



**PONTO FOCAL ALAGOAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS – UFAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

SASKYA ARAÚJO FONSECA

**FRACIONAMENTO FITOQUÍMICO BIODIRECIONADO PELA ATIVIDADE
ANTIRRETROVIRAL E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA
ESPÉCIE *Lafoensia pacari* A.Saint.-Hillaire**

Maceió – Alagoas
Dezembro de 2019



PONTO FOCAL ALAGOAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS – UFAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

SASKYA ARAÚJO FONSECA

**FRACIONAMENTO FITOQUÍMICO BIODIRECIONADO PELA ATIVIDADE
ANTIRRETROVIRAL E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA
ESPÉCIE *Lafoensia pacari* A.Saint.-Hillaire**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Santana
Coorientadora: Profa. Dra. Aldenir Feitosa dos Santos

Maceió – Alagoas
Dezembro de 2019

Catlogação na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central

Bibliotecária: Taciana Sousa dos Santos – CRB-4 – 2062

F676f Fonseca, Saskya Araújo.

Fracionamento fitoquímico biodirecionado pela atividade antirretroviral e avaliação da atividade antioxidante da espécie *Lafoensia pacari* A.Saint.-Hillaire / Saskya Araújo Fonseca. – 2019.

149 f. : il., grafs., tabs. color.

Orientador: Antônio Euzébio Goulart Santana.

Coorientadora: Aldenir Feitosa dos Santos.

Tese (doutorado na Rede Nordeste de Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. RENORBIO. Maceió, 2019.

Bibliografia: f. 142-149.

1. Plantas. 2. Agentes antivirais. 3. HIV(vírus). 4. *Lafoensia pacari*. 5. Fitoquímica. 6. Atividade antioxidante. I. Título.

CDU: 615.1:581.19

SASKYA ARAÚJO FONSECA

**FRACIONAMENTO FITOQUÍMICO BIODIRECIONADO PELA ATIVIDADE
ANTIRRETROVIRAL E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA
ESPÉCIE *Lafoensia pacari* A.Saint.-Hillaire**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Aprovada em: 12/12/2019

BANCA EXAMINADORA



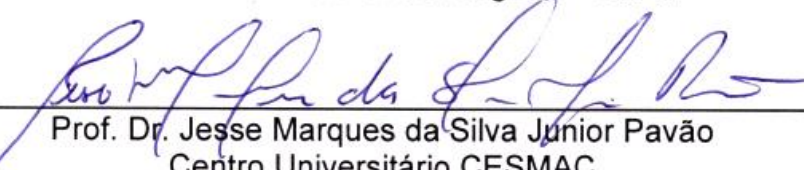
Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Santana
Orientador – Universidade Federal de Alagoas – UFAL



Profa. Dra. Aldenir Feitosa dos Santos
Coorientadora - Universidade Estadual de Alagoas – UNEAL




Profa. Dra. Fabiane Caxico de Abreu Galdino
Universidade Federal de Alagoas – UFAL



Prof. Dr. Jesse Marques da Silva Júnior Pavão
Centro Universitário CESMAC



Profa. Dra. Luciana Aparecida Corá
Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas - UNCISAL



Prof. Dr. Thiago José Matos Rocha
Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas - UNCISAL

Dedico a Deus por me fortalecer em todos os momentos e ao meu filho Yuri, o amor da mamãe.

“Aquele que habita no abrigo do Altíssimo e descansa à sombra do Todo-poderoso. Diga ao Senhor: Tu és o meu refúgio e a minha fortaleza, o meu Deus, em quem confio”.

Salmos 91:1,2

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser meu refúgio e fortaleza e por me fazer acreditar que iria seguir o caminho da docência e da pesquisa;

Ao meu filho amado Yuri Costa Ferro Fonseca por todo amor e carinho;

A minha família por sempre me motivar na carreira acadêmica, em especial aos meus pais: Teodorico José dos Santos Fonseca e Zelma Araújo Fonseca pelo amor incondicional;

Em especial a minha mãe Zelma, minha maior incentivadora na vida acadêmica e profissional;

Aos sempre especiais da minha vida: Raysa Araújo Fonseca, Rockson Araújo Fonseca, Dyanna Veloso, Sarah Fonseca, Gabriel Acioly, Beatriz Veloso, Kaio Veloso e Davi Acioly;

Ao meu orientador Doutor Antônio Euzébio Goulart Santana por ser um exemplo como pessoa, digno de admiração, por apresentar a determinação de um grande pesquisador na área de Produtos Naturais e por viabilizar a realização dessa pesquisa;

A minha coorientadora e amiga Doutora Aldenir Feitosa dos Santos por ser maravilhosa como ser humano e como pesquisadora na área de Produtos Naturais. Por me orientar desde o mestrado e por viabilizar a realização dessa pesquisa;

A professora Roberta Costa Santos Ferreira pela colaboração e motivação para a execução da pesquisa;

A professora Magna Suzana Alexandre Moreira e a Morgana Vital de Araújo pela colaboração para a execução da pesquisa;

A pesquisadora Suellen Albuquerque pela colaboração na pesquisa;

Ao Professor Francisco das Chagas Alves Lima por compartilhar seus conhecimentos e pela colaboração na pesquisa;

Aos Pesquisadores Edson de Souza Bento e Adilson Rodrigues Sabino pela colaboração na pesquisa;

Aos meus amigos do Doutorado Adilson Rodrigues, Aldy, Demetrius, Meyribeth Fernandez, Paulo, Keciane Mesquita, Thiago, Jane, Karlos, Regina, Kelly, Vanderson, Raquel, Abel, Alice, Viviane, Larissa, Bruna, Íssis, Jaqueline, Jéssica, Sâmea, Agda, Simone, Wandeck e Alessandro Riffel;

As minhas amigas que amo, Valéria de Melo Lopes e Samara Griz por todo o incentivo e por terem acreditado no meu sonho de ser docente e pesquisadora;

Aos amigos especiais: Amanda Lima, Karwhory Wallas e João Gomes pela colaboração na pesquisa;

A minha amada vó Maria Araújo *in memoriam*, que sempre me chamou de doutora;

Ao Centro Universitário Cesmac por todo o incentivo durante o doutorado;

A todos os docentes do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia;

A Universidade Federal de Alagoas- UFAL e ao laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais- LPqRN.

FRACIONAMENTO FITOQUÍMICO BIODIRECIONADO PELA ATIVIDADE ANTIRRETROVIRAL E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA ESPÉCIE *Lafoensia pacari* A.Saint.-Hillaire

RESUMO

Nos últimos anos, o interesse por plantas com ação antiviral tem crescido exponencialmente e algumas tem sido relatadas com propriedades anti-HIV. O vírus da imunodeficiência humana (HIV) é responsável pela base patológica da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) sendo um dos maiores desafios para a saúde pública. Justifica-se então a importância da comprovação da ação anti-transcriptase reversa da espécie *Lafoensia pacari* A. St.-Hil. (Lythraceae) visando a identificação das substâncias envolvidas nesta ação. A espécie *L. pacari* A. St.-Hil. é uma planta endêmica do cerrado brasileiro, conhecida popularmente como pacari, dedaleiro e magava-brava. Dentro deste contexto ressalta-se a importância em promover o isolamento biodirecionado pela atividade antirretroviral e antioxidante da espécie *L. pacari*. Essa pesquisa teve como objetivo geral realizar o fracionamento fitoquímico biodirecionado pela atividade antirretroviral e avaliação da atividade antioxidante da espécie *L. pacari*. Trata-se de um estudo experimental *in vitro* e a metodologia envolve preparo do material vegetal, obtenção do extrato etanólico, fracionamento, purificação, identificação e quantificação das frações, extração ácido-base, testes de atividade antioxidante, identificação e quantificação de compostos fenólicos das frações e subfrações da espécie *L. pacari*, ressonância magnética nuclear, teste de inibição da transcriptase reversa (TR) do HIV-1 e estudos de docking molecular. Também foi realizada revisão sistemática com metanálise sobre a utilização de plantas medicinais, fitoterápicos e/ou fitofármacos associados ou não a terapia antirretroviral, utilizando como variável primária a contagem de linfócitos T CD4⁺. Verificou-se com a metanálise que não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de intervenção e placebo, incluídos na pesquisa, em relação a qualquer das variáveis examinadas na contagem de CD4⁺. A partir do fracionamento biodirecionado pela atividade antirretroviral verificou-se uma maior atividade nas subfrações acetanólica com destaque para a subfração acetanólica neutros com 60,98% de inibição de TR e o ácido elágico com 88,61 % de inibição de TR e ausência de citotoxicidade. Verificou-se com o teste de citotoxicidade em linhagem de macrófagos que a fração clorofórmica foi mais tóxica que a fração acetanólica. A análise do espectro J-resolvido na região aromática apresentou um simpleto em 7.48 e 6.93 ppm que foram identificados como ácido elágico e ácido gálico respectivamente. A enzima 5TIQ obteve melhor parâmetro de afinidade com o ligante ácido elágico que foi confirmado pelos espectros HSQC-1H-¹³C. O ácido gálico mostrou-se também favorável a formar interação com a enzima 5TIQ, sendo confirmado através do espectro HSQC-1H-¹³C. Através da avaliação do PreADMET verificou-se que o ácido elágico é uma molécula promissora pela sua atividade de inibição da TR e parâmetros farmacocinéticos e de toxicidade. A amostra Subfração acetanólica água de lavagem compostos ácidos apresentou o melhor desempenho nas variáveis analisadas, com os melhores resultados para compostos fenólicos, flavonoides e ABTS. A amostra subfração acetato água lavagem básicos apresentou o pior desempenho. As variáveis que mais contribuíram para diferenciar as amostras em três grupos foram os compostos fenólicos (29,40%) flavonoides (27,90%) e DPPH (22,10%). A análise cromatográfica das amostras permitiu pela primeira vez a identificação e quantificação dos compostos fenólicos: ácido gálico, catecol, ácido clorogênico, ácido vanílico, ácido caféico, vanilina, seringaldeído, ácido salicílico, ácido cumárico, cumarina, rutina, quercetina e Kaempferol. Verificou-se que com exceção do ácido clorogênico, ácido vanílico, ácido caféico e cumarina, as amostras apresentaram diferença significativa para as demais variáveis. Vale destacar o desempenho da amostra *L. pacari* fração CHCl₃ compostos neutros que apresentou valores médios elevados para catecol, vanilina, ácido salicílico, quercetina e kaempferol. A identificação e quantificação dos compostos fenólicos e a análise multivariada no estudo da composição fenólica e perfil antioxidante sugerem que a *L. pacari* pode ser promissora como agente terapêutico anti-HIV.

PALAVRAS-CHAVE: Antiviral. HIV. Transcriptase reversa. Docking molecular. Antioxidante.

BIODIRECTED PHYTOCHEMICAL FRACTIONING IN ANTIREVIRAL ACTIVITY AND EVALUATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF THE SPECIES *Lafoensia pacari* A.Saint.-Hillaire

ABSTRACT

In recent years, interest in plants with antiviral action has grown exponentially and some have been reported to have anti-HIV properties. The human immunodeficiency virus (HIV) is responsible for the pathological basis of the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) being one of the greatest challenges for public health. The importance of proving the anti-reverse transcriptase action of the species *Lafoensia pacari* A. St.-Hil is justified. (Lythraceae) to identify the substances involved in this action. *L. pacari* A. St.-Hil. is an endemic plant of the Brazilian cerrado, popularly known as pacari, foxglove and magava-brava. Within this context, the importance of promoting isolation biodirected by the antiretroviral and antioxidant activity of the species *L. pacari* is emphasized. This research had as general objective to carry out the phytochemical fractionation bi-directed by the antiretroviral activity and evaluation of the antioxidant activity of the species *L. pacari*. This is an experimental study in vitro and the methodology involves preparing the plant material, obtaining the ethanolic extract, fractionation, purification, identification and quantification of fractions, acid-base extraction, tests of antioxidant activity, identification and quantification of phenolic compounds from *L. pacari* fractions and subfractions, nuclear magnetic resonance, HIV-1 reverse transcriptase (RT) inhibition test and molecular docking studies. A systematic review with meta-analysis on the use of medicinal plants, herbal medicines and / or phytopharmaceuticals associated or not with antiretroviral therapy, using the CD4⁺ T lymphocyte count as the primary variable. It was verified with the meta-analysis that there were no statistically significant differences between the intervention groups and placebo, included in the research, in relation to any of the variables examined in the CD4⁺ count. From the bio-directed fractionation by antiretroviral activity, there was a greater activity in acetanolic subfractions with emphasis on neutral acetanolic subfraction with 60.98% inhibition of TR and ellagic acid with 88.61% inhibition of TR and absence of cytotoxicity. It was verified with the cytotoxicity test in macrophage lineage that the chloroform fraction was more toxic than the acetanolic fraction. The analysis of the J-resolved spectrum in the aromatic region showed a simplet at 7.48 and 6.93 ppm, which were identified as ellagic acid and gallic acid respectively. The enzyme 5TIQ obtained a better affinity parameter with the ellagic acid ligand that was confirmed by the HSQC-1H-13C spectra. Gallic acid was also favorable to form interaction with the enzyme 5TIQ, being confirmed through the HSQC-1H-13C spectrum. Through the evaluation of PreADMET it was found that ellagic acid is a promising molecule due to its activity of inhibiting TR and pharmacokinetic parameters and toxicity. The sample Acetanolic subfraction washing acidic compounds showed the best performance in the analyzed variables, with the best results for phenolic compounds, flavonoids and ABTS. The basic wash water acetate subfraction sample showed the worst performance. The variables that most contributed to differentiate the samples in three groups were the phenolic compounds (29.40%) flavonoids (27.90%) and DPPH (22.10%). Chromatographic analysis of the samples allowed for the first time the identification and quantification of phenolic compounds: gallic acid, catechol, chlorogenic acid, vanillic acid, caffeic acid, vanillin, seringaldehyde, salicylic acid, cumaric acid, coumarin, rutin, quercetin and Kaempferol. It was found that, with the exception of chlorogenic acid, vanillic acid, caffeic acid and coumarin, the samples showed a significant difference for the other variables. It is worth highlighting the performance of the sample *L. pacari* fraction CHCl₃ neutral compounds that presented high mean values for catechol, vanillin, salicylic acid, quercetin and kaempferol. The identification and quantification of phenolic compounds and multivariate analysis in the study of the phenolic composition and antioxidant profile suggest that *L. pacari* can be promising as an anti-HIV therapeutic agent.

KEY WORDS: Antiviral. HIV. Reverse Transcriptase. Molecular docking. Antioxidant.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- δ – Deslocamento Químico
- p – Significância Estatística
- IL-2 – Interleukin-2
- R^2 – Coeficiente de determinação
- ABTS – 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfônico)
- AcOET – Acetato de etila
- ACP – Análise de Componentes Principais
- AG – Arabinogalactanas
- AGPs – Arabinogalactana-Proteínas
- AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida Humana
- Al^{3+} – Íon alumínio
- ANOVA – Análise de variância
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- ARV – Antirretroviral
- BHA – Butil-hidroxianisol
- BHT – Butil-hidroxi-tolueno
- BuTOH – Butanol
- CCD – Cromatografia de Camada Delgada
- CD – *cluster of differentiation*
- CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- CP – Componentes Principais
- d – Duplete
- dd – Duplo Duplete
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- DNA – do inglês: Ácido Desoxirribonucleico (ADN)
- DPPH – 1,1-difenil-2-picrilhidrazil
- EAB – Extração ácido-base
- EAG – Equivalente de Ácido Gálico
- EEB – Extrato Etanólico Bruto
- ELL – Extração Líquido-Líquido
- EO – Estresse oxidativo

EQ – Equivalente de Quercetina
EROs – Espécies Reativas de Oxigênio
EtOH – Etanol
FDA – *Food and Drug Administration*
 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – Cloreto férrico hexa-hidratado
FID – *Free Induction Decay*
FRAP – *Ferric Reducing Antioxidant Power*
FZPDG - *Concentrated granules of herbs*
GSH – Glutathiona Reduzida
GSSG – Glutathiona Oxidada
HDL-C – Lipoproteína de alta densidade direto
HIV – *Human Immunodeficiency Virus*
HMBC – *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*
HSQC – *Heteronuclear Single Quantum Coherence*
ITRNN – Inibidores da Transcriptase Reversa Não Nucleosídeos
J – Constante de Acoplamento
LDL-C – Lipoproteína de baixa densidade direto
M – Molar
MDA – Malonaldeído
MDCK- Madin-Darby Canino Rígido
MeOD – Metanol Deuterado
MeOH – Metanol
mg – miligramas
MHz – Megahertz
mRNA – RNA mensageiro
MTT – Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NF κ B – fator de transcrição nuclear
nm – Nanômetro
OC – Onda Contínua
OMS – Organização Mundial da Saúde
OPAS- Organização Pan-Americana da Saúde
OPLS-DA- *Orthogonal Projections to Latent Structures Discriminant Analysis*
ORAC – *Oxygen Radical Absorbance Capacity*

PA – Para Análise

PCA – *Principal Components Analysis*

PrEP – *Pre-Exposure Prophylaxis*

pH – *Hydrogenation potential*

RMN – Espectros de Ressonância magnética nuclear

RMN 13C – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono Treze

RMN 1H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RNA – *Ribonucleic acid*

RNaseH – Ribonuclease H

ROS – *Reactive oxygen species*

s – Simpleto

SCB- Sistema de Classificação Biofarmacêutica

SRA – Síndrome Retroviral Aguda

t – Tripleto

TARV – Terapia Antirretroviral

TBA – *Thiobarbituric acid*

TEAC – *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*

TF – Transformada de Fourier

TPTZ – *2,4,6 Tri(2-pyridyl)-s-Triazine*

TR – Transcriptase Reversa

TROLOX – 6 -hidroxi - 2,5,7,8 -tetrametilcromano - 2-carboxílico

UV-VIS – Radiação ultravioleta e/ou visível

Zy-4 – Zhongyan-4

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo Geral	16
2.2 Objetivos Específicos	16
3. REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1 O Retrovírus HIV	17
3.2 Ciclo biológico do HIV	17
3.3 Epidemiologia do HIV	19
3.4 Estratégias farmacológicas para terapia anti-AIDS	20
3.4.1 Inibidores da entrada do vírus na célula.....	21
3.4.2 Inibidores nucleotídeos da transcriptase reversa	22
3.4.3 Inibidores não-nucleosídeos da transcriptase reversa do HIV	22
3.4.4 Inibidores da integrase	24
3.4.5 Inibição da protease	25
3.4.6 Profilaxia Pré-Exposição ao HIV (PrEP).....	26
3.5 Resistência viral e a toxicidade das drogas	27
3.6 Plantas medicinais e HIV	28
3.7 A infecção pelo HIV e o estresse oxidativo	34
3.8 <i>Lafoensia pacari</i> A. Saint.-Hilaire	37
3.8.1 Descrição botânica e distribuição geográfica da <i>Lafoensia pacari</i> A. St.-Hil.	37
3.9 Modelagem molecular no desenvolvimento de fármacos	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1 HERBAL MEDICINES FOR TREATING HIV INFECTION AND AIDS: a systematic review and meta-analysis	42
4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIRRETROVIRAL E CITOTOXICIDADE DA ESPÉCIE <i>Lafoensia pacari</i> Saint-Hilaire	68
4.3 ANÁLISE MULTIVARIADA NO ESTUDO DA COMPOSIÇÃO FENÓLICA E PERFIL ANTIOXIDANTE DA ESPÉCIE <i>Lafoensia pacari</i> Saint-Hilaire	102
5. CONCLUSÃO	141
REFERÊNCIAS	142

1. INTRODUÇÃO

As plantas medicinais são elementos que constituem a biodiversidade e são largamente utilizadas desde os primórdios da civilização por vários povos e de diversas maneiras. Atualmente, cerca de 80% da população utiliza recursos da medicina popular para tratamento de alguma doença, sendo que os conhecimentos das técnicas utilizadas e o emprego são transmitidos por gerações (FIRMO et al., 2014).

O crescente interesse pelo uso de plantas na atualidade está relacionado a vários fatores como: o alto custo dos medicamentos industrializados, a crise econômica, a falta de acesso da população à assistência médica e farmacêutica e uma tendência dos consumidores em utilizar produtos de origem vegetal (BASTOS, 2007; LEITE; MARINHO, 2014; SANTOS, 2007).

Além destes fatores, contribuições relevantes sobre as técnicas modernas de separação, elucidação estrutural, *screening* e síntese combinatória têm levado à revitalização do uso de plantas como fonte de novos fármacos (FERREIRA, 2010; LIMA, 2012). Assim, esse conjunto de fatores tem estimulado potencialmente as pesquisas com plantas objetivando a descoberta ou comprovação de sua ação farmacológica ou o isolamento e identificação de seus princípios bioativos.

A utilização irracional das plantas medicinais é preocupante, pois há escassez de informações sobre a confiabilidade e segurança do uso da maioria das plantas medicinais. Entretanto, é possível evidenciar o crescente aumento das pesquisas etnofarmacológicas e emprego de técnicas modernas de farmacologia, bioquímica, toxicologia e biologia molecular para avaliar, preconizar e validar o uso de plantas medicinais, o que também favorece a diminuição do tempo gasto no desenvolvimento de um novo medicamento (FIRMO et al., 2015).

O Brasil, como um país de enorme biodiversidade tem muitas de suas espécies vegetais utilizadas empiricamente, sem respaldo científico quanto à eficácia e segurança, devido ao número inexpressivo de pesquisas sobre o potencial terapêutico dessas espécies (CATÃO et al., 2012). A variedade de biomas reflete a enorme riqueza da flora e da fauna brasileiras que se traduz em mais de 20% do número total de espécies da Terra, fato que eleva o Brasil ao posto de principal nação entre os 17 países megadiversos (PIMENTEL et al., 2015).

Além disso, muitas das espécies brasileiras são endêmicas, e diversas espécies vegetais têm importância econômica mundial. O número de espécies está estimado entre 350.000 e 550.000, destas, apenas 55.000 catalogadas e distribuídas entre as diferentes regiões do país (RIBEIRO et al., 2014).

Entretanto, ainda existe uma grande variedade de plantas não estudadas, tanto no sentido de utilização direta, como na obtenção de novos constituintes ativos ou de novas moléculas que possam servir como modelos para compostos farmacologicamente ativos. Com relação às pesquisas já realizadas com espécies vegetais têm se observado que, de um modo geral, as espécies têm sido muito utilizadas para o tratamento de uma variedade de enfermidades infecciosas e não-infecciosas, de caráter parasitológico, bacteriano, fúngico ou virótico (DA CUNHA, 2007).

O interesse por plantas com ação antiviral tem crescido exponencialmente e algumas tem sido relatadas com propriedades contra o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) (FERREIRA, 2010; ALMEIDA; ALVES; AMARAL, 2012; DAN; CASTELLAR, 2015). Muitos biofármacos de origem vegetal tem sido utilizados no tratamento dos pacientes infectados com o vírus HIV (BAPTISTA et al., 2016).

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida Humana (SIDA) é causada pelo HIV, que infecta as células do sistema imunológico e o tratamento padrão atual é o uso prolongado de medicamentos antirretrovirais. Isso mantém os níveis de vírus baixos na corrente sanguínea, mas não erradica o HIV das células do corpo (HENRICH, 2019).

Existem dois tipos de vírus: HIV-1 e HIV-2, sendo o primeiro prevalente na maior parte do mundo. No ciclo biológico, o vírus utiliza três enzimas para a sua replicação: a Transcriptase Reversa (TR), a Integrase e a Protease. A TR é crucial no início do ciclo, pois converte o ácido ribonucleico (RNA) viral em ácido desoxirribonucleico (DNA) viral, se transformando em um alvo importante para o planejamento de novos inibidores. Os inibidores da TR disponíveis no mercado são limitados, tóxicos e apresentam diversos efeitos colaterais indesejáveis, o que favorece a interrupção do tratamento causando resistência aos medicamentos. Este fato ressalta a urgência de novos fármacos mais eficientes e menos agressivos (SILVA, 2015).

Além disso, o aumento na produção de estresse oxidativo contribui para a patogênese da infecção pelo HIV e a normalização dos distúrbios oxidativos pode ser relevante para os indivíduos que fazem uso da terapia antirretroviral (TASCA, 2016). Dentre as espécies vegetais utilizadas de forma empírica, a espécie *Lafoensia pacari* A. Saint.-Hillaire, conhecida popularmente como Pacarí, Mangava-brava, ou Dedaleiro tem sido utilizada na medicina popular como cicatrizante, antineoplásico, no combate à gastrite e úlcera, como antidepressivo (GALDINO, 2015) como imunostimulante (CORRÊA; PENNA, 1984; PORTO et al., 2008), antioxidante (SOLON et al., 2000), antibacteriano e anti-inflamatório (PORFÍRIO et al., 2009).

Dentre os principais compostos químicos da *L. pacari* estão presentes fenóis, taninos, flavonoides, esteróides, triterpenos, quinonas, alcaloides e saponinas (PORTO et al., 2008; GALDINO, 2015). Existem muitos relatos de atividade anti-HIV e antioxidante de flavonoides (HSIEH et al., 2004; KITAMURA, et al., 1998; BESSONG et al., 2005), taninos (BESSONG et al., 2005), triterpenos (TIAN et al., 2008) e alcaloides (HSIEH et al., 2004), o que reforça os resultados encontrados com os extratos da *L. pacari* e estimula estudos que visem a identificação de seus componentes bioativos.

Dentro deste contexto, ressalta-se a importância em promover o isolamento biodirecionado pela atividade antirretroviral e a análise multivariada no estudo da composição fenólica e perfil antioxidante da espécie *L. pacari*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Realizar o fracionamento fitoquímico biodirecionado pela atividade antirretroviral (anti-TR) e avaliar o potencial antioxidante da espécie *L. pacari* (cascas do caule).

2.2 Objetivos Específicos

- Realizar uma revisão sistemática com metanálise das espécies vegetais com ação antirretroviral;
- Realizar o fracionamento fitoquímico biodirecionado pela ação anti-TR dos extratos brutos e frações da espécie *L. pacari*;
- Promover o fracionamento biodirecionado e a elucidação estrutural dos compostos majoritários presentes nas frações com ação anti-TR;
- Determinar o efeito citotóxico do extrato etanólico das frações com ação anti-TR de *L. pacari*, na viabilidade de macrófagos;
- Realizar a análise multivariada no estudo da composição fenólica e perfil antioxidante da espécie *L. pacari*;
- Realizar estudos de *docking* utilizando o programa Docking Autodock[®] 4,2;
- Calcular parâmetros farmacocinéticos de absorção, distribuição, metabolização e excreção (ADMET) das moléculas propostas para avaliação farmacocinética preliminar dos possíveis candidatos a antirretrovirais e avaliação de toxicidade *in silico*.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 O Retrovírus HIV

A família dos retrovírus é um dos principais alvos de pesquisas nas últimas décadas por ser causadora de doenças graves em humanos, como a AIDS. Os retrovírus são formados por um genoma composto por duas cadeias simples de RNA e replicam o RNA viral por transcrição reversa pela ação da enzima transcriptase reversa (AZEVEDO, 2013).

São conhecidos dois tipos de vírus: HIV-1 e HIV-2. Ao entrar no organismo humano, o HIV age no interior das células do sistema imunológico. As células de defesa mais atingidas pelo vírus são os linfócitos T CD4⁺. As células do sistema imunológico de uma pessoa infectada pelo vírus começam então a funcionar com menos eficiência e, com o tempo, a capacidade do organismo em combater doenças comuns diminui, deixando o indivíduo susceptível ao aparecimento de vários tipos de doenças e infecções (SILVA, 2015).

A Síndrome Retroviral Aguda atinge entre 50 a 90% dos indivíduos infectados que apresentam sintomas da infecção aguda, ocorre geralmente entre a primeira e a terceira semanas após infecção. As manifestações clínicas incluem: febre, linfadenomegalia, faringite, exantema, mialgia e cefaleia. Os sinais e sintomas que caracterizam essa síndrome são muito semelhantes aos de outras infecções virais. Por isso, diante de um quadro de infecção viral aguda, é muito importante considerar esse diagnóstico diferencial e investigar potenciais fontes recentes de exposição ao vírus HIV (RODRIGUES et al., 2017).

3.2 Ciclo biológico do HIV

O início do ciclo do HIV ocorre a partir de um vírion maduro na corrente sanguínea, que contém as subunidades proteicas gp120 e gp41 que se ligam aos linfócitos T CD4⁺ (**Figura 1**). A interação da proteína gp120 com o linfócito CD4⁺ gera mudanças conformacionais na proteína gp120, permitindo a interação com os correceptores das quimiocinas CCR5 e CXCR4 do linfócito T do sistema imunológico, macrófagos e células dendríticas. Tais interações conduzem mudanças conformacionais na proteína gp41, fazendo com que ela exponha um peptídeo de

fusão que adentra na célula hospedeira, ocasionando a fusão do envelope viral (CUNICO; GOMES; VELLASCO JUNIOR, 2008; LAZZAROTTO, 2010).

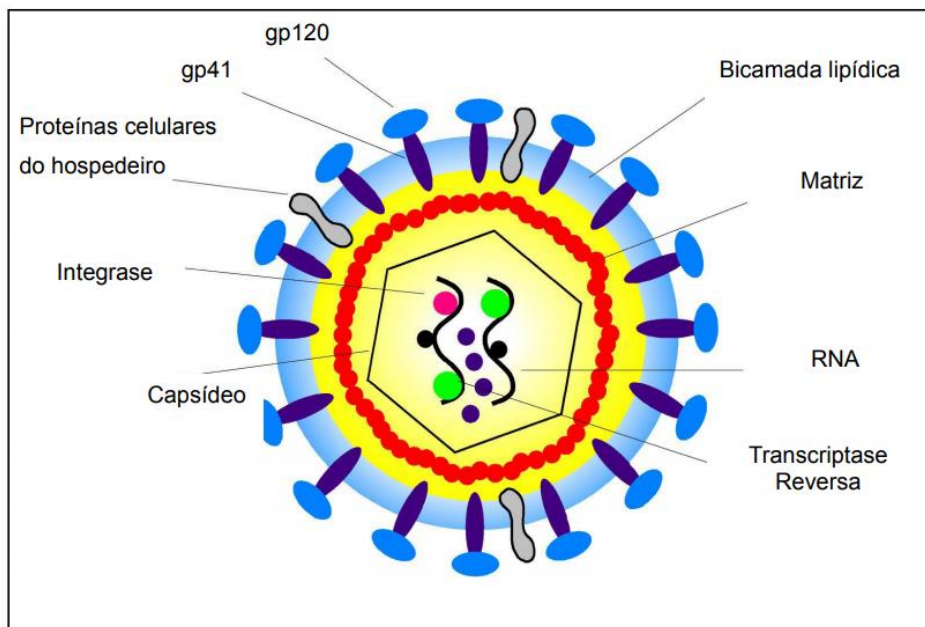


Figura 1. Estrutura morfológica do HIV.

Fonte: <http://hivbook.com/tag/life-cycle-of-hiv/>.

No interior do citoplasma, com a introdução do capsídeo viral no meio, ocorre a liberação do genoma viral com incorporação das enzimas TR, HIV-1 Integrase, Inibidores da protease, as quais se tornam ativas dando início à replicação. A etapa de replicação se inicia com a ação da enzima TR, que realiza a transcrição reversa do RNA viral em DNA viral, dando origem a uma molécula híbrida de RNA/DNA. A ribonuclease H tem a função de clivagem da fita de RNA presente na molécula híbrida. Com a formação da dupla fita de DNA, o DNA pró-viral terá agregação de proteínas virais e será transportado para o núcleo, e por meio da enzima IN, insere o DNA viral no DNA da célula (YOUNAI, 2013).

Na etapa tardia que ocorre dentro do núcleo, ocorre a ativação do pró-vírus e a transcrição do DNA da célula hospedeira, contendo o DNA viral, em RNA mensageiro (mRNA). Durante a síntese do mRNA, são produzidos dois tipos de RNA, um RNA genômico, que auxiliará na formação do vírus maduro e o RNA transcrito que servirá para a criação de poliproteínas virais, através de processos de *splicing*. Em seguida, esse RNA transcrito será transportado para fora do núcleo,

onde ocorrerá a tradução. O processo de tradução se inicia com a codificação das proteínas virais (SILVA, 2015).

No citoplasma, a enzima protease tem a função de clivar proteínas virais em subunidades para a formação de novas partículas virais. Cada subunidade contém uma das proteínas necessárias para a construção da nova partícula de HIV (CUNICO; GOMES; VELLASCO JUNIOR, 2008). Posteriormente, ocorrem os processos de montagem a partir de um complexo de nucleoproteínas, devido ao excesso de RNA transcritos. A nova partícula de HIV sai da célula hospedeira causando a sua morte através dos linfócitos T CD8⁺ que reconhecem as células infectadas como invasoras. O vírion recém-formado entra na circulação sanguínea podendo infectar novas células ou ficar circulando no meio extracelular (LAZZAROTTO, 2010).

3.3 Epidemiologia do HIV

A AIDS constitui uma pandemia e dados epidemiológicos demonstram que o HIV se encontrava presente na África Central, desde 1959. A sua propagação massiva ocorreu nos anos de 1970 e princípios dos anos de 1980, e foi difundida principalmente, entre homossexuais e bissexuais; usuários de drogas por via-parenteral; homens e mulheres heterossexuais com múltiplos parceiros; receptores de sangue e derivados (SILVA, 2015).

O aumento no número de pessoas em tratamento tem contribuído para manter mais pessoas soropositivas vivas e com melhor qualidade de vida. Uma pesquisa científica também mostrou que uma pessoa vivendo com HIV que adere a um regime efetivo de tratamento antirretroviral é até 97% menos propensa a transmitir o HIV. À medida que o acesso ao tratamento foi ampliado para as mulheres grávidas que vivem com HIV, novas infecções por HIV entre crianças foram reduzidas rapidamente. De 2010 a 2016, as novas infecções por HIV entre crianças diminuíram em 56% no leste e no sul da África, a região mais afetada pelo HIV, e em 47% em todo o mundo (UNAIDS, 2018).

No Brasil, de acordo com o Sistema de Informação de Agravos de Notificação no período de 2007 até junho de 2017 foram notificados 194.217 casos de infecção pelo HIV, sendo 96.439 (49,7%) na região Sudeste, 40.275 (20,7%) na região Sul,

30.297 (15,6%) na região Nordeste, 14.275 (7,4%) na região Norte e 12.931 (6,7%) na região Centro-Oeste (BRASIL, 2018).

No período de 2007 a junho de 2017, segundo sexo, foi notificado um total de 131.969 (67,9%) casos em homens e 62.198 (32,1%) casos em mulheres. Dentro do mesmo período, no que se refere às faixas etárias, observou-se que a maioria dos casos de infecção pelo HIV encontra-se nas faixas de 20 a 34 anos, com percentual de 52,5 % dos casos. Com relação à escolaridade, no mesmo período, verificou-se um elevado percentual de casos ignorados (25,4%), o que dificulta uma melhor avaliação dos casos de infecção pelo HIV relativos a esse item. Com relação à raça/cor da pele autodeclarada, observa-se entre os casos registrados no período de 2007 a 2017, 47,6% são entre brancos e 51,5% entre pretos e pardos (BRASIL, 2018).

Segundo a categoria de exposição entre os casos de infecção pelo HIV registrados de 2007 a junho de 2017 em indivíduos maiores de 13 anos de idade. Entre os homens, no período observado, verifica-se que 48,9% dos casos foram decorrentes de exposição homossexual, 37,6% heterossexual, 9,6% bissexual e 2,9% se deram entre usuários de drogas injetáveis; entre as mulheres, nessa mesma faixa etária, nota-se que 96,8% dos casos se inserem na categoria de exposição heterossexual e 1,7% entre usuários de drogas injetáveis (BRASIL, 2018).

Ressalta-se que a notificação compulsória da infecção pelo HIV é muito recente, o que impede uma análise epidemiológica rigorosa com relação às tendências da infecção no Brasil.

3.4 Estratégias farmacológicas para terapia anti-AIDS

O tratamento de doenças causadas por retrovírus consiste em utilizar medicamentos que impedem a síntese de RNA. O avanço mais significativo, em relação à infecção do HIV-1 pode ser atribuído ao tratamento dos pacientes através da utilização de fármacos antivirais, os quais podem suprimir a replicação do HIV-1 a níveis indetectáveis (AZEVEDO, 2013). O tratamento padrão atual é o uso prolongado de medicamentos antirretrovirais. Um avanço na medicina foram os relatos de duas remissões virais, o primeiro em 2009 foi o paciente de Berlim e o segundo exemplo relatado foi de um indivíduo infectado pelo HIV que foi tratado de

leucemia com um transplante de células-tronco que também entrou em remissão viral, sem nenhum vestígio do vírus no sangue (HENRICH, 2019).

Com o advento da terapia antirretroviral potente, as manifestações clínicas decorrentes da infecção pelo HIV tornaram-se menos frequentes e houve melhora substancial do prognóstico e da qualidade de vida dos indivíduos que vivem com o HIV (MEDEIROS; SILVA; SALDANHA, 2013).

Os mecanismos inibitórios sobre o HIV podem ocorrer através da inibição da entrada do vírus na célula (Inibição da adsorção e fusão viral); Inibição da transcriptase reversa; Inibição da integrase e Inibição da protease (AZEVEDO, 2013).

3.4.1 Inibidores da entrada do vírus na célula

A entrada do HIV-1 na célula hospedeira é essencial para que o vírus estabeleça uma infecção produtiva e, desta forma, representa um importante alvo para a prevenção da infecção e subsequente transmissão do HIV-1. Como a entrada do HIV na célula alvo envolve um mecanismo complexo de multietapas, o esforço para identificar agentes farmacológicos que possam interferir neste processo resulta em um grupo de compostos heterogêneos com mecanismos de ação distintos (TILTON; DOMS, 2010).

Nesta fase inicial da infecção, as etapas geralmente exploradas para a pesquisa de agentes antivirais são a ligação da glicoproteína (gp120) do vírus ao receptor do linfócito CD4⁺ ou aos correceptores celulares (CCR5 e CXCR4) e a penetração viral na membrana celular (DE SOUZA; DE ALMEIDA, 2003). A prevenção da fusão do vírus com a membrana da célula hospedeira geralmente ocorre pelo bloqueio da glicoproteína transmembrana viral gp41. O bloqueio da fusão celular também bloqueia a transmissão célula-célula do vírus HIV (FERREIRA; RIFFEL; SANT'ANA, 2010).

São denominados inibidores de fusão os medicamentos anti-HIV que atacam o vírus nesse estágio do seu ciclo de vida. Apenas o composto enfuvirtida (**Figura 2**) foi aprovado pelo *Food and Drug Administration (FDA)* para uso clínico. A enfuvirtida é um polipeptídeo constituído de 36 aminoácidos que interage com a gp41

impedindo a fusão do vírus com a membrana da célula (CUNICO; GOMES; VELLASCO JUNIOR, 2008).

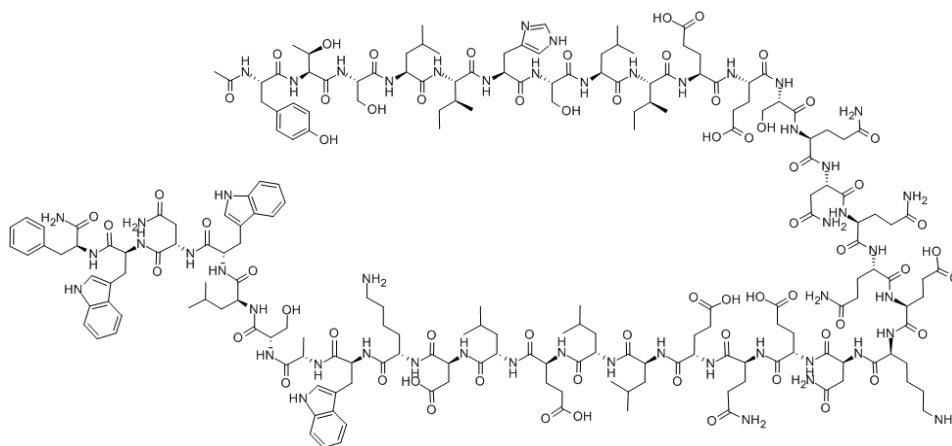


Figura 2. Enfuvirtida.

Fonte: <http://hivbook.com/tag/life-cycle-of-hiv/>.

3.4.2 Inibidores nucleotídeos da transcriptase reversa

A primeira fosforilação é a etapa crucial para a formação dos metabólitos ativos dos inibidores nucleosídeos. Muitas moléculas não apresentam atividade devido à dificuldade de serem monofosforiladas. Com o intuito de contornar este problema, vários análogos nucleotídeos, como adefovir e tenofovir, foram sintetizados. Estes fármacos já possuem um grupo fosfato em sua estrutura e necessitam de apenas duas fosforilações para impedir a transcrição do RNA em DNA e, portanto, impedir a replicação viral. Os análogos de nucleotídeos em uso clínico são o adefovir e o tenofovir. Ambos compostos são pouco solúveis em água e possuem baixa biodisponibilidade quando administrados oralmente (CUNICO; GOMES; VELLASCO JUNIOR, 2008).

3.4.3 Inibidores não-nucleosídeos da transcriptase reversa do HIV

Os inibidores de transcriptase reversa não nucleosídicos (ITRNN) tem a capacidade de interação específica com a RT de HIV-1. Atualmente, mais de trinta classes distintas de compostos, apresentando esta atividade farmacológica foram

identificadas. A principal vantagem dos ITRNN sobre os inibidores nucleosídicos da RT é que não necessitam de uma etapa inicial de ativação intracelular (fosforilação) (PEÇANHA; ANTUNES, 2002).

Os inibidores não-nucleosídeos da transcriptase reversa do HIV são inibidores não competitivos que se ligam a um sítio alostérico da enzima. Como resultado desta interação, o sítio ativo responsável pela formação da dupla hélice de DNA tem sua mobilidade e flexibilidade restritas, que acarretam em uma drástica redução da eficiência da enzima (CUNICO; GOMES; VELLASCO JUNIOR, 2008).

