



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA**



TESE DE DOUTORADO

**ESTUDO QUÍMICO E FARMACOLÓGICO DO GÊNERO
Byrsonima (MALPIGHIACEAE) PARA O
DESENVOLVIMENTO DE NOVOS ANTI-INFLAMATÓRIOS
E ANTIMICROBIANOS**

FERNANDA GUILHON SIMPLICIO

**MANAUS
2017**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA**



FERNANDA GUILHON SIMPLICIO

**ESTUDO QUÍMICO E FARMACOLÓGICO DO GÊNERO
Byrsonima (MALPIGHACEAE) PARA O
DESENVOLVIMENTO DE NOVOS ANTI-INFLAMATÓRIOS
E ANTIMICROBIANOS**

Tese apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia, na linha de pesquisa “Bioprospecção e Desenvolvimento de Bioprocessos e Bioprodutos”.

Orientador: Prof. Dr. Emerson Silva Lima (UFAM)

Coorientadores: Profa. Dra. Maria de Meneses Pereira (UFAM)

Prof. Dr. Paul Cos (UAntwerpen)

Prof. Dr. Hans De Winter (UAntwerpen)

**MANAUS
2017**

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

G956e	<p>Guilhon Simplicio, Fernanda</p> <p>Estudo químico e farmacológico do gênero <i>Byrsonima</i> (Malpighiaceae) para o desenvolvimento de novos anti-inflamatórios e antimicrobianos / Fernanda Guilhon Simplicio. 2017 219 f.: il. color; 31 cm.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Emerson Silva Lima Coorientadora: Profa. Dra. Maria de Meneses Pereira Coorientador: Prof. Dr. Paul Cos Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte) - Universidade Federal do Amazonas.</p> <p>1. <i>Byrsonima</i> . 2. Compostos fenólicos. 3. Triterpenos. 4. Inflamação. 5. Resistência a antimicrobianos. I. Lima, Prof. Dr. Emerson Silva II. Universidade Federal do Amazonas III. Título</p>
-------	--

FERNANDA GUILHON SIMPLICIO

“ESTUDO QUÍMICO E FARMACOLÓGICO DO GÊNERO *BYRSONIMA*
(MALPIGHIACEAE) PARA O DESENVOLVIMENTO DE NOVOS ANTI-
INFLAMATÓRIOS E ANTIMICROBIANOS”.

Tese de doutorado apresentada ao Curso de
Doutorado do Programa de Pós-Graduação
em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede
de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia
Legal, na Universidade Federal do Amazonas,
como requisito parcial para obtenção do título
de Doutora em Biodiversidade e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Emerson Silva Lima
Co-orientadores: Prof. Dra. Maria de Meneses Pereira
Prof. Dr. Paul Cos

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Paul Cos (Universiteit Antwerpen – Bélgica)
Co-Orientador – Presidente da Banca



Prof. Dr. Adrian Martin Pohlit (CBA)
Membro



Profa. Dra. Geane Antiques Lourenço (UFAM)
Membro



Prof. Dr. Rosivaldo dos Santos Borges (UFPA)
Membro



Profa. Dra. Antônia Queiroz Lima de Souza (UFAM)

MANAUS – AMAZONAS
Abril/2017

Ao Professor Paulo Roberto Castro da Costa (*in
memoriam*), inspiração eterna.

AGRADECIMENTOS

À minha pequena-grande família, Graça Guilhon, minha mãe, e Ronald Guilhon, meu irmão, que apoiam minhas escolhas e manifestam, sempre que têm oportunidade, o orgulho e o carinho que sentem de mim. Vocês são o incentivo que me faz querer ir cada vez mais longe. Amo vocês!

Ao meu amor e companheiro para toda e qualquer hora, André Luiz da Costa Carvalho, por ser tudo o que é. Você deveria ser o autor desta Tese junto comigo!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Emerson Silva Lima, que confiou em mim, dando-me liberdade e suporte necessários para conduzir o trabalho com o meu *jeitinho*, sempre preocupado em me fazer crescer profissionalmente e me proporcionar incríveis oportunidades. Muito obrigada!

A minha eterna mentora, Profa. Dra. Maria de Meneses Pereira, que superou em muito o papel de orientadora. Nunca agradecerei o suficiente todos os conselhos e tudo que fez por mim!

Ao meu orientador na Bélgica, Professor Doutor Paul Cos, *o gringo mais gente boa desse mundo*. Obrigada pela incrível oportunidade e por fazer tudo que estava ao seu alcance para tornar minha temporada na UAntwerpen tão tranquila e produtiva quanto possível. Estar em um lugar de cultura tão diferente e com dificuldades para me comunicar, só não foi mais difícil porque sempre me deu apoio e me incentivou a confiar mais em mim mesma!

Ao meu coorientador na Bélgica, Professor Doutor Hans De Winter, que me recebeu da melhor forma que pode em seu laboratório, e muito me ensinou no período de cotutela. Aprendi a admirar sua tranquilidade e generosidade no curto período em que pudemos conviver.

A todos os membros da Equipe Científica desta Tese (listados na página 198), sem os quais não seria possível concluí-la.

Aos inesquecíveis Prof. Dr. Francisco Franco-Montalbán, Dra. Lorena Mayara de Carvalho Cursino, Dra. Mariana Filomena do Carmo Cardoso, Dr. Fábio Mendes dos Santos, Raimundo Carlos Pereira Júnior, Eveline Torfs, Adrienn Baán, Renata Oliveira Soares e Maíra Bidart de Macedo que, em momentos diferentes desta longa trajetória, gentilmente dispuseram seu tempo e paciência para compartilhar comigo seus conhecimentos técnicos e experiências.

À Universidade Federal do Amazonas, minha casa desde 2003, e todos os seus servidores, que não só me formaram na Graduação, Mestrado e Doutorado, como me deram a oportunidade de realizar o sonho de ser professora e pesquisadora com uma estrutura da qual me orgulho todos os dias. UFAM e minha vida se confundem.

Aos meus maravilhosos colegas da FCF-UFAM, que não só foram sensíveis a minha vontade de fazer o Doutorado, como se mobilizaram para tornar isso possível. Gratidão eterna!

Às equipes do Laboratório de Síntese Orgânica da UFF, do Laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação da UFSC, e dos Laboratórios de Microbiologia, Parasitologia e Higiene, Química Medicinal e de Tecnologia Farmacêutica e Biofarmácia da UAntwerpen, que me receberam tão bem nas minhas peregrinações Brasil afora para concluir esta pesquisa.

A Tallita Marques Machado (Guilhonzinha), meu braço direito (e esquerdo também, quiçá as pernas), que acompanhou todas as etapas deste trabalho, dando sempre o seu melhor para me ajudar. Você não imagina o carinho e o orgulho que tenho de você, e o quanto sou satisfeita por ter feito aquela ligação!

A Carlos Klinger Rodrigues Serrão, que confiou em mim e me acompanhou na “ousadia” de desenvolver um projeto síntese orgânica dentro da FCF-UFAM (idealizado dentro do carro, rumo à *New City*, hahaha), quando nem tínhamos estrutura para isso. Obrigada por me ajudar a construir essa história e mudar os rumos deste Doutorado!

A Gabriel Oliveira de Souza, que foi o líder brilhante e dedicado que ajudou e seus colegas e a mim a manter o nosso Laboratório (FITOPHAR) funcionando durante os momentos em que não pude estar presente. Muito obrigada e conte sempre comigo!

A todos os meus alunos de pesquisa, que foram valentes durante o tempo em que tiveram que cuidar, sozinhos, do nosso laboratório. Guerreiros disciplinados e competentes!

A todos os meus amigos, que torceram e vibraram comigo a cada vitória, e me deram suporte nos momentos difíceis. Em especial, agradeço a Leidyana Costa, Salomão Martim e Rosilene Gomes que acompanharam de perto todas as alegrias, tristezas, desafios, loucuras e tudo mais que fez parte deste Doutorado.

Minha sincera gratidão!

Receita para realizar sonhos: comece onde você está, use o que você tem e faça o que você pode!

Autor desconhecido.

RESUMO

Cinco do gênero *Byrsonima* da Amazônia Brasileira, *B. crispa*, *B. duckeana*, *B. garcibarrigae*, *B. incarnata* e *B. japurensis* foram selecionadas para uma investigação das propriedades anti-inflamatórias e antimicrobianas de seus extratos e substâncias semissintéticas. A capacidade de dos extratos aquosos da casca do caule inibirem sinergicamente a ciclo-oxigenase-2 (COX-2), a lipoxigenase (LOX), e a sintase do óxido nítrico indutível (iNOS) e/ou apresentarem atividade antioxidante foram avaliadas em diferentes modelos químicos, *in silico*, *in vitro* e *in vivo*. Por sua vez, os extratos hexânicos mostraram-se ricos nos triterpenos α e β -amirinas, os quais foram obtidos em grande quantidade e alto grau de pureza por um método simples e barato desenvolvido neste trabalho, e foram usados na semissíntese de 24 derivados, dos quais 18 foram avaliados quanto as suas propriedades antimicrobianas. Os extratos aquosos mostraram expressiva quantidade de compostos fenólicos e flavonoides que explicam sua ampla capacidade antioxidante demonstrada nos testes do DPPH \bullet , ABTS \bullet^{+} e Superóxido e no ensaio do macrófago ativado por lipopolissacarídeo bacteriano, o qual é também considerado um modelo de atividade anti-inflamatória *in vitro*. Eles também apresentaram boa capacidade de inibição enzimática e seus componentes fenólicos apresentaram boa afinidade pela COX-2, LOX e iNOS na avaliação *in silico*, sugerindo um efeito sinérgico interessante para novos anti-inflamatórios. *B. japurensis*, única planta medicinal dentre as estudadas, foi a espécie mais ativa *in vivo*, possivelmente pela combinação específica de compostos fenólicos normalmente bem absorvidos pela via oral. Dos 18 derivados desenvolvidos com os triterpenos α e β -amirina e testados quanto a atividade antimicrobiana, cinco derivados apresentaram atividade contra *Trypanosoma cruzi*, *T. brucei*, *Leishmania infantum*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, com diferentes graus de potência e especificidade. Possivelmente, eles atuam por interação com componentes lipídicos da membrana plasmática e também por inibição da 14 α -demetilase (CYP51), para o qual a todos os compostos apresentaram variados graus de afinidade na avaliação *in silico*. O método desenvolvido para a obtenção dos complexos de inclusão entre sulfobutiléter- β -ciclodextrina e os derivados mais lipofílicos, pode ainda ser otimizado e utilizado na modulação da seletividade e toxicidade dessas substâncias ativas, estratégia já relatada na literatura para diferentes fármacos. Sendo assim, este estudo conseguiu demonstrar que as cinco espécies de *Byrsonima* analisadas podem ser promissoras fontes de medicamentos. Em especial, a espécie *B. japurensis* serviria de um promissor modelo de novo polifármaco multialvo para o tratamento da inflamação. Os extratos hexânicos forneceram interessantes esqueletos químicos que podem ser convertidos em substâncias bastante promissoras para o arsenal antimicrobiano, de modo simples, barato e altamente reprodutível.

Palavras-chave: *Byrsonima*, compostos fenólicos, triterpenos, inflamação, resistência a antimicrobianos.

ABSTRACT

Five Amazonian *Byrsonima* species, *B. crispa*, *B. duckeana*, *B. garcibarrigae*, *B. incarnata* and *B. japurensis*, were selected to investigate the anti-inflammatory and antimicrobial properties of its extracts and semi-synthetic substances. The ability of aqueous extracts from the stem bark to act synergistically through inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2), lipoxygenase (LOX), inducible nitric oxide synthase (iNOS) and / or antioxidant activity was investigated by *in vitro*, *in silico* and *in vivo* models. In turn, the hexane extracts were rich in α and β -amyrin triterpenes, which were obtained in high quantity and high purity by a simple and cheap method developed in this work. These triterpenes were used in the semisynthesis of 24 derivatives, of which 18 were evaluated for their antimicrobial properties. The aqueous extracts contained phenolic compounds and flavonoids, resulting in a high antioxidant capacity in the DPPH \bullet , ABTS \bullet^+ and superoxide tests and in the bacterial lipopolysaccharide activated macrophage assay, i.e. an *in vitro* model of inflammatory response. They also showed good enzymatic inhibition capacity and their phenolic components showed a good affinity for COX-2, LOX and iNOS in the *in-silico* evaluation, suggesting an interesting synergistic effect. *B. japurensis*, only species used in folk medicine, showed more potent anti-inflammatory and analgesic activities in *in vivo* models, possibly by the specific combination of some phenolic compounds that are well absorbed by the oral route. Of the 18 derivatives developed with the triterpenes α and β -amirin, five showed activity against *Trypanosoma cruzi*, *T. brucei*, *Leishmania infantum*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, with different degrees of potency and specificity. Possibly, they act by interaction with lipid components of the cell membrane and also by inhibition of 14 α -demethylase (CYP51), for which all the compounds presented different degrees of affinity in the *in-silico* evaluation. The method developed to obtain the inclusion complexes with sulfobutyl ether- β -cyclodextrin can be further optimized and used in modulating the selectivity and toxicity of these active substances, which is a strategy already reported in the literature for different drugs. In conclusion, this study was able to demonstrate that the five species of *Byrsonima* may be promising sources of new medicines. In particular, *B. japurensis* would serve as a promising model for a new multitarget medicine to treat inflammation. The hexane extracts provided interesting chemical skeletons that can be converted into very promising substances for the antimicrobial arsenal, in a simple, inexpensive and highly reproducible way.

Keywords: *Byrsonima*, phenol compounds, triterpenes, inflammation, antimicrobial resistance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturação do estudo realizado nesta Tese	23
Figura 2. Substâncias isoladas de <i>Byrsonima</i> spp. entre 2010-2016.....	32
Figura 3. <i>Byrsonima crisper</i> A. Juss.....	34
Figura 4. <i>Byrsonima duckeana</i> W. R. Anderson.....	35
Figura 5. <i>Byrsonima garcibarrigae</i> Cuatrec.	36
Figura 6. <i>Byrsonima incarnata</i> Sandwith.....	36
Figura 7. <i>Byrsonima japurensis</i> A. Juss.....	37
Figura 8. Metabolismo do ácido araquidônico por cicloxigenases e lipoxigenases.....	43
Figura 9. Formação do peroxinitrito e seus efeitos no organismo	47
Figura 10. Resumo da biossíntese de compostos fenólicos nas plantas	49
Figura 11. Compostos fenólicos como antioxidantes e quelantes de metais.....	50
Figura 12. Metabolização de compostos fenólicos em humanos	53
Figura 13. Ciclo de vida e principais vetores dos parasitas tripanosomatídeos	61
Figura 14. Semelhanças e diferenças nas estruturas do colesterol e do ergosterol	64
Figura 15. Biossíntese de triterpenos e esteroides.....	75
Figura 16. Estrutura dos triterpenos α e β -amirina e a numeração dos carbonos.....	77
Figura 17. Estrutura da β -ciclodextrina e derivados.....	80
Figura 18. Espécimes coletadas na Reserva Florestal Adolpho Ducke, INPA	83
Figura 19. Animais em observação durante o teste da formalina.....	91
Figura 20. Cromatogramas e fragmentos de massa dos compostos identificados em <i>Byrsonima</i> spp..	98
Figura 21. Estrutura dos compostos identificados na desreplicação dos extratos de <i>Byrsonima</i> spp. ..	99
Figura 22. Efeito de <i>Byrsonima</i> spp. na produção de NO [•] por macrófagos ativados por LPS	107
Figura 23. Interação entre COX-2, 5-LOX e iNOS e os compostos fenólicos de maior afinidade.....	111
Figura 24. Efeito dos extratos aquosos de <i>Byrsonima</i> spp. no teste da formalina	112
Figura 25. Efeito de <i>Byrsonima garcibarrigae</i> no teste da formalina	113
Figura 26. Efeito de <i>Byrsonima duckeana</i> no teste da formalina.....	114
Figura 27. Efeito de BJAe e BGAE na nocicepção induzida por glutamato	118
Figura 28. Esquema geral da reação para a obtenção de FGS-2	126
Figura 29. Esquema geral da reação para a obtenção de FGS-3	127
Figura 30. Esquema geral da reação para a obtenção de FGS-4	127
Figura 31. Esquema geral da reação para a obtenção de FGS-5	128
Figura 32. Esquema geral da reação para a obtenção de FGS-6.	128
Figura 33. Esquema geral da reação para a obtenção de FGS-7	129
Figura 34. Esquema geral da reação para a obtenção de FGS-8	129

Figura 35. Esquema geral da reação para a obtenção de FGS-9	130
Figura 36. Esquema geral da reação para a obtenção de FGS-10	130
Figura 37. Esquema geral da reação para a obtenção de FGS-11	131
Figura 38. Esquema geral da reação para a obtenção de FGS-12	132
Figura 39. Esquema geral da reação para a obtenção de FGS-13	132
Figura 40. Esquema geral da reação para a obtenção de FGS-14	133
Figura 41. Esquema geral da reação para a obtenção de FGS-15	133
Figura 42. Esquema geral da reação para a obtenção de FGS-16	134
Figura 43. Esquema geral da reação para a obtenção de FGS-17	135
Figura 44. Esquema geral da reação para a obtenção de FGS-18	135
Figura 45. Esquema geral da reação para a obtenção de FGS-19	136
Figura 46. Esquema geral da reação para a obtenção de FGS-20	136
Figura 47. Esquema geral da reação para a obtenção de FGS-21	137
Figura 48. Esquema geral da reação para a obtenção de FGS-22	137
Figura 49. Esquema geral da reação para a obtenção de FGS-23	138
Figura 50. Esquema geral da reação para a obtenção de FGS-24	138
Figura 51. Sistemas para a preparação dos complexos de inclusão com ciclodextrinas	140
Figura 52. Análise cromatográficas preliminares dos extratos hexânicos	144
Figura 53. Obtenção da mistura de α e β -amirinas a partir dos extratos hexânicos	145
Figura 54. Cromatograma gasoso da FGS-1 e dos padrões α e β -amirina	146
Figura 55. Quantificação dos triterpenos α -amirina e β -amirina nos extratos hexânicos	147
Figura 56. Concentração de FGS-1 nas soluções contendo os complexos com ciclodextrinas	155
Figura 57. Resultado da complexação dos derivados triterpênicos com a SBE- β CD	157
Figura 58. Interação da CYP51 com os derivados de maior afinidade.	164

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização físico-química dos extratos aquosos de <i>Byrsonima</i> spp.....	94
Tabela 2. Atividade antioxidante dos extratos de <i>Byrsonima</i> spp.....	104
Tabela 3. Energia de interação dos compostos fenólicos e as enzimas inflamatórias estudadas.....	110
Tabela 4. CI_{50} e citotoxicidade dos derivados ativos no <i>screening</i> antimicrobiano.....	159
Tabela 5. Energia de interação dos derivados e CYP51 de tripanosomatídeos e <i>C. albicans</i>	162

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Estudos farmacológicos de <i>Byrsonima</i> spp. publicados entre 2010-2016.....	25
Quadro 2. Substâncias isoladas de <i>Byrsonima</i> spp. entre 2010-2016.....	31
Quadro 3. Principais classes de antibacterianos usados na terapêutica humana.....	56
Quadro 4. Principais fármacos e esquemas terapêuticos contra doenças parasitárias.....	62
Quadro 5. Principais classes de antifúngicos utilizadas na terapêutica humana.....	71
Quadro 6. Exemplos de medicamentos contendo complexos com β -ciclodextrinas.....	82
Quadro 7. Nomenclatura utilizada para identificação dos extratos de <i>Byrsonima</i> spp.....	84
Quadro 8. Parâmetros utilizados na análise de ancoragem molecular.....	90
Quadro 9. Prospecção fitoquímica realizada com os extratos de <i>Byrsonima</i> spp.....	95
Quadro 10. Método desenvolvido para separação e quantificação de α e β -amirina.....	125
Quadro 11. Parâmetros avaliados no desenvolvimento dos complexos com ciclodextrinas.....	139
Quadro 12. Concentração das amostras no <i>screening</i> antimicrobiano.....	142
Quadro 13. Estrutura e características físico-químicas dos derivados de α e β -amirinas.....	149

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

5-HPETE	5-Hidroxiperoxi-eicosatetraenoico
5-LOX	5-Lipoxigenase
AAS	Ácido acetilsalicílico
AGE	Produtos finais da glicação avançada
AINE	Anti-inflamatórios não esteroidais
ANOVA	Análise de variância
BCAE	Extrato aquoso da casca do caule de <i>Byrsonima crispera</i>
BDAE	Extrato aquoso da casca do caule de <i>Byrsonima duckeana</i>
BGAE	Extrato aquoso da casca do caule de <i>Byrsonima garcibarrigae</i>
BHA	Mistura de 2 e 3- <i>tert</i> -butil-4-hidroxianisol
BHT	Hidroxitolueno butilado
BIAE	Extrato aquoso da casca do caule de <i>Byrsonima incarnata</i>
BJAE	Extrato aquoso da casca do caule de <i>Byrsonima japurensis</i>
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
CD	Ciclodextrinas
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-EM	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas
COX-1	Ciclo-oxigenase 1
COX-2	Ciclo-oxigenase 2
DAST	Dietilamino trifluoreto de enxofre
DCC	N,N'-diciclohexilcarbodiimida
DCC-DMAP	Sistema catalisador DCC-DMAP
DCM	Diclorometano
DMAP	4-Dimetilaminopiridina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
eNOS	Sintase do radical óxido nítrico endotelial
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
FCF-UFAM	Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas
FITOPHAR	Laboratório de Fitoquímica e Semissíntese
HP-βCD	Hidroxipropil-ciclodextrina
HTS	High throughput screening
i.g.	Via intragástrica
i.pl.	Via intraplantar
iNOS	Sintase do radical óxido nítrico indutível
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

LOX	Lipoxigenases
LT	Leucotrienos
LTA ₄	Leucotrieno A ₄
LPS	Lipopolissacarídeo
M. M.	Massa molar
MPV	Matéria-prima vegetal
NADPH-oxidase	Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina oxidase
NF-κB	Fator nuclear κb
nNOS	Sintase do radical óxido nítrico neuronal
NOS	Sintases do radical óxido nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
P. F.	Ponto de fusão
PCC	Clorocromato de piridínio
PDB	<i>Protein data bank</i>
PG	Prostaglandinas
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGH ₂	Prostaglandina H ₂
PGI ₂	Prostaglandina I ₂ ou prostaciclina
RFAD	Reserva Florestal Adolpho Ducke
RMN	Espectrometria de ressonância magnética nuclear
RMN de ¹³ C	Espectrometria de ressonância magnética nuclear de carbono-13
RMN de ¹ H	Espectrometria de ressonância magnética nuclear de hidrogênio-1
RPMI	Roswell park memorial institute
SBE-βCD	Sulfobutiléter-ciclodextrina
SOD	Superóxido dismutases
T. A.	Temperatura ambiente
TCA	Ácido tricloroacético
THF	Tetrahidrofurano
TXA ₂	Tromboxane A ₂
Uantwerpen	Universidade da Antuérpia
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
UFF	Universidade Federal Fluminense
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
UHPLC-ESI-MS/MS	Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas em <i>Tandem</i> com ionização por eletronebulização
UV	Ultravioleta
βCD	β-ciclodextrina

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcento
±	Mais ou menos
•OH	Radical hidroxila
®	Registrado
°C	Graus Celsius
°C/min	Graus Celsius por minuto
µg/mL	Microgramas por mililitros
µL	Microlitros
µM	Micromolar
µm	Micrometros
Å	Ångströms
ABTS ^{•+}	Monocátion radical do ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolona-6-sulfônico)
AcOH	Ácido acético
AG/100g	Equivalentes de ácido gálico por 100 gramas de amostra
Ca ²⁺	Cátion divalente do cálcio
CI ₅₀	Concentração inibitória média
cm	Centímetros
CYP51	Esterol 14 α -desmetilase
CYPBR	CYP51 de <i>Trypanosoma brucei</i>
CYPCD	CYP51 de <i>Candida albicans</i>
CYPCZ	CYP51 de <i>Trypanosoma cruzi</i>
CYPIN	CYP51 de <i>Leishmania infantum</i>
DPPH [•]	Radical difenil-picril-hidrazil
EtOH	Etanol
g%	Porcentagem em massa em gramas
g/mol	Gramas por mol
h	Horas
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
km ²	Quilômetros quadrados
kV	Quilovolts
L/h	Litros por hora
Log <i>P</i>	Logaritmo do coeficiente de partição óleo/água
m/z	Relação da massa pela carga do íon
mg	Miligramas
mg/kg	Miligrama por quilograma
mg/mL	Miligramas por mililitros
MHz	Mega Hertz
mL	Mililitros
mL/kg	Mililitro por quilograma
mL/min	Mililitros por minuto
mm	Milímetros

mM	Milimolar
mmol	Milimols
N	Normal (concentração normal)
NaH	Hidreto de sódio
nM	Nanomolar
nm	Nanômetros
NO•	Radical óxido nítrico
NO ₂ •	Radical nitrito
O ₂ •-	Ânion radical superóxido
ONOO-	Peroxinitrito
ONOOH	Ácido peroxinitroso
<i>p</i>	Probabilidade de significância
pH	Potencial hidrogeniônico
pM	Picomolar
Q/g	Equivalentes de quercetina por grama de amostra
R ²	Coefficiente de determinação
SMT	Esterol Δ ²⁴ -metil-transferase
TsOH	Ácido toluenossulfônico
™	<i>Trade Mark</i> (marca registrada)
U/mL	Unidades por mililitro
V	Volts

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	20
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	24
2.1. Gênero <i>Byrsonima</i> (Malpighiaceae)	24
2.2. Espécies de <i>Byrsonima</i> H. B. K. selecionadas para o estudo	33
2.2.1. <i>Byrsonima crispera</i>	34
2.2.2. <i>Byrsonima duckeana</i>	35
2.2.3. <i>Byrsonima garcibarrigae</i>	35
2.2.4. <i>Byrsonima incarnata</i>	36
2.2.5. <i>Byrsonima japurensis</i>	37
2.3. Sinergismo e inflamação.....	38
2.3.1. Enzimas inflamatórias	40
2.3.2. Estresse oxidativo.....	44
2.4. Compostos fenólicos no contexto de estratégias multialvo para a inflamação.....	48
2.5. Biodisponibilidade de compostos fenólicos.....	51
2.6. Resistência bacteriana	54
2.7. Doenças (Tropicais) Negligenciadas.....	60
2.7.1. Tripanosomíase americana	66
2.7.2. Tripanosomíase africana.....	67
2.7.3. Leishmaniose visceral	68
2.8. Necessidade de novos antifúngicos	70
2.9. Potencial de triterpenos como novos antimicrobianos	72
2.10. Propriedades farmacológicas de derivados semissintéticos de α e β-amirina.....	77
2.11. Ciclodextrinas.....	79
3. BIOPROSPECÇÃO DOS EXTRATOS AQUOSOS	83
3.1. Metodologia.....	83
3.1.1. Obtenção e caracterização da matéria-prima vegetal e extratos.....	83
3.1.1.1. Coleta, identificação e pré-tratamento do material botânico.....	83
3.1.1.2. Obtenção dos extratos brutos.....	84
3.1.1.3. Teor de fenóis totais.....	84
3.1.1.4. Teor de flavonoides totais	85
3.1.1.5. Prospecção fitoquímica.....	85
3.1.1.6. Caracterização fitoquímica dos extratos	85
3.1.2. Avaliação do potencial farmacológico por ensaios químicos, in vitro e in silico	86
3.1.2.1. Ensaio do DPPH*.....	86
3.1.2.2. Ensaio do ABTS* ^{•+}	87

3.1.2.3.	<i>Ensaio do radical superóxido</i>	87
3.1.2.4.	<i>Inibição da lipoxigenase</i>	88
3.1.2.5.	<i>Viabilidade celular /citotoxicidade</i>	88
3.1.2.6.	<i>Liberção de NO* por macrófagos ativados</i>	88
3.1.2.7.	<i>Ancoragem molecular</i>	89
3.1.3.	Avaliação da atividade farmacológica in vivo	90
3.1.3.1.	<i>Animais</i>	90
3.1.3.2.	<i>Inibição da nociceção e edema induzido por formalina</i>	91
3.1.3.3.	<i>Inibição da nociceção induzida por glutamato</i>	92
3.1.4.	Análise estatística	92
3.2.	Resultados e discussão	92
3.2.1.	Obtenção e caracterização da matéria-prima e extratos	92
3.2.1.1.	<i>Prospecção fitoquímica</i>	95
3.2.1.2.	<i>Estudo fitoquímico</i>	97
3.2.2.	Avaliação do potencial farmacológico por ensaios químicos, in vitro e in silico	103
3.2.2.1.	<i>Atividade antioxidante</i>	103
3.2.2.2.	<i>Inibição da lipoxigenase</i>	105
3.2.2.3.	<i>Liberção de NO* por macrófagos ativados por LPS</i>	106
3.2.2.4.	<i>Ancoragem molecular</i>	108
3.2.3.	Avaliação da atividade farmacológica in vivo	112
3.2.3.1.	<i>Comparação entre <i>Byrsonima garcibarrigae</i> e <i>Byrsonima japurensis</i></i>	117
3.2.3.2.	<i>Papel crítico da rutina nas propriedades de <i>Byrsonima japurensis</i></i>	119
3.3.	Considerações finais e perspectivas	122
4.	BIOPROSPECÇÃO DOS EXTRATOS HEXÂNICOS	124
4.1.	Metodologia	124
4.1.1.	Obtenção dos extratos hexânicos	124
4.1.2.	Obtenção dos triterpenos α e β -amirina	124
4.1.2.1.	<i>Identificação dos triterpenos α e β-amirina</i>	124
4.1.2.2.	<i>Quantificação dos triterpenos α e β-amirinas</i>	125
4.1.3.	Obtenção dos derivados de α e β -amirina	126
4.1.4.	Análise por espectrometria de ressonância magnética nuclear	138
4.1.5.	Obtenção dos complexos de inclusão	139
4.1.6.	Avaliação do potencial farmacológico in vitro e in silico	141
4.1.6.1.	<i>Atividade antimicrobiana</i>	141
4.1.6.2.	<i>Ancoragem molecular</i>	143
4.2.	Resultados e discussão	143
4.2.1.	Obtenção e caracterização dos extratos hexânicos	143

4.2.1.1. Quantificação de α e β -amirina	146
4.2.2. Obtenção dos derivados de α e β -amirina.....	148
4.2.3. Obtenção dos complexos de inclusão	154
4.2.4. Avaliação do potencial farmacológico <i>in vitro</i> e <i>in silico</i>	158
4.2.4.1. Atividade antimicrobiana.....	158
4.2.4.2. Ancoragem molecular	162
4.3. Considerações finais e perspectivas.....	167
CONCLUSÃO	171
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	173
CRONOGRAMA DE ATIVIDADES.....	197
EQUIPE CIENTÍFICA.....	198
APÊNDICES.....	199
ANEXOS	217

1. INTRODUÇÃO

A moderna abordagem para a descoberta de novos fármacos na indústria farmacêutica é fundamentada na triagem biológica automatizada em larga escala (*High Throughput Screening, HTS*), que testa centenas de compostos frente a enzimas e outros receptores isolados em um intervalo de dias. A química combinatória, que consiste na preparação simultânea de grande número de compostos estruturalmente relacionados, tem dado contribuições significativas ao aumento da quantidade de moléculas para o HTS (HAO et al., 2014).

Contudo, a produtividade da indústria farmacêutica não tem correspondido a essa produção em massa de moléculas, o que tem sido atribuído à falta de complexidade estrutural dessas quimiotecas (DI SANTO, 2010). Características como a presença significativa de anéis fundidos, em ponte ou em sistema *espiro-*, presença de átomos de oxigênio em diferentes funções químicas, e de centros estereogênicos, além de seletividade quiral, típicas dos produtos naturais, ainda não são rivalizadas pelas substâncias sintéticas (BARKER et al., 2013).

Como fonte de diversidade estrutural, as plantas ganham destaque pelo seu complexo metabolismo secundário (MILLER, 2011). Esses organismos são quimicamente versáteis, uma vez que não dispõem de outros mecanismos para sua defesa e adaptabilidade ao ambiente, produzindo, portanto, diferentes grupos de moléculas biologicamente ativas (IMMING, 2008).

Claramente, essa diversidade estrutural pode dar origem direta a candidatos a fármacos, como também servir de modelos para semissíntese de novas entidades químicas de forma mais simples e rápida (GANESAN, 2008). Além disso, o estudo de extratos de plantas vem sendo revalorizado para a geração de alternativas terapêuticas de maneira mais rápida e econômica (HARVEY, 2008; MISHRA; TIWARI, 2011), pois converge para a estratégia multialvo atualmente requerida na busca por novos medicamentos (JIAO et al., 2015; KOEBERLE; WERZ, 2014).

Neste sentido, as florestas tropicais são um grande reservatório de novos esqueletos químicos, já que englobam metade das espécies florísticas do planeta. Considerando que apenas 1 % delas tiveram seu potencial terapêutico estudado, ainda há uma grande margem para a descoberta de novos candidatos a fármacos a partir desta fonte (GURIB-FAKIM, 2006). Por outro lado, embora o número de estudos acerca do potencial farmacológico da biodiversidade tropical tenha crescido, grande parte tem falhado em produzir novos fármacos seja por não serem sistemáticos ou contínuos, por desenho experimental inadequado ou por conclusões precipitadas acerca do potencial biológico de extratos com base em poucas evidências (ALBUQUERQUE et al., 2012).

Por sua extensa biodiversidade, com relativa facilidade de coleta e condições ambientais favoráveis, o Brasil encontra-se em posição privilegiada como fonte de novas entidades químicas para a terapêutica humana (BRAZ-FILHO, 2010). O país concentra 67 % da Floresta Amazônica, a maior floresta tropical do mundo, que ocupa 58 % de seu território, distribuída entre os Estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Rondônia, Roraima, Pará e Tocantins. Além da grande diversidade de espécies vegetais, a Amazônia conta com a maior bacia sedimentar do planeta e com o maior complexo de rios do mundo (COURA; JUNQUEIRA, 2012).

Contudo, espécies da região amazônica brasileira têm sido pouco investigadas como fontes de fármacos (CARNEIRO et al., 2008), que claramente poderia ser um dos caminhos para a elucidação de seu real valor econômico, até então apenas suposto. O fato é que há uma extrema defasagem entre a faixa de território brasileiro ocupada por essa floresta (mais de 50 %) e o seu real impacto na economia do país (THÉRY, 2005).

O Estado do Amazonas é o que detém a maior parte dessa floresta, que recobre grande parte dos seus 1.570.746 km² de extensão. Dentre os Estados da Amazônia Legal, o Amazonas tem pouco impacto no desmatamento dessa floresta, em grande parte devido a políticas de

desenvolvimento pautadas na Zona Franca de Manaus em detrimento de práticas agrícolas (FERREIRA; COELHO, 2015). Com essa imensa biodiversidade resguardada, presume-se que esse Estado se constitui em um verdadeiro catálogo de moléculas potencialmente ativas ainda inexploradas.

Boa parte do que é conhecido acerca da biodiversidade do Estado do Amazonas se deve aos estudos realizados na Reserva Florestal Adolpho Ducke (RFAD), localizada nas proximidades da área urbana de Manaus, capital do Estado. A RFAD é a mais antiga base de pesquisas do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), e um dos biomas mais bem estudados da Floresta Amazônica Central de terra firme, sendo considerada uma subamostragem da diversidade amazônica (FREIRE; AZEVEDO, 2010).

Malpighiaceae é uma das famílias vegetais com maior número de espécies na RFAD, com 10 gêneros e 24 táxons (espécies, subespécies ou variedades). O gênero melhor representado é o *Byrsonima*, com 6 espécies: *Byrsonima chrysophylla* H. B. K., *B. crispa* A. Juss., *B. duckeana* W. R. Anderson, *B. garcibarrigae* Cuatrec., *B. incarnata* Sandwith, *B. poeppigiana* A. Juss. (RIBEIRO et al., 1999). Como ocorre com grande parte das espécies vegetais da região amazônica brasileira, nenhum registro é encontrado em base de dados científicas a respeito de estudos químicos ou farmacológico com essas espécies, embora vários estudos com o gênero *Byrsonima* tenham mostrado resultados bastante promissores.

Nesse contexto, foram selecionadas as espécies *Byrsonima crispa*, *Byrsonima duckeana*, *Byrsonima garcibarrigae*, *Byrsonima incarnata* e *Byrsonima japurensis* para este estudo, as quais foram submetidas a diferentes testes com o objetivo de avaliar o potencial anti-inflamatório, antibacteriano e antifúngico de seus extratos aquosos, e substâncias isoladas e derivados semissintéticos obtidos dos seus extratos hexânicos. Especificamente, os extratos aquosos foram investigados por diferentes testes químicos, *in silico*, *in vitro* e *in vivo* com o objetivo de avaliar seu potencial antioxidante, analgésico e anti-inflamatório; por sua vez, as

substâncias isoladas e semissintéticas oriundas dos extratos hexânicos foram investigados por testes *in silico* e *in vitro* visando avaliar seu potencial citotóxico contra diferentes bactérias, fungos e parasitas. Os experimentos e resultados obtidos com os diferentes extratos estão sendo discutidos em diferentes capítulos desta Tese, conforme a figura 1.

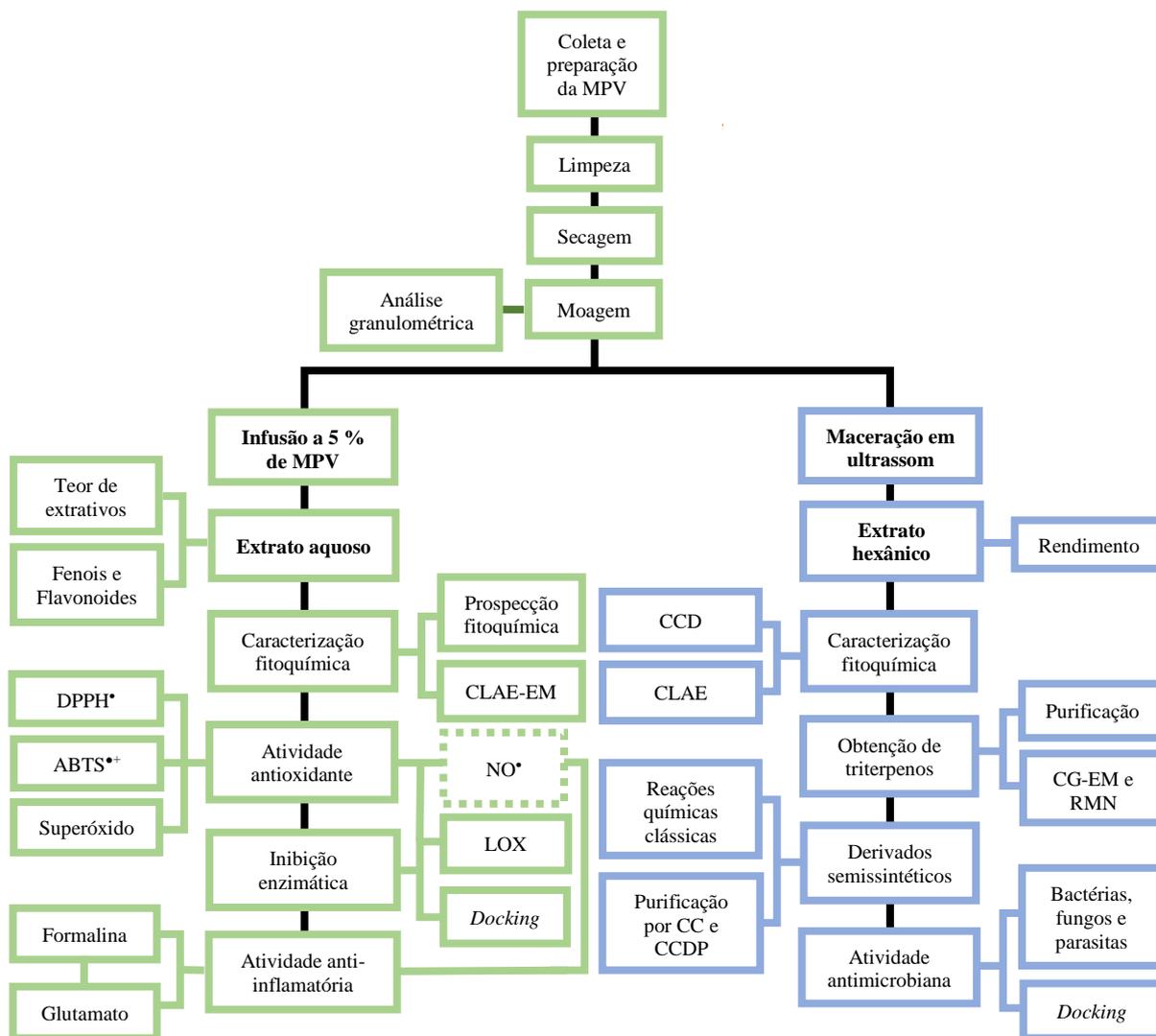


Figura 1. Estruturação do estudo realizado nesta Tese. As etapas destacadas em verde são discutidas no capítulo 3. No capítulo 4 são discutidas as etapas destacadas em azul. ABTS^{•+}: monocatión radical do ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico). CC: cromatografia em coluna. CCD: cromatografia em camada delgada. CCDP: cromatografia em camada delgada preparativa. CG-EM: cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência. CLAE-EM: cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas. DPPH[•]: radical difenil-picril-hidrazil. LOX: lipoxigenase. MPV: matéria-prima vegetal. NO[•]: radical óxido nítrico. RMN: espectrometria de ressonância magnética nuclear.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Gênero *Byrsonima* (Malpighiaceae)

Malpighiaceae é uma família de árvores, arbustos e lianas com cerca de 1300 espécies organizadas em 75 gêneros distribuídos em florestas tropicais e subtropicais e savanas do Velho e Novo Mundo, sendo que este último concentra a maior parte das espécies (ANDERSON, 2013). *Byrsonima* é um dos seus maiores gêneros, com cerca de 150 espécies (VILAS BOAS et al., 2013). No Brasil, elas somam 97, e podem ser encontradas em todas as regiões do país. Na Amazônia Brasileira são registradas 50 espécies, 33 delas no Estado do Amazonas (MAMEDE; FRANCENER, 2017).

Em uma revisão bibliográfica produzida a partir de artigos científicos publicados entre 1970 e 2010, foi observado que os seus constituintes majoritários são os flavonoides e os triterpenos, entre as 90 moléculas com relato de isolamento (GUILHON-SIMPLICIO; PEREIRA, 2011). O quadro 1 traz uma atualização dos artigos completos acerca de estudos com *Byrsonima* spp. publicados entre 2010 e 2016, em inglês, português ou espanhol. Para isso, foi realizada uma breve revisão na base de dados PubMed®, utilizando o descritor “byrsonima”. Os trabalhos recuperados foram selecionados manualmente e somente aqueles que tratavam de abordagem químico-farmacológica foram considerados para esta revisão.

Nota-se um aumento no interesse nas propriedades químico-farmacológicas desse gênero. Na revisão anterior, empregando metodologia semelhante, foram recuperados cerca de 70 trabalhos, respectivos a 40 anos de pesquisa. Na revisão ora apresentada, referente a um período de 6 anos, cerca de 50 trabalhos foram recuperados. Também se notou um aumento no interesse nas propriedades anti-inflamatórias dessas espécies, que nos quarenta anos anteriores, motivaram apenas dois trabalhos.

Quadro 1. Estudos farmacológicos de *Byrsonima* spp. publicados entre 2010-2016.

Espécie	Parte estudada	Atividade investigada	Extrato	Resultado	Referência
<i>B. basiloba</i>	Folha	Antioxidante	Metanol	Ativo	Bonacorsi et al. (2011)
<i>B. bucidaefolia</i>	Caule	Antiprotozoária	Etanol	Inativo (forma epimastigota de <i>Trypanossoma cruzi</i>)	Polanco-Hernández et al. (2012)
	Folha			Pouco ativo (forma epimastigota de <i>Trypanossoma cruzi</i>)	
	Raiz			Inativo (forma epimastigota de <i>Trypanossoma cruzi</i>)	
<i>B. coccolobifolia</i>	Caule	Antiarginase	Flavonoides isolados do extrato etanólico	Ativo (<i>Leishmania amazonensis</i>)	De Sousa et al. (2014)
	Folha				
	Partes aéreas	Antimutagênica	Etanol 70 %	Inativo (<i>Salmonella thyphimurium</i>)	Espanha et al. (2014)
	Mutagênica	Ativo (<i>Salmonella thyphimurium</i>)			
<i>B. correifolia</i>	Partes aéreas	Antimutagênica	Etanol 70 %	Ativo (<i>Salmonella thyphimurium</i>)	
		Mutagênica		Inativo (<i>Salmonella thyphimurium</i>)	
<i>B. crassa</i>	Folha	Antioxidante	Metanol	Ativo	Bonacorsi et al. (2011) ^a Bonacorsi et al. (2012) ^b
			Substâncias isoladas do extrato metanólico		Bonacorsi et al. (2011) ^a Bonacorsi et al. (2012) ^b
<i>B. crassifolia</i>	Folha	Citoestática	Etanol 95%	Pouco ativo (Câncer de cólon humano – HT-29, Câncer de mama murino – 4T1, câncer de próstata humano – PC-3, macrófagos murinos – RAW 246.7)	Taylor et al. (2013)
				Inativo (Câncer de mama humano – MDA-MB-231 e MCF7)	
		Citotóxica		Inativo (Câncer de cólon humano – HT-29, câncer de mama humano – MDA-MB-231 e MCF7, câncer de próstata humano – PC-3)	

(Continua)

(Continuação do Quadro 1)

Espécie	Parte estudada	Atividade investigada	Extrato	Resultado	Referência	
<i>B. crassifolia</i>	Folha	Citotóxica	Etanol 95%	Pouco ativo (Câncer de mama murino – 4T1, macrófagos murinos – RAW 246.7)	Taylor et al. (2013)	
	Fruto	Antioxidante	Casca e polpa liofilizados		Ativo	Gordon et al. (2011) Neves et al. (2015)
		Antibacteriana	Hexano		Ativo (<i>Streptococcus</i> sp. <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> sp. <i>Shigella dysenteriae</i>)	Pío-León et al. (2013)
					Inativo (<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Shigella flexneri</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>)	
			Clorofórmio		Pouco ativo (<i>Salmonella</i> sp., <i>Shigella flexneri</i> , <i>Streptococcus</i> sp.)	
					Inativo (<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Salmonella</i> spp., <i>Shigella dysenteriae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>)	
		Metanol		Pouco ativo (<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Shigella dysenteriae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus</i> sp.)		
			Inativo (<i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Salmonella</i> spp. <i>Shigella flexneri</i>)			
	Partes aéreas	Antidepressiva	Hexano		Inativo	Herrera-Ruiz et al. (2011)
			Metanol		Ativo	
Sementes	Antibacteriana	Diterpeno isolado do extrato hexânico		Moderadamente ativo (<i>Bacillus cereus</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Salmonella paratyphi</i> , <i>S. typhi</i> , <i>Sarcinia lutea</i> , <i>Shigella boydii</i> , <i>S. dysenteriae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Vibrio mimicus</i> , <i>V. parahemolyticus</i>)	Muniz-Ramirez et al. (2014)	

(Continua)

(Continuação do Quadro 1)

Espécie	Parte estudada	Atividade investigada	Extrato	Resultado	Referência
<i>B. crassifolia</i>	Sementes	Antidiabética	Clorofórmio	Inativo ^c	Gutierrez; Flores (2014)
			Hexano	Ativo	
		Anti-inflamatória	Metanol	Inativo ^c	Ramirez et al. (2013)
			Clorofórmio	Pouco ativo ^c	
			Hexano	Ativo	
Cicatrizante	Hexano	Ativo	Pérez-Gutierrez et al. (2013) ^d		
<i>B. dealbata</i>	Frutos	Antioxidante	Mistura de extrato acetônico e extrato metanólico	Ativo	Rufino et al. (2010)
<i>B. fagifolia</i>	Folhas	Antimicobacteriana	Clorofórmio	Ativo (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>)	Higuchi et al. (2011)
			Metanol	Inativo (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>)	
			Metanol 80%		
			Triterpenos e alcanos isolados do extrato clorofórmico	Ativo (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>)	
	Partes aéreas	Antimutagênica	Etanol 70%	Ativo (<i>Salmonella thyphimurium</i>)	Espanha et al. (2014)
Mutagênica		Inativo (<i>Salmonella thyphimurium</i>)			
<i>B. intermedia</i>	Casca do caule	Anti-inflamatória / antinociceptiva	Aquoso	Ativo	Orlandi et al. (2011)
	Folha	Antidiarréica	Metanol	Ativo	Santos et al. (2012)
		Anti-inflamatória / antinociceptiva	Aquoso	Ativo	Moreira et al. (2011)
		Antibacteriana	Metanol	Ativo (<i>Helicobacter pylori</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i>)	Santos et al. (2012)
		Antiúlcera	Metanol	Ativo	

(Continua)

(Continuação do Quadro 1)

Espécie	Parte estudada	Atividade investigada	Extrato	Resultado	Referência
<i>B. intermedia</i>	Partes aéreas	Antimutagênica	Etanol 70%	Ativo (<i>Salmonella thyphimurium</i>)	Espanha et al. (2014)
		Mutagênica		Inativo (<i>Salmonella thyphimurium</i>)	
<i>B. japurensis</i>	Casca do caule	Antiagregante plaquetária	Aquoso	Ativo	Guilhon-Simplicio et al. (2012)
		Anti-inflamatória / antinociceptiva		Ativo	Guilhon-Simplicio et al. (2012)
		Antioxidante		Ativo	Guilhon-Simplicio et al. (2012) ^e Guilhon-Simplicio et al. (2013) ^f
		Antiúlcera		Ativo	Guilhon-Simplicio et al. (2012)
	Caule	Antioxidante	Etanol	Ativo	Vargas et al. (2016)
		Anti-peroxidase		Ativo	
<i>B. ligustrifolia</i>	Frutos	Antioxidante	Metanol: Acetona (80:20), acidificado com ácido acético 2%	Ativo	Sampaio et al. (2015)
	Partes aéreas	Antimutagênica	Etanol 70%	Inativo (<i>Salmonella thyphimurium</i>)	Espanha et al. (2014)
		Mutagênica		Ativo (<i>Salmonella thyphimurium</i>)	
<i>B. sericea</i>	Casca	Citoestática	Etanol	Inativo (Câncer hepático – HepG2, leucemia promielocítica – HL-60)	Da Silva et al. (2016)
	Folha	Antiúlcera	Etanol	Ativo	Rodrigues et al. (2012)
		Citoestática	Etanol	Inativo (Câncer hepático – HepG2, leucemia promielocítica – HL-60)	Da Silva et al. (2016)
			Partição acetato de etila do extrato etanólico	Ativo (Câncer hepático – HepG2, leucemia promielocítica – HL-60)	
			Partição clorofórmio do extrato etanólico	Inativo (Câncer hepático – HepG2, leucemia promielocítica – HL-60)	

(Continua)

(Continuação do Quadro 1)

Espécie	Parte estudada	Atividade investigada	Extrato	Resultado	Referência
<i>B. sericea</i>	Folha	Citoestática	Partição hexânica do extrato etanólico	Ativo (Câncer hepático – HepG2, leucemia promielocítica – HL-60)	Da Silva et al. (2016)
			Partição metanólica do extrato etanólico	Ativo (Câncer hepático – HepG2, leucemia promielocítica – HL-60)	
		Citotóxica	Partição acetato de etila do extrato etanólico	Ativo (Câncer hepático – HepG2, leucemia promielocítica – HL-60, linfoblastos humanos – PBMC, Melanoma murino - B16-F10)	
				Inativo (Leucemia mielocítica crônica – K562)	
		Citotóxica	Partição hexânica do extrato etanólico	Ativo (câncer hepático – HepG2, Leucemia mielocítica crônica – K562, leucemia promielocítica – HL-60, linfoblastos humanos – PBMC, Melanoma murino - B16-F10)	
			Partição metanólica do extrato etanólico	Ativo (Câncer hepático – HepG2, leucemia promielocítica – HL-60, linfoblastos humanos – PBMC, Melanoma murino - B16-F10)	
		Inativo (Leucemia mielocítica crônica – K562)			
		Fotoprotetora	Etanol	Inativo	
	Aquoso				
	Frutos	Citoestática	Etanol	Inativo (Câncer hepático – HepG2, leucemia promielocítica – HL-60)	Da Silva et al. (2016)
<i>B. verbascifolia</i>	Casca da raiz	Antibacteriana	Acetona	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> (Pouco ativo sem luz UV, ativo após exposição a UV)	Ruddock et al. (2011)
	Folha			<i>Neisseria gonorrhoeae</i> (Pouco ativo com ou sem exposição a UV)	

(Continua)

(Continuação do Quadro 1)

Espécie	Parte estudada	Atividade investigada	Extrato	Resultado	Referência
<i>B. verbascifolia</i>	Folha	Antifúngica	Aquoso	Ativo (Germinação dos esporos de <i>Corynespora cassiicola</i> e <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>)	Naruzawa; Papa (2011)
				Inativo (Crescimento miscelial de <i>Corynespora cassiicola</i> e <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>)	
			Etanol 70 %	Ativo (Germinação dos esporos de <i>Corynespora cassiicola</i> e <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>)	
				Inativo (Crescimento miscelial de <i>Corynespora cassiicola</i> e <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>)	
		Antiviral	Etanol 95%	Ativo (rotavirus)	Cecílio et al. (2012)
	Casca da raiz Folha	Anti-inflamatória	Fração butanólica do extrato metanólico	Ativo	Saldanha et al. (2016a)
		Toxicidade	Metanol	Inativo (ratas grávidas)	Gonçalves et al. (2013)
		Anti-inflamatória		Ativo	Saldanha et al. (2016b)
	Partes aéreas	Antimutagênica	Etanol 70%	Ativo (<i>Salmonella thyphimurium</i>)	Espanha et al. (2014)
		Mutagênica		Inativo (<i>Salmonella thyphimurium</i>)	

^aEfeito observado no teste do DPPH•.^bEfeito observado no estresse oxidativo induzido por *Helicobacter pylori* em neutrófilos.^cResultado apenas mencionado no texto.^dEfeito observado em pele de animais com diabetes induzida por estreptozotocina.^eEfeito observado no teste do O₂•⁻ e β-caroteno (peroxidação lipídica).^fEfeito observado no teste do DPPH•, ABTS•⁺ e NO•.

Flavonoides, flavonol e flavan-3-ol em maioria, e ácidos fenólicos predominaram entre os compostos que foram isolados de diferentes partes dessas espécies 2010 e 2016, muitos já conhecidos no próprio gênero (Quadro 2, Figura 2). Em alguns estudos, os fitocompostos foram identificados e quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para validação de resultados farmacológicos, onde ainda se observa a predominância de derivados de flavonoides e triterpenos (HIGUCHI et al., 2011; SALDANHA et al., 2016b; SALDANHA; SOARES, 2015; SAMPAIO et al., 2015).

Quadro 2. Substâncias isoladas de *Byrsonima* spp. entre 2010-2016

Espécie	Parte estudada	Substância isolada ou identificada	Referências
<i>B. coccolobifolia</i>	Caule	(+)-catequina (2) (-)-epicatequina (1) (+)-siringaresinol (4) [#] Trigonostemone (24) [#]	De Sousa et al. (2014)
	Folha	Quercetina-3- <i>O</i> -L-rhamnopiranosídeo (18) Isoquercetina (15)	
<i>B. crassa</i>	Folha	Amentoflavona (12) (+)-catequina (2) (-)-epicatequina (1) Galato de metila (13) Quercetina-3- <i>O</i> - α -D-arabinopiranosídeo (20) Quercetina-3- <i>O</i> - β -D-galactopiranosídeo (Hiperina) (22)	Bonacorsi et al. (2012)
<i>B. crassifolia</i>	Caule	3- <i>O</i> -galoil-(+)-epicatequina (5) Ácido 3- <i>O</i> -galoil-quínico (9) Ácido 5- <i>O</i> -galoil-quínico (10) Ácido 3,4- <i>O</i> -digaloil-quínico (7) Ácido 3,5- <i>O</i> -digaloil-quínico (8) Ácido 3,4,5- <i>O</i> -trigaloil-quínico (6) (+)-catequina (2) (+)-epicatequina (3)	Maldini et al. (2011)
	Partes aéreas	Quercetina-3- <i>O</i> -xilósídeo (19)	
<i>B. intermedia</i>	Folha	Ácido gálico (11) Amentoflavona (12) Galato de metila (13) (+)-catequina (2) / (+)-epicatequina (3) (mistura) Quercetina-3- <i>O</i> - α -L-arabinopiranosídeo (Guaijaverina) (21) Quercetina-3- <i>O</i> - β -D-galactopiranosídeo (Hiperina) (22)	Santos et al. (2012)
<i>B. sericea</i>	Folha	Isoquercetina (15) Kaempferol-3- <i>O</i> -rutinosídeo (16) Quercetina (17) Rutina (23)	Rodrigues et al. (2012)*

[#]Isolados pela primeira vez do gênero *Byrsonima*.

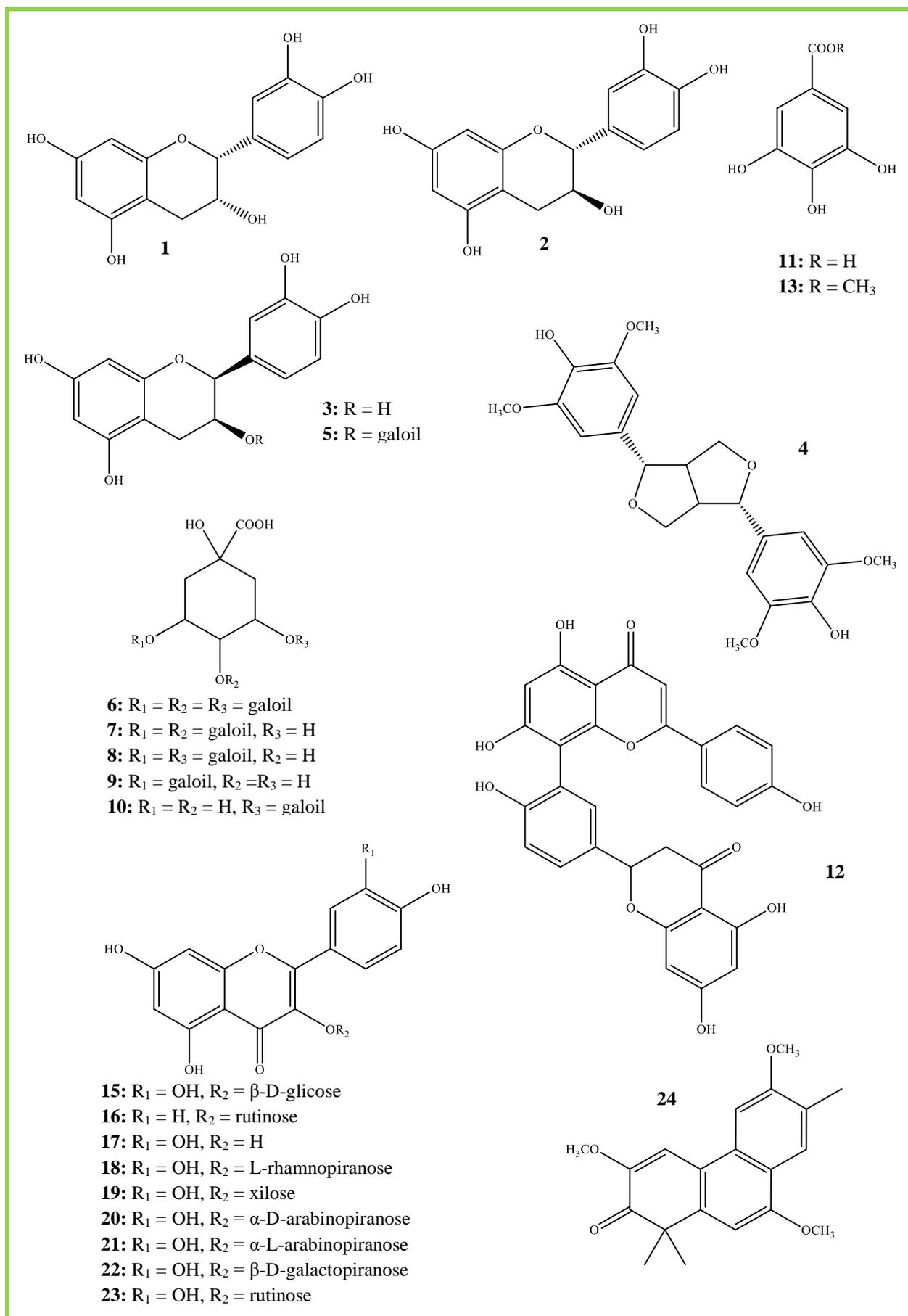


Figura 2. Substâncias isoladas de *Byrsonima* spp. entre 2010-2016.

A forte presença de flavonoides e triterpenos em *Byrsonima* spp. confere a essas plantas um grande potencial anti-inflamatório e antimicrobiano (DAGLIA, 2012; GARCÍA-LAFUENTE et al., 2009; PODOLAK; JANECKO, 2014). Contudo, embora tenha se notado um aumento nos estudos sobre o potencial anti-inflamatório dessas espécies, pode-se dizer que ele é ainda pouco explorado. Aditivamente, grande parte dos estudos que investigaram e comprovaram seu potencial antimicrobiano contra diferentes micro-organismos, foram avaliações preliminares de extratos brutos, sem identificação das moléculas ativas responsáveis pelos resultados observados.

2.2. Espécies de *Byrsonima* H. B. K. selecionadas para o estudo

Apesar do crescente interesse da comunidade científica em espécies do gênero *Byrsonima* e dos excelentes resultados obtidos na investigação de várias propriedades biológicas e do isolamento de dezenas de substâncias farmacologicamente ativas, muitas dessas espécies, especialmente da região Amazônica, permanecem com seu potencial químico-farmacológico desconhecido. A exceção é *B. japurensis*, espécie medicinal que foi objeto de um estudo com enfoque na sua atividade anti-inflamatória por este grupo de pesquisa (GUILHON-SIMPLICIO, 2009).

Diante desse panorama, em 2011 foi realizada uma pesquisa de campo na Reserva Florestal Adolpho Ducke, em Manaus, Amazonas, Brasil, sobre quantas espécies desse gênero estavam identificadas. Das seis espécies registradas pelo projeto “Flora da Reserva Ducke”, encerrado em 1999, foram localizados espécimes de apenas quatro: *B. crispa*, *B. duckeana*, *B. garcibarrigae*, *B. incarnata*. Tal fato reforça a importância de registros científicos sobre espécies da Floresta Amazônica, cujo acervo biológico sofre constante pressão antrópica e até mesmo natural, o que implica que muito do seu potencial tecnológico pode ser perdido antes mesmo de ser conhecido.

De acordo com as bases de dados PubMed, Scopus e SciELO, *B. crisper*, *B. duckeana*, *B. garcibarrigae*, *B. incarnata* ainda não haviam sido objeto de nenhum estudo científico até então. Também não havia relato de uso medicinal popular. Dessa forma, as quatro espécies foram selecionadas para um estudo comparativo acerca do seu potencial anti-inflamatório em relação a *B. japurensis*. Algumas informações sobre as espécies que foram tema desta tese são apresentadas nas seções 2.2.1 a 2.2.5.

2.2.1. *Byrsonima crisper*

Byrsonima crisper A. Juss. (Sinonímia: *Byrsonima carmeniana* Cuatrec.) é uma árvore mediana com folhas glabras com cerca de 10 pares de nervuras secundárias e nervuras intersecundárias pouco evidentes. Seus ramos terminais são ferrugíneos e pubescentes (VICENTINI; ANDERSON, 1999) (Figura 3). É nativa, mas não endêmica no Brasil, tendo registros de ocorrência em Bolívia, Colômbia, Guiana Francesa, Panamá e Venezuela (MISSOURI BOTANICAL GARDEN, 2017a). No Brasil é encontrada na Amazônia e na Mata Atlântica em florestas de terra firme, florestas de várzea e floresta pluviais em Estados da Região Norte (Acre, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima), Nordeste (Alagoas, Bahia, Maranhão, Pernambuco), Centro-oeste (Mato Grosso) e Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro) (MAMEDE, FRANCENER, 2017).

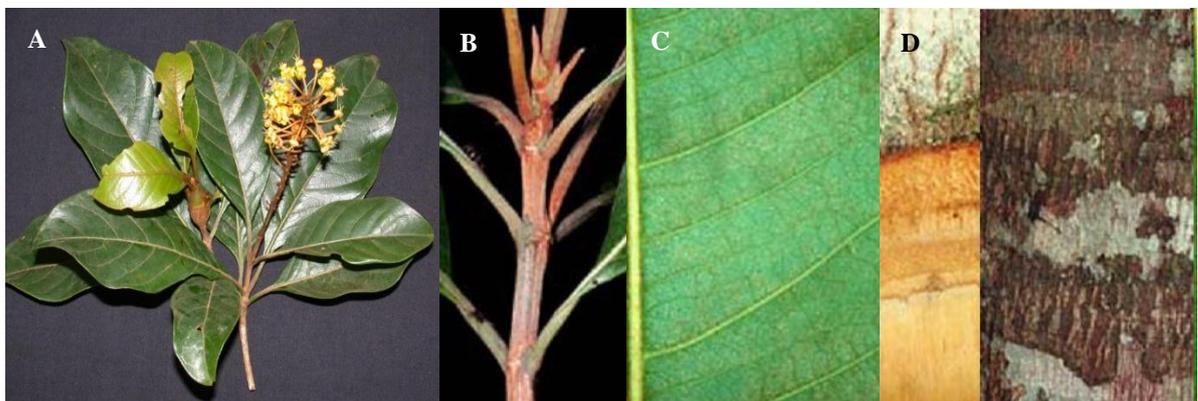


Figura 3. *Byrsonima crisper* A. Juss. A: Detalhes das flores. B: Detalhes dos ramos terminais. C: Detalhes do limbo (folhas). D: Detalhe da casca do caule.

Fontes: A: Smithsonian Tropical Research Institute (2017). B, C e D: Vicentini; Anderson (1999).

2.2.2. *Byrsonima duckeana*

Byrsonima duckeana W. R. Anderson é uma árvore com folhas com pelos ramificados e ferrugíneos que também ocorrem na venação da parte superior, que tem mais de 10 pares de nervuras secundárias (Figura 4) (VICENTINI; ANDERSON, 1999). É uma espécie nativa e endêmica do Brasil, onde ocorrem na Amazônia e Mata Atlântica em florestas de terra firme e pluviais de Estados da Região Norte (Amazonas, Pará) e Sudeste (Espírito Santo) (MAMEDE, FRANCENER, 2017).

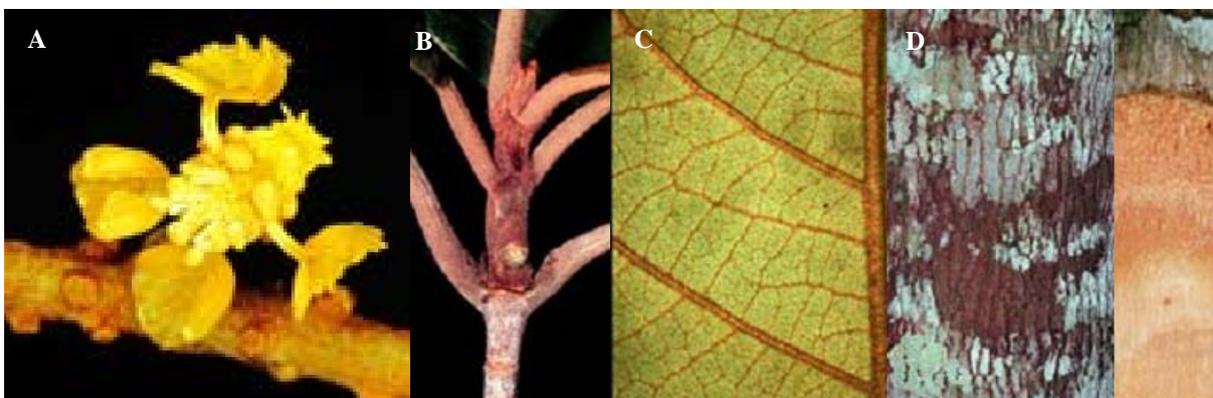


Figura 4. *Byrsonima duckeana* W. R. Anderson. A: Detalhes das flores. B: Detalhes dos ramos terminais. C: Detalhes do limbo (folhas). D: Detalhe da casca do caule.

Fonte: Vicentini; Anderson (1999).

2.2.3. *Byrsonima garcibarrigae*

Byrsonima garcibarrigae Cuatrec. é uma árvore com folhas glabras com 7 a 10 pares de nervuras secundárias e nervuras intersecundárias pouco evidentes. Seus ramos terminais são glabros com tufo de pelos ferrugíneos nas cicatrizes das estípulas, (Figura 5) (VICENTINI; ANDERSON, 1999). Nativa, mas não endêmica no Brasil, tendo registro de ocorrência também na Colômbia (MISSOURI BOTANICAL GARDEN, 2017b). No Brasil é encontrada na Amazônia em florestas de terra firme do Estado do Amazonas (MAMEDE, FRANCENER, 2017).

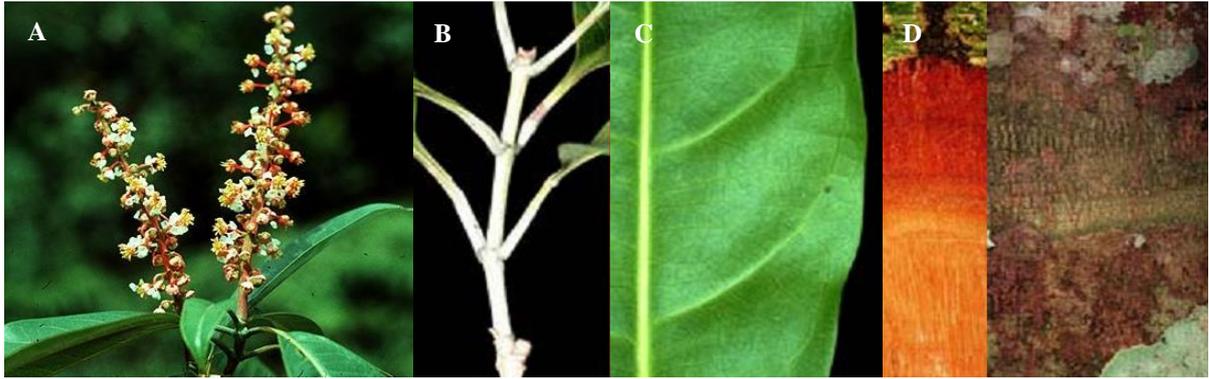


Figura 5. *Byrsonima garcibarrigae* Cuatrec. A: Detalhes das flores. B: Detalhes dos ramos terminais. C: Detalhes do limbo (folhas). D: Detalhe da casca do caule.

Fontes: A: Missouri Botanical Garden (2015c). B, C e D: Vicentini; Anderson (1999).

2.2.4. *Byrsonima incarnata*

Byrsonima incarnata Sandwith. é uma árvore com folhas com ápice abruptamente acuminado com até 12 pares de nervuras secundárias e nervuras intersecundárias pouco evidentes, apresentando alguns pelos esparsos na venação (Figura 6) (VICENTINI; ANDERSON, 1999). Nativa, mas não endêmica no Brasil, tendo registro de ocorrência também na Guiana (MISSOURI BOTANICAL GARDEN, 2017c). No Brasil é encontrada na Amazônia em florestas de igapó do Estados do Amazonas e Pará (MAMEDE, FRANCENER, 2017).

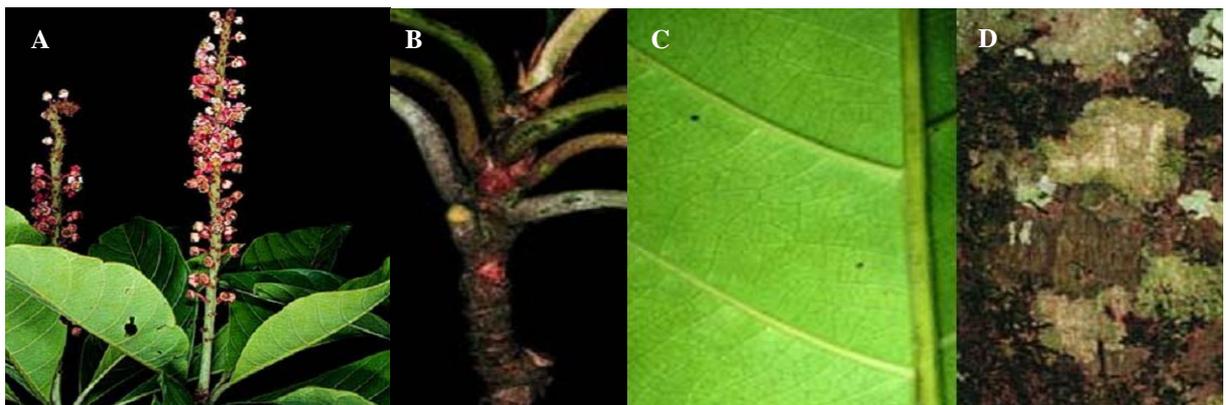


Figura 6. *Byrsonima incarnata* Sandwith. A: Detalhes das flores. B: Detalhes dos ramos terminais. C: Detalhes do limbo (folhas). D: Detalhe da casca do caule.

Fonte: Vicentini; Anderson (1999).

2.2.5. *Byrsonima japurensis*

Byrsonima japurensis A. Juss. é uma árvore de 3 a 21 m de altura, com flores brancas ou rosas, folhas na face abaxial esparsamente seríceas a glabras; brácteas e bractéolas persistentes nos frutos, os quais são agudos no ápice, glabros ou glabrados (Figura 7). Há registro de ocorrência nos Estados de Roraima, Amapá, Pará, Amazonas, Acre, Maranhão e Bahia, e também Rio de Janeiro e Bahia. Está distribuída também na Colômbia, Equador e Peru (CENTRO NACIONAL DE CONSERVAÇÃO DA FLORA, 2017).



