

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**PRODUTOS NATURAIS E HÍBRIDOS SEMISSINTÉTICOS COM
POTENCIAIS CITOTÓXICO E ANTIBIOFILME**

Nádia Miléo Garcês de Couto

Porto Alegre, 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**PRODUTOS NATURAIS E HÍBRIDOS SEMISSINTÉTICOS COM
POTENCIAIS CITOTÓXICO E ANTIBIOFILME**

Tese apresentada por **Nádia Miléo Garcês
de Couto** para obtenção do TÍTULO DE
DOUTORA em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Simone Cristina Baggio Gnoatto

Porto Alegre, 2018

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 27 de abril de 2018, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Eduardo Luis Konrath

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Prof. Dr. Eduardo Miranda Ethur

Universidade do Vale do Taquari- UNIVATES

Profa. Dra. Lucélia Santi

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Couto, Nádia Miléo Garcês de
Produtos naturais e híbridos semissintéticos com
potenciais citotóxico e antibiofilme / Nádia Miléo
Garcês de Couto. -- 2018.

142 f.

Orientadora: Simone Cristina Baggio Gnoatto.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre,
BR-RS, 2018.

1. flavonoides. 2. ácido betulínico. 3. hibridação.
4. atividade antitumoral. 5. atividade antibiofilme.
I. Gnoatto, Simone Cristina Baggio, orient. II.
Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fitoquímica e Síntese Orgânica da Faculdade de Farmácia, Laboratórios de Análises Bioquímicas e Citológicas e Laboratório de Biofilmes e Diversidade Microbiana, ambos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, na cidade de Porto Alegre, com financiamento do CNPq, CAPES e FAPERGS. A autora recebeu bolsa de estudos da CAPES.

“Sans la curiosité de l'esprit, que serions-nous? Telle est la beauté et la noblesse de la science: un désir sans fin de repousser les frontières du savoir, de traquer les secrets de la matière et de la vie sans idée préconçue des conséquences éventuelles.”

Marie Curie

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, aos meus pais Agostinho Couto e Socorro Miléo pelo apoio, incentivo, educação e amor durante toda a minha jornada, e, que apesar da distância sempre se mantiveram presentes, acompanhando todos os meus passos.

A aos meus familiares, sobrinhos, tios, primos e irmãos, sempre dispostos a ajudar e compartilhar momentos de alegria.

Agradeço, em especial, minha irmã Estefany Couto, minha amiga e conselheira para todas as horas, sem ela não teria coragem e perseverança para encarar todos os desafios e decisões difíceis.

Ao meu namorado, amigo e parceiro Rafael Anício, por todo carinho, disposição, companheirismo e, principalmente, pela paciência na fase final do curso de doutorado. E além disso, por compartilhar todas as alegrias e aflições de cuidar do nosso filhote Peteco.

Aos amigos Sônia Pamplona, João Peres e Débora Fagundes por todos os momentos compartilhados, que fizeram fortalecer todo o carinho e apreço que tenho por nossas amizades.

À minha doce orientadora Simone Gnoatto, por ter me acolhido como sua orientanda e por sempre estar disposta a ouvir, apoiar, incentivar e orientar.

Aos meus colegas e ex-colegas do LAFIS por compartilhar aprendizados e experiências, ajudar nos momentos decisivos do curso e dividir boas histórias, risadas e o café no intervalo do trabalho.

Aos meus amigos e colegas de trabalho, em especial Bruna, Elenilson, Denise e Josiane pela amizade, apoio moral e suporte científico.

Aos professores Saulo Andrade, Grace Gosmann e Aline Zimmer por toda a colaboração aos alunos do grupo de pesquisa.

Aos professores Diogo Pilger, Diogo Losch e Andreia Buffon e às alunas Júlia Willig e Débora Renz, do Laboratório de Análise Bioquímicas e Citológicas – UFRGS, pelos ensaios celulares nas linhagens cancerígenas.

Aos professores Alexandre José Macedo e Danielle Tretin e à aluna Sharon do Laboratório de Biofilmes & Diversidade Microbiana – UFRGS pelos ensaios antimicrobianos e de avaliação da formação de biofilme.

Agradeço à banca examinadora pelas contribuições científicas ao meu trabalho.

RESUMO

O câncer é uma doença que provoca em torno de 8,2 milhões de mortes por ano em todo o mundo. O câncer de mama e o câncer cervical são o primeiro e o quarto tipo mais frequentes em mulheres, e ambos apresentam alta taxa de mortalidade. Outro tipo de câncer menos frequente, mas igualmente preocupante é a leucemia mielóide crônica, pois 20-30% dos casos têm apresentado resistência ao tratamento medicamentoso mais recente (inibidores de tirosina-quinase), tido como revolucionário na terapêutica dessa doença. Contudo, episódios de resistência também ocorrem em outras enfermidades, tais como infecções bacterianas que apresentam formação de biofilmes, as quais podem tornar-se de 10 a 100 vezes mais resistentes aos antimicrobianos. Diversos fármacos antitumorais e antimicrobianos foram inspirados em produtos naturais em função da grande diversidade estrutural e a potencialidade desses compostos. Várias estratégias de modificação estrutural são utilizadas para melhorar a bioatividade dessas moléculas. Uma delas é a hibridação, que visa a produção de compostos multialvo, mais potentes e eficazes que seus precursores. Nesse contexto, desenvolvemos o estudo da bioatividade de compostos naturais, sintéticos e híbridos baseados no esqueleto do ácido betulínico (**1**) – Capítulo (Cap. I) e da Brosimina B (**2**). Os produtos naturais foram isolados de cascas de duas espécies vegetais, *Platanus acerifolia*, da qual foi obtido **1** (Cap. I) e *Brosimum acutifolium*, fonte dos flavonoides **1** (Cap. II e III), **2** e **3** (Cap. III). Os flavonoides sintéticos **3** e **4** (ambos do Cap. II) foram sintetizados via condensação aldólica e os compostos híbridos **3-7** (Cap. I) inspirados na hibridização de **1**(Cap. I) e **2**. Alguns compostos foram selecionados para análise em diversas células cancerígenas ou em cepas de *Staphylococcus aureus* sensíveis e resistentes a metilicina. No Capítulo I, mostramos que os híbridos **3** e **6** foram os mais potentes na inibição de células MCF-7 apresentando ação via apoptose. Além disso, outros híbridos também foram ativos em células de carcinoma cervical (Me-180 e HeLa). No Capítulo II, dois flavonoides **2** e **4** foram ativos em células de K562 sensíveis e resistentes a Imatinib apresentando diferentes vias de ação, sendo que **2** induziu apoptose intrínseca através da ativação das caspases 3 e 9 e composto **4** teve ação antiproliferativa causando parada na fase G2/M do ciclo celular. Por fim, no Capítulo III, os flavonoides **1** e **2**, a 50µM, foram capazes

de reduzir em cerca de 73% a viabilidade e **2** reduziu 48% da biomassa de biofilme da cepa *S. aureus* sensível. Em cepas resistentes a meticilina, **2** também foi bastante eficaz, reduzindo de 70-98% da viabilidade da cepa MRSA 126. Nenhum dos compostos ativos apresentou citotoxicidade *in vitro* em células saudáveis, e em modelo *in vivo* de *Galleria mellonella*. Diante desses resultados, os compostos naturais e sintéticos apresentados exibiram atividades distintas de acordo com o tipo de célula ou cepa avaliada, alguns deles mostrando-se versáteis, tanto como agentes antimicrobianos como anticâncer, e outros altamente potentes e seletivos em específicas linhagens cancerígenas que podem estar intimamente relacionadas com complexas ou mesmo simples alterações estruturais introduzidas nas moléculas precursoras.

Palavras-chave: flavanas, chalconas sintéticas, ácido betulínico, hibridação, atividade anticâncer, atividade antibiofilme.

ABSTRACT

Cancer causes about 8.2 million deaths/year worldwide. Breast cancer and cervical cancer are the first and fourth most frequent types in women, respectively, and both have a high mortality rate. Another less frequent but equally worrying type of cancer is the chronic myeloid leukemia, since 20-30% of the cases have been resistant to the most recent drug treatment (tyrosine kinase inhibitors) regarded as revolutionary in the treatment of this disease. However, episodes of resistance also occur in other diseases, such as bacterial infections, including those presenting biofilm formation, which can become bacterial strain 10 to 100 times more resistant to antimicrobials. Several antitumor and antimicrobial drugs were inspired by natural products due to the great structural diversity and the potentiality of these compounds. Several strategies of structural modification are used to improve the bioactivity of these molecules, and one of them is hybridization, which aims to generate more powerful and effective multi-target compounds. In this context, we developed the bioactivity study of natural, synthetic and hybrid compounds based on natural products skeletons betulinic acid (**1**) – (Chapter I) and Brosimine B (**2**). The natural products were isolated from stem bark of two plant species, *Platanus acerifolia*, from which was obtained compound **1** (Cap. I) and *Brosimum acutifolium*, source of flavonoids **1** (Chapter II and III), **2** and **3** (Chapter III). Synthetic flavonoids **3** and **4** (both from Chapter II) were synthesized via aldol condensation and the hybrid compounds **3-7** (Chapter I) were inspired by the hybridization of **1** (Chap. I) and **2**. Some compounds were selected for analysis in cancer cells or in sensitive and methicillin-resistant strains (MRSA) of *Staphylococcus aureus*. In Chapter I, we showed that hybrids **3** and **6** were the most potent in the inhibition of MCF-7 cells presenting action via apoptosis; in addition, other hybrids were also active in cervical carcinoma cells (Me-180 and HeLa). In Chapter II, two flavonoids **2** and **4** were active in K562 cells sensitive and resistant to Imatinib presenting different mechanisms of action, in which **2** induced intrinsic apoptosis through the activation of caspases 3 and 9 and compound **4** had antiproliferative action causing stop in phase G2 / M cell cycle. Finally, in Chapter III, flavonoids **1** and **2**, at 50 μ M, were able to reduce 73% viability and **2** reduced 48% of biofilm biomass of the *S. aureus* sensitive strain. In

MRSA strains, **2** was also quite effective, reducing the viability of the MRSA 126 strain from 70-98%. None of most active compounds showed *in vitro* cytotoxicity in healthy cells, and in *Galleria mellonella* model *in vivo*, flavonoids **1**, **2** and **3** were not toxic. Given these results, the natural and synthetic compounds presented exhibited distinct activities according to the type of cell or strain evaluated, some of them being versatile as both antimicrobial and anticancer agents and other highly potent and selective in specific carcinogenic cell line that may be closely related to complex or even simple structural changes introduced into precursor molecules.

Keywords: flavans, synthetic chalcones, betulinic acid, hibridization, anticancer activity, antibiofilm activity.

LISTA DE ABREVIATURAS

AcOH – Ácido acético
ATP – trifosfato de adenosina
BRCA 1 – Breast Cancer type 1 (susceptibility protein)
BRCA 2 – Breast Cancer type 2 (susceptibility protein)
CC – Cromatografia em Coluna
CC₅₀ – Concentração Citotóxica de 50% em linhagem celular sadia
DCM – Diclorometano
DIPC – N,N'-diisopropilcarbodiimida
DMAP – 4-dimetilaminopiridina
DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO – Dimetilsulfóxido
DP – Desvio Padrão
EE – Extrato Etanólico
GLOBOCAN – projeto do IARC de estimativas de câncer no mundo
HeLa – Adenocarcinoma cervical humano
HER-2 - Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HMBC – Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HPLC – High Performance Liquid Chromatography
IC₅₀ – Concentração Inibitória de 50%
INCA – Instituto Nacional do Câncer
IARC - International Agency for Research on Cancer
IS – Índice de Seletividade
IV - Infravermelho
K562 – Linhagem celular humana de leucemia mielóide crônica
LMC – Leucemia Mielóide Crônica
MCF-7 - Linhagem celular humana de adenocarcinoma mamário
Me-180 - Adenocarcinoma cervical humano
Me₂CO - Acetona
NFκB – Fator Nuclear Kappa B
OMS – Organização Mundial da Saúde
p53 – gene supressor de tumor
PBS – Phosphate Buffered Saline
PC12 - Linhagem celular de feocromocitoma da medula suprarrenal de rato
PGE-2 – Prostaglandina E -2
ppm – Partes por milhão
QS – Quórum Sensing
RMN – Ressonância Magnética Nuclear
RPMI - Roswell Park Memorial Institute 1640
TBP – Traquéia, Brônquios e Pulmão
TKI – Inibidor de Tirosina-Quinase
SFB – Soro Fetal Bovino

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	17
2. OBJETIVOS.....	19
2.1 Objetivo Geral.....	19
2.2. Objetivos específicos	19
3. REVISÃO GERAL	21
3.1 Câncer	21
3.1.1 Câncer de Mama.....	22
3.1.2 Câncer cervical.....	23
3.1.3 Leucemia Mielóide Crônica	25
3.3 Produtos Naturais.....	32
3.4 Hibridação.....	36
CAPÍTULO I.....	39
CAPÍTULO II.....	53
CAPÍTULO III	87
4. DISCUSSÃO GERAL	97
5. CONCLUSÃO	103
6. REFERÊNCIAS	105
ANEXO I.....	115
ANEXO II	123
ANEXO III	129

1. INTRODUÇÃO GERAL

O câncer é uma enfermidade de crescimento incontrolável que mata milhões de pessoas no mundo todo ano (IARC, 2014). Apesar de existirem diversas abordagens terapêuticas para o combate ao câncer, como cirurgia, radioterapia, imunoterapia e quimioterapia, o principal obstáculo à cura do câncer é o desenvolvimento da resistência a multidrogas pelas células tumorais durante o tratamento (YUSA; TSURUO, 1989). A falha de resposta do câncer a uma terapia específica pode estar relacionada a fatores inerentes ao paciente ou a alterações genéticas ou epigenéticas específicas das células neoplásicas, que podem ser expressas em qualquer tipo de câncer, já que essas células exibem uma enorme heterogeneidade em relação à resistência medicamentosa (GEDIYA; NJAR, 2009).

