

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

LEANDRA DE ALMEIDA RIBEIRO OLIVEIRA

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA E ANTI-
INFLAMATÓRIA DE VOUACAPANOS DE *PTERODON EMARGINATUS*
VOGEL (FABACEAE)

BRASÍLIA
2018

LEANDRA DE ALMEIDA RIBEIRO OLIVEIRA

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA E ANTI-
INFLAMATÓRIA DE VOUACAPANOS DE *PTERODON EMARGINATUS*
VOGEL (FABACEAE)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Dâmaris Silveira
Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Teresa Freitas
Bara

BRASÍLIA
2018

O48a Oliveira, Leandra de Almeida Ribeiro
Avaliação in vitro das atividades antimicrobiana e anti-
inflamatória de vouacapanos de *Pterodon emarginatus* Vogel
(FABACEAE) / Leandra de Almeida Ribeiro Oliveira. -- Brasília,
2018.
100 p. : il. ; 29,7 cm

Tese (Doutorado – Doutorado em Ciências Farmacêuticas) –
Universidade de Brasília, 2018

Orientação: Dâmaris Silveira

Co-orientação: Maria Teresa Freitas Bara

Inclui bibliografia.

1. Sucupira . 2. Células HaCaT. 3. Concentração inibitória
mínima. 4. COX-2. 5. Fosfolipase A2. I. Silveira, Dâmaris,
orient. II. Bara, Maria Teresa Freitas, co-orient. III. Título.

CDU 615

LEANDRA DE ALMEIDA RIBEIRO OLIVEIRA

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA E ANTI-
INFLAMATÓRIA DE VOUACAPANOS DE *PTERODON EMARGINATUS*
VOGEL (FABACEAE)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Banca Examinadora

Profa. Dra. Dâmaris Silveira (FS/UnB) – Presidente

Prof. Dr. Edemilson Cardoso da Conceição (FF/UFG)

Prof. Dr. Leonardo Luiz Borges (UnUCET/UEG)

Prof. Dra. Yris Maria Fonseca Bazzo (FS/UnB)

Dedico este trabalho ao meu pai Alonço (*in memoriam*), que mesmo não estando presente fisicamente, continuo a sentir a sua proteção, o seu apoio e o seu amor. À minha mãe Gerusa, por todo amor, cuidado, incentivo e por sempre me ensinar a ser forte. Ao meu esposo Marcos pelo auxílio, compreensão, paciência e sobretudo por seu amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, por ter me protegido e dado saúde para realizar este trabalho e por ter colocado tantas pessoas boas no meu caminho.

Aos bons espíritos e ao meu anjo guardião por me auxiliarem e me ampararem nos momentos mais difíceis.

À minha orientadora Dâmaris Silveira, por ter me dado esta oportunidade, pela orientação e paciência.

À minha co-orientadora Maria Teresa Freitas Bara, pela confiança depositada, paciência e amizade, por todos os ensinamentos compartilhados e principalmente por me ajudar a abrir as portas certas para que este trabalho fosse realizado.

Ao professor Edemilson Cardoso da Conceição pelo apoio profissional e pessoal, pelos conselhos certos nas horas certas e pelo incentivo e apoio ao meu ingresso no doutorado da UnB.

À Central Analítica do Instituto de Química da UFG onde foram realizadas as análises de isolamento.

Ao professor Luciano Morais Lião e sua equipe do Laboratório de RMN do Instituto de Química da UFG pela realização dos espectros de RMN e ao técnico Gerlon de Almeida Ribeiro Oliveira pela colaboração nas análises dos espectros de RMN.

À professora Virgínia Farias Alves e à doutoranda Luiza Toubas Chaul do Laboratório de Pesquisa em Controle de Qualidade de Alimentos e Medicamentos, da UFG, pela colaboração nos ensaios de atividade antibacteriana.

À professora Yanna Karla de Medeiros Nóbrega e a sua orientanda Zita Lopes Dinis do Laboratório Interdisciplinar de Biociências, da UnB, pela colaboração nos ensaios de atividade antifúngica.

À professora Marize Campos Valadares Bozini e ao seu orientando Artur Cristian Garcia da Silva, do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia celular (LFTC), da UFG, pela colaboração nos ensaios de atividade anti-inflamatória. Artur, aprendi muito com você e serei sempre grata por todo o seu auxílio e benevolência.

À amiga Steffany por abrir as portas de sua casa e sobretudo pela amizade.

A todos os amigos e funcionários do Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais (LPPN) e Laboratório de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (PD&I) de Bioprodutos, da UFG, e do Laboratório de Controle de Qualidade, da UnB, por terem feito do laboratório um lugar agradável e propício ao desenvolvimento do conhecimento!

Ao meu esposo, Marcos, por todo o amor, companheirismo, paciência, apoio e auxílio. Por todas as vezes que me levou e buscou na universidade. Pelos finais de semana que me ajudou e incentivou a estudar. E por me fazer feliz!

Aos meus pais Alonço (*in memorian*) e Geresa por tudo o que fizeram para que hoje eu estivesse aqui e pelo amor incondicional.

Aos meus irmãos Lucas, Marcos e Gerlon, muito obrigada a cada um de vocês. Lucas, agradeço por ter cuidado de nossa casa e de mim nesse período acadêmico. Marcos, agradeço por cuidar de nosso cantinho de descanso e paz. Gerlon, agradeço pelo auxílio, apoio, pelos conselhos e por tanto contribuir com a minha formação acadêmica.

Às minhas cunhadas Poliana e Aline pelo apoio e amizade. E aos meus amados sobrinhos, Isabelle, Gabriel, Martim, Rafael, Miguel e Matheus que tanto nos alegram.

Agradeço às minhas amigas Luciana e Rúbia, pelos momentos de alegrias e tristezas sempre compartilhados.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho e para a minha formação profissional.

À CAPES e CNPQ pelo suporte financeiro concedido e pela bolsa.

“Se Deus houvesse isentado do trabalho do corpo o homem, seus membros se teriam atrofiado; se o houvesse isentado do trabalho da inteligência, seu espírito teria permanecido na infância, no estado de instinto animal. Por isso é que lhe fez do trabalho uma necessidade e lhe disse: Procura e acharás; trabalha e produzirás. Dessa maneira serás filho das tuas obras, terás delas o mérito e serás recompensado de acordo com o que hajas feito.”

(O Evangelho Segundo o Espiritismo)

RESUMO

O objetivo desta pesquisa foi avaliar as atividades antimicrobiana e anti-inflamatória de vouacapanos de *Pterodon emarginatus* Vogel (Fabaceae). Foram utilizados frutos coletados nos municípios de Campestre e Bela Vista de Goiás (Estado de Goiás, Brasil). Somente na oleorresina dos frutos de Bela Vista de Goiás foram detectados diterpenos vouacapânicos e por isso essa amostra foi fracionada por partição. A fração diclorometano:hexano da oleorresina foi submetida a cromatografia em coluna aberta. Foi utilizada como fase estacionária Diaion HP-20 e como fase móvel acetoneitrila:água, com força de eluição crescente. Foi desenvolvido um método analítico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para monitorar o fracionamento cromatográfico. As subfrações 7-12 (Grupo 1) foram reunidas e submetidas à separação por CLAE semi-preparativa em fase reversa. A atividade antimicrobiana dos vouacapanos e da oleorresina de *Pterodon* foi determinada frente a 8 cepas Gram-positivas, 11 cepas Gram-negativas e 4 espécies de *Candida* por meio do ensaio de microdiluição em placa. A citotoxicidade foi avaliada em células HaCaT pelo método colorimétrico do MTT - brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-ila)-2,5-difeniltetrazólio]. O potencial anti-inflamatório foi determinado pelas seguintes avaliações: atividade inibitória frente à fosfolipase A2 por método fluorimétrico, expressão de COX-2 e NRF2, e quantificação das citocinas inflamatórias IL-6 e IL-8 por citometria de fluxo. As amostras foram testadas nas concentrações que mantiveram a viabilidade de 90% (CV₉₀) das células HaCaT, para evitar o uso de concentrações citotóxicas nos ensaios anti-inflamatórios. Três compostos foram identificados via RMN: 6 α ,19 β -diacetoxi-7 β ,14 β -diidroxivouacapano (V1), 6 α -acetoxi-7 β ,14 β -diidroxivouacapano (V2) e 6 α -acetoxi-7 β -hidroxivouacapan-17 β -oato de metila (V3). Os três vouacapanos e a oleorresina foram mais ativos frente às cepas Gram-positivas. Com relação às cepas Gram-negativas, as amostras testadas se mostraram ativas apenas frente à *Pseudomonas aeruginosa*. O vouacapano V2 foi o que exibiu melhor atividade antibacteriana, apresentando-se ativo frente a 7 das 8 bactérias Gram-positivas avaliadas, com valores de concentração inibitória mínima entre 62,5 e 125 μ g/mL. As amostras testadas não apresentaram atividade inibitória frente às cepas *C. glabrata*, *C. kruzei*, *C. parapsilosis* e *C. albicans*. A oleorresina e os vouacapanos V1, V2 e V3 apresentaram CV₉₀ de 7,5 μ g/mL, 19,0 μ g/mL, 13,8 μ g/mL e 4,00 μ g/mL, respectivamente, frente às células HaCaT. A oleorresina de *Pterodon* e os vouacapanos V2 e o V3 inibiram a atividade da fosfolipase A2 em 30,78%, 24,96% e 77,64%, respectivamente. Foi observado que os vouacapanos V2 e V3 nas CV₉₀ inibiram a expressão de COX-2 em 28,3% e 33,17%, respectivamente. A oleorresina de sucupira foi capaz de inibir a produção de IL-6 em 35,47%. A expressão de NRF2 e a produção de IL-8 não foram alteradas pelas substâncias testadas, em relação ao controle. Os resultados dão sustentação ao uso popular dos frutos de sucupira como antibacteriano e anti-inflamatório e mostram que estas atividades podem estar associadas à presença de vouacapanos.

Palavras-chave: sucupira, células HaCaT, concentração inibitória mínima, COX-2, fosfolipase A2.

ABSTRACT

This research aimed to evaluate the antimicrobial and anti-inflammatory activities of *Pterodon emarginatus* Vogel (Fabaceae). The fruits were collected in the municipalities of Campestre and Bela Vista de Goiás (State of Goiás, Brazil). Diterpene vouacapanes were detected only in the oleoresin of the fruits of Bela Vista de Goiás, and so this sample was fractionated by partition. The dichloromethane: hexane fraction of this oleoresin was subjected to open column chromatography. Diaion HP-20 was the stationary phase and the mobile phase was acetonitrile: water with increasing elution force. An HPLC method was developed in order to monitor chromatographic fractionation. Subfractions 7-12 (Group 1) were pooled and subjected to reverse-phase semi-preparative HPLC separation. The antimicrobial activity of vouacapanes and *Pterodon* oleoresin was determined against 8 Gram-positive strains, 11 Gram-negative strains and 4 *Candida* species by plaque microdilution assay. Cytotoxicity was evaluated in HaCaT cells by the colorimetric method of MTT - [3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide]]. The anti-inflammatory potential was determined by the following evaluations: phospholipase A2 inhibitory activity by fluorimetric method, expression of COX-2 and NRF2 and quantification of inflammatory cytokines IL-6 and IL-8 by flow cytometry. Samples were tested at concentrations which maintained 90% viability (CV₉₀) of HaCaT cells, in order to avoid the use of cytotoxic concentrations in anti-inflammatory assays. Three compounds were identified via NMR: 6 α , 19 β -diacetoxy-7 β , 14 β -dihydroxyvouacapanone (V1), 6 α -acetoxy-7 β , 14 β -dihydroxyvouacapanone (V2) and methyl α -acetoxy-7 β -hydroxyvouacapan-17 β -oate (V3). All three vouacapanes and oleoresin were more active against Gram-positive strains. Regarding Gram-negative strains, the samples were only active against *Pseudomonas aeruginosa*. Vouacapanone V2 showed the best antibacterial activity, proving to be active against 7 of the 8 Gram-positive bacteria evaluated, presenting values of minimum inhibitory concentration between 62.5 and 125 μ g/mL. Samples had no inhibitory activity against the strains *C. glabrata*, *C. kruzei*, *C. parapsilosis* and *C. albicans*. The oleoresin and V1, V2 and V3 had CV₉₀ of 7.5 μ g/mL, 19.0 μ g/mL, 13.8 μ g/mL and 4.00 μ g/mL, respectively, against HaCaT cells. The *Pterodon* oleoresin and the V2 and V3 vouacapanes inhibited phospholipase A2 activity by 30.78%, 24.96% and 77.64%, respectively. V2 and V3 vouacapanes at CV₉₀ inhibited COX-2 expression in 28.3% and 33.17%, respectively. Sucupira oleoresin was able to inhibit IL-6 production by 35.47%. The expression of NRF2 and the production of IL-8 were not altered by the substances tested, in comparison to the control. Results support the popular use of sucupira fruits as antibacterial and anti-inflammatory and show that these activities may be associated with the presence of vouacapanes.

Keywords: “sucupira”, HaCaT cells, minimum inhibitory concentration, COX-2, phospholipase A2.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	<i>Pterodon emarginatus</i> . (A) árvore adulta; (B) ramos; (C) frutos....	20
Figura 2	Principais tipos de esqueletos de diterpenos.....	22
Figura 3	Biossíntese de cassanos	23
Figura 4	Estrutura fundamental dos diterpenos vouacapânicos.....	23
Figura 5	Estrutura das lactonas vouacapânicas isoladas em espécies do gênero <i>Pterodon</i>	25
Figura 6	Estrutura do furanoditerpeno ácido 6 α ,7 β -diidroxivouacapan-17 β -oico (6) e de suas lactonas derivadas.....	32
Figura 7	Estrutura dos furanoditerpenos derivados do 6 α -hidroxivouacapan-7 β ,17 β -lactona (23).....	33
Figura 8	Metabólitos e enzimas do metabolismo do ácido araquidônico envolvidos no processo inflamatório.....	36
Figura 9	Estrutura dos diterpenos geranilgeraniol (32) β -cariofileno (33)....	38
Figura 10	Fluxograma do fracionamento da oleorresina obtido dos frutos de <i>Pterodon emarginatus</i>	45
Figura 11	<i>Red/Green BODIPY® PC-A2</i>	51
Figura 12	Perfis cromatográficos do diluente (A), da oleorresina de sucupira do lote 1 (B-preto) e da oleorresina de sucupira do lote 2 (B-azul). Condições Cromatográficas: Item 5.3.....	56
Figura 13	Perfil cromatográfico e espectro UV do geranilgeraniol (A) e da oleorresina de sucupira (B). Condições Cromatográficas: Item 5.3.....	57
Figura 14	Perfil cromatográfico da oleorresina de sucupira (A), da FDH (B) e das subfrações 7-12 (C) obtidas por fracionamento da FDH em cromatografia em coluna. Condições Cromatográficas: Item 5.4.3.....	59
Figura 15	Perfis cromatográficos da fração enriquecida em diterpenos (A) e dos vouacapanos purificados V1 (B) V2 (C) e V3 (D). Condições Cromatográficas: Item 5.3.....	60
Figura 16	Espectro de RMN de ¹ H do vouacapano 1 (CDCl ₃ , 500 MHz).....	61

Figura 17	Espectro de RMN de ^1H do vouacapano 2 (CDCl_3 , 500 MHz).....	61
Figura 18	Espectro de RMN de ^1H do vouacapano 3 (CDCl_3 , 500 MHz).....	62
Figura 19	Estrutura dos diterpenos $6\alpha,19\beta$ -diacetoxi- $7\beta,14\beta$ - diidroxivouacapano (V1); 6α -acetoxi- $7\beta,14\beta$ - diidroxivouacapano (V2); e 6α -acetoxi- 7β -hidroxivouacapan- 17β -oato de metila	63
Figura 20	Curva dose-resposta para o tratamento das células HaCaT com diferentes concentrações da OS	70
Figura 21	Curva dose-resposta para o tratamento das células HaCaT com diferentes concentrações do V1.....	70
Figura 22	Curva dose-resposta para o tratamento das células HaCaT com diferentes concentrações do V2.....	71
Figura 23	Curva dose-resposta para o tratamento das células HaCaT com diferentes concentrações do V3.....	71
Figura 24	Inibição de PLA_2 promovida pela oleorresina e vouacapanos isolados de <i>Pterodon</i>	74
Figura 25	Efeito do 5-FU sobre o conteúdo de COX-2 (A) e NRF2 (B) em HaCaT.....	75
Figura 26	Efeito inibitório sobre a expressão de COX-2 em células HaCaT tratadas com as substâncias teste na presença de 5- FU.....	77
Figura 27	Efeito inibitório sobre a expressão de NRF2 em células HaCaT tratadas com as substâncias teste na presença de 5- FU.....	78
Figura 28	Efeito sobre secreção das citocinas IL-6 (A) e IL-8 (B) em células HaCaT após a exposição à radiação UVA (20 J/cm^2).....	79
Figura 29	Efeito inibitório sobre a produção das citocinas IL-6 (A) e IL-8 (B) em células HaCaT expostas à radiação UVA e tratadas com a OS e o V3.....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Fracionamento a partir da FDH da oleorresina de <i>P. emarginatus</i> por cromatografia em coluna aberta em Diaion HP-20.....	43
Tabela 2	Gradiente de eluição empregado para monitoramento do fracionamento cromatográfico por CLAE-FR	44
Tabela 3	Dados de RMN de ¹ H para os vouacapanos 1, 2 e 3 isolados da oleorresina dos frutos de <i>Pterodon emarginatus</i> (d em ppm, J em Hz)	62
Tabela 4	Atividade antimicrobiana da oleorresina de sucupira (OS), do V1, do V2 e V3 frente bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.....	65