Figura 7. *Byrsonima japurensis* A. Juss. A: Detalhe dos ramos terminais. B: Detalhes das flores. C: Detalhes dos frutos.

Fonte: A e B: Missouri Botanical Garden (2017d). C: California rare fruit growers (2017).

A espécie tem amplo uso medicinal popular no Estado do Amazonas contra diversas condições inflamatórias, principalmente do útero e da próstata (VARGAS et al., 2016). É conhecida como “sara-tudo” e, por vezes, também é identificada como murici-vermelho, devido a cor dos seus frutos. Um estudo multidisciplinar de abordagem etnofarmacológica mostrou que a preparação utilizada pela população como anti-inflamatório, o chá da casca do caule, de fato apresenta propriedades antiedematogênica, analgésica, antiúlcera *in vivo*, além de propriedades antiagregante plaquetária e antioxidante *in vitro* (GUILHON-SIMPLICIO, 2009; GUILHON-SIMPLICIO et al., 2012, 2013).

2.3. Sinergismo e inflamação

Desde a revolução industrial, a química medicinal tem priorizado a forte modulação de um único alvo terapêutico por uma única droga no desenvolvimento de medicamentos (BOLOGNESI; CAVALLI, 2016). Entretanto, a percepção da importância do sinergismo na terapia de doenças humanas ganhou força ao longo do anos, e patologias de alto impacto socioeconômico, como a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) e diversos tipos de câncer, têm sido tratadas por meio de “coquetéis” de drogas, que potencializam as ações umas das outras ou diminuem a incidência de efeitos adversos (ANIGHORO et al., 2014; CAI et al., 2016).

O sinergismo entre moléculas bioativas há muito é discutido no contexto da fitoterapia (GURIB-FAKIM, 2006), e sua eficiência e segurança vem sendo validada desde tempos imemoriais (VILLANUEVA et al., 2017). Plantas não podem antecipar o tipo de ataque que irão sofrer, tampouco lutar ou correr de seus agressores, por isso, a estratégia evolucionária mais eficiente foi produzir um grande número de substâncias bioativas por diversos mecanismos (metabólitos secundários), as quais são normalmente estocadas nas células vegetais na forma inativa (glicosídeos), liberadas e hidrolisadas quando necessário (WINK, 2008).

Vários estudos discutem que a atividade biológica da grande maioria dos produtos naturais isolados é baixa, fomentando o entendimento de que seu sucesso na defesa das plantas se deve ao sinergismo (CHUNG et al., 2011). Plantas medicinais com um composto altamente ativo são a minoria, e é normalmente um conjunto de substâncias pouco ou fracamente ativas sobre vários alvos terapêuticos que é responsável pela atividade farmacológica de extratos vegetais. (EFFERTH; KOCH, 2011).

Nesse contexto, extratos vegetais, que são uma mistura de compostos ativos em múltiplos alvos, que atuam sinergicamente com relativa baixa toxicidade, devem ser

revalorizados na busca de alternativas para a farmacoterapia moderna, especialmente para o tratamento de condições multifatoriais como a inflamação, contra a qual inúmeros metabólitos secundários, especialmente compostos fenólicos, já demonstraram promissora, mas pouco potente ação, quando agindo isoladamente (PIOMELLI; SASSO, 2014; SCARPELLI et al., 2016).

À vista disso, está cada vez mais evidente que a abordagem multialvo é mais efetiva no tratamento da inflamação (KOEBERLE; WERZ, 2014). Estudos mais recentes já abordam a racionalização e otimização da combinação de polifenóis, para a modulação da resposta inflamatória (CAI et al., 2016; IACOPINI et al., 2008). Esta última é uma estratégia moderna, promissora e plausível, na medida em que as dificuldades na padronização química de extratos vegetais é um dos maiores desafios da fitoterapia (DHAMI; MISHRA, 2015; GOVINDARAGHAVAN; SUCHER, 2015).

Como exemplo prático, o Flavocoxid, um alimento funcional composto basicamente dos flavonoides baicalina e catequina, tem sido intensamente investigado por suas propriedades anti-inflamatórias. Resultados interessantes foram observados em pacientes com osteoartrite de joelho, onde essa mistura apresentou a mesma potência do naproxeno, com menos efeitos colaterais sobre a mucosa gástrica (LEVY et al., 2010). Dessa forma, o flavocoxid avançou para a fase III dos estudos clínicos para sua aprovação como anti-inflamatório de ação dupla (BITTO et al., 2014).

Já foi demonstrado que o Flavocoxid atua como inibidor das cicloxigenases 1 e 2 e da 5-lipoxigenase, enzimas diretamente implicadas na produção de mediadores inflamatórios, além de ser um poderoso antioxidante. Constatou-se que a ação da mistura é maior que a dos compostos isolados (BITTO et al., 2012, 2014; KONG et al., 2016). Não obstante, apesar da grande complexidade da resposta inflamatória, que envolve múltiplas vias e inúmeros mediadores, a indução de várias enzimas e o estresse oxidativo figuram entre as características

comuns a condições agudas e crônicas (GANESH, 2014) e, portanto, a inibição simultânea desses alvos é uma promissora estratégia para o desenvolvimento de novas terapias para a inflamação.

2.3.1. Enzimas inflamatórias

A inflamação é a resposta primária do organismo humano a qualquer agressão física, química ou biológica. Seus eventos vasculares, celulares e químicos têm como papel fundamental defender o organismo de agressões ou mesmo repará-las (AHMED, 2011). Em condições normais, a inflamação é uma resposta local e aguda, e o organismo possui mecanismos autorregulatórios para encerrá-la após a eliminação do agente lesivo (ROMANO et al., 2015). Contudo, se ocorrer alguma desregulação na cascata de eventos da inflamação, ela pode se tornar generalizada e persistente por longos períodos (dias, meses ou anos), levando a injúrias teciduais (BRÜNE et al., 2013).

Essa perda do controle homeostático da inflamação é a base da fisiopatologia de várias doenças crônicas como artrite reumatoide, aterosclerose, doença de Alzheimer, doença de Parkinson e câncer (STABLES; GILROY, 2011), que têm grande impacto na qualidade de vida dos seus portadores, apresentam incidência crescente e para as quais as atuais opções terapêuticas não são ideais (ARULSELVAN et al., 2016; JOSHI; PRATICÒ, 2015).

Desde a descoberta do papel crítico das cicloxigenases na resposta inflamatória, essas enzimas têm sido bastante exploradas como alvo terapêutico. Elas são inibidas pelos anti-inflamatórios não-esteroidais (AINE), um grupo de fármacos quimicamente diverso usado na modulação de respostas inflamatórias agudas e crônicas. Contudo, a importância fisiológica dessas enzimas e seus metabólitos tem impacto direto nos efeitos colaterais desses medicamentos (DÍAZ-GONZÁLEZ; SÁNCHEZ-MADRID, 2015).

Duas diferentes isoformas da cicloxigenase estão bem caracterizadas: a cicloxigenase-1 (COX-1), a forma constitutiva, expressa continuamente no organismo, e a cicloxigenase 2 (COX-2) a forma indutiva, expressa em grande proporção mediante estímulo inflamatório (SHIMIZU, 2009). As cicloxigenases catalisam a incorporação de duas moléculas de oxigênio no ácido araquidônico, convertendo-o no endoperóxido instável prostaglandina H_2 (PGH_2), o qual é isomerizado em diferentes prostaglandinas (PG) por prostaglandinas sintases, distribuídas de maneira específica nos diferentes tecidos (NORBERG et al., 2014; PATRIGNANI; PATRONO, 2015).

As diferentes PG exercem seus efeitos pró-inflamatórios ou fisiológicos por interações com receptores transmembranares ligados à proteína G. A prostaglandina E_2 (PGE_2) e a prostaglandina I_2 (PGI_2) são notavelmente pró-inflamatórias e atuam na permeabilidade vascular implicada na formação de edema e na hipersensibilização de fibras nervosas durante a inflamação (hiperalgesia, dor inflamatória). Além disso, PGE_2 é o mais potente agente pirético conhecido (STABLES; GILROY, 2011).

Apesar dos seus efeitos pró-inflamatórios, a PGE_2 produzida pela COX-1 atua como importante vasodilatador nos rins, influenciando diretamente na excreção de eletrólitos e, conseqüentemente, no sistema cardiovascular. Assim, os inibidores COX-1 possuem uma gama de efeitos tóxicos sobre o sistema renal e cardiovascular (HARIRFOROOSH et al., 2013). A PGE_2 também atua na produção de muco protetor, fluxo sanguíneo e renovação do epitélio da mucosa gastrointestinal (ASHLEY et al., 2012), o que explica um dos principais efeitos colaterais dos AINE inibidores da COX-1, que são os distúrbios gastrointestinais, que podem culminar em gastrites, úlceras e perfurações, limitando seu emprego em doenças inflamatórias crônicas (BLACKLER et al., 2014).

Por outro lado, a inibição seletiva da COX-2, pela segunda geração dos AINE, conhecidos também como “coxibes”, não é livre de efeitos colaterais. De fato, essa estratégia

pode perturbar o balanço entre a produção da prostaglandina antitrombótica PGI₂ ou prostaciclina pela COX-2, e do tromboxane A₂ (TXA₂) pela COX-1, importante ativador da agregação plaquetária durante a resposta inflamatória. Dessa forma, o risco de formação de trombos e êmbolos durante o uso desses fármacos é aumentado, podendo culminar em infartos e acidente vascular cerebral (VONKEMAN; VAN DE LAAR, 2010). Além disso, existem evidências cada vez mais fortes de que a inibição das duas isoformas da COX tem implicações na ação deletéria dos AINE sobre a mucosa gástrica (SOSTRES et al., 2010).

Paralelamente, as lipoxigenases (LOX) catalisam a peroxidação de regiões específicas de ácidos graxos poli-insaturados. Em mamíferos, seus principais substratos são o ácido araquidônico, ácido eicosapentaenóico, e ácido docosaexanóico, apresentando afinidades distintas. Apesar disso, controversamente, as LOX presentes em mamíferos são classificadas de acordo com a posição de oxidação que catalisam no ácido araquidônico, como 5, 8, 11, 12 ou 15-LOX (IVANOV et al., 2010). Dentre as isoenzimas, a 5-lipoxigenase (5-LOX) é a mais diretamente implicada na formação de leucotrienos (LT), importantes mediadores lipídicos da inflamação, catalisando os dois primeiros passos na sua biossíntese: a oxigenação do ácido araquidônico a ácido 5-hidroxi-peroxieicosatetraenóico (5-HPETE) e a conversão deste em leucotrieno A₄ (LTA₄) (KUHN et al., 2015).

Os diferentes LT são gerados primordialmente em células inflamatórias, e atuam como mediadores lipídicos em diferentes fases da inflamação mediante a interação com receptores transmembranares acoplados a proteína G, influenciando na atração e ativação de neutrófilos, monócitos, linfócitos e eosinófilos, e no aumento da permeabilidade vascular e extravasamento de plasma na formação do edema típico da inflamação (STABLES; GILROY, 2011). Dessa forma, cicloxigenases e lipoxigenases têm papel interrelacionado na produção de mediadores lipídicos da inflamação (Figura 8).

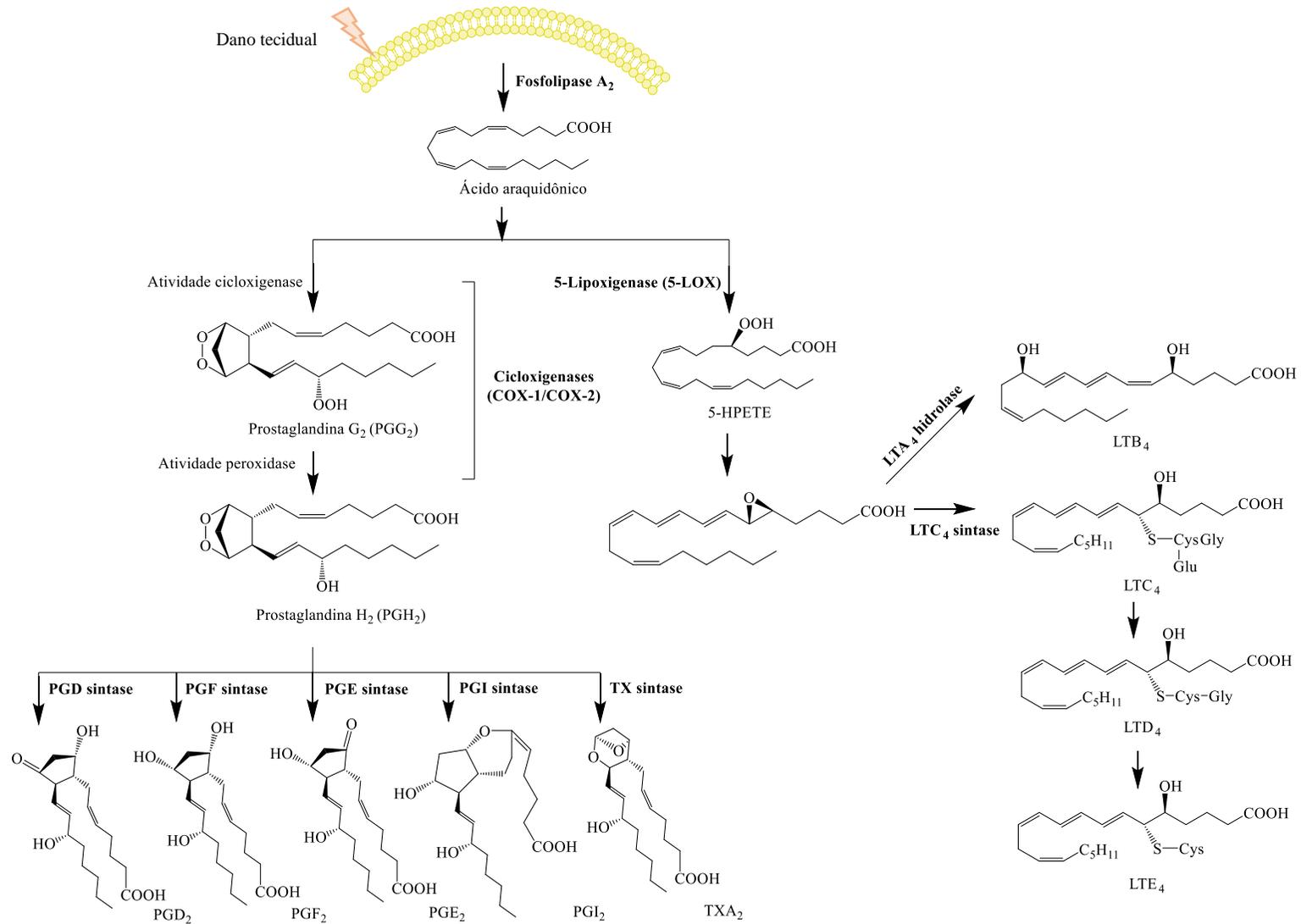


Figura 8. Metabolismo do ácido araquidônico por cicloxigenases e lipoxigenases.
Fonte: Adaptado de Kawahara et al. (2015) e Knab et al. (2014)

Assim como as cicloxigenases, as lipoxigenases tem função fisiológica, atuando como pró-oxidativas na manutenção do balanço redox durante a homeostase, que por sua vez tem implicações na expressão de genes e proliferação celular. Entretanto, existem vários outros mecanismos compensatórios no organismo e tem sido discutido que a inibição seletiva das LOX, poderia trazer menos prejuízos fisiológicos que a inibição das COX (KUHN et al., 2015).

Devido ao seu papel crítico na produção de LTA₄, a 5-LOX é um alvo potencialmente importante para o manejo da inflamação. Está bem caracterizado os seu envolvimento na fisiopatologia de várias doenças inflamatórias alérgicas e, mais recentemente, surgiram evidências de sua participação em câncer de próstata e certos tipos de leucemia (LIU; YOKOMIZO, 2015). Existem três classes de inibidores da 5-LOX, nomeadamente, complexadores de ferro (Zileuton), agentes redutores (ácido nordihidroguaiarético), e inibidores competitivos (Setileuton, PF-4191834, CJ-13610, MK-0591). Dentre esses, somente o zileuton está aprovado como antiasmático (ZHANG et al., 2017), mas apresenta farmacocinética desfavorável e diversos efeitos colaterais, e seu uso clínico ainda é controverso (KUHN et al., 2015).

2.3.2. Estresse oxidativo

Espécies reativas de oxigênio (ERO), como o próprio termo sugere, podem ser definidas como moléculas que contém oxigênio, porém são mais reativas que o oxigênio molecular, podendo ser radicalares ou não radicalares. Nesse grupo estão incluídos o ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio singleto, ácido hipocloroso e outros peróxidos orgânicos (NATHAN; CUNNINGHAM-BUSSEL, 2013). Eles são formados no organismo como resultado da ação de enzimas como fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina oxidase (NADPH-oxidase), enzimas do citocromo P450, enzimas dos peroxissomos,

xantina oxidase, LOX e COX, como produtos ou subprodutos de suas atividades catalíticas (BRÜNE et al., 2013).

De forma análoga, as espécies reativas de nitrogênio (ERN), são derivados do radical óxido nítrico (NO^\bullet), produto principal das sintases do radical óxido nítrico (NOS), presente em grande quantidade nos macrófagos (ROCHETTE et al., 2013). Nos mamíferos, existem três isoformas das NOS, codificadas por genes diferentes. Duas isoformas são constitutivas, a isoforma neuronal (nNOS) e a isoforma endotelial (eNOS), que são ativadas pelo complexo Ca^{+2} /calmodulina. A terceira isoforma é indutiva (iNOS), e sua ativação é independente de Ca^{+2} , sendo modulada por estímulos inflamatórios (GAMPER; OOI, 2014).

A produção de ERO e ERN faz parte da homeostase e tem função importante na sinalização celular, na ativação e desativação de enzimas e células e no combate a patógenos, por meio de interações covalentes e, potencialmente, oxidantes com diversas moléculas. Por isso, a manutenção de níveis basais dessas espécies é tão importante, e realizada por um intrincado balanço entre sua produção e neutralização (ZHANG et al., 2016). Incluem-se como mecanismos endógenos de neutralização, a ação de enzimas como superóxido dismutases, catalases e glutathione peroxidases, e outras moléculas não-enzimáticas como ascorbato e piruvato. Além da neutralização direta das espécies reativas, o organismo também dispõe de recursos para reparo dos danos celulares, que inclui até mesmo a substituição da molécula danificada (NATHAN; CUNNINGHAM-BUSSEL, 2013).

Contudo, o dano oxidativo em membranas e proteínas é muito aumentado durante uma resposta inflamatória, devido ao aumento da expressão de COX, LOX e iNOS (BARTSCH; NAIR, 2006), que favorece o desequilíbrio entre a produção de ERO e ERN e sua neutralização por mecanismos endógenos. Tal fenômeno é nomeado estresse oxidativo, que tem sido relacionado a fisiopatologia de mais de uma centena de doenças inflamatórias, tanto como causa, como consequência (PISOSCHI; POP, 2015). Tem sido mostrado que os danos a

proteínas, carboidratos, lipídios, DNA e enzimas pelo estresse oxidativo, estimula a produção de citocinas inflamatórias por diversos mecanismos moleculares (OYINLOYE et al., 2015).

A grande produção de $\text{NO}\cdot$ em macrófagos pela iNOS é regulada, principalmente, por fator nuclear κB (NF- κB), lipopolissacarídeo bacteriano e citocinas (PAUTZ et al., 2010). O $\text{NO}\cdot$ tem grande afinidade por enzimas que contém ferro em seu sítio catalítico e, portanto, é capaz de interagir e inibir enzimas relacionadas ao transporte de elétrons e replicação de DNA nos micro-organismos alvos. Contudo, esse mecanismo não é seletivo e pode ter reflexos nas células do hospedeiro (FÖRSTERMANN; SESSA, 2012). Macrófagos também produzem ERO por meio da NADPH-oxidase, porém em proporção muito menor que a observada em neutrófilos (KORBECKI et al., 2013).

O principal mecanismo neutralizador da ação deletéria do óxido nítrico no organismo é sua combinação com $\text{O}_2^{\bullet-}$ pela ação das superóxidos dismutases (SOD). O superóxido é uma das principais ERO do organismo, formado pela redução do oxigênio molecular nas mitocôndrias durante o transporte de elétrons ou por oxidases como NADPH-oxidase, xantina oxidase, cicloxigenases e lipoxigenases (PISOSCHI; POP, 2015). Embora esse radical não seja altamente oxidante, sua toxicidade no organismo é mediada justamente pela sua conversão enzimática em oxidantes fortes (GAMPER; OOI, 2014).

A reação de superóxido com óxido nítrico mediada por superóxido dismutases (SOD) resulta na formação de peroxinitrito (ONOO^-), uma espécie reativa de nitrogênio (ERN) fortemente oxidante e nitrante. Sua forma protonada, o ácido peroxinitroso (ONOOH) pode facilmente se difundir em membranas devido a sua alta lipofilicidade, decompondo-se em radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$) e radical nitrito ($\text{NO}_2\cdot$), que interagem rapidamente com grupos sulfidrilas e tioéteres, bem como grupos aromáticos, incluindo tirosina, triptofano e guanina (ZOU, 2007). Por esses mecanismos, o ONOO^- interfere na estrutura e, conseqüentemente, na função de biomoléculas como proteínas, lipídios e DNA (MARTÍNEZ-RUIZ et al., 2011).

Alternativamente, as SOD reduzem o radical superóxido a peróxido de hidrogênio, que também pode se decompor em $\cdot\text{OH}$ (Figura 9) (RADI, 2013).

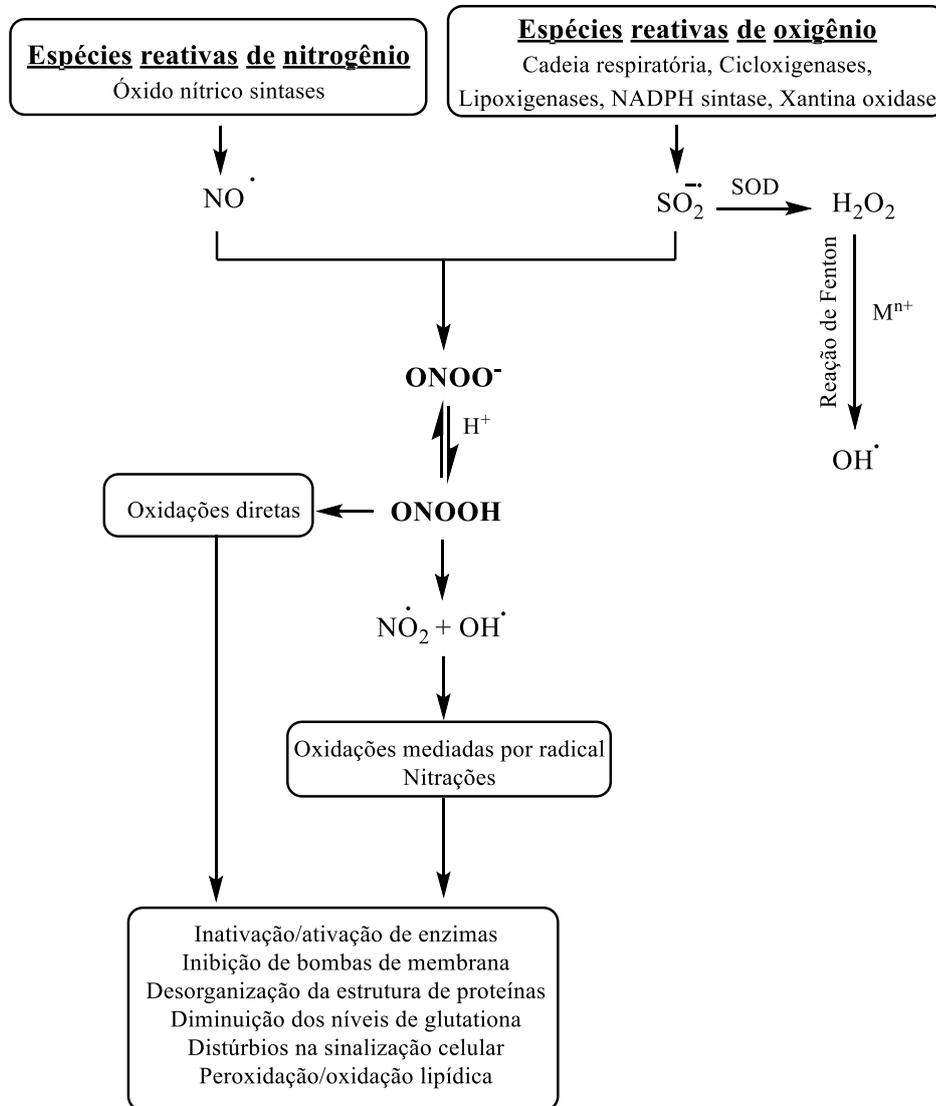


Figura 9. Formação do peroxinitrito e seus efeitos no organismo.

Fonte: Adaptado de Liaudet et al. (2013).

Além dos efeitos pró-inflamatórios indiretos, tem sido mostrado que ERO estão envolvidas na expressão da fosfolipase A₂ citoplasmática dependente de Ca²⁺ e da COX-2 e na modulação da atividade da prostaglandina E sintase constitutiva, responsável pela conversão de PGH₂ gerada pela COX-1 em PGE₂, participando então da amplificação e manutenção da resposta inflamatória (KORBECKI et al., 2013). Portanto, o controle da produção excessiva de ERO e ERN (estresse oxidativo) é promissor na terapia anti-inflamatória, especialmente como

mecanismo auxiliar, dado que a importância fisiológica dessas espécies desqualifica sua forte inibição como estratégia terapêutica (ZHANG et al., 2016).

2.4. Compostos fenólicos no contexto de estratégias multialvo para a inflamação

Entre os metabólitos secundários mais abundantes do reino vegetal estão os compostos fenólicos, os quais são caracterizados pela presença de um anel aromático com pelo menos uma hidroxila diretamente ligada, atuando desde a atração de polinizadores até a defesa contra micro-organismos. Eles podem ser divididos em flavonoides e não flavonoides, os quais são subclassificados de acordo com sua estrutura básica (Figura 10) (CROZIER et al., 2009).

Os flavonoides são os compostos fenólicos mais amplamente distribuídos no reino vegetal. Eles são biossintetizados a partir de 4-coumaroil-CoA, um produto de metabolização da fenilalanina, na via dos fenilpropanoides. A chalcona sintase então metaboliza 4-coumaroil-CoA, dando origem às chalconas, das quais todos os flavonoides derivam. O tipo de flavonoide formado depende de cada espécie e seu conjunto de enzimas (FERREYRA et al., 2012). Eles são frequentemente hidroxilados nas posições 3, 5, 7, 2', 3', 4' e 5', podendo ocorrer éteres ou ésteres nessas posições. Quando ocorrem na forma de heterosídeo, a ligação glicosídica normalmente ocorre nas posições 3 ou 7, e os carboidratos podem ser L-rhamnose, D-glicose, glicorhamnose, galactose ou arabinose (KUMAR; PANDEY, 2013).

Por sua vez, os ácidos fenólicos constituem aproximadamente 30 % dos compostos fenólicos presentes na dieta humana. Eles também são biossintetizados pela via do ácido chiquímico, a partir da desaminação, hidroxilação e metilação da L-fenilalanina e/ou L-tirosina, que dá origem, principalmente, aos ácidos benzoico e cinâmico, principais precursores dos demais ácidos fenólicos. As diferentes posições dos grupos hidroxila ou metoxila dá origem aos diferentes ácidos fenólicos conhecidos (HELENO et al., 2015; TSAO, 2010).

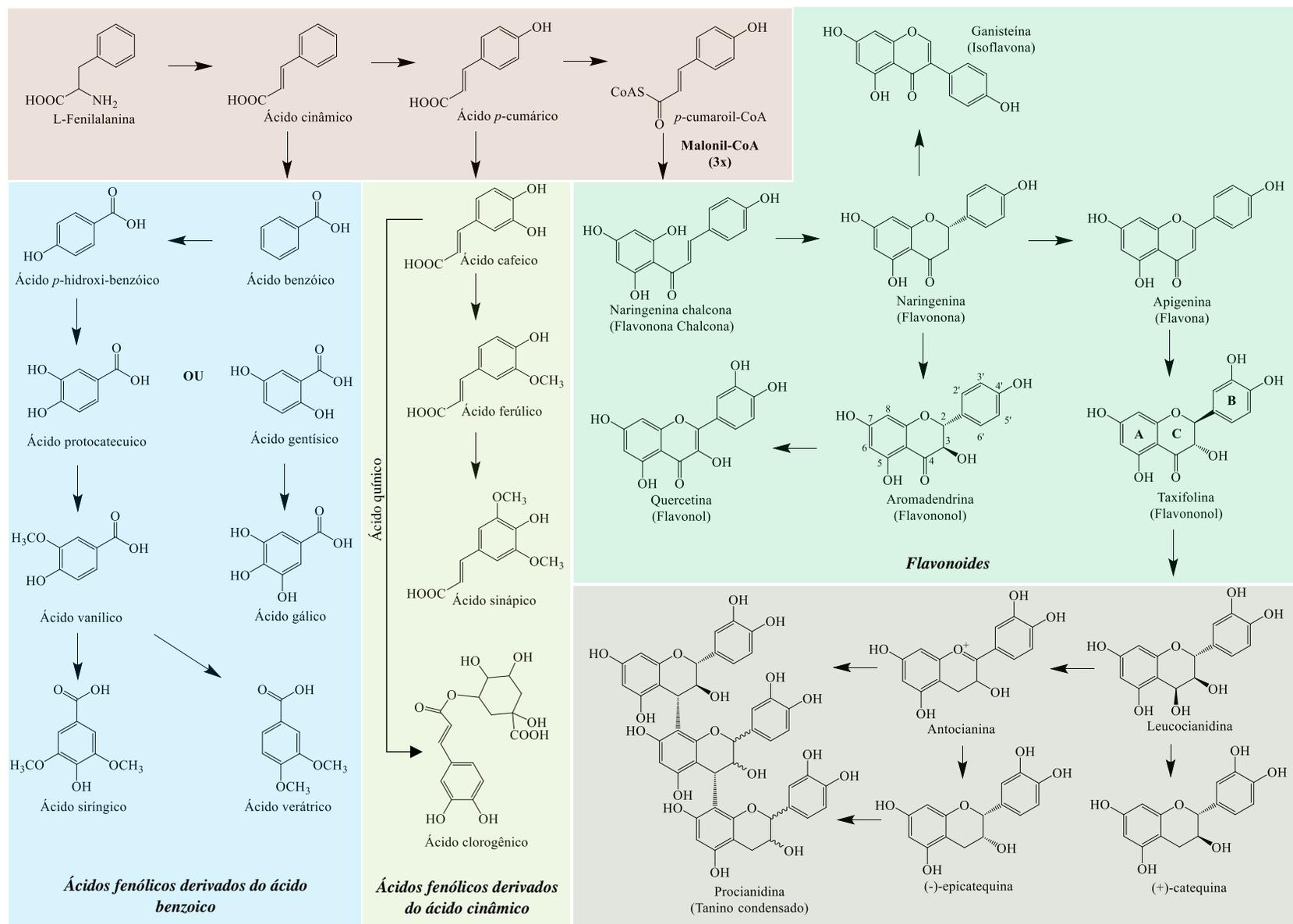


Figura 10. Resumo da biossíntese de compostos fenólicos nas plantas. Destaque para flavonoides e ácidos fenólicos. A estrutura da aromadendrina mostra a numeração do núcleo flavonoide e a estrutura da taxifolina mostra a nomenclatura dos anéis.

Fonte: Adaptado de Heleno et al. (2015).

A alta capacidade antioxidante dos flavonoides tem sido a mais bem estudada de suas propriedades, sendo considerada o mecanismo geral dos demais efeitos terapêuticos (PÉREZ-CANO; CASTELL, 2016). De forma geral, o poder antioxidante varia com o número e posição das hidroxilas, da presença ou não de substituintes nas mesmas, e da presença de ligações duplas conjugadas a cetonas, sendo os flavonóis a subclasse mais ativa (MENDES et al., 2012). A atividade antioxidante dos ácidos fenólicos também depende do número e posições das hidroxilas nos anéis aromáticos e da presença de outros substituintes (GÜLÇIN, 2012).

Flavonoides e ácidos fenólicos podem doar um átomo de hidrogênio pela quebra homolítica da ligação O-H, ou um elétron para a espécie oxidada (HELENO et al., 2015). Em ambos os casos, embora haja a formação de um segundo radical em sua estrutura, esse é mais estável e menos reativo que o original, devido à ressonância típica dos compostos fenólicos (LEOPOLDINI et al., 2011). Adicionalmente, esses compostos também têm capacidade de formar complexos com metais em baixo estado de oxidação (Figura 11), o que é útil em meio biológico, pois íons de cobre, manganês e cobalto catalisam a reação de Fenton com peróxido de hidrogênio, formando o altamente reativo $\bullet\text{OH}$, que não é eficientemente neutralizado pelos mecanismos antioxidantes do organismo (PROCHÁZKOVÁ et al., 2011).

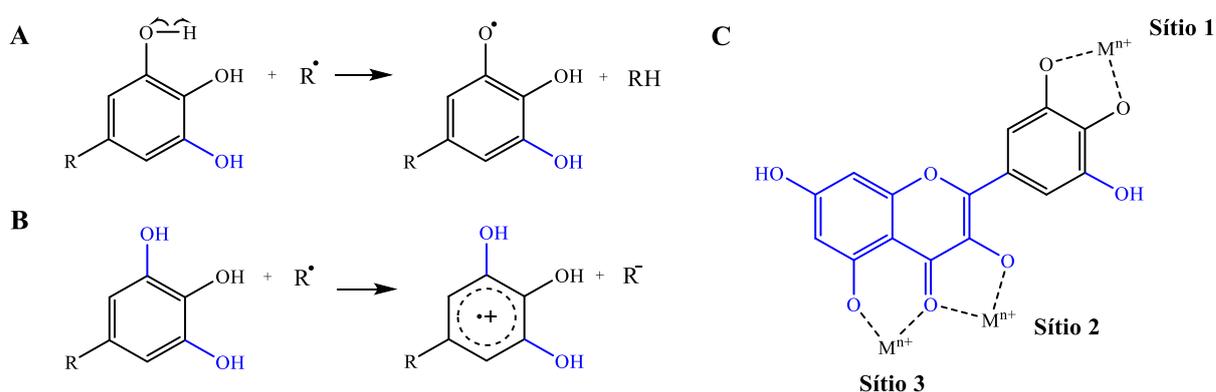


Figura 11. Compostos fenólicos como antioxidantes e quelantes de metais. A: Mecanismo de doação de H por quebra homolítica. B: Mecanismo de doação de elétrons a espécies oxidadas. C: Sítios de quelação de metais. Em azul, características estruturais adicionais que podem contribuir com os mecanismos antioxidantes.

Fonte: Adaptado de Procházková et al. (2011) e Leopoldini et al. (2011).

Por esses mecanismos, os flavonoides e ácidos fenólicos são capazes de neutralizar radicais como $O_2^{\cdot-}$ NO^{\cdot} , que estão entre as mais importantes ERO e ERN gerados durante a resposta inflamatória (NIJVELDT, 2001). Também são capazes de reduzir lipídios e proteínas, incluídas aquelas relacionadas ao balanço redox endógeno que tenham sido oxidados por esses radicais, reduzindo seus efeitos deletérios no organismo (MITJAVILA; MORENO, 2012).

Adicionalmente, vários estudos mostram que diferentes polifenóis têm a capacidade de inibir enzimas da cascata do ácido araquidônico como COX e LOX, responsáveis pela produção de mediadores chave da inflamação, além das NOS, produtoras de espécies reativas em condições de estresse oxidativo (HUSSAIN et al., 2016). Acredita-se que sua capacidade antioxidante contribua com essa ação inibitória não específica (CAO et al., 1997), visto que oxidases como COX e LOX são ativas na sua forma oxidada, e a partir disso inserem átomos de oxigênio em seus substratos (SCHNEIDER et al., 2007). Outrossim, flavonoides também possuem ampla capacidade de formar complexos com proteínas por meio de ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas, ou mesmo ligação covalente, o que pode contribuir para a ação inibitória (KUMAR; PANDEY, 2013).

2.5. Biodisponibilidade de compostos fenólicos

É amplamente divulgado o consumo de compostos fenólicos na alimentação como uma estratégia válida na prevenção de inúmeras patologias, devido a ampla gama de propriedades terapêuticas que possuem. Por outro lado, vários estudos discutem que sua presença em alimentos é grandemente afetada pelos processos de industrialização, como cozimento, fermentação e pasteurização, o que tem suscitado discussões sobre o real benefício desses compostos quando consumidos apenas na dieta, considerando os hábitos modernos de alimentação humana (VELDERRAIN-RODRÍGUEZ et al., 2014).

No que tange à aplicação terapêutica de compostos fenólicos, um fator limitante é a sua baixa biodisponibilidade. Vários estudos indicam que eles são reconhecidos como xenobióticos pelo organismo humano e, portanto, são rapidamente degradados após ingestão, o que faz com que as excelentes propriedades farmacológicas observadas *in vitro*, não sejam reprodutíveis *in vivo* (MARÍN et al., 2015; VLASSOPOULOS et al., 2014). De forma geral, ácidos fenólicos e isoflavonas, seguidos por flavanonas, catequinas e heterosídeos de quercetina são melhor absorvidos, enquanto que os fenólicos mais complexos como procianidinas e antocianidinas tendem a ter mais baixa biodisponibilidade (FANTINI et al., 2015).

Poucos polifenóis são distribuídos na sua estrutura original nos diferentes tecidos após a administração oral (MARGALEF et al., 2015). Dependendo da sua complexidade estrutural, uma baixa porcentagem (5-10 %) é absorvida no intestino delgado, após reações de hidrólise do resíduo de açúcar no lúmen. Quando absorvidos, eles podem sofrer reações de fase I (oxidação, redução e hidrólise) e fase II (conjugação) do metabolismo nos enterócitos, e então são conduzidos da veia porta até o fígado, onde podem sofrer novamente reações de fase I e II, e então serem distribuídos nos tecidos ou excretados na urina (MARÍN et al., 2015).

Quando chega ao cólon, a fração não absorvida no intestino delgado (90-95 %), sofre sucessivas metabolizações por enzimas bacterianas, que incluem quebra de ligações glicosídicas e de anéis, dando a origem a diferentes metabólitos com diferentes perfis de bioatividade, que podem ser absorvidos (via veia porta) ou excretados nas fezes (CARDONA et al., 2013). Uma esquematização da absorção de compostos fenólicos pela via oral pode ser vista na figura 12.

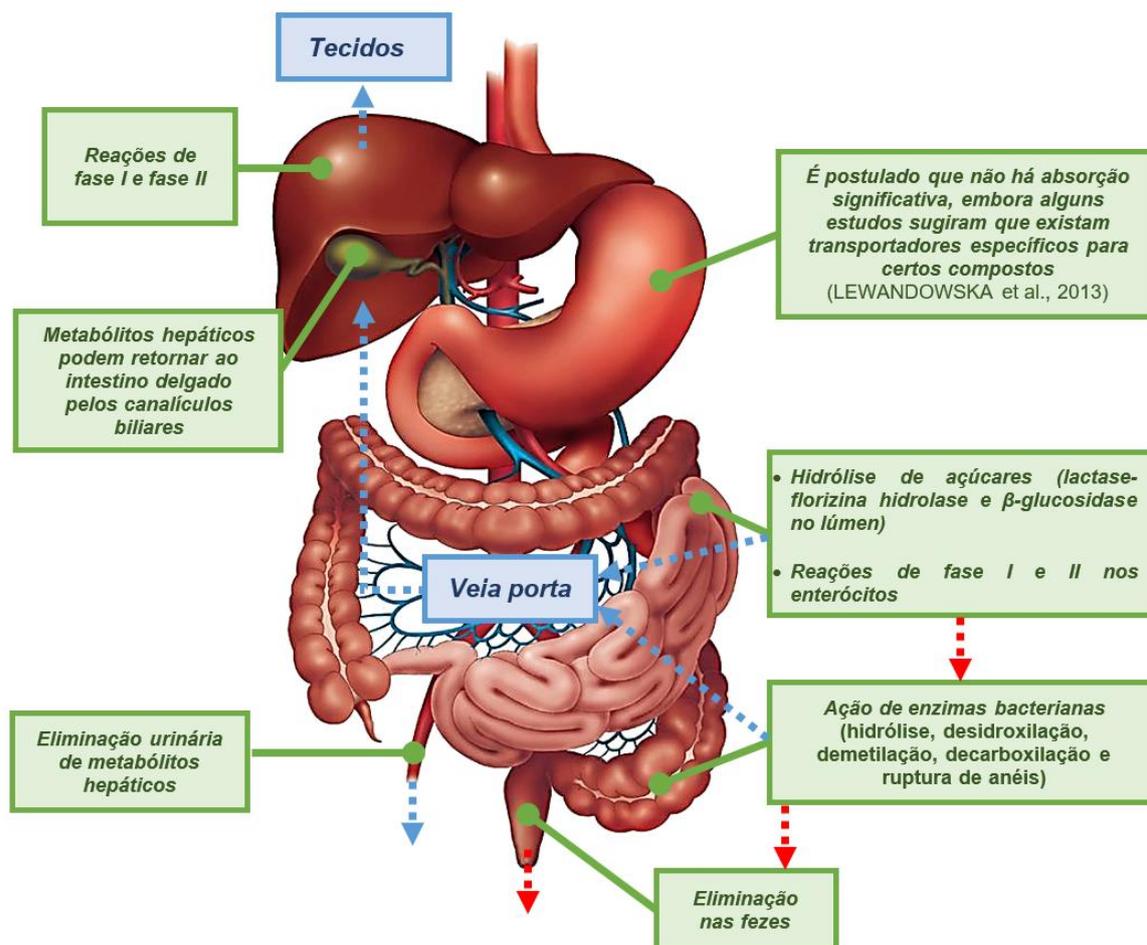


Figura 12. Metabolização de compostos fenólicos em humanos. As setas pontilhadas vermelhas representam os compostos não absorvidos em cada compartimento. As setas pontilhadas azuis representam os metabólitos absorvidos em cada compartimento.

Fonte: Adaptado de Cardona et al. (2013) e Marín et al. (2015).

Por outro lado, vários estudos sugerem que a biodisponibilidade de polifenóis aumenta quando administrados em combinação com outros polifenóis, visto que esses compostos, especialmente flavonoides, podem atuar como reguladores de transportadores de membranas e inibir a expressão de enzimas de fase I e II do metabolismo, diminuindo a rápida degradação dos outros compostos fenólicos (BADHANI et al., 2015; LEWANDOWSKA et al., 2013).

Existem evidências que esses polifenóis poliméricos podem aumentar a absorção de polifenóis monoméricos ou diméricos, sem necessariamente aumentar sua própria biodisponibilidade (NEILSON et al., 2016). Tem se observado que as procianidinas com grau de polimerização até 5 são absorvidas normalmente, e as procianidinas maiores parecem facilitar a absorção de outros compostos fenólicos, incluindo procianidinas de menor peso

molecular (APPELDOORN et al., 2009). Isso pode ocorrer por mecanismos físicos, ou seja, aumentando a espessura das junções celulares, ou por interações com proteínas circulantes e modulação de enzimas metabolizadoras, aumentando as concentrações de polifenóis menores na forma livre (BOHN, 2014; LEWANDOWSKA et al., 2013).

2.6. Resistência bacteriana

O tratamento de infecções bacterianas pela administração de agentes quimioterápicos, que passou a ser empregado sistematicamente desde os anos 30 do século XX, é associado ao aumento da expectativa humana na Terra. Os antibióticos ou antibacterianos são considerados umas das mais importantes descobertas da química medicinal (SIMMONS et al., 2010). Contudo, seu uso extensivo ao longo dos anos tem imposto uma pressão evolucionária sobre as bactérias, que desenvolveram resistência à ação bacteriostática (moduladora do crescimento) ou bactericida (causadora da morte) dos fármacos (DODDS, 2016).

Os principais mecanismos associados à resistência bacteriana concentram-se no desenvolvimento de sistemas de efluxo para os fármacos, diminuição da permeabilidade da membrana plasmática, degradação enzimática dos fármacos e alteração genética e/ou morfológica do alvo. Além da eficiência na inibição da ação de diversos fármacos, as bactérias têm desenvolvido e aperfeiçoado diversos mecanismos de transmissão genética desse arsenal de resistência (YAO; ROCK, 2017).

As bactérias são comumente agrupadas em Gram-positivas e Gram-negativas devido a diferenças na resposta a um clássico sistema de coloração desenvolvido por Hans Christian Gram, que até hoje é utilizado em laboratórios ao redor do mundo. Ambos os grupos possuem uma membrana plasmática normalmente permeável a moléculas não carregadas e lipofílicas (WRIGHT et al., 2014). Contudo, as gram-negativas possuem uma membrana adicional, mais resistente a permeação de drogas, incluindo moléculas do corante do método de Gram (violeta

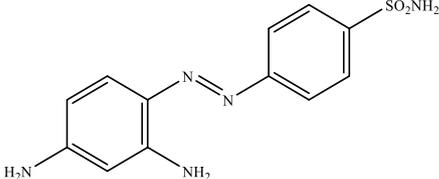
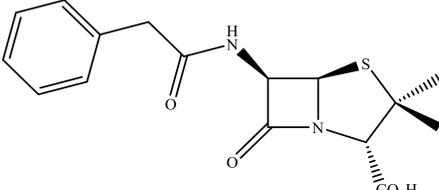
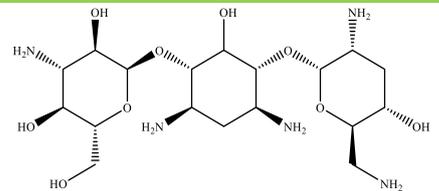
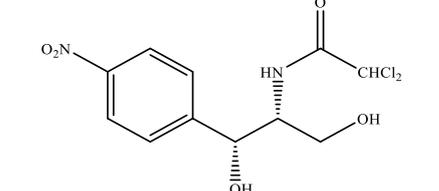
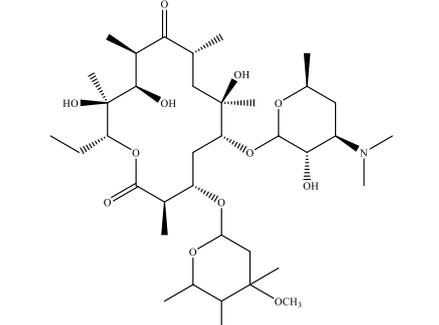
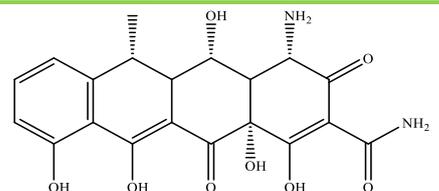
de genciana). Essa membrana adicional muitas vezes apresenta bombas de efluxo para um grande número de moléculas, incluindo antibióticos, o que as torna particularmente mais difíceis de serem combatidas (GILL et al., 2015).

As comunidades científica e médica têm se alarmado com o aumento da ocorrência de resistência nas mais diferentes espécies de bactérias. Tal fenômeno, associado ao intenso e crescente intercâmbio da população mundial, graças às facilidades do mundo moderno, torna a resistência bacteriana um problema de escala global (ABREU et al., 2012). Várias publicações confirmam que, acompanhando o aumento do fenômeno de resistência bacteriana, há um declínio na descoberta de novos antibacterianos (MOELLERING, 2011).

A maioria dos antibióticos utilizados hoje pertencem a limitados grupos químicos descobertos empiricamente, alguns há mais de 80 anos (Quadro 3). São compostos naturais ou produtos semissintéticos, ou análogos destes. Na chamada Era de Ouro dos antibióticos, alterações estruturais de classes químicas predecessoras foram a principal ferramenta para a descoberta de novos antibióticos. Contudo, essa abordagem encontra-se praticamente esgotada, levando ao entendimento de que todos os antibacterianos mais óbvios já foram descobertos (SINGH et al., 2017).

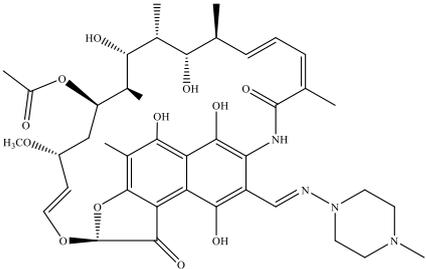
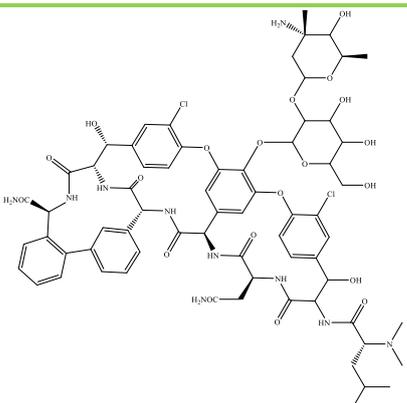
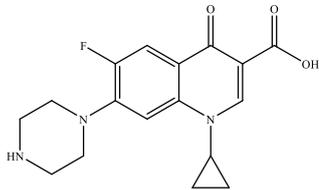
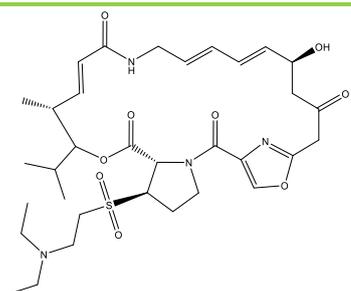
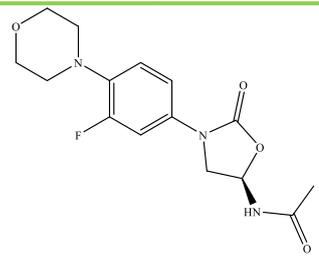
E essa limitada diversidade química facilita o desenvolvimento dos mecanismos de resistência que, na maior parte dos casos, acaba inutilizando toda uma classe farmacológica. Por isso, há uma urgência na pesquisa por novos *hits* que apresentem atividade antibacteriana (BÉRDY, 2012). Na contramão desse fato, nota-se um progressivo desinteresse da indústria farmacêutica no desenvolvimento de novos antibióticos, devido à urgente necessidade de uma classe química completamente nova, que demanda alto investimento, e o retorno relativamente baixo, visto que o uso de antibióticos se estende por poucos dias, na maior parte dos casos (MOORS et al., 2014).

Quadro 3. Principais classes de antibacterianos usados na terapêutica humana.

Classe (exemplo)	Descoberta	Uso	Resistência	Mecanismo	Espectro
 <p>Sulfonamidas (Pantasil)</p>	1932	1936	1942	Inibição da diidropteroato sintetase	Gram-positivas
 <p>β-lactâmicos (Penicilina G)</p>	1928	1938	1945	Inibição da síntese da parede celular	Amplio
 <p>Aminoglicosídeos (Estreptomicina)</p>	1943	1946	1946	Ligação a subunidade ribossomal 30S	Amplio
 <p>Fenilpropanoides (Cloranfenicol)</p>	1946	1948	1950	Ligação a subunidade ribossomal 50S	Amplio
 <p>Macrolídeos (Eritromicina)</p>	1948	1951	1955	Ligação a subunidade ribossomal 50S	Amplio
 <p>Policetídeos (Doxiciclina)</p>	1944	1952	1950	Ligação a subunidade ribossomal 30S	Amplio

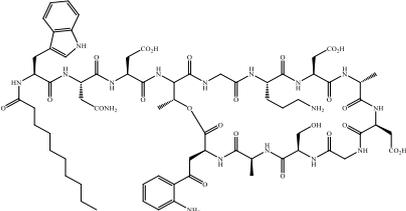
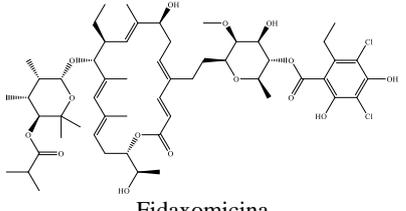
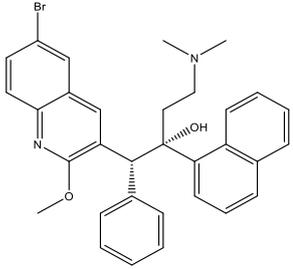
(Continua)

Continuação do Quadro 3.

Classe (exemplo)	Descoberta	Uso	Resistência	Mecanismo	Espectro
 <p>Rifamicinas (Rifampicina)</p>	1957	1958	1962	Ligação a subunidade β da RNA-polimerase	Gram-positivas
 <p>Glicopeptídeos (Vancomicina)</p>	1953	1958	1960	Inibição da síntese da parede celular	Gram-positivas
 <p>Quinolonas (Ciprofloxacino)</p>	1961	1968	1968	Inibição da síntese do DNA	Amplo
 <p>Estreptograminas (Dalfopristina)</p>	1963	1998	1964	Ligação a subunidade ribossomal 50S	Gram-positivas
 <p>Oxazolidinonas (Linezolida)</p>	1955	2000	2001	Ligação a subunidade ribossomal 50S	Gram-positivas

(Continua)

Continuação do Quadro 3.

Classe (exemplo)	Descoberta	Uso	Resistência	Mecanismo	Espectro
 <p>Lipopeptídeos (Daptomicina)</p>	1986	2003	1987	Despolarização da membrana	Gram-positivas
 <p>Fidaxomicina (Fidaxomicina)</p>	1948	2011	1977	Inibição da RNA polimerase	Gram-positiva (<i>Clostridium difficile</i>)
 <p>Diarylquinolinas (Bedaquilina)</p>	1997	2012	2006	Inibição da F ₁ F ₀ -ATPase	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>

Fonte: Adaptado de Lewis (2013) e van Nussbaum et al. (2006).

Somado a isso, os antibióticos normalmente não obedecem às regras de Lipinski, o que tem levado a sucessivos fracassos dos programas de HTS. Essas plataformas frequentemente selecionam moléculas maiores e mais lipofílicas que as consideradas “ideais” para o desenvolvimento de fármacos. Moléculas grandes e lipofílicas normalmente têm afinidade inespecífica por uma grande quantidade de alvos, mas não costumam progredir para as próximas etapas de desenvolvimento de fármacos, devido a farmacocinética desfavorável (GWYNN et al., 2010).

Desse modo, a indústria tem devotado maior atenção ao desenvolvimento de terapias para doenças crônicas modernas que, a despeito das inerentes dificuldades, levam a maiores retornos financeiros (LEWIS, 2013). Nos últimos anos, poucos antibióticos realmente novos foram descobertos. Ao se analisar os fármacos que estão em fase I, II ou III para o tratamento

de infecções por bactérias gram-negativas, particularmente mais difíceis de tratar devido às características morfológicas dos micro-organismos, somente dois são realmente novas entidades químicas atuando por um novo mecanismo de ação (WRIGHT, 2016).

Dada a urgência no desenvolvimento de novos antibióticos, a escolha de um alvo para ambas gram-positivas e gram-negativas parece ser mais adequada. Nesse contexto, ganha destaque o desenvolvimento de inibidores para a síntese de peptidoglicano, abordagem que deu origem aos primeiros antibióticos de sucesso (β -lactâmicos) e também a um dos agentes mais potentes conhecidos até hoje (vancomicina) (BUGG et al., 2011). O peptidoglicano é um componente da membrana de praticamente todas as bactérias e os eventos finais da sua complexa biossíntese envolve a enzima glicosiltransferase/transglicosilase, que polimeriza os resíduos de açúcar, aos quais a enzima transpeptidase liga peptídeos para conferir o aspecto tridimensional da sua estrutura (LIU; BREUKINK, 2016).

Comparativamente, as transpeptidases são alvos terapêuticos melhor estudados que as glicosiltransferases, o que é crítico para o desenvolvimento rápido de novos inibidores. Contudo, os principais inibidores dessa enzima, penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos, contêm o anel β -lactâmico em sua estrutura, para o qual diversas espécies de bactérias já desenvolveram mecanismo de degradação (SAUVAGE; TERRAK, 2016). Logo, o desenvolvimento de novas estruturas capazes de interagir e inibir a ação da transpeptidase é de grande importância clínica (GWYNN et al., 2010).

Outrossim, também tem sido valorizada a busca de adjuvantes para a potencialização da ação de drogas já existentes, como uma forma de resgatar drogas com bom perfil farmacológico por meio de modulação dos mecanismos de resistência bacteriana. Uma estratégia bastante promissora nesse aspecto é a promoção de danos à estrutura da membrana, que podem propiciar maior permeabilidade a outras drogas (BERNAL et al., 2013; WAGNER, 2011; WRIGHT, 2016).

2.7. Doenças (Tropicais) Negligenciadas

O termo “Doenças Tropicais Negligenciadas” tem sido utilizado para descrever certas patologias parasitárias e bacterianas para as quais existem poucas, ou mesmo nenhuma, opções terapêuticas. Ocorrem, principalmente, entre as populações rurais de países em desenvolvimento, sujeitas a condições precárias de saneamento e de sistema de saúde (PEDRIQUE et al., 2013). Portanto, geralmente afetam pessoas e países com baixo poder aquisitivo, o que tem sido associado ao desinteresse da indústria farmacêutica no desenvolvimento de medicamentos para as mesmas, presumindo o baixo retorno financeiro (BARRETT; CROFT, 2014).

Contudo, com a nítida globalização e urbanização da população mundial ao longo dos anos, cada vez mais casos de doenças negligenciadas têm sido registrados em grandes cidades. Acredita-se, inclusive, que esse fenômeno já possa estar subnotificado. Tem sido discutido que tais doenças, hoje consideradas endêmicas de regiões pobres, sejam uma preocupação mundial em pouco tempo. Prevê-se que em 2050, mais da metade da população do planeta viverá em grandes cidades e poucos estudos tem se preocupado em entender os modos urbanos de transmissão (HOTEZ, 2017).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) mantém um programa oficial de monitoramento de doenças negligenciadas visando estimular a pesquisa científica por novos medicamentos. Dentre essas patologias, figuram três importantes infecções causadas por parasitas tripanosomatídeos: doença de Chagas, causada por *Trypanosoma cruzi*; tripanosomíase africana ou doença do sono, causada por *Trypanosoma brucei gambiense* ou *rhodesinense*; e leishmaniose visceral, causada por protozoários do gênero *Leishmania* spp. (NUSSBAUM et al., 2010). Esses parasitas apresentam diferentes fenotipos nos diferentes hospedeiros. Em todos os casos, a transmissão é feita de insetos hematófagos a diferentes

mamíferos, incluindo o ser humano, onde recomeça o seu ciclo de vida (Figura 13) (GEIGER et al., 2016).

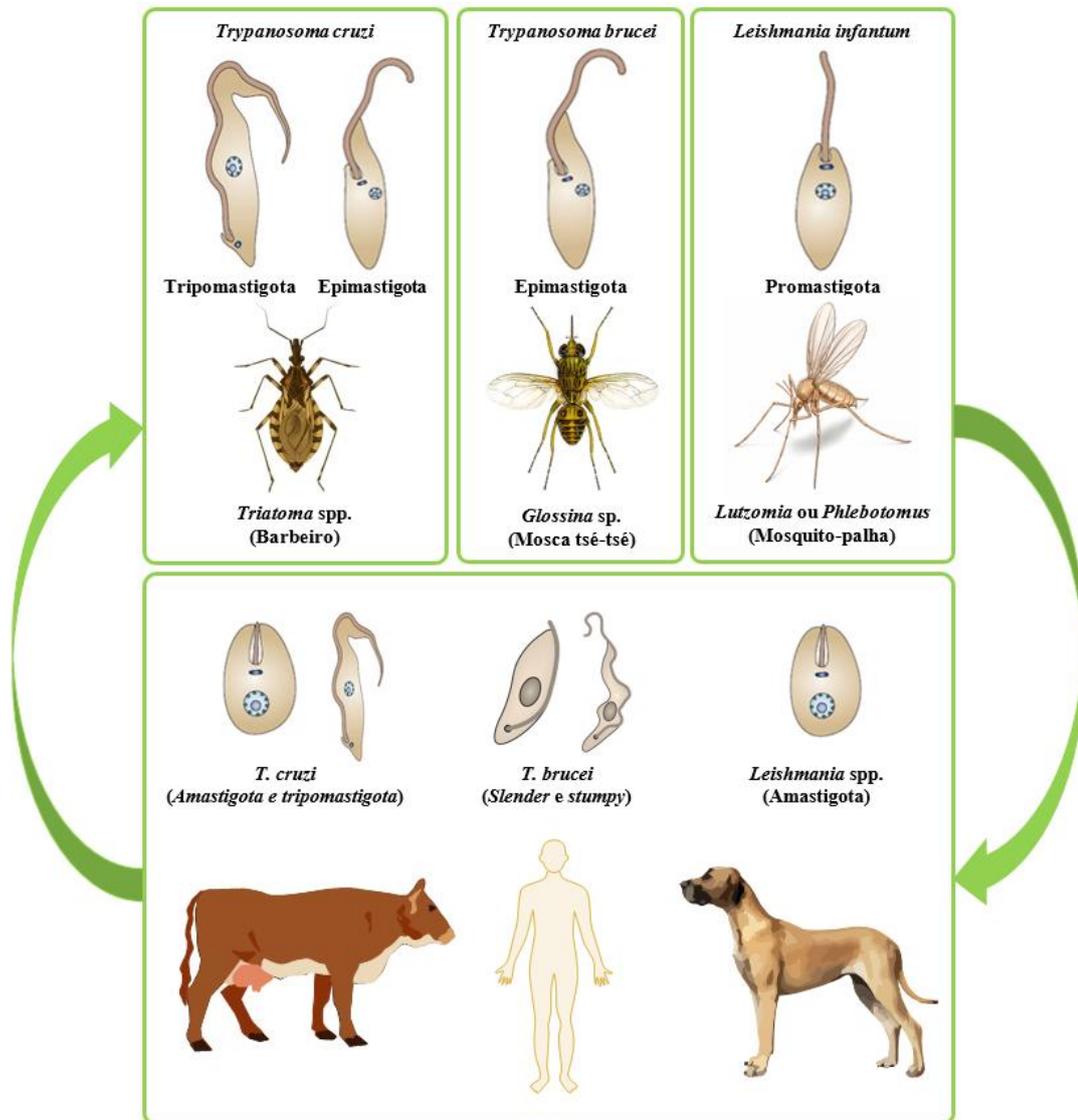
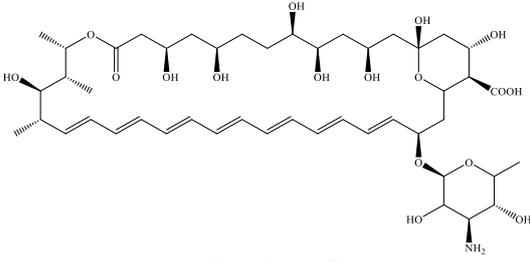
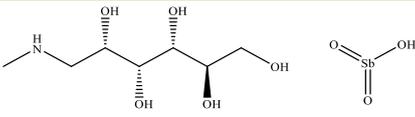
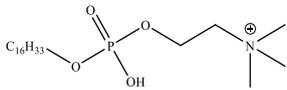
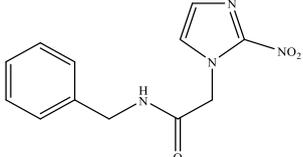
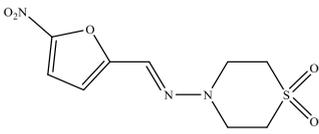
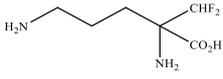


Figura 13. Ciclo de vida e principais vetores dos parasitas tripanosomatídeos.
Fonte: Adaptado de Field et al. (2017).

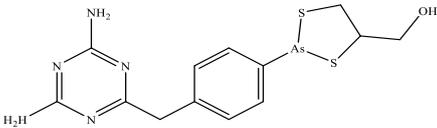
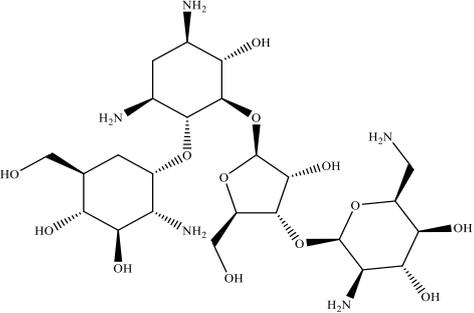
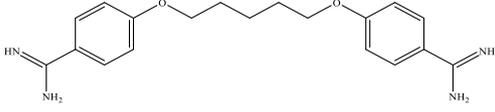
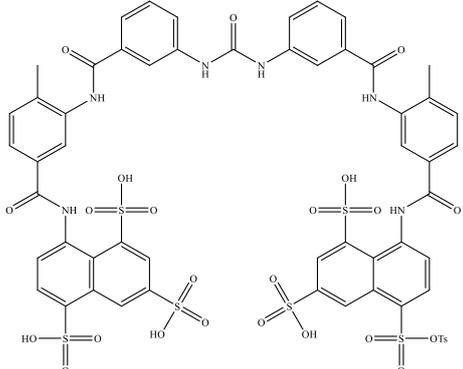
Embora existam avanços no desenvolvimento de vacinas para as infecções por parasitas tripanosomatídeos, até o momento, o combate aos parasitas é estritamente quimioterápico, e os poucos agentes disponíveis estão longe de serem ideais (SILVA-JARDIM et al., 2014). Os esquemas terapêuticos atualmente disponíveis são onerosos, muitas vezes requerem administração parenteral e apresentam altas taxas de efeitos adversos, e tratamentos de longa duração e variável efetividade (Quadro 4).

Quadro 4. Principais fármacos e esquemas terapêuticos contra doenças parasitárias

<i>Leishmania infantum</i> – leishmaniose visceral		
Fármaco	Administração	Desvantagens
 <p>Anfotericina B</p>	Oral	<ul style="list-style-type: none"> Alta toxicidade na maioria das formulações; A preparação mais tolerável (lipossomal) tem alto custo.
 <p>Antimoniato de meglumina</p>	Intramuscular por 30 dias	<ul style="list-style-type: none"> Dor no local da aplicação; Toxicidade; Não é ativo em todos os grupos étnicos.
 <p>Miltefosine</p>	Oral	<ul style="list-style-type: none"> Teratogênico; Relatos frequentes de falhas no tratamento.
<i>Trypanosoma cruzi</i> – tripanosomíase americana ou Doença de Chagas		
Fármaco	Administração	Desvantagens
 <p>Benznidazol</p>	Oral, várias vezes ao dia	<ul style="list-style-type: none"> Razoavelmente ativo apenas no estágio agudo da doença; Problemas na adesão ao tratamento devido aos efeitos adversos; Longo período de tratamento (até 60 dias); Inativo se o dano cardíaco é pré-existente.
 <p>Nifurtimox</p>	Oral	<ul style="list-style-type: none"> Razoavelmente ativo apenas no estágio agudo da doença; Problemas na adesão ao tratamento devido aos efeitos adversos; Uso por gestantes é controverso; Longo período de tratamento (até 60 dias).
<i>Trypanosoma brucei</i> – tripanosomíase africana ou doença do sono		
Fármaco	Administração	Desvantagens
 <p>Eflornitina</p>	Infusão Intravenosa lenta	<ul style="list-style-type: none"> Ativo apenas no segundo estágio da doença; Não tem efeito sobre <i>Trypanosoma brucei</i> rhodesiense; Alto custo, necessita da administração de grande quantidade do fármaco por longos períodos (usado em menor quantidade se associado a nifurtimox); Septicemia é um efeito adverso frequente; Toxicidade com alta mortalidade por encefalopatia.

(Continua)

(Continuação do quadro 4)

<i>Trypanosoma brucei</i> – tripanosomíase africana ou doença do sono		
Fármaco	Administração	Desvantagens
 <p>Melarsoprol</p>	Intravenosa por 10 dias	<ul style="list-style-type: none"> • Ativo apenas no segundo estágio da doença; • Toxicidade com alta mortalidade por encefalopatia.
 <p>Paromomicina</p>	Intramuscular por 21 dias	<ul style="list-style-type: none"> • Dor no local da aplicação; • Ototoxicidade; • Não é ativo em todos os grupos étnicos.
 <p>Pentamidina</p>	Intramuscular por sete dias	<ul style="list-style-type: none"> • Ativo apenas contra o primeiro estágio de <i>Trypanosoma brucei</i> gambiense; • Toxicidade.
 <p>Suramina</p>	Intravenosa	<ul style="list-style-type: none"> • Ativo apenas contra o primeiro estágio de <i>Trypanosoma brucei</i> rhodesiense; • Toxicidade.

Fonte: Adaptado de Field et al. (2017).

Todas essas desvantagens contribuem para interrupções do tratamento pelo próprio paciente, o que é um fator de risco para a indução de resistência nos parasitas. Os principais mecanismos documentados incluem alterações na permeabilidade da membrana ou depleção dos sistemas de incorporação da droga no interior celular, modificação da proteína-alvo, incremento dos sistemas de refluxo, metabolização da droga (GARCIA-SALCEDO et al., 2016), de forma semelhante à observada em bactérias.

Apontam-se como focos importantes na busca por novos fármacos antitripanosomatídeos, o desenvolvimento de uma classe de medicamentos completamente nova, com menor toxicidade ao hospedeiro, melhor esquema de administração, baixo custo de produção e curta duração do tratamento, e/ou o desenvolvimento de terapias combinadas mais eficientes (FIELD et al., 2017). Por serem doenças causadas por parasitas geneticamente similares, tem sido estudada a possibilidade de desenvolvimento de um único fármaco ou terapia combinada para tratá-las (CASTILLO-GARIT et al., 2012).

Durante muito tempo o colesterol foi considerado o principal esteroide de membrana dos tripanosomatídeos. Quando as culturas de parasitas deixaram de ser realizadas em tecidos humanos, ficou claro que esses micro-organismos sintetizam ergosterol e não colesterol, que tem poucas, mas fundamentais diferenças em sua estrutura (Figura 14). Também ficou evidente que essa é uma via metabólica essencial para o seu crescimento e multiplicação (DE SOUZA; RODRIGUES, 2009).

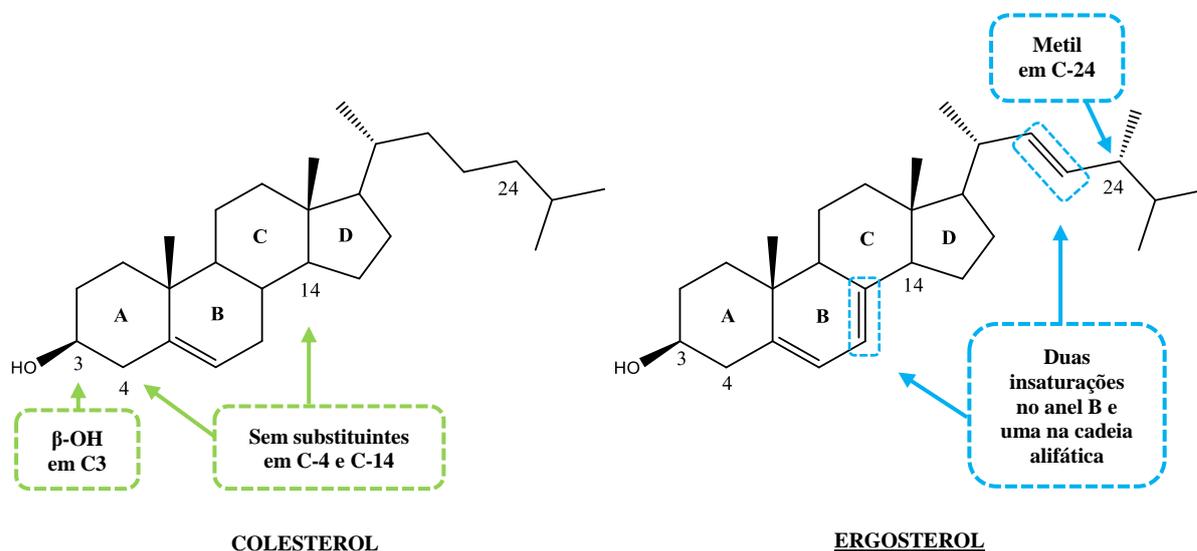


Figura 14. Semelhanças e diferenças nas estruturas do colesterol e do ergosterol. Em verde, características essenciais para o crescimento celular em ambas as estruturas. Em azul, diferenças na estrutura do ergosterol em relação ao colesterol, que são fundamentais para o crescimento de fungos e parasitas.

Fonte: De Sousa; Rodrigues (2009).

Além das diferenças estruturais, há diferença significativa na biossíntese do ergosterol e do colesterol. Duas enzimas, inexistentes em mamíferos, a 14 α -desmetilase (CYP51),

responsável pela retirada de um grupo metil da posição 14 do lanosterol, e a Δ^{24} -metiltransferase (SMT), responsável por alquilações na posição 24 dos precursores, são fundamentais para a síntese desse importante esteroide de membrana em fungos e parasitas (POMEL et al., 2015).

Face as vantagens do reposicionamento de drogas no desenvolvimento de novas terapias, os antifúngicos azólicos, conhecidos inibidores da CYP51, têm sido investigados no tratamento de infecções por *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* spp. Posaconazol foi avaliado em estudos clínicos com pacientes infectados por *T. cruzi*, em associação com o benznidazol. Embora tenha sido observada a redução da parasitemia, a cura total do paciente não foi alcançada. Atualmente, o feznidazol está em fase II de estudos clínicos (FERREIRA et al., 2016). De forma semelhante, a despeito dos promissores resultados *in vitro* contra *Leishmania mexicana* e *L. major*, os resultados clínicos com antifúngicos azólicos no tratamento de leishmanioses não foram satisfatórios. Ademais, esses fármacos em geral não são ativos contra *L. braziliensis*, *L. donovani* e *L. infantum*, as duas últimas sendo as responsáveis pela forma mais letal da doença (CHOI et al., 2014).

O desenvolvimento de análogos aos ligantes endógenos da CYP51, pode ser uma estratégia válida para a inibição dessa enzima em tripanosomatídeos (CHOI; ROUSH, 2017), embora essa alternativa venha sendo pouco avaliada. Em contrapartida, alguns derivados de esteroides já foram propostos como inibidores competitivos da SMT. Os chamados azasterois são os mais antigos inibidores da SMT conhecidos. Esses compostos apresentam grupamentos contendo nitrogênio, normalmente alifáticos, podendo conter grupos protetores na β -OH em C3 na estrutura do ergosterol, a qual é essencial para o crescimento do micro-organismo (GIGANTE et al., 2010).

