



UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI – URCA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - CCBS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA BIOLÓGICA – PPQB

RAÍSSA CRUZ OLIVEIRA

**ANÁLISE ESTRUTURAL E ESPECTROSCÓPICA, AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA E DE BOMBA DE EFLUXO DA MISTURA TRITERPÊNICA
 α,β -AMIRINA ISOLADA DA RESINA *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand**

RAÍSSA CRUZ OLIVEIRA

**ANÁLISE ESTRUTURAL E ESPECTROSCÓPICA, AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA E DE BOMBA DE EFLUXO DA MISTURA TRITERPÊNICA
 α,β -AMIRINA ISOLADA DA RESINA *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, da Universidade Regional do Cariri, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Química Biológica.

Orientador: Dr. Alexandre Magno Rodrigues Teixeira
Coorientador: Dr. Paulo Nogueira Bandeira

**Crato
2021**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI - URCA**

Oliveira, Raíssa Cruz

Análise estrutural e espectroscópica, avaliação da atividade antibacteriana e de bomba de efluxo da mistura triterpênica α,β -amirina isolada da resina *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand. 169 páginas.

Dissertação de Mestrado – Universidade Regional do Cariri - Centro de Ciências Biológica e da Saúde – Departamento de Química Biológica.

1. α,β -amirina 2.Espectroscopia 3.Atividade antibacteriana
I. Universidade Regional do Cariri – Centro de Ciências Biológica e da Saúde – Departamento de Química Biológica.

Termo de Autorização para Publicação de Teses e Dissertações Eletrônicas

Na qualidade de titular dos direitos de autor da publicação abaixo identificada, autorizo à Universidade Regional do Cariri – URCA, a disponibilizar por tempo indeterminado ao alcance do público a obra abaixo citada, através do site <http://bdtd.ibict.br/bdtd/>, bem como da rede mundial de computadores – Internet, sem pagamento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, conforme permissões assinaladas, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data, atendendo à Portaria Nº 13 de 15/02/2006 da CAPES.

Identificação do Material Bibliográfico:		(x) Dissertação	() Tese
Autor: Raíssa Cruz Oliveira			
CPF: 025.813.733-93		RG: 2003034068053	
Nacionalidade: Brasileira		Estado Civil: Solteira	
Endereço: Avenida Duque de Caxias, 153, Bairro: Centro			
CEP: 63100-390	Cidade: Crato	Estado: Ceará	
Fone/Celular: (88) 999267213	E-mail: yssinha_cruz@hotmail.com		
Título: Análise estrutural e espectroscópica, avaliação da atividade antibacteriana e de bomba de efluxo da mistura triterpênica α,β -amirina isolada da resina <i>Protium heptaphyllum</i> (Aubl.) Marchand.			
Orientador: Dr. Alexandre Magno Rodrigues Teixeira			
Coorientador: Dr. Paulo Nogueira Bandeira			
Membros da Banca: Dr. Hécio Silva dos Santos; Dr. Emmanuel Silva Marinho.			
Data da Defesa: 26/10/2021		Curso: Mestrado	
Área do Conhecimento: Química Biológica			
Palavras-Chave: Espectroscopia; α,β -amirina; Atividade antibacteriana; ADMET			
Agência de Fomento:			
Informações de Acesso ao Documento para publicação		(x) Acesso Total	() Acesso Parcial
Em caso de publicação parcial, especifique o(s) arquivo(s) e/ou capítulo(s) restrito(s):			

Crato, 06 de janeiro de 2022

Havendo concordância com a publicação eletrônica enviamos o(s) arquivo(s) em formato digital PDF da dissertação gerada a partir da versão final corrigida e aprovada pelo Orientador. A restrição (parcial ou total) poderá ser mantida por até dois anos a partir da data de autorização da publicação sob responsabilidade do Programa. A extensão deste prazo demandará justificativa formal apresentada será comunicada à CAPES.

Assinatura do Autor:

Raíssa Cruz Oliveira

Assinatura do Orientador:

Alexandre Magno Rodrigues Teixeira

RAÍSSA CRUZ OLIVEIRA

**ANÁLISE ESTRUTURAL E ESPECTROSCÓPICA, AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA E DE BOMBA DE EFLUXO DA MISTURA TRITERPÊNICA
 α,β -AMIRINA ISOLADA DA RESINA *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand**


Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Química Biológica, da
Universidade Regional do Cariri, como requisito
parcial para obtenção do Título de Mestre em
Química Biológica

Apresentação de defesa de Mestrado em: 26 de outubro de 2021.

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Alexandre Magno Rodrigues Teixeira
(Orientador / URCA)



Prof. Dr. Hécio Silva dos Santos
(Membro Titular / URCA)



Prof. Dr. Emmanuel Silva Marinho
(Membro Titular / UECE)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Maria Luiza e José Rodrigues, que são a minha base, pelo incentivo e apoio em todos os momentos. Tive a benção de seguir seus passos na escolha de minha profissão como educadora e desejo de corpo e espírito poder ter sido merecedora dos esforços dedicados por vocês em todos os aspectos. E ao meu querido e iluminado orientador, sem o qual não teria conseguido concluir este belo trabalho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus pela força, pela conclusão deste trabalho.

A minha mãe Maria Luiza, meu pai José Rodrigues, e aos meus irmãos e irmãs Luiza, Jorge, Mariana, Rodrigo, Fábio George e Ana Luiza por todo o incentivo, preocupação, conselhos e amor que foram essenciais para minha formação profissional e formação pessoal.

Ao meu anjinho Igor Kleber que com “a paciência de Jó” foi me guiando.

Ao meu querido orientador o Prof. Dr. Alexandre Magno Rodrigues Teixeira pela paciência, confiança e pelos seus ensinamentos que muito irão me ajudar no crescimento pessoal e profissional.

As minhas amigas Paloma, Sheylle, Deborah e Ranielle por minha ausência durante todo tempo de mestrado.

Ao coorientador o Prof. Dr. Paulo Nogueira Bandeira pelas medidas de Ressonância Magnética Nuclear da amostra e ao composto α , β - amirina deste projeto de mestrado, como também a todo o suporte durante o mestrado.

Ao professor Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho por disponibilizar o espaço do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LMBM), para a realização dos experimentos sobre atividade antibacteriana.

A banca examinadora de qualificação e defesa de mestrado composto pelos membros Dr. Hércio Silva dos Santos, Dr. Emmanuel Silva Marinho e Dr. Gilberto Dantas Saraiva pelas imensas contribuições para a melhoria deste trabalho.

Aos professores e professoras do Programa de Pós-Graduação em Química Biológica (PPQB), e todos os colegas de laboratório (LaSEMol) por serem sempre cordiais comigo e pelos momentos de alegria, harmonia e ensinamentos.

A todos os colegas da pós-graduação.

RESUMO

A espécie *Protium heptaphyllum* pertence à família Burseraceae, popularmente conhecido por “almecegueira ou breu-branco”, produz uma oleorresina que apresenta como constituinte o triterpeno pentacíclico, α,β -amirina. É conhecido que esta mistura binária isomérica possui um amplo espectro de atividade farmacológica, como analgésico, anticonvulsivo, antidepressivo, antipancréatico e antihiperglicêmico. No presente estudo, a estrutura molecular da α,β -amirina foi caracterizada por técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C , RMN bidimensional, espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier de refletância total atenuada (ATR-FTIR), Raman com transformada de Fourier (FT-Raman) e espectroscopia ultravioleta-visível (UV-Vis). Os espectros vibracionais, os orbitais moleculares de fronteira, e os descritores quânticos de reatividade global foram obtidos usando os cálculos baseado na Teoria do Funcional da Densidade (DFT). Os comprimentos de onda de absorção e as forças do oscilador para os três estados singletos desta mistura binária foram calculados usando a Teoria do Funcional da Densidade Dependente do Tempo (TD-DFT). Os parâmetros físico-químicos: constante de ionização (pKa), coeficiente de partição (log P), coeficiente de distribuição (log D), coeficiente de solubilidade (logS) e Área de Superfície Polar (PSA) foram preditos usando o programa Marvin JS da ChemAxon. O efeito cardiotoxico também foi avaliado usando a ferramenta computacional Pred-hERG. O comportamento farmacocinético das moléculas da α -amirina e β -amirina foi avaliado por estudos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção e toxicidade (ADMET). A atividade antibacteriana da mistura de α,β -amirina contra as cepas multirresistentes de *Escherichia coli* 06 e *Staphylococcus aureus* 10, e seu potencial como inibidora das bombas de efluxo de *Staphylococcus aureus* 1199B e K2068, portadoras das proteína de efluxo NorA e MepA, respectivamente foram também avaliadas. A partir do estudo das propriedades físico-químicas, foi possível inferir que os compostos α -amirina e β -amirina não possuem grupos ionizáveis em ambiente fisiológico. Eles são essencialmente lipofílicos e permanecem constantes entre pH 2-14. A partir do estudo das propriedades farmacocinéticas do AMDE, observou-se que a α -amirina e a β -amirina apresentaram valores que sugerem baixa absorção intestinal e não atingem o sistema nervoso central. Verificou-se também que apresentam menor risco de toxicidade hepática por ativação metabólica e não apresentam risco cardiotoxico. Foi observado que a α , β -amirina não apresenta atividade bacteriana direta clinicamente relevante. Entretanto, quando associada ao antibiótico gentamicina apresentou efeito sinérgico frente à cepa *S. aureus* 10. A α,β -amirina foi também capaz de inibir a ação da bomba de efluxo NorA contra o brometo de etídio. Portanto, a α,β -amirina também tem potencial para aumentar a atividade antibacteriana quando associada a antibiótico gentamicina, e ela é também uma forte candidata como inibidora da bomba de efluxo.

Palavras-chave: Espectroscopia; α,β -amirina; ADMET; Atividade antibacteriana; Bomba de efluxo.

ABSTRACT

The species *Protium heptaphyllum* belonging to the Burseraceae family, popularly known as "almecegueira or breu-branco", produces an amorphous oleoresin that presents as constituent the pentacyclic triterpene, α,β -amirin. It is known that this binary isomeric mixture possesses a broad spectrum of pharmacological activity, such as analgesic, anticonvulsant, antidepressant, antipancreatic and antihyperglycemic. In this study, the molecular structure of α,β -amirin was characterized by techniques of Nuclear Magnetic Resonance (NMR) of ^1H , and ^{13}C , and two-dimensional NMR, Fourier Raman Transform (FT-Raman) and Total Attenuated Reflectance Fourier Transform (ATR-FTIR) at room temperature. The vibrational spectra, the frontier molecular orbitals, and the global reactivity quantum descriptors were obtained using Density Functional Theory (DFT)-based computational calculations. The physicochemical parameters: ionization constant (pKa), partition coefficient (log P), distribution coefficient at pH 7.4 (log D7.4), solubility coefficient (log S) and Polar Surface Area (PSA) were predicted using ChemAxon's Marvin JS program. Afterwards, the compounds α -amyrin and β -amyrin were submitted to the prediction of the ADME pharmacokinetic properties using the SwissADME online server. The cardiotoxic effect was also evaluated using the Pred-hERG computational tool of the LabMol online server. The antibacterial activity of the mixture of α,β -amyrin against multidrug-resistant strains of *Escherichia coli* 06 and *Staphylococcus aureus* 10, and its potential as efflux pump inhibitor of *Staphylococcus aureus* 1199B and K2068 strains, carrying the efflux proteins NorA and MepA, respectively were also evaluated. From the study of the physical-chemical properties it was possible to infer that the α -amyrin and β -amyrin compounds do not possess ionizable groups in physiological environment. They are essentially lipophilic and remain constant between pH 2-14. From the study of the pharmacokinetic properties AMDE it was observed that the α -amyrin and β -amyrin had values that suggest low intestinal absorption and do not reach the central nervous system. It was also verified that they present lower risk of hepatic toxicity by metabolic activation, and do not present cardiotoxic risk. It is noted that the α,β -amyrin does not present clinically relevant direct bacterial activity. However, when it was associated with the gentamicin antibiotic it showed synergistic effect against *S. aureus* 10 strain. The α,β -amyrin was also able to inhibit the action of the NorA efflux pump against ethidium bromide. Therefore, the α,β -amyrin also has potential to increase antibacterial activity when it is associated to gentamicin antibiotic, and it is also a strong candidate as efflux pump inhibitor.

Keywords: Spectroscopy; α,β -amyrin; ADME; Antibacterial activity; Efflux pump

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1 – Fluxograma geral da dissertação.	23
Figura 2 – Fluxograma do manuscrito 1 intitulado “Structural, spectroscopic and <i>in silico</i> study of ADME property of a mixture α,β -amyrin obtained from the resin of <i>Protium heptaphyllum</i> resin.”.....	24
Figura 3 – Fluxograma do manuscrito 2 intitulado “ <i>In silico</i> and <i>in vitro</i> evaluation of efflux pumps inhibition of α,β amyrin”.....	25

Capítulo 2

Figura 1 - Estruturas moleculares dos compostos químicos (a) α -amirina (3 α -hidroxiurs-12-eno) e (b) β -amirina (3 β -hidroxiolean-12-eno) isoladas da resina bruta de <i>Protium heptaphyllum</i>	30
Figura 2 - Esquema de um espectrômetro de RMN	34
Figura 3 - Prótons equivalentes do 1-Bromopropano.....	35
Figura 4 - Frequência dos grupos de prótons para o 1-nitropropano	35
Figura 5 - Os prótons Ha e Hb do 1,1-dicloroetano são prótons acoplados; logo, seus sinais possuem a mesma constante de acoplamento $J_{ab}=J_{ba}$	36
Figura 6 - Tipos de espalhamento Raman elástico e inelástico.....	38
Figura 7 - Tipos de vibrações moleculares. Vibrações de deformação axial assimétrica e simétrica e vibrações de deformação angular dos tipos tesoura, torção, balanço e rotação.....	41
Figura 8 - Níveis de energia eletrônicas e transições.	42
Figura 9 - Mecanismo de ação dos antimicrobianos	55
Figura 10 - Mecanismos de resistência bacteriana.....	56

Capítulo 3

Figure 1. Chemical structures of α,β -amyrin isolated from raw <i>Protium heptaphyllum</i> resin.....	101
--	-----

Figure 2. The fragmentation mechanism justifying the fundamental peaks for α,β -amyrinmixture.....	102
Figure 3. Experimental infrared spectrum of the α,β -amyrin mixture and the calculated (scaled) infrared spectra of their chemical components, and of the isomeric mixture in the spectral regions of 3800–2500 cm^{-1} and in 1800–130 cm^{-1}	103
Figure 4. Experimental FT-Raman spectrum of the α,β -amyrin mixture and the calculated (scaled) infrared spectra of their chemical components, and of the isomeric mixture in the spectral regions of 3800–2600 cm^{-1} and in 1800–40 cm^{-1}	104
Figure 5. The frontier HOMO and LUMO orbitals for α -amyrin, β -amyrin and α,β -amyrin.....	105
Figure 6. Experimental UV absorption spectrum of α,β -amyrin (in black color), and fit for this curve (Peak sum of the three singlet states, in gray color) and the peak fit to each transition mode which is given in Table 5. These are: S1 singlet state, in cyan color (226 nm), S2 singlet state, in violet color (205 nm), and S3 singlet state, in olive color (194 nm). In the inset in the 190 -240 nm region consist of the experimental UV spectrum of α,β -amyrin (in black color).....	106
Figure 7. Cyclic voltammograms recorded at GC in: (dot line) PBS buffer, pH = 7.40, (solid line) 0.17 mM of α,β -amyrin (50% PBS buffer: 50% ethanol). Experimental conditions: $E_{\text{initial}} = E_{\text{final}} = -1000 \text{ mV}$; $E_{\lambda 1} = +1000 \text{ mV}$; (A) $\nu = 10 \text{ mVs}^{-1}$ and (B) $\nu = 100 \text{ mVs}^{-1}$	107
Figure 8. (A) ChemAxon logD values and (B) ChemAxon logS values with the pH variation of α -amyrin (blue curve) and β -amyrin (red curve); (C) BOILED-Egg graph with the human intestinal absorption (HIA) and blood-brain barrier (BBB) models by the WlogP and PSA descriptors. (D) Probability map of cardiotoxic effect with positive (green) and negative (pink) fragments for inhibition of hERG channels.....	108
Graphical Abstract	109
Capítulo 4	
Figure 1. Molecular structures of the α,β -amyrin compounds: (a) α -amyrin (3 α -hidroxiurs-12-eno) and (b) β -amyrin (3 β -hidroxiolean-12-eno).....	152
Figure 2. Effect of the α,β -amyrin in association with ampicillin, ciprofloxacin, and gentamicin against the multidrug-resistant bacterial strain of <i>S. aureus</i> 10.....	153
Figure 3. Effect of the α,β -amyrin in association with ampicillin, ciprofloxacin, and gentamicin against the multidrug-resistant bacterial strain of <i>E. coli</i> 06.....	153

Figure 4. Effect of the α - β -amyrin in association with ciprofloxacin, and ethidium bromide on the MepA efflux pump. Each result presents the geometric mean of three MIC values of simultaneous experiments. The data were analyzed with two-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Bonferroni's post-test. $p < 0.0001$ vs control. CCCP = Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone.....	154
Figure 5. Effect of the α - β -amyrin in association with norfloxacin, and ethidium bromide on the NorA efflux pump. Each result represents the geometric mean of three MIC values of simultaneous experiments. The data were analyzed with two-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Bonferroni's post-test. $p < 0.0001$ vs control. CCCP = Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone.....	154
Figure 6. Complex of interaction of the MepA efflux pump receptor with the ligands (A); Map of hydrophobic interactions of the drug ciprofloxacin (B), the ligand α -amyrin (C) and β -amyrin (D) with the MepA efflux pump.....	155
Figure 7. Complex of interaction of the NorA efflux pump receiver with the ligands (A); Map of hydrophobic interactions of the α - β -amyrin ligand (B), the drug norfloxacin (C) and the α , β -amyrin ligand (D) with the NorA efflux pump.....	156
Figure 8. (A) Lipophilic surface map (logP) and (B) Golden triangle to estimate the permeability potential of the α - and β -amyrin compounds.....	157
Figure 9. Graph of the expected lethal doses for the different routes of administration.....	157

•

SUPPLEMENTARY MATERIAL

MANUSCRITO 1

Figure S1. ^{13}C NMR spectrum (75 MHz, CDCl_3) for α,β -amyrin mixture	116
Figure S2. ^1H NMR spectrum (300 MHz, CDCl_3) for α,β -amyrin mixture	116
Figure S3. $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY (75 MHz, CDCl_3) spectrum for α,β -amyrin mixture	117
Figure S4. $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ 2D-HSQC (75 MHz, CDCl_3) spectrum for α,β -amyrin mixture.....	117
Figure S5. $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ 2D-HMBC (75 MHz, CDCl_3) spectrum for α,β -amyrin mixture	118
Figure S6. (A) Chromatogram for α,β -amyrin mixture. (B) Mass spectra for α -amyrin, and (C) Mass spectra for β -amyrin	119
Figure S7. Optimized molecular structures obtained at B3LYP/6-311++G(d,p) level of theory for (a) α -amyrin, (b) β -amyrin, and (c) α,β -amyrin	119
Figure S8. Experimental ATR-FTIR spectrum of α,β -amyrin.	120
Figure S9. Experimental Raman spectrum of α,β -amyrin.....	120
Figure S10. UV absorption spectra (experimental and calculated) of α,β -amyrin.....	121

MANUSCRITO 2

Table S1- Protein sequence of MepA and NorA	162
Figure S1: 2D map of the interactions involved in the formation of the complexes α -amyrin / mepA (A), β -amyrin/MepA (B) and Ciprofloxacin/MepA (C)	163
Figure S2: 2D map of the interactions involved in the formation of the complexes α -amyrin / NorA (A), β -amyrin/ NorA (B) and Ciprofloxacin/ NorA (C)	163

LISTA DE TABELAS

Capítulo 3

Table 1. ^1H NMR and ^{13}C NMR data of α,β -amyrin mixture in CDCl_3	110
Table 2. Correlations of ^1H x ^{13}C [HMBC – ^nJCH ($n = 2$ and $n = 3$) of the α,β -amyrin mixture in CDCl_3	111
Table 3. Experimental wavenumbers (cm^{-1}) of the Raman and infrared bands of the α,β -amyrin mixture and assignment for their vibrational modes.....	112
Table 4. Quantum chemical parameters for α -amyrin, β -amyrin, and α,β -amyrin.....	113
Table 5. Electronic absorption spectral data (experimental and calculated) of α,β -amyrin.....	113
Table 6. Predicted physicochemical and pharmacokinetic properties of α -amyrin and β -amyrin: pKa (ionization constant); NaN (Non-ionizable atoms); ClogP (ChemAxon partitioning coefficient); WlogP (Wildman partitioning coefficient); ClogD _{7.4} (ChemAxon distribution coefficient at pH 7.4); ClogS (ChemAxon solubility coefficient); PSA (Polar Surface Area); HIA (Human Intestinal Absorption); BBB (Blood-Brain Barrier penetration); P-gp (P-glycoprotein substrate).....	114
Table 7. Prediction of the metabolism by the CYP450 inhibition and cardiotoxicity by the hERG channel inhibition for α -amyrin and β -amyrin.....	114

Capítulo 4

Table 1. Bacterial source and antibiotic resistance profile.....	158
Table 2. Interactions between the MepA with the α -amyrin, β -amyrin, and ciprofloxacin.....	158
Table 3. Interactions between the NorA with the α -amyrin, β -amyrin, and norfloxacin.....	159
Table 4. Medicinal chemistry and SAR properties from amyirin analogs.....	160
Table 5. Acute rodent toxicity of different administration routes of LD ₅₀ by the QSAR models of the GUSAR Online tool.....	160

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

HBA	Aceptores de ligações de hidrogênio
ADME	Absorção, distribuição, metabolismo e excreção
PSA	Área de superfície polar
BBB	Barreira Hematoencefálica
Log P	Coefficiente de partição
Log S	Coefficiente de Solubilidade
<i>J</i>	Constante de acoplamento
Log D	Constante de Distribuição
Log D _{7,4}	Constante de Distribuição em pH 7,4
pKa	Constante de Ionização
HBD	Doadores de ligação de hidrogênio
CYP450	Enzimas do citocromo P450
hERG	Gene Humano Relacionado ao éter-a-go-go
P-gp	Glicoproteína P
IR	Infravermelho
ATR-FTIR	Infravermelho com Transformada de Fourier por Refletância Total Atenuada
UV-vis	Espectroscopia no Ultravioleta Visível
PPB	Ligação às proteínas plasmáticas
Rot B	Ligações rotativas
WlogP	Lipofilicidade
BOILED-Egg	<i>Permeação do Brain Or IntestinaL EstimateD</i>
MW	Peso Molecular
FT-Raman	Raman com Transformada de Fourier
RO5	Regra dos Cincos Lipinski
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SNC	Sistema Nervoso Central
DFT	Teoria Fundamental da Densidade
CCCC	Carbonil cianida m-clorofenilhidrazona
CPZ	Clorpromazina
EtBr	Brometo de etídio

CIM	Concentração Inibitória Mínima
MFS	<i>Major facilitator superfamily</i>
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
SMR	<i>Small multidrug resistance</i>
RND	<i>Resistance nodulation cell division</i>
MATE	<i>Multidrug and toxic compound extrusion</i>
AMY	α , β -amirina
PRO	Prolina
LEU	Leucina
ILE	Isoleucina
PHE	Fenilalanina
SER	Serina
GLU	Glutamato (Ácido Glutâmico)
TYR	Tirosina
THR	Treolina
ARG	Arginina
VAL	Valina

SUMÁRIO

1. CAPÍTULO 1- INTRODUÇÃO GERAL	19
1.1 Objetivos e questionamentos	19
1.2 Estratégias de pesquisa	20
1.3 Estrutura da dissertação.....	23
2. Capítulo 2 - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	26
2.1 UTILIZAÇÃO DOS PRODUTOS NATURAIS	26
2.1.1 <i>Protium</i> (BURSERACEAE)	26
2.1.2 <i>Protium heptaphyllum</i> (Aubl.) Marchand	27
2.1.3 Terpenos.....	28
2.1.4 Estrutura química dos compostos α -amirina e β -amirina	29
2.1.5 Atividades farmacológicas do composto α , β -amirina	31
2.2 ESPECTROSCOPIA	33
2.2.1 Ressonância Magnética Nuclear	33
2.2.1.1 Número de sinais no espectrômetro de RMN ^1H	34
2.2.1.2 Posições relativas dos sinais de RMN ^1H	35
2.2.1.3 Constante de acoplamento	36
2.2.2 Espectroscopia no Infravermelho	36
2.2.3 Espalhamento Raman	37
2.2.4 Vibrações Moleculares	39
2.2.5 Espectroscopia no Ultravioleta-Vísivel (UV-Vis)	41
2.3 ESTUDO ADME	43
2.3.1 Farmacocinética.....	43
2.3.2 Propriedades farmacocinéticas ADME	44
2.3.2.1 Absorção	44
2.3.2.1.1 Regra dos cinco Lipinski (RO5)	45
2.3.2.1.2 Constante de Distribuição em pH 7,4 (Log $D_{7,4}$)	46
2.3.2.1.3 Constante de Ionização (pKa)	46
2.3.2.2 Distribuição	47
2.3.2.2.1 Coeficiente de Solubilidade (Log S)	48

2. 3. 2. 3 Metabolismo e Excreção	48
2. 3. 2. 4 Biodisponibilidade	49
2. 3. 2. 5 Barreira Hematoencefálica (BBB)	50
2. 3. 3 Efeito Cardiotóxico	51
2.4. ATIVIDADE ANTIBACTERIANA	51
2. 4. 1 <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	51
2. 4. 2 Uso indiscriminado de antibióticos	53
2. 4. 3 Antibióticos	53
2. 4. 4 Mecanismos de resistência bacteriana	55
2. 4. 5 Bombas de Efluxo (NorA e MepA)	56
2. 4. 6 Inibidores de bomba de efluxo	58
REFERÊNCIAS	60
3. CAPÍTULO 3 – MANUSCRITO 1	77
Manuscrito: Spectroscopic, physicochemical, and pharmacokinetic analysis of α , β -amyrin mixture obtained from <i>Protium heptaphyllum</i> (Aubl.) Marchand resin	
4. CAPÍTULO 4 – MANUSCRITO 2	122
Manuscrito: <i>In silico</i> and <i>in vitro</i> evaluation of efflux pumps inhibition of α , β -amyrin	
5. CAPÍTULO 5 - CONSIDERAÇÕES FINAIS	164
5. 1 Discussão Geral.....	164
5. 2 Conclusões Gerais.....	166
5. 3 Perspectivas	166
ANEXOS - PRODUÇÃO ACADÊMICA.....	168

1.Capítulo 1- INTRODUÇÃO GERAL

1.1 OBJETIVOS E QUESTIONAMENTOS

A biodiversidade tem se provado como uma fonte promissora de insumos farmacêuticos ativos, particularmente quanto à finalidade farmacêutica e à sua utilização em produtos medicinais. Neste contexto, os oleorresinas, cujas fontes vegetais são amplamente distribuídas na região Amazônica, têm-se revelado muito versáteis para aplicações farmacológicas (IBGE, 2010). Desse modo, a busca por substâncias bioativas que podem ser encontrados nessas oleorresinas é um campo de destaque na ciência brasileira, visto que o Brasil abriga a maior biodiversidade do planeta.

Os triterpenos pentacíclicos são de grande interesse devido às diversas atividades biológicas apresentadas, servindo como candidatos ou protótipos na descoberta e na produção de novos medicamentos (ALVARENGA; FERRO, 2005).

A espécie *Protium heptaphyllum* Aubl. pertencente à família Burseraceae, é popularmente conhecida por "almecegueira", produtora de uma resina, cuja o constituinte principal é uma mistura triterpênica de nome α,β -amirina. Suas atividades farmacológicas já conhecidas são analgésica, anticonvulsivante, antidepressiva, antiinflamatório, antipancreática e antihiperglicêmica (NOGUEIRA *et al.*, 2018). Entretanto, uma atividade biológica ainda pouco explorada é seu potencial antibacteriano.

A resistência bacteriana aos antibióticos de uso clínico vem crescendo de forma acelerada em todo o mundo, sendo de conhecimento que o principal mecanismo de resistência é o sistema de bombas de efluxo. Para controlar a resistência bacteriana se tem adotado a associação de antibióticos com substâncias capazes de inibir estas bombas. Existem diversas substâncias que já foram identificadas como inibidores de bombas de efluxo, tais como os compostos triterpênicos (STAVRI; PIDDOCK; GIBBONS, 2007).

Estudo de docagem molecular são realizados após descoberta de nova atividade biológica inerente, com a finalidade de modelar a interação entre molécula e proteína, o que nos permite caracterizar o comportamento de moléculas no local de ligação das proteínas alvo (MCCONKEY; SOOLEY; EDELMAN 2002). O que se trata ser de muito valor quando se testa um composto formado por misturas isoméricas.

A espectroscopia é o principal instrumento para a identificação e elucidação estrutural de compostos orgânicos (LOPES, 2004; TEIXEIRA *et al.*, 2018). Possibilitando caracterizar possíveis compostos bioativos, os quais os resultados são de crucial importância para os centros

de pesquisas, visto que as propriedades físico-químicas de compostos são decorrentes de alterações estruturais que podem influir na atividade biológica (FRAGA, 2001).

Um desafio na descoberta de compostos bioativos é o tempo prolongado para que o composto recém-sintetizado se torne um agente terapêutico comercializável (PAN *et al.*, 2013; AKKARI *et al.*, 2016). Um caminho alternativo para redução do tempo seria a análise de compostos bioativos executada através de computador (*in silico*) para selecionar e eliminar compostos com propriedades ADME (absorção, distribuição, metabolismo e excreção) indesejáveis e selecionar os candidatos mais promissores ainda na fase inicial da pesquisa (RALLABANDI *et al.*, 2020).

Neste trabalho foi realizado um estudo sistemático sobre as propriedades estruturais e vibracionais da mistura binária isomérica α,β -amirina, o qual foi caracterizadas por espectroscopias no ultravioleta-visível (UV-Vis), espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), Raman com Transformada de Fourier (FT-Raman) e infravermelho com Transformada de Fourier por Refletância Total Atenuada (ATR-FTIR). Adicionado a estudo *in silico* de propriedades ADME e atividade antibacteriana, moduladora e inibidora de bomba de efluxo da mistura α,β -amirina obtida da resina de *Protium heptaphyllum*. Juntamente com a investigação da propriedade de biodisponibilidade moleculares desejáveis para o desenvolvimento de novos fármacos.

Os questionamentos iniciais para realização deste trabalho se resumem a: Qual o número de onda e a intensidade banda da mistura binária α,β -amirina? Quais as bandas Raman e IR (infravermelho) semelhantes entre o composto α,β -amirina e seus constituintes químicos isolados? Quantas e quais bandas Raman e IR são mais significativas/principais no espectro vibracional do composto? Para os espectros experimentais, há uma diferença significativa nas intensidades ou nos números de onda com respeito a técnica empregada ser espectroscopia no IR, ou no de espalhamento Raman? A mistura α,β -amirina tem ação antibacteriana direta? Tem capacidade de modular a ação de antibióticos frente a bactérias multirresistentes ou portadoras de bomba de efluxo? Pode ser utilizado como um inibidor de bomba de efluxo? A mistura α,β -amirina possui viabilidade para se tornar um fármaco?

1.2 ESTRATÉGIAS DE PESQUISA

Na dissertação foi utilizada as técnicas espectroscópicas conhecidas: infravermelho, espalhamento Raman, ultravioleta-visível (UV-Vis) e de ressonância magnética nuclear (RMN) para caracterização molecular da α,β -amirina. Posteriormente o comportamento

farmacocinético da mistura α,β -amirina foi avaliado por estudos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção e toxicidade (ADMET).

A espectroscopia na região do infravermelho apresenta diversas aplicações entre elas pode-se citar áreas como a detecção química, imagem biológica e caracterização de materiais onde é possível por meio das técnicas espectroscópicas analisar moléculas pequenas até sistemas mais complexos (BERTHOMIEU; HIENERWADEL, 2009; JONES *et al.*, 2019).

O infravermelho é comumente encontrado em muitos laboratórios de pesquisa no qual é possível utilizar a amostra em estado sólido, amorfo ou cristalino, soluções aquosas, solventes orgânicos, filmes, pastilhas de KBr e membranas (MANTSCH; CHAPMAN 1996; FORATO *et al.*, 2010).

Com a espectroscopia Raman, através de uma luz dispersa, analisa-se as vibrações moleculares que podem fornecer informações sobre a estrutura, ligações moleculares, simetria e ambiente eletrônico, possibilitando um estudo quantitativa e qualitativa dos compostos (DAS; AGRAWAL, 2011).

A espectroscopia de RMN é uma técnica da química analítica utilizada não só para determinar as estruturas de moléculas, mas também para verificar o teor da pureza de uma determinada amostra, acompanhar o rendimento de uma reação de síntese e analisar quantitativamente amostras contendo misturas de compostos cuja estrutura é conhecida. Portanto, a espectroscopia RMN é uma das ferramentas mais poderosas para elucidar a estrutura de espécies orgânicas e inorgânicas (PAULI; JAKI; LANKIN, 2005).

A espectroscopia UV-vis tem sido amplamente utilizada para facilitar a análise qualitativa e quantitativa. A aplicação desta técnica podendo ser utilizada na verificação de ingredientes farmacêuticos e na estabilidade de compostos. Dependendo da estrutura do composto analisado, as informações fornecidas pelo UV-vis podem variar detalhes estruturais ou eletrônicos (EDWARDS; ALEXANDER, 2017).

Em se tratando ao estudo ADME. Para que um composto químico seja elevado a um composto bioativo é necessário que se satisfaçam alguns critérios relacionados a esse estudo que são os seguintes: i) o composto deve apresentar relativa estabilidade em meio ácido e básico; ii) possuir a característica de ser hidrossolúvel para facilitar sua distribuição pela corrente sanguínea; iii) apresentar uma relativa lipossolubilidade para atravessar a membrana celular; iv) possuir boa disponibilidade dentro das células (OLIVEIRA, 2004).

A absorção gastrointestinal e o acesso ao sistema nervoso cerebral são dois comportamentos farmacocinéticos cruciais ao processo de descoberta de fármacos. Para tanto, o método de permeação do Brain Or IntestinaL EstimateD (BOILED-Egg) é proposto como um

modelo preditivo preciso que funciona através de cálculo da lipofilicidade e polaridade de moléculas. As previsões de permeação cerebral e intestinal são obtidas dos mesmos por dois descritores físico-químicos. O BOILED-Egg é comumente aplicado em filtragem de bibliotecas químicas nas etapas iniciais da descoberta de drogas, até a avaliação de candidatos a medicamentos para desenvolvimento (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2016).

A regra dos cinco Lipinski (RO5) descreve propriedades moleculares importantes para a farmacocinética de um medicamento no corpo humano, não apenas a absorção, mas também a distribuição, metabolismo e excreção. Uma regra que vem se mostrando ser apropriada para estipular algumas propriedades físico-químicas necessárias para que as drogas apresentem boa solubilidade em água e permeabilidade intestinal, características essenciais para a disponibilidade oral (LIPINSKI, 1997). Portanto, a regra RO5 é considerado como condição necessária, para que uma molécula se torne um medicamento.

A atividade antibacteriana direta da α,β -amirina, sendo utilizada a metodologia de acordo com a CLSI (2019) com algumas alterações, para isto foi utilizada placas de 96 poços e ao final do teste pode se obter o valor da Concentração Inibitória Mínima (CIM) das substâncias utilizadas no trabalho, ou seja, a menor concentração da α,β - amirina capaz de inibir o crescimento bacteriano.

As bombas de efluxo presentes em bactérias são proteínas transmembrana que conseguem realizar a extrusão de substâncias tóxicas para o exterior da célula bacteriana (ALEKSHUN; LEVY, 2007). Exemplos dessas bombas de efluxo são as bombas NorA e MepA presente em cepas de *Staphylococcus aureus* 1199B e K2068, respectivamente. Uma forma de tentar reverter esse mecanismo de resistência é a pesquisa de Inibidores de Bomba de Efluxo.

Para avaliar se α,β - amirina interfere no mecanismo de bomba de efluxo de *S. aureus* foi utilizada a metodologia proposta por Oliveira-Tintino (2016), faz-se uso de uma microdiluição seriada, no entanto neste teste é utilizado inibidores padrões de bomba como a carbonil cianida m-clorofenilhidrazona (CCCP) e a Clorpromazina (CPZ), e também o corante tóxico brometo de etídio, que é utilizado para confirmação da bomba nas bactérias testadas através da redução da CIM deste composto (ROCHA *et al.*, 2021).

Para verificar a interação entre a α - e β - amirina e as bombas de efluxo MepA e NorA presentes nas bactérias, a técnica de docagem molecular foi utilizada. A docagem molecular é frequentemente utilizada na concepção de drogas porque tem a capacidade de prever a melhor conformação entre pequenas moléculas e os sítios de ligação das proteínas (ALONSO; BLIZNIUK; GREASY, 2006). E por fim, foi analisado as propriedades de Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade (ADMET) da mistura do presente estudo.

1.3 ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

Figura 1 – Fluxograma geral da dissertação.