Apenas três fármacos foram aprovados pelo FDA, nevirapina, delavirdina e efavirenz. Devido ao potencial estes fármacos são amplamente usados como componentes da Terapia antirretroviral (TARV). A nevirapina é inclusive um dos poucos fármacos utilizados para prevenir a transmissão do HIV de mãe para filho (PEÇANHA; ANTUNES, 2002). Os inibidores da transcriptase reversa não nucleosídeos (ITRNN), efavirenz e nevirapina ainda são frequentemente utilizados no âmbito da terapêutica anti-retrovírica de combinação (**Figura 3a e 3b**), a curto prazo, ambos os fármacos têm apresentado uma efetividade semelhante, no entanto têm diferido nos perfis de segurança (MEIRELES, 2015).

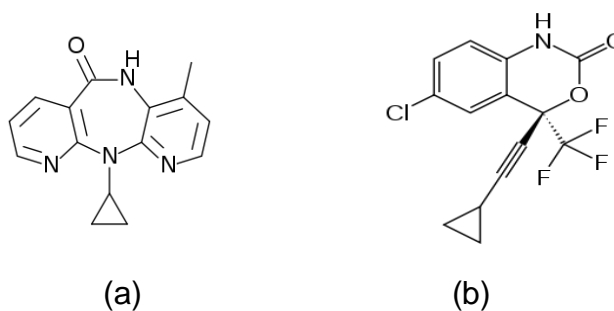


Figura 3. Nevirapina (3a) e Efavirens (3b).

Fonte: <http://www.fcencias.com/2014> e <https://commons.wikimedia.org/wiki>

Mais de 30 classes de moléculas com diferentes estruturas foram identificadas como inibidores da transcriptase reversa do HIV. Entretanto a grande maioria destas moléculas tem suas fases clínicas descontinuadas por diversos motivos, como toxicidade, propriedade farmacocinética insuficiente, baixa eficácia *in vivo* e potência insuficiente contra vírus mutantes (PEÇANHA; ANTUNES, 2002).

A Doravirina é um novo inibidor da transcriptase reversa não nucleosídeo (NNRTI) que demonstrou boa eficácia, tolerabilidade e segurança para o tratamento

de pacientes com infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) -1 em ensaios clínicos de fase III. A doravirina atingiu uma não inferioridade quando comparada com os regimes baseados em efavirenz e darunavir / ritonavir. Foram observados menos efeitos adversos, incluindo efeitos neuropsiquiátricos com doravirina em comparação com efavirenz (BOYLE et al., 2019).

3.4.4 Inibidores da integrase

Desde a sua descrição inicial, ainda nos meados dos anos 1990, a inibição da integrase do HIV era esperada com grande expectativa, por ser uma enzima com maior conservação, isto é, apresenta menor variabilidade genética. Do ponto de vista teórico, por ser mais conservada, apresenta maior dificuldade para selecionar mutações associadas com resistência. Além disso, apresentava sinergismo de potência com os outros medicamentos antirretrovirais (SPRINZ, 2016).

Os inibidores da integrase são uma nova classe de fármacos anti-HIV, apresentando baixa toxicidade em relação a outros fármacos, como o efavirenz (inibidor não nucleosídeo da transcriptase reversa), que promove efeitos tóxicos no sistema nervoso central, e aos inibidores da protease, que causam reações gastrointestinais indesejadas (CRUNKHORN, 2012).

Algumas das razões que fazem dos inibidores da integrase uma classe promissora no tratamento da infecção por HIV, são: atuação num novo alvo, a integrase inibe a etapa de transferência de cadeia do DNA viral para o DNA do hospedeiro, deslocando o DNA viral do sítio ativo e atividade contra cepas de HIV-1 resistentes aos inibidores da transcriptase reversa e da protease. As células de mamíferos não apresentam enzimas integrase, o que torna essa classe altamente específica contra o vírus e, portanto, de baixa toxicidade (BLANCO; MARTINEZ-PICADO, 2012).

Os primeiros compostos inibidores de integrase descobertos apresentam três componentes estruturais importantes: um grupo β -dicetoácido, um anel aromático ou heteroaromático e um grupo carboxila, que pode ser substituído por um bioisómero. Esses grupos farmacofóricos estão envolvidos na complexação de um ou de ambos os íons magnésio, bloqueando o estado de transição da formação do complexo entre o DNA viral e a integrase pela competição com o DNA do hospedeiro.

Conseqüentemente, diversas pesquisas foram realizadas com o objetivo de desenvolver novos compostos capazes de complexar ambos os íons magnésio, resultando em derivados novos e mais potentes (SANTOS; ALBUQUERQUE; BRITO, 2014).

Desde que esta enzima se tornou um possível alvo terapêutico, vários compostos apresentaram atividade inibitória *in vitro* sobre a mesma, porém, poucos passaram para a fase de testes clínicos. Entre eles destaca-se o raltegravir (**Figura 4**) que foi o primeiro inibidor de integrase aprovado pela agência que regulamenta medicamentos nos Estados Unidos para o tratamento de HIV/AIDS, em outubro de 2007. Os outros fármacos dessa classe são o elvitegravir e o dolutegravir (SPRINZ, 2016).

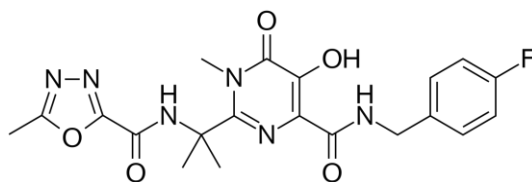


Figura 4: Raltegravir.

Fonte: <https://pharmaffiliates.com/impurities/3426/raltegravir>.

3.4.5 Inibição da protease

A enzima viral chamada protease é responsável pelo processamento das poliproteínas gag e gag-pol, levando à formação das proteínas estruturais e funcionais responsáveis pela formação da estrutura de uma nova partícula do vírus. A protease do HIV pertence à família das aspartil proteases, ou seja, possuem dois grupos β -carboxi aspartil no sítio ativo (CUNICO; GOMES; VELLASCO JUNIOR, 2008).

Após a formação deste intermediário, ocorre a quebra da ligação carbono nitrogênio (C-N) com a formação de um ácido carboxílico e de uma amina primária. Substâncias químicas que mimetizam este intermediário tetraédrico impedem a hidrólise do substrato e, conseqüentemente, o ciclo do vírus HIV é interrompido. Os inibidores da protease do HIV interferem no último estágio da replicação viral, prevenindo a formação de novos vírus. Tem como representantes os fármacos:

saquinavir (**Figura 5**); ritonavir; indinavir; nelfinavir; amprenavir; fosamprenavir, lopinavir; atazanavir (MURI, 2014).

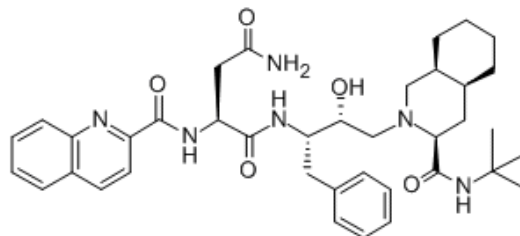


Figura 5: Saquinavir.

Fonte: <http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty>

O desenvolvimento da terapia antirretroviral combinada, potente o suficiente para impedir o aparecimento de resistência do HIV às drogas, foi fundamental para a terapia bem-sucedida. Devido à expansão do número e novas classes de antirretrovirais (ARV), a supressão virológica tornou-se alcançável mesmo em pacientes que falharam aos vários esquemas ARV previamente utilizados. No entanto, a aquisição e a transmissão de resistência do HIV às drogas tem sido um obstáculo contínuo para o sucesso da TARV (ALBUQUERQUE, 2016).

3.4.6 Profilaxia Pré-Exposição ao HIV (PrEP)

Segundo as diretrizes globais atuais, a realização do teste anti-HIV é crucial para o sucesso da estratégia do tratamento como prevenção e controle da AIDS (MONTEIRO et al., 2019).

A política brasileira de enfrentamento ao HIV/AIDS reconhece que nenhuma intervenção de prevenção isolada é suficiente para reduzir novas infecções e que diferentes fatores de risco de exposição, transmissão e infecção operam, de forma dinâmica, em diferentes condições sociais, econômicas, culturais e políticas (BRASIL, 2018).

A Profilaxia Pré-Exposição ao HIV (PrEP, do inglês Pre-Exposure Prophylaxis) consiste no uso de antirretrovirais (ARV) para reduzir o risco de adquirir a infecção pelo HIV. Essa estratégia se mostrou eficaz e segura em pessoas com risco aumentado de adquirir a infecção (FONNER et al., 2016).

O esquema recomendado para uso na PrEP é a combinação dos antirretrovirais fumarato de tenofovir desoproxila (TDF) e entricitabina (FTC), cuja eficácia e segurança foram demonstradas, com poucos eventos adversos associados a seu uso. A Profilaxia Pós-Exposição ao HIV (PEP) é uma das estratégias de prevenção do HIV. Uma vez identificado que a pessoa potencialmente se expôs ao HIV dentro das últimas 72 horas, deve-se recomendar o início imediato da PEP. Indica-se para a PrEP a combinação de tenofovir associado a entricitabina, em dose fixa combinada TDF/FTC 300/200mg, um comprimido por dia, via oral, em uso contínuo (BRASIL, 2018).

3.5 Resistência viral e a toxicidade das drogas

O vírus torna-se resistente por vários fatores: aqueles inerentes ao HIV; baixa aderência à terapêutica; questões farmacológicas; os intrínsecos do indivíduo; toxicidade e interação medicamentosa. Todos eles acarretam concentração subótima dos ARV na célula infectada, gerando a seleção de cepas resistentes às drogas ARV. Como o objetivo principal da TARV é suprimir efetivamente a replicação viral, existe um desafio para atingir esta meta, uma vez que a adequada adesão depende da compreensão plena do paciente em relação à necessidade continuada da manutenção da TARV (ALBUQUERQUE, 2016). A resistência viral, a toxicidade das drogas e a necessidade de elevada adesão ao tratamento permanecem como importantes barreiras ao sucesso prolongado da terapia. Por conseguinte, a avaliação cuidadosa dos riscos e benefícios da terapia antirretroviral no momento de sua indicação é crucial (SANTOS et al., 2012).

As principais complicações metabólicas que envolvem o uso de TARV incluem dislipidemias, diabetes mellitus, resistência à insulina, anomalias mitocondriais, anormalidades ósseas e na distribuição da gordura corporal (lipodistrofia), assim como as sequelas dessas disordens. A acidose láctica tem sido associada à terapia com zidovudina, didanosina e estavudina. Devido ao seu potencial de letalidade, a identificação de sinais e sintomas é importante no acompanhamento dos pacientes infectados pelo HIV. Há um aumento da conversão de piruvato a lactato, que causa também um excesso de triglicerídios no fígado, o que levaria à esteatose hepática. Muitos pacientes sob terapia com inibidores da

protease possuem evidência de resistência à insulina sem diabetes propriamente dita (BORIN et al., 2008).

Assim, inúmeras substâncias presentes nos medicamentos produzidos atualmente foram sintetizados a partir do modelo químico de um produto natural. Muitos extratos vegetais têm sido testados em uma triagem antiviral, buscando compostos que interfiram em várias partes do ciclo de replicação viral (DAN; CASTELLAR, 2015; MARQUES et al., 2015).

3.6 Plantas medicinais e HIV

A pesquisa de produtos naturais com atividade antiviral tem foco principalmente nas espécies vegetais, pelo fato principalmente delas poderem ser selecionadas com base em seu uso etnomedicinal. As investigações etnofarmacológicas e etnobotânicas têm sido a principal abordagem reconhecida por cientistas em todo o mundo como uma estratégia de seleção de plantas medicinais. Além disso, as plantas medicinais têm sido utilizadas para o tratamento de uma variedade de enfermidades infecciosas e não infecciosas. Estima-se que cerca de 25% dos medicamentos comumente utilizados contêm compostos isolados de plantas e acredita-se que muitas plantas podem ser um rico reservatório para a descoberta de novas substâncias contra doenças infecciosas (FERREIRA; RIFFEL; SANT'ANA, 2010).

No que se refere ao uso de espécies vegetais no aumento da resistência imunológica encontra-se respaldado em um grande número de estudos científicos com diferentes modelos experimentais, sendo a propriedade imunoestimulante atribuída à presença de diferentes compostos, como flavonoides, taninos, polissacarídeos, saponinas e alcaloides, presentes em diferentes partes da planta; e a diversos mecanismos, particularmente associados ao sistema imune não específico (MARQUES et al., 2015).

A relevância do conhecimento sobre a utilização de plantas medicinais e sua ação imunomoduladora sobre o sistema imunológico se refere à modulação do sistema imune para prevenção e tratamento de doenças (ALAMGIR; UDDIN, 2010), pois o sistema imunológico é constituído por uma intrincada rede de órgãos, células e moléculas que interagem para manter a homeostase do organismo (CRUVINEL et

al., 2010), estando envolvido na etiologia e mecanismos fisiopatológicos de muitas enfermidades (ARCHANA; PAUL; TIWARI, 2011).

Os polissacarídeos e flavonoides tem se destacado dentre os demais grupos químicos de metabólitos vegetais. Muitos polissacarídeos têm evidenciado ação imunoestimulante através da capacidade de regular a função dos macrófagos (PEREIRA, 2011; JIAO et al., 2012), de ativar o sistema complemento, de induzir a quimiotaxia de leucócitos (PEREIRA, 2011) e de estimular a imunidade humoral e celular (XU et al., 2012). Dentre os polissacarídeos a pectina, bem como as arabinogalactanas (AG) e arabinogalactana-proteínas (AGPs) podem atuar como moduladores do sistema imunológico, sendo, por isso, consideradas modificadores da resposta biológica. A imunomodulação pode estar relacionada tanto com a atividade de macrófagos quanto com as vias do sistema complemento. As arabinogalactanas (AG) (tipo I e tipo II). As AG-II podem estar associadas a proteínas, denominadas de arabinogalactana-proteínas (AGPs) (SEYFRIED et al., 2016).

A busca por antivirais tem como foco compostos que interfiram em várias partes do ciclo de replicação viral. Desta forma, muitos extratos vegetais têm sido testados em um *screening* antiviral primário em cultivos celulares para verificar uma potencial ação antiviral. Este tipo de teste não é especificamente baseado no mecanismo de ação, mas facilita a identificação de produtos naturais que bloqueiem diferentes etapas do ciclo de replicação dos vírus (COS et al., 2004).

Existem extratos vegetais e compostos isolados que atuam na inibição: da penetração do vírus na célula hospedeira (inibição da ligação do vírus à superfície celular e da penetração viral na membrana celular); da transcrição reversa do RNA viral para DNA pró-viral; da integração do DNA pró-viral ao genoma do hospedeiro; do processamento dos polipeptídeos virais pela protease e, da montagem do genoma e proteínas virais dentro da partícula viral para a maturação final e liberação das partículas infecciosas virais maduras. Existem também aqueles que ainda não possuem o seu mecanismo de ação completamente elucidado, mas que demonstraram ação antiviral pela inibição dos efeitos citopáticos do HIV (FERREIRA; RIFFEL; SANT'ANA, 2010).

Segundo Dan e Castellar (2015), das 144 famílias botânicas citadas na pesquisa apresentam atividade contra HIV, mas nem todas possuem uma

substância isolada, identificada ou o mecanismo de ação contra o vírus. A família Asteraceae é mais representativa em relação às espécies estudadas quanto à atividade contra HIV.

Em estudo realizado por Almeida, Alves e Amaral (2012), a prevalência de utilização de plantas por pacientes HIV positivos foi de 34,81%. As mais utilizadas foram: *Turnera ulmifolia* L. (12,09%); *Melissa officinalis* L. (10,62%); *Plectranthus barbatus* Andr. (7,67%); *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf. (capim limão) (4,72%) e *Mentha* spp. (hortelã) (2,36%). A maioria das pessoas (96,61%) referiu melhora após a utilização. Um percentual de 75,42% dos usuários de plantas não informou essa prática ao médico. Entre os que informaram o uso, 55,17 % afirmaram que o médico estava de acordo e somente uma pessoa foi orientada a interromper o uso (3,45%). Apenas um médico (3,45%) indicou o uso de plantas. Este estudo aponta para a necessidade de melhor diálogo entre médico e pacientes sobre o uso de plantas com finalidade medicinal, alertando sobre possíveis riscos quando associados aos antirretrovirais.

As principais classes químicas das substâncias isoladas que apresentam atividade antirretroviral comprovada na literatura são os flavonoides, terpenos, cumarinas, alcaloides, polissacarídeos e taninos. Extratos e substâncias isoladas de plantas foram testados em etapas específicas do ciclo de replicação viral tendo, em alguns casos, o mecanismo de ação elucidado (**Quadro 1**).

Quadro 1. Plantas e constituintes químicos que apresentam atividade inibitória da TR do HIV *in vitro*.

Família	Espécies	Parte utilizada	Substância Isolada	Mecanismo de Ação	Referências
Acanthaceae	<i>Acanthus ebracteatus</i> Vahl <i>Andrographis paniculata</i> (Burm. f.) Wall. ex Nees <i>Justicia gendarussa</i> Burm F.	Parte aérea Toda a planta Parte aérea	-	Inibição da TR	WORADULAYAPINIJ et al., 2005; WORADULAYAPINIJ et al., 2005; DENNIS THOMAS; YOICHIRO, 2010.
Anacardiaceae	<i>Rhus chinensis</i> Mill.	Caule	-	Inibição da TR	WANG et al., 2006.
Annonaceae	<i>Xylopi frutescens</i> Aubl.	Casca e folhas	-	Inibição da TR	MATSUSE et al., 1999.
Asphodelaceae	<i>Bulbine alooides</i> (L.) Willd.	Raiz	-	Inibição da TR	KLOS et al., 2009.
Asteraceae	<i>Baccharis trinervis</i> (Lam.) Pers. <i>Calea jamaicensis</i> L. <i>Gynura pseudochina</i> L.	Partes aéreas Ramos Folhas	-	Inibição da TR	DAN & CASTELLAR, 2015; MATSUSE et al., 1999; FERREIRA et al., 2010; DAN & CASTELLAR, 2015; WORADULAYAPINIJ et al., 2005; DAN & CASTELLAR, 2015.
Boraginaceae	<i>Cordia spinescens</i> L. <i>Lobostemon trigonus</i> H. Buek	Folhas	-	Inibição da TR	MATSUSE et al., 1999; HARNETT et al., 2005; DAN & CASTELLAR, 2015.
Cannaceae	<i>Canna indica</i> L.	Rizoma, Folhas	Proteína Cip31 Proteína Cip14	Inibição da TR	WORADULAYAPINIJ et al., 2005; AL-SNAFI, 2015.
Capparaceae	<i>Capparis spinosa</i> L. buds	Semente	Proteína	Inibição da TR	LAM et al., 2009; ARA; KARAMI; RAOFIE, 2014.
Celastraceae	<i>Elaeodendron transvaalensis</i> Burt Davy	Raiz	-	Inibição da TR	BESSONG et al., 2005.
Clusiaceae	<i>Calophyllum brasiliense</i> Cambess. <i>Calophyllum inophyllum</i> Linn.	Folhas	Calanolídeo A, (Dipiranocumarina) Calanolídeo B, (Dipiranocumarina) Soulatrolídeo, (Dipiranocumarina)	Inibição da TR	HUERTA-REYES et al., 2004; GARCÍAa-ZEBAÚA et al., 2011.
	<i>Calophyllum inophyllum</i> Linn.	Folhas e galhos	Inófilo B, (Dipiranocumarina) Inófilo P, (Dipiranocumarina)	Inibição da TR	PATIL et al., 1993; FERREIRA, 2010.

Quadro 1. Plantas e constituintes químicos que apresentam atividade inibitória da TR do HIV *in vitro*.

Família	Espécies	Parte utilizada	Substância Isolada	Mecanismo de Ação	Referências
Combretaceae	<i>Combretum hartmannianum</i> Schweinf <i>Combretum molle</i> Engl & Diels <i>Terminalia sericea</i> Burch. Ex DC	Folhas Raiz Raiz	-	Inibição da TR	ALI et al., 2002; FERREIRA, 2010. BESSONG et al., 2005; FERREIRA, 2010; BESSONG et al., 2005; TSHIKALANGE et al., 2008
Convolvulaceae	<i>Argyreia nervosa</i> (Burm.f.) Bojer <i>Ipomoea aquática</i> Forssk. <i>Ipomoea cairica</i> (L.) Sweet <i>Ipomoea carnea</i> Jacq.	Parte aérea Toda a planta Toda a planta Parte aérea	-	Inibição da TR	WORADULAYAPINIJ et al., 2005.
Cornaceae	<i>Cornus kousa</i> F. Buerger ex Hance	Caule e folhas	-	Inibição da TR	MIN et al., 2001.
Euphorbiaceae	<i>Alchornea cordifolia</i> Müll. Arg. <i>Bridelia micrantha</i> Baill <i>Chamaesyce hyssopifolia</i> L. <i>Jatropha curcas</i> L. <i>Mallotus japonicus</i> Muell. Arg. <i>Phyllanthus amarus</i> Schum. et Thonn. <i>Ricinus communis</i> L.	Fruto Raiz Toda a planta Folhas Caule Folhas Folhas	- - - - Corilagina, (Galotanino) Geraniina, (Elagitanino)	Inibição da TR	AYISI; NYADEDZOR, 2003; BESSONG et al., 2005; MATSUSE et al., 1999; MATSUSE et al., 1999; MIN et al., 2001; NOTKA et al., 2004; BESSONG et al., 2005.
Fabaceae	<i>Glycine max</i> (L.) Merrill <i>Mucuna coriacea</i> Baker <i>Peltophorum africanum</i> Sond.	Sementes Raiz Raiz e casca do caule	Proteína - Galotanino	Inibição da TR	FANG et al., 2010; BESSONG et al., 2005; BESSONG et al., 2005.
Flacourtiaceae	<i>Lindackeria laurina</i> Presl.	Folhas	-	Inibição da TR	MATSUSE et al., 1999.
Hypoxidaceae	<i>Hypoxis sobolifera</i> (Jacq.).	Semente	-	Inibição da TR	KLOS et al., 2009.
Labiatae	<i>Hyptis lantaniifolia</i> Poir. <i>Vitex glabrata</i> R.Br. <i>Vitex negundo</i> L. <i>Vitex rotundifolia</i> Linne fil. <i>Vitex trifolia</i> L.	Partes aéreas Ramos Partes aéreas Partes aéreas Partes aéreas	-	Inibição da TR	MATSUSE et al., 1999; WORADULAYAPINIJ et al., 2005; WORADULAYAPINIJ et al., 2005; WORADULAYAPINIJ et al., 2005; WORADULAYAPINIJ et al., 2005.
Lamiaceae	<i>Leonotis leonurus</i> (L.) R.Br. <i>Ocimum gratissimum</i> Linn. <i>Scutellariae radix</i>	Folhas Folhas Folhas	- - Baicalina, (Flavonoide)	Inibição da TR	KLOS et al., 2009; AYISI e NYADEDZOR, 2003; KITAMURA et al., 1998.

Quadro 1. Plantas e constituintes químicos que apresentam atividade inibitória da TR do HIV *in vitro*.

Família	Espécies	Parte utilizada	Substância Isolada	Mecanismo de Ação	Referências
Lythraceae	<i>Lafoensia pacari</i> A.St.-Hil.	Casca do Caule	-	Inibição da TR	FERREIRA et al, 2010.
Malpighiaceae	<i>Tetrapteris macrocarpa</i> Johnst.	Partes aéreas	-	Inibição da TR	MATSUSE et al., 1999.
Malvaceae	<i>Pavonia schiedeana</i> Standley	Partes aéreas	-	Inibição da TR	MATSUSE et al., 1999.
Moraceae	<i>Ficus polita</i> Vahl	Folhas		Inibição da TR	FERREIRA et al, 2010.
Plumbaginaceae	<i>Limonium tetragonum</i> (Thunb.) AA Bullock.	Raiz	-	Inibição da TR	MIN et al., 2001.
Rosaceae	<i>Agrimonia pilosa</i> Ledeb.	Toda a planta	-	Inibição da TR	MIN et al., 2001.
Rhamnaceae	<i>Ziziphus mucronata</i> Willd	Folhas		Inibição da TR	BESSONG et al., 2005.
Rutaceae	<i>Clausena excavata</i> Burn F. <i>Murraya koenigii</i> L.	Partes aéreas Partes aéreas	- -	Inibição da TR	WORADULAYAPINIJ et al., 2005; WORADULAYAPINIJ et al., 2005.
Verbenaceae	<i>Aegiphila anomala</i> Pittier. <i>Stachytarpheta jamaicensis</i> L. (Vahl)	Folhas Toda a planta	- -	Inibição da TR	MATSUSE et al., 1999; WORADULAYAPINIJ et al., 2005.

3.7 A infecção pelo HIV e o estresse oxidativo

O estresse oxidativo (EO) pode ser definido como o desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, originando a desregulação da sinalização e controle redox (redução-oxidação), levando a possíveis danos moleculares. Como consequências desta disfunção, ocorre acometimento estrutural e funcional de lipídeos, proteínas, ácidos nucleicos e outras macromoléculas sendo que, a extensão dos danos gerados dependem da natureza, duração e gravidade do estímulo, que são variados entre diferentes espécies e tecidos (TASCA, 2016).

O mecanismo pró-oxidante inclui radicais livres, tais como o ânion superóxido, e o radical hidroxil, ERO (espécies reativas de oxigênio) como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio singlete. Um dos principais mecanismos de lesão celular relativos ao EO é a lipoperoxidação (LPO), que se relaciona com a oxidação da camada lipídica da membrana celular. Além disso, o EO pode gerar danos ao DNA, às proteínas e também tem implicações na patogênese de várias doenças em humanos, que incluem doença de Alzheimer, diabetes, hipercolesterolemia, síndrome hepatorenal, entre outras, além de estar envolvido no processo normal de envelhecimento. No sistema cardiovascular, o EO contribui para o início e a progressão de doenças como a hipertensão, a aterosclerose, a hipertrofia cardíaca e o infarto no miocárdio (DERESZ et al., 2007).

O sistema antioxidante enzimático inclui as enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase. Já o não enzimático inclui compostos sintetizados pelo organismo, como a bilirrubina, a ceruloplasmina, hormônios sexuais, a melatonina, a coenzima Q e o ácido úrico. Além disso, outros antioxidantes são ingeridos através da dieta, como ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno e flavonoides (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).

Os linfócitos T $CD4^+$ dos indivíduos HIV positivos são caracterizadas por apresentar baixa capacidade antioxidante. Antes do início do tratamento com a TARV, eles apresentam significativas diminuições nos níveis plasmáticos de vitamina C. A TARV induz aumento dos marcadores dessa vitamina antioxidante, os maiores níveis ocorrendo após o tratamento; porém, os valores não atingem a normalidade. Durante o tratamento com a TARV foram encontradas diminuições nos níveis do malonaldeído (MDA), mas, como observado para a vitamina C, não chegaram aos níveis dos indivíduos controles. Verificou-se que a máxima alteração

na carga viral foi negativamente correlacionada com a máxima alteração na vitamina C e a razão de glutathiona reduzida pela glutathiona total nos linfócitos T CD4⁺ (DERESZ et al., 2007). A infecção pelo HIV produz EO e secundariamente, dano celular de gravidade variada e sua regressão é dependente do balanço redox entre oxidantes e antioxidantes. Os indivíduos HIV positivos apresentam várias alterações como: distúrbios no metabolismo da glutathiona, concentrações de antioxidantes séricos e teciduais diminuídos, produtos da LPO aumentados e os linfócitos T CD4⁺ caracterizadas por diminuição dos níveis de GSH, aumento da GSSG que, conseqüentemente, gera a diminuição da razão Glutathiona Reduzida/Glutathiona Oxidada (GSH/GSSG), indicando EO (AUKRUST et al., 2003).

Entre os mecanismos que contribuem para a progressão da infecção pelo HIV e o desenvolvimento da AIDS, encontra-se o EO induzido pela produção das ERO durante a ativação de leucócitos e macrófagos. As evidências apontam para um desequilíbrio oxidativo precoce nos indivíduos HIV positivos, que pode estar relacionado com a disfunção imune e a replicação viral apresentadas pelos mesmos. Assim, a significância clínica do distúrbio do metabolismo da glutathiona relacionado ao HIV é refletida pela forte associação entre a diminuição de sobrevivência desses indivíduos e os baixos níveis de tiol no plasma e linfócitos T CD4⁺ (DERESZ et al., 2007).

O próprio HIV é responsável por inibir indiretamente a síntese de alguns antioxidantes e isso é intensificado pelo efeito pró-oxidante de citocinas inflamatórias e/ou da ativação leucocitária de polimorfonucleares, o que leva ao aumento ainda maior na peroxidação lipídica (TASCA, 2016). Com esse desequilíbrio, há o acometimento estrutural/ funcional das organelas e enzimas, bem como da própria célula de defesa, o que acelera ainda mais a progressão para a AIDS (NGONDI et al., 2006).

A proteína do HIV tat, devido à geração de ânion superóxido pela mitocôndria, induz a produção intracelular de EROs que, por sua vez, ativa o NFκB, aumentando a transcrição do HIV, além de induzir deficiência no reparo do DNA. Por isso, esses danos celulares podem induzir, também, a reativação dos vírus latentes, aparecimento de neoplasias, além de estimular a produção de algumas citocinas inflamatórias, como TNF-α, o que contribui com esse ciclo de “inflamação crônica

versus ativação imune persistente *versus* estresse oxidativo” em pessoas que vivem com o HIV/AIDS (NUNNARI; SMITH; DANIEL, 2008).

O EO tem atuação patogênica dominante na infecção pelo HIV. Como os níveis de GSH e cisteína estão significativamente reduzidos no plasma e nos leucócitos, os indivíduos HIV positivos têm aumento na LPO com ondulações nos altos níveis plasmáticos de MDA, vitamina C, glutathiona peroxidase, selênio e superóxido dismutase. Essas características favorecem a progressão da infecção com aumento da replicação viral, carcinogênese, disfunção imune e aumento na apoptose das células T. Assim, a significância clínica do distúrbio do metabolismo da glutathiona relacionado ao HIV é refletida pela forte associação entre a diminuição de sobrevivência desses indivíduos e os baixos níveis de tiol no plasma e linfócitos T CD4⁺ (AUKRUST et al., 2003).

Tal desequilíbrio leva ao aumento ainda maior da peroxidação lipídica, proteínas oxidadas, sequências de DNA alteradas e ao acometimento estrutural/funcional das organelas e enzimas, bem como da própria célula de defesa, o que acelera ainda mais a progressão para a AIDS (GONZÁLEZ-BLANCO et al., 2014). Afinal, além do aumento na replicação viral, da resposta inflamatória, e a diminuição da proliferação celular, o estresse oxidativo pode contribuir também com o aparecimento de muitas comorbidades não associadas à AIDS (SHARMA, 2014).

Como as células do sistema imune geralmente requerem altas concentrações de antioxidantes para manter o balanço redox e preservar a integridade e a sua função, é aceitável que a depleção de antioxidantes cause diminuição da resposta imune (DERESZ et al., 2007).

O organismo humano produz constantemente radicais livres por meio de suas atividades metabólicas. Apesar de ser um processo normal na vida dos organismos vivos, quando em excesso, podem gerar estresse oxidativo, levando a alterações teciduais responsáveis por diversas patologias, como artrites inflamatórias, úlceras e diabetes e processos degenerativos como doença de Alzheimer, doença de Parkinson, aterosclerose e envelhecimento precoce (AQUINO et al., 2017).

Os antioxidantes estão relacionados com as propriedades biológicas de compostos fenólicos, uma vez que estes compostos têm a capacidade para sequestrar radicais livres, devido à sua característica como doadores de elétrons para os radicais livres (SILVA, 2012).

Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias capazes de retardar ou inibir a oxidação de substratos oxidáveis, podendo estes serem enzimáticos ou não enzimáticos, tais como que α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno, ácido ascórbico (vitamina C) e os compostos fenólicos. A síntese de radicais livres no ser humano pode ser controlada por antioxidantes, que podem ser de origem endógena ou provenientes da dieta alimentar, entre outras fontes (AQUINO et al., 2017).

3.8 *Lafoensia pacari* A. Saint.-Hilaire

3.8.1 Descrição botânica e distribuição geográfica da *Lafoensia pacari* A. St.-Hil.

A *L. pacari* Saint-Hil. é uma angiosperma da família Lythraceae utilizada principalmente na medicina tradicional dos estados de Goiás e Mato Grosso (CABRAL; PASA, 2009). A família Lythraceae compreende 31 gêneros com aproximadamente 600 espécies de distribuição pantropical, com alguns representantes herbáceos e subarbustivos de regiões temperadas. No Brasil, nove gêneros podem ser encontrados, sendo o *Cuphea* sp. e o *Diplusodon* sp, os mais ricos em número de espécies (GALDINO, 2015).

O gênero *Lafoensia* sp. é encontrado apenas nas Américas, compreendendo cinco ou seis espécies de porte arbustivo a árvores altas (GRAHAM, 2013). As espécies deste gênero possuem como característica inflorescências terminais em ramos racemiformes ou tirsoides, folhosos ou não, multifloros ou com poucas flores de pétalas brancas ou amarelas (MEIRA, 2000). A *L. pacari* possui como sinonímias botânicas *Lafoensia sessilifolia* Klotzch e *Lafoensia pacari* Saint-Hilaire ssp. *petiolata* Koehne, apresenta porte arbóreo, podendo atingir até 18 m de altura (LORENZI, 2002) (**Figura 6**).



Figura 6. Partes aéreas de *Lafoensia pacari* A. St.-Hil., evidenciando flores e frutos.

Fonte: <https://www.jardineiro.net/plantas/dedaleiro-lafoensia-pacari.html>

Por volta de 1820, o botânico francês Auguste de Saint Hilaire descreveu *L. pacari* durante sua viagem ao interior do Brasil, quando passou pela Capitania de Goyaz, atuais estados de Goiás e Tocantins. O nome do gênero *Lafoensia* sp. foi uma homenagem ao segundo Duque de Lafões, D. João Carlos de Bragança (1719-1806), fundador da Academia das Ciências de Lisboa, enquanto que o epíteto científico adotado por ele foi o próprio nome popular regional que já era usado na época, pacari, um nome de origem tupi que significa “árvore de madeira preciosa” (CARVALHO et al., 1994).

A espécie possui ampla distribuição geográfica, sendo encontrada nos estados de Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Tocantins, chegando até Santa Catarina, além do Paraguai e Bolívia. Tal fato resultou em vários nomes populares, sendo pacari o mais utilizado em Goiás e mangaba-brava o mais frequente nos estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. Já em São Paulo os nomes dedaleiro ou didal são empregados e, em Santa Catarina, o nome popular é louro-da-serra (MARTINS et al., 2014; LORENZI, 2002).

As Lythraceae são frequentemente cultivadas para fins de ornamentação, podem produzir madeira de boa qualidade, e ainda são utilizadas como fonte de pigmentos, geralmente amarelo, estes retirados da casca do caule, madeira ou folhas de algumas espécies do gênero *Lafoensia* (GALDINO, 2015).

Na medicina popular, a casca do caule e as folhas de *L. pacari* apresentam uma ampla utilização, na forma de decocto ou macerado, para o tratamento de gastrite, úlceras gástricas, dores, inflamações sistêmicas e locais, câncer, coceira, diarreia, problemas renais, além de ser usado como antitérmico, emagrecedor,

cicatrizante e tônico para o corpo contra desânimo (CABRAL; PASA, 2009) (**Figura 7**).

As folhas são usadas na medicina popular brasileira na cicatrização de feridas, micoses cutâneas e no tratamento de gastrite e úlceras. Os extratos da planta são dotados de atividade antinociceptiva, anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana e gastroprotetora (PEREIRA et al., 2018).

Embora tenham sido realizados poucos estudos biomonitorados com esta espécie, nos trabalhos em que houve isolamento de algum constituinte, o mais frequente foi o ácido elágico. Foi ainda demonstrado que este composto é responsável pelos efeitos anti-inflamatório, antioxidante e gastroprotetor dos extratos de *L. pacari* (GALDINO, 2015).



Figura 7. Caule da *Lafoensia pacari*.

Fonte: <http://www.ervanariamarcosguiao.com/product-page/pacari>

3.9 Modelagem molecular no desenvolvimento de fármacos

Em virtude da necessidade do surgimento de novos fármacos anti-HIV (SARAFIANOS et al., 2009). O *Docking* Molecular é uma metodologia computacional que consiste na predição da interação entre moléculas. Essa interação pode ser compreendida pelo paradigma “chave-fechadura” estabelecido por Emil Fischer em 1894. As interações do ligante com o receptor são decorrentes da complementaridade, ou seja, o receptor reconhece o ligante, em virtude das interações eletrostáticas, de *Van Der Waals*, ligações de hidrogênio, e outras, que os

átomos do ligante realizam com o sítio ativo ou alostérico de uma proteína (VERLI, 2005).

Com a finalidade de reduzir o tempo e os altos custos envolvidos no processo, modelos *in silico* ou assistidos por computadores estão sendo aplicados na seleção de um número menor de moléculas a serem avaliadas em ensaios *in vitro* e *in vivo*, maximizando as chances de identificação de novas entidades químicas qualificadas. Por vezes, embora o novo medicamento chegue à comercialização, o sucesso farmacoterapêutico não ocorre devido a problemas posteriores quanto à sua farmacocinética, à perda de sua eficácia terapêutica, ao desenvolvimento de efeitos adversos consideráveis e, até mesmo, por razões comerciais (SILVA, 2015).

A modelagem molecular tem papel crucial nessa etapa no processo de descobrimento visando reduzir esse tempo, além de diminuir custos com testes *in vitro* e *in vivo*. A modelagem molecular dispõe de várias metodologias aplicáveis ao planejamento de fármacos (CARVALHO et al., 2003).

Na aplicação de estratégias de planejamento de fármacos, os estudos dos processos evolutivos de reconhecimento molecular em sistemas biológicos assumem grande importância, pois constituem as bases fundamentais para o entendimento de propriedades como potência, afinidade e seletividade. Diante desse complexo paradigma, as ferramentas biotecnológicas associadas aos métodos de química medicinal ganham papel destacado no desenvolvimento de novas moléculas com atividade biológica (GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010).

Existem diversos programas livres e outros comerciais, além de alguns servidores *online*, que possibilitam ao usuário utilizar o programa ou servidor apropriado ao seu estudo de *docking*. Dentre os programas disponíveis ressalta-se os seguintes: AutoDock, Dock, FlexX, Glide e o GOLD, além de servidores *online*, como o DockThor (SILVA, 2015).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da tese foram organizados em artigos científicos:

- Artigo 1: HERBAL MEDICINES FOR TREATING HIV INFECTION AND AIDS: a systematic review and meta-analysis- ARTIGO SUBMETIDO: JOURNAL OF MEDICINAL PLANTS RESEARCH.

- Artigo 2: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIRRETROVIRAL E CITOTOXICIDADE DA ESPÉCIE *Lafoensia pacari* Saint-Hilaire- ARTIGO SUBMETIDO: PLOS ONE.

- Artigo 3: ANÁLISE MULTIVARIADA NO ESTUDO DA COMPOSIÇÃO FENÓLICA E PERFIL ANTIOXIDANTE DA ESPÉCIE *Lafoensia pacari* Saint-Hilaire- ARTIGO SUBMETIDO: SCIENTIA PLENA.

4.1 HERBAL MEDICINES FOR TREATING HIV INFECTION AND AIDS: a systematic review and meta-analysis

Saskya Fonseca¹, Ingrid Melo², Nassibi Bueno³, Aldenir Santos^{1,4} and Antonio Santana⁵

¹Centro Universitário Cesmac, Rua Cônego Machado, 918, Farol, 57051-160, Maceió, AL, Brazil.

²Instituto Federal de Alagoas, Rua Odilon Vasconcelos, 103, 57035-660, Maceió, AL, Brazil.

³Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Alagoas, Av. Lourival Melo Mota, S/N, Tabuleiro do Martins, 57072-970, Maceió, AL, Brazil.

⁴Universidade Estadual de Alagoas, R. Gov. Luís Cavalcante, s/n, Alto do Cruzeiro, 57312-000, Arapiraca, AL, Brazil.

⁵Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Alagoas, Av. Lourival Melo Mota, s/n, Tabuleiro do Martins, 57072-970, Maceió, AL, Brazil.

ABSTRACT

The present meta-analysis evaluated the use of medicinal plants, phytotherapies and/or phytopharmaceuticals associated or not to antiretroviral therapy, using as primary outcome the lymphocyte count, and, among which, the CD4⁺ count. Studies were considered eligible for the present systematic review if they comprised the following criteria: randomized clinical trials using as intervention medicinal plants, phytotherapies, and/or phytopharmaceuticals associated or not with antiretroviral therapy. The search strategy included terms related to the intervention (medicinal plants, medicinal plants extracts, phytotherapies, and/or phytopharmaceuticals associated or not with antiretroviral therapy), to the primary outcome (in which was verified if there was a decreasing in lymphocytes, among which CD4⁺ cells), as well as terms that were used to improve sensitivity in a search for clinical trials. From 2.747 records of potential relevance identified on the databases, remaining two eligible randomized placebo-controlled clinical trials. The present systematic review and meta-analysis showed on the forest plot that there was no difference between control and intervention groups when the two included studies were taken into consideration.

Key words: Meta-analysis, HIV, Medicinal plants, CD4⁺ count, Phytotherapies, antiretroviral therapy.

INTRODUCTION

AIDS is a public health issue since due to its global dissemination and to the psychosocial burden associated to bearing the disease (Costa et al., 2015; Zanon et al., 2016). This large scale pandemics derives from the ease of spread of the disease, which occurs mainly by means of sexual transmission, as well as the lack of a solid investment on education towards prevention of transmission and/or changes in behaviour linked to sexual activities (Unaid, 2015).

As the early diagnosis plays a crucial role in reducing mortality by secondary causes in the immunocompromised patient, the absence of efficient public health

policies in most parts of the world results in underdiagnosis, lack of therapeutic adherence and no investment in the psychosocial support for patients (Villela and Barbosa, 2017).

The proper reduction of morbidity and mortality in patients with AIDS is achieved by means of effective pharmacotherapy. The early discovery of zidovudine as an antiretroviral agent and the later development of protease inhibitors enhanced the effectiveness of available treatments in reducing HIV burden below detectable levels, which in turn allowed patients who bear the virus a better quality of life (Bonolo et al., 2007).

The guidelines provided by the World Health Organization call for treatment of every patient with HIV, with the aim that 30 million people will be able to have access to proper pharmacotherapy by 2020, among the current nearly 37 millions who are estimated to bear the virus (Unaid, 2017).