Também fundamentados na mimetização do ligante endógeno, outros derivados semissintéticos de esteroides foram recentemente propostos como inibidores da SMT.

Derivados obtidos por acoplamento de grupos nitrogenados, incluindo triazólicos, no anel B da estrutura da ergosterona (FIGARELLA et al., 2016) e derivados 24-metilenociclopronano (MILLER et al., 2017) apresentaram bons resultados *in vitro* contra tripanosomatídeos, sinalizando a importância desse alvo terapêutico do desenvolvimento de novos antiparasitários.

2.7.1. Tripanosomíase americana

Apesar de ter sido descoberta há mais de um século pelo médico brasileiro Carlos Chagas, a tripanosomíase americana ou doença de Chagas é a patologia parasitária de maior incidência no Novo Mundo (CERECETTO; GONZÁLEZ, 2010). Ela é transmitida por insetos da família Reduviidae que, após picarem um vertebrado durante o sono, defecam no local. A abrasão causada ao coçar a área da picada facilita a transferência do parasita *Trypanosoma cruzi* das fezes contaminadas para a corrente sanguínea (BERMUDEZ et al., 2016).

O parasita pode ainda ser transmitido de modo congênito (da mãe para o filho), por ingestão de comida ou bebida contaminados, ou por transfusão sanguínea. A doença tem duas fases clínicas principais: a fase aguda (cerca de dois meses), caracterizada por intensa multiplicação do parasita nas células do hospedeiro; e a fase crônica, que pode durar décadas, onde o sistema imune não é mais eficiente no combate ao parasita, culminando nas complicações cardiovasculares e gastrointestinais da doença (CHATELAIN, 2016).

A fase aguda da infecção apresenta sintomas similares a de uma virose comum, como febre e mal-estar. Em poucos casos as manifestações são mais severas, o que faz com que muitos pacientes não procurem ajuda médica nessa fase, que é de fácil diagnóstico ao microscópico. Em boa parte dos casos, o organismo consegue eliminar o parasita durante a fase aguda da infecção. Cerca de 30 % dos pacientes chegam à fase indeterminada, onde pode se desenvolver um equilíbrio entre o parasita e o hospedeiro, sem manifestações clínicas mais

graves, ou ausência total de sintomas, mas com possibilidade de transmissão a outros hospedeiros (MALIK et al., 2015).

Entre 25 % e 30 % dos pacientes na fase indeterminada progridem para a fase crônica, onde surgem as complicações cardíacas como arritmias, ou megassindromes como esplenomegalia, que tornam a Doença de Chagas potencialmente fatal. A OMS (2017) calcula cerca de dez mil mortes ao ano por essa patologia, e estima que oito milhões de pessoas no mundo estejam infectadas com o *T. cruzi*, e 25 milhões estejam sob risco de infecção.

2.7.2. Tripanosomíase africana

A tripanosomíase africana ou doença do sono é uma doença parasitária endêmica em 36 países da África subsaariana. Ela é causada por duas subespécies de *Trypanosoma brucei*, onde a gambiense é responsável por 98 % dos casos, estando o restante relacionado à subespécie rodhesiense, que produz a forma mais letal da doença. Ambos os parasitas são transmitidos ao homem pela picada da mosca tse-tse (*Glossina* spp.). Outros modos de transmissão registrados são por transferência congênita do parasita e por acidentes laboratoriais com os mesmos (BABOKHOV et al., 2013).

Embora os animais de gado sejam os principais reservatórios da subespécie rodhesiense, o ser humano é um hospedeiro frequente da espécie gambiense. Os sintomas da infecção são classicamente divididos em estágio agudo e estágio tardio, embora sejam de difícil diferenciação clínica. Por outro lado, essa diferenciação é fundamental para a correta quimioterapia da doença, visto que nem todas as opções farmacológicas disponíveis são ativas em ambos os estágios (KENNEDY, 2013).

A manifestação clínica da infecção pelos dois parasitas é bastante similar, mas difere em termos de tempo de latência, frequência e severidade. A infecção por *T. brucei rodhesiense* pode conduzir à morte em até seis meses, enquanto que infecção por *T. brucei gambiense* tem

caráter mais crônico, e pode levar à morte em três anos se não tratada. Na fase aguda os parasitas se instalam nos linfonodos e na corrente sanguínea, e o paciente apresenta sintomas indeterminados como febre intermitente, dor de cabeça, prurido e outros sintomas dermatológicos, fraqueza, anemia e dores musculares, até sintomas mais graves como desordens cardíacas e hepatoesplenomegalia (FRANCO et al., 2014).

Depois de um certo período, que varia com o tipo de infecção e onde não necessariamente cessam os sintomas da primeira fase, os parasitas cruzam a barreira hematoencefálica e se instalam no sistema nervoso central, onde provocam danos progressivos, cujos sintomas são dependentes da área do cérebro invadida. É nessa fase que se observam as típicas alterações do sono que deram origem ao nome popular da doença (o paciente fica sonolento durante o dia e em vigília à noite), além de confusão e problemas na coordenação motora (PONTE-SUCRE, 2016).

A incidência da doença diminuiu nos últimos anos, o que tem desestimulado os financiamentos voltados a pesquisas por novas alternativas terapêuticas (BARRETT; CROFT, 2014). Contudo, os esquemas terapêuticos atuais registram cada vez mais casos de resistência, e a principal estratégia de controle da doença tem sido o rastreamento de pacientes infectados em áreas de risco, que normalmente são melhor diagnosticados no segundo estágio da doença, que é passível de transmissão em todo o seu curso (BERTHIER et al., 2016).

2.7.3. Leishmaniose visceral

Leishmanioses são um amplo espectro de doenças que variam desde ulcerações cutâneas até complicações viscerais graves (CHAWLA; MADHUBALA, 2010). Os parasitas do gênero *Leishmania* são transmitidos a humanos por mosquitos hematófagos dos gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo), que são geralmente mais ativos à noite, quando, ao se alimentarem, transmitem pela saliva os parasita a reservatórios mamíferos, tais como

roedores, marsupiais, macacos e cães selvagens ou domésticos (NO, 2016). O homem é infectado incidentalmente nas áreas de risco. Raramente, há transmissão por transfusão sanguínea, compartilhamento de agulhas ou de modo congênito (GEORGIADOU et al., 2015).

É estimado que 350 milhões de pessoas estão sob risco de infecção por alguma espécie de *Leishmania*, cuja incidência anual é de 1,5 a 2 milhões de casos, causando cerca de 70.000 mortes (SEIFERT, 2011). A forma visceral da doença, também conhecida como Kala-azar (febre negra em hindu), é crônica e potencialmente fatal se não tratada adequadamente, devido ao severo comprometimento de vários órgãos. É causada, principalmente, por *Leishmania infantum* (também chamada de *Leishmania chagasi*). A incidência desse tipo de infecção é de 500.000 novos casos por ano, sendo que mais de 90 % destes ocorrem em seis países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Sudão (SAPORITO et al., 2013; SILVA-JARDIM et al., 2014).

Clinicamente, a presença de febre alta, anemia, citopenias, aumento de γ -globulinas, hepatoesplenomegalia, linfedema (que se manifestam de 2 a 6 meses após a infecção), associada a condições epidemiológicas favoráveis, tem sido usada como diagnóstico prévio, o qual é confirmado pela pesquisa de amastigotas no interior de macrófagos (SAVOIA, 2015).

Em geral, pacientes imunocompetentes não desenvolvem sintomas clínicos, contudo, com o aumento de transplantes e terapias imunossupressoras nas práticas médicas, e da incidência de doenças que afetam o sistema imune, como a SIDA, a leishmaniose visceral tem emergido como importante fator de mortalidade, inclusive em países desenvolvidos (GEORGIADOU et al., 2015). Esse fato traz à luz a preocupação com uma possível subnotificação da doença, reforçada pelo dinamismo da epidemiologia da infecção, que possui uma ampla variedade de mamíferos hospedeiros, e extensa capacidade de adaptação a diferentes fatores climáticos e demográficos, e perfil socioeconômico, comportamental e imunogênico da população em risco (HAILU et al., 2016).

2.8. Necessidade de novos antifúngicos

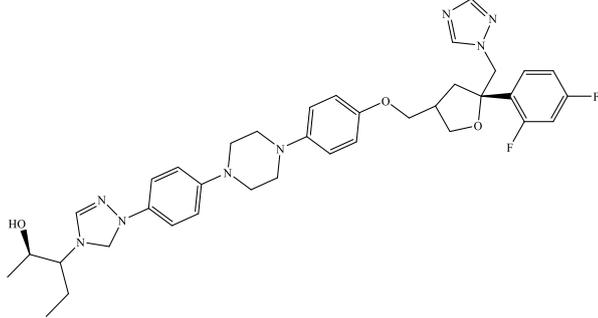
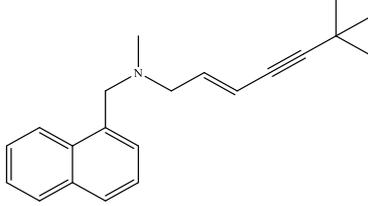
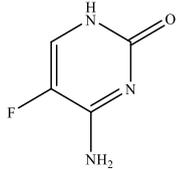
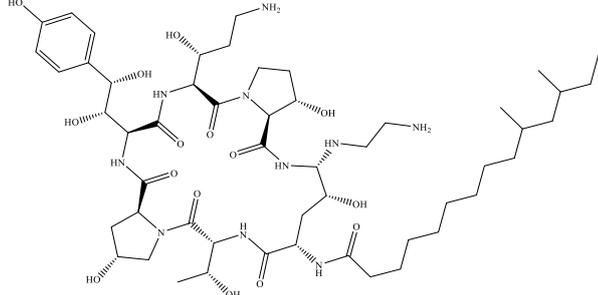
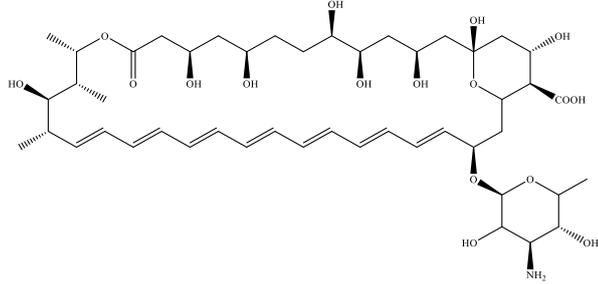
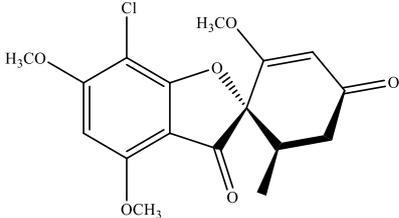
Embora a taxa de sucesso na descoberta de novos antibióticos seja baixa, a busca por novas fármacos dessa classe ainda pode ser considerada intensa se comparada à busca por novos antifúngicos. Tal fato tem sido justificado pela baixa incidência de infecções fúngicas, quando comparadas às bacterianas. A proximidade evolucionária com células humanas também é colocada como um fator que dificulta e desencoraja novas pesquisas (SCORZONI et al., 2017).

Por outro lado, o panorama de incidência de infecções fúngicas tem se alterado com o crescente uso de terapias imunossupressoras nos sistemas de saúde ou doenças da sociedade moderna. Infecções fúngicas invasivas tem se tornado muito comuns em pacientes imunocomprometidos por quimioterapia para o tratamento de câncer, em uso de corticosteroides, ou afetados por SIDA. Além disso, as infecções fúngicas invasivas apresentam uma taxa de mortalidade em nada negligenciável (CAMPOY; ADRIO, 2016).

Muitas das infecções ocorrem durante o uso sondas e cateteres em ambiente hospitalar, por meio dos quais, *Candida albicans*, um dos micro-organismos presentes na microflora oral, intestinal e vaginal humanas, alcança a corrente sanguínea, tornando-se um dos fatores de risco para o choque séptico. Decerto, essa espécie é associada a 70-90 % das infecções fúngicas invasivas, que apresentam uma taxa de mortalidade de 30-40% (TONG; TANG, 2017).

Dentro das limitadas opções de fármacos, os principais agentes usados no combate a *C. albicans* e outras espécies de fungos são derivados sintéticos azólicos, por apresentarem preço acessível, boa efetividade e menor toxicidade em relação às demais classes de antifúngicos (Quadro 5). Esses fármacos atuam por inibição da CYP51, envolvida na síntese de ergosterol. Portanto, sua ação altera a fluidez e permeabilidade da membrana dos fungos e, conseqüentemente, interfere na atividade das enzimas ancoradas. Tais efeitos, em conjunto, inibem o crescimento e replicação celular (BECHER; WIRSEL, 2012; DI SANTO, 2010).

Quadro 5. Principais classes de antifúngicos utilizadas na terapêutica humana.

Classe de fármaco	Exemplo	Mecanismo
Azólicos	 <p>Posaconazol</p>	Inibição da síntese de ergosterol (lanosterol-14 α -desmetilase ou CYP51)
Alilaminas	 <p>Terbinafina</p>	Inibição da síntese de ergosterol (esqualeno-epoxidase)
Antimetabólitos	 <p>Flucitosina</p>	Alterações no RNA ou DNA fúngico
Equinocandinas	 <p>Caspofungina</p>	Alteração da parede celular por inibição da síntese de β -glicanos
Polienos	 <p>Anfotericina B</p>	Perturbação da estrutura da membrana por interação com o ergosterol
Outro	 <p>Griseofulvina</p>	Alterações nos mecanismos de mitose

Fonte: Anderson (2005).

A maioria dos inibidores azólicos são derivados pirimidina e piridina, os quais possuem nitrogênios heteroaromáticos que se coordenam ao ferro do grupo heme presente no sítio ativo da CYP51, inibindo sua ação oxidase. Esse mesmo grupamento está presente na outras enzimas do complexo citocromo P450, incluindo as humanas (ODDS et al., 2003). Portanto, a inibição da CYP51 ainda carece de fármacos mais seletivos (CHOI; ROUSH, 2017). Somado a isso, a resistência a esses fármacos tem sido cada vez mais documentada (DI SANTO, 2010).

C. albicans é normalmente usada como modelo para estudo de novos antifúngicos e também de mecanismos de resistência. Os principais mecanismos de *C. albicans* para resistência a antifúngicos azólicos são modificação estrutural ou aumento da expressão da proteína-alvo e a superexpressão de bombas de efluxo. *C. glabrata* foram encontrados mecanismos adicionais resistência, como utilização de esteroides exógenos para constituição da membrana, o que a torna uma das espécies mais difíceis de serem eliminadas pelos antifúngicos azólicos (WHALEY et al., 2017).

Apesar disso, desencadear alterações nas membranas continua sendo uma estratégia valorizada na busca por novos antifúngicos, especialmente no que tange à inibição da CYP51 por fármacos mais específicos e com novos modos de interação, combinada ou não com a inibição de outras enzimas da cadeia biossintética do ergosterol (SANT et al., 2016). A demanda por drogas que atuem por esses mecanismos também se justifica pela necessidade de novos antiparasitários, desde que inibidores da síntese do ergosterol também são alvos de interesse em parasitas tripanosomatídeos (LEPESHEVA; WATERMAN, 2007), como visto na seção 2.7.

2.9. Potencial de triterpenos como novos antimicrobianos

Um importante grupo de metabólitos para a defesa das plantas contra micro-organismos são os terpenoides. Eles são encontrados em praticamente todas as famílias botânicas e em todas

as partes das plantas, inclusive como compostos majoritários de secreções vegetais. Mono e sesquiterpenos são normalmente encontrados em óleos essenciais, enquanto os terpenos maiores, como os triterpenos, são comumente encontrados em resinas (MUFFLER et al., 2011).

Triterpenos são isoprenoides com 30 átomos de carbono, formados a partir de seis unidades de isopreno (2-metil-1,3-butadieno). Eles podem ser acíclicos como o esqualeno, tetracíclicos como o grupo lanostano, ou pentacíclicos como os grupos oleanano e ursano (LIU; NES, 2009). Triterpenos são frequentemente isolados de plantas consumidas como medicinais, principalmente quando cascas do caule e cascas dos frutos são as partes utilizadas (JÄGER et al., 2009).

Na contramão desses achados, embora existam fármacos *blockbuster* derivados de diferentes terpenos, como o anticâncer paclitaxel (diterpeno) e o antimalárico artemisinina (sesquiterpeno), não existem registros de medicamentos produzidos a partir de triterpenos (GUIMARÃES et al., 2014). Historicamente, mais atenção tem sido dada às suas formas heterosídicas, as saponinas, e durante muito tempo eles foram considerados biologicamente inativos devido a sua alta lipofilicidade (JATCZAK; GRYNKIEWICZ, 2014).

O interesse nas propriedades farmacológicas dos triterpenos, que incluem ação citotóxica, anti-inflamatória e efeitos positivos sobre o metabolismo de glicose e lipídios, surgiu recentemente, e vem crescendo vertiginosamente, principalmente com relação a derivados ácidos das séries oleanano, ursano e lupano (ZHANG et al., 2014). A eles são atribuídas capacidade de indução de apoptose, efeitos antiangiogênicos, atuação como moduladores de ativação e diferenciação de células do sistema imune e inflamatórias, além de atividade antioxidante (LASZCZYK, 2009). É bem documentada a expressiva atividade antimicrobiana de vários extratos vegetais ricos em triterpenos, embora ainda sejam poucos os trabalhos que analisam os compostos separadamente (PODOLAK; JANECKO, 2014).

Por outro lado, a enorme diversidade química dessa classe de produtos naturais, a maior do reino vegetal, motivou muitos estudos de elucidação de sua complexa biossíntese. Hoje é sabido que as rotas biossintéticas de esteróis e triterpenos estão intimamente relacionadas. Esses compostos são sintetizados pela via do mevalonato, e têm o 2,3-oxidoesqualeno como intermediário comum (Figura 15) (THIMMAPPA et al., 2014). A conversão do oxidoesqualeno nos mais de 100 esqueletos triterpênicos conhecidos varia com o arsenal enzimático de cada planta (TAYLOR, 2013).

Não obstante, os triterpenos guardam extrema semelhança estrutural com os esteroides, componentes de membranas plasmáticas de todos os organismos eucarióticos. Também são importantes precursores de hormônios nos mamíferos, plantas, insetos e até mesmo fungos. Em plantas, os esteroides derivam principalmente do cicloartenol, e nos animais e fungos, do lanosterol (AZAM et al., 2014).

Dado o exposto, sugere-se que a semelhança estrutural do triterpenos pentacíclicos com os esteróis, torna-os promissores *cores* para inibidores competitivos das enzimas CYP51 e STM, importantes enzimas da síntese do ergosterol em fungos e parasitas. Além disso, triterpenos do grupo oleanano e ursano, amplamente distribuídos na natureza, possuem grupos metil ligados a C4 e C14 que, como visto anteriormente, são fatores que inibem a construção eficiente da membrana do micro-organismo.

Outra característica fundamental dos esteroides de membranas de fungos e parasitas é a presença de duas insaturações no anel B, que estão ausentes nesses triterpenos (CONNOLLY et al., 2017). Essas características estruturais intrínsecas desse grupo de compostos pode ser uma vantagem natural em favor de uma possível ação antifúngica e antiparasitária.

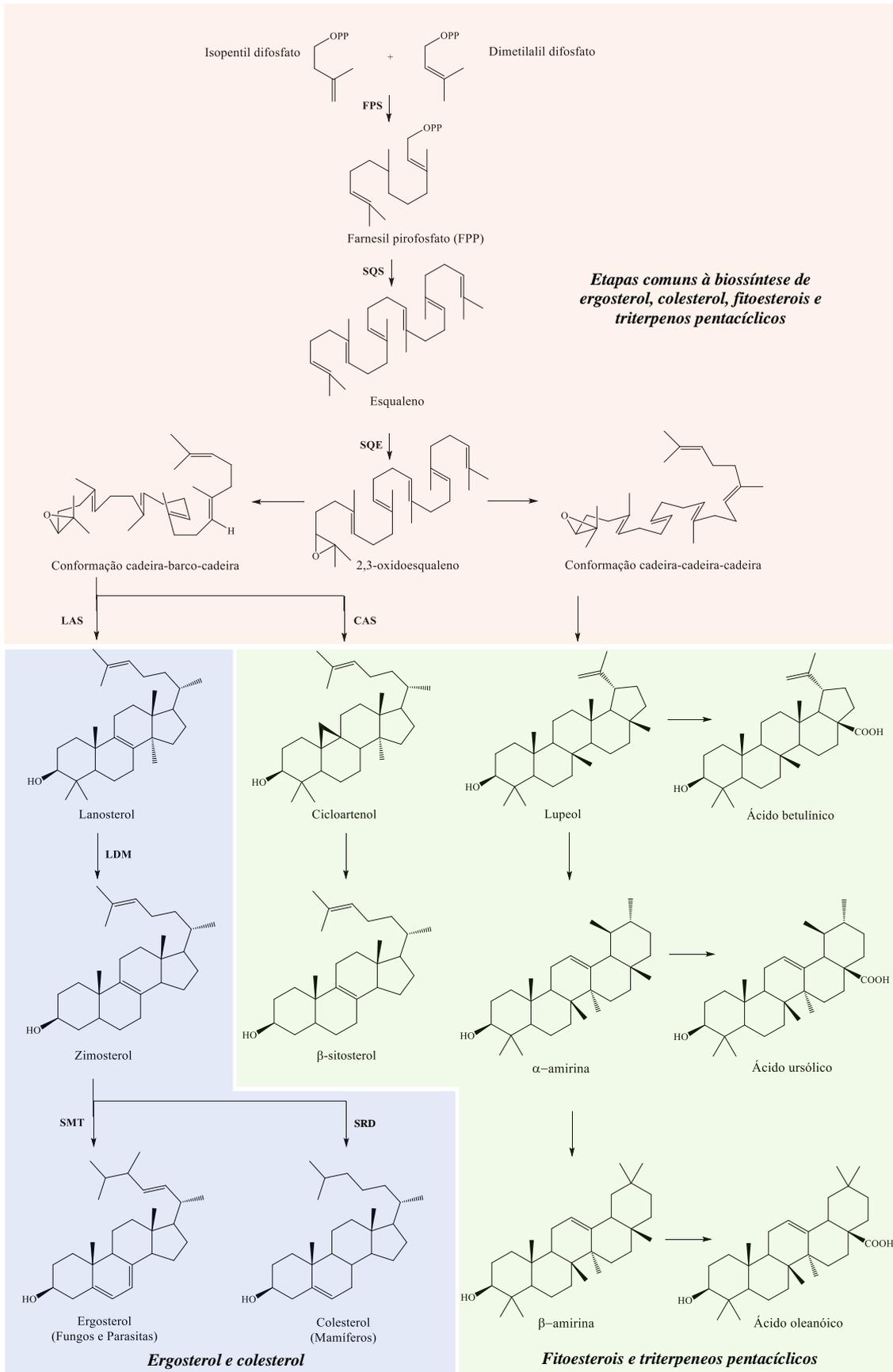


Figura 15. Biossíntese de triterpenos e esteroides. FPS: farnesil-pirofosfato sintase, SQS: esqualeno sintase, SQE: esqualeno epoxidase, LAS: lanosterol sintase, CAS: cicloartenol sintase, LDM: C14 α -demetilase (CYP51), STM: Δ^{24} -metil-transferase, SRD: Δ^{24} -esterol-redutase.

Fonte: Adaptado de Thimmappa et al. (2014) e De Souza; Rodrigues (2009).

Deve-se destacar ainda que a lipofilicidade intrínseca dos triterpenos pode ser uma característica interessante para novos antimicrobianos, visto que pode contribuir na permeação da molécula pela parede celular e/ou membrana do micro-organismo e/ou na interação e consequente perturbação da sua estrutura (MALLAVADHANI et al., 2004). Embora poucos estudos tenham investigado a ação de triterpenos sobre membranas plasmáticas, sabe-se que seus heterosídeos, as saponinas triterpênicas, possuem grande afinidade por esteroides, e a presença de uma porção polar que não interage com a membrana, favorece a formação de poros na mesma (MOSES et al., 2014).

Adicionalmente, no tratamento do segundo estágio da tripanosomíase africana, onde é necessário que o fármaco seja capaz de adentrar a barreira hematoencefálica (FIELD et al., 2017), a lipofilicidade dos triterpenos pode ser uma vantagem (BANKS, 2009). Alguns trabalhos mostram que triterpenos possuem diferentes ações sobre o sistema nervoso central (PARMAR et al., 2013).

Existem poucos estudos acerca do mecanismo da atividade antibacteriana de triterpenos do grupo oleanano e ursano, provavelmente porque não é considerada forte. Alguns estudos que sugerem que eles atuam por interações com os componentes lipídicos da membrana, perturbando sua estrutura (SAVOIA, 2012). Já foi demonstrado que oleananos e ursanos podem alterar a morfologia celular e induzir lise em bactérias (WOLSKA et al., 2010), e também interferir na síntese de peptidoglicano (JESUS et al., 2015).

Também já foi demonstrado que triterpenos podem atuar sinergicamente com outros antibacterianos, diminuindo a sua concentração inibitória mínima (MIC) (CHUNG et al., 2011), o que pode ser um reflexo da sua interferência na estrutura das membranas. Existem trabalhos que mostram que modificações estruturais na posição 3, especialmente esterificações, podem propiciar um importante incremento na sua atividade antibacteriana (DÍAZ-RUIZ et al., 2012; MALLAVADHANI et al., 2004).

2.10. Propriedades farmacológicas de derivados semissintéticos de α e β -amirina

Os isômeros de posição α e β -amirina, de massa molar de 426,72 g/mol e fórmula molecular $C_{30}H_{50}O$ (Figura 16), são um dos mais ubíquos triterpenos na natureza, largamente encontrados em muitas famílias botânicas e em diversas partes dos vegetais. No gênero *Byrsonima*, esses isômeros e alguns derivados foram isolados em cinco das onze espécies que foram objeto de algum estudo fitoquímico (GUILHON-SIMPLICIO; PEREIRA, 2011).

Sabe-se que esses triterpenos apresentam atividade antitumoral, anti-inflamatória, analgésica, antiplaquetária e antimicrobiana, de moderada ou fraca potência, que diferentes autores atribuem à ausência do grupo ácido na sua estrutura (ROKICKA; WOJCIAK-KOSIOR, 2015). Por outro lado, sua abundância na natureza tem motivado alguns trabalhos de semissíntese com esses compostos, buscando melhorar suas propriedades química e farmacológicas.

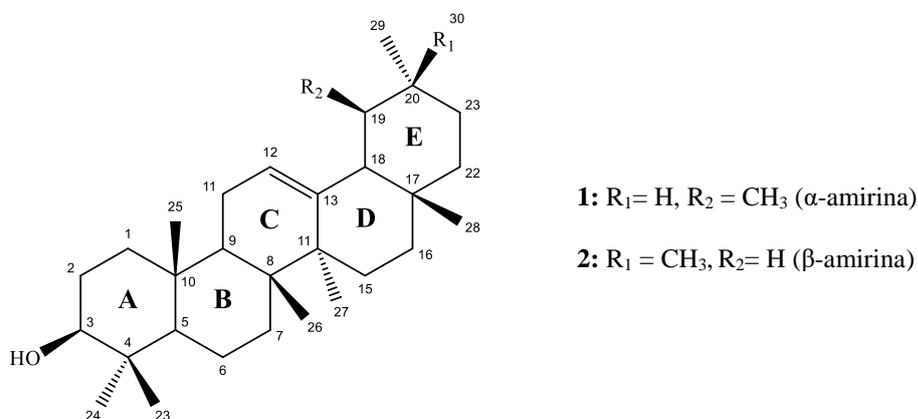


Figura 16. Estrutura dos triterpenos α e β -amirina e a numeração dos carbonos.

A maior parte dos derivados obtidos são ésteres em C3 onde se encontra uma hidroxila que tem seu hidrogênio facilmente substituído. Em menor número apresentam-se derivados oxigenados e híbridos. Esses derivados demonstraram atividade antinociceptiva (MARCON et al., 2009; SOLDI et al., 2008), antitumoral (BARROS et al., 2011), e também efeitos positivos no sistema nervoso central (ARAGÃO et al., 2006; ARAGÃO et al., 2009) e sobre o metabolismo de lipídios e carboidratos (NARENDER et al., 2009). Adicionalmente, essas

alterações estruturais simples podem incrementar o potencial antimicrobiano desses triterpenos, como já demonstraram alguns trabalhos.

Quanto à atividade antibacteriana, palmitato, octanoato e fenilacetato de α -amirina foram testados frente às bactérias cariogênicas *Streptococcus mutans*, *S. salivarius*, *S. sanguinis* e *S. oralis*. O fenilacetato de α -amirina foi a substância mais ativa, reduzindo a viabilidade celular de todas as cepas após 24 horas de exposição com todas as concentrações testadas (10 a 1000 $\mu\text{g/mL}$). Na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$, o composto reduziu a viabilidade de *S. mutans* a 9%, de *S. salivarius* a 12 %, de *S. sanguinis* a 48 % e de *S. oralis* a 1 % (DÍAZ-RUIZ et al., 2012).

Outro trabalho investigou a atividade antifúngica de doze derivados 3-*O*-acila e de três derivados oxigenados de α e β -amirina contra *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata*. Nesse trabalho, tanto a susceptibilidade dos micro-organismos quanto a capacidade de adesão a células epiteliais bucais foram avaliadas. Os derivados formiato e acetato inibiram todas as espécies de *Candida* testadas com concentrações entre 30 e 250 $\mu\text{g/mL}$, de forma semelhante a observada com os triterpenos não modificados. Formiato de α e β -amirina (60 $\mu\text{g/mL}$) inibiu a adesão das espécies de *Candida albicans* a células epiteliais bucais em 65,3 %, enquanto que fluconazol (1,95 $\mu\text{g/mL}$) e anfotericina B (0,25 $\mu\text{g/mL}$) diminuíram a adesão em 63,5 % e 93,4 %, respectivamente (JOHANN et al., 2007).

Os triterpenos α e β -amirina já demonstraram afinidade pela CYP51 de *Leishmania infantum* (OGUNGBE; SETZER, 2013), e diferentes ésteres graxos de β -amirina (beenato, eicosanoato, estearato, linoneato e palmitato) mostram ser seletivos para CYP51 de *Trypanosoma cruzi* (WARFIELD et al., 2014), em estudos de *docking*, o que sugere potencial antiparasitário para esses triterpenos e seus derivados.

2.11. Ciclodextrinas

Vários autores concordam que a lipofilicidade é a característica físico-química mais crítica para a ação dos fármacos. No processo de otimização de drogas, a afinidade é frequentemente potencializada pela introdução de grupos lipofílicos, que aumentam a interação global com o alvo, a despeito de interações específicas (SCHULTES et al., 2010). Na medida em que a afinidade é um dos critérios primordiais para a seleção de drogas por HTS, as últimas patentes da indústria farmacêutica são de moléculas maiores e mais lipossolúveis que aquelas em uso corrente (HOPKINS et al., 2014).

Além dos óbvios efeitos negativos na farmacocinética da droga, a lipofilicidade também pode contribuir para a toxicidade da molécula, dado que aumenta sua inespecificidade. Tais características são algumas das principais razões para o fracasso de drogas lipofílicas em estudos pré-clínicos e clínicos (BAYLISS et al., 2016). Por outro lado, a alta lipofilicidade não pode ser um critério decisivo sobre a potencialidade de uma nova substância, desde que muitas características físico-químicas podem ser favoravelmente modificadas por corretos programas de otimização. Essa é uma perspectiva especialmente importante na busca de novos antimicrobianos que, em geral frequentemente não partilham dos mesmos requerimentos estruturais dos fármacos que atuam sobre receptores endógenos (LEESON, 2016).

Face a necessidade de “resgatar” drogas farmacologicamente promissoras, mas com lipofilicidade acima do desejado, várias tecnologias têm sido desenvolvidas, contexto no qual as ciclodextrinas (CD), tem sido uma das opções mais estudadas. Esses compostos são oligossacarídeos cíclicos formados de unidades de dextrose. Existem três tipos principais de CD, α , β e γ , com 6, 7 e 8 unidades de dextrose, respectivamente. A β -ciclodextrina (β CD) é a variedade mais barata e mais utilizada, e a partir dela novos derivados foram desenvolvidos para melhorar a sua capacidade de inclusão e segurança para uso farmacológico,

nomeadamente, hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β CD) e sulfobutiléter- β -ciclodextrina (SBE- β CD) (KALEPU; NEKKANTI, 2015).

Todas as β -ciclodextrinas apresentam uma estrutura cônica oca, com um interior hidrofóbico e um exterior hidrofílico, devido a orientação específica dos resíduos de açúcar (Figura 17). Devido a sua estrutura, essas ciclodextrinas são capazes de formar complexos de inclusão 1:1 (mais comumente) não específico com diversas moléculas lipossolúveis, sob a única condição de que os substratos se encaixem no interior de sua estrutura, ainda que parcialmente (STELLA; HE, 2008). A estabilidade da complexação se dá por efeitos hidrofóbicos e forças de dispersão de London (VENTURINI et al., 2008).

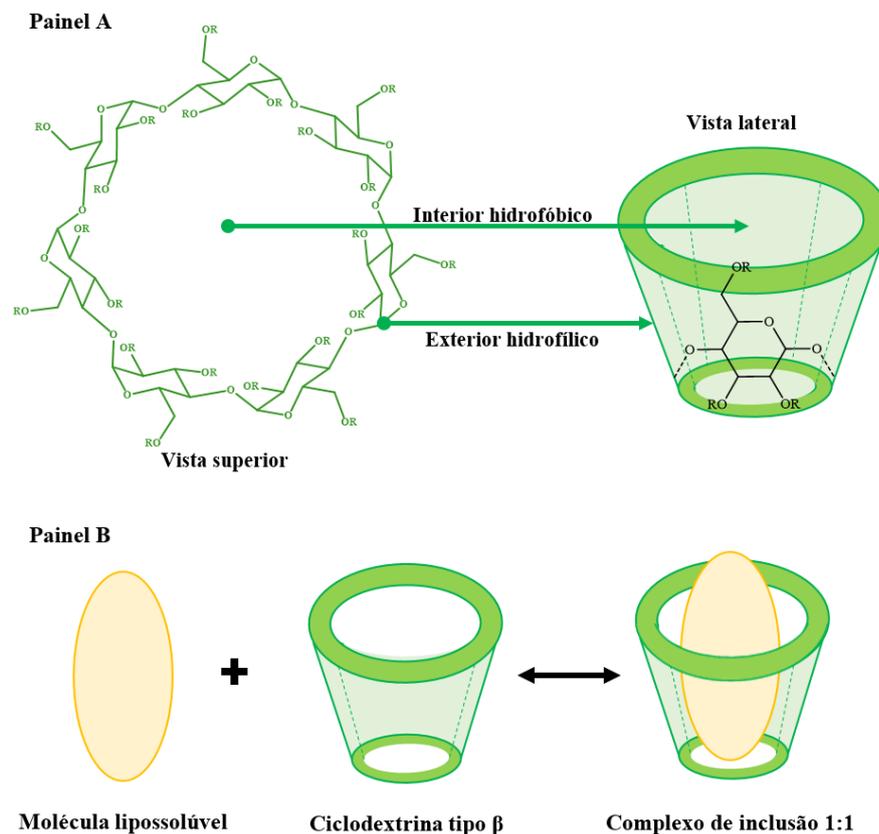


Figura 17. Estrutura da β -ciclodextrina e derivados. Painel A: R = H (β CD), R = $\text{CH}_2\text{CHOHCH}_3$ ou H (HP- β CD), R = $(\text{CH}_2)_4\text{SO}_3\text{Na}$ ou H (SBE- β CD). Painel B: representação dos complexos de inclusão formados entre moléculas hidrofóbicas e ciclodextrinas do tipo β .

Normalmente, a droga apresenta uma afinidade maior pelo seu alvo que pela ciclodextrina, e esse é o principal fator que governa a liberação da molécula do interior do

complexo. Assim, na maioria dos casos, a obtenção de complexos de inclusão com ciclodextrinas altera propriedades físico-químicas do fármaco, sem alterar sua atividade, o que as torna umas das alternativas mais interessantes para o melhoramento da solubilidade de drogas lipofílicas (KURKOV; LOFTSSON, 2013).

As ciclodextrinas não são capazes de difundir em membranas plasmáticas devido a sua estrutura, massa molecular e baixo logaritmo do coeficiente de partição óleo/água ($\text{Log } P$), o que é uma vantagem em termos de toxicidade. As β -ciclodextrinas não podem ser hidrolisadas pela saliva humana, embora estejam sujeitas à fermentação pela flora intestinal. Essas características tornam as β -ciclodextrinas bastante toleráveis pela via oral, sendo consideradas isentas de toxicidade por essa via. Adicionalmente, seus derivados mais hidrofílicos (HP- β CD, SBE- β CD) também são bem tolerados pela via parenteral, embora a β -ciclodextrina apresente nefrotoxicidade por essa via (RASHEED et al., 2008).

As ciclodextrinas conseguem proteger os fármacos de condições ambientais ou fisiológicas potencialmente degradantes, tais como pH, oxidações e ação de enzimas metabolizadoras, o que pode diminuir a quantidade necessária na administração para produzir o efeito esperado. Além disso, podem mascarar características físico-químicas desagradáveis como odor e sabor, modular a taxa de entrega do fármaco, podendo ainda inibir possíveis efeitos irritantes e tóxicos da molécula complexada (PINHO et al., 2014). Um estudo comparativo entre β CD, e solventes comumente usados para a dissolução de amostras para testes *in vitro*, etanol e dimetilsulfóxido (DMSO), mostrou que o uso de β CD produziu mínimos efeitos na produção de interleucina 6 e de ERO em diferentes culturas celulares (TIMM et al., 2013).

Por todas essas vantagens, a complexação de produtos naturais farmacologicamente ativos com CD tem sido uma das alternativas mais estudadas para os problemas de solubilidade e biodisponibilidade desses compostos, com vários exemplos animadores (SUVARNA et al., 2017). Particularmente, complexos com triterpenos tem sido investigados como uma forma de

melhorar a solubilidade de água desses compostos, um dos maiores entraves na utilização terapêutica dessa interessante classe de produtos naturais (LIMA et al., 2016). Como exemplos, um recente trabalho mostrou que a complexação com CD melhorou o potencial antitumoral da mistura de ácido ursólico e oleanólico (OPREAN et al., 2016) e outros estudos relataram aumento do potencial citotóxico do ácido betulínico (SOICA et al., 2014a) e da seletividade da betulina (HERTRAMPF et al., 2012) sobre diferentes linhagens tumorais, após a complexação.

Mesmo fármacos já em uso clínico têm se beneficiado da inclusão em CD para o melhoramento de algumas de suas propriedades. Estudos pré-clínicos mostraram que complexos de diferentes CD e melarsoprol propiciam a sua administração por via oral, sendo ativos no sistema nervoso central sem sinais evidentes de toxicidade, em camundongos infectados por *T. brucei* (KENNEDY, 2013). Outros fármacos da terapêutica atual já são disponibilizados comercialmente na forma de complexos com β -ciclodextrinas, em variadas formas de apresentação, com o objetivo de obter características físico-químicas e até farmacológicas mais favoráveis (Quadro 6).

Quadro 6. Exemplos de medicamentos contendo complexos com β -ciclodextrinas

Ciclodextrina	Fármaco	Indicação	Formulação
β -ciclodextrina	Benexato	Antiulcerogênico	Cápsulas
	Cefalosporina	Antibiótico	Comprimido
	Cetirizina	Antialérgico	Comprimido mastigável
	Cisaprida	Estimulante gastrointestinal	Supositório
	Clordiazepóxido	Ansiolítico	Comprimido
	Dexametasona	Anti-inflamatório	Creme
	Dextrometorfano	Antitussígeno	Solução oral
	Nimesulida	Anti-inflamatório	Sachê oral
	Omeprazol	Antiulcerogênico	Comprimido
	PGE ₂	Indutor de parto	Comprimido/sublingual
	Piroxicam	Anti-inflamatório	Comprimido/sachê/supositório
Hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β CD)	Indometacina	Anti-inflamatório	Colírio
	Itraconazol	Antifúngico	Comprimido
	Mitomomicina	Antineoplásico	Solução parenteral
Sulfobutiléter- β -ciclodextrina (SBE- β CD)	Vorizonazol	Antimicótico	Solução parenteral
	Ziprasidona	Antipsicótico	Solução parenteral

Fonte: Da Cunha Filho; Sá-Barreto (2007).

3. BIOPROSPECÇÃO DOS EXTRATOS AQUOSOS

3.1. Metodologia

3.1.1. Obtenção e caracterização da matéria-prima vegetal e extratos

3.1.1.1. Coleta, identificação e pré-tratamento do material botânico

A coleta de amostras foi notificada ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade sob o registro 41553-1 (ANEXO A). Cascas do caule das espécies de *Byrsonima crispera*, *B. duckeana*, *B. garcibarrigae* e *B. incarnata* foram coletadas na Reserva Florestal Adolpho Ducke, em Manaus, Amazonas (Figura 18). As espécies foram identificadas por botânicos do Herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), no âmbito do Projeto “Flora da Reserva Ducke” onde as respectivas exsicatas foram depositadas sob os registros 1177, 1163, 691, 778. O material vegetal de *B. japurensis* já havia sido coletado, identificado e depositado sob o registro 224415 no mesmo herbário.

De forma idêntica a realizada no estudo anterior com *B. japurensis* (GUILHON-SIMPLICIO, 2009), após a coleta, as amostras foram levadas à estufa com circulação de ar em temperatura de 40-60 °C para secagem. As cascas secas foram então moídas em moinhos de facas e os pós conservado à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Para a caracterização da matéria-prima, os pós foram submetidos à análise granulométrica em tamisador, segundo o método da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010).



Figura 18. Fotografias dos espécimes coletadas na Reserva Florestal Adolpho Ducke, INPA. A: *Byrsonima crispera*. B: *Byrsonima duckeana*. C: *Byrsonima garcibarrigae*. D: *Byrsonima incarnata*.

3.1.1.2. Obtenção dos extratos brutos

No contexto do estudo comparativo pretendido, os extratos aquosos da casca do caule de *Byrsonima crisper*, *B. duckeana*, *B. garcibarrigae* e *B. incarnata* foram obtidos por infusão durante 15 minutos a 5 % de droga vegetal pulverizada, método idêntico ao utilizado no estudo anterior com *B. japurensis*, e que foi empregado com o intuito de mimetizar o uso popular da espécie.

Os extratos foram secados por aspersão em atomizador (*Spray dryer*) empregando 110-115 °C de temperatura de entrada, 78-83 °C, fluxo de alimentação da bomba peristáltica 0,6 L/h e fluxo de ar de 30-35 L/h, e conservados sob a temperatura de 8 ± 2 °C até a utilização. O rendimento foi calculado por meio de análise do resíduo seco, conforme descrito na Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010). Os extratos obtidos da forma descrita neste texto foram nomeados conforme o Quadro 7:

Quadro 7. Nomenclatura utilizada para identificação dos extratos de *Byrsonima* spp.

Código	Amostra
BCAE	Extrato aquoso da casca do caule de <i>Byrsonima crisper</i>
BDAE	Extrato aquoso da casca do caule de <i>Byrsonima duckeana</i>
BGAE	Extrato aquoso da casca do caule de <i>Byrsonima garcibarrigae</i>
BIAE	Extrato aquoso da casca do caule de <i>Byrsonima incarnata</i>
BJAE	Extrato aquoso da casca do caule de <i>Byrsonima japurensis</i>

3.1.1.3. Teor de fenóis totais

BCAE, BDAE, BGAE e BIAE foram analisados pelo método de Folin-Ciocalteu com pequenas modificações. Uma alíquota de 10 µL de cada uma das soluções das amostras e do padrão ácido gálico a 1 mg/mL em etanol foi transferida em triplicata para uma placa de 96 poços. Em seguida, foram adicionados 50 µL solução de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) preparada na proporção 1:10 em água destilada, e então a placa foi incubada em temperatura ambiente por 8 minutos. Ao final, foram adicionados 240 µL de carbonato de sódio 0,4% e a placa foi novamente incubada por mais 3 minutos. A absorbância foi medida a 620

nm usando um espectrofotômetro. A quantidade de fenóis foi expressa em equivalente de ácido gálico por grama de amostra (GUILHON-SIMPLICIO et al., 2013).

3.1.1.4. *Teor de flavonoides totais*

Inicialmente, BCAE, BDAE, BGAE e BIAE foram diluídos a 1 mg/mL em etanol, então 30 µL dessas soluções foram transferidos para uma placa de 96 poços, em triplicata. À mesma placa foram transferidos 30 µL de uma solução de quercetina a 1 mg/mL em etanol 80%, padrão da análise. Depois disso foram adicionados 90 µL de etanol 95 %, 6 µL de cloreto de alumínio a 10 %, 6 µL de acetato de potássio 1 M e 168 µL de água destilada em cada poço. A placa foi incubada por 30 minutos em temperatura ambiente e a absorbância foi medida a 405 nm em um espectrofotômetro. A quantidade de flavonoides foi expressa em equivalente de quercetina por grama de amostra (GUILHON-SIMPLICIO et al., 2013).

3.1.1.5. *Prospecção fitoquímica*

Uma amostra de 500 mg dos extratos secos por aspensão foi diluída em 50 mL de água destilada, e então realizou-se a investigação de alcaloides, antraquinonas, cumarinas, esteroides e triterpenos, flavonoides (antocianinas, antocianidinas, catequinas e leucoantocianidinas, chalconas e auronas, flavanonas, flavonas, flavonóis e xantonas), heterosídeos cardioativos, heterosídeos cianogénicos, saponinas e taninos, segundo as técnicas de Matos (1997) e Costa (2001).

3.1.1.6. *Caracterização fitoquímica dos extratos*

Os compostos fenólicos dos extratos foram identificados por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas em *tandem* com ionização por eletronebulização (UHPLC-ESI-MS/MS), utilizando um cromatógrafo líquido acoplado a um

espectrômetro de massa com um analisador de massa do tipo triplo quadrupolo (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA). Em seguida, os dados espectrais obtidos foram interpretados manualmente por comparação com dados da literatura.

As separações cromatográficas foram realizadas em uma coluna de Kinetex C18 de 30 X 4,6 mm, com partículas de 2,6 μm e tamanho de poro de 100 Å (Phenomenex, Torrance, EUA), utilizando uma fase móvel binária. O solvente A foi água ultrapura e o solvente B foi metanol. Uma eluição em gradiente a 28 °C foi realizada como se segue: 0-3 minutos, 58 % B; 3-7 minutos, 58-100 % a um fluxo de 0,4 mL / minutos. A temperatura do auto-amostrador foi mantida a 15 °C e o volume de injeção foi de 2 μL .

A ionização ocorreu por eletropulverização em modo negativo. Os espectros de massa foram adquiridos em m/z de 50 a 1000, e os espectros de massa em *tandem* realizados por dissociação induzida por colisão de íons precursores previamente isolados no sistema triplo quadrupolo. Utilizou-se argônio como gás de colisão. Os parâmetros de ionização foram: tensão capilar -4,5 kV, tensão do cone 5 V, gás de bainha 25 arb, gás auxiliar 5 arb. As energias de colisão foram aplicadas como uma rampa crescente de 2 a 50 eV.

3.1.2. Avaliação do potencial farmacológico por ensaios químicos, *in vitro* e *in silico*

3.1.2.1. Ensaio do DPPH•

Inicialmente, a absorvância da solução de DPPH• foi ajustada para 1,0 por meio de diluições com etanol a 50% seguidas de medidas de absorvância no comprimento de onda de 517 nm, o mesmo para todo o teste. Foram distribuídas alíquotas de 250,0 μL das diluições dos extratos em triplicata em microplaca, e as absorvâncias foram medidas. Essa leitura constituiu o branco nos cálculos. Em seguida, foram acrescentados 100,0 μL da solução de DPPH• em todos os poços com extrato. Após 30 minutos de incubação no escuro e à temperatura ambiente, as absorvâncias foram novamente medidas. O controle negativo foi etanol a 50 % e o controle

positivo foi a quercetina, também incubados nas mesmas condições, em triplicata. A atividade antioxidante foi calculada em relação ao controle negativo e apresentada como concentração inibitória média (concentração que inibe 50% da atividade, CI_{50}) (GUILHON-SIMPLICIO et al., 2013).

3.1.2.2. *Ensaio do ABTS^{•+}*

Primeiramente, fez-se uma diluição a 40% da solução de ABTS^{•+} recém-preparada, com água Mili-Q. Alíquotas de 250,0 μ L das diluições dos extratos foram distribuídas em triplicata em microplaca e as absorvâncias foram medidas no comprimento de onda de 734 nm. Essa leitura constituiu o branco nos cálculos. Em seguida, foram acrescentados 100,0 μ L da solução de ABTS^{•+} em todos os poços com extrato. Após 15 minutos de incubação no escuro e à temperatura ambiente, as absorvâncias foram novamente medidas. O controle negativo foi etanol a 50 % e o controle positivo foi a quercetina, também incubados nas mesmas condições, em triplicata. A atividade antioxidante foi calculada em relação ao controle negativo e apresentada como CI_{50} (GUILHON-SIMPLICIO et al., 2013).

3.1.2.3. *Ensaio do radical superóxido*

Alíquotas de 50,0 μ L das diluições dos extratos foram distribuídas em triplicata em microplaca, às quais foram acrescentados 100,0 μ L da solução de azul de nitrotetrazólio e 100,0 μ L da solução de nicotinamida adenina dinucleotídeo, nesta ordem. A absorvância foi medida no comprimento de onda de 560 nm, e os valores obtidos constituíram o branco nos cálculos. Em seguida foram adicionados 100,0 μ L da solução de metassulfato de fenazina em todos os poços com extratos, deixando-se a microplaca sob incubação no escuro e à temperatura ambiente por cinco minutos. Após esse tempo, a absorvância foi medida novamente no mesmo comprimento de onda. O controle negativo foi etanol a 50 % e o controle positivo foi ácido

gálico, também incubados nas mesmas condições, em triplicata. A atividade antioxidante foi calculada em relação ao controle negativo e apresentada como CI_{50} (GUILHON-SIMPLICIO et al., 2012).

3.1.2.4. *Inibição da lipoxigenase*

No teste de inibição da lipoxigenase, o sistema contendo todos os extratos nas concentrações de 50 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$, 12,5 $\mu\text{g/mL}$, 6,25 $\mu\text{g/mL}$ e 3,125 $\mu\text{g/mL}$, o ácido linoleico a 20 μM e a enzima lipoxigenase (100.000 U/mL) foram incubados a temperatura ambiente em pH 8,0. Após 3 minutos, fez-se a leitura da absorbância a 234 nm. O percentual de inibição da lipoxigenase *in vitro* foi calculado em relação ao controle negativo.

3.1.2.5. *Viabilidade celular /citotoxicidade*

Fibroblastos murinos 3T3L1 foram cultivados na concentração de 5×10^3 células/poço em placas de 96 poços. Após 24 horas de incubação e aderência das células, as mesmas foram tratadas com os extratos em diferentes concentrações (50, 25, 12,5 e 6,25 μM). Como controle positivo utilizou-se a Doxorrubicina (5 $\mu\text{g/mL}$), e como controle negativo, o meio de cultura. Após o período de 24 horas, adicionou-se 10 μL da solução de Alamar Blue [resazurina 0,4% em tampão fosfato salino pH 7,4]. Após duas horas a 37 °C, realizou-se a leitura da fluorescência (excitação de 545 nm e emissão de 595 nm), que foi usada como parâmetro de viabilidade celular (células viáveis conseguem reduzir a resazurina, que apresenta coloração azul, a resorufina, que apresenta a coloração rosa). (NAKAYAMA et al., 1997).

3.1.2.6. *Liberação de NO^* por macrófagos ativados*

Os macrófagos murinos J774 foram plaqueados na densidade 1×10^6 células/mL em placas de 96 poços seguindo-se adesão por 24 horas a 37 °C, em 5 % de CO_2 . Após aderência,

o meio foi retirado e adicionado o meio de cultivo RPMI 1640 com 1 % de soro fetal bovino com volume de 100 μL /poço. As células foram estimuladas pela adição de lipopolissacarídeo (LPS) e tratadas juntamente com os extratos e fases nas concentrações de 50, 25, 12,5 e 6,25 $\mu\text{g/mL}$, em quadruplicata. Como controle negativo utilizou-se somente o meio de cultura. Em seguida, as células foram incubadas por 24 horas a 37 °C, 5 % de CO_2 , e o sobrenadante celular foi coletado para a análise de nitrito.

Para a determinação da produção de NO^\bullet , 100 μL do sobrenadante celular foi submetido à reação com igual volume do reagente de Griess, que foi preparado utilizando soluções estoques de cloreto de naftiletlenodiamina (0,1%) dissolvido em ácido fosfórico 5% e de sulfanilamida a 1% dissolvida em ácido fosfórico 5%, que foram adicionadas na proporção 1:1. Após o período de incubação de 10 minutos, fez-se a leitura da absorvância a 560 nm. O cálculo das concentrações de NO^\bullet foi feito indiretamente por medição do NO_2^\bullet (forma oxidada do NO^\bullet , mais estável) presente no sobrenadante, com base em curvas-padrão utilizando diferentes concentrações de nitrato de sódio (15 μM até 1000 μM) (VERMA et al., 2012).

3.1.2.7. *Ancoragem molecular*

Para investigar uma possível interação dos compostos identificados nos extratos com os alvos enzimáticos de interesse neste estudo, realizou-se estudos de ancoragem empregando as estruturas cristalinas disponíveis no *Protein Data Bank* (PDB). Selecionou-se enzimas cocristalizadas com inibidores conhecidos, para realização da validação do teste por *redocking* e também para que eles servissem de controle positivo: ciclo-oxigenase-2 (PDB: 5F1A) 5-lipoxigenase (PDB: 3v99) e sintase do óxido nítrico indutível (PDB: 4CX7).

Moléculas de água, moléculas usadas na cristalização de proteínas e íons não necessários à atividade catalítica foram removidos no *software* Pymol (Schrödinger, Cambridge, EUA), e a carga parcial atômica da proteína foi calculada pelo método *Gasteiger*.

A estrutura química dos ligantes foram desenhadas em 3D com o programa ChemBioDraw Ultra 11.0 e foram submetidas à minimização energética pelo *Merck Molecular Force Field* (campo de força MMFF94). O *software* AutoDock 4.2 (The Scripps Research Institute, Jupiter, EUA) foi empregado para realizar as simulações e as análises dos acoplamentos, com os seguintes parâmetros, em sextuplicata (Quadro 8):

Quadro 8. Parâmetros utilizados na análise de ancoragem molecular

Parâmetros	Limites
Algoritmo	Lamarckiano
Indivíduos por população	150
Avaliações de energia	2.500.000
Número de gerações	27.000
Número de conformações (ligante)	10
Dimensões do <i>Grid</i>	60 × 60 × 60 Å
Espaçamento do <i>Grid</i>	0,375 Å

3.1.3. Avaliação da atividade farmacológica *in vivo*

3.1.3.1. Animais

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animais da Universidade Federal do Amazonas sob o protocolo 048/2011 (ANEXO B). Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*), variedade Swiss fêmeas pesando entre 30-40 gramas. Os camundongos foram alojados em gaiolas de polipropileno medindo 41 X 34 X 16 cm forradas com maravalha autoclavada contendo 15 animais, mantidos sob a temperatura de 22 ± 2 °C, controlada por condicionadores de ar, e iluminação em ciclos de 12 horas de claro / escuro. Ração balanceada e água filtrada foram disponibilizadas *ad libitum*. A ambientação no local dos experimentos e a alimentação retirada pelo menos uma hora antes dos testes, quando também foram reagrupados em grupos menores, pesados e marcados.

3.1.3.2. *Inibição da nocicepção e edema induzido por formalina*

Para este teste, foram utilizados oito animais para cada grupo (controle negativo, controle positivo, grupos-teste), os quais foram manipulados em subgrupos de quatro animais, em dias diferentes. Os animais receberam 20 μ L de solução de formalina (2,5 %, i.pl.) 60 minutos após a administração de BCAE, BDAE, BGAE e BIAE (300 mg/kg, i.g.). Posteriormente, os extratos mais ativos foram avaliados em doses complementares: 100 e 1000 mg/kg i.g. de BDAE e 30 e 100 mg/kg i.g. de BGAE.

Após a aplicação, os animais foram alocados individualmente em caixa de acrílico transparente medindo 13 X 13 X 8 cm, posicionada em frente a um espelho para ampliação dos ângulos de visualização (Figura 19). O tempo que cada animal passou lambendo ou mordendo a pata injetada foi medido em segundos, em duas fases: nos primeiros 5 minutos (fase neurogênica) e dos 15 aos 30 minutos (fase inflamatória) da injeção da solução de formalina. No início e no final do teste da formalina, os edemas gerados na pata dos animais foram medidos com um micrômetro digital (NUCCI, 2014). O controle negativo deste foi soro fisiológico e o controle positivo foi ácido acetilsalicílico (400 mg/kg, i.g.), também administrados por via intragástrica em diferentes grupos de animais.



Figura 19. Animais em observação durante o teste da formalina.

3.1.3.3. Inibição da nocicepção induzida por glutamato

Camundongos Swiss fêmeas foram pré-tratados com BJAe (30, 100 e 300 mg/kg, i.g.) e BGAE (30, 100 e 300 mg/kg, i.g.), 1 hora antes da injeção de 20 µL de uma solução de glutamato (20 µmol, pH 7,4, i.pl.). O grupo controle recebeu veículo pela via intragástrica (10 mL/kg, i.g.). Após a aplicação, os animais foram alocados individualmente em caixa de acrílico transparente medindo 13 X 13 X 8 cm, posicionada em frente a um espelho para ampliação dos ângulos de visualização. O tempo que cada animal passou lambendo ou mordendo a pata injetada foi cronometrado durante 15 minutos, e considerado como índice de nocicepção (BEIRITH et al., 2002).

3.1.4. Análise estatística

Os resultados provenientes da caracterização da matéria-prima, atividade antioxidante, e atividade de inibição da lipoxigenase estão apresentados como média ± desvio-padrão. Os resultados dos testes *in vitro* e *in vivo* de atividade farmacológica estão apresentados em gráficos representando a média (coluna) ± erro padrão da média (barra de erro T), elaborados no *software* GraphPad Prism[®] 6.01 (GraphPad Software, La Jolla, EUA). As médias foram comparadas por análise de variância (ANOVA), por meio do teste de Dunn's, considerando $p < 0,05$ como estatisticamente significativo.

3.2. Resultados e discussão

3.2.1. Obtenção e caracterização da matéria-prima e extratos

A análise do tamanho das partículas é fundamental para padronização da extração, pois a eficiência da mesma depende diretamente desse parâmetro. Quanto menor o tamanho da partícula, maior a superfície de contato do solvente com as células vegetais, de forma que diferentes tamanhos de partícula de um mesmo material vegetal, podem levar a diferentes

rendimentos nos processos de extração. A água é solvente atóxico que apresenta afinidade com diferentes grupos de metabólitos secundários vegetais, especialmente os mais polares. Para uma extração bem-sucedida de compostos fenólicos, o emprego de água ou misturas aquosas com outros solventes polares são uma opção barata e segura (XU et al., 2017).

Extratos aquosos são de difícil secagem à temperatura ambiente ou mesmo sob pressão reduzida, utilizando rotaevaporador, por exemplo, e um aumento no tempo de secagem aumenta o risco de degradação de componentes e contaminação microbiana. Sendo assim, escolheu-se a atomização em *Spray dryer* como método de secagem dos extratos, pois proporciona maior estabilidade físico-química do produto obtido e facilidade de derivação para outras formas farmacêuticas (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010).

Durante a secagem dos extratos, notou-se perda razoável de massa pelo próprio funcionamento do aparelho, impossibilitando o cálculo fidedigno do rendimento dos extratos pela diferença entre o resíduo livre de solvente e massa inicial de matéria-prima, como ocorre com extratos orgânicos. Por isso, neste trabalho, a determinação do teor de extrativos por meio de método gravimétrico foi tomado como o rendimento real dos extratos aquosos.

Visando uma caracterização química prévia dos extratos aquosos, também foi realizada a quantificação de fenóis e flavonoides. Esses parâmetros são um importante indicativo de atividade biológica, já que são extensos os relatos na literatura acerca do potencial farmacológico de compostos fenólicos, especialmente flavonoides (KUMAR; PANDEY, 2013). A tabela 1 mostra o tamanho médio das partículas, o teor de extrativos e a quantidade de fenóis e flavonoides totais em cada extrato aquoso, os quais foram obtidos por infusão por 15 minutos a 5 % de droga vegetal pulverizada, como descrito na seção 3.1.1.2.

Tabela 1. Caracterização físico-química dos extratos aquosos de *Byrsonima* spp.

Espécies	Partículas (μm)	Extrativos (g%)	Fenois (AG/100 g)*	Flavonoides (Q/g)**
<i>B. crispa</i>	250 \pm 0,23	10,70 \pm 0,12	164,57 \pm 1,83	3,40 \pm 1,47
<i>B. duckeana</i>	355 \pm 3,82	7,71 \pm 0,07	146,26 \pm 3,25	3,29 \pm 0,88
<i>B. garcibarrigae</i>	250 \pm 1,06	14,16 \pm 0,07	220,00 \pm 2,51	5,15 \pm 0,20
<i>B. incarnata</i>	425 \pm 0,08	9,70 \pm 0,12	251,75 \pm 0,93	14,46 \pm 0,59
<i>B. japurensis</i> [#]	318 \pm 1,65	10,61 \pm 0,12	506,90 \pm 3,64	2,38 \pm 0,15

Número de repetições = 3

[#]Resultados previamente publicados, inseridos na tabela para comparação

*AG/100 g: Equivalentes de ácido gálico por 100 g de amostra

**Q/g: Equivalentes de quercetina por grama de amostra

De acordo com os critérios da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010), o pó obtido das cascas de *B. crispa*, *B. duckeana* e *B. garcibarrigae* são classificados como semifinos, assim como do *B. japurensis*. Por sua vez, o pó de *B. incarnata* é moderadamente grosso. Ambas as classificações são consideradas adequadas para uma extração eficiente por métodos a frio ou a quente.

Para realizar o estudo comparativo com *B. japurensis*, empregou-se o método de infusão de 5% de droga vegetal para a preparação dos extratos brutos das outras espécies, uma vez que este é o método utilizado pela população amazônica para a preparação medicinal com o “sara-tudo”. O rendimento das extrações foi similar ao obtido com *B. japurensis* (10,61 \pm 0,12 g%), e coerente com o tamanho médio das partículas da matéria-prima vegetal. O teor de flavonoides nas espécies também foi similar ao de *B. japurensis*, com exceção de *B. incarnata*.

Houve diferença quanto ao teor de compostos fenólicos totais, visto que *B. japurensis* apresentou quantitativo significativamente superior em relação a outras espécies. No entanto, no estudo anterior com essa espécie, testes físico-químicos apontaram alto teor de taninos condensados, compostos polares de alto peso molecular (GUILHON-SIMPLICIO, 2009). *B. japurensis* é a única espécie coletada em região de várzea, sujeita a intenso estresse hídrico que, comprovadamente, aumenta o teor de taninos condensados nas plantas (AKULA; RAVISHANKAR, 2011), o qual justificaria as discrepâncias no teor de fenóis totais.

3.2.1.1. Prospecção fitoquímica

Os metabólitos secundários vegetais não estão relacionados ao crescimento, desenvolvimento ou reprodução dos vegetais, mas são essenciais para a sua adaptação ao ambiente e defesa contra diferentes agressores (DIAS et al., 2012). Essa função primordial foi reconhecida recentemente, pois durante muito tempo os metabólitos secundários foram considerados apenas produtos de excreção do metabolismo primário. Visto que sua produção depende das condições ambientais às quais a planta está submetida, os metabólitos secundários variam quali e quantitativamente de espécie para espécie (BRAZ-FILHO, 2010).

Nesse sentido, é importante uma investigação prévia dos grupos de compostos presentes em uma planta para validar a busca por determinadas propriedades terapêuticas, o que pode ser feito de forma rápida e barata por meio de testes baseados nas propriedades físico-químicas de cada classe de metabólitos, que podem ser identificadas por típicas mudanças de coloração e formação de precipitados nos extratos confrontados por reagentes específicos (SIMÕES et al., 2017). O quadro 9 mostra o resultado da prospecção fitoquímica realizada nas espécies de interesse deste estudo.

Quadro 9. Prospecção fitoquímica realizada com os extratos de *Byrsonima* spp.

Análises	<i>B. crispera</i>	<i>B. duckeana</i>	<i>B. garcibarrigae</i>	<i>B. incarnata</i>
Alcaloides^a	Negativo	Negativo*	Negativo	Negativo
Antocianinas e antocianidinas	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Antraquinonas^b	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Catequinas e leucoantocianidinas	Catequinas	Catequinas	Negativo	Catequinas
Chalconas e auronas	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Cumarinas	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Esteróis e triterpenos	Triterpenos	Triterpenos	Triterpenos	Triterpenos
Flavanonas	Inconclusivo	Inconclusivo	Inconclusivo	Inconclusivo
Flavonas, flavonóis e xantonas	Inconclusivo	Inconclusivo	Inconclusivo	Inconclusivo
Heterosídeos cardioativos^c	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Heterosídeos cianogenéticos	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Saponinas	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Taninos	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo

^aRealizou-se as reações de Dragendorff, Meyer, Hager e Bertrand (Costa, 2001).

^bPesquisou-se antraquinonas livres e heterosídeos (Costa, 2001).

^cPesquisou-se o núcleo esteroidal, fragmento glicosídico e anel lactona (Matos, 1997).

O perfil fitoquímico de BCAE, BDAE, BGAE e BIAE é semelhante ao encontrado em *B. japurensis* em trabalho anterior (GUILHON-SIMPLICIO, 2009). De forma geral, diferentes estudos científicos mostram que o gênero é altamente rico em diversas classes de flavonoides, triterpenos pentacíclicos e taninos (GUILHON-SIMPLICIO; PEREIRA, 2011). Por outro lado, alcaloides, antraquinonas, cumarinas e heterosídeos cianogénéticos ainda não foram relatados nas espécies de *Byrsonima* já investigadas em outros estudos científicos, assim como nas espécies deste estudo.

Durante o teste de prospecção para alcaloides foi observada turbidez em alguns tubos, que poderia sugerir a formação de precipitados, fenômeno confirmatório da presença de alcaloides. Em estudo paralelo realizado com as folhas de *B. duckeana* (VERDAM, 2014), também ocorreu precipitação sugestiva de alcaloides. Contudo, em todos os casos, testes posteriores não confirmaram a presença desses metabólitos.

A presença de heterosídeos cardioativos é bastante restrita na natureza. Embora a presença desses metabólitos já tenha sido sugerida em *Byrsonima* spp., em teste semelhante ao realizado neste trabalho (MEDINA et al., 2015), a avaliação deste resultado requer um pouco mais de atenção. Neste trabalho, dos três tubos testes usados na prospecção desses metabólitos, os tubos correspondentes ao núcleo esteroidal e ao resíduo de açúcar foram positivos, mas a presença de grupo lactona não foi confirmada no terceiro tubo, não sendo possível afirmar a ocorrência desses metabólitos nas espécies. Todavia, a presença de núcleo esteroidal ligado a um resíduo de açúcar sugere a presença de saponinas, que de fato foi confirmada no teste mais específico.

Os produtos naturais detectados na prospecção fitoquímica (flavonoides, triterpenos, saponinas e taninos), apresentam múltiplas propriedades farmacológicas descritas na literatura científica. Contudo, certamente, são os compostos fenólicos aqueles melhor investigados, e a eles são atribuídas, entre outras, atividade antioxidante e anti-inflamatória, de interesse neste

estudo (CONFORTI; MENICHINI, 2011). Sendo assim, na próxima etapa desta pesquisa procedeu-se a uma investigação mais acurada dos compostos fenólicos presentes nas espécies, visando a elucidação de estruturas.

3.2.1.2. *Estudo fitoquímico*

Com base nos diversos estudos sobre a atividade biológica de metabólitos secundários vegetais, têm sido visualizados dois grupos distintos: compostos altamente ativos e seletivos para determinados alvos terapêuticos, onde normalmente se situam os alcaloides, que ocorrem normalmente em menores quantidades e em menor frequência na natureza; e os compostos menos ativos, mas que atuam sobre uma extensa gama de alvos terapêuticos, onde se classificam os flavonoides, cumarinas, taninos, terpenoides, entre outros, amplamente distribuídos entre as diversas famílias vegetais (EFFERTH; KOCH, 2011).

Nesse contexto, ganha força o conceito da desreplicação, entendida como uma análise qualitativa prévia da composição química de extratos brutos, que surgiu da necessidade de se economizar tempo e recursos com o isolamento e identificação de substâncias a partir de extratos vegetais. Nesse caso, busca-se mais que um *fingerprint* da amostra, mas a identificação do maior número possível de substâncias presentes na mistura sem a necessidade dos tradicionais fracionamentos cromatográficos (FUNARI et al., 2013).

As técnicas atuais consistem no emprego plataformas hifenadas sofisticadas, normalmente compostas por um elemento de separação de alta eficiência acoplado a um detector com capacidade de varredura espectrométrica. Neste estudo foi utilizado um sistema UHPLC-ESI-MS/MS, conforme descrito no tópico 3.1.1.6. A figura 20 traz os cromatogramas obtidos e a m/z de cada fragmento, e a figura 21 traz as estruturas dos compostos identificados.

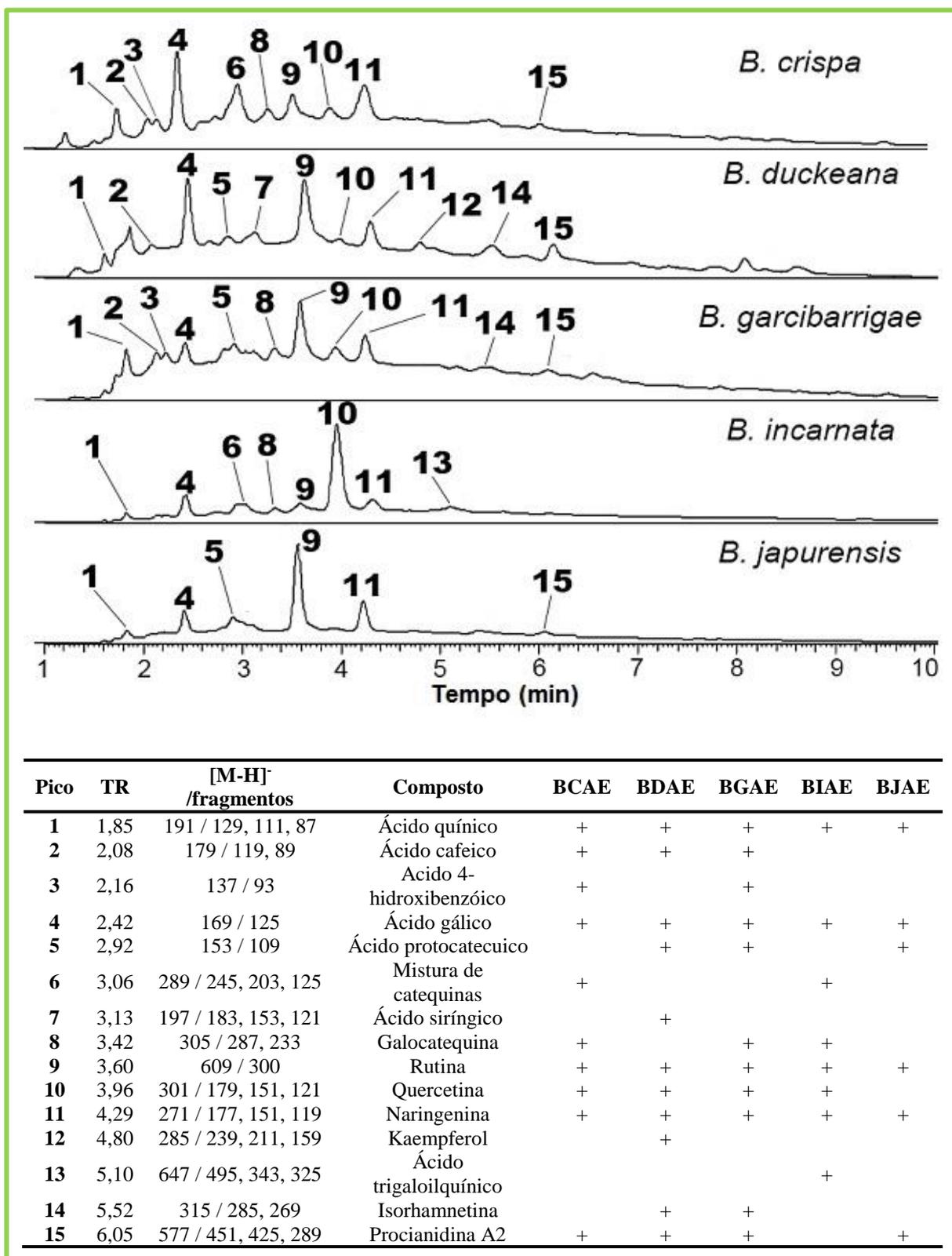


Figura 20. Cromatogramas e fragmentos de massa dos compostos identificados em *Byrsonima* spp.