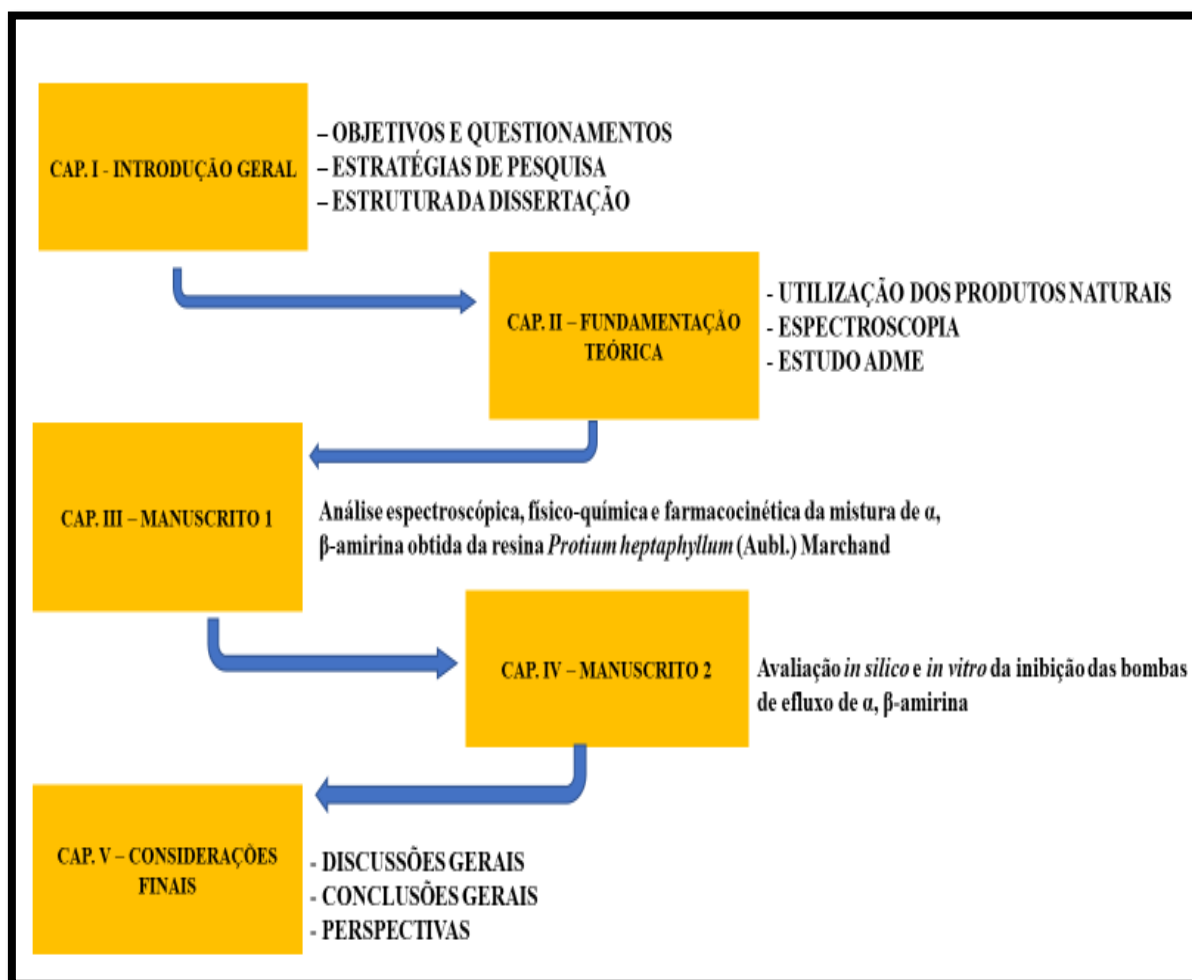


Figura 2 – Fluxograma do manuscrito 1 intitulado “Structural, spectroscopic and *in silico* study of ADME property of a mixture α,β -amyrin obtained from the resin of *Protium heptaphyllum* resin.”

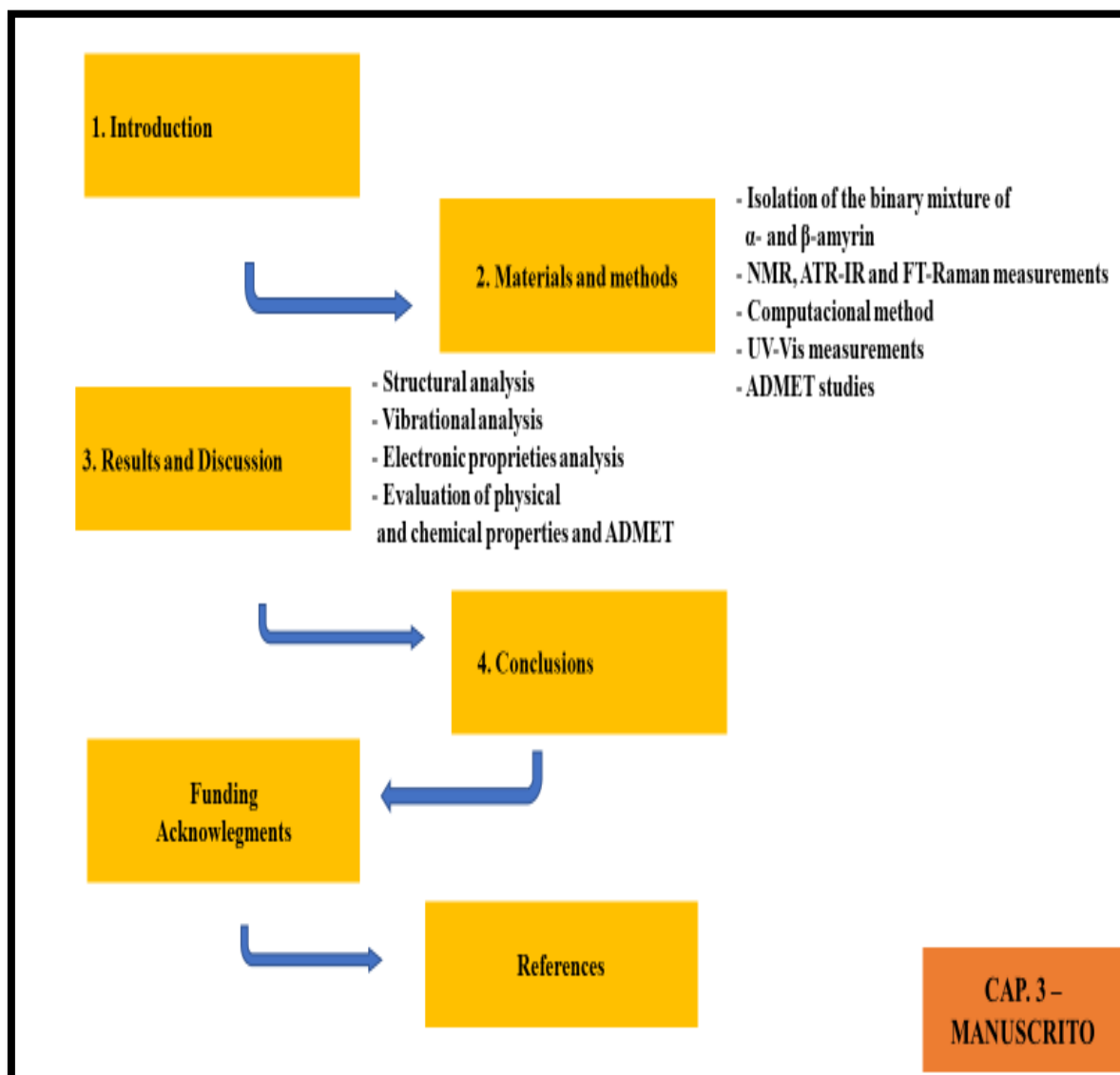
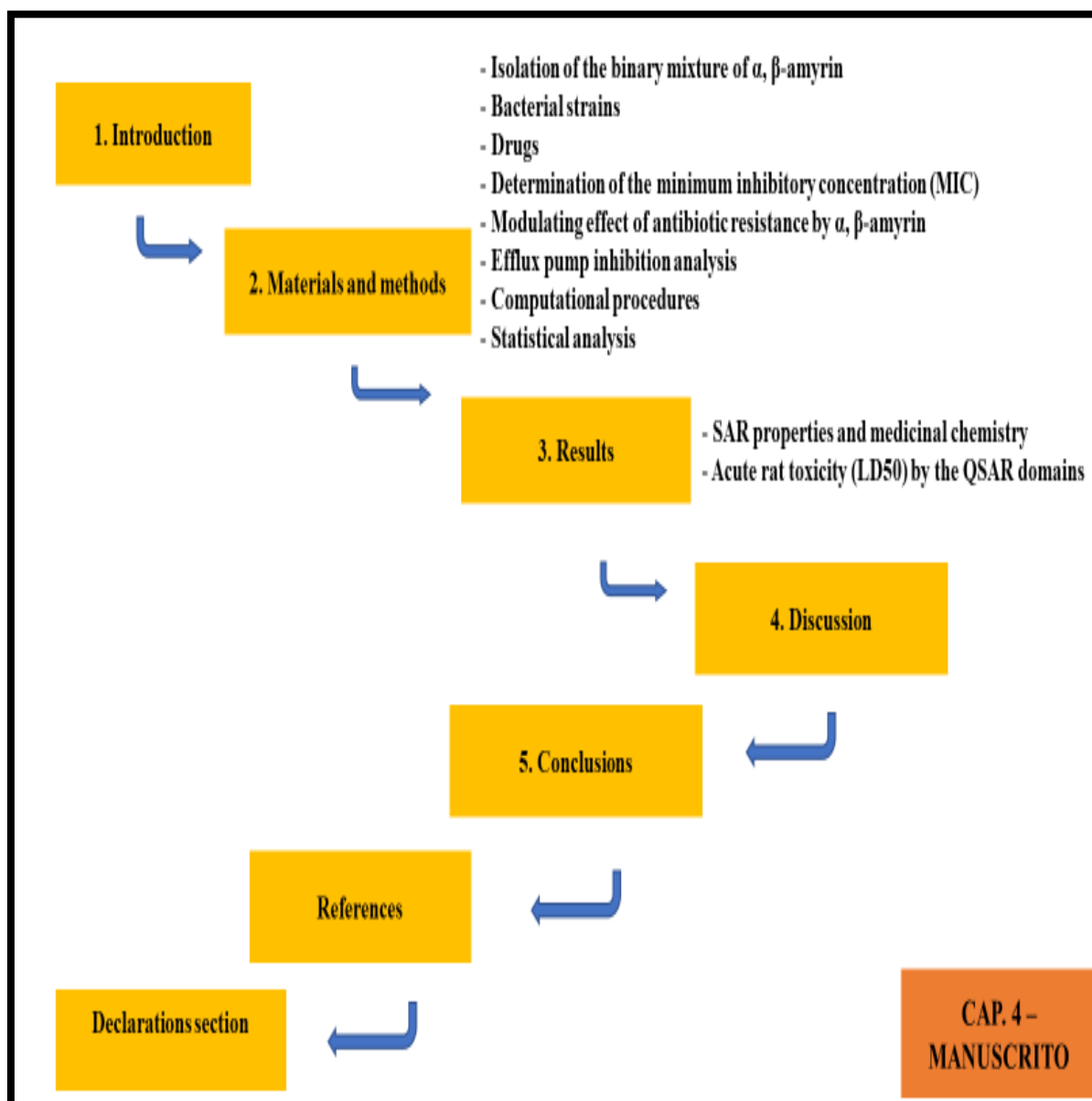


Figura 3 – Fluxograma do manuscrito 2 intitulado “*In silico* and *in vitro* evaluation of efflux pumps inhibition of α,β -amyrin”



2. Capítulo 2 - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 UTILIZAÇÃO DOS PRODUTOS NATURAIS

O uso de produtos derivados da natureza é reflexo de anos combatendo as várias enfermidades, as quais, a humanidade vem sofrendo. De princípio utilizando cascas, sementes, frutas, folhas e raízes (UGARIOGU; DURU; ABAH, 2020).

Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) preconiza que países em desenvolvimento, cerca de 65 a 80 % da população dependem especialmente dos oriundos da natureza na assistência primária à saúde (NOGUEIRA *et al.*, 2018), em virtude de sua disponibilidade, custo acessível e facilidade na manipulação (DUTRA *et al.*, 2016; VIEIRA-JÚNIOR; DE SOUZA; CHAVES, 2005).

Todo o conhecimento adquirido pelo homem foi passando de geração em geração. Sabe-se que civilizações antigas, como os chineses, egípcios, indianos, gregos, romanos e os escravos, conhecidos pelos seu profundo conhecimento sobre inúmeras plantas medicinais. Essas informações se acumularam e foram transmitidas para outras nações, e ao chegar na Idade Média uma quantidade ampla de saberes foram documentados descrevendo o uso e os procedimentos de cura com estas plantas (ŠANTIĆ *et al.*, 2017).

É a partir do século XIX que a fitoterapia teve seu maior avanço, devido ao avanço científico na área da química, o que permitiu analisar, identificar e isolar os princípios ativos das plantas. Desta forma, a eficácia dos produtos naturais é um fato que vem sendo cada vez mais elucidado pela comunidade científica, legitimando o conhecimento guardado desde as antigas civilizações (MONTEIRO; BRANDELLI, 2017).

2.1.1 *Protium* (Burseraceae)

A família Burseraceae distribuída na América do Sul e no continente africano é composta aproximadamente por 750 espécies difundidas em 19 gêneros (DALY; FINE; MARTÍNEZ-HABIBE, 2012). O Brasil contém 7 gêneros e 104 espécies espalhadas em vários biomas brasileiros: Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica (BFG, 2015; REFLORA, 2020).

Estima-se que no território brasileiro, cerca de 80% das espécies da família Burseraceae, pertencem ao gênero *Protium*, por essa razão, é considerado o principal e o mais importante gênero da família (SIANI *et al.*, 2004).

Plantas do gênero *Protium* possuem na casca, dutos produtores de resina que quando lesionados secretam um exsudado translúcido amarelo à branco e de aroma agradável. Espécie do gênero provocam grande interesse comercial, em virtude da produção de resinas e óleo essenciais por parte dos seus exemplares. Diante do exposto, a espécie *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand foi a escolhida para o estudo em questão (LANGENHEIM, 2003; NOGUEIRA *et al.*, 2018).

2.1.2 *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand

A espécie *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand pertence à família Burseraceae, localizada em solo arenoso úmido ou seco, podendo alcançar 10-20 metros de altura. Encontrada na América do Sul e facilmente distribuída na floresta amazônica, é conhecida popularmente como almecega, breu branco-verdadeiro, almecegueira cheirosa, almecegueira vermelha ou almecegueiro bravo (MOBIN *et al.*, 2016).

Plantas do gênero *Protium* possuem na casca dutos produtores de oleorresina que quando lesionados secretam um exsudado, imediatamente ao entrar em contato com o ar ou luz endurecem por evaporação e oxidação das essências, resultando em uma colocação transparente ou translúcida, pouco solúveis em água, inflamáveis e de aroma agradável (LANGENHEIM, 2003; OLIVEIRA, 2005.).

A oleorresina de *P. heptaphyllum* ganhou atenção específica devido à sua composição química e atividade farmacológica diversificada. Comumente utilizada na medicina popular por possuir atividade antiinflamatória, antimicrobiana, analgésico, cicatrizante, estimulante; obstruções das vias respiratórias, bronquite, tosse, dor de cabeça; na produção industrial de verniz; na calafetação de embarcações; incenso em rituais cerimônias religiosas (MAIA *et al.*, 2001; LORENZI; MATOS, 2008).

Diferentes trabalhos relatam a composição química um tanto diferenciada na resina da espécie. A disparidade na composição é consequência dos locais de coleta onde são obtidos e das diferentes condições climáticas do local de crescimento da espécie, resultando a necessidade de caracterizar os constituintes antes de qualquer estudo sobre potencial farmacológico (VIEIRA *et al.*, 2014).

Um estudo descritivo elaborado por Rudiger & Veiga-Junior (2013), avaliou a quimiodiversidade das oleorresinas de 23 espécies amazônicas de Burseraceae, teve como conclusão que os triterpenos pentacíclicos, α -amirina e β -amirina, estavam presentes nas oleorresinas de todas as 23 amostras analisadas.

Em relação a composição química de substâncias na forma de mistura presentes na oleorresina, o estudo realizado por Vieira-Júnior *et al.* (2005), permitiu a identificação de sete constituintes triterpênicos da resina *Protium heptaphyllum*, distribuídos em três misturas: α -amirina e β -amirina; breína e maniladiol; lupenona, α -amirinona e β -amirinona.

Já Siani *et al.* (2012), descreve o achado do seu estudo com amostras de oleorresina bruta de 10 espécies de *Protium*, relatando que as resinas eram constituídas exclusivamente por triterpenos, apresentando uma predominância comum de quatro compostos, α -amirina, β -amirina, α -amirinona e β -amirinona, e em concentração menores breína, maniladiol, α -elemólico e β -elemólico.

Estudos científicos revelam a presença majoritária da mistura isomérica de triterpenóides pentacíclicos, α -amirina e β -amirina, pertencentes às subclasses ursano e oleano, respectivamente (MAIA *et al.*, 2000; BANDEIRA *et al.*, 2001; BANDEIRA *et al.*, 2006; DIAS; HAMERSKI; PINTO, 2011; RÜDIGER; VEIGA-JUNIOR, 2013; DE LIMA *et al.*, 2016).

Os terpenos têm despertado um grande interesse na pesquisa de novos fármacos em razão do seu potencial farmacológico, com inúmeras atividades terapêuticas já descritas em relatórios de pesquisas apontando as modificações estruturais nos terpenos como sendo um potencializador da relação entre a estrutura química e sua atividade biológica (SOLDI *et al.*, 2008).

2. 1. 3 Terpenos

Os terpenos são amplamente distribuídos na natureza e frequentemente encontrados em abundância nas plantas superiores, também podem ser produzidos por animais e micro-organismos, como fungos e bactérias (DVORA; KOFFAS, 2013).

Os terpenos, repetidamente referidos como "terpenóides", são de amplo interesse para humanidade devido a sua extensa utilização nas indústrias farmacêutica, alimentícia, agrícola e cosmética (PICHERSKY; RAGUSO, 2018).

Com valores estimados em mais de 80.000 compostos já conhecidos até o momento, e muitos ainda suspeitos de existirem, os terpenóides compreendem a maior e mais diversa classe química, estrutural e funcional de produtos químicos nos organismos vivos (CHRISTIANSON, 2017). Possuindo funções que incluem hormônios, componentes dos sistemas de transferência de elétrons, agentes de modificação de proteínas, determinantes de fluidez de membrana, antioxidantes e muitos outros (PICHERSKY; RAGUSO, 2018).

Quimicamente, os terpenos podem ser definidos como alcenos, isto é, apresentam uma dupla ligação entre carbonos (C=C) sendo caracterizados como um hidrocarboneto insaturado (MCMURRY, 2011). Embora apresentem diferenças estruturais entre si, todos os terpenos são basicamente formados em unidades de isopreno (C₅H₈), o que caracteriza a chamada “regra do isopreno” (LOMMIS; CROTEAU, 2014).

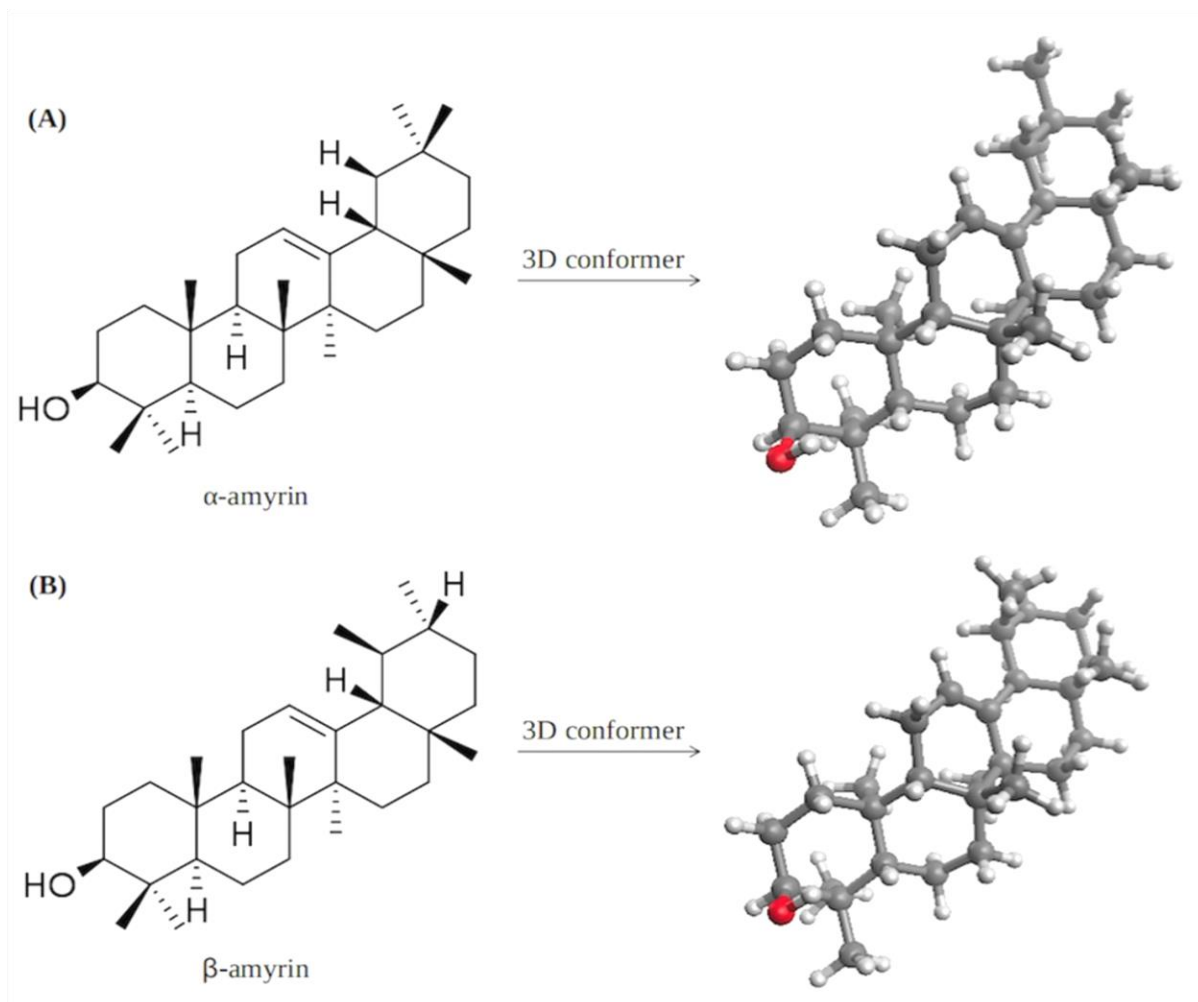
Durante o processo de formação dos terpenóides, as unidades de isopreno são adicionadas, e o número de unidades incorporadas em cada terpenóide é a base para a classificação desses compostos. De tal modo, temos os monoterpenos formados por duas unidades de isopreno; os sesquiterpenos contendo três unidades de isopreno; os diterpenos com quatro unidades de isopreno; os triterpenos compostos por seis unidades; e tetraterpenos carotenóides com oito unidades (NOGUEIRA *et al.*, 2018).

Em se tratando das classes di- e triterpenos, têm característica de baixa volatilidade e ambas são tidas como os componentes principais de oleorresinas, um exsudato constituído basicamente de óleo essencial e resina – obtida de uma variedade de diferentes espécies vegetais (HARTMANN, 2007).

2.1.4 Estrutura química dos compostos α -amirina e β -amirina

A mistura do presente estudo são representantes da classe triterpenos pentacíclicos, α -amirina e β -amirina, e são pertencentes ao grupo ursano e oleanano, respectivamente. Os dois compostos possuem estruturas com trinta átomos de carbono (30C) e cinco anéis (pentacíclicos) hexagonais (Figura 1), com uma estereoquímica dos anéis D/E na forma *cis*, onde sua diferenciação está na posição dos seus grupos metilo posicionados do anel E: no ursano um metilo encontra-se em C-19 e outro está em C-20, no oleanano situa-se os dois metilo no C-20 (SIMÕES *et al.*, 2007).

Figura 1: Estruturas moleculares dos compostos químicos de (a) α -amirina (3 β -hidroxiurs-12-eno) e (b) β -amirina (3 β -hidroxiolean-12-eno) isoladas da resina bruta de *Protium heptaphyllum*.



Fonte: Elaborada pelo autor

Os compostos em questão podem ser encontrados em várias plantas e materiais vegetais, como folhas, cascas, madeira e resinas. O isolamento dos compostos alvos deve obedecer aos seguintes passos: o material vegetal é geralmente seco, depois moído em pó e peneirado; as extrações são realizadas com solventes tipo diclorometano, clorofórmio, n-hexano e metanol; separação por cromatografia em camada delgada; o material resultante pode ser submetido diretamente à análise. Para a quantificação de amirinas em plantas, comumente são utilizados técnicas de cromatografia gasosa e cromatografia em camada delgada (NOGUEIRA *et al.*, 2018).

2.1.5 Atividades farmacológicas do composto α , β -amirina

Nos últimos anos, estudos empregando diferentes modelos experimentais com a resina de *P. heptaphyllum* e seu componente principal, α , β -amirina (AMY) têm descrito uma variedade de propriedades bioativas (CARVALHO *et al.*, 2017).

Segundo Aragão *et al.* (2006), analisando testes de campo aberto, labirinto em cruz elevado, rota rod, natação forçada e tempo de sono induzido por pentobarbital, elaborados em camundongos, foram evidenciados os efeitos sedativos, ansiolíticos e antidepressivos demonstrados pela mistura de AMY, que possivelmente envolve tanto o sistema GABAérgico quanto o noradrenérgico.

Bem como a atividade anticonvulsivante de AMY, também foi demonstrada em modelos experimentais, onde revelou-se que a atividade está relacionada ao sistema GABAérgico e pode estar ligada à inibição da cascata de sinalização da Proteína Quinase C e ainda a alterações no metabolismo de aminoácidos (ARAGÃO *et al.*, 2015).

Posteriormente, um novo estudo para avaliar agora o efeito da administração de AMY na atividade locomotora de camundongos pelo teste de campo aberto, obteve como resultado que o AMY diminuiu a atividade locomotora dos animais acompanhada por uma diminuição dos níveis de serotonina e norepinefrina no córtex cerebral, esse efeito locomotor é revertido por drogas que bloqueiam o adrenoceptor α -2 (ARAGÃO *et al.*, 2018).

Já Otuki *et al.* (2005) em sua pesquisa concluiu que a mistura de AMY produziu antinocicepção periférica, espinhal e supraespinhal consistente em roedores, principalmente quando avaliada em modelos inflamatórios de dor. Entretanto, os mecanismos envolvidos em sua ação não são completamente compreendidos, mas pode envolver a inibição das vias sensíveis à proteína quinase A e à proteína quinase C.

Além disso, o AMY provou efeitos analgésicos periféricos e centrais independentes do sistema opioide, como também mostrou ser um potente agente antiinflamatório. Para a atividade antiinflamatória sugere um envolvimento potencial de prostaglandinas e inibições do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (ARAGÃO *et al.*, 2007).

Na busca por novos compostos naturais eficazes contra a nocicepção visceral, a mistura de triterpenóides α - e β -amirina, isolada de *Protium heptaphyllum* resina, foi avaliada em dois modelos de camundongos estabelecidos de nocicepção visceral. Os camundongos foram pré-tratados por via oral com AMY ou veículo, e as respostas comportamentais relacionadas à dor à ciclofosfamida intraperitoneal ou ao óleo de mostarda intracolônica foram analisadas.

Concluindo, os resultados indicam que o AMY tem um efeito indutor de analgesia, possivelmente envolvendo o potencial receptor transiente vaniloide 1 e um mecanismo opioide (LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2006).

Em outro estudo, o objetivo foi avaliar o potencial antiinflamatório de AMY em ratos com periodontite de fase aguda. Seus resultados fornecem evidências de que o AMY adia a inflamação aguda em modelos de periodontite em ratos e fornece resultado para estudos adicionais sobre sua eficácia na prevenção da perda óssea associada à periodontite crônica (HORLANDA PINTO *et al.*, 2008).

Outro estudo com modelo experimental de pancreatite induzida por L-arginina confirmou que a AMY tem potencial para atuar como agente antiinflamatório e antioxidante (MELO *et al.*, 2010). E com modelo experimental de pancreatite aguda induzida por ceruleína, conclui-se também que AMY melhora a pancreatite aguda por atuar como um agente antiinflamatório e antioxidante (MELO *et al.*, 2011). A atividade antioxidante do isolado AMY da espécie *Myrcianthes pungens* também foi confirmada (CARDOSO *et al.*, 2018).

Experimentos elaborados por Matos *et al.* (2013) avaliou os efeitos antiinflamatórios do AMY na colite induzida por dextran sulfato de sódio em camundongos, os resultados mostraram que o tratamento preventivo ou terapêutico oral com AMY reduziu significativamente a atividade da doença, a perda de peso corporal, o dano colônico, bem como as atividades da mieloperoxidase colônica e da N-acetilglucosaminidase.

Os efeitos gastropotetor (OLIVEIRA *et al.*, 2004) e hepatoprotetor (OLIVEIRA *et al.*, 2005) foram demonstrados para a AMY indicando que o mecanismo gastroprotector envolve a ativação de neurónios aferentes primários sensíveis à capsaicina e para o efeito hepatoprotetor pode ser devido à diminuição do stress oxidativo e formação de metabolitos tóxicos como prováveis mecanismos envolvidos na sua atividade biológica.

Já outro estudo investigou os efeitos de AMY no nível de açúcar no sangue e perfil lipídico em ratos diabéticos normais e induzidos por estreptozotocina, e em ratos alimentados com uma dieta com alto teor de gordura. Logo, os resultados refletem os potenciais efeitos anti-hiperglicêmicos e hipolipemiantes da mistura amirina e sugerem ser um composto líder para o desenvolvimento de drogas eficazes no diabetes e aterosclerose (SANTOS *et al.*, 2012).

Estudo realizado por Prabhakar *et al.* (2017) investigou o efeito α -amirina sobre a síndrome metabólica induzida por dieta rica em frutose em ratos e obteve como resultado que a substância atenua as alterações provocada pela síndrome metabólica de maneira dependente da dose. Além disso, outro ensaio reforçou a informação que AMY pode ser utilizada para

reduzir a obesidade induzida com alto teor de gordura e distúrbios associados por meio da modulação das respostas enzimáticas, hormonais e inflamatórias (CARVALHO *et al.*, 2017).

Diante do exposto sobre a variabilidade descrita nos estudos científicos apresentados, é um consenso os efeitos positivos da AMY, demonstrando ser um candidato promissor para o desenvolvimento de fármacos. No entanto, a falta de relatórios sobre a toxicidade e farmacocinética da AMY obtidos a partir de *P. heptaphyllum* deve ser enfatizada, pois é necessário conhecer a segurança deste composto para admitir a sua utilização em ensaios clínicos com seres humanos.

2.2 ESPECTROSCOPIA

A espectroscopia é a ciência de análise da interação entre a radiação eletromagnética e a matéria que objetiva a determinação da configuração dos níveis de energia, incluindo os níveis de energia eletrônico, vibracional e rotacional, tanto de átomos quanto de moléculas. Por meio dessa técnica pode-se obter informações quanto à estrutura molecular de átomos e moléculas como também suas ligações químicas. A radiação eletromagnética quando incide sobre a matéria pode promover uma transição entre estados energéticos (SALA, 2008).

2.2.1 Ressonância Magnética Nuclear

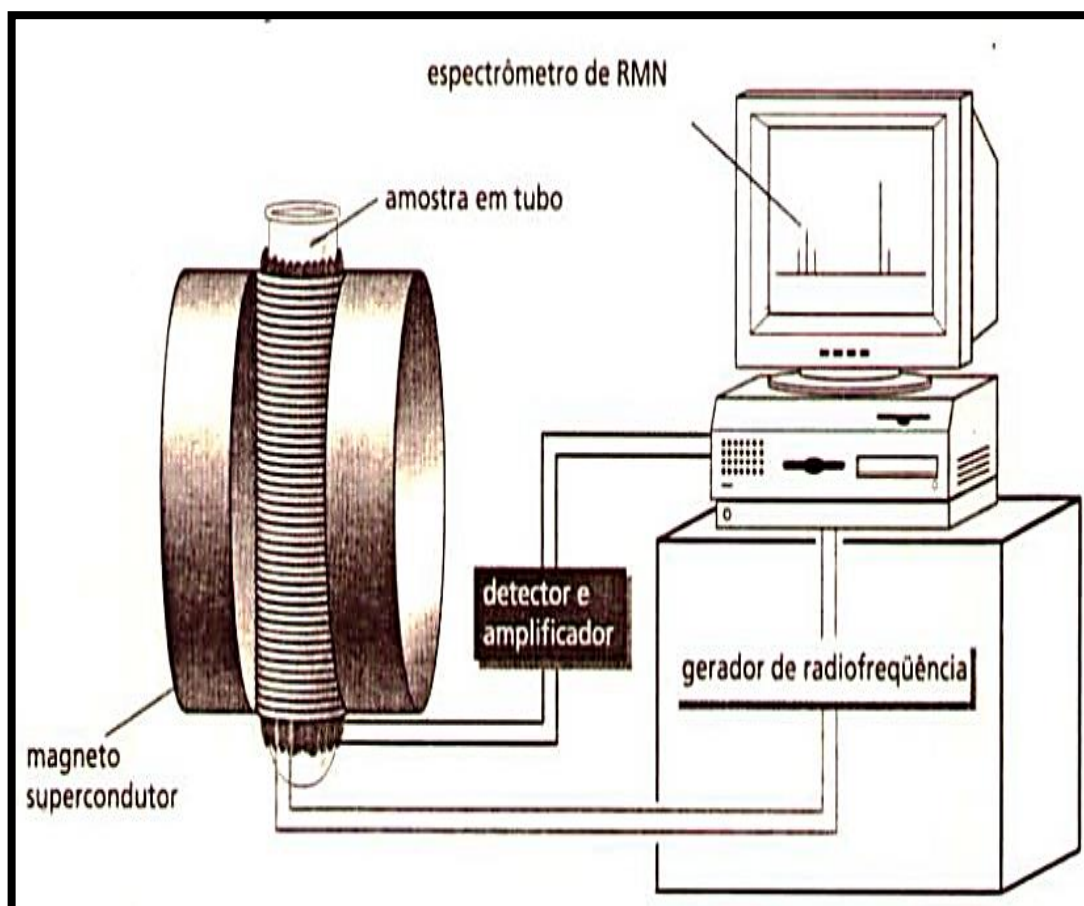
A ressonância magnética nuclear (RMN) é uma técnica espectroscópica no qual vários núcleos podem ser estudados, mas os mais comumente disponíveis são o hidrogênio (H) e o carbono (C). Enquanto a espectroscopia no infravermelho descreve os grupos funcionais presentes em determinada molécula, o RMN oferece informações sobre o número de átomos magneticamente distintos do isótopo de estudo. Por exemplo, quando se estuda os núcleos de hidrogênio (prótons), é possível determinar cada um dos tipos diferentes de prótons não equivalentes, assim como obter informações a respeito da natureza do ambiente. Informações parecidas também podem ser obtidas com o estudo do carbono (^{13}C) (PAVIA, 2010).

O fenômeno da ressonância magnética nuclear ocorre quando núcleos alinhados com um campo magnético aplicado são induzidos a absorver energia e a mudar a orientação de *spin* em relação ao campo aplicado. A absorção de energia é um processo quantizado, e a energia absorvida deve ser igual à diferença de energia entre os dois estados envolvidos (PAVIA, 2010).

Para se obter um típico espectro desse tipo deve-se diluir a substância em uma pequena quantidade de solvente e pôr a solução em um tubo de ensaio. Ao girar o tubo com a substância

o qual foi posta dentro de um campo magneticamente forte pode-se estimar a posição das moléculas no campo magnético e obter o espectro de RMN (BRUICE, 2006). O processo que foi descrito para obtenção dos espectros de RMN acima pode ser visualizado na Figura 2.

Figura 2 - Esquema de um espectrômetro de RMN

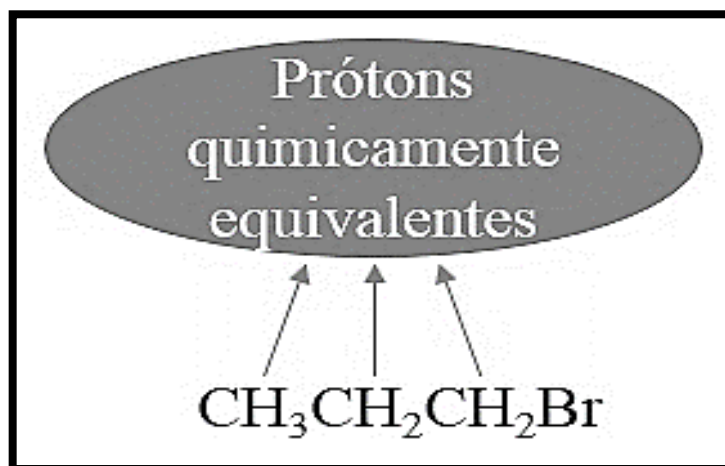


Fonte: BRUICE, 2006.

2.2.1.2 Número de sinais no espectrômetro de RMN ^1H

Os prótons de um mesmo ambiente são chamados prótons quimicamente equivalentes. Por exemplo, podemos observar na Figura 3 que o 1-bromopropano possui três conjuntos diferentes de prótons equivalentes. Os três prótons do grupo metila são quimicamente equivalentes devido à rotação sobre a ligação C-C. Os dois prótons metilênicos no carbono central são quimicamente equivalentes, e os dois prótons metilênicos no carbono ligado ao átomo de bromo formam o terceiro grupo de prótons quimicamente equivalentes (BRUICE, 2006).

Figura 3 - Prótons equivalentes do 1-Bromopropano.

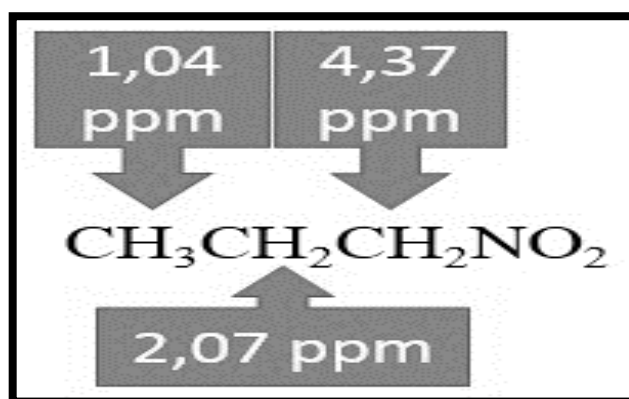


Fonte: BRUICE, 2006.

