



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *Copaifera reticulata* E
DOCAGEM MOLECULAR DE TERPENOS PRESENTES NA
ESPÉCIE**

Jéssica Melissa de Oliveira Tomaz

BELÉM – PA
2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *Copaifera reticulata* E
DOCAGEM MOLECULAR DE TERPENOS PRESENTES NA
ESPÉCIE**

Autora: Jéssica Melissa de Oliveira Tomaz

Orientadora: Prof. Dra. Maria Fâni Dolabela
Co-orientadora: Profa. Dra. Dayse Lúcia do
Nascimento Brandão

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

BELÉM-PA
2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

D278a de Oliveira Tomaz, Jessica Melissa.
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *Copaifera reticulata* E DOCAGEM MOLECULAR DE TERPENOS PRESENTES NA ESPÉCIE / Jessica Melissa de Oliveira Tomaz. — 2019.
73 f.

Orientador(a): Prof. Dr. Maria Fani Dolabela
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará,
Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Belém, 2019.

1. *Copaifera reticulata*. 2. Fitoquímica. 3. estudo computacional. 4. antimicrobianos. I. Título.

CDD 615.4

Jéssica Melissa de Oliveira Tomaz

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *Copaifera reticulata* E
DOCAGEM MOLECULAR DE TERPENOS PRESENTES NA
ESPÉCIE**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do título de mestre em ciências farmacêuticas. Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Banca examinadora

Profa. Dra. Maria Fâni Dolabela (Orientadora)
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Profa. Dra. Marta Chagas Monteiro
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFPA

Prof. Dr. Julio Cesar Pieczarka
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

BELÉM - PA
2022

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal do Pará, por possibilitar a obtenção do título de mestre e por todas as oportunidades a mim concedidas.

Ao Laboratório de Farmacologia e Doenças Negligenciadas e todos seus colaboradores, bem como aos petianos e ao Grupo PET Farmácia, onde recebi todos os insumos e investimentos que possibilitaram a realização deste trabalho e minha formação acadêmica e profissional.

À minha orientadora Maria Fani Dolabela que conheci em 2013 ainda no ensino médio, por me receber e acolher no seu laboratório e na sua vida, agradeço pela orientação, pela amizade, paciência e conselhos de vida.

Às Prof^{as}. Dra. Marta Chagas Monteiro e Dra. Roseane Maria Ribeiro Costa por permitirem a utilização dos Laboratórios de Microbiologia e de Nanotecnologia Farmacêutica. À Dra. Rafaela Cabral pela identificação botânica da espécie estudada neste trabalho.

À Dayse Brandão, minha mamãe acadêmica, que me acolheu de braços abertos e nunca mediu esforços pra tornar tudo isso possível, obrigada por todos os ensinamentos, conhecimentos, orientações pela representatividade e por ser uma inspiração.

À Deus e meus guias pela vida e saúde concedidos a mim e aos meus ancestrais que sempre me guiaram e me sustentaram em cada passo dessa caminhada até aqui.

A mim, pela força, perseverança e resiliência em frente as situações mais adversas possíveis, sou grata por essa conquista e pela realização profissional.

Aos meus pais, José Adilson Tomaz e Imônica Valéria de Oliveira Tomaz que sempre se dedicaram e investiram em mim, sendo fundamentais para minha formação acadêmica.

Às minhas irmãs, Jennefer Tomaz e Stheffany Tomaz, que são minha maior fonte de amor e coragem, são meu colo, meu afeto e minha família, agradeço por ter compartilhado a vida com vocês e por serem meu esteio.

À minha noiva Ariela Motizuki, agradeço ter te encontrado e poder compartilhar contigo a vida e os sonhos, obrigada por todo afeto, cuidado além do teu apoio e incentivos que foram essenciais.

À minha amiga Hanna Martins com quem eu formo a dupla JeHa, por ter caminhado comigo nos 5 anos de graduação, e 3 anos de mestrado, pela amizade, por compartilhar comigo momentos de choros, angustias, noites em claro e muitos momentos felizes e de sorrisos também.

Aos meus amigos Gleison Gonçalves e Hanna Ramos, por compartilharem comigo 2 anos de Grupo PET Farmácia agradeço o companheirismo, o afeto e as contribuições neste trabalho.

Aos amigos que construí durante esses anos, e que me apoiaram e fortaleceram nessa jornada.

E a todos aqueles que torceram por mim, que acreditaram na minha capacidade, a todos que me deram oportunidades e que contribuíram de modo direto ou indireto, na realização desta etapa de minha vida.

Muito obrigada!

“Quando a mulher negra se movimenta, toda a estrutura da sociedade se movimenta com ela.”

RESUMO

A resistência bacteriana aos antibióticos disponíveis é crescente, tornando-se urgente a busca de alternativas terapêuticas. O gênero amazônico *Copaifera L.* é utilizado na medicina tradicional para o tratamento de doenças bacterianas e seus terpenos parecem ser promissores como antimicrobiano. O presente estudo avaliou a atividade antimicrobiana de extratos de *C. reticulata* e terpenos presentes na espécie. Os extratos foram obtidos por maceração e extração sob refluxo, sendo caracterizado por cromatografia em camada e submetidos a microdiluição utilizando diferentes bactérias. Foram selecionados 12 terpenos, seguido da predição dos aspectos físico-químicos, farmacocinéticos, toxicidade, atividades biológicas e docagem molecular em MSBa (transportador ABC de cassete de ligação de ATP). Em extratos obtidos de folhas (EFo) e galhos (EGa) foram detectados diferentes metabolitos secundários, dentre estes terpenos. Os extratos mais promissores como antimicrobianos foram: extratos metanólicos Fo/Ga e etanólico Fo. Em relação a regra de Lipinski, apenas o LogP foi violado pelos terpenos, apresentando alta absorção intestinal, atravessam a BHE, metabolizados por CYP e podem inibi-la. Todas as moléculas apresentaram toxicidade, sendo o ácido caurenóico o menos tóxico. As moléculas mais promissoras como antimicrobiano foram o beta-cariofileno, ácido copalico, kolavic-15-metil-ester e trans-alfa-bergamoteno. A docagem molecular sugere que os compostos mais promissores foram alpha-copaeno, alpha-humulene e Trans- α -Bergamoteno sendo essa última a molécula mais promissora. Em síntese, a *C. reticulata* possui potencial antimicrobiana e algumas moléculas podem ligar a proteína MSBa, interferindo no mecanismo de resistência bacteriana a outros fármacos.

Palavras- chave: Copaifera, terpenos, antimicrobiano, transportador ABC de cassete de ligação de ATP

ABSTRACT

Bacterial resistance to available antibiotics is increasing, making the search for therapeutic alternatives urgent. The Amazonian genus *Copaifera* L. is used in traditional medicine for the treatment of bacterial diseases and its terpenes appear to be promising as an antimicrobial. The present study evaluated the antimicrobial activity of *C. reticulata* extracts and terpenes present in the species. Twelve terpenes were selected, followed by the prediction of physicochemical, pharmacokinetic, toxicity, biological activities and molecular docking in MSBa (ABC transporter with ATP binding cassette). In extracts obtained from leaves (EFo) and twigs (EGa) different secondary metabolites were detected, among these terpenes. Regarding Lipinski's rule, only LogP was violated by terpenes, presenting high intestinal absorption, crossing the BHE, metabolized by CYP and can inhibit it. All molecules showed toxicity, with kaurenic acid being the least toxic. The most promising molecules as antimicrobial were beta-caryophyllene, copalic acid, kolavic-15-methyl-ester and trans-alpha-bergamotene. Molecular docking suggests that the most promising compounds were alpha-copaene, alpha-humulene and trans- α -Bergamotene with the latter being the most promising molecule.

Key words: *Copaifera*, terpenes, antimicrobial, transportador ABC de cassete de ligação de ATP

LISTA DE ESTRUTURAS

- 1 (+)-delta-cadineno
- 2 (+)- Ácido hardwíckico
- 3 Ácido 3-acetoxi-copálico
- 4 Ácido 3-hidroxi-copálico
- 5 α -copaeno
- 6 α -humuleno
- 7 β -cariofileno
- 8 Ácido copálico
- 9 Ácido caurenóico
- 10 Ácido covalenico
- 11 Ester colavico-15-metil
- 12 trans- α -Bergamoteno

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Terpenos isolados de <i>Copaifera</i> L.....	16
Figura 2. Numeração e estereoquímica comuns aos esqueletos diterpênicos: caurano, clerodano e labdano e seus derivados.....	23
Figura 3. Estruturas químicas de substâncias identificadas na espécie <i>C. reticulata</i> Ducke	25
Figura 4. Obtenção dos extratos de <i>Copaifera reticulata</i> por extração sob refluxo.....	32
Figura 5. Representação esquemática da atividade antibacteriana de <i>C. reticulata</i> Ducke frente bactérias Gram-negativas.....	35
Figura 6. Moléculas de <i>Copaifera reticulata</i>	42
Figura 7. Interações transportador Msba-ligante	54

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1. Resultados da prospecção fitoquímica de <i>Copaifera reticulata</i>	38
Tabela 2. Atividade antimicrobiana dos extratos de <i>C. reticulata</i>	41
Tabela 3. Aspectos físico-químicos de moléculas	43
Tabela 4. Aspectos farmacocinéticos e farmacodinâmicos das moléculas	45
Tabela 5. Predição de toxicidade de terpenos de <i>C. reticulata</i>	47
Tabela 6. Atividade antibacteriana de terpenos de <i>C. reticulata</i>	48
Tabela 7. Afinidade de ligação entre as moléculas e MsbA.....	49
Quadro 1. Condições utilizadas nas avaliações em cromatografia em camada delgada.....	33
Quadro 2. Interações entre os ligantes e os resíduos de aminoácidos.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS

mL - Mililitro

% - Porcentagem

g- Grama

µg/mL - Micrograma por mililitro

°C - Graus Celsius

°GL - Graus Gay-Lussac

> - Maior que

< - Menor que

Nm/ sec - Newton metro por segundo

mg/L - Miligramas por litro

CI50 – Concentração inibitória 50%

CC50 - Concentração citotóxica 50%

g/L - Gramas por litro

mol/L - Mol por litro

pH - Potencial hidrogeniônico

N - Normalidade

EEFo - Extrato etanólico da folha

EHFo - Extrato hexano da folha

EDFo - Extrato diclorometano da folha

EAFo - Extrato acetato de etila da folha

EMFo – Extrato metanólico da folha

EEGa - Extrato etanólico do galho

EHGa - Extrato hexano do galho

EDGa - Extrato diclorometano do galho

EAGa – Extrato acetato de etila do galho

EMGa – Extrato metanólico do galho

CCD - Cromatografia em camada delgada

logP - Coeficiente de partição óleo-água

TPSA - Área de superfície polarizada topológica

MM - Massa molar

nALH - Número de aceptores de ligação de hidrogênio

nDLH - Número de doadores de ligação de hidrogênio

nROTB - Número de rotações

MDCK - Madin-Darby-Canine-Kidney

Caco2 - Células de adenocarcinoma de cólon humano

HIA - Human intestinal absorption

PP - Proteína plasmática

BHE - Barreira hematoencefálica

CYP - Citocromo P450

(+) - Positivo

(-) - Negativo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	17
	2.1. Resistencia microbiana	17
	2.2. Copaífera.....	21
	2.2.1. DOCAGEM MOLECULAR	26
3	OBJETIVOS	27
	3.1. Objetivo Geral	27
	3.2. Objetivos Específicos	27
4	MATERIAL E MÉTODOS	28
	4.1. Material	28
	4.1.1. EQUIPAMENTOS.....	28
	4.1.2. SOLVENTES, REAGENTES E OUTROS.....	28
	4.1.3. FÁRMACOS, MEIOS DE CULTURA E OUTROS.....	29
	4.1.4. MATERIAL PLÁSTICO E METAL.....	29
	4.1.5. VIDRARIAS	30
	4.1.6. MATERIAL BIOLÓGICO.....	30
	4.2. Métodos	30
	4.2.1. PROCESSAMENTO DA DROGA VEGETAL E EXTRATOS DE <i>Copaifera reticulata</i>	31
	4.2.2. ESTUDO FITOQUÍMICO DE <i>Copaifera reticulata</i>	32
	4.2.3. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE <i>Copaifera reticulata</i>	33
	4.2.4. ESTUDOS <i>IN SÍLICO</i> PARA PREDIÇÃO DOS ASPECTOS FÍSICO-QUÍMICOS, FARMACOCINÉTICOS, ATIVIDADES BIOLÓGICAS E TOXICIDADES...	35
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
	5.1. Estudos fitoquímicos de <i>Copaifera reticulata</i>	37
	5.2. Atividade antimicrobiana de <i>Copaifera reticulata</i>	38
	5.3. Estudos <i>in sílico</i> para predição dos aspectos físico-químicos, farmacocinéticos, atividades biológicas e toxicidades.....	41
	5.4. Docagem molecular de terpenos de <i>C. reticulata</i>	48
6	CONCLUSÃO.....	55
	REFERENCIAS	56

1 INTRODUÇÃO

Estimam que, anualmente, mais de dois milhões de infecções resistentes a antibióticos ocorrem nos Estados Unidos, resultando em aproximadamente 23.000 mortes (HAMPTON, 2013). Corre-se o risco de retorno a era pré-antibiótica, não sendo possível realizar o tratamento de infecções bacterianas, tornando-se urgente a busca de novas estratégias para combater a crescente resistência dos microorganismos (BROWN; WRIGHT, 2016).

Em bactérias resistentes aos fármacos, estão associados uma grande variedade de mecanismos de resistência dentre os quais podemos citar os reguladores transcricionais (TRs) bacterianos desempenham um papel importante na regulação da transcrição de genes funcionais necessários para sobreviver a estresses ambientais, incluindo resistência a antibióticos (TANG et al., 2019; LI et al., 2021). A mutação nos TRs de resistência a múltiplos antibióticos (MarR) em *Escherichia coli* leva a expressão de proteínas que resultam na ativação da bomba de efluxo que está envolvida na resistência a múltiplos fármacos, como, por exemplos, à tetraciclina, quinolonas e β -lactâmicos (POURAHMAD; JAKTAJI e EBADI, 2013; LANKESTER et al., 2019; LI et al., 2021).

Existem moléculas que podem inibir a bomba de efluxo impedindo a extrusão ativa do fármaco, revertendo a resistência bacteriana, estas são chamadas de 'quebradores de resistência' ou 'potenciadores de antibióticos' (KALAN e WRIGHT, 2011; BERNAL et al., 2013; FARHA e BROWN, 2013; WORTHINGTON e MELANDER, 2013; BUSH, 2015; GILL e FRANCO, 2015; CHAKRADHAR, 2016; WRIGHT, 2016; GONZALEZ-BELLO, 2017; MELANDER e MELANDER, 2017). Vários compostos de origem natural dentre estes estão os terpenos, que potencializaram a atividade de eritromicina e tetraciclina contra o respectivo *S. aureus* contendo Msr(A) e Tet(K) bombas (GONZALEZ- BELLO, 2017).

O Msba (transportador ABC de cassete de ligação de ATP) é um transportador bacteriano do tipo ABC essencial para o transporte de LPS para a superfície celular, tendo sido encontrado um inibidor alostérico para essa proteína que altera a conformação do transportador impedindo que este consiga fazer o transporte do LPS para a superfície (HO et al., 2018). O transportador Msba representa um mecanismo de resistência existentes em *E.coli* devido estar envolvido no efluxo de antibióticos

para fora da célula bacteriana. Desse modo, a sua inibição pode ser um potencial alvo para a reversão da resistência uma bacteriana (HAUBERTIN et al., 2006).

Além de buscar moléculas que possam reverter a resistência bacteriana, ainda é necessário buscar novos fármacos antimicrobianos. Na região amazônica a copaíba é amplamente utilizada para fins medicinais, principal forma de utilização dessa planta medicinal é o seu oleorresina com ações anti-inflamatória, antimicrobiana e cicatrizante. Estudos etnobotânicos relatam também o uso do chá obtido da decoção das cascas, cujas finalidades terapêuticas são o tratamento de doenças pulmonares e asma, anti-hemorroida e purgativo (ROSA; GOMES, 2009, SANTANA et al., 2014).

As propriedades farmacológicas de *Copaifera L.* são atribuída aos terpenos de sua composição química, componentes majoritários em suas oleorresinas e extratos (WENNINGER; YATES; DOLINSKY, 1967; CALVIN, 1980). Estudos demonstraram que sesquiterpenos e diterpenos já foram isolados de espécies de *Copaifera spp.* demonstram potencial cicatrizante, antileishmania, antinociceptiva e antimicrobiana (DE ALBUQUERQUE et al., 2017; RIBEIRO, 2017; SANTOS et al., 2013). Os terpenos: ácido ent-agático (Figura 1); ácido (13E)-ent-labd-8(17)-en-15,18-diólico; ácido ent-poliáltico; ácido ent-caurenóico; ácido colavenico e ácido (13E)-ent-labda-7,13-dien-15-óico, isolados de *Copaifera*, apresentaram atividade antimicrobiana (BARBOSA,

A maioria dos estudos químicos e farmacológicos realizados com espécies de *Copaifera* foi realizada com oleorresinas, havendo carência de estudos com extratos obtidos de diferentes partes do vegetal. Além disso, faltam estudos que avaliem o potencial “potencializadores de atividade” antimicrobiana de terpenos presentes neste gênero. Estas lacunas do conhecimento justifica a realização deste estudo.

As hipóteses deste estudo são: H1- que extratos obtidos de *C. reticulata* são promissores como antimicrobiana; H2- terpenos já isolados deste gênero podem inibir a bomba de efluxo, podendo reverter a resistência bacteriana.

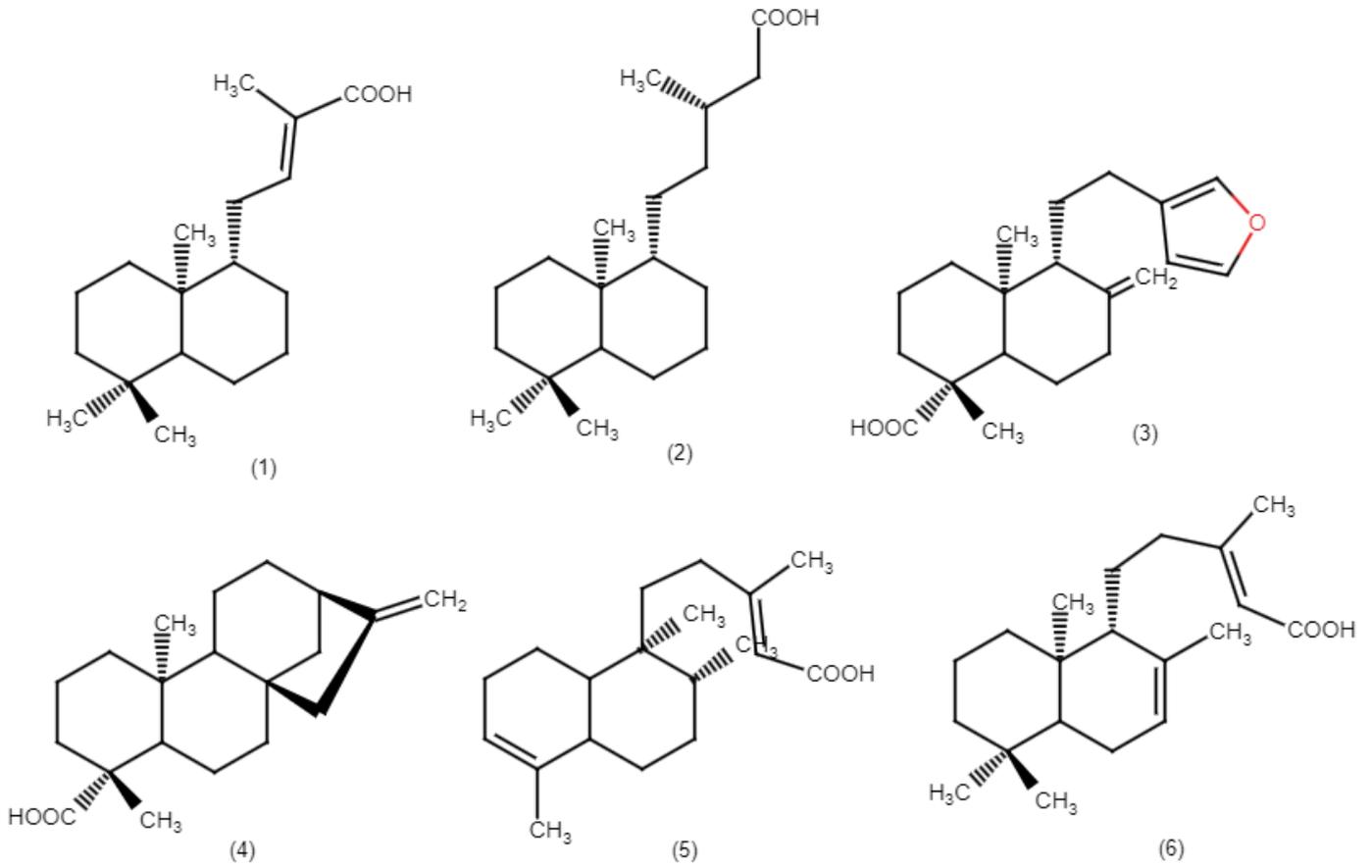


Figura 1. terpenos aislados de *Copaifera L.*

Legenda: (1) ácido ent-agático; (2) ácido (13E)-ent-labd-8(17)-en-15,18-dióico; (3) ácido ent-poliáltico; (4) ácido ent-caurenóico; (5) ácido colavenico; (6) ácido (13E)-ent-labda-7,13-dien-15-óico.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Resistencia microbiana

A resistência bacteriana é um fenômeno natural que ocorre como uma resposta dos microrganismos quando expostos a ambientes hostis, sejam eles no meio ambiente ou não, quando expostos a ação de antibióticos (WHO, 2018). Desta forma, a resistência se refere à capacidade de organismos que provocam doenças infecciosas, incluindo bactérias, sobreviverem a agentes projetados para matá-las. Trata-se de um processo natural, resultante de pressão seletiva no ambiente entre espécies de bactérias (YU et al., 2016).