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Estruturas dos vouacapanos identificados em espécies do gênero <i>Pterodon</i> , com base na estrutura fundamental dos diterpenos vouacapânicos (Fig.4)	24
Quadro 2	Cepas utilizadas na determinação da Concentração Inibitória Mínima da oleorresina de sucupira e vouacapanos isolados.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	<i>American Type Collection Culture</i>
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
CFA	<i>Complete Freund's Adjuvant</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standard Institute</i>
CL ₅₀	Concentração letal média
COX	Ciclooxigenase
CV ₉₀	Concentrações que mantiveram a viabilidade de 90%
<i>d</i>	Dubleto
<i>dd</i>	Duplo dubleto
<i>ddd</i>	Duplo duplo dubleto
DAD	Detector de arranjo de diodo
DE ₅₀	Dose efetiva 50%
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
EC ₅₀	Concentração efetiva 50%
EM	Espectrometria de massas
ESI-MS	Espectrometria de massas por Ionização por eletrospray
FDH	Fração diclorometano/n-hexano
5-HPETE	Ácidos hidroxieicosatetraenóicos do ácido araquidônico
IC ₅₀	Concentração inibitória 50%
ICT	Concentração que resulta em inibição total de crescimento
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
HBSS	<i>Hanks' Balanced Salts Solution</i>
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
LTB ₄	Leucotrieno B ₄

<i>m</i>	Multiplete
NF- $\kappa\beta$	Fator de transcrição nuclear $\kappa\beta$
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PGE ₂	Prostaglandina E2
PGH ₂	Prostaglandina H2
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
ppm	Partes por milhão
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN de ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN de ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
<i>s</i>	Singleto
SFB	Soro fetal bovino
TNF	Fator de necrose tumoral
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
TTC	Cloreto de trifeniltetrazolium
TXA ₂	Tromboxano A2
V1	6 α ,19 β -diacetoxi-7 β ,14 β -diidroxivouacapano
V2	6 α -acetoxi-7 β ,14 β -diidroxivouacapano
V3	6 α -acetoxi-7 β -hidroxivouacapan-17 β -oato de metila
δ	Deslocamento químico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1	Gênero <i>Pterodon</i>	20
2.2	Biossíntese dos Vouacapanos	21
2.3	Extração e elucidação estrutural de vouacapanos	25
2.3.1	<i>Extração</i>	25
2.3.2	<i>Elucidação estrutural</i>	26
2.4	Estudos analíticos.....	27
2.5	Atividades farmacológicas dos vouacapanos.....	27
2.5.1	<i>Atividade antinociceptiva</i>	28
2.5.2	<i>Atividade anti-inflamatória e analgésica</i>	29
2.5.3	<i>Atividade larvicida</i>	30
2.5.4	<i>Atividade cardiovascular</i>	30
2.5.5	<i>Atividade antiproliferativa</i>	30
2.6	Síntese de derivados de vouacapanos.....	31
2.7	Atividade antimicrobiana.....	33
2.8	Atividade anti-inflamatória	34
3	JUSTIFICATIVA.....	38
4	OBJETIVOS	40
4.1	Objetivo geral.....	40
4.2	Objetivos específicos	40
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	Erro! Indicador não definido.
5.1	Material.....	Erro! Indicador não definido.
5.2	Obtenção da oleorresina.....	Erro! Indicador não definido.
5.3	Análises qualitativas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) Erro! Indicador não definido.	
5.4	Fracionamento da oleorresina de sucupira	Erro! Indicador não definido.
5.4.1	<i>Obtenção da fração diclorometano/n-hexano (FDH)</i> Erro! Indicador não definido.	
5.4.2	<i>Fracionamento da FDH por cromatografia em coluna aberta em Diaion HP-20</i> Erro! Indicador não definido.	
5.4.3	<i>Monitoramento do fracionamento cromatográfico</i> Erro! Indicador não definido.	
5.5	Isolamento de diterpenos por CLAE semi-preparativaErro! Indicador não definido.	
5.6	Elucidação estrutural	Erro! Indicador não definido.
5.7	Testes biológicos <i>in vitro</i>	Erro! Indicador não definido.
5.7.1	<i>Atividade Antimicrobiana</i>	Erro! Indicador não definido.
5.7.1.1	<i>Atividade Antibacteriana</i>	Erro! Indicador não definido.
5.7.1.1.1	<i>Determinação da CIM</i>	Erro! Indicador não definido.
5.7.1.2	<i>Atividade Antifúngica</i>	Erro! Indicador não definido.
5.7.1.2.1	<i>Determinação da CIM</i>	Erro! Indicador não definido.

5.7.2	<i>Avaliação da Viabilidade Celular</i>	<i>Erro! Indicador não definido.</i>
5.7.2.1	Cultivo celular.....	Erro! Indicador não definido.
5.7.2.2	Ensaio de Viabilidade Celular	Erro! Indicador não definido.
5.7.3	<i>Atividade anti-inflamatória</i>	<i>Erro! Indicador não definido.</i>
5.7.3.1	Inibição da Fosfolipase A2 “ <i>in vitro</i> ”	Erro! Indicador não definido.
5.7.3.2	Expressão de COX-2 e NRF2	Erro! Indicador não definido.
5.7.3.2.1	Tratamento de Células.....	Erro! Indicador não definido.
5.7.3.3	Quantificação de citocinas inflamatórias	Erro! Indicador não definido.
5.7.3.3.1	Tratamento de Células.....	Erro! Indicador não definido.
5.7.3.4	Análise Estatística.....	Erro! Indicador não definido.
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	Erro! Indicador não definido.
6.1	Material Vegetal	Erro! Indicador não definido.
6.2	Análises qualitativas por CLAE	Erro! Indicador não definido.
6.3	Fracionamento da oleorresina de sucupira	Erro! Indicador não definido.
6.4	Isolamento de diterpenos por CLAE semi-preparativa	Erro! Indicador não definido.
6.5	Elucidação estrutural	Erro! Indicador não definido.
6.6	Testes biológicos <i>in vitro</i>	Erro! Indicador não definido.
6.6.1	<i>Atividade antimicrobiana</i>	<i>Erro! Indicador não definido.</i>
6.6.1.1	Atividade antibacteriana	Erro! Indicador não definido.
6.6.1.2	Atividade antifúngica.....	Erro! Indicador não definido.
6.6.2	<i>Viabilidade Celular</i>	<i>Erro! Indicador não definido.</i>
6.6.3	<i>Atividade anti-inflamatória</i>	<i>Erro! Indicador não definido.</i>
6.6.3.1	Inibição da Fosfolipase A2 <i>in vitro</i>	Erro! Indicador não definido.
6.6.3.2	Expressão de COX-2 e NRF2	Erro! Indicador não definido.
6.6.3.3	Quantificação de Citocinas	Erro! Indicador não definido.
7	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	Erro! Indicador não definido.
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

1 INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade as pessoas utilizam plantas com a finalidade de tratar e curar enfermidades. As primeiras referências relacionadas ao uso medicinal de espécies vegetais podem ser encontradas em papiros egípcios, nas escrituras chinesas e nas placas de argila da Suméria (HAMBURGER; HOSTETTMANN, 1991).

A família Fabaceae contém o segundo maior número de plantas medicinais em todo o mundo, com cerca de 490 espécies de interesse medicinal (GAO et al., 2010). Segundo alguns autores o gênero *Pterodon* (Fabaceae) compreende quatro espécies nativas no Brasil: *Pterodon polygalaeflorus* Benth., *Pterodon apparicioi* Pedersoli., *Pterodon abruptus* Benth. e *Pterodon emarginatus* Vogel., conhecidas como sucupira-branca ou faveira (LORENZI; MATOS, 2002; HANSEN; HARAGUCHI; ALONSO, 2010).

No entanto, de acordo com a base de dados “The Plant List”, o gênero *Pterodon* abrange duas espécies: *Pterodon abruptus* (Moric.) Benth. (sinonímia: *Commilobium abruptum* Moric.) e *P. emarginatus* Vogel [sinonímia: *Acosmium inornatum* (Mohlenbr.) Yakovlev; *C. polygalaeflorus* Benth.; *C. pubescens* Benth.; *P. apparicioi* Pedersoli.; *P. polygalaeflorus* (Benth.) Benth.; *P. polygaliflorus* (Benth.) Benth.; *P. pubescens* (Benth.) Benth.; e *Sweetia inornata* Mohlenbr.] (GSPC, 2016). Neste estudo, os nomes científicos das espécies foram uniformizados por meio da exclusão dos sinônimos conforme a base de dados *The Plant List* (GSPC, 2016).

Os estudos etnobotânicos e etnofarmacológicos são abordagens importantes de seleção de plantas medicinais e para a descoberta de compostos bioativos. Muitos medicamentos foram originados de compostos naturais isolados de plantas medicinais (RAI et al., 2011). Espécies vegetais do gênero *Pterodon* são utilizadas pelas populações por suas propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias, analgésicas, para dores de garganta e disfunções respiratórias (CORRÊA, 1975; GRANDI et al., 1989; LORENZI; MATOS, 2002; HANSEN et al., 2010; RAPOSO et al., 2011; FAGG et al., 2015).

Estudos realizados com o óleo e extrato dos frutos de *Pterodon* confirmaram várias atividades biológicas tais como anti-inflamatória (CARVALHO et al., 1999; HOSCHEID et al., 2013; PASCOA et al., 2015), anti-reumática (SABINO et al., 1999), antinociceptiva (SILVA et al., 2004; COELHO et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2012; NUCCI, et al., 2012; MARTINS, et al., 2015), antiproliferativa (VIEIRA et al., 2008; SPINDOLA et al., 2009; PEREIRA et al., 2011; PEREIRA et al., 2012), antioxidante (DUTRA; LEITE; BARBOSA, 2008), antimicrobiana (DUTRA et al., 2009; TOLEDO et al., 2011), larvicida sobre *Aedes*

aegypti (PIMENTA et al., 2006) e antiparasitária frente ao *Trypanosoma cruzi* (BARRETO et al., 2008; OLIVEIRA, 2014), *Leishmania amazonensis* (DUTRA et al., 2009; OLIVEIRA, 2014) e *L. braziliensis* (OLIVEIRA, 2014). Entre os compostos provavelmente relacionados com as propriedades biológicas de *Pterodon* estão os diterpenos vouacapânicos (OLIVEIRA et al., 2017a; OLIVEIRA et al., 2017b).

Os estudos realizados até à data ainda representam uma avaliação parcial das atividades antimicrobiana e anti-inflamatória dos vouacapanos de *Pterodon*. Em um estudo realizado por Roque (2013), foi avaliada a atividade antimicrobiana do geranilgeraniol, do 6 α ,7 β -diidroxivouacapano-17 β -oato de metila, dos isômeros 6 α -hidroxi-7 β -acetoxi-vouacapan-17 β -oato de metila e 6 α -acetoxi-7 β -hidroxivouacapan-17 β -oato de metila e de um composto com esqueleto vouacapano denominado FrB. Os compostos foram testados frente quatro espécies de *Candida* e contra as cepas bacterianas *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus*, pelo método de microdiluição em caldo. Apenas o composto denominado FrB apresentou atividade antimicrobiana. Foi observada a concentração inibitória mínima de 2 mg/mL frente *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*, e não houve atividade efetiva contra bactérias. No entanto, novas pesquisas devem ser realizadas, testando outros vouacapanos e um maior número de cepas.

Em estudo realizado por Galceran et al. (2011), o ácido 6 α ,7 β -diidroxivouacapan-17 β -oico (50 mg/kg, v.o) inibiu os mecanismos inflamatórios promovidos pela carragenina e prostaglandina E2 no modelo do edema de pata. Estes dados indicam que os vouacapanos podem ser um dos agentes responsáveis pela ação anti-inflamatória do extrato de *Pterodon*. Contudo, os mecanismos envolvidos na ação anti-inflamatória destes compostos ainda não foram bem elucidados.

Os diterpenos vouacapanos presentes em plantas do gênero *Pterodon* podem explicar várias propriedades observadas em extratos dessas espécies e justificar seu uso etnomedicinal. No entanto, estudos da atividade antimicrobiana e anti-inflamatória destes compostos são escassos. Diante do exposto, este trabalho visou avaliar as atividades antimicrobiana e anti-inflamatória de vouacapanos de *Pterodon emarginatus* Vogel (Fabaceae).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Gênero *Pterodon*

O Brasil detém a maior diversidade biológica do mundo e engloba de 15 a 20% de toda a biodiversidade do planeta (GANEM, 2010), distribuída em biomas distintos. Dados publicados em 2011 mostraram que o Cerrado teve sua área de vegetação original reduzida a apenas 50,8% da área original, que era de 2.039.386 km² (BRASIL, 2011). A biodiversidade do Cerrado é estimada em 160.000 espécies de plantas, fungos e animais (RATTER; RIBEIRO; BRIDGEWATER, 1997). São mais de 6000 espécies vegetais, muitas delas com valor alimentício e medicinal (ALMEIDA et al., 1998). Essa riqueza está sofrendo forte pressão da expansão agrícola, com o aumento crescente de monoculturas de maior lucratividade imediata (BRASIL, 2018).

Pterodon emarginatus (Figura 1) é uma planta que atinge de 8 a 12 metros de altura, com tronco cilíndrico de 40 a 60 centímetros de diâmetro, revestido por casca lisa de cor branco-amarelada. Suas raízes ocasionalmente formam expansões ou túberas. As folhas são compostas pinadas, com 30-36 folíolos alternos de 2 a 3 centímetros de comprimento. Suas flores são de cor rosada, dispostas em inflorescências paniculadas terminais. Os frutos são legumes tipo sâmara arredondadas, indeiscentes e aladas, contendo uma única semente fortemente protegida dentro de uma cápsula fibro-lenhosa e envolvida externamente por uma substância oleosa. (LORENZI; MATOS, 2002). Essas espécies podem ser encontradas no cerrado dos estados de Minas Gerais, São Paulo, Goiás e Mato Grosso do Sul (LORENZI; MATOS, 2002; HANSEN; HARAGUCHI; ALONSO, 2010).

Figura 1- *Pterodon emarginatus*. (A) árvore adulta; (B) ramos; (C) frutos.



Fonte: Próprio autor.

Estudos fitoquímicos do gênero *Pterodon* mostraram a presença de isoflavonas e triterpenoides nas cascas do caule (BRAZ FILHO; GOTTLIEB; ASSUMPCÃO, 1971; MARQUES et al., 1998; MORAES et al., 2012), esteroides nas folhas (SANTOS et al., 2010), isoflavonas e diterpenos nos frutos (MAHAJAN; MONTEIRO, 1973; FASCIO et al., 1976; CAMPOS et al., 1994; ARRIAGA et al., 2000) e sesquiterpenos no óleo essencial dos frutos (DUTRA et al., 2009; ALVES et al., 2013). Os constituintes característicos desse gênero são diterpenos tetracíclicos de esqueleto vouacapano (CAMPOS et al., 1994).

2.2 Biossíntese dos Vouacapanos

Diterpenos constituem uma vasta classe de compostos isoprenoides naturais biossintetizados a partir do ácido mevalônico, derivados do 2*E*,6*E*,10*E*-geranilgeranilpirofosfato (GGPP), e fosfato desoxixilulose (DEWICK, 2002). Em sua estrutura molecular, os diterpenos contêm esqueletos com 20 carbonos. De acordo com o número de anéis e o padrão de ciclização de suas estruturas químicas, estes metabólitos podem ser divididos em acíclicos (fitanos), bicíclicos (tipo labdano e clerodano), tricíclico (tipo abietano, pimarano e cassanos), tetracíclico (tipo caurano e vouacapano) e macrocíclicos (tipo latirano e taxano) (Figura 2) (HANSON, 1995; GARCÍA; OLIVEIRA; BATISTA, 2007).

Cassanos contendo um anel furânico são chamados furanocassanos ou vouacapanos. O esqueleto básico dos cassanos pode ser derivado dos pimaranos a partir da migração do grupo metila do C-13 para o C-14 na via biossintética. Os pimaranos são formados a partir da ciclização de um intermediário tipo labdano (MAURYA et al., 2012; XU; YE; ZHAO, 2011), o qual, por sua vez, é derivado do GGPP (PETERS, 2010) (Figura 3).

Figura 2 – Principais tipos de esqueletos de diterpenos.

