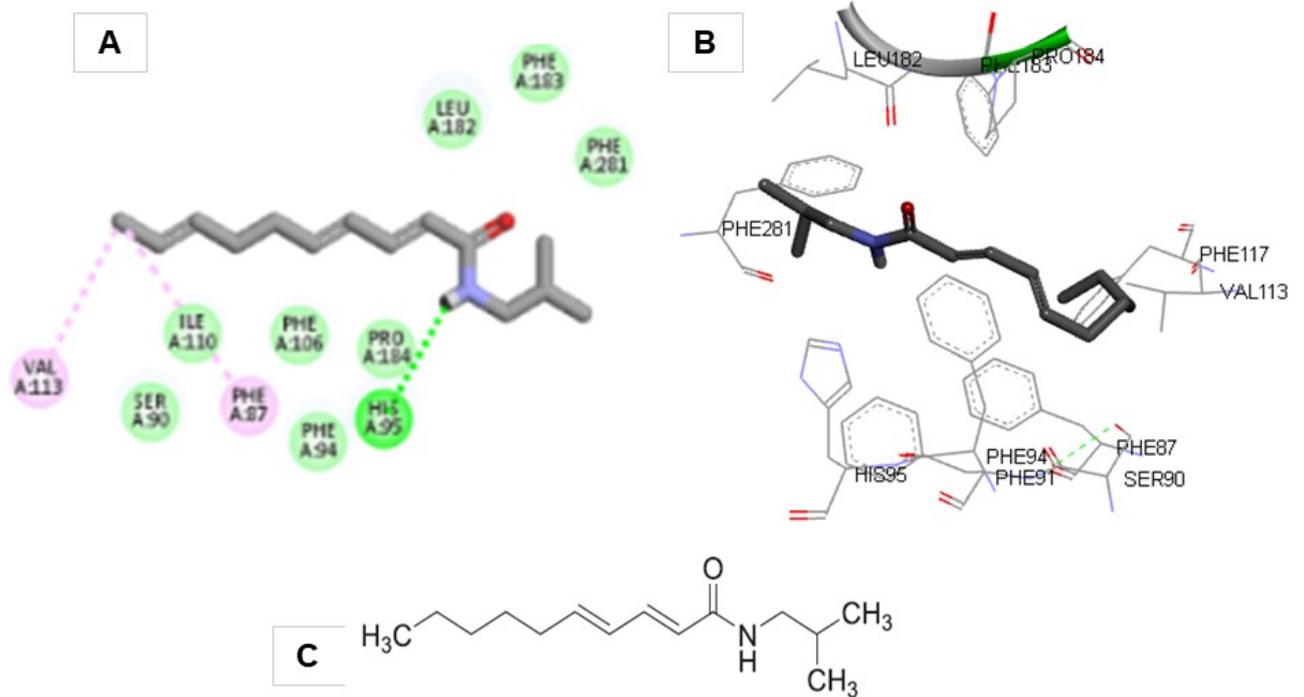
Figura 38 - isobutilamida do ácido deca *2E,4E*-8*Z*- trienoico e ancoramentos no receptor CB2.



Legenda: A) Ancoramento 2D; B) Ancoramento 3D; e C) Estrutura. Energia -7,3kcal/mol. **Fonte:** O Autor (2023).

Na alcamida isobutilamida do ácido deca-*2E,4E*-dienoico é possível observar interações do tipo π -alquil com a Val113 e a Phe87 e uma ligação de hidrogênio entre o NH amidico e o aminoácido His95 (Fig. 39).