A resistência bacteriana pode ser caracterizada de maneira intrínseca, como resultado de uma característica estrutural ou funcional inerente de dada espécie, ou de maneira adquirida, como resultado de mutações que podem ocorrer durante a replicação celular ou serem induzidas por intermédio de agentes mutagênicos. (SILVA; RODRIGUES JUNIOR, 2022). Em bactérias resistentes os antibióticos tendem a atingir uma concentração intracelular mais baixa quando comparados com cepas sensíveis a antibióticos intimamente relacionadas, indicando menor taxa de absorção de drogas ou maior taxa de drogas exportadas (PAGÈS et al., 2008, ALEKSHUN e LEVY, 2007). Esse processo ocorre por diferentes mecanismos de resistência.

Quando a bactéria invade o hospedeiro, para que sobreviva são desenvolvidos mecanismos de combate ao sistema imunológico do hospedeiro. As moléculas secretadas que interferem no reconhecimento de patógenos bacterianos pelo sistema imunológico do hospedeiro e componentes associados a patógenos que tornam o invasor mais resistente ao arsenal de moléculas antimicrobianas do hospedeiro, como lisozima, fosfolipase A2 do grupo IIA e pequenos peptídeos antimicrobianos catiônicos (CAMPs) (KOPRIVNJAK e PESCHEL, 2011).

Em humanos, os CAMPs (catelicidinas é LL-37; defensinas têm uma estrutura de folha β que é estabilizada por três pontes dissulfeto; cinocidinas relacionados às quimiocinas liberadas das plaquetas ao entrar em contato com bactérias, trombocidinas) têm papéis imunomoduladores adicionais que contribuem para a defesa antimicrobiana do hospedeiro (KOPRIVNJAK e PESCHEL, 2011). Além disso, outros peptídeos antimicrobianos humanos foram descritos, incluindo dermcidinas aniônicas produzidas no suor humano, o hormônio regulador do ferro hepcidina

(GANZ, 2006) e produtos derivados de proteínas humanas, como α -melanócito-hormônio estimulante (MADHURI et al., 2009).

Existem vários mecanismos propostos de como os CAMPs matam as bactérias, porém, para se defender alguns patógenos produzem moléculas extracelulares que se ligam e prendem os CAMPs e, assim, impedem sua ação antimicrobiana. Alternativamente, as bactérias podem interceptar peptídeos de defesa do hospedeiro antes de atingirem seu alvo - a membrana citoplasmática bacteriana - usando proteases secretadas ou associadas ao envelope celular. As proteases que degradam CAMP também podem estar associadas ao envelope celular bacteriano ancoradas na parede celular ou na membrana externa (GUINA et al., 2000; HUI et al., 2010). Tem sido sugerido que a evolução do CAMP levou à introdução de múltiplas pontes de cisteína, resultando em uma forma que é substancialmente mais resistente à proteólise (PESCHEL e SAHL, 2006).

Para se proteger da resposta imune do hospedeiro, as bactérias podem se encapsular produzindo elaboradas matrizes extracelulares. O *S. epidermidis* produz exopolímero catiônico polissacarídeo adesina intercelular (PIA) e ácido poli- γ -glutâmico aniônico (PGA), que demonstraram desempenhar um papel na resistência catiônica LL-37 e HBD3 e defesa aniônica peptídeo dermcidina (VUONG et al., 2004^a; VUONG et al., 2004^b; KOCIANOVA et al., 2005). Estes mecanismos de resistência, provavelmente, envolve o sequestro eletrostático e mecânico dos peptídeos de defesa do hospedeiro na membrana citoplasmática bacteriana (KOPRIVNJAK e PESCHEL, 2011).

As moléculas que contribuem para a negatividade líquida da superfície bacteriana incluem peptidoglicano, polímeros aniônicos como TA, ácido teicurônico, lipopolissacarídeo (LPS) e fosfolipídios aniônicos na membrana citoplasmática bacteriana. O envelope de bactérias Gram-negativas consiste em uma fina camada de peptidoglicano e uma membrana externa extra com camada fosfolipídica interna e camada externa de LPS (RAETZ et al., 2007). As bactérias Gram-positivas não possuem a membrana externa, mas a parede celular espessa com múltiplas camadas de peptidoglicano, o envelope celular contém vários polímeros glicolipídicos ou glicolipídicos, nomeadamente TA, que estão ligados ao peptidoglicano (ácido teicóico da parede, WTA) ou à membrana celular (ácido lipoteicóico, LTA) (NEUHAUS e BADDILEY, 2003; WEIDENMAIER e PESCHEL, 2008).

A ligação dos CAMPs depende de interações eletrostáticas com as porções carregadas negativamente no envelope celular bacteriano (lipídio A e ácidos teicóicos: WTA, ácido teicóico da parede, LTA, ácido lipoteicóico). Os CAMPs precisam penetrar na membrana externa (bactérias Gram-negativas) ou na parede celular (bactérias Gram-positivas). PhoQ e ApsS são sensores de histidina quinase que respondem a CAMPs ou perturbações de membrana mediadas por CAMPs, sendo reguladores transcricionais da expressão de genes de resistência a CAMPs. Substituições de lipídio A por aminoarabinose e etanolamina, modificação de fosfatidilglicerol por L-lisina e modificação D - alanina de WTA e LTA, atuam para neutralizar a carga líquida negativa do envelope celular bacteriano (KOPRIVNJAK e PESCHEL, 2011).

Além disso, o aumento da resistência é obtido pela alteração da fluidez da membrana às substituições do TA pelo aminoácido D- alanina, que influencia parcialmente a negatividade líquida de TA (FISCHER, 1994; NEUHAUS e BADDILEY, 2003; XIA; KOHLER e PESCHEL, 2009). Por sua vez, ésteres D - alanílicos de TA modulam funções de TA que aumentam significativamente a resistência de bactérias Gram-positivas a CAMPs e proteínas (PESCHEL et al., 1999; ABACHIN et al., 2002; COLLINS et al., 2002; WEIDENMAIER et al., 2005; KOVACS et al., 2006; ABI KHATTAR et al., 2009; COX et al., 2009). Fatores ambientais como pH, temperatura e concentração de sal (por exemplo, NaCl) (HEPTINSTALL; ARCHIBALD; BADDILEY, 1970; HURST et al., 1975; MACARTHUR e ARCHIBALD, 1984) podem afetar o grau em que os TA são substituídos por D – alaninas (KOPRIVNJAK e PESCHEL, 2011).

Outros fatores transcricionais são influenciados por fatores ambientais, um exemplo é o PmrA. A atividade do regulador transcricional PmrA é controlada por dois sistemas diferentes: (a) um sensor quinase PmrB que detecta ferro, zinco e condições ácidas leves, e (b) sistema de dois componentes PhoPQ que regula a atividade PmrA através da proteína PmrD. PhoPQ é um sensor de Mg²⁺, responde a mudanças no pH e à presença de CAMPs. Foi demonstrado que PhoP influencia direta ou indiretamente a expressão de mais de 100 genes (KOPRIVNJAK e PESCHEL, 2011).

As superbactérias (*Enterococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella* spp., *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp.), que são resistentes a diferentes fármacos (BOUCHER et al., 2009), possuem uma diversidade de mecanismos de resistência (intrínsecos, adquiridos e adaptativos) (BREIDENSTEIN et al., 2011). Por exemplo, uma superexpressão da bomba de efluxo de resistência-nodulação-divisão (RND) MexAB-OprM é comumente associada à

resistência a β -lactâmicos, enquanto MexXY-OprM medeia a diminuição da suscetibilidade a aminoglicosídeos, alguns β -lactâmicos e fluoroquinolonas (POOLE, 2011). Além disso, a resistência às fluoroquinolonas também pode resultar da regulação positiva das bombas MexAB-OprM, MexCD-OprJ e MexEF-OprN (ADABI et al., 2015). As mutações na porina OprD, resultando na diminuição ou perda da mesma, levam à redução da recaptação do imipenem na célula e surgimento da resistência a esse fármaco (WALSH e AMYES, 2007).

Algumas famílias de transportadores também estão entre os mecanismos de resistência descritos, tais como as proteínas da família resistência nodulação-divisão, facilitadores principais, sistemas de efluxo multidrogas, transportadores de cassete de ligação de ATP, como o MsbA em *Escherichia coli*, são as famílias de transportadores encontradas na literatura (TEIXEIRA et al., 2019).

O MsbA consiste em uma proteína transportadora da família de proteínas ABC (ATP-binding cassette), esses transportadores estão envolvidos na importação celular de diferentes metabólitos ou no efluxo de antibióticos e moléculas exógenas (HAUBERTIN et al., 2006). O MsbA está presente em bactérias gram-negativas como *E. coli* onde catalisa o movimento do lipopolissacarídeo (LPS) do interior da célula bacteriana para a superfície da membrana. O LPS consiste em um componente essencial membrana externa das bactérias Gram-negativas, faz parte da constituição da camada externa da membrana externa onde contribui para a assimetria lipídica, onde compõe uma barreira eficiente a antimicrobianos e outros fatores de stress. O LPS tem sua biogênese no folheto citoplasmático da membrana interna citoplasma, e depende da facilitação de uma flippase para realizar seu movimento transbicamada visto que esse movimento é energeticamente desfavorável requer facilitação por flippases. Devido a isso MsbA realiza o movimento de LPS para o folheto periplasmático celular (RAETZ; WHITFIELD, 2002, HO et al., 2018). O MsbA é um possível alvo bacteriano ainda pouco explorado, tendo em vista que a perda do MsbA causa rápida perturbação da membrana e morte celular.

No caso dos macrolídeos, os mecanismos mais comuns de resistência aos macrolídeos são o efluxo dos antibióticos (extrusão do fármaco da célula) e a modificação do sítio alvo por uma modificação pós-transcricional do rRNA 23S ou mutações no rRNA 23S ou proteínas ribossômicas (LECLERCQ, 2002). A resistência adquirida através de uma mutação no sítio de ligação possui diferentes níveis e depende da posição em que a mutação ocorre (XIN et al., 2009; CARDINALE et al.,

2011; AKAIKE et al., 2012). Além disso, *P. aeruginosa* pode produzir vários tipos de β -lactamases codificadas em plasmídeos, entre as quais as β -lactamases de espectro estendido (ESBLs) mediando resistência a cefalosporinas de amplo espectro, e as metalo- β -lactamases (MBLs) mediando resistência a carbapenemes são preocupantes (POTRON et al., 2015).

Outros mecanismos podem interferir na resposta dos antibacterianos, como por exemplo a alteração da permeabilidade do fármaco na bactéria, devido as alterações na físico-químicas bacterianas. Outro possível mecanismo pode envolver a diminuição ou ausência de compatibilidade entre o local de ação e o fármaco (TEIXEIRA et al., 2019).

Em síntese, a resistência bacteriana aos fármacos é crescente, tornando-se urgente a busca de novos fármacos ou de adjuvante farmacológico, como exemplo os inibidores de beta-lactamase. Nesta busca, as plantas amazônicas podem ser uma importante fonte de moléculas com atividade antibacteriana e como adjuvantes farmacológicos. Um fato curioso é que a maioria dos estudos avaliaram somente a atividade antibacteriana das plantas e seus metabólitos, ainda sendo escassos os estudos que avaliem simultaneamente os dois aspectos.

Um gênero muito importante, em termos medicinais, na Amazônia é o *Copaifera*, sendo o uso de seu óleo relatado desde o século XVI (DE ALBUQUERQUE et al., 2017), dentre as alegações tem-se para o tratamento de patologias ocasionadas por bactérias. Alguns estudos demonstraram a atividade antibacteriana do oleorresina (MADHURI et al., 2009) e ainda são escassos os estudos com os extratos de espécies pertencentes ao gênero, tornando este trabalho ainda mais relevante.

2.2. *Copaífera*

O gênero *Copaifera* pertence à família Leguminosae Juss. e subfamília Caesalpinoideae Kunth (VEIGA JR e PINTO, 2002) e são caracterizadas pela presença de estruturas secretoras internas que sintetizam e acumulam oleorresina, que possuem expressiva atividade e alto valor comercial (RODRIGUES; TEIXEIRA; MACHADO, 2011). As plantas deste gênero são conhecidas popularmente como “copaíba ou copaibeiras” e a origem do nome copaíba pode ser atribuída ao tupi cupayba, “árvore de depósito”, ou que tem jazida em alusão ao óleo que guarda em seu interior.

As copaibeiras são árvores de crescimento lento, alcançam de 5 a 40 metros de altura, podendo viver até 400 anos. O tronco é áspero, de coloração escura, medindo de 0,4 a 4 metros de diâmetro. As folhas são alternadas, pecioladas e penuladas. Os frutos contêm uma semente ovóide envolvido por um arilo abundante e colorido. As flores são pequenas, apétalas, hermafroditas e arranjas em panículos axilares (VAN DEN BERG, 1982; PIO CORRÊA, 1984)

As copaibas são árvores nativas da região tropical da América Latina e também da África Ocidental. De acordo com o Index Kewensis (1996) o gênero *Copaifera* possui 72 espécies. No Brasil são encontradas facilmente nas regiões Amazônica e Centro-oeste, sendo as espécies mais abundantes: *C. officinalis* L., *C. guianensis* Desf., *C. reticulata* Ducke, *C. multijuga* Hayne, *C. confertiflora* Bth, *C. langsdorffii* Desf., *C. coriacea* Mart. e *C. cearensis* Huber ex Ducke (ANDRADE; FERRAZ; VEIGA JR, 2000, VEIGA JR e PINTO, 2002). Dentre estas espécies, *C. reticulata* Ducke ocorre apenas no Brasil, na Amazônia brasileira, habita mata de terra firme e foi encontrada amplamente distribuída na porção oriental, sendo rara na região ocidental e ausente a nordeste; amplamente distribuída no Pará, podendo ainda ser encontrada nos estados Amapá, Roraima e Mato Grosso (MARTINS-DA-SILVA; PEREIRA; LIMA, 2008).

Quimicamente, o gênero *Copaifera* destaca-se por apresentar uma enorme diversidade de metabólitos secundários. Estudos realizados, especialmente com o óleo de copaibeiras, revelam em grande maioria a presença de sesquiterpenos e diterpenos (MORIN et al. 1986; PINTO et al. 1996; BRAGA, 1998). Dentre os diterpenos já descritos na literatura, todos pertencem aos esqueletos caurano, clerodano e lábdano, como os ácidos caurenóico, copálico e hardwickiic (Figura 2). (CASCON e GILBERT, 2000).

Quanto as partes aéreas, existem poucos estudos com relação a composição química e suas atividades farmacológicas. Foi observado que a composição das partes aéreas difere muito da oleorresina, sendo constituído majoritariamente de composto polares derivados da via do ácido chiquímico, incluindo flavonoides e derivados do ácido gálico. (SOUZA et al. 2011; NOGUEIRA; FURTADO e BASTOS, 2015).

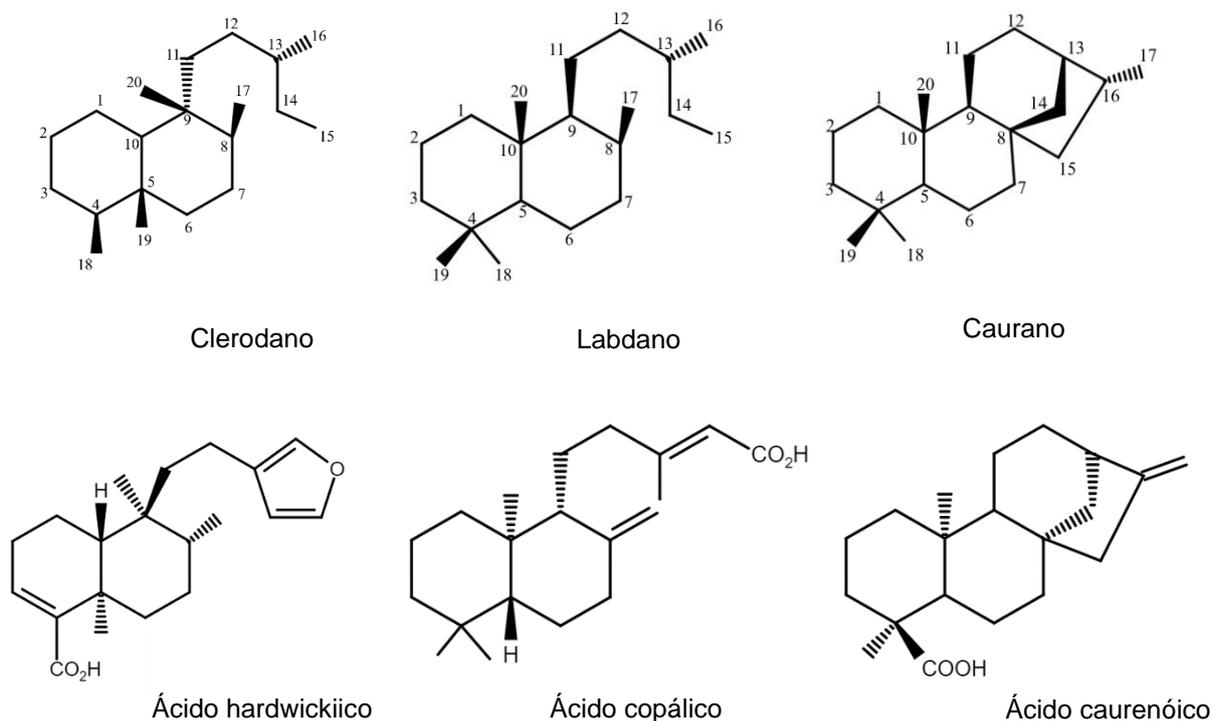


Figura 2. Numeração e estereoquímica comuns aos esqueletos diterpênicos: caurano, clerodano e labdano e seus derivados

A copaíba é uma planta medicinal que tem seu uso popular bastante disseminado, há relatos de uso da copaíba para muitas finalidades, dentre as quais podemos citar o uso como antibacteriano, antiinflamatório, cicatrizante e para doenças gástricas (LEANDRO et al., 2012). O óleo resina extraído do tronco da árvore de copaíba apresenta diversas propriedades, como medicinais e cosméticas. Sendo uma das plantas com uso medicinal mais conhecida e utilizada no Brasil, o óleo é encontrado na forma farmacêutica de pomadas, óleos in natura, cápsulas, emulsões, entre outros (MACIEL; PINTO e VEIGA JUNIOR, 2002).

A oleorresina *C. reticulata* Ducke possui muitos usos terapêuticos tradicionais, entre os quais estão o uso como antiinflamatório, cicatrizante, para doenças gástricas e antibacteriano (LEANDRO et al., 2012). Em destaque estão os usos para tratamento de infecções bacterianas, onde estudos demonstraram atividade contra muitas cepas, especialmente de bactérias Gram-positivas, como o *Staphylococcus aureus* com concentração inibitória mínima (CIM) de 5 µg/mL (PACHECO et al., 2006). Outro

estudo, testou o oleorresina frente à *Enterococcus faecium* e *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA), demonstrando significativa atividade com CIM de 4,2 e 5,3 µg/mL respectivamente (BARBOSA et al., 2018).

Estudos de caracterização química mostraram que a oleorresina de copaíba é composta por sesquiterpenos e diterpenos (VEIGA JUNIOR e PINTO, 2002), sendo atribuída aos terpenos as atividades antimicrobianas da oleorresina (BIAVATTI et al., 2006). Os sesquiterpenos são majoritários na composição da oleorresina, o β-cariofileno é um dos mais encontrados sendo a ele atribuído muitas atividades biológicas como a atividade antimicrobiana (LEANDRO et al., 2012). Além disso, já foram identificados em óleo-resina de *C. reticulata* o ácido copálico, ácido hardwickiico, ácido caurenóico, α humuleno, α copaeno e β bisaboleno (SANTOS, 2008; ZOGHBI, 2009; TRINDADE et al., 2018). (Figura 3).

Quanto aos efeitos sobre a mucosa gástrica, estudos avaliando atividade de extratos das folhas de *C. reticulata* demonstraram efeitos citoprotetores para a mucosa gástrica em modelos de úlceras agudas, entretanto, estes extratos foram tóxicos para a linhagem celulares tumorais de adenocarcinoma gástrico (LEMOS, 2016). Extratos obtidos de 6 espécies de *Copaifera* foram analisadas e demonstraram citotoxicidade *in vitro*, porém não foi observada toxicidade *in vivo* (FURTADO, 2018). De extrato obtido de sementes de *C. langsdorffi* foram detectados compostos fenólicos e aromáticos (STUPP et al. 2008).