The use of medicinal plants has always been a common practice in therapeutics. In spite of that, only in past decades there has been global effort to provide supporting evidence of their efficacy in some conditions and thus rationalize their applications in modern medicine, especially in chronic diseases such as AIDS (Liu et al. 2005). In addition, the high costs associated to the antiretroviral agents in impoverished countries restrict the access to adequate treatment by a large number of patients and therefore the use of medicinal plants may comprise a viable alternative in such regions (Vella and Palmisano, 2000).

Published studies show that the use is greater among individuals with chronic diseases, especially living with HIV/AIDS on antiretroviral therapy (Hsiao et al., 2003). A study published by Salehi et al. (2018) presents a survey of plants that have shown anti-HIV activity, both in vitro and in vivo.

Based on the aforementioned premises this study aims to assess the use of medicinal plants, phytotherapy and phytomedicines, including in conjunction with conventional antiretroviral drugs, in patients with HIV.

MATERIALS AND METHODS

Study selection and search strategy

Studies were considered eligible for the present systematic review if they comprised the following criteria: randomized clinical trials using as intervention medicinal plants, phytotherapies, and/or phytopharmaceuticals associated or not with antiretroviral therapy.

In order to carry out this review we adopted the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses – Cochrane Handbook (Higgins et al., 2008). We included terms related with the intervention (medicinal plants, medicinal plants extracts, phytotherapies, and/or phytopharmaceuticals associated or not with antiretroviral therapy), the primary outcome (in which we verified if there was a decrease in CD4⁺ cells), as well as terms that improved sensitivity in a search for clinical trials (Robinson and Dickersin, 2002).

We evaluated only English papers and carried out the search between March 2016 and March 2018 in the following databases: ClinicalTrials.gov, LILACS, MEDLINE, CENTRAL, Scopus and SciELO. Furthermore we sought non-peer-reviewed databases which included ClinicalEvidence.com, OpenGrey.eu, NYAM.org and DissOnline.de.

Assessment of the eligibility of the study

The previously described search strategy was used to identify titles and abstracts of relevance to the meta-analysis. Researchers independently selected abstracts that were identified on the initial search and each researcher was able to classify a study as relevant and to include the study on the analysis. The full articles were then obtained, and their content was assessed, also independently. Any disagreements between researchers were resolved by discussion to establish a consensus. In cases of queries regarding a specific study, the author of the paper was contacted.

Risk of bias assessment

We followed the recommendations of the Cochrane Manual (Turner et al., 2013) in order to assess the risk of bias. Therefore, the quality of the investigations was assessed by researchers in an independent way and then classified into one out of five categories, namely allocation concealment, sequence generation, blinding of outcome assessors, missing data manipulation and selective outcome report.

Statistical analysis

Dichotomous data of all included randomized clinical trials (RCTs) were combined to estimate the risk ratio (RR) combined with a 95% confidence interval (CI), using a random effects model. We aimed for the most complete information about the outcomes of participating patients and we managed to contact some authors to obtain those details.

To identify heterogeneity on the findings, we applied statistical techniques to verify if the differences observed could be explained by chance. The chi-square test was used to assess the significance of $p < 0,05$. The magnitude of heterogeneity was

investigated by I^2 calculation and we considered an I^2 value superior to 50% as substantial heterogeneity and, above 75%, as considerable heterogeneity (Santos 2013).

RESULTS

Characteristics of the included studies

From 2.747 records of potential relevance identified on the databases, 18 full text articles comprised the eligibility criteria and were used for posterior evaluation. Among these selected papers, 16 were excluded after full text analysis, remaining two eligible randomized placebo-controlled clinical trials. Studies were heterogeneous in terms of participants, intervention, and results (**Figure 1**).

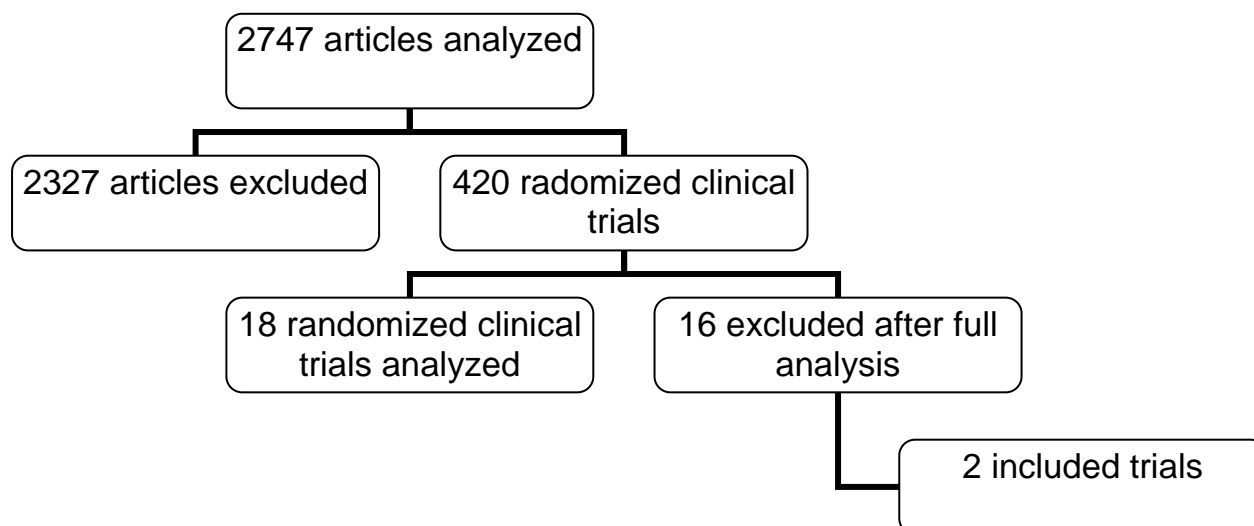


Figure 1. Flow chart of the studies analyzed on the meta-analysis.

Risk of bias of the included studies

The two included trials were double-blinded, placebo-controlled in parallel groups, being randomized and non-multicentre studies. Sequence generation and

allocation concealment were not reported. The motives for dropouts did not change between experimental groups as well as the proportion of losses was similar between groups. The absence of an intention-to-treat analysis is a strong bias. The judgment regarding risk of bias was of high risk (Wang et al., 2006).

On the trial performed by Wilson et al. (2015), regarding sequence generation and allocation concealment, the eligible participants were sequentially assigned to a patient identification number (PIN) in order to obtain a proper allocation. Intention-to-treat analysis was performed. Risk of bias judgement was of low risk.

Blindness was adequate for individuals, including participants, investigators, and caretakers. Both studies reported numbers and reasons for exclusions/dropouts and used the intention-to-treat principle in their data analysis (Wang et al., 2006; Wilson et al., 2015). The sample size varied from 72 to 133 participants. In general, the methodological quality of trials was considered adequate.

Effects of interventions on the included studies

Randomized clinical trials aiming to evaluate the antiretroviral action of phytotherapies versus placebo were performed by Wang *et al.* (2006) and Wilson *et al.* (2015) with Zhongyan-4 (ZY-4) and *Sutherlandia frutescens* L., respectively (Table 1).

Table 1. Randomized clinical trials using phytotherapies and placebo.

Study	Country	Sample size	Mean age	Allocation	Type of blindness	CD4 ⁺ count	Duration	Type of analysis	Risk of bias assessment
Wang et al, 2006	China	72 patients	18 -55 years old	Not reported	Double-blinded	100-400 cells/mm ³	6 months	Per-Protocol	High risk
Wilson et al, 2015	South Africa	133 patients	21 – 64 years old	Participants identification number	Double-blinded	>350 cells/μL	6 months	Intention-to-treat	Low risk

The restricted amount of randomized clinical trials and the small sampling of these investigations leads to data that are far from being conclusive about the complementary Chinese therapy and the therapy using the species *S. frutescens*, which is native from South Africa, on the treatment of patients with infection by HIV and AIDS. Compared to placebo, intervention with Zhongyan-4 (ZY-4) showed positive effects on the increasing of CD4⁺ cells (Wang et al. 2006) (**Table 1**).

In contrast, the second intervention regarding *S. frutescens* showed no impact on CD4⁺ T lymphocyte count when compared to negative control. The authors concluded that the consumption of 1.200 mg of *S. frutescens* had no beneficial effect on patients since the duration of infections was reported to be even longer in these patients in comparison with those taking placebo alone. This occurred because two patients developed tuberculosis during the treatment with *S. frutescens*, despite the administration of Isoniazid preventive therapy (IPT) (**Table 1**).

Zhongyan-4 (ZY-4)

Wang et al. (2006) performed a clinical study with 72 patients diagnosed with HIV/AIDS, 44 men and 28 women, aged from 18 to 55 years old and whose CD4⁺ count ranged between 100-400/mm³.

The intervention was performed using the oral phytotherapeutic Zhongyan-4 (ZY-4), which has in its composition: *Ginseng raiz*, *Radix astragali*, *Fructus lycii*, *Radix frichosanthis*, *Radix scutellariae* e *Herba vilae*, on a proportion of 1: 2 : 1 : 1 : 1: 1, 5 per granulated dose of 7,5 g. The therapeutic regimen was of twice per take, twice per day. Placebo was used as control using the same therapeutic scheme of ZY-4.

The use of other anti-HIV drugs was not allowed during the clinical trial; however, the treatment of opportunistic infections was allowed.

In addition, cell count of CD45 RA⁺ and CD8⁺ lymphocytes showed that the action of ZY-4 might involve multiple targets. However, it has a delayed onset of action since its effects were only observed after three months, not reaching its peak at the end of six months. The observation also showed that ZY-4 affects the effectiveness index of serum Interleukin-2 (IL-2).

The composed formulation of Zy-4 was based on pre-clinical and experimental studies under the use of de Zhongyan-1 e Zhongyan-2 (Wang et al., 2002). The phytotherapeutic contains *Radix astragali*, Ginseng root, *Fructus lycii*, *Radix frichosanthis*, *Radix scutellariae* and *Herba Vilae*. Several pharmacological investigations reported the immunomodulatory effects of Ginseng root, *Radix astragali*, and *Fructus lycii* whereas others describe the inhibition of HIV activity by *Radix frichosanthis* and *Radix scutellariae* (Lu, 1994).

Sutherlandia frutescens

The research performed by Wilson et al. (2015) occurred in two phases. On phase 1, 56 random participants were selected to receive a twice-daily treatment with 400, 800, or 1200 mg of *Sutherlandia frutescens* or placebo for 24 weeks.

On phase 2, 77 participants were included randomly with administration of 1200 mg of *S. frutescens* or placebo. Combined data from phases 1 and 2 were used on the final analysis, comprising a total of 107 participants (54 with 1200 mg of *S. frutescens* and 53 with placebo).

A possible explanation to the interaction between *S. frutescens* and IPT may be related to the antioxidant potential of *S. frutescens* (Fernandes et al., 2004; Tobwala et al. 2014) which are thought to interfere with the mechanisms of action of Isoniazid (Timmins; Deretic, 2006).

HIV-serum positive adults aged between 21 and 64 years old with CD4+ T lymphocyte count higher than 350 cells/ μ L and viral load of HIV>1.000 copies/mL were considered eligible for the study. The only adjuvant treatment administered was Isoniazid and Pyridoxine in order to prevent tuberculosis. Data obtained from the results suggest that treatment with *S. frutescens* in daily doses up to 2.400 mg do not cause significant side effects in HIV-serum positive adults. However, some side effects were observed in patients with diabetes or adrenal imbalances *S. frutescens* (MacKenzie et al., 2009). Therefore, more studies are needed to better describe interactions between antiretroviral drugs and phytotherapies.

Characteristics of the excluded studies

The motives that lead to the exclusion of the articles were the absence of data related to CD4⁺ (Matsabisa et al., 2012; Joshi et al., 2008). Marques et al. (2016); studies without mean and standard deviation (Dabaghzadeh et al., 2014; Petrilli et al., 2016; Nikolaeva et al., 2008); non-randomized clinical studies (Oladele et al., 2012; Jiang et al., 2013); randomized clinical trials that were not placebo controlled (Nikolaeva et al., 2008; Onifade et al., 2013; Ayuba et al., 2014); a random pilot study (Burack et al. 1996); a study without standard deviation (Weber et al. 1999); studies without CD4 values (Galarza et al., 2007; Ellis et al., 2009; Shi-qing et al., 2011); a study with the absence of full text (Gil del Valle et al., 2010).

In a double-blinded placebo controlled trial carried out by Matsabisa *et al.* (2012). Four treatment groups were randomly assigned to patients. The first group comprised a daily dose of 1.835,2 mg of standard IMUNITI Wellness Pack, while the second and third groups received, respectively, two and three times the recommended daily dose. These three groups altogether received as well 150 ml of *Aloe vera* juice. Lastly, the control group received placebo and. 150 ml of water aromatized with *Aloe vera* to blind the treatment. The investigation continued over consecutive 5 weeks and the results showed the IMUNITI was safe for patients since no significant alterations for hematological, renal and biochemical parameters (Matsabisa *et al.*, 2012).

A phase II double-blinded clinical trial carried out by Joshi *et al.* (2008), in 2015 divided 100 patients into two different groups. The first group received Praneem tablets containing 80 mg of *Azadirachta indica* leaves, 40 mg of purified saponins from *Sapindus mukerosi* and 20 mg of Mentha citrate oil. In addition, each formulation also had 20 mg of quinine hydrochloride. The other group comprised patients taking only placebo. The data obtained from the study revealed that the Praneem tablet was safe for vaginal use in phase I studies in low risk HIV-negative women after 6 months of use (Joshi *et al.*, 2008). There were no statistical significant differences regarding reported adverse events between patients enrolled on group Praneem when compared to the negative control group. The most frequently experienced condition by users was genital discomfort manifested as genital pruritus, burning, and ache. However, the long-term safety of polyherbal Praneem must be assessed by a full pre-clinical evaluation (Joshi *et al.*, 2008).

Marques *et al.* (2016) evaluated the effects of passion fruit peel flour with diet therapy and therapeutic counseling in 36 patients with HIV lipodystrophy that were on

a ambulatorial clinic of a teaching hospital. Patients were divided into two groups. One group received 30 g of passion fruit peel flour daily during 90 days and therapeutic counseling. The other group received only nutritional counseling. The metabolic changes were analyzed before and after the intervention with a significance level set at $p \leq 0.05$. The use of passion fruit peel flour was effective in reducing total cholesterol and triglycerides after 30 days. Patients presented undetectable levels of HIV as well as CD4⁺ T lymphocyte count of 300 cells/mm³. The concentrations of LDL-C decreased, whereas the HDL-C increased in the blood of patients with lipodystrophy after 90 days of treatment with passion fruit peel flour.

On a randomized clinical trial performed by Dabaghzadeh et al. (2014), 102 HIV-positive patients that attended an HIV hospital clinic participated on this double-blinded study, which had a duration of two years. Participants received, randomly, 500 mg of *Zingiber officinale* or placebo, twice a day, before each dose of antiretroviral for 14 days. Patients participated the study for two years. Nauseas and vomits are common side effects of antiretroviral therapy (ART) and generally occur early during HIV treatment. Despite these adverse gastrointestinal effects are generally self-limited and vanish with continuous treatment, they may affect the adherence to ART (Dabaghzadeh et al., 2014).

A total of 90,2% and 56,4% patients of group placebo and the group that received ginger, respectively, experienced nausea during the first two weeks of treatment ($p = 0.001$). Moderated and severe nauseas were significant smaller in group receiving the herbal medicine ($p = 0.001$). In addition, 47,1% and 9,8% of patients on groups placebo and ginger, respectively, reported at least one episode of vomit during the treatment ($p = 0.01$) (Dabaghzadeh et al., 2014).

Petrili et al. (2016) assessed the effects cocoa and yerba mate ingestion on several biomarkers of individuals with HIV, including anthropometric, inflammatory, oxidative, and immunological parameters. A double-blinded, placebo controlled, randomized clinical trial assigned 92 individuals undergoing ART during at least six months in 2 groups, one of which receiving 65 g of chocolate or 3 g of yerba mate and the other group comprising the patients taking placebo. Results showed that the intake of 65 g of dark chocolate was enough to increase the concentrations of HDL-C, while the supplementation with 3 g of yerba mate did not change significantly biomarkers on these individuals (Petrili et al., 2016).

On the research performed by Nikolaeva et al. (2008), patients not treated with antiretrovirals were assigned into two equal groups. The positive control group received standard anti-tuberculosis treatment, while the other group received HRZSE and 50 drops of Dzherelo, a hydroalcoholic concentrated extract of several medicinal plants, diluted in 100 ml of water twice a day. Results showed that following two months of treatment led to increased total CD3⁺ and CD4⁺ T lymphocytes in the group receiving the herbal medicine but decreased levels of both cells in control group (Nikolaeva et al., 2008).

There were no significant changes on ATT alone, i.e. 182 (24,2%) to 203 (24,5%); $P = 0.063$ ($P = 0.28$), whereas the treatment with Dzherelo significantly increased the count of helper cells from 174 (23,3%) to 257 cells (27,3%); $P = 0.00003$ ($P = 0.0004$). At the end of the second month, lymphocytes increased to 174 (25,3%) and 283 (31%) with probability values of $P = 0,13$ and $P = 0.0000004$ for treatments A and B, respectively (Nikolaeva et al., 2008).

Ten young women diagnosed with HIV in a Nigerian hospital that did not fit national criteria for antiretroviral use participated on a randomized clinical trial.

Treatment was performed with *Aloe barbadensis* Miller with daily administration of 30-40 ml. CD4⁺ count was monitored over one year. Results were similar for both groups, suggesting that *A. vera* consumption may be an alternative for individuals infected by HIV in the tropics, given its availability and low cost. One patient had a bad reaction to the antiretroviral drug and started to use *Aloe vera*. The average increase of CD4⁺ count among patients was 153,7 cells/L in comparison to 238,85 cells/L among controls ($p = 0.087$), and no side effects were reported for both groups (Oladele et al., 2012).

Jiang et al. (2013) performed a clinical study that included 34 ambulatorial patients with HIV/AIDS. Changes in serum levels of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD3⁺, CD4⁺, CD38⁺, CD3⁺, CD4⁺, HLA-DR⁺, CD3⁺, CD8⁺, CD38⁺, e CD3⁺, CD8⁺, HLA-DR⁺ were analyzed in patients treated with FZPDG, a concentrated granules of herbs that has in its composition Huangqi (*Radix astragali mongolici*), Rensen (*Radix ginseng*), Chaobaizhu (Roasted *rhizoma atractylodis macrocephalae*), Fuling (*Poria*), Chenpi (*Pericarpium citri reticulatae*), Sharen (*Fructus amomi*), Yiyiren (*Semen coicis*), Bajitian (*Radix morindae officinalis*), Rouconrong (*Herba cistanche deserticolae*), Yinyanghuo (*Herba epimedii brevicornus*), Lianqiao (*Fructus forsythiae suspensae*), Danggui (*Radix angelicae sinensis*), and Gancao (*Radix glycyrrhizae*).

In this research, patients with HIV/AIDS received half of a FZPDG sachet orally, twice a day, with boiled water for six months and presented an immune activation profile after treatment, with acts modulating the immunological activation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells (Jiang et al., 2013).

The changes on serum levels of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD3⁺, CD4⁺, CD38⁺, CD3⁺, CD4⁺, HLA-DR⁺, CD3⁺, CD8⁺, CD38⁺ e CD3⁺, CD8⁺, HLA-DR⁺ (human leukocyte antigen) in patients with HIV/AIDS treated with FZDPPG for six months were

examined by flux cytometry and compared with levels of health controls. The initial count of CD4⁺ T lymphocytes in patients with HIV/AIDS was of 38-595 (247 ± 133) cells/ml. Specifically, 15 patients had a CD4⁺ T cell count inferior to 200 cells/mL and 7 had a count of over 350 cells/ml. Patients with HIV/AIDS showed better immunological profile after receiving FZPDG (Jiang et al., 2013).

The herbal medicine Zam was investigated by Onifade *et al.* (2013). It contains *Nigella sativa* and honey on a 60:40 proportion in its composition. The recommended posology for adults is about 10 ml diluted in about 50 ml of warm water, three times daily after each meal. For monthly monitoring, data and contact information of each patient were registered.

Patients were counted daily and visited regularly after the beginning of treatment with the herbal preparation to assess its efficacy, side effects, and toxicity. The findings suggest improvement on symptoms and signs related to HIV infection disappeared within 20 days after the beginning of treatment with statistical difference ($p < 0,05$). In addition the results also pointed for increased body weight, decreased viral load to undetectable levels of ≤ 50 copies/ml, and improved CD4⁺ levels, from 227 ± 9 to 680 ± 12 mm³/uL. This study concluded that Zam is effective on the treatment of HIV infection based on a significant improvement on both clinical and laboratorial parameters (Onifade et al., 2013).

Godwin et al. (2014) performed a investigated the effects of a 8 weeks treatment with the herbal medicine Jobelyn in 10 patients not receiving antiretroviral treatment. The therapeutic schedule comprised of twice-daily dose of 500 mg. Patients that received ART presented a statistical significant improvement on CD4⁺ T lymphocyte count during the study period of 12 weeks ($p < 0,01$). On the other hand, patients that received ART associated to Jobelyn showed a faster improvement

within 6 weeks of treatment ($p < 0,001$). Furthermore, data suggest that the intake of Jobelyn contributed to improve CD4⁺ T lymphocyte count (Ayuba et al., 2014).

Another trial carried out by Burack et al. (1996), in 1996 aimed at the investigation of a Chinese formulation of (IGM-1) composed by 31 medicinal plants and its effects on HIV-related symptoms. Participants were stratified by CD4⁺ count in two groups ($0,200-0,349 \times 10^9/L$ e $0,350-0,499 \times 10^9/L$) and then were assigned to treatment groups using a series of random numbers for each group. Among the ingredients contained in the 650 mg pill, the ones present in high concentrations included *Andrographis paniculata*, *Astragalus membranaceus*, *Ganoderma lucidum*, *Isatis tinctoria*, *Laminaria japonica*, *Lonicera japonica*, *Milletia reticulata* and *Oldenlandia diffusa*. The negative control group received placebo pills composed mainly by microcrystalline cellulose (Burack et al., 1996).

On the study of Weber (1999), a total of 68 adults infected with HIV, and with CD4⁺ lymphocyte count $< 0,5 \times 10^9 / L$ were included. The patients were assigned randomly to receive doses of seven pills which included 35 Chinese herbs or placebo and to be taken over six months on a daily basis. However, the treated individuals showed no signs of improvement regarding clinical manifestations, CD4⁺ lymphocyte counts or serum viral load.

Galarza et al. (2007) performed a double-blinded, randomized study with HIV-related eosinophilic folliculitis. Sample was comprised by 40 patients with HIV-related eosinophilic folliculitis that were assigned by systematic random sample in two groups, one receiving different therapies. Therapy 1 consisted of 0,075% of Capsaicin, whereas therapy 2 comprised 1% Menthol. Treatment on the affected area was performed every 6 hours for 45 days. Response was good in 90% of patients that received 0,075% of Capsaicin, in comparison with 40% of the group

treated with 1% Menthol ($p = 0,001$). The effectiveness of topical therapies was modified by CD4⁺ T lymphocyte count ($p < 0,001$). The presence of opportunistic diseases ($p = 0,252$) did not affect therapy effectiveness. Topical therapy with Capsaicin was effective and safe on the treatment of pruritus on HIV-related eosinophilic folliculitis (Galarza et al., 2007).

Ellis et al. (2009), in a double-blinded clinical trial, assessed the effects of *Cannabis sativa* on neuropathic pain refractory to analgesics in HIV-positive patients. The concentrations of the active constituent, Δ^9 -tetrahydrocannabinol, ranged from 1 to 8% in the formulations given to patients. The therapeutic scheme consisted of an alternated two weeks treatment, in which the patients had to smoke *Cannabis* 4 times a day during 5 days in each week of treatment. The trial considered 34 individuals eligible and 28 out of the total concluded the study. The data gathered from the investigation suggest that the pain relief was enhanced by the use of *Cannabis*, when compared to the negative control placebo. Furthermore, the side effects experienced by the patients were mild and self-limited, with the exception of two individuals with limiting toxicities. Therefore, the use of *Cannabis* was well tolerated and effective when used for analgesic therapy on patients with refractory pain (Ellis et al., 2009).

On a double-blinded randomized study, 58 patients used oral capsules of Jingyuankang and ART, and the other 58 patients used Leucogen pill and ART for 6 weeks. Hematological parameters were monitored in order to establish the effects of Jingyuankang capsules on the leucocytes count in HIV-positive patients. The results showed that the herbal formulation could improve blood cells count with minor to non-existent secondary or side effects during the trial (Shi-qing et al., 2011).

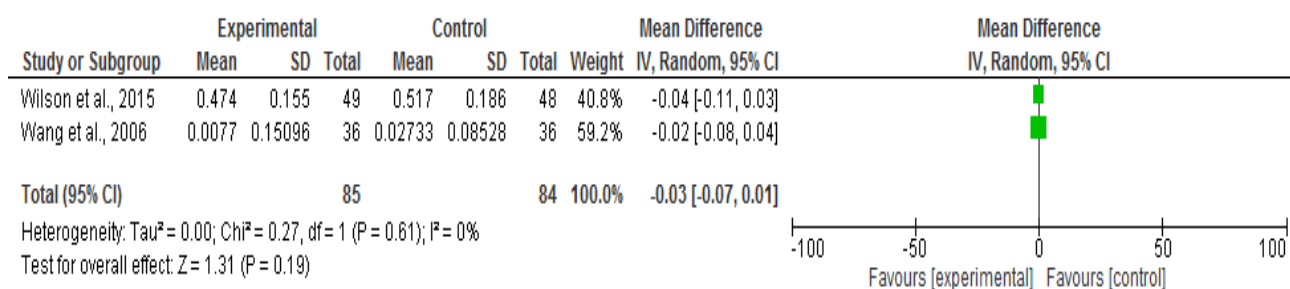
DISCUSSION

Medicinal plants can be a promising alternative for various diseases and conditions, including viral infections associated with Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1) and 2 (HIV-2) as genetic variabilities. A study published by Kurapati et al. (2016), points out that a (alkaloid), lithospermic acid (phenolic compound) have been proposed as promising candidates for anti-HIV agents. However, most of these studies are in vitro, and too few investigations have been performed in vivo or in human studies.

One example was a study published by Burack et al. (1996), in which demonstrates that the anti-HIV activity of the tea infusion prepared from the Chinese medicinal plant identified as *Artemisia annua* L. by using the validated cellular systems were examined. The tea infusion of *Artemisia annua* was found to be highly active with IC₅₀ values as low as 2.0 µg/mL. In addition, artemisinin was found as inactive at 25 µg/mL and the related species *Artemisia afra* (not containing artemisinin) has also shown a similar level of activity.

There were no statistically significant differences between the intervention and placebo groups in the study compared to any of the variables examined in the CD4⁺ lymphocyte count. One of the factors that may have influenced the small number of randomized clinical trials included in the study.

According to these studies, the reduction of CD4⁺ lymphocytes. There was no significant difference in relation to placebo, with (P = 0.19) (Figure 2).

Figure 2. Forest plot for the outcome CD4+ lymphocyte count.

Considering infection vulnerability and HIV/AIDS treatment, the knowledge regarding the taking of antiretroviral drugs and the use of phytotherapics and medicinal plants is of utmost importance.

The forest plot depicted above shows that there was no difference between control and intervention groups when the two included studies were taken into consideration.

The study performed by Wang et al. (2006) showed a standard deviation superior to the mean value, which represents contrasting results. On the other hand, the study performed by Wilson et al. (2015) presented standard deviation inferior to the mean value, indicating less data variation.

The magnitude of heterogeneity was verified mainly by I² calculation, which ranges from 0 to 100%. An I² superior to 50% indicates substantial heterogeneity and, above 75%, indicates considerable heterogeneity. The questioning about the validity of combine results increases with greater heterogeneity. It was verified a heterogeneity of 0%, which represented a satisfactory result (Pereira & Galvão 2014).

The results of the clinical effectiveness of ZY-4 in patients with AIDS pointed that the herbal medicine is better than placebo in enhancing CD4⁺ lymphocytes levels, besides reducing HIV viral load, increasing body mass, and the improving the

symptoms. The use of other anti-HIV drugs was not allowed during the clinical trial; however, the treatment of opportunistic infections was allowed on patients (Wang et al., 2006).

On the other hand, the results from the clinical trial with *S. frutescens* were not as good, since the herbal medicine did not induce a decrease in viral load neither an increase on lymphocyte levels. The parameters analyzed during the investigation were similar to the negative control during the whole interval of treatment. In addition, two cases of tuberculosis in individuals with Isoniazid preventive therapy (IPT), induced an increase in the mean load and total of infection in patients taking on *S. frutescens* (Wilson et al., 2015).

Therefore, drug interactions between *S. frutescens* and Isoniazid require additional studies. Adherence to treatment of tuberculosis (TB) and HIV/AIDS is of important for infection control, in view that, even considering them as chronic infections, the treatment of tuberculosis lasts six to nine months, depending on the type of TB, while HIV/AIDS treatment lasts the whole life (Unaid 2015). The coinfection HIV/TB results in mortality rates higher than infection of HIV alone (Vilela et al., 2017; Lemos et al., 2012).

This study had several limitations. HIV-positive symptomatic adults were included in a single place in KwaZulu-Natal. The inclusion of participants with a more advanced HIV infection may have altered the results of the study in unpredictable ways. However, known interactions between *S. frutescens* and antiretroviral drugs prevented their inclusion on this study (Wilson et al., 2015; Mills et al., 2005; Minocha et al., 2011).

Most participants of this study were women. This gender bias for inclusion in clinical studies is a limiting factor, yet it has been observed in several other contexts.

In addition, different forms of preparing *S. frutescens* for consume may alter the chemistry and the availability of any bioactive compounds (Wilson et al., 2015).

The small number of included randomized clinical trials on this study may have influenced on the absence of statistical significant differences between intervention groups using herbal medicines and placebo.

The data selected to comprise this meta-analysis may be influenced by publication bias which is a trend to publish results that are systematically different from reality. The non-publication of results might be explained by a decision from the author or the research financier to not submit unfavorable findings for publication; or the editors of scientific journals that might not be interested in publishing results without statistical significance.

REFERENCES

- Ayuba GI, Jensen GS, Benson KF, Okubena AM, Okubena O (2014). Clinical Efficacy of a West African Sorghum bicolor-Based Traditional Herbal Preparation Jobelyn Shows Increased Hemoglobin and CD4 + T-Lymphocyte Counts in HIV-Positive Patients. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine* 20(1):53-56. [https://doi: 10.1089/acm.2013.0125](https://doi.org/10.1089/acm.2013.0125)
- Bonolo PF, Gomes RRFM, Guimarães MDC (2007). Adesão à terapia anti-retroviral (HIV/aids): fatores associados e medidas da adesão. *Epidemiologia e Serviços de Saúde* 16(4):61-278. <http://dx.doi.org/10.5123/S1679-49742007000400005>
- Burack JH, Cohen MR, Hahn JA, Abrams DI (1996). Pilot randomized controlled trial of Chinese herbal treatment for HIV-associated symptoms. *J. Acquir Immune Defic*

Syndr Hum Retrovirol. 12(4):386-393. <https://doi.org/10.1097/00042560-199608010-00009>

Costa TL, Oliveira DC, Formozo GA (2015). Qualidade de vida e AIDS sob a ótica de pessoas vivendo com o agravo: contribuição preliminar da abordagem estrutural das representações sociais. *Cadernos de Saúde Pública* 31(2):365-376. <https://dx.doi.org/10.1590/0102-311X00180613>

Dabaghzadeh F, Khalili H, Dashti-Khavidaki S, Abbasian L, Moeinifard A (2014). Ginger for prevention of antiretroviral-induced nausea and vomiting: a randomized clinical trial. *Expert Opinion Drug Safety* 13(7):859-866. <https://doi:10.1517/14740338.2014.914170>

Ellis RJ, Toperoffm W, Vaidam F, van den Brande G, Gonzales J, Gouaux B, Bentley H, Atkinson JH (2009). Smoked Medicinal Cannabis for Neuropathic Pain in HIV: A Randomized, Crossover Clinical Trial. *Neuropsychopharmacology* 34(3):672-680. <https://doi:10.1038/npp.2008.120>

Fernandes AC, Cromarty AD, Albrecht C, van Rensburg CE (2004). The antioxidant potential of *Sutherlandia frutescens*. *Journal of Ethnopharmacology* 95(1):1-5. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.05.024>

Galarza C, Ramos W, Chía H, Ronceros G, Santiani J, Gutiérrez E, Navincopa M, Vilcarromero M, Ávila J, Hancoco J, Gámez D (2007). Eficacia y seguridad de la terapia tópica con capsaicina 0,075% versus mentol 1% em el tratamiento del prurito de la foliculitis eosinofílica asociada al vírus de la inmunodeficiencia adquirida. *Anales de la Facultad de Medicina* 68(3):244-248. ISSN 1025-5583

Gil del Valle L, Serrano López T, Calderón Fuentes O, Núñez Sánchez F, Tápanes Peraza RD, Pérez Avila J (2010). Effect of Vimang in HIV/AIDS patients. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 62(3):200-206. PMID: 23437549

- Hsiao AF. et al. (2003). Complementary and alternative medicine use and substitution for conventional therapy by HIV-infected patients. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, Hagerstown 33(2):157-65. PMID: 12794548
- Higgins J, Sally Green, eds. (2008). *Cochrane handbook for systematic reviews of interventions*. John Wiley & Sons. v. 4.
- Jiang F, Zhang R, Gu Z, Zhang H, Guo H, Deng X, Liang J (2013). Fuzhengpaidu granule regulates immune activation molecules CD38 and human leukocyte antigen-D related on CD4+ and CD8+ T cells in patients with acquired immunodeficiency syndrome/human immunodeficiency virus. *Journal of Traditional Chinese Medicine* 33(4):439-443. [http://dx.doi.org/10.1016/s0254-6272\(13\)60145-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0254-6272(13)60145-4) ISSN 0255-2922 PMID: 24187862
- Joshi SN, Dutta S, Kumar BK, Katti U, Kulkarni S, Risbud A, Mehendale S (2008). Expanded safety study of Praneem polyherbal vaginal tablet among HIV-uninfected women in Pune, India: a phase II clinical trial report. *Sexually Transmitted Infections* 84(5):343-347. <http://dx.doi.org/10.1136/sti.2007.029207> ISSN: 1472-3263
- Kurapati KRV, Atluri VS, Samikkannu T, Garci G, Nair MP (2016). Natural products as anti-HIV agents and role in HIV-associated neurocognitive disorders (hand): A brief overview. *Front. Microbiol.* 6, 444. doi: 10.3389/fmicb.2015.01444
- Lemos L A, Feijão AR, Gir E, Galvão MTG (2012). Aspectos da qualidade de vida de pacientes com coinfeção HIV/tuberculose. *Acta Paulista de Enfermagem* 25(1):41-7. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-21002012000800007>
- Liu JP, Manheimer E, Yang M (2005). Herbal medicines for treating HIV infection and AIDS. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 20(3). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003937.pub2>

- Lu WB (1994). Preventing and treating HIV/AIDS. Beijing: People's Medical Publishing House. 170-181.
- MacKenzie J, Koekemoer T, Van de Venter M, Dealtry G, Roux S (2009). *Sutherlandia frutescens* limits the development of insulin resistance by decreasing plasma free fatty acid levels. *Phytotherapy Research* 23(11), 1609-1614. <https://doi.org/10.1002/ptr.2830>
- Marques SSF, Libonati RMF, Sabaa-Srur AUO, Luo R, Shejwalkar P, Hara K, Dobbs T, Smith RE (2016). Evaluation of the effects of passion fruit peel flour (*Passiflora edulis* fo. *flavicarpa*) on metabolic changes in HIV patients with lipodystrophy syndrome secondary to antiretroviral therapy. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 26(4):420-426. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2016.03.002>
- Matsabisa MG, Sekhoacha MP, Ibrahim O, Moodley P, Faber M (2012). Nutritional content and a phase-i safety clinical trial of a herbal nutritional supplement (imuniti) with putative immune-modulating properties. *African Journal of Traditional Complementary and Alternative Medicines* 13(9):19-23. <https://doi.org/10.4314/ajtcam.v9i3s.3>
- Mills E, Foster BC, van Heeswijk R, Phillips E, Wilson K, Leonard B, Kosuge K, Kanfer I (2005). Impact of African herbal medicines on antiretroviral metabolism. *AIDS*. 19(1):95-7.
- Minocha M, Mandava NK, Kwatra D, Pal D, Folk WR, Earla R, Mitra AK (2011). Effect of short term and chronic administration of *Sutherlandia frutescens* on pharmacokinetics of nevirapine in rats. *International Journal of Pharmaceutics* 413(1-2):44-50. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.04.051>
- Nikolaeva LG, Maystat TV, Pylypchuk VS, Volyanskii YL, Masyuk LA, Ktsyna GA (2008). Effect of oral immunomodulator Dzherelo in TB/HIV co-infected patients receiving

anti-tuberculosis therapy under DOTS. *International Immunopharmacology* 8(6):845-851. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2008.01.029>

Oladele OS, Olatunya AM, Anyabolu HC, Adejuyigbe EA, Oyelami OA (2012). Preliminary Trial of Aloe Vera Gruel on HIV infection. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 18(9):850-853. <https://doi.org/10.1089/acm.2010.0735>

Onifade AA, Jewell AP, Ajadi TA, Rahamon SK, Ogunrin OO (2013). Effectiveness of a herbal remedy in six HIV patients in Nigeria. *Journal of Herbal Medicine* 3(3):99-103. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2013.04.006>

Pereira MG, Galvão TF (2014). Heterogeneidade e viés de publicação em revisões sistemáticas. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*. 23(4):775-778. <https://doi:10.5123/S1679-49742014000400021>

Petrilli AA, Souza SJ, Teixeira AM, Pontilho P, Souza J, Luzia L, Rondó P (2016). Effect of Chocolate and Yerba Mate Phenolic Compounds on Inflammatory and Oxidative Biomarkers in HIV/AIDS Individuals. *Nutrients* 8(5):1-14. <https://doi.org/10.3390/nu8050132>

Robinson KA, Dickersin K. (2002). Development of a highly sensitive search strategy for the retrieval of reports of controlled trials using PubMed. *International Journal of Epidemiology* 31(1):150-3. <https://doi.org/10.1093/ije/31.1.150>

Santos EJM, Cunha, M (2013). Interpretação crítica dos resultados estatísticos de uma meta-análise: estratégias metodológicas. *Millenium*. 44:85-98

Salehi B, Kumar NVA, Şener B, Sharifi-Rad M, Kılıç M, Mahady GB, Vlasisavljevic S, Iriti M, Kobarfard F, Setzer WN, Ayatollahi SA, Ata A, Sharifi-Rad J (2018). Medicinal Plants Used in the Treatment of Human Immunodeficiency Virus. *International Journal of Molecular Sciences*. 19(5). pii: E1459. doi: 10.3390/ijms19051459. Review.

- Salehi B, Ezzat SM, Tsouh Fokou PV, Albayrak S, Vlaisavljevic S, Sharifi-Rad M, Bhatt ID, Sharifi-Rad M, Belwal T, Ayatollahi SA, Kobarfard F, Ata A, Baghalpour N, Martorell M, Setzer WN, Sharifi-Rad J (2018). *Athyrium* plants - Review on phytopharmacy properties. *Journal of Traditional and Complementary Medicine* 11(3):201-205. [10.1016/j.jtcme.2018.09.001](https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2018.09.001).
- Shi-qing J, Hong-xin S, Ying-min X, Yan-ling J, Jun-wen P, Hong-ling W (2011). Effects of Jingyuankang Capsules (精元康胶囊) on Leukocyte Level in AIDS Patients. *Journal of Traditional Chinese Medicine*. 31(1):32-35.
- Timmins GS, Deretic V (2006). Mechanisms of action of isoniazid. *Mol Microbiol*, 62(5):1220–1227. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05467.x>
- Tobwala S, Fan W, Hines CJ, Folk WR, Ercal N (2014). Antioxidant potential of *Sutherlandia frutescens* and its protective effects against oxidative stress in various cell cultures. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 14(271):1-11. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-271>
- Turner L, Boutron I, Hróbjartsson A, Altman DG, Moher D (2013). The evolution of assessing bias in Cochrane systematic reviews of interventions: celebrating methodological contributions of the Cochrane Collaboration. *Systematic Reviews*. 2(79):1-8. <https://doi.org/10.1186/2046-4053-2-79>
- UNAIDS (2015). UNAIDS. Global AIDS response progress reporting. http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/JC2702_GARPR2015guidelines_en.pdf.
- UNAIDS (2017). https://unaids.org.br/wp/2017/07/Data_book_2017_Brasil.pdf.
- Vella S, Palmisano L (2000). Antiretroviral therapy: state of the HAART. *Antiviral Research*. 45:1–7. [https://doi.org/10.1016/S0166-3542\(99\)00068-6](https://doi.org/10.1016/S0166-3542(99)00068-6)

- Villela WV, Barbosa RM (2017). Trajetórias de mulheres vivendo com HIV/aids no Brasil. Avanços e permanências da resposta à Epidemia. *Ciência & Saúde coletiva* 22(1):87-96. <http://dx.doi.org/10.1590/1413-81232017221.14222016>
- Wang J, Yang FZ, Zhao M, Zhang YH, Zhang YX, Liu Y, Liu WM, Wang FS, Xu SL, Yu ZM, Xie YM, Zhou XZ, Jiang TJ (2006). Randomized Double-blinded and Controlled Clinical Trial on Treatment of HIV/AIDS by Zhongyan-4. *Chinese Journal of Integrative Medicine* 12(1):6-11.
- Weber R, Christen L, Loy M, Schaller S, Christen S, Joyce CR, Ledermann U, Ledergerber B, Cone R, Lüthy R, Cohen MR (1999). Randomized, placebo-controlled trial of Chinese herb therapy for HIV-infected individuals. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome*. 22(1):56–64.
- Wilson D, Goggin K, Willims K, Gerkovich MM, Gqaleni N, Syce J, Bartman P, Johnson Q, Folk WR (2015). Consumption of *Sutherlandia frutescens* by HIV-Seropositive South African Adults: An Adaptive Double-Blind Randomized Placebo Controlled Trial. *PLoS One*. 10(7):1-14. C
- Zanon BP, Almeida PB, Brum CN, Paula CC, Padoim SMM, Quintana AM (2016). Revelação do diagnóstico de HIV dos pais. *Revista Bioética* 24(3):557-566. <http://dx.doi.org/10.1590/1983-8042201624315>. PMID: 10.1371/journal.pone.0128522

4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIRRETROVIRAL E CITOTOXICIDADE DA ESPÉCIE *Lafoensia pacari* Saint-Hilaire

Saskya A. Fonseca^{*1}, Francisco C. A. Lima², Magna S. A. Moreira³, Morgana V. Araújo³, Suellen M. A. Silva³, Edson de Souza Bento⁴, Adilson R. Sabino⁵, Roberta Costa Santos Ferreira⁶, Aldenir F. Santos^{7,8} and Antônio E. G. Sant'Ana⁹

1 Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Av. Lourival Melo Mota, s/n, Tabuleiro do Martins, 57072-970, Maceió, AL, Brasil, 2 Grupo de Química Quântica Computacional e Planejamento de Fármaco (GQQC&PF), Teresina, PI, Brasil, 3. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Alagoas, Av. Lourival Melo Mota, s/n, Tabuleiro do Martins, 57072-970, Maceió, AL, Brasil, 4. Instituto de Química e Biotecnologia, 5. Instituto de Química e Biotecnologia 6 Universidade Federal de Alagoas. Laboratório de Farmacologia antiviral e celular, 7 Centro Universitário Cesmac, Rua Cônego Machado, 918, Farol, 57051-160, Maceió, AL, Brazil, 8 Universidade Estadual de Alagoas, Rua Gov. Luís Cavalcante, s/n, Alto do Cruzeiro, 57312-000, Arapiraca, AL, Brazil, 9 Centro de Ciências Agrárias. Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais-LPqRN.