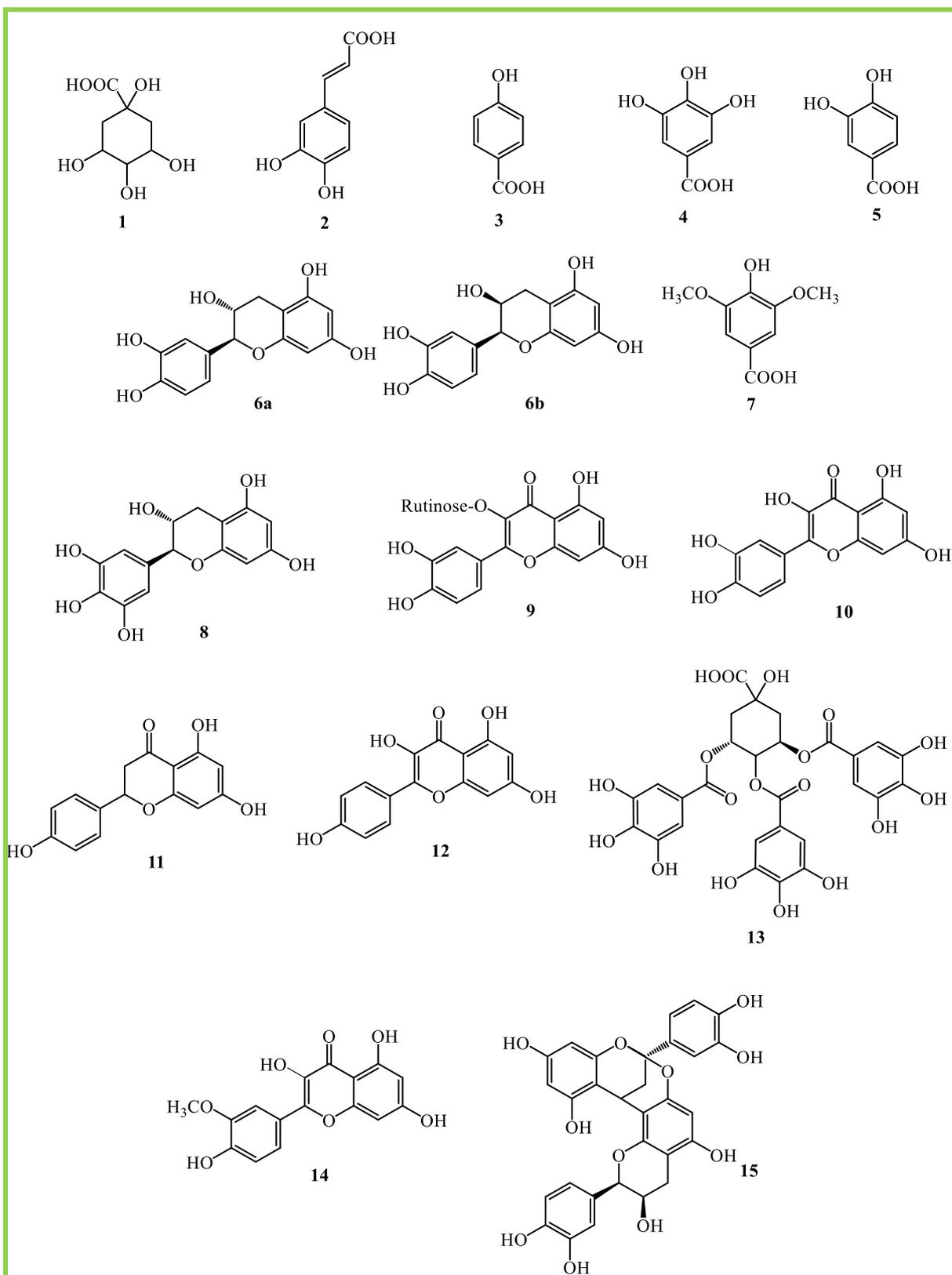


Figura 21. Estrutura dos compostos identificados na desreplicação dos extratos de *Byrsonima* spp.

Em muitos casos, essa análise é suficiente para a identificação dos principais componentes bioativos de extratos vegetais, sem a necessidade do emprego de diferentes solventes orgânicos e fases estacionárias. Portanto, esse é um tipo de abordagem fitoquímica atual e ambientalmente amigável.

Nesta Tese, as moléculas foram identificadas sem o uso de padrões das substâncias, somente por comparação com dados da literatura, método conhecido como “*tentative identification*”. É o tipo de identificação comumente feita em análises de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-MS), por exemplo, que são realizadas com base em comparações dos espectros obtidos com uma biblioteca internacionais de fragmentos, muitas vezes já disponíveis nos *softwares* dos equipamentos. Este tipo de identificação é reconhecido pela Sociedade Americana de Espectrometria de Massa e outras sociedades relacionadas. Nesses casos, admite-se que a identificação é confiável (com base em padrões de fragmentação), embora não seja indiscutível.

Observou-se que rutina, naringenina, ácido gálico e ácido quínico estão presentes em todas as espécies. Ácido gálico foi o composto majoritário em *B. crispa*; quercetina foi o composto majoritário em *B. incarnata*, o que pode explicar o alto teor em equivalentes de quercetina observado na seção 3.2.1; rutina foi o composto majoritário em *B. japurensis* e em *B. garcibarrigae*, sendo também detectado em grande quantidade em *B. duckeana*, juntamente com ácido gálico. Embora a estrutura dos taninos condensados não tenha sido elucidada pela técnica empregada, foi possível confirmar a ocorrência de flavonóis e flavanonas nas amostras, o que na prospecção fitoquímica impôs certa dificuldade, visto que se dava pelo aparecimento da coloração vermelha sob mudanças de pH, mesma cor das soluções dos extratos usadas nos testes.

Um estudo sugere que o ácido quínico pode aumentar os níveis de triptofano e nicotinamida *in vivo*, dois antioxidantes endógenos (PERO et al., 2008). O ácido cafeico

apresentou ação antioxidante concentração-dependente nos ensaios do DPPH• e do O₂• (NASR BOUZAIENE et al., 2015). Contudo, de forma geral, o ácido clorogênico, éster do ácido quínico e cafeico, tem sido melhor estudado que seus precursores (LIANG; KITTS, 2015). Por sua vez, ácido sirínico e ácido 4-hidroxi-benzoico já demonstraram ter ação inibitória sobre a peroxidação lipídica maior que BHA e BHT *in vitro*, e também apresentaram boa atividade antioxidante no ensaio do DPPH• e bom poder redutor e quelante de metais (SEVGI et al., 2015).

O ácido gálico é um ácido trifenólico com poderosa ação inibitória sobre a peroxidação lipídica, superior a TROLOX e ácido ascórbico. Ele é capaz de reduzir seis DPPH• por molécula. Tem capacidade de neutralizar espécies reativas de oxigênio (ERO) tais como H₂O₂ e HO•, mas não apresenta ação frente a O₂•. Seu principal mecanismo de ação é a doação de átomos de hidrogênio, pelo qual pode restaurar antioxidantes endógenos e lipídios que tenham sido oxidados (BADHANI et al., 2015). Por sua vez, o ácido trigaloilquínico apresenta ação contra O₂•, além de DPPH• e HO• e também inibe fortemente a peroxidação lipídica (BARATTO et al., 2003).

O ácido protocatecuico é um ácido fenólico de ampla distribuição na natureza. Sua atividade antioxidante concentração-dependente já foi demonstrada em diferentes modelos, incluindo os ensaios de varredura dos radicais DPPH•, ABTS^{•+} e O₂•. No modelo de inflamação induzida por carragenina, ele reduziu o edema e o granuloma relacionados. Adicionalmente, é um fraco inibidor da liberação de NO• e TNF- α por macrófagos ativados por LPS (KAKKAR; BAIS, 2014).

As catequinas são um grupo de diastereoisômeros de flavonol constituído de catequina, epicatequina, epigalotequina, galato de epicatequina e galato de epigalocatequina, dentre os quais a última é a mais abundante e melhor estudada. Esses compostos partilham uma estrutura básica que favorece a estabilização de radicais livres, e apresentam boa capacidade de quelar

metais, por isso são uns dos mais fortes antioxidantes naturais conhecidos (CHEN et al., 2016; FATHIMA; RAO, 2016). Galocatequina também apresenta capacidade antioxidante e de inibição da peroxidação lipídica, embora seja menos potente que a catequina (PLUMB et al., 2002).

Quercetina é possivelmente o mais bem estudados dos flavonoides. É um ubíquo flavonol que reúne todas as características estruturais de um forte antioxidante (PROCHÁZKOVÁ et al., 2011), sendo o mais potente neutralizador de radicais livres dessa classe de fitocompostos (BOOTS et al., 2008). *In vitro*, ela é capaz de inibir a inflamação desencadeada por macrófagos induzidos por LPS, especialmente por mecanismos relacionados a liberação de citocinas. Também é capaz e inibir a expressão da iNOS em macrófagos murinos de diferentes linhagens. É um bom inibidor da COX-1 e da 5-LOX. Tais efeitos foram confirmados *in vivo*, de forma dose-dependente (LI et al., 2016; TUÑÓN et al., 2009).

A rutina é considerada um bom antioxidante, exibindo efeitos biológicos semelhantes à da sua aglicona, quercetina, mas em uma concentração mais elevada (KOVAL'SKII et al., 2014). Foi demonstrada sua capacidade de inibição das enzimas COX-1, COX-2 e 15-LOX e de indução e recuperação de antioxidantes endógenos (GAUTAM et al., 2016). A isorhamnetina é um dos metabólitos da quercetina quando esta é administrada pela via oral. Foi demonstrado que ela é capaz de reduzir o edema na inflamação induzida por carragenina. Pode inibir o NF- κ B, que tem ação importante na iniciação do estresse oxidativo, e também inibe a COX-2 (SEO et al., 2016)

Naringenina é uma flavanona que reduz a resposta inflamatória desencadeada por diversos agentes, incluindo formalina, superóxido, carragenina e LPS. Nos dois últimos modelos, ficou evidenciado que seu mecanismo de ação se dá pela inibição da ativação de NF- κ B tendo, portanto, efeito sobre o estresse oxidativo. Além disso, inibe o recrutamento de leucócito, a liberação de $O_2^{\bullet-}$ e atua na indução de antioxidantes endógenos (MANCHOPE et

al., 2016). De um modo geral, flavanonas são capazes de inibir enzimas relacionadas a cascata do ácido araquidônico, incluindo fosfolipases, ciclo-oxigenases e lipoxigenases (BRETT et al., 2009).

Kaempferol é um flavonol que possui efeitos inibitórios diretos sobre a COX-1, COX-2 e 5-LOX (DEVI et al., 2015). Ele suprime a liberação de ROS por macrófagos ativados por LPS devido a sua capacidade de inibir a expressão da iNOS e COX-2 e aumentar a expressão de antioxidantes endógenos. Também inibe a ativação de NF- κ B em macrófagos ativados por LPS e é um potente inibidor do radical superóxido (RAJENDRAN et al., 2014).

Alguns estudos mostraram que procianidinas podem inibir a transcrição e a expressão da COX-2 em macrófagos ativados por LPS. Outros estudos sugerem que também podem atuar como inibidores competitivos dessa enzima. Também regulam a transcrição e secreção de citocinas pró-inflamatórias e a transcrição de iNOS, diminuindo a secreção de NO \bullet (MARTINEZ-MICAELO et al., 2012).

3.2.2. Avaliação do potencial farmacológico por ensaios químicos, *in vitro* e *in silico*

3.2.2.1. Atividade antioxidante

Ensaio químicos de atividade antioxidante são úteis para avaliação inicial do potencial de neutralização de radicais livres de diversas substâncias. Nesses ensaios é possível avaliar se as substâncias atuam por transferência de átomos de hidrogênio ou de elétrons. Nesse sentido, ensaios como o do DPPH \bullet (que avalia a capacidade de doação de átomos de hidrogênio), ABTS \bullet^+ (que avalia a capacidade de doação de elétrons e hidrogênio) são populares pela simplicidade, rapidez, reprodutibilidade e baixo custo (GÜLÇİN, 2012). Este estudo demonstrou claramente que os extratos aquosos da casca do caule das quatro espécies de *Byrsonima* têm elevada atividade antioxidante nos ensaios de varredura de radicais DPPH \bullet , ABTS \bullet^+ e O $_2$ \bullet (Tabela 2).

Tabela 2. Atividade antioxidante dos extratos de *Byrsonima* spp.

Amostras	DPPH•	ABTS•+	O ₂ •-
	Média da CI ₅₀ ± desvio-padrão em µg/mL		
<i>B. crista</i>	6,00 ± 0,30	5,74 ± 0,00	19,53 ± 1,56
<i>B. duckeana</i>	5,23 ± 0,21	4,22 ± 0,14	8,73 ± 0,32
<i>B. garcibarrigae</i>	7,77 ± 0,74	1,66 ± 0,01	10,37 ± 0,25
<i>B. incarnata</i>	5,23 ± 0,55	3,80 ± 0,18	8,60 ± 0,98
<i>B. japurensis</i> [#]	7,10 ± 0,40	4,20 ± 0,20	42,50 ± 1,30
Ácido gálico	NT	NT	16,90 ± 0,85
Quercetina	4,10 ± 0,80	2,80 ± 0,40	NT

NT: Não Testado. CI₅₀ = concentração inibitória a 50%. Número de repetições = 6.

[#]Resultados previamente publicados, inseridos na tabela para comparação

Os resultados dos testes de atividade antioxidante estão de acordo com as conhecidas propriedades antioxidantes dos compostos presentes nos extratos. As baixas CI₅₀ das amostras nos ensaios do DPPH• e ABTS•⁺, sugerem grande potencial antioxidante destas espécies. Adicionalmente, indica que estas amostras podem atuar doando elétrons ou hidrogênios, o que é compatível com o mecanismo de ação da atividade antioxidante de compostos fenólicos, que possuem uma estrutura que favorece a doação de um átomo de hidrogênio aos radicais livres, neutralizando a sua ação deletéria, e o radical fenólico produzido é estabilizado pelo seu sistema conjugado (LEOPOLDINI et al., 2011).

Os extratos foram capazes de neutralizar o superóxido gerado localmente, em baixas concentrações. No organismo humano, superóxido é uma das primeiras ERO liberadas no local da inflamação. Ele está envolvido na formação de ONOO⁻ por combinação com NO•. Dentre outros efeitos, ONOO⁻ está relacionado com a peroxidação lipídica, responsável pela manutenção e o agravamento de respostas inflamatórias agudas e crônicas (RADI, 2013). Diante destes fatos, diminuir a concentração de seus precursores pode ser apontada como uma estratégia válida para evitar seus efeitos danosos.

Os metabólitos identificados em *Byrsonima* spp. possuem efeitos biológicos semelhantes, por mecanismos de ação relacionados, notavelmente, por sua habilidade de neutralizar espécies oxidadas. Isso é um fator positivo para uma possível ação sinérgica desses

componentes no extrato. Além destes compostos principais, os outros polifenóis mais complexos presentes nas espécies *Byrsonima* e que não puderam ser identificados pela técnica espectrométrica empregada, podem ter atividades de eliminação de radicais, como proantocianidinas (ROLEIRA et al., 2015).

3.2.2.2. *Inibição da lipoxigenase*

Os extratos apresentaram ampla atividade de inibição da lipoxigenase, sugerindo um mecanismo de ação comum: BCAE ($28,87 \pm 0,72 \mu\text{g/mL}$); BDAE ($16,44 \pm 0,29 \mu\text{g/mL}$), BGAE ($11,22 \pm 0,08 \mu\text{g/mL}$), BIAE ($9,85 \pm 0,04 \mu\text{g/mL}$) e BJAe ($9,02 \pm 0,29 \mu\text{g/mL}$). A quercetina apresentou CI_{50} de $5,42 \pm 0,00 \mu\text{g/mL}$. Tal inespecificidade provavelmente está relacionada à atividade antioxidante das amostras, a qual todas compartilham (CAO et al., 1997; SCHNEIDER et al., 2007).

As LOX são as enzimas catalisadoras dos dois primeiros passos na biossíntese dos LT, importantes mediadores lipídicos da inflamação, e têm sido consideradas um alvo terapêutico alternativo ao bloqueio das ciclo-oxigenases, mecanismo pelo qual atua a maioria dos anti-inflamatórios. Já existem relatos na literatura sobre a capacidade de flavonoides, presentes em expressivas quantidades nas amostras estudadas, serem capazes de inibir a lipoxigenase por mecanismo antioxidante (NAPAGODA et al., 2014).

Por se tratarem de misturas complexas de substâncias, presumíveis diferenças nas afinidades dos compostos presentes nos extratos de *Byrsonima* pelos alvos terapêuticos podem implicar que alguns tenham ação mais crítica para as atividades biológicas observadas, enquanto outros atuem mais diretamente na recuperação dos primeiros. Esse fenômeno vem sendo discutido nos estudos mais recentes acerca dos efeitos biológicos de extratos vegetais (KANCHEVA; KASAIKINA, 2013).

3.2.2.3. Liberação de NO• por macrófagos ativados por LPS

Neste trabalho, a capacidade de neutralização do NO• foi avaliada pelo modelo do macrófago ativado por lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano, que mimetiza uma resposta inflamatória mediada por micro-organismo (CHOVATIYA; MEDZHITOV, 2014). Esse mesmo modelo tem sido usado para avaliar a ação (direta ou indireta) de amostras sobre a expressão e atividade da iNOS, principal responsável pela produção de NO• em macrófagos ativados (VERMA et al., 2012).

Previamente, foi verificado que nenhuma das amostras afeta a viabilidade celular da cultura de macrófagos (não são citotóxicas), de modo que os resultados observados podem ser completamente associados à atividade biológica das mesmas. Todas as amostras apresentaram forte capacidade de redução da concentração de nitrito no sobrenadante da cultura de macrófagos, especialmente BIAE, efeito que pode ser devido a sua ação varredora de radicais ou mesmo algum efeito direto sobre a iNOS (Figura 22).

De forma geral, todos os extratos contêm diferentes compostos fenólicos com atividade antioxidante *in vitro* previamente demonstrada. É sabido que a combinação de compostos antioxidantes favorece mecanismos sinérgicos que favorece a maior atividade da mistura (FOTI, 2007). Corroborando com essa observação, as espécies mais ativas apresentam quercetina na sua composição química, sugerindo que o forte efeito antioxidante desse flavonol, o maior entre os compostos fenólicos conhecidos, está se somando ao efeito antioxidante dos outros componentes da mistura. Outrossim, alguns compostos presentes nos extratos apresentam capacidade de modulação da iNOS previamente demonstrada, conforme comentado na seção 3.2.1.2, corroborando para uma possível ação desses extratos sobre essa enzima.

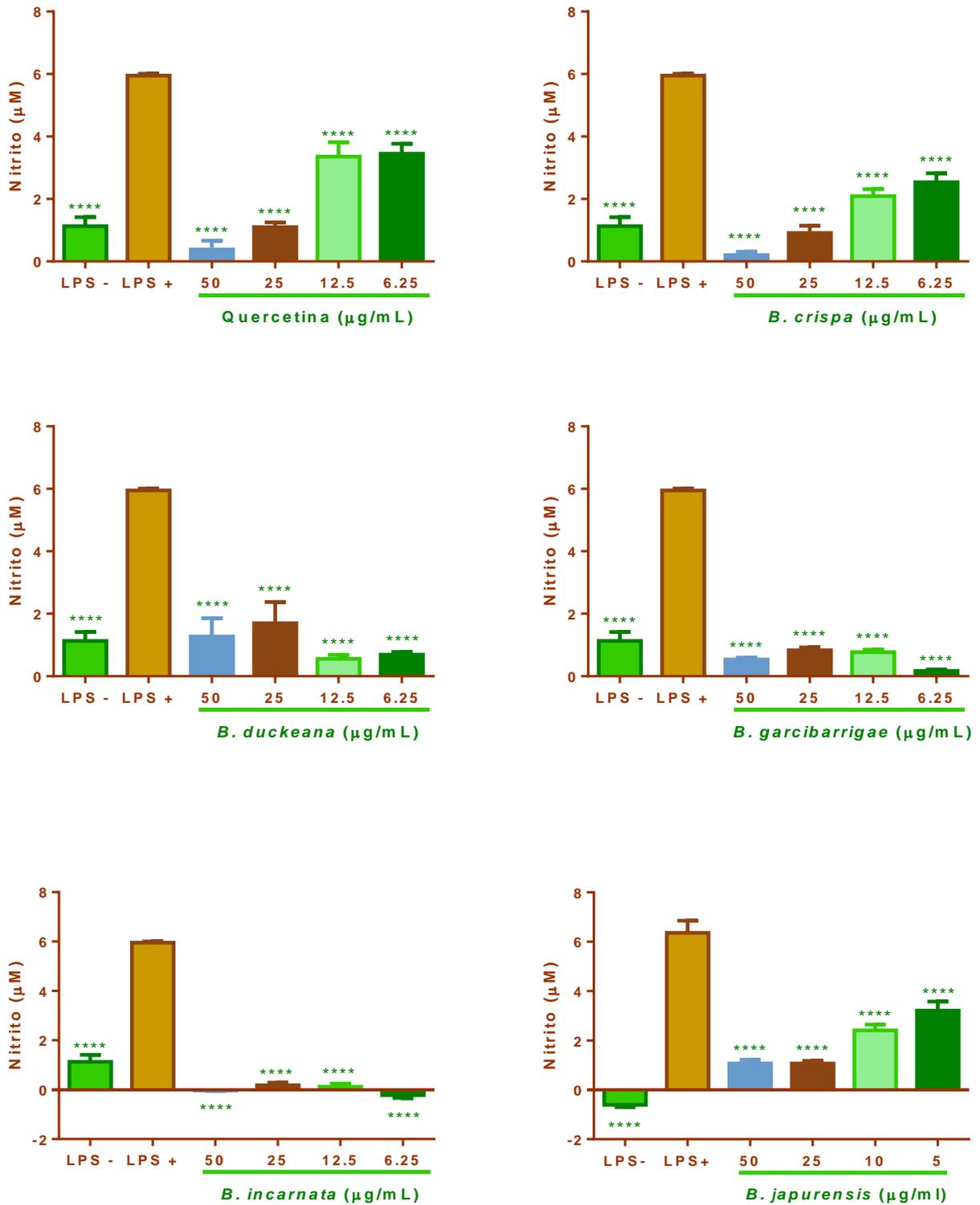


Figura 22. Efeito de *Byrsonima* spp. na produção de NO^{*} por macrófagos ativado por LPS. Número de repetições = 3. Valor de *p* versus controle negativo *****p* < 0,0001.

3.2.2.4. *Ancoragem molecular*

Os ensaios de inibição da lipoxigenase e o do macrófago ativado por LPS são colorimétricos, e avaliam indiretamente a ação sobre enzimas, por medida da intensidade de cor gerada pelos seus metabólitos. Portanto, eles podem indicar somente que os extratos, dada a sua forte atividade antioxidante previamente demonstrada, estão atuando como varredores de radicais. Mesmo nos ensaios *in vivo*, não é possível avaliar a ação das amostras sobre alvos enzimáticos específicos, apenas observar o resultado global do seu mecanismo de ação.

Observando que a inibição enzimática é um mecanismo plausível, dada a forte presença de compostos fenólicos nos extratos, realizou-se a análise de *docking* (ancoragem, docagem) molecular entre os compostos identificados e as enzimas estudadas. Por meio desta análise foi possível avaliar se, além do mecanismo de varredura dos radicais, as amostras podem ter ação direta sobre as mesmas, em seus sítios ativos, através da predição da estrutura mais favorável entre o ligante e a proteína e análise da sua afinidade (DU et al., 2016).

Nessa análise foi utilizado o AutoDock, que é um programa gratuito que tem sido usado com sucesso na predição de modos de ligação entre micro e macromoléculas. Ele utiliza um algoritmo genético (Lamarckiano) como método de busca conformacional, que consiste na geração de uma população de indivíduos onde cada um representa um possível modo de ligação (conformação e orientação) do ligante com a proteína, ou seja, uma solução (MORRIS et al., 1998).

As soluções são classificadas pela energia livre de ligação, que é a soma das energias das interações de Van der Waals, energias eletrostáticas e das energias das ligações de hidrogênio complexo ligante-proteína e pela energia intramolecular do ligante. Quanto mais negativa é a energia, mais estável é o complexo e maior é a afinidade do ligante pela proteína (VAQUE et al., 2008). As de melhor pontuação são submetidas a processos de recombinação e mutação para gerar novas e melhores soluções. Ao final do processo as soluções semelhantes

são agrupadas em conjuntos (clusters) e os conjuntos são ordenados de acordo com energia de cada grupo.

Neste trabalho, utilizou-se a análise de *docking* para avaliar as diferenças entre as afinidades de cada composto identificado nos extratos pelas enzimas de interesse: ciclo-oxigenase-2 (COX-2), 5-lipoxigenase, e sintase do óxido nítrico indutível (iNOS). Os sítios ativos foram localizados pela análise da região de interação dos ligantes cocrystalizados, que também foram utilizados para a validação dos experimentos por *redocking*. Foram realizadas seis repetições de cada análise e foi avaliada a média de energia do cluster com maior número de conformações para decidir as interações de maior afinidade.

Como esperado, todas as moléculas analisadas apresentaram algum grau de afinidade com as enzimas analisadas, sendo os flavonoides em geral, mais ativos. A naringenina foi o composto que apresentou maior afinidade (menor energia de ligação) pela COX-2 entre os compostos fenólicos de todos os extratos, inclusive frente ao ácido salicílico, um conhecido inibidor da enzima. Para as enzimas 5-LOX e iNOS, a procianidina A apresentou maior afinidade. A afinidade com a iNOS não foi melhor que a do inibidor sintético cocrystalizado (S71), por outro lado, apresentou afinidade bem maior para LOX que o ligante endógeno ácido araquidônico, sugerindo que pode atuar como inibidor competitivo (Tabela 3). A Figura 23 traz o modo de interação predito entre as enzimas estudadas e os compostos fenólicos de maior afinidade.

Sendo assim, há maior probabilidade desses compostos de maior afinidade atuarem diretamente sobre as enzimas, enquanto os demais componentes dos extratos atuam mais diretamente na neutralização das espécies reativas por elas geradas, e na redução/recuperação dos demais componentes oxidados, embora não sejam mecanismos mutuamente exclusivos. Observa-se que os compostos fenólicos fazem, normalmente, mais de uma ligação de hidrogênio no sítio ativo das enzimas, o que favorece a estabilidade do complexo formado.

Na verdade, de acordo com os preceitos da química medicinal, esse é o tipo de interação mais desejável entre fármacos e seus alvos terapêuticos, por ser relativamente fraca, mas suficientemente estável para garantir a adequada formação do complexo droga : receptor (NISHIO et al., 2014).

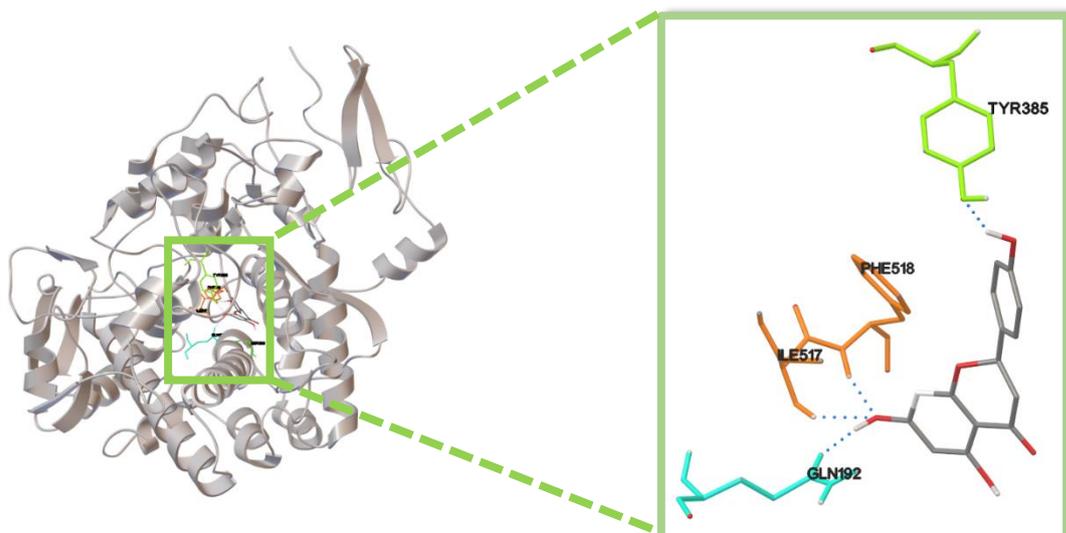
Tabela 3. Energia de interação entre os compostos fenólicos e as enzimas inflamatórias.

Compostos	Ciclo-oxigenase 2 (PDB: 5F1A)	Lipoxigenase (PDB: 3v99)	Sintase do Óxido Nítrico Indutível (PDB: 4CX7)
	Kcal/mol		
Ácido 4-hidroxibenzóico	-4,94 ± 0,07	-4,57 ± 0,04	-5,59 ± 0,06
Ácido cafeico	-5,59 ± 0,07	-4,64 ± 0,02	-4,91 ± 0,18
Ácido gálico	-4,07 ± 0,30	-3,80 ± 0,09	-5,77 ± 0,09
Ácido quínico	-2,79 ± 0,11	-3,71 ± 0,13	-2,96 ± 0,25
Ácido siríngico	-4,67 ± 0,02	-4,40 ± 0,07	-4,72 ± 0,16
Catequina	-7,36 ± 0,07	-6,66 ± 0,13	-8,20 ± 0,21
Epicatequina	-7,40 ± 0,05	-6,49 ± 0,18	-8,08 ± 0,10
Galocatequina	-8,57 ± 0,01	-6,42 ± 0,23	-8,47 ± 0,07
Isorhamnetina	-8,83 ± 0,05	-6,83 ± 0,38	-8,19 ± 0,10
Kaempferol	-8,63 ± 0,02	-7,28 ± 0,04	-8,10 ± 0,09
Naringenina	-9,34 ± 0,01	-7,62 ± 0,11	-8,86 ± 0,03
Procianidina A	-3,16 ± 0,04	-9,20 ± 0,13	-8,90 ± 0,03
Quercetina	-8,30 ± 0,09	-6,90 ± 0,32	-8,65 ± 0,13
Rutina	-5,38 ± 1,83	-5,03 ± 0,84	-6,95 ± 1,86
Ácido salicílico	-5,41 ± 0,03	-----	-----
Ácido araquidônico	-----	-6,17 ± 0,17	-----
S71*	-----	-----	-11,45 ± 1,00

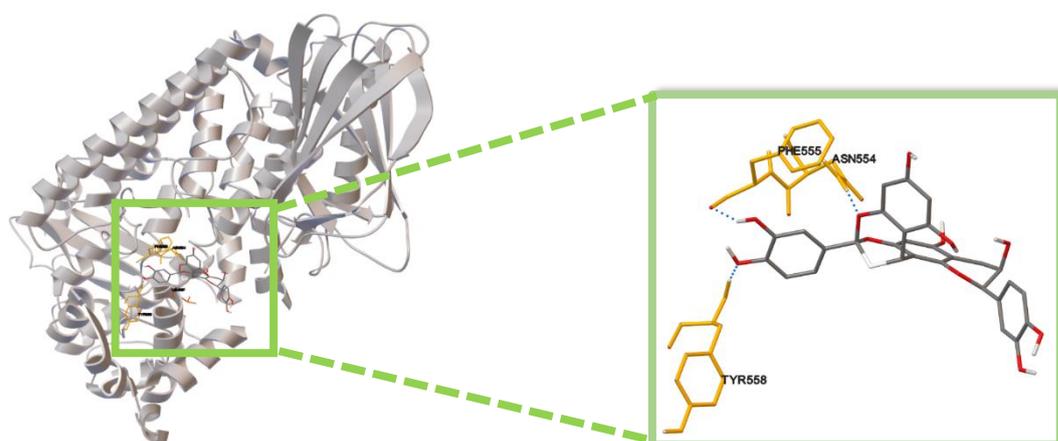
Obs.: Não foi possível analisar o ácido trigaloil-quínico devido a uma limitação do programa utilizado.

*S71: (R)-6-(3-amino-2-(5-(2-(6-amino-4-metilpiridina-2-il)etil)piridin-3-il)propil)-4-metilpiridin-2-amina.

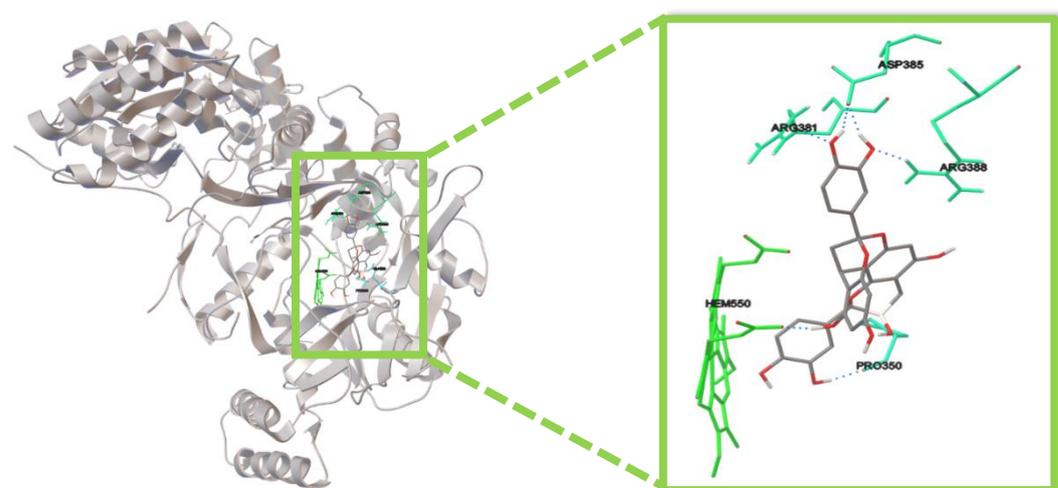
Número de repetições = 6.



Ciclooxigenase-2 (Subunidade B, PDB: 5F1A) em complexo com a naringenina



5-Lipoxygenase (Subunidade A, PDB: 3v99) em complexo com a procianidina A



Sintase do óxido nítrico indutível (Subunidades A e B, PDB: 4CX7) em complexo com a procianidina A

Figura 23. Interação entre COX-2, 5-LOX e iNOS e os compostos fenólicos de maior afinidade.

3.2.3. Avaliação da atividade farmacológica *in vivo*

Por já ter sido avaliado quanto ao seu potencial anti-inflamatório e analgésico em outros modelos animais (GUILHON-SIMPLICIO et al., 2012), BJAÉ foi o único extrato não avaliado pelo teste da formalina nesta pesquisa. Nesse modelo é possível fazer a observação e quantificação das respostas motoras do animal (lamber, agitar ou morder a pata que recebeu a injeção do agente inflamatório) em duas fases bem estabelecidas: a primeira inicia imediatamente após a administração da formalina, dura os cinco primeiros minutos, e é de caráter neurogênico; a segunda fase inicia aos 15 minutos posteriores, encerra 30 minutos após a administração da formalina, e é caracterizada por dor de origem inflamatória (BARROT, 2012).

Além do tempo de lambida/agitação/mordida, parâmetro principal do teste, também foram mensurados os edemas formados nas patas dos animais. Dessa forma, em um mesmo modelo foi possível avaliar a influência dos extratos sobre dois sinais cardinais da inflamação, dor e edema. Visando diminuir ao máximo o uso de animais de experimentação, para o *screening* inicial foi utilizada somente a dose de 300 mg/kg em comparação ao controle negativo (salina) (Figura 24).

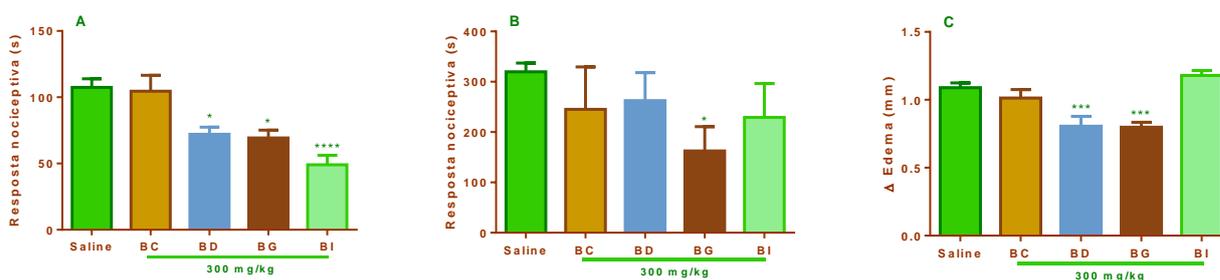


Figura 24. Efeito dos extratos aquosos de *Byrsonima* spp. no teste da formalina O gráfico A apresenta o resultado da primeira fase (5 minutos iniciais) do teste da formalina. O gráfico B apresenta o resultado da segunda fase (15 minutos finais) do teste da formalina. O gráfico C apresenta o volume do edema formado nas patas dos animais durante o teste. Oito animais foram utilizados em cada grupo. BC: *B. crispa*. BD: *B. duckeana*. BG: *B. garcibarrigae*. BI: *B. incarnata*. Número de animais por grupo = 8. Valor de *p* versus controle negativo: **p* < 0,05, ****p* < 0,001, *****p* < 0,0001.

Apenas as amostras mais ativas nessa primeira avaliação, tiveram mais doses investigadas frente a um controle positivo. Embora *B. incarnata* tenha apresentado efeito significativo na primeira fase do ensaio da formalina, as espécies *Byrsonima duckeana* e *B. garcibarrigae* foram consideradas as mais promissoras, por reduzirem significativamente os dois aspectos avaliados no ensaio (dor e o edema). Assim, *B. duckeana* e *B. garcibarrigae* foram selecionadas para uma nova análise no mesmo ensaio, em doses diferentes e frente a uma droga-padrão, o ácido acetilsalicílico (AAS), um conhecido e eficiente anti-inflamatório não-esteroidal.

B. garcibarrigae foi a única que apresentou efeito significativo na fase inflamatória do ensaio. Além disso, essa espécie foi a que apresentou maior rendimento, e maior teor de fenóis e flavonoides totais. Dessa forma, as doses de 30 e 100 mg/kg foram incluídas na nova avaliação no modelo da formalina. Analisando os dados dos dois testes em conjunto, *B. garcibarrigae* demonstrou atividade analgésica significativa nas doses de 100 mg/kg e 300 mg/kg, e efeito sobre o edema somente com a dose de 300 mg/kg. A dose de 300 mg/kg apresentou atividade equivalente à da droga-padrão (AAS 400 mg/kg) tanto na segunda fase do teste da formalina, quanto na modulação do edema (Figura 25).

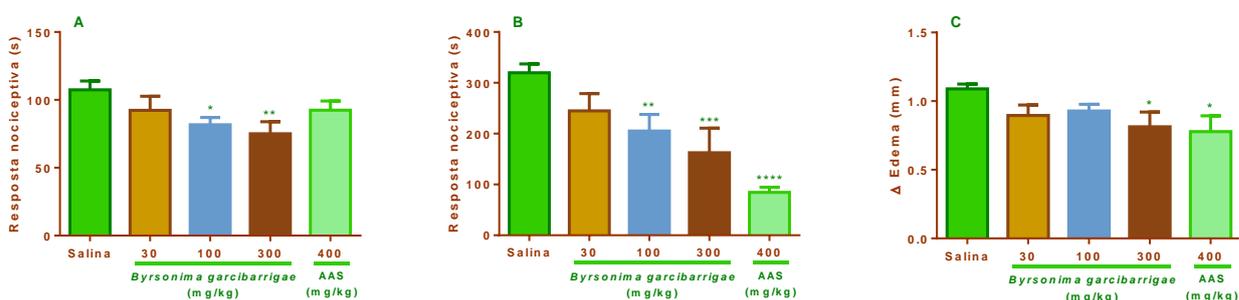


Figura 25. Efeito de *Byrsonima garcibarrigae* no teste da formalina. O gráfico A apresenta o resultado da primeira fase (5 minutos iniciais) do teste da formalina. O gráfico B apresenta o resultado da segunda fase (15 minutos finais) do teste da formalina. O gráfico C apresenta o volume do edema formado nas patas dos animais durante o teste. Número de animais por grupo = 8. Valor de p versus controle negativo: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Observando os resultados obtidos com *B. garcibarrigae*, onde a dose de 30 mg/kg não apresentou atividade no ensaio da formalina, resolveu-se adotar a dose de 100 mg/kg como a menor dose para o novo teste com *B. duckeana*. Para selecionar a segunda dose, considerou-se os resultados de um estudo paralelo realizado em parceria com pesquisadores da Universidade Federal do Paraná, onde se observou um promissor potencial analgésico de um extrato etanólico das folhas de *B. duckeana* nas doses de 500 e 1000 mg/kg no ensaio da formalina (VERDAM et al., 2017). Para manter a doses suficientemente espaçadas, optou-se por investigar adicionalmente a dose 1000 mg/kg.

Analisando os dados dos dois testes com *B. duckeana* em conjunto, as doses de 300 e 1000 mg/kg apresentaram atividade analgésica significativa na primeira fase do teste da formalina, mas somente a dose de 1000 mg/kg apresentou atividade na segunda fase, a qual foi equivalente à da droga-padrão (AAS 400 mg/kg). Quanto à modulação do edema, a nova análise estatística indicou que a atividade de nenhuma das doses testadas era significativa em relação à atividade apresentada pela droga-padrão (Figura 26).

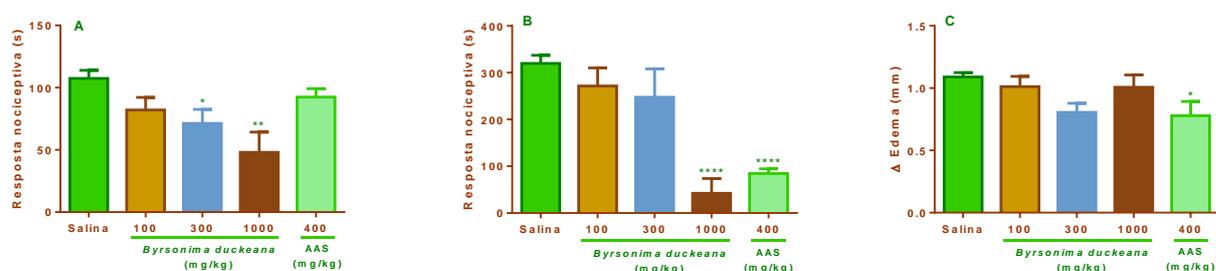


Figura 26. Efeito de *Byrsonima duckeana* no teste da formalina. O gráfico A apresenta o resultado da primeira fase (5 minutos iniciais) do teste da formalina. O gráfico B apresenta o resultado da segunda fase (15 minutos finais) do teste da formalina. O gráfico C apresenta o volume do edema formado nas patas dos animais durante o teste. Número de animais por grupo = 8. Valor de p versus controle negativo: * $p < 0,05$.

A relação entre o estresse oxidativo e a manutenção e agravamento de respostas inflamatórias está tão bem estabelecida (PISOSCHI; POP, 2015), que mesmo tradicionais inibidores da ciclooxigenase e lipoxigenase foram avaliados em ensaios químicos de atividade antioxidante, a fim de verificar se a capacidade de neutralizar radicais livres é um mecanismo

adicional pelo qual esses fármacos atuam. Ficou evidenciado que a atividade antioxidante pode contribuir tanto na inibição dos efeitos pró-inflamatórios dos próprios radicais, quanto na inibição de enzimas que possuem radicais livres em seus sítios ativos (BORGES; CASTLE, 2015; CZAPSKI et al., 2012)

Já é conhecida a capacidade de drogas antioxidantes atenuarem ambas as fases da nocicepção induzida por formalina (HACIMUFTUOGLU et al., 2006). A estimulação química da resposta inflamatória via formalina induz ao aumento da produção de NO^\bullet via iNOS, o qual atua na hipersensibilização de fibras nervosas aferentes, fator crítico para a hiperalgesia (SCHMIDTKO et al., 2009). As cicloxigenases, por sua vez, são uma importante fonte de $\text{O}_2^{\bullet-}$ durante processos inflamatórios, e vários estudos já mostram que a neutralização direta desse radical, a inibição da sua produção ou a estimulação de mecanismos endógenos de neutralização, tem reflexo positivo na atenuação da hiperalgesia no modelo da formalina em animais (KALLENBORN-GERHARDT et al., 2013).

Embora a hiperalgesia induzida por NO^\bullet e $\text{O}_2^{\bullet-}$ apresente mecanismos independentes, o produto da combinação desses dois radicais, o ONOO^- , também tem claro papel na hipersensibilização de fibras nervosas durante a inflamação, atuando por meio da indução e/ou ativação das cicloxigenases, as quais são as enzimas responsáveis pela produção de PGE_2 , prostaglandina diretamente implicada no desenvolvimento da dor inflamatória (NDENGELE et al., 2008).

Recentemente foi elucidado que a PGE_2 é capaz de ativar mastócitos durante a resposta inflamatória, os quais são os principais responsáveis pela liberação de histamina, um poderoso modulador da permeabilidade celular. Ademais, a PGE_2 possui um conhecido efeito vasodilatador, que também pode contribuir para a formação do edema (KAWAHARA et al., 2015b; MORIMOTO et al., 2014). Também já foi demonstrado que a resposta nociceptiva por

injeção intraplantar de formalina é diminuída por inibidores de lipoxigenase e antagonistas de receptores de leucotrienos (ASAHARA et al., 2015).

Portanto, o duplo efeito dos extratos na neutralização de NO^\bullet e $\text{O}_2^{\bullet-}$, além do possível efeito sobre as enzimas COX-2, 5-LOX e iNOS, como sugerido pelo estudo ancoragem molecular, podem ser os mecanismos dos efeitos apresentados no modelo da formalina pelos extratos estudados. A capacidade de compostos fenólicos atuarem como varredores de radicais livres *in vivo* é alvo de muita controvérsia. Contudo, a maioria dos estudos que investiga esse efeito analisa um único composto por vez e vários autores apontam que ainda não existem métodos *in vivo* suficientemente adequados para avaliar essa atividade (D'ARCHIVIO et al., 2010). Em última instância, assume-se que compostos fenólicos contribuem atuam de forma significativa contra o estresse oxidativo, a despeito de sua atividade varredora de radicais *in vivo* ainda ser de difícil de comprovação (CROFT, 2016).

Por outro lado, na análise de ancoragem molecular, foi sugerido que a procianidina A é o composto de maior afinidade pela LOX e iNOS, duas enzimas de interesse neste trabalho. Evidências recentes mostram que, apesar de ser mais complexa que a maioria dos flavonoides, esse composto é bem absorvido, inclusive em relação ao dímero B (JAKOBEK, 2015). Portanto, é possível que esse composto atue sobre enzimas *in vivo*, sendo essa uma parte do mecanismo de ação dos extratos analisados.

Flavononas, tal como a naringenina, em geral são melhor absorvidas que outras classes de flavonoides, embora seus glicosídeos tenham mais sucesso nesse aspecto (ORHAN et al., 2015). Contudo, a presença de outros compostos fenólicos nos extratos, como já discutido, pode ter efeito positivo na absorção desse composto, que apresentou maior afinidade pela COX-2 na análise de ancoragem molecular, enzima criticamente envolvida no mecanismo de nocicepção induzida por formalina.

Com relação aos compostos majoritários, o ácido gálico (*B. crispa* e *B. duckeana*), embora seja relativamente bem absorvido (BADHANI et al., 2015), não tem ação anti-inflamatória tão potente quanto de flavonoides. De fato, na análise de ancoragem molecular, sua afinidade pelas enzimas inflamatórias analisadas foi uma das mais baixas. Sabe-se que a quercetina, composto majoritário no extrato de *B. incarnata*, é rapidamente metabolizada *in vivo* e, embora alguns dos seus metabólitos também sejam ativos, não são tão potentes quanto ela própria (D'ANDREA, 2015).

Por outro lado, seu heterosídeo rutina, composto majoritário no extrato de *B. duckeana* e *B. garcibarrigae*, é absorvido no cólon, sendo convertido na própria quercetina, que demonstrou alta afinidade pelas enzimas inflamatórias na análise de ancoragem molecular e em outros metabólitos com conhecida atividade antioxidante e anti-inflamatória (HOSSEINZADEH; NASSIRI-ASL, 2014; PASHIKANTI et al., 2010; SU et al., 2014). Não obstante, os respectivos extratos foram os mais ativos no ensaio *in vivo* realizado neste trabalho.

3.2.3.1. Comparação entre *Byrsonima garcibarrigae* e *Byrsonima japurensis*

Byrsonima garcibarrigae foi a mais ativa entre as quatro espécies investigadas no ensaio da formalina, onde apresentou atividade equivalente ao controle positivo (AAS 400 mg/kg) a 300 mg/kg. *B. japurensis* demonstrou potência equivalente à da indometacina na dose de 100 mg/kg (GUILHON-SIMPLICIO et al., 2012). Por outro lado, as duas espécies apresentaram interessantes efeitos na fase neurogênica dos modelos de nocicepção/inflamação em que foram avaliadas, além de um forte efeito na fase inflamatória. Esse duplo efeito das duas espécies poderia ser devido a alguma ação modulatória sobre a nocicepção induzida por glutamato, o principal e mais abundante neurotransmissor presente em vertebrados, fortemente envolvido nas respostas nociceptivas centrais e periféricas (LARSSON; BROMAN, 2011).

Visando enfatizar essa observação e investigar um possível mecanismo da ação analgésica observada, os extratos de *B. japurensis* (BJAE) e de *B. garcibarrigae* (BGAE) foram submetidos ao ensaio da nocicepção induzida por glutamato, nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg. No caso de *B. garcibarrigae*, como a dose de 30 mg/kg já havia sido testada e foi inativa no ensaio da formalina, foi excluída do teste, visando diminuir o uso de animais (Figura 27).

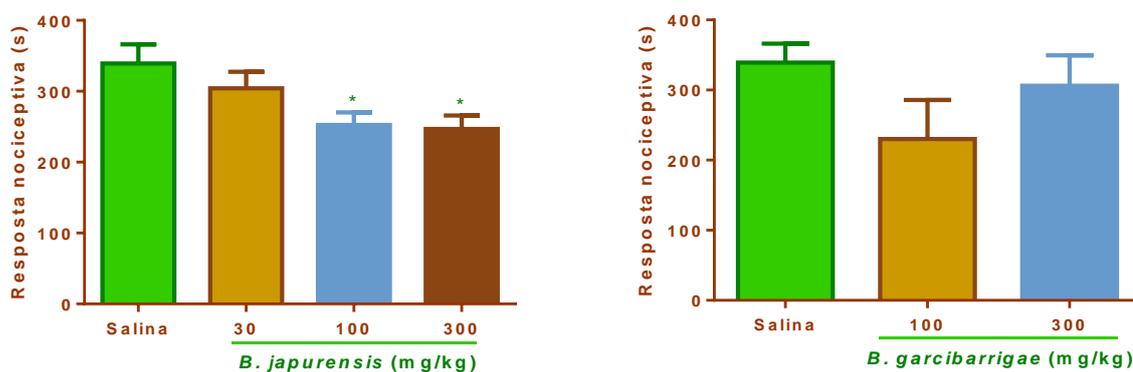


Figura 27. Efeito de BJA e BGA na nocicepção induzida por glutamato. Número de animais por grupo = 8. Valor de p versus controle negativo: $*p < 0,05$.

Como observado, *B. japurensis* confirmou sua potente atividade analgésica nesse novo ensaio, apresentando atividade significativa com as doses de 100 e 300 mg/kg. Na análise estatística dos dados, não ficou evidenciada ação significativa de BGAE, sugerindo que a modulação do glutamato não é um mecanismo crítico na ação analgésica da amostra.

Existem evidências de que a hiperálgia inflamatória depende de alterações paralelas no sistema nervoso central, tendo o glutamato ação fundamental (LARSSON; BROMAN, 2011). Por outro lado, é sabido que a ação do glutamato sobre fibras nervosas aferentes é mediada pela liberação de NO[•] (MILLER et al., 2011). Adicionalmente, já foi demonstrado que a ativação de receptores de glutamato aumenta a produção dos radicais superóxido e óxido nítrico (HACIMUFTUOGLU et al., 2006). Dessa forma, é provável que amostras capazes de modular a ativação de receptores de glutamato e que apresentem boa atividade varredora de radicais superóxido e óxido nítrico apresentem significativo potencial analgésico.

Nesse caso, a atividade analgésica de BGAE não pode ser considerada tão potente quanto BJAÉ. Assim, *B. japurensis*, uma planta medicinal do Estado do Amazonas largamente conhecida como “sara-tudo”, previamente investigada em modelos *in vivo* de dor e inflamação por este grupo de pesquisa, é a mais promissora entre as espécies de *Byrsonima* consideradas nesta pesquisa.

3.2.3.2. *Papel crítico da rutina nas propriedades de Byrsonima japurensis*

As atividades biológicas apresentadas por BJAÉ são condizentes com sua constituição química, elucidada neste trabalho. Seu composto majoritário é a rutina, um heterosídeo de quercetina que apresenta atividade anti-inflamatória consistente em diferentes modelos animais, tanto por via oral, quanto intraperitoneal, e um efeito protetor na mucosa gástrica em comparação com os anti-inflamatórios tradicionais (ABDEL-RAHEEM, 2010; GOMES et al., 2008). Todos esses fatos estão em consonância com o achado anterior de que BJAÉ, além de ser um bom anti-inflamatório, protege a mucosa gástrica contra úlceras induzida por indometacina (GUILHON-SIMPLICIO et al., 2012). No mesmo trabalho, foi também observada ação antioxidante e antiplaquetária dessa amostra, que também são justificadas pela presença de rutina (FLAUMENHAFT, 2013; MASUOKA et al., 2012; YANG et al., 2008).

A capacidade de inibição da glicação proteica é uma das propriedades da rutina melhor caracterizadas (PASHIKANTI et al., 2010). Enfatizando o papel crítico da rutina nos efeitos de BJAÉ, foi verificado que esse extrato inibe a glicação não enzimática da albumina (testes realizados em paralelo ao desenvolvimento desta Tese, ainda não publicados), a qual é mediada formação de radicais dicarbonil (MATSUDA et al., 2003; MUTHENNA et al., 2012). *In vivo*, grupos carbonil de açúcares redutores como glicose e frutose se ligam a grupos aminos livres de diversas proteínas, formando bases de Schiff instáveis, que então se convertem nos chamados produtos finais da glicação avançada (AGE), após etapas subsequentes de

desidratação, oxidação e rearranjo estrutural. Esses AGE são capazes, por exemplo, de ativar a via de sinalização de NF- κ B, ativando macrófagos e aumentando os níveis de ERO, mecanismo intimamente relacionado com as complicações inflamatória do *diabetes mellitus* (KHANGHOLI et al., 2015).

Na maioria dos estudos sobre o mecanismo de ação da rutina, postulou-se que sua atividade antioxidante está intimamente relacionada a outras atividades biológicas, conforme discutido aqui e no trabalho anterior com *B. japurensis* (GUILHON-SIMPLICIO et al., 2012). Como pode ser observado ao longo deste trabalho, atividade antioxidante dos outros compostos presentes no extrato pode estar atuando de forma sinérgica e aditiva aos efeitos da rutina. Existem trabalhos que demonstram que a combinação de determinados compostos fenólicos tem efeito positivo na atividade antioxidante da mistura (IACOPINI et al., 2008).

Por outro lado, é sabido que a biodisponibilidade de compostos fenólicos pela via oral, a principal via usada nas investigações das propriedades farmacológicas de BJAÉ, é baixa, implicando em baixa atividade *in vivo*, a despeito de promissores resultados *in vitro*, em muitos casos. O principal local de absorção da rutina é o cólon, onde é metabolizado em vários compostos menores e menos ativos pela microflora, e muito pouco flavonol intacto é realmente absorvido após ingestão (CHUA, 2013), embora a sua absorção seja melhor que da sua aglicona quercetina.

Alternativamente, já havia sido demonstrado que a rutina apresenta maior efeito anti-inflamatório no modelo de edema de pata induzido por carragenina, e atividade analgésica mais potente no modelo da nocicepção induzida por glutamato, quando administrada pela via intraperitoneal em comparação com a via oral (GOMES et al., 2008; LAPA et al., 2009), provavelmente por não sofrer extensa metabolização na mucosa intestinal e, conseqüentemente, ser absorvida em maior proporção pelos tecidos. De fato, este grupo de pesquisa já havia observado que BJAÉ apresentava atividade anti-inflamatória mais potente pela via

intraperitoneal, conservando seu principal efeito na fase inflamatória (fase tardia) do edema da pata induzido por carragenina (GUILHON-SIMPLICIO, 2009).

As atividades farmacológicas de BJAÉ são mais relevantes *in vivo* que as das outras espécies, embora seu composto majoritário seja bastante conhecido. Nesse caso, pode-se inferir que diferenças na biodisponibilidade dos componentes de cada mistura têm papel crítico nos efeitos observados. Alguns estudos têm investigado a influência da combinação entre os compostos químicos dos extratos vegetais na biodisponibilidade de outros componentes, que tem sido considerado um tipo de sinergismo específico de extratos vegetais (WAGNER, 2011).

Como discutido na análise fitoquímica das amostras, *B. japurensis* é a mais rica em compostos fenólicos dentre as espécies estudadas. A prospecção fitoquímica previamente realizada com a espécie indicou que grande parte desses compostos constitui-se de proantocianidinas (GUILHON-SIMPLICIO, 2009), um heterogêneo grupo de compostos fenólicos poliméricos, de alto peso molecular, facilmente solúvel em água e de difícil análise estrutural pelas técnicas espectrométricas usuais (SMERIGLIO et al., 2017), incluindo a empregada neste estudo. Como visto anteriormente neste texto, têm sido sugeridos diferentes mecanismos pelos quais, as proantocianidinas contribuem para a melhor absorção de outros compostos fenólicos, ainda que elas mesmas sejam pouco absorvidas (NEILSON et al., 2016).

Dessa forma, é possível que a composição rica em proantocianidinas de BJAÉ seja de importância fundamental para a ação dessa amostra *in vivo*, por meio da influência positiva na biodisponibilidade dos outros compostos fenólicos presentes. Reforça-se, portanto, que a bioatividade de um extrato vegetal não está condicionada à presença de um composto altamente ativo, mas está sob influência decisiva da combinação específica dos seus compostos. Tal percepção vai de encontro a tendência atual de valorização da terapia multialvo e do sinergismo na farmacoterapia.

Tem se solidificado o entendimento que a mistura de compostos com ação farmacológica relacionada, ainda que não tão potentes, pode exibir mecanismos compensatórios e sinérgicos que aumentam a eficácia e a segurança do produto final. Prova disso, é que o uso de coquetel de fármacos/medicamentos já é uma realidade na terapêutica humana há algum tempo, com vários exemplos de sucesso. Não obstante, alguns estudos têm proposto e/ou investigado o potencial farmacológico de combinações racionalizadas de compostos fenólicos inspiradas em preparações vegetais ativas (CAI et al., 2016; IACOPINI et al., 2008; NIEDZWIECKI et al., 2016), mas tais iniciativas ainda são esparsas.

3.3. Considerações finais e perspectivas

Neste estudo, foi enfatizado que o uso medicinal popular é um parâmetro valioso para seleção de espécies para estudo químico-farmacológico. A espécie mais promissora desta pesquisa, *B. japurensis*, é a única cujo extrato aquoso é empregado na medicina popular como anti-inflamatório. Está bem estabelecido que há mais sucesso em estudos farmacológicos com plantas selecionadas pela abordagem etnofarmacológica, que aquelas selecionadas por outros métodos, tais como o quimiosistemático, empregado como critério para seleção das demais espécies estudadas nesta Tese.

Paralelamente, um dos principais desafios em se desenvolver fitoterápicos a partir de fontes naturais, é justamente a variabilidade da sua composição química em razão de fatores edafoclimáticos, processamentos tecnológicos e até mesmo contaminação microbiana. Mesmo fitoterápicos já em uso na terapêutica convencional, presumivelmente padronizados por um marcador químico, apresentam considerável variabilidade química entre os diferentes lotes, que tem impacto direto na qualidade e eficácia dos produtos. Somam-se ainda os impactos ambientais, já que muitos extratos ativos e potencialmente promissores são inviáveis para exploração em larga escala, como é o caso de *B. japurensis*.

Nesse contexto, vislumbra-se uma crescente e renovada vertente na abordagem de atividades biológicas de extratos vegetais, que é a adoção de extratos ativos como modelos de sinergismo e ação multialvo. Nesse contexto, ganham destaque a desreplicação e a quantificação de metabólitos em extratos vegetais, aliados ao *screening* de atividades biológicas por modelos adequados, ao invés da priorização de onerosos e, por vezes não compensados, esforços no fracionamento de extratos e isolamento de fitocompostos.

Essa é uma forma de revalorização dos extratos vegetais como fonte de medicamentos. Entende-se que seu valor não se restringe a obtenção de novas moléculas bioativas, visto que, em boa parte dos casos, os fracionamentos resultam no isolamento de moléculas conhecidas e com ação moderada quando atuando isoladamente. Sugere-se, então, que a mistura química presente em extratos ativos pode ser reproduzida em condições controladas, a partir das fontes comerciais das substâncias identificadas, para o planejamento de formulação polifarmacológicas.

4. BIOPROSPECÇÃO DOS EXTRATOS HEXÂNICOS

4.1. Metodologia

4.1.1. Obtenção dos extratos hexânicos

Os extratos orgânicos foram obtidos por maceração cinética (banho de ultrassom por 15 minutos) com hexano p.a. Os extratos foram filtrados e concentrados em rotaevaporador em temperaturas abaixo de 60 °C. O volume residual do solvente foi eliminado à temperatura ambiente, em capela de exaustão (SIMÕES et al., 2007). O rendimento dos extratos foi calculado pela relação entre a massa residual livre de solvente e quantidade de matéria prima empregada na confecção do extrato.

4.1.2. Obtenção dos triterpenos α e β -amirina

Os extratos hexânicos das espécies *B. crispera*, *B. duckeana*, *B. garcibarrigae* e *B. incarnata* foram reunidos e lavados exaustivamente com acetona em ultrassom, em ciclos de 15 minutos, seguido de centrifugação e recolhimento do precipitado formado. Encerrado o ciclo com acetona, foram repetidos os mesmos procedimentos com metanol. O resultado das lavagens foi monitorado por cromatografia em camada delgada (CCD) em placas de sílica gel 60 eluídas no sistema hexano: acetato de etila 9:1. Ao final desse procedimento, o pó branco amorfo obtido, o qual apresentou apenas uma mancha na análise por CCD, foi nomeado FGS-1.

4.1.2.1. Identificação dos triterpenos α e β -amirina

FGS-1 foi solubilizada em diclorometano (1 mg/mL) e analisada quanto ao perfil químico em um cromatógrafo a gás acoplado (GC-2010, Shimadzu, Quioto, Japão), utilizando uma coluna DB-5 de 30 metros. O volume de injeção foi de 1 μ L com razão do Split de 10. A temperatura do injetor foi de 290 °C e o fluxo de hélio de 1 mL/min. A programação do forno foi de 210-310 °C a uma razão de 10 °C/min, mantendo a temperatura final por 5 minutos. A

temperatura do ionizador foi de 310 °C. Perfluorotributilamina foi utilizado como padrão interno.

Outra alíquota de 5 mg foi dissolvida em 600 µL de clorofórmio deuterado (Cambridge Isotope Laboratories, Andover, EUA) e submetida a análise por espectrometria de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C em um espectrômetro de 500 MHz (Varian, Palo Alto, EUA). Os espectros foram processados no programa 1D NMR Processor versão 12.0 (ACD/LABs, Toronto, Canadá) e os deslocamentos químicos comparados com dados da literatura.

4.1.2.2. *Quantificação dos triterpenos α e β -amirinas*

Visando obter uma quantificação do triterpenos α e β -amirinas, foi desenvolvido e validado um método para a separação desses isômeros por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando um cromatógrafo Shimadzu LC-20A Proeminence e uma coluna Luna C18 de 250 x 4,6 mm e 5 µm de diâmetro de partícula (Phenomenex, Torrance, EUA). O gradiente empregado, definido após algumas tentativas, está descrito no quadro 10.

Quadro 10. Método desenvolvido para separação e quantificação de α e β -amirina

Tempo	Acetonitrila	H ₂ O mili-Q	Fluxo	Volume de injeção	Deteção
0.01 min	60 %	40 %	0,8 mL/minuto	20 µL	210 nm
10.00 min	80 %	20 %			
20.00 min	88 %	12 %			
30.00 min	100 %	0 %			

Curvas de calibração foram elaboradas para as duas substâncias. Cinco concentrações de cada um dos isômeros foram consideradas (4, 40, 80, 400 e 800 µg/mL) e o método foi analisado quanto a especificidade (seletividade), linearidade, precisão (repetitividade), exatidão (recuperação) e robustez (RIBANI et al., 2004).

4.1.3. Obtenção dos derivados de α e β -amirina

a) Acetato de amirinas (FGS-2)

A um balão de fundo redondo de 50 mL foram adicionados 100 mg de FGS-1, 1 mL de piridina e 2 mL de anidrido acético, sendo a mistura submetida à agitação magnética por duas horas (Figura 28). Após isso, 20 mL de solução aquosa saturada de cloreto de sódio ou sulfato de cobre foram acrescentadas e solução foi extraída em funil de separação com duas porções de 30 mL de éter etílico. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e evaporada rotaevaporador e capela de exaustão. O resíduo foi purificado em coluna cromatográfica de sílica gel com indicador de fluorescência, eluída com gradientes de hexano: acetato de etila. A separação foi acompanhada sob luz ultravioleta 254 nm.

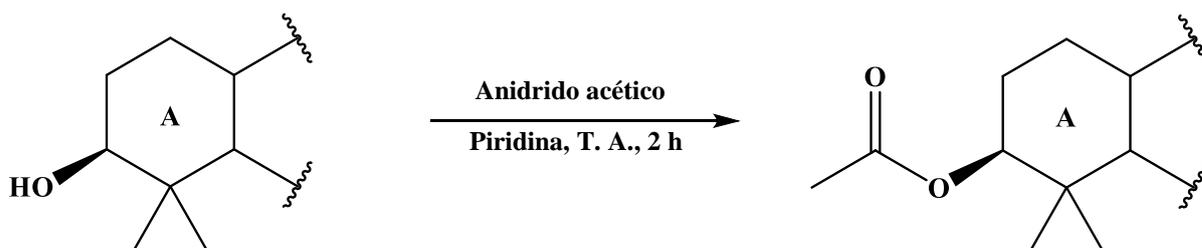


Figura 28. Esquema geral da reação para a obtenção de FGS-2. T.A.: temperatura ambiente.

b) α e β -amironas (FGS-3)

A um balão de fundo redondo foram adicionados 100 mg da FGS-1 solubilizados em 10 mL de diclorometano seco (DCM), e em seguida, 70 mg de clorocromato de piridínio (PCC), mantendo-se a agitação por 24 horas (Figura 29). O produto final foi lavado com duas porções de 15 mL de éter etílico, sobre gaze e algodão cobertos por sulfato de sódio anidro e o solvente foi eliminado em capela de exaustão. O resíduo foi purificado em coluna cromatográfica de sílica gel com indicador de fluorescência, eluída com gradientes de hexano: acetato de etila. A separação foi acompanhada sob luz ultravioleta 254 nm.

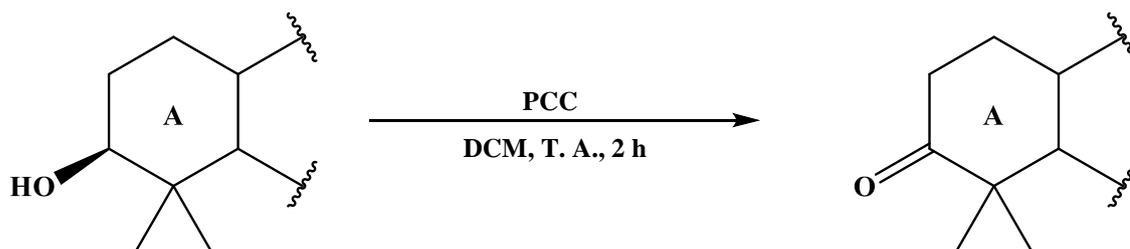


Figura 29. Esquema geral da reação para a obtenção de FGS-3. T.A.: temperatura ambiente.

c) Benzoato de amirinas (FGS-4)

Em um balão de fundo redondo foram acrescentados 100 mg de FGS-1, 10 mL de benzeno e 150 μ L de cloreto de benzoíla. O sistema foi mantido em agitação magnética a 55 °C em sistema de refluxo por sete horas (Figura 30). O solvente então foi evaporado em capela de exaustão. O resíduo foi purificado em coluna cromatográfica de sílica gel com indicador de fluorescência, eluída com gradientes de hexano: acetato de etila. A separação foi acompanhada sob luz ultravioleta 254 nm.

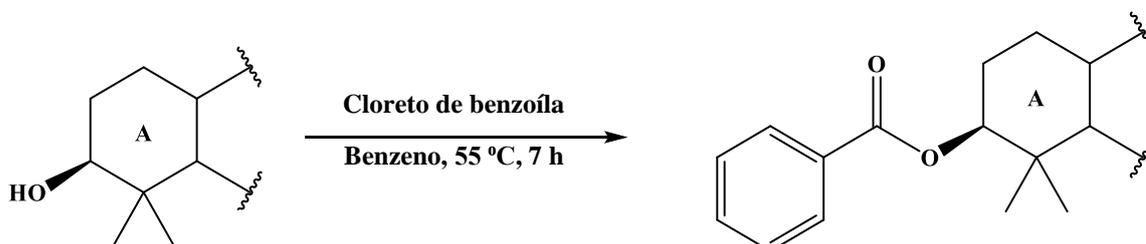


Figura 30. Esquema geral da reação para a obtenção de FGS-4.

d) Cinamato de amirinas (FGS-5)

A um balão de fundo redondo foram adicionados 100 mg de FGS-1, 10 mL de DCM, 195 mg de cloreto de cinamoíla e duas gotas de ácido perclórico (HClO_4) concentrado. O sistema foi agitado magneticamente por sete horas a 55 °C em sistema de refluxo (Figura 31). Então, o solvente foi evaporado em capela. O resíduo foi purificado em coluna cromatográfica de sílica gel com indicador de fluorescência, eluída com gradientes de hexano: acetato de etila. A separação foi acompanhada sob luz ultravioleta 254 nm.

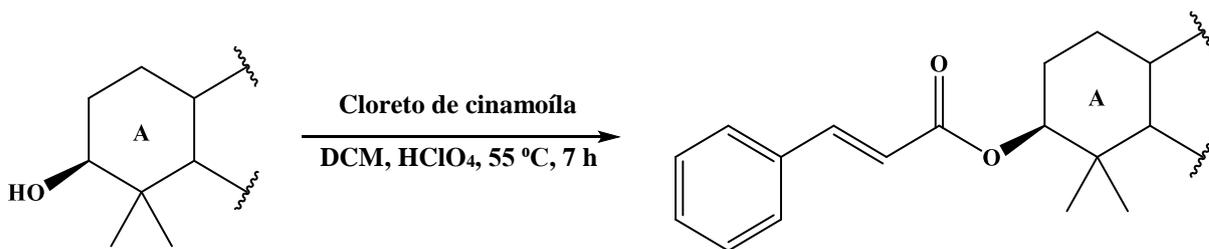


Figura 31. Esquema geral da reação para a obtenção de FGS-5. DCM: Diclorometano.

e) Metanoato de amirinas (FGS-6)

Em um balão de fundo chato de 50 mL foram adicionados 100 mg de FGS-1, 200 μ L de ácido fórmico 90% e 20 μ L de HClO₄ concentrado. O sistema foi mantido sob agitação magnética por duas horas a 55 °C em refluxo (Figura 32). Após esse tempo, 2 mL de anidrido acético e 30 mL de água foram adicionados à solução, observando-se a formação de um precipitado. O precipitado formado foi filtrado a vácuo e lavado com água. O resíduo foi purificado em coluna cromatográfica de sílica gel com indicador de fluorescência, eluída com gradientes de hexano: acetato de etila. A separação foi acompanhada sob luz ultravioleta 254 nm.

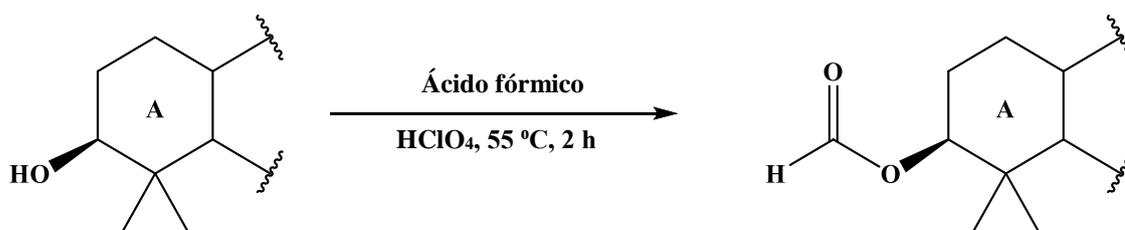


Figura 32. Esquema geral da reação para a obtenção de FGS-6.

f) Maleato de amirinas (FGS-7)

A um balão de fundo chato foram transferidos 100 mg de FGS-1 solubilizados em 20 mL de DCM, 92 mg de anidrido maleico e duas gotas de HClO₄ concentrado. O sistema foi mantido em agitação magnética por sete horas a 55 °C em refluxo (Figura 33). A solução final foi evaporada em capela. O resíduo foi purificado em coluna cromatográfica de sílica gel com

indicador de fluorescência, eluída com gradientes de hexano: acetato de etila. A separação foi acompanhada sob luz ultravioleta 254 nm.

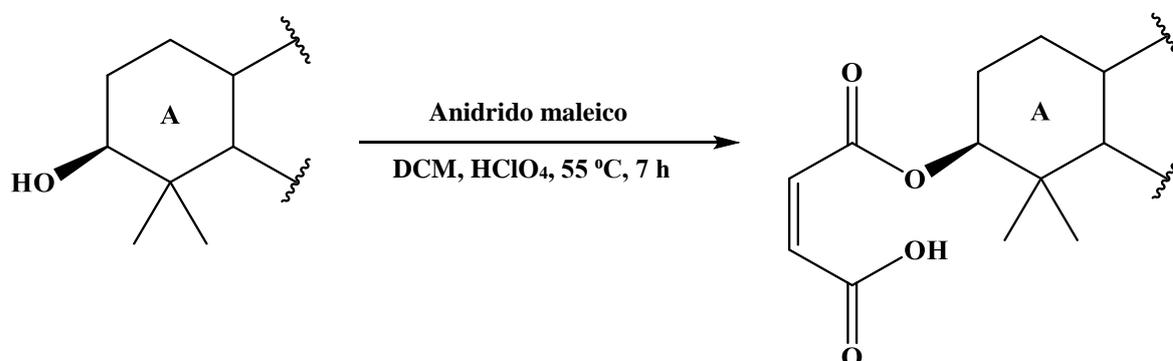


Figura 33. Esquema geral da reação para a obtenção de FGS-7. DCM: diclorometano.

g) Naproxenato de amirinas (FGS-8)

Em um balão de fundo redondo foram diluídos 50 mg de FGS-1, 36,4 mg de N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC), alguns miligramas de 4-dimetilaminopiridina (DMAP) e 26,2 mg de naproxeno em 5 mL de DCM. A mistura foi mantida sob agitação magnética por 24 horas em temperatura ambiente (Figura 34). A reação foi finalizada pela adição de 5 mL de água e a solução foi extraída com três porções de 5 mL de clorofórmio e seca com sulfato de sódio anidro. A solução orgânica final foi filtrada e evaporada em capela de exaustão. Uma parte do resíduo foi purificado por cromatografia em camada delgada preparativa eluída com hexano: acetato de etila (9:1).