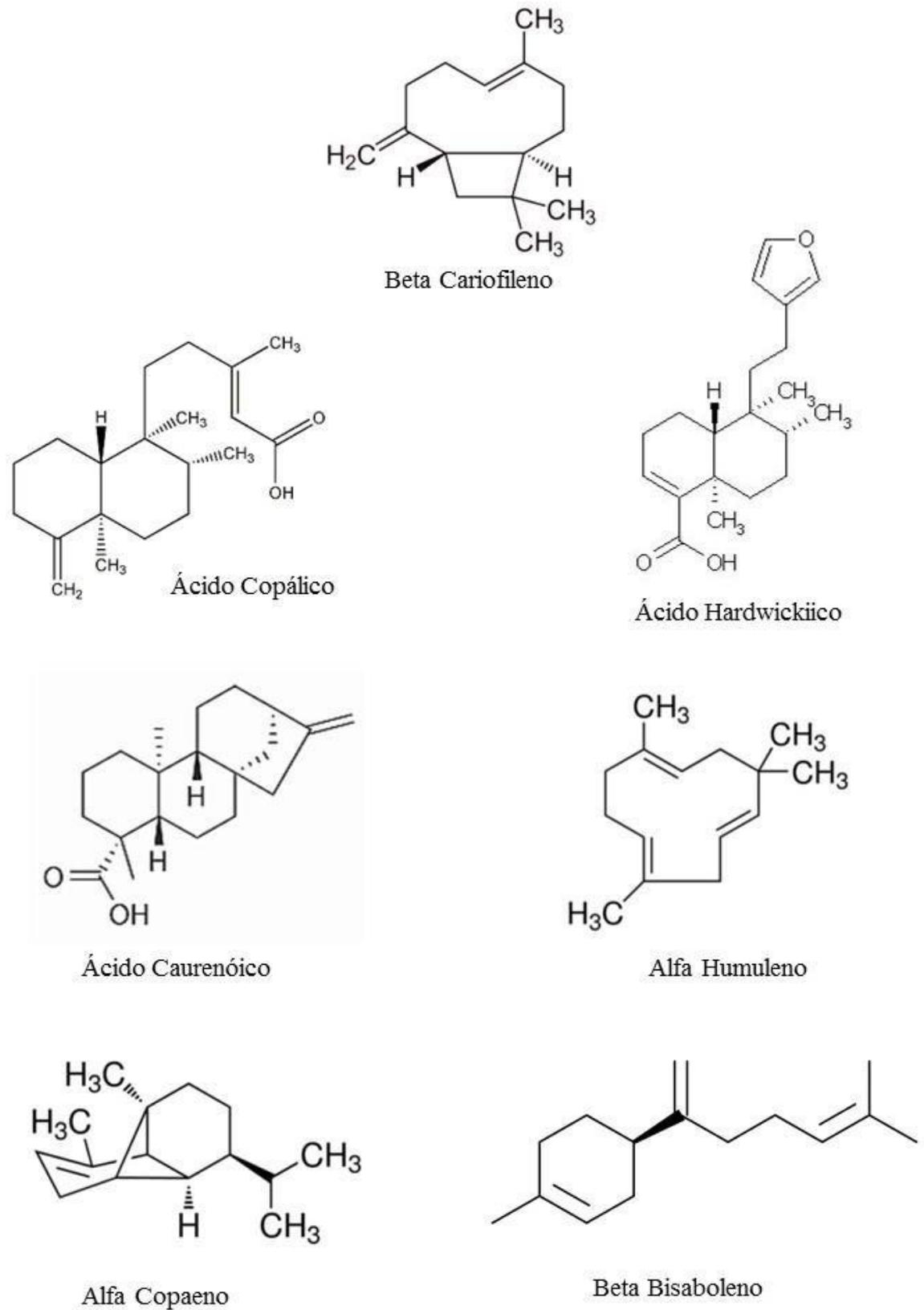


Figura 3. Estruturas químicas de substâncias identificadas na espécie *C. reticulata* Ducke

2.2.1. DOCAGEM MOLECULAR

A pesquisa e desenvolvimento de fármacos passou por alguns períodos ao longo da história, indo desde a descoberta ocasional de fármacos no século XIX até as metodologias atuais que aliam o conhecimento das estruturas químicas com a área da química computacional e a modelagem molecular, triagem de fármacos em larga escala, e os dados produzidos pelos projetos genoma e proteoma humanos (ROQUE, 2010). Nesse contexto, o planejamento racional de fármacos baseado em estruturas (*Struct-Based Drug Design*) por meio da computação científica vem se mostrando uma abordagem metodológica de sucesso e tomando destaque devido a redução do tempo e dos custos relacionados a pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos (ODUGUWA et al., 2006)

Essa metodologia inclui etapas relacionadas ao ligante e etapas relacionadas ao alvo. Para selecionar os ligantes, é realizada uma triagem das moléculas com potencial farmacológico para ser testadas e suas afinidades com o receptor comparadas através de métodos computacionais de cinética, metabolismo e toxicidade. Posteriormente temos o atracamento receptor-ligante que consiste na predição do correto modo de ligação de uma molécula teste com uma macromolécula alvo (ANDRICOPULO; SALUM e ABRAHAM, 2009). A abordagem *in silico* para a triagem e o melhoramento de compostos a traves de métodos de atracamento são estratégias importantes na redução de custos do processo de desenvolvimento de fármacos (MAGALHÃES, 2006).

Nesse sentido as plantas medicinais consistem em uma importante fonte para a prospecção de moléculas bioativas, devido a diversidade química e estrutural dos metabolitos secundários encontrados na composição destas possuem alto potencial para se tornarem protótipos de fármacos (BRASIL, 2017) dentre esses metabolitos com atividade farmacológica destacamos os terpenos aos quais são atribuídos atividade antitumoral, antimicrobiano, antifúngico, antiviral, anti-hiperglicêmico, analgésico, anti-inflamatório

e atividades antiparasitárias (PADUCH et al., 2007). A partir dessas moléculas biológicas podem ser realizadas modelagem molecular e modificação molecular e variação estrutural para a obtenção de antibióticos menos tóxicos, mais efetivos ou ambos (LIMA; BENJAMIM e SANTOS, 2017).

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Investigar o potencial antibacteriano de *C. reticulata*, bem como o potencial de reversão da resistência bacteriana dos terpenos isolados, determinar a atividade antibacteriana de extratos de *C. reticulata*

3.2. Objetivos Específicos

- Realizar estudos fitoquímicos de extratos obtidos de diferentes partes de *C. reticulata* Ducke;
- Avaliar a atividade antimicrobiana frente a bactérias gram-positiva, gram-negativa e *Candida sp.*;
- Realizar a predição *in silico* da atividade antibacteriana de terpenos de *C. reticulata* Ducke;
- Realizar docagem molecular de terpenos isolados de *C. reticulata* Ducke em MsbA.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. EQUIPAMENTOS

- Agitador magnético mini com aquecimento - Quimis;
- Autoclave 75 L - Phoenix;
- Balança analítica – Bioprecisa, modelo FA2104 N Eletronic Balance;
- Banho-maria – SOLAB Científica, modelo SL 150;
- Banho de Ultrassom – Tecnal Equipamentos para laboratório, modelo 2210 Branson.
- Cabine de fluxo laminar vertical – Pachane, modelo PA 310;
- Capela – Quimis;
- Chapa aquecedora;
- Dessecador de vidro;
- Destilador de água;
- Estufa – Medicate Produtos Médicos, modelo Md 1.2;
- Estufa Microprocessada de Cultura Bacteriológica, modelo Q316M, Quimis;
- Evaporador rotatório, Fisatom;
- Forno Mufla – Forlabo nº 2750;
- Geladeira – Electrolux;
- Leitor de Microplacas – Biotek, modelo ELX 808;
- Micropipetas, volume ajustável de 2-20 µL, 10-100 µL e de 100-1000 µL – Paguepet;
- Moinho de facas - Marconi;
- pHmetro de bancada – Quimis Q400RS;

4.1.2. SOLVENTES, REAGENTES E OUTROS

- Água destilada;
- Acetato de etila P.A - Dinâmica;
- Ácido clorídrico - Dinâmica;
- Ácido sulfúrico - Dinâmica;
- Álcool metílico (Metanol) – Dinâmica;

- Álcool grau 96°GL (Álcool Etílico hidratado);
- Álcool etílico 70%;
- Diclorometano P.A – Dinâmica;
- Dimetil-sulfóxido (DMSO) – Dinâmica;
- Hexano P.A – Dinâmica;
- Solução salina 0,85%;
- Sílica gel 60 para cromatografia de camada delgada Flash - Merck®.

4.1.3. FÁRMACOS, MEIOS DE CULTURA E OUTROS

- Anfotericina B 50 mg sol.;
- Ágar Müller Hinton - Himedia;
- Ágar Cetrimide – Himedia
- Ágar Manitol – Himedia
- Ágar McConkey – Himedia;
- Ágar Sabouraud - Himedia;
- Caldo Müller Hinton – Kasvi;
- Cloranfenicol 1g pó (suspensão);
- Sulfato de Gentamicina 80 mg/ 2mL;
- Algodão hidrófobo;
- Gaze

4.1.4. MATERIAL PLÁSTICO E METAL

- Cuba cromatográfica;
- Espátulas de metal;
- Estantes plásticas;
- Pinça de alça inox;
- Papel alumínio comercial;
- Papel de filtro MN 618;
- Pipetas Pasteur de plástico;
- Placas de cultura de células de 96 poços, fundo chato com tampa - TPP;
- Ponteiras de 10 – 1000 µL e de 20 a 200µL;

- Tubo cônico graduado 15 mL não estéril (Tipo Falcon);
- Tubo cônico graduado 50 mL estéril (Tipo Falcon) - Becton-Dicknson;
- Tubos de microcentrifuga (Tubos eppendorf) de 1,5 e 2,0 mL – Alfa;
- Alças em poliestireno calibradas descartáveis 10 μ L (LabPlast);
- Swab (J. Prolab);
- Placas Petri descartável 90X15 cm (J. Prolab);
- Pipeta Pausteur descartável;
- Ponteiras de 10 a 1000 μ L e de 20 a 200 μ L;

4.1.5. VIDRARIAS

- Balão volumétrico de 250 mL, 500 mL, 100 mL – Laborquimi;
- Bastão de vidro;
- Becker de 600, 1000 mL – Sateli;
- Condensador;
- Erlenmeyes de 250, 2000 mL – Vidrolabor;
- Pipetas de vidro graduadas de 1 mL, 5 mL, 10 mL – Vidrolabor;
- Proveta de 50 mL, 200 mL, 500 mL, 100 mL – Vidrolex;
- Tubos de ensaio;
- Tubos de ensaio com rosca;

4.1.6. MATERIAL BIOLÓGICO

Para os testes da atividade antimicrobiana foram utilizadas cepas padrão American Type Culture Colection (ATCC) de *Staphylococcus aureus*, ATCC 25923; *Pseudomonas aeruginosa*, ATCC 9027; *Salmonella typhi*. ATCC 14029; *Protheus mirabilis*. ATCC 8/7 e *Candida albicans*, ATCC 14053, obtidas da FIOCRUZ/Laboratório Central do Estado (LACEN-PA).

4.2. Métodos

4.2.1. PROCESSAMENTO DA DROGA VEGETAL E EXTRATOS DE *Copaifera reticulata*

O material vegetal foi obtido em Barcarena-PA (latitude 01°31'8" e longitude 48°37'1"), identificado pela Dra. Rafaela Cabral e sua exsicata MG 231604 depositada no herbário João Murça do Museu Emilio Goeldi.

As folhas e galhos foram devidamente separados e lavados com água corrente, posteriormente dispostos em bancada sobre papel absorvente a temperatura ambiente para evaporação da água, secos em estufa de ar circulante a 40 °C, em seguida triturado em moinho de facas. Os pós de galhos e folhas foram submetidos a dois processos de extração: maceração etanólica e extração sob refluxo com solventes de polaridade crescente (Hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol).

Na maceração foi utilizado álcool etílico 96° GL, em temperatura ambiente e ao abrigo de luz, durante sete dias. A solução etanólica foi filtrada e submetida a concentração em evaporador rotatório, até obtenção de resíduo, sendo obtido os extratos etanólicos (EEFo e EEGa).

Na extração sob refluxo (Figura 4) os pós dos galhos (38g) das folhas (27g) foram submetidos separadamente à extração a sob refluxo sendo estes transferidos para um balão de fundo redondo de 500 mL o qual foi conectado a um condensador. Ao balão contendo o material vegetal foi adicionado 140 mL de Hexano (1 x por 30 minutos) e fez-se o aquecimento sob refluxo em manta aquecedora a 40°C. Logo após, fez-se a extração com 140 mL de diclorometano e posteriormente esse procedimento foi realizado com acetato de etila e metanol (1 x por 30 minutos para cada solvente). As soluções obtidas foram filtradas em funil simples com o auxílio de papel filtro, seguida de concentração em rotaevaporador e obteve-se os seguintes

extratos: extrato hexano (EHFo e EHGa); extrato diclorometano (EDFo e EDGa); extrato acetato de etila (EAFo e EAGa) e extrato metanólico (EMFo e EMGa).

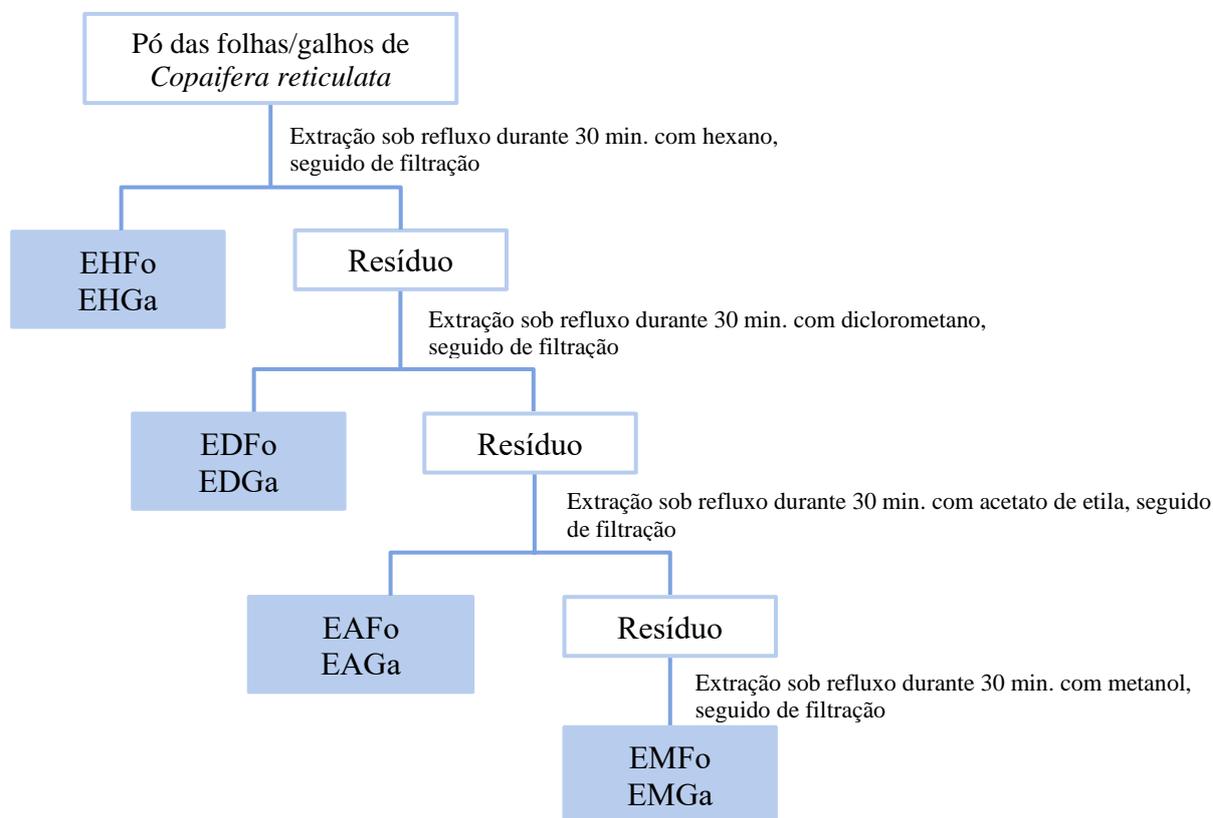


Figura 4. Obtenção dos extratos de *Copaifera reticulata* por extração sob refluxo

Legenda. EE – Extrato Etanólico; EH - Extrato Hexânico; ED – Extrato Diclorometano; EA – Extrato Acetato de Etila; EM – Extrato Metanol; Fo – Folha. Ga – Galho; O procedimento foi realizado para o pó de folhas e galhos, separadamente.

4.2.2. ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Copaifera reticulata*

A prospecção fitoquímica foi realizada por cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando 5mg de cada extrato solubilizado em metanol. Foram pesquisadas as seguintes classes de metabólitos: triterpenos e esteróides, geninas flavônicas, heterosídeos flavônicos, cumarinas, saponinas, alcaloides, polifenóis, taninos, geninas antraquinônicas e naftoquinônicas, heterosídeos antracênicos (Quadro 1).

Quadro 1. Condições utilizadas nas avaliações em cromatografia em camada delgada

Metabólito	Fase móvel	Revelador
Alcalóides	Clorofórmio: Metanol: Hidróxido de Amônio (85:15:0,2).	Dragendorff.
Cumarinas	Tolueno: Éter (1:1) saturado com Ácido acético (5 gotas).	Hidróxido de potássio a 5% em metanol.
Geninas Antraquinônicas Naftoquinônicas	Clorofórmio: Acetato de etila: Ácido fórmico (60:40:2,5).	Cloreto de alumínio a 2% em metanol.
Geninas Flavônicas	Clorofórmio: Acetato de etila: Ácido fórmico (60:40:2,5).	Cloreto de alumínio a 2% em metanol.
Polifenóis	Acetato de etila: Ácido Fórmico: Ácido acético: Água (100:11:11:27).	Soluções de ferricianeto de potássio a 1% e cloreto férrico a 2%.
Saponinas	Clorofórmio: Metanol (95:5).	Anisaldeído.
Triterpenos e Esteróides	Hexano: Acetato de etila (8:2)	Reagente de Lieberbanm-Burchard
Heterosídeos Flavônicos	Acetato de etila: Ácido Fórmico: Ácido acético: Água (100:11:11:27).	Cloreto de alumínio a 2% em metanol.
Taninos	Acetato de etila: Ácido Fórmico: Ácido acético: Água (100:11:11:27).	Soluções de ferricianeto de potássio a 1% e cloreto férrico a 2%.
Heterosídeos Antracênicos	Acetato de etila: Metanol: Água (81:11:8)	Hidróxido de potássio a 5% em metanol

Fonte: BRANDÃO, 2012 adaptado de WAGNER et al., 1984.

4.2.3. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *Copaifera reticulata*

4.2.3.1. Cultivo de microrganismos

Cada microrganismo foi semeado em meio de cultura específico e posteriormente em ágar Müller Hinton e as placas foram encubadas em estufa bacteriológica a 37 °C, por um período de 24 horas para as bactérias e de 48 horas para o fungo e então utilizadas no experimento.

4.2.3.2. Determinação da concentração inibitória mínima

Os diferentes extratos de *C. reticulata* foram testados frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus*, ATCC 25923; *Pseudomonas aeruginosa*, ATCC 9027; *Salmonella typhi*, ATCC 14029; *Protheus mirabilis*. ATCC 8/7 e *Candida albicans*, ATCC 14053. A atividade antimicrobiana foi determinada por meio da microdiluição em placa de 96 poços segundo a metodologia descrita a seguir.

Os microrganismos foram diluídos em solução salina a 0,85% sendo a turbidez ajustada à turbidez do tubo 0,5 da escala de McFarland, correspondendo aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (unidade formadora de colônias/mL) de cada microrganismo (CLSI, 2009 apud BRANDÃO, 2012). As amostras de folhas e galhos de *C. reticulata* Ducke foram solubilizadas em metanol e submetidas à microdiluição nas seguintes concentrações: 500 µg/mL; 250 µg/mL; 125 µg/mL; 62,5 µg/mL; 31,25 µg/mL e 15,625 µg/mL.

Foram utilizadas placas de 96 poços pré-dosificadas, com 10 µL das amostras em diluição seriada e após a evaporação total do metanol foram depositados 190 µL de caldo Müller Hinton, e 10 µL das suspensões de bactérias ou de fungo, totalizando 200 µL em cada poço, cada concentração das amostras foi testada em triplicata, em cada placa foram adicionados os controles negativos e positivo.

Os controles positivos (CP) utilizados para estes ensaios foram a gentamicina para bactérias Gram-negativas, o clorafenicol para bactérias Gram-positivas e a nistatina para *Candida albicans*, onde foi utilizado 180 µL de caldo Müller Hinton + 10 µL da suspensão de microrganismo e 10 µL de controle positivo (gentamicina, clorafenicol ou nistatina) nas mesmas concentrações dos extratos.

Foram utilizados dois controles negativos CN1 onde foram acrescentados em 3 poços utilizados 190 µL de caldo Müller Hinton + 10 µL da suspensão bacteriana ou fúngica e CN2 onde foram acrescentados à 3 poços 10 µL de metanol + 180 µL de caldo Müller Hinton + 10 µL da suspensão bacteriana ou fúngica, visando excluir a possibilidade de interferência do solvente na atividade biológica (Figura 5.) (ELOFF, 1998; BRANDÃO, 2012).

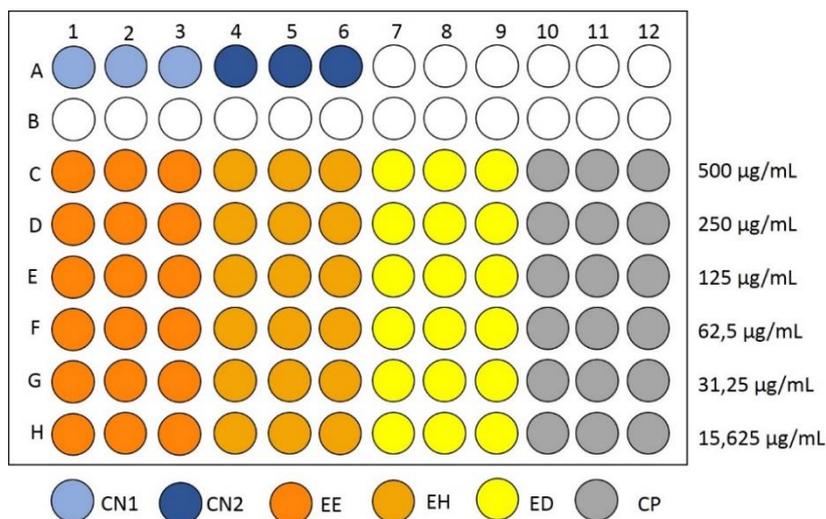


Figura 5. Representação esquemática da atividade antibacteriana de *C.reticulata* Ducke

Legenda: CN1 – Controle Negativo 1: caldo Müller Hinton + 10 µL de suspensão bacteriana; CN2 – Controle Negativo 2: 10 µL de metanol + 180 µL de caldo Müller Hinton + 10 µL da suspensão bacteriana; EE – Extrato Etanólico; EH – Extrato Hexano; ED – Extrato Diclorometano; CP – Controle positivo: Gentamicina.