*saskya_mcz@hotmail.com

RESUMO

O interesse por espécies vegetais com ação antiviral tem crescido exponencialmente e algumas tem sido relatadas como possuidoras de propriedades anti-HIV. Essa pesquisa tem como objetivo realizar o fracionamento fitoquímico biodirecionado pela atividade antirretroviral das cascas do caule da espécie *Lafoensia pacari*. Trata-se de um estudo experimental *in vitro* e a metodologia envolve preparo do material vegetal, obtenção do extrato etanólico, fracionamento, purificação, identificação e quantificação das frações, extração ácido-base, ressonância magnética nuclear, teste de inibição da TR do HIV-1 e estudos de docking molecular. A partir do fracionamento biodirecionado pela atividade antirretroviral verificou-se uma maior atividade nas subfrações acetanólica. Com destaque para a subfração acetanólica neutros com 60,98% de inibição de TR e o ácido elágico com 88,61 % de inibição de TR e ausência de citotoxicidade. Verificou-se com o teste de citotoxicidade em linhagem de macrófagos que a fração clorofórmica foi mais tóxica que a fração acetanólica. A análise do espectro J-resolvido na região aromática apresentou um simpleto em 7.48 e 6.93 ppm que foram identificados como ácido elágico e ácido gálico respectivamente. A enzima 5TIQ obteve melhor parâmetro de afinidade com o ligante ácido elágico que foi confirmado pelos espectros HSQC-¹H-¹³C. O ácido gálico mostrou-se também favorável a formar interação com a enzima 5TIQ, sendo confirmado através do espectro HSQC-¹H-¹³C. Através da avaliação do PreADMET verificou-se que o ácido elágico é uma molécula promissora pela sua atividade de inibição da TR e parâmetros farmacocinéticos e de toxicidade.

PALAVRAS-CHAVE: Antiviral. HIV. Docking molecular.

ABSTRACT

Interest in antiviral plant species has grown exponentially and some have been reported to have anti-HIV properties. This research aims to perform the bio-directed phytochemical fractionation by antiretroviral activity of *Lafoensia pacari* stem bark. This is an *in vitro* experimental study and the methodology involves preparation of plant material, obtaining ethanolic extract, fractionation, purification, identification and quantification of fractions, acid-base extraction, nuclear magnetic resonance, HIV 1-RT inhibition test and molecular docking studies. From the fractionation biodirected by the antiretroviral activity there was a higher activity in the acetanolic subfractions. Highlighting the neutral acetanolic subfraction with 60.98% TR inhibition and ellagic acid with 88.61% TR inhibition and absence of cytotoxicity. The macrophage lineage cytotoxicity test showed that the chloroform fraction was more toxic than the acetanolic fraction. The analysis of the J-resolved spectrum in the aromatic region was simplified at 7.48 and 6.93 ppm which were identified as ellagic acid and gallic acid respectively. The 5TIQ enzyme obtained better affinity parameter with the ellagic acid ligand which was confirmed by the HSQC-¹H-¹³C spectra. Gallic acid was also favorable to form interaction with the 5TIQ enzyme, being confirmed through the HSQC-¹H-¹³C spectrum. From the PreADMET evaluation it was found that ellagic acid is a promising molecule for its RT inhibition activity and pharmacokinetic and toxicity parameters.

KEY WORDS: Antiviral. Virus. Molecular Docking.

Introdução

O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) pertence à família Retroviridae e ao gênero *Lentivirus*. Esse vírus é responsável pela base patológica da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) [1] e no decorrer dos últimos 30 anos a epidemia dessa síndrome trouxe consequências devastadoras para famílias, comunidades e países, sendo um dos maiores desafios para a saúde pública [2]. Números da Organização Mundial da Saúde (OMS) mostram que em 2016 foram identificados 1,8 milhão de novas infecções pelo vírus HIV (um novo caso a cada 17 segundos) e um total de 1 milhão de mortes decorrentes de complicações da AIDS. De 1980 a junho de 2017 foram identificados no país 882.810 casos de AIDS no Brasil [3].

O país tem registrado, anualmente, uma média de 40 mil novos casos da epidemia nos últimos cinco anos [4]. O Brasil foi o primeiro país em desenvolvimento que iniciou a distribuição universal dos medicamentos via política pública de saúde para doentes, e desde 1996, o acesso gratuito de todas as pessoas infectadas com HIV aos antirretrovirais é garantido por lei [1, 5].

Entretanto, apesar de todo esse aparato medicamentoso, a falência terapêutica ainda ocorre, principalmente em decorrência da persistência e mutagenicidade do HIV. A alta taxa de mutação da TR promove o surgimento de novas cepas de HIV resistentes aos inibidores, inclusive o efavirenz, um inibidor da transcriptase reversa não análogo de nucleosídeos (ITRNN) [6, 7, 8].

Tais aspectos têm impulsionado e justificado o crescente interesse de diversos grupos de pesquisa visando a identificação e desenvolvimento de novas substâncias que possam ser utilizadas em substituição ou em combinação com os antivirais em uso, a partir de pesquisas e moléculas isoladas de plantas.

A investigação da atividade anti-HIV de extratos vegetais e de moléculas isoladas de plantas tem sido realizada a partir de compostos que interfiram em várias partes do ciclo de replicação viral, destacando-se os inibidores da transcriptase reversa (TR). Nas espécies vegetais com comprovada ação anti-TR são realizados estudos fitoquímicos com a finalidade de identificação das substâncias envolvidas nesta ação e para elucidação do mecanismo inibitório [9].

A *Lafoensia pacari* A. St.-Hil. é uma espécie da família Lythraceae, que compreende 22 gêneros amplamente distribuídos nos trópicos e sub-trópicos,

embora alcancem as zonas moderadas. Geralmente vivem em áreas úmidas de costas fluviais, sendo o gênero *Lafoensia* sp. restrito ao continente Sul Americano. Esta família está representada por uma média de 500 espécies, dentre as quais se destaca a *Lafoensia pacari*, com distribuição no Brasil e no Paraguai [10].

Na medicina popular, essa espécie é utilizada como antipirético, cicatrizante, tônico, analgésico, antiulcerogênico, antidiarreico e no tratamento do câncer [11, 12]. Estudos realizados com extratos das folhas de *L. pacari* indicaram atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, antinoceptiva, antidepressora e antidispéptica [13, 14, 15].[[

Nos últimos anos, o interesse por espécies vegetais com ação antiviral tem crescido exponencialmente e algumas tem sido relatadas com propriedades anti-HIV. A pesquisa teve como objetivo avaliar a atividade antirretroviral, realizar a identificação dos constituintes químicos e estudos de *docking* da espécie *L. pacari*.

Material e Métodos

Coleta do material botânico e obtenção do extrato etanólico bruto

A coleta das cascas do caule de *Lafoensia pacari* foi realizada no estado de Goiás no ano de 2007. E identificada com o número de registro 3535 no herbário da Universidade de Brasília (UnB). O extrato etanólico das cascas do caule de *L. pacari* foi preparado através do método de percolação. Esse procedimento foi repetido até extração exaustiva do material vegetal.

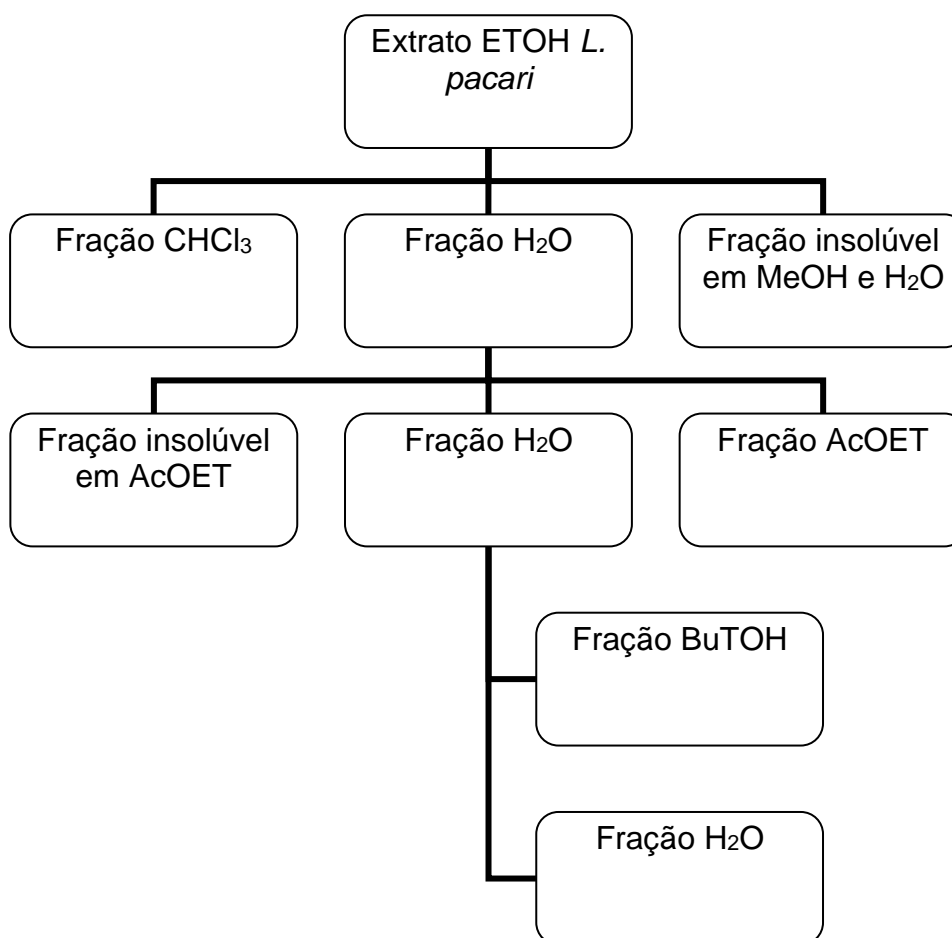
A amostra líquida obtida foi então submetida à concentração em evaporador rotatório sob pressão reduzida até a obtenção do extrato etanólico bruto (EEB) [16].

Métodos de Fracionamento e Purificação

Foi realizada a extração líquido-líquido para separação dos compostos. O EEB das cascas do caule de *L. pacari* foi solubilizado em água e metanol (MeOH:H₂O 8:2) e fracionado através do método de extração líquido-líquido (ELL), utilizando os solventes em ordem crescente de polaridade: clorofórmio (CHCl₃), acetato de etila (AcOET) e butanol (BuTOH).

Inicialmente foi adicionado ao EEB uma solução de MeOH:H₂O na proporção de 8:2 e depois CHCl₃. Após a separação da fração clorofórmica; na fração hidrometanólica proveniente desta primeira separação foi adicionado AcOET. Após a separação da fração acetanólica, foi adicionado BuTOH à fração hidrometanólica resultante. Todas as frações (Fluxograma 1) foram concentradas em rotaevaporador e submetidas ao ensaio de Transcriptase Reversa (TR) (Fluxograma 1).

Fluxograma 1. Frações obtidas através da ELL do EEB da *L. pacari*



Teste inibição transcriptase reversa (TR)

Neste estudo foi utilizado um método colorimétrico quantitativo imunoenzimático para determinar a atividade de inibição da TR, de acordo com o protocolo do fabricante (Reverse Transcriptase Assay, Roche, Germany), segundo a metodologia descrita por Ferreira; Riffel; Goulart Sant'ana (2010) [1]. No teste de inibição da TR do HIV-1, a TR é requerida para a síntese de DNA proviral e usa o

RNA genômico viral como um molde para esta síntese. Foi utilizado TR recombinante do HIV-1, diluída em tampão de lise na concentração de 2 ng/poço e um tempo de incubação de 2 horas. Foram adicionados em uma placa de 96 poços, 40µL da solução com nucleotídeos e o template/primer, 40µL de tampão de lise com 4ng de TR recombinante do HIV-1 e 40µL de tampão de lise com os extratos a serem testados.

Esta placa foi incubada por 2 horas a 37 °C, para que a TR utilizando o template/primer, pudesse produzir DNA proviral, incorporando nucleotídeos marcados com digoxigenina e biotina. Após a incubação foram transferidos 60µL desta mistura para cada poço de uma placa tratada com estreptavidina, incubando-se por 1h a 37°C para que a biotina pudesse ligar o DNA proviral sintetizado, à superfície da microplaca revestida com estreptavidina. A seguir, cada poço foi lavado cinco vezes com 250 µL de tampão de lavagem e foram adicionados 200 µL/poço, da solução de anticorpos antidigoxigenina conjugados à peroxidase (anti-DIG-POD) na concentração de 200 mU/mL. Incubou-se a placa por 1 hora a 37 °C, a fim de que o anti-DIG-POD se ligasse ao DNA marcado com digoxigenina.

Removeu-se então a solução dos poços e estes foram novamente lavados cinco vezes com 250 µL de tampão de lavagem. Na etapa final adicionou-se 200 µL/poço, do substrato para peroxidase, ABTS. A enzima peroxidase cataliza a clivagem do substrato, produzindo um produto de reação colorimétrica. A intensidade da coloração das amostras foi determinada utilizando-se um leitor de microplaca no comprimento de onda de 490nm. A intensidade da coloração, e consequentemente a absorbância está diretamente correlacionada ao nível de atividade da TR na amostra.

Extração ácido-base

As frações bioativas foram separadamente submetidas ao processo de extração ácido-base (EAB), utilizando as soluções de ácido clorídrico (HCl) a 0,1 M e hidróxido de sódio (NaOH) a 0,1 M [17].

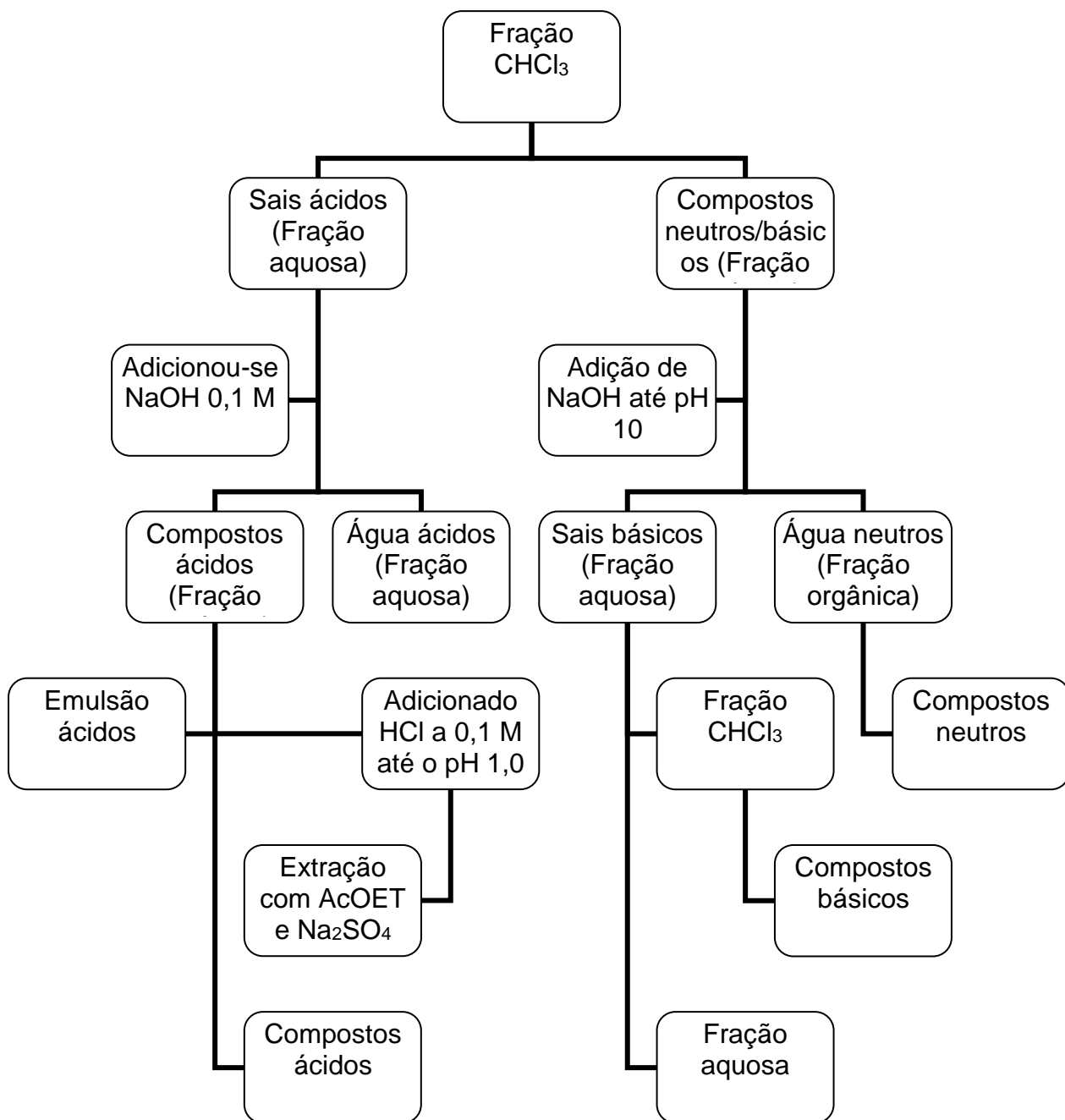
A fração CHCl_3 foi solubilizada em CHCl_3 e adicionada à solução aquosa de NaOH 0,1 M, o que possibilitou a obtenção da fração de sais ácidos (fração aquosa) e da fração de compostos básicos e neutros (fração clorofórmica). À fração de sais

ácidos foi adicionado HCl a 0,1 M até o pH 1,0 restaurando o caráter ácido dos compostos. Estes compostos foram extraídos com AcOET e secos com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), resultando nas frações compostos ácidos e emulsão ácidos (Fluxograma 2).

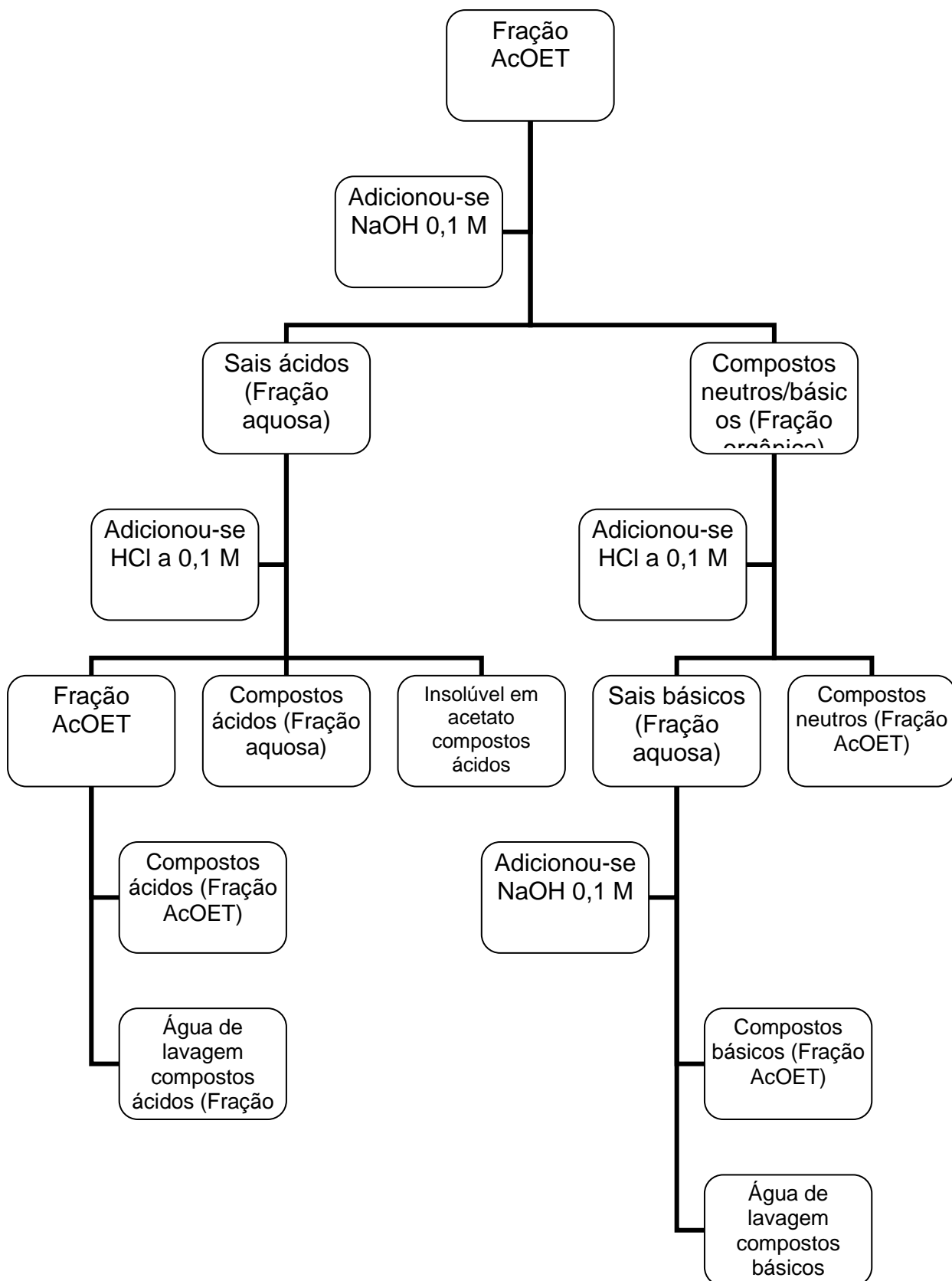
A fração CHCl_3 neutros e básicos foi tratada com HCl a 0,1M, que possibilitou a extração dos seus sais básicos (fração aquosa). A esses foi adicionado NaOH até pH 10 e solução de CHCl_3 . Na fração orgânica obteve-se os compostos básicos, após ser lavada com água e seca com Na_2SO_4 . A fração água neutros foi logo lavada com água e seca com Na_2SO_4 para dar origem aos compostos neutros (Fluxograma 2). Todas as subfrações foram concentradas em rotaevaporador.

A fração AcOET foi solubilizada com MeOH e foi adicionado NaOH a 0,1 M, formando sais ácidos (fração aquosa) que posteriormente foram tratados com HCl a 0,1 M, restaurando seu caráter ácido, e AcOET, obtendo seus compostos ácidos (fração aquosa), compostos ácidos insolúvel em AcOET e H_2O e fração AcOET, que foi lavada com água e seca com Na_2SO_4 dando origem aos compostos ácidos (fração AcOET) e H_2O de lavagem compostos ácidos (fração aquosa) (Fluxograma 3).

A fração AcOET básicos e neutros foi tratada com HCl a 0,1M, e obteve-se os compostos neutros (fração AcOET) e sais básicos (fração aquosa), estes sais foram tratados com NaOH a 0,1 M, restaurando o caráter básico de seus compostos, e AcOET, gerando seus compostos básicos (fração AcOET) e H_2O de lavagem compostos básicos (fração aquosa) (Fluxograma 3). Todas as subfrações obtidas foram concentradas em rotaevaporador.

Fluxograma 2 - Subfrações obtidas a partir da EAB da fração CHCl_3 .

Fluxograma 3 - Subfrações obtidas a partir da EAB da fração AcOET.



Análises de ressonância magnética nuclear

Os espectros de Ressonância magnética nuclear (RMN) foram analisados a 20°C em espectrômetro Bruker AVANCE operando a 400 MHz na frequência do hidrogênio. O MeOD-d4 e o DMSO-d6 foi usado para o chaveamento do campo magnético (“lock”). Cada espectro de RMN-¹H foi realizado com 128 pulsos (10 min e 26 s), o tempo de aquisição = 2,72 s, largura espectral = 16 ppm, tamanho do fid = 32K, largura de pulso (P1) de 30° (10,5 s) e atraso de relaxamento (delay-d1) de 2 s.

O experimento J-resolvido foi adquirido com 32 pulsos por 8192 x 128 pontos, largura espectral = 5.208 KHz e 60 Hz acoplamento spin-spin e atraso de relaxamento = 1,5 s. O experimento COSY ¹H-¹H foi realizado com 32 pulsos por 2048 x 512 pontos, largura espectral = 13 ppm em ambas as dimensões com o d1 = 1,5 s.

Os experimentos HMBC ¹H-¹³C e HSQC EDITADO ¹H-¹³C foram realizados com 64 pulsos por 4,096 x 512 pontos, largura espectral = 5208 KHz para 22,149 KHz ¹H e do ¹³C com d1 = 1,5 s. Os espectros foram processados com o emprego do software TopSpin versão 2.1 (Bruker), com uma linha de alargamento (lb) = 0,3 Hz e correção da fase, correção da linha de base e calibração pelo padrão interno (TSP) com sinal em 0,0 ppm.

Determinação da viabilidade celular

Macrófagos da linhagem J774.A1 foram cultivados em triplicatas em placas de 96 poços, na concentração de 1×10^5 células/poço e incubadas em estufa a 37 °C com atmosfera úmida contendo 7% de CO₂ *over night*, para adesão dos macrófagos à placa. Após esse período, o meio sobrenadante foi retirado para remoção das células não aderentes e diferentes concentrações das substâncias (1, 10, 100 µg) foram acrescentadas aos poços e mantidas em estufa de CO₂ por 48 horas [18].

Após esse período, 100 µL de solução de brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (5 mg/10mL) foi adicionado aos poços e mantidos por 1 hora em estufa de CO₂. Após esse período, o sobrenadante foi descartado e 100 µL de DMSO foi adicionado aos poços e em seguida realizada a leitura em leitor de ELISA a 550 nm. Os poços controles apresentam células cultivadas somente com

meio de cultura ou células cultivadas na presença do diluente das amostras (DMSO, Sigma). A viabilidade celular das culturas tratadas com as substâncias foi comparada ao padrão de morte obtido nas culturas controle [18].

Docking Molecular

Foi realizado PreADMET que corresponde a um aplicativo baseado na web para prever dados ADMET e criar uma biblioteca semelhante a drogas usando o método *in Silico*. Através do ADMET é possível de se prever análises como: Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade que constituem a farmacocinética de uma molécula candidata a fármaco. Atualmente se tem uma série de ferramentas computacionais *on-line* e *off-line* que ajudam a prever e analisar os perfis ADME dos ligantes, como base da sua estrutura e a interação entre o ligante e o receptor [19]. Dados como predição e descritores da droga como mutagenicidade, dosagem toxicológica para diferentes tecidos e propriedades farmacologicamente relevantes do composto em análise, podem ser previstos utilizando o servidor Preadmet [20-22].

A estrutura 3D da Major Capsid protein (Proteína principal do capsídeo) do PBCV-1 foi obtida no banco de dados de proteínas (PDB) (PRONTEIN DATA BANK, 2018) com o código (5TIQ). As estruturas 3D do ácido gálico (AG), ácido elágico (AE) e da punicalagina (PU) foram obtidas no PUBCHEM com os códigos 370, 5281855 e 16129869, respectivamente.

Todos os procedimentos de ancoragem utilizaram o pacote Autodock 4.2 [23, 24, 25]. As proteínas e ligantes foram preparados para simulações de encaixe com AutoDock Tools (ADT), versão 1.5.6 [26]. O receptor foi considerado rígido enquanto que cada ligante era considerado flexível. As cargas parciais Gasteiger [27] foram calculadas após a adição de todos os hidrogênios. Os átomos de hidrogênio não polares de proteínas e ligantes foram subsequentemente mesclados. Foi gerada uma caixa cúbica de 60 x 60 x 60 pontos com espacagem de 0,35 Å entre os pontos da grade para todo o alvo da proteína. Os métodos de pesquisa Lamarckianos Genéticos Globais (LGA) [28] e a pesquisa local (LS) pseudo-Solis e Wets [29] foram aplicados na pesquisa de ancoragem. Cada ligante foi submetido a 100 execuções independentes de simulações de ancoragem [30]. O resto dos parâmetros de

ancoragem foram definidos como os valores padrão. As conformações acopladas resultantes foram agrupadas em famílias de acordo com o RMSD (Root-Mean-Square Deviation). As coordenadas dos complexos selecionados para uma análise mais detalhada foram escolhidas usando o critério da menor conformação de encaixe do cluster com menor energia combinada com inspeção visual.

Análise estatística

Foi realizada análise multivariada em que os espectros de RMN-¹H otimizados foram reduzidos (δ 0,3-10,0 ppm) e divididos em regiões de largura (bucket = 0,0005 ppm), normalizados e alinhados através do programa MATLAB versão 2015a. A região de δ 4,7-5,0 ppm foi excluída da análise por causa do sinal residual do metanol. As análises de componentes principais (PCA) e análises discriminantes ortogonal por mínimos quadrados parciais (OPLS-DA) foram realizadas com o emprego do software SIMCA-P (versão 14.0, Umetrics, Umeå, Suécia) com escalonamento baseado no método de única variância (UV).

Os dados obtidos da determinação da citotoxicidade das amostras vegetais da espécie *L. pacari* em macrófagos foram expressos como média \pm erro padrão da média (M \pm E.P.M.) após análise estatística empregando-se análise de variância (ANOVA) *one-way* seguido pelo pós-teste de Dunnett, onde as diferenças entre as médias foram consideradas significantes quando $p^* < 0,05$, $p^{**} < 0,01$ e $p^{***} < 0,001$ ao ser comparado ao grupo controle.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Fracionamento biodirecionado pela atividade de inibição da TR

Foram obtidos 1783,20g de (EEB) das cascas do caule de *L. pacari*, com rendimento de 85,43%. Todas as frações obtidas após a ELL/EAB foram submetidas ao ensaio de TR. Possivelmente a alta polaridade e complexidade dos constituintes químicos desta espécie fizeram surgir subfrações atípicas deste processo de extração ácido-base. Estas subfrações foram codificadas como fração água-ácida, água compostos ácidos, água de lavagem compostos ácidos e água de lavagem compostos básicos.

Nas pesquisas de Firmo, Miranda, Coutinho, Barboza, Alves, Olea. (2015), [31] no gênero *Lafoensia* foram identificados em maior quantidade os compostos ácidos, seguido de triterpenos, saponinas, flavonoides e acetofenonas, garantindo que os compostos ácidos representam o fator de atividade biológica da espécie.

A partir do fracionamento biodirecionado pela atividade antirretroviral verificou-se uma maior atividade nas subfrações acetanólicas. Na subfração acetanólica água lavagem ácidos obteve-se 88,82% de inibição de TR. A subfração acetanólica H₂O ácidos apresentou 87,63% de inibição de TR. A subfração acetanólica neutros apresentou 60,98% de inibição de TR, seguida da subfração clorofórmica neutros com 41,46 % e a subfração clorofórmica ácidos que apresentou 37,6% de inibição de TR. Comparando-se ao medicamento Efavirenz verificou-se uma atividade de inibição da TR no ácido elágico de 88,61% e no ácido gálico 0 % de inibição da TR (Tabela 1).

Tabela 1. Atividade antirretroviral do extrato, frações e subfrações de *L. pacari*.

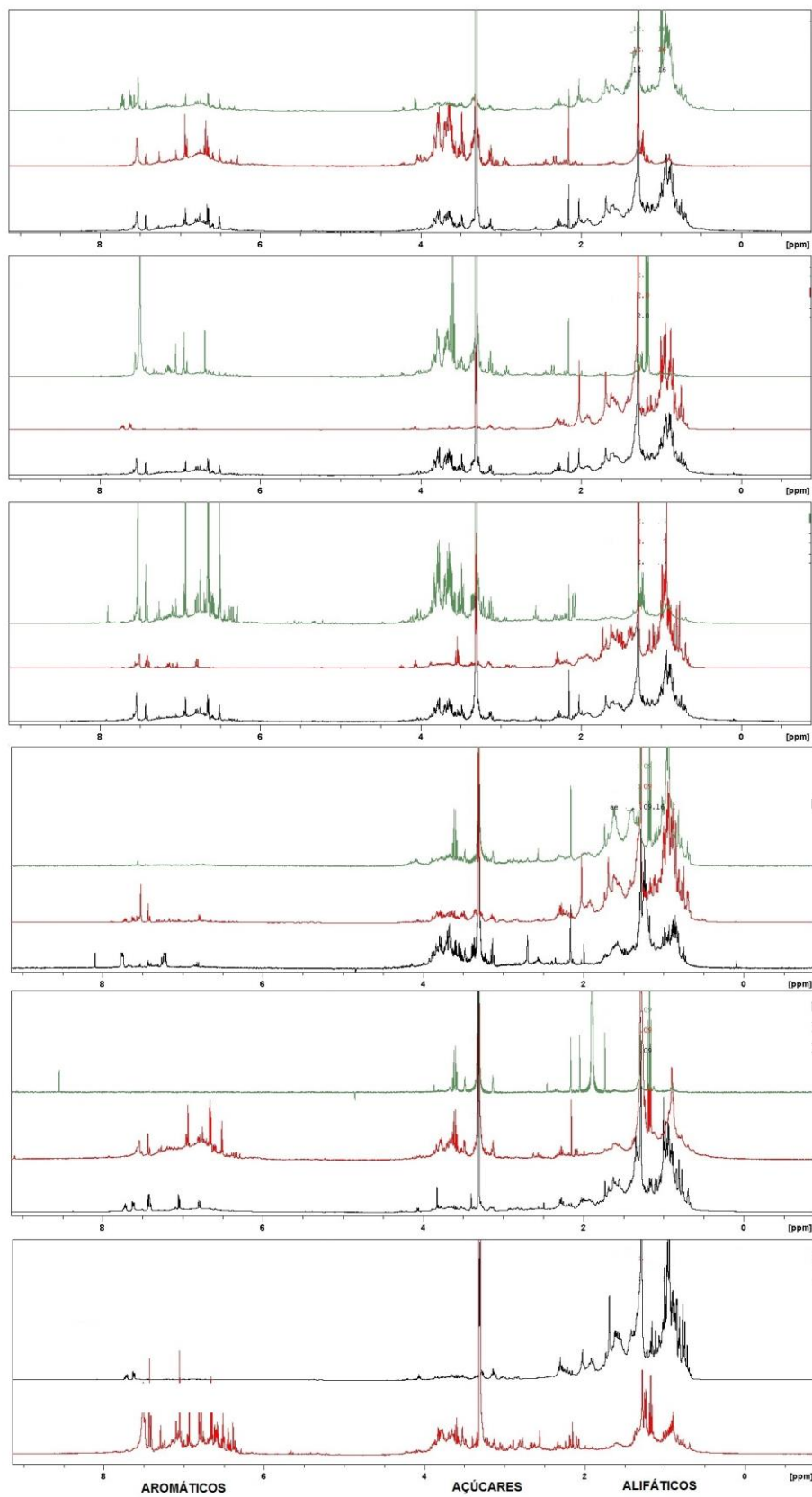
Tipo de extração	Frações	Atividade de inibição (TR)%
EEB	-----	73,15
Fração da ELL	Fração CHCl ₃	53,05
Frações da EAB	SubF. CHCl ₃ (neutros)	41,46
	SubF. CHCl ₃ (água/ácidos)	30
	SubF. CHCl ₃ (ácidos)	37,6
	SubF. CHCl ₃ (emulsão ácidos)	29,22
	SubF. CHCl ₃ (básicos)	22,55
Fração da ELL	Fração insolúvel AcOEt	69,14
Fração da ELL	Fração AcOEt	74,82
Frações da EAB	SubF. AcOET (neutros)	60,98
	SubF. AcOET (H ₂ O ácidos)	87,65
	SubF. AcOET (água lavagem básicos)	25,69
	SubF. AcOET (água lavagem ácidos)	88,82
	SubF. AcOET (ácidos)	87,65
Fração da ELL	Fração aquosa	72,55
Padrões		
Ácido Elágico	-----	88,61
Ácido Gálico	-----	0
Efavirenz (controle)	-----	100

EEB: extrato etanólico bruto. ELL: extração líquido líquido. EAB:extração ácido base. CHCl₃: clorofórmio. AcOEt: acetato. SubF(Subfração).

Foram realizados os experimentos de ressonância magnética nuclear das amostras submetidas ao teste da TR%. O perfil dos espectros de RMN-¹H das

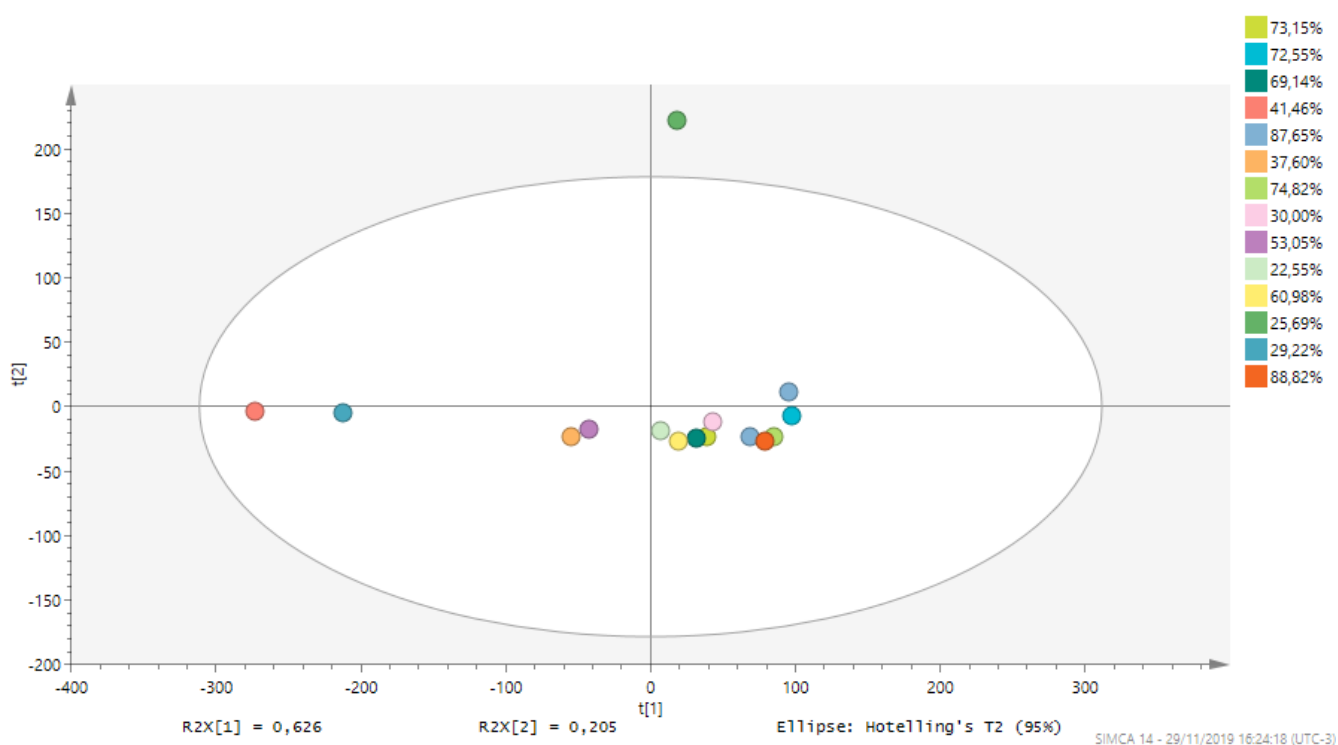
subfrações obtidas do extrato etanólico da *L. pacari* classificadas pela atividade (TR%) de cada subfração demonstram complexidade em suas composições, pois tratam de mistura de compostos de diferentes polaridades. Para maioria das subfrações é possível observar sinais característicos de compostos aromáticos (6 a 9 ppm), açúcares (3 a 5.5 ppm) e compostos alifáticos (0.5 a 2 ppm) (Figura 1).

Figura 1: Perfil dos espectros de RMN-¹H das subfrações obtidas do extrato etanólico da *L. pacari* classificadas pela atividade (TR%) de cada subfração.



Foi realizada a análise dos componentes principais que mostrou uma variância total das componentes principais 1 e 2 de 83,11% dos dados de RMN de hidrogênio de cada subfração, com o intuito de identificar as diferenças entre as subfrações e assim identificar os compostos através dos sinais indicados na PCA; cada ponto se refere a um espectro de ressonância de hidrogênio (Figura 2). A PCA mostrou que não foi possível separar as subfrações mais ativas mostrando que as mesmas estão aleatórias, devido a variância dos perfis dos metabólitos detectados nas subfrações semelhantes não ocorreu a separação mais efetiva das subfrações mais ativas. Apenas as subfrações 41,46%, 25,69% e 29,22% foram separadas pela componente principal 1 (PC1).