Não tão distante das estatísticas do câncer, centenas de milhões de pacientes, segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), são afetados por infecções nosocomiais a cada ano levando a uma mortalidade significativa e a gastos financeiros no sistema de saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

A resistência a multidrogas em bactérias pode estar relacionada a diversos mecanismos genéticos ou também ao modo de vida ou sobrevivência de comunidades de bactérias, associadas ao biofilme, que por sua vez tem sido relatada como tipo de resistência mais significativamente complicado de se combater do que a de bactérias em modo planctônico (NIKAIDO, 2009; QI et al., 2016).

Assim como o câncer, as infecções bacterianas nosocomiais, são afecções com causas e complicações multifatoriais, as quais, geralmente, necessitam ser tratadas com medicamentos que tem ação sobre múltiplos componentes intracelulares e mecanismos de sinalização. Esforços têm sido aplicados na terapêutica para contornar os casos refratários como a combinação de terapias ou de drogas com o intuito de alcançar múltiplos alvos simultaneamente, diminuindo a propensão da doença à resistência (GEDIYA; NJAR, 2009; TEITEN; DICATO; DIEDERICH, 2014). A estratégia baseada nesse sentido, consiste em desenvolver fármacos que apresentem característica multialvo, chamados de compostos híbridos, os quais unem de formas variadas duas ou

mais moléculas ou segmentos farmacofóricos em uma só estrutura com o objetivo de agir sinergicamente sobre o alvo (DECKER, 2007).

Considerando a crescente urgência pelo desenvolvimento de agentes que modulem mais de um alvo terapêutico simultaneamente com o objetivo de aumentar a eficácia e segurança em comparação aos atuais medicamentos disponíveis no mercado, neste trabalho, compostos de origem natural e produtos sintéticos inspirados neles, como triterpenos e flavonoides com potencial antitumoral e antibacteriano, foram submetidos a modificações estruturais e hibridação molecular.

O planejamento dos compostos híbridos foi baseado em evidências do potencial antineoplásico de derivados sintéticos de chalcona acoplada a um esqueleto esteroidal demonstrado por Saxena e colaboradores (2007) e também de dados na literatura que afirmam a atividade de flavonoides e triterpenos na inibição da formação de biofilme (VIKRAM et al., 2010; MANNER et al., 2013; AWOLOLA et al., 2014; EVARISTO et al., 2014; WOJNICZ; TICHACZEK-GOSKA; KICIA, 2015; CHO et al., 2015; RASAMIRAVAKA et al., 2015; SLOBODNÍKOVÁ et al., 2016), este trabalho visa avaliar a atividade antitumoral e antibiofilme dos produtos naturais e seus derivados semissintéticos propostos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Isolar produtos naturais bioativos de *Brosimum acutifolium* e *Platanus acerifolia*, sintetizar derivados e moléculas inspiradas em flavonoides a fim de avaliar suas atividades biológicas.

2.2. Objetivos específicos

- Isolar flavonoides das cascas de *B. acutifolium*.
- Isolar o triterpeno ácido betulínico a partir das cascas de *P. acerifolia*.
- Sintetizar produto híbrido do acoplamento da Brosimina B e ácido betulínico
- Sintetizar flavonoides inspirados em produtos naturais.
- Avaliar a citotoxicidade dos compostos sintetizados em células de mamíferos.
- Avaliar a atividade antitumoral dos compostos em diferentes linhagens de câncer.
- Avaliar os possíveis mecanismos de ação dos compostos que demonstrarem atividade antitumoral.
- Avaliar a atividade antimicrobiana e antibiofilme em cepas de *S. aureus* dos flavonoides de *B. acutifolium*.

3. REVISÃO GERAL

3.1 Câncer

O câncer é considerado um grande problema de saúde pública mundial, e é causado, na maioria das vezes, por mutações de genes que controlam o crescimento e a mitose celular. A proliferação celular exacerbada pode invadir tecidos e órgãos, e ainda, quando ocorre rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas, podendo induzir metástase (INCA, 2015).

Segundo o projeto GLOBOCAN, em 2012, foram estimados 14,1 milhões de novos casos de câncer e 8,2 milhões de mortes em todo o mundo (FERLAY et al., 2013). Três anos depois, em 2015, outra estimativa realizada pelo Global Burden of Disease Cancer Collaboration mostrou um aumento em torno de 3,4 milhões de novos casos e 500 mil mortes (FITZMAURICE et al., 2017).

A nível global, o câncer de pulmão e de mama são os tipos mais frequentemente diagnosticados e mais letais, em homens e mulheres, respectivamente (TORRE et al., 2015). Em 2015, o câncer de mama foi o tipo de câncer mais diagnosticado em todo o mundo, com estimativa de 2,4 milhões de casos, seguido do câncer de traqueia, brônquios e pulmão (TBP, aproximadamente 2 milhões de casos), câncer colorretal, câncer de próstata e câncer de estômago (FITZMAURICE et al., 2017).

A incidência do câncer tem se expandido em países de todos os níveis de desenvolvimento devido ao crescimento e envelhecimento da população. As mulheres representam 49,5% da população mundial, mas compõem uma parcela maior dos indivíduos acima dos 60 anos, faixa etária em que o câncer ocorre com maior frequência (TORRE et al., 2017).

Entre mulheres, o câncer é a segunda principal causa de morte em todo o mundo, seguido de morte por doenças cardíacas. Em 2015, foram estimadas aproximadamente 3,7 milhões de mortes de mulheres causadas por câncer, e, destes casos em torno de 64% ocorreram em países em desenvolvimento (TORRE et al., 2017).

Em países desenvolvidos, o câncer que mais mata as mulheres é o câncer de TBP seguido do câncer de mama. Em países em desenvolvimento são diagnosticados, em mulheres, mais casos de câncer de mama e câncer cervical, e as principais causas de

morte relacionadas a câncer são por câncer de mama, seguido do câncer de TBP e câncer cervical (TORRE et al., 2017).

3.1.1 Câncer de Mama

Dentre os tipos mais frequentes de câncer, o câncer de mama se destaca por ser o mais comum entre as mulheres e o mais diagnosticado no mundo (FITZMAURICE et al., 2017; TORRE et al., 2017), sendo responsável pela morte de 523 mil mulheres em 2015. No Brasil foram estimados 59.700 novos casos de câncer de mama para 2018 (INCA, 2017).

A incidência e a mortalidade do câncer de mama têm aumentado nas últimas décadas (LUCIANI et al., 2013) e persiste em função de fatores de risco que estão associados à exposição prolongada ao hormônio estrogênico endógeno, como em casos de menarca precoce ou menopausa tardia, e a hormônios exógenos, administrados em terapias contraceptivas ou de reposição hormonal (EISENBERG; KOIFMAN, 2000; IARC, 2008; LACEY et al., 2009). O estrogênio estimula a carcinogênese de mama hormônio-dependente através de receptores de estrogênio (ER), expressos em 75% dos casos de câncer de mama (KARAMOUZIS et al., 2016). Os fatores genéticos associados ao histórico familiar são mais raros, como mutações nos genes BRCA1, BRCA2 e p53, e, a super expressão do gene do receptor de fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2), porém aumentam os riscos para a ocorrência do câncer de mama (INCA, 2015).

Variáveis fatores de risco incluindo consumo de álcool, excesso de peso corporal e sedentarismo foram responsáveis por cerca de 20% dos casos de câncer de mama em todo o mundo. Esses fatores oferecem um foco potencial para a redução dos casos dessa doença através da adoção de comportamentos saudáveis. Felizmente, a mamografia tem diminuído a mortalidade do câncer de mama na identificação precoce de tumores, fase em que o tratamento tem maior probabilidade de sucesso (TORRE et al., 2017).

Em países desenvolvidos, o câncer de mama é diagnosticado nos estágios iniciais e o prognóstico é bom. No entanto, em países em desenvolvimento, o diagnóstico ocorre nas fases mais avançadas da doença, acompanhado de uma taxa de sobrevivência baixa. Em 2012, 6,2 milhões de mulheres em todo o mundo sobreviveram ao câncer de mama passados cinco anos do diagnóstico da doença (TORRE et al., 2017).

As alternativas de tratamento para o câncer de mama atualmente utilizadas incluem procedimento cirúrgico, radioterapia e terapia sistêmica com quimioterápicos, terapia hormonal ou com imunoterápicos (MAXIMIANO et al., 2016).

Com o advento da biologia molecular e imunoterapia foi possível a realização de intervenções terapêuticas em alvos específicos, como o HER2 ou ERBB2, que um receptor tirosina-quinase que modula funções de sinalização relacionada com a proliferação e diferenciação celular (MAXIMIANO et al., 2016), a superexpressão desse receptor implica na patofisiologia do câncer de mama HER-positivo, sendo considerado um importante biomarcador. Trastuzumab (Herceptina®) foi o primeiro anticorpo recombinante aprovado que tem o HER2 como alvo biológico. Após este, foram lançados pertuzumab e lapatinib (MAXIMIANO et al., 2016; SWAIN et al., 2015).

Apesar dos avanços científicos e tecnológicos no diagnóstico precoce da doença e dos esforços para a melhoria do desenvolvimento dos tratamentos sistêmicos como imunoterapia alvo, ainda há recorrência do câncer, relacionada a resistência medicamentosa em 30% dos casos e a preocupante cardiotoxicidade provocada pelos agentes anti-HER2 (GONZALEZ-ANGULO; MORALES-VASQUEZ; HORTOBAGYI, 2007; MAXIMIANO et al., 2016).

3.1.2 Câncer cervical

O câncer cervical é o quarto tipo de câncer mais diagnosticado em mulheres e quarto em causa de morte relacionada a câncer feminino, com estimativa de 526 mil casos e 239 mortes em todo o mundo em 2015. Em países em desenvolvimento, é o segundo mais diagnosticado e terceiro em causa de morte, e é onde ocorrem aproximadamente 90% dos casos de câncer cervical (FITZMAURICE et al., 2017; TORRE et al., 2017).

O câncer cervical é causado por infecção por Papiloma vírus humano (HPV), na qual há produção de novas partículas virais em células epiteliais maduras, nestas células o HPV altera o controle do ciclo celular promovendo divisão celular descontrolada e acúmulo de danos genéticos (CROSBIE et al., 2013).

Segundo o *International Agency for Research on Cancer* (IARC), dentre as centenas de tipos de HPV, apenas 12 têm potencial carcinogênico: HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 e 59, dos quais os tipos HPV 16 e 18 são responsáveis por 70% dos casos de câncer cervical em todo o mundo (TORRE et al., 2017). A infecção persistente com HPV de alto risco (especialmente o tipo 16) pode causar, além do câncer cervical, câncer de vulva, vagina, ânus, pênis e orofaringe (CROSBIE et al., 2013).

Os fatores que aumentam o risco de câncer cervical em mulheres infectadas com HPV de alto risco inclui uso de contraceptivos orais, infecção por HIV ou por *Chlamydia trachomatis* e o hábito de fumar (ARNHEIM DAHLSTROM et al., 2011; TORRE et al., 2017).

Mulheres infectadas por HIV apresentam altas taxas de lesão escamosa intraepitelial e são mais suscetíveis ao câncer cervical invasivo, do que as mulheres HIV negativo. Isso ocorre em função da manutenção da alta carga viral de HIV no plasma e nas genitais, que influencia persistente infecção por HPV, gerando a lesão (KREITCHMANN et al., 2013).