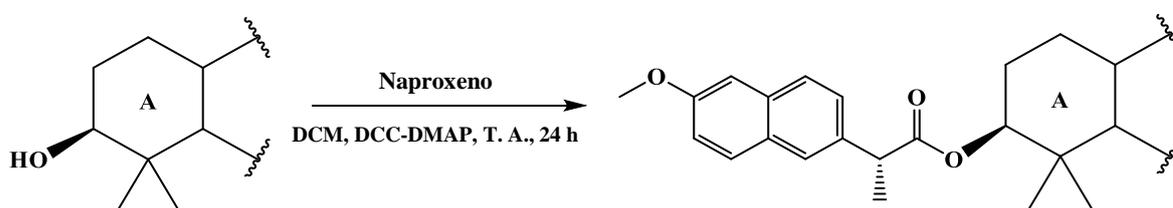


Figura 34. Esquema geral da reação para a obtenção de FGS-8. T. A.: temperatura ambiente.

h) Octanoato de amirinas (FGS-9)

Em um balão de fundo redondo, 100 mg de FGS-1 foram dissolvidos em 2 mL de piridina. Foram adicionados 100 μ L de cloreto de octanoíla em 5 mL de piridina e a mistura foi

agitada magneticamente e mantida sob refluxo a 55 °C durante duas horas (Figura 35). Após esse período, foram adicionados mais 500 µL de cloreto de octanoíla, deixando a mistura em agitação por mais 15 minutos. Então, foram adicionados 100 mL de solução de ácido clorídrico pH 2 e a mistura foi transferida para um funil de separação onde foi extraída três vezes com 30 mL de clorofórmio. A fase orgânica foi lavada com 100 mL de solução saturada de bicarbonato de sódio, secada com sulfato de sódio anidro e evaporada em rotaevaporador e capela de exaustão.

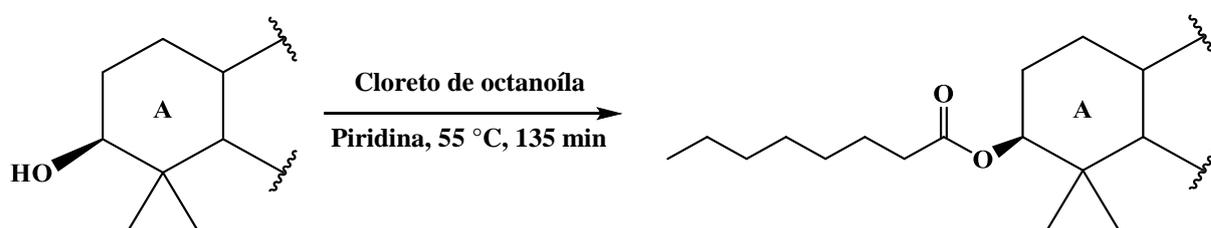


Figura 35. Esquema geral da reação para a obtenção de FGS-9. T. A.: temperatura ambiente.

i) Ftalato de amirinas (FGS-10)

A um balão de fundo chato foram acrescidos 100 mg de FGS-1 solubilizados em 20 mL de acetato de etila, 139 mg de anidrido ftálico e duas gotas de HClO₄ concentrado. A mistura foi agitada magneticamente por sete horas a 55 °C em sistema de refluxo (Figura 36). A solução final foi evaporada em capela. O resíduo foi purificado em coluna cromatográfica de sílica gel com indicador de fluorescência, eluída com gradientes de hexano: acetato de etila. A separação foi acompanhada sob luz ultravioleta 254 nm.

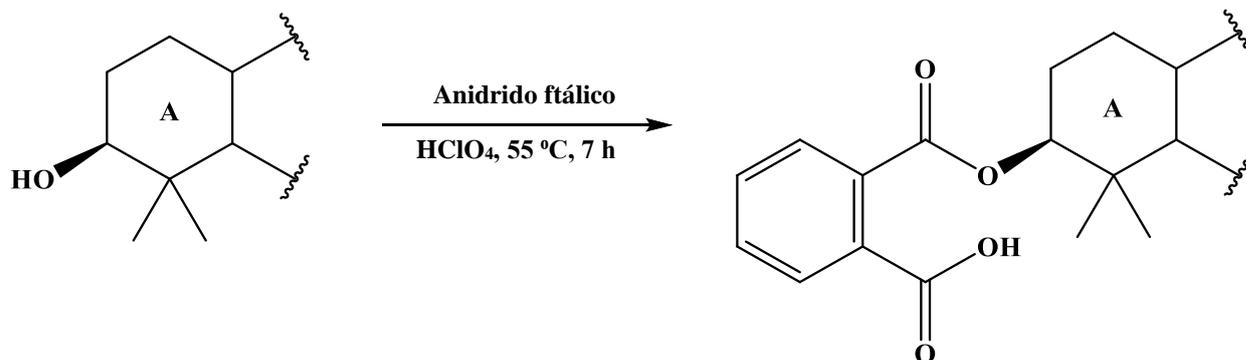


Figura 36. Esquema geral da reação para a obtenção de FGS-10.

j) Propanoato de amirinas (FGS-11)

Em um balão de fundo redondo foram reunidos de 100 mg de FGS-1, 1 mL de piridina e 2 mL de anidrido propiônico, sendo a mistura submetida à agitação magnética por oito horas sob aquecimento a 55 °C (Figura 37). Ao final desse período, foram adicionados 20 mL de solução aquosa saturada de cloreto de sódio e a mistura foi transferida a um funil de separação onde foi extraída com duas porções de 30 mL de éter etílico. A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro e concentrada em rotaevaporador e capela de exaustão. O resíduo foi purificado em coluna cromatográfica de sílica gel com indicador de fluorescência, eluída com gradientes de hexano: acetato de etila. A separação foi acompanhada sob luz ultravioleta 254 nm.

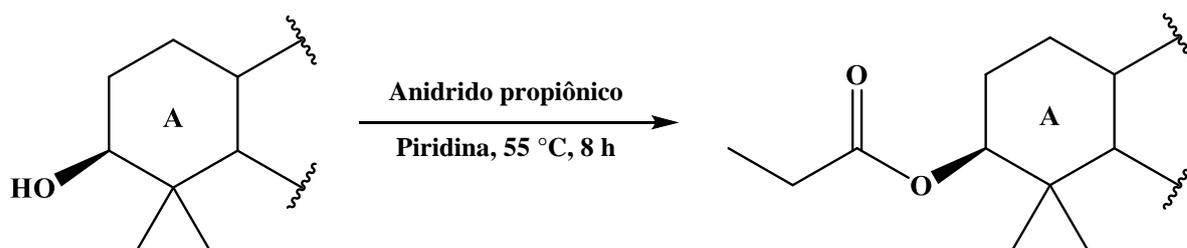


Figura 37. Esquema geral da reação para a obtenção de FGS-11.

k) Salicilato de amirinas (FGS-12)

Em um balão de fundo redondo foram dissolvidos 50 mg de FGS-1, 36,8 mg de DCC, alguns miligramas de DMAP e 16,4 mg de ácido salicílico em 5 mL de DCM. A mistura foi mantida sob agitação magnética por 48 horas em temperatura ambiente (Figura 38). A reação foi finalizada pela adição de 5 mL de água destilada e a solução foi então extraída com três porções de 5 mL de clorofórmio. A porção orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e evaporada em capela de exaustão. O resíduo foi purificado em coluna cromatográfica de sílica gel com indicador de fluorescência, eluída com gradientes de hexano: acetato de etila. A separação foi acompanhada sob luz ultravioleta 254 nm.



Figura 38. Esquema geral da reação para a obtenção de FGS-12. DCM: diclorometano. DCC-DMAP: sistema catalisador N,N'-diciclohexilcarbodiimida e 4-dimetilaminopiridina. T. A.: temperatura ambiente.

l) Succinato de amirinas (FGS-13)

A um balão de fundo chato foram adicionados 100 mg de FGS-1 solubilizados em 20 mL de DCM, 43,67 mg de anidrido succínico e duas gotas de HClO₄ concentrado. O sistema foi agitado magneticamente por 7 h a 55 °C em refluxo (Figura 39). A solução final evaporada em capela. O resíduo foi purificado em coluna cromatográfica de sílica gel com indicador de fluorescência, eluída com gradientes de hexano: acetato de etila. A separação foi acompanhada sob luz ultravioleta 254 nm.

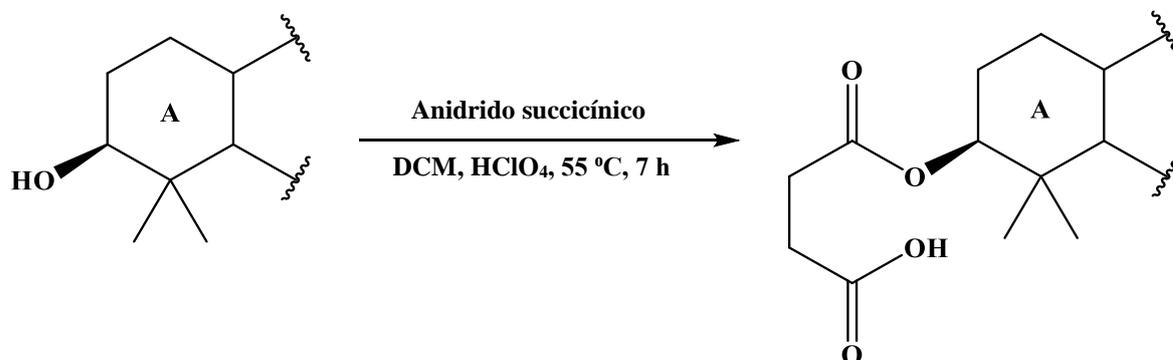


Figura 39. Esquema geral da reação para a obtenção de FGS-13. DCM: diclorometano.

m) Éter propargílico de amirinas (FGS-14)

A um balão de fundo redondo imerso em banho de gelo foram adicionados 100 mg de FGS-1 e 20 mL de tetrahidrofurano seco (THF). Sob agitação magnética, foram acrescentados 2 equivalentes de hidreto de sódio (NaH). Imediatamente, vedou-se o balão, e criou-se uma atmosfera de nitrogênio. A reação foi agitada magneticamente por 15 minutos, e então o brometo de propargila foi adicionado por meio de seringa (Figura 40). Completada a reação,

foram acrescentados 100 mL solução saturada de bicarbonato de sódio e a fase aquosa foi extraída com acetato de etila. A fase orgânica foi seca em sulfato de sódio anidro e concentrada em rotaevaporador e capela de exaustão. O resíduo foi purificado em coluna cromatográfica de sílica gel com indicador de fluorescência, eluída com gradientes de hexano: acetato de etila. A separação foi acompanhada sob luz ultravioleta 254 nm.

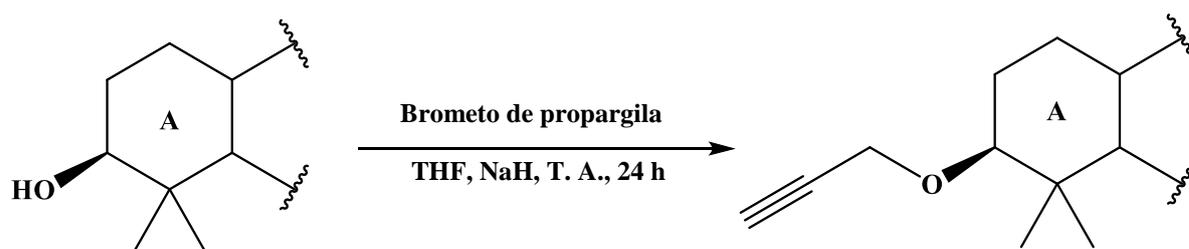


Figura 40. Esquema geral da reação para a obtenção de FGS-14. THF: tetrahydrofurano. T. A.: temperatura ambiente.

n) Derivado fluorado de amirinas (FGS-15)

A um balão de fundo redondo foram adicionados 1 equivalente de FGS-1 solubilizados em 20 mL de DCM, e 2 equivalentes de dietilamino trifluoreto de enxofre (DAST). A mistura foi mantida sob agitação magnética por 24 horas (Figura 41). Completada a reação, foram acrescentados 100 mL solução saturada de bicarbonato de sódio e a mistura foi transferida para um funil de separação e extraída com acetato de etila. A fase orgânica foi seca em sulfato de sódio anidro e concentrada em rotaevaporador e capela.

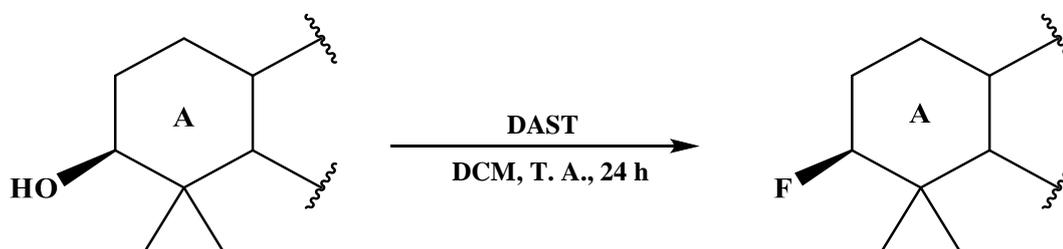


Figura 41. Esquema geral da reação para a obtenção de FGS-15. DAST: dietilamino trifluoreto de enxofre, DCM: diclorometano. T. A.: temperatura ambiente.

o) Derivado aminoguanidina (FGS-16)

Em um balão de fundo redondo foram misturados 66,8 mg de FGS-3, 50,8 mg de hidrocloreto de aminoguanidina, 1 mL de ácido clorídrico (HCl), 1 mL de água destilada (H₂O) e 10 mL de etanol absoluto (EtOH). A solução foi mantida sob refluxo por 6 horas em temperatura ambiente (Figura 42). Após esse período o solvente foi evaporado e o resíduo foi dissolvido em 20 mL de água e extraído com três porções de 20 mL de acetato de etila. A fase orgânica foi lavada com duas porções de 20 mL de solução saturada de bicarbonato de sódio e, em seguida, a fase aquosa foi extraída com três porções de 20 mL de acetato de etila. A fase orgânica foi lavada com 20 mL de água destilada, seca com sulfato de sódio anidro e evaporada. O resíduo foi dissolvido em 10 mL de etanol, então adicionou-se 1 mL de ácido clorídrico 1 N e a mistura ficou em agitação por uma hora. Ao final, o solvente foi evaporado em capela de exaustão e o resíduo foi recristalizado em etanol.

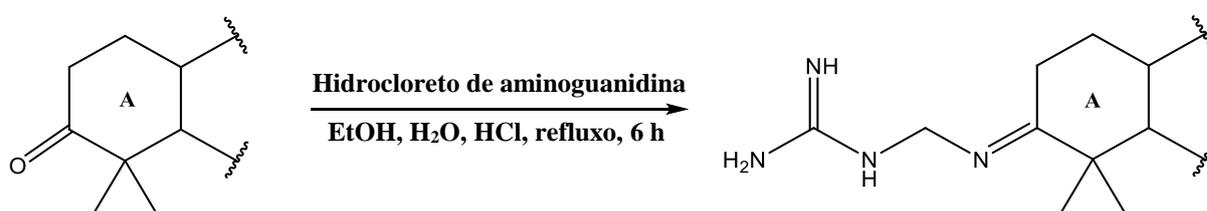


Figura 42. Esquema geral da reação para a obtenção de FGS-16. EtOH: etanol.

p) Derivado dinitrofenilhidrazina de amirinas (FGS-17)

A mistura de 50,1 mg de FGS-3 foi reunida com 53,6 mg de 2,4-dinitrofenilhidrazina, 19,2 mg de ácido tricloroacético (TCA) e 2 mL de ácido acético (AcOH) foi posta sob agitação e aquecimento a 100 °C por 20 horas (Figura 43). Após esse tempo, a reação foi finalizada pela adição de 5 mL de água destilada gelada, e a solução foi extraída três vezes com porções de 10 mL de diclorometano. A fase orgânica foi lavada com 10 mL de ácido clorídrico 1 N e 10 mL de água destilada, e seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e evaporada em capela. O resíduo foi purificado por cromatografia em camada delgada preparativa eluída com hexano: acetato de etila (9:1).



Figura 43. Esquema geral da reação para a obtenção de FGS-17. AcOH: ácido acético. TCA: ácido tricloroacético.

q) Derivado hidroxilamina de amirinas (FGS-18)

Uma mistura de 51,6 mg de FGS-3 e 25,3 mg de hidrocloreto de hidroxilamina foi solubilizada em 2 mL de piridina, e mantida sob agitação magnética e aquecimento a 60 °C por quatro horas (Figura 44). Então, deixou-se a mistura arrefecer à temperatura ambiente e adicionou-se 10 mL de diclorometano, e procedeu-se a extração com três porções de 5 mL de ácido clorídrico 10 %. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada em capela de exaustão. O resíduo foi recristalizado em metanol a frio.

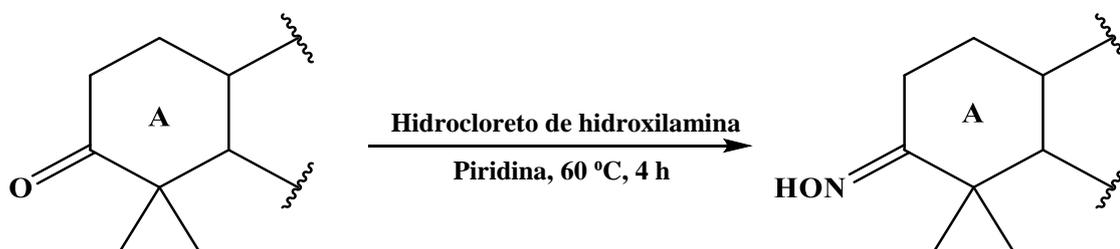


Figura 44. Esquema geral da reação para a obtenção de FGS-18. AcOH: ácido acético. TCA: ácido tricloroacético.

r) Ibuprofenoato de amirinas (FGS-19)

Em um balão de fundo redondo foram reunidos 50 mg de FGS-1, 36,5 mg de DCC, alguns miligramas de DMAP e 24,3 mg de ibuprofeno. A mistura foi diluída em 5 mL de DCM e mantida sob agitação magnética em temperatura ambiente por 24 horas (Figura 45). Após esse tempo a reação foi finalizada pela adição de 5 mL de água destilada. A solução foi extraída com três porções de 5 mL de clorofórmio, e seca com sulfato de sódio anidro. A solução foi filtrada e evaporada em capela de exaustão. O resíduo foi dissolvido em acetato de etila e o

sobrenadante foi purificado por cromatografia em camada delgada preparativa eluída com hexano: acetato de etila (9:1).

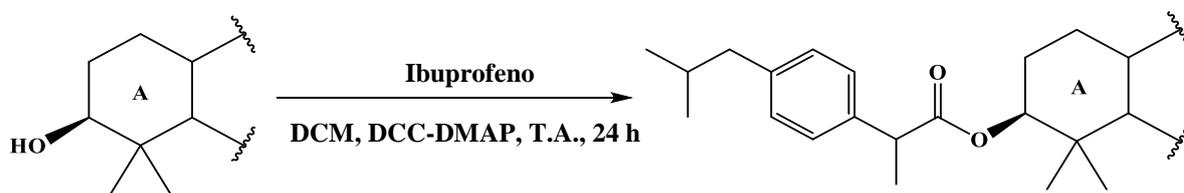


Figura 45. Esquema geral da reação para a obtenção de FGS-19. DCM: diclorometano. DCC-DMAP: sistema catalisador N,N'-diciclohexilcarbodiimida e 4-dimetilaminopiridina. T. A.: temperatura ambiente.

s) Derivado lactona de amirinas (FGS-20)

Em um balão de fundo redondo, 49,7 mg de FGS-3 foram dissolvidos em 10 mL de clorofórmio. Adicionou-se 60,4 mg de ácido *m*-cloroperoxibenzoico (*m*-CPBA) e deixou-se sob agitação magnética em temperatura ambiente por 72 horas (Figura 46). Após isso, a reação foi finalizada pela adição de 10 mL de clorofórmio, e extraída com 20 mL de iodeto de potássio 5%, 20 mL de água destilada e 20 mL de solução saturada de bicarbonato de sódio. Em seguida a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro. A solução foi filtrada e evaporada em capela de exaustão, e o resíduo foi purificado por cromatografia em camada delgada preparativa eluída com hexano: acetato de etila (9:1).

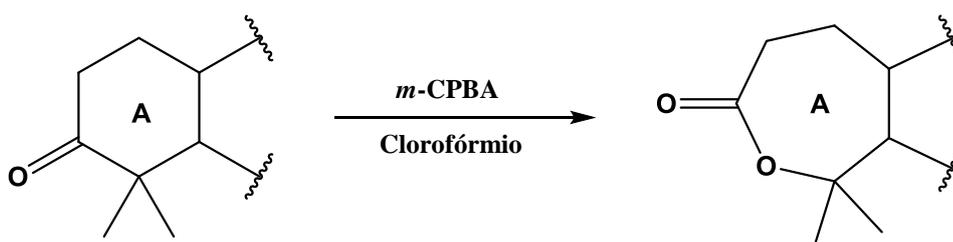


Figura 46. Esquema geral da reação para a obtenção de FGS-20. *m*-CPBA: ácido *m*-cloroperoxibenzoico.

t) Butanoato de amirinas (FGS-21)

Em um balão de fundo redondo, adicionou-se 50 mg de FGS-1 e dissolveu-se em DCM. Em seguida, adicionou-se 24 mg de carbonato de potássio (K_2CO_3) e 1,5 equivalente de cloreto de butirila. A reação foi mantida em agitação magnética por 24 horas sob atmosfera de

nitrogênio (Figura 47). Ao fim desse período, adicionou-se água a reação e foi realizada a extração com diclorometano. A fase orgânica foi lavada diversas vezes com água e seca com sulfato de sódio anidro, então o solvente foi concentrado em rotaevaporador e eliminado em capela de exaustão.

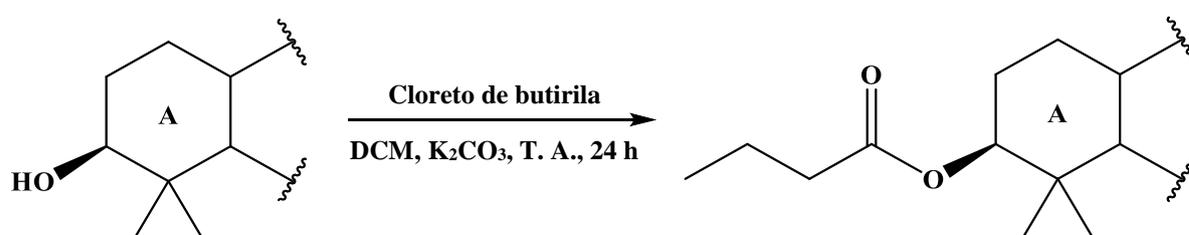


Figura 47. Esquema geral da reação para a obtenção de FGS-21. DCM: diclorometano. T. A.: temperatura ambiente.

u) Hexanoato de amirinas (FGS-22)

Em um balão de fundo redondo, adicionou-se 50 mg de FGS-1 e dissolveu-se em DCM. Em seguida, adicionou-se 24 mg de K_2CO_3 e 1,5 equivalentes de cloreto de hexanoíla. A reação foi mantida em agitação magnética por 24 horas sob atmosfera de nitrogênio (Figura 48). Ao fim desse período, adicionou-se água a reação e foi realizada a extração do produto com diclorometano. A fase orgânica foi lavada diversas vezes com água e seca com sulfato de sódio anidro, e o solvente foi concentrado em rotaevaporador e eliminado em capela de exaustão.

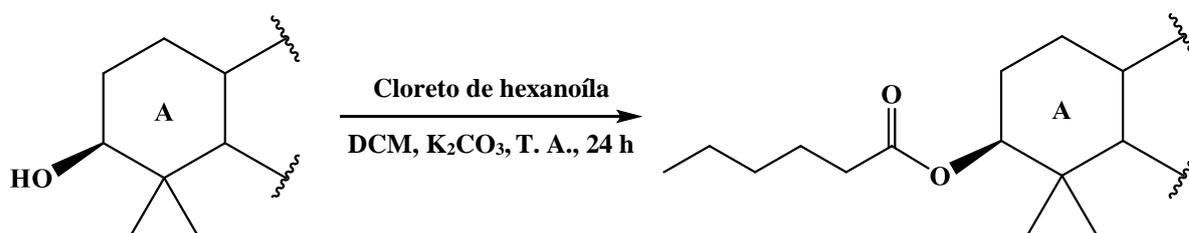


Figura 48. Esquema geral da reação para a obtenção de FGS-22. DCM: diclorometano, T. A.: temperatura ambiente.

v) Derivado naftoquinona de amirinas (FGS-23)

A um balão contendo 50 mg de FGS-3 dissolvidos em 10 mL de tolueno, foi acoplado um *Dean-Stark*. Em seguida adicionou-se 30 mg de 2-amino-1,4-naftoquinona e quantidade catalítica de ácido *p*-toluenossulfônico (TsOH). A reação foi aquecida até o refluxo e deixada

em agitação magnética por 6 horas (Figura 49). O produto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel, eluída com gradientes de hexano: acetato de etila.

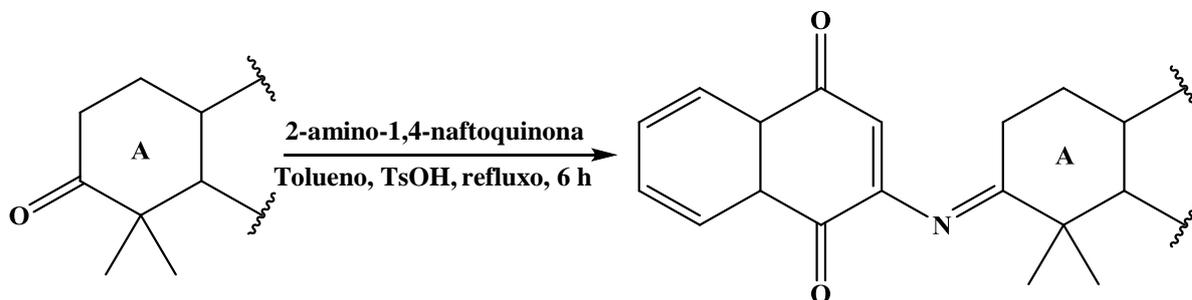


Figura 49. Esquema geral da reação para a obtenção de FGS-23. TsOH: ácido *p*-toluenossulfônico.

w) 3-benzil-amirinas (FGS-24)

A um balão contendo 104 mg de FGS-3, vedado com um septo de borracha e sob atmosfera de nitrogênio, foi adicionado 10 mL de tetrahydrofurano seco com o auxílio de uma seringa e sob agitação magnética. Em seguida, também com auxílio de uma seringa, foi adicionado 0,488 mmol de cloreto de benzilmagnésio. A reação foi deixada em agitação magnética em temperatura ambiente por 24 horas (Figura 50). Então, a reação foi lavada com água e a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro. O produto foi purificado por cromatografia em camada delgada preparativa eluída com hexano: acetato de etila (9:1).

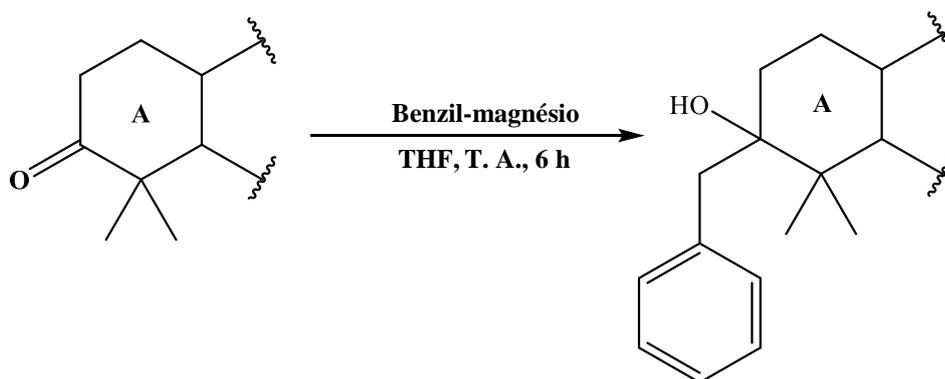


Figura 50. Esquema geral da reação para a obtenção de FGS-24. T. A.: temperatura ambiente.

4.1.4. Análise por espectrometria de ressonância magnética nuclear

Os derivados foram dissolvidos em 600 μ L de clorofórmio (Cambridge Isotope Laboratories, Andover, EUA) ou dimetilsulfóxido (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA)

deuterados, e transferidas a tubos de 7 polegadas e 5 mm de diâmetro. Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C foram obtidos em três equipamentos diferentes: um espectrômetro de 500 MHz (Bruker, Billerica, EUA), na Universidade Federal Fluminense; um de 400 MHz (Bruker, Billerica, EUA), no Laboratório de Química Medicinal da Universidade da Antuérpia; um de 300 MHz (Bruker, Billerica, EUA), na Central Analítica do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.

Os espectros foram processados no programa 1D NMR Processor versão 12.0 (ACD/LABS, Toronto, Canadá) e os deslocamentos químicos comparados com a predições de espectro obtidas no programa ChemBioDraw Ultra versão 14.0 (PerkinElmer, Whaltman, EUA) e dados da literatura. Os deslocamentos mais significativos para identificação dos compostos foram assinalados na estrutura do composto, e estão disponíveis nos Apêndices desta Tese.

4.1.5. Obtenção dos complexos de inclusão

Empregou-se uma variação do *Kneading method* (malaxagem), em que se busca otimizar a complexação por impacto físico da micromolécula com a ciclodextrina. No estudo realizado neste trabalho, seis variáveis foram analisadas, de acordo com o quadro 11. Os testes foram realizados com a amostra FGS-1, e o sistema que apresentou maior taxa de inclusão foi empregado nas demais amostras.

Quadro 11. Parâmetros avaliados no desenvolvimento dos complexos com ciclodextrinas

Ciclodextrina	Concentração	Solvente	Temperatura	Tempo	Dispositivo
β -ciclodextrina (βCD)	10 e 20 mM	Água desmineralizada Etanol THF 50%	Ambiente 75 °C	72 h 96 h	UniPrep™ Eppendorf®
Hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- βCD)	10, 50 100 e 200 mM				
Sulfobutiléter- β -ciclodextrina (SBE- βCD)	10, 50 100 e 200 mM				

Primeiramente, as ciclodextrinas foram solubilizadas sob agitação magnética em 1 mL de água desmineralizada, etanol ou THF 50% nas diferentes concentrações descritas no quadro 11. Ao final da dissolução, a solução de ciclodextrinas foram transferidas para o UniPrep™ (0,5 mL) ou Eppendorf® (1 mL), que continham 5 mg de FGS-1. Os sistemas foram fechados e colocados em agitação orbital com ou sem aquecimento (Figura 51). Ao final de 72 h ou 96 h, as amostras foram secas em estufa a 60 °C por 5 horas, para eliminação do THF, prevenindo falsos-positivos.

Para avaliação da complexação, os resíduos foram solubilizados em água desmineralizada, filtrados em filtro de fibra de vidro, e 50 µL da solução foram diluídos até 1 mL com metanol grau CLAE e analisadas pelo mesmo método CLAE desenvolvido e validado anteriormente neste trabalho (Quadro 10, seção 4.1.2.2). Contudo, nessas análises, empregou-se uma coluna GraceSmart® RP18 150 x 4,6 mm, 5 µm, 120 Å. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

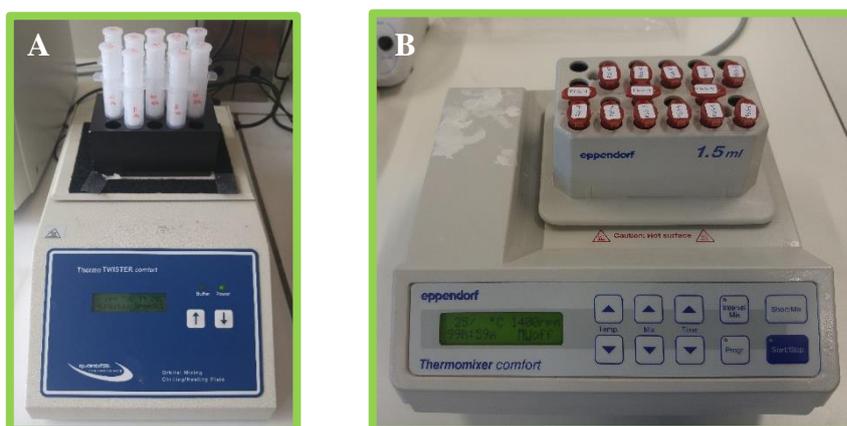


Figura 51. Sistemas para a preparação dos complexos de inclusão com ciclodextrinas. A: Sistema de agitação em filtros *syringeless* UniPrep™ (GE Healthcare Life Science, Pittsburgh, EUA). B: Sistema de agitação em tubos *safe-lock* (Eppendorf®, Hamburgh, Alemanha).

4.1.6. Avaliação do potencial farmacológico *in vitro* e *in silico*

4.1.6.1. Atividade antimicrobiana

As amostras foram dissolvidas a 40 mM em DMSO e 30 μ l foram transferidos para o poço 2 de uma placa de fundo em V de 96 poços contendo 30 μ l de DMSO (diluição 1:1). Realizaram-se dez diluições em série até o poço 11. Exatamente 11,76 μ L desta diluição foram transferidos para novas placas de 96 poços de fundo em V contendo 80 μ l de água desmineralizada estéril e 10 μ L desta solução foram transferidos (a partir da concentração mais baixa para a concentração mais elevada) para diferentes placas de teste, preparadas manualmente de acordo com o protocolo para cada micro-organismo ou célula, respeitando o volume final de 200 μ L por poço (COS et al., 2006):

- *Trypanosoma cruzi* (Talahuaen): cada poço contendo 3×10^3 células MRC-5 e 3×10^4 tripomastigotas em meio MEM (*Minimum Essential Medium*, Sigma-Aldrich) completo a 37 °C sob atmosfera de 5% de CO₂.
- *Trypanosoma brucei*: cada poço contendo 10^4 tripomastigotas meio HMI (Hirumi-9) a 37 °C sob atmosfera de 5% de CO₂.
- *Leishmania infantum*: 10^4 macrófagos murinos peritoneais (colhidas após estimulação intraperitoneal com amido aquoso a 2%) e 10^5 amastigotas por poço, previamente incubados por 5 dias.
- *Staphylococcus aureus* ATCC6538: 5×10^3 cepas por poço em ágar Müller-Hinton.
- *Escherichia coli* ATCC8739: 5×10^3 cepas por poço em ágar Müller-Hinton.
- *Candida albicans*: 10^4 CFU/mL em ágar Sabouraud.
- MRC-5 (linfoblastos humanos) ou macrófagos peritoneais murinos (PMM): 5×10^5 células poço em meio DMEM, previamente aderidas por 4 horas em a 37 °C sob atmosfera de 5% de CO₂

Desta maneira, a concentração final de DMSO foi de 13 % em água desmineralizada estéril, evitando qualquer interferência da toxicidade desse solvente nos resultados dos testes. Ao final dos testes as placas foram reveladas com solução de Resazurina e lidas em espectrofotômetro.

A concentração das amostras solúveis em DMSO (FGS-10, FGS-16, FGS-17, FGS-20 e FGS-23) variou entre 256 e 0,5 μM , partindo de uma solução de 40 mM em DMSO das amostras, ou seja, foram diluídas 156,25 vezes. As amostras complexadas com ciclodextrina receberam o mesmo tratamento, contudo sua concentração na placa variou de acordo com a concentração da solução inicial com o complexo, que foi diferente para cada amostra. O quadro 12 mostra a concentração inicial e final de cada amostra avaliada nos testes.

Quadro 12. Concentração das amostras no *screening* antimicrobiano

Amostra	Sistema de diluição	Concentração inicial	Concentração final
FGS-1	SBE- β CD	4,33 nM	8,45 pM
FGS-2	SBE- β CD	0,91 nM	1,79 pM
FGS-3	SBE- β CD	0,69 nM	1,36 pM
FGS-4	SBE- β CD	0,90 nM	1,76 pM
FGS-5	SBE- β CD	0,47 nM	0,92 pM
FGS-6	SBE- β CD	2,20 nM	4,30 pM
FGS-7	SBE- β CD	0,31 nM	0,60 pM
FGS-8B	SBE- β CD	2,37 nM	2,39 pM
FGS-9	SBE- β CD	0,34 nM	4,63 pM
FGS-10	DMSO	256 μM	500 pM
FGS-12B	SBE- β CD	2,68 nM	5,23 pM
FGS-13	SBE- β CD	1,09 nM	2,13 pM
FGS-16	DMSO	256 μM	500 pM
FGS-17	DMSO	256 μM	500 pM
FGS-18	SBE- β CD	2,80 nM	5,48 pM
FGS-19	SBE- β CD	1,93 nM	3,77 pM
FGS-20	DMSO	256 μM	500 pM
FGS-23	DMSO	256 μM	500 pM

Foram utilizadas diferentes drogas-padrão para cada micro-organismo testado: benznidazol para *T. cruzi*; doxiciclina para *S. aureus* e *E. coli*; flucitosina para *C. albicans*;

miltefosina para *L. infantum*; suramina para *T. brucei*. Tamoxifeno foi usado na avaliação da citotoxicidade contra células MRC-5. Todas as drogas foram avaliadas nas mesmas condições das amostras.

4.1.6.2. Ancoragem molecular

Para investigar uma possível interação dos compostos identificados nos extratos com os alvos enzimáticos de interesse neste estudo, realizou-se estudos de ancoragem empregando as estruturas cristalinas disponíveis no *Protein Data Bank* (PDB). Selecionou-se enzimas cocrystalizadas com inibidores conhecidos, para realização da validação do teste por *redocking* e também para que eles servissem de controle positivo: CYP51 de *Trypanosoma brucei* (PDB: 2WV2), *Trypanosoma cruzi* (PDB: 3k1O), *Leishmania infantum* (PDB: 3L4D) e *Candida albicans* (PDB: 5FSA).

Moléculas de água, moléculas usadas na cristalização de proteínas e íons não necessários à atividade catalítica foram removidos no *software* Pymol (Schrödinger, Cambridge, EUA), e a carga parcial atômica da proteína foi calculada pelo método *Gasteiger*. As estruturas químicas dos ligantes foram desenhadas em 3D com o programa ChemBioDraw Ultra 11.0 e foram submetidas à minimização energética pelo *Merck Molecular Force Field* (campo de força MMFF94). O *software* AutoDock 4.2 (The Scripps Research Institute, Jupiter, EUA) foi empregado para realizar as simulações e as análises dos acoplamentos, com os mesmos parâmetros citados no quadro 8 (seção 3.1.2.7).

4.2. Resultados e discussão

4.2.1. Obtenção e caracterização dos extratos hexânicos

Os rendimentos dos extratos hexânicos de *B. crispa* (0,52 %), *B. duckeana* (0,36%), *B. garcibarrigae* (0,35%) e *B. incarnata* (1,19%) foram considerados baixos. É possível que

métodos como extração em Soxhlet proporcionem rendimentos mais elevados, por empregarem temperaturas mais altas e vários ciclos de lavagem do material vegetal pelo solvente. Durante a concentração em rotaevaporador, ocorreu a formação de um precipitado branco abundante em todos os extratos.

Considerando o perfil químico do gênero *Byrsonima*, foi realizada uma análise por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC), utilizando diferentes padrões de triterpenos. Na análise por CCD, os extratos apresentaram um *spot* intenso no mesmo fator de retenção (Rf) da mistura dos triterpenos α e β -amirina e, além disso, apresentavam perfil cromatográfico muito semelhante entre si. Decidiu-se, então, reunir os extratos para a obtenção desses triterpenos na maior quantidade possível (Figura 52).

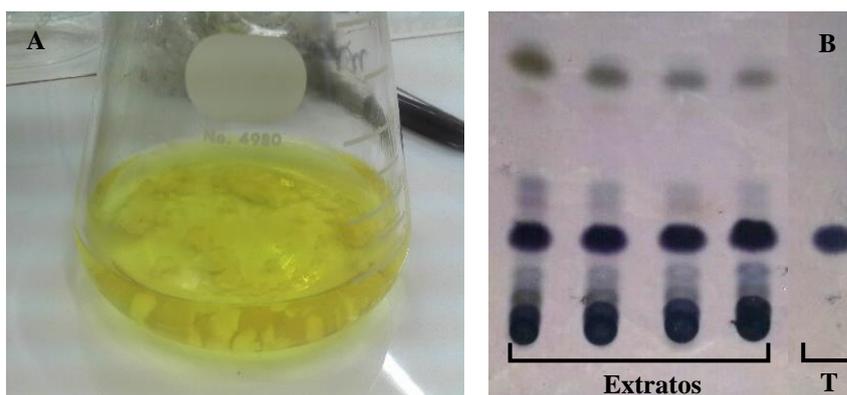


Figura 52. Análise cromatográficas preliminares dos extratos hexânicos. A: precipitado branco formado durante a concentração dos extratos. B: análise dos extratos por CCDC, na sequência: *B. crispera*, *B. duckeana*, *B. garcibarrigae* e *B. incarnata*. T: mistura de α e β -amirina, Eluente: hexano: acetato de etila (9,5: 0,5). Revelador: anisaldeído sulfúrico. Rf = 0,2.

Com base nas conhecidas características cromatográficas e de solubilidade da mistura de α e β -amirina, procedeu-se à lavagem exaustiva dos extratos com acetona e metanol, auxiliada por ultrassom, até não se observar mais coloração amarela no resíduo. Após a eliminação completa dos solventes, obteve-se 12,28 g de um pó branco amorfo, nomeado FGS-1. A pureza foi inicialmente constatada por CCD (Figura 53). Posteriormente, a pureza e a estrutura dos compostos presentes na amostra foram constatadas por cromatografia gasosa e por RMN de ^1H e ^{13}C (Apêndices), respectivamente.

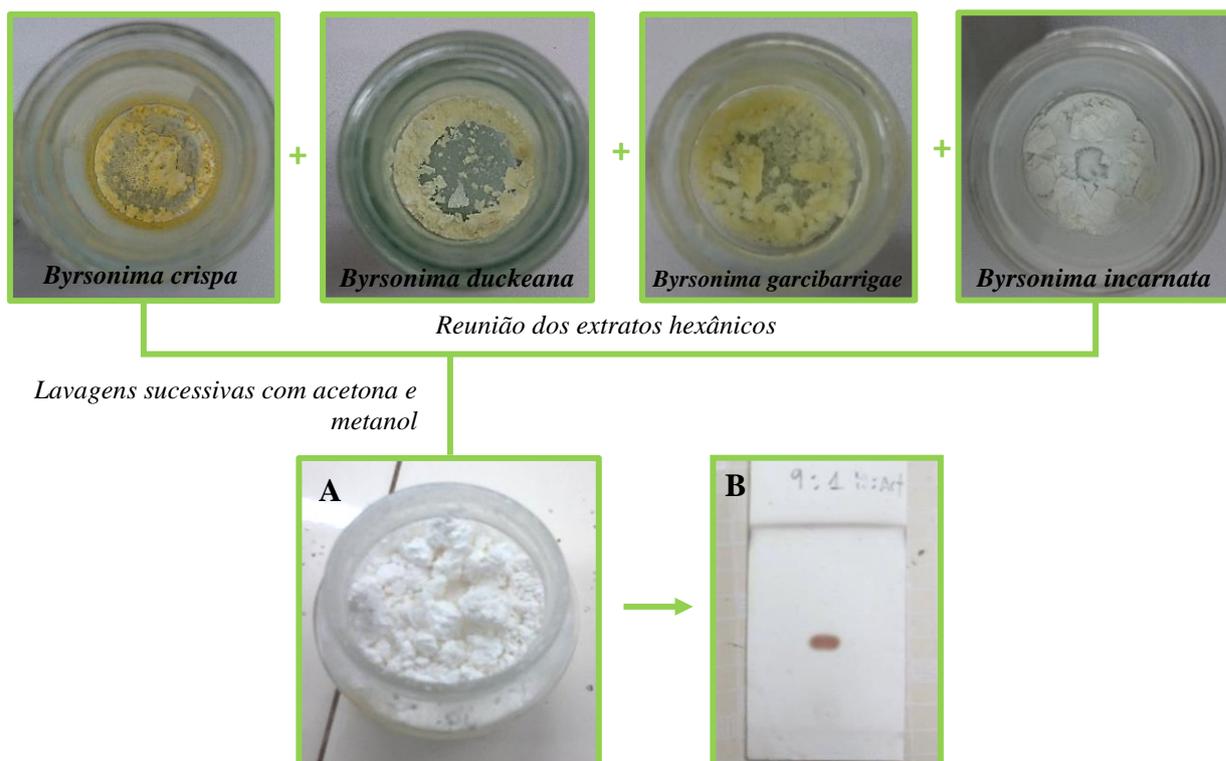


Figura 53. Obtenção da mistura de α e β -amirinas a partir dos extratos hexânicos. A: amostra obtida após as lavagens sucessivas. B: CCD comprovando preliminarmente a pureza da mistura de α e β -amirinas. Eluente: hexano: acetato de etila (9:1). Revelador: anisaldeído sulfúrico.

No cromatograma abaixo (Figura 54) notam-se apenas dois picos referentes a α -amirina, com tempo de retenção de 14,11 minutos, e β -amirina, com tempo de retenção de 14,64 minutos, identificados por comparação com os cromatogramas dos respectivos padrões. Dessa forma, é possível presumir que a área dos respectivos picos como proporcional à quantidade de cada uma das substâncias na amostra. Assim sendo, a mistura contém cerca de 79 % de α -amirina e 21 % de β -amirina. Adicionalmente, o cromatograma denota claramente a pureza da amostra, que contém somente os dois isômeros, comprovando que método empregado na purificação dessas compostos a partir de *Byrsonima* spp., além de simples e barato, é bastante eficiente.

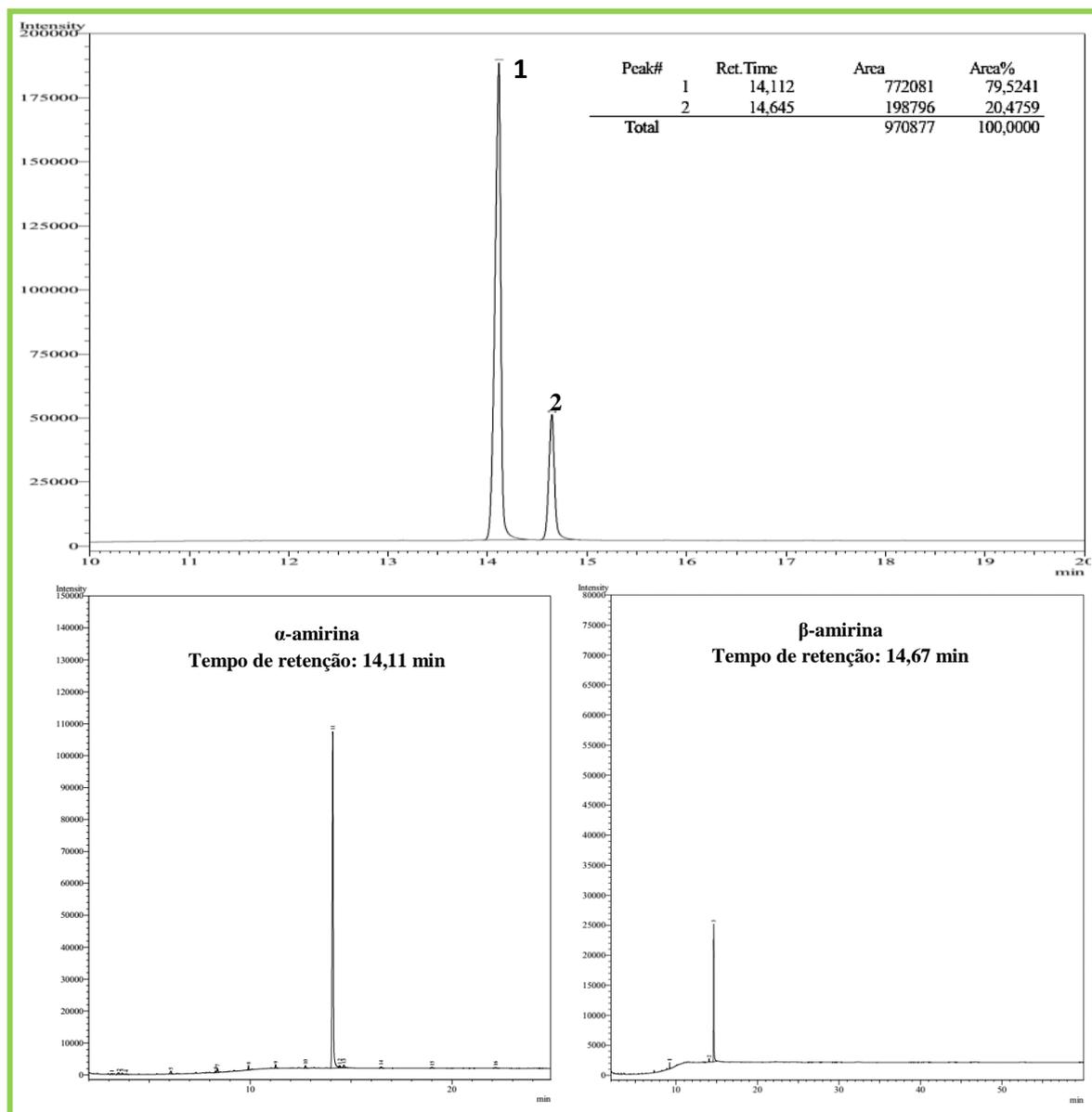


Figura 54. Cromatograma gasoso da FGS-1 e dos padrões α e β -amirina.

4.2.1.1. Quantificação de α e β -amirina

No método desenvolvido, os picos referentes a cada um dos isômeros não apresentaram traços de impurezas, o que denota seletividade do método. A linearidade das curvas foi superior a 0,99 ($R^2 = 0,9902$ para α -amirina e $R^2 = 0,9916$ para β -amirina), o que indica baixa dispersão entre os pontos das curvas, e que os resultados são diretamente proporcionais à quantidade dos padrões nas amostras. A repetitividade (precisão) do método foi considerada adequada, já que o coeficiente de variação entre três leituras de cada concentração foi de 6,10 para α -amirina e

5,87 para β -amirina. A recuperação (exatidão) da curva de α -amirina foi de 100 %. A robustez do método foi constatada ao se analisar a amostra purificada FGS-1, em outro equipamento. Mesmo variando algumas condições de análise, o sistema foi eficiente em separar os picos de α e β -amirina (RIBANI et al., 2004).

Um dos méritos do método cromatográfico desenvolvido neste estudo é justamente sua capacidade de separação dos isômeros α -amirina e β -amirina, a qual é considerada muito difícil por técnicas cromatográficas usuais (HALDAR et al., 2014), que permitiu que os isômeros pudessem ser quantificados separadamente nos extratos hexânicos. A Figura 55 mostra a quantificação referente a cada curva analítica.

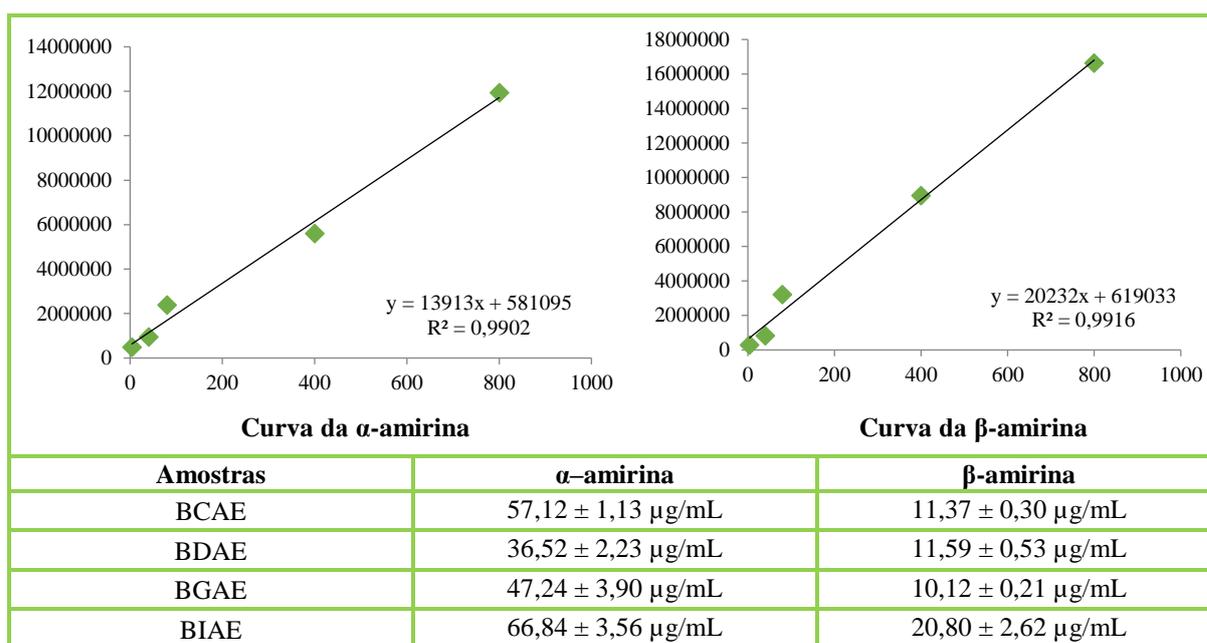


Figura 55. Quantificação dos triterpenos α -amirina e β -amirina nos extratos hexânicos.

Considerando que extratos vegetais normalmente são uma mistura complexa de substâncias, a quantidade dos isômeros detectada nos extratos pode ser considerada expressiva. Os valores encontrados nessa quantificação são coerentes com o perfil apresentado pela FGS-1 quando analisada por cromatografia gasosa, o que mostra mais uma vez a exatidão do método CLAE desenvolvido neste trabalho.

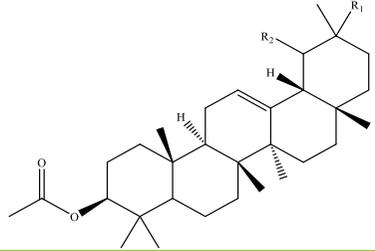
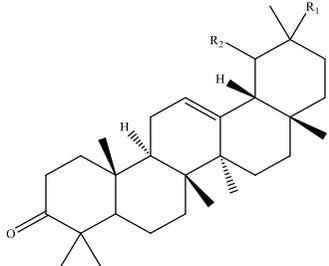
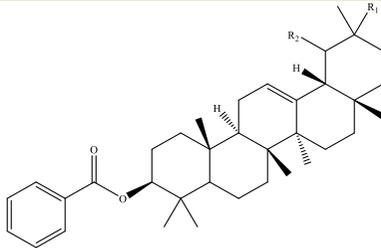
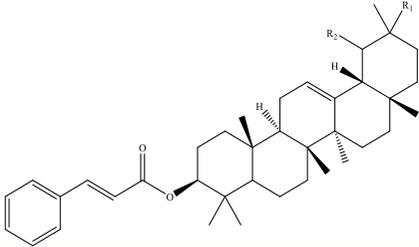
4.2.2. Obtenção dos derivados de α e β -amirina

A facilidade de obtenção dos isômeros α e β -amirina em *B. crispa*, *B. duckeana*, *B. garcibarrigae* e *B. incarnata*, credenciam essas espécies como fonte dessas substâncias. Seu esqueleto central pentacíclico se assemelha bastante com o esqueleto de esteróis, considerados “estruturas privilegiadas” no contexto da química medicinal. Esse é um termo designado a substâncias que tem habilidade de interagir com múltiplos alvos terapêuticos (WELSCH et al., 2010). Não obstante, esteróis são esqueleto básico de importantes medicamentos da terapêutica humana, como os anti-inflamatórios esteroidais, e hormônios sintéticos usados na atenuação dos sintomas da menopausa, tais como a medrogestona (JIANG et al., 2015).

Tais fatos motivaram a realização de modificações moleculares nesses isômeros, visando obter novas moléculas com atividade antimicrobiana. Utilizou-se métodos fundamentados na química sintética clássica para a obtenção dos 23 derivados triterpênicos relatados nesta Tese. Os principais mecanismos para a obtenção dos derivados foram esterificações, alquilações, oxidações e condensações no anel A da estrutura dos triterpenos, notadamente na posição 3, um dos poucos pontos reativos nas moléculas em condições brandas, devido a presença de um grupo hidroxila.

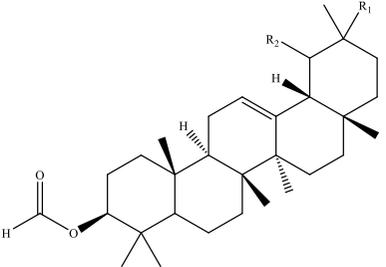
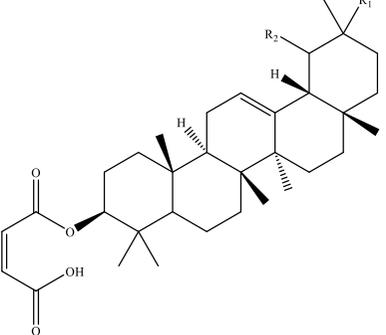
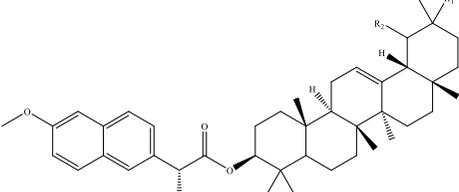
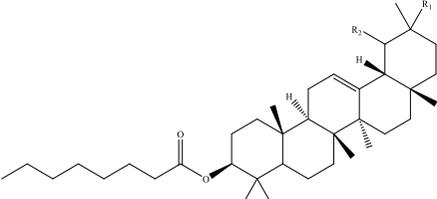
Entre todas as reações realizadas e purificadas (as 23 que estão relatadas no tópico 4.1.3 deste Capítulo), 16 foram bem-sucedidas, ou seja, tiveram a estrutura do produto proposto confirmada por RMN de ^1H e ^{13}C . Problemas na aquisição dos espectros de FGS-11, FGS-14, FGS-15, FGS-20, FGS-21, FGS-22 e FGS-24 dificultaram a confirmação das suas respectivas estruturas, por isso essas amostras não foram incluídas nesta seção de resultados. O quadro 13 mostra a estrutura, rendimento e algumas características físico-químicas dos derivados com estrutura confirmada por RMN de ^1H e ^{13}C . Os respectivos espectros com a assinalação dos deslocamentos se encontram nos Apêndices desta Tese.

Quadro 13. Estrutura e características físico-químicas dos derivados de α e β -amirinas.

Código	Estrutura ^a	Aspecto	Rendimento	Fórmula molecular	M. M. (g/mol)	Solubilidade ^b	P.F (°C)	Log <i>P</i>
FGS-2		Sólido branco	95 %	C ₃₂ H ₅₂ O ₂	468,40	THF Clorofórmio	391,48 (α) 419,62 (β)	8,49 (α) 8,63 (β)
FGS-3		Sólido branco	70 %	C ₃₀ H ₄₈ O	424,37	THF Clorofórmio	399,07 (α) 385,01 (β)	8,75 (α) 7,62 (β)
FGS-4		Sólido branco	93 %	C ₃₇ H ₅₄ O ₂	530,41	THF Clorofórmio	474,25 (α) 502,39 (β)	10,39 (α) 10,53 (β)
FGS-5		Sólido amarelado	95 %	C ₃₉ H ₅₆ O ₂	556,43	THF Clorofórmio	491,71 (α) 519,85 (β)	10,73 (α) 10,87 (β)

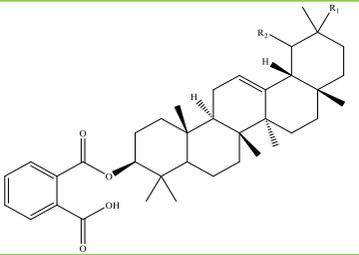
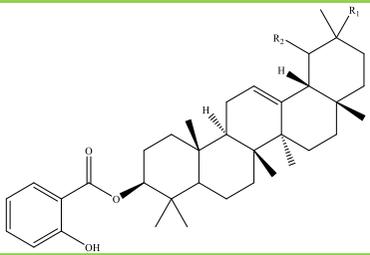
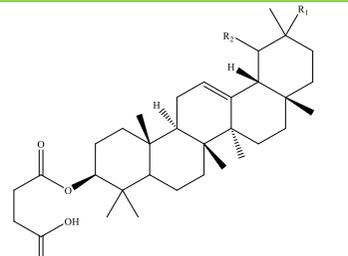
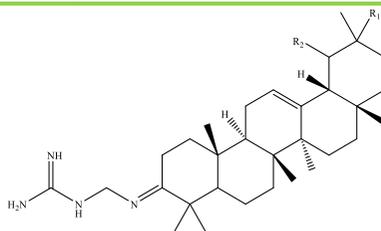
(Continua)

(Continuação do Quadro 13)

Código	Estrutura ^a	Aspecto	Rendimento	Fórmula molecular	M. M. (g/mol)	Solubilidade ^b	P.F (°C)	Log <i>P</i>
FGS-6		Sólido branco	75 %	C ₃₁ H ₅₀ O ₂	454,38	THF Clorofórmio	402,11 (α) 430,25 (β)	8,38 (α) 8,52 (β)
FGS-7		Sólido amarelado	33 %	C ₃₄ H ₅₂ O ₄	524,39	THF Clorofórmio	569,54 (α) 597,68 (β)	8,44 (α) 8,58 (β)
FGS-8		Sólido branco	---	C ₄₄ H ₆₂ O ₃	638,47	THF Clorofórmio	ND	ND
FGS-9		Sólido amarelado	80 %	C ₃₈ H ₆₄ O ₂	552,49	THF Clorofórmio	ND	ND

(Continua)

(Continuação do Quadro 13)

Código	Estrutura ^a	Aspecto	Rendimento	Fórmula molecular	M. M. (g/mol)	Solubilidade ^b	P.F (°C)	Log <i>P</i>
FGS-10		Sólido branco	44 %	C ₃₈ H ₅₄ O ₄	574,40	DMSO	658,64 (α) 686,78 (β)	9,95 (α) 10,09 (β)
FGS-12		Sólido branco	94 %	C ₃₇ H ₅₄ O ₃	546,41	THF Clorofórmio	585,97 (α) 614,11 (β)	10,00 (α) 10,14 (β)
FGS-13		Sólido branco	64 %	C ₃₄ H ₅₄ O ₄	526,40	THF Clorofórmio	574,62 (α) 602,76 (β)	8,16 (α) 8,30(β)
FGS-16		Sólido amarelado	86 %	C ₃₂ H ₅₄ N ₄	494,43	DMSO	ND	8,87 (α) 9,01 (β)

(Continua)

(Continuação do Quadro 13)

Código	Estrutura ^a	Aspecto	Rendimento	Fórmula molecular	M. M. (g/mol)	Solubilidade ^b	P.F (°C)	Log P
FGS-17		Sólido branco	28 %	C ₃₆ H ₅₁ N	497,40	DMSO	ND	9,79 (α) 9,93 (β)
FGS-18		Sólido branco	100 %	C ₃₀ H ₄₉ NO	439,38	THF Parcialmente solúvel em Clorofórmio e DMSO	ND	9,14 (α) 9,28 (β)
FGS-19		Sólido branco	71 %	C ₄₃ H ₆₆ O ₂	614,51	THF Clorofórmio	ND	ND
FGS-23		Sólido amarelo	30 %	C ₄₀ H ₅₃ NO ₂	579,41	DMSO	ND	ND

^aR₁ = H, R₂ = CH₃ (α-amirina); R₁ = CH₃, R₂ = H (β-amirina)^bSolventes testados: THF, Clorofórmio, DMSO

O interesse na obtenção de ésteres de α e β -amirinas devido aos diferentes relatos na literatura de que esse tipo de modificação tende a aumentar a atividade antimicrobiana desses compostos. Além disso, esse tipo de reação química possui procedimento fácil, rápido e barato, que são características importantes a serem consideradas na busca por novos antimicrobianos. Alguns derivados obtidos já haviam sido relatados na literatura, contudo, sua atividade antimicrobiana não havia testada ou, em alguns casos, somente contra alguns micro-organismos diferentes dos abordados nesse estudo.

A síntese dos derivados acetato (FGS-2), amirenona (FGS-3), benzoato (FGS-4), formiato (FGS-6), octanoato (FGS-9), ftalato (FGS-10), propanoato (FGS-11), butanoato/butirato (FGS-21) e hexanoato (FGS-22) da mistura de α e β -amirinas já havia sido relatada na literatura. Contudo, com exceção da FGS-11, foram realizadas algumas alterações nos procedimentos que melhoraram os rendimentos divulgados. Ademais, essas moléculas só haviam sido investigadas em modelos de dor inflamatória (SOLDI et al., 2008). De forma semelhante, outros trabalhos já haviam relatado a obtenção de cinamato (FGS-5) (BANDEIRA et al., 2007), maleato (FGS-7), e succinato (FGS-13) (BARROS et al., 2011), porém, com baixo rendimento. Neste trabalho, substituiu-se o DCC-DMAP ácido perclórico p.a., e obteve-se rendimentos superiores, com menor tempo de reação.

Os quatro derivados nitrogenados obtidos por acoplamento da FGS-1 com aminoguanidina (FGS-16), dinitrofenilhidrazina (FGS-17), hidroxilamina (FGS-18) e aminoquinona (FGS-23), assim como os derivados híbridos obtidos por esterificação de FGS-1 com naproxeno (FGS-8), ácido salicílico (FGS-12) e ibuprofeno (FGS-19), embora inspirados em modificações estruturais de outros triterpenos ou mesmo reações orgânicas clássicas, são inéditos na literatura científica.

4.2.3. Obtenção dos complexos de inclusão

Considerando que o método a ser utilizado dos ensaios antimicrobianos dos derivados impossibilitava o uso de suspensões ou soluções pouco estáveis, havendo ainda limitação ao uso de DMSO ou água estéril como solventes, foi realizado um estudo da viabilidade da obtenção de complexos de inclusão com ciclodextrinas, com o objetivo de melhorar a solubilidade em água dos compostos, permitindo ainda a esterilização do sistema.

Um dos métodos mais utilizados para a obtenção desses complexos em escala laboratorial é a malaxagem, pois é barato e apresenta rendimento satisfatório. Nesse procedimento, a amostra é triturada em um graal juntamente com a ciclodextrina e um solvente, normalmente etanol ou água, por vários minutos até horas, que vai sendo eliminado gradualmente do sistema por evaporação, seguida de secagem em estufa (DA CUNHA FILHO; SÁ-BARRETO, 2007). Dada a quantidade de amostras lipossolúveis geradas neste trabalho, esse procedimento essencialmente manual tornou-se inviável.

Visando mimetizar o impacto forçado entre as moléculas da amostra e as ciclodextrinas, principal diferencial do método da malaxagem, substituiu-se a agitação manual por agitação orbital mecânica, aumentando-se o tempo de contato. No estudo desenvolvido neste trabalho, as primeiras tentativas utilizaram exclusivamente o sistema UniPrep™, 5 mg de FGS-1 e 500 µL de solução de ciclodextrinas em água desmineralizada ou etanol, nas concentrações mostradas no quadro 11 (seção 4.1.5). Esses são solventes normalmente utilizados na literatura para a obtenção de complexos com ciclodextrinas com diversas amostras.

Observou-se que o sistema UniPrep™ não era hermeticamente fechado, facilitando a evaporação do solvente ao passar do tempo, o que poderia ter impacto negativo na formação dos complexos. Notou-se ainda que o aquecimento do sistema apenas intensificava a evaporação, sem proporcionar incremento significativo na formação dos complexos. A vedação do sistema com Parafilm M® minimizou as perdas de solvente, mas observou-se que boa parte

da amostra ainda permanecia em suspensão mesmo após várias horas em agitação contínua. Os sistemas contendo a máxima concentração de ciclodextrinas apresentaram os melhores resultados, mas o processo ainda precisava ser otimizado.

Percebeu-se que era necessário adicionar ao sistema um solvente para a amostra, para que as moléculas se dispersassem, facilitando a inclusão. O tetrahidrofurano (THF) foi a primeira escolha, por ser miscível com uma ampla gama de solventes, incluindo polares, além de ser um excelente solvente para FGS-1 e seus derivados. Dado que as ciclodextrinas eram pouco ou insolúveis em THF, manteve-se a água no sistema, na proporção de 50 %.

Visando avaliar se a evaporação do solvente era realmente crítica para a eficiência do método, comparou-se o sistema UniPrep™ vedado com tubos *safe-lock* Eppendorf®, como dispositivos do sistema. Para tanto, sistemas contendo a máxima concentração das ciclodextrinas (20 mM de β CD e 200 nM de HP- β CD e SBE- β CD) e 5 mg de amostra foram agitados em triplicata nos diferentes dispositivos, durante 96 horas. Ao final, as soluções foram levadas a secar em estufa a 60 °C por 5 horas, ressuspendidas em 0,5 mL de água desmineralizada, filtradas em fibra de vidro (UniPrep™) e analisadas por CLAE, nas condições descritas no quadro 10 (seção 4.1.2.2). A figura 56 mostra a quantificação FGS-1 nas soluções agitadas com as diferentes ciclodextrinas.

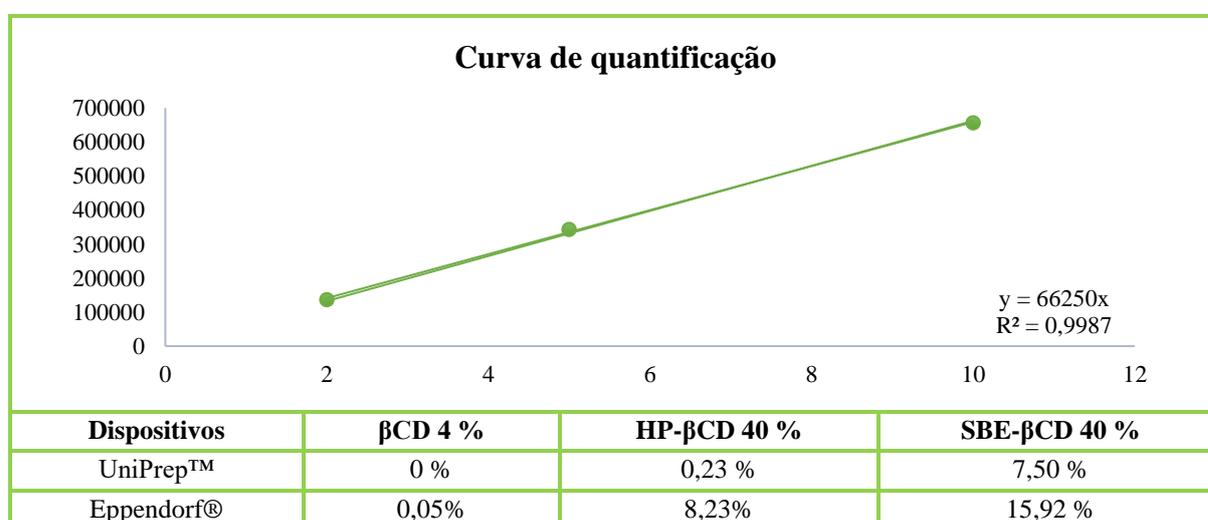


Figura 56. Concentração de FGS-1 nas soluções contendo os complexos com ciclodextrinas.

Todos os sistemas que utilizaram os tubos *safe-lock* Eppendorf® tiveram melhor desempenho que os sistemas montados no dispositivo UniPrep™, sugerindo, portanto, que a evaporação tem influência negativa na eficiência do método. Comparando-se as diferentes ciclodextrinas, constatou-se que o sistema contendo SBE-βCD obteve o melhor desempenho em nos dois dispositivos.

Sendo assim, realizou-se uma nova bateria de análises, comparando as concentrações de 10, 50, 100 e 200 mM de SBE-βCD em Eppendorf®, para avaliar se era possível diminuir sua quantidade no sistema. Contudo, a complexação foi proporcional à quantidade de SBE-βCD: 0,30 %, 1,13 %, 5,11 % e 27,97 % respectivamente. Dessa forma, definiu-se que o sistema contendo 5 % de amostra e 40 % de SBE-βCD, dispersos em THF 50%, e agitados em Eppendorf® por 72 horas (FGS-M), foi o mais eficiente para a complexação da FGS-1, sendo este o método escolhido para a complexação das demais amostras.

A próxima etapa do estudo foi aplicar o FGS-M na complexação nos derivados de FGS-1. Na tentativa de obter a maior quantidade possível dos complexos, aumentou-se a massa de amostras no sistema. A figura 57 mostra os dados da complexação dos derivados triterpênicos com a SBE-βCD. A complexação foi realizada somente com as amostras insolúveis em DMSO, conforme descrito no quadro 12 (seção 4.1.6.1) e no quadro 13 (seção 4.2.2).

O aumento da quantidade de amostra no sistema não necessariamente melhorou a complexação. Contrariamente, as amostras que estavam em menor proporção nos seus respectivos sistemas, apresentam as melhores taxas de complexação. Nota-se isso claramente nas amostras FGS-8 e FGS-12, que foram complexadas em duas quantidades diferentes: as amostras FGS-8B e FGS-12B, em menor quantidade, apresentaram uma complexação mais eficiente. Contudo, as soluções obtidas nessa última bateria de complexação foram filtradas em fibra de vidro de 0,22 μm para garantir a esterilidade, e utilizadas nas concentrações em que foram obtidas nos testes antimicrobianos.