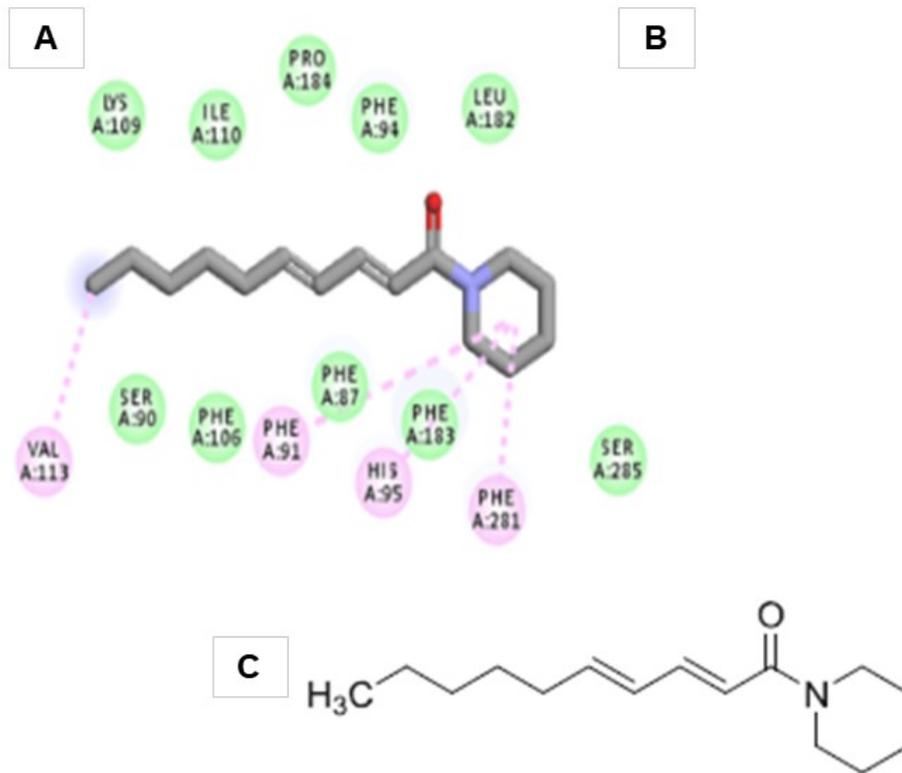
Figura 39 - isobutilamida do ácido deca-2*E*,4*E*-dienoico e ancoramentos no receptor CB2.



Legenda: A) Ancoramento 2D; B) Ancoramento 3D; e C) Estrutura. Energia -7,6kcal/mol. **Fonte:** O Autor (2023).

Na alcanida piperidinamida do ácido deca 2*E*,4*E*-dienoico é possível observar interações do tipo alquil com a Val113 e interações do tipo π -alquil com Phe91, Phe281 e a His95 (Fig. 40).

Figura 40 - piperidinamida do ácido deca 2*E*,4*E*-dienoico e ancoramentos no receptor CB2.



Legenda: A) Ancoramento 2D; B) Ancoramento 3D; e C) Estrutura. Energia -7,9kcal/mol. **Fonte:** O Autor (2023).

Ao ancorar as alcâmidas selecionadas no receptor CB2, observa-se que elas estabelecem interações com aminoácidos comuns (destacados em negrito) ao ligante cristalográfico e anandamida, como por exemplo, a His95, e exibem valores de energia muito semelhantes ao da anandamida e até melhores, como visto para piperidinamida do ácido deca-2*E*,4*E*-8,10-diinoico e a piperidinamida do ácido deca 2*E*,4*E*-dienoico (Tabela 3).

Tabela 3 - Energia de interação entre o ligante cristalográfico, anandamida e alcanidas no receptor CB2 e aminoácidos envolvidos na interação.

Ligantes	Energia de Interação (kcal/mol)	Aminoácidos
9JU (ligante cristalográfico)	-11,6	Met265; Trp258; Phe117 ; Cys288; Phe183; Phe91; Phe94; Phe87; His95 ; Val291; Val113 .
Anandamida	-7,7	Leu182; Phe117 ; Trp194; Pro184; His95 .
Isobutilamida do ácido deca 2E-4E-dienoico (Pelitorina)	-7,0	His95; Phe183; Phe87 .
piperidinamida do ácido deca-2E,4E-8,10-diinoico	-8,4	Ile110; Val113; Phe91; His95 ; Phe281.
Isobutilamida do ácido deca 2E,4E,8Z trienoico	-7,3	Val113; Phe87; His95 .
Isobutilamida do ácido undeca- 2E,4E-dieno,8,10 diinoico	-7,6	His95; Phe183; Phe87 .
Piperidinamida do ácido deca 2E,4E-dienoico	-7,9	Phe91; His95; Val113

Fonte: O Autor (2023).