Alguns estudos mostram que o desenvolvimento do câncer cervical também possui uma relação estreita entre a exposição prolongada ao estrogênio, em combinação com os receptores de estrogênio (RE α e RE β) e com o HPV (CHUNG; FRANCESCHI; LAMBERT, 2010). O estrogênio contribui diretamente para o desenvolvimento dessa doença, pois é capaz de desencadear hiperplasia cervical epitelial através da indução de proliferação celular RE α -dependente. Além disso, pode agir sinergicamente com o HPV, ativando a expressão dos oncogenes do HPV através do RE α ou por outras vias (CHUNG; FRANCESCHI; LAMBERT, 2010).

As principais formas de intervenções preventivas do câncer cervical constam a investigação através de exames clínicos e citológicos, pelos quais é possível a detecção de estágios iniciais da doença, muitas vezes podendo ser tratada com sucesso (TORRE et al., 2017); e a vacinação bivalente e quadrivalente contra HPV, que, teoricamente, poderia prevenir em torno de 70% dos casos de câncer. Atualmente, Organização Mundial da Saúde (OMS) preconiza a prioridade da vacinação em meninas entre 9 e 13 anos (CROSBIE et al., 2013) como principal forma preventiva da doença.

A abordagem padrão para tratamento local de câncer cervical é à quimiorradioterapia utilizando cisplatina, principalmente em seus estágios avançados. A adição da cisplatina a radioterapia reduz o risco relativo à morte em aproximadamente 50% (MONK; TEWARI; KOH, 2007; SILVA et al., 2013). Quanto ao câncer metastático, geralmente a quimioterapia citotóxica é adotada como tratamento de primeira escolha. No entanto, é frequente o desenvolvimento da resistência à cisplatina e, mesmo com a combinação com outros fármacos, não resulta em aumento das taxas de sobrevivência (MOORE et al., 2010). Contudo, as opções para quimioterapias de segunda geração são bastante limitadas. Por esse motivo, é constante a busca por melhorias da terapia de primeira linha (KRILL; TEWARI, 2015).

Há diversas evidências que relacionam o desenvolvimento do câncer cervical com a angiogênese, através de oncogenes do HPV que ativam diversas cascatas de sinalização que promovem a intensificação da via do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF).

Tendo em vista o VEGF como alvo biológico, bevacizumab foi o primeiro agente mediador de angiogênese de câncer cervical invasivo aprovado pelo FDA para uso de quimioterapia combinatória, sendo uma alternativa para melhora da sobrevida das pacientes com câncer cervical metastático (KRILL; TEWARI, 2015; TEWARI et al., 2014).

3.1.3 Leucemia Mielóide Crônica

A Leucemia Mielóide Crônica (LMC) é caracterizada pela presença do cromossomo Filadélfia, uma anormalidade genética que ocorre em função de uma translocação genética recíproca dos genes *bcr* e *abl* nos cromossomos 9 e 22, respectivamente. Esses genes direcionam a produção da proteína BCR-ABL, tirosina-quinase, que promove a proliferação das células tumorais responsáveis pela LMC (DOBBIN; GADELHA, 2002; LOPES; ABREU, 2009; TEFFERI et al., 2005).

A LMC ocorre com uma incidência global anual de 10 a 12 casos em cada 100.000 habitantes, afetando principalmente adultos na faixa etária entre 57 e 60 anos

(HÖGLUND; SANDIN; SIMONSSON, 2015). No Brasil, em 2012, foi estimada uma prevalência anual de cerca de 10.125 casos desta doença (BRASIL, 2013).

A média de sobrevivência era de 5 a 7 anos para 59% dos pacientes até o ano 2000. Contudo, com a descoberta da terapia alvo utilizando ITQ (inibidores de tirosina-quinase), o número de transplantes de medula tem reduzido, e em menos de dez anos, a LMC deixou de ser vista como uma doença de prognóstico incurável (BJÖRKHOLM et al., 2011).

Os inibidores da tirosina-quinase constituem fármacos alvo que interferem nos mecanismos de sinalização celular, permitindo a terapia alvo-específica para determinadas doenças (ARORA; SCHOLAR, 2005). No caso da LMC, o medicamento pioneiro da terapia alvo é o imatinibe, composto 2-fenil-aminopirimidina que possui um efeito inibidor específico sobre três tirosinas-quinases ABL (BCR-ABL, v-ABL, c-ABL), prevenindo a ligação do ATP ao domínio abl via seis ligações de hidrogênio. Além disso, inibe a liberação de PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas) e ativação do gene *c-Kit*, sendo assim, capaz de induzir a remissão hematológica e citogenética na LMC (ALVES, 2009; MUGHAL et al., 2013). Esse medicamento é o tratamento de primeira linha disponível a pacientes do Sistema Único de Saúde (SUS), pois apresenta respostas mais expressivas, além de ser melhor tolerado do que outros medicamentos como o interferon alfa (BRASIL, 2014).

Apesar disso, em torno de 20 a 30% dos pacientes descontinuam o tratamento com imatinibe por várias razões. A principal delas é o desenvolvimento de resistência ao imatinibe, que ocorre entre 50 a 90% destes casos, provocando risco de progressão da doença nesses pacientes (APPERLEY, 2015).

No caso da leucemia, a resistência pode ocorrer em diferentes categorias, de acordo com as respostas hematológica, citogenética, molecular ou multifatorial. Com o estudo dos mecanismos de resistência envolvendo, principalmente, causas citogenéticas como mutações do gene BCR-ABL, as quais impedem a ligação adequada do imatinibe à quinase, outros ITQs foram incluídos no arsenal terapêutico da LMC em todos os estágios da doença, como o nilotinibe, dasatinibe e busotinibe. Estes medicamentos de segunda geração provocam a inibição de um espectro mais abrangente de células com mutações resistentes ao imatinibe, mostrando superior eficácia e induzindo rápido efeito

e altas taxas de resposta molecular e resposta citogenética completa (BRECCIA; ALIMENA, 2014; IQBAL; IQBAL, 2014; MASSARO et al., 2018; PAGNANO, 2008). No entanto, células com a mutação específica T315I, somente são tratadas com ponatinibe, um ITQ de terceira geração (BRECCIA; ALIMENA, 2014).

Apesar do progresso no estudo da leucemogênese e avanços nos esquemas de clínicos, as taxas de mortalidade continuam altas (SAK; EVERAUS, 2017; McGARRY et al, 2014). A fim de mudar esse cenário novas estratégias terapêuticas tem sido o foco de muitas pesquisas.

3.2 Biofilmes Bacterianos

Até meados da década de 1970, acreditava-se que o crescimento bacteriano ocorria apenas em modo planctônico (suspensão em meio líquido), porém, estudos mais recentes reconhecem que muitas populações bacterianas tendem a agregar-se em comunidades de microorganismos, até mesmo de diferentes espécies (HENRIQUES; VASCONCELOS; CERCA, 2013).

Evidências geológicas demonstram que microcolônias de biofilmes podem ter sido identificadas em ambientes hidrotermais e em fósseis datados há mais de 3,4 bilhões de anos, o que indica que essa habilidade é uma característica ancestral de procariotos para promover a sua própria sobrevivência (HALL-STOODLEY; COSTERTON; STOODLEY, 2004).

O biofilme pode ser classificado como formas sésseis funcionais de microorganismos ligados entre si ou a um substrato, envoltos por matriz extracelular. Dessa forma, a camada de biofilme consiste numa barreira de proteção a agentes antimicrobianos, ao sistema imune e a estímulos mecânicos (HENRIQUES; VASCONCELOS; CERCA, 2013; LIZCANO, 2015; TRENTIN, 2013).

A transição do crescimento planctônico para biofilme ocorre em resposta a mudanças no ambiente, consistindo num processo que envolve múltiplas vias regulatórias que induzem alterações nas expressões gênicas, mediando a reorganização espacial e temporal das bactérias. Além disso, modifica o perfil de expressão de moléculas de superfície e fatores de virulência, permitindo a sobrevivência dessas

bactérias (KOSTAKIOTI; HADJIFRANGISKOU; HULTGREN, 2013). O biofilme contribui para a conservação do genótipo microbiano, no caso de bactérias, permite a manutenção do sistema que facilita a comunicação entre elas, a liberação de sinais químicos e a expressão de genes de virulência (HENRIQUES; VASCONCELOS; CERCA, 2013; LIZCANO, 2015; TRENTIN et al., 2013).

A comunicação dessas bactérias ocorre através de um fenômeno denominado *quorum sensing* (QS) que consiste na produção, liberação, detecção e resposta a metabólitos, os quais são responsáveis pela sinalização e comunicação entre os membros do biofilme. Outras vantagens que o QS proporciona são a adaptação a alterações ambientais promovendo uma resistência a fatores de estresse externos, e, a possibilidade de distinção entre diferentes cepas de bactérias, como forma de monitoramento da densidade populacional e de seus metabólitos para a utilização adequada e eficaz dos recursos disponíveis (HENRIQUES; VASCONCELOS; CERCA, 2013; SILVA et al., 2016).

O mecanismo de iniciação da formação dos biofilmes ocorre através do processo de adesão reversível entre o microorganismo e a superfície biótica ou abiótica, sujeitos a interações físicas como polaridade, forças de Van der Waals e interações hidrofóbicas (VEERACHAMY et al., 2014).

Uma forte adesão passa a se formar a partir de interações químicas das adesinas da superfície das bactérias com a superfície ligante, dando início à formação do polissacarídeo de superfície e alicerce do biofilme. Essa aderência leva ao desenvolvimento de microcolônia estável que dá início à proliferação bacteriana e adesão intercelular (VEERACHAMY et al., 2014).

A multiplicação dessas bactérias leva a construção da arquitetura do biofilme com aglomerados de células em camadas. Dessa forma, as microcolônias se desenvolvem a macrocolônias envoltas de matriz extracelular polissacarídica contendo proteínas, polissacarídeos e DNA extracelular. As substâncias poliméricas extracelulares compõem 90% da massa do biofilme, assumindo a barreira de proteção e o ambiente em que ocorre sinalização intercelular entre as bactérias (BLACKLEDGE; WORTHINGTON; MELANDER, 2013; SILVA et al., 2016; VEERACHAMY et al., 2014).

Sendo assim, a formação de agregados de bactérias aderidos a uma superfície implica em alterações fisiológicas e em padrões de expressão gênica diferentes dos observados em bactérias planctônicas, criando um “fenótipo de biofilme” pela expressão de genes específicos (DAVIES, 2003). Talvez a mais relevante diferença fenotípica entre esses modos de vida é a menor susceptibilidade dos biofilmes aos agentes antimicrobianos em relação às bactérias planctônicas equivalentes (HALL; MAH, 2017).

Em virtude da formação do biofilme, as bactérias podem chegar a tornar-se de 10 a 100 vezes mais resistentes aos antimicrobianos, sendo extremamente difíceis de se erradicar (DAVIES, 2003; LIU et al., 2015). Há diversos fatores que permitem maior resistência do biofilme aos antimicrobianos como o *quorum sensing*, a heterogeneidade das taxas metabólicas e de crescimento; a presença da matriz extracelular que age como um adsorvente reduzindo de forma física a penetração do antimicrobiano, prejudicando a interação com as células bacterianas; a expressão de fatores protetivos que incluem a bomba de efluxo de multidrogas, os regulons, ativados em resposta ao estresse, entre outros (DAVIES, 2003; SINGH et al., 2017).

Os biofilmes bacterianos são responsáveis por mais de 80% das infecções microbianas em humanos, como ferimentos crônicos, otites e fibrose cística. Além disso, 60% das infecções hospitalares estão relacionadas a estas formações em implantes médicos (LIU et al., 2015; MANNER et al., 2013; TRENTIN et al., 2011). Isso provoca um grande impacto, no que concerne à saúde do paciente, e também no âmbito socioeconômico (HENRIQUES; VASCONCELOS; CERCA, 2013).

Estudos mostram diversas estratégias para o combate a infecções relacionadas a biofilmes patogênicos, as quais envolvem interrupção do QS, revestimentos poliméricos, antimicrobianos ou nanoestruturados em superfícies, agentes quelantes, biossurfactantes, peptídeos antimicrobianos e fagoterapia (MCKENNEY et al., 2000; CIRIONI et al., 2006; CURTIN; DONLAN, 2006; ROHDE et al., 2005; VEERACHAMY et al., 2014). No entanto, as estratégias eficazes de combate a biofilmes patogênicos normalmente requerem terapias combinadas ou multialvo (WU et al., 2015).

Os principais agentes patogênicos envolvidos nas infecções associadas a biofilmes são bactérias gram-positivas como *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sp.*; e as gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, entre outros (KOSTAKIOTI; HADJIFRANGISKOU; HULTGREN, 2013; LIZCANO, 2015). Na tabela 1, constam alguns exemplos de bactérias formadoras de biofilme relacionadas a implantes ou dispositivos médicos.