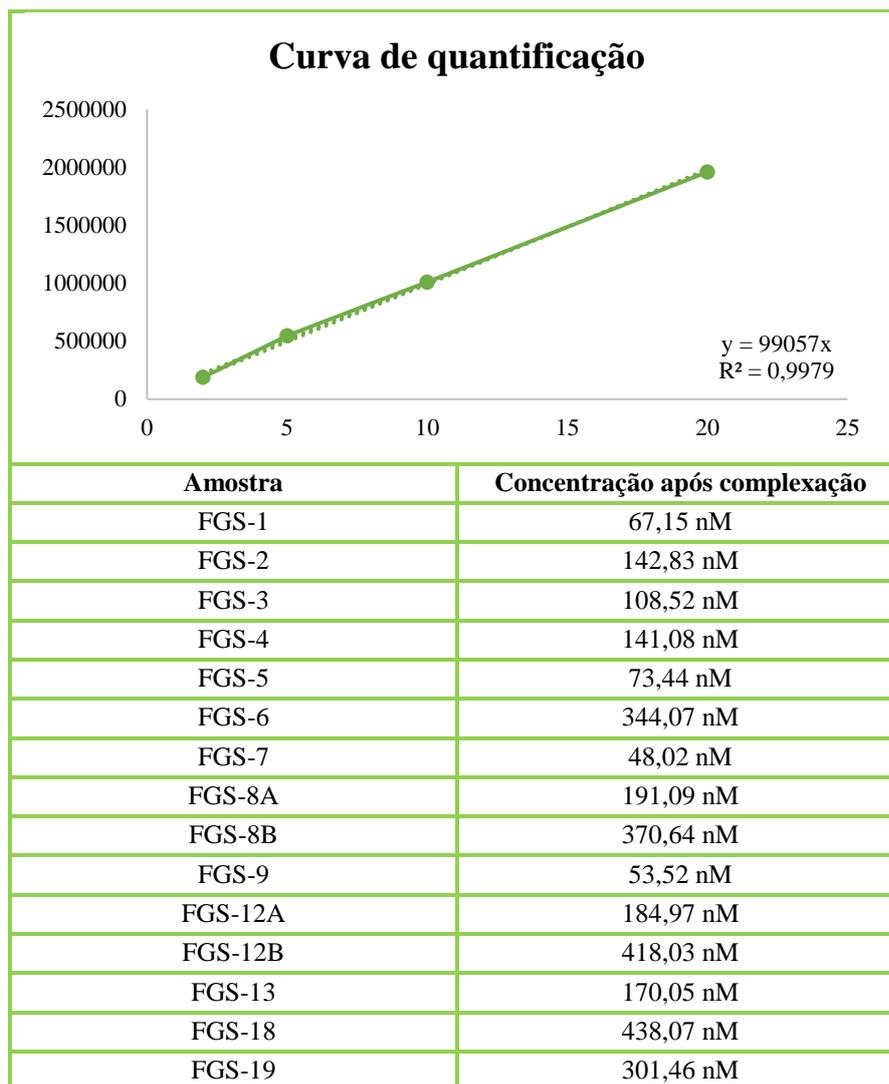


Figura 57. Resultado da complexação dos derivados triterpênicos com a SBE- β CD. As concentrações dos complexos de cada derivado foram calculadas em função da curva de calibração construída com FGS-1.

A escala do método pode ser facilmente aumentada, pois utilizada instrumentos comuns e disponíveis em diversas capacidades. Além disso, embora existam trabalhos que abordam a complexação de ácido ursólico e oleanólico, entre outros triterpenos ácidos com diferentes ciclodextrinas (LIMA et al., 2016; SOICA et al., 2014b), não foram encontrados trabalhos publicados anteriormente acerca de complexos de inclusão de α e β -amirinas e seus derivados.

4.2.4. Avaliação do potencial farmacológico *in vitro* e *in silico*

4.2.4.1. Atividade antimicrobiana

O *screening* de atividade antimicrobiana com abordagem fenotípica apresenta como vantagens a consideração da célula inteira, possivelmente selecionando compostos com ação multialvo e com características favoráveis como a capacidade de permeação das membranas, por exemplo. Associado a uma abordagem simultânea contra células humanas, esses *screenings* fornecem um painel completo sobre a potencialidade terapêutica e toxicidade do candidato a *hit* (FERREIRA et al., 2016).

A metodologia empregada neste estudo é internacionalmente utilizada para realizar o *screening* e determinar a CI_{50} de novos candidatos a fármacos antimicrobianos, como mostram diversos trabalhos publicados em revistas de alto impacto sobre o tema. Nela é utilizada uma plataforma automatizada que avalia a atividade antibacteriana, antifúngica e antiparasitária com abordagem fenotípica (COS et al., 2006). Paralelamente, neste estudo foi avaliada a citotoxicidade das amostras contra fibroblastos humanos e macrófagos murinos.

A maioria dos derivados obtidos é bastante solúvel em THF, o qual é miscível com água, porém, esse não é um solvente usual para sistemas *in vitro*. Embora seja utilizado na dissolução de carotenoides para testes frente a diferentes culturas celulares, não é solvente ideal devido a sua alta volatilidade, que poderia causar a precipitação das amostras, e às oxidações que pode sofrer no meio, afetando a estabilidade e a atividade dos compostos em teste (BOESCH-SAADATMANDI et al., 2011). Além disso, vários tipos de plástico, incluindo aqueles que compõem as microplacas de 96-poços que seriam utilizados nos testes, são degradados pelo THF. Assim, com base em pesquisas na literatura, avaliou-se que a opção mais promissora para melhorar a solubilidade dos compostos seria a obtenção de complexos de inclusão com ciclodextrinas, o que foi realizado conforme descrito na seção 4.1.5.

Ademais, os complexos formados seriam pré-formulações farmacêuticas que poderiam ser utilizados em outras avaliações de atividade farmacológica, inclusive *in vivo*, tornando ainda mais interessante o seu desenvolvimento. A literatura não reporta atividade antimicrobiana de ciclodextrinas e nenhuma interferência nas culturas dos micro-organismos testados foi observada nos testes preliminares que foram realizados com as ciclodextrinas utilizadas neste trabalho.

Por não terem sua estrutura confirmada por RMN de ^1H e ^{13}C , as amostras FGS-11, FGS-14, FGS-15, FGS-20, FGS-21, FGS-22 e FGS-24 não foram testadas quanto ao potencial antimicrobiano. Dentre as 18 amostras que foram testadas, cinco foram ativas contra parasitas tripanosomatídeos e/ou bactéria gram-positiva e/ou bactéria gram-negativa e/ou fungo, conforme mostrado na tabela 4, que não aborda os derivados inativos.

Tabela 4. CI_{50} e citotoxicidade dos derivados ativos no *screening* antimicrobiano

Amostra	<i>T. cruzi</i>	<i>T. brucei</i>	<i>L. infantum</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>	MRC-5	PMM
FGS-10	24,45	40,32	22,79	> 256,00	> 256,00	> 256,00	19,10	22,79
FGS-16	2,85	2,24	3,56	2,83	10,08	2,83	5,19	11,31
FGS-17	5,44	4,12	4,50	22,71	> 256,00	> 256,00	8,42	11,31
FGS-18*	2,00	> 2,80	> 2,80	> 2,80	> 2,80	2,49	> 2,80	> 2,80
FGS-23	21,70	22,46	22,79	82,52	> 256,00	> 256,00	43,12	22,63
Benznidazol	2,88	----	----	----	----	----	----	----
Doxiciclina	----	----	----	0,09	0,64	----	----	----
Flucitosina	----	----	----	----	----	0,54	----	----
Miltefosina	----	----	1,09	----	----	----	----	----
Suramina	----	0,04	----	----	----	----	----	----
Tamoxifeno	----	----	----	----	----	----	9,71	----

*Resultados da FGS-18 (complexada com SBE- β CD) estão em nM; Demais resultados estão em μM .

FGS-16 foi a mais ativa contra todos os micro-organismos testados. FGS-18 foi ativa frente a *T. cruzi* e *C. albicans*, demonstrando relativa seletividade. FGS-17 e FGS-23 foram ativas contra todos os parasitas e contra *S. aureus*. FGS-10 foi ativa somente contra os parasitas, indicando que pode atuar por algum mecanismo mais específico que os demais compostos. Nesse contexto, é válido destacar que a estrutura básica dos compostos desenvolvidos neste

trabalho difere consideravelmente dos fármacos utilizados no tratamento de infecções (Ver quadros 3, 4 e 5 nas seções 2.6, 2.7 e 2.8, respectivamente). Dessa forma, é possível que possuam mecanismo de ação diferente ou que interajam de maneira diferenciada com os mesmos.

Por outro lado, com exceção de FGS-18, esses compostos apresentaram toxicidade frente a células humanas e murinas. Em um primeiro momento, esse fato pode limitar seu potencial como novas drogas antimicrobianas. Contudo, nos testes realizados nenhuma das moléculas complexadas com SBE- β CD apresentou tal citotoxicidade, apesar de bastante lipofílicas. Já existem estudos que discutem uso de ciclodextrinas na modulação da toxicidade de algumas drogas, e até mesmo na modulação da resistência a drogas antiparasitárias (GARCIA-SALCEDO et al., 2016), e tem sido investigado o seu emprego na potencialização dos efeitos farmacológicos de triterpenos, como comentado na seção 2.11.

Sendo assim, é possível que o desenvolvimento de complexos de inclusão com a SBE- β CD possa tornar essas moléculas ativas mais seguras e até mais potentes. Tal hipótese não foi testada, pois o foco inicial na obtenção dos complexos era resolver a solubilidade dos compostos mais lipofílicos. Com exceção da FGS-18, todos os compostos ativos são solúveis em DMSO, o que permitiu a realização do *screening* antimicrobiano sem a complexação prévia com a SBE- β CD.

Devido a sua atividade contra bactéria gram-positiva e gram-negativa, decidiu-se testar FGS-16 contra outras cepas bacterianas pelo método de diluição em caldo, onde apresentou calculou-se as seguintes MIC: $15,21 \pm 0,5$ μ g/mL contra *Enterococcus* sp. (gram-positiva); $7,3 \pm 0,35$ μ g/mL contra *Pseudomonas* sp. (gram-negativa); $25,48 \pm 0,29$ μ g/mL contra *Salmonella* sp. (gram negativa). Contra cepas resistentes a antibióticos, essa amostra apresentou MIC de $7,9 \pm 0,78$ μ g/mL contra *Staphylococcus aureus* MRSA (gram-positiva, resistente a oxacilina,

amoxicilina e metilcilina) e de $7,9 \pm 0,14$ $\mu\text{g/mL}$ contra *Acinetobacter baumannii* Oxa-23 (gram-negativa, resistente a betalactâmicos, carbapenêmicos e vancomicina).

Portanto, a amostra FGS-16, obtida por hibridação da aminoguanidina com os triterpenos α e β -amirinas, é um possível candidato a antimicrobiano de amplo espectro. Contudo, levando-se em consideração a abordagem fenotípica das avaliações e as diferentes atividades apresentadas (antibacteriana, antifúngica, antiparasitária e citotóxica), torna-se difícil a discussão do seu mecanismo de ação neste momento, embora seja um indício de ação multialvo, que é um requisito importante para os antimicrobianos modernos (OLDFIELD; FENG, 2014).

Dada a estrutura dos triterpenos pentacíclicos, poderia ser sugerido que a ação citotóxica se deve a alguma alteração nas membranas lipídicas das diferentes células. Investigações conduzidas com os ácido oleanólico e ursólico, mostraram que esses compostos podem interferir na constituição da parede celular de bactérias (JESUS et al., 2015), e outros estudos já mostraram que eles são capazes de interferir na fluidez de membranas fosfolipídicas (TSUCHIYA, 2015). Contudo, esse mecanismo deveria justificar a ação de todos os derivados desenvolvidos neste trabalho, a qual não foi observada, ao menos nas concentrações testadas.

Por outro lado, embora não tenham apresentando ação tão potente quanto a da FGS-16, os demais compostos ativos foram mais seletivos, o que permite sugerir, ainda que preliminarmente, algum mecanismo de ação. FGS-10, FGS-17, FGS-18 e FGS-23 foram ativos, principalmente, contra os parasitas tripanosomatídeos. Com exceção de FGS-10, todas as amostras ativas são derivados nitrogenados dos triterpenos.

A presença de átomos de nitrogênio tem grande importância para a atividade contra enzimas da síntese do ergosterol. Os chamados antifúngicos azólicos (imidazólicos e triazólicos), tais como itraconazol, posaconazol e fluconazol, entre outros, são considerados os melhores antifúngicos existentes, atuam por inibição CYP51, a qual possui um Fe^{+3} ancorado

em uma protoporfirina em seu sítio ativo, que é o ponto de interação entre os átomos de nitrogênio das micromoléculas e a enzima (ODDS et al., 2003).

Portanto, a CYP51 já é um alvo terapêutico validado para antifúngicos há vários anos, embora resistência a diferentes azólicos já tenha sido registrada em *Candida* spp. (PFALLER, 2012). Estudos mais recentes têm apontado a mesma enzima como um alvo em parasitas tripanosomatídeos, principalmente, *T. cruzi* e *Leishmania* spp. A inibição dessa enzima interrompe o crescimento celular e pode levar ao colapso da membrana dos protozoários (VERMELHO et al., 2017). Destarte, antifúngicos azólicos têm sido investigados como antiparasitários (LEPESHEVA et al., 2011).

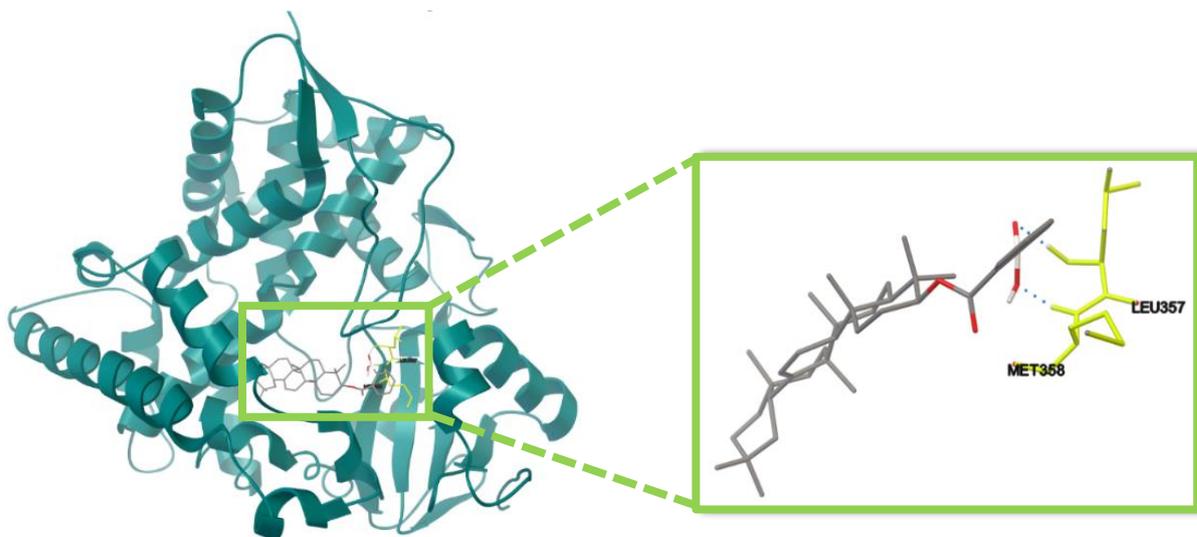
4.2.4.2. Ancoragem molecular

A análise de ancoragem molecular sugere que os derivados interagem com o sítio ativo da CYP51 de *Trypanosoma brucei* (CYPBR), *Trypanosoma cruzi* (CYPCZ) e *Leishmania infantum* (CYPIN) e *Candida albicans* (CYPCD). A tabela 5 mostra a afinidade de cada composto analisado frente as diferentes enzimas e a figura 58 mostra o modo de interação dos compostos de maior afinidade. Os isômeros α e β estão indicados pelas letras A e B, respectivamente, após a codificação das amostras.

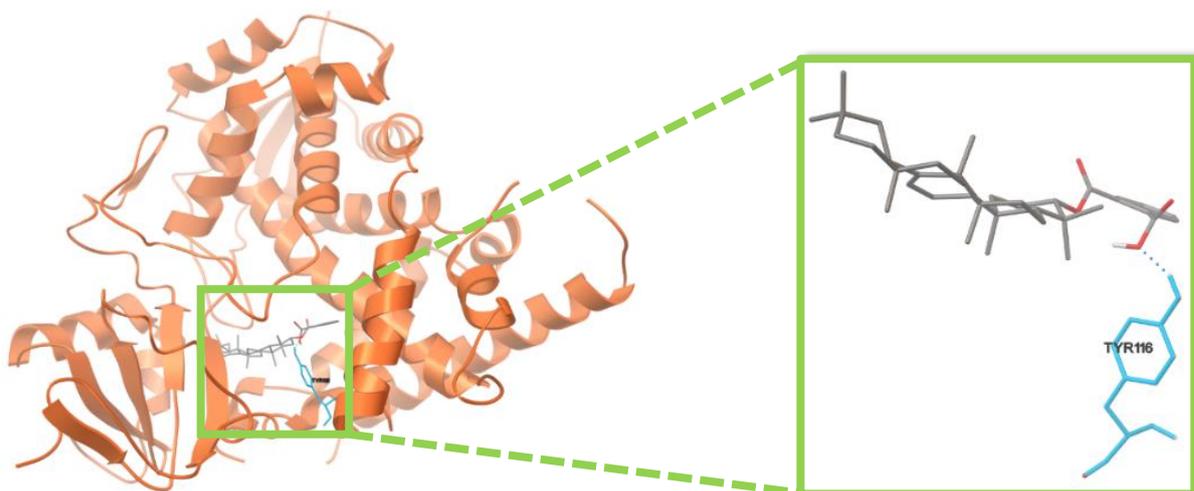
Tabela 5. Energia de interação dos derivados e CYP51 de tripanosomatídeos e *C. albicans*.

Compostos	CYPBR	CYPCZ	CYPIF	CYPCD
	(PDB: 2WV2)	(PDB: 3K10)	(PDB: 3L4D)	(PDB: 5FSA)
Kcal/mol				
FGS-10A	-11,75 ± 0,54	-13,89 ± 0,10	-12,90 ± 0,12	-13,22 ± 0,13
FGS-10B	-13,22 ± 0,22	-15,62 ± 0,06	-13,34 ± 0,28	-12,57 ± 0,13
FGS-16A	-12,11 ± 0,10	-12,83 ± 0,17	-13,01 ± 0,05	-13,96 ± 0,09
FGS-16B	-11,97 ± 0,05	-12,90 ± 0,06	-13,46 ± 0,07	-13,53 ± 0,66
FGS-17A	-10,67 ± 0,00	-11,42 ± 0,00	-12,90 ± 0,00	-10,89 ± 0,01
FGS-17B	-9,28 ± 0,00	-10,29 ± 0,01	-14,48 ± 0,00	-11,84 ± 0,00
FGS-18A	-12,25 ± 0,00	-13,27 ± 0,01	-12,49 ± 0,00	-12,82 ± 0,01
FGS-18B	-12,50 ± 0,00	-13,40 ± 0,01	-11,60 ± 0,00	-12,85 ± 0,01
FGS-23A	-11,18 ± 0,17	-13,39 ± 0,90	-11,34 ± 0,13	-13,79 ± 0,05
FGS-23B	-11,45 ± 0,00	-13,60 ± 0,05	-11,34 ± 0,01	-13,06 ± 0,28
Fluconazol	-6,73 ± 0,05	-----	-----	-13,00 ± 0,30
Posaconazol	-----	-14,09 ± 0,90	-7,20 ± 0,09	-----

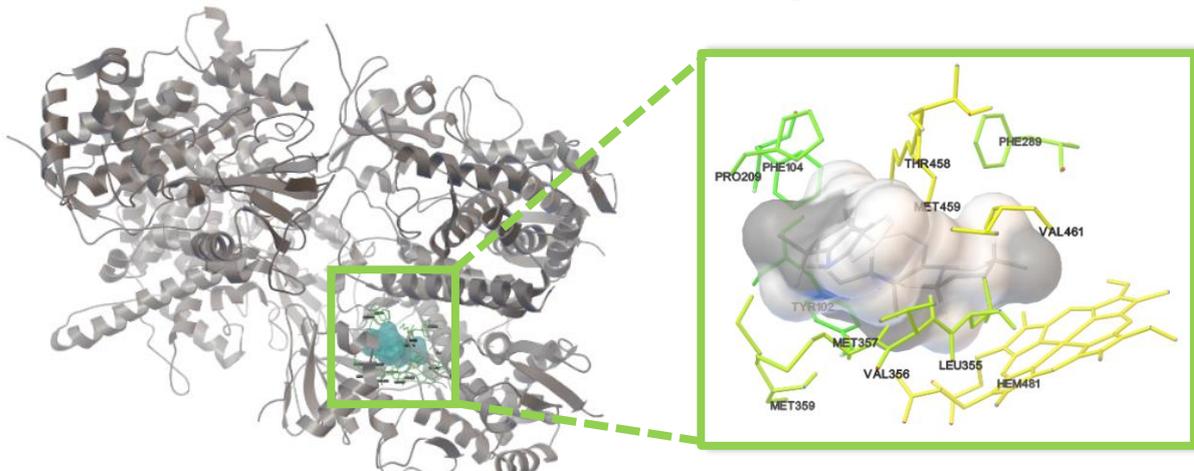
Número de repetições = 6.



CYP51 (*T. brucei*, Subunidade A, PDB: 2WV2) em complexo com a FGS-10B

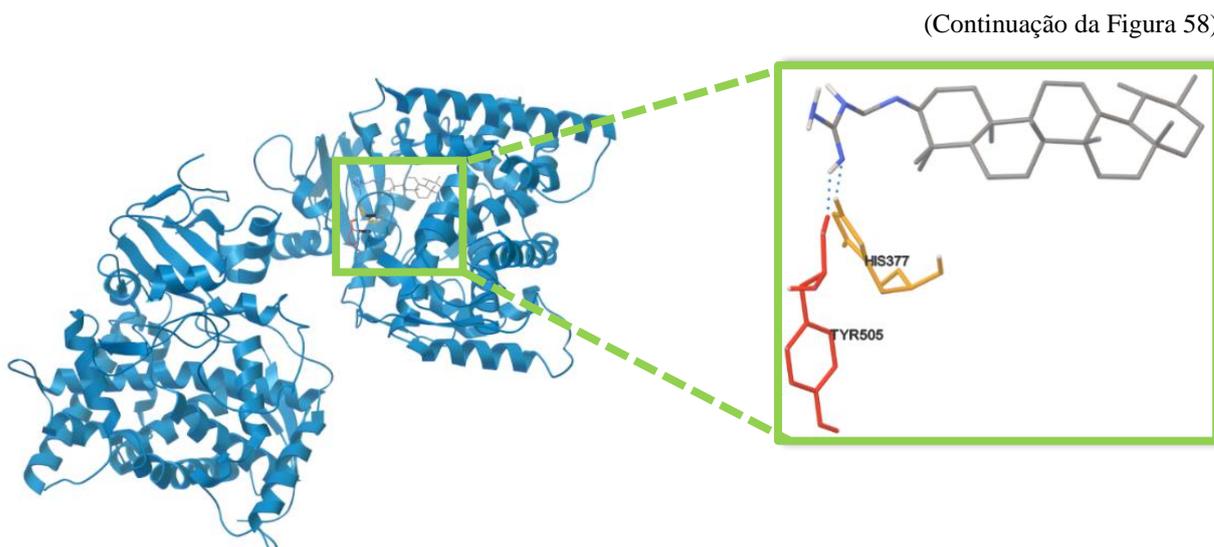


CYP51 (*T. cruzi*, Subunidade A, PDB: 3K1O) em complexo com a FGS-10B



CYP51 (*L. infantum*, Subunidades A, B, C e D, PDB: 3L4D) em complexo com a FGS-17B

(Continua)



CYP51 (*C. albicans*, Subunidades A e B, PDB: 5FSA) em complexo com a FGS-16A

Figura 58. Interação da CYP51 com os derivados de maior afinidade.

De forma geral, não houve interação com o grupo heme das enzimas, o que pode oferecer uma nova forma de inibição. Estudos anteriores já mostraram que os sítios ativos das CYP51 são suficientemente largos para admitir ligantes em diferentes conformações e orientações. A orientação inversa a do lanosterol no sítio ativo da CYP, já foi observada em uma cocristalização com outro análogo de substrato candidato a inibidor dessa enzima, o metileno-ciclopropil- Δ^7 -24,25-diidrolanosterol (LNP) (CHOI et al., 2014). Embora não seja conhecida uma explicação para tal fato, torna plausível a orientação dos derivados tal como sugerido pela análise de ancoragem molecular.

Nota-se que a FGS-10B apresentou maior afinidade para as CYP51 das duas *Trypanosoma* spp. A literatura indica que esse alvo pode não ser letal para o *T. brucei*, que é capaz de construir sua membrana plasmática utilizando o colesterol do mamífero hospedeiro. Dessa maneira, *T. brucei* é moderadamente sensível aos derivados azólicos e à depleção da CYP51 está associada a alterações fenotípicas nesse parasita (DAUCHY et al., 2016). Isso pode explicar sua CI_{50} relativamente alta de FGS-10 contra esse parasita. Contudo, é um promissor resultado de uma molécula relativamente fácil e barata de ser obtida.

Genericamente, as interações dos derivados com a CYPIF foram exclusivamente hidrofóbicas, o que denota inespecificidade. Em contrapartida, essa pode ser uma alternativa interessante para evitar a resistência aos compostos. Um dos principais mecanismos de resistência nos micro-organismos é a alteração estrutural do alvo, normalmente uma proteína, que dificulta ou mesmo impede a ação da droga (GARCIA-SALCEDO et al., 2016). Sendo assim, a grande semelhança estrutural com o substrato, aliada a interação inespecífica, poderia dificultar ao desenvolvimento desse tipo de resistência aos inibidores aqui propostos.

Coerente com o que foi observado no teste fenotípico, a FGS16A foi a que apresentou maior afinidade pela CYPCD, visto que somente FGS-16 e FGS18 apresentaram atividade contra *Candida albicans*. Por outro lado, muito provavelmente seu principal mecanismo de ação se dê pela perturbação da estrutura da membrana, visto que foi a mais inespecífica das amostras.

Saponinas triterpênicas possuem como principal mecanismo de ação a perturbação da estrutura de membranas plasmáticas. Esses compostos são 3-*O*- β -heterosídeos de triterpenos, e por isso possuem ação surfactante (LORENT et al., 2014). Os compostos ativos neste estudo são derivados triterpênicos com grupamentos mais polares na posição 3. Em outras palavras, apresentam uma região lipofílica, com alta capacidade de interação com esteroides, e uma região hidrofílica, tal como as saponinas e, por analogia, pode-se sugerir que eles também atuem como surfactantes sobre as membranas plasmáticas (MANAARGADOO-CATIN et al., 2016). De todos os derivados ativos, a FGS-16 é o que está ligado ao grupamento mais polar (aminoguanidina), podendo apresentar ação surfactante mais pronunciada, o que explicaria sua citotoxicidade não seletiva.

Vários trabalhos estudam a complexação de fármacos e ciclodextrinas como modelos de interação entre essas moléculas e membranas lipídicas, visto que são as mesmas leis químicas que governam as duas situações (BECHER; WIRSEL, 2012; HARGROVE et al., 2015;

VENTURINI et al., 2008). Logo, a ocorrência de complexação dos derivados obtidos neste trabalho com diferentes ciclodextrinas, sugere que esses compostos podem interagir com as membranas dos micro-organismos, podendo ser esse um mecanismo adicional da atividade citotóxica apresentada.

Embora seja um mecanismo ordinário, preterido pela maioria dos grupos de pesquisa e pela indústria farmacêutica, a interação direta com a membrana, perturbando sua estrutura e funcionalidade, é interessante se for seletiva. Vale recordar que um dos melhores antifúngicos e antiparasitários em uso hoje é a anfotericina B, um polieno cujo mecanismo baseia-se na sua interação com o ergosterol, formando poros na membrana plasmática dos micro-organismos, de modo não seletivo. Sua maior desvantagem são hepatotoxicidade e nefrotoxicidade, a qual vem sendo modulada por meio de sistemas carreadores (STEIMBACH et al., 2017).

Paralelamente, é de conhecimento da comunidade científica que os chamados azasterois, os quais são esteróis com átomos de nitrogênio nas posições 23, 24 ou 25, atuam inibindo a Δ^{24} -esterol-metiltransferase (STM), importante enzima na síntese de ergosterol nos parasitas tripanosomatídeos e fungos, equivalente do colesterol em células mamíferas, e principal esteroide da membrana plasmática desses organismos. Contudo, vários desses compostos também possuem a capacidade de inibir o equivalente humano da STM, a 24-esterol-redutase, o que explica sua toxicidade (LORENTE et al., 2004).

Dada a grande semelhança estrutural entre esteroides e triterpenos, a presença de nitrogênio na molécula e a toxicidade apresentada em células humanas e murinas, é possível sugerir que os compostos nitrogenados produzidos neste trabalho também atuem por esse mesmo mecanismo. Todavia, embora seja considerado um alvo promissor para novos fármacos antiparasitários, ainda não foi produzido um fármaco seletivo para a SMT. Tentativas de modelagem molecular ou análise por *docking* são dificultadas, pois sua estrutura tridimensional ainda não é conhecida (AZAM et al., 2014).

Soma-se a isso a presença natural de grupamentos em posições equivalentes a C4 e C14 da estrutura da estrutura esteroides, na estrutura dos triterpenos. Como visto na figura 14 (seção 2.7), a ausência de grupamentos nessas posições é um dos requisitos fundamentais para a sua funcionalidade de esteroides como componentes de membrana dos micro-organismos (DE SOUZA; RODRIGUES, 2009). Sendo assim, ainda que a SMT seja capaz de incorporar os grupamentos metil na estrutura dos inibidores propostos, os mesmos possuem outras características intrínsecas que, aos serem incorporadas na membrana do micro-organismos, podem afetar significativamente sua estabilidade.

Tem sido abertamente discutido que a ação sobre múltiplos alvos ou ação multimecanismos é a abordagem terapêutica mais eficiente para praticamente todas as patologias. No caso de antimicrobianos, essa estratégia também tem importância diante do fenômeno da resistência. Diante disso, terapias usando combinações drogas monoalvo já tem sido utilizada para tratamento de doenças infecciosas com algum sucesso. Contudo, é reconhecido que uma única droga com mais de um mecanismo de ação é mais vantajosa em termos de esforços necessários para obter um esquema terapêutico adequado e características toxicológicas mais favoráveis, além de menores custos (OLDFIELD; FENG, 2014). Em médio prazo, acredita-se que os compostos aqui apresentados, podem agregar tais características com relativo baixo investimento.

4.3. Considerações finais e perspectivas

É preciso considerar que os antimicrobianos normalmente não partilham os mesmos requerimentos estruturais de outras classes de drogas, com os ditados pela famosa Regra de Lipinski (Regra dos 5), embora seja importante serem compatíveis com a administração oral ou parenteral, como qualquer fármaco. Pelos atuais critérios químicos de seleção de *hits*, a

artemisinina não teria a menor chance de ser tornar o fármaco que tem salvado milhões de vidas, devido a sua baixa estabilidade química, meia-vida curta e modo de ação pouco entendido.

Neste capítulo foram apresentadas a obtenção de novas moléculas semissintéticas com atividade antimicrobiana, por reações simples e facilmente reprodutíveis, as quais incrementaram sobremaneira a atividade dos precursores naturais, para os quais também foi desenvolvido um método simples, barato e eficiente para obtenção, que ainda pode ser otimizado.

Também foi desenvolvido e validado um método em cromatografia em fase reversa para a separação dos isômeros de partida. Embora pareça haver uma relação de afinidade enzimática maior pelos isômeros β , a região da molécula onde se dá a diferença estrutural, não parece ter importância crítica para a ocorrência de interações mais específicas com o alvo. Portanto, é preciso ponderar se é um esforço justificado separar esses isômeros, que pode encarecer significativamente o processo de obtenção dos derivados.

Adaptou-se um método para o melhoramento da solubilidade em água dos compostos de partida e seus derivados mais lipossolúveis, que eliminou possíveis problemas com precipitação e uso de sistemas de solventes potencialmente tóxicos e voláteis, e permitiu a esterilização das amostras, e a análise do seu potencial antimicrobiano. A caracterização físico-química dessas pré-formulações farmacêuticas, a qual não era objetivo desta Tese, pode ser ainda realizada, definindo-se inéditos parâmetros de controle de qualidade.

O método de obtenção dos complexos de inclusão pode ainda pode ser melhorado por um estudo fatorial, onde se sugere que sejam avaliadas as variáveis tempo, velocidade de agitação (só pode ser testada a máxima velocidade dos equipamentos disponíveis) e proporção entre a amostra e a sulfobutiléter- β -ciclodextrina, que mostraram ter importância fundamental na eficiência do método. A hidroxipropil- β -ciclodextrina também mostrou uma capacidade de

complexação razoável, e seu custo mais acessível também torna interessante o aperfeiçoamento da obtenção dos complexos de inclusão com a mesma.

Outrossim, é possível que o potencial antimicrobiano das amostras lipossolúveis tenha sido subavaliado, uma vez que as concentrações que puderam ser testadas ficaram limitadas às concentrações das soluções aquosas contendo seus complexos com a SBE- β CD. A necessidade da esterilização das mesmas, que só foi possível via filtro de seringa de 25 mm, processo em que houve retenção de líquido no próprio dispositivo, impôs uma maior diluição das soluções dos complexos que foram testadas tal como foram obtidas. A diluição de uma quantidade conhecida dos complexos em um volume conhecido de solvente, forneceria uma solução com concentrações mais elevadas, possivelmente alterando o panorama de atividade que foi observado.

Por conseguinte, tal fato torna ainda mais interessante o resultado obtido com a FGS-18, que apresentou a atividade sobre duas espécies diferentes *Trypanosoma cruzi* e *Candida albicans* em uma concentração bastante baixa. É importante destacar que não foi observada toxicidade com essa amostra em nenhuma das linhagens celulares normais, o que pode ser devido à complexação com SBE- β CD. Sabidamente, a complexação com ciclodextrinas pode promover, além de melhoramento de características físico-químicas, a modulação da seletividade e toxicidade das amostras, o que merece ser melhor investigado com as moléculas geradas neste estudo.

A complexação de FGS-10, aparentemente seletiva para tripanosomatídeos, pode ser uma forma de modular a toxicidade apresentada sobre células humanas e murinas e oferecer um novo *hit* antiparasitário. Seu núcleo fundamental é um triterpeno e esses compostos não possuem átomos de nitrogênio, características estruturais bastante distintas dos antiparasitário em uso corrente. Essa pode ser uma estratégia interessante para a modulação da resistência nesses micro-organismos.

A literatura relata que os complexos com SBE- β CD são relativamente seguros para administração oral, o que é uma vantagem para futuras investigações sobre o potencial farmacológico desses novos complexos. Embora alguns não tenham apresentado o potencial antimicrobiano desejado, várias possíveis aplicações terapêuticas ainda podem ser investigadas. As propriedades farmacológicas dos triterpenos que mais tem chamado a atenção da comunidade científica são a antitumoral e a anti-inflamatória, que podem ser um direcionamento de futuros estudos com as mesmas.

CONCLUSÃO

Nesta pesquisa avaliou-se a atividade anti-inflamatória *in vitro* e *in vivo* de extratos aquosos da casca do caule das *Byrsonima crispera*, *B. duckeana*, *B. garcibarrigae* e *B. incarnata*. Os extratos mostraram-se ricos em flavonoides e ácidos fenólicos. *B. garcibarrigae* apresentou os melhores resultados nos testes *in vitro* e *in vivo*. Entretanto, sua ação *in vivo* foi inferior à de *B. japurensis*, que apresentou atividade analgésica/anti-inflamatória equivalente à da indometacina na dose de 100 mg/kg administrada pela via oral, por um mecanismo que parece estar intimamente relacionado a sua forte atividade antioxidante e sua capacidade de modular a nocicepção induzida por glutamato.

Após a análise da composição fenólica dos extratos aquosos de todas as espécies, concluiu-se que a atividade superior de *B. japurensis* se deve à sua composição química particularmente rica em rutina, que possui conhecida atividade anti-inflamatória, em combinação com os ácidos quínico, gálico e protocatecuico, que possuem significativa atividade antioxidante. Além desses, detectou-se naringenina, que mostrou interessante afinidade pela ciclo-oxigenase-2, e procianidina A2, que foi o composto fenólico de maior afinidade pelas 5-lipoxigenase e sintase do óxido nítrico indutível, nas análises de ancoragem molecular realizadas entre as substâncias identificadas nas espécies e as três enzimas inflamatórias de interesse neste trabalho. De acordo com a literatura, essas substâncias são relativamente bem absorvidas em relação a outros compostos fenólicos, quando administradas pela via oral, explicando o bom desempenho de *B. japurensis* nos testes *in vivo*.

Em outra fase do estudo, mostrou-se que os extratos hexânicos das mesmas espécies são ricos nos triterpenos α e β -amirinas. Essa mistura racêmica foi purificada de maneira fácil e barata e em apreciável quantidade a partir dos extratos, sendo usada na síntese de 16 derivados, que tiveram sua estrutura confirmada por espectrometria de ressonância magnética nuclear. A

lipofilicidade de alguns desses derivados foi modulada pela obtenção de complexos de inclusão com a sulfobutiléter- β -ciclodextrina (SBE- β CD), por um método foi desenvolvido neste estudo.

Cinco derivados, sendo quatro inéditos, apresentaram uma interessante atividade contra parasitas tripanosomatídeos. Esses micro-organismos partilham a rota biossintética do ergosterol, um importante componente de membrana, que tem como uma das enzimas-chave a 14 α -demetilase, também presente em fungos. Na análise de ancoragem molecular, todos os derivados ativos demonstraram algum grau de afinidade por essa enzima, interagindo com esta de maneira distinta a dos antifúngicos azólicos, até então únicos inibidores em uso clínico, indicando que este pode ser um ponto crucial no seu mecanismo de ação.

Contudo, as amostras ativas também apresentaram toxicidade contra células humanas e murinas. A exceção foram as amostras complexadas com SBE- β CD, que não foram tóxicas a nenhuma das células, incluindo o derivado FGS-18, que apresentou atividade contra *Trypanosoma cruzi* e *Candida albicans* na escala de nanogramas. Tal fato sugere que, além de modular a lipossolubilidade das amostras, a obtenção dos complexos de inclusão com SBE- β CD deve ter algum efeito positivo na toxicidade e seletividade das amostras.

Sendo assim, esta Tese logrou êxito em demonstrar o potencial farmacológico de espécies do gênero *Byrsonima* da Amazônia Brasileira, até então escassamente estudadas, como fonte de novos anti-inflamatórios e antimicrobianos. Mostrou-se que sua rica combinação de compostos fenólicos e larga produção de triterpenos pentacíclicos podem dar origem a novos fármacos e/ou medicamentos com diferentes e promissores mecanismos de ação, corroborando para hipótese de que as plantas da Amazônia ainda têm muito a oferecer à farmacologia humana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-RAHEEM, I. T. Gastroprotective effect of rutin against indomethacin-induced ulcers in rats. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 107, n. 3, p. 742–750, 2010.

ABDELRAHMAN, M. H. et al. Synthesis, biological evaluation, docking study and ulcerogenicity profiling of some novel quinoline-2-carboxamides as dual COXs/LOX inhibitors endowed with anti-inflammatory activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 127, p. 972–985, 2016.

ABREU, A. C.; MCBAIN, A. J.; SIMÕES, M. Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents. **Natural Product Reports**, v. 29, n. 9, p. 1007, 2012.

AHMED, A. U. An overview of inflammation: mechanism and consequences. **Frontiers of Biology in China**, v. 6, n. 4, p. 274–281, 2011.

AKULA, R.; RAVISHANKAR, G. A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. **Plant Signaling & Behavior**, v. 6, n. 11, p. 1720–1731, 2011.

ALBUQUERQUE, U. P.; RAMOS, M. A.; MELO, J. G. New strategies for drug discovery in tropical forests based on ethnobotanical and chemical ecological studies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 140, n. 1, p. 197–201, 2012.

ANDERSON, J. B. Evolution of antifungal-drug resistance: mechanisms and pathogen fitness. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 547–556, 2005.

ANDERSON, W. R. Origins of Mexican Malpighiaceae. **Acta Botanica Mexicana**, v. 2013, n. 104, p. 107–156, 2013.

APPELDOORN, M. M. et al. Procyanidin dimers A1, A2, and B2 are absorbed without conjugation or methylation from the small intestine of rats. **The Journal of nutrition**, v. 139, n. 8, p. 1469–73, 2009.

ARAGÃO, G. F. et al. A possible mechanism for anxiolytic and antidepressant effects of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 85, n. 4, p. 827–834, 2006.

ARULSELVAN, P. et al. Role of Antioxidants and natural products in inflammation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016.

ASAHARA, M. et al. The absence of the leukotriene B4 receptor BLT1 attenuates peripheral inflammation and spinal nociceptive processing following intraplantar formalin injury. **Molecular pain**, v. 11, p. 11, 2015.

ASHLEY, N. T.; WEIL, Z. M.; NELSON, R. J. Inflammation: mechanisms, costs, and natural variation. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 43, n. 1, p. 385–406, 2012.

AZAM, S. S. et al. Structure and dynamics studies of sterol 24-C-methyltransferase with mechanism based inactivators for the disruption of ergosterol biosynthesis. **Molecular Biology Reports**, v. 41, n. 7, p. 4279–4293, 2014.

BABOKHOV, P. et al. A current analysis of chemotherapy strategies for the treatment of human African trypanosomiasis. **Pathogens and global health**, v. 107, n. 5, p. 242–52, 2013.

BADHANI, B.; SHARMA, N.; KAKKAR, R. Gallic acid: a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. **RSC Advances**, v. 5, n. 35, p. 27540–27557, 2015.

BANDEIRA, P. N. et al. Obtenção de derivados da mistura triterpenoídica alfa e beta-amirina. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 2, p. 204–208, 2007.

BANKS, W. A. Characteristics of compounds that cross the blood-brain barrier. **BMC Neurology**, v. 9, n. Suppl 1, p. S3, 2009.

BARATTO, M. C. et al. Antioxidant activity of galloyl quinic derivatives isolated from *P. lentiscus* leaves. **Free Radical Research**, v. 37, n. 4, p. 405–412, 2003.

BARKER, A. et al. Expanding medicinal chemistry space. **Drug Discovery Today**, v. 18, n. 5–6, p. 298–304, 2013.

BARRETT, M. P.; CROFT, S. L. Emerging paradigms in anti-infective drug design. **Parasitology**, v. 141, n. 1, p. 1–7, 2014.

BARROS, F. W. A et al. Amyrin esters induce cell death by apoptosis in HL-60 leukemia cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 3, p. 1268–1276, 2011.

BARROT, M. Tests and models of nociception and pain in rodents. **Neuroscience**, v. 211, p. 39–50, 2012.

BARTSCH, H.; NAIR, J. Chronic inflammation and oxidative stress in the genesis and perpetuation of cancer: Role of lipid peroxidation, DNA damage, and repair. **Langenbeck's Archives of Surgery**, v. 391, n. 5, p. 499–510, 2006.

BAYLISS, M. K. et al. Quality guidelines for oral drug candidates: dose, solubility and lipophilicity. **Drug Discovery Today**, v. 21, n. 10, p. 1719–1727, 2016.

BECHER, R.; WIRSEL, S. G. R. Fungal cytochrome P450 sterol 14 α -demethylase (CYP51) and azole resistance in plant and human pathogens. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 95, n. 4, p. 825–840, 2012.

BEIRITH, A.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. **Brain Research**, v. 924, n. 2, p. 219–228, 2002.

BÉRDY, J. Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. **The Journal of Antibiotics**, v. 65, n. 8, p. 441–441, 2012.

BERMUDEZ, J. et al. Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. **Acta Tropica**, v. 156, p. 1–16, 2016.

BERNAL, P. et al. Antibiotic adjuvants: identification and clinical use. **Microbial Biotechnology**, v. 6, n. 5, p. 445–449, 2013.

BERTHIER, D. et al. Tolerance to trypanosomatids: a threat, or a key for disease elimination? **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 2, p. 157–168, 2016.

BHOWMICK, R. et al. Systemic disease during *Streptococcus pneumoniae* acute lung infection requires 12-lipoxygenase-dependent inflammation. **The Journal of Immunology**, v. 191, n. 10, p. 5115–23, 2013.

BITTO, A. et al. Flavocoxid, a dual inhibitor of COX-2 and 5-LOX of natural origin, attenuates the inflammatory response and protects mice from sepsis. **Critical Care**, v. 16, n. 1, p. R32, 2012.

BITTO, A. et al. Flavocoxid, a nutraceutical approach to blunt inflammatory conditions. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, n. ID 790851, p. 1–8, 2014.

BLACKLER, R. W. et al. NSAID-gastroenteropathy: new aspects of pathogenesis and prevention. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 19, p. 11–16, 2014.

BOESCH-SAADATMANDI, C. et al. Comparison of tetrahydrofuran, fetal calf serum, and Tween 40 for the delivery of astaxanthin and canthaxanthin to HepG2 cells. **Cytotechnology**, v. 63, n. 1, p. 89–97, 2011.

BOHN, T. Dietary factors affecting polyphenol bioavailability. **Nutrition Reviews**, v. 72, n. 7, p. 429–452, 2014.

BOLOGNESI, M. L.; CAVALLI, A. Multitarget Drug Discovery and Polypharmacology. **ChemMedChem**, v. 11, n. 12, p. 1190–1192, 2016.

BONACORSI, C. et al. Relative antioxidant activity of brazilian medicinal plants for gastrointestinal diseases. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 5, n. 18, p. 4511–4518, 2011.

BONACORSI, C. et al. Effect of *Byrsonima crassa* and phenolic constituents on *Helicobacter pylori*-induced neutrophils oxidative burst. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 1, p. 133–141, 2012.

BOOTS, A. W.; HAENEN, G. R. M. M.; BAST, A. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. **European Journal of Pharmacology**, v. 585, n. 2–3, p. 325–337, 2008.

BORGES, R. S.; CASTLE, S. L. The antioxidant properties of salicylate derivatives: a possible new mechanism of anti-inflammatory activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, p. 1–4, 2015.

BRAZ-FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente.

Química Nova, v. 33, n. 1, p. 229–239, 2010.

BRETT, G. M. et al. Absorption, metabolism and excretion of flavanones from single portions of orange fruit and juice and effects of anthropometric variables and contraceptive pill use on flavanone excretion. **The British Journal of Nutrition**, v. 101, n. 5, p. 664–75, 2009.

BRÜNE, B. et al. Redox control of inflammation in macrophages. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 19, n. 6, p. 595–637, 2013.

BUGG, T. D. H. et al. Bacterial cell wall assembly: still an attractive antibacterial target. **Trends in Biotechnology**, v. 29, n. 4, p. 167–173, 2011.

CAI, C. et al. synergistic effect of compounds from a chinese herb: compatibility and dose optimization of compounds from n-butanol extract of *Ipomoea stolonifera*. **Scientific Reports**, v. 6, n. November 2015, p. 27014, 2016.

CALIFORNIA RARE FRUIT GROWERS. *Byrsonima japurensis*. Disponível em: http://www.crfg.org/g2/main.php?g2_itemId=6962. Acesso em: 27 de janeiro de 2017.

CAMPOY, S.; ADRIO, J. L. Antifungals. **Biochemical Pharmacology**, 2016.

CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R. L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 22, n. 5, p. 749–760, 1997.

CARDONA, F. et al. Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 8, p. 1415–1422, 2013.

CARNEIRO, A. L. B. et al. Screening of Amazonian plants from the Adolpho Ducke forest reserve, Manaus, state of Amazonas, Brazil, for antimicrobial activity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 1, p. 31–38, 2008.

CARTER, G. T. Natural products and Pharma 2011: strategic changes spur new opportunities. **Natural product reports**, v. 28, n. 11, p. 1783–9, 2011.

CASTILLO-GARIT, J. A. et al. A Review of QSAR studies to Discover New Drug-like Compounds Actives Against Leishmaniasis and Trypanosomiasis. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 8, p. 852–865, 2012.

CECÍLIO, A. B. et al. Screening of Brazilian medicinal plants for antiviral activity against rotavirus. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 141, n. 3, p. 975–981, 2012.

CENTRO NACIONAL DE CONSERVAÇÃO DA FLORA. *Byrsonima japurensis* A. Juss. Disponível em: <http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Byrsonima%20japurensis>. Acesso em: 27 de janeiro de 2017.

CERECETTO, H.; GONZÁLEZ, M. Synthetic medicinal chemistry in Chagas' disease: Compounds at the final stage of “hit-to-lead” phase. **Pharmaceuticals**, v. 3, n. 4, p. 810–838, 2010.

CHATELAIN, E. Chagas disease research and development: is there light at the end of the tunnel? **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 15, p. 98–103, 2016.

CHAWLA, B.; MADHUBALA, R. Drug targets in *Leishmania*. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 34, n. 1, p. 1–13, 2010.

CHEN, X.-Q. et al. Preventive effects of catechins on cardiovascular disease. **Molecules**, v. 21, n. 12, p. 1759, 2016.

CHOI, J. Y.; PODUST, L. M.; ROUSH, W. R. Drug strategies targeting CYP51 in neglected tropical diseases. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 22, p. 11242–11271, 2014.

CHOI, J. Y.; ROUSH, W. R. Structure based design of CYP51 inhibitors. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 30–39, 2017.

CHOVATIYA, R.; MEDZHITOV, R. Stress, inflammation, and defense of homeostasis. **Molecular Cell**, v. 54, n. 2, p. 281–288, 2014.

CHUA, L. S. A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, n. 3, p. 805–817, 2013.

CHUNG, P. Y.; NAVARATNAM, P.; CHUNG, L. Y. Synergistic antimicrobial activity between pentacyclic triterpenoids and antibiotics against *Staphylococcus aureus* strains. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 10, n. 1, p. 25, 2011.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora da Unicamp, 2006. 456p.

CONFORTI, F.; MENICHINI, F. Phenolic compounds from plants as nitric oxide production inhibitors. **Current Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 8, p. 1137–1145, 2011.

CONNOLLY, J. D.; HILL, R. A.; CONNOLLY, J. D. Triterpenoids. **Natural Products Reports**, v. 27, n. 1, p. 90–122, 2017.

COS, P. et al. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro “proof-of-concept”. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, n. 3, p. 290–302, 2006.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 3. 3. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001. 1032 p.

COURA, J. R.; JUNQUEIRA, A. C. V. Risks of endemicity, morbidity and perspectives regarding the control of Chagas disease in the Amazon region. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 2, p. 145–154, 2012.

CROFT, K. D. Dietary polyphenols: antioxidants or not? **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 595, p. 120–124, 2016.

CROZIER, A.; JAGANATH, I. B.; CLIFFORD, M. N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. **Natural product reports**, v. 26, n. 8, p. 1001–1043, 2009.

CZAPSKI, G. A.; CZUBOWICZ, K.; STROSZNAJDER, R. P. Evaluation of the antioxidative properties of lipoxygenase inhibitors. **Pharmacological Reports**, v. 64, n. 5, p. 1179–1188, 2012.

D'ANDREA, G. Quercetin: a flavonol with multifaceted therapeutic applications? **Fitoterapia**, v. 106, p. 256–271, 2015.

D'ARCHIVIO, M. et al. Bioavailability of the polyphenols: Status and controversies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 4, p. 1321–1342, 2010.

DA CUNHA FILHO, M. S. S.; SÁ-BARRETO, L. C. L. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 1, p. 1–9, 2007.

DA SILVA, T. B. C. et al. Cytotoxic potential of selected medicinal plants in northeast Brazil. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, p. 1–9, 2016.

DAGLIA, M. Polyphenols as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 174–181, 2012.

DAUCHY, F.-A. et al. *Trypanosoma brucei* CYP51: Essentiality and targeting therapy in an experimental model. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 11, p. e0005125, 2016.

DE SOUSA, L. R. F. et al. Isolation of arginase inhibitors from the bioactivity-guided fractionation of *Byrsonima coccolobifolia* leaves and stems. **Journal of Natural Products**, v. 77, n. 2, p. 392–396, 2014.

DE SOUZA, W.; RODRIGUES, J. C. F. Sterol biosynthesis pathway as target for anti-trypanosomatid drugs. **Interdisciplinary perspectives on infectious diseases**, v. 2009, p. 642502, 2009.

DEVI, K. P. et al. Kaempferol and inflammation: from chemistry to medicine. **Pharmacological Research**, v. 99, p. 1–10, 2015.

DHAMI, N.; MISHRA, A. D. Phytochemical variation: how to resolve the quality controversies of herbal medicinal products? **Journal of Herbal Medicine**, v. 5, n. 2, p. 118–127, 2015.

DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A historical overview of natural products in drug discovery. **Metabolites**, v. 2, n. 2, p. 303–336, 2012.

DI SANTO, R. Natural products as antifungal agents against clinically relevant pathogens. **Natural Product Reports**, v. 27, n. 7, p. 1084–1098, 2010.

DÍAZ-GONZÁLEZ, F.; SÁNCHEZ-MADRID, F. NSAIDs: Learning new tricks from old drugs. **European Journal of Immunology**, v. 45, p. 679–686, 2015.

DÍAZ-RUIZ, G. et al. Growth inhibition of streptococcus from the oral cavity by α -amyrin esters. **Molecules**, v. 17, n. 11, p. 12603–12611, 2012.

DODDS, D. R. Antibiotic resistance; a current epilogue. **Biochemical Pharmacology**, 2016.

DU, X. et al. Insights into protein-ligand interactions: mechanisms, models, and methods. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 17, n. 2, p. 144, 2016.

EFFERTH, T.; KOCH, E. Complex interactions between phytochemicals. The multi-target therapeutic concept of phytotherapy. **Current Drug Targets**, v. 12, n. 1, p. 122–132, 2011.

ESPANHA, L. et al. Mutagenicity and antimutagenicity of six Brazilian *Byrsonima* species assessed by the Ames test. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n. 182, p. 1–10, 2014.

FANTINI, M. et al. *In vitro* and *in vivo* antitumoral effects of combinations of polyphenols, or polyphenols and anticancer drugs: perspectives on cancer treatment. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 5, p. 9236–9282, 2015.

FATHIMA, A.; RAO, J. R. Selective toxicity of catechin - a natural flavonoid towards bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 14, p. 1–8, 2016.

FERREIRA, L. G.; DE OLIVEIRA, M. T.; ANDRICOPULO, A. D. Advances and progress in chagas disease drug discovery. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 20, p. 2290–302, 2016.

FERREIRA, M. D. P.; COELHO, A. B. Desmatamento recente nos estados da Amazônia Legal: uma análise da contribuição dos preços agrícolas e das políticas governamentais. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 53, n. 1, p. 93–108, 2015.

FERREYRA, M. L. F.; RIUS, S. P.; CASATI, P. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. **Frontiers in Plant Science**, v. 3, n. September, p. 1–15, 2012.

FIELD, M. C. et al. Anti-trypanosomatid drug discovery: an ongoing challenge and a continuing need. **Nature Reviews Microbiology**, 2017.

FIGARELLA, K. et al. Ergosterone-coupled Triazol molecules trigger mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and acidocalcisomal Ca²⁺ release in *Leishmania mexicana* promastigotes. **Microbial Cell**, v. 3, n. 1, p. 14–28, 2016.

FLAUMENHAFT, R. Protein disulfide isomerase as an antithrombotic target. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 23, n. 7, p. 264–268, 2013.

FÖRSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **European Heart Journal**, v. 33, n. 7, p. 829–837, 2012.

FOTI, M. C. Chemistry and Biology of antioxidants properties of phenols. v. 2007, n. 2, p. 1673–1685, 2007.

FRANCO, J. R. et al. Epidemiology of human african trypanosomiasis. **Clinical Epidemiology**, v. 6, p. 257–275, 2014.

FREIRE, E. O. L.; AZEVEDO, R. A. Salva-guarda do acervo documental da Reserva Florestal Ducke - Manaus-AM: registros de uma experiência. **Ciência da Informação**, v. 39, n. 2, p.

101–114, 2010.

FUNARI, C. S. et al. Metabolômica, uma abordagem otimizada para exploração da biodiversidade brasileira: Estado da arte, perspectivas e desafios. **Química Nova**, v. 36, n. 10, p. 1605–1609, 2013.

GAMPER, N.; OOI, L. Redox and Nitric Oxide-Mediated Regulation of Sensory Neuron Ion Channel Function. **Antioxidants & redox signaling**, v. 22, n. 6, p. 486–504, 2014.

GANESAN, A. The impact of natural products upon modern drug discovery. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 12, n. 3, p. 306–317, 2008.

GANESH, T. Prostanoid receptor EP2 as a therapeutic target. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, n. 11, p. 4454–4465, 2014.

GARCÍA-LAFUENTE, A. et al. Flavonoids as anti-inflammatory agents: Implications in cancer and cardiovascular disease. **Inflammation Research**, v. 58, n. 9, p. 537–552, 2009.

GARCIA-SALCEDO, J. A. et al. New approaches to overcome transport related drug resistance in trypanosomatid parasites. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, n. SEP, p. 1–14, 2016.

GAUTAM, R. et al. Rutin attenuates intestinal toxicity induced by Methotrexate linked with anti-oxidative and anti-inflammatory effects. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, n. 1, p. 99, 2016.

GEIGER, A. et al. Escaping deleterious immune response in their hosts: Lessons from trypanosomatids. **Frontiers in Immunology**, v. 7, n. MAY, p. 1–21, 2016.

GEORGIADOU, S. P.; MAKARITSIS, K. P.; DALEKOS, G. N. Leishmaniasis revisited: Current aspects on epidemiology, diagnosis and treatment. **Journal of Translational Internal Medicine**, v. 3, n. 2, p. 43–50, 2015.

GIGANTE, F. et al. Design and preparation of sterol mimetics as potential antiparasitics. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 20, p. 7291–7301, 2010.

GILL, E. E.; FRANCO, O. L.; HANCOCK, R. E. W. Antibiotic adjuvants: Diverse strategies for controlling drug-resistant pathogens. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 85, n. 1, p. 56–78, 2015.

GOMES, A. et al. Molecular mechanisms of anti-inflammatory activity mediated by flavonoids. **Current Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 16, p. 1586–1605, 2008.

GONÇALVES, C. A. et al. Gestational exposure to *Byrsonima verbascifolia*: Teratogenicity, mutagenicity and immunomodulation evaluation in female Swiss mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, n. 3, p. 843–850, 2013.

GORDON, A. et al. Phenolic constituents and antioxidant capacity of four underutilized fruits from the amazon region. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 14, p. 7688–7699, 2011.

GOVINDARAGHAVAN, S.; SUCHER, N. J. Quality assessment of medicinal herbs and their extracts: Criteria and prerequisites for consistent safety and efficacy of herbal medicines. **Epilepsy and Behavior**, v. 52, p. 363–371, 2015.

GUILHON-SIMPLICIO, F. **Estudo farmacognóstico e de atividade farmacológica de *Byrsonima japurensis* A. Juss.** 2009. 158f. Dissertação (Mestrado em Patologia Tropical) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2009.

GUILHON-SIMPLICIO, F. et al. Anti-inflammatory, anti-hyperalgesic, antiplatelet and antiulcer activities of *Byrsonima japurensis* A. Juss. (Malpighiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 140, n. 2, p. 282–286, 2012.

GUILHON-SIMPLICIO, F. et al. Antioxidant activity of a standardized extract of *Byrsonima japurensis* A. Juss. (Malpighiaceae) stem bark. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 7, n. 26, p. 1926–1930, 2013.

GUILHON-SIMPLICIO, F.; PEREIRA, M. M. Aspectos químicos e farmacológicos de *Byrsonima* (Malpighiaceae). **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 1032–1041, 2011.

GUIMARÃES, A. G.; SERAFINI, M. R.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Terpenes and derivatives as a new perspective for pain treatment: a patent review. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 24, n. 3, p. 243–65, 2014.

GÜLÇİN, I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. **Archives of Toxicology**, v. 86, n. 3, p. 345–391, 2012.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 1, p. 1–93, 2006.

GUTIERREZ, R. M. P.; FLORES, M. M. Effect of chronic administration of hexane extract of *Byrsonima crassifolia* seed on B-cell and pancreatic oxidative parameters in streptozotocin-induced diabetic rat. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, n. 2, p. 231–236, 2014.

GWYNN, M. N. et al. Challenges of antibacterial discovery revisited. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1213, n. 1, p. 5–19, 2010.

HACIMUFTUOGLU, A. et al. Antioxidants attenuate multiple phases of formalin-induced nociceptive response in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 173, n. 2, p. 211–216, 2006.

HAILU, T. et al. Challenges in visceral leishmaniasis control and elimination in the developing countries: A review. **Journal of Vector Borne Disease**, v. 53, p. 193–198, 2016.

HANSEN, J. et al. Bacterial lipoxygenases, a new subfamily of enzymes? A phylogenetic approach. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 11, p. 4737–4747, 2013.

HAO, H.; ZHENG, X.; WANG, G. Insights into drug discovery from natural medicines using reverse pharmacokinetics. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 35, n. 4, p. 168–177, 2014.

HARGROVE, T. Y. et al. Structure-functional characterization of cytochrome P450 sterol 14 α -

demethylase (CYP51B) from *Aspergillus fumigatus* and molecular basis for the development of antifungal drugs. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 39, p. 23916–23934, 2015.

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 19–20, p. 894–901, 2008.

HELENO, S. A. et al. Bioactivity of phenolic acids: metabolites versus parent compounds: a review. **Food Chemistry**, v. 173, p. 501–513, 2015.

HERRERA-RUIZ, M. et al. Antidepressant effect and pharmacological evaluation of standardized extract of flavonoids from *Byrsonima crassifolia*. **Phytomedicine**, v. 18, n. 14, p. 1255–1261, 2011.

HERTRAMPF, A. et al. In vitro cytotoxicity of cyclodextrin-bonded birch bark extract. **Planta Medica**, v. 78, n. 9, p. 881–889, 2012.

HIGUCHI, C. T. et al. *Byrsonima fagifolia* Niedenzu apolar compounds with antitubercular activity. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, n. ID 128349, p. 1–5, 2011.

HOPKINS, A. L. et al. The role of ligand efficiency metrics in drug discovery. **Nature Reviews. Drug discovery**, v. 13, n. 2, p. 105–21, 2014.

HOSSEINZADEH, H.; NASSIRI-ASL, M. Review of the protective effects of rutin on the metabolic function as an important dietary flavonoid. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 37, n. 9, p. 783–788, 2014.

HOTEZ, P. J. Global urbanization and the neglected tropical diseases. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 2, p. e0005308, 2017.

HUSSAIN, T. et al. Oxidative stress and inflammation: what polyphenols can do for us? v. 2016, n. ID 7432797, 2016.

IACOPINI, P. et al. Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: content, in vitro antioxidant activity and interactions. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, n. 8, p. 589–598, 2008.

IMMING, P. Molecular targets of natural drug substances. **Planta Medica**, v. 74, n. 9, p. 1794–1801, 2008.

IVANOV, I. et al. Molecular enzymology of lipoxygenases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 503, n. 2, p. 161–174, 2010.

JÄGER, S. et al. Pentacyclic triterpene distribution in various plants - rich sources for a new group of multi-potent plant extracts. **Molecules**, v. 14, n. 6, p. 2016–2031, 2009.

JAKOBEK, L. Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. **Food Chemistry**, v. 175, p. 556–567, 2015.

JATCZAK, K.; GRYNKIEWICZ, G. Triterpene saponins with oleanene skeleton:

chemotypes and biological activities. **Acta Biochimica Polonica**, v. 61, n. 2, p. 227–243, 2014.

JESUS, J. A. et al. Antimicrobial activity of oleanolic and ursolic acids: an update. v. 2015, n. Figure 1, 2015.

JIANG, C.-L. et al. The novel strategy of glucocorticoid drug development via targeting nongenomic mechanisms. **Steroids**, v. 102, p. 27–31, 2015.

JIAO, M. et al. Computational drug repositioning for cancer therapeutics. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 767–775, 2015.

JOHANN, S. et al. Antifungal activity of the amyirin derivatives and *in vitro* inhibition of *Candida albicans* adhesion to human epithelial cells. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 148–153, 2007.

JOO, Y. C.; OH, D. K. Lipoxygenases: Potential starting biocatalysts for the synthesis of signaling compounds. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1524–1532, 2012.

JOSHI, Y. B.; PRATICÒ, D. The 5-lipoxygenase pathway: oxidative and inflammatory contributions to the Alzheimer's disease phenotype. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 8, n. January, p. 1–8, 2015.

KAKKAR, S.; BAIS, S. A review on protocatechuic acid and its pharmacological potential. **ISRN pharmacology**, v. 2014, p. 952943, 2014.

KALEPU, S.; NEKKANTI, V. Insoluble drug delivery strategies: review of recent advances and business prospects. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 5, n. 5, p. 442–453, 2015.

KALLENBORN-GERHARDT, W. et al. NOXious signaling in pain processing. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 137, n. 3, p. 309–317, 2013.

KANCHEVA, V. D.; KASAIKINA, O. T. Bio-Antioxidants - a chemical base of their antioxidant and activity effect on human health. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 37, p. 4784–4805, 2013.

KAWAHARA, K. et al. Prostaglandin E2-induced inflammation: relevance of prostaglandin E receptors. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1851, n. 4, p. 414–421, 2015.

KENNEDY, P. G. E. Clinical features, diagnosis, and treatment of human African trypanosomiasis (sleeping sickness). **The Lancet Neurology**, v. 12, n. 2, p. 186–194, 2013.

KHANGHOLI, S. et al. The mechanisms of inhibition of advanced glycation end products formation through polyphenols in hyperglycemic condition. **Planta Medica**, v. 82, n. 1–2, p. 32–45, 2015.

KNAB, L. M.; GRIPPO, P. J.; BENTREM, D. J. Involvement of eicosanoids in the pathogenesis of pancreatic cancer: the roles of cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 31, p. 10729–10739, 2014.

KOEBERLE, A.; WERZ, O. Multi-target approach for natural products in inflammation. **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 12, p. 1871–1882, 2014.

KONG, W.; HOOPER, K. M.; GANEA, D. The natural dual cyclooxygenase and 5-lipoxygenase inhibitor flavocoxid is protective in EAE through effects on Th1/Th17 differentiation and macrophage/microglia activation. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 53, p. 59–71, 2016.

KORBECKI, J.; GUTOWSKA, I.; CHLUBEK, D. The effect of reactive oxygen species on the synthesis of prostanoids from arachidonic acid. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 64, n. 4, p. 409–421, 2013.

KOVAL'SKII, I. V et al. Molecular-biological problems of drug design and mechanism of drug action - mechanisms of rutin pharmacological action (Review). **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 48, n. 2, p. 73–76, 2014.

KUHN, H.; BANTHIYA, S.; VAN LEYEN, K. Mammalian lipoxygenases and their biological relevance. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1851, n. 4, p. 308–330, 2015.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p. 1–16, 2013.

KURKOV, S. V.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 453, n. 1, p. 167–180, 2013.

LAPA, F. R. et al. Antinociceptive properties of the hydroalcoholic extract and the flavonoid rutin obtained from *Polygala paniculata* L. in Mice. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 104, n. 4, p. 306–315, 2009.

LARSSON, M.; BROMAN, J. Synaptic plasticity and pain: role of ionotropic glutamate receptors. **Neuroscientist**, v. 17, n. 3, p. 256–273, 2011.

LASZCZYK, M. N. Pentacyclic triterpenes of the lupane, oleanane and ursane group as tools in cancer therapy. **Planta Medica**, v. 75, n. 15, p. 1549–1560, 2009.

LEESON, P. D. Molecular inflation, attrition and the rule of five. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 101, p. 22–33, 2016.

LEOPOLDINI, M.; RUSSO, N.; TOSCANO, M. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. **Food Chemistry**, v. 125, n. 2, p. 288–306, 2011.

LEPESHEVA, G. I.; VILLALTA, F.; WATERMAN, M. R. Targeting *Trypanosoma cruzi* Sterol 14 alpha-Demethylase (CYP51). **Advances in Parasitology**, v. 75, p. 65–87, 2011.

LEPESHEVA, G. I.; WATERMAN, M. R. Sterol 14 α -demethylase cytochrome P450 (CYP51), a P450 in all biological kingdoms. **Biochemical and Biophysical Acta**, v. 1770, n. 3, p. 467–477, 2007.

LEVY, R. M. et al. Efficacy and safety of flavocoxid, a novel therapeutic, compared with

naproxen: A randomized multicenter controlled trial in subjects with osteoarthritis of the knee. **Advances in Therapy**, v. 27, n. 10, p. 731–742, 2010.

LEWANDOWSKA, U. et al. Overview of metabolism and bioavailability enhancement of polyphenols. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 50, p. 12183–12199, 2013.

LEWIS, K. Platforms for antibiotic discovery. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 12, n. 5, p. 371–87, 2013.

LI, Y. et al. Quercetin, inflammation and immunity. **Nutrients**, v. 8, n. 167, p. 1–14, 2016.

LIANG, N.; KITTS, D. D. Role of chlorogenic acids in controlling oxidative and inflammatory stress conditions. **Nutrients**, v. 8, n. 1, p. 1–20, 2015.

LIAUDET, L.; ROSENBLATT-VELIN, N.; PACHER, P. Role of peroxynitrite in the Cardiovascular Dysfunction of Septic Shock. **Current Vascular Pharmacology**, v. 11, n. 2, p. 196–207, 2013.

LIMA, P. S. S. et al. Inclusion of terpenes in cyclodextrins: preparation, characterization and pharmacological approaches. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 965–987, 2016.

LIU, J.; NES, W. D. Steroidal triterpenes: design of substrate-based inhibitors of ergosterol and sitosterol synthesis. **Molecules**, v. 14, n. 11, p. 4690–4706, 2009.

LIU, M.; YOKOMIZO, T. The role of leukotrienes in allergic diseases. **Allergology International**, v. 64, n. 1, p. 17–26, 2015.

LIU, Y.; BREUKINK, E. The membrane steps of bacterial cell wall synthesis as antibiotic targets. **Antibiotics**, v. 5, n. 3, p. 28, 2016.

LORENT, J. H.; QUETIN-LECLERCQ, J.; MINGEOT-LECLERCQ, M. P. The amphiphilic nature of saponins and their effects on artificial and biological membranes and potential consequences for red blood and cancer cells. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 12, n. 44, p. 8803–8822, 2014.

LORENTE, S. O. et al. Novel azasterols as potential agents for treatment of leishmaniasis and trypanosomiasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 8, p. 2937–2950, 2004.

MALDINI, M.; MONTORO, P.; PIZZA, C. Phenolic compounds from *Byrsonima crassifolia* L. bark: phytochemical investigation and quantitative analysis by LC-ESI MS/MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 56, n. 1, p. 1–6, 2011.

MALIK, L. H.; SINGH, G. D.; AMSTERDAM, E. A. Chagas heart disease: an update. **The American Journal of Medicine**, v. 128, n. 11, p. 1251.e7-1251.e9, 2015.

MALLAVADHANI, U. V. et al. Antimicrobial activity of some pentacyclic triterpenes and their synthesized 3-O-lipophilic chains. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 27, n. 10, p. 1576–1579, 2004.

MAMEDE, M.C.H.; FRANCENER, A. *Byrsonima*. **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB8827>. Acesso em: 27 de janeiro de 2017.

MANAARGADOO-CATIN, M. et al. Hemolysis by surfactants - A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 228, p. 1–16, 2016.

MANCHOPE, M. F.; CASAGRANDE, R.; VERRI, JR., W. A. Naringenin: an analgesic and anti-inflammatory citrus flavanone. **Oncotarget**, v. 8, n. 3, p. 3766–3767, 2016.

MARCON, R. et al. Evidence of TRPV1 receptor and PKC signaling pathway in the antinociceptive effect of amyrin octanoate. **Brain Research**, v. 1295, p. 76–88, 2009.

MARGALEF, M. et al. Tissue distribution of rat flavanol metabolites at different doses. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 26, n. 10, p. 987–995, 2015.

MARÍN, L. et al. Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolism: Antimicrobial properties. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–18, 2015.

MARTINEZ-MICHAEL, N. et al. Procyanidins and inflammation: molecular targets and health implications. **BioFactors**, v. 38, n. 4, p. 257–265, 2012.

MARTÍNEZ-RUIZ, A.; CADENAS, S.; LAMAS, S. Nitric oxide signaling: classical, less classical, and nonclassical mechanisms. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 1, p. 17–29, 2011.

MASUOKA, N.; MATSUDA, M.; KUBO, I. Characterisation of the antioxidant activity of flavonoids. **Food Chemistry**, v. 131, n. 2, p. 541–545, 2012.

MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. 2. ed. Fortaleza: Edições UFC, 1997. 136p.

MATSUDA, H. et al. Structural requirements of flavonoids for inhibition of protein glycation and radical scavenging activities. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 24, p. 5317–5323, 2003.

MEDINA, C. O.; LOUCHARD, B. O.; GONÇALVES, T. Análise espectrofotométrica da atividade fotoprotetora *in vitro* de extratos das folhas de *Byrsonima sericea*. v. 36, n. 3, p. 391–398, 2015.

MENDES, A. P. S. et al. The basic antioxidant structure for flavonoid derivatives. **Journal of Molecular Modeling**, v. 18, n. 9, p. 4073–4080, 2012.

MILLER, J. S. The discovery of medicines from plants: a current biological perspective. **Economic Botany**, v. 65, n. 4, p. 396–407, 2011.

MILLER, K. E. et al. Glutamate pharmacology and metabolism in peripheral primary afferents: physiological and pathophysiological mechanisms. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 130, n. 3, p. 283–309, 2011.

MILLER, M. B. et al. 24-Methylenecyclopropane steroidal inhibitors: A Trojan horse in ergosterol biosynthesis that prevents growth of *Trypanosoma brucei*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1862, n. 3, p. 305–313, 2017.

MISHRA, B. B.; TIWARI, V. K. Natural products: an evolving role in future drug discovery. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 10, p. 4769–4807, 2011.

MISSOURI BOTANICAL GARDEN. *Byrsonima crispata* A. Juss. Disponível em: <http://www.tropicos.org/Name/19501329>. Acesso em: 27 de janeiro de 2017a.