2.2.1.3 Posições Relativas dos sinais de RMN ^1H

O espectro de RMN ^1H do 1-nitropropano apresenta três sinais porque a substância possui três tipos diferentes de prótons. Quanto mais próximos os prótons estão do grupo nitro puxador de elétrons, menos blindados estão em relação aos campos magnéticos aplicados: portanto, maior é a frequência na qual seus sinais aparecerão. Dessa forma, podemos observar na Figura 4, os prótons mais próximos do grupo nitro apresentam um sinal em frequência mais alta (4,37 ppm), e os prótons mais afastados do grupo nitro apresentam um sinal em frequência mais baixa (1,04 ppm) (BRUICE, 2006).

Figura 4 – Frequência dos grupos de prótons para o 1-nitropropano

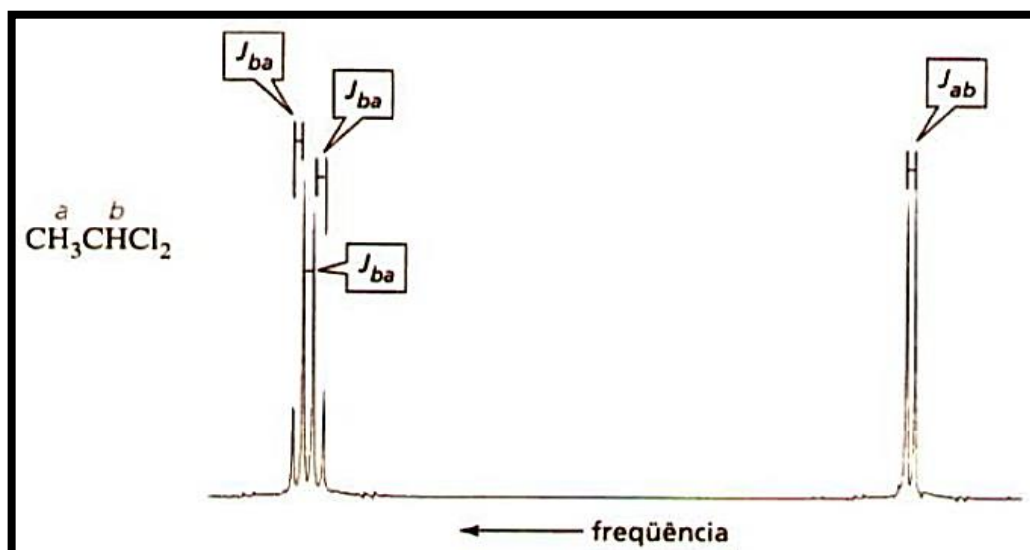


Fonte: BRUICE, 2006.

2.2.1.4 Constante de Acoplamento

A distância em hertz, entre dois picos vizinhos de um sinal de RMN desdobrado é chamado constante de acoplamento (J) que é uma medida de quão intensamente um núcleo é afetado pelos estados de spin de seu vizinho. A constante de acoplamento de H_a sendo desdobrado por H_b é denotada J_{ab} . Os sinais de prótons acoplados possuem a mesma constante de acoplamento, em outras palavras $J_{ab}=J_{ba}$ como visto na Figura 5. Constantes de acoplamento são úteis na análise de espectros de RMN complexos porque os prótons em carbonos adjacentes podem ser identificados por constantes de acoplamento idênticas (BRUICE, 2006).

Figura 5 - Os prótons H_a e H_b do 1,1-dicloroetano são prótons acoplados; logo, seus sinais possuem a mesma constante de acoplamento $J_{ab}=J_{ba}$.



Fonte: BRUICE, 2006.

2.2.2 Espectroscopia no Infravermelho

Na espectroscopia infravermelho, as moléculas ao absorverem radiação começam a se excitar para atingir um estado de maior energia. O processo de absorção de energia é quantizado, permitindo então que uma determinada molécula absorva apenas determinadas frequências específicas (energias), e sejam selecionadas, as mesmas equivalendo à diferença entre dois níveis energéticos distintos. A radiação na faixa de frequências do infravermelho médio que se estende de 400 a 4000 cm^{-1} , corresponde a uma faixa de energia a qual engloba frequências vibracionais de estiramento e deformação angular das ligações da maioria dos compostos mais covalentes (PAVIA, 2008).

As frequências de radiação que são absorvidas no processo de absorção correspondem a frequências vibracionais naturais de uma dada molécula, sendo que a energia que foi absorvida serve para aumentar a amplitude dos movimentos vibracionais das ligações da molécula. Apenas ligações que possuem momento de dipolo que mudam em uma função de tempo são capazes de absorver a radiação no infravermelho (SALA, 2008).

O espectro infravermelho de uma dada substância apresenta grande número de bandas de absorção características que confirmam a presença ou ausência de determinados grupos funcionais. As bandas de absorbância ou transmitância no infravermelho observados nos espectros podem ser caracterizados por seu número de onda, intensidade, comprimento de onda e energia (PRINCE *et al.*, 2001; BARBOSA, 2007).

Ao comparar espectros infravermelhos de duas moléculas as quais pareçam idênticas, pode-se descobrir se de fato são, se compararmos os seus espectros e estes aparentarem ter os mesmos valores (PAVIA *et al.*, 2008). Além de servir como impressão digital para moléculas, a espectroscopia no infravermelho fornece informações estruturais de determinada molécula, e as absorções de cada tipo de ligação são encontradas em regiões do espectro vibracional (LARKIN, 2011).

2.2.3 Espalhamento Raman

Com a espectroscopia Raman, através de uma luz dispersa, analisa-se as vibrações moleculares que podem fornecer informações sobre a estrutura, ligações moleculares, simetria e ambiente eletrônico, possibilitando um estudo quantitativa e qualitativa dos compostos (DAS; AGRAWAL, 2011).

A irradiação de uma molécula com luz monocromática resulta sempre em dois tipos de dispersão de luz, a dispersão elástica e a inelástica. No espalhamento elástico, não ocorre alteração na frequência do fóton ou no seu comprimento de onda e energia. Esse espalhamento é conhecido como Rayleigh, que corresponde à luz dispersa na mesma frequência da radiação incidente (TAVARES, 2020). Já no espalhamento inelástico ocorre uma mudança na frequência de fótons devido à excitação molecular, de tal forma que o fóton pode perder ou ganhar alguma quantidade de energia (LEWIS; EDWARDS, 2001).

O espalhamento Raman depende da radiação espalhada, este efeito fornece informações sobre os estados quânticos moleculares através do espalhamento provocado pelo choque de fótons com as moléculas da amostra analisada. É um modo indireto de obter os espectros vibracionais, transportando para a região do visível, informações que seriam obtidas

rotineiramente no infravermelho. O espalhamento Raman é nada mais que, um espalhamento do tipo inelástico de uma radiação eletromagnética monocromática que interage com o alvo (SALA, 1996).

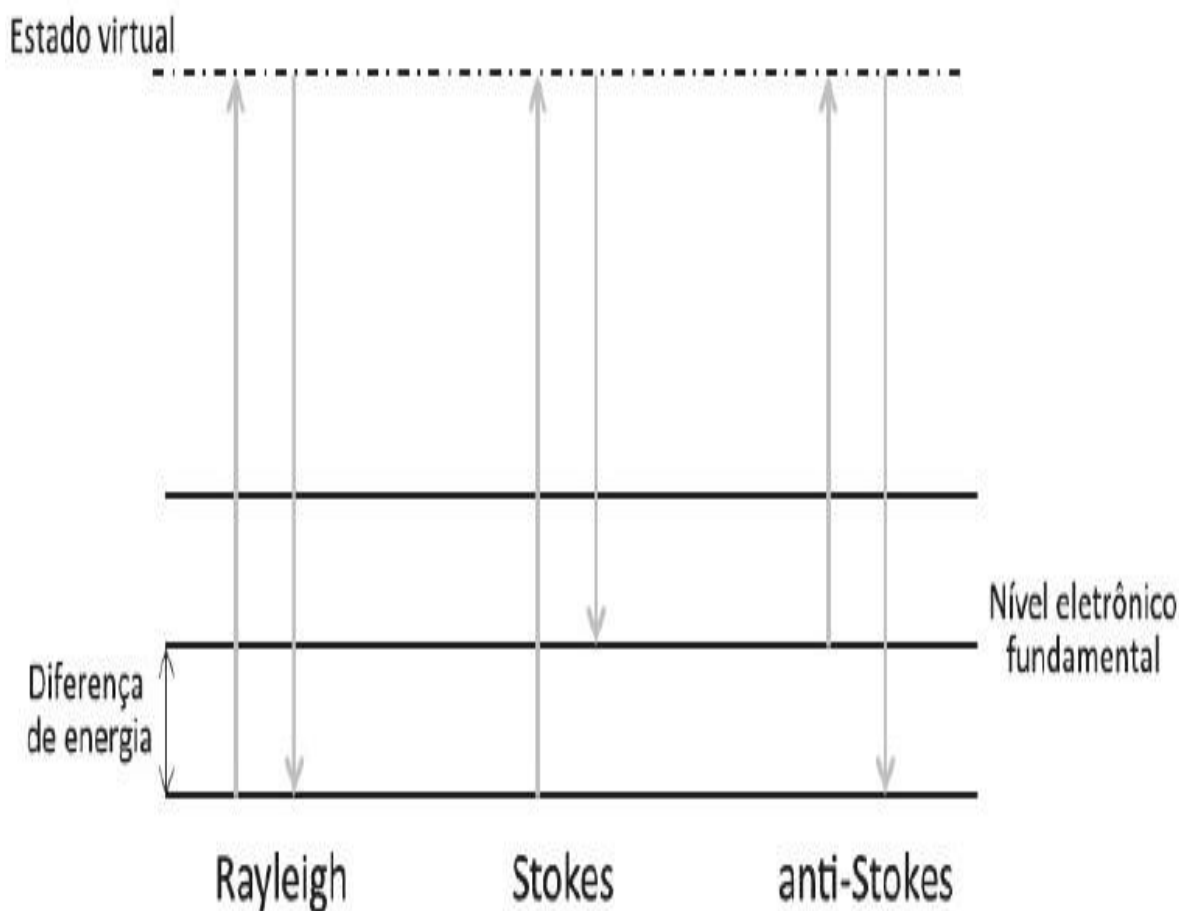
A obtenção dos espectros Raman ocorre ao irradiar uma amostra com uma fonte laser de radiação monocromática no visível ou no infravermelho próximo. Após a radiação ao atravessar um meio transparente, as espécies presentes espalham uma fração do feixe em todas as direções. Se a radiação após interação com a matéria, tiver um comprimento de onda diferente da radiação incidente (fonte de excitação) haverá um espalhamento inelástico/Raman (OLIVEIRA, 2001; SKOOG *et al.*, 2002).

O efeito Raman, consiste na deformação da distribuição eletrônica determinada pela polarizabilidade. A luz incidente pode ser considerada como uma onda eletromagnética com vetor campo elétrico E oscilante, que após interagir com a amostra induz uma polarização $P=\alpha E$ que é capaz de deformar a distribuição eletrônica. De acordo com a mecânica quântica uma vibração somente é ativa no espectro Raman, quando durante a vibração ocorre uma mudança na polarizabilidade (SKOOG *et al.*, 2002).

O espectro Raman de uma determinada molécula consiste de uma série de bandas, cada um correspondendo a uma frequência vibracional característica daquela molécula. Cada molécula possui o espectro característico, e dessa forma, o espectro Raman pode fornecer uma impressão digital ou *fingerprint* de uma substância da qual a sua estrutura molecular pode ser determinada (LORINCZ *et al.*, 2004).

O espalhamento Raman pode ser de dois tipos: *Stokes* e *Anti-Stokes*. Quando a radiação espalhada tem frequência menor do que a radiação incidente, consequência de receber energia vibracional, ela é chamada de espalhamento *Stokes*. Já quando a radiação espalhada apresenta frequência maior do que a radiação da fonte, consequência de perder energia vibracional, é chamada espalhamento *Anti-Stokes* (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009; LEWIS; EDWARDS, 2001). Respresentado na Figura 6.

Figura 6 – Tipos de espalhamento Raman elástico e inelástico.



Fonte: TAVARES, 2020

2.2.4 Vibrações Moleculares

As posições relativas dos átomos em uma molécula não são fixas, mas oscilam continuamente como consequência de vibrações e rotações de diferentes tipos que frequentemente ocorrem em suas ligações. No caso de uma molécula diatômica ou triatômica simples, é fácil definir o número e a natureza de suas vibrações e relacioná-las às energias. Uma análise desse tipo torna-se praticamente impossível para moléculas formadas por vários átomos. Moléculas grandes possuem um grande número de centros de vibração, os quais possivelmente sofrem interação, que deverão ser consideradas para uma análise completa (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

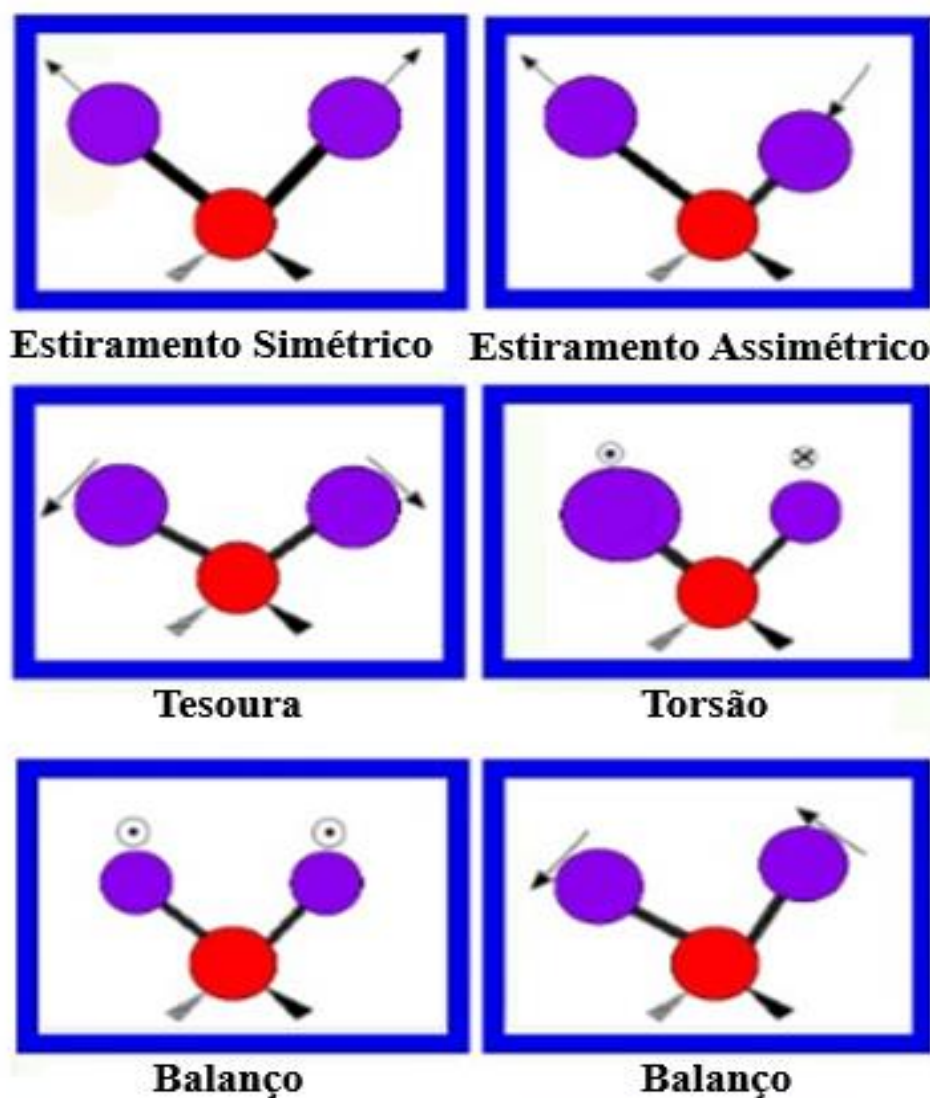
O número de vibrações possíveis em uma molécula poliatômica pode ser calculado como descrito a seguir: Três coordenadas (x, y e z) são necessárias para localizar um ponto no

espaço. Localizar N pontos requer um conjunto de três coordenadas para cada ponto, fornecendo um total de $3N$. Cada coordenada corresponde a um grau de liberdade para cada um dos átomos presentes em uma molécula poliatômica. Assim, uma molécula com N átomos possuirá $3N$ graus de liberdade, estes correspondendo a natureza e a quantidade de movimentos que podem ser efetuados pelos átomos componentes da molécula. Três deles correspondem ao movimento translacional do centro de massa da molécula e os outros três graus de liberdade são necessários para descrever a rotação das moléculas como um todo (PAVIA *et al.*, 2008; HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

Como as técnicas de espectroscopias infravermelho e Raman focam no estudo das vibrações moleculares, podemos descartar seis desses graus de liberdade, que são aqueles correspondentes à translação e rotação. No caso de uma molécula que não é linear ocorrem todos os modos translacionais e rotacionais, portanto o número de modos vibracionais é definido por $3N - 6$. Uma molécula linear é um caso especial porque, por definição, todos os átomos estão posicionados sobre uma única linha reta. A rotação em torno do eixo de ligação não é possível, dessa forma haverá 3 modos vibracionais e 2 modos rotacionais. Assim, o número de vibrações para uma molécula linear é dado por $3N - 5$. Os movimentos vibracionais são calculados pelo total de graus de liberdade ($3N$) menos a quantidade de movimentos translacionais e rotacionais presentes na molécula e são denominados modos normais de vibração (OLIVEIRA, 2001; SKOOG *et al.*, 2002; HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2008).

As vibrações moleculares podem ser classificadas nas categorias de vibração de deformação axial ou estiramento (*stretching*) e deformação angular (*bending*). As vibrações de estiramento são caracterizadas por uma variação contínua na distância interatômica ao longo do eixo da ligação entre dois átomos. Os estiramentos são classificados em simétricos (*symmetric stretching*) e assimétricos (*asymmetric stretching*). As vibrações de deformação angular correspondem às variações no ângulo entre duas ligações, seja internamente em um conjunto de átomos ou um grupo de átomos em relação à molécula como um todo. Tais vibrações são classificadas em quatro tipos: assimétrica no plano (*rocking*, rotação), simétrica no plano (*scissoring*, tesoura), simétrica fora do plano (*wagging*, balanço) e assimétrica fora do plano (*twisting*, torção) (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2008). Os tipos de vibrações moleculares são mostrados na Figura 7.

Figura 7 – Tipos de vibrações moleculares. Vibrações de deformação axial assimétrica e simétrica e vibrações de deformação angular dos tipos tesoura, torção, balanço e rotação.



Fonte: SANTIAGO, 2018.

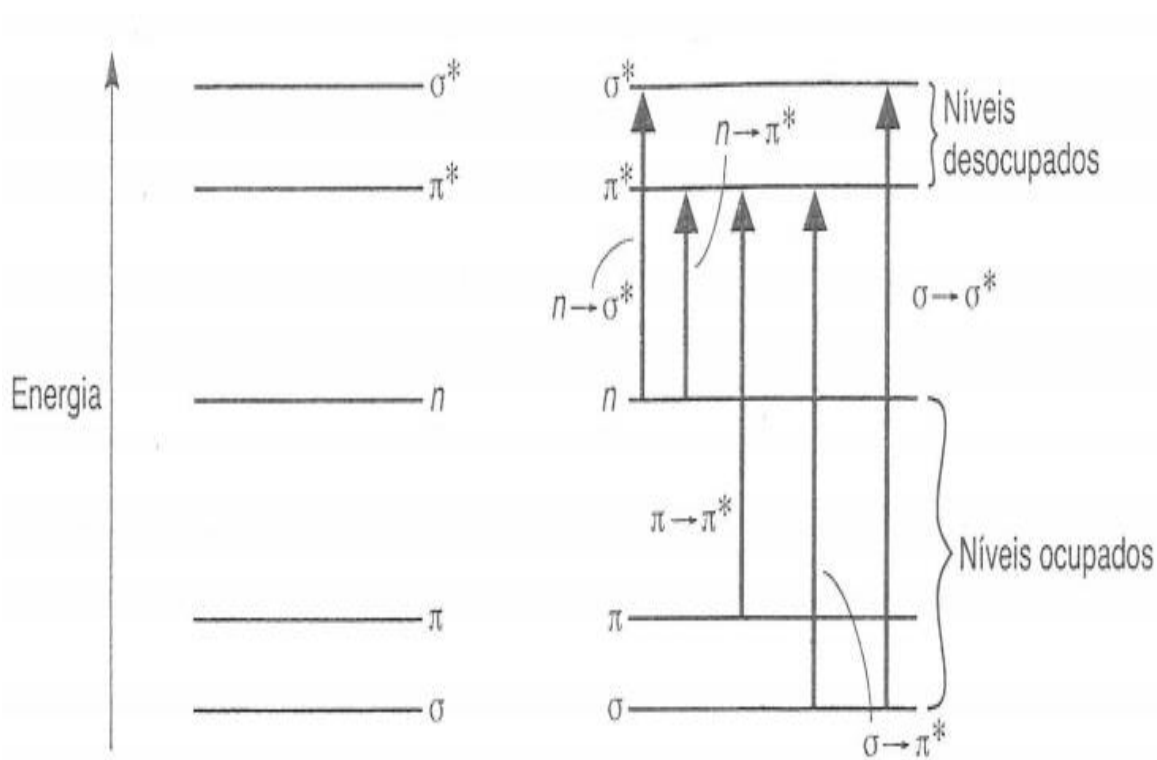
2.2.5 Espectroscopia no Ultravioleta-Vísivel (UV-VIS)

A espectroscopia de absorção na região do ultravioleta e visível (UV-Vis) é uma técnica que se baseia na interação da radiação eletromagnética com a amostra analisada. Se ao passar pela amostra a radiação for absorvida, produzirá um espectro de absorção. O resultado da absorção de energia, átomos ou moléculas passam de um estado de energia mais baixa (estado fundamental) para um estado de energia maior (estado excitado). E a diferença entre os dois estados de energia corresponde à energia da luz absorvida (GOROG, 2018).

Na espectroscopia UV-Vis, as transições que ocorrem devido a absorção de radiação eletromagnética nessa região do espectro acontecem entre níveis de energia eletrônicos. Assim que uma molécula absorve energia, um elétron salta de um orbital ocupado para um orbital desocupado de maior potencial de energia. Em regra, a transição mais aceitável é do orbital molecular ocupado de mais alta energia (HOMO) para o orbital molecular não-ocupado de mais baixa energia (LUMO) (PAIVA *et al.*, 2010; PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 2016).

Grande parte das moléculas, os orbitais moleculares ocupados com a energia mais baixa são os orbitais σ enquanto os de energia mais alta são os orbitais π e não-ligantes n (aqueles com pares de elétrons não compartilhados) ficam em energias superior que o orbital π . Os orbitais desocupados, ou antiligantes (π^* e σ^*), são aqueles de maior energia (PAVIA *et al.*, 2010; PAVIA, LAMPMAN, KRITZ, 2016). A Figura 8 mostra uma típica progressão de níveis de energia eletrônicos.

Figura 8: Níveis de energia eletrônicas e transições.



Fonte: PAIVA, 2010.

Um espectrofotômetro UV-Vis é composto por três partes principais: uma fonte de luz UV, um monocromador e um detector. O monocromador funciona como um gráfico de difração para dispersar/separar a luz dentro de vários comprimentos de onda. Os detectores registram a

intensidade da luz que foram transmitidas (PAVIA *et al.*, 2008). O espectro ultravioleta-visível é registrado como uma função de absorbância *versus* comprimento de onda (PAVIA; LAMPMAN; KRITZ, 2010). Contudo, pouquíssimos espectros eletrônicos são repostados na literatura, a maioria é descrita por indicações de comprimento de onda de máxima absorção.

Com a espectroscopia UV-Vis é possível estudar bandas de absorção e de excitações eletrônicas, verificar a ocorrência de efeitos de transferência de cargas, visualizar picos de absorção de ressonância em filmes e identificar a presença de analitos dispersos em gases. Isso se deve, a possibilidade de utilizar amostras gasosas, líquidas ou sólido sejam estes transparentes ou parcialmente transparentes (FOX, 2001).

2.3 ESTUDO ADME

2.3.1 Farmacocinética

A ação de um fármaco, quando administrado em humanos ou animais, pode ser dividida em três fases: i) fase farmacêutica. ii) fase farmacocinética; iii) fase farmacodinâmica. Na fase farmacêutica, ocorre a desintegração da forma de dosagem, acompanhada da dissolução da substância ativa. A fase farmacocinética abrange os processos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME). E a fase farmacodinâmica está relacionada com a interação do fármaco com seu alvo e a produção do efeito terapêutico (PEREIRA, 2007).

Os estudos das diversas vias que o fármaco deve percorrer no complexo sistema biológico do corpo humano, desde a sua administração até atingir a circulação sanguínea para desempenhar o efeito terapêutico esperado, fazem parte da farmacocinética (WATERBEEMD; GIFFORD, 2003). Determinando assim a velocidade do início da ação, a intensidade do efeito e a duração da ação do fármaco (CLARK *et al.*, 2013).

O estudo dos parâmetros ADME devem ser analisados para se obter um bom perfil farmacocinético, consequentemente, uma biodisponibilidade apropriada. Para que um composto químico que demonstra atividade em testes *in vitro* seja elevado a um composto bioativo é necessário que se satisfaçam alguns critérios relacionados a ADME. O composto apresente relativa estabilidade em meio ácido e básico, hidrossolubilidade para facilitar sua distribuição pela corrente sanguínea e uma relativa lipossolubilidade, propriedade essa que facilita o composto atravessar a membrana celular e apresentar boa disponibilidade nas células (OLIVEIRA, 2004).

Caso o fármaco seja pouco solúvel em água não são absorvidos devidamente e não alcançam concentrações plasmáticas satisfatórias. Todavia, fármacos com hidrossolubilidade elevada não atravessam as membranas plasmáticas por difusão passiva, sendo esse a principal entrada para sua absorção nas células (BARREIRO, 2001).

A concentração do fármaco nos tecidos e o tempo de meia-vida são fatores cruciais que determinam a dosagem e a escolha da via de administração para garantir os níveis de concentração do fármaco na faixa terapêutica desejada por um tempo apropriado. A concentração abaixo da faixa pode afetar a efetividade do tratamento, e concentração elevadas podem levar a toxidez (GLEESON *et al.*, 2011).

Atualmente, é crescente os esforços no campo de pesquisa considerando importante o estudo *in silico* de propriedades de ADME (BOCCI *et al.*, 2017).

2.3.2 Propriedades farmacocinéticas ADME

A via mais estudada por conveniência e segurança é a via oral (RITCHE; ERTL; LEWIS, 2011). Por esse motivo é descrito as propriedades por esta via. A primeira propriedade envolve a absorção do fármaco desde o local de administração até o plasma. A distribuição está relacionada a saída do fármaco da corrente sanguínea para distribuir-se nos líquidos intersticial e intracelular. O processo de biotransformação ou metabolismo envolve se o fármaco pode ser biotransformado em outra substância química no fígado ou tecidos. Por último, a propriedade de eliminação, o fármaco e seus metabólitos são eliminados do organismo na urina, na bile ou nas fezes (CLARK *et al.*, 2013).

2.3.2.1 Absorção

Após a administração, o fármaco deve requerer propriedades que permitem a dissolução e estabilidade no trato gastrointestinal, incluindo o ambiente ácido do estômago (pH 1-2 em jejum ou pH 3-7 em estado alimentado) e o ambiente próximo ao neutro pH 4,4 - 6,6 do intestino delgado (DOAK *et al.*, 2014).

O intestino delgado é onde ocorre a maioria da absorção dos compostos químicos, especificamente na região duodeno por enterócitos. A absorção pode ser separada em três categorias, paracelular (entre enterócitos), transcelular (difusão passiva através de enterócitos) e transporte ativo (utilizando proteínas transportadoras) (ARTURSSON; PALM; LUTHMANN, 2012; SMITH, 2010).

Entre as principais propriedades moleculares que influenciam a absorção de fármacos se relevam a solubilidade e lipofilicidade. Em geral, uma baixa solubilidade ou inadequada taxa de dissolução do princípio ativo está relacionada à alta lipofilicidade. Por outro lado, moléculas muito hidrofílicas apresentam dificuldade de penetração e absorção (GARDNER; WALSH; ALMARSSON, 2004; GRÜNEBERG; GÜSSREGEN, 2004).

A lipofilicidade que pode ser expressa pela medida do coeficiente de partição ($\log P$, partição de uma substância entre as fases aquosa e orgânica em um sistema octanol/água), simula a passagem do meio extracelular para o meio intracelular através da bicamada lipídica (VAN DE WATERBEEMD; GIFFORD, 2003).

Os fármacos que apresentam maior coeficiente de partição, ou seja, têm maior afinidade pela fase orgânica, tendem a apresentar maior taxa de permeabilidade pela parte hidrofóbica da membrana, conseqüentemente, maior biodisponibilidade, que pode resultar no aumento de seus efeitos farmacológicos. Os valores do $\log P$ são normalmente entre valores de 1 a 3, capaz de expressar requisitos farmacocinéticos e farmacodinâmicos ideais e cujo incremento leva à progressiva redução da absorção (KIMARU, 2009).

Diversos estudos foram realizados para investigar o perfil dos fármacos disponíveis no mercado usando os parâmetros de permeabilidade e solubilidade. Um estudo em especial desenvolvido por Lipinski e colaboradores, conhecido como a "regra dos cinco" foi baseado em um amplo conjunto de novas entidades químicas coletadas do *World Drug Index* (WDI) e estabeleceu de forma pioneira limites simples para permeabilidade e solubilidade dos compostos e, portanto, com a absorção de agentes terapêuticos (LIPINSKI *et al.*, 1997).

2.3.2.1.1 Regra dos cinco Lipinski (RO5)

Os resultados alcançados pelo estudo liderado por Lipinski gerou a chamada regra dos cinco de Lipinski, regra dos cinco, ou “rule of five” (RO5). Observaram que algumas propriedades físico-químicas eram necessárias para que as drogas apresentassem boa solubilidade em água e permeabilidade intestinal, características essenciais para a disponibilidade oral (LIPINSKI, 2004).

De acordo com o RO5, um composto semelhante a uma droga deve ter um peso molecular (MW) ≤ 500 Da, um coeficiente de partição ($\log P$) ≤ 5 representando sua hidrofobicidade, não ≥ 5 doadores de ligação de hidrogênio (HBDs) e não ≥ 10 aceptores de ligações de hidrogênio (HBA) (DOAK *et al.*, 2014). Primeiro, nota-se que todos os números são múltiplos de cinco, que é a origem do nome da regra. De tal forma, quaisquer átomos de

oxigênio (O) e nitrogênio (N) são definidos como aceitadores de ligações de hidrogênio e os grupos N – H e O – H são considerados doadores de ligações de hidrogênio (LAGORCE *et al.*, 2011).

Posteriormente, adicionaram mais duas condições: área de superfície polar (PSA) de $\leq 140 \text{ \AA}$ e < 10 ligações rotativas (Rot B) que estão correlacionados com a permeabilidade e flexibilidade do fármaco, respectivamente. Como resultado a molécula pode apresentar apenas uma violação destes parâmetros para ser um bom candidato a fármaco. Portanto, estas regras permitem uma boa previsão do perfil de biodisponibilidade oral para moléculas novas (CHEN, 2020).

2.3.2.1.2 Constante de Distribuição em pH 7,4 (Log D_{7,4})

A maioria dos fármacos conhecidos contém grupos ionizáveis (com carga) e são provavelmente carregadas em pH fisiológico, o descritor Log P apenas descreve o coeficiente de partição de moléculas neutras (sem carga). Já o Log D é um descritor que avalia também a lipofilicidade de uma molécula. Isso pode ser determinado de maneira semelhante ao Log P, mas em vez de usar água, a fase aquosa é ajustada a um pH específico usando um tampão. Log D é, portanto, dependente do pH, deve-se especificar o pH no qual o Log D foi avaliado. Geralmente, o Log P é igual ao LogD_{7,4}, ou seja, o logaritmo do coeficiente de distribuição medido em pH 7,4 (pH fisiológico do soro sanguíneo) (KERNS; DI, 2008).

Um estudo sistemático da relação estrutura-permeabilidade em um conjunto de pequenas moléculas semelhantes a drogas com valores de Log D na faixa de -2,5 a 3, revela que os compostos com $0 < \text{LogD} < 3$ são altamente permeáveis (FICHERT; YAZDANIAN; PROUDFOOT, 2003).

2.3.2.1.3 Constante de Ionização (pKa)

O pKa é a constante de ionização de um composto químico. Mais de 60% dos medicamentos comercializados são ionizáveis (LAGORCE *et al.*, 2011).

Um fármaco atravessa a membrana mais facilmente se ele estiver na sua forma não ionizada, dessa forma, a concentração efetiva da forma permeável de cada fármaco no seu local de absorção é determinada pelas concentrações relativas entre as formas ionizada e não

ionizada. A relação entre as duas formas é determinada pelo pH no local de absorção e pela força do ácido fraco ou base fracas, que é representada pela constante de ionização, o pKa (CLARK *et al.*, 2013). Os compostos ácidos tendem a ser mais solúveis e menos permeáveis em pH elevados e os compostos básicos tendem a ser mais solúveis e menos permeáveis em pH baixo. (LAGORCE *et al.*, 2011; DI; KERNS, 2016).

Moléculas ionizadas são mais solúveis em meio aquoso do que moléculas neutras, porque são mais polares. Por outro lado, moléculas ionizadas têm permeabilidade menor do que moléculas neutras. As moléculas neutras são mais lipofílicas do que as moléculas ionizadas e são as formas predominantes no processo de permeação por difusão passiva.

Considerando que o pKa determina o grau de ionização, o mesmo possui efeitos tanto na solubilidade quanto na permeabilidade dos compostos, que são fatores que determinam a absorção intestinal dos fármacos após administração oral. No presente estudo foi analisado o pKa da mistura α , β - amirina devido à importância em afetar as propriedades do medicamento que fundamentam a farmacocinética.

2.3.2.2 Distribuição

Após serem absorvidos, os fármacos alcançam a circulação sistêmica e são distribuídos, porém, a distribuição não é uniforme nos vários tecidos (HANSCH *et al.*, 2004). A distribuição se refere à transferência reversível de moléculas de uma parte do corpo para outro dentro do organismo. O sangue é o tecido responsável pela distribuição do medicamento por toda a extensão do corpo humano. Um fator importante no processo de distribuição é a extensão da ligação dos fármacos às proteínas plasmáticas é um aspecto que afeta a concentração do fármaco na circulação e altera a amplitude do efeito terapêutico.

As proteínas plasmáticas constituem uma fração significativa do plasma (8%) e os medicamentos geralmente se ligam a essas proteínas de maneira reversível (considera-se que a ligação irreversível leva à toxicidade). A ligação reversível da droga às proteínas plasmáticas é chamada de ligação às proteínas plasmáticas (PPB) (KIRKOVSKY, 2010).

O complexo fármaco-proteína serve como um reservatório na corrente sanguínea, retardando a chegada do fármaco ao local de eliminação e disponibilizando-os no local de ação (SHEPPARD; BOUSKA, 2005). Quando a ligação às proteínas é forte (fração livre $< 0,1$) pode ocorrer diminuição da intensidade de ação do fármaco. Por outro lado, quando a ligação é fraca, pode ocorrer um aumento na intensidade de ação do fármaco (WERMUTH, 2003).

2.3.2.2.1 Coeficiente de Solubilidade (Log S)

Para passar pelas membranas biológicas, um medicamento deve ser hidrossolúvel. Se a solubilidade e a taxa de dissolução forem relativamente baixas, um fármaco administrado será na sua maioria excretado sem a possibilidade de passagem do trato gastrointestinal para o sistema cardiovascular. A solubilidade de um composto é normalmente representada como $\log S$, onde S é a concentração do composto em mol/L. Na prática, cerca de 85% das drogas têm valores de $\log S$ entre -1 e -5 e praticamente nenhuma tem valores abaixo de -6. Valores acima de -1 estão frequentemente associados a moléculas altamente polares que podem ter baixa permeabilidade da membrana na ausência de transporte ativo. Empiricamente, é evidente que o intervalo de $\log S$ entre -1 a -5 para a maioria dos fármacos reflete a relação entre a polaridade necessária para razoável solubilidade aquosa e a hidrofobicidade necessária para a passagem aceitável de membrana (JORGENSEN; DUFFY, 2002).

2.3.2.3 Metabolismo e Excreção

A biotransformação do composto em uma entidade relativamente mais polar é chamada de metabolismo. Esta biotransformação é afetada por uma série de enzimas. A principal família de enzimas que está envolvida no metabolismo de qualquer composto químico estranho (xenobióticos) é chamada de citocromo P450, sendo enzimas encontradas em vários órgãos do corpo, mas a principal fonte dessas enzimas é o fígado, o maior órgão metabolizador do corpo. Os rins e os pulmões são outros órgãos que expressam o citocromo P450, bem como outras enzimas metabolizadoras de drogas. Esses processos metabólicos convertem a droga em uma entidade mais polar e a preparam para ser eliminado do corpo (KIRKOVSKY, 2010).

Após serem absorvidos no intestino, os fármacos entram na via hepática seguindo até o fígado onde sofreram o metabolismo de primeira passagem. As biotransformações nas estruturas químicas dos princípios ativos têm como finalidade aumentar a solubilidade dos metabólitos, facilitando o processo de primeira excreção. Existem várias vias de eliminação, como suor, lágrimas, respiração e fezes, sendo a principal delas, a urina (RITSCHELIS; KEARNIS, 2009).

O metabolismo de fármacos ocorre em duas fases. A primeira fase engloba reações catalisadas pela superfamília de isoformas do citocromo P450 (CYP450). Nesta fase ocorrem, predominantemente, reações de oxidação, redução, hidroxilação e hidrólise, levando a metabólitos mais polares. Neste processo, os metabólitos gerados podem ser inativos ou ativos,

em caso de ativo, a potência relativa e toxidez varia em comparação ao princípio ativo. Os pró-fármacos são um caso especial, onde o fármaco é administrado em uma forma inativa e tem que sofrer biotransformação para ser ativado. O processo de biotransformação pode ocorrer na membrana intestinal, fígado ou corrente sistêmica (DE GRAAF; VERMEULEN; FEENSTRA, 2005; HARDMAN; LIMBIRD; GILMAN, 2001).