Dentre as bactérias citadas acima, destacamos *S. aureus* por ser o patógeno mais comumente encontrado em hospitais e na comunidade. Humanos são normalmente colonizados por *S. aureus* na superfície da pele e no trato respiratório superior. No entanto, é uma bactéria oportunista que podem causar graves infecções (STAPLETON; TAYLOR, 2002).

A primeira abordagem de tratamento de infecções por *S. aureus* foi com penicilina, porém, logo apareceram cepas resistentes que eram capazes de hidrolisar os anéis β -lactâmicos, que perdiam seu potencial antimicrobiano. Para evitar a perda da atividade, foram introduzidos na terapia antibióticos não suscetíveis às enzimas β -lactamases, como a meticilina. Também em pouco tempo foram detectadas cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA), em que o desenvolvimento da resistência foi devido a expressão adicional de uma proteína de ligação a penicilina (PBP2a) adquiridas de outras espécies resistentes a antibióticos (FOSTER, 2017). O uso de antibióticos tem induzido a emergente ocorrência de cepas MRSA multirresistentes, que resultam de mutações em genes que codificam proteínas-alvo e do acúmulo de genes resistentes a antibióticos (STAPLETON; TAYLOR, 2002).

Entre as bactérias multirresistentes, MRSA é a maior causadora de infecções ligadas a cuidados da saúde e de morte associadas a infecções nosocomiais (TACCONELLI et al., 2007). Neste contexto, este trabalho avalia a atividade antimicrobiana e antibiofilme de produtos naturais em cepas de *S. aureus* sensíveis e resistentes a meticilina.

Tabela 1. Tipos de implante ou dispositivo médico relacionados com as principais bactérias formadoras de biofilmes.

Implante médico	Bactérias formadoras de biofilme
Prótese artificial vocal	<i>Streptococcus mitis</i> <i>Streptococcus salivarius</i> <i>Rothia dentocariosa</i> <i>Streptococcus sobrinus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Stomatococcus mucilaginosus</i>
Prótese artificial de quadril	<i>Staphylococcus</i> coagulase-negativo <i>Streptococcus</i> β-hemolítico <i>Enterococcus</i> sp. <i>Pseudomonas mirabilis</i> <i>Bacteroides</i> sp. <i>S. aureus</i> <i>Streptococcus</i> sp. <i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Prótese articular	<i>S. aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>
Próteses de válvulas cardíacas	<i>Staphylococcus</i> coagulase-negativo <i>Enterococcus</i> sp. <i>S. aureus</i> <i>Streptococcus viridans</i>
Marca-passos cardíacos	<i>S. aureus</i>
Dispositivo para desvio do líquido cefalorraquidiano	<i>S. aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Enterococcus</i> sp.
Tubo endotraqueal	<i>S. aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Cateter urinário	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Pseudomonas mirabilis</i>
Cateter de diálise peritoneal	<i>Staphylococcus</i> sp. <i>Streptococcus</i> sp.
Cateter venoso central	<i>S. aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>

	<i>Enterococcus faecalis</i>
Lentes de contato	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Cocos gram-positivos</i>
Implante dental	Cocos gram-positivos acidogênicos Bactérias orais anaeróbicas gram-negativas
Próteses implantadas para disfunção erétil	<i>S. aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>
Implantes ortopédicos	<i>Enterococcus sp.</i> <i>Pseudomonas mirabilis</i> <i>Bacteroides sp.</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Streptococcus hemolítico</i>
Implantes de mama	<i>S. aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Enterococcus sp.</i>
Dispositivos contraceptivos intrauterinos	<i>Enterococcus sp.</i> <i>Micrococcus sp.</i> <i>Streptococcus grupo B</i>

Fonte de dados: (VEERACHAMY et al., 2014)

3.3 Produtos Naturais

A descoberta de novos fármacos é um grande desafio para a indústria farmacêutica moderna, pois demanda muito investimento de tempo e recursos, principalmente no que concerne a busca por novos compostos de origem natural (PATRIDGE et al., 2016).

Por essa razão, as indústrias tem adotado predominantemente métodos de triagem de alto rendimento (HTS – *high throughput screening*) ou estudos baseados em fragmentos de estruturas na descoberta de novos protótipos de fármacos, as quais se baseiam nas afinidades dos compostos com sítios específicos nos alvos biológicos ou similaridade de ligantes conhecidos através de métodos computacionais (BUTLER; ROBERTSON; COOPER, 2014; FERREIRA; GLAUCIUS; ANDRICOPULO, 2011). Os altos investimentos na área de pesquisa e desenvolvimento (P&D) contrastam com o número de novos medicamentos que têm chegado ao mercado nos últimos anos, especialmente antimicrobianos (MUNOS, 2009).

Apesar disso, os produtos naturais tem sido uma importante fonte de agentes bioativos utilizados na terapêutica. Em torno de 60% dos fármacos utilizados na quimioterapia tiveram inspiração em moléculas de origem natural, em virtude da grande diversidade e complexidade dessas estruturas (CRAGG; PEZZUTO, 2016). De 2008 a 2013, foram aprovadas para comercialização, 25 drogas de origem natural ou derivadas de produtos naturais; dentre elas, encontra-se o derivado sintético do paclitaxel, o cabazitaxel (Jevtana®) (BUTLER; ROBERTSON; COOPER, 2014). E outros derivados de produtos naturais com potencial anticâncer como de combretastatinas, ácido betulínico, roscovitina, purvalanóis e indirubinas estão em testes pré-clínicos (ALI-SEYED et al., 2016).

Neste contexto, abordamos neste trabalho, o estudo de produtos naturais, seus derivados semissintéticos e moléculas sintéticas baseadas em compostos de origem natural.

Brosimum acutifolium subs. acutifolium (Moraceae) é uma árvore típica de terras altas da região amazônica, conhecida popularmente como mururé-de-terra-firme ou mercúrio vegetal, por causa de seu látex avermelhado (CORRÊA, 1974; LE COINTE, 1947; VAN DEN BERG, 1982). Na medicina tradicional, as suas cascas são utilizadas como depurativo, antihelmíntico, antiinflamatório, principalmente no tratamento de doenças reumáticas, antitussígeno, tônico e como coadjuvante no tratamento de lesões da pele (COUTINHO, D. F.; TRAVASSOS, L. M. A.; DO AMARAL, 2002; LE COINTE, 1947; LIMA FILHO et al., 2002; TORRES et al., 2000).

A sua diversidade química foi demonstrada pelo isolamento de substâncias pertencentes a diversas classes, como flavonoides, cumarinas, bis-nor-sesquiterpenos, lignóides e terpenóides (TAKASHIMA et al., 2005; TAKASHIMA; ASANO; OHSAKI, 2002; TAKASHIMA; OHSAKI, 2001, 2002, TORRES et al., 1997, 2000; TORRES, 1998). Takashima e colaboradores (TAKASHIMA et al., 2005) investigaram o potencial antitumoral de diversos flavonoides isolados das cascas dessa espécie em células de leucemia murina P388 vincristina-resistente.

Recentemente, foi avaliada a atividade antioxidante de extratos de diferentes partes da *B. acutifolium*, assim como dos flavonoides 4'-diidróxi-7,8-(2'',2''-dimetilpirano)flavana (estrutura **1** dos Capítulos II e III), Brosimina B (estrutura **2** dos

Capítulos I, II e III) e 4-OH-lonchocarpina (estrutura **3** do Capítulo III), frente ao radical DPPH e NBT em macrófagos peritoneais de camundongo (COUTO, 2013). Além disso, **1**, **2** e **3** (tabela 2) induziram apoptose e efeito antiproliferativo em células de glioma do tipo C-6 a 75, 72 e 95 μM , respectivamente (MAUÉS, 2013).

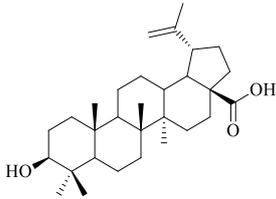
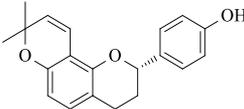
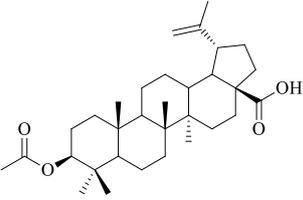
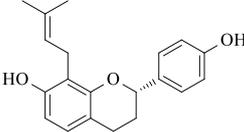
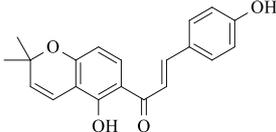
Outro efeito observado para o composto **1** (Cap. II e III) foi o citotóxico e antiproliferativo em células PC12 de feocromocitoma de rato e também, antiinflamatório através da inibição da produção de mediadores inflamatórios, em cultura de macrófagos como: a liberação de TNF- α (10 μM) e PGE-2 (50 μM) e produção de óxido nítrico (25 μM) (COSTA et al., 2005; MORAES, 2011), contribuindo às alegações de uso da espécie e a afirmativa de Signorini e colaboradores (2006) sobre a ocorrência da atividade antiinflamatória do extrato hidroalcoólico de *B. acutifolium*, em ratos Lewis, com artrite induzida por adjuvante (SIGNORINI et al., 2006). Além disso, essa molécula apresentou atividade antimicrobiana *in vitro* em cepa de *Mycobacterium tuberculosis* (KANOKMEDHAKUL et al., 2004).

O composto **3** (Cap. III) é uma chalcona amplamente distribuída em diversas espécies vegetais e bastante relatada na literatura em virtude de suas diversas atividades biológicas, entre elas atividade antibacteriana, antifúngica, anticâncer, anti-transcriptase reversa, antituberculosa, antimalárica, antiinflamatória, anti-ornitine descarboxilase e antioxidante (KUETE; NOUMEDEM; NANA, 2013). No que concerne a sua atividade antimicrobiana e antifúngica, **3** foi capaz de inibir a viabilidade de diversas cepas de bactérias Gram negativas e Gram positivas, incluindo isolados clínicos de MRSA, bem como de diferentes cepas de *Candida sp.*, *Trichophyton rubrum* e *Micrporum audorium* (DZOYEM et al., 2013; KUETE et al., 2011; MBAVENG et al., 2008).

Outra molécula que se destaca por sua diversidade de atividades biológicas é um triterpeno lupano, o ácido betulínico (estrutura **1** do Capítulo I, tabela 2), também amplamente encontrado em várias espécies de plantas, dentre elas, o *Platanus acerifolia* (Platanaceae), planta exótica encontrada na região sul do país, caracterizada por ser uma árvore de grande porte comumente usada para ornamentação de locais públicos, bem como empregada na carpintaria (LEONARDIS, 1977; NICOLOSO; LAZZARI; FORTUNATO, 1999; PAI, JOSHI, 2014). O primeiro registro do isolamento do

composto **1** foi isolado a partir das cascas dessa espécie foi em 1948 por Bruckner e colaboradores (BRUCKNER; KOVÁCS; KOCZKA, 1948).

Tabela 2. Fórmulas estruturais dos produtos naturais estudados neste trabalho.

Composto	Fórmula Estrutural
1 (Capítulo I)	
1 (Capítulo II e III)	
1a (Capítulo I)	
2 (Capítulo I, II e III)	
3 (Capítulo III)	

O ácido betulínico possui potencial anti-inflamatório, antiviral, antisséptico, antimalárico, espermicida, repelente, antimicrobiano, antileishmania, anti-helmíntico e anticâncer através de ação na inibição de topoisomerase e indução de apoptose (BAI et al., 2012; DA SILVA et al., 2013; INNOCENTE et al., 2012; KOMMERA et al., 2010; MUKHERJEE et al., 2006; YANG et al., 2012). Outros estudos também indicam a atividade de **1** (Cap. I) sobre fatores e enzimas envolvidas na regulação da angiogênese em casos de câncer metastáticos, como inibição da enzima aminopeptidase N e do fator de crescimento induzido em células endoteliais e ativação da degradação proteasoma-

dependentes dos fatores de transcrição Sp1, Sp3 e Sp4, que regulam a expressão de VEGF (CHINTHARLAPALLI et al., 2007; FULDA, 2008).

Nosso grupo de pesquisa demonstrou que **1** (Cap. I) apresentou IC₅₀ de 10 µM frente à linhagem C-6 de glioma em estudos *in vitro*. Esse triterpeno também foi testado em outras linhagens celulares tumorais como leucemia mielóide crônica (K562), na qual exibiu IC₅₀ de 77,6 µM em 24h e 8,2 µM em 48h, avaliado como inibidor de proteossoma (WAECHTER et al., 2018). O ácido betulínico e seu derivado semissintético ácido 3-oxima-betulínico também foram ativos contra linhagem tumoral de melanoma murino (B16F10) em que exibiram IC₅₀ de 84 µM e 3,2 µM com indução de apoptose (dados submetidos à publicação).