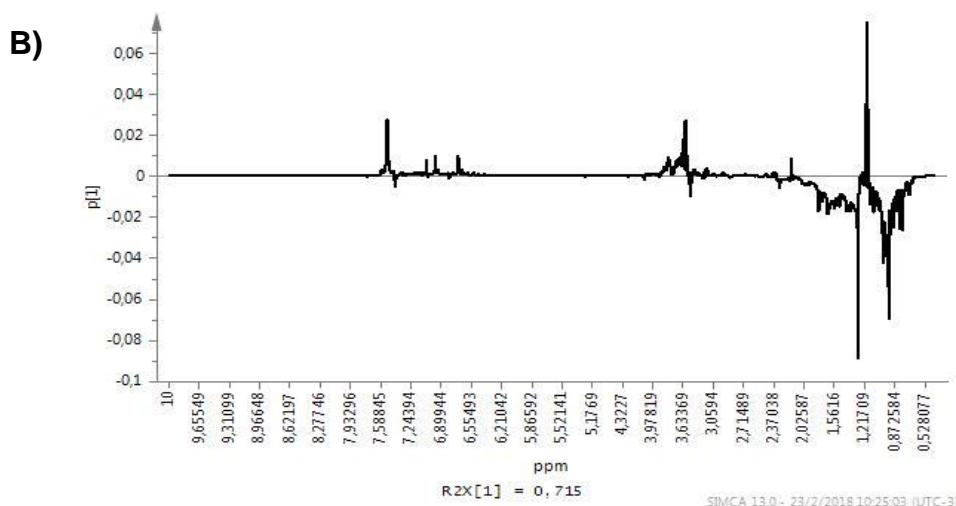
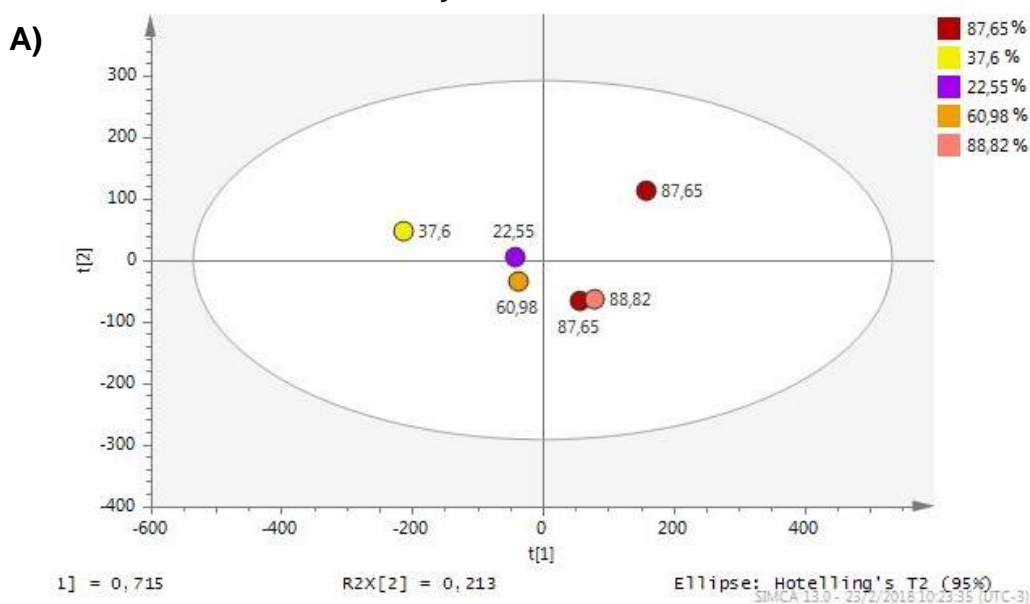
Figura 2. Escores da PCA das subfrações obtidas do extrato etanólico da *L. pacari* classificadas pela atividade (TR%) de cada subfração.



Visando separar as frações mais ativas das menos ativas, foi realizada uma PCA contendo 6 subfrações, sendo 3 com maior percentual de atividade (88,82, 87,65 e 87,65%) e 3 com percentual de atividade (37,6, 22,55 e 60,98%). A PCA explicou 92,8% da variância total dos dados através das componentes 1 e 2, e, conforme apresentado na figura 3A houve a separação das frações mais ativas das menos ativas através da PC1 (71,5%). Para identificar os compostos que

caracterizam a classe das frações mais ativas que foram separadas na PCA foi realizada uma análise dos carregamentos da PC1 (Figura 3B). A figura 3B indica os picos dos discriminantes para cada classe, as frações mais ativas estão caracterizadas pela alta concentração de compostos aromáticos (6 a 9 ppm) e açúcares (3 a 5 ppm, picos de fase positiva). Enquanto que as frações menos ativas possuem uma alta concentração de compostos alifáticos (0,8 a 2,5 ppm), provavelmente triterpenos (picos de fase negativa). Sinais com fase positiva são referentes as subfrações 87,65%, 88,82% e 87,65% e sinais com fase negativa são referentes as subfrações 22,55%, 37,60% e 60,98%.

Figura 3. (A) Escores da PCA (71,5 % PC1 e 21,3% PC2) das 6 subfrações obtidas do extrato etanólico da *L. pacari* classificadas pela atividade (TR%) de cada subfração. (B) Loadings referentes a PC1 (71,5 %) com os sinais de RMN discriminantes entre as subfrações.



Com o objetivo de identificar os compostos discriminantes das subfrações mais ativas apresentados nos carregamentos da PC1, realizou-se experimentos RMN-¹H, J-resolvido ¹H-¹H, HSQC-¹H-¹³C e HMBC-¹H-¹³C da subfração acetanólica (água lavagem ácidos) 88,82%, a mais ativa. A análise do espectro de RMN-¹H da subfração acetanólica (água lavagem ácidos) (88,82%) apresentou sinais característicos de compostos alifáticos, açúcares e compostos aromáticos.

Como a análise da PCA demonstrou uma alta concentração de compostos aromáticos e açúcares, decidiu-se focar a identificação dos metabólitos na região aromática, uma vez que a região de açúcares é muito complexa por apresentar sobreposição de sinais. A análise do espectro J-resolvido na região aromática entre 6 e 8 ppm apresentou um grande número de simpletos (Figura 4), um simpleto em 7.48 e 6.93 ppm foram identificados como ácido elágico e ácido gálico respectivamente (Figura 4).

O ácido elágico foi confirmado pelos espectros HSQC-¹H-¹³C, que resultou no acoplamento do H-5 (7.48 ppm) com o C-5 em 110.63 ppm, e HMBC-¹H-¹³C que permitiu detectar as correlações do H-5 com os carbonos a longa distância C-1 em 112.4 ppm, C-2 em 136.8 ppm, C-3 em 139.2 ppm, C-4 em 148.2 ppm, C-6 em 107.6 ppm e C-7 em 159.4 ppm (Tabela 2).

O ácido gálico foi confirmado através do espectro HSQC-¹H-¹³C que mostrou a correlação direta entre o H-2 e H-6 em 6.93 ppm e o C-2 e C-6 em 109.1 ppm (Figura 5), no espectro HMBC-¹H-¹³C foi possível observar as correlações do H-2 com os carbonos C-1 em 121.01 ppm, C-7 em 167.8 ppm, C-3 em 145.2 ppm e C-4 em 138,3 ppm.

Ao analisar a região aromática de 6.40 a 6.85 notou-se um grande número de simpletos e no espectro HMBC ¹H-¹³C da subfração acetanólica água lavagem ácidos (88,83%) observou-se um padrão de acoplamentos que sugerem a estrutura de elagitaninos. Foram observados acoplamentos dos hidrogênios em 6,40 ppm, 6,52 ppm, 6,58 ppm, 6,66 ppm, 6,77 ppm com os respectivos carbonos em 168,5 ppm, 144,1 ppm, 135,0 ppm e 114,2 ppm permitindo especular as presenças da α e β punicalagina (Figura 6) [32]. No entanto, no espectro HMBC não foi observado os acoplamentos dos hidrogênios da unidade de açúcar com as carbonilas da

punicalagina, porém vale salientar que essas moléculas já foram identificadas na *L. pacari* [33].

Figura 4. Espectros de RMN- ^1H (A) e J-resolvido ^1H - ^1H (B) expandidos na região de compostos aromáticos da subfração acetanólica água lavagem ácidos (88.82%) da *L. pacari* obtidos em metanol- d_4 .

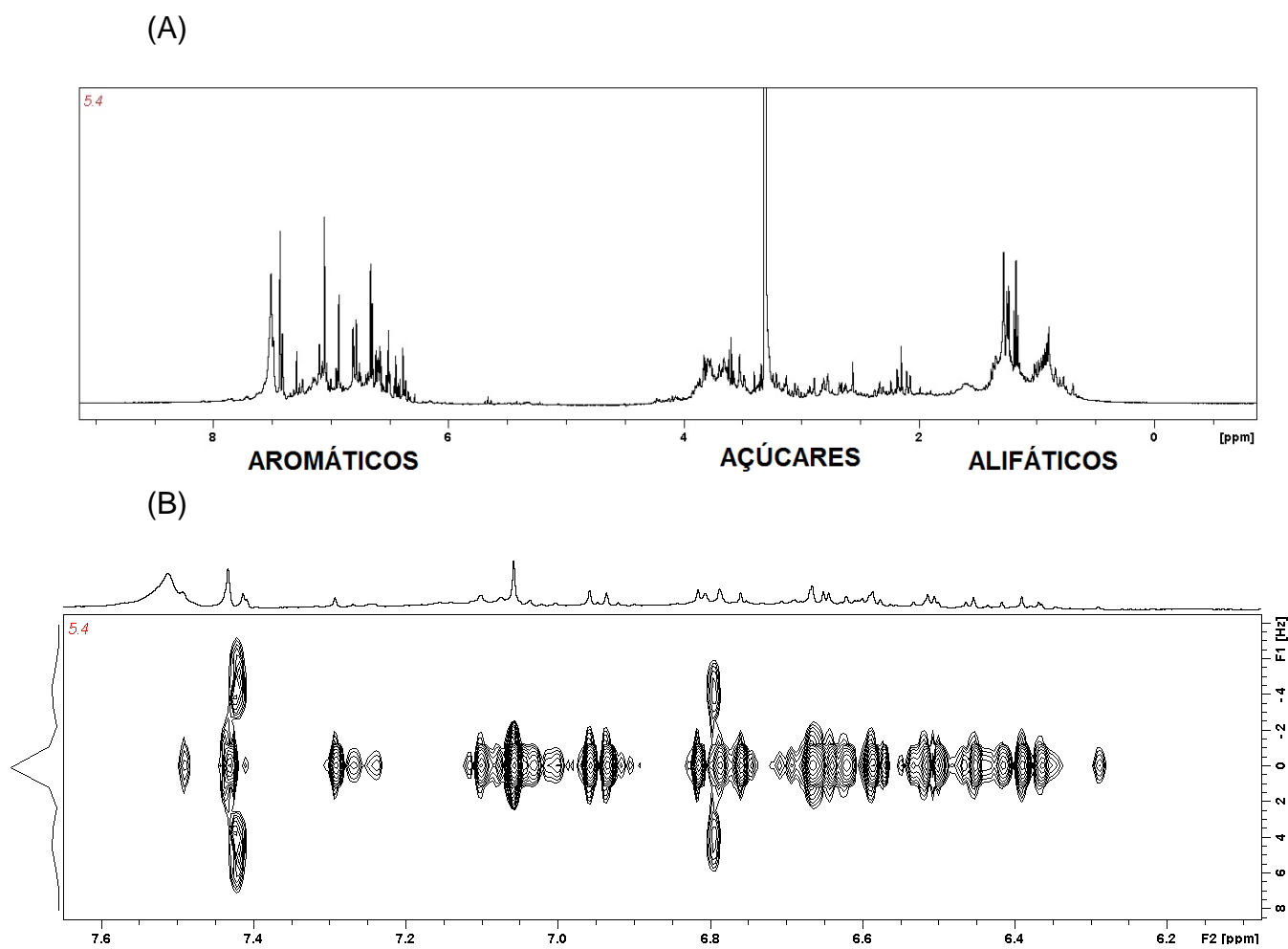


Figura 5: Região do espectro HSQC ^1H - ^{13}C (A) e HMBC ^1H - ^{13}C com região de compostos aromáticos da subfração acetato água de lavagem ácidos (88.83%) da *L. pacari* obtido em metanol- d_4 .

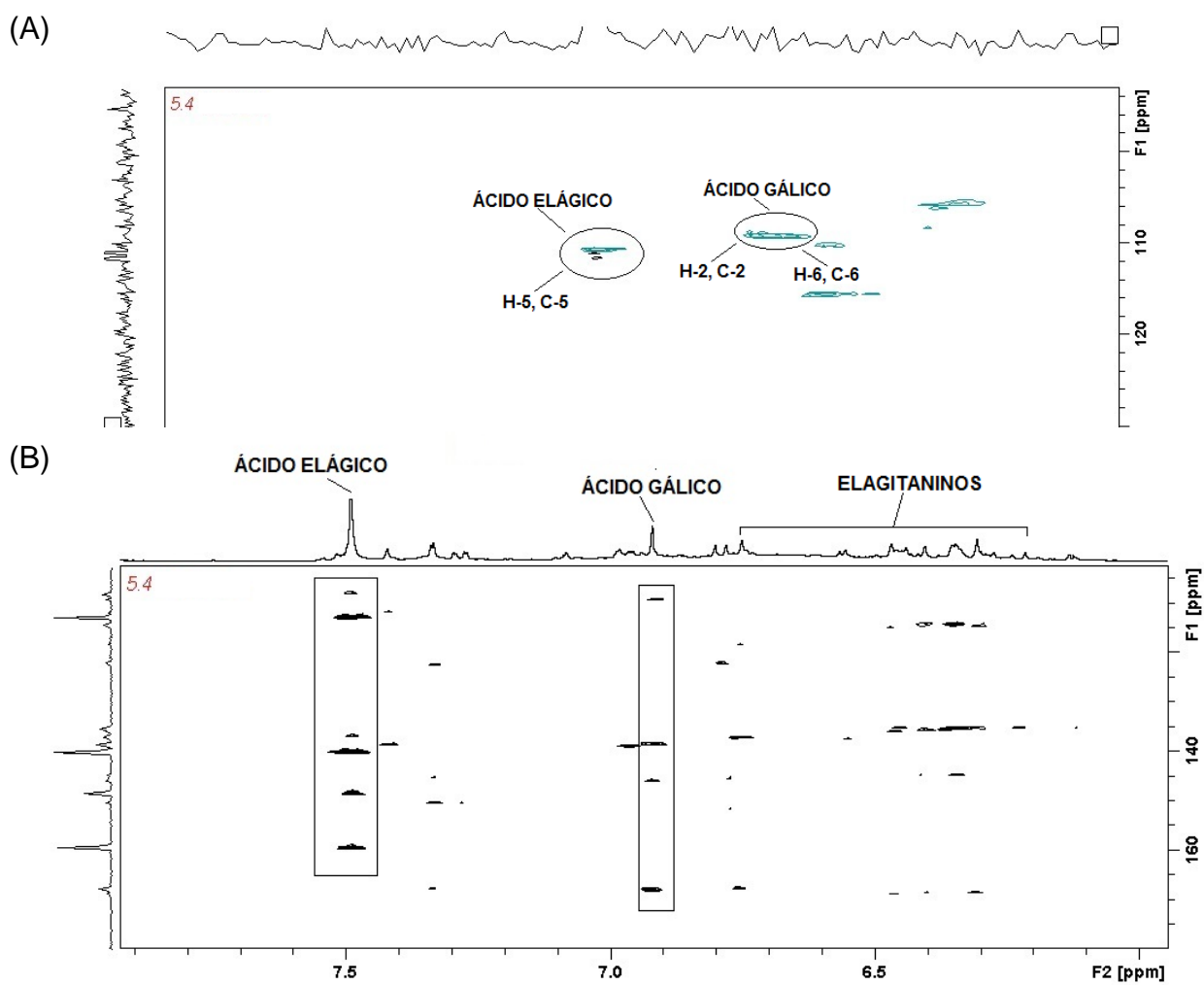
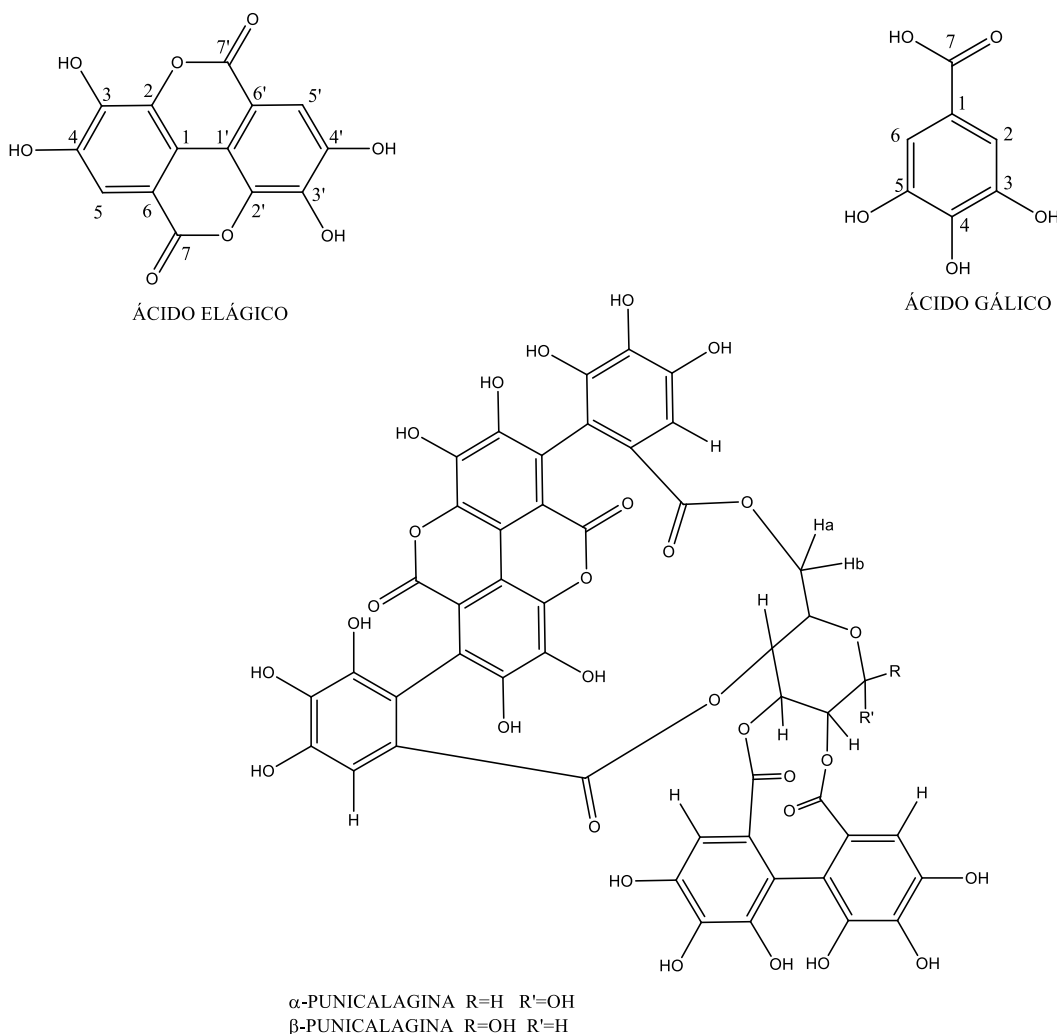


Tabela 1: Correlações ^1H e ^{13}C a longa distância (HMBC) referentes ao ácido elágico, ácido gálico e elagitanino obtidos em metanol- d_4 .

Composto	^1H	^{13}C
Ácido Elágico	7,48 (H-5-5')	112,4 (C-1-1'), 136,8 (C-2-2'), 139,2 (C-3-3'), 148,2 (C-4-4'), 107,6 (C-6-6'), 159,4 (C-7-7')
Ácido Gálico	6,93 (H-2)	121,0 (C-1), 167,8 (C-7), 145,2 (C-3), 138,3 (C-4)
	6,40	114,2, 135,0, 144,1, 168,5
	6,52	114,2 (C-14), 135,0 (C-16), 144,1 (C-15), 168,5 (C-20)
Elagitanino*	6,58	114,2 (C-14), 135,0 (C-16), 144,1 (C-15), 168,5 (C-20)
	6,66	114,2 (C-14), 135,0 (C-16), 144,1 (C-15), 168,5 (C-20)
	6,77	114,2 (C-14), 135,0 (C-16), 144,1 (C-15), 168,5 (C-20)

Figura 6. Estruturas do Ácido Elágico, Ácido Gálico, α e β Punicalaginas.



Pesquisas sobre os constituintes químicos presentes em *L. pacari* demonstraram a presença de compostos fenólicos. Dentre os compostos fenólicos encontrados pertencentes ao grupo de taninos, estão os polifenólicos, que podem ser divididos em duas classes: elagitaninos e galotaninos [34, 35].

Dentre os compostos fenólicos encontrados nesta espécie, estão os derivados do ácido benzóico, como o ácido gálico e seu produto de dimerização (ácido hexa-hidróxi-difênico) e derivados, especialmente o ácido elágico, principalmente na forma de taninos hidrolisáveis. Assim como polifenóis derivados da via do acetato-polimalato, principalmente os flavonóides e seus heterosídeos além de taninos condensados [34].

A punicalagina é o principal constituinte elagitanino identificado na espécie *L. pacari* [33]. No entanto, os princípios ativos responsáveis pela maioria dos efeitos biológicos da espécie ainda não foram completamente elucidados.

As amostras em quantidade suficiente foram submetidas aos testes de citotoxicidade das amostras vegetais da espécie *L. pacari* (1, 10, 100 µg/mL) em macrófagos J774.A1 (teste de MTT) (Tabela 2).

O método MTT avalia a atividade metabólica das células, quantificando a redução metabólica do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio) realizada pela enzima mitocondrial succinato desidrogenase associadas ao NADPH e ao NADH, que resulta na produção de cristais de formazan (coloração arroxeadada e insolúvel em água), permitindo assim, avaliar a atividade de desidrogenases mitocondriais, sendo quantificado através de espectrofotometria [18].

Apesar de muito ativo (73,15% de inibição de TR), o extrato etanólico bruto promoveu citotoxicidade máxima na concentração de 100 ± 0 µg/mL. Seu fracionamento biodirecionado resultou nas frações mais ativas: subfração acetanólica água lavagem ácidos que promoveu 88,82% de inibição de TR e citotoxicidade de $38,2 \pm 7,6$ até 100 µg/L. Merecem destaque a subfração acetanólica neutros com 60,98% de inibição de TR e o ácido elágico com 88,61% de inibição de TR e ausência de citotoxicidade.

As amostras que não apresentaram toxicidade estatisticamente significativa para macrófagos J774.A1 até a concentração máxima testada (100 µg/L) foram a

Subfração acetato compostos neutros, Subfração acetanólica ácidos, Subfração aquosa compostos ácidos, Fração aquosa, Efavirenz e o Ácido elágico.

A partir deste experimento foi possível observar que as seguintes amostras apresentaram toxicidade até a concentração máxima testada (100 µg/L): Extrato etanólico bruto (100 ± 0), Fração acetanólica ($69,6 \pm 2,3$), Subfração acetanólica água de lavagem compostos básicos ($90,8 \pm 2,2$), Subfração acetanólica água de lavagem compostos ácidos ($38,2 \pm 7,6$), Fração clorofórmica ($97,7 \pm 2,1$), Subfração clorofórmica ácidos ($94,6 \pm 7,6$), Subfração clorofórmica neutros ($74,0 \pm 2,0$), Subfração clorofórmica básicos ($63,0 \pm 3,8$), Subfração clorofórmica água ácidos ($27,0 \pm 7,4$), Subfração clorofórmica emulsão ácidos ($43,3 \pm 4,5$), Atazanavir ($86,0 \pm 4,3$), Raltegravir (100 ± 0) e Ácido gálico (100 ± 0) (Tabela 2).

Tabela 2. Determinação da citotoxicidade das amostras vegetais da espécie *L. pacari* (1, 10, 100 µg/mL) em macrófagos J774.A1 (teste de MTT).

Tipo de extração	Frações	CI ₅₀ (µg/mL)	Toxicidade máxima (%)
EEB		55 ± 0	100 ± 0***
Fração da ELL	Fração clorofórmica	56 ± 0,6	97,7 ± 2,1***
Frações da EAB	Subfração clorofórmica ácidos	48,7 ± 2,9	94,6 ± 7,6***
	Subfração clorofórmica neutros	70,7 ± 1,2	74,0 ± 2,0***
	Subfração clorofórmica básicos	81,3 ± 2,2	63,0 ± 3,8**
	Subfração clorofórmica água ácidos	>100	27,0 ± 7,4*
	Subfração clorofórmica emulsão ácidos	>100	43,3 ± 4,5*
Fração da ELL	Fração acetanólica	74,1 ± 1,2	69,6 ± 2,3***
Frações da EAB	Subfração acetanólica compostos neutros	>100	NA
	Subfração aquosa compostos ácidos	>100	NA
	Subfração acetanólica água de lavagem compostos básicos	59,3 ± 0,7	90,8 ± 2,2***
	Subfração acetanólica água de lavagem compostos ácidos	>100	38,2 ± 7,6*
	Subfração. acetanólica ácidos	>100	NA
Fração da ELL	Fração aquosa	>100	NA
Padrões		CI₅₀ (µg/mL)	Toxicidade máxima (%)
Efavirenz		>100	NA
Atazanavir		61,7 ± 1,5	86,0 ± 4,3***
Raltegravir		32,4 ± 1,8	100 ± 0***
Ácido gálico		19,8 ± 0,2	100 ± 0***
Ácido elágico		>100	NA

^a Concentração inibitória 50 (CI₅₀) calculada a partir da curva dose-resposta. ^b Média ± erro padrão da média da citotoxicidade máxima em triplicata. Os valores de efeito máximo foram considerados significantes quando * p <0,05, ** p <0,01, e *** p <0,001 comparados com o grupo DMSO 0.1%; NA: Não apresentou citotoxicidade máxima até a concentração de 100 µg/mL comparado com o grupo DMSO.

Destas as mais tóxicas são: Extrato etanólico bruto que em 55 ± 0 µg/L que foi letal para 100% dos macrófagos. Raltegravir em 32,4 ± 1,8 µg/L letal para 100% das células de macrófagos. Ácido gálico em 19,8 ± 0,2 µg/L letal para 100% das células. Atazanavir em 61,7 ± 1,5 µg/L letal para 86,0 ± 4,3% das células de macrófagos. Fração clorofórmica em 56 ± 0,6 µg/L letal para 97,7 ± 2,1 % das células de macrófagos.

As amostras: Subfração acetanólica água de lavagem compostos ácidos, subfração clorofórmica água ácidos, subfração clorofórmica emulsão ácidos são

pouco tóxicas por isso não tiveram CI_{50} calculado, pois apresentaram toxicidade máxima (%) menor que 50%.

Vale destacar que o veículo utilizado para solubilizar todas as substâncias (DMSO 0,1%) não apresentou efeito tóxico significativo para a célula (dados não mostrados), quando comparado ao controle negativo (células cultivadas apenas em meio de cultura). Desta forma, a toxicidade das substâncias não pode ser atribuída a presença de DMSO na cultura.

Verifica-se com os resultados que a toxicidade de uma substância é um evento complexo que pode causar danos celulares, promover efeitos fisiológicos e sistêmicos. A citotoxicidade de uma substância refere-se à sua capacidade de induzir a morte celular. Pode ser utilizado também para definir concentrações ideais de substâncias, refletindo na investigação de suas potenciais atividades *in vitro* [35].

Dos fármacos utilizados no teste de citotoxicidade o atazanavir e o raltegravir foram os mais tóxicos. Eventos adversos associados à terapêutica vêm sendo descritos em pessoas com HIV em uso de TARV, trazendo outras demandas aos serviços responsáveis pelo cuidado integral a esses pacientes. Destaca-se a síndrome lipodistrófica do HIV, caracterizada por dislipidemias, alterações glicêmicas e alterações morfológicas com lipoatrofia e lipohipertrofia. Alguns estudos observacionais revelaram que a incidência de evento cardiovascular em pacientes infectados pelo HIV em TARV é maior do que aquela observada na população em geral [37].

São relatados na literatura ensaios de citotoxicidade da espécie *L. pacari*, utilizando outras metodologias como o teste do micronúcleo e com linhagens celulares humanas de câncer. O extrato metanólico preparado das cascas induzem as células a apoptose sobre o comportamento das linhagens celulares humanas de câncer U-937, Daudi, Jurkat, HeLa, HRT-18 e SY5Y e de células mononucleares do sangue periférico e de camundongos *in vitro* [38]. Verificou-se que a gemin D e punicalagina isoladas da *L. pacari* demonstraram relevantes efeitos antígeno-tóxico e citotóxico, indicando que eles podem ser prováveis candidatos para quimioprevenção ou desenvolvimento de novas terapias para o câncer [33].

Verificou-se também o efeito citotóxico extrato etanólico das folhas de *L. pacari* moderado em cepas bacterianas de *Salmonella typhimurium* TA98 e TA100 [36].

Foram analisados os parâmetros de afinidade de docking molecular do ácido gálico (AG), ácido elágico (AE) e punicalagina (PU) com a enzima 5TIQ pelo programa Autodock® 4.2 (Tabela 3).

Tabela 3: Parâmetros de afinidade de docking molecular do ácido gálico (AG), ácido elágico (AE) e punicalagina (PU) com a enzima 5TIQ pelo programa Autodock® 4.2.

Complexo (Proteína-ligante)	ΔG_{bind}^a (kcal/mol)	K_i^b (μM)	Aminoácidos que interagem por ponte de hidrogênio^c	Aminoácidos que fazem interação hidrofóbica^c
5TIQ/AG	-5,48	96 μM	HIS96, VAL381, LYS101	ILE382, GLY99, LEU100
5TIQ/AE	-8,01	1,34 μM	PRO236, LYS101	PHE227, LEU234, HIS235, TYR318, LEU100, LYS108
5TIQ/PU	249,41	-	ILE180, LYS103, LYS101	ILE178, VAL179, TYR181, TYR193, PHE227, VAL106, PRO226

^a Ligação de energia na melhor conformação; ^b Constante de inibição da melhor conformação. HIS (Histidina). GLI (Glicina), ILE (Isoleucina), LEU (Leucina), LYS (Lisina), PRO (Prolina), PHE (Fenilalanina), TYR (Tirosina), VAL (Valina).

A enzima 5TIQ obteve melhor parâmetro de afinidade com o ligante ácido elágico. A energia de Gibbs obtida nessa interação foi de -8,01 Kcal/mol. O AE faz ligações de hidrogênio com os resíduos PRO236, LYS102 do sítio ativo da enzima, além de interações hidrofóbicas com os resíduos PHE227, LEU234, HIS235, TYR318, LEU100, LYS108.

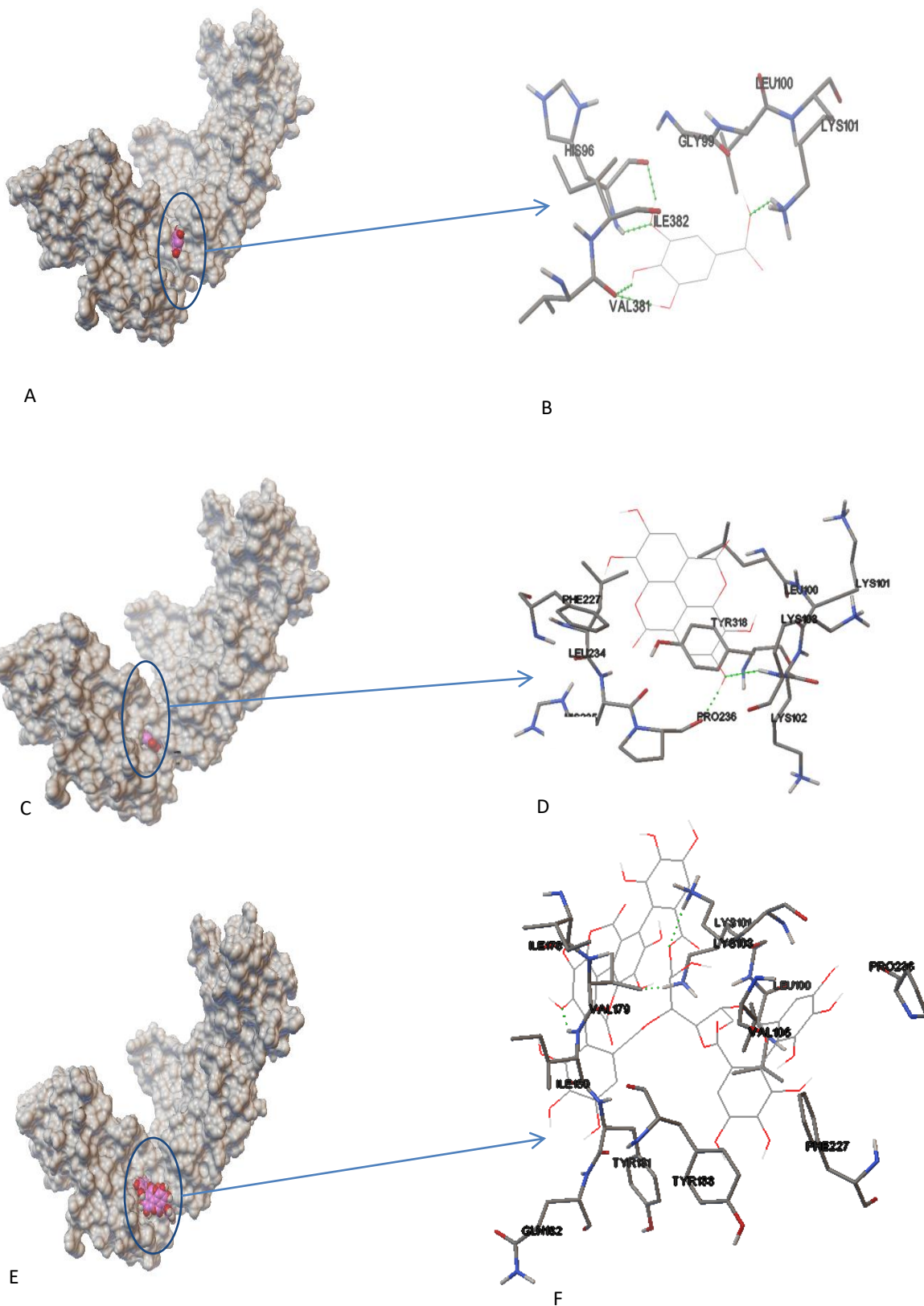
O ácido gálico mostrou-se também favorável a formar interação com a enzima 5TIQ, com energia de -5,48 Kcal/mol. Os resíduos HIS96, VAL381, LYS101 formam ligações de hidrogênio com o AG, enquanto os resíduos ILE382, GLY99, LEU100 formam ligações de Van der Waals com esse ácido.

O ligante punicalagina não se mostrou favorável a interagir com a enzima, pois a energia de Gibbs obtida é altamente positiva de 249 Kcal/mol. Nesse complexo são observadas ligações de hidrogênio da PU no sítio ativo da enzima com os resíduos de aminoácidos ILE180, LYS103, LYS101, bem como interações hidrofóbicas com os resíduos ILE178, VAL179, TYR181, TYR193, PHE227, VAL106, PRO226.

Os resultados de docking molecular mostram que os ligantes AG, AE e PU interagem dentro do mesmo sítio ativo da 5TIQ, sendo que o resíduo LYS101 forma ligação de hidrogênio com todos os ligantes, sugerindo assim que esse resíduo é

importante para a complexação do ligante no sítio ativo da enzima. O volume molecular do AE possibilita melhor interação dentro do sítio ativo, porém o grande volume molecular da PU torna esse ligante inadequado para complexação, justificando assim o valor positivo da energia de interação. Foram detectadas todas as todas as interações ocorridas dentro do sítio ativo da enzima 5TIQ com os ligantes AG, AE e PU, bem como a isosuperfície dos complexos formados (Figura 7).

Figura 7. Representação da isosuperfície dos complexos (A, C e E) e das interações dentro do sítio ativo da enzima (B, D e F): A) AG/5TIQ, B) AG/5TIQ, C) AE/5TIQ, D) AE/5TIQ, E) PU/5TIQ E F) PU/5TIQ.



Os resultados obtidos *in silico* permitem utilizar o âmbito da simulação computacional e áreas correlatas para se indicar algo ocorrido através de uma simulação computacional [20, 21].

Foram avaliados pelo PreADMET os parâmetros farmacocinéticos e de toxicidade das moléculas de ácido elágico, ácido gálico e punicalagina (Tabela 4).

Tabela 4: Parâmetros farmacocinéticos e de toxicidade avaliados pelo PreADMET.

Parâmetros	Ácido elágico	Ácido gálico	Punicalagina
BBB	0.321339	0.348084	0.0269945*
Caco-2	20,4888	13,8492	15,6233
HIA	61,39513	53,69685	0.000000
MDCK	17,2974	9,53976	0.0434156*
Solubilidade em água pura (mg/L)	922,464	72333,4	1.076e+007
Ames test	mutagênico	mutagênico	não mutagênico
Carcino Mouse	negativo	negativo	negativo
Carcino Rat	positivo	positivo	negativo
Risk Herg inhibition	baixo risco	baixo risco	baixo risco

BBB: Brain Barrier Penetration; Caco-2: epitélio intestinal; HIA: Absorção Intestinal Humana. MKCK: Madin-Darby Canino Rígido).

As análises dos dados foram iniciados pela análise dos dados pela BBB (Brain barrier penetration) que corresponde á penetração, utilizado para avaliar se os compostos passam pela barreira hematoencefálica, que funciona como uma barreira entre o sangue e o liquido cérebro-espinhal, em termos ADMET a penetração tende a ser alta quando maior que dois [19]. A barreira hematoencefálica funciona como uma barreira fisiológica que restringe a passagem da maioria dos compostos do sangue ao cérebro, tendo assim uma propriedade protetora do cérebro [20]. Nesta simulação, esse parâmetro mostrou baixa absorção desses compostos quando se passa pela barreira hematoencefálica.

A absorção de uma molécula de fármaco, proposta para administração oral, depende da extensão de transporte através das paredes do trato gastrointestinal (TGI). A absorção Intestinal Humana ou (HIA%) é mais um fator crucial que ajuda a prever a viabilidade de absorção de um medicamento através do intestino delgado [39]. Tem-se os seguintes parâmetros entre 70% e 100% (alta), entre 20% e 70% (média) e menor 20% (baixa), verificou-se que os ácidos elágico e gálico apresentaram uma absorção intestinal média e punicalagina com uma absorção muito baixa.

Outro dado de extrema importância são as permeabilidades tais como Caco-2 (epitélio intestinal) e MDCK (Madin-Darby Canino Rígido). Estes sistemas possibilitam avaliar a dissolução e a permeação de fármacos solúveis em água, prevendo sua velocidade de absorção após administração oral em humanos [40]. A velocidade e a extensão com as quais um fármaco é absorvido podem variar devido às suas características físico-químicas e fatores relacionados à desintegração e dissolução [39]. Foi possível observar a partir da simulação que em relação às permeabilidades Caco-2 os resultados apresentam um resultado médio para ambos e em termos de MDCK apresentam um valor baixo.

Segundo o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), a dissolução e a permeação intestinal do fármaco podem limitar a absorção e, conseqüentemente, a ação terapêutica [41]. A solubilidade aquosa de um fármaco é considerada alta de acordo com o SCB quanto à relação dose, se for igual ou menor que 250 mg/L. É possível observar uma boa solubilidade em ambas as moléculas analisadas.

A mutagenicidade de um fármaco tem extrema importância na sua caracterização, pois as mutações alteram o funcionamento normal e a divisão das células [42]. Os resultados obtidos denotam os ácidos gálico e elágico como mutagênicos, no entanto, testes em Carcino Mouse obtiveram resultados negativos, e o punicalagina não se apresentou como mutagênica.

Outro dado de extrema importância é o risco de doenças cardíacas que o possível fármaco possivelmente pode trazer, pois é um fato preocupante segundo Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) No Brasil, 300 mil pessoas sofrem infartos todos os anos, em 30% dos casos o ataque cardíaco é fatal [43]. Os resultados obtidos determinam o risco baixo para o ácido elágico e para o ácido gálico, já para o punicalagina apresenta como um risco incerto ou duvidoso.

O ácido elágico é um derivado dimérico do ácido gálico que se caracteriza como termodinamicamente muito estável, com caráter lipofílico conferido pelos dois anéis aromáticos e uma parte hidrofílica representada por quatro grupos fenóis, que atuam como doadores de hidrogênio, e por duas lactonas, receptoras de ligações com hidrogênio. É uma molécula promissora pela sua atividade de inibição da TR e parâmetros farmacocinéticos e de toxicidade.

Conclusão

A partir do fracionamento biodirecionado pela atividade antirretroviral verificou-se uma maior atividade nas subfrações acetanólicas. Apesar de muito ativo (73,15% de inibição da TR), o extrato etanólico bruto promoveu citotoxicidade máxima de $100 \pm 0 \mu\text{g/mL}$. Seu fracionamento biodirecionado resultou nas frações mais ativas: subfração acetanólica água lavagem ácidos que promoveu 88,82% de inibição da TR e citotoxicidade de $38,2 \pm 7,6$ até $100 \mu\text{g/L}$. Merecem destaque a subfração acetanólica neutros com 60,98% de inibição da TR e o ácido elágico com 88,61% de inibição da TR e ausência de citotoxicidade nas concentrações testadas. Verificou-se com o teste de citotoxicidade em linhagem de macrófagos que a fração clorofórmica foi mais tóxica que a fração acetanólica.

A análise do espectro J-resolvido na região aromática entre 6 e 8 ppm apresentou um grande número de simpletos, um simpleto em 7.48 e 6.93 ppm foram identificados como ácido elágico e ácido gálico respectivamente. Sugere-se ainda a partir dos experimentos um padrão de acoplamentos que sugerem a estrutura de elagitaninos ao se analisar a região aromática.

Os resultados de docking molecular mostram que os ligantes ácido gálico, ácido elágico e punicalagina interagem dentro do mesmo sítio ativo da 5TIQ. A enzima 5TIQ obteve melhor parâmetro de afinidade com o ligante ácido elágico que foi confirmado pelos espectros HSQC- ^1H - ^{13}C . O ácido gálico mostrou-se também favorável a formar interação com a enzima 5TIQ. Foi confirmado através do espectro HSQC- ^1H - ^{13}C com uma energia de -5,48 Kcal/mol.