A segunda fase abarca reações de conjugação, onde os metabólitos formados na primeira fase são associados a outras substâncias formando um composto polar em geral mais hidrossolúvel e terapeuticamente inativo que serão eliminados pela urina ou fezes (CLARK *et al.*, 2013).

Sete das 57 isoformas humanas conhecidas são responsáveis pelo metabolismo de mais de 90% dos fármacos em uso clínico. Estas isoformas são: CYP1A2, CYP2C9, CYP2C18, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 e CYP3A46 (DE GROOT, 2006). Dentre estas, a CYP3A4, a forma mais abundante no fígado e responsável pelo metabolismo de aproximadamente 50% dos fármacos (SILVADO, 2008). O presente trabalho os modelos de metabolismo e excreção foram previstos através da inibição da isoenzima P450 (CYP450).

2.3.2.4 Biodisponibilidade

Uma das propriedades farmacocinéticas mais relevante no processo de descoberta de novos fármacos é a biodisponibilidade por via oral, que expressa o valor percentual da dose de um fármaco administrado por via oral que atinge a circulação sistêmica. Por definição, biodisponibilidade de 100% é o valor percentual de um fármaco administrado por via intravenosa (HARDMAN; LIMBIRD; GILMAN, 2001; WERMUTH, 2003).

A intensidade da biodisponibilidade de fármacos varia consideravelmente se avaliarmos a diversidade química e a classe terapêutica, além disso, a biodisponibilidade é influenciada por diversos processos que têm início desde a administração de um fármaco, tais como, desintegração e dissolução da formulação, solubilidade do princípio ativo, absorção intestinal, metabolismo mediado pela CYP, ligação às proteínas plasmáticas e excreção (VAN DE WATERBEEMD; GIFFORD, 2003).

Ao longo do processo de planejamento de compostos bioativos, é frequente que muitos compostos que possuem comprovada potência e seletividade em ensaios *in vitro* não apresentem o mesmo perfil em modelos *in vivo*. A ausência de ação farmacológica constantemente está associada a propriedades farmacocinéticas desapropriada, que por sua vez,

não permitem que o princípio ativo atinja o seu alvo para exercer o efeito terapêutico esperado. O que demonstra a importância do estudo da biodisponibilidade em candidatos a novos fármacos (WILLIAMS; LEMKE, 2002; MARTIN, 2005).

Nesta dissertação de mestrado, a biodisponibilidade foi uma das propriedades farmacocinéticas alvo para o desenvolvimento de modelos preditivos de ADME.

2.3.2.5 Barreira Hematoencefálica (BBB)

A barreira hematoencefálica (BBB) é uma barreira celular ativa que fornece tanto uma obstrução física à entrada de moléculas quanto, pela expressão dos transportadores de drogas, um mecanismo dinâmico para o controle a permeação de drogas para o cérebro. Esta barreira tem sido estudado extensivamente por seu papel na farmacologia de medicamentos, principalmente porque possui a maior área de superfície para a passagem de compostos do sangue para o cérebro (NICHOLLS; YODIM, 2016).

Os capilares cerebrais formam uma camada contínua de células endoteliais unidas por junções estreitas, essa característica regula a difusão paracelular de substâncias endógenas e xenobióticos, influenciando diretamente na permeabilidade da BBB (CHEN *et al.*, 2003; NEUWELT *et al.*, 2008).

Uma apropriada penetração no sistema nervoso central (SNC) requer do composto possua boa permeabilidade passiva. As propriedades físico-químicas lipofílicas evidenciaram ser importantes para drogas com alvo no SNC (DOAN *et al.*, 2002). Para uma boa penetração na região cerebral também requer evitar a suscetibilidade à glicoproteína P (P-gp). Embora outras proteínas transportadoras tenham sido identificadas no BBB, a P-gp tem demonstrado em inúmeros estudos sua relevância clínica, estando localizada no lado luminal da célula endotelial do cérebro e, como tal, impede que substâncias hidrofóbicas atravessem a BBB. Possui uma especificidade de substrato altamente variada. Maior peso molecular, log P, PSA e ligação H aumentam a probabilidade de interação da P-gp, como consequência pode alterar a permeabilidade de BBB (PAJEVA, I. K.; WIESE, 2002; VARMA; PANCHAGNULA, 2005).

Os parâmetros farmacocinéticos que afetam diretamente a eficácia do cérebro são a concentração do fármaco no cérebro não ligada. Apenas as moléculas de droga não ligadas interagem com o alvo terapêutico para produzir um nível de resposta de atividade que está correlacionado à concentração de droga não ligada (DI; KERNS, 2016).

Drogas periféricas podem causar efeitos colaterais no SNC se interagirem com um receptor cerebral, por isso recomenda-se impedir essa exposição do SNC para estas drogas.

Nesse contexto, a BBB tem como função evitar à exposição de drogas que tenham o alvo periférico (DI; RONG; FENG, 2012; BUNGAY; BAGAL, 2015). O conhecimento das propriedades farmacocinéticas da mistura α , β -amirina deste trabalho frente a permeação a barreira hematoencefálica foi analisada.

2.3.3 Efeito Cartiotoxico

Estima-se que a toxicidade seja responsável pela reprovação de aproximadamente um terço dos candidatos a medicamentos, particularmente os problemas mais comuns são os de toxicidade cardiovascular e hepática (GUENGERICH, 2011).

A síndrome do QT longo é uma anormalidade da repolarização do músculo cardíaco que predispõe os indivíduos a arritmias potencialmente fatais. A arritmia também pode ser induzida por um bloqueio dos canais de potássio relacionado ao gene humano ether-a-go-go (hERG) por um grupo surpreendentemente diverso de drogas. Este efeito colateral é uma razão comum para o fracasso do medicamento em testes de segurança pré-clínica (SANGUINETTI; TRISTANI-FIROUZI, 2006).

Não está claro por que tantos compostos estruturalmente diversos bloqueiam os canais de hERG, mas esse efeito colateral indesejável agora é reconhecido como um grande obstáculo no desenvolvimento de medicamentos novos e seguros (MITCHESON *et al.*, 2000).

A notória promiscuidade do ligante deste canal marcou o hERG como um dos mais importantes anti-alvos a serem considerados nos estágios iniciais do processo de desenvolvimento de drogas. Portanto, há uma necessidade no desenvolvimento de ferramentas computacionais para identificar e filtrar de forma confiável potenciais bloqueadores de hERG. (BRAGA *et al.*, 2015).

2.4. ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

2. 4. 1 *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), bactérias multirresistentes poderão causar a morte de mais de 10 milhões de pessoas ao ano em 2050 (SILVA; AQUINO, 2018). Uso indiscriminado de antimicrobianos e escassez global de novas drogas agravam essa ameaça das superbactérias. As espécies bacterianas *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*,

são exemplos de bactérias de extrema relevância global, devido à resistência aos antibióticos (OMS, 2016).

Staphylococcus aureus é um patógeno bacteriano humano caracterizado por cocos Gram-positivos, geralmente encontradas em vários locais na microbiota humana, como pele e trato gastrointestinal, compartilhando uma relação benigna com o hospedeiro. No entanto, pode se tornar um patógeno oportunista, ao penetrar no tecido do hospedeiro por meio de lesão (REDDY; SRIRAMA; DIRISALA, 2017). Está frequentemente associada a infecções hospitalares e comunitárias, causando doenças infecciosas de difícil tratamento, principalmente por sua ampla capacidade de adquirir resistência a múltiplas classes de antibióticos, incluindo resistência a β -lactâmicos, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas (AKANBI *et al.*, 2017; SCHINDLER; JACINTO; KAATZ, 2013; LAKHUNDI; ZHANG, 2018).

Nesse contexto, a cepa de *Staphylococcus aureus* foi escolhida por representa a superbactéria mais ameaçadora entre os organismos Gram-positivos devido à sua capacidade de desenvolver resistência a uma diversidade de compostos (BAGNOLI; RAPPUOLI; GRANDI, 2017).

Escherichia coli é um bacilo Gram-negativo encontrada na microbiota humana, vivendo comensalmente no trato intestinal (CROXEN *et al.*, 2013). No entanto, quando encontrada fora do trato intestinal, a *E. coli* pode causar infecções no trato urinário, pulmonares e corrente sanguínea (TAMADONFAR *et al.*, 2019; DENAMUR *et al.*, 2021).

A infecção do trato urinário (ITU) é considerada a infecção bacteriana de maior prevalência mundialmente. Sendo a *E. coli* a maior causadora dessa infecção, estima-se que 150 milhões de ITU ocorrem anualmente em todo mundo, resultando em custos de mais de 6 bilhões de dólares (FLORES-MIRELES *et al.*, 2015). Além do mais, as infecções do ITU é a segunda causa de internações em ambientes hospitalares (HSIEH *et al.*, 2019).

Estima-se que uma em cada três mulheres receberá tratamento com antibióticos devido à ITUs antes mesmo dos seus 24 anos (FOXMAN, 2014). No ambiente ambulatorial, 15% das prescrições de antibióticos foram descritas como para tratamento de ITUs. Os antimicrobianos das classes dos β -lactâmicos, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos são os principais medicamentos prescritos para o tratamento das infecções do trato urinário. No entanto, as diferentes cepas de *E. coli* podem adquirir diferentes mecanismos de resistência (BUNDUKI *et al.*, 2021).

O uso recorrente e prolongado dos antibióticos, juntamente com a crescente resistência aos antibióticos disponíveis para o tratamento *E. coli*, alerta para a necessidade de estratégias

alternativas para prevenção e tratamento de enfermidades causadas por essa bactéria (TAMADONFAR *et al.*, 2019).

2. 4. 2 Uso indiscriminado de antibióticos

Os antibióticos são fármacos que revolucionaram o tratamento de doenças infecciosas causadas por bactérias e reduziram mundialmente as taxas de morbidade e mortalidade associadas a infecções bacterianas. Entretanto, o mau uso desses fármacos acelera o processo natural de resistência das bactérias contra os antibióticos. Chamando a atenção quanto a forma como esses medicamentos são utilizados em ambientes ambulatoriais, hospitalares e domésticos no tratamento de doenças humanas (DA COSTA & JUNIOR, 2017).

A utilização elevada e equivocada dos antibióticos por parte da população é um dos fatores mais significativos relacionados à disseminação de bactérias multirresistentes. O Centro de Controle de Doenças e Prevenção alerta sobre a estimava que de todos os medicamentos prescritos atualmente em ambiente hospitalar, cerca de metade dos antimicrobianos são usados de maneira indevido (CDC, 2013).

A negligência nos procedimentos de biossegurança e a deficiência do serviço de atenção farmacêutica ao paciente usuário de antibióticos, entre outros motivos, estão associados ao aparecimento de infecções hospitalares (FERRACINI; FILHO; ALMEIDA, 2014).

A propagação de microrganismos patogênicos resistentes aos antibióticos mais comumente utilizados tornou-se um obstáculo para a saúde pública; visto que apresenta consequências preocupantes para a sociedade (DA SILVA; AQUINO, 2018).

Vários estudos conduzidos em ambiente hospitalares forneceram evidências de que o uso abundante de antimicrobianos pode ter resultados adversos, podendo chegar a óbito do paciente (ARULKUMARAN *et al.*, 2020).

2. 4. 3 Antibióticos

Existem diferentes classes de antimicrobianos, que se diferenciam por sua estrutura química ou mecanismo de ação no tratamento de determinado patógeno. Quanto ao mecanismo de ação, são eles: inibição da síntese da parede celular, inibição da síntese ou dano da membrana citoplasmática, inibição da síntese proteica dos ribossomos, alterações na síntese dos ácidos

nucléicos e alterações do metabolismo celular (BAPTISTA, 2013). Representado na Figura 9 alguns antibióticos e respectivos mecanismos de ação em uma célula bacteriana.

Dentre essas, a fluoroquinolonas, aminoglicosídeos e β -lactâmico foram as classes trabalhadas na pesquisa. Sendo os antibióticos ciprofloxacina, norfloxacina, gentamicina e ampicilina selecionados para os testes com a substância em estudo.

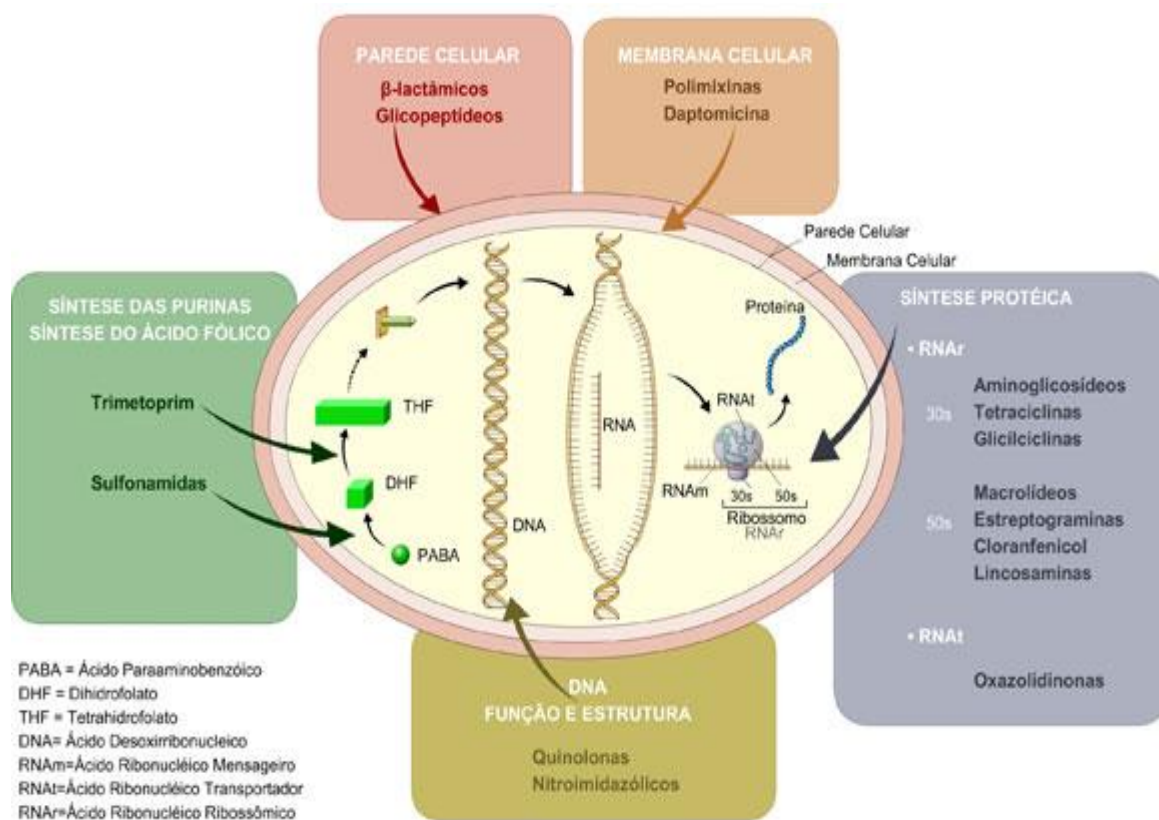
A ciprofloxacina é um antibiótico pertencente a classe das fluoroquinolonas. Trata-se de uma droga com um amplo espectro de ação antimicrobiana, é eficaz em infecções bacterianas causadas por bactérias gram-negativas e gram-positivas (BAPTISTUCCI, 2012). A ciprofloxacina atua inibindo a ação da DNA-girase e topoisomerase IV, impedindo a replicação do DNA bacteriano. A resistência a estes antibiótico é adquirida por mutações em genes cromossômicos, levando a modificação na conformação e inibição das atividades enzimáticas da bactéria (SILVA, 2012).

A norfloxacina é eficaz no tratamento de infecções não sistêmicas, como infecções do trato urinário. A norfloxacina apresenta o mesmo mecanismo de ação da ciprofloxacina por se tratar de um antibiótico da classe das fluoroquinolonas, atuando impedindo a replicação do DNA-bacteriano (WHALEN; FINKEL; PAVANELIL, 2016).

A gentamicina pertence a classe dos aminoglicosídeos, são potentes antibióticos bactericidas, atuando tanto para bactérias Gram-positivas e Gram-negativa, como também as multirresistentes. No entanto, é utilizado principalmente contra Gram-negativas. Seu mecanismo de ação envolve a ligação, de maneira irreversível, à subunidade ribossômica 30S, modificando a função da organela e comprometendo a síntese de proteínas bacterianas (SERIO *et al.*, 2018).

A Ampicilina/Sulbactam é uma combinação composta por ampicilina, um β -lactâmico e sulbactam, um inibidor de β -lactamases. A adição de Sulbactam amplia consideravelmente o espectro de ação da ampicilina (O'BRIEN, 1987). O mecanismo de ação da associação Ampicilina/Sulbactam depende preferencialmente da ligação do sulbactam, um inibidor irreversível da maioria das moléculas de β -lactamases. Já a ampicilina inibe a síntese protéica bacteriana. O espectro de ação da associação compreende bactérias Gram-positivos e Gram-negativos (FERREIRA *et al.*, 2006).

Figura 9 - Mecanismo de ação dos antimicrobianos



Disponível em: <https://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/pop_mecanismo.htm>. Acessado em: 20 de junho de 2021.

2. 4. 4 Mecanismos de resistência bacteriana

Um prejuízo associado a utilização de antimicrobianos, principalmente os antibióticos, mais difundido é o surgimento de mecanismo de resistência antimicrobiana. Embora o alerta global seja amplamente reconhecido, nenhuma nova classe de antibiótico foi descoberta desde a década de 1980 (COURTENAY *et al.*, 2019).

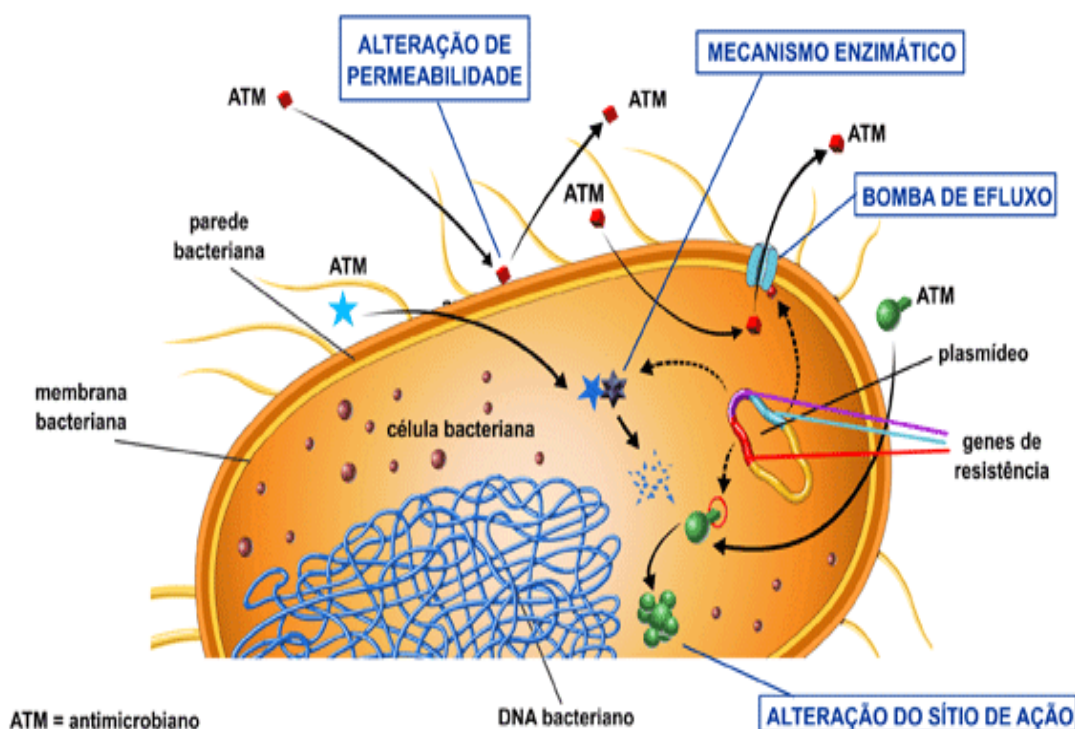
O surgimento da resistência aos antibióticos é promovido pela liberação de antibióticos no meio ambiente; seu uso excessivo por automedicação, uso indevido em infecções não bacterianas; uso de antibióticos em animais, propagando bactérias resistentes, por meio de múltiplas rotas de transferência como a água e alimentos (MARSHALL; LEVY, 2011).

A resistência pode ser intrínseca ou adquirida. A adquirida corresponde ao mecanismo originado a partir mutações nos próprios genes ou pela aquisição dos genes de resistência de outras bactérias (conjugação: plasmídeo, transposon), via bacteriófago (transdução) ou associadas à captação de DNA exógeno (transformação). Em síntese, podem adquirir

resistência a outros antibióticos através de mutações em genes cromossômicos e da transferência horizontal de genes. Já resistência a intrínseca corresponde a mecanismos de resistência naturais de uma espécie bacteriana (VARELA *et al.*, 2021; TRABULSI & ALTHERTUM, 2015).

As ações associadas à resistência incluem os sistemas de inativação antimicrobiana à base de enzimas, alteração de alvos antimicrobianos, proteção de alvos antimicrobianos, redução da permeabilidade antimicrobiana em células bacterianas e bombas de efluxo ativo de agentes antimicrobianos (VARELA *et al.*, 2021). Representado na Figura 10.

Figura 10 - Mecanismos de resistência bacteriana.



Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/servicosauade>>. Acesso em: 20 de junho de 2021.

2. 4. 5 Bombas de Efluxo (NorA e MepA)

Nas últimas décadas, as bombas de efluxo de múltiplas drogas têm ganhado a atenção dos pesquisadores devido à sua potencial associação com a resistência clínica a múltiplas drogas. A utilização do mecanismo de bomba de efluxo bacteriano para reduzir as concentrações de antibióticos da região intracelular para a extracelular é um dos principais

mecanismos pelos quais as bactérias adquirem esta resistência aos antibióticos e biocidas (SHRIRAM *et al.*, 2018).

As bombas de efluxo são proteínas transportadoras integrais de membrana e estão presentes em todas as bactérias fazendo parte da sua fisiologia. Estando envolvidas em diversas funções, tais como a expulsão de produtos tóxicos do metabolismo e a manutenção da homeostase (VARELA *et al.*, 2021).

A escolha por cepas de *S. aureus* foi motivada por possuir uma variedade de bombas de efluxo pertencentes a diferentes famílias, capazes de expulsar uma ampla gama de antibióticos, como exemplo as bombas de efluxo NorA e MepA (BAIOMY; SHAKER; ABBAS, 2020).

Os sistemas de efluxo podem agrupar-se em cinco grupos de acordo a sua relação estrutural, funcional e relação filogenética: i) superfamília de facilitadores principais ou MFS (*Major facilitator superfamily*); ii) superfamília de cassetes de ligação ao ATP ou família ABC (*ATP-binding cassette*); iii) família de pequenas proteínas de resistência a múltiplas drogas ou SMR (*Small multidrug resistance*); iv) superfamília de resistência-nodulação-divisão celular ou RND (*Resistance nodulation cell division*); v) família de múltiplas drogas e extrusão de compostos tóxicos ou MATE (*Multidrug and toxic compound extrusion*) (XING *et al.*, 2014).

A superfamília RND é predominante em Gram-negativas, enquanto os sistemas de efluxo das famílias ABC, MATE, MFS e SMR são difundidos entre bactérias Gram-positivas, também podendo ser encontradas em bactérias Gram-negativas (HANDZLIK; MATYS; KIEĆ-KONONOWICZ, 2013).

A NorA é uma bomba de efluxo multidrogas e um dos sistemas de efluxo mais estudados em *S. aureus*. É um membro da superfamília de facilitadores principais (MFS), sendo codificada pelo gene cromossômico *norA*, descrito pela primeira vez em um isolado resistente à fluoroquinolona e coletado pela primeira vez em 1986 em um hospital japonês (UBUKATA; ITOH-YAMASHITA; KONNO, 1989; PIDDOCK, 2006).

Vários estudos mostraram que NorA pode extrudar antibióticos da classe fluoroquinolona hidrofílica como norfloxacin e o corante brometo de etídio (KAATZ; SEO, 1995; KAATZ; SEO; RUBLE, 1993; NEYFAKH; BORSCH; KAATZ, 1993).

Essa proteína foi identificada em cepas de *S. aureus* como SA-1199-3, SA-K1904, SA-K2361 e SA-K3092 (SCHINDLER; JACINTO; KAATZ, 2013). Sendo a cepa selvagem SA-1199 a mais estudada que expressa a bomba de efluxo NorA e a sua cepa mutante SA-1199B que superexpressa essa proteína (KAATZ; SEO; RUBLE, 1991, 1993).

Já a bomba de efluxo MepA é codificada pelo gene cromossômico *mepA* e foi o primeiro transportador multidrogas da família MATE a ser descrito em *S. aureus*, conferindo o

fenótipo de resistência na cepa SA-K2068 (KAATZ; MCALEESE; SEO, 2005; MCALEESE *et al.*, 2005). A bomba de efluxo MepA dispõem de uma variedade de substratos, dentre eles, os antibióticos ciprofloxacina e norfloxacina; e corantes como brometo de etídio (KAATZ; DEMARCO; SEO, 2006; KAATZ; MCALEESE; SEO, 2005).

Até o momento, pouco se tem sobre o mecanismo de funcionamento de efluxo NorA e MepA, exceto que a família MFS e MATE usam um gradiente de prótons transmembrana como a força motriz para o transporte de antibióticos para o meio extracelular (HANDZLIK; MATYS; KIEĆ-KONONOWICZ, 2013).

Um dos objetivos deste estudo é a busca por novas substâncias capazes de reverter a resistência bacteriana promovida pelas bombas de efluxo. Vários compostos isolados de plantas têm indicado bons resultados em relação à inibição desse mecanismo (DOS SANTOS *et al.*, 2018).

2. 4. 6 Inibidores de bomba de efluxo

São moléculas responsáveis pela inibição das proteínas de extrusão, usufruindo-se de um ou mais mecanismos para tal inibição, sendo usadas como um auxiliar na ação protagonista do antibiótico, levando ao acúmulo bem-sucedido deste, e conseqüentemente potencializando seu efeito contra as bactérias. Tais moléculas inibidoras são projetadas com o intuito de aumentar a concentração intracelular do antibiótico, diminuir a resistência bacteriana intrínseca e reverter a resistência adquirida, reduzindo o surgimento de cepas mutantes com resistência (BHARDWAJ; MOHANTY, 2012; LI; NIKAIDO, 2004; SUN; DENG; YAN, 2014; ZECHINI; VERSACE, 2009).

A inibição do efluxo pode ser ou não competitiva. Não competitivo quando o inibidor impede o funcionamento da proteína (seja impedindo as alterações conformacionais essenciais para a extrusão, impedindo a montagem da bomba ou bloqueando o canal de saída), ou competitivo, onde o inibidor é um substrato preferencial e é extrudado para o ambiente extracelular em vez do antibiótico. Em ambos os casos, o antibiótico permanece dentro da célula, onde pode interagir com seu alvo intracelular (GRIMSEY & PIDDOCK, 2019).

Para se enquadrar nesse quesito um inibidor de bomba ideal deve ser livre de qualquer atividade farmacológica em células eucariotas. A síntese de inibidores de bombas de efluxo oriundos de produtos naturais, não deve ser demorada, cara e difícil. Os inibidores devem ser proteoliticamente estáveis para garantir os níveis séricos e de acumulação celular para o potencial controle de infecções intracelular. Também devem aumentar o índice terapêutico e

perfil farmacocinético para garantir o máximo de especificidade e eficácia. Devem ser desprovidos de atividade antibacteriana, e como característica principal eles não devem ser tóxicos para humanos (VAN; PAGES; LEE, 2006; STAVRI; PIDDOCK; GIBBONS 2006; BHARDWAJ & MOHANTY, 2012).

Em relação ao seu modo de ação, os inibidores podem ser amplamente caracterizados em duas categorias principais: os dissipadores de energia e os que se ligam diretamente na proteína. Todas as bombas de efluxo necessitam de uma fonte de energia, sendo elas o gradiente de prótons ou ATP, de modo que a dissociação destas fontes acarretaria em uma inibição. Como representante desse inibidor está o carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona (CCCP), um protonóforo que dissipa a força próton-motriz, modificando o potencial eletroquímico transmembranar para o íon H^+ (NI *et al.*, 2016; SPINDLER *et al.*, 2011; YU *et al.*, 2015).

Um exemplo de inibidor é o desacoplador de energia CCCP, utilizado para estudos *in vitro* com bombas de efluxo de bactérias, sendo também extremamente tóxico para células eucarióticas. A indução de uma competição de fluxo na própria bomba é provavelmente o mecanismo de ação mais utilizado pelos inibidores de bomba (BAMBEKE; PAGÉS; LEE, 2006).

Outro inibidor é a clorpromazina (CPZ), uma fenotiazina com reconhecida atividade antimicrobiana (PAGÉS; AMARAL, 2010). A CPZ apresenta sinergia e potencializa a atividade dos substratos da bomba de efluxo para muitas bactérias, incluindo *S. aureus* (KAATZ *et al.* 2003). Sugere-se que as fenotiazinas inibam a atividade das bombas de efluxo dependentes do gradiente protônico, por interação direta com as bombas de efluxo ou por bloqueio dos canais de cálcio, impedindo a hidrólise de ATP. Deste modo, as fenotiazinas inibem a fonte energética das bombas de efluxo e consequentemente o efluxo de compostos tóxicos da célula bacteriana, como os antibióticos e biocidas (MARQUEZ, 2006; KHAN; AHMAD; HADI, 2000).

Diferentes métodos podem ser usados para avaliação de potenciais inibidores de bomba de efluxo. Entre eles, um método amplamente usado é a medição de fluorescência de diversas moléculas (JOUX; LEBARON, 2000; MARTINS *et al.*, 2006). Destacando-se o brometo de etídio (EtBr), um substrato conhecido de bombas de efluxo multirresistência que é capaz de intercalar no DNA, abrangendo quase todas as bombas de efluxo de *S. aureus* estudadas (PAGES; AMARAL; FANNING, 2011).

O princípio desse ensaio consiste na passagem do EtBr através da parede celular e membrana citoplasmática por difusão passiva, acumulando-se no interior da bactéria, mas que

só pode ser removido pelo sistema de efluxo ativo. No caso de bactérias Gram-negativas essa passagem se dá por meio dos canais de porina (AMARAL; FANNING; PAGÉS, 2010).

Ciente que o EtBr emite fluorescência apenas no interior celular, uma diminuição na fluorescência significa que nenhum inibidor de bomba está presente e que o EtBr está sendo expulso das células livremente, já que o efluxo é a única forma de resistência a esse composto. No entanto, caso ocorra um aumento na fluorescência após sua adição, é um indicativo da presença de inibidor de bomba de efluxo. (BLAIR; PIDDOCK, 2016; GIBBONS; OLUWATUYI; KAATZ, 2003; MARKHAM *et al.*, 1999).

Ciente de toda a informação exposta, o presente trabalho utilizou esses métodos para o estudo da avaliação da atividade antibacteriana, moduladora de antibióticos e inibidora de bomba de efluxo da mistura α,β - amirina.

REFERÊNCIAS

_____. Cuidar em Saúde Frente à Resistência Bacteriana: Uma Revisão. Revista Eletrônica de Enfermagem, n. 10, v. 1, p. 189-197, 2008.

AKANBI, O. E.; NJOM, H. A.; FRI, J.; OTIGBU, A. C.; CLARKE, A. M. Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Isolated from Recreational Waters and Beach Sand in Eastern Cape Province of South Africa. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v.14, n. 9, 2017. DOI:10.3390/ijerph14091001

AKKARI, A. C. S.; MUNHOZ, I. P.; TOMIOKA, J.; SANTOS, N. M. B. F.; SANTOS, R. F. Inovação tecnológica na indústria farmacêutica: diferenças entre a Europa, os EUA e os países farmaemergentes. *Gestão & Produção*, v. 23, n. 2, p. 365–380 2016. DOI:10.1590/0104-530x2150-15.

ALEKSHUN, M. N.; LEVY, S. B. Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug. **Resistance Cell**, 2007. DOI: 10.1016/j.cell.2007.03.004.

ALONSO, H.; BLIZNIUK, A. A.; GREASY, J. E. Combining docking and molecular dynamic simulations in drug desing. **Medicinal Research Reviews** v.26, p. 531-56, 2006. DOI: 10.1002/med.20067.

ALVARENGA, E.; FERRO, E. A. Bioactive triterpenes and related compounds from Celastraceae. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 33, p. 239, 2005. doi: 10.1016 / s1572-5995 (05) 80044-4. DOI: 10.1016/S1572-5995(06)80029-3.

AMARAL, A. T.; ANDRADE, C. H.; KÜMMERL, A. E.; GUIDO, R. V. C. A evolução da química medicinal no brasil: avanços nos 40 anos da sociedade brasileira de química. **Química Nova**, v. 40, n. 6, p. 694 - 700, 2017. DOI: 10.21577/0100-4042.20170075.

AMARAL, L.; MARTINS, A.; MOLNAR, J.; RISTIENSEN, J. E.; MARTINS, M.; VIVEIROS, M.; RODRIGUES, L.; SPENGLER, G.; COUTO, I.; RAMOS, J.; DASTIDAR, S.; FANNING, S.; MCCUSKER, M.; PÂGES, J. Phenothiazines, bacterial efflux pumps and targeting the macrophage for enhanced killing of intracellular XDRTB. **In Vivo**. v. 24, n. 4, p. 409–424, 2010.

AMARAL, L.; VIVEIROS, M.; MOLNAR, J. Antimicrobial Activity of Phenothiazines. **In Vivo**. v.18, p. 725–731, 2004.

ARAGÃO, G. F.; CARNEIRO, L. M. V.; JUNIOR, A. P. F.; VIEIRA, L. C.; BANDEIRA, P. N.; LEMOS, T. L. G.; VIANA, G. S. de B. A possible mechanism for anxiolytic and antidepressant effects of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. v. 8, n. 4, p. 827–834, 2006. DOI: 10.1016/j.pbb.2006.11.019

ARAGÃO, G. F.; CARNEIRO, L. M. V.; ROTA-JUNIOR, A. P.; BANDEIRA, P. N.; LEMOS, T. L. G.; VIANA, G. S. B. Alterations in brain amino acid metabolism and inhibitory effects on PKC are possibly correlated with anticonvulsant effects of the isomeric mixture of α - and β -amyrin from *Protium heptaphyllum*. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 3, p. 407–413, 2015. DOI:10.3109/13880209.2014.923001

ARAGÃO, G. F.; CUNHA, P. M. C.; NOGUEIRA, B. P.; GOMES, L. T. L.; VIANA, G. S. B. Analgesic and anti-inflammatory activities of the isomeric mixture of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. **J. Herb. Pharmacother**. v. 7, n. 2, p. 31–47, 2007. DOI: 10.1080 / j157v07n02_03

ARAGÃO, G. F.; MORAES FILHO, M. O.; BANDEIRA, P. N.; FROTA JÚNIOR, A. P.; OLIVEIRA, Y. I. S.; BALACÓ, C. F. A.; MORAES, M. E. A. Monoaminergic involvement in decreased locomotor activity of mice treated with α - and β -amyrin from *Protium heptaphyllum*. **Natural Product Communications**, v. 13, n. 8, p. 935–938, 2018. DOI:10.1177/1934578X1801300804

ARTURSSON, P.; PALM, K.; LUTHMAN, K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. **Adv. Drug Deliv. Rev.** v. 64, p.280–289, 2012. DOI: 10.1016/S0169-409X(00)00128-9.

ARULKUMARAN, N.; ROUTLEDGE, M.; SCHLEBUSCH, S.; LIPMAN, J.; CONWAY MORRIS, A. Antimicrobial-associated harm in critical care: a narrative review. **Intensive care medicine**, v. 46, n. 2, p 225–235, 2020. DOI.10.1007/s00134-020-05929-3.

BAGNOLI F., RAPPUOLI R., GRANDI G. *Staphylococcus aureus: Microbiologia, Patologia, Immunologia, Terapia e Profilaxia*. Springer; Cham, Suíça: 2017.

BAIOMY, A. A., SHAKER, G. H., & ABBAS, H. A. Sensitizing multi drug resistant *Staphylococcus aureus* isolated from surgical site infections to antimicrobials by efflux pump inhibitors. **African health sciences**, v. 20, n. 4, p. 1632–1645, 2020. DOI: 10.4314/ahs.v20i4.16

BAMBEKE, F. V.; PAGES, J. M.; LEE, V. J. Inhibitors of bacterial efflux pumps as adjuvants in antibiotic treatments and diagnostic tools for detection of resistance by efflux. **Recent**

patents on anti-infective drug **Discovery**, 1, 157-75, 2006. doi: 10.2174/157489106777452692.

BANDEIRA, P. N.; FONSECA, A. M.; COSTA, S. M. O.; LINS, M. U. D. S.; PESSOA, O. D. L.; MONTE, F. J. Q.; NOGUEIRA, N. A. P.; LEMOS, T. L. G. Antimicrobial and Antioxidant Activities of the Essential Oil of Resin of *Protium heptaphyllum*. **Natural Product Communications**, v.1, n. 2, p. 117-120, 2006. DOI:10.1177/1934578x0600100207

BANDEIRA, P. N.; MACHADO, M. I. L.; CAVALCANTI, F. S.; LEMOS, T. L. G. Essential Oil Composition of Leaves, Fruits and Resin of *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. **Journal of Essential Oil Research**, v. 13, n. 1, p. 33–34, 2001. DOI:10.1080/10412905.2001.9699597

BAPTISTA, M. G. F. M. Mecanismos de Resistência aos Antibióticos, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Saúde. Lisboa, 2013, pp 01-28.

BAPTISTUCCI, C. B. Degradação do antibiótico ciprofloxacina em solução aquosa por meio de processo oxidativo avançado baseado em ozônio. 2012. **Dissertação (Mestrado em engenharia química)**, Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, SP, 2012.

BARBOSA, L. C. D. A. **Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos**. Viçosa: UFV, v. 189, 2007.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química medicinal: as bases moleculares para ação dos fármacos**. Porto Alegre. Artmed, 2001.