Apesar de **1** (Cap. I) possuir muitas propriedades biológicas, estudos buscam otimizar suas atividades através de modificações estruturais, principalmente nas posições C-1, C-2, C-3, C-4, C-20 e C-28, considerados centros de diversidade dessa molécula (MUKHERJEE et al., 2006). Essa farmacomodulação também tem sido aplicada em diversas moléculas na descoberta de drogas, como estratégia de geração de compostos mais potentes e com menos efeitos colaterais.

Dessa forma, neste trabalho abordamos os carbonos C-3 e C-28 de **1** (Cap. I) como principais núcleos escolhidos para as modificações estruturais, entre elas o acoplamento de subunidade flavonoídica, bem como introdução ou substituição de grupos funcionais.

3.4 Híbridaçã

A hibridaçã é um tipo de estratégia utilizada no desenho de fármacos que consiste na elaboraçã de um composto contendo dois ou mais farmacóforos ligados entre si covalentemente (MEUNIER, 2008).

A pesquisa por moléculas híbridas está sendo aplicada na nova geraçã de medicamentos antitumorais, antibióticos e antimaláricos, no sentido de desenvolver compostos que combatam a doençã em vários alvos ou com diferentes mecanismos de açã, de maneira a apresentar uma toxicidade seletiva a célula tumoral, bactéria ou

parasito. Além disso, espera-se que a hibridação possa oferecer outras vantagens como aumentar a aderência do paciente ao tratamento, minimizar da toxicidade, gerar melhores combinações de fármacos, uma avaliação pré-clínica mais barata e diminuir o risco da interação medicamentosa, enquanto retarda o desenvolvimento da resistência da doença em foco (MEUNIER, 2008; MORPHY; RANKOVIC, 2005; MUREGI; ISHIIH, 2009).

A expectativa é de que os agentes híbridos possuam uma eficácia superior comparada aos seus precursores ou a suas combinações, como o exemplo das trioxaquinas que produzem uma melhor atividade antimalárica do que os seus componentes originais combinados. Atualmente, dos compostos híbridos anticâncer sintetizados, apenas a estramustina, foi aprovada pelo FDA na terapia do câncer de próstata (GEDIYA; NJAR, 2009; MUREGI; ISHIIH, 2009).

Os híbridos podem ser classificados de duas maneiras, uma através do tipo de conexão realizada entre as duas subunidades e outra através do tipo de interação com o alvo biológico.

Há três principais tipos de híbridos, de acordo com a forma de ligação entre os farmacóforos: híbridos diretamente ligados (fundidos), híbridos ligados por espaçador e híbridos sobrepostos. O primeiro tipo diz respeito às moléculas diretamente conectadas por ligações éster, amida, carbamatos ou fosfatos, geralmente compostas por ligações hidrolisáveis. O segundo tipo, como o nome já indica, são híbridos ligados por um espaçador entre as subunidades. O espaçador pode ser passível de clivagem ou não, sendo o último enzimaticamente estável. E o terceiro tipo, consiste em híbridos que combinam a sobreposição estrutural das subunidades, gerando um composto menor e mais simples em relação ao que se espera dos tipos anteriores (MEUNIER, 2008; MORPHY; RANKOVIC, 2005).

Outra classificação subdivide os híbridos de acordo com o tipo de interação que eles têm com o seu alvo biológico (Figura 1), que podem ser híbridos que agem sobre um único alvo, em que ambas subunidades interagem com o mesmo alvo, esse tipo também é conhecido como espada de gumes. Trioxaquinas mencionadas anteriormente, são híbridos que possuem ação antimalárica sobre a heme, através da sobreposição de

sua subunidade de aminoquinolina e também de alquilação do heme após ativação redutiva (MEUNIER, 2008).

Os híbridos que possuem alvos independentes e não relacionados, como o exemplo desenhado para tratamento da doença de Alzheimer, que conjuga as estruturas da Rivastigmina e Fluoxetina, as quais inibem a enzima acetilcolinesterase e transportadores de serotonina, respectivamente (KOGEN et al., 2002). E por fim, o tipo de híbrido que possui alvos diferentes que estão relacionados entre si ou que possuem dois domínios diferentes de um mesmo alvo biológico (OLIVEIRA PEDROSA et al., 2017), são exemplos os híbridos de quinacrina e imipramina que apresentam atividade antiprions, e são classificadas na categoria C (Figura 1) pois se ligam a sequências específicas do DNA (DOLLINGER et al., 2006).

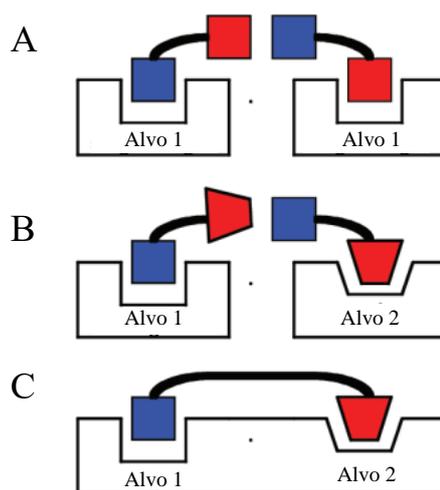


Figura 1. Representação esquemática do tipo de classificação dos híbridos de acordo com as interações com seu alvo biológico. A – Híbrido que possui farmacóforos que agem sobre o mesmo alvo. B – Híbrido que possui alvos independentes e não relacionados. C – Híbrido que possui ação sobre alvos diferentes e dependentes entre si.

Considerando a crescente urgência pelo desenvolvimento de agentes que modulem mais de um alvo terapêutico simultaneamente com o objetivo de aumentar a eficácia e segurança em comparação aos atuais medicamentos, este trabalho visa o estudo das potencialidades de produtos naturais, de seus derivados sintéticos e semissintéticos, incluindo compostos híbridos no intuito de avaliar as suas potencialidades biológicas e apontar características que influenciam na relação estrutura-atividade.

CAPÍTULO I

O texto completo do Capítulo I, ocupa o intervalo entre as páginas de 41 a 52, referente conteúdo do artigo científico oriundo da tese defendida. Este texto foi suprimido por tratar-se de manuscrito publicado em periódico científico de referência: Couto, N.M.G de, Willig, J.B., Ruaro, T.C., Oliveira, D.L., Buffon, A., Pilger, D.A, Arruda, M.S.P., Miron, D., Zimmer, A.R. and Gnoatto, S.C.B. Betulinic Acid and Brosimine B Hybrid Derivatives as Potential Agents Against Female Cancers. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 622 – 633, 2020. DOI: 10.2174/1871520620666200124111634.

CAPÍTULO II

O texto completo do Capítulo II, ocupa o intervalo entre as páginas de 55 a 86, referente às páginas do texto completo da tese defendida. Este texto foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. Consta do isolamento e síntese de flavonoides avaliados quanto às suas atividades antitumorais *in vitro* em células leucêmicas da linhagem K562 sensível e K562 resistente ao Imatinib.

CAPÍTULO III

O texto completo do Capítulo III, ocupa o intervalo entre as páginas de 89 a 95, referente ao conteúdo do artigo científico oriundo da tese defendida. Este texto foi suprimido por tratar-se de manuscrito publicado em periódico científico de referência: Reis, S.V. dos , Couto, N.M.G. de, Brust, F.R., Trentin, D.S., Silva, J.K.R. da, Arruda, M.S.P., Gnoatto, S.C.B., Macedo, A.J. Remarkable capacity of brosimine b to disrupt methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) preformed biofilms. **Microbial Pathogenesis**, v. 140, n. 103967, p.1 – 7, 2020. DOI: 10.1016/j.micpath.2020.103967.

4. DISCUSSÃO GERAL

Nos capítulos anteriores, apresentamos as análises biológicas realizadas com as moléculas de origem natural e os compostos sintéticos produzidos neste trabalho.

O triterpeno ácido betulínico **1** (Cap. I) foi obtido das cascas de *P. acerifolia* em ótimo rendimento de 2% considerando um composto isolado de fontes naturais. É uma molécula bastante versátil quanto às suas atividades biológicas, que abrangem inibição da geração de espécies reativas de oxigênio, atividade antifúngica e antimicrobiana em diversas cepas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, atividade antienzimática, anti-inflamatória, antiviral e, por fim, anticâncer (FULDA, 2008; FULDA; KROEMER, 2009; INNOCENTE et al., 2014a, 2014b, 2012; JIN et al., 2014; MULLAUER; KESSLER; MEDEMA, 2010). Sendo assim, nosso grupo de pesquisa tem trabalhado com a semissíntese de derivados de **1** e com o estudo da relação estrutura-atividade (REA), revelando a influência dessas modificações estruturais no esqueleto triterpênico em determinados testes biológicos. Não menos importante, os flavonoides representam uma classe relevante de metabólitos secundários bastante estudados, que se destacam também, por suas diversas e variadas atividades biológicas.

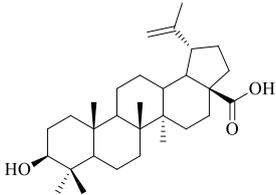
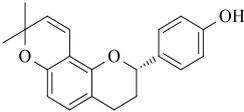
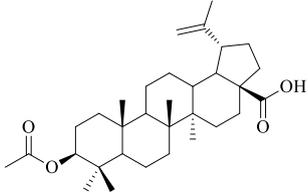
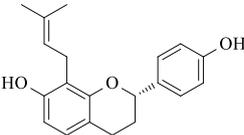
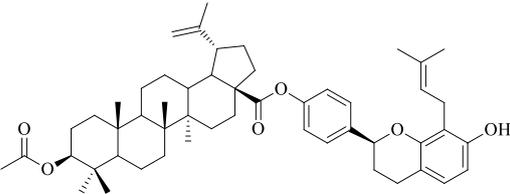
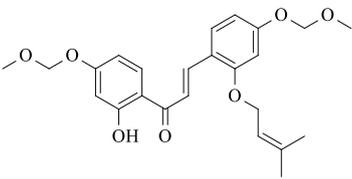
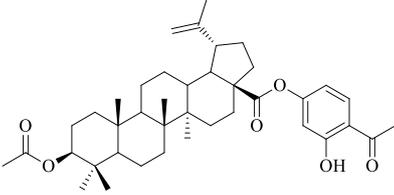
No Capítulo I, mostramos a síntese de derivados híbridos de **1** com o flavonoide **2** e com a 2,4-dihidróxi-acetofenona (**8**), seguido de alterações em alguns grupos funcionais. Os derivados foram sintetizados com um bom rendimento, exceto pelo híbrido **3**, reação em que o tamanho e a complexidade das moléculas (**1** e **2**) interferem no rendimento da reação final de acoplamento.

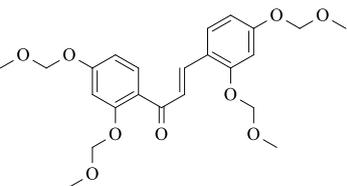
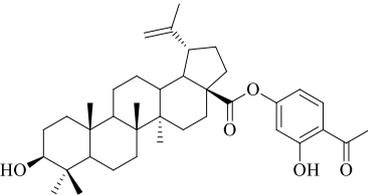
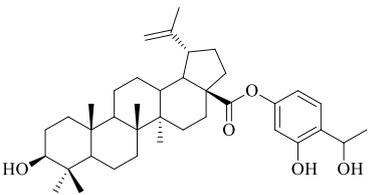
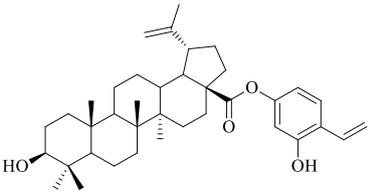
Nos Capítulos I, II e III, descrevemos dois métodos de isolamento de flavonoides obtidos das cascas de *B. acutifolium* **1** (Cap. II e III), **2** (Cap. I, II e III) e **3** (Cap. III) e, somente no Cap. II mostramos a síntese de duas chalconas **3** (Cap. II) e **4** (Cap. II), sendo a **3** inédita.

Os híbridos (**3** – **7**, Cap. I) assim como as outras moléculas abordadas nos outros capítulos foram submetidos a um screening em diversas linhagens celulares de câncer, como K562, MCF-7, HeLa e Me-180. Notamos que os compostos híbridos apresentaram uma tendência maior quanto à atividade em linhagens celulares de câncer cervical e de

mama, já os flavonoides, naturais e sintéticos, apresentaram atividade anticâncer mais pronunciada na linhagem de LMC.