Assim, por meio dos estudos de *docking* molecular, pode-se sugerir a similaridade estrutural entre a anandamida e as alcanidas da espécie *Achillea millefolium*, indicando que essas moléculas têm a capacidade de interagir com os receptores CB1 e CB2. Isso as torna promissoras para futuros estudos *in vitro* e *in vivo*, com foco no sistema endocanabinoide. Um exemplo desses estudos é o realizado por Yien *et al.* em seu trabalho "*Alkylamides from Echinacea Are a New Class of Cannabinomimetics: Cannabinoid Type 2 Receptor-Dependent And Independent Immunomodulatory Effects*" no qual avaliaram *in silico* as alcanidas de *Echinacea* em relação ao CB2.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, foi possível obter um bom rendimento do extrato de *Achillea millefolium* para a realização da partição líquido-líquido, encaminhando-se a fração hexânica para o CLAE-ESI-EM, na qual foi possível detectar as alcanidas por meio desta técnica. Aliado a análise dos dados de espectro de massas e ultravioleta em comparação com os dados previamente da literatura.

Portanto, destaca-se neste trabalho a alcanida piperidinamida do ácido deca-2*E*,4*E*-8,10-diinoico, com energia semelhante a anandamida cuja energia de interação foi de -7,5 kcal/mol no receptor CB1 e as alcanidas, piperidinamida do ácido deca-2*E*,4*E*-8,10-diinoico e a piperidinamida do ácido deca 2*E*,4*E*-dienoico com energias -8,4kcal/mol e -7,9kcal/mol, respectivamente, com interação no receptor CB2,mostrando-se com energias até melhores do que a própria anandamida.

Pela primeira vez, foram relatados estudos por docking molecular via interação nos receptores endocanabinoides com as alcanidas de *Achillea millefolium*, demonstrando-se um importante potencial alvo para dor.

Como perspectivas futuras, pretende-se dar continuidade na elucidação estrutural das alcanidas, aplicando as técnicas EM-EM, bem como, o isolamento das alcanidas.

REFERÊNCIAS

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos. 3.ed. Porto Alegre: Editora Artmed, p. 608, 2015.

BERMAN, H. M. The Protein Data Bank. **Nucleic acids research**, v. 28, n. 1, p. 235–242, 2000. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC102472/>. Acesso em: 15 out. 2023. DOI: 10.1093/nar/28.1.235.

BISSON, P. M. Farmácia clínica e atenção farmacêutica. 4.ed. Santana de Paraíba: Editora Manole, p. 652, 2021.

BIZÃO, N. D. S. Interação genótipo x ambiente, caracterização isoenzimática, diversidade genética e química em *Eclipta alba* (L.) Hassk. Orientador: Vicente Wagner Dias Casali. 2002. 161f. Trabalho de Conclusão de Curso (Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de “*Doctor Scientiae*”) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2002. Disponível em: <https://www.locus.ufv.br/bitstream/123456789/10307/1/texto%20completo.pdf>. Acesso em: 18 set. 2023.

BOONEN *et al.* Alkamid database: Chemistry, occurrence and functionality of plant N-alkylamides. **Journal of ethnopharmacology**, v. 142, n. 3, p. 563–590, 2012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378874112003480>. Acesso em: 15 out. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.05.038>.