Através da avaliação do PreADMET verificou-se que o ácido elágico como uma molécula promissora pela sua atividade de inibição da TR e parâmetros farmacocinéticos e de toxicidade.

Referências

1. Ferreira RCS, Riffel A, Sant'ana AEG. HIV: mecanismo de replicação, alvos farmacológicos e inibição por produtos derivados de plantas. *Química Nova*. 2010; 33(8):1743-55. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422010000800023>
2. Martins T, Kerr LRFS, Kendall C, Mota RMS. Cenário Epidemiológico da Infecção pelo HIV e AIDS no mundo. *Fisioterapia & Saúde Funcional*. 2014; 3(1):4-7.
3. UNAIDS. [online]. 19,5 mi estão em tratamento para HIV no mundo e mortes relacionadas à AIDS caem pela metade desde 2005, diz UNAIDS. Disponível em: <<https://unaids.org.br/2017/07/19-mi-em-tratamento-hiv-mortes-relacionadas-aids-caem-no-mundo/>>. Acesso em: 03 maio 2018.
4. Brasil. Ministério da Saúde. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para manejo da infecção pelo HIV em crianças e adolescentes. Brasília: Ministério da Saúde, 2019. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2017/protocolo-clinico-e-diretrizes-terapeuticas-para-manejo-da-infeccao-pelo-hiv-em-criancas-e>>. Acesso em:
5. Silva VS. Avaliação in sílico de novos compostos bioativos para o tratamento da Síndrome de Imunodeficiência Adquirida Humana (AIDS): potenciais inibidores da transcriptase reversa (Tr) do HIV-1 [Dissertação]. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz; 2015.
6. Yang SS, Cragg GM, Newman DJ, Bader JP. Natural product-based anti-hiv drug discovery and development facilitated by the NCI developmental therapeutics program. *Journal of Natural Products*. 2001; 64 (2):265-77. <https://doi.org/10.1021/np0003995>
7. Wang X, Morris-Natschke, SL, Lee KH. New developments in the chemistry and biology of the bioactive constituents of tanshen. *Medicinal Research Reviews*. 2007; 27(1)133-4. <https://doi.org/10.1002/med.20077>
8. Azevedo FC. A transcriptase reversa como alvo terapêutico em doenças retrovirais [dissertação]. 2013. Porto: Universidade Fernando Porto; 2013.
9. Ferreira RCS. Avaliação da atividade antirretroviral de produtos Naturais [tese]. Maceió: Universidade Federal de Alagoas; 2010.
10. Cabral PRF, PASA, MC. Mangava-brava: *Lafoensia pacari* A. St. - Hil. (Lythraceae) e a etnobotânica em Cuiabá, MT. *Biodiversidade*. 2009; 8(1):2-21.
11. Solon S, Lopes L, Sousa Jr pt, Schmeda-Hirschmann G. Free radical scavenging activity of *Lafoensia pacari*. *Journal of Ethnopharmacology*. 2000; 72(1-2):173-78. [https://doi.org/10.1016/s0378-8741\(00\)00233-6](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(00)00233-6) PMID: 10967469

12. Mundo SR, Duarte MR. Morfoanatomia foliar e cualinar de dedaleiro: *Lafoensia pacari* A St-Hil (Lythraceae). *Latin American Journal of Pharmacy*. 2007; 26(4):522-29.
13. Lima MRF, Ximenes ECPA, Luna JS, Sant'Ana AEG. The antibiotic activity of some Brazilian medicinal plants. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2006; 105(1-2):137-47. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2006000300004>
14. GALDINO, P. M. et al. Antidepressant-like effect of *Lafoensia pacari* A. St.-Hil. ethanolic extract and fractions in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 124, n. 3, p. 581-585, jul. 2009.
15. Guimarães HA, Nascimento MVM, Tavares A, Galdino PM, Paula JR, Costa EA. Effects of ethanolic extract of leaves of *Lafoensia pacari* A. St.-Hil., Lythraceae (*pacari*), in pain and inflammation models. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2010; 20(3):328-33. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2010000300007>
16. Sonaglio D, Ortega GG, Petrovick PR, Bassani VL. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. Cap. 13, p. 313-318. In: *Farmacognosia: da planta ao medicamento*, UFRGS Editora, 5ed., 2004.
17. Cogenero LS, Ide RM, Nazari AS, Sarragiotto MH, Dias Filho BP, Nakamura CV, et al. Constituintes químicos de *Alchornea glandulosa* (Euphorbiaceae). *Química Nova*. 2003; 26(6):825-27.
18. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunology Methods*. 1983; 65:55-63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4) PMID: 6606682
19. Atkins P, de Paula J. *Physical Chemistry: Eighth Edition*. Oxford University Press: Great Britain, 2006.
20. Nisha CM, Kumar A, Vimal A, Bai BM, Pal D, Kumar A. Docking and ADMET prediction of few GSK-3 inhibitors divulges 6-bromoindirubin-3-oxime as a potential inhibitor. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. 2016; 65:100-07. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2016.03.001>
21. Krishnan GS, Rajagopal V, Antony Joseph SR, Sebastian D, Savarimuthu I, Selvaraj DRN, et al. In vitro, In silico and In vivo antitumor activity of crude methanolic extract of *Tetilla dactyloides* (Carter, 1869) on DEN Induced HCC in a Rat Model. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017; 95:795-807. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.08.054>
22. Voet D, Voet JG. *Bioquímica*. 4. ed. Porto Alegre, Artmed, 2013.
23. Goodsell DS, Morris GM, Olson AJ. Automated docking of flexible ligands: applications of autodock. *Journal of Molecular Recognition*. 1996; 9(1):1-5. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1352\(199601\)9:1%3C1::AID-JMR241%3E3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1352(199601)9:1%3C1::AID-JMR241%3E3.0.CO;2-6) PMID: 8723313

24. Goodsell DS. Computational docking of biomolecular complexes with Auto-Dock. In: Golemis EA, Adams PD, editors. Protein-protein interactions: A molecular cloning manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2005.
25. Morris GM, Huey R, Olson AJ. Using AutoDock for ligand-receptor docking. In: Curr Protoc Bioinforma. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc; 2008.
26. Sanner MF. Python: a programming language for software integration and development. Journal of Molecular Graphics & Modelling. 1999; 17(1):57-61. PMID: 10660911
27. Gasteiger J, Marsili M. Iterative partial equalization of orbital electronegativity--a rapid access to atomic charges. Tetrahedron, v. 36, n. 22, p. 3219-3228, 1980. [https://doi.org/10.1016/0040-4020\(80\)80168-2](https://doi.org/10.1016/0040-4020(80)80168-2)
28. Morris GM, Goodsell DS, Halliday RS, Huey R, Hart WE, Belew RK, et al. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. Journal of Computational Chemistry. 1998; 19(14):1639-62. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(19981115\)19:14%3C1639::AID-JCC10%3E3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(19981115)19:14%3C1639::AID-JCC10%3E3.0.CO;2-B)
29. Solis FJ, Wets RJB. Minimization by random search techniques. Math Oper Res. 1981; 6:19-30.
30. Ramos RM, Perez JM, Baptista LA, de Amorim HL. Interaction of wild type, G68R and L125M isoforms of the arylamine-N-acetyltransferase from Mycobacterium tuberculosis with isoniazid: a computational study on a new possible mechanism of resistance. Journal of Molecular Modeling. 2012; 18(9):4013-24. <https://doi.org/10.1007/s00894-012-1383-6> PMID: 22460521
31. Firmo WCA, Miranda MV, Coutinho GSL, Barboza JR, Alves LPL, Olea RSG. Determinação de compostos fenólicos e avaliação da atividade antioxidante de Lafoensia pacari (Lythraceae). Revista Eletrônica de Farmácia. 2015; 12(1):1-10. <https://doi.org/10.5216/ref.v12i1.24645>
32. Doig AJ, Williams DH, Oelrichs PB, Lubomir B. Isolation and structure elucidation of punicalagin, a toxic hydrolysable tannin, from Terminalia oblongata. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1. 1990; (8):2317-21. <https://doi.org/10.1039/P19900002317>
33. Carneiro CC. Avaliação das atividades genotóxica, antigenotóxica, citotóxica, anticitotóxica, angiogênica e antiangiogênica de elagitaninos utilizando ensaios in vitro e in vivo [tese]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás; 2016.
34. Sampaio BL. Influência dos fatores ambientais sobre a concentração de compostos fenólicos nas folhas e na casca do caule de Lafoensia pacari A. St.-Hil. (Lythraceae) [dissertação]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás; 2010.
35. Costa EV. Perfil do ácido elágico na produção de pasta kraft de E. globulus [dissertação]. Aveiro: Universidade de Aveiro; 2008.

36. Lima DC. Avaliação das atividades genotóxica e antigenotóxica do extrato etanólico de *Lafoensia pacari* A. St-Hil em bactérias e camundongos [dissertação]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás; 2012.
37. Almeida LB, Giudici KV, Jaime, PC. Consumo alimentar e dislipidemia decorrente da terapia antirretroviral combinada par ainfecção pelo HIV: uma revisão sistemática. *Arquivos Brasileiros Endócrino Metabologia*. 2009; 53(5):519-27. <http://dx.doi.org/10.1590/S0004-27302009000500005>
38. Marcondes DBS. Indução de apoptose pelo extrato e frações de *Lafoensia pacari* A. St.-Hil, Lythraceae, em células tumorais. 2013. 98 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.
39. Souza J, Freitas ZMF, Storpirtis S. Modelos in vitro para determinação da absorção de fármacos e previsão da relação dissolução/absorção. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 2007; 43(4):515-27. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-93322007000400004>
40. Kobayashi M, Sada N, Sugawara M, Iseki K, Miyazaki K. Development of a new system for prediction of drug absorption that takes into account drug dissolution and pH change in the gastro-intestinal tract. *International Journal of Pharmaceutics*. 2001; 221(1-2):87-94. [https://doi.org/10.1016/s0378-5173\(01\)00663-9](https://doi.org/10.1016/s0378-5173(01)00663-9)
41. Gonçalves JE, Storpirtis S. O Sistema de Classificação Biofarmacêutica: Conceitos, Determinação da Solubilidade e Permeabilidade e Aplicações na Área Farmacêutica – In: VIEIRA e CAMPOS, Manual de Bioequivalência – Série Pesquisa Clínica – Ed Dendrix, 2011; 137-169.
42. Fischer S, Startz R, Sherwood L, Woolverton C; Willey J. Prescott's Microbiology. Edição: McGraw-Hill QDR, 2010.
43. Brasil. MINISTÉRIO DA SAÚDE, OMS. Relatório mundial de saúde, 2006: trabalhando juntos pela saúde. Brasília, DF: 2007.

4.3 ANÁLISE MULTIVARIADA NO ESTUDO DA COMPOSIÇÃO FENÓLICA E PERFIL ANTIOXIDANTE DA ESPÉCIE *Lafoensia pacari* Saint-Hilaire

Fonseca S. A.¹, Silva S. M. A.², Xavier J. A.², Cunha A.L.³,
Santos A. F.^{1,3} and Santana AEG⁴

¹Centro Universitário Cesmac, Rua Cônego Machado, 918, Farol, 57051-160, Maceió, AL, Brasil.

²Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Av. Lourival Melo Mota, s/n, Tabuleiro do Martins, 57072-970, Maceió, AL, Brasil.

³Universidade Estadual de Alagoas, R. Gov. Luís Cavalcante, s/n, Alto do Cruzeiro, 57312-000, Arapiraca, AL, Brasil.

⁴Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Alagoas, BR 104, Km 85, s/n, Rio Largo, AL, Brasil.

A espécie *Lafoensia pacari* A. St.-Hil. (Lythraceae), conhecida popularmente como pacarí, mangava-brava, ou dedaleiro, tem sido utilizada na medicina popular como cicatrizante, antineoplásico, no combate à gastrite e úlcera, como antidepressivo e imunostimulante. Tendo em vista as atividades biológicas da *L. pacari* ressalta-se a importância do estudo fitoquímico desta espécie a partir da obtenção de suas frações e subfrações e identificação dos seus constituintes químicos bioativos, visando a análise multivariada no estudo da composição fenólica e perfil antioxidante. Trata-se de um estudo experimental *in vitro* e a metodologia envolve preparo do material vegetal, obtenção do extrato etanólico, fracionamento, purificação, extração ácido-base, testes de atividade antioxidante, identificação e quantificação de compostos fenólicos das frações e subfrações; e análise multivariada no estudo da composição fenólica e perfil antioxidante da espécie da espécie *L. pacari*. Na triagem fitoquímica do extrato etanólico bruto da *L. pacari* foram detectados fenóis, taninos, flavonoides, triterpenos e saponinas. Com base na distância Euclidiana média padronizada, considerando compostos fenólicos, flavonoides, DPPH, ABTS e FRAP, verificou-se a formação de três grupos nos agrupamentos formados entre as 17 amostras analisadas, sendo o primeiro formado por quinze amostras e o segundo e o terceiro constituído por uma única amostra, cada um. A amostra subfração acetanólica insolúvel água compostos ácidos apresentou o melhor desempenho nas variáveis analisadas, com os melhores resultados para compostos fenólicos, flavonoides e ABTS. A amostra subfração acetato água lavagem básicos apresentou o pior desempenho. As variáveis que mais contribuíram para diferenciar as amostras em três grupos foram os compostos fenólicos (29,40%) flavonoides (27,90%) e DPPH (22,10%). A análise cromatográfica das amostras permitiu pela primeira vez a identificação e quantificação, dos compostos fenólicos: ácido gálico, catecol, ácido clorogênico, ácido vanílico, ácido caféico, vanilina, seringaldeído, ácido salicílico, ácido cumárico, cumarina, rutina, quercetina e Kaempferol. Verificou-se que com exceção do ácido clorogênico, ácido vanílico, ácido caféico e cumarina, as amostras apresentaram diferença significativa para as demais variáveis. Vale destacar o desempenho da amostra *L. pacari* fração CHCl₃ compostos neutros que apresentou valores médios elevados para catecol, vanilina, ácido salicílico, quercetina e Kaempferol. A identificação e quantificação dos compostos fenólicos; quantificação dos teores de fenólicos totais e flavonoides, análise multivariada no estudo da composição fenólica e perfil antioxidante demonstraram o potencial antioxidante da espécie *L.pacari*.

PALAVRAS-CHAVE: Isolamento biodirecionado. Antioxidante. Cromatografia.

The species *Lafoensia pacari* A. St.-Hil. (Lythraceae), popularly known as pacarí, mangava-brava, or dedaleiro, has been used in folk medicine as healing, antineoplastic, in the fight against gastritis and ulcer, as antidepressant and immunostimulant. Given the biological activities of *L. pacari*, the importance of the phytochemical study of this species is emphasized by obtaining its fractions and subfractions and identifying its bioactive chemical constituents, aiming at multivariate analysis in the study of phenolic composition and antioxidant profile. This is an *in vitro* experimental study and the methodology involves preparation of plant material, obtaining ethanolic extract, fractionation, purification, acid-base extraction, antioxidant activity tests, identification and quantification of phenolic compounds of fractions and subfractions; and multivariate analysis in the study of phenolic

composition and antioxidant profile of *L. pacari* species. Phytochemical screening of crude ethanolic extract of *L. pacari* detected phenols, tannins, flavonoids, triterpenes and saponins. Based on the standardized average Euclidean distance, considering phenolic compounds, flavonoids, DPPH, ABTS and FRAP, three groups were formed in the groupings formed among the 17 samples analyzed, the first consisting of fifteen samples and the second and third consisting of a single sample each. The sample insoluble water insoluble acid compounds subfraction presented the best performance in the analyzed variables, with the best results for phenolic compounds, flavonoids and ABTS. The subfraction acetate basic water wash sample showed the worst performance. The variables that most contributed to differentiate the samples in three groups were the phenolic compounds (29.40%) flavonoids (27.90%) and DPPH (22.10%). The chromatographic analysis of the samples allowed for the first time the identification and quantification of the phenolic compounds: gallic acid, catechol, chlorogenic acid, vanillic acid, caffeic acid, vanillin, syringaldehyde, salicylic acid, coumarin acid, coumarin, rutin, quercetin and Kaempferol. Except for chlorogenic acid, vanillic acid, caffeic acid and coumarin, the samples showed significant differences for the other variables. It is worth highlighting the performance of the sample *L. pacari* fraction CHCl₃ neutral compounds that presented high average values for catechol, vanillin, salicylic acid, quercetin and Kaempferol. The identification and quantification of phenolic compounds; quantification of total phenolics and flavonoids contents, multivariate analysis in the study of phenolic composition and antioxidant profile demonstrated the antioxidant potential of *L. pacari* species.

KEY WORDS: Biologically isolated. Antioxidant. Chromatography.

1. INTRODUÇÃO

O homem sempre buscou através dos recursos naturais melhorar suas condições de sobrevivência. As plantas medicinais são utilizadas pelo homem desde o início de sua história, muito antes do surgimento da escrita a humanidade já utilizava ervas para fins medicinais. Atualmente, as plantas medicinais são utilizadas por grande parte da população mundial, devido a sua composição química são utilizadas como recurso medicinal alternativo para o tratamento de diversas enfermidades, uma vez que em muitas comunidades, representam um recurso mais acessível em relação aos medicamentos alopáticos [1, 2].

Os compostos químicos das plantas podem ser divididos em duas classes: metabólitos primários e metabólitos secundários. O metabolismo é caracterizado por transformações das moléculas orgânicas, catalisadas por enzimas, suprindo o organismo de energia. Além do metabolismo primário, responsável pela síntese de celulose, lignina, proteínas, lipídeos, açúcares e outras substâncias importantes para a realização das funções vitais, as plantas também apresentam o chamado metabolismo secundário [3].

Dentre os metabólitos secundários, encontram-se os compostos fenólicos, cuja molécula é caracterizada pela presença de um anel benzênico, um grupamento carboxílico e uma ou mais hidroxilas e/ou metoxilas; conhecidos por suas propriedades antioxidantes, essas substâncias podem bloquear a oxidação de

diversos substratos podendo agir na inibição da formação de radicais livres ou na eliminação de radicais importantes na etapa da propagação [4]. As espécies vegetais que possuem fontes significativas de compostos fenólicos apresentam potencial antioxidante [5].

Os antioxidantes são importantes para o combate aos radicais livres. As espécies reativas de oxigênio (EROs) são radicais livres, cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio e que podem atuar na tradução e transcrição gênica e na regulação da atividade guanilato ciclase nas células, peroxidação dos lipídios de membrana e danos a proteínas dos tecidos e das membranas, esse desequilíbrio pode ser desencadeado por diversos fatores, como predisposição genética, radiação ultravioleta e propriedades intrínsecas [6].

A síntese de radicais livres no ser humano pode ser controlada por antioxidantes, que podem ser de origem endógena ou provenientes da dieta alimentar. A partir da década de 80, doenças como enfisema pulmonar, doenças crônicas, cardiovasculares, doenças inflamatórias, câncer, formação de ateroma e aterosclerose foram relacionadas com os radicais livres [7].

Dentre as espécies utilizadas na medicina popular destaca-se a espécie *Lafoensia pacari* A. St.-Hil. (Lythraceae). A família Lythraceae compreende 22 gêneros amplamente distribuídos nos trópicos e subtropicais, embora alcancem as zonas moderadas. Geralmente vivem em áreas úmidas de costas fluviais, sendo o gênero *Lafoensia* sp. restrito ao continente Sul Americano. Esta família está representada por uma média de 500 espécies, dentre as quais se destaca a *Lafoensia pacari*, com distribuição no Brasil e no Paraguai [8].

A espécie conhecida popularmente como Pacarí, Mangava-brava, ou Dedaleiro, tem sido utilizada na medicina popular como cicatrizante, antineoplásico, no combate à gastrite e úlcera, como antidepressivo [9], tratamento de úlceras gástricas [10], e como imunoestimulante [11, 12]. A espécie também já foi relatada por sua atividade sequestradora de radicais livres [13], atividade antibacteriana e atividade anti-inflamatória [14].

Dentre os principais compostos químicos da *L. pacari* estão fenóis, taninos, flavonoides, esteróides, triterpenos, quinonas, alcaloides e saponinas [12,9]. Existem muitos relatos de atividade anti-HIV e antioxidante de flavonoides [15, 16], taninos [16], triterpenos [17] e alcaloides [15], o que reforça os resultados encontrados com

os extratos da *L. pacari* e estimula estudos que visem a identificação de seus componentes bioativos.

Tendo em vista as atividades biológicas da *L. pacari* ressalta-se a importância do estudo fitoquímico desta espécie a partir da obtenção de suas frações e subfrações, visando a avaliação da atividade antioxidante e identificação dos seus constituintes químicos bioativos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Coleta e obtenção do extrato vegetal

A coleta das cascas do caule de *Lafoensia pacari* foi realizada no estado de Goiás no ano de 2007. E identificada com o número de registro 3535 no herbário da Universidade de Brasília (UnB). O extrato etanólico das cascas do caule de *L. pacari* foi preparado através do método de percolação. Esse procedimento foi repetido até extração exaustiva do material vegetal.

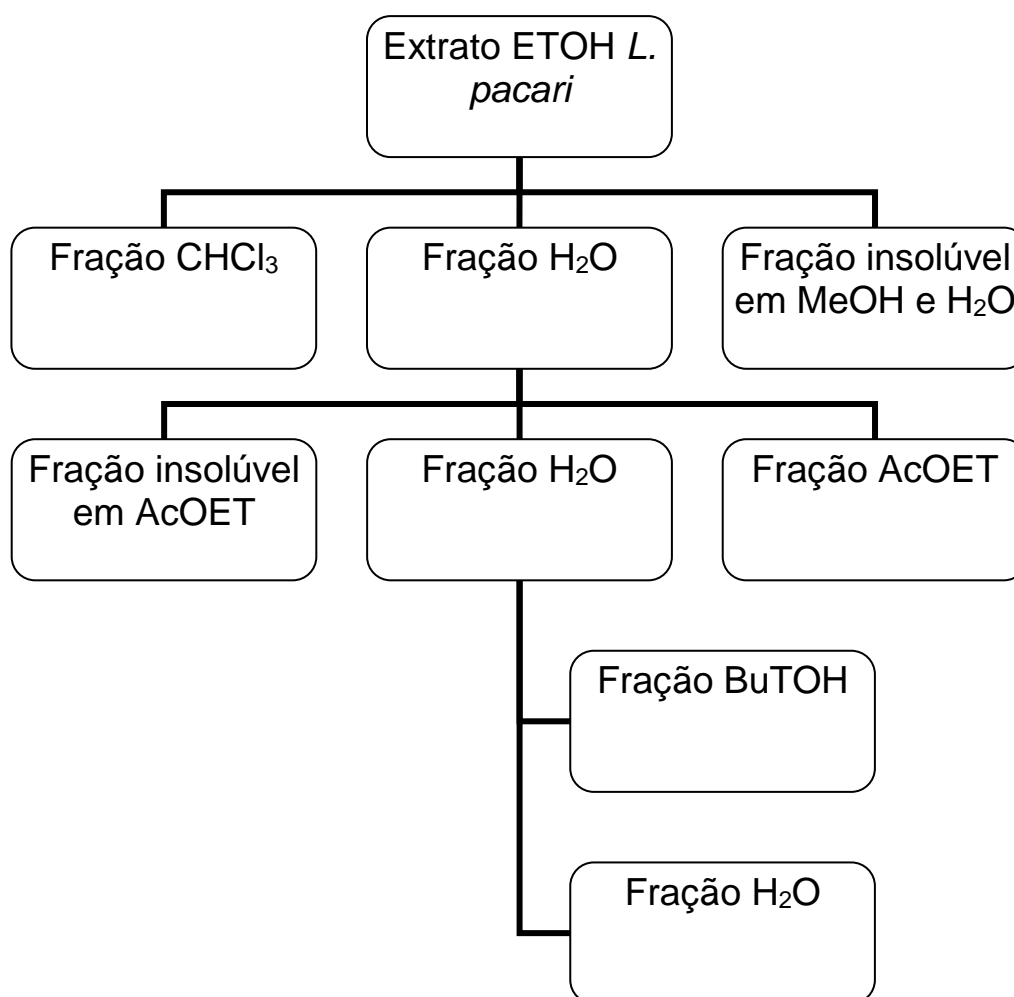
A amostra líquida obtida foi então submetida à concentração em evaporador rotatório sob pressão reduzida até a obtenção do extrato etanólico bruto (EEB) [18].

Métodos de Fracionamento e Purificação

Foi realizada a extração líquido-líquido para separação dos compostos. O extrato etanólico bruto (EEB) das cascas do caule de *L. pacari* foi solubilizado em água e metanol (MeOH:H₂O 8:2) e fracionado através do método de extração líquido-líquido (ELL), utilizando os solventes em ordem crescente de polaridade: clorofórmio (CHCl₃), acetato de etila (AcOET) e butanol (BuTOH).

Inicialmente foi adicionado ao EEB uma solução de MeOH:H₂O na proporção de 8:2 e depois CHCl₃. Após separação da fração clorofórmica, na fração hidrometanólica proveniente desta primeira separação foi adicionado AcOET. Após a separação da fração acetanólica, foi adicionado BuTOH a fração hidrometanólica resultante. Todas as frações (Fluxograma 1) foram concentradas em rotaevaporador e submetidas a quantificação de fenóis totais e flavonoides e aos ensaios antioxidantes.

Fluxograma 1. Frações obtidas através da ELL do EEB da *L. pacari*.



Extração ácido-base (EAB)

As frações bioativas foram separadamente submetidas ao processo de extração ácido-base (EAB), utilizando as soluções de ácido clorídrico (HCl) a 0,1 M e hidróxido de sódio (NaOH) a 0,1 M, além do solvente clorofórmio P. A. (COGENERO et al., 2003) [19].

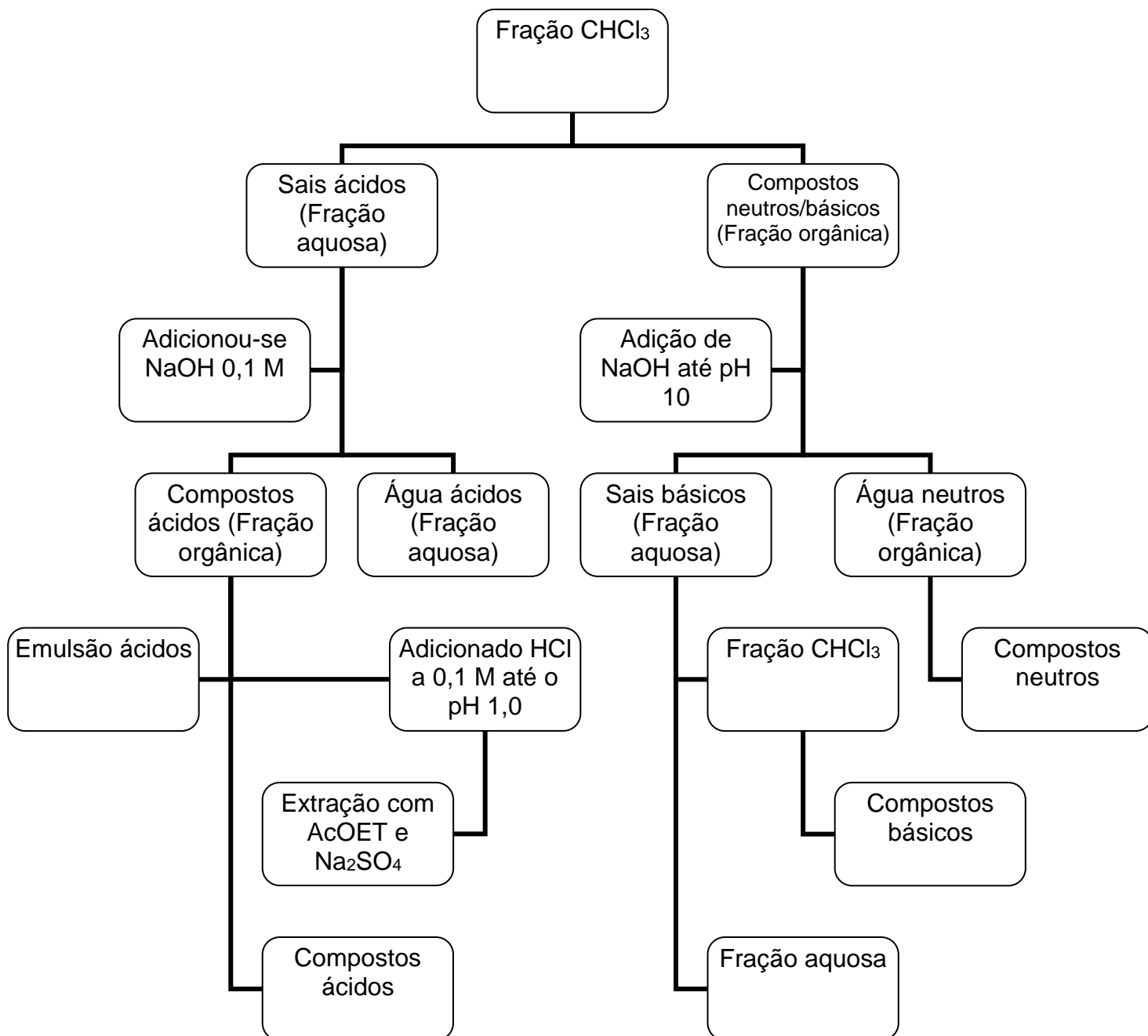
A fração CHCl_3 foi solubilizada em CHCl_3 e adicionada à solução aquosa de NaOH 0,1 M, o que possibilitou a obtenção da fração de sais ácidos (fração aquosa) e da fração de compostos básicos e neutros (fração clorofórmica). À fração de sais ácidos foi adicionado HCl a 0,1 M até o pH 1,0 restaurando o caráter ácido dos compostos. Estes compostos foram extraídos com AcOET e secos com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), resultando nas frações compostos ácidos e emulsão ácidos (Fluxograma 2).

A fração CHCl_3 neutros e básicos foi tratada com de HCl a 0,1M, que possibilitou a extração dos seus sais básicos (fração aquosa). A esses foi adicionado NaOH até ter um pH 10 e solução de CHCl_3 . Na fração orgânica obteve-se os compostos básicos, após ser lavada com água e seca com Na_2SO_4 . A fração água neutros foi logo lavada com água e seca com Na_2SO_4 para dar origem aos compostos neutros (Fluxograma 2). Todas as subfrações foram concentradas em rotaevaporador.

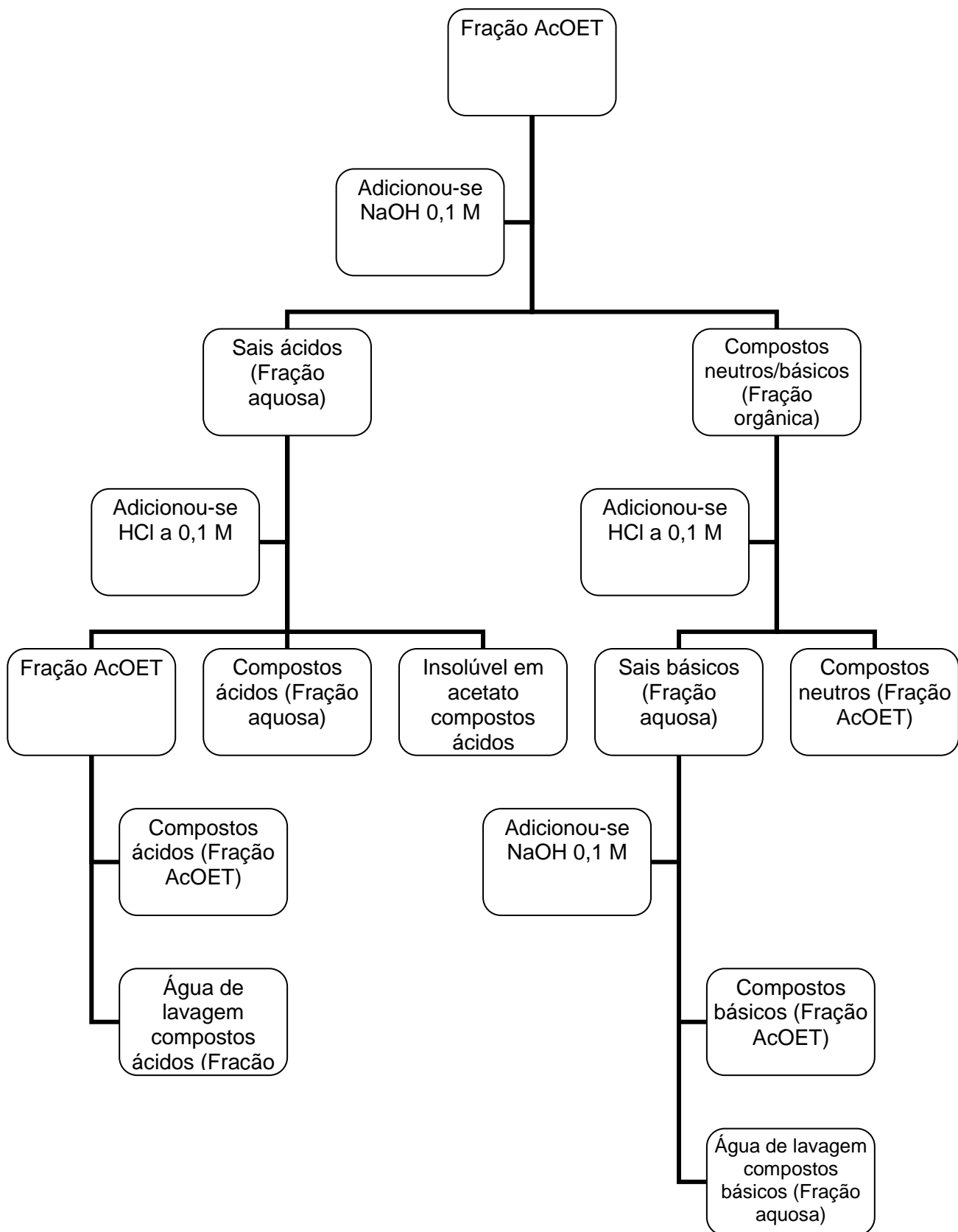
A fração AcOET foi solubilizada com MeOH e foi adicionado NaOH a 0,1 M, formando sais ácidos (fração aquosa) que posteriormente foram tratados com HCl a 0,1 M, restaurando seu caráter ácido, e AcOET, obtendo seus compostos ácidos (fração aquosa), compostos ácidos insolúvel em AcOET e H_2O e fração AcOET, que foi lavada com água e seca com Na_2SO_4 dando origem aos compostos ácidos (fração AcOET) e H_2O de lavagem compostos ácidos (fração aquosa) (Fluxograma 3).

A fração AcOET básicos e neutros foi tratada com HCl a 0,1M, e obteve-se os compostos neutros (fração AcOET) e sais básicos (fração aquosa), estes sais foram tratados com NaOH a 0,1 M, restaurando o caráter básico de seus compostos, e AcOET, gerando seus compostos básicos (fração AcOET) e H_2O de lavagem compostos básicos (fração aquosa) (Fluxograma 3). Todas as subfrações obtidas foram concentradas em rotaevaporador.

Fluxograma 2. Subfrações obtidas a partir da EAB da fração CHCl_3 .



Fluxograma 3 - Subfrações obtidas a partir da EAB da fração AcOET.



Prospecção dos constituintes químicos

Para a realização da etapa de triagem fitoquímica tomou-se como base a metodologia proposta por Matos (1997) [20] com algumas adaptações a fim de realizar prospecção dos seguintes aleloquímicos: fenóis, taninos pirógalicos, taninos flobafênicos, antocianina e antocianidina, flavonas, flavonóis, xantonas, chalconas, auronas, flavononois, leucoantocianidinas, catequinas, flavononas, flavonois, xantonas, esteróides, triterpenóides e saponinas.

Quantificação de compostos fenólicos

A realização do teste para quantificar o teor de fenóis total, teve como adaptação a técnica de Cohen et al. (2008); Souza, Vieira e Putti (2018) [21, 22] usando o método de Folin e tendo o ácido gálico como padrão no teste. Foi preparada a solução aquosa de Carbonato de Sódio (Na_2CO_3) a 7,5% (P/V), solução aquosa de Folin Ciocalteau (Folin) 1:11 (V/V) e solução metanólica de ácido gálico na concentração de 2mg/mL para determinação da curva de calibração, usando as seguintes concentrações: 0,1, 0,075, 0,06, 0,045, 0,025, 0,015, 0,01 e 0,005mg/mL. Foram adicionados em ependorf para cada concentração em quadruplicata 100 μL da solução teste de ácido gálico, 500 μL da solução aquosa de Folin 1:11 (V/V) e 400 μL da solução metanólica de Na_2CO_3 a 7,5% (P/V). Logo após agitou-se no aparelho vórtex por 30 segundos, e transferiu-se 250 μL de cada ependorf para a microplaca. Um branco foi feito pela adição de 100 μL do solvente MeOH, 500 μL da solução aquosa de Folin 1:11 (V/V) e 400 μL da solução aquosa de Na_2CO_3 a 7,5 % (P/V). Manteve-se por um período de 2 horas no escuro e após esse tempo, fez-se a leitura a 740nm, construindo a curva em relação às absorvâncias e às concentrações de ácido gálico.

Cada amostra foi analisada em quadruplicata onde adicionou-se em cada ependorf 100 μL de solução teste da amostra, 500 μL da solução aquosa de Folin 1:11 (V/V) e 400 μL da solução metanólica de Na_2CO_3 a 7,5 % (P/V), utilizando o branco do solvente MeOH. Logo após agitou-se no aparelho vortex por 30 segundos e transferiu 250 μL de cada ependorf para seu determinado poço da microplaca.

Manteve-se a placa em escuro por 2 horas e logo após foi realizada leitura no espectrofotômetro a 740nm [23].

O reagente de Folin-Ciocalteu consiste na mistura dos ácidos fosfomolibídico e fosfotungstístico, no qual o molibdênio e o tungstênio encontram-se no estado de oxidação 6⁺ porém, em presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se os chamados molibdênio azul e tungstênio azul, nos quais a média do estado de oxidação dos metais está entre 5 e 6 e cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras [24].

O teor de fenóis totais foi determinado através das médias das absorvâncias das amostras e da curva do ácido gálico, expressos como miligramas (mg) de equivalente de ácido gálico por mg do extrato, utilizando a equação da reta: $y=ax+b$, onde:

y = absorvância da amostra.

x = concentração de ácido gálico ou teor de fenóis totais expressos em mg de EAG/g do extrato.

Quantificação de flavonoides

Para realização da quantificação de flavonoides, foi adaptada a técnica de Godoy et al. (2013); Ferreira, et al., (2016) [25. 26], usando a quercetina como padrão. Foi preparada uma solução metanólica de cloreto de alumínio a 2% (P/V) e de quercetina na concentração de 1mg/mL. Para determinação da curva de calibração de quercetina, foram utilizadas as concentrações de 0,03, 0,025, 0,020, 0,015, 0,01, 0,005, 0,0025, 0,00125 mg/mL. Adicionou-se em cada poço da microplaca 200 μ L da solução teste de quercetina, sendo em quadruplicata para cada concentração, e 100 μ L da solução metanólica de cloreto de alumínio a 2% de cada concentração obtida. Foi feito um branco adicionando 200 μ L do solvente MEOH e 100 μ L da solução metanólica de cloreto de alumínio a 2%. Construiu-se a curva em relação às absorvâncias e as concentrações de quercetina.

Para determinação do teor de flavonoides em cada amostra foi pesado 1mg de cada fração e subfração, obtendo a concentração de 1mg/mL. Para cada amostra foi analisada em quadruplicata onde adicionou-se em cada poço da microplaca

200µL de solução teste da amostra e 100 µL da solução metanólica de cloreto de alumínio a 2%, e utilizando o solvente MeOH como branco. A placa foi mantida no escuro por 30 minutos e logo após foi realizada leitura no espectrofotômetro a 420nm.

O teor de flavonoides foi expresso em miligramas EQ (equivalente de quercertina) por grama do extrato, determinando de acordo com o resultado da média das absorbâncias das amostras e pela curva de calibração do ácido gálico.

Desenvolvidos a partir da equação da reta: $y=ax+b$, como nos outros testes, onde:

y = absorbância da amostra.

x = concentração de flavonoides, expresso em mg de EQ/g do extrato.

Determinação da atividade antioxidante

As frações e subfrações obtidas através da ELL e da EAB foram submetidas aos testes qualitativos para determinação da atividade antioxidante, frente à captura dos radicais livres de DPPH e ABTS e ao método de redução dos íons de ferro FRAP.

Determinação da Atividade Antioxidante Total pela Captura do Radical DPPH

A técnica foi adaptada por Rufino et al. (2007a); [27, 28] A partir da obtenção das frações pela ELL e EAB foram pesados 1 mg de cada fração e subfração, estas respectivamente foram diluídas cada uma em 1 mL de MeOH, assim foram formadas soluções de cada fração na concentração de 1 mg/mL.

Para realização do teste preparou-se uma solução metanólica de DPPH a 0,208 mM. Para leitura no leitor de microplaca, foi adicionado em cada poço da microplaca 100 µL da solução do ependorf de cada amostra e 100 µL de DPPH 0,208 mM. Um controle foi feito pela adição de 100 µL de DPPH 0,208 mM e 100 µL de MeOH, e um branco foi feito pela adição apenas de 200 µL do solvente MeOH. Após a adição do DPPH esperou-se 40 minutos e aconteceram as leituras das absorbâncias das soluções em quaduplicata no espectrofotômetro a 518nm.

Para determinação da curva padrão preparou-se uma solução metanólica de Trolox a 5.10^3 M. Em seguida, foram preparadas diluições dessa solução para

obtenção de diferentes concentrações 400, 200, 100, 70, 50, 40, 30, 20 e 10 μM . Para cada ependorf foi colocado 490 μL do solvente e 10 μL da solução Trolox, transferindo para cada poço da microplaca 100 μL e adicionando mais 100 μL da solução de DPPH. Foram feitas as leituras das absorvâncias das soluções, em quadruplicata a 518nm, utilizando-se o solvente MeOH como branco. O teor de redução do radical DPPH foi determinado através das médias das absorvâncias das amostras e contra a curva de Trolox e expressos como μmol equivalente de Trolox por grama de extrato seco, utilizando a equação da reta: $y=ax+b$, onde:

y = absorvância da amostra.

x = concentração de Trolox ou teor de redução do radical DPPH expressos em μmol eq.Trolox/ g de extrato seco.