Tabela 3. Referência numérica das estruturas avaliadas neste trabalho.

Referência numérica	Estruturas
1 (Capítulo I)	
1 (Capítulo II e III)	
1a (Capítulo I)	
2 (Capítulo I, II e III)	
3 (Capítulo I)	
3 (Capítulo II)	
4 (Capítulo I)	

4 (Capítulo II)	
5 (Capítulo I)	
6 (Capítulo I)	
7 (Capítulo I)	

O critério de seleção dos compostos foi a inibição mínima de 50% das células viáveis a uma concentração de 50 μM . A partir disso, os compostos selecionados foram testados nas determinadas linhagens celulares em faixas de concentração que variaram de 5 a 100 μM , para a obtenção das curvas dose-respostas, que por sua vez, fornecem diversos parâmetros que permitem caracterizar o efeito citotóxico das moléculas sobre as células, como potência (IC_{50}), eficácia (efeito máximo) e a relação entre elas (área sob a curva). Além disso, as moléculas foram testadas em linhagens de células saudáveis de Vero (Cap. I) e linfócitos humanos (Cap. II) para a avaliação dos índices de seletividade.

Dessa forma, o composto híbrido **3** (Cap. I) foi o mais potente e seletivo nas células de MCF-7, seguido do **6** que também foi ativo em HeLa. Ambos, provocaram a indução de apoptose detectada pela análise do ensaio de Anexina e Iodeto de Propídio e da morfologia nuclear com DAPI. Observamos também que as outras moléculas **1a** e **5** apresentaram atividade nas células de MCF-7 e Me-180, sendo detectada apoptose nos tratamentos em células de MCF-7, induzida por ambas moléculas, e, nas células de Me-

180 somente por **1a**. Além disso, os híbridos **5** e **7** apresentaram potência similar a **1a** sobre as células de Me-180, no entanto, podem agir por outras vias que não sejam por morte celular, uma vez que não foi induzida por ambos.

As atividades que envolvem a indução da apoptose podem estar relacionadas com a citotoxicidade do esqueleto triterpênico de **1**, já descrita na literatura, nas células de MCF-7 e HeLa através de diferentes vias de sinalização (LUO et al., 2016; POTZE et al., 2014).

Além disso, a atividade de **1** nesses tipos de câncer pode ter uma relação com a capacidade desse composto de inibir a síntese dos receptores de estrogênio (REs) e os sinais mediados pelos REs. Estudos apontam que o câncer cervical pode se desenvolver a partir de exposição prolongada de estrogênio em combinação com HPV (CHUNG; FRANCESCHI; LAMBERT, 2010) e na carcinogênese hormônio-dependente de mama, o estrogênio estimula o desenvolvimento da doença através dos REs, que chegam a ser expressos em 70% dos casos de câncer de mama (KARAMOUZIS et al., 2016; YUE et al., 2010). Sendo assim, ambas as células sofrem influência do estrogênio e de seus receptores, o que leva à hipótese de uma provável capacidade dos híbridos derivados de **1** também exercerem tal ação inibitória.

No Capítulo II, foi mostrada mais uma evidência do importante papel que a classe dos flavonoides tem sobre diferentes linhagens leucêmicas. A REA desta classe de compostos tem sido postulada de acordo com as principais características estruturais observadas nos compostos até então avaliados em diversas pesquisas, como a presença da dupla ligação no anel C, de substituições em posições específicas no anel A (C-5 e C-7) e B (C-3' e C-4') ou mesmo a presença de substituintes como metoxilas ou grupamentos isoprenos, como prenilas ou geranilas.

Concordando com a literatura, mostramos que a presença de metoximetilas (composto **4**, Cap. II) potencializam a atividade nas linhagens sensível e resistentes ao imatinibe de K562 e que a presença de OH nas posições 7 e 4' e do radical prenila (composto **2**) favorecem, principalmente, a indução do mecanismo de morte celular das células de K562 através da via intrínseca apoptótica, com ativação das caspases 3 e 9.

Além disso, o composto **4** (Cap. II), assim como outras chalconas descritas na literatura, provocou bloqueio da fase G2/M do ciclo celular e de maneira dose-dependente induziu a autofagia nas células de K562 (FILIPPI-CHIELA et al., 2011; MAIORAL et al., 2013). A flavana **2** também induziu autofagia nessa linhagem, o que pode indicar que ambos compostos desencadeiam vias de sinalização envolvidas ou relacionadas a mais de um mecanismo de ação (CHEN et al., 2018; DRULLION et al., 2012; NIKOLETOPOULOU et al., 2013).

No Capítulo III, fizemos uma abordagem diferente com os flavonoides isolados de *B. acutifolium* (**1**, **2** e **3**, Cap. III), pois os avaliamos quanto à capacidade antioxidante e a atividade sobre cepas de *Staphylococcus aureus* formadoras de biofilme sensíveis e resistentes a metilina.

A avaliação da atividade antioxidante indireta foi realizada por diferentes métodos de sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH•). A atividade é observada quando um composto antioxidante é capaz de inibir o radical mudando sua coloração de roxo para amarelo. As análises da atividade antioxidante fizeram parte da dissertação de mestrado da autora, em que consta que por meio do ensaio autográfico, o extrato etanólico das cascas de *B. acutifolium* (EE) e os compostos **1** e **2** apresentaram capacidade sequestradora do DPPH•. O extrato etanólico, por conter variados compostos naturais incluindo polifenóis apresentou menor EC₅₀ (4.8µg/mL) seguido de **2** (16.6 µg/mL).

O EE apresentou uma reação antirradicalar rápida atingindo inibição máxima do radical logo após dez minutos, estando de acordo com estudos com ácido ascórbico e outros polifenóis (SÁNCHEZ-MORENO; LARRAURI; SAURA-CALIXTO, 1998). O composto **1** (Cap. III), por sua vez, não apresentou atividade antioxidante na concentração testada (125 µg/mL) e o composto **2**, apresentou uma cinética de reação mais lenta, como já observado em outros estudos com flavonoides, como rutina. Além disso, a capacidade de alguns flavonoides de inibir EROs produzidos por oxidases, podem ter efeitos sobre antioxidantes endógenos agindo como protetores da oxidação celular (DIRVEN; OMMEN; BLADEREN, 1994; KUMAR; PANDEY, 2013; LIN et al., 2008; ROSS; KASUM, 2002).

A atividade antimicrobiana dos três flavonoides contra a cepa *S. aureus* ATCC 25904 foi avaliada a partir da obtenção da concentração mínima inibitória (MIC) e da concentração mínima bactericida (MBC). A MIC observada para os três compostos foi de 50 μM , enquanto que a MBC para **2** foi a menor (200 μM), além disso reduziu em 48% a biomassa do biofilme estabelecido de *S. aureus* à 100 μM com inibição de 88% da viabilidade bacteriana, destacando-se entre os demais flavonoides.

A relação entre as atividades antioxidante e antibiofilme da flavana **2** é de grande relevância para o tratamento de biofilme de *S. aureus*, como relatado em estudos que demonstram que a geração de EROs (liberados por neutrófilos) estimulam a formação de biofilme pelo *S. aureus* e a aumentam frequência de mutação a resistência bacteriana, sendo reduzido pela introdução de agente antioxidante, inclusive de flavonoides como a quercetina que aumentou a susceptibilidade da cepa de *S. aureus* a ação antimicrobiana da gentamicina (BUSTOS et al., 2016).

Além disso, entre os três flavonoides, **2** mostrou a mais baixa toxicidade e a melhor janela terapêutica para tratamento de infecção, sendo que a concentração quatro vezes a MIC não provocou danos aos eritrócitos. E *in vivo* no modelo animal de *G. mellonella* nenhum dos compostos atingiu a LD₅₀ nas concentrações testadas.

Considerando os promissores resultados da flavana **2**, esta molécula foi testada em três cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA), alcançando MICs que variaram de 50 a 100 μM nessas cepas. Ainda, o composto **2** foi capaz de reduzir a biomassa de biofilme e a viabilidade bacteriana nas três cepas em diferentes concentrações, sendo mais ativa contra MRSA 126. Esses resultados reforçam a potencialidade desse composto como agente no tratamento de infecção por *S. aureus*.

5. CONCLUSÃO

Este trabalho foi dividido em três capítulos que descrevem as atividades anticancerígenas e antibiofilme de compostos naturais e sintéticos propostos.

O isolamento dos produtos naturais foi obtido de duas espécies de plantas, uma delas nativa da Amazônia, *B. acutifolium*, da qual foram obtidos os compostos 4'-hidróxi-7,8(2'',2''-dimetilpirano)flavana (**1**, Cap. II), Brosimina B (**2**, Cap. I, II e III) e 4-hidróxi-lonchocarpina (**3**, Cap. III). E a outra planta é uma espécie exótica, *P. acerifolia*, desta última foi obtido o ácido betulínico (**1**, Cap. I) em ótimo rendimento.

Os produtos das reações, em geral, foram resultados de procedimentos simples e com alto rendimento, com exceção de um composto. O acoplamento entre **1** (Cap. I) e **2**, descrito no Cap. I, gerou uma série de moléculas, em que foram incluídos híbridos simplificados. O composto 2'(*S*)-7'-hidróxi-8'-(3'',3''-dimetil)alil-flavana-3-O-acetil-lup-20(29)-en-28-carboxilato (**3**, Cap. I) fruto dessa hibridização, apresentou alta seletividade e potência contra as células de MCF-7, induzindo morte por apoptose. E, outros compostos como híbrido **6** (1''-hidróxi-2'-hidróxifenil-3 β -hidróxi-lup-20(29)-en-28-carboxilato), provocaram morte por apoptose também em células de câncer cervical sendo 10 vezes menos tóxicos em células saudáveis. Esses dados indicam forte influência do esqueleto triterpênico quanto à ação por via apoptótica, e o aumento da potência da atividade das hibridizações quando comparados aos precursores **1a** e **2**.

As flavanas de *B. acutifolium* **1** (Cap. II) e **2** e as chalconas sintéticas **3**, 2-hidróxi-2'-O-(3'',3''-dimetil)-alil-4,4'-dimetoximetilchalcona (Cap. II) e **4**, 2,2',4,4'-tetrametoximetilchalcone (Cap. II) mostraram ser ativas em células leucêmicas de K562. As divergências estruturais foram cruciais para a determinação da potência e o mecanismo de ação desses flavonoides, em que observamos que a chalcona **4** foi a mais potente através de bloqueio do ciclo celular, em função da presença dos grupos metoximetila; além disso, a presença da C-prenila na posição 8 mostrada no composto **2** favorece a indução da apoptose, diferentemente dos grupos cromeno e O-prenila, presentes nos compostos **1** e **3**, que induziram morte por necrose. Além disso, o estudo

permitiu verificar que **2** e **4** também foram ativas nas células de K562 resistentes, possuindo um índice de resistência baixo em relação ao do imatinibe.

Por fim, observamos que os flavonoides de *B. acutifolium* são capazes de inibir o crescimento bacteriano de cepa de *S. aureus* sensível a meticilina, mesmo na presença de biofilme pré-formado, sendo que a flavana **2** conseguiu reduzir em quase 50% a biomassa do biofilme a 100 µM, e da mesma forma, diminuiu o biofilme formado e a viabilidade bacteriana de cepas resistentes a meticilina classificadas de moderada a fortes produtoras de biofilme. Além disso, o composto **2** demonstrou baixa toxicidade *in vitro* e *in vivo*.

A atividade do composto **2** sobre as cepas de *S. aureus* e seus biofilmes pode estar intimamente relacionada com a capacidade antioxidante dessa molécula, evitando que EROs estimulem o mecanismo de defesa da bactéria se manifestando através da formação de biofilme, como já descrito por outros autores.

Neste trabalho foram apresentadas moléculas naturais, híbridas e sintéticas com diferentes atividades biológicas e perfis de ação variados, no que concerne a potência e eficácia dos compostos, reforçando e contribuindo aos estudos de REA existentes na literatura e mostrando que as séries de compostos apresentaram uma interação diferente com cada tipo de célula ou microorganismo. Dessa maneira, esse estudo traz moléculas seletivamente potentes e seguras, representando promissores candidatos à fármacos na terapia anticâncer e contra infecções por *S. aureus*.