BRAGA, C. Flores e folhagens. Disponível em: <https://www.floresefolhagens.com.br/mil-folhas-achillea-millefolium/>. Acesso em: 15 de out. 2023.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira. 2.ed. Brasília: Anvisa, p.18-21,2021. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/formulario-fitoterapico/2023-ffb2-1-er-2-atual-final-versao-com-capa-em-word-25-abr-2023.pdf> . Acesso em: 10 ago. 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde (1996). Resolução n° 10, de 9 de março de 2010. **Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e dá outras providências.** Disponível em: https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/rdc0010_09_03_2010.pdf. Acesso em: 26 abr. 2023.

CARUSO V. P. Papel dos endocanabinoides no desenvolvimento da retina. Orientador: Karin da Costa Calaza. 2019. 46f. Trabalho de conclusão de curso (Curso Bacharelado em Biomedicina) - Universidade Federal Fluminense. 2019. Disponível em: <https://app.uff.br/riuff/bitstream/handle/1/12983/TCC%20VICTORIA%20PORTO%20CARUSO%202019.pdf?sequence=1>. Acesso em 15 out.2023.

CARVALHO, L. M.; CASALI, V. W. D. Plantas medicinais e aromáticas: relações com luz, estresse e insetos. Viçosa. Editora Universidade Federal de Viçosa. 148 p.147,1994.

CORTEZ-ESPINOSA *et al.* Valine and phenylalanine as precursors in the biosynthesis of alkaloids in *Acmella radicans*. **Natural product communications**, v. 6, n. 6, p. 1934578X1100600, 2011. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/1934578X1100600625>. Acesso em: 15 out. 2023.

CZECH *et al.* Phytochemical profiling, antioxidant and tyrosinase regulatory activities of extracts from herb, leaf and in vitro culture of *Achillea millefolium*(yarrow). **Molecules**, v. 28, n.12, p. 4791, 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37375348/>. Acesso em 10 out.2023. DOI:<https://doi.org/10.3390/molecules28124791>.

DASRAM, M. H.; WALKER, R. B.; KHAMANGA, S. M. Recent advances in endocannabinoid system targeting for improved specificity: Strategic approaches to targeted drug delivery. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 21, p. 13223, 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9658826/>. Acesso em 15 out. 2023. DOI: 10.3390/ijms232113223.

DAVIDSE, G. Trópicos.org. Disponível em: <http://legacy.tropicos.org/Image/78328>. Acesso em: 15 out. 2023.

DESANTANA *et al.* Definição de dor revisada após quatro décadas. **BrJP**, v. 3, p. 197–98, set. 2020. Disponível em: <https://sbed.org.br/wp-content/uploads/2020/09/Jornal-Dor-n-74.pdf>. Acesso em 15 out. 2023.

FERNANDES, F.; HEINDEN, G. *Achillea* in Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio De Janeiro. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB613447> Acesso em: 15 set. 2023.

FERNANDES, I. A. M. Uso de canabinóides para tratamento da dor orofacial e disfunção temporomandibular: uma revisão de literatura. Orientadora: Beatriz Dulcineia Mendes de Souza. 2023. 74f. Trabalho de conclusão de curso (Curso Bacharelado em Odontologia) - Universidade Federal de Santa Catarina.2023. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/247853/TCC%20Isabelle%20Fernandes.pdf?sequence=3>. Acesso em 15 out.2023.

FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L. Farmacologia clínica e terapêutica. 5.ed. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan LTDA. p. 1605, 2017.

GONÇALVES *et al.* Recomendações para o tratamento farmacológico da dor. **Revista Portuguesa de Medicina Geral e Familiar**, [S. l.], v. 23, n. 4, p. 457–64, 2007. DOI: 10.32385/rpmgf.v23i4.10384. Disponível em: <https://rpmgf.pt/ojs/index.php/rpmgf/article/view/10384>. Acesso em: 15 out. 2023.

GREGER, H. Alkamides: a critical reconsideration of a multifunctional class of unsaturated fatty acid amides. **Phytochemistry reviews: proceedings of the Phytochemical Society of Europe**, v. 15, n. 5, p. 729–770, 2016. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/279962192>. Acesso em: 15 out. 2023. DOI: 10.1007/s11101-015-9418-0.