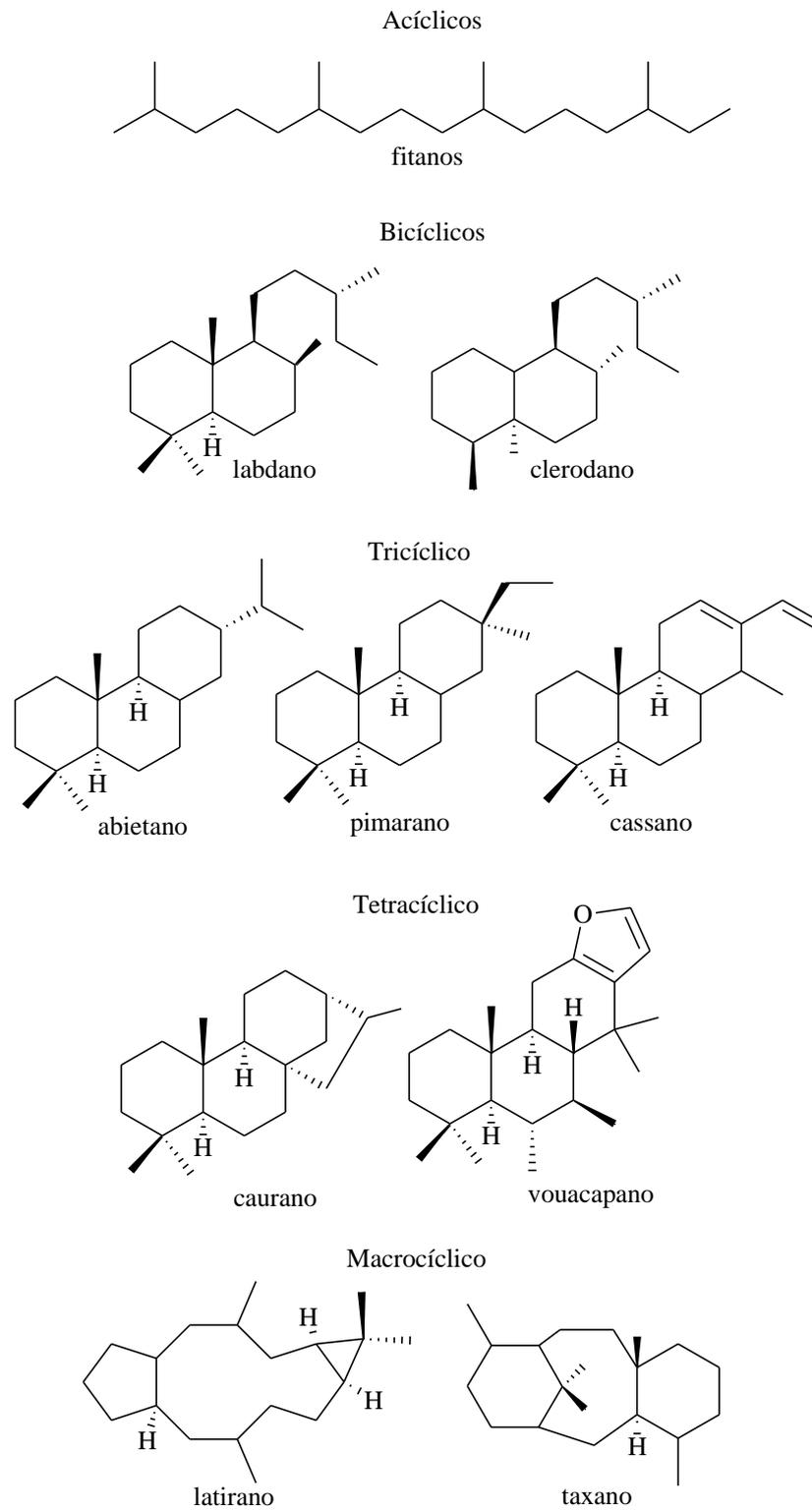
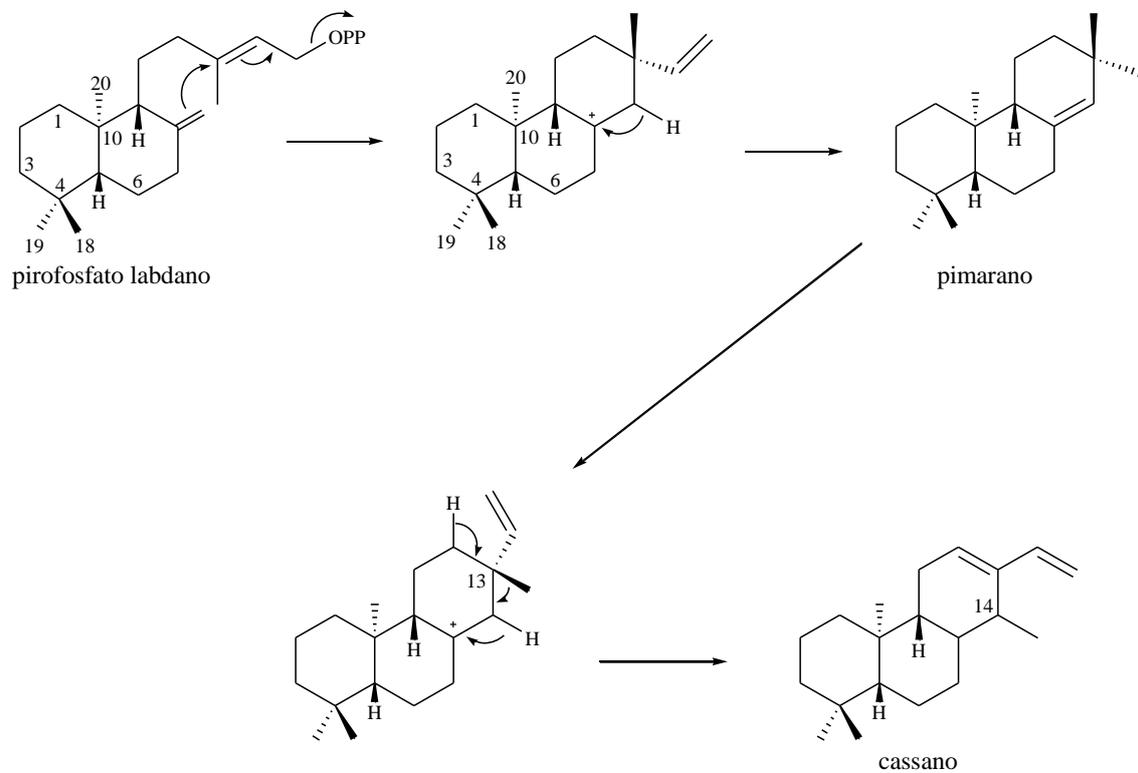
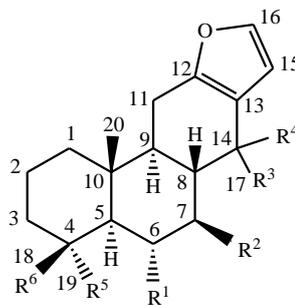


Figura 3 – Biossíntese de cassanos.



Vouacapanos representam um importante grupo de cassanos tetracíclicos e suas estruturas são caracterizadas por um esqueleto molecular construído a partir da fusão de três anéis de ciclohexano e um anel de furano (Figura 4) (JIANG et al., 2001). Diterpenos vouacapanos são distribuídos principalmente em espécies do gênero *Caesalpinia* (JIANG et al., 2001; MAURYA et al., 2012; HURTADO et al., 2013) e *Pterodon*. Os vouacapanos já identificados em espécies do gênero *Pterodon* estão sumarizados no Quadro 1 e na Figura 5.

Figura 4 – Estrutura fundamental dos diterpenos vouacapânicos.



Quadro 1 – Estruturas dos vouacapanos identificados em espécies do gênero *Pterodon*, com base na estrutura fundamental dos diterpenos vouacapânicos (Fig.4).

Diterpenos	R1	R2	R3	R4	R5	R6	REFERÊNCIAS
6 α ,7 β -diacetoxivouacap-14(17)-eno (1)	(α) OAc	(β) OAc	C = CH ₂		(α) Me	(β) Me	MAHAJAN; MONTEIRO, 1973
7 β -acetoxivouacapano (2)	H	OAc	(α) Me	(β) H	(α) Me	(β) Me	FASCIO et al., 1976; MAHAJAN; MONTEIRO, 1973; SPINDOLA et al., 2009
6 α ,7 β -diacetoxivouacapano (3)	(α) OAc	(β) OAc	(α) Me	(β) H	(α) Me	(β) Me	FASCIO et al., 1976; MAHAJAN; MONTEIRO, 1973; SPINDOLA et al., 2009
vouacapano-6 α ,7 β ,14 β -triol (4)	(α) OH	(β) OH	(α) Me	(β) OH	(α) Me	(β) Me	FASCIO et al., 1976; MAHAJAN; MONTEIRO, 1973
6 α ,7 β -diidroxivouacap-17 β -oato de sódio (5)	(α) OH	(β) OH	(β) COONa	(α) H	(α) Me	(β) Me	DUARTE et al., 1992; DUARTE et al., 1996
ácido 6 α ,7 β -diidroxivouacap-17 β -oico (6)	(α) OH	(β) OH	(β) COOH	(α) H	(α) Me	(β) Me	BELINELO et al., 2002; CAMPOS et al., 1994; CASTELO-BRANCO et al., 2008; DEMUNER et al., 1996; SANTOS et al., 2008; EUZÉBIO et al., 2009, 2010; FASCIO et al., 1976; GALCERAN et al., 2011; KING-DÍAZ et al., 2006a, 2006b, 2010; MAHAJAN; MONTEIRO, 1973; OMENA et al., 2006; RUBINGER et al., 2004
6 α ,7 β -diidroxivouacap-17 β -oato de metila (7)	(α) OH	(β) OH	(β) COOMe	(α) H	(α) Me	(β) Me	ARRIAGA et al., 2000; SANTOS et al., 2008; FASCIO et al., 1976; KING-DÍAZ et al., 2010; MAHAJAN; MONTEIRO, 1973; OMENA et al., 2006; RUBINGER et al., 2004; SPINDOLA et al., 2009, 2010, 2011
7 β - acetoxi-6 α -hidroxivouacap-17 β -oato de metila (8)	(α) OH	(β) OAc	(β) COOMe	(α) H	(α) Me	(β) Me	MAHAJAN; MONTEIRO, 1973; SERVAT et al., 2012
6 α ,7 β -diacetoxivouacap-14 β -al (9)	(α) OAc	(β) OAc	(α) H	(β) CHO	(α) Me	(β) Me	FASCIO et al., 1976
6 α ,7 β -diacetoxivouacap-14 β -oato (10)	(α) OAc	(β) OAc	(α) H	(β) COOMe	(α) Me	(β) Me	FASCIO et al., 1976
6 α -acetoxi-7 β -hidroxivouacap-17 β -oato de metila (11)	(α) OAc	(β) OH	(β) COOMe	(α) H	(α) Me	(β) Me	CAMPOS et al., 1994; FASCIO et al., 1976; SERVAT et al., 2012; HOSCHEID et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2017a
6 α -hidroxi-7 β -acetoxivouacap-17 β -oato de metila (12)	(α) OH	(β) OAc	(β) COOMe	(α) H	(α) Me	(β) Me	FASCIO et al., 1976; SERVAT et al., 2012; HOSCHEID et al., 2012
6 α -hidroxi-7 β -acetoxivouacap-14(17)-eno (13)	(α) OH	(β) OAc	C = CH ₂		(α) Me	(β) Me	CAMPOS et al., 1994
vouacapano-6 α ,7 β ,14 β ,19-tetraol (14)	(α) OH	(β) OH	(α) Me	(β) OH	(β) CH ₂ OH	(α) Me	ARRIAGA et al., 2000; DEMUNER et al., 1996; VIEIRA et al., 2008
6 α -acetoxivouacapano (15)	(α) OAc	H	(α) Me	(β) H	(α) Me	(β) Me	PIMENTA et al., 2006
6 α -hidroxivouacapano (16)	(α) OH	H	(α) Me	(β) H	(α) Me	(β) Me	ARRIAGA et al., 2000; PIMENTA et al., 2006
Vouacapano (17)	(α) H	H	(α) Me	(β) H	(α) Me	(β) Me	PIMENTA et al., 2006
6 α ,7 β -diidroxivouacap-17 β -metileno-ol (18)	(α) OH	(β) OH	(β) CH ₂ OH	(α) H	(α) Me	(β) Me	SPINDOLA et al., 2009
6 α -acetoxi-7 β -hidroxivouacapano (19)	(α) OAc	(β) OH	(α) Me	(β) H	(α) Me	(β) Me	SPINDOLA et al., 2009
6 α ,19 β -diacetoxi-7 β ,14 β -dihydroxyvouacap (20)	(α) OAc	(β) OH	(β) OH	(α) Me	(α) Me	(α) OAc	OLIVEIRA et al., 2017a
6 α -acetoxi-7 β ,14 β - dihydroxyvouacap (21)	(α) OAc	(β) OH	(β) OH	(α) Me	(α) Me	(β) Me	OLIVEIRA et al., 2017a

Figura 5 – Estrutura das lactonas vouacapânicas isoladas em espécies do gênero *Pterodon*.



2.3 Extração e elucidação estrutural de vouacapanos

2.3.1 Extração

Os vouacapanos são um grupo de compostos de média a baixa polaridade, que são solúveis principalmente em solventes hidrofóbicos. Diterpenos vouacapanos são geralmente isolados dos frutos de diferentes espécies de *Pterodon* por procedimentos similares. Os frutos são moídos e submetidos à extração por Soxhlet, usando diferentes solventes, como éter de petróleo (MAHAJAN; MONTEIRO, 1973), hexano (ARRIAGA et al., 2000; DEMUNER et al., 1996; PIMENTA et al., 2006) e etanol (VIEIRA et al., 2008). A extração por percolação com hexano e etanol 90% também tem sido empregada (FASCIO et al., 1976; OMENA et al., 2006), bem como a extração a quente com etanol (CAMPOS et al., 1994) e a extração a frio utilizando diclorometano (SPINDOLA et al., 2009, 2010).

Após o processo extrativo, o solvente é removido e o extrato é submetido à cromatografia em coluna para a obtenção dos vouacapanos (DEMUNER et al., 1996; FASCIO et al., 1976; MAHAJAN; MONTEIRO, 1973; PIMENTA et al., 2006; RUBINGER et al., 2004; SERVAT et al., 2012; SPINDOLA et al., 2009, 2010). Antes da purificação por coluna cromatográfica, pode ser realizado fracionamento pelo processo de extração por solvente (OMENA et al., 2006; VIEIRA et al., 2008) ou extração ácido-base (ARRIAGA et al., 2000; CAMPOS et al., 1994; FASCIO et al., 1976; MAHAJAN; MONTEIRO, 1973). O 6 α ,7 β -diacetoxivouacapano (**3**) foi obtido por cristalização direta, após a extração e subsequente remoção do solvente extrator (FASCIO et al., 1976; MAHAJAN; MONTEIRO, 1973).

A separação dos compostos por cromatografia em coluna aberta geralmente utiliza sílica-gel como fase estacionária (FASCIO et al., 1976; RUBINGER et al., 2004; VIEIRA et

al., 2008); todavia, para a purificação do 6 α ,7 β -diacetoxivouacapano (**3**) e do 6 α ,7 β -diacetoxivouacap-14(17)-eno (**1**) foi utilizado como adsorvente a alumina (MAHAJAN; MONTEIRO, 1973) e para a purificação do vouacapano-6 α ,7 β ,14 β ,19-tetraol (**14**) houve uma etapa de purificação em que foi utilizada coluna de florisil (VIEIRA et al., 2008).

A separação dos compostos por cromatografia clássica em coluna muitas vezes se revela trabalhosa e dispendiosa, pois requer a análise das frações após sua obtenção, e não concomitantemente. Além disso, as várias etapas envolvidas na purificação por cromatografia em coluna podem favorecer a ocorrência de reações químicas envolvendo os metabólitos secundários, resultando na formação de artefatos (PIZZOLATTI et al., 2002). Oliveira et al., (2017a) desenvolveram um método alternativo, simples e eficaz para o isolamento de vouacapanos de *P. emarginatus* por cromatografia líquida de alta eficiência semi-preparativa (CLAE).

2.3.2 Elucidação estrutural

Após as etapas de extração e isolamento, o próximo passo consiste na elucidação da estrutura dos vouacapanos obtidos. As estruturas dos diterpenos vouacapânicos têm sido determinadas principalmente por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) (CAMPOS et al., 1994; EUZÉBIO et al., 2009; GALCERAN et al., 2011; VIEIRA et al., 2008), ou em conjunto com outras técnicas espectrométricas, como infravermelho (IV) (SPINDOLA et al., 2010) e espectrometria de massas (EM) sozinhas (ARRIAGA et al., 2000; FASCIO et al., 1976; SERVAT et al., 2012; OLIVEIRA, 2014) ou em conjunto (DEMUNER et al., 1996; OMENA et al., 2006; SPINDOLA et al., 2009).

A espectrometria por RMN fornece informações detalhadas sobre os vouacapanos. A principal desvantagem desta técnica é a menor sensibilidade na análise de amostras em baixas concentrações, principalmente no caso da RMN de ^{13}C . Os espectros de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C dos vouacapanos são caracterizados pelos sinais do anel furânico. O espectro de RMN de ^1H mostra os sinais dos hidrogênios furânicos em δ_{H} 6,4 (1H, *d*, $J=1,9$ Hz, H₁₅) e δ_{H} 7,2 (1H, *d*, $J=1,9$ Hz, H₁₆) e o espectro de RMN de ^{13}C mostra os sinais do anel furânico em δ_{C} 148,2 (C-12), 141,9 (C-16), 123,9 (C-13), e 107,2 (C-15) (HURTADO et al., 2013; SPINDOLA et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2017a).

2.4 Estudos analíticos

São necessários métodos analíticos exatos e reprodutíveis para a identificação e quantificação de diterpenos vouacapânicos nos frutos de *Pterodon* ou em amostras biológicas. O *fingerprinting* ou “impressão digital” química é indicado para a distinção qualitativa entre amostras com composição química complexa (SAWAYA et al., 2010).

Cabral et al. (2013) utilizaram a técnica de espectrometria de massas (MS, da sigla em inglês) para a análise de *fingerprinting* do óleo dos frutos de *P. pubescens*. Neste estudo, foram empregadas técnicas por espectrometria de massas (EM) com ionização por eletrospray (ESI-MS, da sigla em inglês), por infusão direta após extração com solvente e diluição da amostra; e uma técnica de dessecção/ionização para análise em ambiente com ionização por sonic-spray (EASI-MS, da sigla em inglês) realizada diretamente na superfície do fruto ou no papel impregnado com o óleo. As principais vantagens da EM em relação às demais técnicas utilizadas para obtenção de *fingerprints* são a alta sensibilidade e a seletividade (VILLAS-BÔAS et al., 2004; DETTMER; ARONOV; HAMMOCK, 2007).