BERTHOMIEU, C.; HIENERWADEL, R. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. **Photosynthesis research**, v. 101, n. 2-3, p. 157-170, 2009. DOI: 10.1007 / s11120-009-9439-x

BFG - The Brazil Flora Group. Growing knowledge: an overview of seed plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, v. 66, n. 4, p. 1085-1113, 2015. DOI: 10.1590/2175-7860201566411

BHARDWAJ, K. A.; MOHANTY, P. Bacterial efflux pumps involved in multidrug resistance and their inhibitors: rejuvenating the antimicrobial chemotherapy. **Recent patents on antiinfective drug discovery**, 7, 73-89, 2012. DOI: 10.2174/157489112799829710.

BLAIR, J. M., & PIDDOCK, L. J. How to Measure Export via Bacterial Multidrug Resistance Efflux Pumps. **mBio**, v. 7, n. 4, e00840-16., 2016. DOI:10.1128/mBio.00840-16

BOCCI, G.; CAROSATI, E.; VAYER, P.; ARRAULT, A.; LOZANO, S.; CRUCIANI, G. ADME-Space: a new tool for medicinal chemists to explore ADME properties. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 2017. DOI:10.1038/s41598-017-06692-0

BRAGA, R. C.; ALVES, V. M.; SILVA, M. F. B.; MURATOV, E.; FOURCHES, D.; LIÃO, L. M.; TROPSHA, A.; ANDRADE, C. H. Pred-hERG: A Novel web-Accessible Computational Tool for Predicting Cardiac Toxicity. **Molecular Informatics**, v. 34, n. 10, p. 698–701, 2015. DOI:10.1002/minf.201500040

BRUICE, P. Y. **Química Orgânica**. 4ª edição. Hall, São Paulo, 2006.

BUNDUKI, G. K.; HEINZ, E.; PHIRI, V. S.; NOAH, P.; FEASEY, N.; & MUSAYA, J. Virulence factors and antimicrobial resistance of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) isolated from urinary tract infections: a systematic review and meta-analysis. *BMC infectious diseases*, v.21, n. 1, p. 753, 2021. DOI:10.1186/s12879-021-06435-7

BUNGAY, P.; BAGAL, A. S. **Pike, Designing peripheral drugs for minimal drug exposure**, in: L. Di, E.H. Kerns (Eds.), *Blood-Brain Barrier in Drug Discovery*, Wiley, Hoboken, NJ, p. 446–462, 2015.

Burseraceae in: **Flora do Brasil 2020** em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB6588>>. Acesso em: 04 dez. 2020.

CAMPBELL, S. L.; GAULTON, A.; MARSHALL, J.; BICHKO, D.; MARTIN, S.; BROUWER, C.; HARLAND, L. Visualizing the drug target landscape. **Drug Discovery Today**, v.15, n. 1-2, p.3-15, 2010. DOI:10.1016/j.drudis.2009.09.011.

CARDOSO, B. K.; DE OLIVEIRA, H. L. M.; MELO, U. Z.; FERNANDEZ, C. M. M.; CAMPO, C. F. DE A. A.; GONÇALVES, J. E.; ... GAZIM, Z. C. Antioxidant activity of α - and β -amyrin isolated from *Myrcianthes pungens* leaves. **Natural Product Research**, v. 34, n. 12, p. 1777-1781, 2020. DOI:10.1080/14786419.2018.1525715

CARVALHO, K. M. M. B.; MELO, T. S.; MELO, K. M.; QUINDERÉ, A. L. G.; OLIVEIRA, F. T. B.; VIANA, A. F. S. C.; NUNES, P. I. G.; QUETZ, J. S.; VIANA, D. A.; SILVA, A. A. C. A.; HAVT, A.; FONSECA, S. G. C.; CHAVES, M. S.; RAO, V. A.; SANTOS, F. A. Amyrins from *Protium heptaphyllum* Reduce High-Fat Diet-Induced Obesity in Mice via Modulation of Enzymatic, Hormonal And Inflammatory Responses. **Planta Medica**, v. 83, n. 03-04, p. 285–291, 2017. DOI:10.1055/s-0042-114222

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Office of Infectious Disease Antibiotic resistance threats in the United States [Internet]. 2013. Disponível em: <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013>

CHEN, C.; HANSON, E.; WATSON, J. W.; LEE, J. S. P-glycoprotein limits the brain penetration of nonsedating but not sedating H1-antagonists. **Drug Metab. Dispos.** v. 31, n.3, p. 312–318, 2003. DOI: 10.1124 / dmd.31.3.312

CHEN, X.; LI, H.; TIAN, L.; LI, Q.; LUO, J.; ZHANG, Y. Analysis of the Physicochemical Properties of Acaricides Based on Lipinski's Rule of Five. **Journal of Computational Biology**. v.27, p.1-10, 2020. DOI:10.1089/cmb.2019.0323

CHRISTIANSON, D. W. Structural and chemical biology of terpenoid cyclases. **Chem Rev.** v.117, p.11570-11648, 2017. DOI:10.1021/acs.chemrev.7b00287

CLARK, M. A.; FINKEL, R.; REY, J. A.; WHALEN, K. **Farmacologia ilustrada** - 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

COURTENAY, M.; CASTRO-SANCHEZ, E.; FITZPATRICK, M.; GALLAGHER, R.; LIM, R.; MORRIS, G. Tackling antimicrobial resistance 2019-2024 - The UK's five-year national action plan. **The Journal of hospital infection**, v.101, n.4, 426–427, 2019. DOI: 10.1016/j.jhin.2019.02.019

COYNE, S.; COURVALIN, P.; PÉRICHON, B. Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 55, n. 3, p. 947-53, 2011. doi: 10.1128/AAC.01388-10.

CROXEN, M. A.; LAW, R. J.; SCHOLZ, R.; KEENEY, K. M.; WLODARSKA, M.; FINLAY, B. B. Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 4, p.822, 2013. DOI: 10.1128/CMR.00022-13

DA COSTA, A. L. P.; JUNIOR, A. C. S. S. Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura. **Estação Científica (UNIFAP)**, v. 7, n. 2, p. 45-57, 2017. DOI:10.18468/estcien.2017v7n2.p45-57.

DAS, R. S.; AGRAWAL, Y. K. Raman spectroscopy: Recent advancements, techniques and applications. **Vibrational Spectroscopy**, v. 57, n. 2, p. 163–176, nov. 2011.

DA SILVA, M. O.; AQUINO, S. Resistência aos antimicrobianos: uma revisão dos desafios na busca por novas alternativas de tratamento. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, vol. 8, n. 4, p. 472-482, 2018. DOI: 10.17058/reci.v8i4.11580

DAINA, A.; ZOETE, V. A BOILED-Egg To Predict Gastrointestinal Absorption and Brain Penetration of Small Molecules. **ChemMedChem**, v. 11, n. 11, p. 1117-1121, 2016. DOI: 10.1002/cmdc.201600182

DALY, D. C. DE B.; FINE, P. V. A.; MARTÍNEZ-HABIBE, M. C. Burseraceae: um modelo para estudar a flora amazônica. **Rodriguésia**, v. 63, p. 021–030, 2012. DOI: 10.1590 / s2175-78602012000100002

DE GRAAF, C.; VERMEULEN, N. P. E.; FEENSTRA, K. A. Cytochrome P450 *in silico*: an integrative modeling approach. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48. n. 8. p. 2725-2755, 2005. DOI:10.1021/jm040180d

DE GROOT, M. J. Designing better drugs: predicting cytochrome P450 metabolism. **Drug Discovery Today**, v 11. n. 13-14 p. 601-606, 2006. DOI: 10.1016 / j.drudis.2006.05.001.

DE LIMA, E. M.; CAZELLI, D. S.; PINTO, F. E.; MAZUCO, R. A.; KALIL, I. C.; LENZ, D.; SCHERER, R.; DE ANDRADE, T. U.; ENDRINGER, D. C. Essential oil from the resin of *Protium heptaphyllum*: chemical composition, cytotoxicity, antimicrobial activity, and antimutagenicity. **Phcog Mag**, v.12, n.1, p.42–46, 2016. DOI: 10.4103/0973-1296.176113.

DENAMUR, E.; CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; GORDON, D. The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 37-54, 2021. DOI:10.1038/s41579-020-0416-x

DI, L.; KERNS, E. H. **pKa**. Drug-Like Properties, p.51–59, 2016. DOI:10.1016/b978-0-12-801076-1.00006-x

DI, L.; RONG, H.; FENG, B. Demystifying brain penetration in central nervous system drug discovery, **J. Med. Chem.** v. 56, p. 2–12, 2012. DOI: 10.1021 / jm301297f

DIAS, M. O.; HAMERSKI, L.; PINTO, A. C. Separação Semipreparativa de α - e β -amirina por Cromatografia Líquida de alta eficiência. **Quim. Nova**, v. 34, n. 4, p. 704–706, 2011. DOI:10.1590/S0100-40422011000400026

DOAK, B. C.; OVER, B.; GIORDANETTO, F.; KIHLEBERG, J. Espaço Oral Druggable além da Regra de 5: Insights de Drogas e Candidatos Clínicos. **Chemistry & Biology**, 21 (9), 1115–1142, 2014. DOI: 10.1016 / j.chembiol.2014.08.013

DOAN, K. M. M.; HUMPHREYS, J. E. ;WEBSTER, L. O.; WRING, S. A.; SHAMPINE, L. J.; SERABJIT-SINGH, C. J. ; ADKISON, K. K.; POLLI, J. W. Passive permeability and P-glycoprotein-mediated efflux differentiate central nervous system (CNS) and non-CNS marketed drugs. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 303, n. 3, p.1029–1037, 2002. DOI: 0.1124 / jpet.102.039255

DOS SANTOS, J.; TINTINO, S. R.; DE FREITAS, T. S.; CAMPINA, F. F.; DE A MENEZES, I. R.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P.; COUTINHO, H.; & CUNHA, F. *In vitro e in silico* evaluation of the inhibition of *Staphylococcus aureus* efflux pumps by caffeic and gallic acid. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 57, p.22–28, 2018. DOI:10.1016/j.cimid.2018.03.001

DUTRA, R. C.; CAMPOS, M. M.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4–29, 2016. DOI: 10.1016 / j.phrs.2016.01.021.

DVORA, H.; KOFFAS, M. A. G. In: McNeil, B.; Archer, D.; Giavasis, I.; Harvey, L.. (ed). 1º Ed. **Microbial production of flavonoids and terpenoids**. *Microbial Production of Food Ingredients, Enzymes and Nutraceuticals*. Cambridge: Elsevier, 2013. Chap. 10, p. 234-261.

EDWARDS, A. A.; ALEXANDER, B. D. UV-Visible Absorption Spectroscopy, Organic Applications. In: **Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 511–519.

FERRACINI, F.T.; FILHO, W.M.B.; ALMEIDA, S.M. Atenção à Prescrição Médica, 1.ed. São Paulo, Atheneu, 2014.

FERREIRA, J. B.; RAPOPORT, P. B.; SAKANO, E.; KÓS, A. O. D. Á.; PILTCHER, O. B.; PIGNATARI, S. S. N.; MOCELLIN, M. Eficácia e segurança de Sultamicilina (Ampicilina/Sulbactam) e Amoxicilina/Clavulanato no tratamento das infecções de via aéreas superiores em adultos: um estudo multicêntrico, aberto e randomizado. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, 72, 104-111. 2006.

FICHERT, T.; YAZDANIAN, M.; PROUDFOOT, J. R. Um estudo de permeabilidade de estrutura de pequenas moléculas semelhantes a drogas. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 13, n. 4, p. 719–722, 2003. DOI: 10.1016 / s0960-894x (02) 010351

FLORES-MIRELES, A. L.; WALKER, J. N.; CAPARON, M.; & HULTGREN, S. J. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. **Nature reviews. Microbiology**, 13(5), 269–284, 2015. Doi:10.1038/nrmicro3432

FOX, M. **Optical properties of solids**. Oxford University press, New York, NY, United States.

FOXMAN, B. Urinary tract infection syndromes: occurrence, recurrence, bacteriology, risk factors, and disease burden. **Infectious disease clinics of North America**, v. 28, n. 1, p. 1–13, 2014. doi:10.1016/j.idc.2013.09.003

FRAGA, C. A. Razões da Atividade Biológica: Interações Micro e Biomacro-moléculas. **Química Nova na Escola**, v. 3, p. 33–42, 2001.

GARDNER, C. R.; WALSH, C. T; ALMARSSON, O. Drugs as materials: valuing physical form in drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, Vol. 3. n. 11, p. 926-934, 2004. doi:10.1038/nrd1550.

GIBBONS, S., OLUWATUYI, M., & KAATZ, G. W. A novel inhibitor of multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 51, n. 1, p. 13–17, 2003. Doi: 10.1093/jac/dkg044

GLEESON, M. P.; HERSEY, A.; MONTANARI, D.; OVERINGTON, J. Probing the links between *in vitro* potency, ADMET and physicochemical parameters. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 10, n. 3, p. 197-208, 2011.

GOROG, Sander. **Ultraviolet-visible spectrophotometry in pharmaceutical analysis**. CRC press, 2018.

GRIMSEY, E. M.; PIDDOCK, L. Do phenothiazines possess antimicrobial and efflux inhibitory properties?. **FEMS microbiology reviews**, v. 43, n. 6, p. 577–590., 2019. Doi: 10.1093/femsre/fuz017

GRÜNEBERG, S., & GÜSSREGEN, S. **Drug Bioavailability. Estimation of Solubility, Permeability, Absorption and Bioavailability**. (Series: Methods and Principles in Medicinal Chemistry, Vol. 18; series editors: R. Mannhold, H. Kubinyi, and G. Folkers). Edited by Han van de Waterbeemd, Hans Lennernäs and Per Artursson. Angewandte Chemie International Edition, v. 43, n. 2, p.146–147, 2004. DOI:10.1002/anie.200385055

GUENGERICH, F. P. Mechanisms of Drug Toxicity and Relevance to Pharmaceutical Development. **Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 26, n.1, p. 3–14, 2011. doi:10.2133/dmpk.dmpk-10-rv-062

HANDZLIK, J.; MATYS, A.; & KIEĆ-KONONOWICZ, K. Avanços recentes em inibidores da bomba de efluxo de bactérias gram-positivas *S. aureus* por resistência a múltiplas drogas (MDR). **Antibiotics (Basel, Suíça)**, v. 2, n. 1, p. 28-45, 2013. DOI:10.3390/antibiotics2010028

HANSCH, C.; LEO. A.; MEKAPATI, S. B.; KURUP, A. QSAR and ADME. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, v. 12. n. 12. p. 3391-3400, 2004. DOI: 10.1016 / j.bmc.2003.11.037

HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; GILMAN, A. G. **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**, 10th ed.: McGraw-Hill: United States of America, 2001.

HARTMANN, T. From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. **Phytochemistry**. v. 68, n. 22-24, p. 2831-2846, 2007. DOI:10.1016/j.phytochem.2007.09.017

HOLANDA PINTO, S. A.; PINTO, L. M. S.; CUNHA, G. M. A.; CHAVES, M. H.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. Antiinflammatory effect of α , β -amyrin, a pentacyclic triterpene from *Protium heptaphyllum* in rat model of acute periodontitis. **Inflammopharmacology**. v.16, p. 48-52, 2008. DOI: 10.1007 / s10787-007-1609-x.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Principles of Instrumental Analysis**, 420. Science plus, 2008.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de análise instrumental**. Bookman, 2009.

HSIEH, V. C.; HSIEH, M. L.; CHIANG, J. H.; CHIEN, A.; HSIEH, M. S. Emergency Department Visits and Disease Burden Attributable to Ambulatory Care Sensitive Conditions in Elderly Adults. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 3811, 2019. DOI:10.1038/s41598-019-40206-4

IBGE-Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Quantidade e valor dos produtos da extração vegetal e da silvicultura, segundo os principais produto -Brasil. 2010.

JONES, R. R; HOOPER, D. C; ZHANG, L.; WOLVERSON, D.; & VALEV, V. K. Raman Techniques: Fundamentals and Frontiers. **Nanoscale Research Letters**. v.14, p. 231, 2019. DOI: 10.1186 / s11671-019-3039-2

JORGENSEN, W. L.; DUFFY, E. M. Prediction of drug solubility from structure. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, n. 3, p. 355–366, 2002. DOI:10.1016/s0169-409x(02)00008-x

JOUX, F.; LEBARON, P. Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level. **Microbes and Infection**, 2000.

KAATZ, G. W., MOUDGAL, V. V., SEO, S. M., & KRISTIANSEN, J. E. Phenothiazines and thioxanthenes inhibit multidrug efflux pump activity in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 47, n. 2, p. 719–726, 2003. DOI: 10.1128/AAC.47.2.719-726.2003

KAATZ, G. W.; DEMARCO, C. E.; SEO, S. M. MepR, a repressor of the *Staphylococcus aureus* MATE family multidrug efflux pump MepA, is a substrate-responsive regulatory protein. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2006. DOI: 10.1128/aac.50.4.1276-1281.2006.

KAATZ, G. W.; MCALEESE, F.; SEO, S. M. Multidrug resistance in *Staphylococcus aureus* due to overexpression of a novel multidrug and toxin extrusion (MATE) transport protein. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2005. DOI: 10.1128/aac.49.5.1857-1864.2005.

KAATZ, G. W.; SEO, S. M. Inducible NorA-mediated multidrug resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 39, 2650–2655, 1995. DOI: 10.1128/2Faac.39.12.2650.

KAATZ, G. W.; SEO, S. M.; RUBLE, C. A. Efflux-mediated fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 1993. DOI: 10.1128/AAC.37.5.1086.

KAATZ, G. W.; SEO, S. M.; RUBLE, C. A. Mechanisms of fluoroquinolone resistance in *staphylococcus aureus*. **J Infect Dis**, 1991.DOI:10.1093/infdis/163.5.1080.

KERNS E. H.; DI, L. Part 2: **physicochemical properties**. In: Kerns EH, Di L. Druglike properties: concepts, structure design and methods: from ADME to tpxicity optimization. Amsterdam: Academic. p. 35-99, 2008.

KHAN, S. Z.; LONGLAND, C. L.; MICHELANGELI, F. The effects of phenothiazines and other calmodulin antagonists on the sarcoplasmic and endoplasmic reticulum Ca^{2+} pumps. **Biochem Pharmacol.** v. 60, n. 12, p. 1797-806, 2000. DOI: 10.1016/s0006-2952(00)00505-0. PMID: 11108794.

KHAN, N. S.; AHMAD, A.; HADI, S. M. Anti-oxidant, pro-oxidant properties of tannic acid and its binding to DNA. **Chemico-Biological Interactions**, 125, 177-189, 2000. DOI: 10.1016/s0009-2797(00)00143-5.

KIMURA, T. Analysis of factors governing drug absorption and their improvement. *Yakugaku Zasshi*. v. 129, n. 8, p. 911-23, 2009. DOI: 10.1248 / yakushi.129.911.

KIRKOVSKY, L. L.; ZUTSHI, A. **Pharmacokinetics for Medicinal Chemists**. ADMET for Medicinal Chemists, p. 201–285, 2010. DOI:10.1002/9780470915110.ch5

LAGORCE, D.; REYNES, C.; CAMPROUX, A.C.; MITEVA, M. A.; SPERANDIO, O.; VILLOUTREIX, B. O. *In Silico ADME / Tox Predictions*. Em ADMET for Medicinal Chemists (eds K. Tsaïoun e SA Kates), 2011. DOI:10.1002/9780470915110.ch2

LAKHUNDI, S.; ZHANG, K. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. **Clinical Microbiology Reviews**, v.31, n. 4, 2018. DOI: 10.1128/CMR.00020-18

LANGENHEIM, J. H. Plant resins: chemistry, evolution, ecology and ethnobotany. **Annals of Botany**, p. 784–785, 2003. DOI: 10.1093 / aob / mch103

LARKIN, P. **Infrared and Raman spectroscopy: principles and spectral interpretation**. Elsevier, 2011.

LEWIS, I. R.; EDWARDS, H. G. M. (EDS.). **Handbook of Raman spectroscopy: from the research laboratory to the process line**. New York: Marcel Dekker, 2001.

LI, X. Z.; NIKAIDO, H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. **Drugs**, 64, 159-204, 2004. DOI: 10.2165/00003495-200464020-00004.

LIMA-JÚNIOR, R. C. P.; OLIVEIRA, F. A.; GURGEL, L. A.; CAVALCANTE, I. J.; SANTOS, K. A.; CAMPOS, D. A.; VALE, C. A.; SILVA, R. M.; CHAVES, M. H.; RAO, V. S. N.; SANTOS, F. A. Attenuation of visceral nociception by α - and β -amyrin, a triterpenoid mixture isolated from the resin of *Protium heptaphyllum* in mice. **Planta Med.** v. 72, p. 34-39, 2006. DOI:10.1055/s-2005-873150

LIPINSKI, C. A. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. **Drug Discovery Today: Technologies**. v. 1, n. 4, p. 337–341, 2004. DOI: 10.1016/j.ddtec.2004.11.007

LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Discovery Reviews**, V. 46. n. 1-3. P. 3-26. 1997. DOI:10.1016/S0169-409X(96)00423-1

LOOMIS, W. D.; CROTEAU, R. In: STUMPF, P. K. (ed). **Biochemistry of Terpenoids. Lipids: Structure and Function: The Biochemistry of Plants**. Elsevier, 2014. v. 4, Chap. 13, p. 364-410.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2.ed. Nova Odessa, SP: Plantarum, 2008.

LORINCZ, A.; HADDAD, D.; NAIK, R.; NAIK, V.; FUNG, A.; CAO, A.; MANDA, P.; PANDYA, A.; GREG AUNER; RABAH, R.; LANGENBURG, S. E.; KLEIN, M. D. Raman spectroscopy for neoplastic tissue differentiation: a pilot study. **Journal of pediatric surgery**, v. 39, n. 6, p. 953-956, 2004. DOI:10.1016/j.jpedsurg.2004.02.043

MAHAMOUD A, CHEVALIER J, ALIBERT-FRANCO S, KERN W V, PAGÉS J. Antibiotic efflux pumps in Gram-negative bacteria: the inhibitor response strategy. **J Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, n. 1, p. 1223–9, 2007. DOI: 10.1093/jac/dkl493.

MAIA, J. G. S.; ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A. **Plantas aromáticas na Amazônia e seus óleos essenciais**. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, 2001.

MAIA, R. M.; BARBOSA, P. R.; CRUZ, F. G.; ROQUE, N. F.; & FASCIO, M. Triterpenos da resina de *Protium heptaphyllum* March (Burseraceae): caracterização em misturas binárias. **Química Nova**, v. 23, n. 5, p. 623–626, 2000. DOI:10.1590/s0100-40422000000500010

MANTSCH, H. H.; CHAPMAN, D. **Infrared spectroscopy of biomolecules**. Wiley-Liss, 1996.

MARKHAM, P. N., WESTHAUS, E., KLYACHKO, K., JOHNSON, M. E., & NEYFAKH, A. A. Multiple novel inhibitors of the NorA multidrug transporter of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 43, n. 10, p. 2404–2408, 1999. DOI:10.1128/AAC.43.10.2404

MARQUEZ B. Bacterial efflux systems and efflux pumps inhibitors. **Biochimie**, v. 87, n. 12, p.1137-1147, 2005. DOI:10.1016/j.biochi.2005.04.012

MARSHALL, B. M.; LEVY, S. B. Food animals and antimicrobials: Impacts on human health. **Clinical Microbiology Reviews**, 2011. DOI: 10.1128%2FCMR.00002-11.

MARTIN, Y. C. A Bioavailability Score. **J. Med. Chem**, v. 48, n. 9, p. 3164-3170, 2005. DOI: 10.1021 / jm0492002

MARTINS, M., SANTOS, B., MARTINS A., VIVEIROS, M., COUTO, I., CRUZ, A. AMARAL, L. An instrument-free method for the demonstration of efflux pump activity of bacteria. **In vivo**, 20(5), 657-664. PMID: 17091774.

MATOS, I.; BENTO, A. F.; MARCON, R.; CLAUDINO, R. F.; CALIXTO, J. B. Preventive and therapeutic oral administration of the pentacyclic triterpene α,β -amyrin ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice: The relevance of cannabinoid system. **Molecular Immunology**, v. 54, n. 3-4, p. 482-492, 2013. DOI:10.1016/j.molimm.2013.01.018

MAY, M. Structured drug design. **Drug. Discovery & Development**, v. 13, n. 6, p.8-10, 2010.

MCALLEESE, F.; PETERSEN, P.; RUZIN, A.; DUNMAN, P. M.; MURPHY, E.; PROJAN, S. J.; BRADFORD, P. A. A novel MATE family efflux pump contributes to the reduced susceptibility of laboratory-derived *Staphylococcus aureus* mutants to tigecycline. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 5, p. 1865-1871, 2005. DOI: 10.1128/AAC.49.5.1865-1871.2005

MCCONKEY BJ, SOBOLEY V, EDELMAN M. The performance of current methods in ligand-protein docking. **Current Science**. 2002; 83:845–855.

MCMURRY, J. 7º Ed. *Química Orgânica - Combo*. São Paulo: Cengage Learning, p.1344, 2011.

MELO, C. M., MORAIS, T. C., TOMÉ, A. R., BRITO, G. A. C., CHAVES, M. H., RAO, V. S., SANTOS, F. A. Anti-inflammatory effect of α , β -amyrin, a triterpene from *Protium heptaphyllum*, on cerulein-induced acute pancreatitis in mice. **Inflammation Research**, v. 60, n. 7, p. 673–681, 2011. DOI:10.1007/s00011-011-0321-x

MELO, C. M.; CARVALHO, K. M. M. B.; NEVES, J. C. S.; MORAIS, T. C.; RAO, V. S.; SANTOS, F. A.; BRITO, G. A. C.; CHAVES, M. H. α , β -amyrin, a natural triterpenoid ameliorates L-arginine-induced acute pancreatitis in rats. **World Journal of Gastroenterology**, v. 16, n. 34, p. 4272-4280, 2010. DOI:10.3748/wjg.v16.i34.4272

MÉNDEZ-VILAS, Antonio (Ed.). **Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education**. Formatex Research Center, 2013.

MENG X. Y.; ZHANG, H. X.; MEZEI, M.; CUI, M. Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. **Current computer-aided drug design**, v. 7, n. 2, p. 146-157, 2011. DOI:10.2174/157340911795677602

MITCHESON, J. S.; CHEN, J.; LIN, M.; CULBERSON, C.; SANGUINETTI, M. C. A structural basis for drug-induced long QT syndrome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 22, p. 12329–12333, 2000. DOI:10.1073/pnas.210244497

MOBIN, M.; DE LIMA, S. G.; ALMEIDA, L. T. G.; TAKAHASHI, J. P.; TELES, J. B.; SZESZS, M. W.; MARTINS, M. A.; CARVALHO, A. A.; MELHEM, M. S. C. MDGC-MS analysis of essential oils from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) and their antifungal activity against *Candida* specie. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 2, p. 531–538, 2016. DOI:10.1590/1983-084x/15_110

MONTEIRO, S. C; BRANDELLI, C. L. C. (ORGs.) **Farmacobotânica: Aspectos Teóricos e Aplicação**. Artmed, 2017.

NEUWELT, E.; ABBOTT, N. J.; ABREY, L.; BANKS, W. A.; BLAKLEY, B.; DAVIS, T.; ENGELHARDT, B.; GRAMMAS, P.; NEDERGAARD, M.; NUTT, J.; PARDRIDGE, W.; ROSENBERG, G. A.; SMITH, Q.; DREWES, L. R. Strategies to advance translational research into brain barriers. **The Lancet Neurology**, v. 7, n. 1, p. 84–96, 2008. DOI:10.1016/s1474-4422(07)70326-5

NEYFAKH, A. A.; BORSCH, C. M.; KAATZ, G. W. Fluoroquinolone resistance protein NorA of *Staphylococcus aureus* is a multidrug efflux transporter. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 37,128–129, 1993. DOI: 10.1128/AAC.37.1.128. PMID: 8431010; PMCID: PMC187619.

NI, W.; LI, Y.; GUAN, J.; ZHAO, J.; CUI, J.; WANG, R.; LIU, Y. Effects of efflux pump inhibitors on colistin resistance in multidrug-resistant gram-negative bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.60, n.5, p. 3215-3218, 2016. DOI: 10.1128/2FAAC.00248-16.

NICHOLLS, G.; YODIM, K. **Drug Transporters** Volume 1: Role and Importance in ADME and Drug Development. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2016.

NOGUEIRA, A. O.; OLIVEIRA, Y. I. S.; ADJAFRE, B. L.; MORAES, M. E. A.; ARAGÃO, G. F. Pharmacological effects of the isomeric mixture of alpha and beta amyrin from *Protium heptaphyllum*: a literature review. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v. 33, n. 1, p. 4-12, 2018. DOI:10.1111/fcp.12402

O'BRIEN, T. F. Resistance of bacteria to antibacterial agents: report of Task Force 2. *Reviews of infectious diseases*, v. 9 Suppl 3, S244–S260, 1987. DOI: 10.1093/clinids/9.supplement_3.s24

O'NEILL J. Antimicrobial Resistance: Tackling a Crisis for the Health and Wealth of Nations [Internet]. Review on Antimicrobial Resistance, 2014. Disponível em: https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations_1.pdf.

OLIVEIRA, A. M. **Reconhecimento molecular de sequências específicas do DNA**; tese de doutorado do Departamento de Química do ICEx-UFMG. 2004.

OLIVEIRA, F. A.; COSTA, C. L. S.; CHAVES, M. H.; ALMEIDA, F. R. C.; CAVALCANTE, Í. J. M.; LIMA, A. F.; LIMA JR, R. C. P.; SILVA, R. M.; CAMPOS, A. R.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N. Attenuation of capsaicin-induced acute and visceral nociceptive pain by α - and β -amyrin, a triterpene mixture isolated from *Protium heptaphyllum* resin in mice. **Life Sciences**, v. 77, n. 23, p. 2942–2952, 2005. DOI:10.1016/j.lfs.2005.05.031

OLIVEIRA, F. A.; VIEIRA-JÚNIOR, G. M.; CHAVES, M. H.; ALMEIDA, F. R.; SANTOS, K. A.; MARTINS, F. S.; SILVA, R. M.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. . Gastroprotective Effect of the Mixture of α - and β -Amyrin from *Protium heptaphyllum*: Role of Capsaicin-Sensitive Primary Afferent Neurons. **Planta Medica**, v. 70, n. 8, p. 780–782, 2004. DOI:10.1055/s-2004-827212

OLIVEIRA, F. de A. **Estudo das propriedades farmacológicas da resina de Protium heptaphyllum (Aubl.) March. e de seus principais constituintes, mistura de alfa e beta amirina**. 2005. 279 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

OLIVEIRA, L. F. S. Espectroscopia Molecular. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, n. 4, p. 24-30, 2001.

OLIVEIRA, M. L. G. de. **Avaliação in silico do potencial farmacológico e toxicológico de friedelanos, lupanos e derivados** (Tese de doutorado). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2004.

OTUKI, M. F.; FERREIRA, J.; LIMA, F. V.; MEYRE-SILVA, C.; MALHEIROS, A.; MULLER, L. A.; CANI, G. S.; SANTOS, A. R.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Antinociceptive Properties of Mixture of α -Amyrin and β -Amyrin Triterpenes: Evidence for Participation of Protein Kinase C and Protein Kinase A Pathways. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 313, n. 1, p. 310–318, 2005. DOI:10.1124/jpet.104.071779

PAGÈS, J. M.; AMARAL, L. Mechanisms of drug efflux and strategies to combat them: Challenging the efflux pump of Gram-negative bacteria. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, 2009. DOI: 10.1016/j.bbapap.2008.12.011. Epub 2008 Dec 25. PMID: 19150515.

PAGES, J.-M.; AMARAL, L.; FANNING, S. An Original Deal for New Molecule: Reversal of Efflux Pump Activity, A Rational Strategy to Combat Gram-Negative Resistant Bacteria. **Current Medicinal Chemistry**, 2011. DOI: 10.2174/092986711796150469.

PAJEVA, I. K.; WIESE, M. Pharmacophore model of drugs involved in P-glycoprotein multidrug resistance: explanation of structural variety (hypothesis). **J. Med. Chem.** v.45, n. 26, p. 5671–5686, 2002. DOI:10.1021/jm020941h

PAN, S. Y.; ZHOU, S. F.; GAO, S. H.; YU, Z. L.; ZHANG, S. F.; TANG, M. K.; SUN, J. N.; MA, D. L.; HAN, Y. F. New perspectives on how to discover drugs from herbal medicines: CAM's outstanding contribution to modern therapeutics. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, 2013. DOI: 10.1155/2013/627375.

PAULI, G. F.; JAKI B. U.; LANKIN, D. C. Quantitative ¹H NMR: development and potential of a natural of products analysis. **J. Nat. Prod.** v.68, p. 133-149, 2005. DOI:10.1021/np0497301

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. **Introduction to spectroscopy: a guide for students of organic chemistry**. Fort Worth: W.B. Saunders, 2016.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à espectroscopia**. Cengage Learning, 2010.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. A. **Introduction to spectroscopy**. Cengage Learning, 2008.

PEREIRA, D. G. Importância do metabolismo no planejamento de fármacos. **Química nova**, v. 30, n.1, p. 171-177, 2007. DOI: 10.1590/S0100-40422007000100029

PICHERSKY, E.; RAGUSO, R. A. Why do plants produce so many terpenoid compounds?. **New Phytol**, v. 220, p. 692-702, 2018. DOI:10.1111/nph.14178

PIDDOCK, L. J. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. **Clinical microbiology reviews**, 19, 382–402, 2006. DOI: 10.1128/2FCMR.19.2.382-402.2006.

PRABHAKAR, P.; REETA, K.; MAULIK, S. K.; DINDA, A. K.; & GUPTA, Y. K. α -Amyrin attenuates high fructose diet-induced metabolic syndrome in rats. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 42, n. 1, p. 23–32, 2017. DOI:10.1139/apnm-2016-0088

PRICE, N. C.; DWEK, R. A.; RARCLIFFE, R. G.; WOLMARD, M. **Principles and problems in physical chemistry for biochemists**. 3^o ed. Oxford University press, 2001.

RALLABANDI, H. R.; MEKAPOGU, M.; NATESAN, K.; SAINDANE, M.; DHUPAL, M.; SWAMY, M. K.; VASAMSETTI, B. M. K. Computational Methods Used in Phytocompound-Based Drug Discovery. **Plant-Derived Bioactives**, p. 549–573, 2020. DOI:10.1007/978-981-15-2361-8_25

REDDY, P. N.; SRIRAMA, K.; DIRISALA, V. R. An Update on Clinical Burden, Diagnostic Tools, and Therapeutic Options of *Staphylococcus aureus*. **Infectious Diseases: Research and Treatment**. 10:1179916117703999, 2017. DOI:10.1177/1179916117703999

RITCHIE, T. J.; ERTL, P.; LEWIS, R. The graphical representation of ADME-related molecule properties for medicinal chemists. **Drug Discovery Today**, v. 16, n. 1-2, p. 65–72, 2011. DOI: 10.1016/j.drudis.2010.11.002

RITSCHELIS, W. A.; KEARNSIS, G. L. **Handbook of basic pharmacokinetics including clinical applications**. 7th ed. EUA: American Pharmacists Association, 2009.

ROCHA, J. E.; DE FREITAS, T. S.; DA CUNHA XAVIER, J.; PEREIRA, R. L.S.; JUNIOR, F.N. P.; NOGUEIRA, C. E. S.; MARINHO, M. M.; BANDEIRA, P. N.; DE OLIVEIRA, M. R.; MARINHO, E. S.; TEIXEIRA, A. M. R.; DOS SANTOS, H. S., & COUTINHO, H. D. M. Antibacterial and antibiotic modifying activity, ADMET study and molecular docking of synthetic chalcone (E)-1-(2-hydroxyphenyl)-3-(2,4-dimethoxy-3-methylphenyl)prop-2-en-1-one in strains of *Staphylococcus aureus* carrying NorA and MepA efflux pumps. **Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie**, v. 140, p. 111768, 2021. DOI:10.1016/j.biopha.2021.111768

RÜDIGER, A. L.; VEIGA-JUNIOR, V. F. Chemodiversity of Ursane- and Oleanane-Type Triterpenes in Amazonian Burseraceae Oleoresins. **Chemistry & Biodiversity**, v. 10, n. 6, p. 1142–1153, 2013. DOI:10.1002/cbdv.201200315.

SALA, O. **Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho**. 2 ed. São Paulo: Unesp, p. 276, 2008.

SANGUINETTI, M. C.; TRISTANI-FIROUZI, M. hERG potassium channels and cardiac arrhythmia. **Nature**, v. 440, n.7083, p.463–469, 2006. DOI:10.1038/nature04710

SANTIAGO, R. N. S. **Propriedades estruturais e vibracionais da acetofenona C₁₁O₅H₁₄ e da chalcona C₁₅H₁₃NO por espectroscopia Raman e infravermelho e cálculos de primeiros princípios**. 2018. Tese (Doutorado em Física) - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.

ŠANTIĆ, Ž.; PRAVDIĆ, N.; BEVANDA, M.; GALIĆ, K. The historical use of medicinal plants in traditional and scientific medicine. **Psychiatr Danub**. v. 29, p.787-792, 2017. DOI: 10.4103 / 0973-7847.95849

SANTOS, F. A.; FROTA, J. T.; ARRUDA, B. R.; MELO, T. S.; DA SILVA, A. A. C. A.; BRITO, G. A. C.; CHAVES, M. H.; RAO, V. S. Antihyperglycemic and hypolipidemic effects of α , β -amyrin, a triterpenoid mixture from *Protium heptaphyllum* in mice. **Lipids in Health and Disease**, v. 11, n. 1, p. 98, 2012. DOI:10.1186/1476-511x-11-98

SCHINDLER, B. D.; JACINTO, P.; KAATZ, G. W. Inhibition of drug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*: current status of potentiating existing antibiotics. **Future microbiology**, 4, 491-507, 2013. DOI: 10.2217/fmb.13.16.