GREGER, H.; WERNER, A. Comparative HPLC Analysis of Alkamides within the *Achillea millefolium* Group. **Planta medica**, v. 56, n. 5, p. 482–486, 1990. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17221454/>. Acesso em 24 ago. 2023. DOI: 10.1055/s-2006-961017.

GREGIO, S. J. D.; SEBASTIÃO, M. I. Anatomia de raiz, caule e folha e identificação de estruturas secretoras de *Achillea millefolium*. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, vol. 28, núm. 4, outubro-dezembro, 2006, p. 327-334. Disponível em: <<https://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciBiolSci/article/view/163/233>>. Acesso em: 10 out. 2023.

HUA *et al.* Crystal structure of the human cannabinoid receptor CB1. **Cell**, v.167, n. 3, p.750-762, 2006. Disponível em: [https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674\(16\)31385-X?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS009286741631385X%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(16)31385-X?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS009286741631385X%3Fshowall%3Dtrue). Acesso em 15 out. 2023. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.004>

IVANOVIC *et al.* Extraction of bioactive metabolites from *Achillea millefolium* L. with choline chloride based natural deep eutectic solvents: A study of the antioxidant and antimicrobial activity. **Antioxidants** v.11, n. 4, p. 724, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35453409/> Acesso em: 10 out.2023. DOI:<https://doi.org/10.3390/antiox11040724>

JENABI, E.; FERREDOONY, B. Effect of *Achillea millefolium* on relief of primary dysmenorrhea: A double-blind randomized clinical trial. **Journal of pediatric and adolescent gynecology**, v. 28, n. 5, p. 402–404, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26238568/>. Acesso em: 26 abr.2023. DOI:10.1016/j.jpag. 2014.12.008.

KOPF, A.; PATEL, N.B. Guia para o Tratamento da Dor em Contextos de Poucos Recursos. Seattle. p. 418, 2009.

KRAUS S.I. Potencial terapêutico do extrato etanólico de *Combretum leprosum* no modelo experimental de neuropatia periférica camundongos. Orientador: Adair Roberto Soares dos Santos. 2017. 74f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Santa Catarina, 2017. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/182112/TCC%20-%20Vers%C3%A3o%20Final%20A5.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 15 out. 2023.

KUMAR *et al.* Pharmacognosy, phytochemistry, and molecular studies of an important medicinal herb *Achillea millefolium* L. **Ayu**, v. 42, n. 2, p. 93, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10158652/>. Acesso em: 10 out. 2023.

LAKSMI *et al.* Yarrow(*Achillea millefolium* Linn). A herbal medicinal plant with broad therapeutic use-a review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v.9, n.22, p.136-141, 2011. Disponível em: <https://globalresearchonline.net/journalcontents/volume9issue2/Article-022.pdf>. Acesso em: 10 out. 2023.

MARION, G. M. Modelagem computacional da NTPDase 5 de *Homo sapiens* e estudos de *docking* de chalconas e auronas. Orientadora: Priscila Vanessa Zabala Capriles Goliatt. 2018. 81f. Trabalho de conclusão de curso (Curso Bacharelado em Farmácia) - Universidade Federal de Juiz de Fora.2019. Disponível em:<https://www2.ufjf.br/farmacia/wp-content/uploads/sites/161/2015/04/TCC-Gabriel-Macedo-Marion.pdf>. Acesso em 15 out.2023.

MATTOS, I.R.D. Estudo por docagem molecular da atividade da 2'- Hidroxiflavona na quinase NDK do organismo humano e do protozoário *Leishmania amazonensis*. Orientadora: Arlan da Silva Gonçalves. 2021. 92f. Trabalho de conclusão de curso(Curso Bacharelado em em Química Industrial) - Instituto Federal do Espírito Santo.2021. Disponível em: https://repositorio.ifes.edu.br/bitstream/handle/123456789/1303/TCC_Estudo_por_docagem_molecular.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Acesso em 15 out.2023.