As microplacas de 96 poços utilizadas no ensaio foram incubadas em estufa bacteriológica por 24 horas e após esse período foi realizada a leitura da densidade óptica em Leitor de ELISA em comprimento de onda de 570 nm, os resultados das absorbâncias foram tabulados e analisados em Excel e a Concentração Inibitória 50% foi determinada utilizando a ferramenta IC50 calculator.¹

Para a classificação da atividade antimicrobiana dos extratos foram adotados os parâmetros de Holetz e colaboradores (2002), onde a atividade antimicrobiana de uma amostra é classificada com alta atividade quando concentração inibitória mínima (CIM) < 100 µg/mL; moderada atividade quando a CIM está entre 100 a 500 µg/mL; fraca atividade quando apresenta CIM entre 500 a 1000 µg/mL e a amostra foi considerada inativa quando o CIM > 1000 µg/mL (HOLETZ et al. 2002).

4.2.4. ESTUDOS *IN SÍLICO* PARA PREDIÇÃO DOS ASPECTOS FÍSICO-QUÍMICOS, FARMACOCINÉTICOS, ATIVIDADES BIOLÓGICAS E TOXICIDADES

As propriedades moleculares físico-químicas foram calculadas na plataforma Molinspiration Cheminformatics®, um software de quimioinformática que fornece ferramentas de processamento e manipulação de molécula. Foram calculados parâmetros físico-químicos estabelecidos pelas regras de Lipinski e Veber: Partição octanol/água: $\log P \leq 5$; área de superfície topológica $\leq 140\text{Å}$, massa molar (MM) $\leq 500\text{Da}$; aceptores de ligação de hidrogênio (nALH) ≤ 10 ; número de grupos de doadores de hidrogênio (nDLH) ≤ 5 ; número de ligações rotacionáveis (nROTB) ≤ 10 (LIPINSKI et al., 1997; VEBER et al., 2002).

Parâmetros farmacocinéticos como a absorção, distribuição e metabolismo foram preditos utilizando o software PreADMET, os critérios para avaliação dos resultados foram os estipulados pelo servidor online: Absorção Intestinal Humana (AIH): 0-20% baixa absorção, 20-70% moderada absorção, > 70% elevada absorção (YEE, 1997); Permeabilidade em células Caco2 e MDCK: baixa permeabilidade < 4

¹ IC50 calculator é uma ferramenta que pode ser encontrada no site: <https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator>.

nm/sec, média permeabilidade 4-70 nm/sec e alta permeabilidade > 70 nm/sec (YAZDANIAN, 1998, FILIMONOV et al., 2014); Ligação às proteínas plasmáticas: >90% ligada fortemente e < 90% fracamente ligadas.

A predição de toxicidade foi obtida a partir de dois softwares: PreADMET e Protox. O primeiro avalia a toxicidade em algas, microcrustáceos e peixes, mutagenicidade por meio do teste de Ames e carcinogenicidade em roedores; o segundo avalia dose tóxica em roedores (DL50) e efeitos tóxicos (GOLD et al., 1991; HANSEN et al., 2009; BENTO et al., 2014; SCHREY et al., 2017; BANERJEE; DEHNBOSTELE; PREISSNER, 2018), sendo indicado se positivo (+) ou negativo (-) para cada um dos efeitos.

Os critérios utilizados para a avaliação da toxicidade foram: Toxicidade em algas: tóxico: < 1 mg/L; Não tóxicos: > 1 mg/L (COSTA et al., 2008); Toxicidade em *Daphnia sp.*: tóxico: < 0,22 µg/mL, não tóxico: > 0,22 µg/mL (GULHERMINO et al., 2000); Toxicidade em peixes Medeka e Minnow Muito tóxico: < 1 mg/L; Tóxico: 1-10 mg/L; Prejudiciais: 10-100 mg/L; Não tóxico: > 100 mg/L (ZUNCKER, 1985).

O potencial de atividade antimicrobiana das moléculas foi predito no software *online Prediction of Activity Spectra for Substances (PASS)* por meio de similaridade e o resultado é expresso em intervalo de confiança para o potencial de atividade (Pa) para cada um dos microrganismos analisados. Para avaliação dos resultados foram considerados positivos Pa acima de 0.7 ou seja $Pa \geq 0.7$ (FILIMONOV et al., 2014).

No servidor DockThor na primeira página foi submetido a proteína e então válida pelo mesmo, selecionando a cadeia otimizada, na página seguinte não foram adicionados cofatores uma vez que não se aplicam a nossa análise, na página seguinte a estrutura (1) foi adicionado, validada pelo programa e então foi mantido a livre rotação dos carbonos, por fim, o *grid size* foi adicionado obedecendo as especificações de X:20 Å, Y:20 Å e Z: 20 Å, a pesquisa foi feita pelo algoritmo padrão, com 1.000.000 avaliações, população de 750 em 24 execuções, esse processo foi repetido para cada um dos terpenos.

O resultado da análise forneceu a afinidade, as interações receptor-ligante, bem como a distância e os tipos de ligação que foram observadas no programa Discovery Studio (BIOVIA, 2022). Para a validação do protocolo o ligante original foi submetido a *redocking* no mesmo servidor seguindo os passos descritos acima, foi considerado válido o protocolo quando o RMSD (Root-mean-square deviation) obtido não ultrapassou 2,5 Å (ALMEIDA, 2011; PASCHOAL, 2021).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Estudos fitoquímicos de *Copaifera reticulata*

Os extratos etanólicos foram obtidos de galhos (rendimento Ga= 10,2%) e folhas (Fo= 25,7%). Os pós dos galhos e folhas foram submetidos a maceração com solventes de diferentes polaridades de forma sequencial, sendo obtidos os extratos: hexânico (rendimentos Fo=2,4%; Ga= 1,7%), diclorometano (Fo= 1,49%; Ga= 2,05%), acetato de etila (Fo=1,46%; Ga= 0,75%) e Metanol (Fo= 6,1%; Ga= 5,14%).

Diferentes partes das plantas armazenam classes e concentrações diferentes de constituintes químicos que podem ainda variar de acordo com fatores ambientais (solo, suprimento de água, temperatura, pragas, espécies concorrentes, etc.) e de maneira sazonal, variando com as estações do ano ou até mesmo horas do dia (BLANK et al. 2007; STEFANELLO et al., 2010). Nesse estudo, os extratos com maior rendimento foram os etanólico, hexano, acetato de etila e metanol obtido de folhas. Isso possivelmente ocorre devido os metabolitos majoritários possuírem afinidade com solventes polares, na literatura são descritos mais estudos cujos maiores rendimentos são de extratos mais polares como o extrato hidroalcolico e etanólico (COSTA, 2016, GONÇALVES et al., 2005).

Na prospecção fitoquímica dos extratos realizado por cromatografia em camada delgada foi observado poucas diferenças entre os extratos obtidos de folhas e galhos (Tabela 1), os resultados sugerem uma maior complexidade química no extrato etanólico de folhas (EEFo).

A classe de metabolitos triterpenos/ esteroides está na constituição de todos os extratos, em análises de CG/MS de amostras não polares de *C. langsdorfii* mostraram prevalência de sesquiterpenos como α -copaeno, α -bergamoteno, β -cariofileno, α -humuleno, óxido de cariofileno, entre outros (BRANCALION et al., 2012). Caracterização fitoquímica de extratos hidroalcolicos e acetato de etila de *C. langsdorfii* apontam flavonóides como a classe majoritária de metabolitos secundários, a diferença entre espécies é um dos fatores que podem influenciar na composição fitoquímica desses extratos, mais estudos com extratos de *C. reticulata* são necessários para estabelecer esta correlação (FURTADO, 2013).

Todos extratos apresentaram resultados (Tabela 1) negativos para alcaloides, cumarinas, geninas antraquinônicas e geninas naftoquinônicas. Os extratos hexano (EHFo), acetato (EAFo) e diclorometano (EAFo) da folha foram positivos para heterosídeos antracênicos. A presença de antraquinonas, terpenos, flavanoides, saponinas e taninos em extratos de folhas de *C. langsdorfii* aponta que espécies diferentes dentro do mesmo gênero podem ter diferenças significativas em sua composição, conseqüentemente podendo modificar as atividades farmacológicas (GONÇALVES et al., 2016).

Geninas e heterosídeos flavônicos (Tabela 1.) foram encontradas nos extratos etanólico (EEFo) e metanólico (EMFo) das folhas, assim como foi positivo para polifenóis nos extratos etanólicos (EEFo e EEGa) e metanólico (EMFo e EMGa) de folhas e galhos. Análises de GC/MS de extratos hidroalcológicos de *C. langsdorfii* e *C. multijuga* apontam que os compostos fenólicos correspondem de 6 a 10% a composição dos extratos, foi possível identificar que flavanoides e ácidos fenólicos (OLIVEIRA et al., 2019; FRANCO, 2013; BRANCALION, 2010), reforçando a hipótese que os extratos deste estudo possam conter estes metabólitos.

Tabela 1. Resultados da prospecção fitoquímica de *Copaifera reticulata*.

Metabólitos	Amostras									
	Folhas					Galhos				
	EE	EH	ED	EA	EM	EE	EH	ED	EA	EM
Triterpenos/ esteroides	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Geninas Flavônicas	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Heterosídeos Flavônicas	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Cumarinas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Saponinas	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Taninos	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+
Polifenóis	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+
Alcaloides	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Heterosídeos Antracênicos	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+
Geninas Antraquinônicas e Naftoquinônicas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: (+) presença; (-) ausência; EE – Extrato Etanólico; EH - Extrato Hexânico; ED – Extrato Diclorometano; EA – Extrato Acetato de Etila; EM – Extrato Metanol.

5.2. Atividade antimicrobiana de *Copaifera reticulata*

Todos os extratos foram submetidos a avaliação da atividade antimicrobiana pelo método da microdiluição e foram considerados ativos os extratos com $CI_{50} \leq 50$ $\mu\text{g/mL}$. Os resultados sugerem que os extratos mais promissores foram: EMGa (ativo em *S. typhi*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*), EEFo (ativo em *S. aureus* e *P. mirabilis*) e EMFo (ativo em *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*; Tabela 2). Os controles negativos, com e sem metanol evaporado, não foram observadas inibição do crescimento microbiano, isso indica que o solvente utilizado para a diluição das amostras não influenciou nos resultados obtidos no teste de sensibilidade.

O EMGa se mostrou muito promissor ($CI_{50} = 2,5$ $\mu\text{g/mL}$) frente à *S. typhi* e nos extratos EAGa ($CI_{50} = 54,97$ $\mu\text{g/mL}$) e EMFo ($CI_{50} = 60,39$ $\mu\text{g/mL}$), foi possível observar alta atividade antibacteriana. Em geral, o efeito antimicrobiano das plantas medicinais e seus metabolitos não são muito pronunciados sob bactérias gram-negativas, porém o extrato etanólico de *C. multijuga* (64 $\mu\text{g/mL}$) observou efeito modulatório de citocinas pro-inflamatórias como IL-6 e IL-8 que são importantes no início e na progressão de doenças infecciosas (CORREIA et al., 2008, MARTÍNEZ, 2022). Logo, além de avaliar o efeito direto na bactéria, é importante submeter estes extratos em modelos animais, como por exemplo de sepse, verificando as possíveis alterações na resposta imune.

Quanto a atividade inibitória frente a *S. aureus* (Tabela 2), os extratos EEFo ($CI_{50} = 1,64$ $\mu\text{g/mL}$) e EMFo ($CI_{50} = 12,18$ $\mu\text{g/mL}$) se mostraram os mais ativos. Essa atividade pode estar relacionada a composição terpenica desses extratos, os sesquiterpenos α - bisabolol, oxido de cariofileno τ -muurolol, α -cadinol, δ -cadinol e trans- α -santalol isolados de *C. reticulata* apresentaram atividade frente a *S. aureus* em relação ao extrato de *C. reticulata* (SANTOS et al., 2020). Quando comparado com os dados descritos em literatura para atividade de extrato de copaíba frente a cepas estafilocócicas, a atividade inibitória de extrato aquoso de *C. langsdorfii* demonstra ser ativo e de maneira concentração dependente, semelhante aos encontrado nesse estudo (BRAGA e SILVA, 2007).

Quando analisado os resultados (Tabela 2) frente à *P. mirabilis*, os extratos EMGa ($CI_{50} = 15,27$ $\mu\text{g/mL}$), EAGa ($CI_{50} = 29,70$ $\mu\text{g/mL}$) e EDFo ($CI_{50} = 66,13$ $\mu\text{g/mL}$), mostraram-se ativos. Apenas o EMG teve atividade inibitória frente à *P. aeruginosa*. Outros estudos com extratos de *Copaifera* demonstram atividade frente a enterobactérias e bacterias gram-negativas, no entanto ainda não é possível relacionar qual substancia presente nos extratos é responsável por esse efeito antibacteriano (LEMOS, 2016).

Neste estudo, o extrato EMFo se mostrou muito promissor frente à *C. albicans* ($CI_{50} = 1,84 \mu\text{g/mL}$; Tabela 2), enquanto que os demais extratos inibiram moderadamente o crescimento deste fungo, o que difere do resultado encontrado em ensaio com oleorresina de *C. officinalis* que não demonstrou inibição do crescimento e adesão de biofilme de *C. albicans* (DEUS et al., 2011; TOBOUTI et al., 2014).

Terpenos isolados da oleorresina de *C. reticulata* (ácido ent-agático; ácido (13E)-ent-labd-8(17)-en-15,18-diólico; ácido ent-poliáltico; ácido ent-caurenóico; ácido colavenico e ácido (13E)-ent-labda-7,13-dien-15-óico) foram avaliados quanto ao potencial antimicrobiano, sendo os mais promissores o ácido (13E)-ent-labda-7,13-dien-15-óico com melhor atividade frente a *Enterococcus faecium* ($CI_{50} = 1,6 \mu\text{g/mL}$) e *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA; $CI_{50} = 2,5 \mu\text{g/mL}$). O ácido ent-poliáltico o terpeno mais promissor frente à dermatofitos ($CI_{50} = 6,8 \mu\text{g/mL}$), *T. rubrum* ($CI_{50} = 4,3 \mu\text{g/mL}$) e *T. mentagrophytes* (BARBOSA et al., 2018). Esses resultados divergentes podem ser relacionados ao fato de serem oleorresinas de diferentes fontes, pois dependendo de fatores ambientais, as plantas produzem diferentes metabólitos que podem influenciar diretamente na atividade, somado a isso, tem o fato de metabólitos secundários analisados serem diferentes entre si (GOBBONETO e LOPES, 2007).

Os extratos de *C. reticulata* foram testados quanto seu potencial antimicrobiano e os EMGa, EMFo e EEFo mostraram mais promissores, sendo também os extratos com maior complexidade química, provavelmente, possuem em sua composição triterpenos, geninas flavônicas, heterosídeos flavônicos, polifenóis e saponinas. Resultado semelhante foi encontrado em prospecção fitoquímica realizada em extrato de folhas de *C. langsdorfii* onde foram encontrados metabólitos secundários das classes triterpenos e esteroides, flavonóides, saponinas e taninos (GONÇALVES; MIRANDA e ARAÚJO, 2016).

As diferenças entre as atividades inibitórias dos extratos podem se justificar pela complexidade da composição terpenica nos mesmos, os sesquiterpenos são relacionados à atividade antimicrobianas de extratos e oleorresina de *Copaifera* e outros gêneros, estudo avaliou o potencial antibacteriano de extratos de *Copaifera* e terpenos isolados, de modo que os extratos foram moderadamente ativos frente a *S. aureus* e os terpenos isolados como sesquiterpenos β -cariofileno, α -humuleno, α -copaeno, δ -cadineno, oxido de cariofileno, β -elemeno não apresentaram atividade

antibacteriana frente a essa cepa, sendo então considerados não ativos (RIBEIRO, 2017).

Tabela 2. Atividade antimicrobiana dos extratos de *C. reticulata*.

Extratos	Cl ₅₀ (µg/mL) + DP				
	<i>S. typhi</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
EEGa	1402 ± 0,08	1550± 0,06	1514±0,04	168 ± 0,03	132 ± 0,07
EHGa	175 ± 0,05	213 ± 0,03	219 ± 0,09	194 ± 0,07	132 ± 0,07
EDGa	266 ± 0,07	263 ± 0,05	536 ± 0,05	1780 ± 0,09	206 ± 0,08
EAGa	55 ± 0,03	155 ± 0,07	29 ± 0,02	670 ± 0,02	647 ± 0,07
EMGa	2,50 ± 0,003	145 ± 0,02	15 ± 0,02	3,3 ± 0,005	19 ± 0,001
EEFo	392 ± 0,09	1,64 ± 0,09	27 ± 0,09	310 ± 0,05	294, ± 0,04
EHFo	271 ± 0,02	266± 0,08	149± 0,07	272 ± 0,04	160 ± 0,04
EDFo	558 ± 0,01	657 ± 0,07	66 ± 0,01	775 ± 0,09	523 ± 0,015
EAFo	176 ± 0,06	176 ± 0,09	127 ± 0,09	91,77 ± 0,07	1934 ± 0,06
EMFo	60 ± 0,001	12 ± 0,02	234±0,002	38,86 ± 0,006	1,84 ± 0,01

Legenda. EEFo: Extrato Etanólico de Folhas; EHFo: Extrato Hexânico de Folhas; EDFo: Extrato Diclorometano de Folhas; EAFo: Extrato Acetato de Etila de Folhas; EMFo: Extrato Metanólico de Folhas; EEGa: Extrato Etanólico de Galhos; EHGa: Extrato Hexânico de Galhos; EDGa: Extrato Diclorometano de Galhos; EAGa: Extrato Acetato de Etila de Galhos; EMGa: Extrato Metanólico de Galhos; D.P: Desvio Padrão.

5.3. Estudos *in silico* para predição dos aspectos físico-químicos, farmacocinéticos, atividades biológicas e toxicidades

De acordo com a prospecção fitoquímica, a classe mais amplamente distribuída nos extratos foram os terpenos e, por isso, esta foi selecionada para os estudos *in silico*. Então, foi realizada uma pesquisa na base de dados Pubchem e todos os terpenos isolado da espécie disponíveis foram incluídos no estudo, totalizando 12 moléculas (Figura 6).

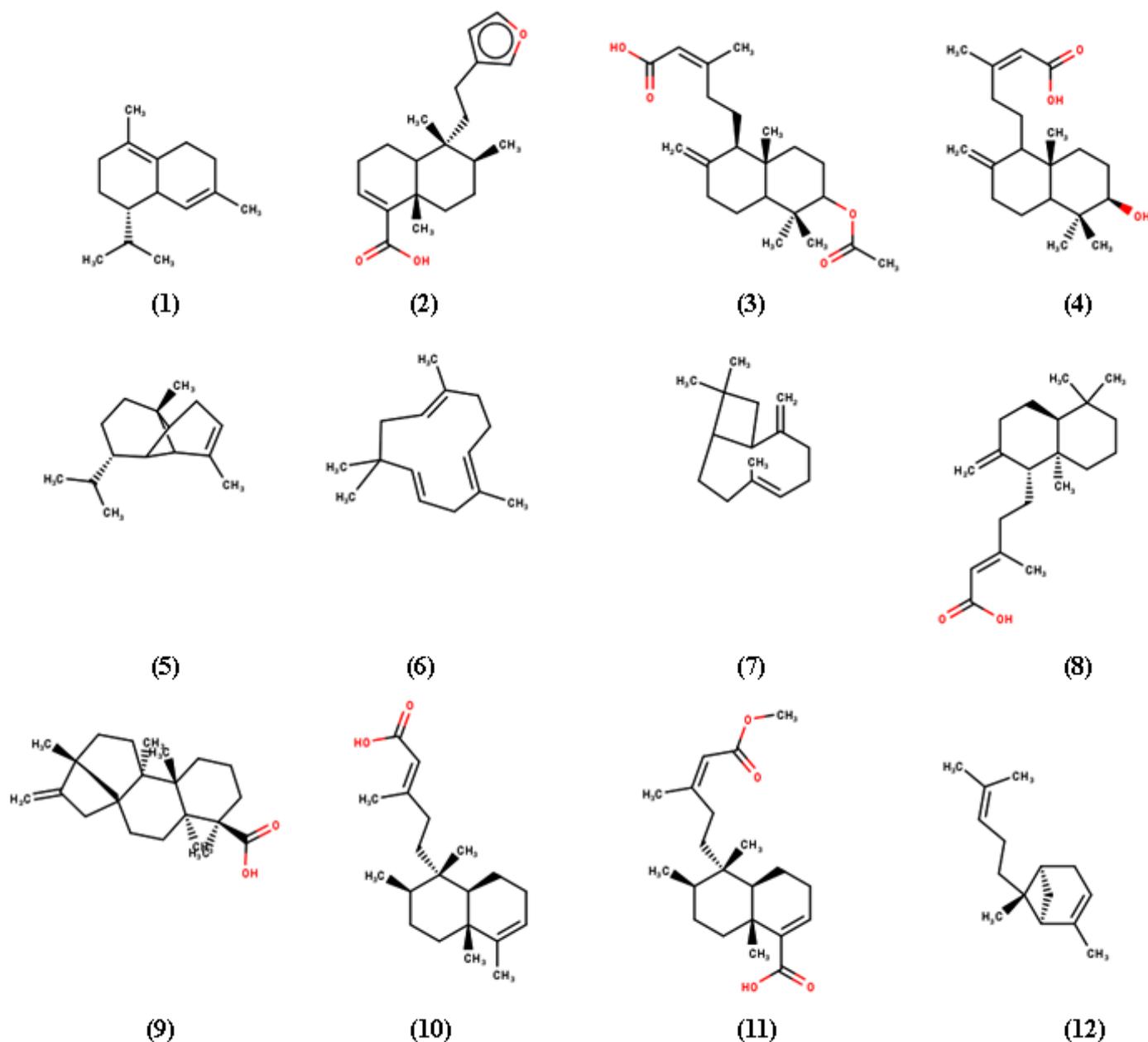


Figura 6. Moléculas de *Copaifera reticulata*

Legenda: (1) (+)-delta-cadineno; (2) (+)- Ácido hardwíickico; (3) Ácido 3-acetoxi-copálico; (4) Ácido 3-hidroxi-copálico; (5) α -copaeno; (6) α -humuleno; (7) β -cariofileno; (8) Ácido copálico; (9) Ácido caurenóico; (10) Ácido covalenico; (11) Ester colavico-15-metil; (12) trans- α -Bergamoteno.