SERIO, A. W.; KEEPERS, T.; ANDREWS, L.; KRAUSE, K. M. Aminoglycoside Revival: Review of a Historically Important Class of Antimicrobials Undergoing Rejuvenation. **EcoSal Plus**, v.8, n. 1, 2018. DOI:10.1128/ecosalplus.ESP-0002-2018

SHEPPARD, G. S.; BOUSKA, J. J. Why optimize cancer drugs for ADMET? **Drug Discovery Today**, v. 2, n. 4, p. 343-349, 2005. DOI: 10.1016/j.ddstr.2005.10.001

SHRIRAM, V.; KHARE, T.; BHAGWAT, R.; SHUKLA, R., KUMAR, V. Inhibiting Bacterial Drug Efflux Pumps via Phyto-Therapeutics to Combat Threatening Antimicrobial Resistance. **Frontiers in Microbiology**, 2018. DOI. 10.3389/fmicb.2018.02990

SIANI, A. C.; NAKAMURA, M. J.; TAPPIN, M. R. R.; MONTEIRO, S. S.; GUIMARÃES, A. C.; RAMOS, M. F. S. Chemical Composition of South American Burseraceae Non-volatile Oleoresins and Preliminary Solubility Assessment of their Commercial Blend. **Phytochemical Analysis**, v.23, n. 5, p. 529–539, 2012. DOI:10.1002/pca.2351

SIANI, A. C; GARRIDO, I. S; MONTEIRO, S. S; CARVALHO, E. S; RAMOS, M. F. S. *Protium icicariba* como fonte de essências voláteis. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, n. 5, p. 477-489, 2004. DOI: 10.1016 / j.bse.2003.11.003

SILVA, J. R. D. Desenvolvimento de metodologia para eletrodegradação de ciprofloxacina por agentes oxidantes gerados in situ. Dissertação (Mestrado em química) Universidade Federal de Sergipe, 2012.

SILVA, M. O.; AQUINO, S. Resistência aos antimicrobianos: uma revisão dos desafios na busca por novas alternativas de tratamento. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v. 8, n. 4, p. 472-482, 2018. DOI: 10.17058/reci.v8i4.11580

SILVADO, C. Farmacogenética e antiepilépticos (farmacologia das drogas antiepilépticas: da teoria à prática). **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology**, v.14, n. 2, p. 51-56, 2008. DOI: 10.1590 / s1676-26492008000600009

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 6ª ed., UFSC, 2007.

SKOOG, D. A. **Princípios de análise instrumental**. Bookman, 6ª ed. 2009.

SMITH, D. A. **Metabolism, Pharmacokinetics and Toxicity of Functional Groups: Impact of the Building Blocks of Medicinal Chemistry in ADMET**. (Cambridge, UK: RSC Pub.), 2010.

SOLDI, C.; PIZZOLATTI, M. G.; LUIZ, A. P.; MARCON, R.; MEOTTI, F. C.; MIOTO, L. A.; SANTOS, A. R. Synthetic derivatives of the α - and β -amyrin triterpenes and their antinociceptive properties. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 6, p. 3377–3386, 2008. DOI: 10.1016/j.bmc.2007.12.008

SPINDLER, E. C.; HALE, J. D. F.; GIDDINGS Jr, T. H.; HANCOCK, R. E. W.; GILL, R. T. Deciphering the mode of action of the synthetic antimicrobial peptide Bac8c. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 4, p. 1706-1716, 2011. DOI: 10.1128/AAC.01053-10.

STAVRI, M.; PIDDOCK, L. J.; GIBBONS, S. Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 59, n. 6, p. 1247-1260, 2007. DOI: 10.1093/jac/dkl460.

SUN, J.; DENG, Z.; YAN, A. Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2014.

TAMADONFAR, K. O.; OMATTAGE, N. S.; SPAULDING, C. N.; HULTGREN, S. J. Reaching the End of the Line: Urinary Tract Infections. **Microbiology spectrum**, v. 7, n. 3, 2019. DOI: 10.1128/microbiolspec.BAI-0014-2019

TAVARES, C. J. **Nanopartículas de cobre auto-suportadas em vidros borofosfatos para reações click**. MS thesis. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2020.

TEIXEIRA, A. M. R.; LIMA, I. K. C.; XAVIER, M. R.; PEREIRA, R. L. S.; GONÇALVES, B. G.; DE SENA JUNIOR, D. M.; DE COSTA, J. M.; FREIRE, P. T. C.; SARAIVA, G. D.; BENTO, R. R. F.; DE FARIAS, J. L. B.; TOLEDO, T. A. Vibrational spectroscopy study of essential oils from *Plectranthus amboinicus* Lour. Spreng and *Vanillosmopsis arborea* Baker. **Vibrational Spectroscopy**, v. 98, p. 22–29, 2018. DOI: 10.1016 / j.vibspec.2018.05.008

TRABULSI, L. Rachid; ALTERTHUM, Flavio. Microbiologia. 6ª edição. **Editora Atheneu**, 2015.

UBUKATA K, ITOH-YAMASHITA N, KONNO M. Cloning and expression of the norA gene for fluoroquinolone resistance in Staphylococcus aureus. **Antimicrob Agents Chemother**, 1989. DOI: 10.1128/AAC.33.9.1535.

UGARIOGU, S. N.; DURU I. A.; ABAH, C. V. Natural Product Chemistry and Computer Aided Drug Design an Approach to Drug Discovery: A Review Article. **Int J Pharmacogn Chinese Med**, v.4, n.2, 2020. DOI: 10.23880/ipcm-16000208

VAN DE WATERBEEMD, H.; GIFFORD, E. ADMET *in silico* modelling: towards prediction Paradise? **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, p. 192-204, 2003. DOI: 10.1038 / nrd1032.

VARELA, M. F.; STEPHEN, J.; LEKSMI, M.; OLHA, M.; WENZEL, N.; SANFORD, L. M.; HERNANDEZ, A. J.; PARVATHI, A.; KUMAR, S. H. Bacterial Resistance to Antimicrobial Agents. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, v. 10, n. 5, p. 593, 2021. DOI: 10.3390/antibiotics10050593.

VARMA, M.V.; PANCHAGNULA, R. Prediction of in vivo intestinal absorption enhancement on P-glycoprotein inhibition, from rat *in situ* permeability. **J. Pharm. Sci.** v. 94, n. 8, p. 1694–1704, 2005. DOI:10.1002 / jps.20309.

VIEIRA, R. K.; VIEIRA, A. K.; KIM, J. T.; NETRAVALI, A. N. Characterization of Amazonic White Pitch (*Protium heptaphyllum*) for potential use as ‘green’ adhesive. **Journal of Adhesion Science and Technology**, v. 28, n.10, p. 963-974, 2014. DOI: 10.1080/01694243.2014.880220

VIEIRA-JÚNIOR, G. M. .; DE SOUZA, C. M. .; CHAVES, M. H. Resina de *Protium heptaphyllum*: Isolamento, caracterização, estrutura e avaliação das propriedades térmicas. **Quim. Nova**, v. 28, n. 2, p. 183–187, 2005. DOI:10.1590/S0100-40422005000200003

WALSH, Christopher. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 775-781, 2000. DOI: 10.1038/35021219

WERMUTH, C. G. **The Practice of Medicinal Chemistry**. 2th ed. Great Britain: Academic Press, 2003.

WHALEN, K; FINKEL, R; PANAVELIL, T A. Farmacologia Ilustrada-6ª Edição. Artmed Editora, 2016.

WILLIAMS, A. D.; LEMKE, T. L. **Foye's Principles of Medicinal Chemistry**, 5 ed.: Lippincott Williams & Wilkins: United States of America, 2002.

World Health Organization (WHO). Antimicrobial resistance [Internet]. 2016.. Disponível em: [http:// www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/).

XING, L.; Barnie, P. A.; Su, Z.; Xu, H. Development of Efflux Pumps and Inhibitors (EPIs) in *A. baumannii*. **Clin Microbiol.** v. 3, n. 1, p. 1–6, 2014. DOI: 10.4172/2161-0494.1000101.

YU, Z.; CAI, Y.; QIN, W.; LIN, J.; QIU, J. Polymyxin E induces rapid *Paenibacillus polymyxa* death by damaging cell membrane while Ca^{2+} can protect cells from damage. **PLoS One**, v. 10, n. 8, 2015. DOI: 10.1371/2Fjournal.pone.0135198.

ZECHINI, B.; VERSACE, I. Inhibitors of multidrug resistant efflux systems in bacteria. **Recent patents on anti-infective drug Discovery**, 4, 37-50, 2009. DOI: 10.2174/157489109787236256.

3. CAPÍTULO 3 – MANUSCRITO 1

Manuscrito: Spectroscopic, physicochemical, and pharmacokinetic analysis of α,β -amyrin mixture obtained from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand resin

Raíssa C. Oliveira^a, Paulo N. Bandeira^b, Telma G. Lemos^c, Hécio S. dos Santos^{a,b,h}, Murilo S.S. Julião^b, Emmanuel S. Marinho^{e,h}, Francisco Flávio da S. Lopes^h, Selene Maia de Moraes^h, João Pedro da Hora^b, Ana J. de Moraes Bento^a, Igor K.C. Lima^a, Carlos E.S. Nogueira^{a,f}, Gilbero D. Saraiva^f, Antônio C.H. Barreto^g, Raimundo Braz-Filho^h, Alexandre M.R. Teixeira^{a,d,h,i*}

^a Departamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri, Crato, CE, Brazil

^b Centro de Ciências e Tecnologia - Curso de Química, Universidade Vale do Acaraú, Sobral, CE, Brazil

^c Departamento de Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

^d Departamento de Física, Universidade Regional do Cariri, Juazeiro do Norte, CE, Brazil

^e Grupo de Química Teórica e Eletroquímica, Universidade Estadual do Ceará, Campus FAFIDAM, Limoeiro do Norte, Ceará, Brazil

^f Departamento de Física, Universidade Estadual do Ceará, Quixadá, Ceará, Brazil

^g Departamento de Física, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

^h Universidade do Norte Fluminense – Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

ⁱ Centro de Ciência e Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brazil.

*Corresponding author. Postgraduate Program in Biological Chemistry, Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri, Campus Pimenta II, CEP: 63.100-000, Crato, CE, Brazil. E-mail addresses: alexandre.teixeira@urca.br

ABSTRACT

In the present study, the α,β -amyrin mixture was obtained from *Protium heptaphyllum* resin, and its molecular structure was determined by one- and two-dimensional Nuclear Magnetic Resonance (NMR) techniques and Mass spectroscopy. This natural compound was also characterized by Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared spectroscopy (ATR-FTIR), Fourier Transform Raman (FT-Raman), and Ultraviolet-Visible (UV-Vis) spectroscopy. Vibrational wavenumber and wavevector have been predicted using the Density Functional Theory (DFT) calculations, and the comparison with experimental data allowed us to assign most of the normal modes of this isomeric binary mixture. The absorption wavelengths and oscillator strengths for the three singlet states of this binary mixture were calculated using time-dependent density functional theory (TD-DFT). The electrochemical behavior was also evaluated. The physical-chemical parameters for ionization constant (pKa), partition coefficient (log P), distribution coefficient (log D), solubility coefficient (log S), and Polar Surface Area (PSA) were predicted. The cardiotoxic effect was also evaluated using the Pred-hERG computational tool. Furthermore, the pharmacokinetic behavior of the α -amyrin and β -amyrin molecules was evaluated by studies of absorption, distribution, metabolism and excretion, and toxicity (ADMET). From the study of the physical-chemical properties, it was possible to infer that the α -amyrin and β -amyrin compounds do not possess ionizable groups in physiological environment. They are essentially lipophilic and remain constant between pH 2-14. From the study of the pharmacokinetic properties of AMDE, it was observed that the α -amyrin and β -amyrin had values that suggest low intestinal absorption and do not reach the central nervous system. It was also verified that they present a lower risk of hepatic toxicity by metabolic activation and do not present cardiotoxic risk.

Keywords: Isomeric mixture; NMR; ATR-FTIR; FT-Raman; UV-Vis; ADMET.

1. Introduction

The Burseraceae family is composed of approximately 750 species distributed in 19 genera [1]. One of these species is *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand, popularly known as “breu branco”, “almecegueira” and “almecega do Brasil”. It is found throughout Brazil, especially in the Amazon region [2]. When the trunk of this species is lesioned, it exudes an essential oil and amorphous resin. Ethnopharmacological information refers to this species as possessing anti-inflammatory, antimicrobial, antinociceptive, healing, and expectorant proprieties [3]. Furthermore, the resin of *Protium heptaphyllum* is used in the industry of venom, in the calafetation of boats [4-7].

Phytochemical studies performed with the resin of the species *Protium heptaphyllum* identified seven triterpenoid constituents, diffused in three mixtures of triterpenes (maniladiol and breine; α and β -amyrin; lupenone, α and β -amyrinone) [5], the majority of which is the isomeric mixture of pentacyclic triterpenoids, α -amyrin and β -amyrin [8-11]. The α,β -amyrin mixture possesses pharmacological activities in the central and peripheral nervous system, as well as in the gastrointestinal tract and immunological system [12]. It is known that this isomeric mixture possesses anti-inflammatory and antioxidant [13-16], anticonvulsant [17], gastroprotective [4], hepatoprotective [18], antihyperglycemic [19, 20], antibacterial [21], and sedative and anxiolytic [22] effects.

Establishing the spectroscopic, physicochemical, and pharmacokinetic properties of substances extracted from plants is fundamental to support possible pharmacological and technological applications. In this work, the isomeric binary mixture of 3 α -hydroxiurs-12-ene (α -amyrin) and 3 β -hydroxiolean-12-ene (β -amyrin) was characterized by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR) techniques of ^1H , and ^{13}C , and two-dimensional NMR, Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared spectroscopy (ATR-FTIR), Fourier Transform Raman (FT-Raman), and Ultraviolet-Visible (UV-Vis) spectroscopy. Vibrational wavenumber and wavevector have been predicted using the Density Functional Theory (DFT) calculations, and their normal modes were assigned. The absorption wavelengths and oscillator strengths for the three singlet states of this binary mixture were calculated using time-dependent density functional theory (TD-DFT). The physical-chemical properties and the pharmacokinetic behavior of the α -amyrin and β - amyrin molecules were evaluated by studies of absorption, distribution, metabolism and excretion, and toxicity (ADMET).

2. Materials and methods

2.1. Isolation of the binary mixture of α - and β -amyrin

The α,β -amyrin mixture was isolated from the resin of *Protium heptaphyllum*. The procedure for isolation of this isomeric binary mixture was already reported in the literature [23].

2.2 NMR, ATR-IR, and FT-Raman measurements

The structural determination of this isomeric mixture was obtained by ^1H and ^{13}C NMR technique, using Bruker, DPX-300, Advance DRX-500 spectrometers operating with frequencies of 300 MHz, and 500 MHz for hydrogen and 75 MHz and 125 MHz for carbon, respectively.

The GCMS analyses were conducted on an Agilent instrument model GC-7890B/MSD-5977A with a quadrupole mass analyzer of electron impact at 70 eV and a RTX5-MS (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm) capillary column. The mass spectrometer was adjusted for acquisition in the range of 40–660 m/z. The injector temperature was kept constant at 230 $^{\circ}\text{C}$ with a helium flow rate of 1.00 mL min^{-1} (carrier gas). The temperatures of the source and transfer lines were set at 230 $^{\circ}\text{C}$ and 280 $^{\circ}\text{C}$, respectively. The following program was used in the chromatographic oven: initial temperature of 40 $^{\circ}\text{C}$, with a heating ramp from 3 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ to 280 $^{\circ}\text{C}$ for 5 min at the end of the run. The voltammetric measurements were performed using a potentiostat/galvanostat $\mu\text{AUTOLAB III}$ from Metrohm-Autolab (The Netherlands) running with the NOVA 2.1.4 software. The 1.70 mM of the α,β -amyrin stock solution was prepared by dissolution of the appropriate amount of the α,β -amyrin mixture in ethanol 99,8% (v/v), stored and maintained under refrigeration. The phosphate-buffered saline, PBS, (1x, pH 7.40) solution was prepared by dissolution of the appropriate amount of NaCl, KCl, Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , and the pH of the measuring solution was adjusted at 7.40 by neutralization using small volumes of 0.10 M HCl or 0.10 mol L^{-1} NaOH.

All electrochemical experiments were carried out in a conventional three-electrode cell at room temperature. Glassy carbon (GC), platinum wire, and Ag/AgCl/ $\text{KCl}_{3.0 \text{ mol L}^{-1}}$ were used as the working, counter, and reference electrodes, respectively. Cyclic voltammograms, at 10 and 100 mVs^{-1} , were recorded in an appropriate potential window using 1.70 mM of α,β -amyrin

stock solution: 1.0 mL of stock solution was added to the electrochemical cell containing 9.0 mL of PBS solution, pH 7.40.

The infrared absorption spectrum was obtained by Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared spectroscopy (ATR-FTIR) using a Bruker vacuum spectrometer, model VERTEX 70V with a HeNe laser source with 633 nm wavelength. A Globar source was used for the mid-infrared (MIR) region with DLaTGS pyroelectric detectors to record the signal from the sample. The ATR-FTIR measurement was recorded at room temperature in the region of 130 cm^{-1} to 4000 cm^{-1} .

Raman spectrum was measured by Fourier Transform Raman spectroscopy (FT-Raman) using a Bruker RFS100/S FTR system and a D418-T detector, with a Nd:YAG laser emitting at 1064 nm as excitation source with 150 mW laser power, recording in the spectral range of 40 to 4000 cm^{-1} with a resolution of 4 cm^{-1} .

2.3 UV-Vis measurements

The α,β -amyrin mixture was prepared in ethanol at a concentration of $12.5\text{ }\mu\text{M}$ and the UV–Vis absorption spectrum was obtained at room temperature using a GENESYSTM 10S spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wisconsin, USA) in the wavelength range of 190 to 240 nm.

2.4 Computational method

Calculations using Density functional theory (DFT) were carried out using the Gaussian 09 package [24], with the B3LYP method and 6-31G (d,p) basis set to obtain the theoretical infrared spectrum and to correlate their wavenumbers with the experimental ones. The calculated vibrational wavenumbers were scaled by the empirical scaling factor, $f=0.9613$, as suggested by Wong [25]. The description of the normal modes of vibration was carried out based on the visualization of the atomic displacement representations for each vibration using the *Chemcraft* program [26]. The UV-Vis spectrum was calculated using the Time-Dependent Density Functional Theory (TD-DFT) using the CAM-B3LYP [27] at 6-31 G(d,p) level of theory in ethanol as an implicit solvent. The implicit solvent effect was considered employing the polarizable continuum model (PCM) using the integral equation formalism polarizable continuum model (IEF-PCM) [28]. In this model, the solute is inserted into a cavity in a continuous solvent treated as an effective medium. In such a way, the electrostatic component

of the solvent effect can be estimated from the interactions of the solute with the surrounding polarizable medium [29].

2.5 ADMET studies

Initially, the α -amyrin and β -amyrin molecules were drawn in the Marvin JS design window deployed on the ChemAxon © online server (<https://disco.chemaxon.com/calculators/demo/plugins/>) to perform the theoretical calculations ionization constant (pKa), partition coefficient (logP), distribution coefficient at pH 7.4 (logD7.4), solubility coefficient (logS) and Polar Surface Area (PSA), physical-chemical properties used as fundamental descriptors in the description of pharmacokinetic properties. Then, the molecules were subjected to the prediction of pharmacokinetic properties by the absorption, distribution, metabolism, and excretion (ADME) models of the SwissADME online server (<http://www.swissadme.ch/index.php>) of the Swiss Institute of Bioinformatics [30]. Absorption and distribution were defined using the human intestinal absorption (HIA), blood-brain barrier (BBB) permeability, and P-glycoprotein substrate (P-gp) graphs in the Brain Or IntestinaL EstimateD permeation method (BOILED-Egg) [31] through molecular descriptors of lipophilicity (WlogP) [32] and polarity (PSA) [33] and the metabolism and excretion models were predicted through the inhibition of cytochrome P450 (CYP450) isoenzymes.

To predict the cardiotoxic effect, the molecules were designed in the JSME molecular editor [34] implanted in the Pred-hERG tool of the online server LabMol (<http://predherg.labmol.com.br/>), where the results include positive or negative activity for cardiotoxic risk, percentage of confidence of the toxicity model and the two-dimensional probability map, where the positive (green region) and negative (pink region) contributions to the inhibition of the hERG ion channels are expressed.

3. Results and Discussion

3.1 Structural analysis

Figure 1 shows the molecular structure of the isomers α -amyrin and β -amyrin with molecular formula $C_{30}H_{50}O$, whose NMR data for this isomeric mixture are given in Table 1. The 1H , and ^{13}C NMR spectra, $^1H \times ^{13}C$ -2D HMBC spectrum, and $^1H \times ^1H$ -COZY homonuclear

correlation spectrum for the α,β -amyrin mixture are presented in the Supplementary material in Figures S1 to S4.

Figure 1

Table 1

The number of spectral lines revealed by the fully decoupled ^{13}C NMR spectrum (BB = Broad Band) (Figure S1, supplementary material), it was possible to observe the presence of nineteen methylene groups, twelve methynic groups, sixteen methyl groups, and thirteen non-hydrogenated carbon atoms (Table 1), suggesting a triterpenic mixture.

Observing the ^{13}C NMR spectrum, as given in Table 1, the positions on the chemical shift scale relative to four spectral lines in the characteristic region of olefinic carbon, it is concluded that it is a binary mixture of triterpenes belonging to the urs-12-ene and olean-12-ene series, which is also confirmed by the chemical shift values at C-18, whose position in the olean series is more protected at around 11.5 ppm, due to the protective effect of the axial methyl on C-20, which has a γ gauche disposition in relation to the C-18. The spectral line at δ_{C} 79.1 is characteristic of carbinolic carbon, and its high intensity suggests that it can be attributed to two carbon atoms, reinforcing the proposition of a binary mixture of triterpenes.

The ^1H NMR spectrum (Figure S2, supplementary material) showed a set of signals in the δ_{H} 0.8 to 2.0 region, revealing the triterpenoid character of the mixture, already referenced in the ^{13}C NMR spectrum. It also revealed, through integration, that the signal at δ_{H} 3.23 (dd, $J = 10.4$ Hz and 5.0 Hz) corresponds to a hydrogen atom bonded to a carbinolic carbon. It also showed, through the value of integration, the presence of an olefinic hydrogen atom. The data set presented so far allow us to conclude that the mixture is constituted by the triterpene substances identified as α -amyrin and β -amyrin belonging to the ursane and olean series, respectively

The homonuclear correlation map $^1\text{H} \times ^1\text{H} - \text{COSY}$ (Figure S3, supplementary material) clearly showed the couplings between the methynic hydrogen H-12 at δ_{H} 5.10 (1H, t, $J = 3.6$ Hz) of C-sp2 with the methylene hydrogens 2H-11, the coupling between the methine hydrogen H-9 at δ_{H} 1.57 (^1H) of C-sp3 with the methylene hydrogens 2H-11, also revealed the axial-axial couplings with $J = 10.4$ Hz and equatorial-axial with $J = 5.0$ Hz between the 2H-2 methylene hydrogens and the H-3 methynic hydrogen, whose coupling constants are compatible with a

cyclohexane ring having the hydrogen at C-3 in the axial position and the hydroxyl in the equatorial position, in agreement with the structure of the compounds α -amyrin and β -amyrin.

The heteronuclear correlation map HMQC (^1JCH) (Figure S4, supplementary material) with detection in the hydrogen channel allowed to associate the absorptions of olefinic hydrogens and carbonic carbon hydrogens, in addition to others as shown in Table 1. On the other hand, the long-distance heteronuclear correlation map HMBC (^nJCH , $n = 2$ and $n = 3$) (Figure S5, supplementary material) helped us in the attributions of chemical shifts, revealing, among others, the coupling between the C-23, C-24, and C-4 with H-3, as shown in Table 2. The data presented led to the proposition that the mixture consists of the substances α - amyrin and β - amyrin reported by Barros and collaborators [35].

Table 2

In the GC-MS analysis chromatogram (Figure S6, supplementary material), the predominance of the signal in 51.63 minutes of the mixture α -amyrin and β -amyrin can be clearly seen. The mass spectrum (Figures S6, supplementary material) records a small signal with $[M^+]$ 426, corresponding to the molecular mass of the isomeric mixture of α -amyrin and β -amyrin, both with the formula $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$. These pentacyclic triterpenes produce typical oelan-12-enes and ursan-12-enes fragments from the Retro-Diels-Alder reaction in the C ring generating the most abundant fragment with $m/z = 281$ (100%), 203, 189, and 95 (Figure 2). The optimized molecular structures obtained at B3LYP/6-311++G(d,p) level of theory for (a) α -amyrin, (b) β -amyrin, and (c) α,β -amyrin are given in Figure S7.

Figure 2

3.2 Vibrational analysis

The experimental infrared and Raman spectra of the α,β -amyrin mixture along with the calculated vibrational spectra of their chemical components, of the isomeric mixture in the spectral regions of $3800\text{--}2500\text{ cm}^{-1}$ and in $1800\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ are presented in Figure 3 and Figure 4, respectively. And the experimental ATR-FTIR and FT-Raman spectra of α,β -amyrin mixture in the interval $200\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$ are given in Figure S8, and Figure S9, respectively. The

aforementioned spectra showed that the experimental vibrational spectrum of the mixture presented key bands characteristics from each chemical component, as expected.

Figure 3

Figure 4

The isomeric molecules α -amyrin and β -amyrin have molecular formula $C_{30}H_{50}O$, and therefore possess 81 atoms. These 81 atoms give rise to 243 degrees of freedom. Excluding the translational and rotational modes, 237 vibrational modes are expected for each isomer. Nevertheless, there are identical normal modes that are associated with the distinct molecules due to similarity of the molecular structure and the existence of similar functional groups that are present in the chemical components of the mixture. However, it is known that binary mixture presents a noncoincidence effect at some vibrational modes [36-38]. Synchronous and asynchronous vibration patterns produce differences in vibrational wavenumbers; the value of these differences depends on the strength of interaction between neighbor molecules [38]. The isomeric mixture of α , β -amyrin, in the proportion of two molecules of α -amyrin, and one de β -amyrin presents intermolecular interactions with different strengths between some groups of the neighbor molecules.

Table 3 lists a description of the assignments of some vibrational modes of the α,β -amyrin mixture for Raman and infrared bands. The first and second columns show, respectively, the FT-Raman wavenumbers (ω_{Ramam}), and the normalized Raman intensities. The third and fourth columns show the ATR-FTIR wavenumbers, and the normalized infrared absorbance intensities. The last column presents the assignments of the normal modes for α,β -amyrin mixture.

Table 3

The spectral region of wavenumbers between 3500 and 2500 cm^{-1} is localized the vibrations of the stretching modes of the O-H, CH, CH_2 , and CH_3 groups of α,β -amyrin mixture. The OH stretching mode appears in the experimental infrared spectrum at 3272 cm^{-1} . This mode is also present in the calculated absorbance spectra of the chemical components of the mixture appearing at 3668 cm^{-1} . However, it is observed that in the calculated absorbance

spectrum of the isomeric mixture appears two stretching modes of the hydroxyl, one at 3651 cm^{-1} , and the other at 3594 cm^{-1} . This noncoincidence effect in the OH stretching mode is expected in the binary mixture [36] due to differences in the strength of interaction between neighbor molecules in the unit cell of the α,β -amyrin crystal. In the experimental absorbance spectrum, these two bands overlap. It is noted the OH stretching mode does not appear in the Raman spectrum. The strong intensities bands observed in infrared spectrum at 2976, 2946, 2928, and 2838 cm^{-1} and in the Raman spectrum at 2978, 2949, 2921, and 2840 cm^{-1} are associated with a mixture of stretching vibrational modes of the CH, CH₂, and CH₃ groups of the chemical constituents of the α,β -amyrin mixture. Strong infrared bands around 2900 cm^{-1} appear in almost all the vibrational spectra of organic compounds with alkane cycle chains, which justifies these high-intensity bands.

The wavenumber region from 600 cm^{-1} to 1800 cm^{-1} covers part of the fingerprint region. In this spectral region are found a variety of vibrational modes, among them, twisting (τ), stretching (ν), bending (δ), wagging (wag), scissoring (sc), rocking (r), and deformation out of the plane (γ). The stretching mode of the double bond C=C present in the α -amyrin and β -amyrin is observed with very weak intensity in the experimental infrared spectrum at 1660 cm^{-1} ; however, it appears in the Raman spectrum with medium intensity. This vibrational mode does not appear in the calculated absorbance spectra of the chemical components of the mixture but appears in the calculated absorbance spectrum of the isomeric mixture at 1665 cm^{-1} with very weak intensity.

The infrared absorption bands observed at 1606 and 1585 cm^{-1} are not found in the calculated infrared absorption spectra of the chemical constituents of the isomeric mixture, and neither calculated absorbance spectrum of the α,β -amyrin mixture; and they are probably overtones or combination modes.

The anti-symmetric bending of the methyl group is clearly observed at 1509 cm^{-1} in the experimental and calculated absorbance spectra of the α,β -amyrin mixture, and it does not appear in the calculated infrared absorption spectra of the chemical constituents of the isomeric mixture.

The bending modes of methyl and methylene groups appear at four distinct spectral regions. Scissoring and asymmetric deformation appears in the region between 1464 and 1457 cm^{-1} . Three infrared bands observed at 1387 , 1379 , and 1359 cm^{-1} , which also appear in the Raman spectrum are attributed to the wagging vibrations of the methyl and methylene groups.

A very weak intensity infrared absorption band observed at 1308 cm^{-1} , which appears of very weak intensity in the Raman spectrum at 1303 cm^{-1} , corresponds to a mixture of

vibrational modes that are associated with the CC stretching vibration and wagging and rocking vibrations of the CH₃ group.

The infrared absorption band observed at 1190 cm⁻¹ presented a weak intensity and is related to HCCC twisting mode, CC and CO stretching modes, and HOC bending mode. The infrared band at 1096 cm⁻¹ was associated with the presence of CC stretching mode and HCCC twisting vibration.

The rocking vibrations of methyl and methylene groups appear at 1037 and 1026 cm⁻¹ with medium intensity in the infrared absorption spectrum, and torsion vibrations of these groups are observed at 992 cm⁻¹ in combination with CC stretching mode.

In the region of wavenumber below 960 cm⁻¹, it is expected mainly bands associated with rings deformations. However, deformation vibrations of the COH group also appear within this region. Whereas the Raman bands associated with lattice vibrations are expected in the wavenumber region lower than 150 cm⁻¹.

3.3 Electronic proprieties analysis

The HOMO-LUMO frontier orbitals and energy gap of the α -amyrin, β -amyrin, and α,β -amyrin are shown in Figure 5. The positive and negative lobes are represented in orange line and purple line colors, respectively. The HOMO (electron donor) and the LUMO (electron acceptor) are mainly localized over the aromatic rings C and D, in the isomeric molecules α -amyrin and β -amyrin. In the mixture of α,β -amyrin, the HOMO is also localized over the aromatic rings C and D of the α -amyrin. Whereas the LUMO is mainly localized over the aromatic rings C and D of the β -amyrin.

Figure 5

The calculated values for the quantum chemical parameters, which are the energy levels of the HOMO (E_{HOMO}) and LUMO (E_{LUMO}), the energy gap ($\Delta E = E_{\text{LUMO}} - E_{\text{HOMO}}$) [39], ionization energy ($I = -E_{\text{HOMO}}$) [40], electron affinity ($A = -E_{\text{LUMO}}$) [40], chemical potential ($\mu = -(I + A)/2$) [27, 41], electronegativity ($\chi = -\mu$) [27, 41], global hardness ($\eta = (I - A)/2$) [42-44], the global softness ($S = 1/\eta$) [45], electrophilicity index ($\omega = \mu^2/2\eta$) [46], global nucleophilicity index ($\varepsilon = 1/\omega$) [47], and the maximum charge transfer index ($\Delta N_{\text{max}} = -(I+A)/2(I-A)$) [46, 48, 49] for α -amyrin, β -amyrin, and α,β -amyrin are given in Table 4. The energy gap between HOMO and LUMO calculated for α -amyrin, β -amyrin, and α,β -amyrin

is equal to 6.86 eV, 6.92 eV, and 6.74 eV, respectively. The large HOMO-LUMO energy gap for these compounds indicate that they have low reactivity, and low kinetic stability [50], and therefore, they are enough stable. The calculated value of dipole moment for α -amyrin, β -amyrin, and α,β amyirin were 1.47, 1.46, and 2.75 Debye (D), respectively.

Table 4

The experimental absorption spectrum of α,β amyirin and the fit of this spectrum is shown in Figure 6. The curve fitting for the experimental UV spectrum (Figure 6) was modeled as a sum of two Lorentzian functions for the first and third singlet states, and an asymmetric band fitted for the second singlet state with an Asymmetric Double Gaussian Cumulative function. The curve fitting was able to reproduce the experimental UV absorption spectrum with a faithful similarity.

Figure 6

The comparison between the experimental and calculated absorption spectra is presented in Figure S10 in the Supplementary Material. Table 5 shows the electronic absorption spectral data (experimental and calculated) of α,β -amyirin. Three bands of excitation energy corresponding to three singlet states for this binary mixture were observed in the experimental absorption spectrum in the ultraviolet region. The absorbance bands centered at 226 nm (5.49 eV), 205 nm (6.05 eV), and 194 nm (6.40 eV) correspond to the first, second, and third singlet states, respectively. The experimental maximum absorption wavelength, λ_{max} , which is observed at 226 nm (5.49 eV) is associated with the π - π^* transition between the HOMO and the LUMO with a contribution of 82 % for this transition. The HOMO-LUMO energy gap evaluated from TD-DFT/B3LYP/6-31G(d,p) method was equal to 6.84 eV, corresponding to a difference of 1.35 nm between the experimental and calculated energy values for the first singlet state.

Table 5

The experimental maximum absorption (second singlet state), which is observed at the wavelength of 205 nm, mainly corresponds to HOMO-1 \rightarrow LUMO+1 electronic transition. The TD-DFT/B3LYP/6-31G(d,p) method estimated this electronic state at 177 nm. The percentual error between the experimental and calculated wavelengths for the second singlet state is equal

to 15.82%. This difference let us suggest that it could be due to the asymmetric character of the experimental UV absorption spectrum. The asymmetrical shape of this band is characteristic of inhomogeneity of the isomeric mixture [51], since that the α,β -amyrin mixture is in the proportion of two molecules of α -amyrin, and one de β -amyrin. Furthermore, the TD-DFT/CAM-B3LYP/6-31G(d,p) method uses symmetric gaussian functions, whereas the experimental UV absorption spectrum presents UV absorption band with asymmetric profile.

Finally, the third singlet state, which is observed at 194 nm in the experimental UV spectrum possesses two electronic transitions with major contributions, which are HOMO-2 \rightarrow LUMO (34%) and HOMO-3 \rightarrow LUMO (32%).

3.4 Electrochemical behavior of α,β -amyrin at GC electrode in PBS buffer, pH 7.40

Figure 7 shows the cyclic voltammograms recorded on a glassy carbon electrode for the 0.17 mM α,β -amyrin solution in PBS buffer (pH 7.40). An oxidation peak and a reduction peak are observed at 93 mV and 103 mV (10 mV/s) (Figure 7a), and at -567 mV and -687 mV (100 mV/s) (Figure 7b), respectively. The oxidation of α,β -amyrin recorded in the anode peaks, as seen in Figures 7a and 7b, is related to the electrochemical oxidation of the alcohol group on carbon 3 to form a ketone, α,β -amyrone [52].

Figure 7

3.5 Evaluation of physical and chemical properties and ADMET

The physicochemical properties were initially calculated to analyze the direct chemical and structural influences on the pharmacokinetic behavior of the molecules. Properties such as acid dissociation constant (pKa), partition coefficient (logP), distribution coefficient (logD) at specific pH's, and polar surface area (PSA) can provide information regarding the bioavailability of oral drugs or the discovery of new drugs [53-57]. As a rule of thumb for oral drugs, molecules with a physiological charge equal to zero are preferred, that is, molecules without ionizable groups. Another influential property in the bioavailability of oral drugs is the distribution coefficient at physiological pH (log D_{7.4}). Thus, compounds with values of 0

$\log D 7.4 < 3$ present the ideal conditions for absorption and distribution, as they are in an ideal range that relates to lipophilicity and permeability [54, 58].

Through the calculated theoretical values, it was possible to observe that the molecules have a neutral physiological charge, which suggests that the compounds do not have ionizable groups in a physiological medium. They are essentially lipophilic, with $\log P$ values evaluated at 7.40 and 7.39 for α -amyrin and β -amyrin, respectively, and values which remain constant between pH 2-14. Therefore, the distribution coefficient ($\log D$) at physiological pH greater than 3.0 suggests that the molecules are very lipophilic and poorly permeable, directly influencing the bioavailability of these substances (Figure 8A). At the same time, the obtained value of $-10.0 < \log S < -6.0$ suggests that these molecules are poorly soluble in water, following a concentration in the order of $3.38 \cdot 10^{-10}$ and $4.72 \cdot 10^{-10}$ mol / L, for α -amyrin and β -amyrin respectively, and invariable as a function of pH (Figure 8B).

Figure 8

The Brain Or Intestinal Estimated permeation method (BOILED-Egg) graph expressed in Figure 8C uses the molecular descriptors of lipophilicity (WlogP) and polarity (PSA) to define the bioavailability of bioactive compounds using the human intestinal absorption (HIA) and blood-brain barrier (BBB) permeability [31]. The compounds are outside the high HIA limit established between the WlogP values between -2.3 and 6.8 and PSA less than 142 \AA^2 and the permeability area limit in the BBB of WlogP of 0.4 to 6 and less than 79 \AA^2 PSA (Figure 8C). Thus, the calculated values of $\text{WlogP} > 8$ and $\text{PSA} = 20.23$ suggest that the substances have low intestinal absorption and do not reach the central nervous system (CNS) because they are not permeable to BBB, in addition to the low potential for efflux through biological membranes by not being substrates of P-glycoprotein (P-gp) and, therefore, limiting characteristics of their distribution volumes in the bloodstream after intestinal absorption (Table 6).