MISSOURI BOTANICAL GARDEN. *Byrsonima garcibarrigae* Cuatrec. Disponível em: <http://www.tropicos.org/Name/19501675>. Acesso em: 27 de janeiro de 2017b.

MISSOURI BOTANICAL GARDEN. *Byrsonima incarnata* Sandwith. Disponível em: <http://www.tropicos.org/Name/19501617>. Acesso em: 27 de janeiro de 2017c.

MISSOURI BOTANICAL GARDEN. *Byrsonima japurensis* A. Juss. Disponível em: <http://www.tropicos.org/Name/19500195>. Acesso em: 27 de janeiro de 2017d.

MITJAVILA, M. T.; MORENO, J. J. The effects of polyphenols on oxidative stress and the arachidonic acid cascade. Implications for the prevention/treatment of high prevalence diseases. **Biochemical Pharmacology**, v. 84, n. 9, p. 1113–1122, 2012.

MOELLERING, R. C. Discovering new antimicrobial agents. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 37, n. 1, p. 2–9, 2011.

MOORS, E. H. M.; COHEN, A. F.; SCHELLEKENS, H. Towards a sustainable system of drug development. **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 11, p. 1711–1720, 2014.

MOREIRA, L. Q. et al. Anti-inflammatory effect of extract and fractions from the leaves of *Byrsonima intermedia* A. Juss. in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 138, n. 2, p. 610–615, 2011.

MORIMOTO, K. et al. Prostaglandin E2-EP3 signaling induces inflammatory swelling by mast cell activation. **Journal of Immunology**, v. 192, p. 1130–1137, 2014.

MORRIS, G. M. et al. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. **Journal of Computational Chemistry**, v. 19, n. 14, p. 1639–1662, 1998.

MOSES, T.; PAPADOPOULOU, K. K.; OSBOURN, A. Metabolic and functional diversity of saponins, biosynthetic intermediates and semi-synthetic derivatives. **Critical Reviews in Biochemistry And Molecular Biology**, v. 49, n. 6, p. 439–62, 2014.

MUFFLER, K. et al. Biotransformation of triterpenes. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 1–15, 2011.

MUNIZ-RAMIREZ, A. et al. Antimicrobial activities of diterpene labdane from seeds of *Byrsonima crassifolia*. **Boletín Latinoamericano Y Del Caribe De Plantas Medicinales Y**

Aromaticas, v. 13, n. 1, p. 31–37, 2014.

MUTHENNA, P. et al. Inhibition of advanced glycation end-product formation on eye lens protein by rutin. **British Journal of Nutrition**, v. 107, n. 7, p. 941–949, 2012.

NAKAYAMA, G. R. et al. Assessment of the Alamar blue assay for cellular growth and viability *in vitro*. **Journal of Immunological Methods**, v. 2, n. 204, p. 205–208, 1997.

NAPAGODA, M. et al. Inhibition of 5-lipoxygenase as anti-inflammatory mode of action of *Plectranthus zeylanicus* Benth and chemical characterization of ingredients by a mass spectrometric approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, n. 2, p. 800–809, 2014.

NARENDER, T. et al. Synthesis of α -amyrin derivatives and their *in vivo* antihyperglycemic activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 3, p. 1215–1222, 2009.

NARUZAWA, E. S.; PAPA, M. F. S. Antifungal activity of extracts from Brazilian Cerrado plants on *Colletotrichum gloeosporioides* and *Corynespora cassiicola*. **Brazilian Journal of Medicinal Plants**, v. 13, n. 4, p. 408–412, 2011.

NASR BOUZAIENE, N. et al. The effects of caffeic, coumaric and ferulic acids on proliferation, superoxide production, adhesion and migration of human tumor cells *in vitro*. **European Journal of Pharmacology**, v. 766, p. 99–105, 2015.

NATHAN, C.; CUNNINGHAM-BUSSEL, A. Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species. **Nature Reviews. Immunology**, v. 13, n. 5, p. 349–61, 2013.

NDENGELE, M. M. et al. Cyclooxygenases 1 and 2 contribute to peroxynitrite-mediated inflammatory pain hypersensitivity. **The FASEB Journal**, v. 22, n. 9, p. 3154–3164, 2008.

NEILSON, A. P.; O'KEEFE, S. F.; BOLLING, B. W. High-molecular-weight proanthocyanidins in foods: overcoming analytical challenges in pursuit of novel dietary bioactive components. **Annual Review of Food Sciences and Technology**, v. 7, p. 43–64, 2016.

NEVES, L. C. et al. Post-harvest nutraceutical behaviour during ripening and senescence of 8 highly perishable fruit species from the Northern Brazilian Amazon region. **Food Chemistry**, v. 174, p. 188–196, 2015.

NIEDZWIECKI, A. et al. Anticancer efficacy of polyphenols and their combinations. **Nutrients**, v. 8, n. 9, 2016.

NIJVELDT, R. Flavonoids: a review of probable mechanism of action and potential applications. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 74, p. 418–425, 2001.

NISHIO, M. et al. CH- π hydrogen bonds in biological macromolecules. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 16, n. 25, p. 12648–12683, 2014.

NO, J. H. Visceral leishmaniasis: Revisiting current treatments and approaches for future discoveries. **Acta Tropica**, v. 155, p. 113–123, 2016.

NORBERG, J. K. et al. Targeting inflammation: multiple innovative ways to reduce. v. 2, n. 2, p. 265–288, 2014.

NUCCI, C. **Potencial terapêutico do extrato etanólico dos frutos da *Pterodon pubescens* Benth. no controle da dor aguda e crônica.** 2014. Dissertação (Mestrado em Neurociências) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, 2014.

NUSSBAUM, K. et al. Trypanosomatid parasites causing neglected diseases. **Current Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 15, p. 1594–1617, 2010.

ODDS, F. C.; BROWN, A. J. P.; GOW, N. A R. Antifungal agents: mechanisms of action. **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 6, p. 272–279, 2003.

OGUNGBE, I. V.; SETZER, W. N. In-silico *Leishmania* target selectivity of antiparasitic terpenoids. **Molecules**, v. 18, n. 7. p.7761-7847.

OLDFIELD, E.; FENG, X. Resistance-resistant antibiotics. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 35, n. 12, p. 664–674, 2014.

OLIVEIRA, O. W.; PETROVICK, P. R. Secagem por aspersão (spray drying) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 4, p. 641–650, 2010.

OPREAN, C. et al. Improvement of ursolic and oleanolic acids' antitumor activity by complexation with hydrophilic cyclodextrins. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 83, p. 1095–1104, 2016.

ORHAN, I. et al. Naringenin and atherosclerosis: a review of literature. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 16, n. 3, p. 245–251, 2015.

ORLANDI, L. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of the stem bark of *Byrsonima intermedia* A. Juss. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 3, p. 1469–1476, 2011.

OYINLOYE, B.; ADENOWO, A.; KAPPO, A. Reactive oxygen species, apoptosis, antimicrobial peptides and human inflammatory diseases. **Pharmaceuticals**, v. 8, n. 2, p. 151–175, 2015.

PARMAR, S. K. et al. Neuropharmacological effects of triterpenoids. **Phytopharmacology**, v. 4, n. 2, p. 354–372, 2013.

PASHIKANTI, S. et al. Rutin metabolites: novel inhibitors of nonoxidative advanced glycation end products. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 48, n. 5, p. 656–663, 2010.

PATRIGNANI, P.; PATRONO, C. Cyclooxygenase inhibitors: from pharmacology to clinical read-outs. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1851, n. 4, p. 422–432, 2015.

PAUTZ, A. et al. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. **Nitric Oxide**, v. 23, n. 2, p. 75–93, 2010.

PEDRIQUE, B. et al. The drug and vaccine landscape for neglected diseases (2000-11): A systematic assessment. **The Lancet Global Health**, v. 1, n. 6, p. 371–379, 2013.

PÉREZ-CANO, F. J.; CASTELL, M. Flavonoids, inflammation and immune system. **Nutrients**, v. 8, n. 10, p. 8–11, 2016.

PÉREZ GUTIÉRREZ, R. M.; MUÑIZ RAMIREZ, A. Hexane extract of the seeds of *Byrsonima crassifolia* accelerates wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. **Chinese Journal of Integrative Medicine**, p. 1–7, 2013.

PERO, R. W.; LUND, H.; LEANDERSON, T. Antioxidant metabolism induced by quinic acid. Increased urinary excretion of tryptophan and nicotinamide. **Phytotherapy Research**, v. 23, n. 3, p. 335–346, 2008.

PFALLER, M. A. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. **American Journal of Medicine**, v. 125, n. 1 SUPPL., p. S3–S13, 2012.

PINHO, E. et al. Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, n. 1, p. 121–135, 2014.

PÍO-LEÓN, J. F. et al. Actividad antibacteriana de extractos de frutos de nanchi (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth), arrayán (*Psidium sartorianum* (O. Berg) Nied.) y ayale (*Crescentia alata* Kunth). **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 12, n. 4, p. 356–364, 2013.

PIOMELLI, D.; SASSO, O. Peripheral gating of pain signals by endogenous lipid mediators. **Nature Neuroscience**, v. 17, n. 2, p. 164–74, 2014.

PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a Review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 55–74, 2015.

PLUMB, G. W. et al. Antioxidant properties of gallic catechin and prodelpinidins from pomegranate peel. **Redox Report**, v. 7, n. 1, p. 41–46, 2002.

PODOLAK, I.; JANECKO, Z. Pharmacological activity of natural non-glycosylated triterpenes. **Mini-Reviews in Organic Chemistry**, v. 11, p. 280–291, 2014.

POLANCO-HERNÁNDEZ, G. et al. *In vitro* and *in vivo* trypanocidal activity of native plants from the Yucatan Peninsula. **Parasitology Research**, v. 110, n. 1, p. 31–35, 2012.

POMEL, S.; COJEAN, S.; LOISEAU, P. M. Targeting sterol metabolism for the development of antileishmanials. **Trends in Parasitology**, v. 31, n. 1, p. 5–7, 2015.

PONTE-SUCRE, A. An overview of *Trypanosoma brucei* infections: an intense host-parasite interaction. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 2126, 2016.

PROCHÁZKOVÁ, D.; BOUŠOVÁ, I.; WILHELMOVÁ, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. **Fitoterapia**, v. 82, n. 4, p. 513–523, 2011.

RADI, R. Peroxynitrite, a stealthy biological oxidant. **Journal of Biological Chemistry**, v.

288, n. 37, p. 26464–26472, 2013.

RAJENDRAN, P. et al. Kaempferol, a potential cytostatic and cure for inflammatory disorders. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 86, p. 103–112, 2014.

RAMIREZ, A. M.; COTERA, L. B. F.; GUTIERREZ, R. M. P. Anti-inflammatory activity of the hexane extract of *Byrsonima crassifolia* seeds in experimental animal models. **Alternative Therapies**, v. 19, n. 1, p. 26–36, 2013.

RASHEED, A.; KUMAR C. K. A.; SRAVANTHI, V. V. N. S. S. Cyclodextrins as drug carrier molecule: A review. **Scientia Pharmaceutica**, v. 76, n. 4, p. 567–598, 2008.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

ROCHETTE, L. et al. Nitric oxide synthase inhibition and oxidative stress in cardiovascular diseases: Possible therapeutic targets? **Pharmacology and Therapeutics**, v. 140, n. 3, p. 239–257, 2013.

RODRIGUES, P. A. et al. Gastroprotective effect of *Byrsonima sericea* DC leaf extract against ethanol-induced gastric injury and its possible mechanisms of action. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 84, n. 1, p. 113–122, 2012.

ROKICKA, K.; WOJCIAK-KOSIOR, M. Identification and quantitative analysis of amyryns in *Humulus lupulus* L. **Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences**, v. 27, n. 3, p. 142–144, 2015.

ROLEIRA, F. M. F. et al. Plant derived and dietary phenolic antioxidants: anticancer properties. **Food Chemistry**, v. 183, p. 235–258, 2015.

ROMANO, M. et al. Lipoxins and aspirin-triggered lipoxins in resolution of inflammation. **European Journal of Pharmacology**, v. 760, p. 49–63, 2015.

RUDDOCK, P. S. et al. Antimicrobial activity of flavonoids from *Piper lanceaefolium* and other Colombian medicinal plants against antibiotic susceptible and resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae*. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 38, n. 2, p. 82–88, 2011.

RUFINO, M. DO S. M. et al. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, n. 4, p. 996–1002, 2010.

SALDANHA, A. A. et al. Anti-inflammatory effects of the butanolic fraction of *Byrsonima verbascifolia* leaves: Mechanisms involving inhibition of tumor necrosis factor alpha, prostaglandin E2 production and migration of polymorphonuclear leucocyte in vivo experimentation. **International Immunopharmacology**, v. 31, p. 123–131, 2016a.

SALDANHA, A. A. et al. Chemical composition and anti-inflammatory activity of the leaves of *Byrsonima verbascifolia*. **Journal of Natural Medicines**, v. 70, n. 4, p. 760–768, 2016b.

SALDANHA, A. A.; SOARES, A. C. Compostos químicos e aspectos botânicos, etnobotânicos e farmacológicos da *Byrsonima verbascifolia* Rich ex. A. Juss. **Revista Brasileira de Plantas**

Medicinais, v. 17, n. 4, p. 1000–1006, 2015.

SAMPAIO, C. R. P.; HAMERSKI, F.; RIBANI, R. H. Antioxidant phytochemicals of *Byrsonima ligustrifolia* throughout fruit developmental stages. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 400–410, 2015.

SANT, D. G. et al. Fungal cell membrane - promising drug target for antifungal therapy. **Journal of Applied Microbiology**, p. 1–13, 2016.

SANTOS, R. C. et al. *Byrsonima intermedia* A. Juss.: Gastric and duodenal anti-ulcer, antimicrobial and antidiarrheal effects in experimental rodent models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 140, n. 2, p. 203–212, 2012.

SAPORITO, L. et al. Visceral leishmaniasis: host – parasite interactions and clinical presentation in the immunocompetent and in the immunocompromised host. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 8, p. e572–e576, 2013.

SASSO, O. et al. Multitarget fatty acid amide hydrolase/cyclooxygenase blockade suppresses intestinal inflammation and protects against nonsteroidal anti-inflammatory drug-dependent gastrointestinal damage. **FASEB Journal**, v. 29, n. 6, p. 2616–2627, 2015.

SAUVAGE, E.; TERRAK, M. Glycosyltransferases and transpeptidases/penicillin-binding proteins: valuable targets for new antibacterials. **Antibiotics**, v. 5, n. 12, p. 1–27, 2016.

SAVOIA, D. Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics. **Future Microbiology**, v. 7, n. 8, p. 979–990, 2012.

SAVOIA, D. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 9, n. 6, p. 588–596, 2015.

SCARPELLI, R.; SASSO, O.; PIOMELLI, D. A double whammy: targeting both fatty acid amide hydrolase (FAAH) and cyclooxygenase (COX) to treat pain and inflammation. **ChemMedChem**, v. 11, n. 12, p. 1242–1251, 2016.

SCHMIDTKO, A.; TEGEDER, I.; GEISLINGER, G. No NO, no pain? The role of nitric oxide and cGMP in spinal pain processing. **Trends in neurosciences**, v. 32, n. 6, p. 339–46, 2009.

SCHNEIDER, C. et al. Control of Oxygenation in Lipoxygenase and Cyclooxygenase Catalysis. **Chemistry and Biology**, v. 14, n. 5, p. 473–488, 2007.

SCHULTES, S. et al. Ligand efficiency as a guide in fragment hit selection and optimization. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 7, n. 3, p. 157–162, 2010.

SCORZONI, L. et al. Antifungal therapy: new advances in the understanding and treatment of mycosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. January, p. 1–23, 2017.

SEIFERT, K. Structures, targets and recent approaches in anti-leishmanial drug discovery and development. **The Open Medicinal Chemistry Journal**, v. 5, p. 31–39, 2011.

SEO, S. et al. Isorhamnetin inhibits reactive oxygen species-dependent hypoxia inducible factor

(HIF) -1 α accumulation. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 39, n. 11, p. 1830–1838, 2016.

SEVGI, K.; TEPE, B.; SARIKURKCU, C. Antioxidant and DNA damage protection potentials of selected phenolic acids. **Food and Chemical Toxicology**, v. 77, p. 12–21, 2015.

SILVA-JARDIM, I.; THIEMANN, O. H.; ANIBAL, F. F. Leishmaniasis and Chagas disease chemotherapy: a critical review. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 10, p. 1810–1823, 2014.

SIMMONS, K. J.; CHOPRA, I.; FISHWICK, C. W. G. Structure-based discovery of antibacterial drugs. **Nature reviews. Microbiology**, v. 8, n. 7, p. 501–510, 2010.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017. 486p.

SINGH, S. B.; YOUNG, K.; SILVER, L. L. What is an “ideal” antibiotic? Discovery challenges and path forward. **Biochemical Pharmacology**, v. 133, p. 63–73, 2017.

SMERIGLIO, A. et al. Proanthocyanidins and hydrolysable tannins: occurrence, dietary intake and pharmacological effects. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, n. 11, 2017.

SMITHSONIAN TROPICAL RESEARCH INSTITUTE. *Byrsonima crispa* A. Juss. Disponível em: <http://biogeodb.stri.si.edu/biodiversity/species/28535/>. Acesso em: 27 de janeiro de 2017.

SOICA, C. et al. Betulinic acid in complex with a gamma-cyclodextrin derivative decreases proliferation and in vivo tumor development of non-metastatic and metastatic B164A5 cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 5, p. 8235–8255, 2014a.

SOICA, C. et al. New improved drug delivery technologies for pentacyclic triterpenes: A review. **Protein and Peptide Letters**, v. 21, n. 11, p. 1137–1145, 2014b.

SOLDI, C. et al. Synthetic derivatives of the α - and β -amyrin triterpenes and their antinociceptive properties. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 6, p. 3377–3386, 2008.

SOSTRES, C. et al. Adverse effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs, aspirin and coxibs) on upper gastrointestinal tract. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 24, n. 2, p. 121–132, 2010.

STABLES, M. J.; GILROY, D. W. Old and new generation lipid mediators in acute inflammation and resolution. **Progress in Lipid Research**, v. 50, n. 1, p. 35–51, 2011.

STEIMBACH, L. M. et al. Efficacy and safety of amphotericin B lipid-based formulations-A systematic review and meta-analysis. **Mycoses**, v. 60, n. 3, p. 146–154, 2017.

STEINHILBER, D.; HOFMANN, B. Recent advances in the search for novel 5-lipoxygenase inhibitors. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 114, n. 1, p. 70–77, 2014.

STELLA, V. J.; HE, Q. Cyclodextrins. **Toxicologic Pathology**, v. 36, n. 1, p. 30–42, 2008.

SU, K.-Y. et al. 3,4-Dihydroxytoluene, a metabolite of rutin, inhibits inflammatory responses in lipopolysaccharide-activated macrophages by reducing the activation of NF- κ B signaling. **BMC Complementary And Alternative Medicine**, v. 14, n. 1, p. 21, 2014.

SUVARNA, V.; GUJAR, P.; MURAHARI, M. Complexation of phytochemicals with cyclodextrin derivatives – An insight. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 88, p. 1122–1144, 2017.

TAYLOR, P. et al. Screening of Venezuelan medicinal plants extracts for cytotoxic and cytostatic activity against tumor cell lines. **Phytotherapy Research**, v. 27, p. 530–539, 2013.

TAYLOR, P. W. Alternative natural sources for a new generation of antibacterial agents. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 42, n. 3, p. 195–201, 2013.

THÉRY, H. Situações da Amazônia no Brasil e no continente. **Estudos Avançados**, v. 19, n. 53, p. 37–49, 2005.

THIMMAPPA, R. et al. Triterpene biosynthesis in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 65, p. 225–257, 2014.

TIMM, M. et al. Considerations regarding use of solvents in in vitro cell based assays. **Cytotechnology**, v. 65, n. 5, p. 887–894, 2013.

TONG, Y.; TANG, J. Candida albicans infection and intestinal immunity. **Microbiological Research**, v. 198, p. 27–35, 2017.

TSAO, R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. **Nutrients**, v. 2, n. 12, p. 1231–1246, 2010.

TSUCHIYA, H. Membrane interactions of phytochemicals as their molecular mechanism applicable to the discovery of drug leads from plants. **Molecules**, v. 20, n. 10, p. 18923–18966, 2015.

TUÑÓN, M. J. et al. Potential of flavonoids as anti-inflammatory agents: modulation of pro-inflammatory gene expression and signal transduction pathways. **Current drug metabolism**, v. 10, n. 3, p. 256–271, 2009.

VAQUE, M. et al. Protein-ligand docking: a review of recent advances and future perspectives. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 4, n. 1, p. 1–19, 2008.

VARGAS, F. S. et al. Antioxidant activity and peroxidase inhibition of Amazonian plants extracts traditionally used as anti-inflammatory. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 16, n. 1, p. 83, 2016.

VELDERRAIN-RODRÍGUEZ, G. R. et al. Function phenolic compounds: their journey after intake. **Food & Function**, v. 5, p. 189–197, 2014.

VENTURINI, C. D. G. et al. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. **Quimica Nova**, v. 31, n. 2, p. 360–368, 2008.

VERDAM, M. C. S. **Contribuição ao estudo fitoquímico e biológico de *Byrsonima duckeana* W. R. Anderson (Malpighiaceae)**. 2014. 146f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

VERDAM, M. C. S. et al. Analgesic, anti-Inflammatory, and antioxidant activities of *Byrsonima duckeana* W. R. Anderson (Malpighiaceae). **The Scientific World Journal**, v. 2017, n. ID 8367042, p. 1–8, 2017.

VERMA, N. et al. Anti-inflammatory effects of shea butter through inhibition of iNOS, COX-2, and cytokines via the Nf-Kb pathway in LPS-activated J774 macrophage cells. **Journal of Complementary and Integrative Medicine**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2012.

VERMELHO, A. B. et al. Carbonic anhydrases from *Trypanosoma* and *Leishmania* as anti-protozoan drug targets. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 25, n. 5, p. 1543–1555, 2017.

VICENTINI, A.; ANDERSON, W. R. Malpighiaceae. In: RIBEIRO, J.E.L.S. et al. **Flora da reserva Ducke - guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme da Amazônia Central**. Manaus: INPA-DFID, 1999. v. 1, p. 505-511.

VILAS BOAS, J. C. et al. Two sympatric *Byrsonima* species (Malpighiaceae) differ in phenological and reproductive patterns. **Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 208, n. 5–6, p. 360–369, 2013.

VILLANUEVA, J. R.; ESTEBAN, J. M.; VILLANUEVA, L. R. Solving the puzzle: what is behind our forefathers' anti-inflammatory remedies? **Journal of Intercultural Ethnopharmacology**, v. 6, n. 1, 2017.

VLASSOPOULOS, A.; LEAN, M. E. J.; COMBET, E. Protein-phenolic interactions and inhibition of glycation - combining a systematic review and experimental models for enhanced physiological relevance. **Food & function**, v. 5, n. 10, p. 2646–2655, 2014.

VONKEMAN, H. E.; VAN DE LAAR, M. A F. J. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: adverse effects and their prevention. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 39, n. 4, p. 294–312, 2010.

WAGNER, H. Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Fitoterapia**, v. 82, n. 1, p. 34–37, 2011.

WARFIELD, J.; SETZER, W. N.; OGUNGBE, I. V. Interactions of antiparasitic sterols with sterol 14 α -demethylase (CYP51) of human pathogens. **SpringerPlus**, v. 3, n. 1, p. 679, 2014.

WELSCH, M. E.; SNYDER, S. A.; STOCKWELL, B. R. Privileged scaffolds for library design and drug discovery. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 14, n. 3, p. 347–361, 2010.

WHALEY, S. G. et al. Azole antifungal resistance in *Candida albicans* and emerging non-albicans *Candida* species. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. January, p. 1–12, 2017.

WINK, M. Evolutionary advantage and molecular modes of action of multi-component mixtures used in phytomedicine. **Current Drug Metabolism**, v. 9, n. 10, p. 996–1009, 2008.

WOLSKA, K. I. et al. Antibacterial activity of oleanolic and ursolic acids and their derivatives. **Central European Journal of Biology**, v. 5, n. 5, p. 543–553, 2010.

WRIGHT, G. D. Antibiotic adjuvants: rescuing antibiotics from resistance. **Trends in Microbiology**, v. 24, n. 11, p. 862–871, 2016.

WRIGHT, P. M.; SEIPLE, I. B.; MYERS, A. G. The evolving role of chemical synthesis in antibacterial drug discovery. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 53, n. 34, p. 8840–8869, 2014.

XU, D. P. et al. Natural antioxidants in foods and medicinal plants: extraction, assessment and resources. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 1, p. 96, 2017.

YANG, J.; GUO, J.; YUAN, J. *In vitro* antioxidant properties of rutin. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, n. 6, p. 1060–1066, 2008.

YAO, J.; ROCK, C. O. Bacterial fatty acid metabolism in modern antibiotic discovery. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1862, n. 11, p. 1300–1309, 2017.

ZHANG, J. et al. ROS and ROS-mediated cellular signaling. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, n. ID4350965, 2016.

ZHANG, M.; XIA, Z.; YAN, A. Computer modeling in predicting the bioactivity of human 5-lipoxygenase inhibitors. **Molecular Diversity**, v. 21, n. 1, p. 235–246, 2017.

ZHANG, W.; MEN, X.; LEI, P. Review on anti-tumor effect of triterpene acid compounds. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v. 10, n. 5, p. 14, 2014.

ZOU, M. H. Peroxynitrite and protein tyrosine nitration of prostacyclin synthase. **Prostaglandins and Other Lipid Mediators**, v. 82, n. 1–4, p. 119–127, 2007.

CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

2013												
ATIVIDADES	MESES											
	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Mar	Abr
Coleta e caracterização da matéria-prima vegetal	R	R	R									
Obtenção e caracterização dos extratos brutos				R	R	R						
Disciplinas obrigatórias e optativas	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

2014												
ATIVIDADES	MESES											
	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
Atividade antioxidante por métodos químicos	R	R	R									
Testes de inibição enzimática				R	R							
Atividade anti-inflamatória <i>in vitro</i>						R	R					
Atividade anti-inflamatória/analgésica <i>in vivo</i>								R	R	R		
Obtenção dos derivados semissintéticos							R	R	R	R	R	R

2015												
ATIVIDADES	MESES											
	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
Obtenção dos derivados semissintéticos	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Preparação do plano de qualificação					R	R	R	R				
Realização do exame de qualificação								R				

2016												
ATIVIDADES	MESES											
	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
Organização da documentação para a cotutela	R	R	R									
Avaliação da atividade antimicrobiana			R	R	R	R	R	R	R			
Obtenção dos complexos de inclusão							R	R	R			
Análises de ancoragem molecular				R	R	R	R	R	R			
Análise dos resultados										R	R	R
Elaboração e submissão de artigos científicos										R	R	R

2017				
ATIVIDADES	MESES			
	Jan	Fev	Mar	Abr
Preparação do texto da Tese	R	R	R	R
Realização da defesa da Tese				R
Elaboração do pedido de patente				R

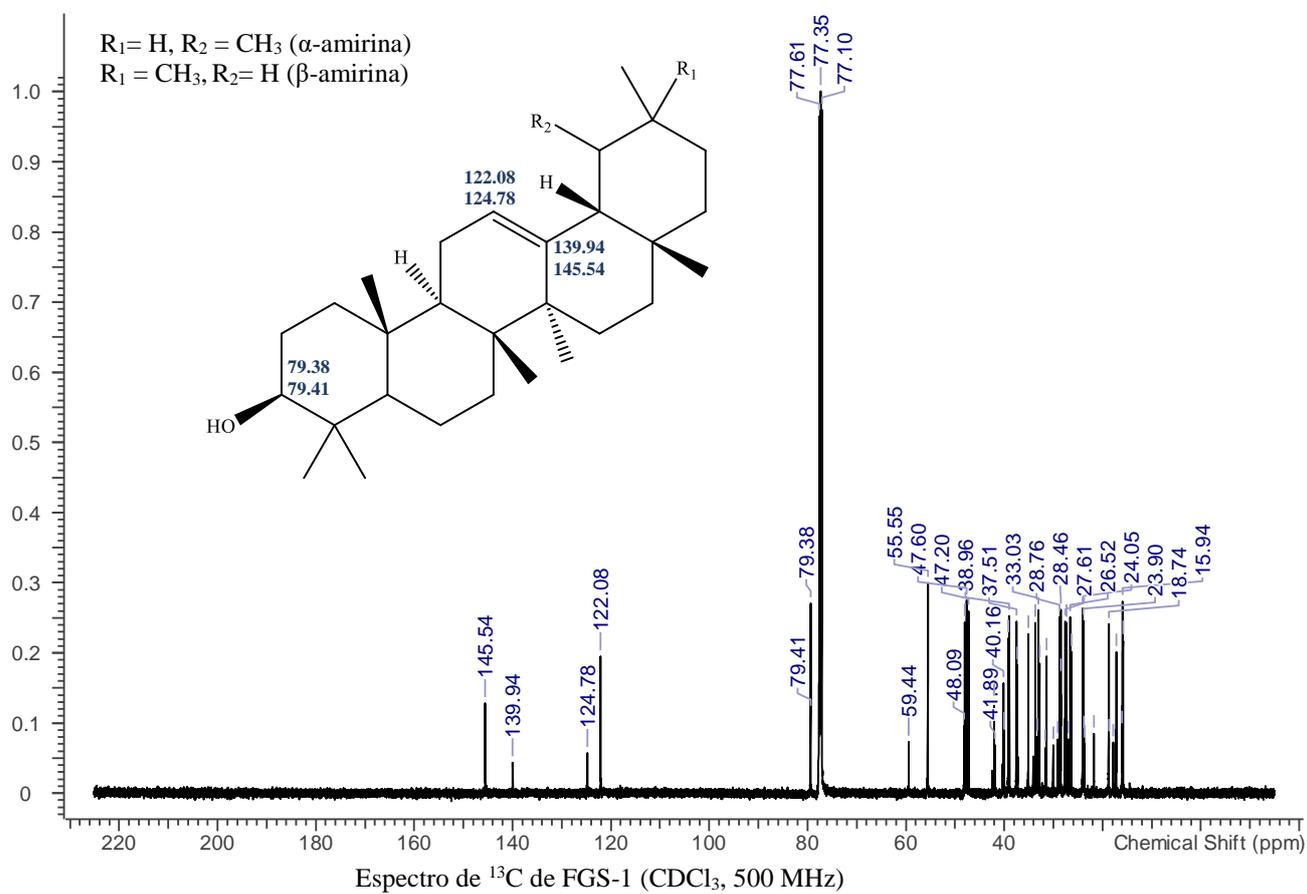
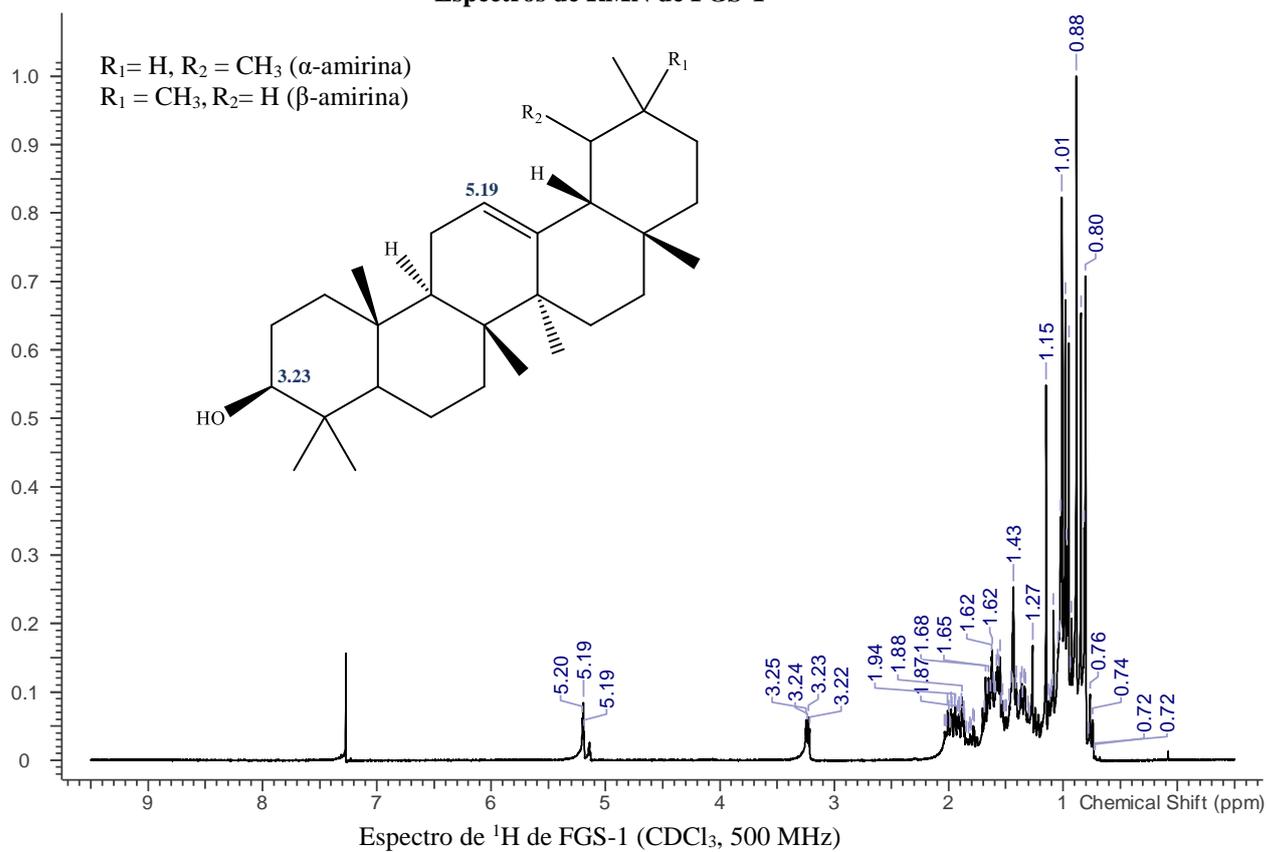
R = realizado

EQUIPE CIENTÍFICA

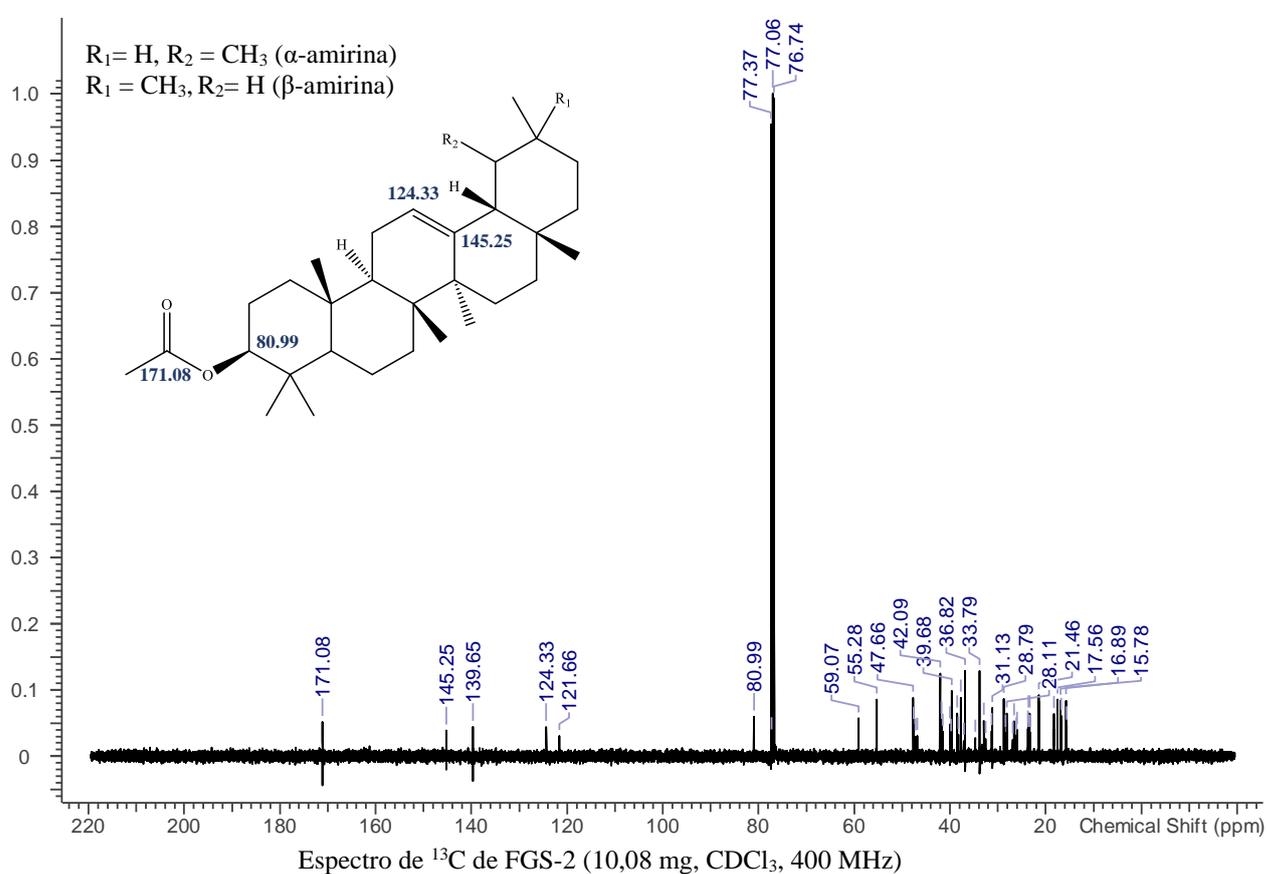
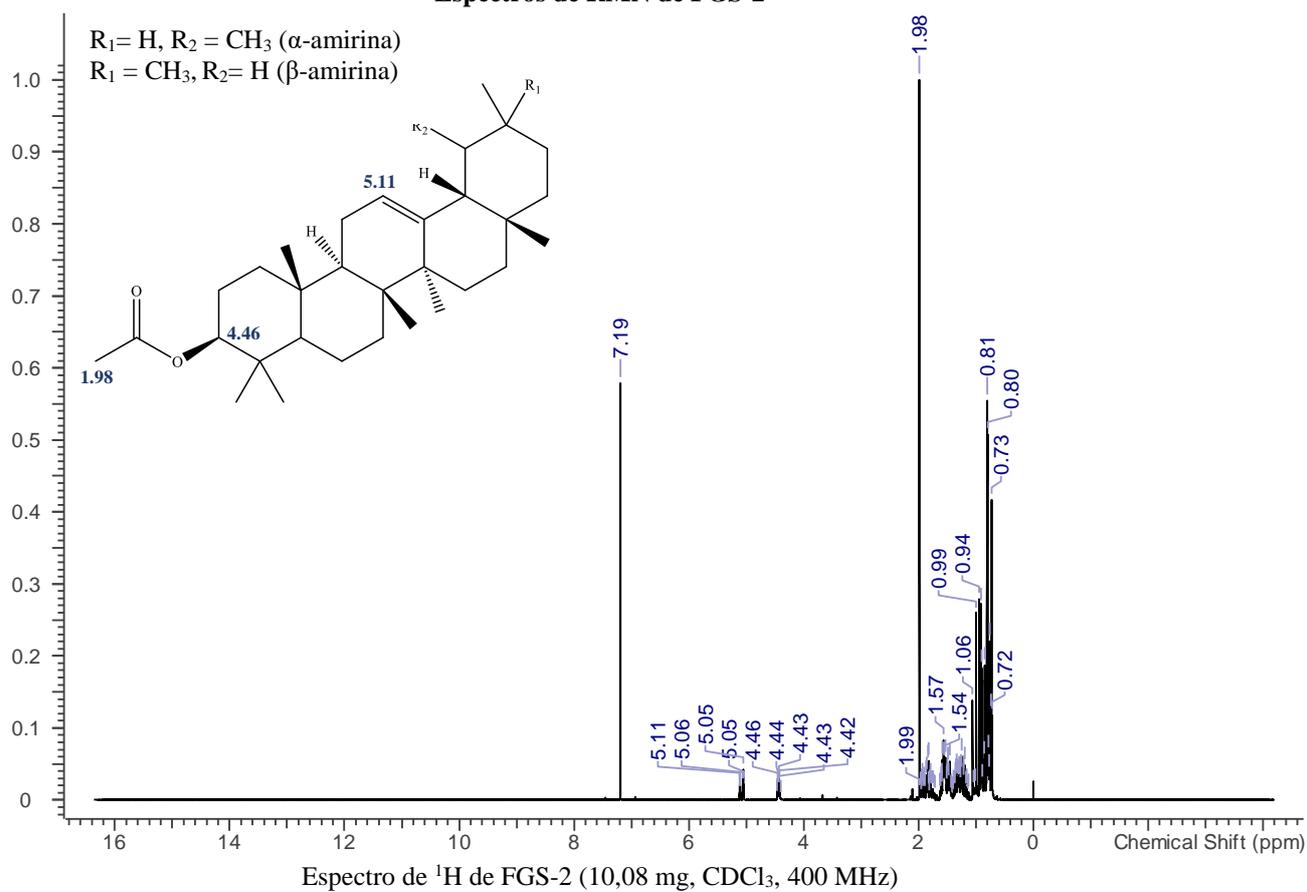
PESQUISADORES	
Nome	Instituição
Profa. Dra. Ana Cristina Pinto	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos	Universidade Federal de Santa Catarina
Prof. Dr. David Rodrigues da Rocha	Universidade Federal Fluminense
Prof. Dr. Felipe Moura Araújo da Silva	Universidade Federal do Amazonas
Prof. Dr. Filip Kiekens	Universidade da Antuérpia
Prof. Dr. Hans De Winter	Universidade da Antuérpia
Prof. Dr. Hector Henrique Ferreira Koolen	Universidade do Estado do Amazonas
Prof. Dr. Vitor Francisco Ferreira	Universidade Federal Fluminense
TÉCNICOS E ESTUDANTES	
Nome	Instituição
M.Sc. Adrienn Baán	Universidade da Antuérpia
Farm. Carlos Klinger Rodrigues Serrão	Universidade Federal do Amazonas
M. Sc. Leandro Flores do Nascimento	Universidade Federal de Santa Catarina
Farm. Leonard Domingo Rosales Acho	Universidade Federal do Amazonas
M. Sc. Paulo Anastácio Furtado Pacheco	Universidade Federal Fluminense
Farm. Tallita Marques Machado	Universidade Federal do Amazonas

APÊNDICES

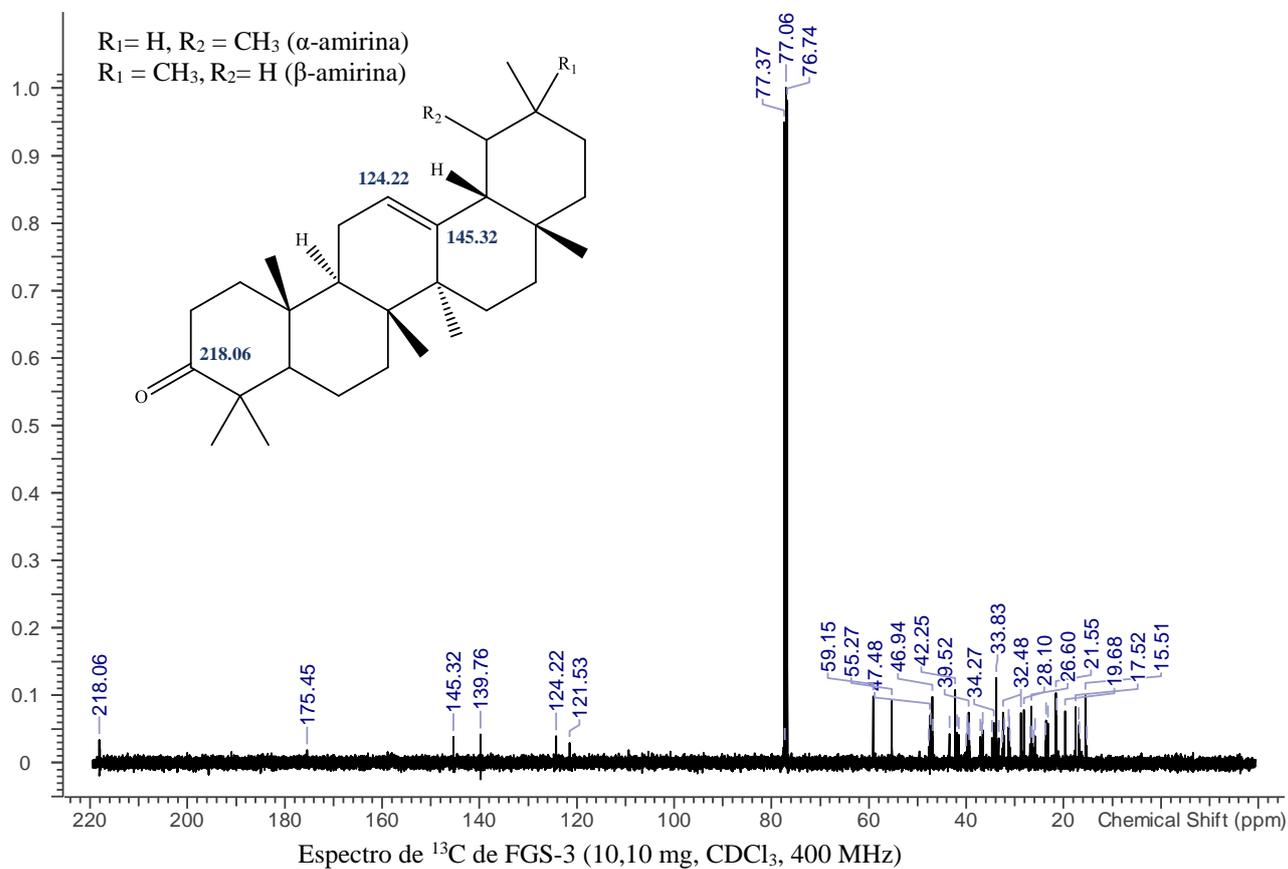
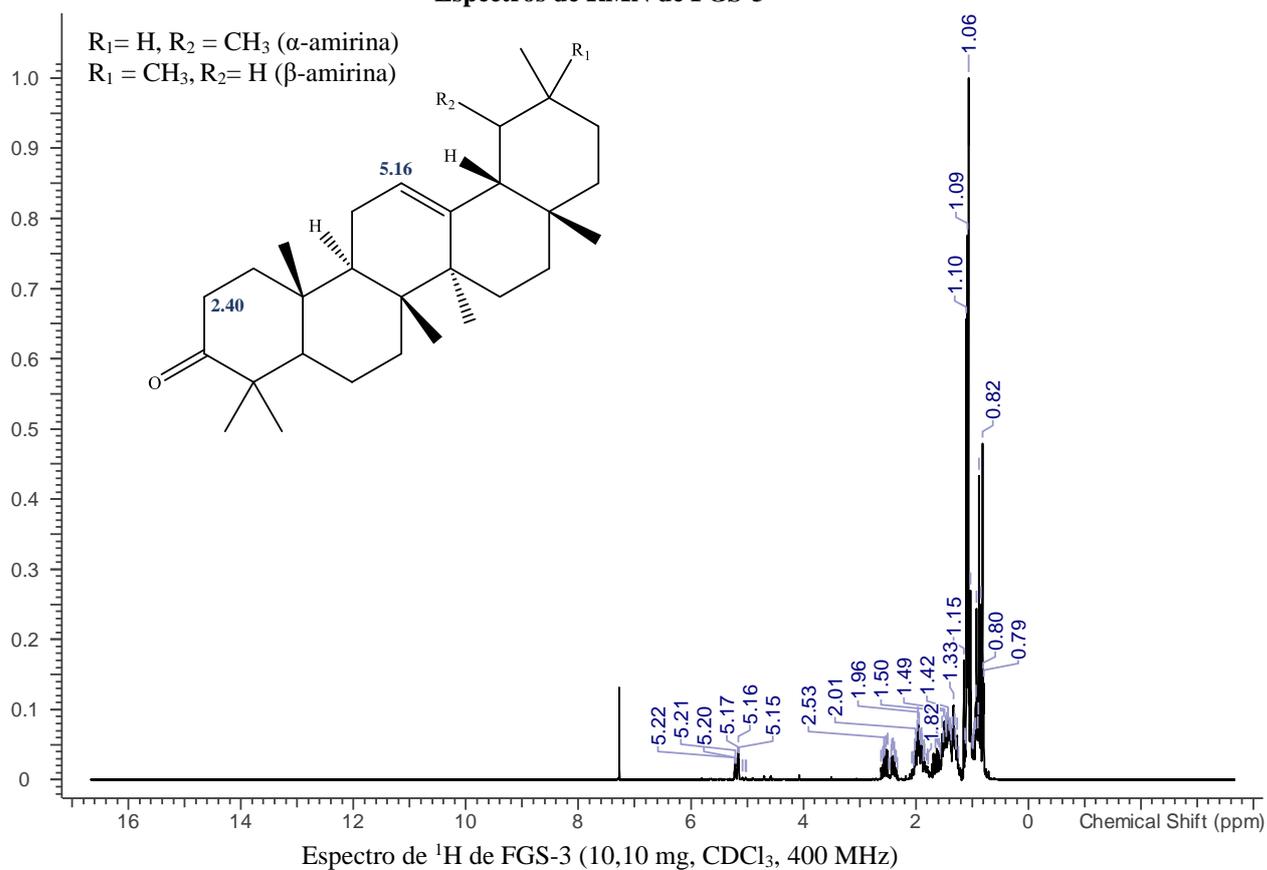
Espectros de RMN de FGS-1



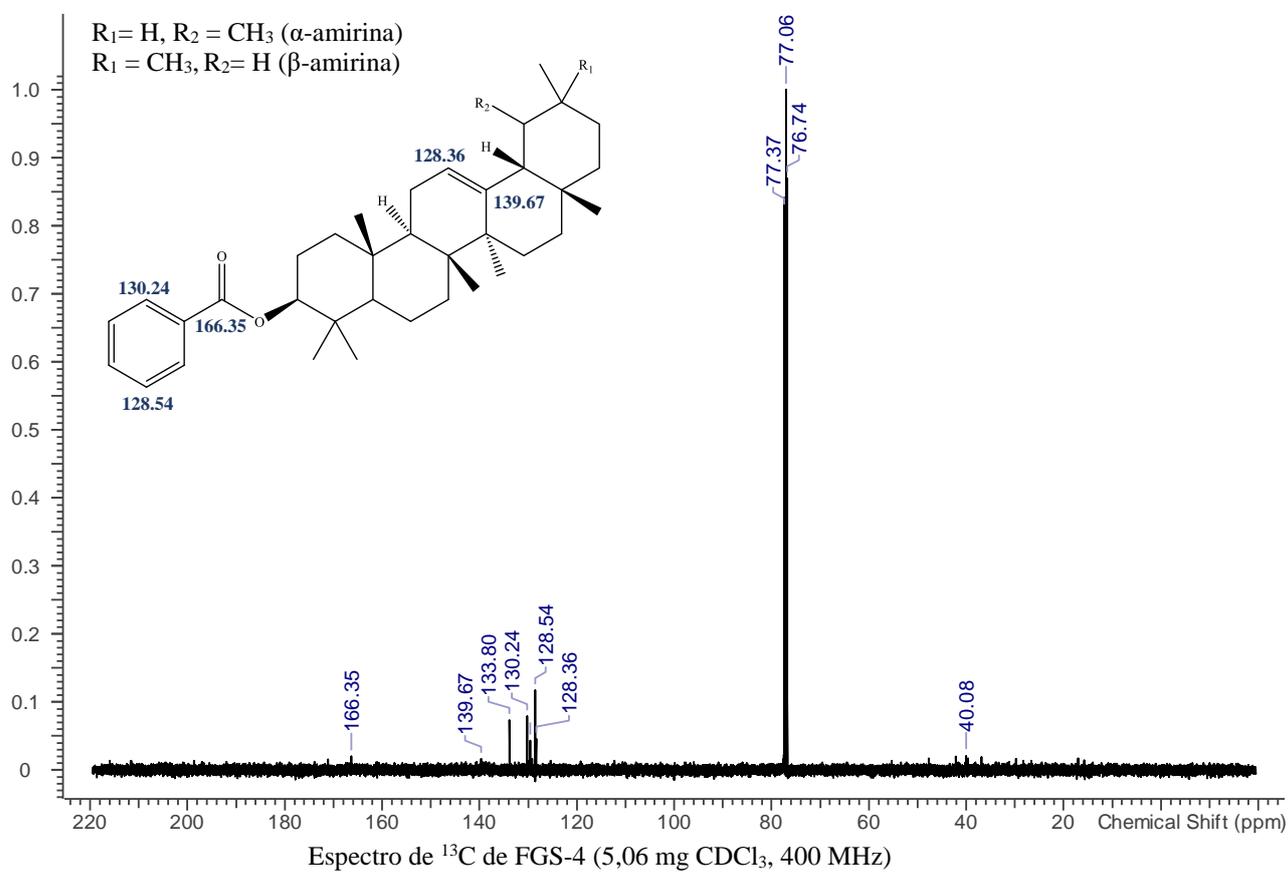
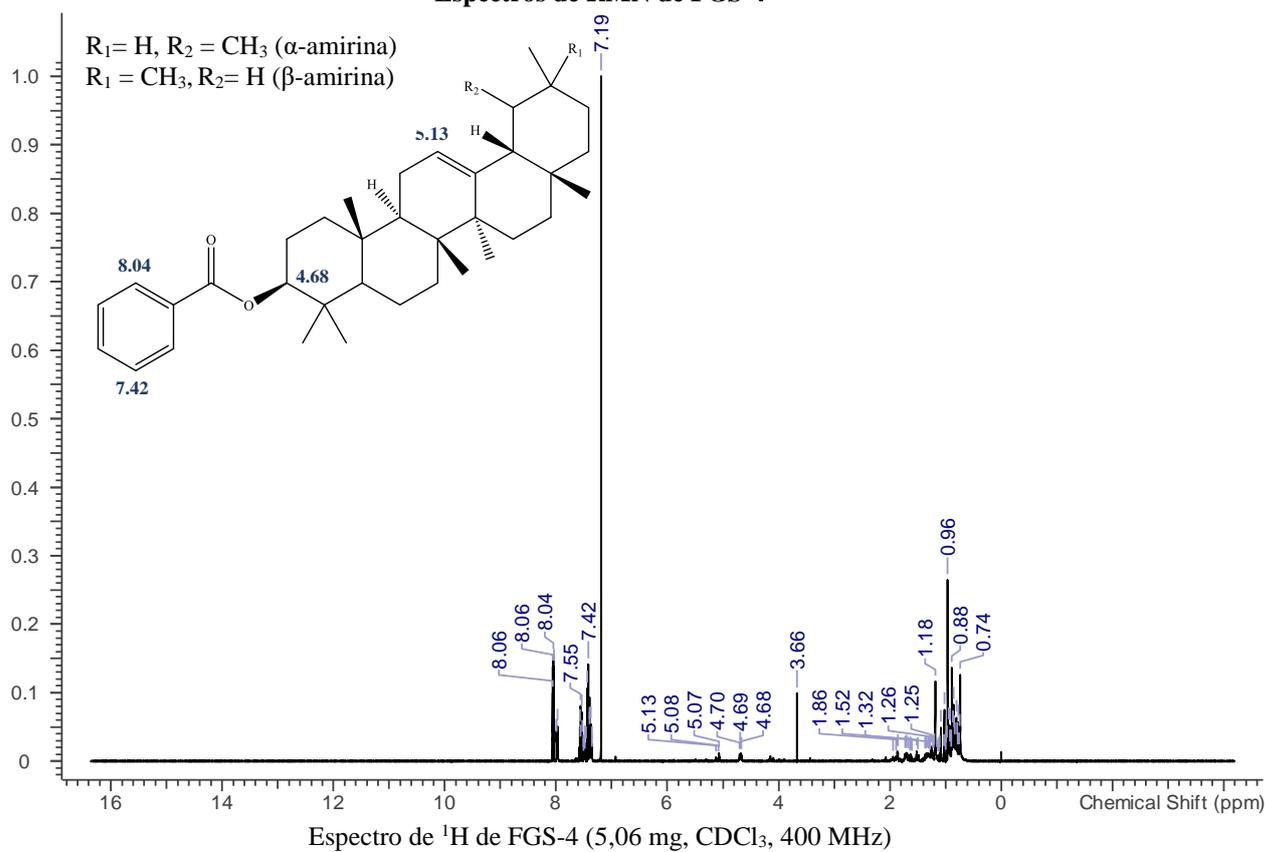
Espectros de RMN de FGS-2



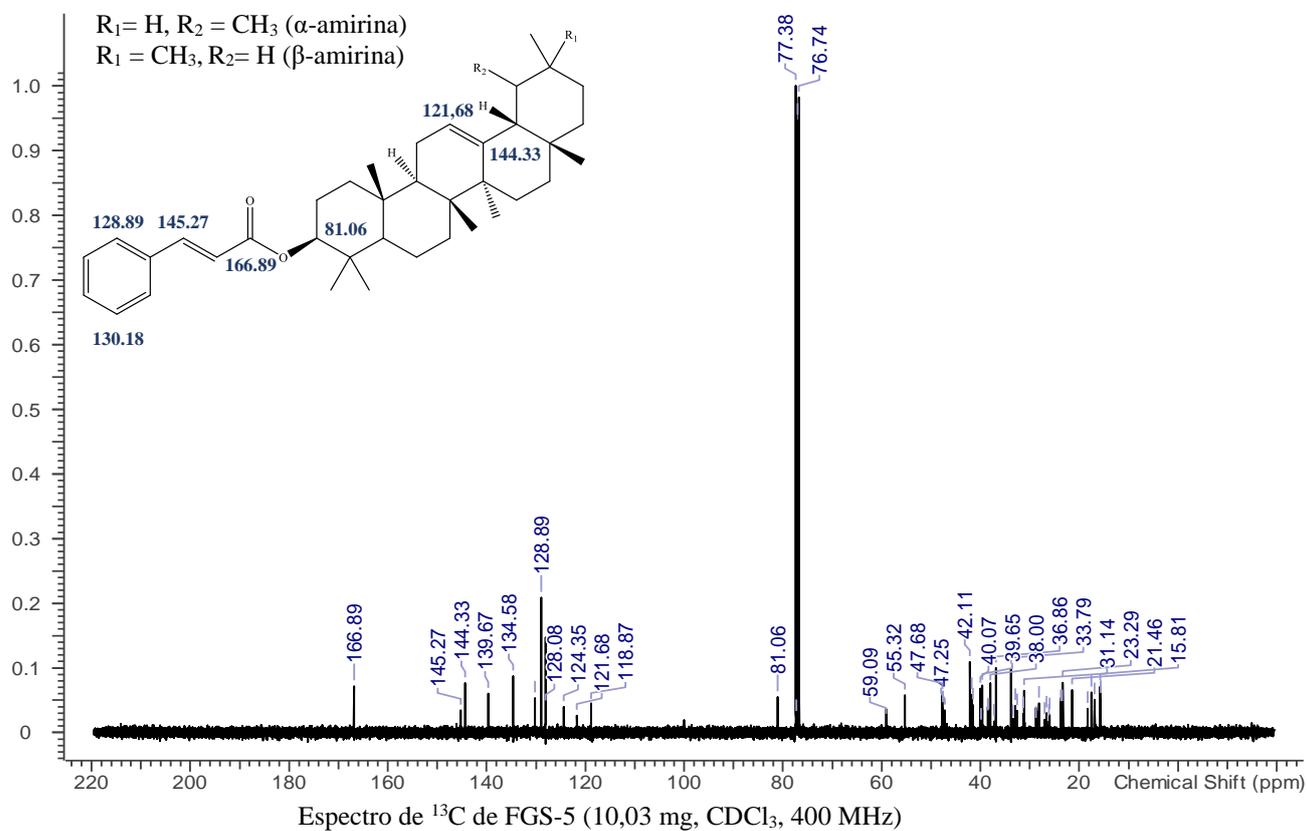
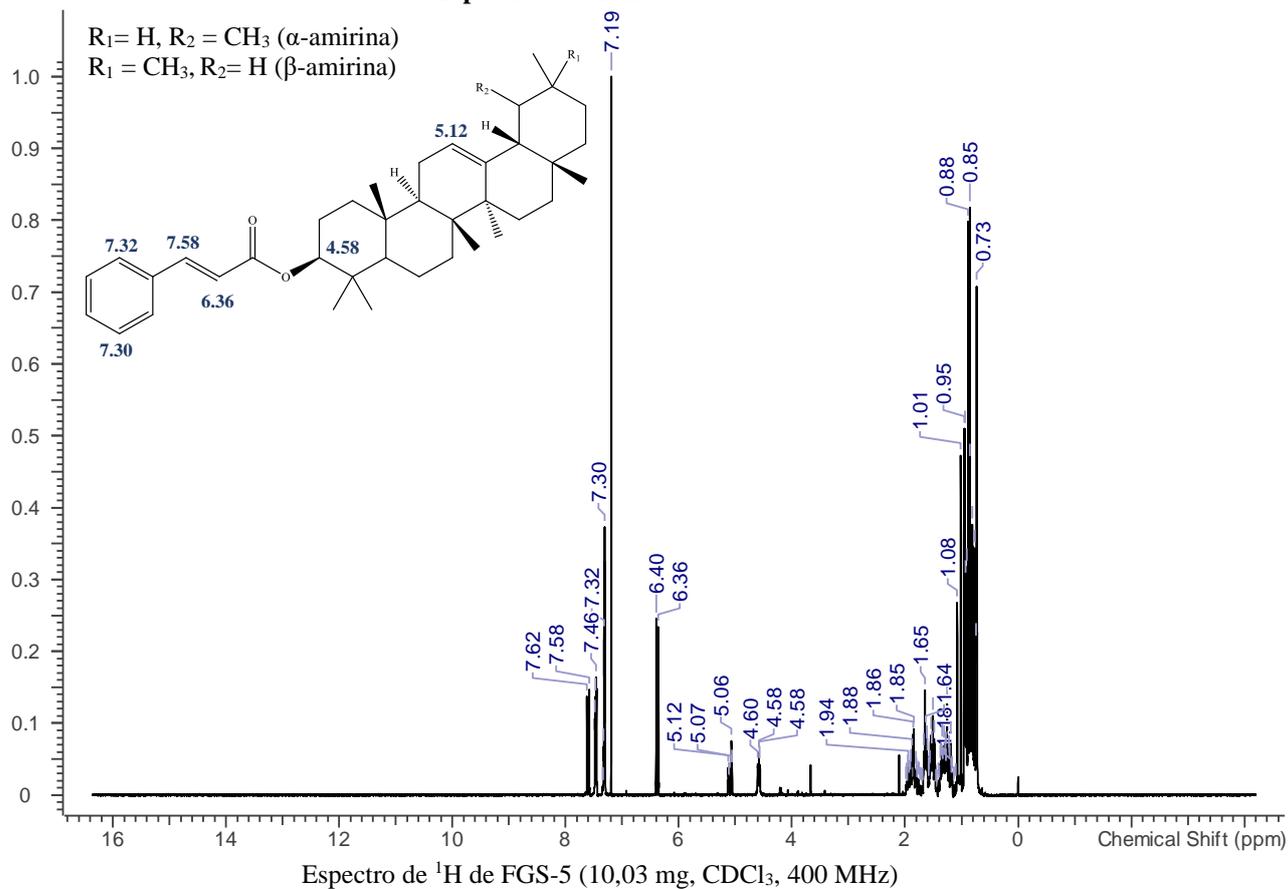
Espectros de RMN de FGS-3



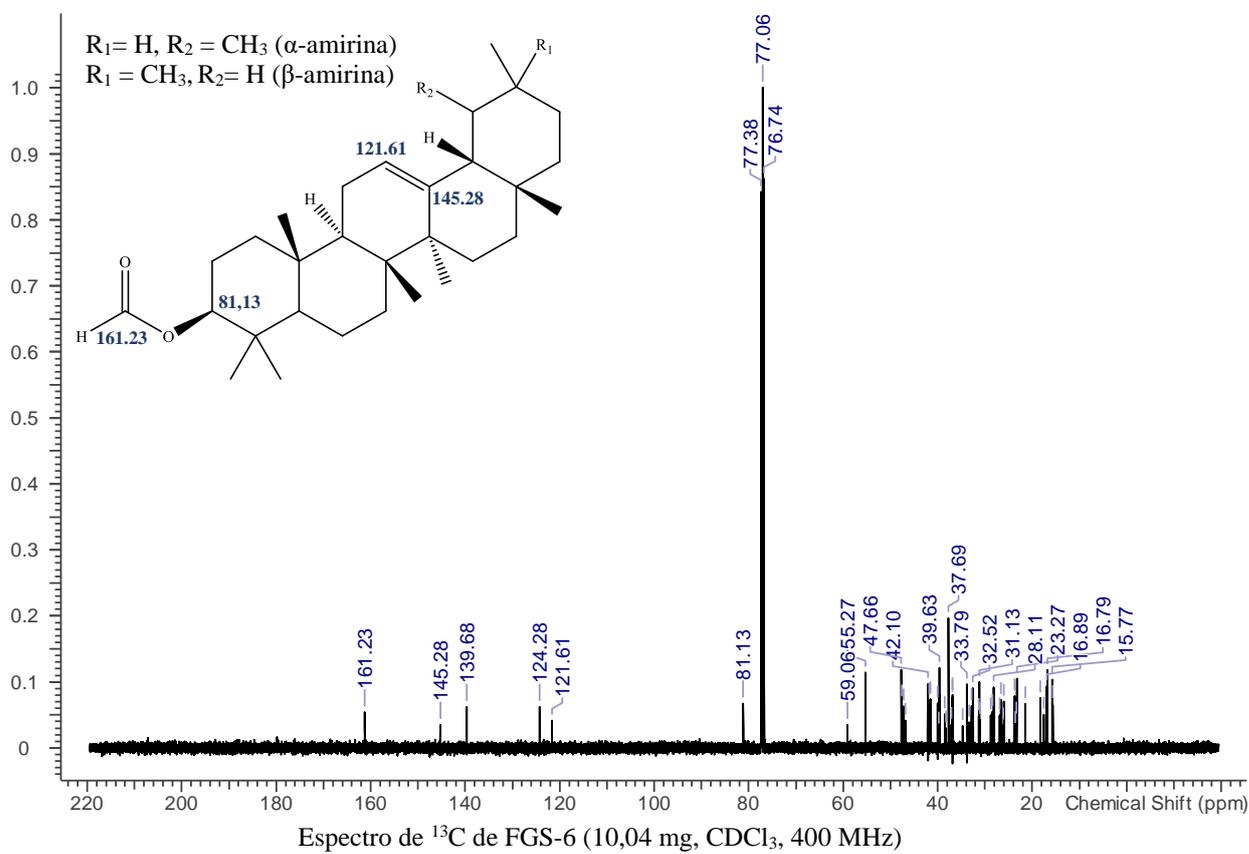
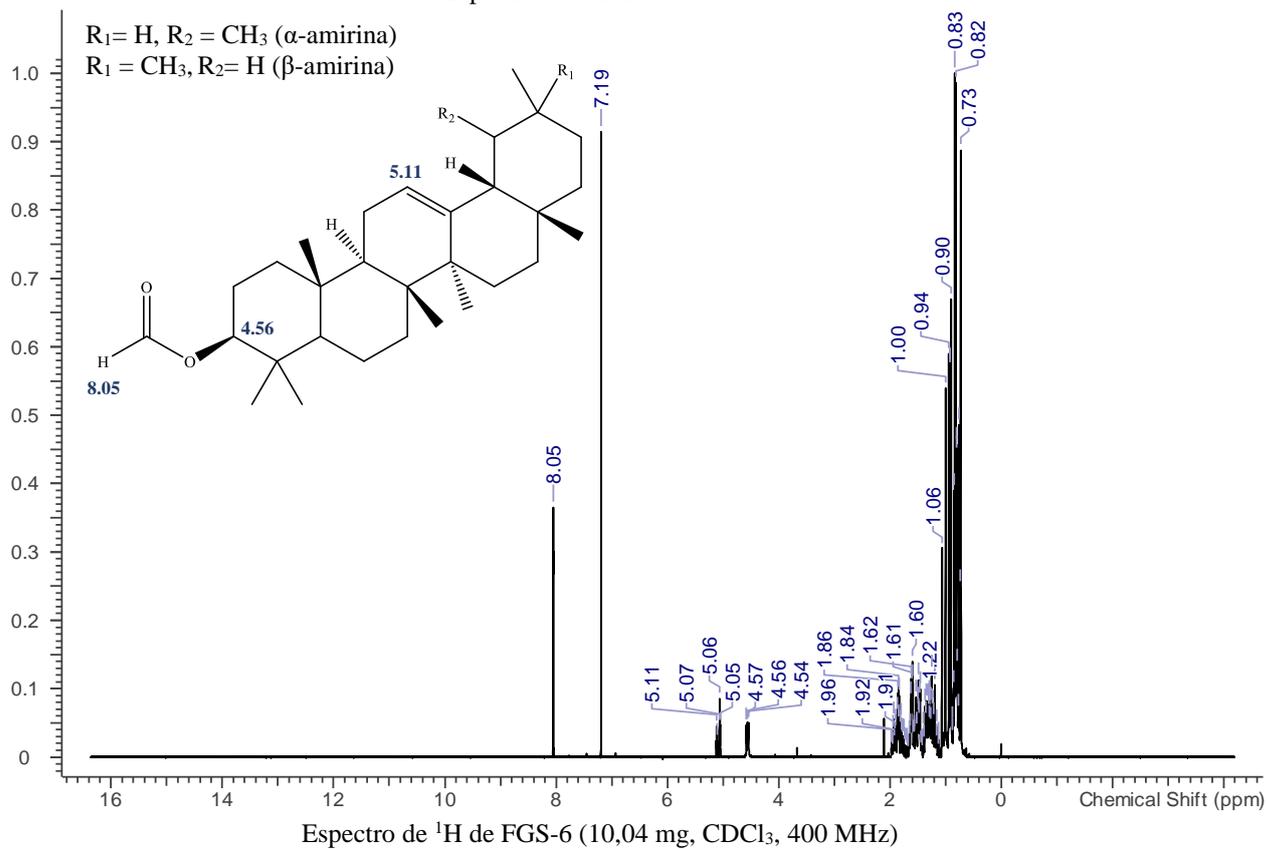
Espectros de RMN de FGS-4



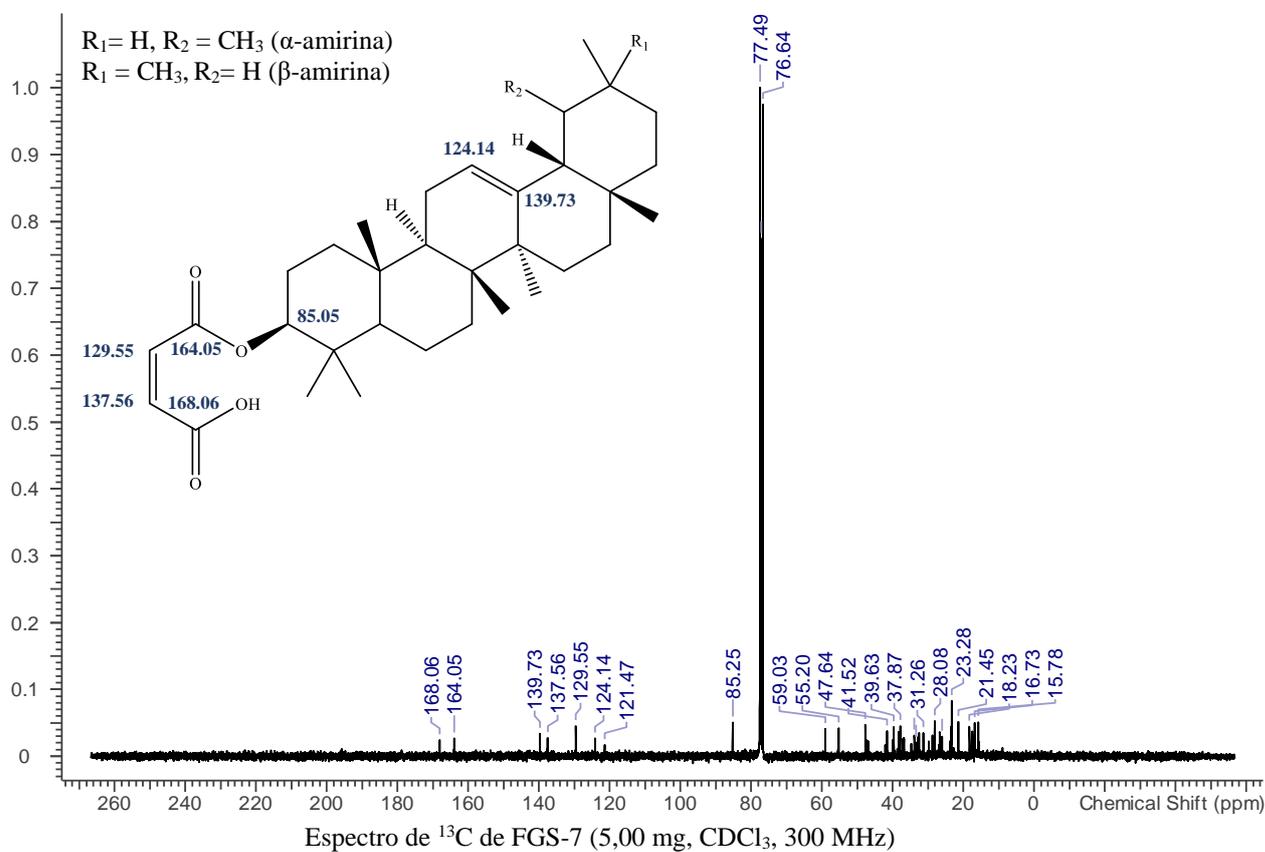
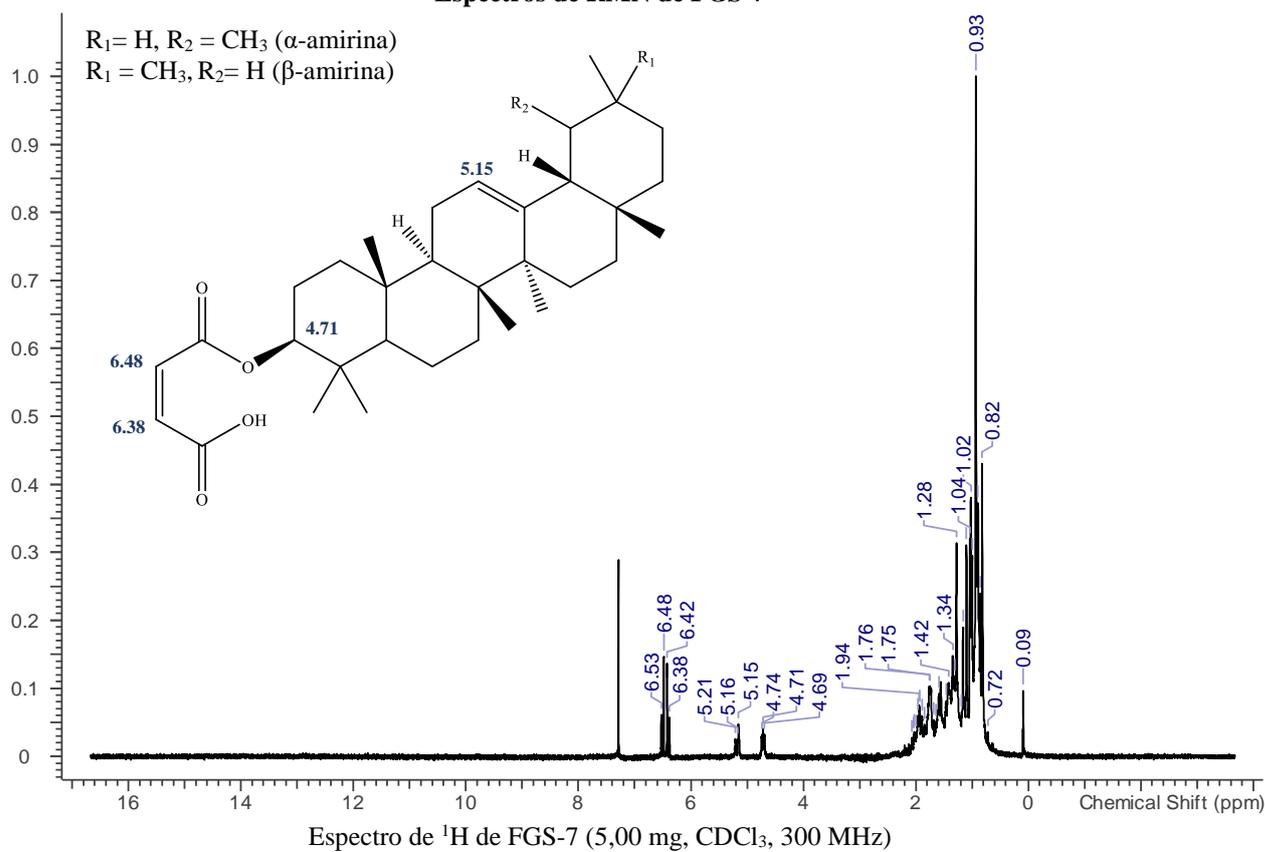
Espectros de RMN de FGS-5