6. REFERÊNCIAS

- ALI-SEYED, M. et al. Betulinic Acid: Recent Advances in Chemical Modifications, Effective Delivery, and Molecular Mechanisms of a Promising Anticancer Therapy. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 87, n. 4, p. 517–536, abr. 2016.
- ALVES, R. DE C. S. Análise de pacientes com leucemia mieloide crônica com resistência primária ou secundária ao mesilato de imatinibe. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, n. 3, p. 166–177, 2009.
- APPERLEY, J. F. Chronic myeloid leukaemia. **The Lancet**, v. 385, n. 9976, p. 1447–1459, 2015.
- ARNHEIM DAHLSTROM, L. et al. Prospective Seroepidemiologic Study of Human Papillomavirus and Other Risk Factors in Cervical Cancer. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 20, n. 12, p. 2541–2550, 1 dez. 2011.
- ARORA, A.; SCHOLAR, E. M. Role of Tyrosine Kinase Inhibitors in Cancer Therapy. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 315, n. 3, p. 971 LP–979, 16 nov. 2005.
- BAI, K.-K. et al. Synthesis and evaluation of ursolic acid derivatives as potent cytotoxic agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 7, p. 2488–2493, 1 abr. 2012.
- BJÖRKHOLM, M. et al. Success Story of Targeted Therapy in Chronic Myeloid Leukemia: A Population-Based Study of Patients Diagnosed in Sweden From 1973 to 2008. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 18, p. 2514–2520, 20 jun. 2011.
- BLACKLEDGE, M. S.; WORTHINGTON, R. J.; MELANDER, C. Biologically inspired strategies for combating bacterial biofilms. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 13, n. 5, p. 699–706, out. 2013.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Leucemia Mieloide Crônica do Adulto** BRASIL, 2013. Disponível em: <http://conitec.gov.br/images/FichasTecnicas/PCDT_LeucemiaMieloideCrônicaAdulto_Retificada.pdf>
- BRASIL. Protocolos clínicos e diretrizes terapêuticas em Oncologia. . 2014.
- BRECCIA, M.; ALIMENA, G. SECOND-GENERATION TYROSINE KINASE INHIBITORS (TKI) AS SALVAGE THERAPY FOR RESISTANT OR INTOLERANT PATIENTS TO PRIOR TKIs. **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**, v. 6, n. 1, p. 2014003, 2 jan. 2014.
- BRUCKNER, V.; KOVÁCS, J.; KOCZKA, I. 181. Occurrence of betulinic acid in the bark of the plane tree. **J. Chem. Soc.**, p. 948–951, 1948.
- BUSTOS, P. S. et al. Protective effect of quercetin in gentamicin-induced oxidative stress in vitro and in vivo in blood cells. Effect on gentamicin antimicrobial activity. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 48, p. 253–264, dez. 2016.
- BUTLER, M. S.; ROBERTSON, A. A. B.; COOPER, M. A. Natural product and natural

product derived drugs in clinical trials. **Nat. Prod. Rep.**, v. 31, n. 11, p. 1612–1661, 2014.

CHEN, G. et al. Rapalog everolimus induces G1 cell cycle arrest through autophagy-mediated protein degradation of cyclin D1 in breast cancer cells. **Cancer Research**, v. 78, n. 4, p. P6-4-1-P6-4-1, 15 fev. 2018.

CHINTHARLAPALLI, S. et al. Betulinic Acid Inhibits Prostate Cancer Growth through Inhibition of Specificity Protein Transcription Factors. **Cancer Research**, v. 67, n. 6, p. 2816–2823, 15 mar. 2007.

CHUNG, S.-H.; FRANCESCHI, S.; LAMBERT, P. F. Estrogen and ER α : Culprits in cervical cancer. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 21, n. 8, p. 504–511, ago. 2010.

CIRIONI, O. et al. RNAIII-Inhibiting Peptide Significantly Reduces Bacterial Load and Enhances the Effect of Antibiotics in the Treatment of Central Venous Catheter-Associated Staphylococcus aureus Infections. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 193, n. 2, p. 180–186, 15 jan. 2006.

CORRÊA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das plantas exóticas cultivadas. Volume V.** Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1974.

COSTA, D. M. R. et al. **Antiproliferative Effect and Induction of Apoptosis on PC12 Cells by BSA-1, a Flavonoid Isolated From Brosimum Acutifolium** Florianópolis Brazilian Journal of Morphological Sciences, , 2005.

COUTINHO, D. F.; TRAVASSOS, L. M. A.; DO AMARAL, F. M. M. ESTUDO ETNOBOTÂNICO DE PLANTAS MEDICINAIS UTILIZADAS EM COMUNIDADES INDÍGENAS NO ESTADO DO MARANHÃO - BRASIL. **Visão Acadêmica**, 2002.

COUTO, N. M. G. DE. **Avaliação cromatográfica e da atividade antioxidante de extratos e flavanas da espécie Brosimum acutifolium subs. acutifolium (MORACEAE).** Universidade Federal do Pará, 2013.

CRAGG, G. M.; PEZZUTO, J. M. Natural Products as a Vital Source for the Discovery of Cancer Chemotherapeutic and Chemopreventive Agents. **Medical Principles and Practice**, v. 25, n. 2, p. 41–59, 2016.

CROSBIE, E. J. et al. Human papillomavirus and cervical cancer. **The Lancet**, v. 382, n. 9895, p. 889–899, set. 2013.

CURTIN, J. J.; DONLAN, R. M. Using Bacteriophages To Reduce Formation of Catheter-Associated Biofilms by Staphylococcus epidermidis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 4, p. 1268–1275, 1 abr. 2006.

DA SILVA, G. N. S. et al. Two series of new semisynthetic triterpene derivatives: differences in anti-malarial activity, cytotoxicity and mechanism of action. **Malaria journal**, v. 12, p. 89, 9 mar. 2013.

DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, p. 114–122, 2003.

- DIRVEN, H. A. A. M.; OMMEN, B. VAN; BLADEREN, P. J. VAN. Involvement of Human Glutathione S-Transferase Isoenzymes in the Conjugation of Cyclophosphamide Metabolites with Glutathione. **Cancer Research**, v. 54, p. 6215–6220, 1994.
- DOBBIN, J. DE A.; GADELHA, M. I. P. Mesilato de Imatinibe para Tratamento da Leucemia Mielóide Crônica. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 48, n. 3, p. 429–438, 2002.
- DOLLINGER, S. et al. A Chimeric Ligand Approach Leading to Potent Antiprion Active Acridine Derivatives: Design, Synthesis, and Biological Investigations. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, n. 22, p. 6591–6595, nov. 2006.
- DRULLION, C. et al. Apoptosis and autophagy have opposite roles on imatinib-induced K562 leukemia cell senescence. **Cell Death and Disease**, v. 3, n. e373, p. 1–9, 2012.
- DZOYEM, J. P. et al. Antimicrobial action mechanism of flavonoids from *Dorstenia* species. **Drug Discoveries & Therapeutics**, v. 7, n. 2, p. 66–72, 2013.
- EISENBERG, A. L. .; KOIFMAN, S. Aspectos Gerais dos Adenocarcinomas de Mama, Estadiamento e Classificação Histopatológica com Descrição dos Principais Tipos. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 46, n. 1, 2000.
- FERLAY, J. et al. **GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11**. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr>>.
- FERREIRA, R. S.; GLAUCIUS, O.; ANDRICOPULO, A. D. Integração das técnicas de triagem virtual e triagem biológica automatizada em alta escala: oportunidades e desafios em P&D de fármacos. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1770–1778, 2011.
- FILIPPI-CHIELA, E. C. et al. Autophagy Interplay with Apoptosis and Cell Cycle Regulation in the Growth Inhibiting Effect of Resveratrol in Glioma Cells. **PLoS ONE**, v. 6, n. 6, p. e20849, 13 jun. 2011.
- FITZMAURICE, C. et al. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015. **JAMA Oncology**, v. 3, n. 4, p. 524, 1 abr. 2017.
- FOSTER, T. J. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, n. 3, p. 430–449, 1 maio 2017.
- FULDA, S. Betulinic Acid for Cancer Treatment and Prevention. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, n. 6, p. 1096–1107, 27 jun. 2008.
- FULDA, S.; KROEMER, G. Targeting mitochondrial apoptosis by betulinic acid in human cancers. **Drug Discovery Today**, v. 14, n. 17–18, p. 885–890, set. 2009.
- GEDIYA, L. K.; NJAR, V. C. O. Promise and challenges in drug discovery and development of hybrid anticancer drugs. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 4, n. 11, p. 1099–1111, 1 nov. 2009.
- GONZALEZ-ANGULO, A. M.; MORALES-VASQUEZ, F.; HORTOBAGYI, G. N. Overview of resistance to systemic therapy in patients with breast cancer. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 608, p. 1–22, 2007.

- HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J. W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases. **Nat Rev Micro**, v. 2, n. 2, p. 95–108, fev. 2004.
- HALL, C. W.; MAH, T.-F. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, n. 3, p. 276–301, 1 maio 2017.
- HENRIQUES, A.; VASCONCELOS, C.; CERCA, N. A importância dos biofilmes nas infecções nosocomiais – o estado da arte. **Arquivos de Medicina**, v. 27, n. 1, p. 27–36, 2013.
- HÖGLUND, M.; SANDIN, F.; SIMONSSON, B. Epidemiology of chronic myeloid leukaemia: an update. **Annals of Hematology**, v. 94, n. S2, p. 241–247, 27 abr. 2015.
- IARC. **World Cancer Report 2008**. [s.l: s.n.].
- INNOCENTE, A. et al. Synthesis of isosteric triterpenoid derivatives and antifungal activity. **Chemical biology & drug design**, v. 83, n. 3, p. 344–9, mar. 2014a.
- INNOCENTE, A. M. et al. Anti-Trichomonas vaginalis activity from triterpenoid derivatives. **Parasitology Research**, v. 113, n. 8, p. 2933–2940, 2014b.
- INNOCENTE, M. A. et al. **Synthesis and Antiplasmodial Activity of Betulinic Acid and Ursolic Acid Analogues** *Molecules*, 2012.
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: MINISTÉRIO DA SAÚDE INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA), 2015.
- IQBAL, N.; IQBAL, N. Imatinib: a breakthrough of targeted therapy in cancer. **Chemotherapy research and practice**, v. 2014, p. 357027, 19 maio 2014.
- JIN, K. S. et al. Betulinic acid isolated from Vitis amurensis root inhibits 3-isobutyl-1-methylxanthine induced melanogenesis via the regulation of MEK/ERK and PI3K/Akt pathways in B16F10 cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 68, p. 38–43, 2014.
- KANOKMEDHAKUL, S. et al. New bioactive prenylflavonoids and dibenzocycloheptene derivative from roots of Dendrolobium lanceolatum. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 6, p. 968–972, 2004.
- KARAMOUZIS, M. V. et al. Targeting Androgen/Estrogen Receptors Crosstalk in Cancer. **Trends in Cancer**, v. 2, n. 1, p. 35–48, jan. 2016.
- KOGEN, H. et al. Design and Synthesis of Dual Inhibitors of Acetylcholinesterase and Serotonin Transporter Targeting Potential Agents for Alzheimer's Disease. **Organic Letters**, v. 4, n. 20, p. 3359–3362, out. 2002.
- KOMMERA, H. et al. Synthesis and Anticancer Activity of Novel Betulinic acid and Betulin Derivatives. **Archiv der Pharmazie**, v. 343, n. 8, p. 449–457, 19 ago. 2010.
- KOSTAKIOTI, M.; HADJIFRANGISKOU, M.; HULTGREN, S. J. Bacterial Biofilms: Development, Dispersal, and Therapeutic Strategies in the Dawn of the Postantibiotic Era. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 3, n. 4, p. a010306–a010306,

1 abr. 2013.

KREITCHMANN, R. et al. Squamous intraepithelial lesions in HIV-infected women: prevalence, incidence, progression and regression. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 288, n. 5, p. 1107–1113, 5 nov. 2013.

KRILL, L. S.; TEWARI, K. S. Integration of bevacizumab with chemotherapy doublets for advanced cervical cancer. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 16, n. 5, p. 675–683, 24 mar. 2015.

KUETE, V. et al. Antibacterial activity of some natural products against bacteria expressing a multidrug-resistant phenotype. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 37, n. 2, p. 156–161, 2011.

KUETE, V.; NOUMEDDEM, J. A. K.; NANA, F. Chemistry and pharmacology of 4-hydroxyonchocarpin: A review. **Chinese Journal of Integrative Medicine**, v. 19, n. 6, p. 475–480, 20 jun. 2013.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p. 1–16, 2013.

LACEY, J. V et al. Breast cancer epidemiology according to recognized breast cancer risk factors in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial Cohort. **BMC Cancer**, v. 9, n. 1, p. 84, 2009.

LE COINTE, P. **Amazônia Brasileira III – Árvores e Plantas Úteis (Indígenas e Aclimadas)**. 2. ed. Belém - PA: Companhia Editora Nacional, 1947.

LIMA FILHO, D. DE A. et al. Regeneração natural de três hectares de floresta ombrófila densa de terra firme na região do rio Urucu-AM, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 32, n. 4, p. 555–555, dez. 2002.