MINTO, R. E.; BLACKLOCK, B. J. Biosynthesis and function of polyacetylenes and allied natural products. **Progress in lipid research**, v. 47, n. 4, p. 233–306, 2008. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2515280/>. Acesso em 15 de out. 2023. DOI: 10.1016/j.plipres.2008.02.002.

MOLINA-TORRES, J.; CHAVEZ, A. G. Alcamidas en plantas; distribución e importancia. **Avance y perspectiva**, v. 20, p. 337-387, 2001.Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/242260227>. Acesso em: 10 set.2023.

NUNES, V.S.P. Análise comparativa das Ecto-NTPDase 1 de *Homo sapiens* e *Schistosoma mansoni* por meio de modelagem tridimensional, dinâmica molecular e docking receptor-ligante. Orientadora: Priscila Vanessa Zabala Capriles Goliatt. 2017. 38f. Tese de conclusão de doutorado(Programa de Pós Graduação em Modelagem Computacional)- Universidade Federal de Juiz de Fora.2015. Disponível em: <https://repositorio.ufjf.br/jspui/handle/ufjf/1139>. Acesso em 15 out.2023.

OLIVEIRA, M.D.S. O papel dos endocanabinoides no controle da dor. Orientador: Marina Gomes Miranda. 2002. 161f. Trabalho de Conclusão de Curso (título de Especialista em Farmacologia apresentado à Universidade Federal de Minas Gerais). ,2017. Disponível em: https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/BUOS-BC9MRG/1/o_papel_dos_endocanabinoides_no_controle_da_dor.pdf . Acesso em: 18 set. 2023.

RANG *et al.* Farmacologia. 8.ed. Editora Elsevier. Rio de Janeiro. p.1939, 2016.

RAUCHENSTEINER, F.; NEJATI, S.; SAUKEL, J. The *Achillea millefolium* group (Asteraceae) in Middle Europe and Balkans: a diverse source for the crude drug *Herba Millefolii*. **Journal of Traditional Chinese Medicine**,p. 113–119, 2004. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/284549387_The_Achillea_millefolium_grou

p_Asteraceae_in_Middle_Europe_and_the_Balkans_A_diverse_source_for_the_cru de_drug_Herba_Millefolii. Acesso em: 28 ago. 2023.

STEIN, R. Abordagem química e investigação do efeito anti-inflamatório de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen em modelos pré-clínicos. 2020. 128f. Trabalho de Conclusão de Curso (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande Do Sul, 2020. Disponível em: <https://www.repositorioceme.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/255275/001163336.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 15 out. 2023.

REZENDE *et al.* Endocannabinoid system: Chemical characteristics and biological activity. **Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)**, v. 16, n. 2, p. 148, 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9966761/>. Acesso em 15 de out. 2023. DOI: 10.3390/ph16020148.

ROCHA, G.G. Mecanismos de ação do canabidiol: revisão de literatura. Orientador: Semíramis Domingues Diniz. 2023. 20f. Trabalho de conclusão de curso(Curso de graduação em Farmácia)- o Centro Universitário UNA.2023. Disponível em: <https://repositorio.animaeducacao.com.br/bitstream/ANIMA/35086/1/Mecanismo%20de%20a%C3%A7%C3%A3o%20do%20canabidiol%20revis%C3%A3o%20de%20literatura.pdf>. Acesso em 15 out.2023.

RODRIGUES, L.M.D.S. Estudos de docking molecular de derivados triazóis como potenciais intercaladores de DNA e inibidores da topoisomerase II. Orientador: Túlio Ricardo Couto de Lima Souza. 2019. 62f. Trabalho de conclusão de curso(Curso de Licenciatura em Química)- Universidade Federal Rural de Pernambuco.2019. Disponível em: https://repository.ufrpe.br/bitstream/123456789/1316/1/tcc_lucasmatheusdesouzarodrigues.pdf. Acesso em 15 out.2023.