Dentre os terpenos analisados 2, 4, 6 e 11 não violaram nenhum critério estabelecido pela regra de Lipinski (Tabela 3), os demais terpenos violaram as regras no parâmetro solubilidade (LogP). Baseado nestes resultados pode-se sugerir que são bons candidatos a fármacos, pois características físico-químicas interferem em aspectos farmacocinéticos e farmacodinâmicos, e a regra de Lipinski ou regra dos 5

(R05) estabelece parâmetros aceitáveis para 4 aspectos físico-químicos importante para a biodisponibilidade de fármacos via oral (LIPINSKI et al., 1997).

Além da R05, as substâncias foram submetidas a análises utilizando a regra Br05 (*beyond rule of five*), onde todas as substâncias possuíam a área de superfície polarizada topológica dentro do preconizado, apenas 3 e 11 violaram o número de ligações rotacionáveis (Tabela 3.). Sabe-se que para uma molécula interagir com seu alvo terá que adotar uma conformação fixa e para passar pela membrana, sendo que um número elevado rotacional pode interferir nestes processos.

Em suma, os resultados preditos para os parâmetros físico-químicos sugerem uma elevada probabilidade de boa absorção no trato gastrointestinal e permeação através das membranas biológicas (SANTOS; GONSALVES e ARAÚJO, 2018). Deste modo, deve-se dar uma maior atenção as moléculas que se seguiram todos os critérios estabelecidos pelas duas regras (ROSA; ESTEVES; BULLA e SILVA, 2022).

Tabela 3. Aspectos físico-químicos de moléculas

Mol	R05					Br05	
	LogP	MM	nALH	nDLH	TPSA	nROTB	Volume
1	5,18	204,36	0	0	0,00	1	229,72
2	4,06	301,41	3	1	50,44	4	296,15
3	5,13	362,51	4	1	63,60	6	368,18
4	4,42	320,47	3	2	57,53	4	331,66
5	5,75	204,36	0	0	0,00	1	224,82
6	4,13	220,36	1	1	20,23	1	242,82
7	5,17	204,36	0	0	0,00	1	242,26
8	5,57	304,47	2	1	37,30	4	323,62
9	6,67	302,46	2	1	37,30	4	308,33
10	5,62	304,47	2	1	37,70	4	323,06
11	4,87	348,48	4	1	63,60	6	351,03
12	5,45	204,36	0	0	0,00	3	229,40

Legenda: LogP (coeficiente de partição óleo-água): ≤ 5 ; MM (massa molar): ≤ 500 Da; nALH (grupos aceptores de ligação de hidrogênio): ≤ 10 ; nDLH (número de grupos de doadores de hidrogênio): ≤ 5 ; TPSA (área de superfície polarizada topológica): $\leq 140\text{Å}$; nROTB (número de ligações rotacionáveis): ≤ 10 ; Volume: 200 a 1000. (1) (+)-delta-cadineno; (2) (+)- Ácido hardwíckico; (3) Ácido 3-acetoxi-copálico; (4) Ácido 3-hidroxi-copálico; (5) α -copaeno; (6) α -humuleno; (7) β -cariofileno; (8) Ácido copálico; (9) Ácido caurenóico; (10) Ácido covalenico; (11) Ester colavico-15-metil; (12) trans- α -Bergamoteno.

Todas as moléculas, apresentaram de moderada a alta permeabilidade quando analisadas no modelo de MDCK (Tabela 4), sugerindo que estas substâncias podem ter uma boa permeabilidade celular (IRVINE et al., 1999, YAZDANIAN et al., 1998; DEZANI, 2017). Estudos mostram a relação da massa molecular com a baixa absorção em células MDCK e a capacidade de formar ligações externas de hidrogênio

dificultando sua absorção epitelial (CHEN; SINGH; KITTS, 2020), o que corrobora o achado nesse estudo onde as moléculas de baixo peso moléculas e com poucos grupos aceptores e grupos doadores de hidrogênio apresentaram alta absorção no modelo celular MDCK.

A permeabilidade em Caco-2 foi moderada para todas as moléculas estudadas (Tabela 4). Resultados similares foram encontrados em estudo de permeabilidade celular com células Caco-2, ácidos diterpênicos demonstraram baixa permeabilidade (MAURO et al., 2019). Quando analisado isoladamente, o ácido ent-poliático apresentou baixa permeabilidade em experimento com células Caco-2 sem agitação, não ocorrendo transporte reverso (ARAÚJO, 2020), entretanto, este tipo de análise não é possível realizar no programa utilizado.

Quando se avaliou a HIA, os resultados sugerem que a absorção intestinal é alta (Tabela 4), sugerindo que estes compostos podem ser administrados por via oral, podendo ter uma boa biodisponibilidade (ARTURSSON; PALM e LUTHMAN, 2001; WANG, 2017; CHEN; SINGH e KITTS, 2020).

Todas moléculas apresentaram elevado potencial de ligação a proteínas plasmáticas (Tabela 4), sendo que esta elevada ligação pode interferir na distribuição dos fármacos pelo organismo. Além disso, a ligação com a albumina, proteínas plasmáticas, pode estar relacionada a interação medicamentosa farmacocinética (FIORI, 2016; VASCONCELOS, 2019), isto é, quando administra-se simultaneamente dois fármacos que se ligam a esta proteína podem competir pelo sítio de ligação, sendo alterada a relação fração livre- fração ligada e a distribuição deste fármaco.

Em relação a BHE, as substâncias 2, 3 e 11, provavelmente, atravessam moderadamente a fracamente (Tabela 4), sendo seus efeitos principalmente periféricos. Vários fatores podem influenciar para a distribuição para o SNC, tais como forte ligação a proteínas plasmáticas (VASCONCELOS, 2019), massa, massa molecular e lipofilicidade e no presente estudo parece que a ligação a proteína plasmática pode ter influenciado negativamente nesta distribuição.

Na predição de metabolismo mostrou que todas as moléculas são metabolizadas pela CYP3A4 (Tabela 4), que também é a responsável pela metabolização de cerca de 50% dos fármacos utilizados na prática clínica (BRAZ et al., 2018). Entretanto, estas substâncias inibem, principalmente, as isoformas CYP2C19 e CYP2C9 (Tabela 4), que também podem metabolizar fármacos. Caso seja associada a substância seja associada a um fármaco metabolizado por estas

isoformas podem reduzir o seu metabolismo, sendo uma das principais formas de interações medicamentos (ROSA; ESTEVES; BULLA; SILVA, 2022).

Tabela 4. Aspectos farmacocinéticos e farmacodinâmicos das moléculas

Mol	Absorção		Distribuição			Metabolismo	
	MDCK (nm/sec)	Caco-2	HIA (%)	PP (%)	BHE	Fase 1	Inibição
1	MP	MP	AA	FORTE	LIVRE	CYP 3A4	CYP 2C19; CYP 2C9
2	AP	MP	AA	FORTE	MOD	CYP 3A4	CYP 2C9; CYP 3A4
3	MP	MP	AA	FORTE	MOD	CYP 3A4	CYP 2C9; CYP 3A4
4	MP	MP	AA	FORTE	LIVRE	CYP 3A4	CYP 2C9; CYP 3A4
5	MP	MP	AA	FORTE	LIVRE	CYP 3A4	CYP 2C9
6	MP	MP	AA	FORTE	LIVRE	CYP 3A4	CYP 2C19; CYP 2C9
7	MP	MP	AA	FORTE	LIVRE	CYP 3A4	CYP 2C19; CYP 2C9
8	AP	MP	AA	FORTE	LIVRE	CYP 3A4	CYP 2C9; CYP 3A4
9	AP	MP	AA	FORTE	LIVRE	CYP 3A4	CYP 2C9; CYP 3A4
10	AP	MP	AA	FORTE	LIVRE	CYP 3A4	CYP 2C9
11	MP	MP	AA	FORTE	MOD	CYP 3A4	CYP 2C9
12	MP	MP	AA	FORTE	LIVRE	CYP 3A4	CYP 2C9

Legenda: MDCK – *Madin-Darby Canine Kidney*; Caco-2 – células de adenocarcinoma de cólon humano; HIA – Human intestinal absorption; PP – proteína plasmática; BHE – barreira hematoencefálica; CYP – citocromo P450. Parâmetros: MDCK e Caco-2: > 70 nm/sec alta permeabilidade (AP), 4-70 nm/sec média permeabilidade (MP), < 4 nm/sec baixa permeabilidade (BP) (Yazdaniyan, *et al.*, 1998); HIA 0-20% baixa absorção (BA), 20-70% moderada absorção (MA), > 7% alta absorção (AA); ligação a PP: > 90% ligado fortemente à albumina (FORTE); < 90% ligação de moderada a fraca à albumina (MOD) (Preadmet, 2021); BHE: > 2,0 atravessa livremente (LIVRE), 2,0-0,1 atravessa de forma moderada a fraca (MOD), < 0,1 atravessa de forma fraca ou não atravessa (FRACO) (Ajay, *et al.*, 1999). (1) (+)-delta-cadineno; (2) (+)- Ácido hardwiickico; (3) Ácido 3-acetoxi-copálico; (4) Ácido 3-hidroxi-copálico; (5) α -copaeno; (6) α -humuleno; (7) β -cariofileno; (8) Ácido copálico; (9) Ácido caurenóico; (10) Ácido covalenico; (11) Ester colavico-15-metil; (12) trans- α -Bergamoteno.

Todos compostos analisados tiveram resultados sugestivos de toxicidade em algum modelo de predição (Tabela 5), entretanto é recomendável que o efeito tóxico avaliado para mais de uma espécie representativa da biota aquática, pertencentes a diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar, pois dessa forma conseguimos analisar efeitos da toxicidade aguda e crônica, além da acumulação e efeitos tóxicos (FERREIRA; BRANDÃO e DOLABELA, 2020). Entrementes, espera-se que os

compostos sejam tóxicos aos primeiros níveis, mas não aos demais, pela complexidade desses organismos.

A predição apontou que todos os terpenos analisados foram tóxicos para algas e *Daphnia* (Tabela 5). Estas toxicidades podem se relacionar as propriedades físico-químicas, principalmente com o logP e o TPSA, moléculas muito lipofílicas e valores baixos para TPSA tem 2.5 vezes mais chances de serem consideradas tóxicas. Existem parâmetros que estabelecem que, idealmente, uma molécula para apresentar menor toxicidade possua TPSA menor que 75 Å e logP maior que 3, de modo que a presença de apenas um desses fatores indica aumento moderado da toxicidade (HUGHES et al., 2008).

Em relação a toxicidade em peixes, as substâncias parecem ser muito tóxicas e somente as moléculas 8 e 9 devem ser prejudiciais a *Minnow*. Os efeitos muito tóxicos preditos aos peixes podem estar ocorrendo por uma dupla exposição a esses compostos, a primeira pelo contato direto com eles pela respiração branquial, no momento em que a água passa pelas brânquias ela deposita os componentes da mesma, iniciando uma resposta a esses xenobióticos, e, um segundo momento, quando esses peixes se alimentam de algas ou crustáceos causando injurias nos órgãos e tecidos internos destes animais (CHAGAS et al., 2022).

A avaliação de citotoxicidade indicou que as moléculas 1, 5, 7, 9, e 10 não devem apresentar potencial citotóxico (Tabela 5), sendo um aspecto muito positivo quando se deseja um novo fármaco. Entretanto, é importante avaliar a genotoxicidade e mutagenicidade.

Somente as moléculas 3 e 5 apresentaram potencial de mutagênico pelo teste de ames, ambas com capacidade de mutar uma cepa de *S. typhi*. Terpenos possuem a capacidade sequestrar radicais livres promovendo uma ação antioxidante nesse sentido, era esperado que os mesmos não promovessem ação mutagênica, e, ao contrário, proporcionassem a proteção gênica. Nesse sentido, os resultados observados no teste de ames estão ressoantes com a literatura, exceto as 3 e 5 (MOYANO et al., 2012; DESTRYANA et al., 2014; ARAÚJO et al., 2020).

Quanto a carcinogenicidade, todas as moléculas foram carcinogênicas para camundongos e somente as moléculas 5, 7 e 9 não foram carcinogênicas para ratos, apenas as moléculas 1, 5 e 12 apresentaram a carcinogenicidade como um ponto final toxicológico. Foram usados dois servidores para essa análise e obtidos resultados dissonantes no servidor preADMET somente as moléculas 5, 7 e 9 foram preditas não

carcinogênicas enquanto que no servidor ProTOX as moléculas 1, 5 e 12 são consideradas não carcinogênicas (Tabela 5). Baseado nestes resultados pode-se sugerir que a substância mais promissora é a 5, pois esta, teoricamente, não tem capacidade induzir alterações que resultam em câncer.

Tabela 5. Predição de toxicidade de terpenos de *C. reticulata*

Mol	PROTOX								PROTOX Carcino
	Algas	Daphnia	Peixes		Citotoxi	Mutagen AMES	Carcinogenicidade		
			Medeka	Minnow			Rato	Camundongo	
1	TOX	TOX	MT	MT	NC	NM	+	+	+
2	TOX	TOX	MT	MT	C	NM	+	+	-
3	TOX	TOX	MT	MT	C	M(1)	+	+	-
4	TOX	TOX	MT	MT	C	NM	+	+	-
5	TOX	TOX	MT	MT	NC	M(1)	-	+	+
6	TOX	TOX	MT	MT	C	NM	+	+	-
7	TOX	TOX	MT	MT	NC	NM	-	+	-
8	TOX	TOX	MT	PREJ	C	NM	+	+	-
9	TOX	TOX	MT	PREJ	NC	NM	-	+	-
10	TOX	TOX	MT	MT	NC	NM	+	+	-
11	TOX	TOX	MT	MT	C	NM	+	+	-
12	TOX	TOX	MT	MT	C	NM	+	+	+

Legenda: Teste Algas: < 1mg/L tóxico, > 1mg/L não tóxico (NT; Costa, et al., 2008); Teste Daphnia: < 0,22 µg/mL tóxico, > 0,22 µg/mL não tóxico (NT; Guilhermino, et al., 2000); Teste em peixes Medeka e Minnow: < 1mg/L muito tóxico (MT), 1-10 mg/L tóxico, 10-100 mg/L prejudicial (PREJ) e > 100mg/L não tóxico (NT; Zuncker, 1985). NC: Não citotóxico, C: citotóxico; NM: não mutagênico, M: mutagênico; M (0/1/2/3): número de cepas de Salmonella que foram positivas; (+) carcinogênico, (-) não carcinogênico. (1) (+)-delta-cadineno; (2) (+)- Ácido hardwickico; (3) Ácido 3-acetoxi-copálico; (4) Ácido 3-hidroxi-copálico; (5) α-copaeno; (6) α-humuleno; (7) β-cariofileno; (8) Ácido copálico; (9) Ácido caurenóico; (10) Ácido covalenico; (11) Ester colavico-15-metil; (12) trans-α-Bergamoteno.

Fonte: Autores.

Quando avaliada a atividade antibacteriana, os terpenos 3, 7, 8, 11 e 12 se mostraram mais promissores inibindo ao menos oito cepas bacterianas entre bactérias gram-positivas, gram-negativas e Mycobacterium (Tabela 6). A predição das atividades antibacterianas demonstrou que os terpenos de *C. reticulata* são promissores frente a bactérias gram-positivas, gram-negativas e Mycobacterium. O composto 7 foi o que apresentou melhor atividade frente a bactérias gram negativas, sendo ativo em todas testadas. O composto 11 foi mostrou maior ação sobre baterias gram-positivas. Resultados similares foram encontrados para o óleo essencial de *O. gratissimum* L. composto majoritariamente por terpenos, sendo o β-cariofileno e o α-humuleno os constituintes com maior percentual, demonstrou atividades antimicrobianas frente às *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *K. pneumoniae* linhagens padrão e multirresistente (CALDAS, 2011). O mecanismo pelo qual os terpenos

desempenham sua atividade antibacteriana parece estar relacionado a alterações na permeabilidade da membrana sem lise celular (NOGUEIRA, 2019).

Tabela 6. Atividade antibacteriana de terpenos de *C. reticulata*

Bactéria	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Microorganismos gram-positivos												
<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-
<i>Kocuria rhizophila</i>	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
<i>Micrococcus luteus</i>	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-
<i>Staphylococcus simulans</i>	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+
Resistente												
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>Staphylococcus sciuri</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+
<i>Staphylococcus simulans</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+
<i>Streptococcus mutans</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+
Microorganismos gram-negativos												
<i>Prevotella melaninogenica</i>	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-
<i>Prevotella oralis</i>	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+
<i>Prevotella intermedia</i>	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+
Mycobacterium												
<i>Mycobacterium marinum</i>	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-

Legenda: (1) (+)-delta-cadineno; (2) (+)- Ácido hardwíickico; (3) Ácido 3-acetoxi-copálico; (4) Ácido 3-hidroxi-copálico; (5) α -copaeno; (6) α -humuleno; (7) β -cariofileno; (8) Ácido copálico; (9) Ácido caurenóico; (10) Ácido covalenico; (11) Ester colavico-15-metil; (12) trans- α -Bergamoteno. (+): presença de atividade bactericida ou bacteriostática (-): ausência de atividade bactericida ou bacteriostática

5.4. Docagem molecular de terpenos de *C. reticulata*

Outro objetivo deste estudo foi verificar se os terpenos podem atuar como adjuvantes farmacêuticos atuando na bomba responsável pela extrusão ativa do fármaco do interior da bactéria. Neste contexto, foi realizado uma análise *cross-docking* tendo como alvo o transportador MsbA um gene resistente, expresso aqui em *Escherichia coli*, que pertence à família-B dos transportadores ATP-binding cassette (ABC) que faz com que o transporte de LPS ocorra de forma unidirecional pela hidrólise do ATP por meio dos domínios de ligação de nucleotídeos intracelulares (NBDs) (LOCHER 2016; HO et al., 2018).

Como demonstrado pela Tabela 7, todos os compostos se ligaram a macromolécula expressando afinidade negativa sendo as moléculas 4, 8, 12 e 1 as que apresentaram melhor afinidade com o MsbA. A energia para todos os ligantes foi

positiva, entretanto podemos observar que de modo semelhante o inibidor cristalizado junto à proteína também apresentou energia positiva quando submetido ao *re-docking* e seu RMSD foi de 0.7 Å. A afinidade do Dockthor é dada pela pose de encaixe a partir da energia total baseada no campo de força MMFF94S, e como visto, para todos os ligantes foi positiva, isso indica que as moléculas estão pouco estáveis no sítio de ligação (WANG et al., 2016).

Tabela 7. Afinidade de ligação entre as moléculas e MsbA

Composto	Afinidade	E. total	VwV	RMSD Å
1	-8.936	29.819	-21.675	NDA
2	-8.158	58.170	-16.245	NDA
3	-7.581	56.915	-10.579	NDA
4	-9.554	69.464	-23.703	NDA
5	-8.887	30.878	-18.130	NDA
6	-8.897	113.178	-20.450	NDA
7	-8.840	33.218	-16.451	NDA
8	-9.244	59.123	-8.682	NDA
9	-7.406	129.563	-8.087	NDA
10	7.798	53.770	-13.988	NDA
11	-7.517	47.955	-14.100	NDA
12	-8.973	23.699	-21.536	NDA
Inibidor G092	-10.633	72.191	-34.317	0.70

Legenda: VwV: forças de Van der Wals; RMSD: do inglês (root mean square deviation); NDA: não se aplica; (1) (+)-delta-cadineno; (2) (+)- Ácido hardwiickico; (3) Ácido 3-acetoxi-copálico; (4) Ácido 3-hidroxi-copálico; (5) α -copaeno; (6) α -humuleno; (7) β -cariofileno; (8) Ácido copálico; (9) Ácido caurenóico; (10) Ácido covalenico; (11) Ester colavico-15-metil; (12) trans- α -Bergamoteno.

Observando os tipos de ligação que são feitas entre os ligantes com a macromolécula, os ligantes fazem principalmente interações do tipo Alquil, que são interações hidrofóbicas, em distâncias que variam entre 3.24-5.49 Å. Por mais que a ancoragem tenha demonstrado que o complexo molécula-MsbA pareça pouco estável, outras interações observadas, também hidrofóbicas, entretanto em menor distância, como pontes convencionais de hidrogênio, π -Alquil e π - σ (Quadro 2). Estas diferentes ligações parecem colaborar para a estabilidade e ligação das moléculas, incluindo do inibidor, com o sítio ativo da macromolécula assim gerando uma resposta efetiva (ZHANG et al., 2022).