A partir dos resultados obtidos determina-se a porcentagem de atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres. A molécula de DPPH é caracterizada como um radical livre estável em virtude da deslocalização do elétron desemparelhado por toda a molécula. Esta deslocalização confere a esta molécula uma coloração púrpura, caracterizada por uma banda de absorção em etanol em cerca de 520 nm [29].

Determinação da Atividade Antioxidante pela Captura do Radical Livre ABTS

O ABTS apresenta elevada solubilidade em água e estabilidade química. É um ensaio colorimétrico, com máxima absorção a 342 nm, cujo radical ABTS descolorem na presença de antioxidantes (BACH, 2017) [30].

A técnica foi adaptada de Rufino et al. (2007b); (LUCAS-GONZÁLEZ et al., 2018) [31, 32]. A partir das amostras provenientes das ELL e EAB, foram pesados 1mg de cada fração e subfração e diluídas em 1mL de metanol, formando para cada amostra uma concentração de 1 mg/mL.

Para a obtenção do radical ABTS (2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) foi utilizado uma solução estoque de ABTS a 7 mM e uma solução de persulfato de potássio a 140 mM, este foi preparado a partir de 5 mL da solução estoque de ABTS e 88 μL da solução de persulfato de potássio, mantendo esta mistura no escuro, à temperatura ambiente, por 16 horas antes da realização do

teste. Para o radical ABTS ser utilizado, a mistura foi diluída em álcool etílico até que sua absorvância marcasse 0,70 na leitura de 734 nm.

Obteve-se uma curva padrão a partir do padrão Trolox, utilizando uma solução estoque de Trolox a 4000 μM e metanol como solvente. Foram feitas diferentes concentrações: 2500, 2000, 1500, 1000, 500, 200 e 100 μM . Após as diluições, estas foram transferidas para ependorf individualmente, na medida de 10 μL e foi incluído 990 μL do radical ABTS preparado, formando quadruplicatas. Estas foram homogeneizadas em agitador de tubos e transferidas a microplaca no volume de 250 μL em quadruplicata para cada amostra, e foi realizada a leitura no espectrofotômetro, após 6 minutos a 734 nm.

Após realizada a curva, as amostras foram também transferidas para ependorf, em quadruplicatas, no volume de 10 μL e foi adicionado 990 μL do radical ABTS. Foi mais uma vez homogeneizado no agitador de tubos. Por fim, transferidos 250 μL de cada amostra em quadruplicata para a microplaca e após 6 minutos realizada a leitura a 734 nm.

O teor de captura do radical ABTS é determinado através das médias das absorvâncias das amostras e contra a curva de Trolox e expressos como μM de Trolox por g de extrato, utilizando a equação da reta: $y=ax+b$, onde:

y = absorvância da amostra.

x = concentração de Trolox ou teor de captura do radical ABTS expressos em μM de Trolox/ g de extrato.

Determinação da Atividade Antioxidante Total Pelo Método de Redução do Ferro – FRAP

Para determinação da atividade antioxidante por meio da redução do ferro (FRAP) foi adaptada a técnica de Rufino et al. (2006) [33]; Ferreira, et al., (2016) [26]. Foi preparada uma solução de HCL à 40 Mm, solução de 2,4,6 Tripyridyl-s-Triazine (TPTZ) à 10mM, solução de Cloreto Férrico (FeCl_3) à 20 mM e tampão acetato à 0,3 M (pH 3,6). O reagente FRAP foi preparado no momento da análise, através da mistura de 25mL de tampão acetato (0,3 M, pH 3,6), 2,5 mL da solução TPTZ (10 mM TPTZ em 40 mM HCl) e 2,5mL de FeCl_3 (20 mM) em solução aquosa.

Para a curva de calibração foi feita uma solução de Trolox à 2 mM nas concentrações 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 e 10 μM . Adicionou-se em cada ependorf em quadruplicata para cada amostra, 30 μL da solução de Trolox à 2 mM, 90 μL de água destilada e 900 μL da solução do reagente FRAP, agitou-se por 30 segundos, e logo após foi transferido, de cada ependorf para seu respectivo poço na microplaca 250 μL . Manteve-se por um período de 30 minutos no escuro e foi realizada a leitura das absorbâncias das soluções, em quadruplicata, no espectrofotômetro a 595 nm. Foi feito um branco adicionando 30 μL do solvente MeOH, 90 μL de água destilada e 900 μL da solução do reagente FRAP. A curva foi construída relacionando a concentração da solução de Trolox e o valor médio das absorbâncias.

A partir das frações e subfrações foi retirada uma alíquota de 1 mg de cada e solubilizada em 1 mL de MeOH obtendo-se a concentração de 1 mg/mL. Em ependorf foi adicionado 30 μL da solução da amostra, oriunda das frações e subfrações obtidas, 90 μL de água destilada e 900 μL da solução do reagente FRAP, agitando no vortex por 30 segundos. Logo em seguida, adicionou-se em cada poço da microplaca 200 μL , em quadruplicata e usando-se o solvente MeOH como branco. Esperou-se 30 minutos, mantendo a placa em escuro, e depois foi realizada a leitura a 595nm.

O método do FRAP é caracterizado pela redução do complexo entre o Fe^{3+} e a tripiridiltriazina (Fe^{3+} - TPTZ), para (Fe^{2+} - TPTZ). Esta redução ocorre em contato com antioxidantes em meio ácido, alterando a cor da solução de amarelo para azul intenso [30].

O teor de redução dos íons de ferro por grama de Trolox por micromolar (μM) do extrato foi determinado de acordo com o resultado da média das absorbâncias das amostras e pela curva de calibração do Trolox. Desenvolvidos a partir da equação da reta: $y=ax+b$, onde:

y = absorbância da amostra.

x = concentração da redução dos íons de ferro, expresso em μM Trolox/g amostra.

Análises cromatográficas

A determinação dos compostos fenólicos foi realizada utilizando-se da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. O equipamento utilizado foi um HPLC Shimadzu, equipado com quatro bombas de alta pressão modelo LC-20AT, degaseificador modelo DGU-20A 5R, interface modelo CBM-20A, injetor automático modelo SIL-20A HT e detector modelo SPD-20A. A coluna cromatográfica empregada em ambas as análises foi uma coluna Agilent - Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 x 250 mm, 5 μ m). Foi obtido o cromatograma com detecção espectrofotométrica em 290 nm após uma injeção de 20 μ L de solução padrão dos compostos fenólicos em uma concentração de 10 mg/L. O fluxo empregado foi de 0,6 mL min⁻¹ à uma temperatura de 33°C, utilizando-se gradiente de eluição e a fase móvel composta pelas soluções: ácido fórmico 2% (A) e metanol (B)

Padrões e Reagentes

Os padrões utilizados para a análise cromatográfica dos compostos fenólicos foram o ácido gálico, catecol, ácido vanílico, ácido salicílico, vanilina, seringaldeído, ácido cumárico, ácido clorogênico, cumarina, rutina, quercetina, kaempferol, ácido cafeico. Todos os padrões foram adquiridos da Sigma-Aldrich ou AcrosOrganics. Todos os solventes utilizados para cromatografia foram de grau analítico; metanol, ácido fórmico e água ultrapura obtida de um sistema Milli-Q®.

Preparo das soluções padrões de compostos fenólicos

Para os padrões, foram preparadas soluções-estoque com concentração de 40 mg.L⁻¹ em água/álcool a 30%/70%. O método utilizado para a quantificação foi o da padronização externa. Para a construção das curvas analíticas, foram realizadas diluições de uma solução intermediária, contendo uma mistura de todos os padrões, sendo que esta foi obtida por meio da diluição das soluções-estoque previamente preparadas. Nesta solução intermediária, todos os padrões encontravam-se na concentração de 10 mg.L⁻¹. Foram utilizados como fase móvel para a eluição dos compostos analisados a solução de ácido fórmico a 1% em água

milli-Q[®] (Solvente A) e metanol (Solvente B). As amostras e os padrões foram eluídos de acordo com o gradiente totalizando uma corrida de 80 minutos.

O comprimento de onda utilizado foi de 290 nm, numa temperatura de 33°C, fluxo de 0,6 mL.min⁻¹ e volume de injeção de 20 µL. As amostras e os padrões foram filtrados em membrana de polietileno de 0,45 µm (Milipore) e injetados diretamente no sistema cromatográfico. Cada injeção foi realizada três vezes no sistema HPLC, com a finalidade de se obter a média das concentrações e dos tempos de retenção. Sendo assim, a identidade dos analitos foi confirmada pelo tempo de retenção, e o perfil dos picos da amostra comparados aos dos padrões.

Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística de regressão no programa Microsoft Office Excel[®], para determinação da equação da reta e do coeficiente de determinação (R^2) que melhor explicassem o potencial antioxidante da amostra vegetal.

As análises dos dados obtidos foram realizadas por meio de estatísticas multivariadas, utilizando-se os diferentes conjuntos de variáveis químicas das amostras. Foram realizadas análises de agrupamento. Para isso, foi determinada a distância Euclidiana média como uma medida de dissimilaridade (D^2) e aplicados os métodos de otimização de Tocher. Com essas análises objetivou-se agrupar amostras com características semelhantes.

Na execução dos procedimentos estatísticos foi utilizado o programa GENES [34].

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Obtenção do extato etanólico vegetal

Foram obtidos 1783,20g de (EEB) das cascas do caule de *L. pacari*, com rendimento de 85,43%. A partir do EEB obtida com o processo de extração foi retirada uma alíquota de 127,57g para submissão à ELL.

Como resultado da ELL foram obtidas pode-se obter as frações *L. pacari*: fração insolúvel em metanol (MeOH) e água (H₂O), *L. pacari* fração acetanólica (AcOET), *L. pacari* fração insolúvel em acetato de etila (AcOET), *L. pacari* fração clorofórmica (CHCl₃), *L. pacari* fração butanólica (BuTOH) e *L. pacari* fração aquosa (H₂O) (Gráfico 1).

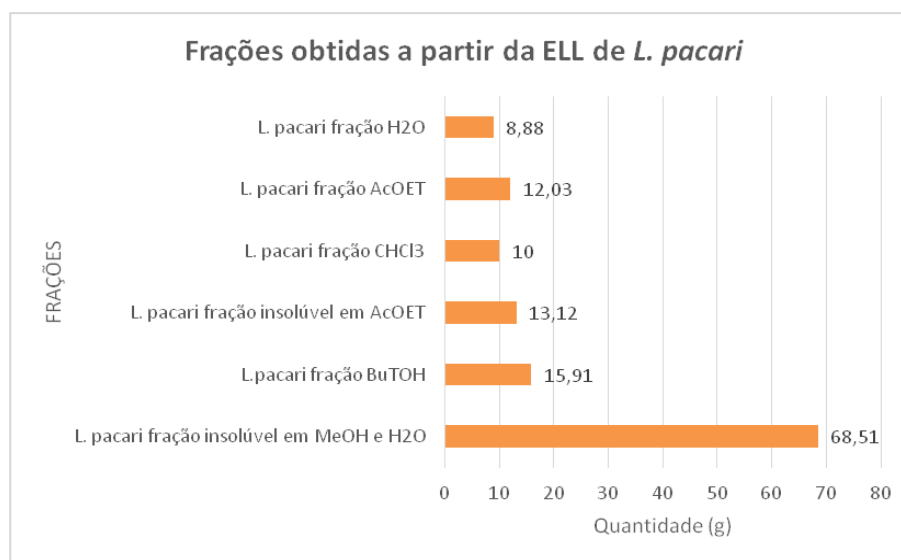


Gráfico 1 - Gráfico das frações obtidas e sua quantidade em gramas a partir da extração líquido-líquido de 127,57g do EEB da *L. pacari*.

Pela quantidade obtida de cada fração, pode-se observar que o maior valor foi proveniente da *L. pacari* fração insolúvel em MeOH e H₂O com 68,51g e as outras frações apresentaram uma quantidade inferior e semelhante entre elas.

Prospecção fitoquímica

A *L. pacari* é uma espécie pertencente ao bioma Cerrado onde a vegetação está submetida aos constantes estresses metabólicos, em resposta às variações ambientais, principalmente a escassez de água e nutrientes, o que favorece a produção de uma variedade de metabólitos secundários vegetais, como mecanismos de defesa [35].

Na determinação do perfil fitoquímico os testes detectaram a presença de fenóis em decorrência de coloração amarelada; taninos pirogálicos, devido ao aparecimento de precipitado escuro de tonalidade azul. A presença de flavononóis

foi constatada pelo aparecimento de coloração vermelha alaranjada. Foi revelada a presença de flavononas após a coloração vermelha alaranjada. Foram apresentados triterpenoides devido à coloração vermelho parda e a presença de saponinas foi revelada após o aparecimento de espuma persistente (Quadro 1).

Quadro 1. Triagem fitoquímica do extrato etanólico bruto da *L. pacari*.

ALELOQUÍMICOS	Resultado
Fenóis	Presença
Taninos Pirogálicos	Presença
Taninos Flobafênicos	Ausência
Antocianina e Antocianidina	Ausência
Flavonas, Flavonóis e Xantonas	Ausência
Chalconas e Auronas	Ausência
Flavononóis	Presença
Leucoantocianidinas	Ausência
Catequinas	Ausência
Flavononas	Presença
Flavonóis, Flavononas, Flavonóis e Xantonas	Ausência
Esteróides	Ausência
Triterpenóides	Presença
Saponinas	Presença

Corroborando com a pesquisa, Campos e Frasson (2011) e Galdino (2015) [36, 37] também detectaram a presença de taninos, flavonoides, saponinas, esteroides e triterpenoides na *L. pacari*. De acordo com Solon (2000), Violante et al. (2009) e Firmo et al. (2015) [13, 38, 39], os compostos fenólicos apresentam alto potencial bioativo como antioxidantes.

De acordo com a literatura os principais constituintes químicos presentes na espécie pertencem à classe de compostos fenólicos como taninos e flavonoides, com destaque para o ácido elágico, responsável pela maior parte das atividades biológicas da *L. pacari*, dentre elas as atividades antioxidante, anti-inflamatória e anticarcinogênica. Também já foram identificadas saponinas em extratos da casca do caule e das folhas da *L. pacari* [40, 37].

Segundo Sampaio (2010) [40] os compostos fenólicos encontrados na *L. pacari* são derivados do ácido benzoico, como o ácido gálico e seu produto de dimerização o ácido hexahidrodifênico e derivados como o ácido elágico na forma de taninos hidrolisáveis. Sugere-se que a atividade antioxidante está relacionada a estes compostos ácidos.

Nas pesquisas de Firmo et al. (2014) [41], no gênero *Lafoensia* também tiveram destaque os compostos ácidos, seguido de triterpenos, saponinas, flavonoides e acetofenonas, salientando que os compostos ácidos representam o fator de atividade biológica da espécie.

Determinação do teor de fenóis totais e de flavonoides

A obtenção do teor de fenóis totais das amostras estudadas ocorreu através do método Folin-Ciocalteu, utilizando a curva de calibração de ácido gálico, interpolando a média das absorbâncias da amostra contra a curva de calibração (Gráfico 2). A partir da curva padrão de ácido gálico obteve-se os resultados expressos em mgEAG/g de extrato (mg equivalentes de ácido gálico por grama de extrato).

Através dos resultados pode-se observar que dentre as frações provenientes da ELL; destacaram-se as frações acetanólica (5926,65 mgEAG/g de extrato) e butanólica (5643,13 mgEAG/g de extrato) que não diferem estatisticamente ao nível de 5%.

Com relação as subfrações resultantes da EAB, pode-se observar que os compostos ácidos provenientes da subfração AcOET apresentaram os melhores resultados, com destaque para a subfração aquosa compostos ácidos (5870,81 mgEAG/g de extrato) e subfração água de lavagem compostos ácidos (5246,94 mgEAG/g de extrato) estatisticamente diferentes ao nível de 5% (Tabela 1).

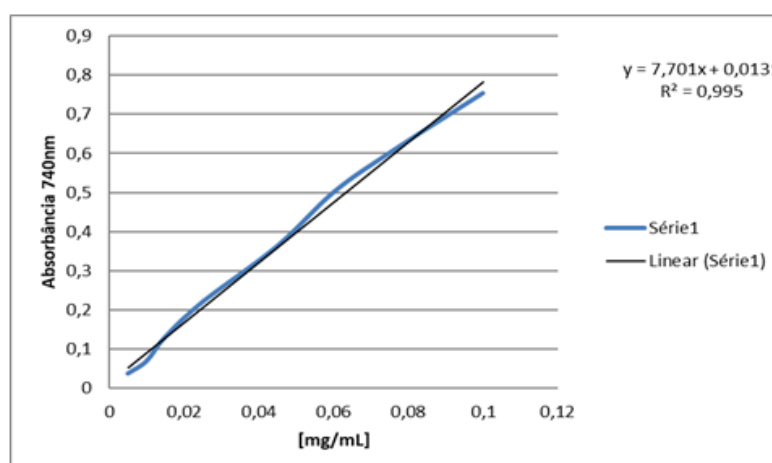


Gráfico 2 - Curva padrão do ácido gálico.

O teor de flavonoides da espécie analisada foi verificado através do teste de quantificação de flavonoides, utilizando uma curva padrão de quercetina (Gráfico 3).

Na quantificação de flavonoides dentre as frações provenientes da ELL destacou-se a fração CHCl_3 com 281,99 mg EQ/g de extrato. Na extração ácido base, na quantificação de compostos fenólicos e na quantificação de flavonoides, destacaram-se os compostos ácidos em relação aos compostos neutros e básicos. Na EAB, a subfração água lavagem ácidos oriunda da fração acetato apresentou resultado mais significativo com 1150,81 mg EQ/g de extrato (Tabela 1).

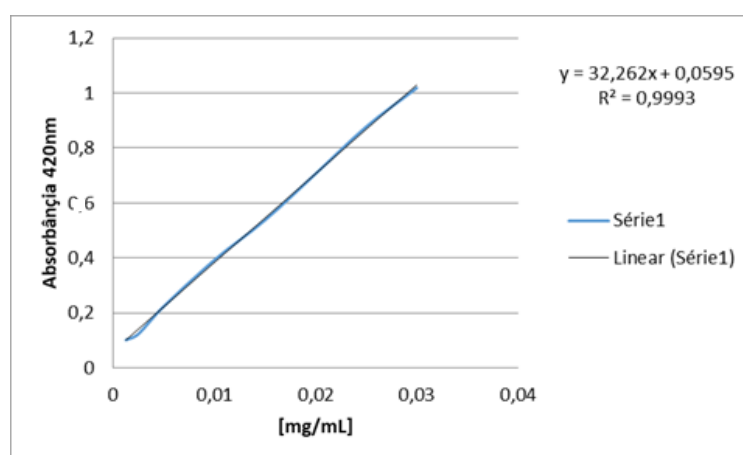


Gráfico 3 - Curva de calibração da Quercetina.

Os resultados apresentados pelas frações CHCl_3 e AcOEt podem ser explicados pela influência da polaridade do solvente no processo extrativo, pois a maioria dos compostos fenólicos não é encontrada no estado livre na natureza, mas sob forma de ésteres ou de heterosídeos, compostos de alta polaridade [39].

Estudos realizados com espécies da mesma família, *Cuphea lanceolata* W.T.Aiton (flores e folhas) por Cardenas-Sandoval et al., (2012) [42] indicaram um menor quantitativo para flavonoides, quando comparado ao da *L. pacari*.

Testes antioxidantes

Para avaliação da capacidade antioxidante das amostras de *L. pacari* três metodologias foram utilizadas: DPPH, FRAP e ABTS, que ocorrem por meio de transferência de elétrons ou de átomo de hidrogênio. Os métodos que avaliaram a transferência de elétrons foram o DPPH• (1,1-difenil-2-picrilidrazil) e o FRAP (*ferric*

reducing – antioxidant power). O método que avaliou a transferência de átomo de hidrogênio foi o ABTS (2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico) [43].

Após a obtenção da curva de calibração Trolox (Gráfico 4), foi possível determinar a atividade antioxidante de cada amostra frente ao radical DPPH, expressa em $\mu\text{mol Trolox/g}$ de extrato.

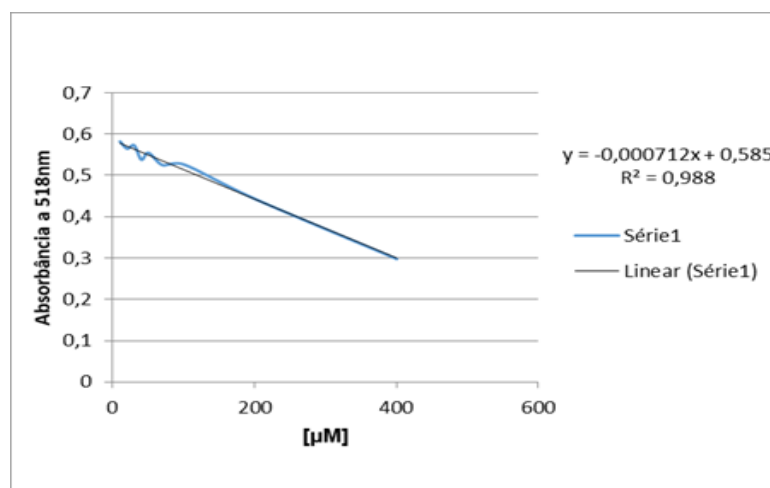


Gráfico 4 - Curva de calibração do padrão Trolox para o experimento DPPH.

Na extração LL, a fração aquosa apresentou (702,7154 $\mu\text{mol Trolox/g}$ de extrato), a fração insolúvel AcOEt (701,3108), a fração insolúvel em ACOET e água (699,4382 $\mu\text{mol Trolox/g}$ de extrato) e a Fração AcOEt (692,4157 $\mu\text{mol Trolox/g}$ de extrato) que não diferem estatisticamente ao nível de 5%.

Dentre as subfrações obtidas com a EAB, as que foram provenientes da fração AcOET se destacaram com resultados mais significativos. O maior resultado foi da subfração AcOET (água ácidos) (694,2883 $\mu\text{mol Trolox/g}$ de extrato) e das subfrações AcOET (água lavagem ácidos) (667,6030 $\mu\text{mol Trolox/g}$ de extrato) e subfração. AcOET (ácidos) (674,6255 $\mu\text{mol Trolox/g}$ de extrato) estatisticamente diferentes ao nível de 5% (Tabela 1). Os compostos ácidos na EAB se sobressaíram com maior atividade de captura do radical livre DPPH, quando em comparação com os compostos neutros e básicos.

A espécie *L.pacari* do presente estudo apresentou melhores resultados comparando-se com o estudo de Cardenas-Sandoval et al. (2012) [42] que verificou maior atividade de eliminação de radicais livres contra o DPPH em folhas de *C. aequipetala var. hispida* (173,33 \pm 2,12 $\mu\text{mol trolox / g}$ de peso seco).

Com a obtenção de uma curva do padrão Trolox foi realizado o teste ABTS (Gráfico 5).

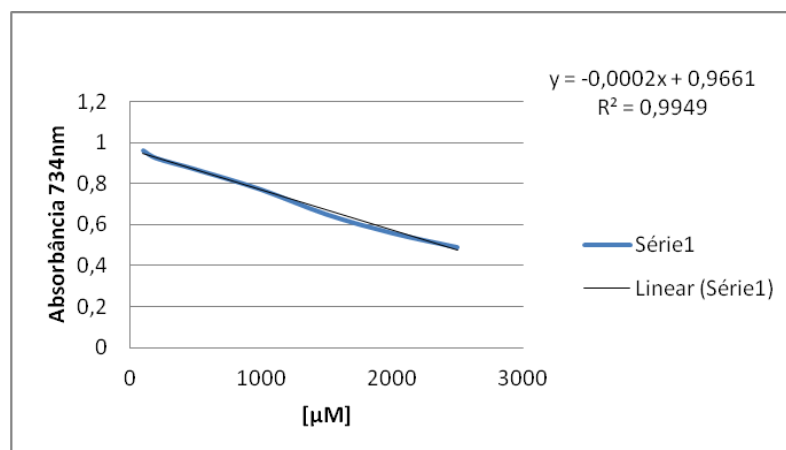


Gráfico 5 - Curva do padrão Trolox para o ensaio de ABTS.

Dentre as frações provenientes da ELL os melhores resultados foram da fração aquosa (224,11667 μM Trolox/g de extrato) e da fração insolúvel AcOEt (188,96667 μM Trolox/g de extrato) estatisticamente diferentes ao nível de 5% (Tabela 1).

Dentre os resultados provenientes da EAB, as derivadas da fração AcOET apresentaram resultados mais significativos. A subfração AcOET (água ácidos) apresentou (198,550 μM Trolox/g de extrato) e a subfração AcOET (água lavagem ácidos) (259,800 μM Trolox/g de extrato) que não diferem estatisticamente ao nível de 5%.

No estudo realizado por Martínez-Bonfil et al. (2013) [44], em que os valores médios de ABTS variaram de $43,38 \pm 0,1$ a $119,50 \pm 0,3$ μmol Trolox / g nos extratos de folhas, caules e raízes da espécie *Cuphea aequipetala* Cav. A espécie *L. pacari* revelou resultados superiores quando comparado à *C. aequipetala*. A partir da curva padrão de Trolox foi possível também obter uma equação da reta e uma curva, para calcular a redução do ferro no método FRAP (Gráfico 6).

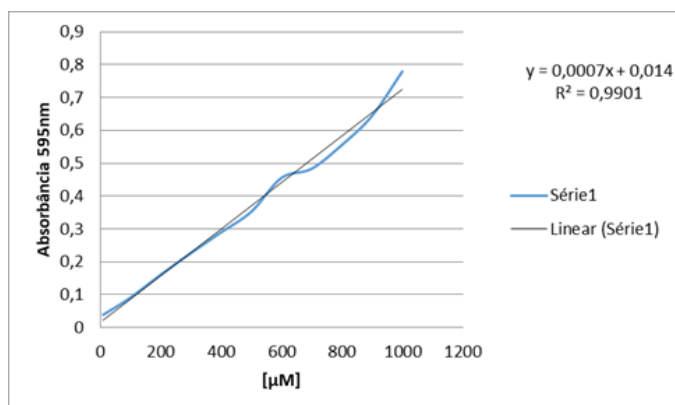


Gráfico 6 - Curva de calibração Trolox para o teste FRAP.

Com a obtenção da curva de padrão Trolox, pode-se obter os resultados que foram expressos em μM Trolox/g de extrato.

Através dos resultados pode-se observar que dentre as frações provenientes da ELL destacou-se a fração acetato ($235,17978 \mu\text{M}$ Trolox/g de extrato).

Tendo em vista a EAB, os compostos ácidos apresentam valores mais significativos do que os compostos neutros e básicos, com destaque para a subfração acetato ácidos ($244,25008 \mu\text{M}$ Trolox/g de extrato) e a subfração acetato água lavagem ácidos ($201,00422 \mu\text{M}$ Trolox/g de extrato) que apresentaram resultados estatisticamente diferentes ao nível de 5%.

Em outro estudo com *L. pacari*, Caixeta (2014) [45], detectou em 1g do extrato de *L. pacari*, capacidade de redução de $323,62 \mu\text{M}$ de sulfato ferroso.

Tabela 1 - Dados médios de ABTS, compostos fenólicos, flavonoides, DPPH e FRAP.

	Tipo de extração	Frações	Compostos fenólicos (mg EAG/g de extrato)	Flavonoides (mg EQ/g de extrato)	DPPH ($\mu\text{mol eq. Trolox por mg de extrato}$)	FRAP ($\mu\text{M Trolox/g de extrato}$)	ABTS ($\mu\text{M Trolox/g de extrato}$)
1	ELL	Fração clorofórmica	4003,52E	281,99E	532,7715D	147,71623E	157,18333C
2	EAB	Subfração clorofórmica neutros	1972,47H	51,38I	7,4906H	40,49239I	156,31667C
3		Subfração clorofórmica água ácidos	0,00J	473,39C	128,7453F	63,816H	205,300B
4		Subfração clorofórmica ácidos	4337,39D	356,22D	621,2547C	0,17184969D	174,76667C
5		Subfração clorofórmica emulsão ácidos	2838,16G	95,86H	24,3446H	45,18950I	135,23333C
6		Subfração clorofórmica básicos	455,18I	222,47F	90,8240G	42,75996I	161,13333C
7	ELL	<i>L. pacari</i> fração insolúvel em acetato	4744,40C	104,38H	701,3108A	174,76514D	188,96667B
8	ELL	Fração acetanólica	5926,65A	139,09G	692,4157A	235,17978A	143,400C
9	EAB	Subfração acetato compostos neutros	3311,69F	582,03B	477,5281E	105,60415G	193,75000B
10		Subfração acetato aquosa compostos ácidos	5246,94B	127,32G	694,2883A	187,39877C	198,550A
11		Subfração acetanólica água de lavagem compostos básicos	0,00J	21,77I	0,00H	25,26725I	142,76667C
12		Subfração acetanólica água de lavagem compostos ácidos	5870,81A	1150,81A	667,6030B	201,00422B	259,800A
13		Subfração acetato compostos ácidos	3388,45F	133,83g	674,6255B	244,25008A	192,650B
14		Insolúvel em acetato compostos ácidos	3891,85E	86,40H	699,4382A	171,03984D	170,16667C
15	ELL	<i>L. pacari</i> fração aquosa	5129,20B	97,09H	702,7154A	164,39909D	224,11667 A
16		<i>L. pacari</i> fração insolúvel em metanol e água	2926,89G	74,16H	602,0599C	126,33625F	149,38333C
17		<i>L. pacari</i> fração butanólica	5643,13A	95,70H	668,0712B	188,20861C	123,200C

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de agrupamento de Scott-Knott a 5%. ELL-Extração líquido-líquido. EAB-Extração ácido-base.

Com o objetivo de agrupar as diferentes amostras em relação às variáveis que medem a atividade antioxidante foi utilizada a análise multivariada pelo método de otimização de Tocher. Com base na distância Euclidiana média padronizada, considerando compostos fenólicos, flavonoides, DPPH, ABTS e FRAP, verificou-se a formação de três grupos nos agrupamentos formados entre as 17 amostras analisadas, sendo o primeiro formado por quinze amostras e o segundo e o terceiro

constituído por uma única amostra, cada um. A amostra (12) Subfração acetanólica água de lavagem compostos ácidos apresentou o melhor desempenho nas variáveis analisadas, com os melhores resultados para compostos fenólicos, flavonoides e ABTS (Tabela 1). A amostra (11) Subfração. AcOET água lavagem básicos apresentou o pior desempenho (Tabela 1). Essa análise confirmou que as amostras 11 e 12 formam grupos distintos das demais amostras (Tabela 2).

Tabela 2 - Agrupamentos entre as dezessete amostras, obtido pelo método de Tocher, com base na distância Euclidiana média padronizada, considerando as variáveis compostos fenólicos totais, flavonoides, DPPH, ABTS e FRAP

Grupos	Amostras/Tratamentos																
1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	13	14	15	16	17		
2	11																
3	12																

As variáveis que mais contribuíram para diferenciar as amostras em três grupos foram os compostos fenólicos (29,40%) flavonoides (27,90%) e DPPH (22,10%) (Tabela 3).

Tabela 3 - Contribuição das variáveis na dissimilaridade das amostras.

Variável	Contribuição (%)
ABTS	10,30
Compostos fenólicos	29,40
Flavonoides	27,90
DPPH	22,10
FRAP	10,30

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Neste estudo foram determinados 13 compostos fenólicos utilizando método validado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de ultravioleta (UV). Todos os padrões avaliados foram detectados nas amostras testadas. Foi obtido o cromatograma com detecção espectrofotométrica em 290 nm após uma injeção de 20 µL de solução padrão dos compostos fenólicos em uma

concentração de 10 mg/L. O fluxo empregado foi de 0,6 mL min⁻¹ à uma temperatura de 33°C, utilizando-se gradiente de eluição e a fase móvel composta pelas soluções: ácido fórmico 2% (A) e metanol (B) (Gráfico 7).

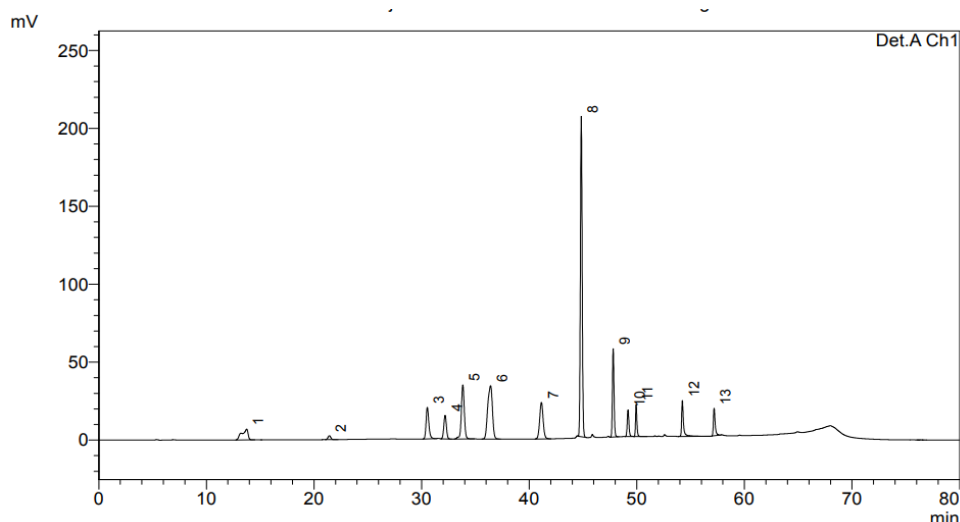


Gráfico 7. Cromatograma da solução de polifenóis com detecção espectrofotométrica 290 nm.

Identificação dos picos: 1= ácido gálico; 2= catecol, 3= ácido clorogênico, 4= ácido vanílico, 5= ácido cafeico, 6= vanilina, 7= seringaldeído, 8= ácido cumárico, 9= cumarina, 10= ácido salicílico, 11= rutina, 12= quercetina; 13= kaempferol.

A análise cromatográfica das amostras permitiu pela primeira vez, a identificação e quantificação dos compostos fenólicos: ácido gálico, catecol, ácido clorogênico, ácido vanílico, ácido cafeico, vanilina, seringaldeído, ácido salicílico, ácido cumárico, cumarina, rutina, quercetina e Kaempferol. Verificou-se que com exceção do ácido clorogênico, ácido vanílico, ácido cafeico e cumarina, as amostras apresentaram diferenças significativas para as demais variáveis (Tabela 4).

Vale destacar o desempenho da amostra *L. pacari* fração CHCl₃ compostos neutros que apresentou valores médios elevados para catecol, vanilina, ácido salicílico, quercetina e kaempferol (Tabela 4).

Tabela 4 - Dados médios de compostos fenólicos da espécie *L. pacari*.

Código das amostras	Tipo de extração	Frações	Ácido gálico	Catecol	Ácido clorogênico	Ácido vanílico	Ácido caféico	Vanilina	Seringaldeído	Ácido cumárico	Cumarina	Ácido Salicílico	Rutina	Quercetina	Kaempferol
1	Fração da ELL	Fração clorofórmica	18,25B	845,75B	22A	19,5A	7,25A	52,5B	3,5B	36,5A	14,5A	78,75B	42,5B	130,5B	30,5B
2	Frações da EAB	Subfração clorofórmica neutros	0,0B	22.229,25A	13A	16,25A	4,75A	19.704A	0,00B	34,5A	13,5A	11.088A	30,75B	68.645,5A	19.715A
3		Subfração clorofórmica água ácidos	0,0B	145,75E	17A	10A	5A	20,5B	0,00B	5,75B	12,5A	40B	33,75B	26,5B	28,25B
4		Subfração clorofórmica ácidos	0,0B	129,5E	10A	9,5A	30,75A	23,25B	0,00B	6,25B	11A	31,75B	63,25B	15,75B	82B
5		Subfração clorofórmica emulsão ácidos	0,0B	144,75E	16,25A	13A	0,00A	48,5B	0,00B	33A	14,5A	46,25B	52,75B	100,75B	26B
6		Subfração clorofórmica básicos	0,0B	143,75E	14A	12A	11,5A	43,5B	0,00B	35,75A	15,25A	60,5B	19,75B	97,75B	25,5B
7	Fração da ELL	<i>L. pacari</i> fração insolúvel em acetato	0,0B	111E	13A	0,00A	21,5A	38,5B	0,00B	5,75B	9A	27,25B	8,5B	10,5B	27B
8	Fração da ELL	Fração acetanólica	0,0B	418,25C	12,75A	10,25A	0,00A	0,5B	0,00B	39A	17A	14,5B	32B	107,25B	31B
9	Frações da EAB	Subfração acetato compostos neutros	62,75A	466,5C	20,5A	15A	5,25A	54,25B	46A	23,25A	11A	140,75B	16,75B	116,5B	26,5B
10		Subfração aquosa compostos ácidos	0,0B	133,75E	11,25A	20,25A	10,75A	21B	0,00B	26,25A	15A	74,5B	56,5B	111,75B	28,5B
11		Subfração acetanólica água de lavagem compostos básicos	0,0B	111,5E	13,5A	18,75A	14,25A	45,25B	0,00B	23,5A	10,25A	31,5B	21,25B	95,75B	25,5B

12		Subfração acetanólica água de lavagem compostos ácidos	74,25A	232,5D	5A	6,25A	4,75A	9,75B	18,5B	17,75B	5,25A	17,25B	20,5B	122,5B	28,75B
13		Subfração acetato compostos ácidos	15,75B	91,5E	17 ^a	12,25 ^a	13,5A	36,25B	0,00C	20,25A	8,75A	35,5B	28B	148,75B	15B
14		Insolúvel em acetato compostos ácidos	0,0B	16,25F	4,75A	14A	0,00A	24,5B	17B	8,5B	2,75A	73B	164,75A	48,75B	38,5B
15	Fração da ELL	<i>L. pacari</i> fração aquosa	0,0B	170,75E	13,5A	4,5A	4,75A	42,75B	0,00B	3,25B	12,5A	30B	46,25B	22,25B	231,25B
16		<i>L. pacari</i> fração insolúvel em metanol e água	0,0B	96E	5A	0,00A	15A	14B	0,00B	10B	5,25A	11,75B	8,75B	94,75B	25,75B
17		<i>L. pacari</i> fração butanólica	0,0B	226,5D	5,25A	3,75A	0,00A	58,25B	0,00B	13B	9,75A	27,25B	12,25B	118B	29,25B

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de agrupamento de Scott-Knott a 5%.

Com o objetivo de agrupar as diferentes amostras foi utilizada a análise multivariada pelo método de otimização de Tocher. Com base na distância Euclidiana média padronizada, considerando a quantificação de compostos fenólicos verificou-se a formação de apenas dois grupos nos agrupamentos formados entre as 17 amostras analisadas, sendo o primeiro formado por dezesseis amostras e o segundo constituído por uma única amostra *L. pacari* clorofórmio compostos neutros (código 2). Essa amostra se apresentou em um grupo distinto das demais amostras, pois apresentou uma maior quantificação de catecol, vanilina, ácido salicílico, quercetina, kaempferol (Tabela 5).

Tabela 5. Agrupamentos entre as dezessete amostras, obtido pelo método de Tocher, com base na distância Euclidiana média padronizada, considerando as variáveis ácido gálico, catecol, ácido clorogênico, ácido vanílico, ácido caféico, vanilina, seringaldeído, ácido cumárico, cumarina, ácido salicílico, rutina, quercetina e kaempferol.

Grupos	Amostras/Tratamentos
1	1 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17
2	2

Na Tabela 6 encontra-se a contribuição das variáveis em relação a discriminação entre os grupos formados. Verifica-se que as variáveis que mais contribuíram para a diferenciação dos grupos foram ácido caféico, cumarina e ácido clorogênico que juntas, somaram 61,80%.

Tabela 6. Contribuição das variáveis na dissimilaridade das amostras.

Variável	Contribuição (%)
Ácido gálico	4,41
Catequina	8,09
Ácido clorogênico	14,00
Ácido vanílico	1,47
Ácido caféico	26,50
Vanilina	2,21
Seringaldeído	2,21
Ácido cumárico	11,80
Cumarina	21,30
Ácido Salicílico	0,73
Rutina	6,62
Quercetina	0,00
Kaempferol	0,73

Os compostos fenólicos são definidos como o maior grupo de antioxidantes naturais, com cerca de 8.000 compostos diferentes. Estão largamente distribuídos nos alimentos vegetais, sendo considerados fundamentais para o desenvolvimento adequado da planta e a defesa contra injúrias ambientais e processos infecciosos [46].

Em relação à quantificação de compostos fenólicos destacaram-se catecol, vanilina, ácido salicílico, quercetina e kaempferol, ácido caféico, cumarina e ácido clorogênico. O catecol é um composto fenólico simples, cuja estrutura também é encontrada em compostos polifenólicos, como a quercetina e catequinas. O catecol atua na recuperação de plantas afetadas por pragas ou doenças e pode promover o enraizamento em espécies vegetais. Apresenta propriedades antioxidante, anti-inflamatória, neuroprotetora, antibacteriana e antifúngica [47].

A vanilina possui em sua estrutura o grupo vanilóide, constituído pelo anel aromático e os grupos substituintes metóxi e fenol, o qual apresenta importantes atividades em sistemas biológicos. Compostos que possuem o grupo vanilóide em suas estruturas, normalmente favorecem a apoptose, além de apresentarem importantes características antioxidantes, antimutagênica e antimicrobianas [48]. Atenua a expressão dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , IL-1 β e IL-6, em ensaios com ratos [49]. A vanilina é uma substância bastante utilizada na

indústria alimentícia e de cosméticos por ser o ingrediente ativo responsável pelo aroma de baunilha [50].

O ácido salicílico é um beta-hidroxiácido que afeta a cascata araquidônica, apresentando capacidade anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana e queratolítica, tornando-se útil na rápida diminuição do eritema facial [51, 52].

Segundo estudos a quercetina é um flavonoide que possui grande ação anticancerígena, principalmente reduzindo os sistemas associados a tumores, englobando estresse oxidativo, morte celular e metástase. Tais funções biológicas relacionadas a quercetina tem chamado a atenção como um potente coadjuvante na quimioterapia [53].