Table 6

Table 7 shows the metabolism information of the molecules by inhibition of cytochrome P450 (CYP450) isoenzymes, the main precursor of phase I metabolism of bioactive compounds. Among these are the isoenzymes CYP1A2, responsible for the majority of the

reactions of biotransformation of drugs by metabolic activation, and CYP3A4, responsible for the reactions of N- and O-dealkylations [59-62]. It was, thus, possible to observe that the compounds α -amyrin and β -amyrin do not have promiscuity of inhibition of the CYP450 isoenzymes evaluated in this prediction, constituting compounds with a lower risk of liver toxicity by metabolic activation. However, they are very lipophilic compounds and tend to have a longer half-life in the human body before being excreted. In addition, the compounds have no cardiotoxic risk due to inhibition of hERG ion channels, where the cardiotoxic probability map shows that the negative contribution associated with the hydroxyl group of the molecules does not overlap the positive contributions of the pentacyclic chain of triterpenes, with a degree of confidence of 60 % in this prediction (Figure 8D).

Table 7

4. Conclusions

The molecular structure of the isomeric binary mixture of 3 α -hydroxiurs-12-ene (α -amyrin) and 3 β -hydroxiolean-12-ene (β -amyrin) was confirmed by one- and two-dimensional NMR and Mass spectroscopy. The ATR-FTIR and FT-Raman spectra of the α,β -amyrin mixture from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand resin were obtained at room temperature. A comparison of the experimental absorbance spectrum with calculated absorbance spectra of the chemical components and of the isomeric binary mixture allowed us to assign most of the normal modes. The experimental and theoretical UV absorption spectra were also obtained, and allowed to find possible electronic transitions for α,β amyrin. Three bands of excitation energy corresponding to three singlet states for this binary mixture were observed in the experimental absorption spectrum in the ultraviolet region. Cyclic voltammetry analysis for of α,β -amyrin allowed to elucidate the oxidations and reductions processes. The calculation of theoretical physical-chemical properties was also fundamental in justifying the pharmacokinetic behavior of molecules which, despite the decrease in their respective bioavailability, are promising chemical compounds and with the lowest toxicological risk due to metabolic activation.

Funding

This study was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES (Finance code 001 for R.C. Oliveira, and I.K.C. Lima), by the Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico - FUNCAP. (Grants#: N° BP2-0107- 00026.01.00/15 for H.S. Santos, N° BP4-00172-00017.01.00/20 for M.S.S. Julião, and N° BP4-00172-00065.01.01/20 for C.E.S. Nogueira), and by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (Grants#: N° 305719/2018-1 for A.M.R. Teixeira, N° 426995/2018-0, and N° 309510/2017 for G.D. Saraiva).

Acknowledgments

The authors thanks to the Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN) by the NMR spectroscopy measurements, to the Departamento de Física of the Universidade Federal do Ceará (UFC) for the technical support in the measurements of FT-Raman, and ATR-FTIR, and to the Centro Nacional de Processamento de Alto Desempenho (CENAPAD-UFC) of the UFC for the computational resources.

References

- [1] D.C.d.B. Daly, P.V.A. Fine, M.C. Martínez-Habibe, Burseraceae: a model for studying the Amazon flora, *Rodriguésia*, 63 (2012) 021-030. <https://doi.org/10.1590/S2175-78602012000100002>
- [2] M.P. Corrêa, *Dicionário de Plantas Uteis do Brasil*, Ministério da Agricultura/ Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, Rio de Janeiro, 1984.
- [3] H. Lorenzi, F.J.A. Matos, *Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas* Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda., Brazil - Nova Odessa, SP, 2002.
- [4] F.A. Oliveira, G.M. Vieira-Júnior, M.H. Chaves, F.R. Almeida, K.A. Santos, F.S. Martins, R.M. Silva, F.A. Santos, V.S. Rao, Gastroprotective effect of the mixture of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum*: role of capsaicin-sensitive primary afferent neurons, *Planta Medica*, 70 (2004) 780-782. <https://doi.org/10.1055/s-2004-827212>.

- [5] G.M. Vieira Júnior, C.M.L.d. Souza, M.H. Chaves, Resina de *Protium heptaphyllum*: isolamento, caracterização estrutural e avaliação das propriedades térmicas, *Química Nova*, 28 (2005) 183-187. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000200003>
- [6] M.d.F. Agra, P.F.d. Freitas, J.M. Barbosa-Filho, Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17 (2007) 114-140. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2007000100021>
- [7] J.H. Langenheim, Plant resins: chemistry, evolution, ecology and ethnobotany, *Annals of Botany*, 93 (2003) 784–785. <https://doi.org/10.1093/aob/mch103>.
- [8] R.M. Maia, P.R. Barbosa, F.G. Cruz, N.F. Roque, M. Fascio, Triterpenos da resina de *Protium heptaphyllum* March (Burseraceae): caracterização em misturas binárias, *Química Nova*, 23 (2000) 623-626. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422000000500010>.
- [9] E. de Lima, D. Cazelli, F. Pinto, R. Mazuco, I. Kalil, D. Lenz, R. Scherer, T. de Andrade, D. Endringer, Essential oil from the resin of *Protium heptaphyllum*: Chemical composition, cytotoxicity, antimicrobial activity, and antimutagenicity, *Pharmacognosy Magazine*, 12 (2016) 42-46. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.176113>.
- [10] A.L. Rüdiger, V.F. Veiga-Junior, Chemodiversity of Ursane- and Oleanane-Type Triterpenes in Amazonian Burseraceae Oleoresins, *Chemistry & Biodiversity*, 10 (2013) 1142-1153. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201200315>.
- [11] C.A. Fraga, Razões da Atividade Biológica: Interações Micro e Biomacro-moléculas, *Química Nova na Escola*, 3 (2001) 33–42.
- [12] A.O. Nogueira, Y.I.S. Oliveira, B.L. Adjafre, M.E.A. de Moraes, G.F. Aragão, Pharmacological effects of the isomeric mixture of alpha and beta amyrin from *Protium heptaphyllum*: a literature review, *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 33 (2019) 4-12. <https://doi.org/10.1111/fcp.12402>.
- [13] S.A. Holanda Pinto, L.M.S. Pinto, G.M.A. Cunha, M.H. Chaves, F.A. Santos, V.S. Rao, Anti-inflammatory effect of α , β -Amyrin, a pentacyclic triterpene from *Protium heptaphyllum* in rat model of acute periodontitis, *Inflammopharmacology*, 16 (2008) 48-52. <https://doi.org/10.1007/s10787-007-1609-x>.
- [14] C.M. Melo, K.M. Carvalho, J.C. Neves, T.C. Morais, V.S. Rao, F.A. Santos, G.A. Brito, M.H. Chaves, α , β -amyrin, a natural triterpenoid ameliorates L-arginine-induced acute pancreatitis in rats, *World Journal of Gastroenterology*, 16 (2010) 4272-4280. <https://doi.org/10.3748/wjg.v16.i34.4272>.
- [15] C.M. Melo, T.C. Morais, A.R. Tomé, G.A.C. Brito, M.H. Chaves, V.S. Rao, F.A. Santos, Anti-inflammatory effect of α , β -amyrin, a triterpene from *Protium heptaphyllum*, on cerulein-induced acute pancreatitis in mice, *Inflammation Research*, 60 (2011) 673-681. <https://doi.org/10.1007/s00011-011-0321-x>.

- [16] I. Matos, A.F. Bento, R. Marcon, R.F. Claudino, J.B. Calixto, Preventive and therapeutic oral administration of the pentacyclic triterpene α,β -amyrin ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice: The relevance of cannabinoid system, *Molecular Immunology*, 54 (2013) 482-492. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2013.01.018>.
- [17] G.F. Aragão, L.M.V. Carneiro, A.P. rota-Junior, P.N. Bandeira, T.L.G.d. Lemos, G.S.d.B. Viana, Alterations in brain amino acid metabolism and inhibitory effects on PKC are possibly correlated with anticonvulsant effects of the isomeric mixture of α - and β -amyrin from *Protium heptaphyllum*, *Pharmaceutical Biology*, 53 (2015) 407-413. <https://doi.org/10.3109/13880209.2014.923001>.
- [18] F.A. Oliveira, C.L.S. Costa, M.H. Chaves, F.R.C. Almeida, Í.J.M. Cavalcante, A.F. Lima, R.C.P. Lima, R.M. Silva, A.R. Campos, F.A. Santos, V.S.N. Rao, Attenuation of capsaicin-induced acute and visceral nociceptive pain by α - and β -amyrin, a triterpene mixture isolated from *Protium heptaphyllum* resin in mice, *Life Sciences*, 77 (2005) 2942-2952. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.05.031>.
- [19] F.A. Santos, J.T. Frota, B.R. Arruda, T.S. de Melo, A.A. da Silva, G.A. Brito, M.H. Chaves, V.S. Rao, Antihyperglycemic and hypolipidemic effects of α , β -amyrin, a triterpenoid mixture from *Protium heptaphyllum* in mice, *Lipids in Health and Disease*, 11 (2012) 98. <https://doi.org/10.1186/1476-511x-11-98>.
- [20] K.M.M.B. Carvalho, T.S. de Melo, K.M. de Melo, A.L.G. Quinderé, F.T.B. de Oliveira, A.F.S.C. Viana, P.I.G. Nunes, J.d.S. Quetz, D.d.A. Viana, A.A.d.C.A. da Silva, A. Havt, S.G.d.C. Fonseca, M.H. Chaves, V.S. Rao, F.A. Santos, Amyrins from *Protium heptaphyllum* Reduce High-Fat Diet-Induced Obesity in Mice via Modulation of Enzymatic, Hormonal And Inflammatory Responses, *Planta Medica*, 83 (2017) 285-291. <https://doi.org/10.1055/s-0042-114222>.
- [21] R.C. Oliveira, P.N. Bandeira, T.L.G. Lemos, H.S. dos Santos, J.R. Scherf, J.E. Rocha, R.L.S. Pereira, T.S. Freitas, P.R. Freitas, F.N. Pereira-Junior, M.M. Marinho, E.M. Marinho, E.S. Marinho, C.E.S. Nogueira, H.D.M. Coutinho, A.M.R. Teixeira, In silico and in vitro evaluation of efflux pumps inhibition of α,β -amyrin, *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, Taylor & Francis, 2021, pp. 1-15. <https://doi.org/10.1080/07391102.2021.1976277>.
- [22] G.F. Aragão, L.M.V. Carneiro, A.P.F. Junior, L.C. Vieira, P.N. Bandeira, T.L.G. Lemos, G.S.d.B. Viana, A possible mechanism for anxiolytic and antidepressant effects of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March, *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 85 (2006) 827-834. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2006.11.019>.
- [23] P.N. Bandeira, T.L.G. Lemos, S.M.O. Costa, H.S.d. Santos, Obtenção de derivados da mistura triterpenoídica a- e b-amirina, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17 (2007) 204-208. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2007000200012>.
- [24] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H.P. Hratchian, A.F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J.L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T.

Vreven, J.A. Montgomery Jr., J.E. Peralta, F. Ogliaro, M.J. Bearpark, J. Heyd, E.N. Brothers, K.N. Kudin, V.N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A.P. Rendell, J.C. Burant, S.S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, N.J. Millam, M. Klene, J.E. Knox, J.B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A.J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, R.L. Martin, K. Morokuma, V.G. Zakrzewski, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, S. Dapprich, A.D. Daniels, Ö. Farkas, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, J. Cioslowski, D.J. Fox, Gaussian 09, Gaussian, Inc., Wallingford, CT, USA, 2009.

[25] M.W. Wong, Vibrational frequency prediction using density functional theory, *Chemical Physics Letters*, 256 (1996) 391-399. [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(96\)00483-6](https://doi.org/10.1016/0009-2614(96)00483-6).

[26] Chemcraft - graphical software for visualization of quantum chemistry computations, 2006.

[27] H. Chermette, Chemical reactivity indexes in density functional theory, *Journal of Computational Chemistry*, 20 (1999) 129-154. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(19990115\)20:1<129::AID-JCC13>3.0.CO;2-A](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(19990115)20:1<129::AID-JCC13>3.0.CO;2-A).

[28] G. Scalmani, M.J. Frisch, Continuous surface charge polarizable continuum models of solvation. I. General formalism, *The Journal of Chemical Physics*, 132 (2010) 114110. <http://dx.doi.org/10.1063/1.3359469>.

[29] A. Eilmes, Solvatochromic probe in molecular solvents: implicit versus explicit solvent model, *Theoretical Chemistry Accounts*, 133 (2014) 1538. <http://dx.doi.org/10.1007/s00214-014-1538-x>.

[30] A. Daina, O. Michielin, V. Zoete, SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules, *Scientific Reports*, 7 (2017) 42717. <https://doi.org/10.1038/srep42717>.

[31] A. Daina, V. Zoete, A BOILED-Egg To Predict Gastrointestinal Absorption and Brain Penetration of Small Molecules, *ChemMedChem*, 11 (2016) 1117-1121. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201600182>.

[32] S.A. Wildman, G.M. Crippen, Prediction of Physicochemical Parameters by Atomic Contributions, *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 39 (1999) 868-873. <https://doi.org/10.1021/ci9903071>.

[33] P. Ertl, B. Rohde, P. Selzer, Fast Calculation of Molecular Polar Surface Area as a Sum of Fragment-Based Contributions and Its Application to the Prediction of Drug Transport Properties, *Journal of Medicinal Chemistry*, 43 (2000) 3714-3717. <https://doi.org/10.1021/jm000942e>.

[34] B. Bienfait, P. Ertl, JSME: a free molecule editor in JavaScript, *Journal of Cheminformatics*, 5 (2013) 24. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-5-24>.

- [35] F.W.A. Barros, P.N. Bandeira, D.J.B. Lima, A.S. Meira, S.S. de Farias, M.R.J.R. Albuquerque, H.S.d. Santos, T.L.G. Lemos, M.O. de Moraes, L.V. Costa-Lotufo, C.d.Ó. Pessoa, Amyrin esters induce cell death by apoptosis in HL-60 leukemia cells, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 19 (2011) 1268-1276. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2010.12.016>.
- [36] M. Paolantoni, P. Sassi, A. Morresi, R.S. Cataliotti, Raman noncoincidence effect on OH stretching profiles in liquid alcohols, *Journal of Raman Spectroscopy*, 37 (2006) 528-537. <https://doi.org/10.1002/jrs.1427>.
- [37] A.K. Ojha, S.K. Srivastava, B.P. Asthana, R.K. Singh, Concentration-dependent Raman study of noncoincidence effect in the NH₂ bending and C=O stretching modes of HCONH₂ in the binary mixture (HCONH₂ + CH₃OH), *Journal of Raman Spectroscopy*, 38 (2007) 159-165. <https://doi.org/10.1002/jrs.1618>.
- [38] H. Ouyang, M. Liu, Y. Zhao, H. Wang, X. Zheng, Noncoincidence Effects of Dimethyl Carbonate in Binary Mixtures Probed by Raman Spectroscopy: Experimental and DFT Calculations, *ACS Omega*, 4 (2019) 11074-11081. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b00175>.
- [39] R.G. Pearson, Hard and soft acids and bases, *Journal of the American Chemical Society*, 85 (1963) 3533-&. <http://dx.doi.org/10.1021/ja00905a001>.
- [40] T. Koopmans, Über die Zuordnung von Wellenfunktionen und Eigenwerten zu den Einzelnen Elektronen Eines Atoms, *Physica*, 1 (1934) 104-113. [https://doi.org/10.1016/S0031-8914\(34\)90011-2](https://doi.org/10.1016/S0031-8914(34)90011-2).
- [41] R.P. Iczkowski, J.L. Margrave, Electronegativity, *Journal of the American Chemical Society*, 83 (1961) 3547-3551. <https://doi.org/10.1021/ja01478a001>.
- [42] R.G. Pearson, Recent advances in the concept of hard and soft acids and bases, *Journal of Chemical Education*, 64 (1987) 561. <https://doi.org/10.1021/ed064p561>.
- [43] J.F. Janak, Proof that $\partial E / \partial n_i = \epsilon_i$ in density-functional theory, *Physical Review B*, 18 (1978) 7165-7168. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.18.7165>.
- [44] L. Von Szentpály, Studies on electronegativity equalization: Part 1. Consistent diatomic partial charges, *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 233 (1991) 71-81. [https://doi.org/10.1016/0166-1280\(91\)85055-C](https://doi.org/10.1016/0166-1280(91)85055-C).
- [45] W.T. Yang, R.G. Parr, Hardness, softness, and the Fukui function in the electronic theory of metals and catalysis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82 (1985) 6723-6726. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.20.6723>.
- [46] R.G. Parr, L.v. Szentpály, S. Liu, Electrophilicity Index, *Journal of the American Chemical Society*, 121 (1999) 1922-1924. <https://doi.org/10.1021/ja983494x>.
- [47] P.K. Chattaraj, S. Giri, S. Duley, Update 2 of: Electrophilicity Index, *Chemical Reviews*, 111 (2011) PR43-PR75. <https://doi.org/10.1021/cr100149p>.

- [48] R.G. Parr, R.G. Pearson, Absolute Hardness - Companion Parameter to Absolute Electronegativity, *Journal of the American Chemical Society*, 105 (1983) 7512-7516. <https://doi.org/10.1021/ja00364a005>.
- [49] R.G. Pearson, Absolute electronegativity and hardness correlated with molecular orbital theory, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83 (1986) 8440. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.22.8440>.
- [50] N.T. Anh., *Frontier Orbitals: a practical manual*, John Wiley and Sons, Chichester, 2007.
- [51] A.F. Fell, B.J. Clark, H.P. Scott, Novel applications of multichannel spectroscopy in pharmaceutical analysis, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1 (1983) 557-572. [https://doi.org/10.1016/0731-7085\(83\)80069-7](https://doi.org/10.1016/0731-7085(83)80069-7).
- [52] M.-A. Galeron, F. Vaultier, J.-F. Rontani, Oxidation products of α - and β -amyrins: potential tracers of abiotic degradation of vascular-plant organic matter in aquatic environments, *Environmental Chemistry*, 13 (2016) 732-744. <https://doi.org/10.1071/EN15237>.
- [53] E.C.M. de Lange, P.G.M. Ravenstijn, D. Groenendaal, T.J. van Steeg, Toward the prediction of CNS drug-effect profiles in physiological and pathological conditions using microdialysis and mechanism-based pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling, *The AAPS Journal*, 7 (2005) E532-E543. <https://doi.org/10.1208/aapsj070354>.
- [54] T. Hay, R. Jones, K. Beaumont, M. Kemp, Modulation of the partition coefficient between octanol and buffer at pH 7.4 and pKa to achieve the optimum balance of blood clearance and volume of distribution for a series of tetrahydropyran histamine type 3 receptor antagonists, *Drug Metabolism and Disposition*, 37 (2009) 1864. <https://doi.org/10.1124/dmd.109.027888>.
- [55] C.A. Lipinski, Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution, *Drug Discovery Today: Technologies*, 1 (2004) 337-341. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2004.11.007>.
- [56] N. Perisic-Janjic, R. Kaliszan, P. Wiczling, N. Milosevic, G. Uscumlic, N. Banjac, Reversed-Phase TLC and HPLC Retention Data in Correlation Studies with in Silico Molecular Descriptors and Druglikeness Properties of Newly Synthesized Anticonvulsant Succinimide Derivatives, *Molecular Pharmaceutics*, 8 (2011) 555-563. <https://doi.org/10.1021/mp100373d>.
- [57] D.F. Veber, S.R. Johnson, H.Y. Cheng, B.R. Smith, K.W. Ward, K.D. Kopple, Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates, *Journal of Medicinal Chemistry*, 45 (2002) 2615-2623. <https://doi.org/10.1021/jm020017n>.
- [58] T. Fichert, M. Yazdanian, J.R. Proudfoot, A structure-Permeability study of small drug-like molecules, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 13 (2003) 719-722. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(02\)01035-1](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(02)01035-1).

- [59] Y.-A. Cho, J.-S. Choi, J.-P. Burm, Effects of the antioxidant baicalein on the pharmacokinetics of nimodipine in rats: a possible role of P-glycoprotein and CYP3A4 inhibition by baicalein, *Pharmacological Reports*, 63 (2011) 1066-1073. [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(11\)70624-7](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(11)70624-7).
- [60] T. Eitrich, A. Kless, C. Druska, W. Meyer, J. Grotendorst, Classification of Highly Unbalanced CYP450 Data of Drugs Using Cost Sensitive Machine Learning Techniques, *Journal of Chemical Information and Modeling*, 47 (2007) 92-103. <https://doi.org/10.1021/ci6002619>.
- [61] J. Matal, Z. Matuskova, A. Tunkova, E. Anzenbacherova, P. Anzenbacher, Porcine CYP2A19, CYP2E1 and CYP1A2 forms are responsible for skatole biotransformation in the reconstituted system, *Neuro Endocrinology Letters*, 30 Suppl 1 (2009) 36-40.
- [62] R.A. Terkeltaub, D.E. Furst, J.L. DiGiacinto, K.A. Kook, M.W. Davis, Novel evidence-based colchicine dose-reduction algorithm to predict and prevent colchicine toxicity in the presence of cytochrome P450 3A4/P-glycoprotein inhibitors, *Arthritis & Rheumatism*, 63 (2011) 2226-2237. <https://doi.org/10.1002/art.30389>.

CAPTION FOR THE FIGURES:

Figure 1. Chemical structures of α,β -amyrin isolated from raw *Protium heptaphyllum* resin.

Figure 2. The fragmentation mechanism justifying the fundamental peaks for α,β -amyrin mixture.

Figure 3. Experimental infrared spectrum of the α,β -amyrin mixture and the calculated (scaled) infrared spectra of their chemical components, and of the isomeric mixture in the spectral regions of $3800\text{--}2500\text{ cm}^{-1}$ and in $1800\text{--}130\text{ cm}^{-1}$.

Figure 4. Experimental FT-Raman spectrum of the α,β -amyrin mixture and the calculated (scaled) infrared spectra of their chemical components, and of the isomeric mixture in the spectral regions of $3800\text{--}2600\text{ cm}^{-1}$ and in $1800\text{--}40\text{ cm}^{-1}$.

Figure 5. The frontier HOMO and LUMO orbitals for α -amyrin, β -amyrin and α,β -amyrin.

Figure 6. Experimental UV absorption spectrum of α,β -amyrin (in black color), and fit for this curve (Peak sum of the three singlet states, in gray color) and the peak fit to each transition mode which is given in Table 5. These are: S1 singlet state, in cyan color (226 nm), S2 singlet state, in violet color (205 nm), and S3 singlet state, in olive color (194 nm). In the inset in the 190 -240 nm region consist of the experimental UV spectrum of α,β -amyrin (in black color).

Figure 7. Cyclic voltammograms recorded at GC in: (dot line) PBS buffer, pH = 7.40, (solid line) 0.17 mM of α,β -amyrin (50% PBS buffer: 50% ethanol). Experimental conditions: $E_{\text{initial}} = E_{\text{final}} = -1000\text{ mV}$; $E_{\lambda,1} = +1000\text{ mV}$; (A) $\nu = 10\text{ mVs}^{-1}$ and (B) $\nu = 100\text{ mVs}^{-1}$.

Figure 8. (A) ChemAxon $\log D$ values and (B) ChemAxon $\log S$ values with the pH variation of α -amyrin (blue curve) and β -amyrin (red curve); (C) BOILED-Egg graph with the human intestinal absorption (HIA) and blood-brain barrier (BBB) models by the $\text{Wlog}P$ and PSA descriptors. (D) Probability map of cardiotoxic effect with positive (green) and negative (pink) fragments for inhibition of hERG channels.

CAPTION FOR THE TABLES:

Table 1. ^1H NMR and ^{13}C NMR data of α,β -amyrin mixture in CDCl_3 .

Table 2. Correlations of ^1H x ^{13}C [HMBC – ^nJCH ($n = 2$ and $n = 3$) of the α,β -amyrin mixture in CDCl_3 .

Table 3. Experimental wavenumbers (cm^{-1}) of the Raman and infrared bands of the α,β -amyrin mixture and assignment for their vibrational modes.

Table 4. Quantum chemical parameters for α -amyrin, β -amyrin, and α,β -amyrin.

Table 5. Electronic absorption spectral data (experimental and calculated) of α,β -amyrin.

Table 6. Predicted physicochemical and pharmacokinetic properties of α -amyrin and β -amyrin: pKa (ionization constant); NaN (Non-ionizable atoms); ClogP (ChemAxon partitioning coefficient); WlogP (Wildman partitioning coefficient); ClogD_{7.4} (ChemAxon distribution coefficient at pH 7.4); ClogS (ChemAxon solubility coefficient); PSA (Polar Surface Area); HIA (Human Intestinal Absorption); BBB (Blood-Brain Barrier penetration); P-gp (P-glycoprotein substrate).

Table 7. Prediction of the metabolism by the CYP450 inhibition and cardiotoxicity by the hERG channel inhibition for α -amyrin and β -amyrin.

FIG 1_STRUCTURE MOLECULAR

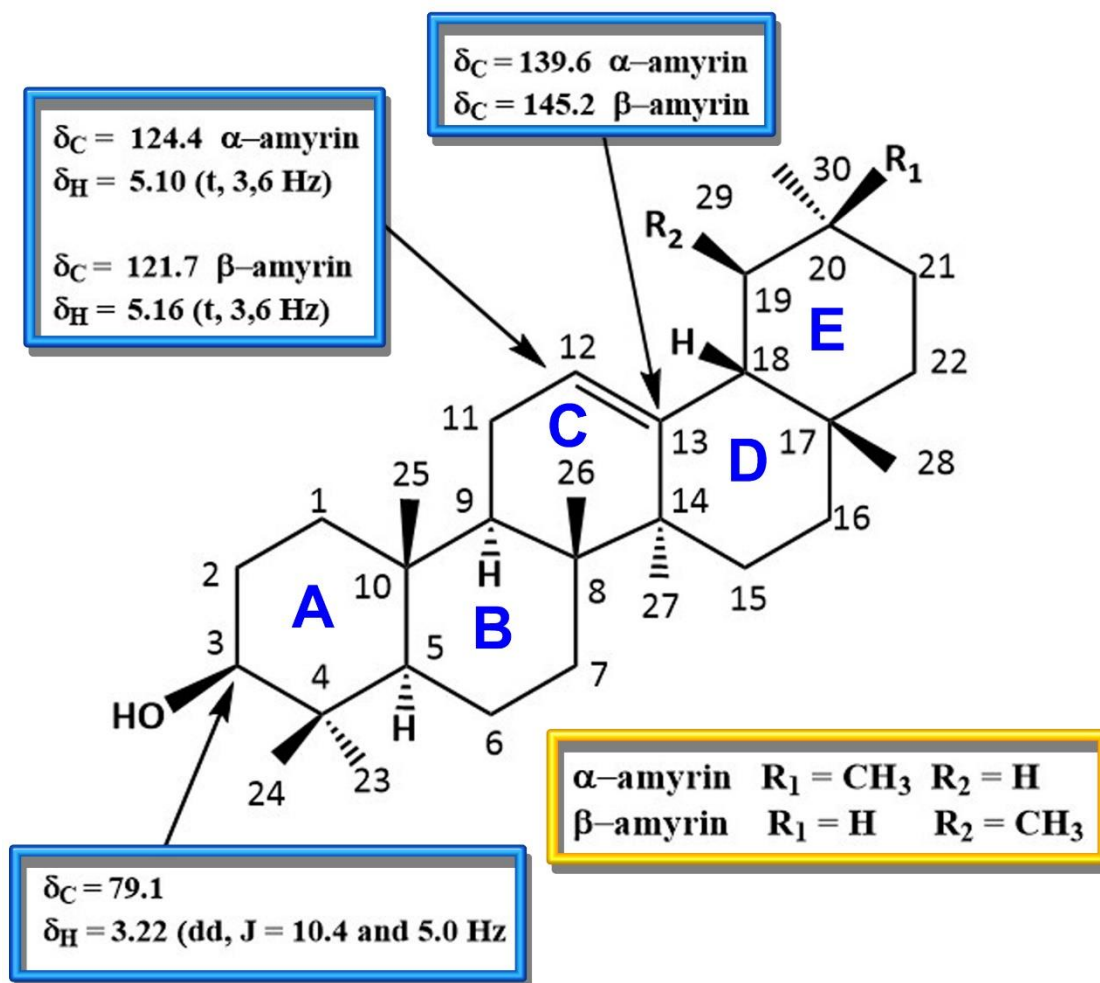
**Figure 1.** Chemical structures of α,β -amyrin isolated from raw *Protium heptaphyllum* resin.

FIG 2_FRAGMENTATION MECHANISM

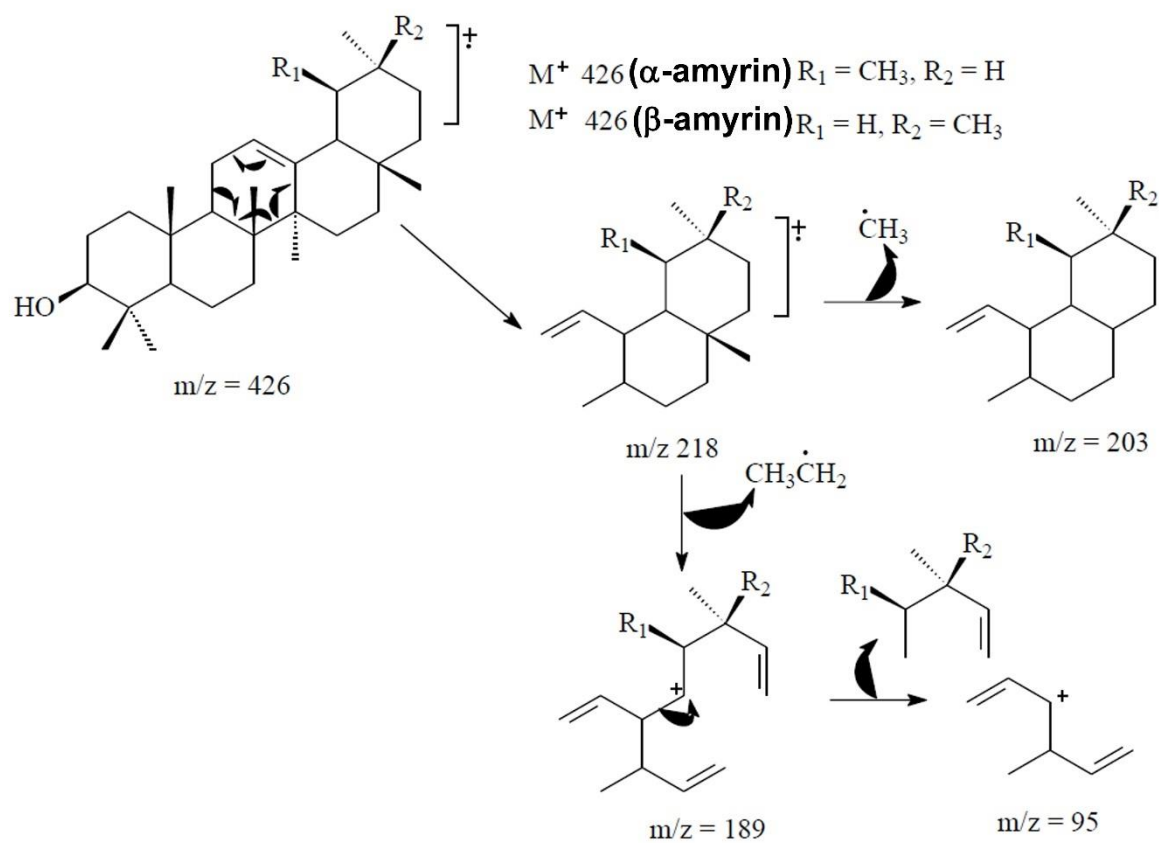


Figure 2. The fragmentation mechanism justifying the fundamental peaks for α,β -amyrin mixture.

FIG 3_ATR-FTIR_AMYRIN_EXP&THEOR

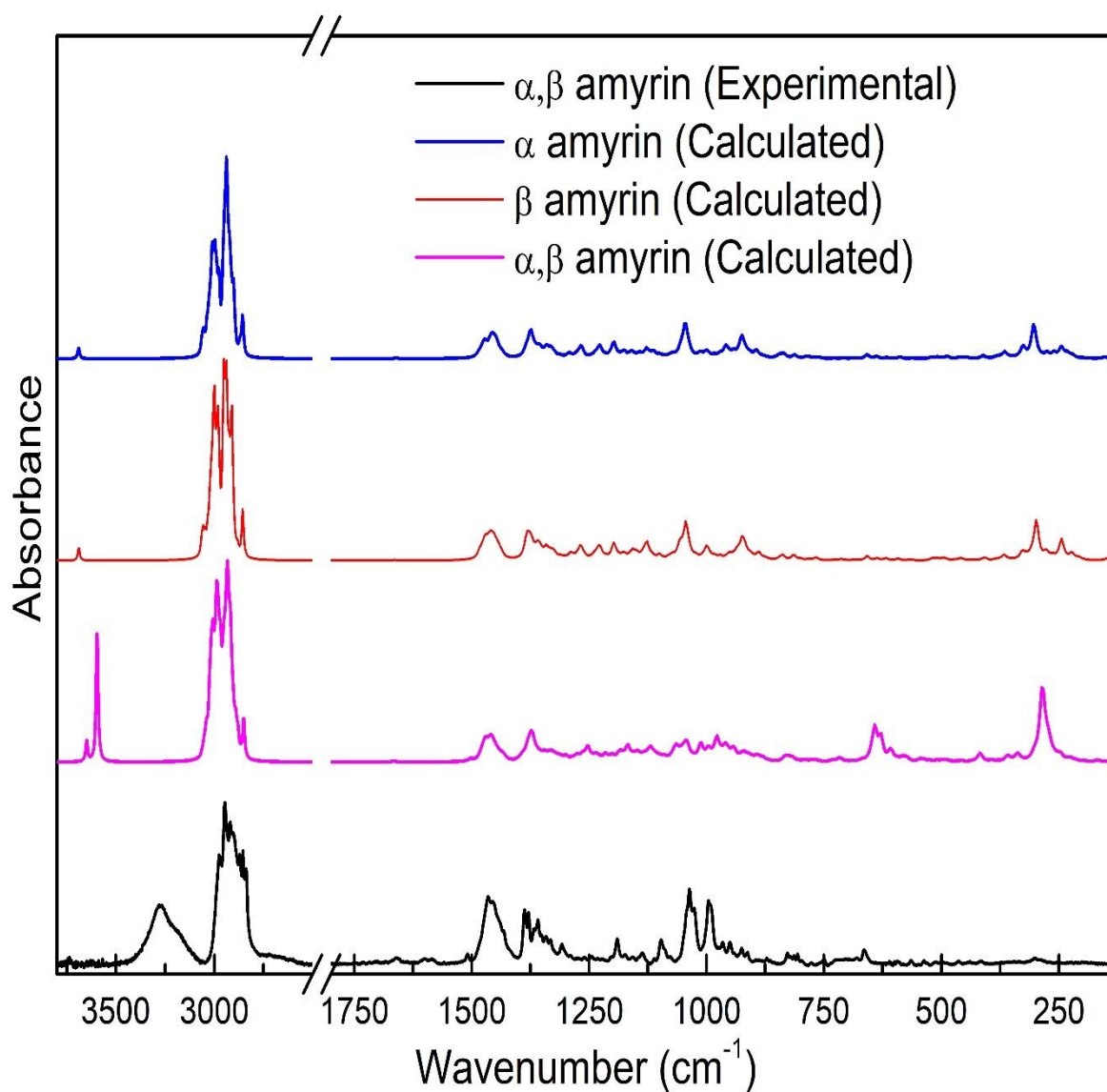


Figure 3. Experimental infrared spectrum of the α,β -amylin mixture and the calculated (scaled) infrared spectra of their chemical components, and of the isomeric mixture in the spectral regions of 3800–2500 cm^{-1} and in 1800–130 cm^{-1} .

FIG 4_FT_RAMAN_AMYRIN_EXP&THEOR

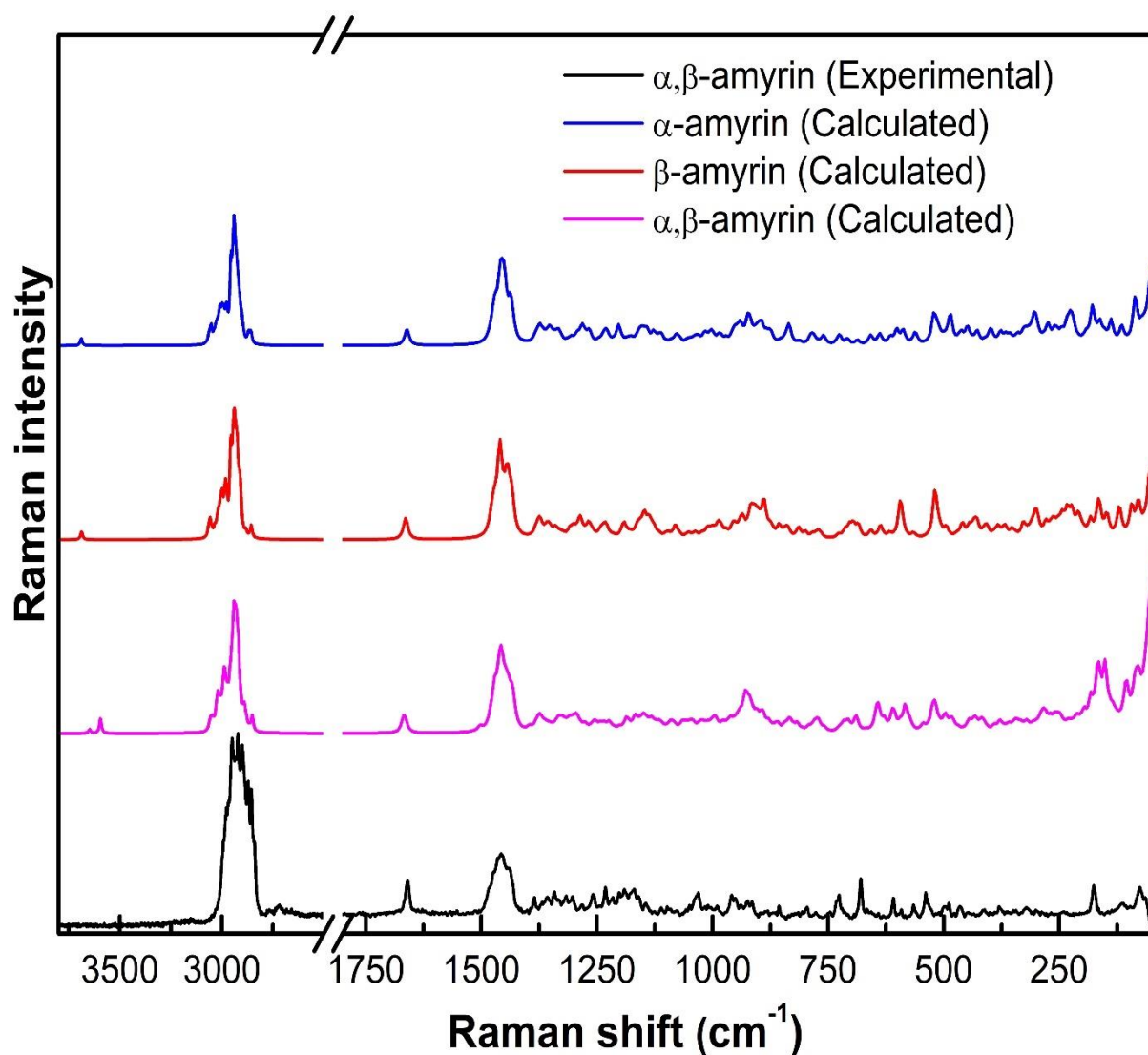


Figure 4. Experimental FT-Raman spectrum of the α,β -amyrin mixture and the calculated (scaled) infrared spectra of their chemical components, and of the isomeric mixture in the spectral regions of 3800–2600 cm^{-1} and in 1800–40 cm^{-1} .