Poucos estudos foram encontrados para a quantificação de vouacapanos em *Pterodon*. Hoscheid et al. (2012) desenvolveram e validaram um método por cromatografia a gasosa acoplada à espectrometria de massas com monitoramento seletivo de íons (GC-MS-SIM) para quantificar os diterpenos 6 α -acetoxi-7 β -hidroxivouacapan-17 β -oato de metila (**11**) e 6 α -hidroxi-7 β -acetoxivouacapan-17 β -oato (**12**) de metila em extrato semi-purificado dos frutos de *P. emarginatus*. As amostras foram quantificadas após um processo de purificação que envolveu partição e cromatografia em coluna aberta. Oliveira (2014) propôs um método alternativo para quantificar 6 α -acetoxi-7 β -hidroxivouacapan-17 β -oato de metila (**11**) em *P. emarginatus* por CLAE-DAD. A principal vantagem deste método em relação ao anterior é que não são necessárias as etapas prévias de purificação da amostra.

2.5 Atividades farmacológicas dos vouacapanos

Alguns autores têm sugerido que o esqueleto vouacapânico de diterpenos furânicos esteja envolvido com algumas propriedades farmacológicas de extratos obtidos dos frutos de *Pterodon* (CARVALHO et al., 1999; EUZEBIO et al., 2009; SPINDOLA et al., 2010; NUCCI et al., 2012). As possíveis atividades farmacológicas e mecanismos de ação de vouacapanos isolados desses frutos são baseados nos estudos *in vitro* e *in vivo* discutidos nesse tópico.

2.5.1 Atividade antinociceptiva

Duarte et al. (1992) avaliaram o envolvimento de peptídeos opioides endógenos no efeito antinociceptivo induzido pelo $6\alpha,7\beta$ -diidroxivouacapan-17 β -oato de sódio (**5**). Para tanto, foi utilizado o teste de contorção abdominal em camundongos provocada por ácido acético e o teste de compressão da pata do rato. Os resultados mostraram que o efeito antinociceptivo foi apenas parcialmente bloqueado por antagonistas opiáceos. Os autores sugeriram que a liberação de endorfinas poderia estar envolvida no efeito analgésico causado pelo vouacapano.

Em outro estudo, Duarte et al. (1996) avaliaram o possível envolvimento de aminas biogênicas no efeito antinociceptivo do $6\alpha,7\beta$ -diidroxivouacapan-17 β -oato de sódio (**5**). Foi utilizado o teste de contorção abdominal em camundongos provocado por ácido acético. Os resultados indicaram o envolvimento da dopamina na resposta de antinocicepção do vouacapano.

Spindola et al. (2010) investigaram a contribuição do geranilgeraniol e do $6\alpha,7\beta$ -diidroxivouacapan-17 β -oato de metila (**7**) isolado dos frutos de *P. pubescens* na atividade antinociceptiva do extrato. O teste de campo aberto foi realizado a fim de excluir a possibilidade de os efeitos antinociceptivos do geranilgeraniol e do $6\alpha,7\beta$ -diidroxivouacapan-17 β -oato de metila (**7**) estarem relacionados com perturbações específicas na atividade locomotora dos animais. Os compostos apresentaram um efeito na redução das contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos tratados por via intraperitoneal (i.p.) e oral (p.o), mostrando diferenças na potência relacionadas à via de administração. Os resultados sugeriram que os diterpenos testados podem apresentar atividade sinérgica. Utilizando cloridrato de naloxona, um antagonista opióide não específico, no teste da placa quente, foi demonstrado que a atividade antinociceptiva não está relacionada às vias opioidérgicas. Os resultados indicaram o envolvimento dos receptores vaniloide VR1, e/ou receptores glutamato periféricos na atividade antinociceptiva observada.

Dando sequência ao trabalho anterior, Spindola et al. (2011) investigaram os possíveis mecanismos de ação envolvidos na atividade antinociceptiva dos compostos geranilgeraniol e $6\alpha,7\beta$ -diidroxivouacapan-17 β -oato de metila (**7**). No ensaio de alodínia, onde foi avaliada a resposta ao toque em ratos submetidos à injeção subplantar de *Complete Freund's Adjuvant* (CFA: *Mycobacterium tuberculosis*, 1 mg/mL), os compostos testados (30 mg/kg; i.p.) diminuíram a sensibilidade para a dor na fase aguda. No ensaio de hiperalgesia, onde foi avaliada a resposta a um estímulo doloroso, os ratos tratados com geranilgeraniol tiveram uma

redução significativa da hipernocicepção induzida por carragenina. As ações antinociceptivas do geranilgeraniol e do $6\alpha,7\beta$ -diidroxivouacapan- 17β -oato de metila (**7**) durante os testes de contorção induzida por ácido acético, podem estar relacionadas aos sistemas serotoninérgico e imidazólico.

Servat et al. (2012) avaliaram a atividade antinociceptiva da mistura de isômeros 6α -acetoxi- 7β -hidroxivouacapan- 17β -oato de metila (**11**) e 7β -acetoxi- 6α -hidroxivouacapan- 17β -oato de metila (**8**). O tratamento com a mistura de isômeros não causou mudança significativa na atividade locomotora dos animais. A mistura de isômeros reduziu as contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos de forma dose-dependente, em comparação com o grupo controle, apresentando $DE_{50} = 35,6$ mg/kg. No teste da formalina, foi mostrado que a atividade antinociceptiva da mistura de isômeros está mais relacionada à dor neurogênica do que de origem inflamatória. No ensaio de alodínia, a amostra testada (30 mg/kg; i.p.) mostrou ser efetiva nas duas primeiras fases: aguda e sub aguda (4 e 24 horas após administração de CFA). No ensaio de hiperalgesia, que possui essencialmente componentes inflamatórios, a mistura de isômeros vouacapanos não foi efetiva na diminuição da dor, sugerindo que a amostra tem maior afinidade por componentes neurogênicos.

2.5.2 Atividade anti-inflamatória e analgésica

Em estudo realizado por Galceran et al. (2011) foi avaliado o potencial anti-inflamatório e analgésico do ácido $6\alpha,7\beta$ -diidroxivouacapan- 17β -oico (**6**). Os resultados mostraram que o ácido $6\alpha,7\beta$ -diidroxivouacapan- 17β -oico (**6**) inibiu os mecanismos inflamatórios promovidos pela carragenina e prostaglandina E2, e não inibiu significativamente o edema provocado por dextrana. No teste das contorções induzidas pelo ácido acético, houve inibição dependente da dose nos camundongos que receberam tratamento oral do diterpeno. No teste da formalina, o ácido $6\alpha,7\beta$ -diidroxivouacapan- 17β -oico (**6**) apresentou ação antinociceptiva de origem neurogênica e inflamatória, quando avaliada em camundongos tratados pela via oral. O ácido $6\alpha,7\beta$ -diidroxivouacapan- 17β -oico (**6**) não foi eficaz no aumento do tempo de latência durante o teste de placa quente. Juntos, estes resultados sugerem que o ácido $6\alpha,7\beta$ -diidroxivouacapan- 17β -oico (**6**) apresenta efeitos anti-inflamatórios e analgésicos periféricos.

2.5.3 Atividade larvicida

Pimenta et al. (2006) avaliaram a atividade do 6 α -acetoxivouacapano (**15**) sobre larvas de estágio 3 de *Aedes aegypti*. O diterpeno foi testado em concentrações variando de 12,5 $\mu\text{g/mL}$ a 500 $\mu\text{g/mL}$. O 6 α -acetoxivouacapano (**15**) apresentou concentração letal média (CL_{50}) igual a 186,21 $\mu\text{g/mL}$. Omena et al. (2006) avaliaram a atividade larvicida de três diterpenos vouacapanicos sobre larvas de estágio 4 de *Aedes aegypti*. Os compostos 6 α -hidroxivouacapano-7 β ,17 β -lactona (**21**), ácido 6 α ,7 β -diidroxivouacapan-17 β -oico (**6**) e 6 α ,7 β -diidroxivouacapan-17 β -oato de metila (**7**) apresentaram CL_{50} de 50,08 $\mu\text{g/mL}$, 14,69 $\mu\text{g/mL}$ e 21,76 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Substâncias com valores de CL_{50} menores que 100 são considerados ativos frente ao *Aedes aegypti* (CHENG et al., 2003).

2.5.4 Atividade cardiovascular

Reis et al. (2015) avaliaram a atividade vasorrelaxante e os possíveis mecanismos de ação do 6 α -acetoxi-7 β -hidroxivouacapan-17 β -oato de metila (**11**), em preparações isoladas de aorta de ratos. Os resultados sugeriram que o 6 α -acetoxi-7 β -hidroxivouacapan-17 β -oato de metila (**11**) induz relaxamento vascular endotélio-independente, bloqueando o canal de Ca^{2+} do tipo L ($\text{Ca}_v1.2$).

2.5.5 Atividade antiproliferativa

Em estudo conduzido por Vieira et al. (2008) foi avaliada a atividade antiproliferativa do vouacapano-6 α ,7 β ,14 β ,19-tetraol (**14**) pelo método colorimétrico do MTT, empregando células de melanoma humano SK MEL 37. O composto foi testado em concentrações entre 1,4 μM e 92 μM e apresentou valor de IC_{50} de 32 μM . A doxorrubicina (controle) apresentou IC_{50} de 35 μM , valor semelhante ao do vouacapano testado.

Em estudo realizado por Spindola et al. (2009) foi avaliada a atividade antiproliferativa do 6 α -acetoxi-7 β -hidroxivouacapano (**19**), 6 α ,7 β -diacetoxivouacapano (**3**), 7 β -acetoxivouacapano (**2**), 6 α ,7 β -diidroxivouacapan-17 β -oato de metila (**7**) e 6 α ,7 β -diidroxivouacapan-17 β -metileno-ol (**18**) contra as linhagens de células tumorais humanas UACC-62 (melanoma), MCF-7 (mama), NCI-H460 (pulmão), OVCAR-03 (ovário), PC-3 (próstata), HT-29 (colon), 786-0 (rim), K562 (leucemia) e NCI-ADR/RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos). Os compostos foram testados em concentrações entre 0,25

$\mu\text{g/mL}$ e $250 \mu\text{g/mL}$. A proliferação celular foi determinada por quantificação espectrofotométrica do conteúdo de proteína celular, usando teste com sulforadamina B.

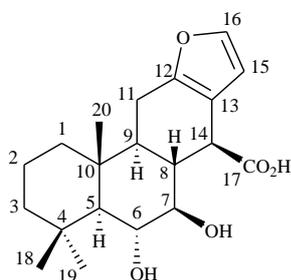
No mesmo estudo também foi avaliada a citotoxicidade dos compostos 6α -acetoxi- 7β -hidroxivouacapano (**19**), $6\alpha,7\beta$ -diidroxivouacapan- 17β -oato de metila (**7**) e $6\alpha,7\beta$ -diidroxivouacapan- 17β -metileno-ol (**18**) frente a uma linhagem de célula murina normal (3T3), empregando o método do MTT. Os compostos foram testados em concentrações entre 0,25 e $250 \mu\text{g/mL}$. O 6α -acetoxi- 7β -hidroxivouacapano (**19**) foi 26 vezes mais potente em inibir 50% do crescimento (IC_{50}) de PC-3 (próstata), 15 vezes mais citostático (ICT – concentração que resulta em inibição total de crescimento) e 6 vezes menos tóxico, em relação a concentração que resulta em 50% de morte celular (CL_{50}) quando comparado com o controle (doxorrubicina). Em relação à citotoxicidade frente a 3T3, o 6α -acetoxi- 7β -hidroxivouacapano (**19**) apresentou menor toxicidade ($\text{IC}_{50} = 34,33 \mu\text{g/mL}$) que o $6\alpha,7\beta$ -diidroxivouacapan- 17β -oato de metila (**7**) ($\text{IC}_{50} = 22,83 \mu\text{g/mL}$) e $6\alpha,7\beta$ -diidroxivouacapan- 17β -metileno-ol (**18**) ($\text{IC}_{50} = 23,55 \mu\text{g/mL}$).

2.6 Síntese de derivados de vouacapanos

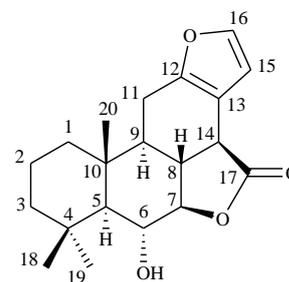
A fim de se obter mais informações da atividade antiproliferativa de furanoditerpenos frente diferentes linhagens celulares, novos constituintes ativos foram sintetizados a partir do ácido $6\alpha,7\beta$ -diidroxivouacapan- 17β -oico (**6**) isolado dos frutos de *P. polygalaeiflorus*.

Euzébio et al. (2009) sintetizaram, a partir do **6**, três lactonas: 6α -hidroxivouacapan- $7\beta,17\beta$ -lactona (**23**), 6α -acetoxivouacapan- $7\beta,17\beta$ -lactona (**24**) e 6 -oxovouacapan- $7\beta,17\beta$ -lactona (**25**) (Figura 6). A atividade antiproliferativa do ácido $6\alpha,7\beta$ -diidroxivouacapan- 17β -oico (**6**) e das lactonas derivadas foi avaliada contra as mesmas linhagens de células humanas cancerígenas utilizadas no estudo realizado por Spindola et al. (2009). O 6α -hidroxivouacapan- $7\beta,17\beta$ -lactona (**23**) foi mais ativo entre os quatro furanoditerpenos. Além disso, este composto foi mais potente em inibir 50% do crescimento (IC_{50}) de células cancerígenas de ovário resistente a adriamicina (NCI-ADR/RES) e leucemia eritromieloblastóide (K562), quando comparado com doxorrubicina. O 6α -acetoxivouacapan- $7\beta,17\beta$ -lactona (**24**) apresentou efeito inibidor de crescimento apenas em relação às células de leucemia eritromieloblastoide ($\text{IC}_{50} = 27,4 \mu\text{g/mL}$). Os resultados apontaram o 6α -hidroxivouacapan- $7\beta,17\beta$ -lactona (**23**) como o derivado mais promissor para estudos posteriores. O estudo demonstrou a importância do anel $7\beta, 17\beta$ -lactona e do grupo hidroxila em C-6 para a atividade antiproliferativa do composto $6\alpha,7\beta$ -hidroxivouacapan- $7\beta, 17\beta$ -lactona (**23**).

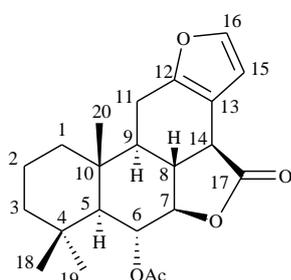
Figura 6 – Estrutura do furanoditerpeno ácido 6 α ,7 β -diidroxivouacapan-17 β -oico (**6**) e de suas lactonas derivadas.



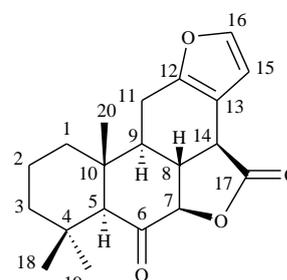
Ácido 6 α ,7 β -diidroxivouacapan-17 β -óico (**6**)



6 α -hidroxivouacapan-7 β -17 β -lactona (**23**)



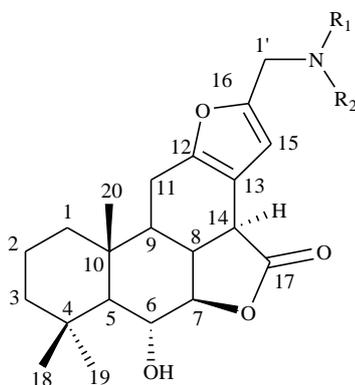
6 α -acetoxivouacapan-7 β -17 β -lactona (**24**)



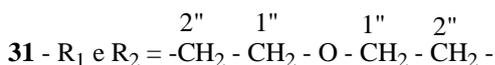
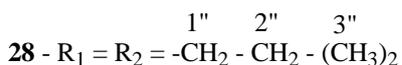
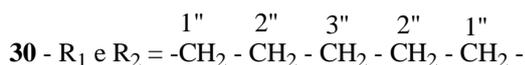
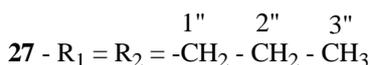
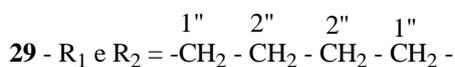
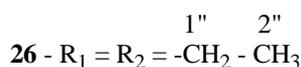
6-oxovouacapan-7 β -17 β -lactona (**25**)

Dando continuidade a este estudo, Euzébio et al. (2010) sintetizaram, a partir do derivado lactônico 6 α -hidroxivouacapan-7 β ,17 β -lactona (**23**), seis aminas (Figura 7): 16-(*N,N*-dietilamino) metileno-6 α -hidroxivouacapan-7 β ,17 β -lactona (**26**); 16-(*N,N*-dipropilamino) metileno-6 α -hidroxivouacapan-7 β ,17 β -lactona (**27**); 16-(*N,N*-diisobutilamino) metileno-6 α -hidroxivouacapan-7 β ,17 β -lactona (**28**); 16-(1-pirrolidino) metileno-6 α -hidroxivouacapan-7 β ,17 β -lactona (**29**); 16-(1-piperidino) metileno-6 α -hidroxivouacapan-7 β ,17 β -lactona (**30**); 16-(4-morfolino) metileno-6 α -hidroxivouacapan-7 β ,17 β -lactona (**31**), os quais foram submetidos a testes com as mesmas linhagens de células cancerígenas avaliadas por Euzébio et al. (2009). Os compostos foram mais potentes frente à maioria das linhagem de células cancerígenas avaliadas, apresentando valores de IC₅₀ inferiores aos obtidos para o 6 α -hidroxivouacapan-7 β ,17 β -lactona (**23**), no estudo de Euzébio et al. (2009). Os compostos **26-31** (Figura 7) foram tão potentes em inibir o crescimento de células cancerígenas de ovário resistente a adriamicina (NCI-ADR/RES), pulmão (NCI-H460) e leucemia eritromieloblastoide (K562), quanto a doxorrubicina (controle). Cálculos teóricos mostraram que os grupos amino em C-16 podem ser importantes para a atividade antiproliferativa dos derivados vouacapanos.