Quadro 2. Interações entre os ligantes e os resíduos de aminoácidos

Moléculas	Aminoácidos	Tipo de ligação	Distância
1	MET A: 292	Alquil	4.28
	MET A: 292	Alquil	4.89
	MET A: 292	Alquil	5.28
	ALA A: 256	Alquil	3.65

	ALA	A:	256	Alquil	4.69
	ALA	A:	256	Alquil	4.69
	ILE	A:	179	Alquil	4.69
	ILE	A:	179	Alquil	5.46
	LEU	A:	295	Alquil	4.99
	LEU	A:	295	Alquil	4.51
	VAL	A:	175	Alquil	5.05
2	ILE	A:	169	Pi-Alquil	4.58
	ILE	A:	179	Alquil	5.39
	PHE	A:	154	Alquil	4.99
	ALA	A:	172	Alquil	3.92
	ALA	A:	172	Alquil	4.74
	LEU	A:	295	Pi-Sigma	3.82
	SER	A:	176	Pi-H	2.93
3	ARG	A:	180	-H	1.67
	SER	A:	176	-H	3.70
	ALA	A:	172	Alquil	4.86
	PRO	A:	173	Pi-Alquil	3.90
	ILE	A:	150	Pi-Alquil	4.51
	LEU	A:	295	Pi-Alquil	4.58
	LEU	A:	295	Pi-Alquil	5.09
	PHE	A:	154	Pi-Alquil	5.13
	PHE	A:	154	Pi-Alquil	5.25
4	ALA	A:	172	Alquil	4.14
	ALA	A:	256	Alquil	4.27
	ALA	A:	256	Alquil	5.41
	MET	A:	292	Alquil	4.44
	MET	A:	292	Alquil	5.31
	LYS	A:	296	Alquil	4.73
	ILE	A:	179	Alquil	3.88
	VAL	A:	175	Alquil	4.75
	LEU	A:	168	Alquil	3.73
	LEU	A:	295	Alquil	4.47
	LEU	A:	295	Alquil	5.26
5	ALA	A:	172	Alquil	3.68
	ALA	A:	172	Alquil	5.04
	ALA	A:	256	Alquil	3.97
	ALA	A:	259	Alquil	5.17
	VAL	A:	175	Alquil	4.96
	VAL	A:	175	Alquil	4.70
	LEU	A:	168	Alquil	5.24
	LEU	A:	168	Alquil	4.05
	LEU	A:	168	Alquil	4.17
	LEU	A:	260	Alquil	4.59
	LEU	A:	295	Alquil	4.48
	LEU	A:	295	Alquil	4.04
	ILE	A:	179	Alquil	5.01
	PHE	A:	154	Alquil	5.28
6	LEU	A:	168	Alquil	4.43
	LEU	A:	168	Alquil	4.60
	LEU	A:	260	Alquil	4.12
	LEU	A:	295	Alquil	4.29
	LEU	A:	295	Alquil	4.80
	LEU	A:	295	Alquil	4.86
	ALA	A:	172	Alquil	3.24
	ALA	A:	172	Alquil	5.42
	ALA	A:	256	Alquil	4.30
	ALA	A:	256	Alquil	4.38
	ALA	A:	256	Alquil	5.44
	ALA	A:	259	Alquil	4.08

	MET	A:	292	Alquil	4.75
	VAL	A:	175	Alquil	5.35
7	ALA	A:	172	Alquil	4.04
	ALA	A:	172	Alquil	4.73
	ALA	A:	256	Alquil	3.29
	ALA	A:	256	Alquil	5.26
	LEU	A:	168	Alquil	4.46
	LEU	A:	295	Alquil	3.96
	LEU	A:	295	Alquil	4.54
	LEU	A:	295	Alquil	5.07
	LEU	A:	295	Alquil	5.48
	ILE	A:	179	Alquil	4.58
	MET	A:	292	Alquil	4.61
	MET	A:	292	Alquil	5.02
	VAL	A:	175	Alquil	4.28
8	ARG	A:	187	-H	2.75
	LYS	A:	296	-H	2.03
	LYS	A:	296	-H	2.46
	ASN	A:	300	-H	2.55
	LYS	A:	296	Alquil	4.15
	ALA	A:	172	Alquil	3.91
	ALA	A:	256	Alquil	3.08
	ALA	A:	256	Alquil	4.11
	ALA	A:	256	Alquil	4.46
	ALA	A:	259	Alquil	3.98
	ILE	A:	179	Alquil	3.48
	ILE	A:	179	Alquil	4.75
	ILE	A:	252	Alquil	4.76
	LEU	A:	168	Alquil	4.12
	LEU	A:	295	Alquil	4.32
	LEU	A:	295	Alquil	4.95
	VAL	A:	175	Alquil	4.16
	VAL	A:	175	Alquil	4.17
	VAL	A:	175	Alquil	4.92
	VAL	A:	175	Alquil	4.96
9	SER	A:	176	-H	1.64
	SER	A:	176	-H	2.51
	ALA	A:	172	-H	2.82
	ALA	A:	172	Alquil	3.56
	ILE	A:	169	Alquil	5.19
	PRO	A:	173	Alquil	5.49
10	SER	A:	176	-H	1.60
	ALA	A:	172	Pi-Alquil	3.78
	ALA	A:	172	Pi-Alquil	4.86
	LEU	A:	295	Pi-Alquil	4.52
	ILE	A:	169	Pi-Alquil	4.42
	PHE	A:	154	Alquil	4.52
	PHE	A:	154	Alquil	4.72
11	ARG	A:	180	-H	1.78
	ARG	A:	180	-H	3.32
	SER	A:	176	-H	2.98
	ALA	A:	172	Alquil	4.48
	ILE	A:	169	Alquil	5.33
	LEU	A:	295	Alquil	4.15
	PRO	A:	173	Alquil	4.14
	PRO	A:	173	Alquil	4.78
12	ALA	A:	172	Alquil	4.68
	ALA	A:	256	Alquil	3.48
	ALA	A:	259	Alquil	5.33
	VAL	A:	175	Alquil	4.22

	VAL	A:	175	Alquil	4.80
	MET	A:	292	Alquil	4.68
	MET	A:	292	Alquil	5.29
	LEU	A:	168	Alquil	4.35
	LEU	A:	168	Alquil	4.50
	LEU	A:	168	Alquil	4.62
	LEU	A:	291	Alquil	4.72
	LEU	A:	295	Alquil	4.85
	LEU	A:	295	Alquil	5.02
	LEU	A:	295	Alquil	5.10
	LEU	A:	295	Alquil	5.30
	ILE	A:	179	Alquil	5.26
	LYS	A:	296	Alquil	4.84
	PHE	A:	154	Alquil	4.83
Inibidor G092	ARG	A:	187	-H	2.31
	LYS	A:	296	-H	2.72
	MET	A:	288	-H	1.78
	ALA	A:	172	Alquil	4.59
	ALA	A:	256	Alquil	3.39
	ALA	A:	259	Alquil	3.77
	VAL	A:	175	Alquil	3.96
	VAL	A:	175	Alquil	5.19
	MET	A:	292	Alquil	5.02
	LEU	A:	168	Alquil	4.30
	LEU	A:	171	Alquil	5.38
	LEU	A:	291	Alquil	5.11
	LEU	A:	295	Alquil	4.12
	LEU	A:	295	Alquil	5.31
	ILE	A:	179	Alquil	3.38
	ILE	A:	168	Pi-Sigma	3.68
	ILE	A:	179	Pi-Sigma	3.88
	LEU	A:	295	Pi-Sigma	3.62

Legenda: -H: Ponte de hidrogênio; (1) (+)-delta-cadineno; (2) (+)- Ácido hardwickico; (3) Ácido 3-acetoxi-copálico; (4) Ácido 3-hidroxi-copálico; (5) α -copaeno; (6) α -humuleno; (7) β -cariofileno; (8) Ácido copálico; (9) Ácido caurenóico; (10) Ácido covalenico; (11) Ester colavico-15-metil; (12) trans- α -Bergamoteno.

Quando se compara as ligações feitas entre o inibidor G092 com as outras moléculas de estudo, com estudo realizado com o inibidor G092 cristalizado na macromolécula MsbA, observa-se o estabelecimento de interações similares (Figura 8). O inibidor G092 faz ligações com os resíduos ALA A: 172, ALA A: 256, ALA A: 259, ARG A: 187, ILE A: 168, ILE A: 179, LEU A: 168, LEU A: 171, LEU A: 291, LEU A: 295, LYS A: 296, MET A: 288, MET A: 292 e VAL A: 175, que são similares as interações encontradas em outro estudo??/ interações de van der Waals com as cadeias laterais TM4 nos resíduos L171, A175 e V178; TM5 nos resíduos A259, L263 e na cadeia TM6 nos resíduos M291 e L294. O anel quinolínico B interage com resíduos das cadeias laterais TM4, TM5 e TM6 e também com o substituinte 2-cloro-6-ciclopropilfenil, conferindo um ajuste da bolsa interna de MsbA ao inibidor (HO et al., 2018).

Quando se compara as interações das substâncias selecionadas ao inibidor G092, em comum, todas as moléculas fazem ligação com o resíduo de LEU A: 295. Vale destacar as moléculas 5, 6 e 12 que além da mesma interação, compartilham com o inibidor interações com ALA A: 172, ALA A: 256, ALA A: 259, LEU A: 168 e VAL A: 175 e pode sugerir que essas moléculas tenham a mesma ação. Quando se relacionada a afinidade dos compostos e energia total (menores energias), pode-se sugerir que o melhor substrato para MsbA é a substância 12 (trans-alfa-bergamoteno) e deve ser priorizada em estudos posteriores.

Dentre os compostos analisados nesse estudo elegemos o composto 12, trans-alfa-bergamoteno, como mais promissor devido compartilhar com G092 similaridade de ligação com muitos resíduos de aminoácidos, além de ter a menor energia de ligação e ser um dos compostos com maior afinidade à proteína entre as moléculas de estudo, diante disso, supomos que o trans- α -Bergamoteno pode agir em MsbA como inibidor de modo semelhante ao G092.

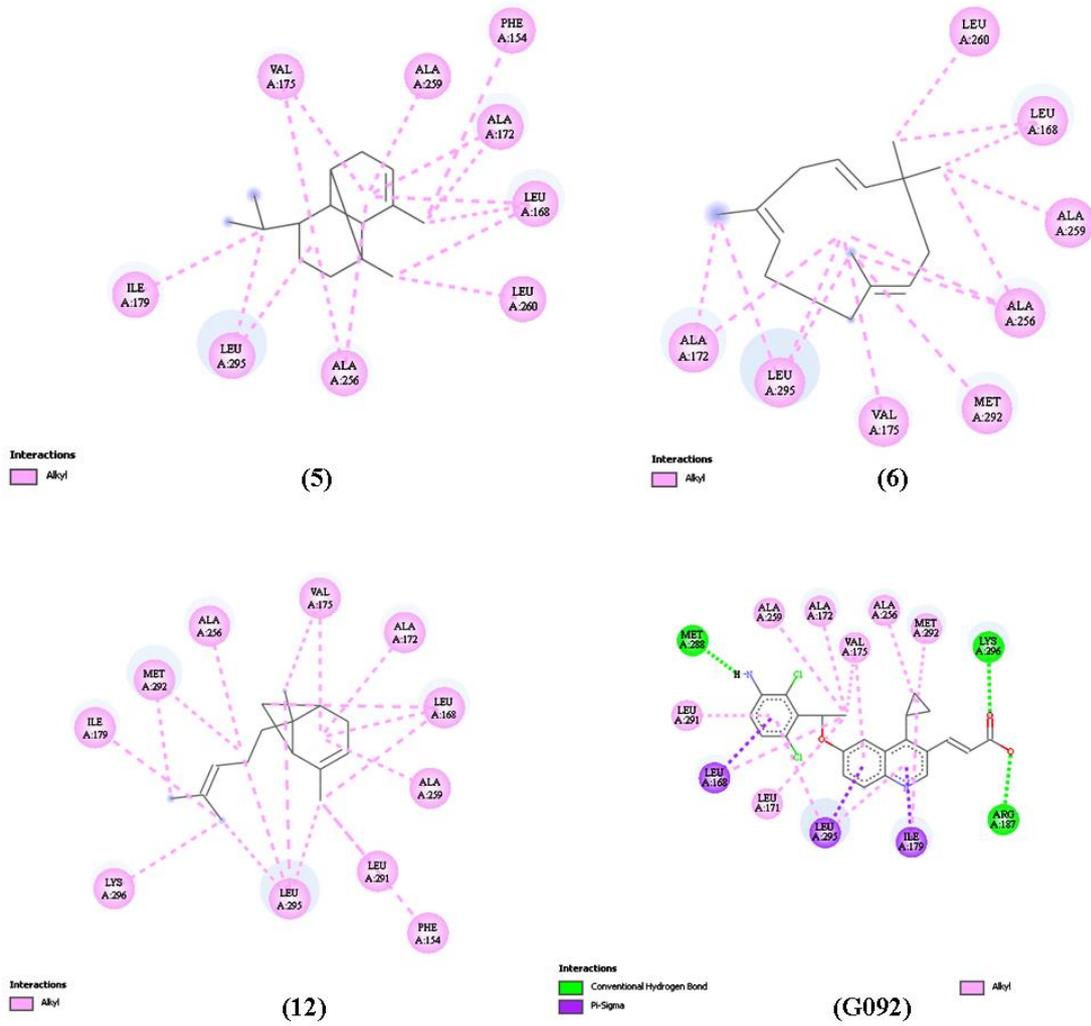


Figura 7. Interações transportador Msba-ligante

Legenda: (5) α -copaeno; (6) α -humuleno; (12) trans- α -Bergamoteno.

6 CONCLUSÃO

Os extratos de *C. reticulata* apresentaram atividade antimicrobiana mais pronunciada frente a cepas Gram-positivas, os extratos mais promissores foram EMGa, EEFo e EMFo ativos em pelo menos tres cepas microbianas. A predição *in silico* demonstrou o potencial antimicrobiano dos terpenos frente a bacterias gram-positivas e gram-negativas. A docagem realizada entre os terpenos e o transportador ABC (cassete de ligação de ATP) MsbA indicou que trans-alfa-bergamoteno é o composto com maior potencial de inibir esse transportador.

REFERENCIAS

HAMPTON, Tracy. Report Reveals Scope of US Antibiotic Resistance Threat. **Jama**, [S.L.], v. 310, n. 16, p. 1661, 23 out. 2013. American Medical Association (AMA). <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2013.280695>. Disponível em: <https://jamanetwork.com/journals/jama/article-abstract/1758742>. Acesso em: 26 out. 2022.

BROWN, Eric D.; WRIGHT, Gerard D.. Antibacterial drug discovery in the resistance era. **Nature**, [S.L.], v. 529, n. 7586, p. 336-343, jan. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature17042>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature17042>. Acesso em: 25 out. 2022.

TANG, Taishan; CHEN, Guoqiang; GUO, Aizhen; XU, Ye; ZHAO, Linli; WANG, Mengrui; LU, Chengping; JIANG, Yuan; ZHANG, Changyin. Comparative proteomic and genomic analyses of *Brucella abortus* biofilm and planktonic cells. **Molecular Medicine Reports**, [S.L.], v. 21, p. 731-743, 17 dez. 2019. Spandidos Publications. <http://dx.doi.org/10.3892/mmr.2019.10888>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6947884/>. Acesso em: 24 out. 2022.

LI, Zhen; ZHANG, Lishan; SONG, Qingli; WANG, Guibin; YANG, Wenxiao; TANG, Huamei; SRINIVASAN, Ramanathan; LIN, Ling; LIN, Xiangmin. Proteomics Analysis Reveals Bacterial Antibiotics Resistance Mechanism Mediated by *ahslyA* Against Enoxacin in *Aeromonas hydrophila*. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 12, 8 jun. 2021. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2021.699415>.

JAKTAJI, Razieh Pourahmad; EBADI, Rayhaneh. Study the Expression of *marA* Gene in Ciprofloxacin and Tetracycline Resistant Mutants of *Escherichia coli*. **Iranian Journal Of Pharmaceutical Research**, [S.L.], v. 12, n. 4, p. 923-928, set. 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24523773/>. Acesso em: 25 out. 2022.

LANKESTER, Anna; AHMED, Shafayeth; LAMBERTE, Lisa E.; KETTLES, Rachel A.; GRAINGER, David C. The *Escherichia coli* multiple antibiotic resistance activator protein represses transcription of the *lac* operon. **Biochemical Society Transactions**, [S.L.], v. 47, n. 2, p. 671-677, 8 mar. 2019. Portland Press Ltd. <http://dx.doi.org/10.1042/bst20180498>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30850424/>. Acesso em: 24 out. 2022.

GONZÁLEZ-BELLO, Concepción. Antibiotic adjuvants – A strategy to unlock bacterial resistance to antibiotics. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [S.L.], v. 27, n. 18, p. 4221-4228, set. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.08.027>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960894X17308284?via%3Dihub>. Acesso em: 20 out. 2022.

KALAN, Lindsay; WRIGHT, Gerard D. Antibiotic adjuvants: multicomponent anti-infective strategies. **Expert Reviews In Molecular Medicine**, [S.L.], v. 13, n. 5, p. 1-17, fev. 2011. Cambridge University Press (CUP).

<http://dx.doi.org/10.1017/s1462399410001766>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21342612/>. Acesso em: 24 out. 2022.

BERNAL, Patricia; MOLINA-SANTIAGO, Carlos; DADDAOUA, Abdelali; LLAMAS, María A. Antibiotic adjuvants: identification and clinical use. **Microbial Biotechnology**, [S.L.], v. 6, n. 5, p. 445-449, 28 fev. 2013. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/1751-7915.12044>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23445397/>. Acesso em: 25 out. 2022.

FARHA, Maya A.; BROWN, Eric D. Discovery of antibiotic adjuvants. **Nature Biotechnology**, [S.L.], v. 31, n. 2, p. 120-122, fev. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.2500>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23392510/>. Acesso em: 22 out. 2022.

WORTHINGTON, Roberta J.; MELANDER, Christian. Combination approaches to combat multidrug-resistant bacteria. **Trends In Biotechnology**, [S.L.], v. 31, n. 3, p. 177-184, mar. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.12.006>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23333434/>. Acesso em: 26 out. 2022.

GILL, Erin E.; FRANCO, Octavio L.; HANCOCK, Robert. E. W.. Antibiotic Adjuvants: diverse strategies for controlling drug :resistant pathogens. **Chemical Biology & Drug Design**, [S.L.], v. 85, n. 1, p. 56-78, 17 dez. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/cbdd.12478>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25393203/>. Acesso em: 22 out. 2022.

CHAKRADHAR, Shraddha. Reservoirs of resistance: to understand why antibiotics fail, geneticists chase the 'resistome'. **Nature Medicine**, [S.L.], v. 22, n. 10, p. 1069-1071, out. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nm1016-1069>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27711055/>. Acesso em: 24 out. 2022.

BUSH, Karen. Synergistic MRSA combinations. **Nature Chemical Biology**, [S.L.], v. 11, n. 11, p. 832-833, 20 out. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nchembio.1935>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nchembio.1935>. Acesso em: 22 out. 2022.

WRIGHT, Gerard D.. Antibiotic Adjuvants: rescuing antibiotics from resistance. **Trends In Microbiology**, [S.L.], v. 24, n. 11, p. 862-871, nov. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2016.06.009>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27430191/>. Acesso em: 22 out. 2022.

MELANDER, Roberta J.; MELANDER, Christian. The Challenge of Overcoming Antibiotic Resistance: an adjuvant approach?. **Acs Infectious Diseases**, [S.L.], v. 3, n. 8, p. 559-563, 26 maio 2017. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acsinfecdis.7b00071>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28548487/>. Acesso em: 24 out. 2022.

HO, Hoangdung; MIU, Anh; ALEXANDER, Mary Kate; GARCIA, Natalie K.; OH, Angela; ZILBERLEYB, Inna; REICHELTL, Mike; AUSTIN, Cary D.; TAM, Christine; SHRIVER, Stephanie. Structural basis for dual-mode inhibition of the ABC transporter

MsbA. **Nature**, [S.L.], v. 557, n. 7704, p. 196-201, maio 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-018-0083-5>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41586-018-0083-5>. Acesso em: 16 out. 2022.

HAUBERTIN, David Y.; MADAOU, Hocine; SANSON, Alain; GUÉROIS, Raphaël; ORLOWSKI, Stéphane. Molecular Dynamics Simulations of E. coli MsbA Transmembrane Domain: formation of a semipore structure. **Biophysical Journal**, [S.L.], v. 91, n. 7, p. 2517-2531, out. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.106.084020>.

WENNINGER, John A; YATES, Ronald L; DOLINSKY, Meyer. High Resolution Infrared Spectra of Some Naturally Occurring Sesquiterpene Hydrocarbons. **Journal Of Aoac International**, [S.L.], v. 50, n. 6, p. 1313-1335, 1 dez. 1967. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jaoac/50.6.1313>. Disponível em: <https://academic.oup.com/jaoac/article-abstract/50/6/1313/5720619>. Acesso em: 26 out. 2022.

CALVIN, Melvin. Hydrocarbons from plants: analytical methods and observations. **Naturwissenschaften**, [S.L.], v. 67, n. 11, p. 525-533, nov. 1980. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00450661>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00450661>. Acesso em: 22 out. 2022.

DE ALBUQUERQUE, Kelly Cristina Oliveira de; VEIGA, Andreza do Socorro Silva da; SILVA, João Victor da Silva e; BRIGIDO, Heliton Patrick Cordovil; FERREIRA, Erica Patrícia dos Reis; COSTA, Erica Vanessa Souza; MARINHO, Andrey Moacir do Rosário; PERCÁRIO, Sandro; DOLABELA, Maria Fâni. Brazilian Amazon Traditional Medicine and the Treatment of Difficult to Heal Leishmaniasis Wounds withCopaifera. **Evidence-Based Complementary And Alternative Medicine**, [S.L.], v. 2017, p. 1-9, 2017. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2017/8350320>. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2017/8350320/>. Acesso em: 22 out. 2022.