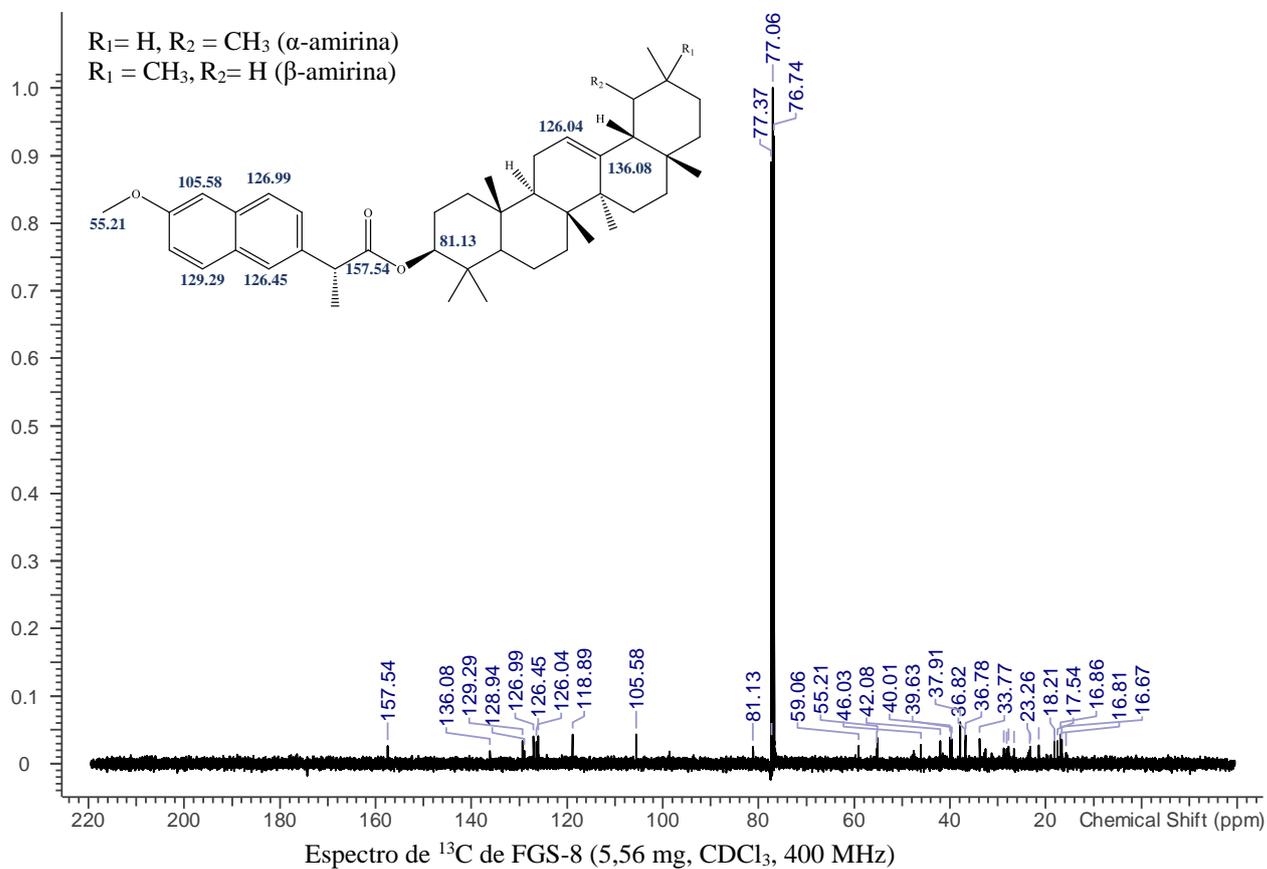
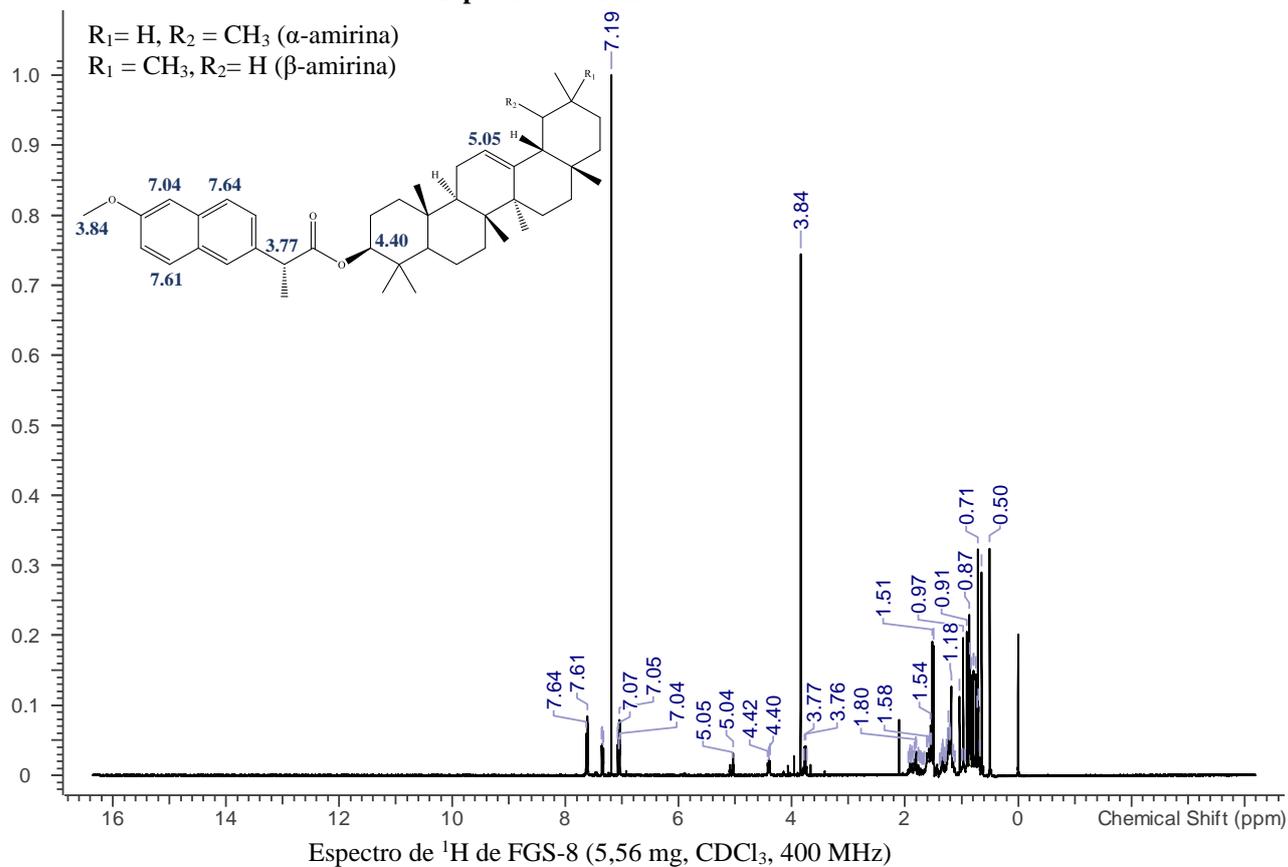
Espectros de RMN de FGS-6



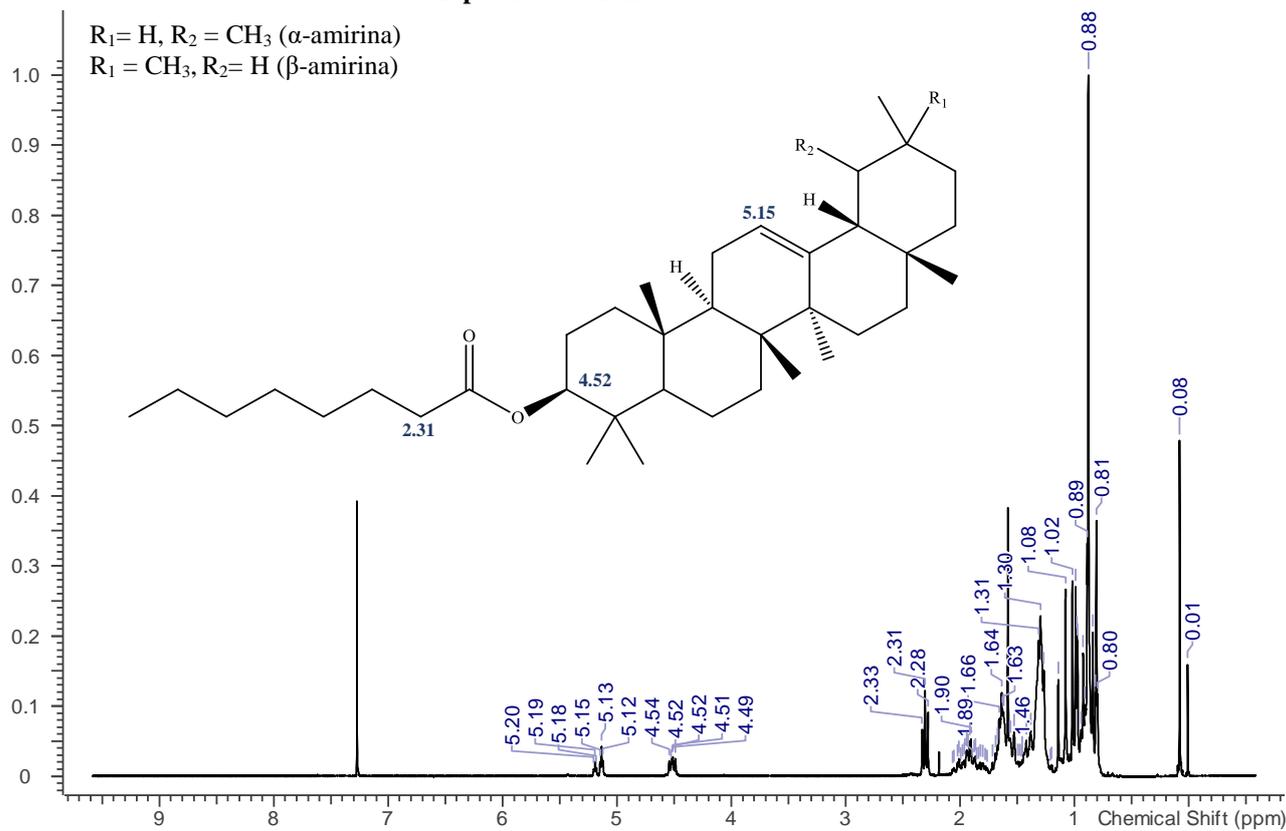
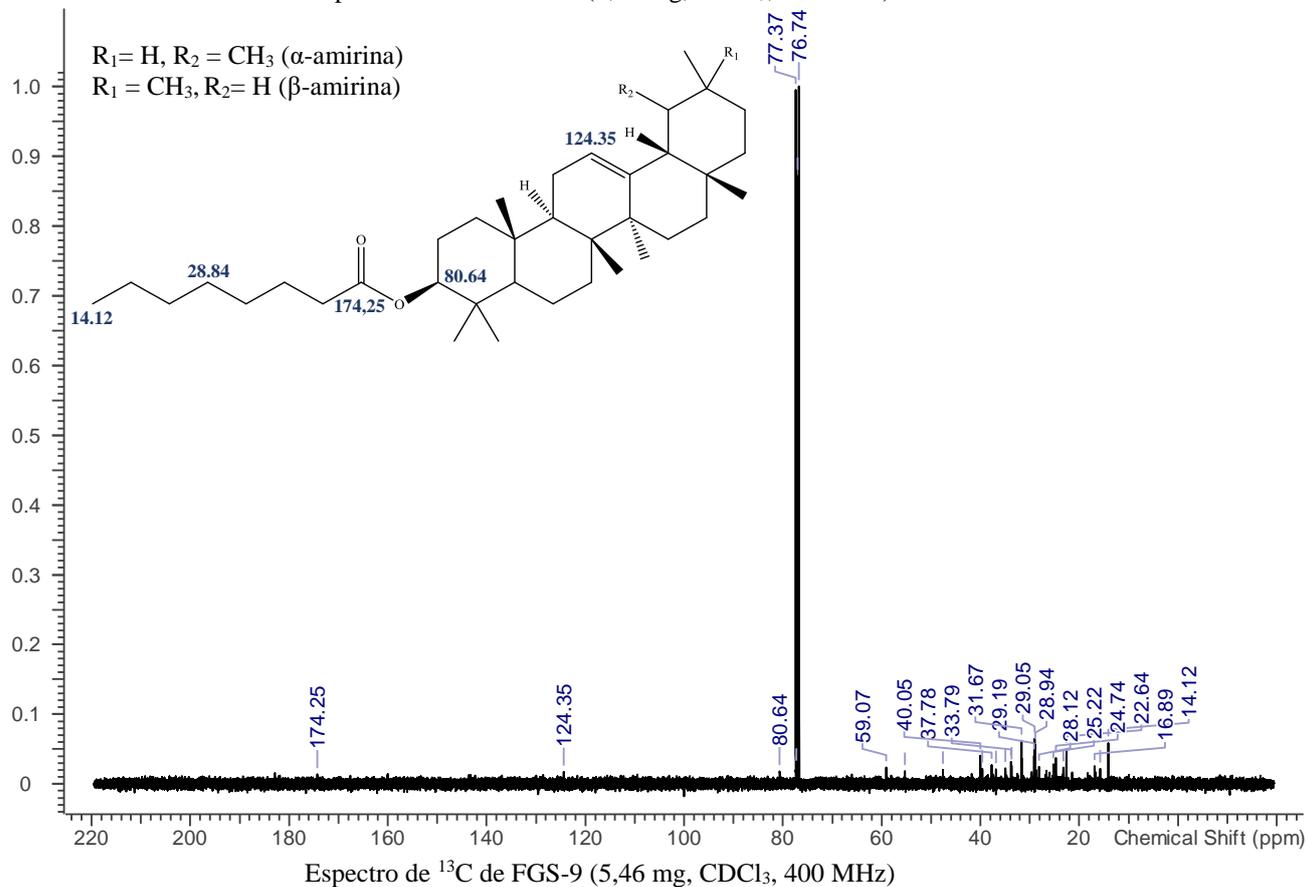
Espectros de RMN de FGS-7



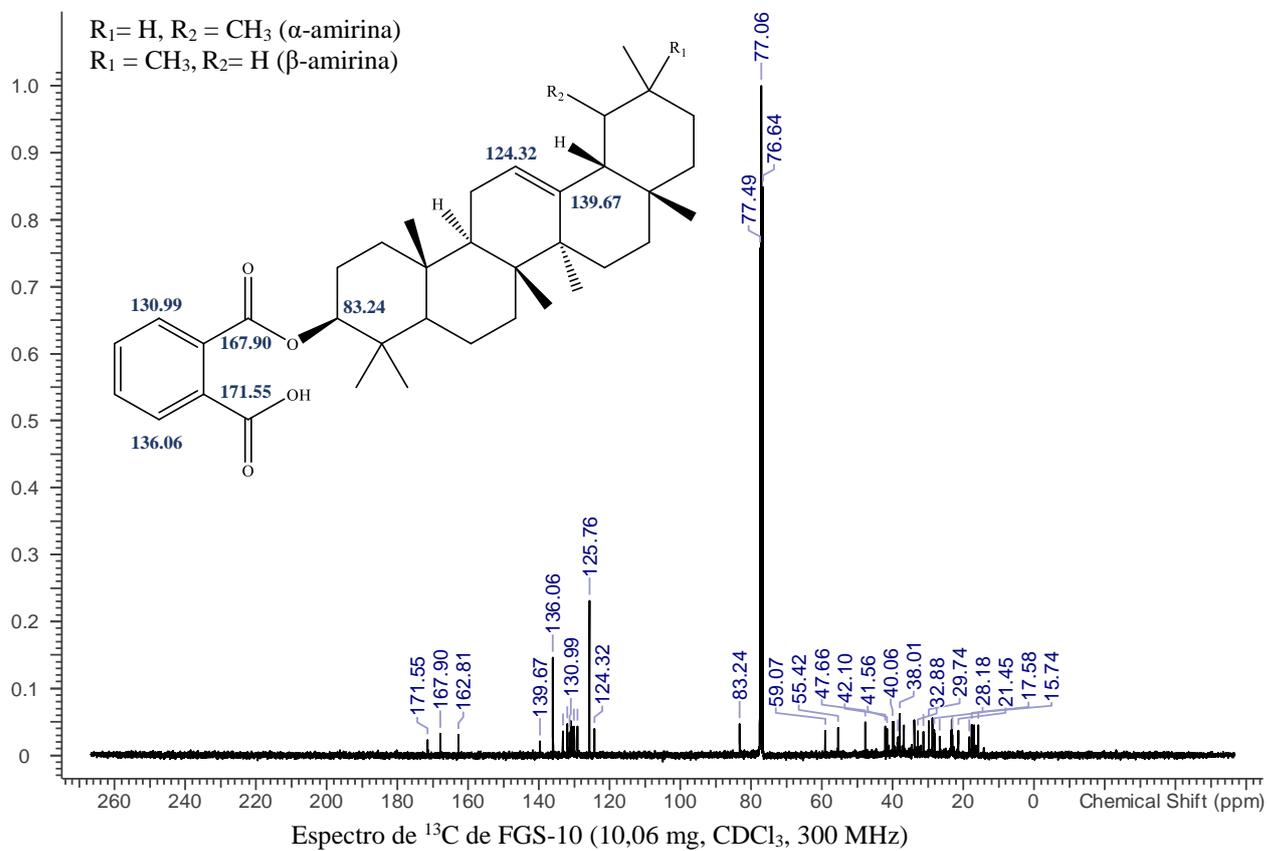
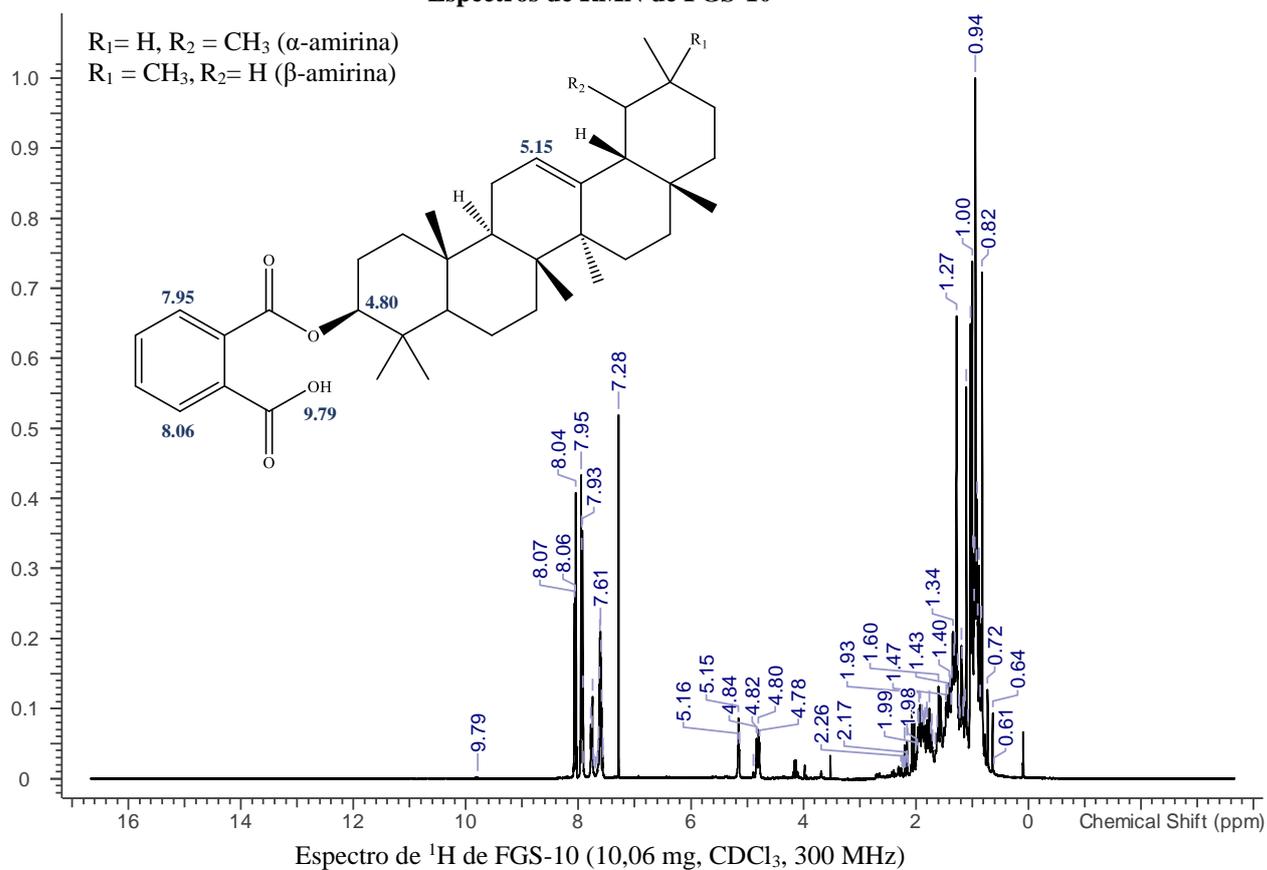
Espectros de RMN de FGS-8



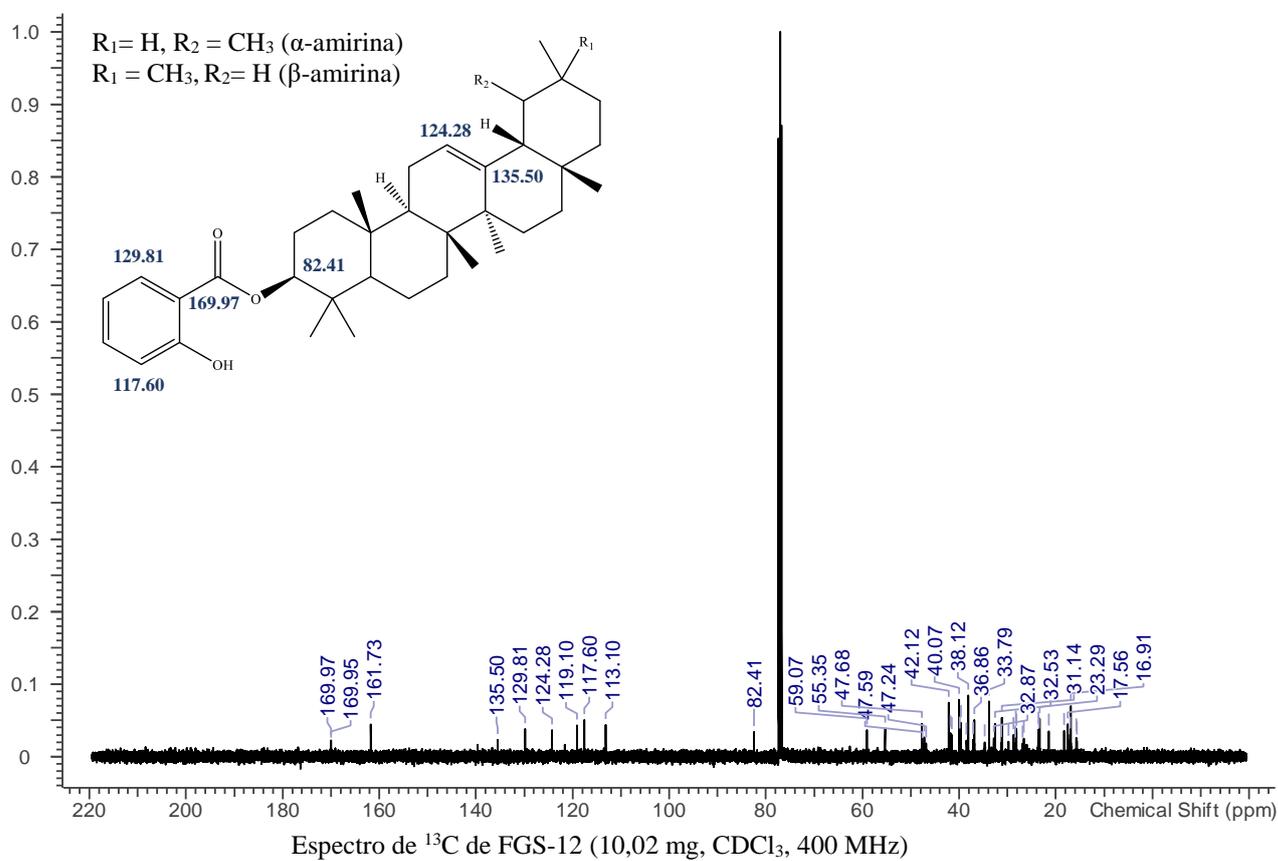
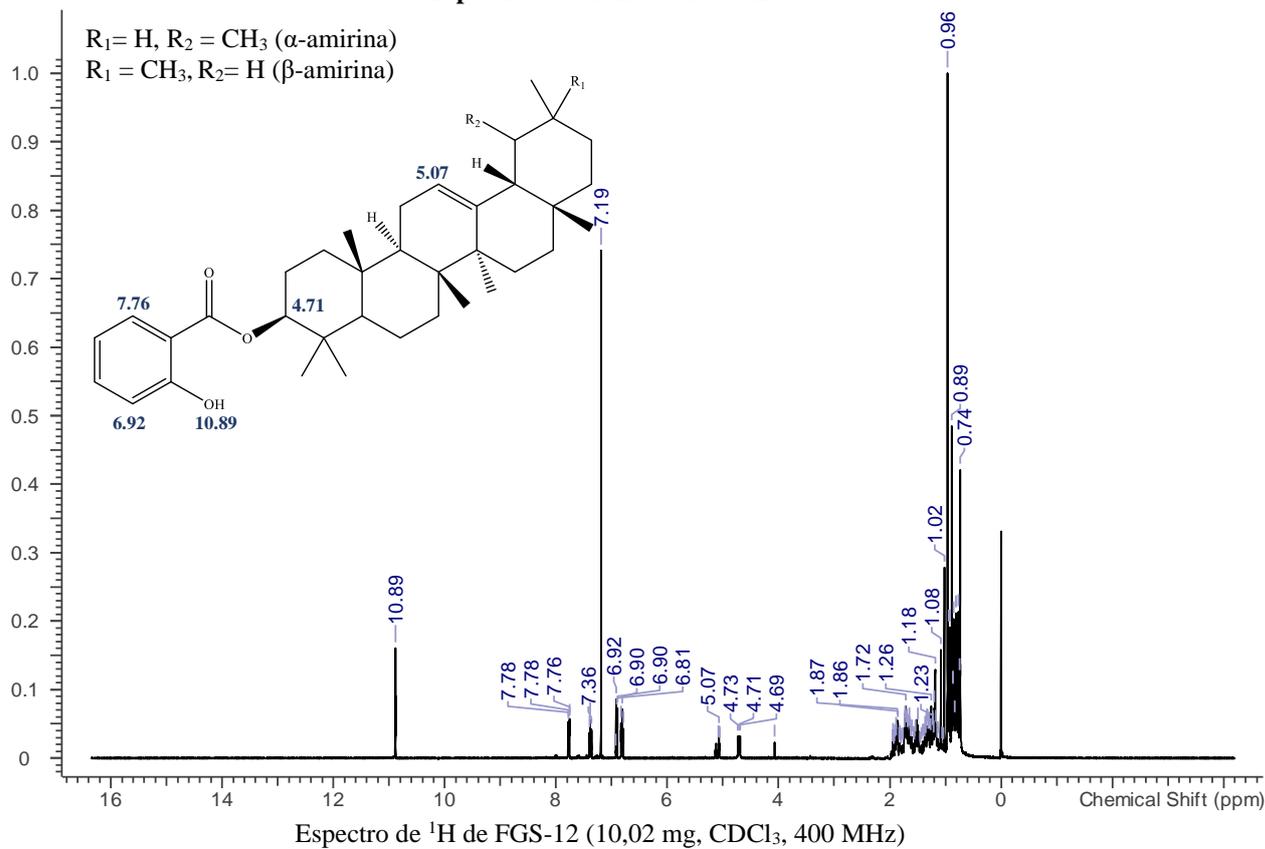
Espectros de RMN de FGS-9

Espectro de 1H de FGS-9 (5,46 mg, $CDCl_3$, 300 MHz)Espectro de ^{13}C de FGS-9 (5,46 mg, $CDCl_3$, 400 MHz)

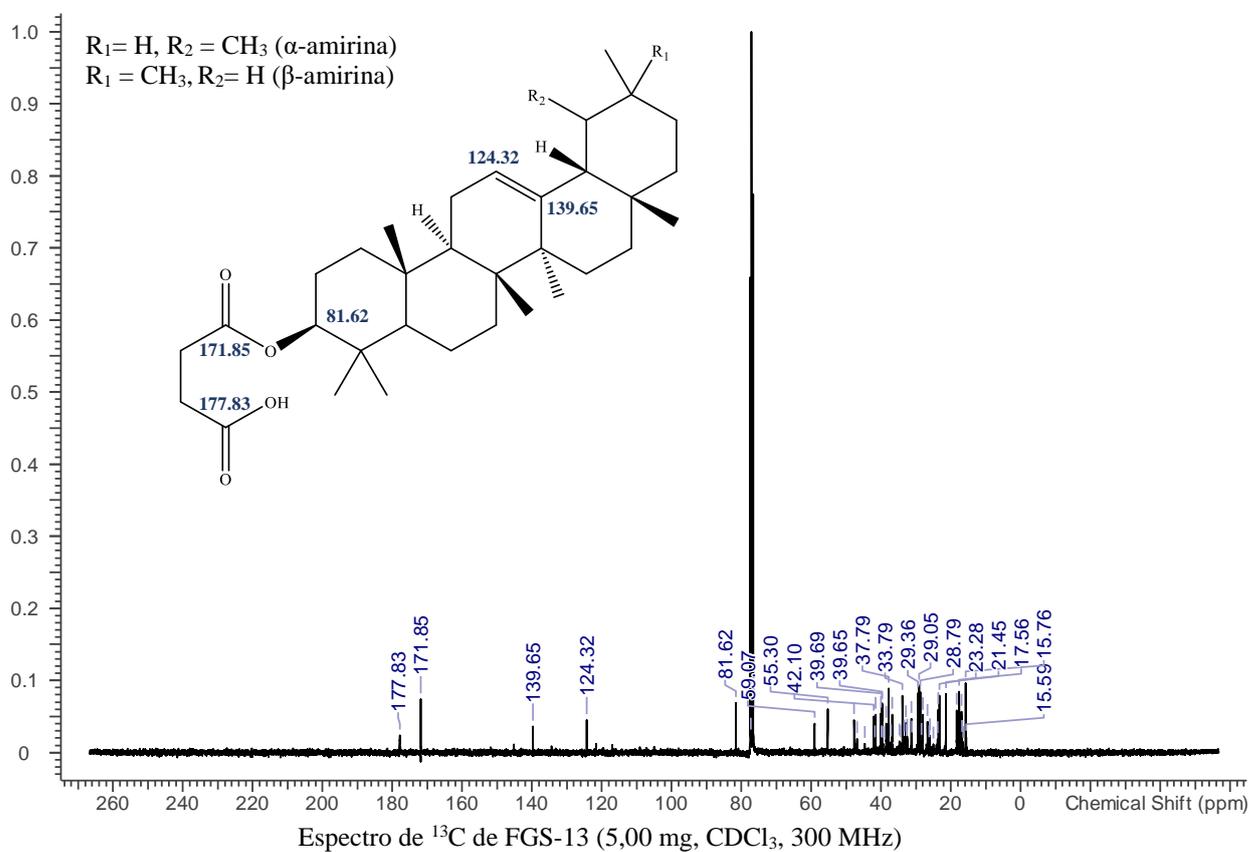
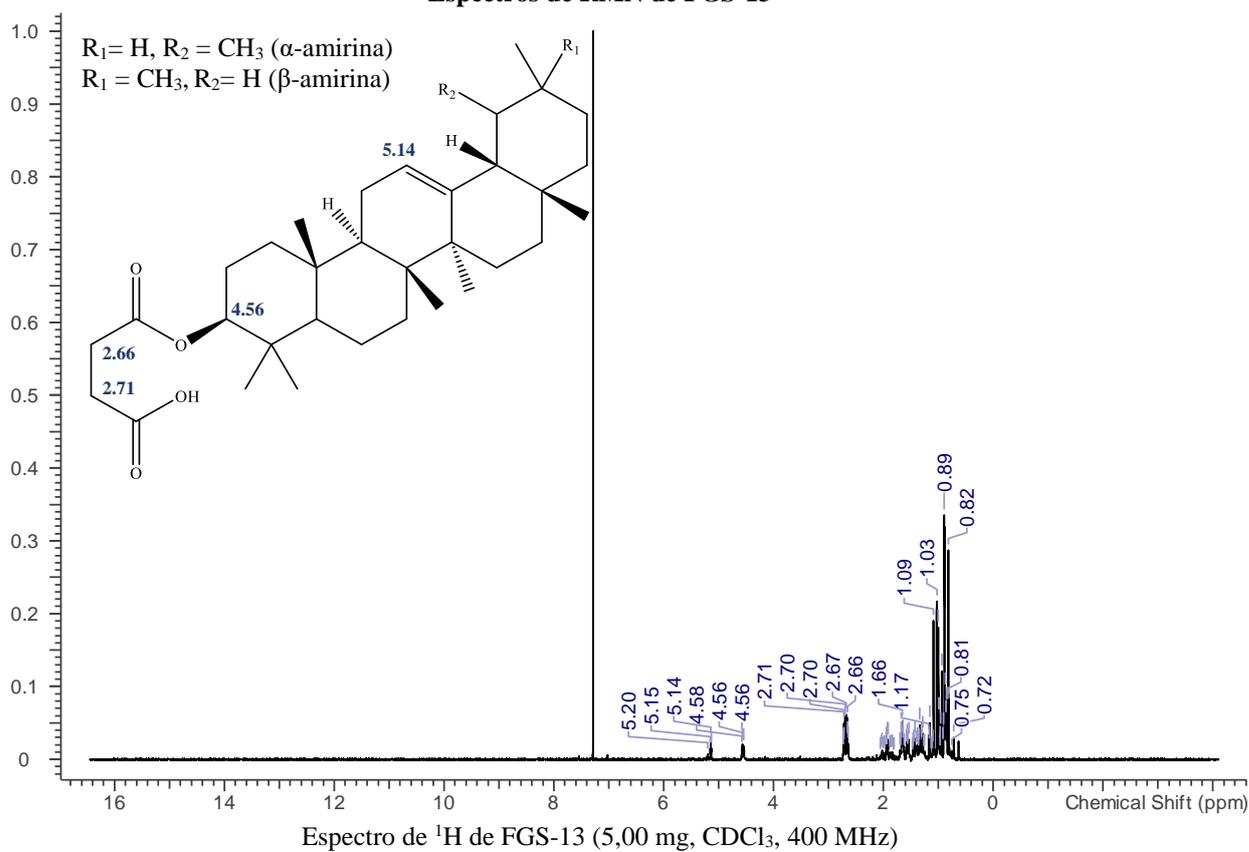
Espectros de RMN de FGS-10



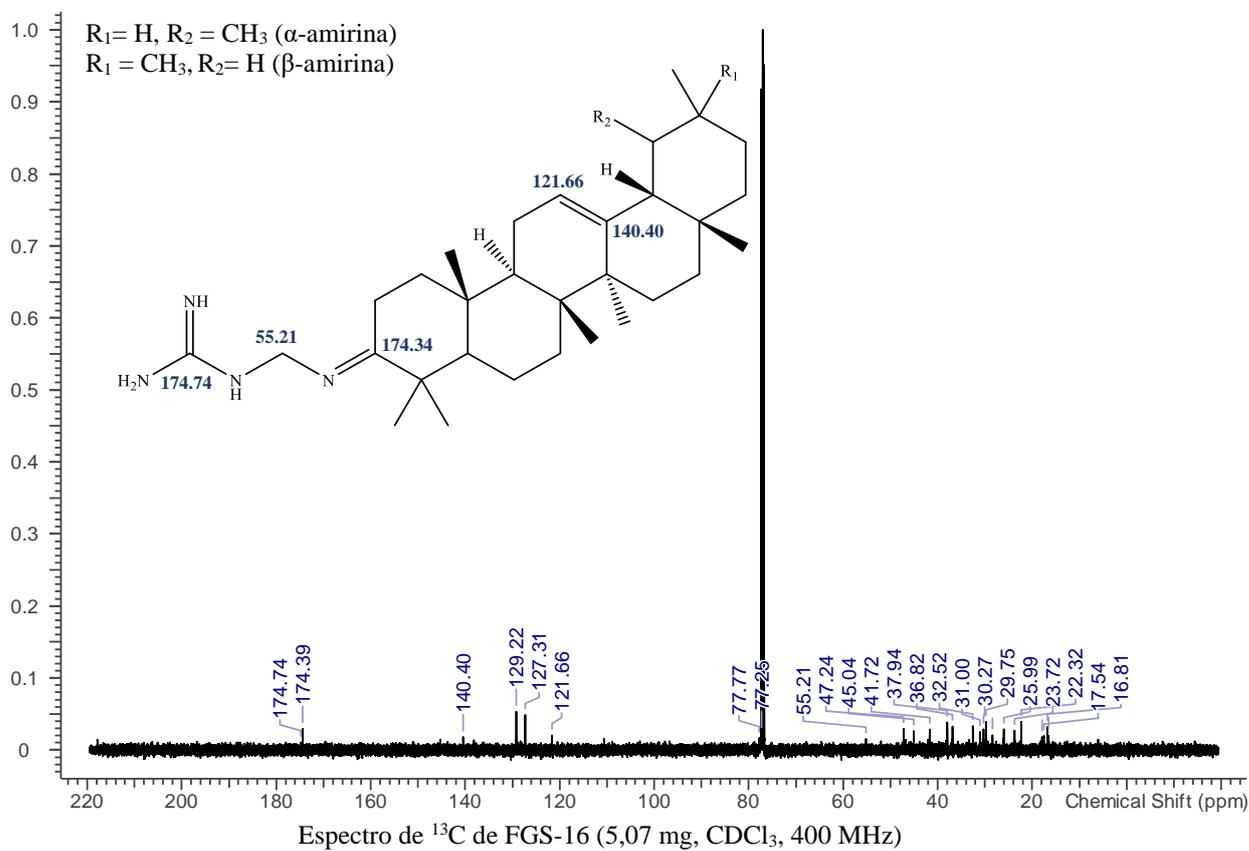
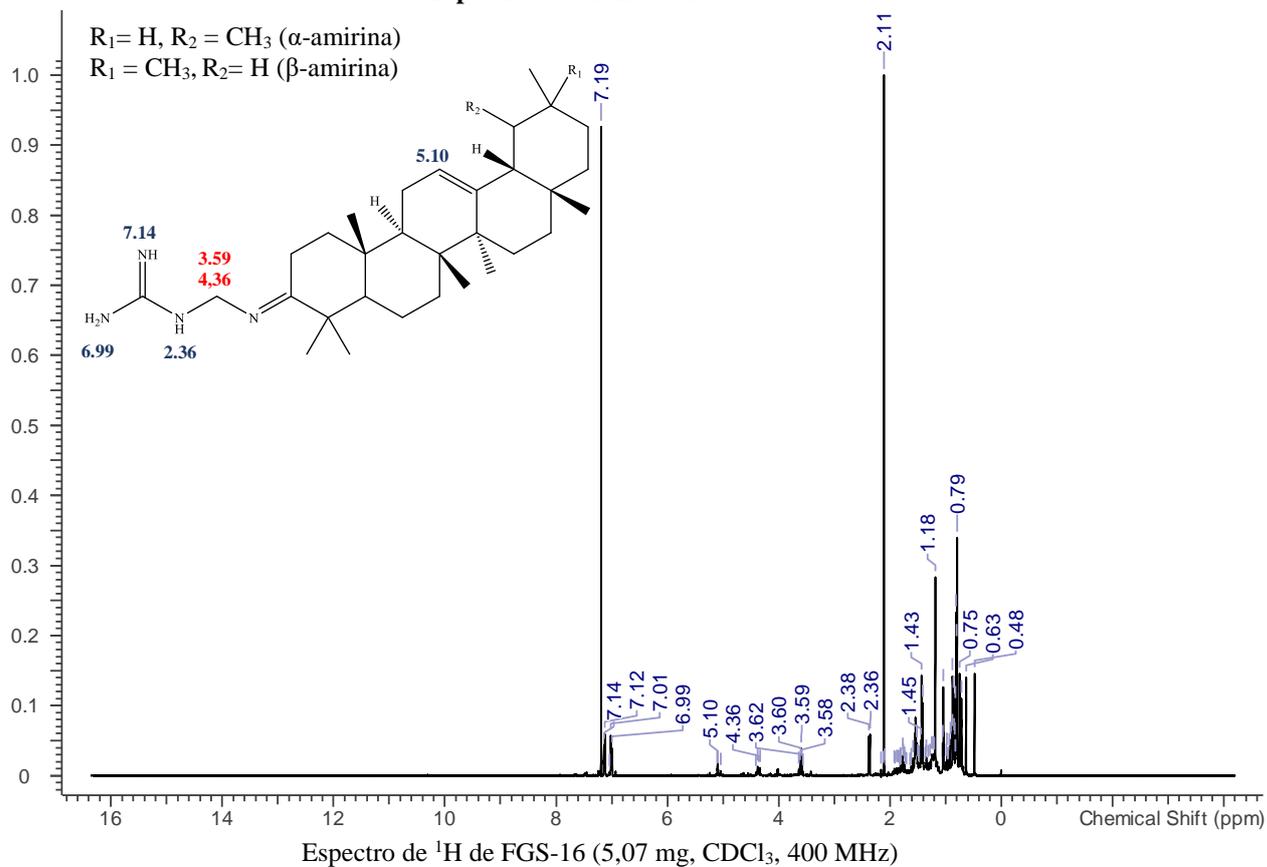
Espectros de RMN de FGS-12



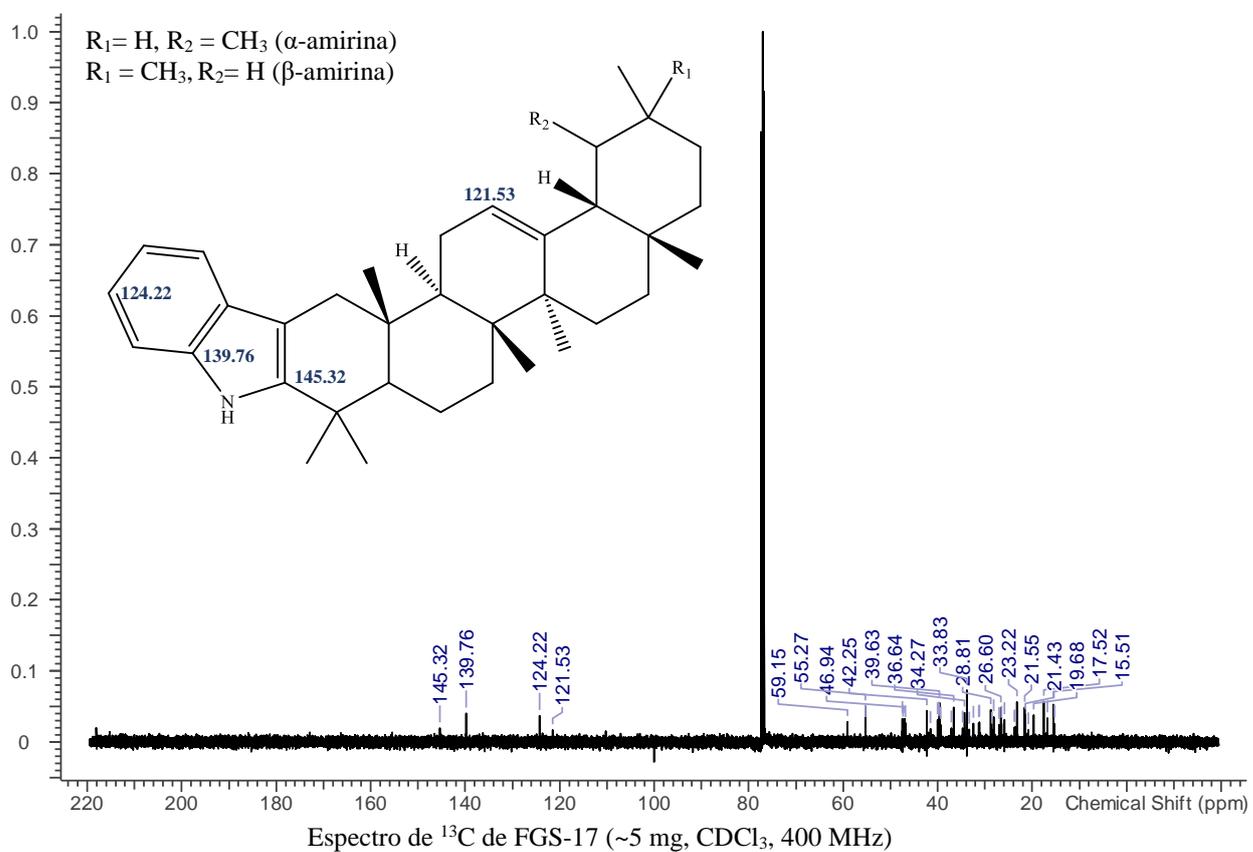
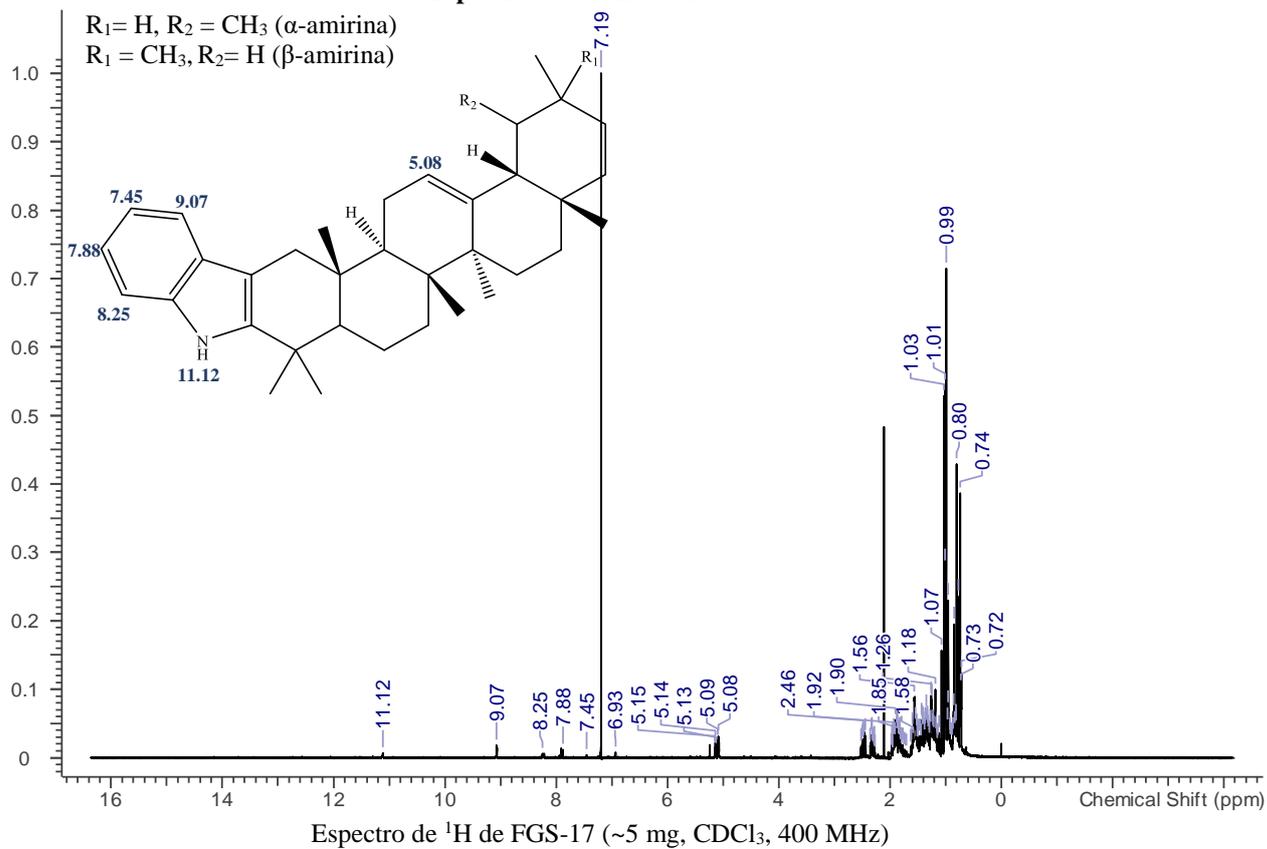
Espectros de RMN de FGS-13



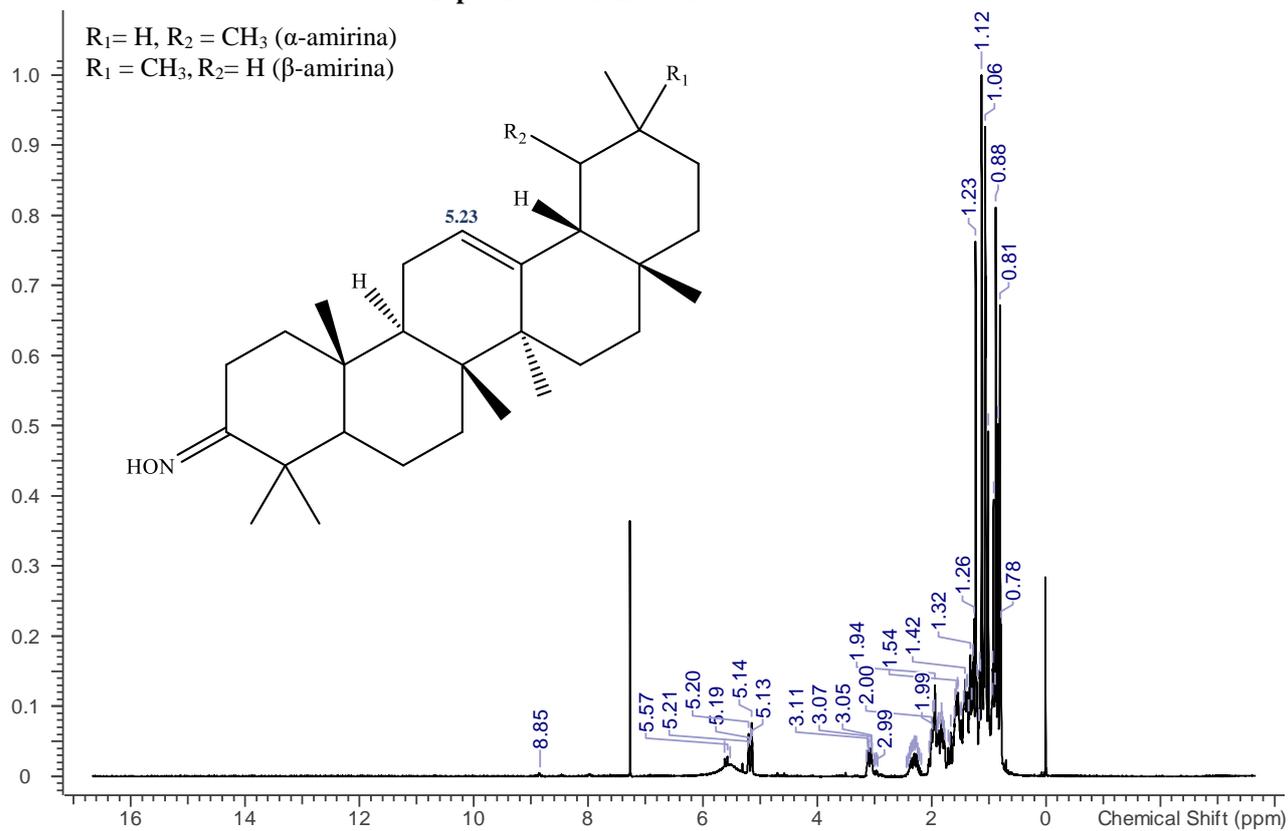
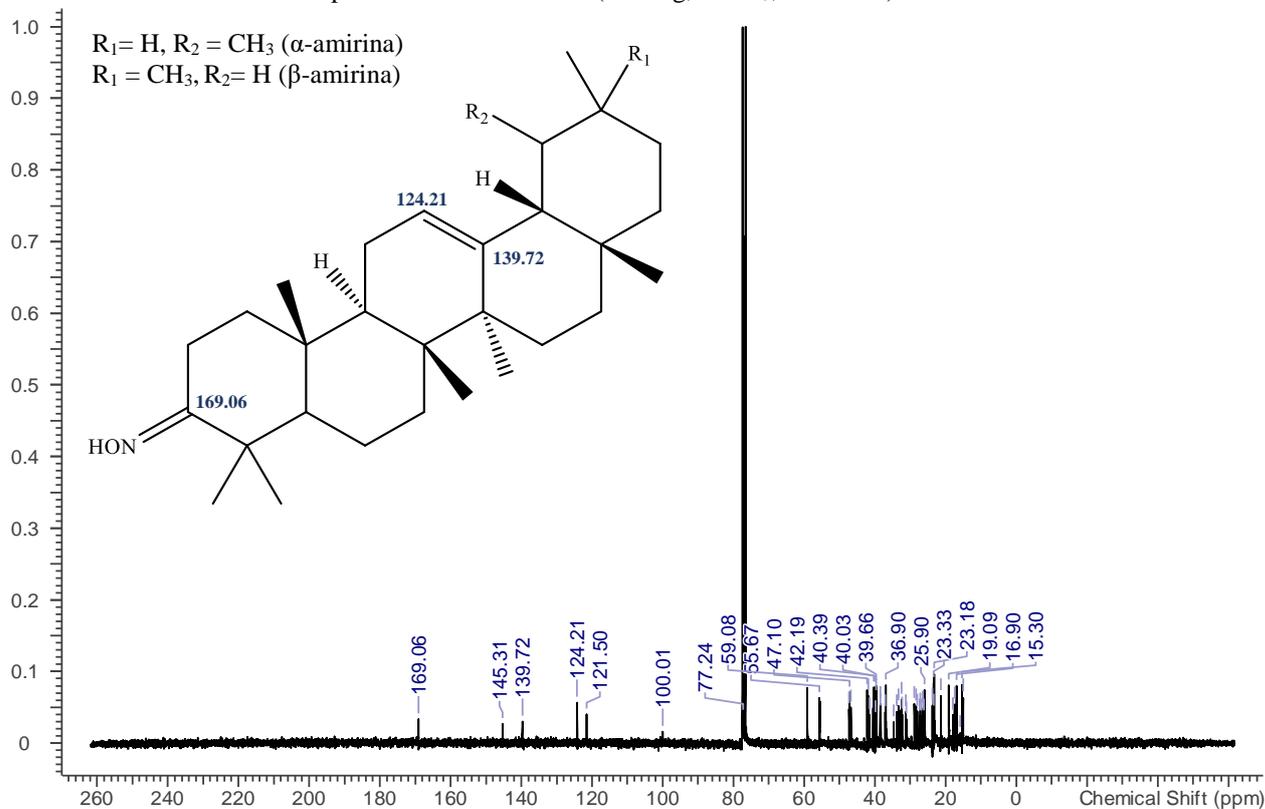
Espectros de RMN de FGS-16



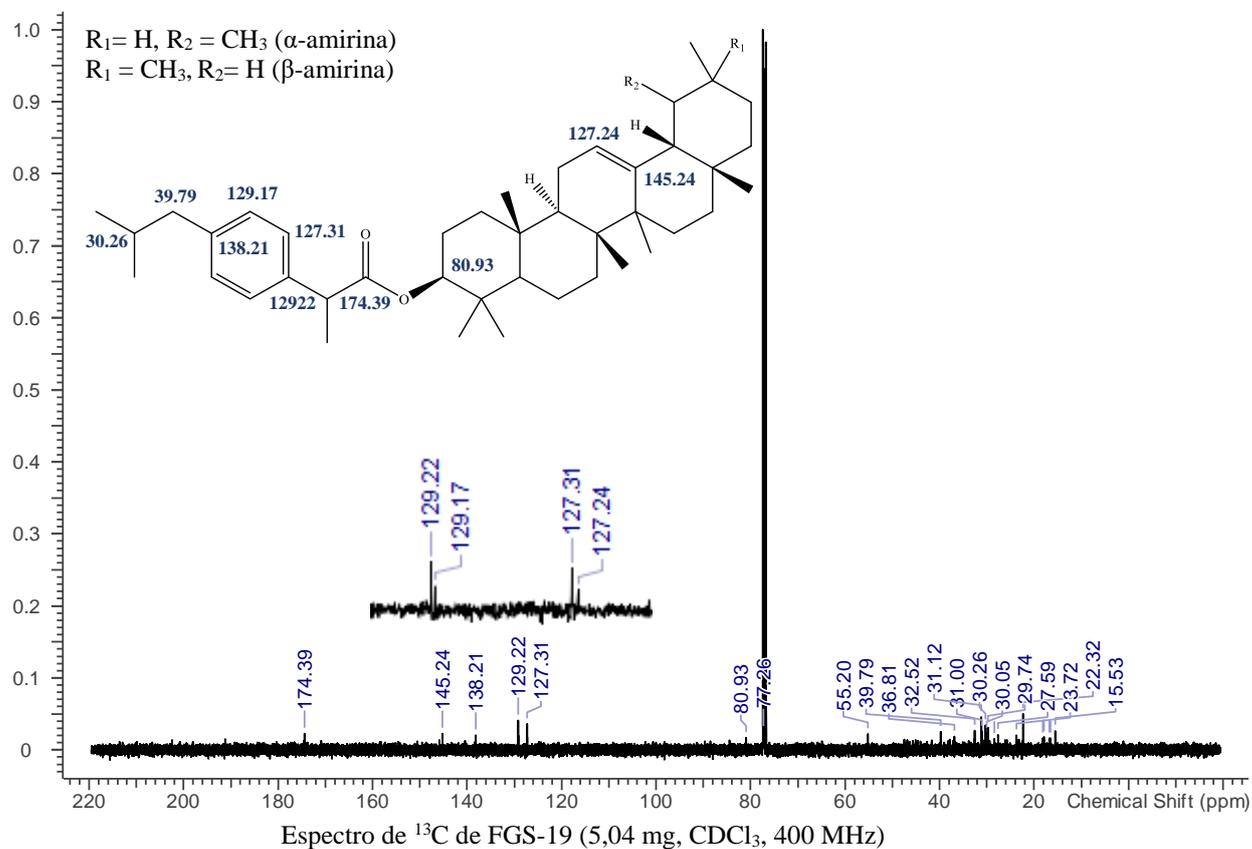
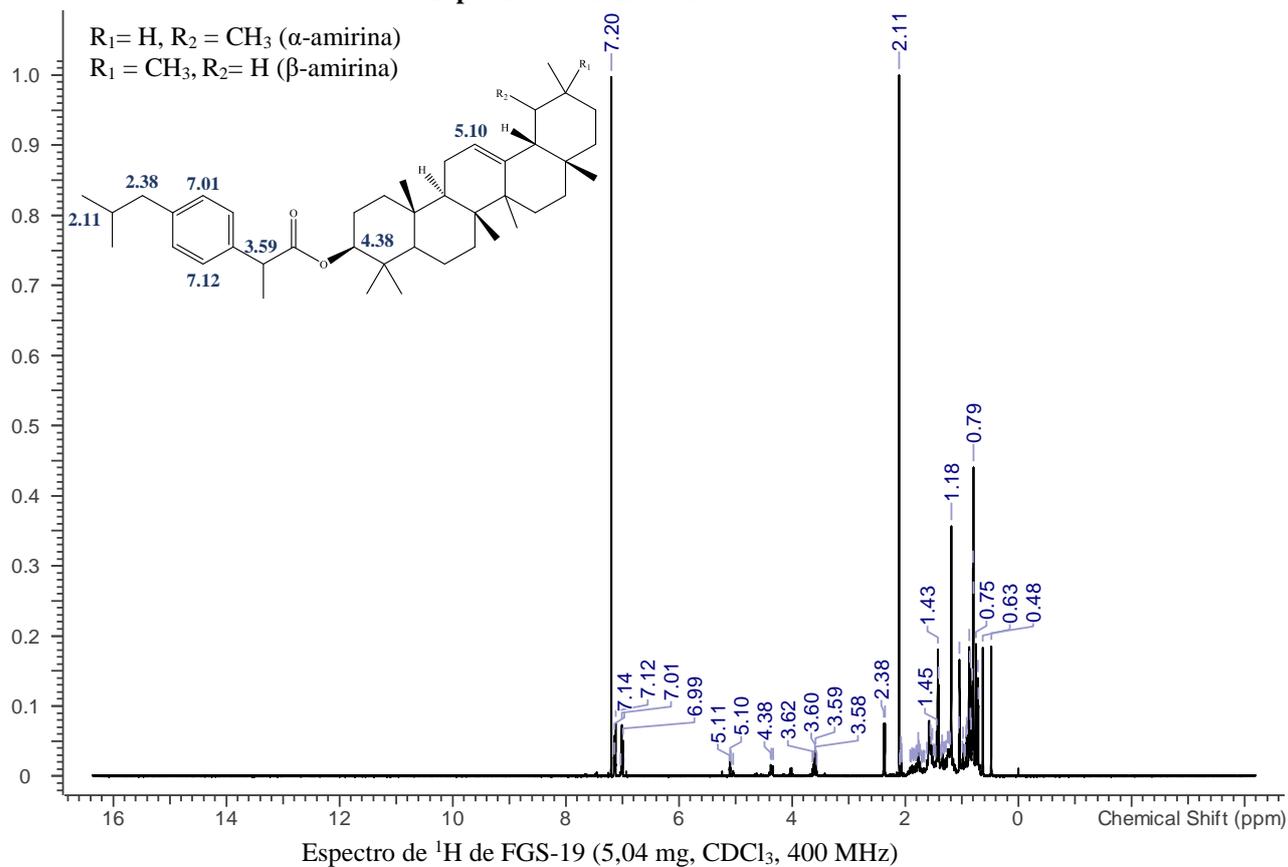
Espectros de RMN de FGS-17



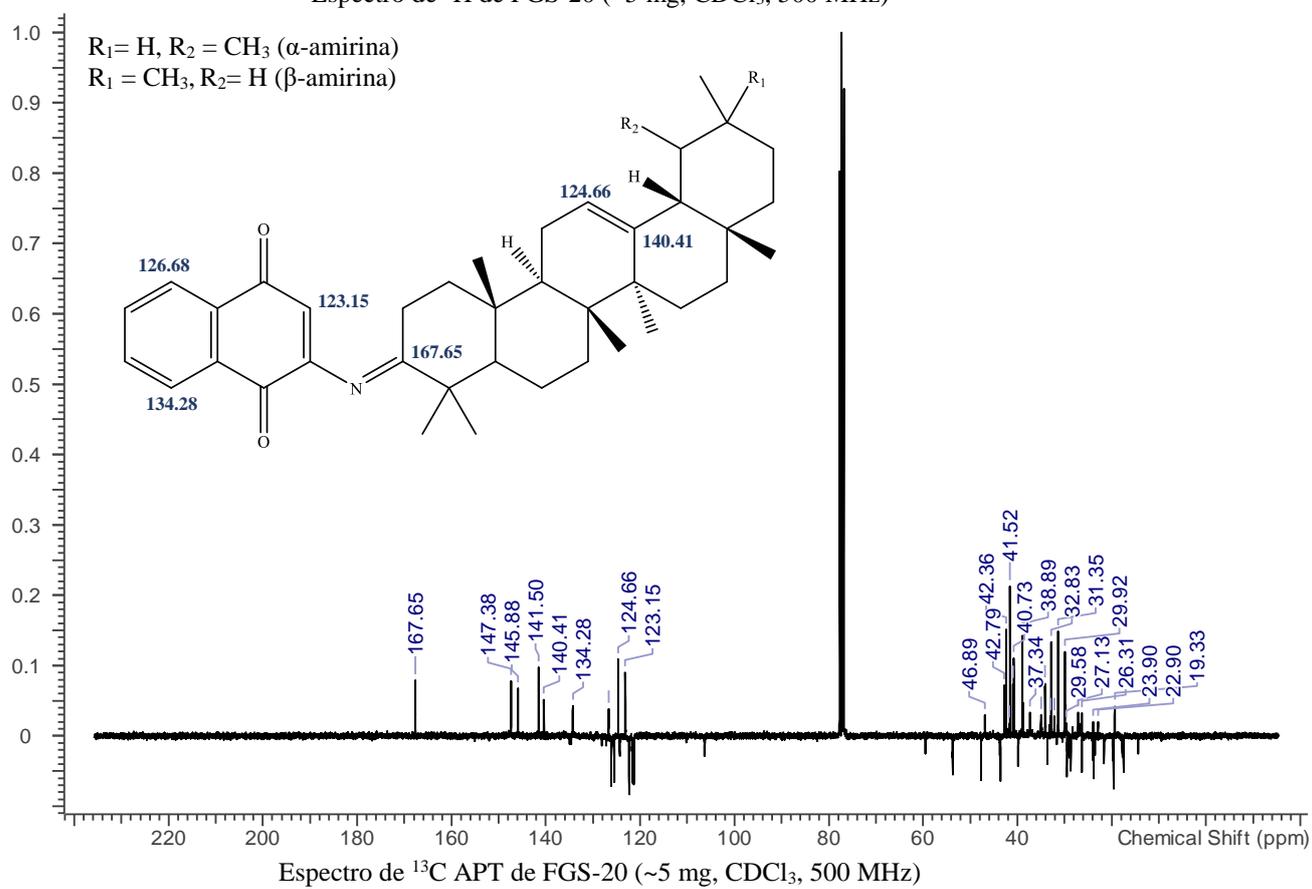
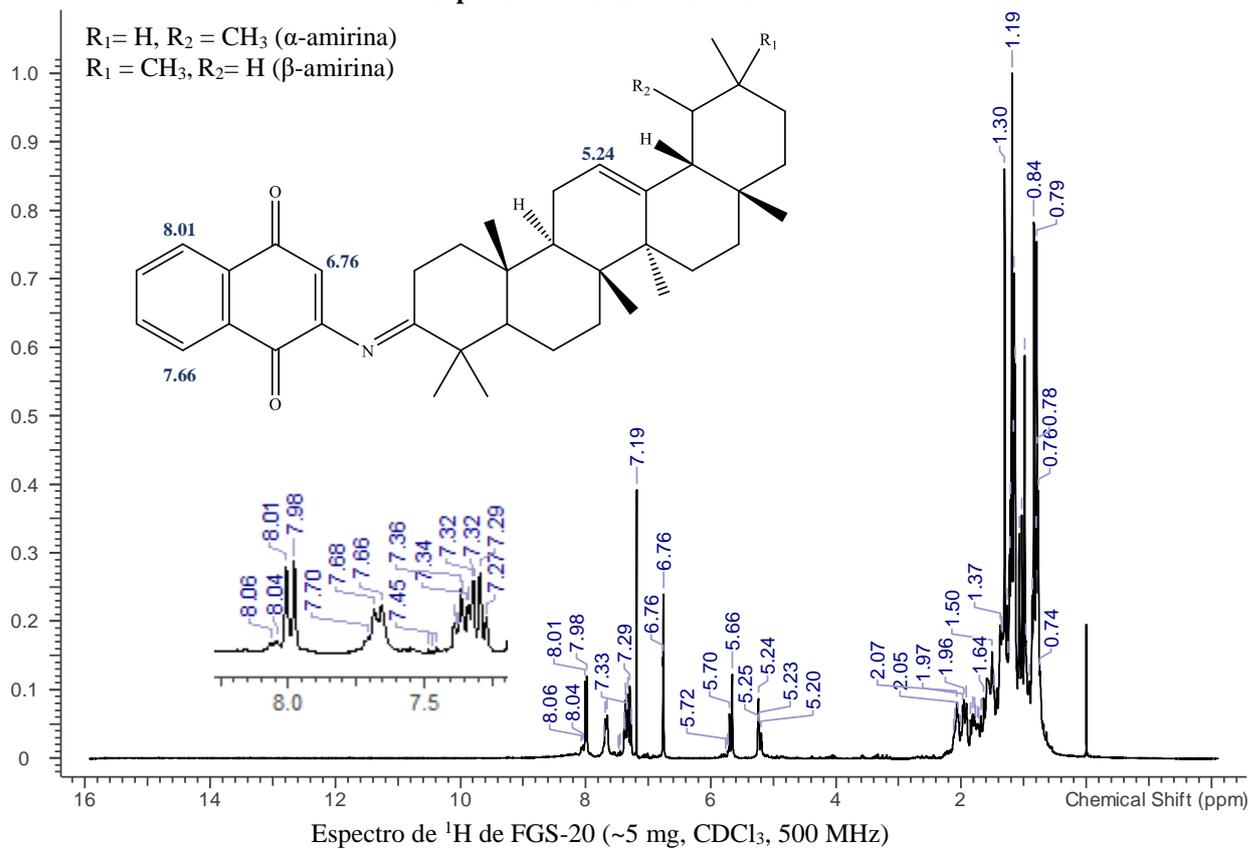
Espectros de RMN de FGS-18

Espectro de 1H de FGS-18 (~10 mg, $CDCl_3$, 300 MHz)Espectro de ^{13}C de FGS-18 (~10 mg, $CDCl_3$, 300 MHz)

Espectros de RMN de FGS-19



Espectros de RMN de FGS-23



ANEXOS



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico

Número: 41553-1	Data da Emissão: 02/10/2013 15:17
-----------------	-----------------------------------

Dados do titular

Nome: Fernanda Guilhon Simplicio	CPF: 779.819.602-15
----------------------------------	---------------------

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	A autorização não eximirá o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador quando as atividades forem realizadas em área de domínio privado ou dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso; II) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; III) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; IV) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; V) do Departamento Nacional da Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; VI) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outras.
3	O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	É necessário a obtenção de anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como de consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade
5	Este documento não abrange a coleta de vegetais hidróbios, tendo em vista que o Decreto-Lei nº 221/1967 e o Art. 36 da Lei nº 9.605/1998 estabelecem a necessidade de obtenção de autorização para coleta de vegetais hidróbios para fins científicos..
6	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
7	Este documento não é válido para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e c) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna.
8	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .

Táxons autorizados

#	Nível taxonômico	Táxon(s)
1	FAMÍLIA	Burseraceae, Malpighiaceae

Este documento (Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 72789445



Página 1/1



Poder Executivo
Ministério da Educação
Universidade Federal do Amazonas
Comitê de Ética em Experimentação Animal – CEEA



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Protocolo nº 007/2013-CEEA/UFAM, intitulado como "Potencial anti-inflamatório de espécies do gênero *Byrsonima* (Malpighiaceae) de ocorrência na cidade de Manaus, Amazonas, Brasil" sob responsabilidade e orientação de **Profª. MSc. Fernanda Guilhon Simplicio**, está de acordo com a Legislação Federal pertinente ao uso científico de animais e foi **APROVADO** pelo COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA-UFAM) em Reunião ocorrida em 03/07/2013.

Manaus, 15 de julho de 2013.

Profª. Dra. Cinthya Iamille Fritzh Brandão de Oliveira
Diretora em exercício do Biotério Central da UFAM
Portaria 1561/2013- Gabinete da Reitoria, de 30 de abril de 2013