Figura 7 – Estrutura dos furanoditerpenos derivados do 6 α -hidroxivouacapan-7 β ,17 β -lactona (23).



26-31



Os frutos de sucupira têm sido utilizados pelas populações para o tratamento de infecções e inflamações. As propriedades farmacológicas dos frutos de *Pterodon* são frequentemente associadas a presença de diterpenos vouacapanicos (OLIVEIRA et al., 2017b). Os estudos realizados até à data ainda representam uma avaliação parcial das atividades antimicrobiana e anti-inflamatória dos vouacapanos de *Pterodon*. Neste sentido, novas pesquisas devem ser realizadas com vouacapanos de *Pterodon*, visando avaliar o seu potencial antimicrobiano frente a um maior número de cepas e anti-inflamatório empregando metodologias *in vitro*, a fim de se determinar seus possíveis mecanismos de ação.

2.7 Atividade antimicrobiana

As doenças infecciosas representam uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo, particularmente nos países em desenvolvimento (SILVA, FERNANDES JÚNIOR, 2010). O controle de doenças infecciosas está ameaçado devido ao aumento no número de microrganismos patogênicos resistentes aos antimicrobianos convencionais (OKEKE et al., 2005; LAXMINARAYAN et al., 2013). De acordo com a

Organização Mundial da Saúde (OMS), o paciente que apresenta infecções resistentes tem um custo muito maior para a Saúde Pública que aquele com infecções não resistentes, devido à maior duração do agravo, necessidade de testes adicionais e o uso de fármacos mais caros (WHO, 2018).

Além disso, muitos antifúngicos e antibacterianos disponíveis causam efeitos colaterais indesejáveis ou são citotóxicos (TERMENTZI et al., 2011). Portanto, faz-se necessário a descoberta de novos agentes antimicrobianos para tratar ou controlar doenças infecciosas.

As plantas são uma importante fonte de substâncias ativas para o tratamento de muitas enfermidades (DAVID; WOLFENDER; DIAS, 2015). Espécies vegetais dos biomas brasileiros são utilizadas pelas populações para tratar diversas doenças, incluindo infecções bacterianas e fúngicas (BASTOS et al., 2011). As propriedades antimicrobianas das plantas são atribuídas a presença de metabólitos secundários, incluindo fenóis, alcaloides, flavonoides e terpenóides (CHANDRA et al., 2017). Deste modo, a pesquisa com plantas medicinais ou metabólitos secundários derivados das mesmas pode fornecer dados para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas às infecções microbianas.

Existem vários métodos para determinar a atividade antimicrobiana de derivados vegetais. Os mais conhecidos incluem método de difusão em ágar, método de macrodiluição e microdiluição (OSTROSKY et al., 2008). Para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM), vários estudos tem utilizado o método de microdiluição em placas, seguindo as normas descritas pelo *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI, 2012) (GARZON et al., 2015; KOOLEN et al., 2013; MANETTI et al., 2010; PARAGINSKI et al., 2014).

2.8 Atividade anti-inflamatória

A inflamação é um mecanismo de defesa de organismos superiores em resposta a lesões teciduais, produtos químicos nocivos ou patógenos, para erradicar os agentes patogênicos invasores e remover substâncias irritantes (KUMAR et al., 2007; AHMED, 2011). No entanto, uma resposta inflamatória excessiva pode causar lesão no tecido do hospedeiro, inflamação crônica, doenças crônicas (MEDZHITOV, 2010; AZAB et al., 2016) e transformação neoplásica (MANTOVANI et al., 2008).

A exposição de células pró-inflamatórias, como macrófagos e monócitos, a estímulos imunológicos resulta na ativação, produção e liberação de diversos mediadores moleculares que iniciam o processo inflamatório (ELSAYED et al., 2014; AZAB et al., 2016). Essas substâncias induzem a vasodilatação, promovem aumento da permeabilidade microvascular e auxiliam no

recrutamento de neutrófilos ao local de inflamação (SCHIMMEL et al., 2016). Porém, a superprodução de mediadores inflamatórios pode resultar em danos celulares e doenças inflamatórias (ELSAYED et al., 2014).

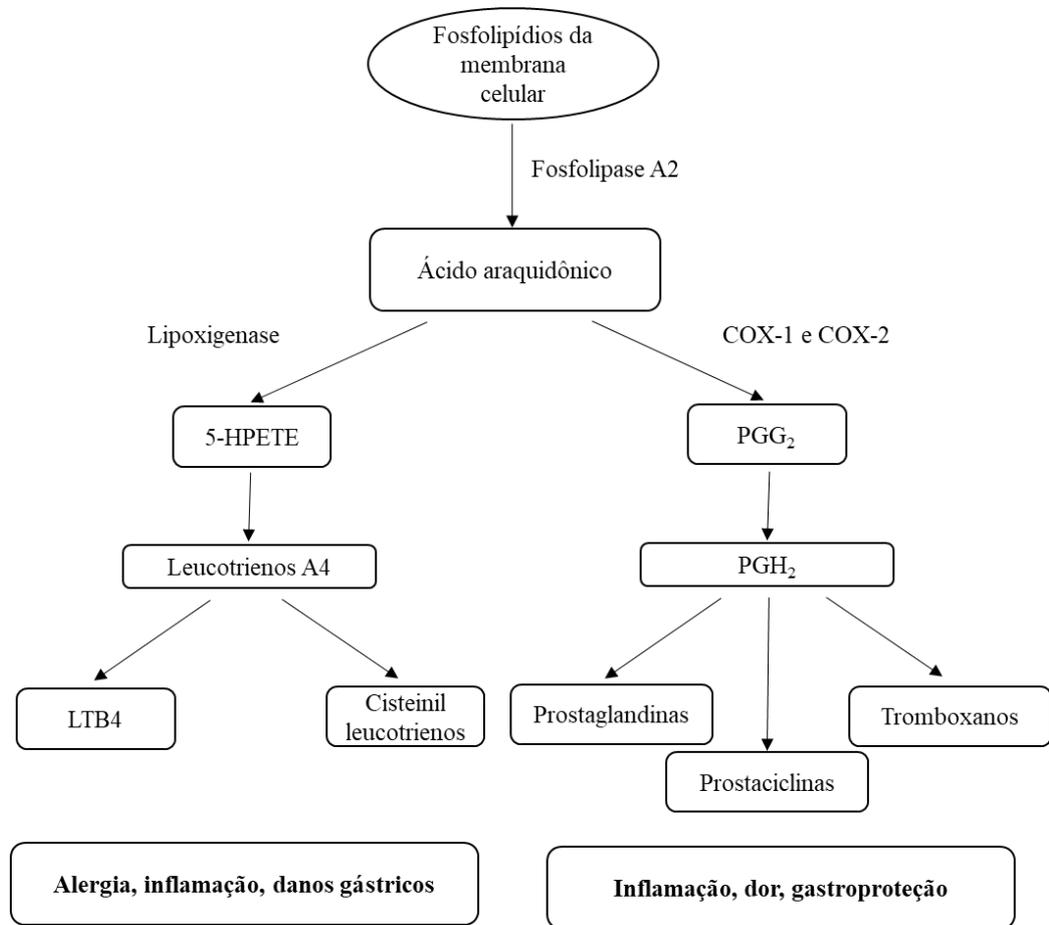
Dentre os mediadores inflamatórios e vias celulares que têm sido estudados em associação com processos fisiopatológicos destacam-se o fator de transcrição nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$), as citocinas (interferons, interleucinas e fator de necrose tumoral alfa) e os eicosanoides (prostaglandinas e leucotrienos) (AZAB et al., 2016). O NF- $\kappa\beta$ regula a expressão de diversos genes que codificam as enzimas óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e cicloxigenase-2 (COX2) e as citocinas fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina 1 β (IL-1 β) e interleucina 6 (IL-6), que estão envolvidas na patogênese das doenças inflamatórias (BHARTI; AGGARWAL, 2002; MAKAROV, 2000).

Citocinas são proteínas de baixo peso molecular secretadas por diferentes tipos de células que medeiam as interações e comunicações entre as células (ZHANG; NA, 2007). As citocinas incluem as interleucinas (ILs), interferons (IFNs), fatores de crescimento, fatores estimuladores de colônia, fatores de necrose tumoral (TNFs) e quimiocinas (citocinas quimiotáticas) (LOMBARDI; ROOME; CHRIST, 2013). As citocinas desempenham diversas funções no organismo, como mediação e regulação da imunidade, inflamação e hematopoiese, e estão envolvidas na proliferação e diferenciação de células (TAYAL; KALRA, 2008).

Eicosanoides são uma classe de moléculas derivadas de ácidos graxos poliinsaturados de 20 carbonos (NORMAN; HERNRY, 2015). O ácido araquidônico é o principal precursor na biossíntese de eicosanoides (Figura 8) (MEIRER et al., 2014). Ele é derivado de fosfolípidios da bicamada lipídica da membrana celular por meio da ação de fosfolipases (GEORGE et al., 2014; ZARGHI; ARFAEI, 2011).

As cicloxigenases convertem o ácido araquidônico em prostaglandina H₂ (PGH₂) que, por sua vez, é transformada em uma série de produtos finais como prostaglandinas, tromboxanos e prostaciclina (PELLETIER et al., 2003; SMITH et al., 2000). As lipoxigenases catalisam a formação de ácidos hidroxieicosatetraenóicos do ácido araquidônico (5-HPETE), levando à formação de leucotrienos e outros compostos biologicamente ativos (FREIRE; VAN DYKE, 2013).

Figura 8 - Metabólitos e enzimas do metabolismo do ácido araquidônico envolvidos no processo inflamatório.



Fonte: Pelletier et al., 2003.

Duas isoformas das COX têm sido bem caracterizadas: a COX-1, expressa de forma constitutiva na maioria dos tecidos, é responsável pela proteção da mucosa gástrica, agregação plaquetária, fluxo sanguíneo renal e homeostase vascular (LEE et al., 2003); enquanto a COX-2, cuja expressão é induzida em resposta a estímulos inflamatórios, é a principal fonte de eicosanoides nos processos inflamatórios (SMYTH et al., 2009). Alguns estudos têm demonstrado a existência de uma terceira isoforma, a COX-3, uma variante da COX-1, distribuída principalmente no córtex cerebral e no coração (CHANDRASEKHARAN et al., 2002; SHAFTEL et al., 2003).

As prostaglandinas são mediadores lipídicos que estão envolvidos em diversos processos fisiológicos e patológicos, incluindo vasodilatação ou vasoconstrição, contração ou relaxamento da musculatura brônquica ou uterina, aumento do fluxo sanguíneo renal, ovulação, diminuição da secreção ácida gástrica (NORMAN; HERNRY, 2015), agregação plaquetária, liberação de neurotransmissores, modulação da função imune, dentre outras (HARRIS et al.,

2002). A prostaglandina E₂ (PGE₂) é provavelmente a prostaglandina mais estudada em associação com condições fisiopatológicas e é responsável pelos sintomas inflamatórios como vermelhidão, edema e dor (AZAB et al., 2016; MEIRER et al., 2014). Alterações na atividade da PGE₂ estão relacionadas com doenças inflamatórias, alterações anormais na temperatura corporal, câncer colorretal, dentre outras (AZAB et al., 2016).

A prostaciclina (prostaglandina I₂) e o tromboxano A₂ (TXA₂) apresentam mecanismos reguladores opostos no sistema cardiovascular (LI et al., 2017). A prostaciclina atua no sistema cardiovascular, promovendo o relaxamento da musculatura lisa vascular e inibindo a agregação plaquetária (STITHAM et al., 2011). O tromboxano A₂ (TXA₂), principal produto do metabolismo do ácido araquidônico em plaquetas, é um potente vasoconstritor e um estimulador da agregação plaquetária (KOLTAI et al., 2017).

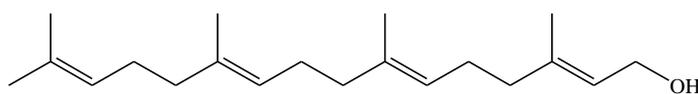
Os leucotrienos são mediadores lipídicos envolvidos na patogênese do processo inflamatório. São divididos em dois grupos: leucotrieno B₄ (LTB₄) e cisteinil leucotrienos (LTC₄, LTD₄, LTE₄), respectivamente (HOXHA, 2018). O leucotrieno B₄ (LTB₄) atua como um potente regulador da quimiotaxia dos neutrófilos e na adesão dos leucócitos às células endoteliais. Os cisteinil leucotrienos participam em reações de hipersensibilidade imediata e são potentes constritores da musculatura lisa dos brônquios (FUNK, 2001; MEIRER et al., 2014). Além disso, os cisteinil leucotrienos podem induzir danos na mucosa gástrica (PELLETIER et al., 2003).

Os corticosteroides e os anti-inflamatórios não esteroidais constituem as terapêuticas mais eficazes para diversas condições inflamatórias. Contudo, a eficácia e a tolerabilidade desses fármacos podem ser questionadas devido aos efeitos adversos indesejados provocados por seus usos (HARIRFOROOSH et al., 2013; MAIONE et al., 2016) e à resistência a esteroides em grande número de pacientes (BARNES et al., 2006; ADCOCK; BARNES, 2008). Sendo assim, faz-se necessária a descoberta de agentes anti-inflamatórios mais eficazes para complementar ou substituir as terapias atuais.

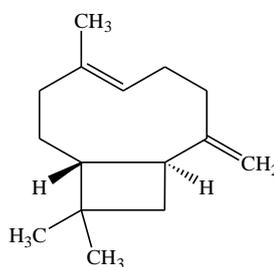
3 JUSTIFICATIVA

Entre os estudos desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa estão incluídos a obtenção de extrato seco padronizado dos frutos de sucupira (OLIVEIRA, 2012), a avaliação de atividades biológicas de extratos obtidos das cascas do caule de sucupira (MORAES, 2009; BUSTAMANTE, 2010) e estudos da variabilidade química do óleo essencial dos frutos de sucupira (ALVES et al., 2013). Além disso, em estudo realizado por Oliveira (2014) foram isolados dois novos furanoditerpenos de frutos de *Pterodon emarginatus*: 6 α ,19 β -diacetoxi-7 β ,14 β -diidroxivouacapano (**20**) e 6 α -acetoxi-7 β ,14 β -diidroxivouacapano (**21**), além do composto 6 α -acetoxi-7 β -hidroxivouacapan-17 β -oato de metila (**11**), já descrito na literatura. Foi avaliada a atividade *in vitro* do 6 α -acetoxi-7 β -hidroxivouacapan-17 β -oato de metila (**11**) sobre as formas promastigotas das espécies *Leishmania braziliensis* e *L. amazonensis* e epimastigota do parasita *T. cruzi*. O 6 α -acetoxi-7 β -hidroxivouacapan-17 β -oato de metila (**11**) apresentou EC₅₀ < 30 μ g/mL, em todos os ensaios realizados. Neste estudo, também foram identificados na oleorresina o 6 α , 7 β -diidroxivouacapan-17 β -oato de metila (**7**) o geranilgeraniol (**32**) e o β -cariofileno (**33**) (Figura 9).

Figura 9 – Estrutura dos diterpenos geranilgeraniol (**32**) β -cariofileno (**33**).



geranylgeraniol (**32**)



β -cariofileno (**33**)

Diversas atividades biológicas têm sido relatadas para o diterpeno vouacapânico **7**, como a atividade larvicida sobre *Aedes aegypti*, antiproliferativa contra as linhagens de células tumorais humanas e antinociceptiva (OMENA et al., 2006; SPINDOLA et al., 2009;

SPINDOLA et al., 2010). Estudos conduzidos com o diterpeno linear geranilgeraniol, isolado dos frutos de sucupira, demonstraram atividade antinociceptiva (SPINDOLA et al., 2010), antiplaquetária (CALIXTO et al., 2007) e antitripanossomicida (BARRETO et al., 2008). O sesquiterpeno β -cariofileno (**33**), composto majoritário no óleo essencial de sucupira (LEONHARDT et al., 2010), também está relacionado com atividades farmacológicas, tais como antimicrobiana (SABULAL et al., 2006), anti-inflamatória (DI SOTTO et al., 2010) e antitumoral (FERNANDES et al., 2007).

No estudo de Oliveira (2014) não foi possível obter os diterpenos $6\alpha,19\beta$ -diacetoxi- $7\beta,14\beta$ -diidroxivouacapano (**20**) e 6α -acetoxi- $7\beta,14\beta$ -diidroxivouacapano (**21**) (inéditos) em quantidade suficiente para avaliações de atividades biológicas. Novas pesquisas devem ser realizadas visando avaliar o potencial biológico destes compostos, uma vez que não há estudos na literatura consultada. Considerando o potencial dos vouacapanos de *Pterodon emarginatus* como agentes farmacológicos, é interessante o aprimoramento do método que possibilitou o isolamento dessas substâncias e as suas avaliações em atividades antimicrobiana e anti-inflamatória.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar as atividades antimicrobiana e anti-inflamatória de vouacapanos de *Pterodon emarginatus*.