RIBEIRO, Victor Pena. **Desenvolvimento de método analítico por cromatografia gasosa para identificação e análise sazonal de compostos voláteis de Copaifera sp. e avaliação da atividade antimicrobiana**. 2017. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2017. doi:10.11606/D.60.2019.tde-24112017-112529. Acesso em: 27 out. 2022.

SANTOS, Adriana Oliveira dos; IZUMI, Erika; UEDA-NAKAMURA, Tânia; DIAS-FILHO, Benedito Prado; VEIGA-JÔNIO, Valdir Florêncio da; NAKAMURA, Celso Vataru. Antileishmanial activity of diterpene acids in copaiba oil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [S.L.], v. 108, n. 1, p. 59-64, fev. 2013. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0074-02762013000100010>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/mioc/a/dbq86yV5BDrtmwvZPSQjnyb/?lang=en>. Acesso em: 24 out. 2022.

BARBOSA, Anna Laís Pfeifer; WENZEL-STORJOHANN, Arlette; BARBOSA, José Diomedes; ZIDORN, Christian; PEIFER, Christian; TASDEMIR, Deniz; ÇIÇEK, Serhat Sezai. Antimicrobial and cytotoxic effects of the Copaifera reticulata oleoresin and its

main diterpene acids. **Journal Of Ethnopharmacology**, [S.L.], v. 233, p. 94-100, abr. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2018.11.029>. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874118331957?casa_token=vr-ZI-PXwclAAAAA:s7inJs3Di18Exmc-XCZ3pAkPGygeszx3NoG2aMyRQgDy2VXG_lrzObdeaLbQxCpbOCJLrHNwIRA. Acesso em: 20 out. 2022

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E. M. **Plant drug analysis**. Springer- Verlag, Berlin, 1984.

ELOFF, J.. A Sensitive and Quick Microplate Method to Determine the Minimal Inhibitory Concentration of Plant Extracts for Bacteria. **Planta Medica**, [S.L.], v. 64, n. 08, p. 711-713, dez. 1998. Georg Thieme Verlag KG. <http://dx.doi.org/10.1055/s-2006-957563>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9933989/>. Acesso em: 22 out. 2022.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **M27-A2**: Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica. 2 ed. Pennsylvania: 2002. 43 p. Disponível em: https://www.anvisa.gov.br/servicos/clinica/manuais/clsi/clsi_OPAS1M27-A2. Acesso em: 22 out. 2022.

Molinspiration Cheminformatics free web services, <https://www.molinspiration.com>, Slovensky Grob, Slovakia

LIPINSKI, Christopher A.; LOMBARDO, Franco; DOMINY, Beryl W.; FEENEY, Paul J.. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S.L.], v. 23, n. 1-3, p. 3-25, jan. 1997. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0169-409x\(96\)00423-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0169-409x(96)00423-1).

VEBER, D.F.; JOHNSON, S.R.; CHENG, H.Y.; SMITH, B.R.; WARD, K.W.; KOPPLE, K.D. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 45, n. 12, p. 2615-2623, 2002.
YEE, S. In vitro permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict in vivo (small intestinal) absorption in man—fact or myth. *Pharmaceutical Research*. v.14, n.6, p.763-766, 1997.

YAZDANIAN, M.; GLYNN, S.L.; WRIGHT, J.L.; HAWI, A. Correlating partitioning and Caco-2 Cell Permeability of Structurally Diverse Small Molecular Weight Compounds. **Pharmaceutical Research**. v.15, n.9, p.1490-1494, 1998.

Filimonov DA, Lagunin AA, Glorizova TA, Rudik AV, Druzhilovskii DS, Pogodin PV, Poroikov VV (2014). Previsão dos espectros de atividade biológica de compostos orgânicos usando o recurso online PASS. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 50 (3), 444-457.

GOLD, L.S.; SLONE, T.H.; MANLEY, N.B.; GARFINKEL, G.B.; HUDES, E.S.; ROHRBACH, L.; AMES, B.N. The carcinogenic potency database: analyses of 4000

chronic animal cancer experiments published in the general literature and by the U.S National Cancer Institute/National Toxicology Program. **Environ Health Perspect.** v. 96, p. 11-15, 1991.

HANSEN, K.; MIKA, S.; SCHROETER, T.; SUTTER, A.; TER LAAK, A.; STEGERHARTMANN, T.; HEINRICH, N.; MÜLLER, K.R. Benchmark data set for in silico prediction of Ames mutagenicity. **J. Chem. Inf. Model.** v. 49, n. 9, p. 2077-2081, 2009.

BENTO, A.P.; GAUTON, A.; HERSEY, A.; BELLIS, L.J.; CÂMARAS, J.; DAVIES, M.; KRUGER, F.A.; LUZ, Y.; MAK, L.; MCGLINCHEY, S.; NOWOTKA, M.; PAPADATOS, J.; SANTOS, R.; OVERINGTON, J.P. The ChEMBL bioactivity database: na update. **Nucleic Acids Res.** v. 42, p. 1083-1090, 2014.

SCHREY, A.K.; NICKEL-SEEBER, J.; DRWAL, M.N.; ZWICKER, P.; SCHULTZE, N.; HAERTEL, B.; PREISSNER, R. Computacional prediction of imune cell cytotoxicity. **Food and Chemical toxicology.** v. 107, p.150-166, 2017.

BANERJEE, P.; DERNBOSTEL, F.O.; PREISSNER, R. Prediction is a balancing act: importance of sampling methods to balance sensitivity and specificity Chemical data sets. **Front. Chem.** v. 6, p. 1-11, 2018.

COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Quim. Nova.** v. 31, n. 7, p 1820-1830, 2008.

GUILHERMINO, L.; DIAMANTINO, T.; SILVA, M.; SOARES, A. Acute toxicity test with *Daphnia magna*: na alternative to mammals in the prescreening of Chemical toxicity. **Ecotoxicology and environmental safety.** v. 46, p. 357-362, 2000.

ZUCKER, E. Hazard Evaluation Division - Standard Evaluation Procedure - Acute Toxicity Test for Freshwater Fish. U.S.EPA Publication 540/9-85-006. 1985

BIOVIA, Dassault Systèmes, BIOVIA Discovery Studio, 9.24, San Diego: Dassault Systèmes, 2022

ALMEIDA, Diogo Marinho. **Dockthor:Implementation, upgrade and validation of a receptor-ligand Docking software.** 2011. 137 f. Dissertação (Mestrado em Modelagem computacional) - Laboratório Nacional de Computação Científica, Petrópolis, 2011.

PASCHOAL, Neila da Silva. **Estudo do docking molecular da proteína ligadora de odor 2WC5 do bicho-da-seda.** Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Federal de Alagoas. Licenciatura em Química, Arapiraca, 2021.

LOCHER, Kaspar P. Mechanistic diversity in ATP-binding cassette (ABC) transporters. **Nature Structural & Molecular Biology**, [S.L.], v. 23, n. 6, p. 487-493, jun. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.3216>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nsmb.3216>. Acesso em: 25 out. 2022.

GONÇALVES A. C. R.; MIRANDA O. N. S.; ARAÚJO L. L. N. Prospecção fitoquímica das folhas de *Copaifera langsdorffii* pertencente à família Leguminosae. **Revista Eletrônica de Ciências Humanas, Saúde e Tecnologia**, v. 1, n. 09, p. 37-54, 16 dez. 2016.

GOBBO-NETO, Leonardo e LOPES, Norberto P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**. 2007, v. 30, n. 2, pp. 374-381, 13 Mar 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200026>>. Acesso em: 31 out. 2022.

ROSA, Raíssa Santos de Lima; ESTEVES, Maria Eduarda Alves; BULLA, Ana Carolina Silva; SILVA, Manuela Leal da. PREDITORES FARMACOCINÉTICOS E TOXICOLÓGICOS in silico PARA VIA ORAL: conheça e análise admetox. In: BASTOS, Luana Luiza. **BIOINFO**: revista brasileira de bioinformática e biologia computacional. 2. ed. Lago Santa: Alfahelix, 2022. p. 83-95. Disponível em: <https://bioinfo.com.br/bioinfo-02/>. Acesso em: 31 out. 2022.

SANTOS, V. L. A., GONSALVES, A. A., ARAÚJO, C. R. M. Abordagem didática para o desenvolvimento de moléculas bioativas: regra dos cinco de lipinski e preparação de heterociclo 1,3,4-oxadiazol em forno de micro-ondas doméstico. **Química Nova**. v. 41, n. 1, pp. 110-115. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170135>. Acesso em: 10 out. 2022.

HITCHCOCK, Stephen A.; PENNINGTON, Lewis D.. Structure–Brain Exposure Relationships. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 49, n. 26, p. 7559-7583, 1 dez. 2006. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jm060642i>. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jm060642i>. Acesso em: 31 out. 2022.

ERTL, Peter. Polar Surface Area. In: MANNHOLD, Raimund; KUBINYI, Hugo; FOLKERS, Gerd. *Molecular Drug Properties: Measurement and Prediction*, [S.L.], Wiley, 2008, p. 111-126.

HOU, Tingjun; WANG, Junmei; ZHANG, Wei; XU, Xiaojie. ADME Evaluation in Drug Discovery. 6. Can Oral Bioavailability in Humans Be Effectively Predicted by Simple Molecular Property-Based Rules? **Journal Of Chemical Information And Modeling**, [S.L.], v. 47, n. 2, p. 460-463, 6 jan. 2007. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ci6003515>.

WALTERS, W. Patrick; GREEN, Jerdezaemy; WEISS, Jonathan R.; MURCKO, Mark A.. What Do Medicinal Chemists Actually Make? A 50-Year Retrospective. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 54, n. 19, p. 6405-6416, 31 ago. 2011. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jm200504p>.

IRVINE, Jennifer D.; TAKAHASHI, Lori; LOCKHART, Karen; CHEONG, Jonathan; TOLAN, John W.; SELICK, H.e.; GROVE, J.Russell. MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) Cells: a tool for membrane permeability screening. **Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [S.L.], v. 88, n. 1, p. 28-33, jan. 1999. American Geophysical Union (AGU). <http://dx.doi.org/10.1021/js9803205>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9874698/>. Acesso em: 30 out. 2022.

DEZANI, André Bersani. **Avaliação dos mecanismos envolvidos na permeabilidade de fármacos antirretrovirais por meio dos modelos ex vivo (células de Franz) e in vitro (PAMPA)**. 2017. Tese (Doutorado em Produção e Controle Farmacêuticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017. doi:10.11606/T.9.2017.tde-24042017-144959. Acesso em: 30 de out 2022.

CHEN, Xiumin; SINGH, Anika; KITTS, David D.. In-vitro bioaccessibility and bioavailability of heavy metals in mineral clay complex used in natural health products. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 10, n. 1, 1 jun. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-020-65449-4>.

WANG, Xiaolong. Semi-active adaptive optimal control of vehicle suspension with a magnetorheological damper based on policy iteration. **Journal Of Intelligent Material Systems And Structures**, [S.L.], v. 29, n. 2, p. 255-264, 12 jun. 2017. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/1045389x17711786>.

ARTURSSON, P.; PALM, K.; LUTHMAN, K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. **Adv. Drug. Deliv. Rev.** v. 1, n. 46, p. 27-43, 2001.

UNITED States Pharmacopeia: USP 29: The National Formulary: NF 24. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2005. p.1064-1065, 1961-1963.

MAURO, M.; GRANDIS, R.A. de; CAMPOS, M.L.; BAUERMEISTER, A.; PECCININI, R.G.; PAVAN, F.R.; LOPES, N.P.; MORAES, N.V. de. Acid diterpenes from Copaiba oleoresin (*Copaifera langsdorffii*): chemical and plasma stability and intestinal permeability using caco-2 cells. **Journal Of Ethnopharmacology**, [S.L.], v. 235, p. 183-189, maio 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2019.02.017>.

ARAÚJO, Larissa Carolina Ramos de; LINS, Márcia Arruda; LIMA, Geisy Rebouças de; MORESCHI, Ana Regina Casaroto; LIMA, Emerson Silva; HANAN, Simone Assayag; TODA, Carina; BANDEIRA, Maria Fulgência Costa Lima. Atividade do óleo de copaíba sobre radicais livres formados durante a resposta inflamatória. **Brazilian Journal Of Development**, [S.L.], v. 6, n. 7, p. 53538-53553, 2020. Brazilian Journal of Development. <http://dx.doi.org/10.34117/bjdv6n7-845>.

VASCONCELOS, D. N. (2019). **Estudo e aplicação de sondas moleculares baseadas em dicroísmo circular induzido para determinação de sítios de ligação em albumina e caracterização de agregados amilóides**. Tese de doutorado. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho, Bauru., São Paulo, Brasil. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/181077>

FIORI, G. M. L.i (2016). Farmacocinética populacional e ligação as proteínas plasmáticas da cucurbitacina E e seu metabólito cucurbitacina I em ratos. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil. Disponível em: https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60134/tde-03102016-150801/publico/Tese_completa_original.pdf

SILVA, Bruno César Mendonça *et al.* Predição do metabolismo do candidato a protótipo de fármaco anti-inflamatório lqfm002. **Revista Faculdade Montes Belos**, Montes Belos, v. 7, n. 2, p. 114-133, mar. 2014. Disponível em: <http://revista.fmb.edu.br/index.php/fmb/article/viewFile/124/120>. Acesso em: 28 out. 2022.

FERREIRA, Gleison Gonçalves; BRANDÃO, Dayse Lúcia do N.; DOLABELA, Maria Fâni. Predição do comportamento farmacocinético, toxicidade e de atividades biológicas de alcaloides isolados de *Geissospermum laeve* (Vell.) Miers. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 12, p. e27991211056-e27991211056, 2020.

PROPHIRO, Josiane S. *et al.* Evaluation of time toxicity, residual effect, and growth-inhibiting property of *Carapa guianensis* and *Copaifera* sp. in *Aedes aegypti*. **Parasitology Research**, v. 110, n. 2, p. 713-719, 2012.

TRINDADE, Frances Tatiane Tavares *et al.* *Copaifera multijuga* ethanolic extracts, oilresin, and its derivatives display larvicidal activity against *Anopheles darlingi* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 3, p. 464-470, 2013.

CHAGAS, Cristian Kallahan Silva *et al.* Estudo in silico de compostos fenólicos isolados de *Inga laurina*. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 2, p. e24511225592-e24511225592, 2022.

DA COSTA, Jaqueline Custódio *et al.* *Copaifera duckei* oleoresin as a novel alternative for treatment of monogenean infections in pacu *Piaractus mesopotamicus*. **Aquaculture**, v. 471, p. 72-79, 2017.

DE SEIXAS, Arthur Tavares *et al.* *Copaifera* oleoresins as a novel natural product against acanthocephalan in aquaculture: Insights in the mode of action and toxicity. **Aquaculture Research**, v. 51, n. 11, p. 4681-4688, 2020.

FROTA, Jhéssica Krhistine Caetano. **Avaliação química e atividade antitumoral in vitro do óleo-resina de *Copaifera reticulata* Ducke**. 2018. 63f. Dissertação (Dissertação em Biociências) – Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Federal do Oeste do Pará, Santarém, 2018. Disponível em: <https://repositorio.ufopa.edu.br/jspui/handle/123456789/454> Acesso em: 28 out 2022.

SILVA, Josiane Elizabeth Almeida e. **Caracterização química, avaliação antimicrobiana e o desenvolvimento de uma formulação com o óleo de *Copaifera reticulata* Ducke**. 2019. 58 f. Dissertação (Dissertação em Biociências) – Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Federal do Oeste do Pará, Santarém, 2019. Disponível em: <https://repositorio.ufopa.edu.br/jspui/handle/123456789/456> Acesso em: 28 out 2022.

MAURMANN, Natasha *et al.* Avaliação da composição química de um óleo de copaíba (*Copaifera* spp.) e seu efeito em células-tronco mesenquimais. **Revista de Medicina**, v. 101, n. 5, 2022.

MOYANO, Diego et al. Evaluación de parámetros bromatológicos, fitoquímicos y funcionalidad antioxidante de frutos de *Bromelia karatas* (Bromeliaceae). **Vitae**, v. 19, n. 1, p. S439-S441, 2012.

DESTRYANA, R. Amilia; YOUNG, D. Gary; WOOLLEY, Cole L.; HUANG, Tzou-Chi; WU, Hung-Yi; SHIH, Wen-Ling. Antioxidant and Anti-inflammation Activities of Ocotea, Copaiba and Blue Cypress Essential Oils in Vitro and in Vivo. **Journal Of The American Oil Chemists' Society**, [S.L.], v. 91, n. 9, p. 1531-1542, 5 jul. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1007/s11746-014-2504-4>.

SACHETTI, Camile G. et al. Developmental toxicity of copaiba tree (*Copaifera reticulata* Ducke, Fabaceae) oleoresin in rat. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 5, p. 1080-1085, 2011.

SENEDESE, Juliana Marques et al. Chemopreventive role of *Copaifera reticulata* Ducke oleoresin in colon carcinogenesis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 111, p. 331-337, 2019.

CALDAS, Francisco Rodrigo de Lemos. **Avaliação das atividades antimicrobiana e antioxidante de óleos essenciais de folhas e inflorescências de *Ocimum gratissimum* L. (Lamiaceae)**. 2011. 77 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular, Departamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri, Crato, 2011. Disponível em: <http://www.urca.br/portal2/wp-content/uploads/sites/38/phocadownload/userupload/Dissertacoes/2011/dissertao%20Orodrigo%20lemons.pdf>. Acesso em: 01 nov. 2022.

NOGUEIRA, Jéssica Oliveira e. **AÇÃO ANTIMICROBIANA DE DIFERENTES TERPENOS E FENILPROPANOIDES EM *Escherichia coli* E *Staphylococcus aureus***. 2019. 111 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de O Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2019. Disponível em: <http://repositorio.ufla.br/handle/1/34257>. Acesso em: 01 nov. 2022.

WANG, Qi; HUANG, Chuan-Ren; JIANG, Min; ZHU, Ying-Yao; WANG, Jing; CHEN, Jun; SHI, Jie-Hua. Binding interaction of atorvastatin with bovine serum albumin: spectroscopic methods and molecular docking. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, [S.L.], v. 156, p. 155-163, mar. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2015.12.003>.

ZHANG, Yuai et al. Interactions between Human Serum Albumin and Sulfadimethoxine Determined Using Spectroscopy and Molecular Docking. **Molecules**, v. 27, n. 5, p. 1526, 2022.

BATTISTI, Robert F.; ZHONG, Yanqiang; FANG, Lanyan; GIBBS, Seth; SHEN, Jie; NADAS, Janos; ZHANG, Guisheng; SUN, Duxin. Modifying the Sugar Moieties of Daunorubicin Overcomes P-gp-Mediated Multidrug Resistance. **Molecular Pharmaceutics**, [S.L.], v. 4, n. 1, p. 140-153, 6 dez. 2006. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/mp060075v>.

LIMA, Camila Correa; BENJAMIM, Sandra Cristina Calixto; SANTOS, Rosana Francisco Siqueira dos. Mecanismo de resistência bacteriana frente aos fármacos: uma revisão. **Cuidarte Enfermagem**, [S.l.], v. 1, n. 11, p. 105-113, jun. 2017.

AMINOV, Rustam I.. A Brief History of the Antibiotic Era: lessons learned and challenges for the future. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 1, n. 1, p. 1-7, dez. 2010. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2010.00134>.

VON DÖHREN, Hans. Antibiotics: actions, origins, resistance, by c. walsh. 2003. washington, dc. **Protein Science**, [S.L.], v. 13, n. 11, p. 3059-3060, 1 jan. 2009. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1110/ps.041032204>.

PIDDOCK, Laura Jv. The crisis of no new antibiotics—what is the way forward? **The Lancet Infectious Diseases**, [S.L.], v. 12, n. 3, p. 249-253, mar. 2012. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099\(11\)70316-4](http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099(11)70316-4).

CARLET, Jean; JARLIER, Vincent; HARBARTH, Stephan; VOSS, Andreas; GOOSSENS, Herman; PITTET, Didier. Ready for a world without antibiotics? The Pensières Antibiotic Resistance Call to Action. **Antimicrobial Resistance And Infection Control**, [S.L.], v. 1, n. 1, p. 11, 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/2047-2994-1-11>.

ALANIS, Alfonso J.. Resistance to Antibiotics: are we in the post-antibiotic era?. **Archives Of Medical Research**, [S.L.], v. 36, n. 6, p. 697-705, nov. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.arcmed.2005.06.009>.

Jornal Oficial da União Europeia, Orientações da UE para a utilização prudente de agentes antimicrobianos no domínio da saúde humana, (2017/C 212/01). Disponível em: [https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:52015XC0911\(01\)&from=ES](https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:52015XC0911(01)&from=ES). Acesso em: 12 de nov. 2022.

WHO report on surveillance of antibiotic consumption: 2016-2018 early implementation. Geneva: World Health Organization; 2018. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/277359/9789241514880eng.pdf?ua=1>. Acesso em: 12 de nov. 2022.

BERTOLLO, Leandro G.; LUTKEMEYER, Diego S.; LEVIN, Anna S. Are antimicrobial stewardship programs effective strategies for preventing antibiotic resistance? A systematic review. *American journal of infection control*, v. 46, n. 7, p. 824-836, jul, 2018.

POLLACK, Loria A.; SRINIVASAN, Arjun. Core elements of hospital antibiotic stewardship programs from the Centers for Disease Control and Prevention. *Clinical Infectious Diseases*, v. 59, n. suppl_3, p. S97-S100, out, 2014.

Yu A, Flott K, Chainani N, Fontana G, Darzi A. Patient Safety 2030. London, UK: NIHR, Imperial Patient Safety Translational Research Centre, 2016.