Os resultados da pesquisa realizada por Yang et al. (2018) [54] demonstraram que a quercetina reativou eficazmente a expressão gênica do HIV-1 latente isoladamente e levou à reativação sinérgica quando combinada com a prostratina ou o ácido valpróico. Além disso, o estudo fornece evidências de que a quercetina pode reativar a expressão do HIV-1 induzindo a translocação nuclear do fator nuclear-kB, e que a toxicidade da quercetina é menor quando comparada a vários outros ativadores do HIV-1. Os resultados indicam que a quercetina pode ser um agente eficaz para interromper a latência do HIV-1 e pode ser útil em futuras estratégias de erradicação.

Segundo Singh e Pai (2015) [55] a infecção pelo HIV leva a um aumento do estresse oxidativo que, por sua vez, pode levar a um desenvolvimento mais rápido da doença pelo HIV. Assim, os antioxidantes podem ter um papel significativo no tratamento do HIV/AIDS.

O Kaempferol é um flavonóide natural antioxidante com efeito protetor contra o stress oxidativo [56, 57]. Já o ácido cafeico neutraliza radicais livres que possam causar danos oxidativos nas membranas celulares e DNA [58]. Esse ácido ajuda a prevenir danos às células causados pela luz ultravioleta e também atua como antioxidante, anti-hipertensivo, antiviral, anticarcinogênico e hipoglicemiante [59].

A Cumarina (1,2-benzopirona) apresenta efeitos farmacológicos comprovados como antioxidante, antimicrobiano, anticoagulante, antiinflamatório, neuroprotetor, antidepressiva, espasmolítico, antiinflamatório e broncodilatador [60, 61].

O ácido clorogênico também é considerado um excelente antioxidante, com inibição significativa da peroxidação lipídica [62] além de promover efeito hipotensor,

reduzir a absorção de glicose pelo organismo e atuar como agente anti-inflamatório. Tem atividade anti-hipertensiva, antibiótica, antiglicante e cardioprotetora [63].

Verifica-se nas pesquisas uma correlação positiva entre a atividade antioxidante e a quantidade de compostos fenólicos. Esta atividade deve-se principalmente às propriedades redutoras e à estrutura química dos fenólicos, que permitem a neutralização ou sequestro de radicais livres e/ou quelação de metais de transição. A ressonância do anel aromático presente nestes compostos é a principal responsável pela formação de intermediários estáveis que após o processo de redução dos radicais livres, bloqueia reações em cadeia [64, 65].

4. CONCLUSÃO

Na triagem fitoquímica do extrato etanólico bruto da *L. pacari* foram detectados fenóis, taninos, flavonoides, triterpenos e saponinas. A amostra Subfração acetanólica água de lavagem compostos ácidos apresentou o melhor desempenho nas variáveis analisadas, com os melhores resultados para compostos fenólicos, flavonoides e ABTS. As variáveis que mais contribuíram para diferenciar as amostras em três grupos foram os compostos fenólicos (29,40%) flavonoides (27,90%) e DPPH (22,10%). A análise cromatográfica das amostras permitiu pela primeira vez a identificação e quantificação, dos compostos fenólicos: ácido gálico, catecol, ácido clorogênico, ácido vanílico, ácido caféico, vanilina, seringaldeído, ácido salicílico, ácido cumárico, cumarina, rutina, quercetina e Kaempferol. Verificou-se que com exceção do ácido clorogênico, ácido vanílico, ácido caféico e cumarina, as amostras apresentaram diferenças significativas para as demais variáveis. Vale destacar o desempenho da amostra *L. pacari* fração CHCl₃ compostos neutros que apresentou valores médios elevados para catecol, vanilina, ácido salicílico, quercetina e Kaempferol.

A identificação e quantificação dos compostos fenólicos; quantificação dos teores de fenólicos totais e flavonoides, análise multivariada no estudo da composição fenólica e perfil antioxidante demonstraram o potencial antioxidante da espécie *L. pacari*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Carneiro FM, et al. Tendências dos estudos com plantas medicinais no Brasil. *Revista Sapiência: sociedade, saberes e práticas educacionais*. 2014 jul/dez; 3, (2):44-75.
2. Pereira JBA, Rodrigues MM, Moraes IR, Vieira CRS, Sampaio JPM, Moura MG, et al. O papel terapêutico do programa farmácia viva e das plantas medicinais no centro-sul piauiense. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*. 2015; 17(4):550-561, doi: 10.1590/1983-084X/14_008
3. Pereira RJ, Cardoso MG. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*. 2012; 3(4):146-152.
4. Soares SE. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Revista de Nutrição*. 2002 jan; 15(1):71-81, doi: 10.1590/S1415-52732002000100008
5. Silva JB. As práticas de uso de plantas medicinais e fitoterápicos por trabalhadores de saúde na atenção básica [dissertação]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 2012.
6. Cerqueira FM, Medeiros MHG, Augusto O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. *Química Nova*. 2007; 30(2):441-449, doi: 10.1590/S0100-40422007000200036
7. Martelli F, Nunes FMF. Radicais livres: em busca do equilíbrio. *Ciência e Cultura*. 2014 set.; 66(3):54-57, doi: 10.21800/S0009-67252014000300017
8. Pasa MC, Cabral PRF. Mangava-brava: *Lafoensia pacari* A. St.-Hil. (Lythraceae) e a etnobotânica em Cuiabá, MT. *Biodiversidade*. 2009; 8(1):02-21.
9. Galdino, P. M. *Lafoensia pacari* A. St. Hil: Identificação de constituintes ativos e avaliação da atividade antidepressiva. 2015 [tese]. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina; 2015.
10. Tamashiro Filho P, Sikiru Olaitan B, Tavares de Almeida DA, Lima JC, Marson-Ascênio PG, Donizeti Ascêncio S, et al. Evaluation of antiulcer activity and mechanism of action of methanol stem bark extract of *Lafoensia pacari* A. St.-Hil. (Lythraceae) in experimental animals. *Journal of Ethnopharmacology*. 2012 dez; 144(3):497-505, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.09.019>
11. Corrêa MP, Penna LA. *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas*. Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1984.

12. Porto MP, Costa EA, Paula JR, Pereira KC, Cunha KS. Avaliação tóxico-genética do extrato de *Lafoensia pacari* em células somáticas de *Drosophila melanogaster*. In: Congresso Brasileiro de Genética, 54^o. Salvador- BA, p.106, 2008.
13. Solon S, Lopes L, Sousa Jr, PT, Schmeda-Hirschmann G. Free radical scavenging activity of *Lafoensia pacari*. Journal of Ethnopharmacology. 2000 set; 72(1-2):173-178, doi: 10.1016/S0378-8741(00)00233-6
14. Porfírio Z, Melo-Filho GC, Alvino V, Lima MRF, Sant'Ana AEG. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de *Lafoensia pacari* A. St.-Hil., Lythraceae, frente a bactérias multirresistentes de origem hospitalar. Revista Brasileira de Farmacognosia. 2009; 19(3):785-789, doi: 10.1590/S0102-695X2009000500023
15. Hsieh PW, Chang FR, Lee KH, Hwang TL. A New Anti-HIV alkaloid, Drymaritin, and a new C-glycoside flavonoid, Diandraflavone, from *Drymaria diandra*. Journal of Natural Products. 2004 jul; 67(7):1175-1177, doi: <http://dx.doi.org/10.1021/np0400196>
16. Bessong PO, Obi CL, Andréola ML, Rojas LB, Pouységu L, Igumbor E, et al. Evaluation of selected South African medicinal plants for inhibitory properties against human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and integrase. Journal of Ethnopharmacology. 2005 maio; 99(1):83-91, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.01.056>
17. Tian RR, Chen JJ, Zhang GH, Qiu MH, Wang YH, Du L, et al. Anti-HIV-1 Activities of Hemslecins A and B. Chinese Journal of Natural Medicines, 2008 maio; 6(3):214-218, doi: 10.1016/S1875-5364(09)60020-0
18. ., Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. Cap. 13, p. 313-318. In: Farmacognosia: da planta ao medicamento, UFRGS Editora, 5ed., 2004.
19. Congenero LS, Ide RM, Nazari AS, Sarragiotto MH, Dias Filho BP, Nakamura CV, et al. Constituintes químicos de *Alchornea glandulosa* (Euphorbiaceae). Química Nova. 2003; 26(6):825-827, doi: 10.1590/S0100-40422003000600008
20. Matos FJA. Introdução à Fitoquímica Experimental. 2. ed. Fortaleza: Edições UFC, 1997. p.141.
21. Cohen KO, et al. Compostos fenólicos e vitamina C na polpa extraída dos frutos do híbrido de maracujazeiro azedo BRS ouro vermelho. Comunicado técnico 156. EMBRAPA. Planaltina, DF, dez. 2008.
22. Souza AV, Vieira MRS, Putti FF. Correlações entre compostos fenólicos e atividade antioxidante em casca e polpa de variedades de uva de mesa. Brazilian Journal of Food Technology. 2018; 21:1-6, doi: 10.1590/1981-6723.1031
23. Wettasinghe M, Shahidi F. Evening primrose meal: a source of natural antioxidants and scavenger of hydrogen peroxide and oxygen-derived free

- radicals. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 1999; 47:1801-1812, doi: 10.1021/jf9810416.
24. Sousa CMM, Rocha HR, Vieira-Jr GM, Ayres MC, Costa CLS, Araújo DS, et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*. 2007; 30(2):351-355, doi: 10.1590/S0100-40422007000200021
25. Godoy RLO, Nascimento EM, Ribeiro LO, Nascimento LSM, Pacheco S, Borguini RG, et al. Identificação e quantificação de flavonoides na polpa de umbu por cromatografia líquida de alta eficiência. Comunicado técnico 196. EMBRAPA. Rio de Janeiro, RJ, dez. 2013.
26. Ferreira TS, Heldwein AB, Santos CO, Somavilla JC, Sautter CK. Substâncias fenólicas, flavonoides e capacidade antioxidante em erva-mate sob diferentes coberturas do solo e sombreamentos. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*. 2016; 18(2):588-596, doi: 10.1590/1983-084x/15_197
27. Rufino MSM, Alves RE, Brito ES, Morais SM, Sampaio CG, Pérez-Jiménez, et al. Metodologia Científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. Comunicado técnico 127. EMBRAPA. Fortaleza, CE, jul. 2007.
28. Hara K, Someya T, Sano K, Sagane Y, Watanabe T, Wijesekara RGS. Antioxidant activities of traditional plants in Sri Lanka by DPPH free radical-scavenging assay. *Data in brief*. 2018; 17:870-875, doi: 10.1016/j.dib.2018.02.013
32. Lucas-González R, Fernández-López J, Pérez-Álvarez JÁ, Viuda-Martos M. Effect of particle size on phytochemical composition and antioxidant properties of two persimmon flours from *Diospyros kaki* Thunb. vars. 'Rojo Brillante' and 'Triumph' co-products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2018; 98:504-510, doi: 10.1002/jsfa.8487.
29. Alves CQ, David JM, David JP, Bahia MV, Aguiar RM. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. *Química Nova*. 2010; 33(10):2202-2210, doi: 10.1590/S0100-40422010001000033
30. Bach F. Avaliação do potencial nutricional, antioxidante e antibacteriano de cogumelos comestíveis [tese]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2017.
31. Rufino MSM, Alves RE, Brito ES, Morais SM, Sampaio CG, Pérez-Jiménez, et al. Metodologia Científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS. Comunicado técnico 128. EMBRAPA. Fortaleza, CE, jul. 2007.
33. Rufino MSM, Metodologia Científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). Comunicado técnico 125. Fortaleza, CE, dez, 2006.
34. Cruz CD. Genes: a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Scientiarum. Agronomy*. 2013 jul./set.; 35(3):271-276.

35. Malheiros RSP, Santana FS, Linhares Neto MV, Machado LL, Mapeli AM. Atividade alelopática da fração metanólica da folha de *Lafoensia pacari* A. ST.-HIL. na germinação e crescimento do alface. In: 1ª Jornada de Química da UFOB, Prainha/Barreiras, 2014.
36. Campos JS, Frasson APZ. Avaliação da atividade antioxidante do extrato aquoso de *Lafoensia pacari* A. ST.-HIL. em emulsão não-iônica. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada. 2011; 32(3):363-368.
37. Galdino PM, Carvalho AA, Florentino IF, Martins JL, Gazola AC, Paula FR, et al. Involvement of monoaminergic systems in the antidepressant-like properties of *Lafoensia pacari* A. St. Hil. Journal of Ethnopharmacology. 2015 jul; 21(170):218-225, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.05.015>
38. Violante IMP, Souza IM, Venturini CL, Ramalho AF, Santos RAN, Ferrari M. Avaliação in vitro da atividade fotoprotetora de extratos vegetais do cerrado de Mato Grosso. Revista Brasileira de Farmacognosia. 2009; 19(2A):452-57, doi: 10.1590/S0102-695X2009000300020
39. Firmo WCA, Miranda MV, Coutinho GSL, Barboza JR, Alves LPL, Olea RSG. Determinação de compostos fenólicos e avaliação da atividade antioxidante de *Lafoensia pacari* (Lythraceae). Revista Eletrônica de Farmácia. 2015; 12(1):01-10, doi: 10.5216/ref.v12i1.24645
40. Sampaio BL. Influência dos fatores ambientais sobre a concentração de compostos fenólicos nas folhas e nas cascas do caule de *Lafoensia pacari* A. ST.-HIL (Lythraceae) [dissertação]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás; 2010.
41. Firmo WCA, Miranda MV, Coutinho GSL, Silveira LMS, Olea RSG. Estudo fitoquímico e avaliação da atividade antibacteriana de *Lafoensia pacari* (Lythraceae). Publicatio UEPG Ciências Biológicas e da Saúde; 2014; 20(1):7-12, doi: 10.5212/publicatio%20uepg.v20i1.6541
42. Cardenas-Sandoval BA, López-Laredo AR, Martinez B, Torres KB. Advances in the phytochemistry of *Cuphea aequipetala*, *C. aequipetala* var. *hispida* and *C. lanceolata*: Extraction and quantification of phenolic compounds and antioxidant activity. Revista Mexicana de Ingeniería Química. 2012; 11(3):401-413.
43. Oliveira GLS. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH•: estudo de revisão. Revista Brasileira de Plantas de Medicinais. 2015 jan./mar.; 17(1):36-44, doi: 10.1590/1983-084X/12_165.
44. Martínez-Bonfil B, Pineda-Montero M, Lopez-Laredo AR, Guadalupe SM. A propagation procedure for *Cuphea aequipetala* Cav. (Lythraceae) and antioxidant properties of wild and greenhouse-grown plants. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. 2013; 12(1-14).

45. Caixeta EV. Avaliação do potencial fotoprotetor do extrato hidroalcoólico de *Lafoensia pacari* A. St-Hill (Lytracae) e obtenção de uma formulação fitocosmética [dissertação]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás; 2014.
46. Benemann GD, Botelho RV, Torres YR, Cmargo LA, Khalil NM, Oldoni TLC, et al. Compostos bioativos e atividade antirradicalar em farinhas de bagaço de uvas de diferentes cultivares desidratadas em liofilizador e em estufa. *Brazilian Journal of Food Technology*. 2018; 21, doi: <https://doi.org/10.1590/1981-6723.20517>
47. Zheng LT, Ryu GM, Kwon BM, Lee WH, Suk K. Anti-inflammatory effects of catechols in lipopolysaccharide-stimulated microglia cells: Inhibition of microglial neurotoxicity. *European Journal of Pharmacology*. 2008; 588(1):106-113, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.04.035>
48. Medeiros WTQ. Síntese e caracterização de complex tetranuclear de cobre com o ligante resorcinareno [dissertação]. Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte; 2014.
49. Makni M, Chtourou Y, Fetoui H, Faroui M, Boudawara T, Zeghal N. Evaluation of the antioxidant, anti-inflammatory and hepatoprotective 171 properties of vanillin in carbon tetrachloride-treated rats. *European Journal of Pharmacology*. 2011; 668(1-2):133-139, doi: 10.1016/j.ejphar.2011.07.001
50. Wu SL, Chen JC, Li CC, Lo HY, Ho TY, Hsiang CY. Vanillin improves and prevents trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2009 ago; 330(2):370-376, doi: 10.1124/jpet.109.152835
51. Bagatin E, Hassum K, Talarico S. Revisão sistemática sobre peelings químicos. *Surgical & Cosmetic Dermatology*. 2009; 1(1):37-46.
52. Rodrigues-Brandão I, Kleinowski AM, Einhardt AM, Lima MC, Amarante L, Peters JA, et al. Salicylic acid on antioxidant activity and betacyanin production from leaves of *Alternanthera tenella*. *Ciência Rural*. 2014 out; 44(10):1893-1898, doi: 10.1590/0103-8478cr20130873
53. Baghel SS, Shrivastava N, Baghel PARS, Rajput S. A review of quercetin: antioxidant and anticancer properties. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2016; 1(1):146-160.
54. Yang X, Zhu X, Ji H, Deng J, Lu P, Jiang Z, et al. Quercetin synergistically reactivates human immunodeficiency virus type 1 latency by activating nuclear factor-κB. *Molecular Medicine Reports*. 2018 fev; 17(2):2501-2508, doi: 10.3892/mmr.2017.8188
55. Singh G, Pai RS. Dawn of antioxidants and immune modulators to stop HIV-progression and boost the immune system in HIV/AIDS patients: An updated comprehensive and critical review. *Pharmacological Reports*. 2015; 67(3):600-605.

56. Pu W, Wang D, Zhou D. Structural Characterization and Evaluation of the Antioxidant Activity of Phenolic Compounds from *Astragalus taipai* and Their Structure-Activity Relationship. *Scientific Reports*. 2015; 5:13914.
57. Deng SP, Yang YL, Cheng XX, Li WR, Cai JY. Synthesis, Spectroscopic Study and Radical Scavenging Activity of Kaempferol Derivatives: Enhanced Water Solubility and Antioxidant Activity. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019 fev; 20(4):975, doi: 10.3390/ijms20040975
58. Fu J, Chenc K, Zhang ZM, Fang RQ, Zhu HL. Synthesis, structure and structure-activity relationship analysis of caffeic acid amides as potential antimicrobials. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2010 jun; 45(6):2638-2643.
59. Prasad Rajendra N, Karthikeyan A, Karthikeyan S, Reddy BV. Inhibitory effect of caffeic acid on cancer cell proliferation by oxidative mechanism in human HT-1080 fibrosarcoma cell line. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2010; 349(1-2):11-19, doi: 10.1007/s11010-010-0655-7
60. Bertoldi FC, Deschamps FC, Silva Junior AA, Correa AF, Franco MF, Eberlin MN. Validação de um método analítico rápido por CLAE-UV para determinação de cumarina em guaco (*Mikania glomerata* Sprengel) confirmado com espectrometria de massas. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. 2016; 18(1):316-325, 10.1590/1983-084X/15_160
61. Qin T, Fang F, Song M, Li R, Ma Z, Ma S. Umbelliferone reverses depression-like behavior in chronic unpredictable mild stress-induced rats by attenuating neuronal apoptosis via regulating ROCK/Akt pathway. *Behavioural Brain Research*. 2017; 15(317):147-156.
62. Lima FA, Sant'ana AEG, Ataíde TR, Omena CMB, Menezes MES, Vasconcelos SML. Café e saúde humana: um enfoque nas substâncias presentes na bebida relacionadas às doenças cardiovasculares. *Revista de Nutrição*. 2010 dez.; 23(6):1063-1073, doi: 10.1590/S1415-52732010000600012
63. Soares MJ. Avaliação do efeito da adição de ingredientes sobre os compostos fenólicos e a capacidade antioxidante de cápsulas de café expresso e sua bioacessibilidade [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2018.
64. Barreiros ALBS, David JM, David JP. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. 2006 jan./fev.; 29(1):113-123, doi: 10.1590/S0100-40422006000100021
65. Chendynski L. et al. Analysis of the formation of radicals in biodiesel in contact with copper and metallic alloys via electronic paramagnetic resonance (EPR). *Fuel*. 2019 abr; 242:316-322.

5. CONCLUSÃO

Na revisão sistemática com metanálise que avaliou a utilização de plantas medicinais, fitoterápicos e/ou fitofármacos associados ou não a terapia antiretroviral, utilizando como variável primária a contagem de linfócitos T CD4⁺, verificou-se que não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de intervenção e placebo, incluídos na pesquisa, em relação a qualquer das variáveis examinadas na contagem de Linfócitos T CD4⁺. Um dos fatores que pode ter influenciado é o pequeno número de estudos clínicos randomizados incluídos no estudo.

A partir do fracionamento biodirecionado pela atividade antirretroviral verificou-se uma maior atividade nas subfrações acetanólicas. Apesar de muito ativo (73,15% de inibição de TR), o extrato etanólico bruto promoveu citotoxicidade máxima de 100 ± 0 µg/mL. Seu fracionamento biodirecionado resultou nas frações mais ativas: subfração acetanólica água lavagem ácidos que promoveu 88,82%TR e citotoxicidade de $38,2 \pm 7,6$ até 100 µg/L. Merecem destaque a subfração acetanólica neutros com 60,98% de inibição de TR e o ácido elágico com 88,61% de inibição de TR e ausência de citotoxicidade. Verificou-se com o teste de citotoxicidade em linhagem de macrófagos que a fração clorofórmica foi mais tóxica que a fração acetanólica. A enzima 5TIQ obteve melhor parâmetro de afinidade com o ligante ácido elágico do que com ácido gálico que foi confirmado pelos espectros HSQC-¹H-¹³C.

A análise cromatográfica das amostras permitiu pela primeira vez a identificação e quantificação, dos compostos fenólicos: ácido gálico, catecol, ácido clorogênico, ácido vanílico, ácido caféico, vanilina, seringaldeído, ácido salicílico, ácido cumárico, cumarina, rutina, quercetina e Kaempferol. Verificou-se que com exceção do ácido clorogênico, ácido vanílico, ácido caféico e cumarina, as amostras apresentaram diferença significativa para as demais variáveis. Vale destacar o desempenho da amostra *L. pacari* fração CHCl₃ compostos neutros que apresentou valores médios elevados para catecol, vanilina, ácido salicílico, quercetina e Kaempferol.

A identificação e quantificação dos compostos fenólicos e a análise multivariada no estudo da composição fenólica e perfil antioxidante sugerem que a *L. pacari* pode ser promissora como agente terapêutico anti-HIV.

REFERÊNCIAS

- ALAMGIR, M.; UDDIN, S. J. Recent advances on the ethnomedicinal plants as immunomodulatory agents. **Ethnomedicine**, [S. l.], v. 37/661, n. 2, p. 227-244, 2010.
- ALBUQUERQUE, M. **Avaliação do perfil de resistência genotípica do HIV-1 aos antirretrovirais em crianças adolescentes em falha terapêutica em Goiás, no período de 2003 a 2015**. 2016. 181 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2016.
- ALI, H. et al. Evaluation of selected Sudanese medicinal plants for their in vitro activity against hemoflagellates, selected bacteria, HIV-1-RT and tyrosine kinase inhibitory, and for cytotoxicity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 83, n. 3, p. 219-228, dez. 2002.
- ALMEIDA, F. M.; ALVES, M. T. S. S. B.; AMARAL, F. M. M. Uso de plantas com finalidade medicinal por pessoas vivendo com HIV/ AIDS em terapia antirretroviral. **Saúde e Sociedade**, São Paulo, v. 21, n. 2, p. 424-434, abr./jun. 2012.
- AL-SNAFI, A. E. Bioactive componentes and pharmacological effects of *Canna indica*- An overview. **International Journal of Pharmacology & Toxicology**, [S. l.], v. 5, n. 2, p. 71-75, 2015.
- AQUINO, V. V. F. et al. Metabólitos Secundários e ação antioxidante de *Croton heliotripifolius* e *Croton blanchetianus*. **Acta Brasiliensis**, [S. l.], v. 1, n. 3, p. 1-62, set./dez. 2017.
- ARA, K. M.; KARAMI, M.; RAOFIE, F. Application of response surface methodology for the optimization of supercritical carbon dioxide extraction and ultrasound-assisted extraction of *Capparis sponosa* seeds oil. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 85, p. 173-182, jan. 2014.
- ARCHANA, S. J.; PAUL, R.; TIWARI, A. Indian medicinal plants: a rich source of natural immuno-modulator. **International Journal Pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 198-205, 2011.
- AUKRUST, P. et al. Disturbed glutathione metabolism and decreased antioxidants levels in human immunodeficiency virus-infected patients during highly active antiretroviral therapy – potential immunomodulatory effects of antioxidants. **The Journal of Infectious Diseases**, [S. l.], v. 188, n. 2, p. 232-238, 2003.
- AYISI, N. K.; NYADEDZOR, C. Comparative in vitro effects of AZT and extracts of *Ocimum gratissimum*, *Ficus polita*, *Clausena anisata*, *Alchornea cordifolia*, and *Elaeophorbium drupifera* against HIV-1 and HIV-2 infections. **Antiviral Research**, v. 58, p. 25-33, 2003.

AZEVEDO, F. A transcriptase reversa como **alvo terapêutico em doenças retrovirais**. 2013. 82 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2013.

BAPTISTA, V. I. C. S. et al. Fármacos de origem biotecnológica na terapêutica do vírus. **UNILUS Ensino e Pesquisa**, Santos, v. 13, n. 31, p. 18-28, abr./jun. 2016.

BASTOS, G. M. **Uso de preparações caseiras de plantas medicinais utilizadas no tratamento de doenças infecciosas**. 2007. 108 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

BESSONG, P. O. et al. Evaluation of selected South African medicinal plants for inhibitory properties against human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and integrase. **Journal of Ethnopharmacology**, [S. l.], v. 99, p.83-91, 2005.

BLANCO, J. L.; MARTINEZ-PICADO, J. HIV integrase inhibitors in ART-experienced patients. **Current Opinion in HIV & AIDS**, [S. l.], v. 7, n. 5, p. 415-421, 2012.

BORIN, D. B. et al. Ação do atazanavir sobre os parametros hemostáticos em modelo animal. **Disciplinarum Scientia**, Santa Maria, v. 9, n. 1, p. 1-7, 2008.

BOYLE, A; MOSS, C. E.; MARZOLINI, C.; KHOO, S. Clinical Pharmacodynamics, Pharmacokinetics, and Drug Interaction Profile of Doravirine. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 58, n. 12, p. 1553-1565, ago. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para manejo da infecção pelo HIV em crianças e adolescentes**. Brasília: Ministério da Saúde, 2018.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Secretaria de Vigilância em Saúde. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para profilaxia pré-exposição (PREP) de risco à infecção pelo HIV**. 2018.

CABRAL, P. R. F. PASA, M. C. Mangava-brava: Lafoensia pacari A. St.-Hil, (Lythraceae) e a etnobotânica em Cuiabá, MT. **Revista Biodiversidade**, [S. l.], v. 8, n.1, p. 2-21, 2009.

CARVALHO, I. et al. Introdução a modelagem molecular de fármacos no curso experimental de química farmacêutica. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 3, p. 428-438, maio 2003.

CARVALHO, P.E.R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidade e uso da madeira**. Brasília: EMBRAPA, CNPF. Colombo, 1994. 640p.

CATÃO, M. H. C. V. et al. Estudos clínicos com plantas medicinais no tratamento de afecções bucais: uma revisão de literatura. **UNOPAR Científica. Ciência Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 14, n. 4, p. 279-285, out. 2012.

CORRÊA, M. P.; PENNA, L. A. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**. Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1984.

COS, P. et al. Plant Substances as anti-HIV agents selected according to their putative mechanism of action. **Jornal of Natural Products**, [S. l.], v. 67, n. 2, p. 284-293, fev. 2004.

CRUNKHORN, S. Trial watch: HIV integrase inhibitor-based regimen beats market leader. **Nature Reviews Drug Discovery**, [S. l.], v. 11, n. 9, p. 664, 2012.

CRUVINEL, W. M. et al. Sistema Imunitário – Parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, São Paulo, v. 50, n. 4, p. 434-461, 2010.

CUNICO, W.; GOMES, C. R. B.; VELLASCO JUNIOR, W. T. HIV - recentes avanços na pesquisa de fármacos. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 8, p. 2111-2117, 2008.

DA CUNHA, A. P. et al. **Plantas na terapêutica - farmacologia e ensaios clínicos**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2007.

DAN, G.; CASTELLAR, A. Plantas medicinais com atividade antirretroviral. Alumni-**Revista Discente da UNIABEU**, Belford Roxo, v. 3, n. 6, ago./dez. 2015.

DE SOUZA, M. V. N.; DE ALMEIDA, M. V. Drogas anti-VIH: passado, presente e perspectivas futuras. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 3, p. 366-372, maio/jun. 2003.

DENNIS THOMAS, T.; YOICHIRO, H. *In vitro* propagation for the conservation of a rare medicinal plant *Justicia gendarussa* Burm. f. by nodal explants and shoot regeneration from callus. **Acta Physiologiae Plantarum**, [S. l.], v. 32, n. 5, p. 943-950, set. 2010.

DERESZ, L. F. et al. O estresse oxidativo e o exercício físico em indivíduos HIV positivo. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, Niterói, v. 13, n. 4, p. 275-279, 2007.

FANG, E. F.; WONG, J. H.; NG, T. B. Thermostable Kunitz trypsin inhibitor with cytokine inducing, antitumor and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from Korean large black soybeans. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, [S. l.], v. 109, n. 3, p.211-217, mar. 2010.

FERREIRA, R. C. S. **Avaliação da atividade antirretroviral de produtos Naturais**. 2010. 147 f. Tese (Doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2010.

FERREIRA, R. C. S., RIFFEL, A., SANT'ANA, A. E. G. HIV: mecanismo de replicação, alvos farmacológicos e inibição por produtos derivados de plantas. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 8, p. 1743-1755, nov. 2010.

FIRMO, W. C. A. et al. Estudo fitoquímico e avaliação da atividade antibacteriana de *Lafoensia pacari* (Lythraceae). **Publicatio UEPG Ciências Biológicas e da Saúde**, Ponta Grossa, v. 20, n. 1, p. 7-12, jan./jun., 2014.

FIRMO, W. C. A. et al. Determinação de compostos fenólicos e avaliação da atividade antioxidante de *Lafoensia pacari* (Lythraceae). **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiânia, v. 12, n. 1, p. 1–10, 2015.

FONNER, V. A. et al. Effectiveness and safety of oral HIV pre-exposure prophylaxis (PrEP) for all populations: a systematic review and meta-analysis. **AIDS**, [S.I.], v. 30, n. 12, p. 1973-1983, jul. 2016.

GALDINO, P. M. ***Lafoensia pacari* A. St. Hil**: Identificação de constituintes ativos e avaliação da atividade antidepressiva. 2015. 124 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

GÁRCIA-ZEBADÚA, J. C. et al. Inhibition of HIV-1 reverse transcriptase, toxicological and chemical profile of *Calophyllum brasiliense* extracts from Chiapas, México. **Fitoterapia**, [S. I.], v. 82, p. 1027-2034, 2011.

GONZÁLEZ-BLANCO, I. et al. Oxidant/antioxidant status in subjects with HIV infection in different clinical conditions. **Biomedicine & Aging Pathology**, [S. I.], v. 4, n. 3, p. 235-242, 2014.

GRAHAM, S. A. Fossil Records in the Lythraceae. **The Botanical Review**, [S. I.], v. 79, n. 1, p. 48-145, mar. 2013.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 24, n. 70, p. 81-98, 2010.

HARNETT, S. M.; OOSTHUIZEN, V.; VAN DE VENTER, M. Anti-HIV activities of organic and aqueous extracts of *Sutherlandia frutescens* and *Lobostemon trigonus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 4, n. 96(1-2), p.113-119, 2005.

HENRICH, T. J. Second example reported of a stem-cell transplant in the clinic leading to HIV remission. **Nature**, [S. I.], v. 568, p. 175-176, 2019.

HSIEH, P. W. et al. A new anti-HIV alkaloid, drymaritin, and a new c-glycoside flavonoid, diandraflavone, from *Drymaria diandra*. **Journal of Natural Products**, [S. I.], v. 67, n. 7, p.1175-1177, jul. 2004.

HUERTA-REYES, M. et al. HIV-1 Inhibitory compounds from *Calophyllum brasiliense* Leaves. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, [S. I.], v. 27, p.1471-5, 2004.

JIAO, L. et al. Characterization and immunostimulating effects on murine peritoneal macrophages of oligosaccharide isolated from *Panax ginseng* C.A. Meyer. **Journal Ethnopharmacology**, [S. I.], v. 144, n. 3, p. 490-496, dez. 2012.

KITAMURA, K. et al. Baicalin, an inhibitor of HIV-1 production in vitro. **Antiviral Research**, [S. l.], v. 37, n. 2, p.131-140, fev. 1998.

KLOS, M. et al. *In vitro* anti-HIV activity of five selected South African medicinal plant extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, [S. l.], v. 124, p. 182-188, jul. 2009.

LAM, S.-K.; NG, T. B. A proteinwithantiproliferative, antifungalandHIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from caper (*Capparis spinosa*) seeds. **Phytomedicine**, v. 16, n. 5, p.444-450, maio 2009.

LAZZAROTTO, A. R. D., L. F.; SPRINZ, E. HIV/AIDS e Treinamento Concorrente: a Revisão Sistemática. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, São Paulo, v. 16, n. 2, p. 149-154, maio/abr. 2010.

LEITE, I. A.; MARINHO, M. das G. V. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais em comunidade indígena no município de Baía da Traição-PB. **Biodiversidade**, [S. l.], v. 13, n.1, p. 82-105, 2014.

LIMA, D. C. S. **Avaliação das atividades genotóxica e antigenotóxica do extrato etanólico de *Lafoensia pacari* A. St-Hil em bactérias e camundongos**. 2012. 127 f. Dissertação (Mestrado em Biologia) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. 4ª ed., Nova Odessa: Editora Instituto Plantarum, 2002. v. 2.

MARQUES, G. S. et al. Plantas medicinais como alternativa terapêutica para aumento da resistência imunológica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 36, n. 1, p. 27-33, 2015.

MARTINS, T. A. et al. Cenário epidemiológico da infecção pelo HIV e AIDS no mundo. **Revista Fisioterapia & Saúde Funcional**, Fortaleza, v. 3, n. 1, p. 4-7, jan./jun. 2014.

MATSUSE, I. T. et al. A search for anti-viral properties in Panamanian medicinal plants. The effects on HIV and its essential enzymes. **Journal of Ethnopharmacology**, [S. l.], v. 64, n. 1, p. 15-22, jan. 1999.

MEDEIROS, B.; SILVA, J.; SALDANHA, A. A. W. Determinantes biopsicossociais que predizem qualidade de vida em pessoas que vivem com HIV/AIDS. **Estudos de Psicologia**, Natal, v. 18, n. 4, p. 543-550, out./dez. 2013.

MEIRA, R. M. S. **Anatomia foliar e estudos morfológicos em espécies de *Lafoensia* Vand. (Lythraceae) nativas do Brasil**. 2000. 259 f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Universidade de Campinas, Campinas, 2000.

MEIRELES, C. A. B. **Efavirenz versus Nevirapina**: Comparação da efectividade e do perfil de segurança, a longo prazo, no tratamento da infecção por vírus da imunodeficiência humana tipo 1. 2015. 246 f. Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas Emergentes) – Universidade de Lisboa, Lisboa, 2015.

MIN, B. S. et al. Inhibitory effects of Korean plants on HIV-1 activities. **Phytotherapy Research**, [S. l.], v. 15, n. 6, p. 481-6, 2001.

MONTEIRO, Simone Souza et al. Desafios do tratamento como prevenção do HIV no Brasil: uma análise a partir da literatura sobre testagem. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 5, p. 1793-1807, maio 2019.

MURI, E. M. F. Proteases virais: importantes alvos terapêuticos de compostos peptídeomiméticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 37, n. 2, p. 308-316, 2014.

NGONDI, J. L. et al. The effect of different combination therapies on oxidative stress markers in HIV infected patients in Cameroon. **AIDS Research and Therapy**, [S. l.], v. 22, p. 3-19, jul. 2006.

NOTKA, F.; MEIER, G.; WAGNER, R. Concerted inhibitory activities of *Phyllanthus amarus* on HIV replication in vitro and ex vivo. **Antiviral Research**, [S. l.], v. 64, n. 2, p.93-102, 2004.

NUNNARI, G.; SMITH, J. A.; DANIEL, R. HIV-1 Tat and AIDS-associated cancer: targeting the cellular anti-cancer barrier? **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, [S. l.], v. 27, n. 1, p. 1, maio 2008.

PATIL, A. K. et al. The Inophyllum, Novel Inhibitors of HIV- 1 Reverse Transcriptase Isolated from the Malaysian Tree, *Calophyllum inophyllum* Linn. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 36, n. 26, p.4131-4138, dez. 1993.

PEÇANHA, E. P.; ANTUNES, O. A. C.; TANURI, A. Estratégias farmacológicas para a terapia anti-AIDS. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 6b, p. 1108-1116, dez. 2002.

PEREIRA, L. O. M. et al. *Lafoensia pacari* A. St.-Hil.: Wound healing activity and mechanism of action of standardized hydroethanolic leaves extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 12, n. 219, p. 337-350, 2018.

PEREIRA, L. P. **Atividade anti-inflamatória de polissacarídeos isolados das plantas *Caesalpinia ferrea* e *Azadirachta indica***. 2011. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2011.

PIMENTEL, V. et al. Biodiversidade brasileira como fonte da inovação farmacêutica: uma nova esperança? **Revista do BNDES**, Rio de Janeiro, v. 43, p. 41-89, jun. 2015.

PORFÍRIO, Z. et al. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de *Lafoensia pacari* A. St.-Hil., Lythraceae, frente a bactérias multirresistentes de origem hospitalar. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 19, n. 3, p. 785-789, jul./set. 2009.

PORTO, M. P. et al. Avaliação tóxico-genética do extrato de *Lafoensia pacari* em células somáticas de *Drosophila melanogaster*. In: Congresso Brasileiro de

Genética, 54^o, Salvador, 2008. **Anais...** Salvador: Sociedade Brasileira de Genética, 2008.

RIBEIRO, D. A. et al. Potencial terapêutico e uso de plantas medicinais em uma área de Caatinga no estado do Ceará, nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 16, n. 4, p. 912-930, dez. 2014.

RODRIGUES, T. S. et al. Vulnerabilidades para o HIV/AIDS em pós-graduandos em saúde pública e da família no Piauí. **Revista UNINGÁ**, Maringá, v. 53, n. 2, p. 99-105, jul./set. 2017.

SANTOS, A. T. O. et al. Novos avanços relacionados ao HIV/AIDS. **Revista Enfermagem Contemporânea**, Salvador, v. 1, n. 1, p. 80-102, dez. 2012.

SANTOS, M. L. A.; ALBUQUERQUE, M. G.; BRITO, M. A. Integrase: Um Alvo Terapêutico Importante no Combate à Infecção HIV/AIDS. **Revista Virtual de Química**, Niterói, v. 6, n. 4, p. 937-954, mar. 2014.

SANTOS, S. C. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre: UFRGS, p. 615-644, 2007.

SARAFIANOS, S. G. et al. Structure and function of HIV-1 reverse transcriptase: molecular mechanisms of polymerization and inhibition. **Journal of Molecular Biology**, [S. l.], v. 385, n. 3, p. 693-713, 2009.

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, Niterói, v. 10, n. 4, p. 308-313, ago. 2004.

SEYFRIED, M. et al. Pectinas de plantas medicinais: características estruturais e atividades imunomoduladoras. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 18, n. 1, p. 201-214, jan./mar. 2016.

SHARMA, B. Oxidative Stress in HIV Patients Receiving Antiretroviral Therapy. **Current HIV Research**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 13-21, 2014.

SILVA, V. S. **Avaliação in silico de novos compostos bioativos para o tratamento da Síndrome de Imunodeficiência Adquirida Humana (AIDS): potenciais inibidores da transcriptase reversa (Tr) do HIV-1**. 2015. 142 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2015.

SILVA, J. B. **As práticas de uso de plantas medicinais e fitoterápicos por trabalhadores de saúde na atenção básica**. 2012. 157 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

SOLON, S. et al. Free radical scavenging activity of *Lafoensia pacari*. **Journal of Ethnopharmacology**, [S. l.], v. 72, n. 1-2, p.173–178, set. 2000.

SPRINZ, E. Uso de inibidores da integrase como agentes de primeira linha no tratamento da infecção pelo HIV. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, [S. l.], v. 2, n. 4, p. 99-106, ago. 2016.

TASCA, K. I. **Marcadores de ativação imune, inflamação crônica e estresse oxidativo em pessoas que vivem com o HIV/Aids**: a busca do melhor prognóstico. 2016. 135 f. Tese (Doutorado em Ciências Tropicais) – Universidade Estadual Paulista, 2016.

TIAN, R. R. et al. Anti-HIV-1 Activities of hemslecins A and B. **Chinese Journal of Natural Medicines**, [S. l.], v. 6, n. 3, p. 214-218, maio 2008.

TILTON, J. C.; DOMS, R. W. Entry inhibitors in the treatment of HIV-1 infection. **Antiviral Research**, [S. l.], v. 85, n. 1, p. 91-100, jan. 2010.

TSHIKALANGE, T. E. et al. *In vitro* anti-HIV-1 properties of ethnobotanically selected South African plants used in the treatment of sexually transmitted diseases. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, p.478-81, 2008.

UNAIDS. [online].19,5 mi estão em tratamento para HIV no mundo e mortes relacionadas à AIDS caem pela metade desde 2005, diz UNAIDS. Disponível em: <<https://unaid.org.br/2017/07/19-mi-em-tratamento-hiv-mortes-relacionadas-aids-caem-no-mundo/>>. Acesso em: 03 maio 2018.

VERLI, H.; BARREIRO, E. J. Um paradigma da química medicinal: a flexibilidade dos ligantes e receptores. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 1, p. 95-102, jan./fev. 2005.

WANG, R. et al. Anti-HIV-1 activities of extracts from the medicinal plant *Rhus chinensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 21, n. 105(1-2), p. 269-273, 2006.

WORADULAYAPINIJ, W.; SOONTHORNCHAREONNON, N.; WIWAT, C. *In vitro* HIV type 1 reverse transcriptase inhibitory activities of Thai medicinal plants and *Canna indica* L. rhizomes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 101, p.84-89, 2005.

XU, C. et al. Inhibitory effect of Schisandra chinensis leaf polysaccharide against L5178Y lymphoma. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 88, n. 1, p. 21-25, 2012.

YOUNAI, F. S. Thirty years of the human immunodeficiency virus epidemic and beyond. **International Journal of Oral Science**, [S. l.], v. 5, n. 4, p. 191–199, dez. 2013.