4.2 Objetivos específicos

Obter perfis cromatográficos das oleorresinas obtidas dos frutos coletados nos municípios de Campestre e Bela Vista de Goiás (Estado de Goiás, Brasil).

Desenvolver metodologia por cromatografia em coluna para obtenção de fração enriquecida em diterpenos.

Desenvolver metodologia por CLAE analítico para monitorar o fracionamento cromatográfico.

Isolar diterpenos vouacapânicos presentes na oleorresina de *P. emarginatus* por CLAE semi-preparativa.

Caracterizar por técnicas espectrométricas a estrutura dos vouacapanos isolados.

Avaliar as seguintes atividades da oleorresina de *P. emarginatus* e de seus vouacapanos isolados:

- atividade antimicrobiana *in vitro* contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos;
- citotoxicidade frente às células HaCaT;
- atividade inibitória *in vitro* frente à fosfolipase A2;
- atividade inibitória *in vitro* na expressão de COX-2 e NRF2;
- atividade inibitória *in vitro* na produção de IL-6 e IL-8.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADCOCK, I. M.; BARNES, P. J. Molecular Mechanisms of Corticosteroid Resistance. **CHEST**, v.134, p.394-401, 2008.

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

AKETOMI, Y.; MILI, Y.; NISHITO, Y.; SAITO, M.; FUKAMI, K.; YAMAMOTO, K.; MURAKAMI, M. Group III phospholipase A2 promotes colitis and colorectal cancer. **Scientific Reports**, v.7, n.12261, p.1-13, 2017.

ALMEIDA, S.P.; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: Espécies vegetais úteis**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. 464 p.

ALVES, S. F. **Estudo da composição química, de atividades biológicas e microencapsulação do óleo essencial dos frutos de *Pterodon emarginatus* Vogel – Fabaceae (“sucupira”)**. 2012. 198 f. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.

ALVES, S. F.; BORGES, L. L.; PAULA, J. A. M.; VIEIRA, R. F.; FERRI, P. H.; COUTO, R. O.; PAULA, J. R.; BARA, M. T. F. Chemical variability of the essential oils from fruits of *Pterodon emarginatus* in the Brazilian Cerrado. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.23, n.2, p.224-229, 2013.

ARRIAGA, A. M. C.; CASTRO, M. A. B.; SILVEIRA, E. R.; BRAZ-FILHO, R. Further Diterpenoids Isolated from *Pterodon polygalaeiflorus*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.11, n.2, p.187-190, 2000.

ATANASOV, A. G.; WALTENBERGER, B.; WENZING, E. M. P.; LINDER, T.; WAWROSCHE, C.; UHRIN, P.; TEMML, V.; WANG, L.; SCHWAIGER, S.; HEISS, E. H.; ROLLINGER, J. M.; SCHUSTER, D.; BREUSS, J. M.; BOCHKOV, V.; MIHOVILOVIC, M. D.; KOPP, D.; BAUER, R.; DIRSCH, V. M.; STUPPNER, H. Discovery and resupply of pharmacologically active plant derived natural products: a review. **Biotechnology Advances**, v.33, n.8, p.1582-1614, 2015.

AZAB, A.; NASSAR, A.; AZAB, A. N. Anti-inflammatory activity of natural products. **Molecules**, v. 21, n.10, p. 1-19, 2016.

BARNES, P. J. How corticosteroids control inflammation: Quintiles Prize Lecture 2005. **British Journal of Pharmacology**, v.148, p.245-254, 2006.

BARRETO, R. F. S. M.; LARANJA, G. A. T.; SILVA, M. C. C.; COELHO, M. G. P.; PAES, M. C.; OLIVEIRA, M. M.; CASTRO, S. L. Anti-Trypanosoma cruzi activity of *Pterodon pubescens* seed oil: geranylgeraniol as the major bioactive component. **Parasitology research**, v. 103, n. 1, p. 111-117, 2008.

BASTOS, G. M.; NOGUEIRA, N. A. P.; SOARES, C. L.; MARTINS, M. R.; ROCHA, L. Q.; TEIXEIRA, A. B. In vitro determination of the antimicrobial potential of homemade

preparations based on medicinal plants used to treat infectious diseases. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.32, n.1, p.113-120, 2011.

BHARTI, A. C.; AGGARWAL, B. B. Nuclear factor-kappa B and cancer: its role in prevention and therapy. **Biochemical Pharmacology**, v.64, p.883-888, 2002.

BELINELO, V. J.; REIS, G. T.; STEFANI, G. M.; FERREIRA-ALVES, D. L.; PILÓ-VELOSO, D. Derivatives and its activities on the electrically stimulated guinea-pig ileum preparation. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.13, n.6, p.830-837, 2002.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente- MMA e Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA. Monitoramento do desmatamento nos biomas brasileiros por satélite. Acordo de cooperação técnica MMA/IBAMA. **Monitoramento do bioma Cerrado 2009-2010**. Brasília: Centro de informação, documentação ambiental e editoração Luís Eduardo Magalhães – CID Ambiental, 2011. 65p.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. O Bioma Cerrado. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>>. Acesso em: 15 de jan. 2018.

BRAZ FILHO, R.; GOTTLIEB, O. R.; ASSUMPÇÃO, R. M. V. The isoflavones of *Pterodon pubescens*. **Phytochemistry**, v.10, p.2835-2836, 1971.

BUSTAMANTE, K. G. L.; LIMA, A. D. F.; SOARES, M. L.; FIUZA, T. S.; TRESVENZOL, L. M. F.; BARA, M. T. F.; PIMENTA, F. C.; PAULA, J. R. Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato etanólico bruto da casca da sucupira branca (*Pterodon emarginatus* Vogel) - Fabaceae. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, p. 341-345, 2010.

CABRAL, E. C.; SERVAT, L.; SPINDOLA, H. M.; COELHO, M. B.; SOUSA, I. M. O.; QUEIROZ, N. C. A.; FOGGIO, M. A.; EBERLIN, M. N. RIVEROS, J. M. *Pterodon pubescens* oil: characterisation, certification of origin and quality control via mass spectrometry fingerprinting analysis. **Phytochemical analysis**, v.24, n.2, p.184-192, 2013.

CALIXTO, N.O.; COSTA E SILVA, M.C.; GAYER, C.R.; COELHO, M.G.; PAES, M.C.; TODESCHINI, A.R. Antiplatelet activity of geranylgeraniol isolated from *Pterodon pubescens* fruit oil is mediated by inhibition of cyclooxygenase-1. **Planta Medica**, v.73, n.5, p.480-483, 2007.

CAMPOS, A. M.; SILVEIRA, E. R.; BRAZ-FILHO, R.; TEIXEIRA, T. C. Diterpenoids from *Pterodon polygalaeflorus*. **Phytochemistry**, v.36, n.2, p.403-406, 1994.

CARVALHO, J. C. T.; SERTIÉ, J. A. A.; BARBOSA, M. V. J.; PATRÍCIO, K. C. M.; CAPUTO, L. R. G.; SARTI, S. J.; FERREIRA, L. P.; BASTOS, J. K. Anti-inflammatory activity of the crude extract from the fruits of *Pterodon emarginatus* Vog. **Journal of Ethnopharmacology**, v.64, p.127-133, 1999.

CASTELO-BRANCO, P. A.; DOS SANTOS, F. J. L.; RUBINGER, M. M. M.; FERREIRA-ALVES, D. L.; PILÓ-VELOSO, D.; KING-DÍAZ, B. LOTINA-HENNSSEN, B. Inhibition and uncoupling of photosynthetic electron transport by diterpene lactone amide derivatives. **Journal of Biosciences**, v.63, n.3-4, p.251-259, 2008.

CHAKOTIYA, A. S.; CHAWLA, R.; THAKUR, P.; TANWAR, A.; NARULA, A.; GROVER, S. S.; GOEL, R.; ARORA, R.; SHARMA, R. K. In vitro bactericidal activity of promising nutraceuticals for targeting multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Nutrition**, v.32, p.890-897, 2016.

CHANDRA, H.; BISHNOI, P.; YADAV, A.; PATNI, B.; MISHRA, A. P.; NAUTIYAL, A. R. Antimicrobial resistance and the alternative resources with special emphasis on plant-based antimicrobial – a review. **Plants**, v.6, n.16, p.1-11, 2017.

CHANDRASEKHARAN, N. V.; DAI, H.; ROOS, K. L. T.; EVANSON, N. K.; TOMSIK, J.; ELTON, T. S.; SIMMONS, D. L. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/ antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n.21, p.13926–13931, 2002.

CHATTERJEE, M.; ANJU, C. P.; BISWAS, L.; KUMAR, V. A.; MOHAN, C. G.; BISWAS, R. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and alternative therapeutic options. **International Journal of Medical Microbiology**, v.306, p.48-58, 2016.

CHEN, R.; LOWE, L.; WILSON, J. D.; CROWTHER, E.; TZEGGAI, K.; BISHOP, J. E.; VARRO, R. Simultaneous quantification of six human cytokines in a single sample using microparticle-based flow cytometric technology. **Clinical Chemistry**, v.45, n.9, 1999.

CHENG, S. S.; CHANG, H. T.; CHANG, S. T.; TSAI, K. H.; CHEN, W. J. Bioactivity of selected plant essential oils against the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* larvae. **Bioresource Technology**, v.89, p.99-102, 2003.

CLSI - Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. 3th ed. Approved Standard M27-A3. CLSI: Wayne, 2008.

CLSI - Clinical Laboratory Standards Institute; Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, 9th ed., Document M07-A9. CLSI: Wayne, 2012.

COELHO, L. P.; REIS, P. A.; CASTRO, F. L.; GAYER, C. R. M.; LOPES, C. S.; SILVA, M. C. C.; SABINO, K. C. C.; TODESCHINI, A. R.; COELHO, M. G. P. Antinociceptive properties of ethanolic extract and fractions of *Pterodon pubescens* Benth. seeds. **Journal of Ethnopharmacology**, v.98, p.109-116, 2005.

COELHO, M. G. P.; SABINO, K. C. C.; DALMAU, S. R. Immunomodulatory effects of sucupira (*Pterodon pubescens*) seed infusion on collagen-induced arthritis. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v.22, p.213-218, 2004.

CORRÊA MP 1975. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, Rio de Janeiro, 153 p.

DAVID, B.; WOLFENDER, J. L.; DIAS, D. A. The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. **Phytochemical Review**, v.14, p.299-315, 2015.

DEMUNER, A. J.; BARBOSA, L. C. A.; PILÓ-VELOSO, D.; FERREIRA-ALVES, L. D.; HOWARTH, O. W. Structure and plant growth regulatory activity of new diterpenes from *Pterodon polygalaeiflorus*. **Journal of Natural Products**, v. 59, n. 8, p.770-772, 1996.

DENNIS, E. A.; CAO, J.; HSU, Y. H.; MAGRIOTI, V.; KOKOTOS, G. Phospholipase A₂ enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. **Chemical Reviews**, v.11, n.10, p.6130-6185, 2011.

DEWICK, M.P. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. John Wiley & Sons, New York, 2002.

DETTMER, K.; ARONOV, P. A.; HAMMOCK, B. D. Mass Spectrometry-Based Metabolomics. **Mass Spectrometry Reviews**, v.26, p.51-78, 2007.

DI SOTTO, A.; MAZZANTI, G.; CARBONE, F.; HRELIA, P.; MAFFEI, F. Inhibition by beta-caryophyllene of ethyl methanesulfonate-induced clastogenicity in cultured human lymphocytes. **Mutation research**, v.699, p.23-28, 2010.

DUARTE, I. D. G.; FERREIRA-ALVES, D. L.; NAKAMURA-CRAIG, M. Possible participation of endogenous opioid peptides on the mechanism involved in analgesia induced by vouacapano. **Life Sciences**, v. 50, n.12, p.891-897, 1992.

DUARTE, I. D. G.; FERREIRA-ALVES, D. L.; PILÓ-VELOSO, D.; NAKAMURA-CRAIG, M. Evidence of the involvement of biogenic amines in the antinociceptive effect of a vouacapan extracted from *Pterodon polygalaeiflorus* Benth. **Journal of Ethnopharmacology**, v.55, n.1, p.13-18, 1996.

DUTRA, R. C.; BRAGA, F. G.; COIMBRA, E. S.; SILVA, A. D.; BARBOSA, N. R. Atividade antimicrobiana e leishmanicida das sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.19, p.429-435, 2009.

DUTRA, R. C.; LEITE, M. N.; BARBOSA, N. R. Quantification of phenolic constituents and antioxidant activity of *Pterodon emarginatus* Vogel seeds. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, p.606-614, 2008.

ELSAYED, E. A.; ENSHASY, H. E.; WADAAN, M. A. M.; AZIZ, R. Mushrooms: a potential natural source of anti-inflammatory compounds for medical applications. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, p. 1-15, 2014.

EUZEBIO, F. P. G.; SANTOS, F. J. L.; PILÓ-VELOSO, D.; ALCÂNTARA, A. F. C.; RUIZ, A. L. T. G.; CARVALHO, J. E.; FOGGIO, M. A.; FERREIRA-ALVES, D. L.; FÁTIMA, A. Synthesis, antiproliferative activity in cancer cells and theoretical studies of novel 6 α ,7 β -dihydroxyvouacapan-17 β -oic acid Mannich base derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v.18, n.23, p.8172-8177, 2010.

EUZÉBIO, F. P. G.; SANTOS, F. J. L.; PILÓ-VELOSO, D.; RUIZ, A. L. T. G.; CARVALHO, J. E.; FERREIRA-ALVES, D. L.; FÁTIMA, A. Effect of 6 α ,7 β -dihydroxyvouacapan-17 β -oic acid and its lactone derivatives on the growth of human cancer cells. **Bioorganic Chemistry**, v.37, n.3, p.96-100, 2009.

FAGG, C. W.; LUGHADHA, E. N.; MILLIKEN, W.; HIND, D. J. N.; BRANDÃO, M. G. L. Useful Brazilian plants listed in the manuscripts and publications of the Scottish medic and naturalist George Gardner (1812-1849). **Journal of Ethnopharmacology**, v.161, p.18-19, 2015.

FASCIO, M.; MORS, W. B.; GILBERT, B.; MAHAJAN, J. R.; MONTEIRO, M. B.; SANTOS FILHO, D.; VICHNEWSKI, W. Diterpenoid furans from *Pterodon* species. **Phytochemistry**, v.15, p.201-203, 1976.

FERNANDES, E. S.; PASSOS, G. F.; MEDEIROS, R.; CUNHA, F. M.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M. M.; PIANOWSKI, L. F.; CALIXTO, J. B. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-) – transcaryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **European Journal of Pharmacology**, v.569, n.3, p.228-236, 2007.

FREIRE M. O.; VAN DYKE, T.E. Natural resolution of inflammation. **Periodontology 2000**, v.63, n.1, p.149-164, 2013.

FUNK, C. D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. **Science**, v.294, p.1871-1875, 2001.

GABAY, C. Interleukin-6 and chronic inflammation. **Arthritis Research & Therapy**, v.8, p.1-6, 2006.

GALCERAN, C. B.; SERTIE, J. A. A.; LIMA, C. S.; CARVALHO, J. C. T. Anti-inflammatory and analgesic effects of 6 α ,7 β -dihydroxyvouacapan-17 β -oic acid isolated from *Pterodon emarginatus* Vog. fruits. **Inflammopharmacology**, v.19, n.3, p.139-143, 2011.

GANEM, R. S. (Org.) **Conservação da biodiversidade**: Legislação e Políticas Públicas. Brasília, Câmara dos Deputados, 2010. 437 p.

GAO, T.; YAO, H.; SONG, J.; LIU, C.; ZHU, Y.; MA, X.; PANG, X.; XU, H.; CHEN, S. Identification of medicinal plants in the family Fabaceae using a potential DNA barcode ITS2. **Journal of Ethnopharmacology**, v.130, n.1, p.116-121, 2010.

GARCÍA, P. A.; OLIVEIRA, A. B.; BATISTA, R. Occurrence, Biological Activities and Synthesis of Kaurane Diterpenes and their Glycosides. **Molecules**, v.12, p.455-483, 2007.

GARZON, L. R.; NUNES, M. S.; MARTINI, R.; RAMPELOTTO, R. F.; HÖRNER, R.; LOCATELLI, A.; HÖRNER, M. Complexos triazenidos de platina (II): Avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana e citotóxica frente a bactérias e células de medula óssea de pacientes leucêmicos de um hospital escola. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.36, n.2, p.285-291, 2015.

GEORGE, A.; CHINNAPPAN, S.; CHINTAMANENI, M.; KOTAK, V. C.; CHOUDHARY, Y.; KUEPER, T.; RADHAKRISHNAN, A. K. Anti-inflammatory effects of *Polygonum minus* (Huds) extract (LineminusTM) in in-vitro enzyme assays and carrageenan induced paw edema. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.14, p.1-7, 2014.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, p.374–381, 2007.

GRANDI, T. S. M.; TRINDADE, J. A.; PINTO, M. J. F.; FERREIRA, L. L.; CATELLA, A. C. Plantas Mediciniais de Minas Gerais, Brasil. **Acta botânica brasílica**, v.3, n.2, p.185-224, 1989.

GSPC, The Plant List Version 1.1, Global Strategy Plant Conservation, <http://www.theplantlist.org>, 2013.

HAMBURGER, M., HOSTETTMANN, K., 1991. **Bioactivity in plants**: the link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry*, v.30, p.3864-3874.

HANSEN, D.; HARAGUCHI, M.; ALONSO, A. Pharmaceutical properties of “sucupira” (*Pterodon* spp). **Brasilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.46, n.4, p.607-616, 2010.