RAETZ, Christian R. H.; WHITFIELD, Chris. Lipopolysaccharide Endotoxins. **Annual Review Of Biochemistry**, [S.L.], v. 71, n. 1, p. 635-700, jun. 2002. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414>.

World Health Organization. Programme on Traditional Medicine. (1998). Regulatory situation of herbal medicines : a worldwide review. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/63801>

ROQUE, Ana Cecília Afonso (ed.). **Ligand-Macromolecular Interactions in Drug Discovery**. New York: Humana Press, 2010.

PADUCH, Roman; KANDEFER-SZERSZEŃ, Martyna; TRYTEK, Mariusz; FIEDUREK, Jan. Terpenes: substances useful in human healthcare. **Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis**, [S.L.], v. 55, n. 5, out. 2007. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00005-007-0039-1>.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Lista DCB Plantas Medicinais atualizada em dezembro 2017. 2017. Brasília. Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/resultadodebusca?p_p_id=101&p_p_lifecycle=0&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&p_p_col_id=column1&p_p_col_count=1&_101_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&_101_assetEntryId=3881905&_101_type=document>, acesso em: 07 de nov. de 2022.

MAGALHÃES, Camila Silva de. Algoritmos genéticos para o problema de Docking proteína-ligante. 2006. 220 f. Tese (Doutorado em Modelagem computacional) - Laboratório Nacional de Computação Científica, Petrópolis, 2006.

ANDRICOPULO, Adriano; SALUM, Livia; ABRAHAM, Donald. Structure-Based Drug Design Strategies in Medicinal Chemistry. **Current Topics In Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 9, n. 9, p. 771-790, 1 jun. 2009. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/156802609789207127>.

ODUGUWA, A.; TIWARI, A.; FIORENTINO, S.; ROY, R.. Multi-objective optimisation of the protein-ligand docking problem in drug discovery. In: **Proceedings of the 8th annual conference on Genetic and evolutionary computation**, GECCO '06, páginas 1793–1800, New York, NY, USA, 2006. ACM. ISBN 1-59593-186-4.

MARTINS-DA-SILVA, Regina C. V.; PEREIRA, Jorge Fontella; LIMA, Haroldo Cavalcante de. O gênero Copaifera (Leguminosae - Caesalpinioideae) na Amazônia brasileira. **Rodriguésia**, [S.L.], v. 59, n. 3, p. 455-476, jul. 2008. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/2175-7860200859304>.

ROSA, Júlio Cardoso; GOMES, Angela Maria da Silva. OS ASPECTOS ETNOBOTÂNICOS DA COPAÍBA. **Revista Geografar**, [S.L.], v. 4, n. 1, p. 1-9, 26 maio 2009. Universidade Federal do Parana. <http://dx.doi.org/10.5380/geografar.v4i1.14428>.

OLIVEIRA, Davi; LIMA, Leandro; ANTONIO, Ananda; WIEDEMANN, Larrisa; VEIGA-JUNIOR, Valdir. PERFIL METABÓLICO DOS EXTRATOS POLARES DAS FOLHAS,

GALHOS E CASCAS DE *Copaifera multijuga* HAYNE (COPAÍBA MARI-MARI DA AMAZÔNIA) POR ESI-EM. **Química Nova**, [S.L.], v. 43, n. 1, p. 72-77, out. 2019. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170418>.

BRANCALION, Ana Paula Santin. **Estudo fitoquímico e investigação da atividade antilitiásica do extrato hidroalcoólico das partes aéreas de *Copaifera langsdorffii***. 2010. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2010. doi:10.11606/D.60.2010.tde-01122010-113501. Acesso em: 2022-11-27.

FURTADO, Ricardo Andrade. **Caracterização fitoquímica, avaliação das atividades analgésica e anti-inflamatória e biotransformação de um composto isolado das folhas de *Copaifera langsdorffii***. 2013. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013. doi:10.11606/T.60.2013.tde-27062013-101222. Acesso em: 2023-03-10.

BRAGA, M. D.; SILVA; C. C. M. Atividade antimicrobiana do extrato aquoso de *Copaifera langsdorffii* Desf. sobre *Staphylococcus aureus*. **Unimontes Científica**. v. 9, n.1, p.1-7, 2007.

BRANCALION, A. P. S.; OLIVEIRA, R. B.; SOUSA, J. P. B.; GROppo, M.; BERRETTA, A. A.; BARROS, M. E.; BOIM, M. A.; BASTOS, J. K. Effect of hydroalcoholic extract from *Copaifera langsdorffii* leaves on urolithiasis induced in rats. *Urological Research*, v. 40, n. 5, p.475-481, 2012.

SANTOS, Deiziane G *et al.* *Copaifera Reticulata*: Caracterização Química e Atividade Bactericida Frente à Patógenos de Alimentos. **Revista Virtual de Química**, [S.L.], v. 12, n. 2, p. 2-19, abr. 2020.

HAMPTON, Tracy. **Report Reveals Scope of US Antibiotic Resistance Threat**. **Jama**, [S.L.], v. 310, n. 16, p. 1661, 23 out. 2013. American Medical Association (AMA). <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2013.280695>. Disponível em: <https://jamanetwork.com/journals/jama/article-abstract/1758742>. Acesso em: 26 out. 2022.

BROWN, Eric D.; WRIGHT, Gerard D.. Antibacterial drug discovery in the resistance era. **Nature**. [S.L.], v. 529, n. 7586, p. 336-343, jan. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature17042>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature17042>. Acesso em: 25 out. 2022.

TANG, Taishan; CHEN, Guoqiang; GUO, Aizhen; XU, Ye; ZHAO, Linli; WANG, Mengrui; LU, Chengping; JIANG, Yuan; ZHANG, Changyin. Comparative proteomic and genomic analyses of *Brucella abortus* biofilm and planktonic cells. **Molecular Medicine Reports**, [S.L.], v. 21, p. 731-743, 17 dez. 2019. Spandidos Publications. <http://dx.doi.org/10.3892/mmr.2019.10888>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6947884/>. Acesso em: 24 out. 2022.

LI, Zhen; ZHANG, Lishan; SONG, Qingli; WANG, Guibin; YANG, Wenxiao; TANG, Huamei; SRINIVASAN, Ramanathan; LIN, Ling; LIN, Xiangmin. Proteomics Analysis Reveals Bacterial Antibiotics Resistance Mechanism Mediated by *ahslyA* Against Enoxacin in *Aeromonas hydrophila*. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 12, 8 jun. 2021. Frontiers Media SA.

HO, Hoangdung; MIU, Anh; ALEXANDER, Mary Kate; GARCIA, Natalie K.; OH, Angela; ZILBERLEYB, Inna; REICHELTL, Mike; AUSTIN, Cary D.; TAM, Christine; SHRIVER, Stephanie. Structural basis for dual-mode inhibition of the ABC transporter MsbA. **Nature**, [S.L.], v. 557, n. 7704, p. 196-201, maio 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-018-0083-5>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41586-018-0083-5>. Acesso em: 16 out. 2022.

SILVA, Carla Maria Dhaniane Costa da; ROGRIGUES JUNIOR, Omero Martins. Os benefícios de uma alimentação saudável no período da pandemia da COVID-19. **Research, Society And Development**, [S.L.], v. 11, n. 13, p. 1-9, 11 out. 2022. Research, Society and Development. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i13.35895>.

Koprivnjak, Tomaz & Peschel, Andreas. (2011). Bacterial resistance mechanisms against host defense peptides. **Cellular and molecular life sciences** : CMLS. 68. 2243-54. [10.1007/s00018-011-0716-4](https://doi.org/10.1007/s00018-011-0716-4).

PAGÈS, Jean-Marie; JAMES, Chloë E.; WINTERHALTER, Mathias. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in gram-negative bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, [S.L.], v. 6, n. 12, p. 893-903, 10 nov. 2008. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1994>.

ALEKSHUN, Michael N.; LEVY, Stuart B.. Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. **Cell**, [S.L.], v. 128, n. 6, p. 1037-1050, mar. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.004>.

Ganz, T. (2006). Hecpudin—A Peptide Hormone at the Interface of Innate Immunity and Iron Metabolism. In: Shafer, W.M. (eds) Antimicrobial Peptides and Human Disease. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, vol 306. Springer, Berlin, Heidelberg . https://doi.org/10.1007/3-540-29916-5_7

MADHURI; SHIREEN, Tahsina; VENUGOPAL, S.K.; GHOSH, Dipankar; GADEPALLI, Ravisekhar; DHAWAN, Benu; MUKHOPADHYAY, Kasturi. In vitro antimicrobial activity of alpha-melanocyte stimulating hormone against major human pathogen *Staphylococcus aureus*. **Peptides**, [S.L.], v. 30, n. 9, p. 1627-1635, set. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2009.06.020>.

GUINA, Tina; YI, Eugene C.; WANG, Houle; HACKETT, Murray; MILLER, Samuel I.. A PhoP-Regulated Outer Membrane Protease of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Promotes Resistance to Alpha-Helical Antimicrobial Peptides. **Journal Of Bacteriology**, [S.L.], v. 182, n. 14, p. 4077-4086, 15 jul. 2000. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.182.14.4077-4086.2000>.

HUI, Chang-Ye; GUO, Yan; HE, Qiu-Shan; PENG, Liang; WU, Shu-Chi; CAO, Hong; HUANG, Sheng-He. *Escherichia coli* outer membrane protease OmpT confers

resistance to urinary cationic peptides. **Microbiology And Immunology**, [S.L.], v. 54, n. 8, p. 452-459, 7 jun. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1348-0421.2010.00238.x>.

PESCHEL, Andreas; SAHL, Hans-Georg. The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. **Nature Reviews Microbiology**, [S.L.], v. 4, n. 7, p. 529-536, 12 jun. 2006. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1441>.

VUONG, Cuong; KOCIANOVA, Stanislava; VOYICH, Jovanka M.; YAO, Yufeng; FISCHER, Elizabeth R.; DELEO, Frank R.; OTTO, Michael. A Crucial Role for Exopolysaccharide Modification in Bacterial Biofilm Formation, Immune Evasion, and Virulence. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 279, n. 52, p. 54881-54886, dez. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m411374200>.

VUONG, Cuong; VOYICH, Jovanka M.; FISCHER, Elizabeth R.; BRAUGHTON, Kevin R.; WHITNEY, Adeline R.; DELEO, Frank R.; OTTO, Michael. Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system. **Cellular Microbiology**, [S.L.], v. 6, n. 3, p. 269-275, mar. 2004. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1462-5822.2004.00367.x>.

KOCIANOVA, Stanislava; VUONG, Cuong; YAO, Yufeng; VOYICH, Jovanka M.; FISCHER, Elizabeth R.; DELEO, Frank R.; OTTO, Michael. Key role of poly- γ -dl-glutamic acid in immune evasion and virulence of *Staphylococcus epidermidis*. **Journal Of Clinical Investigation**, [S.L.], v. 115, n. 3, p. 688-694, 1 mar. 2005. American Society for Clinical Investigation. <http://dx.doi.org/10.1172/jci200523523>.

RAETZ, Christian R.H.; REYNOLDS, C. Michael; TRENT, M. Stephen; BISHOP, Russell E.. Lipid A Modification Systems in Gram-Negative Bacteria. **Annual Review Of Biochemistry**, [S.L.], v. 76, n. 1, p. 295-329, 7 jun. 2007. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.010307.145803>.

NEUHAUS, Francis C.; BADDILEY, James. A Continuum of Anionic Charge: structures and functions of d -alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, [S.L.], v. 67, n. 4, p. 686-723, dez. 2003. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/mnbr.67.4.686-723.2003>.

WEIDENMAIER, Christopher; PESCHEL, Andreas. Teichoic acids and related cell-wall glycopolymers in Gram-positive physiology and host interactions. **Nature Reviews Microbiology**, [S.L.], v. 6, n. 4, p. 276-287, 10 mar. 2008. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1861>.

FISCHER, Werner. Lipoteichoic acid and lipids in the membrane of *Staphylococcus aureus*. **Medical Microbiology And Immunology**, [S.L.], v. 183, n. 2, p. 61-76, maio 1994. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00277157>.

XIA, Guoqing; KOHLER, Thomas; PESCHEL, Andreas. The wall teichoic acid and lipoteichoic acid polymers of *Staphylococcus aureus*. **International Journal Of Medical Microbiology**, [S.L.], v. 300, n. 2-3, p. 148-154, fev. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2009.10.001>.

PESCHEL, Andreas; OTTO, Michael; JACK, Ralph W.; KALBACHER, Hubert; JUNG, Günther; GÖTZ, Friedrich. Inactivation of the *dlt* Operon in *Staphylococcus aureus* Confers Sensitivity to Defensins, Protegrins, and Other Antimicrobial Peptides. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 274, n. 13, p. 8405-8410, mar. 1999. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.274.13.8405>.

ABACHIN, Eric; POYART, Claire; PELLEGRINI, Elisabeth; MILOHANIC, Eliane; FIEDLER, Franz; BERCHE, Patrick; TRIEU-CUOT, Patrick. Formation of D-alanyl-lipoteichoic acid is required for adhesion and virulence of *Listeria monocytogenes*. **Molecular Microbiology**, [S.L.], v. 43, n. 1, p. 1-14, jan. 2002. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02723.x>.

COLLINS, L. Vincent; KRISTIAN, Sascha A.; WEIDENMAIER, Christopher; FAIGLE, Marion; VANĖKESSEL, Kok P. M.; VANĖSTRIJP, Jos A. G.; GÖTZ, Friedrich; NEUMEISTER, Birgid; PESCHEL, Andreas. *Staphylococcus aureus* Strains Lacking d-Alanine Modifications of Teichoic Acids Are Highly Susceptible to Human Neutrophil Killing and Are Virulence Attenuated in Mice. **The Journal Of Infectious Diseases**, [S.L.], v. 186, n. 2, p. 214-219, 15 jul. 2002. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1086/341454>.

WEIDENMAIER, Christopher; PESCHEL, Andreas; KEMPF, Volkhard A. J.; LUCINDO, Natalie; YEAMAN, Michael R.; BAYER, Arnold S. DltABCD- and MprF-Mediated Cell Envelope Modifications of *Staphylococcus aureus* Confer Resistance to Platelet Microbicidal Proteins and Contribute to Virulence in a Rabbit Endocarditis Model. **Infection And Immunity**, [S.L.], v. 73, n. 12, p. 8033-8038, dez. 2005. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/iai.73.12.8033-8038.2005>.

KOVÁCS, Márta; HALFMANN, Alexander; FEDTKE, Iris; HEINTZ, Manuel; PESCHEL, Andreas; VOLLMER, Waldemar; HAKENBECK, Regine; BRÜCKNER, Reinhold. A Functional *dlt* Operon, Encoding Proteins Required for Incorporation of d-Alanine in Teichoic Acids in Gram-Positive Bacteria, Confers Resistance to Cationic Antimicrobial Peptides in *Streptococcus pneumoniae*. **Journal Of Bacteriology**, [S.L.], v. 188, n. 16, p. 5797-5805, 15 ago. 2006. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.00336-06>.

KHATTAR, Z. Abi; REJASSE, A.; DESTOUMIEUX-GARZÓN, D.; ESCOUBAS, J. M.; SANCHIS, V.; LERECLUS, D.; GIVAUDAN, A.; KALLASSY, M.; NIELSEN-LEROUX, C.; GAUDRIAULT, S.. The *dlt* Operon of *Bacillus cereus* Is Required for Resistance to Cationic Antimicrobial Peptides and for Virulence in Insects. **Journal Of Bacteriology**, [S.L.], v. 191, n. 22, p. 7063-7073, 15 nov. 2009. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.00892-09>.

COX, Kathleen H.; RUIZ-BUSTOS, Eduardo; COURTNEY, Harry S.; DALE, James B.; PENCE, Morgan A.; NIZET, Victor; AZIZ, Ramy K.; GERLING, Ivan; PRICE, Susan

M.; HASTY, David L.. Inactivation of DltA Modulates Virulence Factor Expression in *Streptococcus pyogenes*. **Plos One**, [S.L.], v. 4, n. 4, p. 1-10, 29 abr. 2009. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0005366>.

HEPTINSTALL, S.; ARCHIBALD, A. R.; BADDILEY, J.. Teichoic Acids and Membrane Function in Bacteria. **Nature**, [S.L.], v. 225, n. 5232, p. 519-521, fev. 1970. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/225519a0>.

HURST, A.; HUGHES, A.; DUCKWORTH, M.; BADDILEY, J.. Loss of D-Alanine during Sublethal Heating of *Staphylococcus aureus* s6 and Magnesium Binding during Repair. **Journal Of General Microbiology**, [S.L.], v. 89, n. 2, p. 277-284, 1 ago. 1975. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/00221287-89-2-277>.

MACARTHUR, A e; ARCHIBALD, A R. Effect of culture pH on the D-alanine ester content of lipoteichoic acid in *Staphylococcus aureus*. **Journal Of Bacteriology**, [S.L.], v. 160, n. 2, p. 792-793, nov. 1984. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.160.2.792-793.1984>.

BOUCHER, Helen W.; TALBOT, George H.; BRADLEY, John S.; EDWARDS, John E.; GILBERT, David; RICE, Louis B.; SCHELD, Michael; SPELLBERG, Brad; BARTLETT, John. Bad Bugs, No Drugs: no escape! an update from the infectious diseases society of america. **Clinical Infectious Diseases**, [S.L.], v. 48, n. 1, p. 1-12, jan. 2009. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1086/595011>.

BREIDENSTEIN, Elena B.M.; LAFUENTE-NÓÑEZ, César de; HANCOCK, Robert E.W.. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. **Trends In Microbiology**, [S.L.], v. 19, n. 8, p. 419-426, ago. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2011.04.005>.

POOLE, Keith. *Pseudomonas Aeruginosa*: resistance to the max. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 2, n. 1, p. 1-68, maio 2011. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2011.00065>.

ADABI, Maryam; TALEBI-TAHER, Mahshid; ARBABI, Leila; AFSHAR, Mastaneh; FATHIZADEH, Sara; MINAEIAN, Sara; MOGHADAM-MARAGHEH, Niloufar; MAJIDPOUR, Ali. Spread of Efflux Pump Overexpressing-Mediated Fluoroquinolone Resistance and Multidrug Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* by using an Efflux Pump Inhibitor. **Infection & Chemotherapy**, [S.L.], v. 47, n. 2, p. 98, 2015. Korean Society of Infectious Diseases and Korean Society for Chemotherapy. <http://dx.doi.org/10.3947/ic.2015.47.2.98>.

RAETZ, Christian R. H.; WHITFIELD, Chris. Lipopolysaccharide Endotoxins. **Annual Review Of Biochemistry**, [S.L.], v. 71, n. 1, p. 635-700, jun. 2002. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414>.

LECLERCQ, Roland. Mechanisms of Resistance to Macrolides and Lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. **Clinical Infectious Diseases**, [S.L.], v. 34, n. 4, p. 482-492, fev. 2002. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1086/324626>.

XIN, Deli; MI, Zuhuang; HAN, Xu; QIN, Ling; LI, Jing; WEI, Tianli; CHEN, Xiaogeng; MA, Shaojie; HOU, Ancun; LI, Gui. Molecular Mechanisms of Macrolide Resistance in Clinical Isolates of *Mycoplasma pneumoniae* from China. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [S.L.], v. 53, n. 5, p. 2158-2159, maio 2009. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.01563-08>.

CARDINALE, F.; CHIRONNA, M.; DUMKE, R.; BINETTI, A.; DALENO, C.; SALLUSTIO, A.; VALZANO, A.; ESPOSITO, S.. Macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* in paediatric pneumonia. **European Respiratory Journal**, [S.L.], v. 37, n. 6, p. 1522-1524, 1 jun. 2011. European Respiratory Society (ERS). <http://dx.doi.org/10.1183/09031936.00172510>.

AKAIKE, Hiroto; MIYASHITA, Naoyuki; KUBO, Mika; KAWAI, Yasuhiro; TANAKA, Takaaki; OGITA, Satoko; KAWASAKI, Kozo; NAKANO, Takashi; TERADA, Kihei; OUCHI, Kazunobu. In Vitro Activities of 11 Antimicrobial Agents against Macrolide-Resistant *Mycoplasma pneumoniae* Isolates from Pediatric Patients: results from a multicenter surveillance study. **Japanese Journal Of Infectious Diseases**, [S.L.], v. 65, n. 6, p. 535-538, 2012. Editorial Committee of Japanese Journal of Infectious Diseases, National Institute of Infectious Dis. <http://dx.doi.org/10.7883/yoken.65.535>.

POTRON, Anaïs; POIREL, Laurent; NORDMANN, Patrice. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. **International Journal Of Antimicrobial Agents**, [S.L.], v. 45, n. 6, p. 568-585, jun. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.03.001>.

TEIXEIRA, Jobson Josimar Marques; BESERRA, Sebastião Josemir de Oliveira; SILVA, Ítalo Caio Lourenço; LIMA, Cristiane Gomes. Análise antimicrobiana dos óleos essenciais de palmarosa (*Cymbopogon Martini* (Roxb.) J.F.Watson) e pimenta rosa (*Schinus Terebenthifolius* Raddi) frente à *staphylococcus aureus* multirresistentes. **Brazilian Journal Of Development**, [S.L.], v. 6, n. 6, p. 34935-34953, 2020. Brazilian Journal of Development. <http://dx.doi.org/10.34117/bjdv6n6-146>.

BRAZ, Cyntia de Lima; FIGUEIREDO, Tácita Pires de; BARROSO, Soraya Coelho Costa; REIS, Adriano Max Moreira. Drugs with activity on the cytochrome P450 used by elderly at home. **Revista Médica de Minas Gerais**, [S.L.], v. 28, p. 150-161, out. 2018. GN1 Genesis Network. <http://dx.doi.org/10.5935/2238-3182.20180069>.