SAEIDNIA *et al.* A review on phytochemistry and medicinal properties of the genus *Achillea*. **Daru: journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences**, v. 19, n. 3, p. 173–186, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22615655/>. Acesso em: 26 abr 2023.

SANTOS, S. M. D. Obtenção de espilantol a partir de folhas de jambu. Orientador: Edilberto Rocha Silveira. 2015. 35f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Bacharelado em Química com Habilitação Indústria) – Universidade Federal do Ceará, 2015. Disponível em: https://repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/35232/1/2015_tcc_smsantos.pdf. Acesso em: 15 out. 2023.

TROCK D.K., Rede de portais SEInet, 2023. Disponível em: <https://swbiodiversity.org/seinet/index.php>. Acesso em: 12 set. 2023.

SETZER, W. The phytochemistry of Cherokee aromatic medicinal plants. **Medicines (Basel, Switzerland)**, v. 5, n. 4, p. 121, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6313439/>. Acesso em: 01 out. 2023. DOI: 10.3390/medicines5040121.

SIMÕES *et al.* Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6.ed. Porto Alegre: Editora UFRGS, p. 1257, 2008.

SOUZA R.L.D. Aplicação da técnica de ancoragem molecular na otimização do fármaco hipoglicemiante metformina. Orientadora: Walkiria Regis de Medeiros. 2015. 41f. Trabalho de conclusão de curso (Curso Bacharelado em Farmácia) - Centro Universitário Luterano de Palmas. 2015. Disponível em: <https://ulbra-to.br/bibliotecadigital/publico/home/documento/169>. Acesso em 15 out. 2023.

SPELMAN, K.; WETSCHLER, M. H.; CECH, N. B. Comparison of alkylamide yield in ethanolic extracts prepared from fresh versus dry *Echinacea purpurea* utilizing HPLC–ESI-MS. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 49, n. 5, p. 1141–1149, 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19321283/>. Acesso em 10 set. 2023. DOI:10.1016/j.jpba.2009.02.011

STRZEPEK-GOMÓŁKA, M.; GAWEŁ-BĘBEN, K.; KUKULA-KOCH, W. Achillea species as sources of active phytochemicals for dermatological and cosmetic applications. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2021, p. 1–14, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8018854/>. Acesso em: 01 out. 2023.

TURNER, S.R. Trópicos.org. Disponível em: <http://legacy.tropicos.org/Image/100426363>. Acesso em: 15 out. 2023.

VARANDAS, C. M. B. Fisiopatologia da dor. Orientadora: Ana Rita Castro. 2013. 79f. Trabalho de conclusão de curso (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Fernando Pessoa. 2013. Disponível em: https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4312180/mod_resource/content/1dor1.pdf. Acesso em 15 out. 2023.

VERLY, H. Bioinformática: da Biologia à Flexibilidade Molecular. 1. ed. Editora Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular- SBBq. São Paulo.p.292, 2014. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/166105/001012172.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 15 out. 2023.

VERYSER *et al.* N-alkylamide profiling of Achillea ptarmica and Achillea millefolium extracts by liquid and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of pharmaceutical analysis**, v. 7, n. 1, p. 34–47, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29404016/>. Acesso em: 25 abr. 2023. DOI: 10.1016/j.jpha.2016.09.005.

YATSKIEVYCH, G. Trópicos.org. Disponível em: <http://legacy.tropicos.org/Image/100432315>. Acesso em: 15 de out. 2023.

YIEN *et al.* Alkylamides from *Acmella oleracea*: antinociceptive effect and molecular docking with cannabinoid and TRPV1 receptors. **Natural Product Research**, v. 37, n. 18, p. 3136–3144, 2023. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14786419.2022.2142221>. Acesso em 10 de out. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1080/14786419.2022.2142221>.

ZOU, S.; KUMAR, U. Cannabinoid receptors and the endocannabinoid system: Signaling and function in the central nervous system. *International journal of molecular sciences*, v. 19, n. 3, p. 833, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5877694/>. Acesso em 15 de out. 2023. DOI: 10.3390/ijms19030833.