HANSON, J. R. Diterpenoids. **Natural Products Reports.**, v.12, p.207, 1995.

HARIRFOROOSH, S.; ASGHAR, W.; JAMALI, F. Adverse effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs: an update of gastrointestinal, cardiovascular and renal complications. **Journal of Pharmaceutical Science**, v.16, p.821-847, 2013.

HARIZI. Epigenetic Regulations of Inflammatory Cyclooxygenase-Derived Prostanoids: Molecular Basis and Pathophysiological Consequences. **Mediators of Inflammation**, v.2015, p.1-9, 2015.

HARRIS, S. G.; PADILLA, J.; KOUMAS, L.; RAY, D.; PHIPPS, R. P. Prostaglandins as modulators of immunity. **Trends in Immunology**, v.23, n.3, p.144-150, 2002.

HE, FANG.; LINDQVIST, C.; HARDING, W. W. Leonurenones A – C: Labdane diterpenes from *Leonotis leonurus*. **Phytochemistry**, v.83, p.168-172, 2012.

HIRSCH, E.; TAM, V. H. Impact of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection on patient outcomes. **Expert Ver Pharmacoecon Outcomes Res.** V.10, n.4, p.441-451, 2010.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.** v. 97, p. 1027-1031, 2002.

HOSCHEID, J.; BERSANI-AMADO, C. A.; ROCHA, B. A.; OUTUKI, P. M.; SILVA, M. A. R. C. P.; FROEHLICH, D. L.; CARDOSO, M. L. C. Inhibitory effect of the hexane fraction of the ethanolic extract of the fruits of *Pterodon pubescens* Benth in acute and chronic inflammation. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p.1-7, 2013.

HOSCHEID, J.; REINAS, A.; CORTEZ, D. A. G.; COSTA, W. F.; CARDOSO, M. L. C. Determination by GC-MS-SIM of furanoditerpenes in *Pterodon pubescens* Benth.; Development and validation. **Talanta**, v.100, p.372-376, 2012.

HOSCHEID, J.; CARDOSO, M. L. C. Sucupira as a potential plant for arthritis treatment and other diseases. **Arthritis**, v.2015, p.1-12, 2015.

HOXHA, M. A systematic review on the role of eicosanoid pathways in rheumatoid arthritis. **Advanced in Medical Sciences**, v.63, p.22-29, 2018.

HURTADO, M. G.; ESQUIVEL, F. E. A.; GARCÍA, G. R.; PACHECO, M. M. M.; MADRIGAL, R. M. E.; BOLAÑOS, T. P.; HERNÁNDEZ, J. L. S.; GUTIÉRREZ, H. A. G.; ROJAS, C. M. C. G.; NATHAN, P. J.; RIO, R. E.. Cassane diterpenes from *Caesalpinia platyloba*. **Phytochemistry**, v.96, p.397-403, 2013.

JOHNSON, I.; SPENCE, M. T. Z. **The Molecular Probes Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies**. 11. ed . Life Technologies, 2010. 1060 p.

JIANG, R. W.; MA, S. C.; BUT, P. P. H.; MAK, C. W. Isolation and characterization of spirocaesalmin, a novel rearranged vouacapane diterpenoid from *Caesalpinia minax* Hance. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transaction 1**, n.22, p.2920-2923, 2001.

KING-DÍAZ, B.; CASTELO-BRANCO, P. A.; SANTOS, F. J. L.; RUBINGER, M. M. M.; FERREIRA-ALVES, D. L.; PILÓ-VELOSO, D.; LOTINA-HENNSEN, B. Furanoditerpene ester and thiocarbonyldioxy derivatives inhibit photosynthesis. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.96, n.3, p.119-126, 2010.

KING-DÍAZ, B.; PÉREZ-REYES, A.; SANTOS, F. J. L.; FERREIRA-ALVES, D. L.; PILÓ-VELOSO, D.; CARVAJAL, S. U.; LOTINA-HENNSEN, B. Natural diterpene β -lactone derivative as photosystem II inhibitor on spinach chloroplasts. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.84, n.2, p.109-115, 2006a.

KING-DÍAZ, B.; SANTOS, F. J. L.; RUBINGER, M. M. M.; PILÓ-VELOSO, D.; LOTINA-HENNSEN, B. A diterpene γ -lactone derivative from *Pterodon polygalaeiflorus* Benth. as a photosystem II inhibitor and uncoupler of photosynthesis. **Zeitschrift fur Naturforschung – Section C Journal of Biosciences**, v. 61, n.3-4, p.227-233, 2006b.

KOBAYASHI, E. H.; SUZUKI, T.; FUNAYAMA, R.; NAGASHIMA, T.; HAYASHI, M.; SEKINE, H.; TANAKA, N.; MORIGUCHI, T.; MOTOHASHI, H.; NAKAYAMA, K.; YAMAMOTO, M. Nrf2 supresses macrophage inflammatory response by blocking proinflammatory cytokine transcription. **Nature communications**, v.7, n.11624, p.1-14, 2016.

KOOLEN, H. H. F.; SILVA, F. M. A.; GOZZO, F. C.; SOUZA, A. Q. L.; SOUZA, A. D. L.; Antioxidant, antimicrobial activities and characterization of phenolic compounds from buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.) by UPLC-ESI-MS/MS. **Food Research International**, v.51, p.467-473, 2013.

KOLTAI, K.; KESMARKY, G.; FEHER, G.; TIBOLD, A.; TOTH, K. Platelet Aggregometry testing: molecular mechanisms, techniques and clinical implications. **International Journal of Molecular Sciences**, v.18, p.1-21, 2017.

KUDO, I.; MURAKAMI, M. Phospholipase A2 enzymes. **Prostaglandins & other Lipid Mediators**, v.68-69, p.3-58, 2002.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N.; MITCHELL, R.N. **Robbins Basic Pathology**, 8 ed. Elsevier Saunders, 2007.

LAXMINARAYAN, R.; DUSE, A.; WATTAL, C.; ZAIDI, A. K. M.; WERTHEIM, H. F. L.; SUMPRADIT, N.; VLIEGHE, E.; HARA, G. L.; GOULD, I. M.; GOOSSENS, H.; GREKO, C.; SO, A. D.; BIGDELI, M.; TOMSON, G.; WOODHOUSE, W.; OMBAKA, E.; PERALTA, A. Q.; QAMAR, F. N.; MIR, F.; KARIUKI, S.; BHUTTA, Z. A.; COATES, A.; BERGSTROM, R.; WRIGHT, G. D.; BROWN, E. D.; CARS. Antibiotic resistance – the need for global solutions. **The Lancet Infection Diseases Commission**, v.13, p.1057-1098, 2013.

LAMBERT, J. D.; YENNAWAR, N.; GU, Y.; ELIAS, R. J. Inhibition of secreted phospholipase A₂ by proanthocyanidins: a comparative enzymological and *in silico* modeling study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.60, n.30, p.7417-7420, 2012.

LEE, G.; BAE, H. Bee Venom phospholipase A₂: Yesterday's enemy becomes today's friend. **Toxins**, v.8, n.2, p.1-12, 2016.

LEE, J. L.; MUKHTAR, H.; BICKERS, D. R.; KOPELOVICH, L.; ATHAR, M. Cyclooxygenases in the skin: pharmacological and toxicological implications. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.192, p.294-306, 2003.

LEONHARDT, V.; LEAL-CARDOSO, J. H.; LAHLOU, S.; ALBUQUERQUE, A. A. C.; PORTO, R. S.; CELEDÔNIO, N. R.; OLIVEIRA, A. C.; PEREIRA, R. F.; SILVA, L. P.; GARCIA-TEÓFILO, T. M. N.; SILVA, A. P. F. S.; MAGALHÃES, P. J. C.; DUARTE, G. P.; COELHO DE SOUZA, A. N. Antispasmodic effects of essential oil *Pterodon polygalaeflorus* and its main constituent β -caryophyllene on rat isolated ileum. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v.24, n.6, p.749-758, 2010.

LI, Z.; ZHANG, Y.; LIU, B.; LUO, W.; LI, H.; ZHOU, Y. Role of E-type prostaglandin receptor EP3 in the vasoconstrictor activity evoked by prostacyclin in thromboxane-prostanoid receptor deficient mice. **Scientific Reports**, v.7, n.42167, 2017.

LI, M.; LIN, X. F.; LU, J.; ZHOU, B. R.; LUO, D. Hesperidin ameliorates UV radiation-induced skin damage by abrogation of oxidative stress and inflammation in HaCaT cells. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v.165, p.240-245, 2016.

LOMBARDI, R. V.; ROOME, B.; CHRIST, D. Molecular Engineering of Therapeutic Cytokines. **Antibodies**, v.2, p.426-451, 2013.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil Nativas e Exóticas**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002.

MA, Q. Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v.53, p.401-426, 2013.

MAIONE, F.; RUSSO, R.; KHAN, H.; MASCOLO, N. Medicinal plants with anti-inflammatory activities. **Natural Products Research**, v.30, n.12, p.1342-1352, 2016.

MAHAJAN, J. R.; MONTEIRO, M. B. New diterpenoids from *Pterodon emarginatus* Vog. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.42, n.520, p.520-525, 1973.

MAKAROV, S. NF-KB as therapeutic target in chronic inflammation: recent advances. **Molecular Medicine Today**, v.6, p.441-448, 2000.

MANETTI, L. M.; TURRA, A. F.; TAKEMURA, O. S.; SVIDZINSKI, T. I. E.; LAVERDE JUNIOR, A. Avaliação da atividade antimicrobiana, citotóxica, moluscicida e antioxidante de *Bromelia antiacantha* Bertol. (Bromeliaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.12, n.4, p.406-413, 2010.

MANTOVANI, A.; ALLAVENA, P.; SICA, A.; BALKWILL, F. Cancer – related inflammation. **Nature**, v. 454, p. 436-444, 2008.

MARQUES, D. D.; MACHADO, M. I. L.; CARVALHO, M. G.; MELEIRA, L. A.; BRAZ-FILHO, R. Isoflavonoids and triterpenoids isolated from *Pterodon polygalaeiflorus*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.9, n.3, p.295-301, 1998.

MARTINS, C. N.; MARTINS, D. F.; NASCIMENTO, L. F.; VENZKE, D.; OLIVEIRA, A. S.; FREDERICO, M. J. S.; SILVA, F. R. M. B.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G.; SANTOS, A. R. S. Ameliorative potential of standardized fruit extract of *Pterodon pubescens* Benth on neuropathic pain in mice: Evidence for the mechanism of action. **Journal of Ethnopharmacology**, v.175, p.273-286, 2015.

MATHEW, S. T.; DEVI, S. G.; PRASANTH, V. V.; VINOD, B. Efficacy and safety of COX-2 inhibitors in the clinical management of arthritis: mini review. **International Scholarly Research Network**, v. 2011, p.1-4, 2011.

MAURYA, R.; RAVI, M.; SINGH, S.; YADAV, P. P. A review on cassane and norcassane diterpenes and their pharmacological studies. **Fitoterapia**, v.83, p.272-280, 2012.

MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: New adventures of an old flame. **Cell**, v.140, n.6, p. 771-776, 2010.

MEIRER, K.; STEINHILBER, D.; PROSCHAK, E. Inhibitors of the Arachidonic acid cascade: Interfering with multiple pathways. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v.114, p.83-91, 2014.

MEYER, M. C.; RASTOGI, P.; BECKETT, C. S.; MCHOWAT, J. Phospholipase A₂ inhibitors as potential anti-inflammatory agents. **Current Pharmaceutical Design**, v.11, p.1301-1312, 2005.

MORAES, W. F.; GALDINO, P. M.; NASCIMENTO, M. V. M.; VANDERLINDE, F. A.; BARA, M. T. F.; COSTA, E. A.; PAULA, J. R. Triterpenes involved in the anti-inflammatory effect of ethanolic extract of *Pterodon emarginatus* Vogel stem bark. **Journal of Natural Medicines**, v.66, n.1, p.202-207, 2012.

MORAES, W. F. **Estudo fitoquímico e avaliação das atividades analgésica e antiinflamatória do extrato etanólico, frações e substância isolada das cascas de *Pterodon emarginatus* Vog.** (sucupira). Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2007.

MORAES, W.F.; MATOS, L. G.; NASCIMENTO, M. V.; PAULA, J. R.; BARA, M. T. F.; CUNHA, L. C.; VALADARES, M. C.; COSTA, E. A. Anti-inflammatory and antinociceptive

effects of *Pterodon emarginatus* stem bark alcohol extract. **Pharmaceutical Biology**, v. 47, p. 146-150, 2009.

MORGAN, E.; VARRO, R.; SEPULVEDA, H.; EMBER, J. A.; APGAR, J.; WILSON, J.; LOWE, L.; CHEN, R.; SHIVRAJ, L.; AGADIR, A.; CAMPOS, R.; ERNST, D.; GAUR, A. Cytometric bead array: a multiplexed assay platform with applications in various areas of biology. **Clinical Immunology**, v. 110, p.252-266, 2004.

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

NORMAN, A. W.; HENRY, H. L. **Hormones**. 3ed. London: Elsevier, 2015. 413 p.

NUCCI, C.; MAZZARDO-MARTINS, L.; STRAMOSK, J.; BRETANHA, L. C.; PIZZOLATTI, M. G.; SANTOS, A. R. S.; MARTINS, D. F. Oleaginous extract from the fruits *Pterodon pubescens* Benth induces antinociception in animal models of acute and chronic pain. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, n.1, p.170-178, 2012.

OKEKE, I. N.; LAXMINARAYAN, R.; BHUTTA, Z. A.; DUSE, A. G.; JENKINS, P.; BRIEN, T. F. O.; MENDEZ, A. P.; KLUGMAN, K. P. Antimicrobial resistance in developing countries. Part I: recent trends and current status. **The Lancet Infection Diseases**, v.5, p.481-493, 2005.

OLIVEIRA, L. A. R. **Isolamento, quantificação e avaliação das atividades leishmanicida e tripanocida de furanoditerpenos do óleo de *Pterodon* spp. Vogel (Fabaceae)**. 2014. 118 f. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014.

OLIVEIRA, L. A. R.; OLIVEIRA, G. A. R.; LEMES, G. F.; ROMÃO, W.; VAZ, B. G.; ALBUQUERQUE, S.; GONÇALEZ, C.; LIÃO, L. M.; BARA, M. T. F. Isolation and structural characterization of two new furanoditerpenes from *Pterodon emarginatus* (Fabaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.28, n.10, p.1911-1916, 2017a.

OLIVEIRA, L. A. R.; OLIVEIRA, G. A. R.; BORGES, L. L.; BARA, M. T. F.; SILVEIRA, D. Vouacapane diterpenoids isolated from *Pterodon* and their biological activities. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.27, n.5, p.663-672, 2017b.

OLIVEIRA, P. C.; CONCEIÇÃO, E. C.; OLIVEIRA, P. A.; NASCIMENTO, M. V.; COSTA, E. A.; PAULA, J. R.; BARA, M. T. F. Obtaining a Dry Extract of *Pterodon emarginatus* (Fabaceae) Fruits by Spray-Drying. **Journal of Pharmacy Research**, v.5, n.1, p.641-645, 2012.

OMENA, M. C.; BENTO, E. S.; PAULA, J. E.; SANT'ANA, A. E. G. Larvicidal diterpenes from *Pterodon polygalaeiflorus*. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v.6, n.2, p.216-222, 2006.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.2, p.301-307, 2008.

OU, K.; GU, L. Absorption and metabolism of proanthocyanidins. **Journal of functional foods**, v.7, p.43-53, 2014.

PARAGINSKI, G. L.; BERTICELL, C. R.; ZAMBIAZI, P. J.; PARAGINSKI, V. T. K.; HÖRNER, M.; SANTOS, A. J. R. W. A.; HÖRNER, R. Atividade antibacteriana *in vitro* e toxicidade frente à *Artemia salina* Leach. de alguns compostos triazenos. **Química Nova**, v.37, n.7, p.1138-1144, 2014.

PASCOA, H.; DINIZ, D. G. A.; FLORENTINO, I. F.; COSTA, E. A.; BARA, M. T. F. Microemulsion based on *Pterodon emarginatus* oil and its anti-inflammatory potential. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 51, p.117-126, 2015.

PAVARINI, D. P.; PAVARINI, S. P.; NIEHUES, M.; LOPES, N. P. Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. **Animal Feed Science and Technology**, v. 176, p. 5–16, 2012.

PELLETIER, J. M.; LAJEUNESSE, D.; REBOUL, P.; PELLETIER, J. P. Therapeutic role of dual inhibitors of 5-LOX and COX, selective and non-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Annals of the Rheumatoid Diseases**, v.62, p.501-509, 2003.

PEREIRA, M. F.; MARTINO, T.; DALMAU, S. R.; ALBANO, R. M.; FÉRÉZOU, J. P.; COSTA, S. S.; COELHO, M. G. P.; SABINO, K. C. C. Terpenic subfraction of *Pterodon pubescens* induces apoptosis of K562 leukemic cells by modulating gene expression. **Oncology reports**, v.25, p.215-221, 2011.

PEREIRA, M. F.; MARTINO, T.; DALMAU, S. R.; PAES, M. C.; FIDALGO, C. B.; ALBANO, R. M.; COELHO, M. G. P.; SABINO, K. C. C. Terpenic fraction of *Pterodon pubescens* inhibits nuclear factor kappa B and extracellular signal-regulated protein kinase 1/2 activation and deregulates gene expression in leukemia cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.12, p.231-239, 2012.

PETERS, R. J. Two rings in them all: the labdane-related diterpenoids. **Natural Product Research**, v.27, n.11, p.1521-1530, 2010.