LIN, Y. et al. Luteolin, a flavonoid with potential for cancer prevention and therapy. **Current cancer drug targets**, v. 8, n. 7, p. 634–646, 2008.

LIU, H. et al. Antibacterial and anti-biofilm activities of thiazolidione derivatives against clinical staphylococcus strains. **Emerg Microbes Infect**, v. 4, p. e1, 7 jan. 2015.

LIZCANO, N. R. **Combate à adesão de bactérias patogênicas : busca por compostos ativos oriundos de micro-organismos associados ao gênero drosfera**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2015.

LOPES, N. R.; ABREU, M. T. C. L. Inibidores de tirosino quinase na leucemia mieloide crônica. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, n. 6, p. 449–453, 2009.

LUCIANI, S. et al. Cervical and female breast cancers in the Americas: current situation and opportunities for action. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 91, n. 9, p. 640–649, 1 set. 2013.

LUO, R. et al. Multiple molecular targets in breast cancer therapy by betulinic acid. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 84, p. 1321–1330, dez. 2016.

MAIORAL, M. F. et al. Apoptotic events induced by synthetic naphthylchalcones in human acute leukemia cell lines. **Biochimie**, v. 95, n. 4, p. 866–874, abr. 2013.

- MANNER, S. et al. Systematic Exploration of Natural and Synthetic Flavonoids for the Inhibition of *Staphylococcus aureus* Biofilms. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 19434–19451, 2013.
- MASSARO, F. et al. Novel tyrosine-kinase inhibitors for the treatment of chronic myeloid leukemia: safety and efficacy. **Expert Review of Hematology**, p. 1–6, 13 mar. 2018.
- MAUÉS, L. A. L. **Atividade antiproliferativa e antineoplásica de flavonóides da espécie *Brosimum acutifolium* em modelo de glioblastoma in vitro**. Universidade Federal do Pará, 2013.
- MAXIMIANO, S. et al. Trastuzumab in the Treatment of Breast Cancer. **BioDrugs**, v. 30, n. 2, p. 75–86, 18 abr. 2016.
- MBAVENG, A. T. et al. Antimicrobial activity of the crude extracts and five flavonoids from the twigs of *Dorstenia barteri* (Moraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, n. 3, p. 483–489, 2008.
- MCKENNEY, D. et al. Vaccine potential of poly-1-6 β -d-N-succinylglucosamine, an immunoprotective surface polysaccharide of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of Biotechnology**, v. 83, n. 1–2, p. 37–44, set. 2000.
- MEUNIER, B. Hybrid Molecules with a Dual Mode of Action: Dream or Reality? †. **Accounts of Chemical Research**, v. 41, n. 1, p. 69–77, jan. 2008.
- MONK, B. J.; TEWARI, K. S.; KOH, W.-J. Multimodality Therapy for Locally Advanced Cervical Carcinoma: State of the Art and Future Directions. **Journal of Clinical Oncology**, v. 25, n. 20, p. 2952–2965, 10 jul. 2007.
- MOORE, D. H. et al. Prognostic factors for response to cisplatin-based chemotherapy in advanced cervical carcinoma: A Gynecologic Oncology Group Study. **Gynecologic Oncology**, v. 116, n. 1, p. 44–49, jan. 2010.
- MORAES, W. P. **Caracterização do mecanismo de ação antiinflamatória do flavonóide BAS1 isolado da planta *Brosimum acutifolium***. [s.l.] Universidade Federal do Pará, 2011.
- MORPHY, R.; RANKOVIC, Z. Designed Multiple Ligands. An Emerging Drug Discovery Paradigm. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 21, p. 6523–6543, 1 out. 2005.
- MUGHAL, A. et al. Bcr-Abl tyrosine kinase inhibitors- current status. **Infectious Agents and Cancer**, v. 8, n. 1, p. 23, 2013.
- MUKHERJEE, R. et al. Betulinic Acid Derivatives as Anticancer Agents: Structure Activity Relationship. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 3, p. 271–279, 1 maio 2006.
- MULLAUER, F. B.; KESSLER, J. H.; MEDEMA, J. P. Betulinic acid, a natural compound with potent anticancer effects. **Anti-Cancer Drugs**, v. 21, n. 3, p. 215–227, 2010.
- MUNOS, B. Lessons from 60 years of pharmaceutical innovation. **Nature Reviews**

Drug Discovery, v. 8, n. 12, p. 959–968, 1 dez. 2009.

MUREGI, F. W.; ISHIH, A. Next-generation antimalarial drugs: hybrid molecules as a new strategy in drug design. **Drug Development Research**, p. n/a-n/a, 2009.

NICOLOSO, F. T.; LAZZARI, M.; FORTUNATO, R. P. Propagação vegetativa de *Platanus Acerifolia* Ait.: (I) efeito de tipos fisiológicos das estacas e épocas de coleta no enraizamento de estacas. **Ciência Rural**, v. 29, n. 3, p. 479–485, set. 1999.

NIKOLETOPOULOU, V. et al. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1833, n. 12, p. 3448–3459, dez. 2013.

OLIVEIRA PEDROSA, M. et al. Hybrid Compounds as Direct Multitarget Ligands: A Review. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 9, p. 1044–1079, 13 fev. 2017.

PAGNANO, K. B. B. Leucemia Mielóide Crônica: causas de falha do tratamento com mesilato de imatinibe. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, p. 22–26, abr. 2008.

PATRIDGE, E. et al. An analysis of FDA-approved drugs: natural products and their derivatives. **Drug Discovery Today**, v. 21, n. 2, p. 204–207, fev. 2016.

POTZE, L. et al. Betulinic acid-induced mitochondria-dependent cell death is counterbalanced by an autophagic salvage response. **Cell Death & Disease**, v. 5, n. 4, p. e1169–e1169, 10 abr. 2014.

ROHDE, H. et al. Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases. **Molecular Microbiology**, v. 55, n. 6, p. 1883–1895, mar. 2005.

ROSS, J. A.; KASUM, C. M. Dietary Flavonoids : Bioavailability, Metabolic Effects, and Safety. **Annual Review of Nutrition**, v. 22, n. 1, p. 19–34, jul. 2002.

SAK, K.; EVERAUS, H. Established Human Cell Lines as Models to Study Anti-leukemic Effects of Flavonoids. **Current Genomics**, v. 18, n. 1, p. 3–26, 2017.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 270, n. 199802, p. 270–276, 1998.

SIGNORINI, P. A. et al. **Avaliação do tratamento da artrite induzida por adjuvante completo de Freund, em ratos Lewis com as frações isoladas de *Brosimum acutifolium***. Manaus: XV Congresso de Iniciação Científica da UFAM, 2006

SILVA, I. H. et al. The impact of GGH -401C>T polymorphism on cisplatin-based chemoradiotherapy response and survival in cervical cancer. **Gene**, v. 512, n. 2, p. 247–250, jan. 2013.

SILVA, L. N. et al. Plant Natural Products Targeting Bacterial Virulence Factors. **Chemical Reviews**, v. 116, n. 16, p. 9162–9236, 24 ago. 2016.

SINGH, S. et al. Understanding the Mechanism of Bacterial Biofilms Resistance to Antimicrobial Agents. **The Open Microbiology Journal**, v. 11, n. 1, p. 53–62, 28 abr.

2017.

STAPLETON, P. D.; TAYLOR, P. W. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: mechanisms and modulation. **Science progress**, v. 85, n. Pt 1, p. 57–72, 2002.

SWAIN, S. M. et al. Pertuzumab, Trastuzumab, and Docetaxel in HER2-Positive Metastatic Breast Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 8, p. 724–734, 19 fev. 2015.

TACCONELLI, E. et al. Does antibiotic exposure increase the risk of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolation? A systematic review and meta-analysis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, n. 1, p. 26–38, 22 nov. 2007.

TAKASHIMA, J. et al. Brosimacutins J - M, Four New Flavonoids from *Brosimum acutifolium* and their Cytotoxic Activity. **Planta Medica**, v. 71, n. 7, p. 654–658, jul. 2005.

TAKASHIMA, J.; ASANO, S.; OHSAKI, A. Mururins A-C, Three New Lignoids from *Brosimum acutifolium* and their Protein Kinase Inhibitory Activity. **Planta Medica**, v. 68, n. 7, p. 621–625, jul. 2002.

TAKASHIMA, J.; OHSAKI, A. Acutifolins A–F, a New Flavan-Derived Constituent and Five New Flavans from *Brosimum acutifolium*. **Journal of Natural Products**, v. 64, n. 12, p. 1493–1496, dez. 2001.

TAKASHIMA, J.; OHSAKI, A. Brosimacutins A–I, Nine New Flavonoids from *Brosimum acutifolium*. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 12, p. 1843–1847, 1 dez. 2002.

TEFFERI, A. et al. Chronic Myeloid Leukemia: Current Application of Cytogenetics and Molecular Testing for Diagnosis and Treatment. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 80, n. 3, p. 390–402, mar. 2005.

TEWARI, K. S. et al. Improved Survival with Bevacizumab in Advanced Cervical Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 370, n. 8, p. 734–743, 20 fev. 2014.

TORRE, L. A. et al. Global cancer statistics, 2012. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 65, n. 2, p. 87–108, 2015.

TORRE, L. A. et al. Global Cancer in Women: Burden and Trends. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 26, n. 4, p. 444–457, abr. 2017.

TORRES, S. L. et al. Two flavans from *Brosimum acutifolium*. **Phytochemistry**, v. 44, n. 2, p. 347–349, 1997.

TORRES, S. L. et al. Flavonoids from *Brosimum acutifolium*. **Phytochemistry**, v. 53, n. 8, p. 1047–1050, 2000.

TORRES, S. L. F. **Flavonóides de *Brosimum acutifolium* (Moraceae)**. [s.l.] Universidade Federal do Pará, 1998.

TRENTIN, D. D. S. **Estratégias de combate à adesão de bactérias patogênicas e formação de biofilmes: prospecção de fitocompostos e modificações de superfícies visando uso biomédico**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2013.

TRENTIN, D. DA S. et al. Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid

region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 1, p. 327–335, 2011.

TRENTIN, D. S. et al. Tannins Possessing Bacteriostatic Effect Impair *Pseudomonas aeruginosa* Adhesion and Biofilm Formation. **Ploss One**, v. 8, n. 6, p. e66257, 2013.

VAN DEN BERG, W. E. **Plantas medicinais na Amazônia - Contribuição ao seu conhecimento sistemático**. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, 1982.

VEERACHAMY, S. et al. Bacterial adherence and biofilm formation on medical implants: A review. **Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine**, v. 228, n. 10, p. 1083–1099, 18 out. 2014.

WAECHTER, F. et al. Design, Synthesis and Biological Evaluation of Betulinic Acid Derivatives as New Antitumor Agents for Leukemia. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 13, 16 jan. 2018.

WU, H. et al. Strategies for combating bacterial biofilm infections. **International Journal of Oral Science**, v. 7, n. 1, p. 1–7, 12 mar. 2015.

YANG, S. et al. Design, synthesis and biological evaluation of novel betulinic acid derivatives. **Chemistry Central Journal**, v. 6, n. 141, 2012.

YUE, W. et al. Effects of estrogen on breast cancer development: Role of estrogen receptor independent mechanisms. **International Journal of Cancer**, v. 127, n. 8, p. 1748–1757, 15 out. 2010.

ANEXO I

O conteúdo completo do Anexo I, ocupa o intervalo entre as páginas de 117 a 122, referente ao material suplementar do artigo científico publicado em periódico: Couto, N.M.G de, Willig, J.B., Ruaro, T.C., Oliveira, D.L., Buffon, A., Pilger, D.A, Arruda, M.S.P., Miron, D., Zimmer, A.R. and Gnoatto, S.C.B. Betulinic Acid and Brosimine B Hybrid Derivatives as Potential Agents Against Female Cancers. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 622 – 633, 2020. DOI: 10.2174/1871520620666200124111634

ANEXO II

O conteúdo completo do Anexo II, ocupa o intervalo entre as páginas de 125 a 127, referente ao material suplementar do artigo científico, que foi suprimido por tratar-se de conteúdo que será publicado em revista científica.

ANEXO III

O conteúdo completo do Anexo III, ocupa o intervalo entre as páginas de 131 a 142, referente ao material suplementar do artigo científico publicado em periódico: Reis, S.V. dos, Couto, N.M.G. de, Brust, F.R., Trentin, D.S., Silva, J.K.R. da, Arruda, M.S.P., Gnoatto, S.C.B., Macedo, A.J. Remarkable capacity of brosimine b to disrupt methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) preformed biofilms. **Microbial Pathogenesis**, v. 140, n. 103967, p.1 – 7, 2020. DOI: 10.1016/j.micpath.2020.103967.