PIGHINELLI, A. L. M. T.; PARK, K. J.; RAUEN, A. M.; BEVILAQUA, G.; FILHO, J. A. G. Otimização da prensagem a frio de grãos de amendoim em prensa contínua tipo expeller. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, p.66-71, 2008.

PIMENTA, A. T. A.; SANTIAGO, G. M. P.; ARRIAGA, A. M. C.; MENEZES, G. H. A.; BEZERRA, S. B. Estudo fitoquímico e avaliação da atividade larvicida de *Pterodon polygalaeflorus* Benth (Leguminosae) sobre *Aedes aegypti*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.16, n.4, p.501-505, 2006.

PIZZOLATTI, M. G.; CRISTIANO, R.; MONACHE, F. D.; BRANCO, A. Artefatos cumarínicos isolados de *Polygala paniculata* L. (Polygalaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 21-26, 2002.

QAZI, B. S.; TANG, K.; QAZI, A. Recent advances in underlying pathologies provide insight into interleukin-8 expression-mediated inflammation and angiogenesis. **International Journal of Inflammation**, v.2011, p.1-13, 2011.

QIN, J.; LI, H. M.; GAO, L. H.; LIU, D.; LI, R. T.; LEE, K. H. New labdane diterpenoids from *Leonurus japonicus* and their anti-inflammatory activity. **Phytochemistry Letters**, v.10, p.313-317, 2014.

QUACH, N. D.; ARNOLD, R. D.; CUMMINGS, B. S. **Biochemical Pharmacology**, v.90, n.4, p.338-348, 2014.

RAI, M; ACHARYA, D.; RIOS, J.L. **Ethnomedicinal plants: Revitalizing of Traditional Knowledge of Herbs**. New Hampshire: Science Publishers, 2011.

RAPOSO, N. R. B.; DUTRA, R. C.; FERREIRA, A. S. **Biological properties of sucupira branca (*Pterodon emarginatus*) seeds and their potential usage in health treatments**. In: PREEDY, V. R.; WATSON, R. R.; PATEL, V. B (Eds.), **Nuts & Seeds in Health and Disease Prevention**, Elsevier, New York, pp. 1087-1095, 2011.

RATTER, J.A.; RIBEIRO, J.F.; BRIDGEWATER, S. The Brazilian Cerrado Vegetation and Threats to its Biodiversity. **Annals of Botany**, v.80, p.223-230, 1997.

REIS, C. F.; ANDRADE, D. M. L.; NEVES, B. J.; OLIVEIRA, L. A. R.; PINHO, J. F.; SILVA, L. P.; CRUZ, J. S.; BARA, M. T. F.; ANDRADE, C. H.; ROCHA, M. L. Blocking the L-type Ca^{2+} channel ($Ca_v 1.2$) is the key mechanism for the vascular relaxing effect of *Pterodon* spp. and its isolated diterpene methyl-6 α -acetoxymethyl-7 β -hydroxyvouacapan-17 β -oate. **Pharmacological Research**, v.100, p.242-249, 2015.

RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G. A. Prostaglandins and Inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v.31, n.5, p. 986-1000, 2011.

ROQUE, F. P. **Atividade antimicrobiana in vitro da fração obtida do óleo de *Pterodon pubescens* contra *Candida* spp., *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* e biofilme de *Candida albicans***. 2013. 94 f. Dissertação (Mestre em Biologia Buco-Dental) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 2013.

ROQUE, F. P.; ANÍBAL, P. C.; BUSATO, S. N.; BONI, G. C.; HOFLING, J. F.; QUEIROZ, N. C. A.; FOGGIO, M. A. In vitro anti-fungal activity of a new compound isolated from *Pterodon pubescens* Benth. **Advancement in Medicinal Plant Research**, v.3, n.2, p.55-61, 2015.

RUBINGER, M. M. M.; CASTELO-BRANCO, P. A.; GUILARDI, S.; SOUZA, E. M. R.; GAMBARDELLA, M. T. P.; BORGES, E. E. L.; FERREIRA-ALVES, D. L.; PILÓ-VELOSO, D. Preparation, X-ray structural studies and plant growth regulatory activity of methyl 6 α ,7 β -Thiocarbonyldioxyvouacapan-17 β -oate. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.15, n.2, p.219-223, 2004.

SABINO, K. C. C.; CASTRO, F. A.; OLIVEIRA, J. C. R.; DALMAU, S. R. A.; COELHO, M. G. P. Successful treatment of collagen-induced arthritis in mice with a hydroalcohol extract of seeds of *Pterodon pubescens*. **Phytotherapy research**, v. 13, p.613-615, 1999.

SABULAL, B.; DAN, M.; J, A. J.; KURUP, R.; PRADEEP, N. S.; VALSAMMA, R. K.; GEORGE, V. Caryophyllene-rich rhizome oil of *Zingiber nimmonii* from South India: Chemical characterization and antimicrobial activity. **Phytochemistry**, v.67, n.22, p.2469-2473, 2006.

SANTOS, A. P.; ZATTA, D. T.; MORAES, W. F.; BARA, M. T. F.; FERRI, P. H.; SILVA, M. R. R.; PAULA, J. R. Composição química, atividade antimicrobiana do óleo essencial e ocorrência de esteroides nas folhas de *Pterodon emarginatus* Vogel, Fabaceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n.6, p.891-896, 2010.

SANTOS, F. J. L.; ALCÂNTARA, A. F. C.; FERREIRA-ALVES, D. L.; PILÓ-VELOSO, D. Theoretical and experimental NMR studies of the Swern oxidation of methyl 6 α ,7 β -dihydroxyvouacapane-17 β -oate. **Structural Chemistry**, v.19, n.4, p.625-631, 2008.

SANTOS FILHO, E. X.; SILVA, A. C. G.; ÁVILA, R. I.; BATISTA, A. C.; MARRETO, R. N.; LIMA, E. M.; OLIVEIRA, C. M. A.; MENDONÇA, E. F.; VALADARES, M. C. Chemopreventive effects of FITOPROT against 5-fluorouracil-induced toxicity in HaCaT cells. **Life Science**, v.193, p.300-308, 2018.

SATO, H.; TAKETOMI, Y.; ISOGAI, Y.; MASUDA, S.; KOBAYASHI, T.; YAMAMOTO, K.; MURAKAMI, M. Group III secreted phospholipase A₂ transgenic mice spontaneously develop inflammation. **Biochemical Journal**, v.421, p.17-27, 2009.

SATO, H.; KATO, R.; ISOGAI, Y.; SAKA, G. I.; OHTSUKI, M.; TAKETOMI, Y.; YAMAMOTO, K.; TSUTSUMI, K.; YAMADA, J.; MASUDA, S.; ISHIKAWA, Y.; ISHII, T.; KOBAYASHI, T.; IKEDA, K.; TAGUCHI, R.; HATAKEYAMA, S.; HARA, S.; KUDO, I.; ITABE, H.; MURAKAMI, M. Analyses of group III secreted phospholipase A₂ transgenic mice reveal potential participation of this enzyme in plasma lipoprotein modification, macrophage foam cell formation, and atherosclerosis. **The Journal of Biological Chemistry**, v.283, n.48, p.33483-33497, 2008.

SAWAYA, A. C. H. F.; ABDELNUR, P. V.; EBERLIN, M. N.; KUMAZAWA, S.; AHN, M. R.; BANG, K. S.; NAGARAJA, N.; BANKOVA, V. S.; AFROUZAN, H. Fingerprinting of propolis by easy ambiente sonic-spray ionization mass spectrometry. **Talanta**, v.81, n.1-2, p.100-108, 2010.

SCHELLER, J.; CHALARIS, A.; ARRAS, D. S.; JOHN, S. R. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1813, p.878-888, 2011.

SCHELLER, J.; GARBERS, C.; JOHN, S. R. Interleukin-6: From basic biology to selective blockade of pro-inflammatory activities. **Seminars in Immunology**, v.26, p.2-12, 2014.

SCHIMMEL, L.; HEEMSKERK, N.; BUUL, J. D. V. Leukocyte transendothelial migration: a local affair. **Small GTPases**, v.8, p.1-15, 2016.

SEO, M. D.; KANG, T. J.; LEE, C. H.; LEE, A. Y.; NOH, M. HaCaT keratinocytes and primary epidermal keratinocytes have different transcriptional profiles of cornified envelope-associated genes to T helper cell cytokines. **Biomolecules & Therapeutics**, v.20, n.2, p.171-176, 2012.

SERVAT, L.; SPINDOLA, H. M.; RODRIGUES, R. A. F.; SOUSA, I. M. O.; RUIZ, A. L. T. G.; CARVALHO, J. E.; FOGLIO, M. A. *Pterodon pubescens* Benth: Stability Study of Microencapsulated Extract and Isolated Compounds Monitored by Antinociceptive Assays. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 7, p. 1244–1253, 2012.

SHAFTEL S. S.; OLSCHOWKA, J. A.; HURLEY S. D.; MOORE A. H.; O'BANION, M. K. COX-3: a splice variant of cyclooxygenase-1 in mouse neural tissue and cells. **Molecular Brain Research**, v. 119, n. 2, p. 213–215, 2003.

SILVA, M. C. C.; GAYER, C. R. M.; LOPES, C. S.; CALIXTO, N. O.; REIS, P. A.; PASSAES, C. P. B.; PAES, M. C.; DALMAU, S. R.; SABINO, K. C. C.; TODESCHINI, A. R.; COELHO, M. G. P. Acute and topic anti-edematogenic fractions isolated from the seeds of *Pterodon pubescens*. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 55, p.135-141, 2004.

SILVA, N. C. C.; JÚNIOR FERNANDES, A. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. **The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v.16, n.3, p.402-413, 2010.

CARVALHO, W. A. Anti-inflamatórios Não-Esteróides, Analgésicos, Antipiréticos e Drogas Utilizadas no Tratamento da Gota. In: SILVA, P. **Farmacologia**. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

SMITH, W. L.; DEWITT, D. L.; GARAVITO, R. M. Cyclooxygenases: structural, cellular, and Molecular Biology. **Annual Review Biochemistry**, v.69, p.145-182, 2000.

SMYTH, E. M.; GROSSER, T.; WANG, M.; YOU, Y.; FITZGERALD, G. A. Prostanoids in health and disease. **Journal of Lipid Research**, v.50, 423-428, 2009.

SOUZA, A. M.; ARMSTRONG, L.; MERINO, F. J. Z.; COGO, L. L.; MONTEIRO, C. L. B.; DUARTE, M. R.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D. In vitro effects of *Eugenia pyriformis* Cambess., Mirtaceae: antimicrobial activity and synergistic interactions with Vancomycin and Fluconazole. **Africal Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 8, n. 35, p. 862 – 867, 2014.

SPINDOLA, H. M.; CARVALHO, J. E.; RUIZ, A. L. T. G.; RODRIGUES, R. A. F.; DENNY, C.; SOUSA, I. M. O.; TAMASHIRO, J. Y.; FOGLIO, M. A. Furanoditerpenes from *Pterodon pubescens* Benth with selective in vitro anticancer activity for prostate cell line. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.20, n.3, p.569-575, 2009.

SPINDOLA, H. M.; SERVAT, L.; DENNY, C.; RODRIGUES, R. A. F.; EBERLIN, M. N.; CABRAL, E.; SOUSA, I. M. O.; TAMASHIRO, J. Y.; CARVALHO, J. E.; FOGLIO, M. A. Antinociceptive effect of geranylgeraniol and 6 α ,7 β -dihydroxyvouacapan-17 β -oate methyl ester isolated from *Pterodon pubescens* Benth. **BMC pharmacology**, v.10, n.1, p.1-10, 2010.

SPINDOLA, H. M.; SERVAT, L.; RODRIGUES, R. A. F.; SOUSA, I. M. O.; CARVALHO, J. E.; FOGLIO, M. A. Geranylgeraniol and 6 α ,7 β -dihydroxyvouacapan-17 β -oate methyl ester isolated from *Pterodon pubescens* Benth.: Further investigation on the antinociceptive mechanism of action. **European Journal of Pharmacology**, v. 656, p.45-51, 2011.

STITHAM, J.; MIDGETT, C.; MARTIN, K. A.; HWA, J. Prostacyclin: an inflammatory paradox. **Frontiers in Pharmacology**, v.2, n.24, p.1-8, 2011.

STOW, J. L.; LOW, P. C.; OFFENHAUSER, C.; SANGERMANI, D. Cytokine secretion in macrophage and other cells: pathways and mediators. **Immunobiology**, v.214, p.601-612, 2009.

SUN, G. Y.; CHUANG, D. Y.; ZONG, Y.; JIANG, J.; LEE, J. C. M.; GU, Z.; SIMONYI. Role of cytosolic phospholipase A₂ in oxidative and inflammatory signaling pathways in different cell types in the central nervous system. **Molecular Neurobiology**, v.50, n.1, p.6-14, 2014.

TAYAL, V.; KALRA, B. S. Cytokines and anti-cytokines as therapeutics – An update. **European Journal of Pharmacology**, v.579, p.1-12, 2008.

TERMENTZI, A.; FOKIALAKIS, N.; SKALTSOUNIS, A. L. Natural resins and bioactive natural products there of as potential antimicrobial agents. **Current Pharmaceutical Designs**, v.17, p.1267-1290, 2011.

TOLEDO, C. E. M.; BRITTA, E. A.; CEOLE, L. F.; SILVA, E. R.; MELLO, J. C. P.; DIAS FILHO, B. P.; NAKAMURA, C.V.; NAKAMURA, T.U. Antimicrobial and cytotoxic activities of medicinal plants of the Brazilian cerrado using Brazilian cachaça as extractor liquid. **Journal of Ethnopharmacology**, v.133, p.420-425, 2011.

TURNER, M.; NEDJAI, B.; HURST, T.; PENNINGTON, D. J. Cytokines and chemokines: at the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1843, p.2563-2582, 2014.

UMAR, M. I.; ASMAWI, M. Z.; SADIKUN, A.; MAJID, A. M. S. A.; ATANGWHO, J.; AHAMED, M. B. K.; ALTAF, R.; AHMAD, A. Multi-constituent synergism is responsible for anti-inflammatory effect of *Azadirachta indica* leaf extract. **Pharmaceutical Biology**, v.52, n.11, p.1411-1422, 2014.

VIEIRA, C. R.; MARQUES, M. F.; SOARES, P. R.; MATUDA, L.; OLIVEIRA, C. M. A.; KATO, L.; SILVA, C. C.; GUILLO, L. A. Antiproliferative activity of *Pterodon pubescens* Benth. seed oil and its active principle on human melanoma cells. **Phytomedicine**, v. 15, p.528-532, 2008.

VILLAS-BÔAS, S. G.; MAS, SANDRINE.; ÂKESSON, M.; SMEDSGAARD, J.; NIELSEN, J. Mass Spectrometry in Metabolome Analysis. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 24, p.613-646, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Antimicrobial resistance. Facts Sheets**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>>. Acesso em: 15 de jan. 2018.

YANG, S.; SUGAWARA, S.; MONODANE, T.; NISHIJIMA, M.; ADACHI, Y.; AKASHI, S.; MIYAKE, K.; HASE, S.; TAKADA, H. *Micrococcus luteus* teichuronic acids activate human and murine monocytic cells in a CD14- and toll-like receptor 4-dependent manner. **Infection and Immunity**, v.69, n.4, p.2025-2030, 2001.

YEDGAR, S.; LICHTENBERG, D.; SCHNITZER, E. Inhibition of phospholipase A₂ as a therapeutic target. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1488, p.182-187, 2000.

YEO, C. I.; SIM, J. H.; KHOO, C. H.; GOH, Z. J.; ANG, K. P.; CHEAH, Y. K.; FAIRUZ, Z. A.; HALIM, S. N. B. A.; NG, S. W.; SENG, H. L.; TIEKINK, E. R. T. Pathogenic Gram-positive bacteria are highly sensitive to triphenylphosphane-gold (*O*-alkylthiocarbamates), Ph₃Pau [SC (OR) = N (*p*-tolyl)] (R = Me, Et and *i*Pr). **Gold Bull**, n.46, p.145-152, 2013.

Xia, J.; Song, X.; Bi, Z.; Chu, W.; Wan, Y. UV-induced NF- κ B activation and expression of IL-6 is attenuated by (-)-epigallocatechin-3-gallate in cultured human keratinocytes *in vitro*. **International Journal of Molecular Medicine**, v.16, p.943-950, 2005.

XU, R.; YE, Y.; ZHAO, W. **Introduction to Natural Products Chemistry**. CRC Press, Taylor & Francis Group, 2011.

ZARGHI, A.; ARFAEI, S. Selective COX-2 Inhibitors: a review of their structure- activity relationships. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v.10, n.4, p.655-683, 2011.

ZHANG, J. M.; AN, J. Cytokines, Inflammation and Pain. **International Anesthesiology Clinics**, v.45, n.2, p.27-37, 2007.

ZHANG, J. L.; CHEN, Z. H.; XU, Z.; LI, J.; TAN, Y. F.; ZHOU, J. H.; YE, W. C.; TIAN, H. Y.; JIANG, R. W. New structures, chemotaxonomic significance and COX-2 inhibitory activities of cassane-type diterpenoids from the seeds of *Caesalpinia minax*. **RSC advances**, v.5, p.76567-76574, 2015.

ZORRILLA, S. G.; JUAN, C.; CABOT, G.; CAMOEZ, M.; TUBAU, F.; OLIVER, A.; DOMINGUEZ, M. A.; ARIZA, J.; PEÑA, C. Impact of multidrug resistance on the pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa*: in vitro and in vivo studies. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.47, n.5, p.368-374, 2016.