FIG 5_HOMO&LUMO

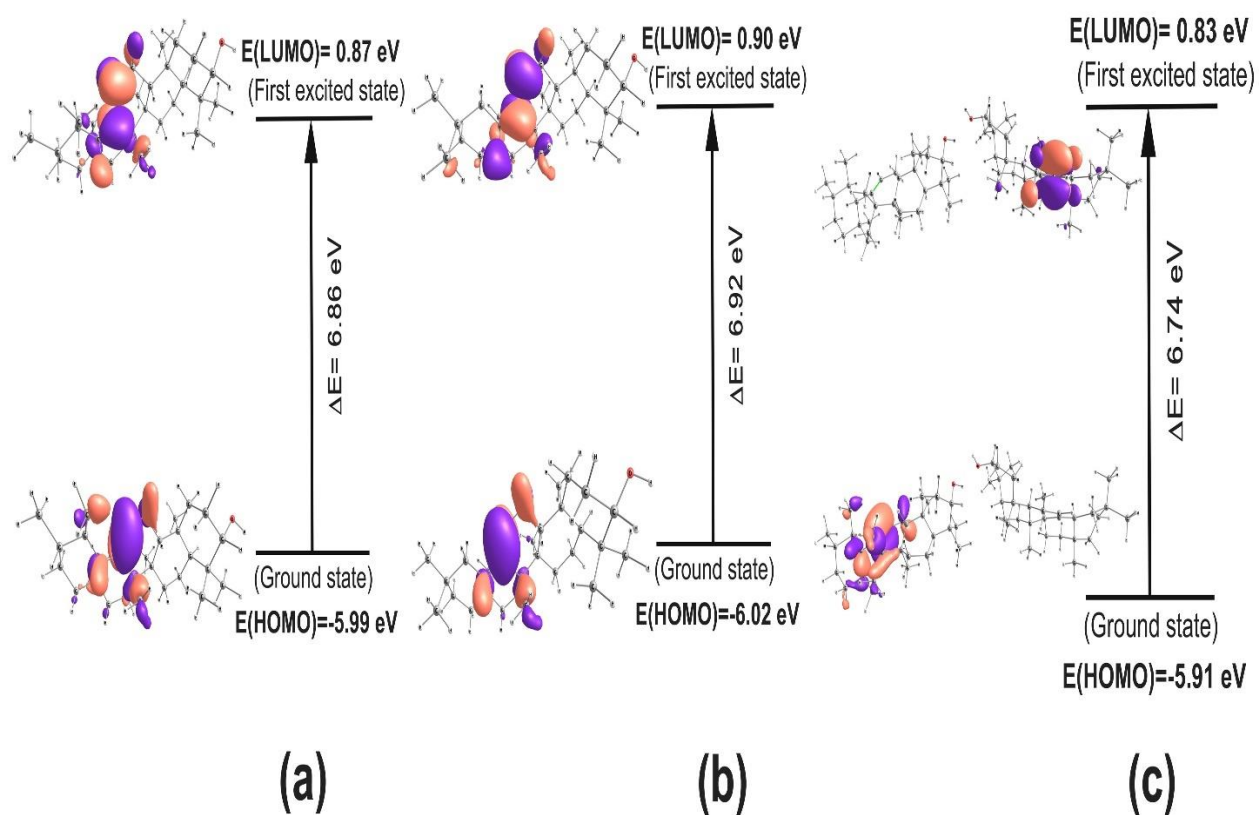
**Figure 5.** The frontier HOMO and LUMO orbitals for α -amyrin, β -amyrin and α,β -amyrin.

FIG 6_UV SPECTRUM_EXP_FIT

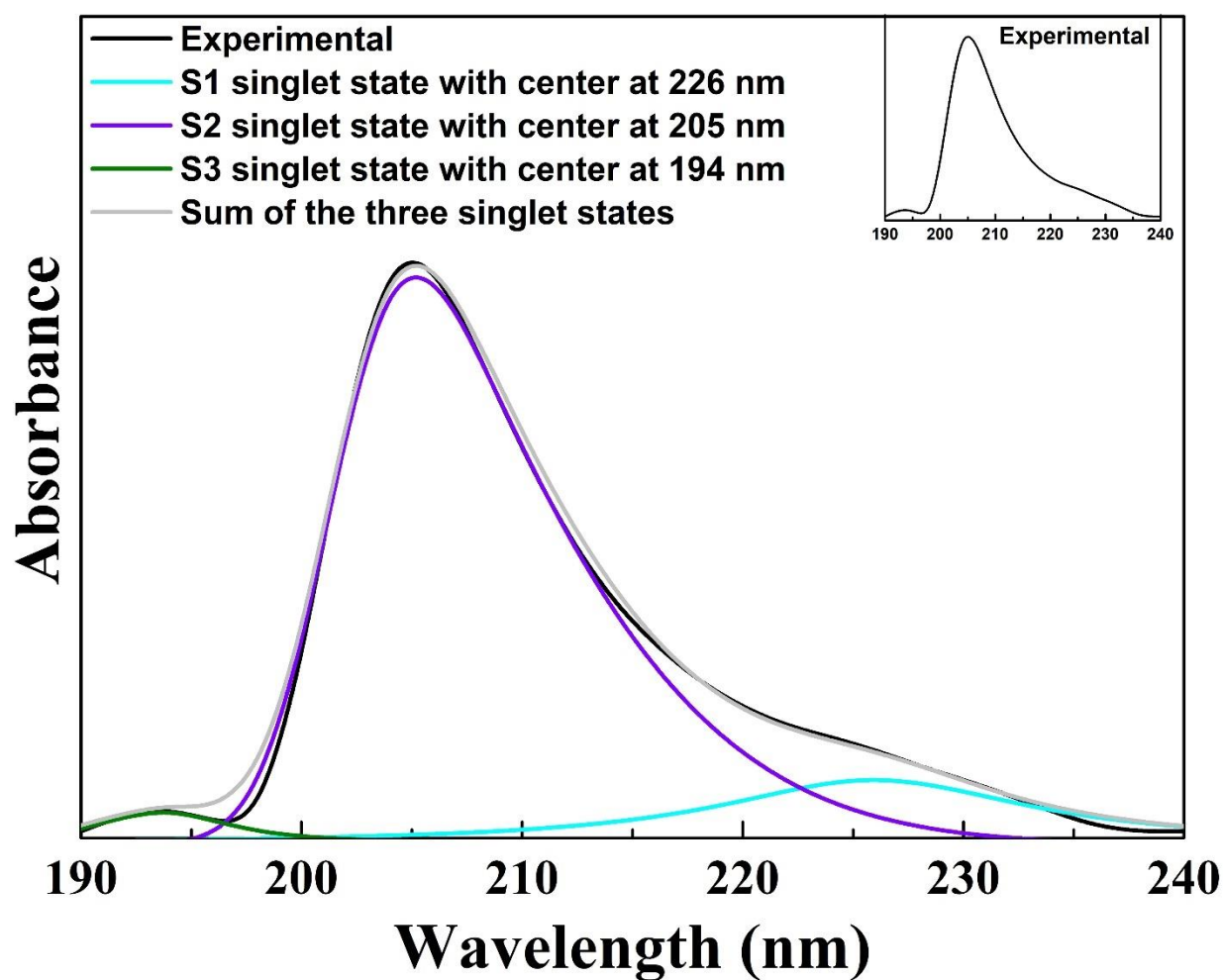


Figure 6. Experimental UV absorption spectrum of α,β -amyryn (in black color), and fit for this curve (Peak sum of the three singlet states, in gray color) and the peak fit to each transition mode which is given in Table 5. These are: S1 singlet state, in cyan color (226 nm), S2 singlet state, in violet color (205 nm), and S3 singlet state, in olive color (194 nm). In the inset in the 190 -240 nm region consist of the experimental UV spectrum of α,β -amyryn (in black color).

FIG 7_VOLTAMMOGRAMS

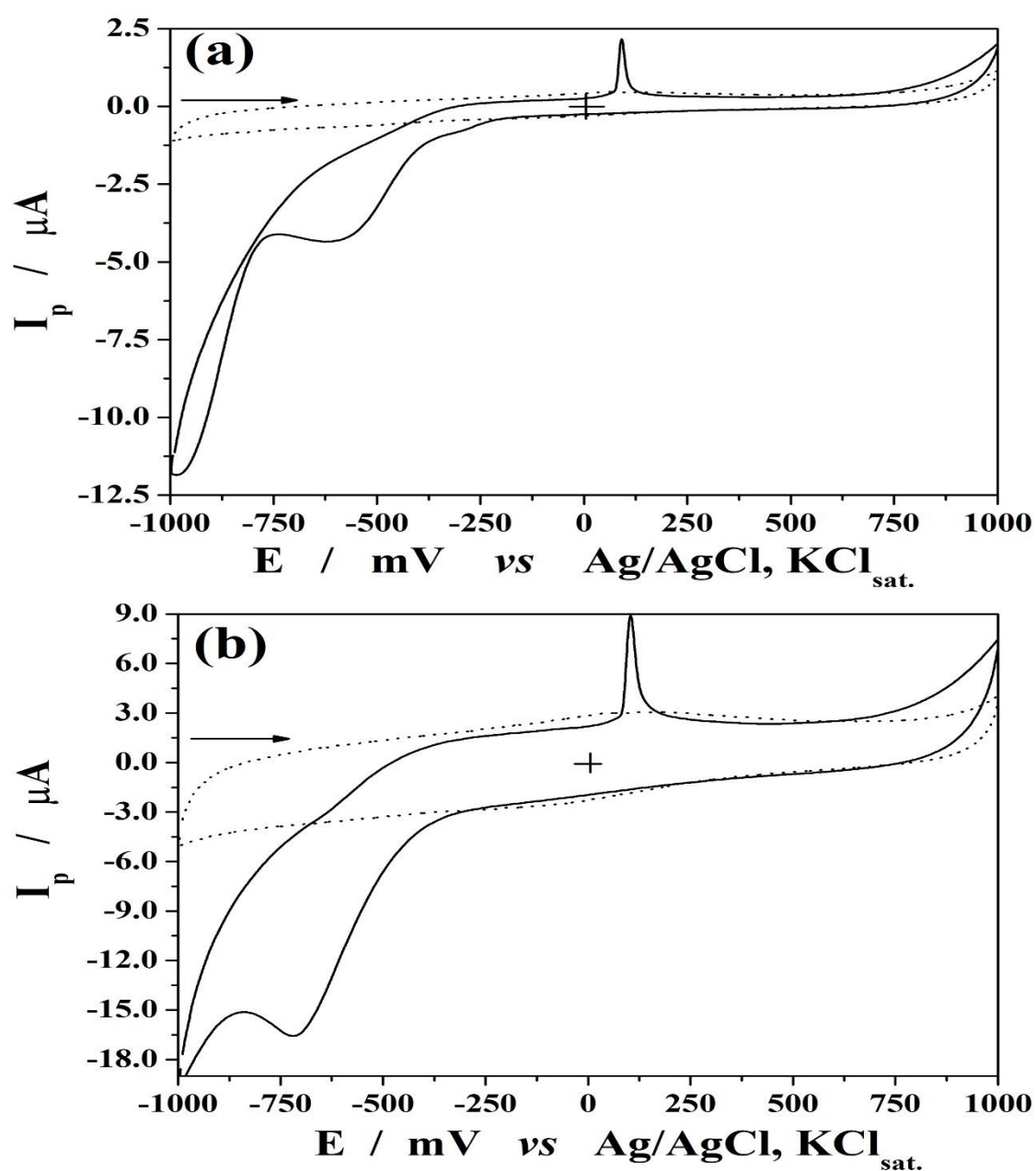


Figure 7. Cyclic voltammograms recorded at GC in: (dot line) PBS buffer, pH = 7.40, (solid line) 0.17 mM of α, β -amyrin (50% PBS buffer: 50% ethanol). Experimental conditions: $E_{\text{initial}} = E_{\text{final}} = -1000 \text{ mV}$; $E_{\text{L1}} = +1000 \text{ mV}$; (A) $v = 10 \text{ mVs}^{-1}$ and (B) $v = 100 \text{ mVs}^{-1}$.

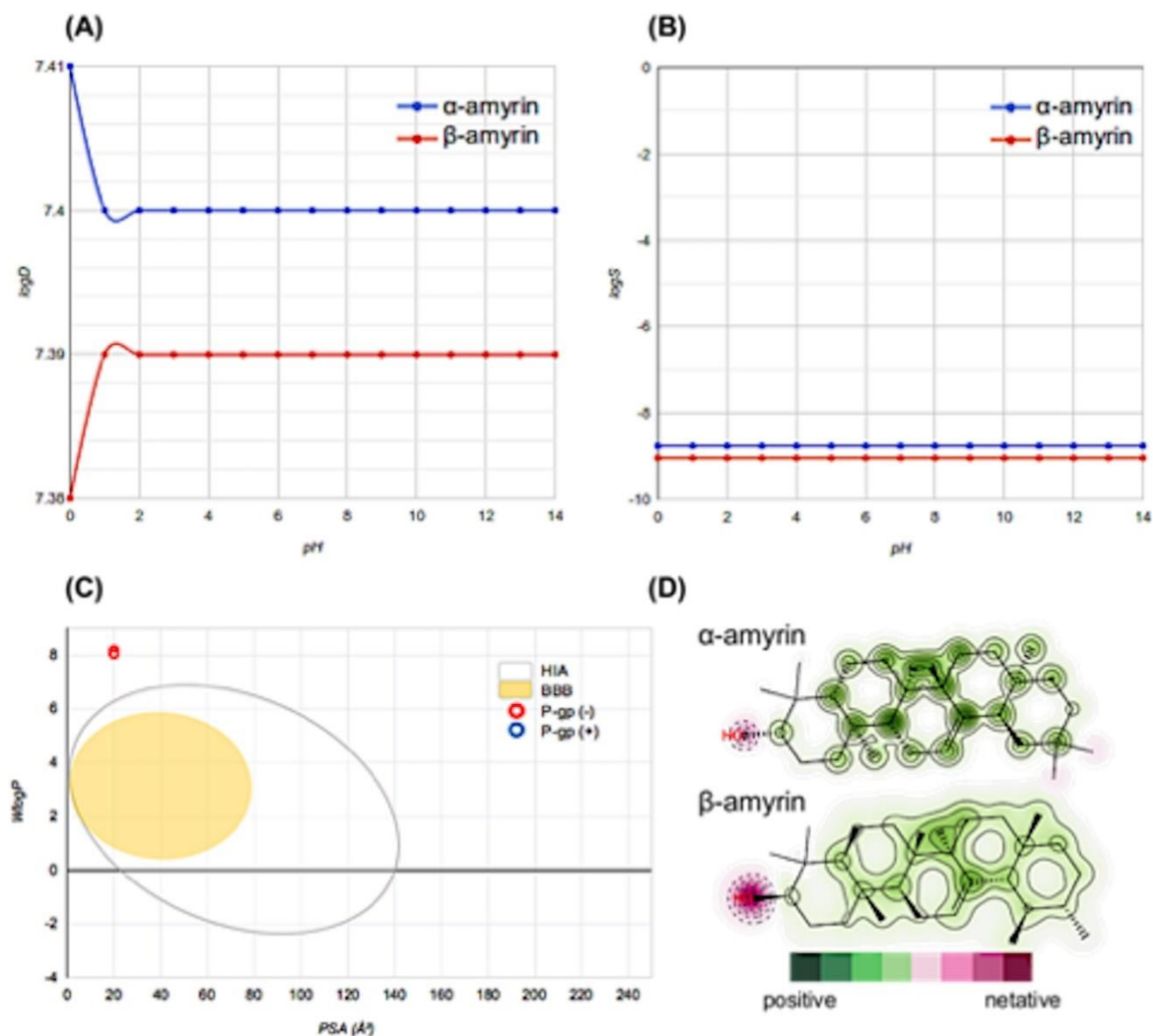
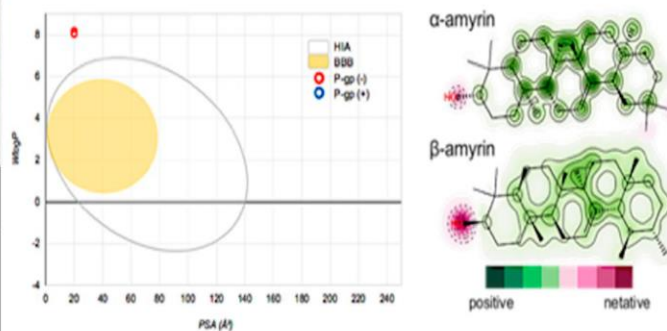
FIG 8_ADMET FOR α,β -AMYRIN

Figure 8. (A) ChemAxon logD values and (B) ChemAxon logS values with the pH variation of α -amyrin (blue curve) and β -amyrin (red curve); (C) BOILED-Egg graph with the human intestinal absorption (HIA) and blood-brain barrier (BBB) models by the WlogP and PSA descriptors. (D) Probability map of cardiotoxic effect with positive (green) and negative (pink) fragments for inhibition of hERG channels.

GRAPHICAL ABSTRACT

Protium heptaphyllum

Pharmacokinetic analysis



Spectroscopy analysis

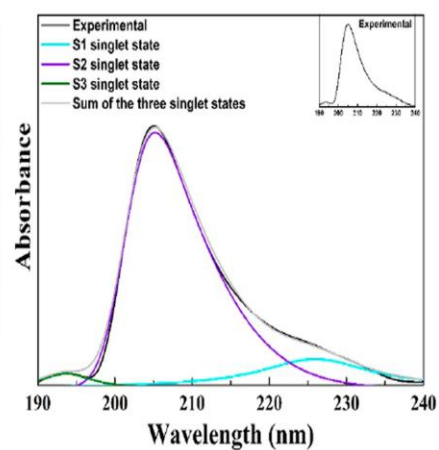
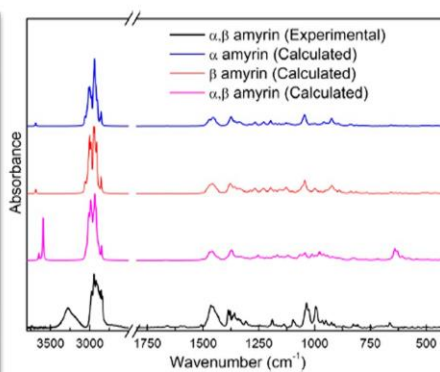
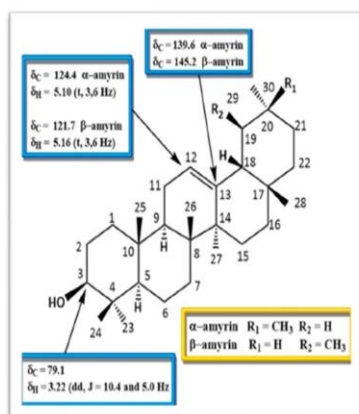


Table 1. ^1H NMR and ^{13}C NMR data of α,β -amyrin mixture in CDCl_3 .

α -amyrin			β -amyrin	
C	δ_{C}	$\delta_{\text{H}}, J (\text{Hz})$	δ_{C}	$\delta_{\text{H}}, J (\text{Hz})$
1CH ₂	38.8	1.66 ; 1.00	38.6	1.06 ; 1.05
2CH ₃	27.3	-	27.3	-
3CH	79.1	3.22 (dd, J = 10.4 e 5.0)	79.1	3.23 (dd, J = 10.4 e 5.0)
4C	38.8	-	38.8	-
5CH	55.2	-	55.2	-
6CH ₂	18.4	1.60 ; 1.30	18.4	1.60 ; 1.30
7CH ₂	32.9	-	32.6	-
8C	40.0	-	39.8	-
9CH	47.7	1.57	47.6	1.53
10C	36.9	-	36.9	-
11CH ₂	23.4	-	23.5	-
12CH	124.4	5.10 (t, J = 3.6)	121.7	5.16 (t, J = 3.6)
13C	139.6	-	145.2	-
14C	42.1	-	41.7	-
15CH ₂	28.1	-	26.1	-
16CH ₂	26.6	-	26.9	-
17C	33.8	-	32.5	-
18CH	59.1	1.32	47.2	1.95
19	39.7	1.32	46.8	1.70 ; 1.03
20	39.6	0.92	31.1	-
21CH ₂	31.3	-	34.7	-
22CH ₂	41.5	1.45 ; 1.29	37.1	-
23CH ₃	28.1	-	28.1	-
24CH ₃	15.6	-	15.5	-
25CH ₃	15.7	-	15.6	-
26CH ₃	16.9	-	16.8	-
27CH ₃	23.3	1.05 (s)	26.0	1.2 (s)
28CH ₃	28.8	0.78 (s)	28.4	0.81(s)
29CH ₃	17.5	0.77 (d)	33.4	-
30CH ₃	21.4	0.91 (d, J = 6.1)	23.7	-

Legend: 19CH and 20CH = α -amyrin; 19CH₂ and 20C = β -amyrin.

Table 2. Correlations of $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ [HMBC – ^nJCH ($n = 2$ and $n = 3$) of the α,β -amyrin mixture in CDCl_3 .

C	α -amyrin		β -amyrin	
	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$
1		H-3		H-3
3		3H-23; 3H-24		3H-23; 3H-24
5		3H-23; 3H-24; 3H-25		3H-23; 3H-24; 3H-25
9				H-12
11	H-12		H-12	
12				
13		3H-27		3H-27
14		H-12		H-12
18		H-12		
23		H-3		H-3
24		H-3		H-3

Table 3. Experimental wavenumbers (cm^{-1}) of the Raman and infrared bands of the α,β -amyrin mixture and assignment for their vibrational modes.

Raman bands of α,β -amyrin	Raman intensities of α,β -amyrin	IR bands of α,β -amyrin	IR bands of α, β -amyrin	Assignment for some vibrational modes of α,β -amyrin
$\omega_{\text{Raman}} (\text{cm}^{-1})$	$^a I_{\text{Raman}}$	$\omega_{\text{IR}} (\text{cm}^{-1})$	βI_{IR}	
-	-	3272	0.29	$\nu (\text{OH})$
2978	0.61	2976	0.69	$\nu_{\text{as}} (\text{CH}) + \nu_{\text{as}} (\text{CH}_2)$
2949	1.00	2946	1.00	$\nu (\text{CH}_3) + \nu_{\text{as}} (\text{CH}_2) + \nu_{\text{s}} (\text{CH})$
2921	0.99	2928	0.88	$\nu_{\text{s}} (\text{CH}_3) + \nu_{\text{s}} (\text{CH}_2)$
2840	0.44	2838	0.60	$\nu (\text{CH}_3) + \nu_{\text{s}} (\text{CH}_3)$
1660	0.24	1660	0.07	$\nu (\text{C} = \text{C})$
		1606	0.06	Overtone or combination modes
		1585	0.06	Overtone or combination modes
		1509	0.09	$\delta_{\text{as}} (\text{CH}_3)$
1464	0.35	1465	0.44	$\text{sc} (\text{CH}_2) + \delta_{\text{as}} (\text{CH}_3)$
1457	0.38	1456	0.41	$\text{sc} (\text{CH}_2) + \delta_{\text{as}} (\text{CH}_3)$
1386	0.15	1387	0.36	$\text{wag} (\text{CH}_2) + \text{wag} (\text{CH}_3)$
1379	0.10	1379	0.34	$\text{wag} (\text{CH}_2) + \text{wag} (\text{CH}_3)$
1356	0.15	1359	0.22	$\text{wag} (\text{CH}_2) + \text{wag} (\text{CH}_3)$
1303	0.16	1308	0.10	$\text{wag} (\text{CH}_3) + \nu (\text{CC}) + \text{r} (\text{CH})$
1190	0.2	1190	0.18	$\tau (\text{HCCC}) + \nu (\text{CC}) + \delta (\text{HOC}) + \nu (\text{OC})$
1098	0.10	1096	0.18	$\nu (\text{CC}) + \tau (\text{HCCC})$
1038	0.14	1037	0.48	$\text{r} (\text{CH}_2) + \text{r} (\text{CH}_3)$
-	-	1026	0.37	$\text{r} (\text{CH}_2) + \text{r} (\text{CH}_2)$
996	0.10	996	0.41	$\tau (\text{HCCC}) + \nu (\text{CC}) + \gamma (\text{CCCC})$
989	0.10	992	0.39	$\nu (\text{CC}) + \tau (\text{CH}_2) + \tau (\text{CH}_3)$
959	0.16	965	0.11	$\gamma (\text{CCCC}) + \tau (\text{CCCC})$
952	0.14	950	0.11	$\gamma (\text{CCCC}) + \tau (\text{CCCC}) + \tau (\text{CCCH})$
924	0.13	925	0.08	$\tau (\text{CCCC}) + \tau (\text{CCCH})$
915	0.13	913	0.06	$\gamma (\text{CCCC}) + \tau (\text{CCCC})$
828	0.06	827	0.05	$\tau (\text{CCCC}) + \tau (\text{CCCH}) + \nu (\text{CC})$
806	0.08	806	0.05	$\nu (\text{CC}) + \tau (\text{CCCC}) + \gamma (\text{CCCH})$
665	0.10	664	0.07	$\nu (\text{CC}) + \nu (\text{CO}) + \tau (\text{CCCC}) + \tau (\text{CCCH})$
300	0.08	302	0.03	$\delta (\text{COH}) + \tau (\text{CCCC}) + \gamma (\text{CCCH})$
294	0.08	292	0.02	$\tau (\text{CCCC}) + \tau (\text{CCCH}) + \gamma (\text{CCCH})$

Nomenclature: τ = torsion; γ = deformation out of plane; r = rocking; wag = wagging;

δ = deformation; δ_{as} = anti-symmetric bending, ν = stretching; ν_{as} = asymmetric stretching;

ν_{s} = symmetric stretching.

^a Raman intensities experimental (I_{Raman}) were normalized between 0 to 1 with highest peak Raman equal to 1.

^b Absorbance intensities experimental (I_{IR}) were normalized between 0 to 1 with highest peak absorbance equal to 1.

Table 4. Quantum chemical parameters for α -amyrin, β -amyrin, and α,β -amyrin.

Compound	E_{HOMO} (eV)	E_{LUMO} (eV)	ΔE (eV)	I (eV)	A (eV)	μ (eV)	χ (eV)	η (eV)	S (1/eV)	ω (eV)	ϵ (1/eV)	ΔN_{max}
α -amyrin	-5.99	0.87	6.86	5.99	-0.87	2.56	-2.56	3.43	0.29	0.96	1.04	0.37
β -amyrin	-6.02	0.90	6.92	6.02	-0.90	2.56	-2.56	3.45	0.29	0.95	1.05	0.37
α,β -amyrin	-5.91	0.83	6.74	5.91	-0.83	2.54	-2.54	3.37	0.30	0.96	1.04	0.38

Table 5. Electronic absorption spectral data (experimental and calculated) of α,β -amyrin.

Singlet states	Experimental		TD-DFT/B3LYP/6-31G(d,p)				
	$\lambda(\text{nm})$	$E(\text{eV})$	$\lambda(\text{nm})$	$E(\text{eV})$	f_{os}	Electronic Transitions	% Major Contributions
S1	226	5.49	181	6.84	0.3445	H \rightarrow L	82
S2	205	6.05	177	6.99	0.4313	H-1 \rightarrow L+1	77
S3	194	6.40	170	7.31	0.0026	H-2 \rightarrow L	34
						H-3 \rightarrow L	32

f_{os} = oscillator strength, H = highest occupied molecular orbital, L = lowest unoccupied molecular orbital.

Table 6. Predicted physicochemical and pharmacokinetic properties of α -amyrin and β -amyrin: pKa (ionization constant); NaN (Non-ionizable atoms); ClogP (ChemAxon partitioning coefficient); WlogP (Wildman partitioning coefficient); ClogD_{7.4} (ChemAxon distribution coefficient at pH 7.4); ClogS (ChemAxon solubility coefficient); PSA (Polar Surface Area); HIA (Human Intestinal Absorption); BBB (Blood-Brain Barrier penetration); P-gp (P-glycoprotein substrate).

Compound name	pKa	ClogP	WlogP	ClogD _{7.4}	ClogS	Ali Solubility (mol/L)	PSA (Å ²)	HIA	BBB	P-gp
α -amyrin	NaN	7.40	8.17	7.40	-8.75	3.38 ⁻¹⁰	20.23	Low	No	No
β -amyrin	NaN	7.39	8.02	7.39	-9.04	4.72 ⁻¹⁰	20.23	Low	No	No

Table 7. Prediction of the metabolism by the CYP450 inhibition and cardiotoxicity by the hERG channel inhibition for α -amyrin and β -amyrin.

Compound name	CYP1A2 inhibitor	CYP2C19 inhibitor	CYP2C9 inhibitor	CYP2D6 inhibitor	CYP3A4 inhibitor	hERG inhibitor	Confidence pred-hERG
α -amyrin	No	No	No	No	No	No	0.60
β -amyrin	No	No	No	No	No	No	0.60

Spectroscopic, physicochemical, and pharmacokinetic analysis of α,β -amyrin mixture obtained from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand resin

Raíssa C. Oliveira^a, Paulo N. Bandeira^b, Telma G. Lemos^c, Hércio S. dos Santos^{a,b,h}, Murilo S.S. Julião^b, Emmanuel S. Marinho^{e,h}, Francisco Flávio da S. Lopes^h, Selene Maia de Moraes^h, João Pedro da Hora^b, Ana J. de Moraes Bento^a, Igor K.C. Lima^a, Carlos E.S. Nogueira^{a,f}, Gilberio D. Saraiva^f, Antônio C.H. Barreto^g, Raimundo Braz-Filho^h, Alexandre M.R. Teixeira^{a,d,h,i*}

^a Departamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri, Crato, CE, Brazil

^b Centro de Ciências e Tecnologia - Curso de Química, Universidade Vale do Acaraú, Sobral, CE, Brazil

^c Departamento de Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

^d Departamento de Física, Universidade Regional do Cariri, Juazeiro do Norte, CE, Brazil

^e Grupo de Química Teórica e Eletroquímica, Universidade Estadual do Ceará, Campus FAFIDAM, Limoeiro do Norte, Ceará, Brazil

^f Departamento de Física, Universidade Estadual do Ceará, Quixadá, Ceará, Brazil

^g Departamento de Física, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

^h Universidade do Norte Fluminense – Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

ⁱ Centro de Ciência e Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brazil.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

*Corresponding author. Postgraduate Program in Biological Chemistry, Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri, Campus Pimenta II, CEP: 63.100-000, Crato, CE, Brazil. E-mail addresses: alexandre.teixeira@urca.br

Figure S1. ^{13}C NMR spectrum (75 MHz, CDCl_3) for α,β -amyrin mixture

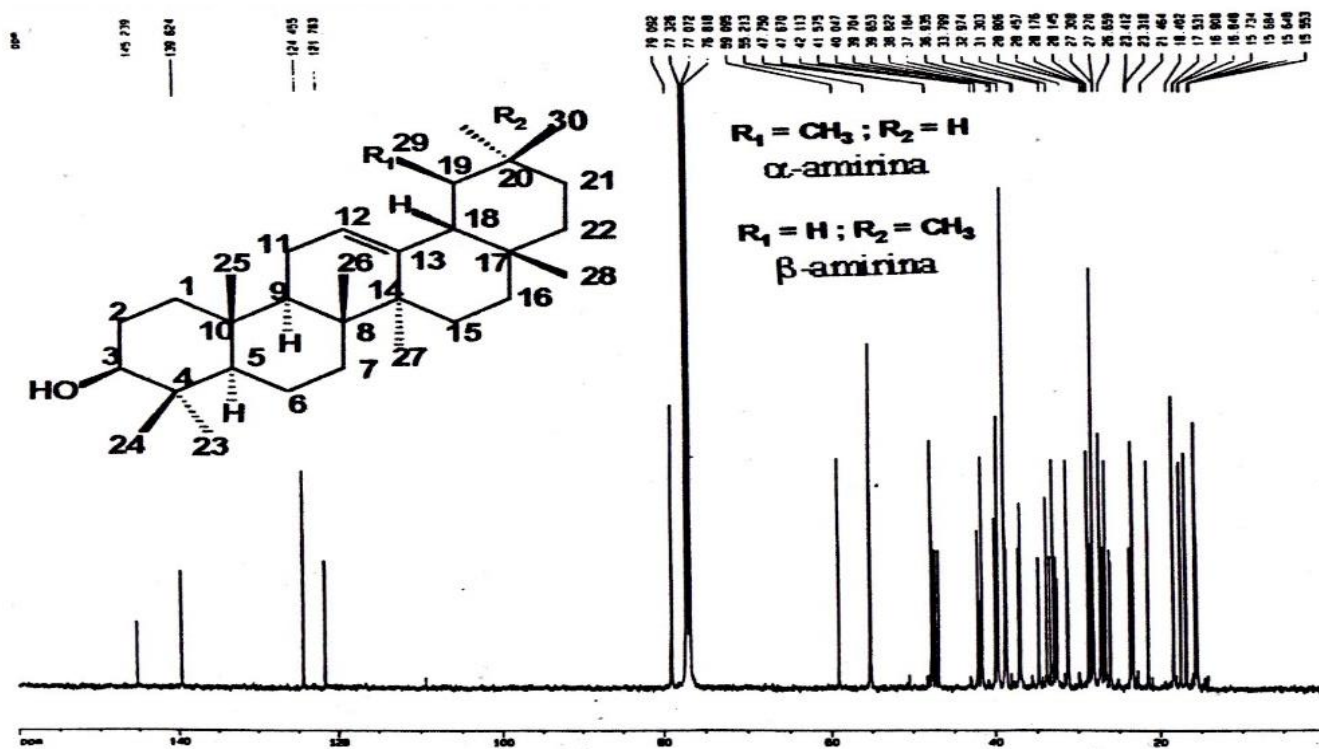


Figure S2. ^1H NMR spectrum (300 MHz, CDCl_3) for α,β -amyrin mixture

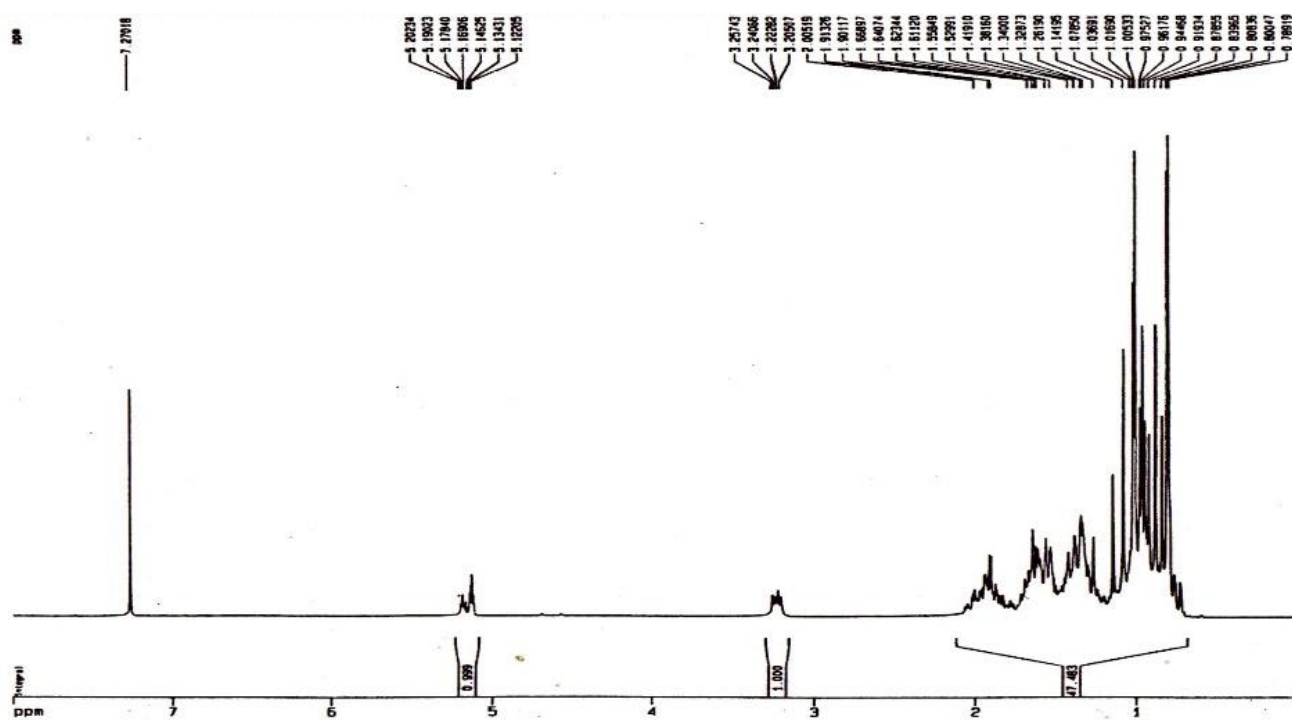


Figure S3. $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY (75 MHz, CDCl_3) spectrum for α,β -amyrin mixture.

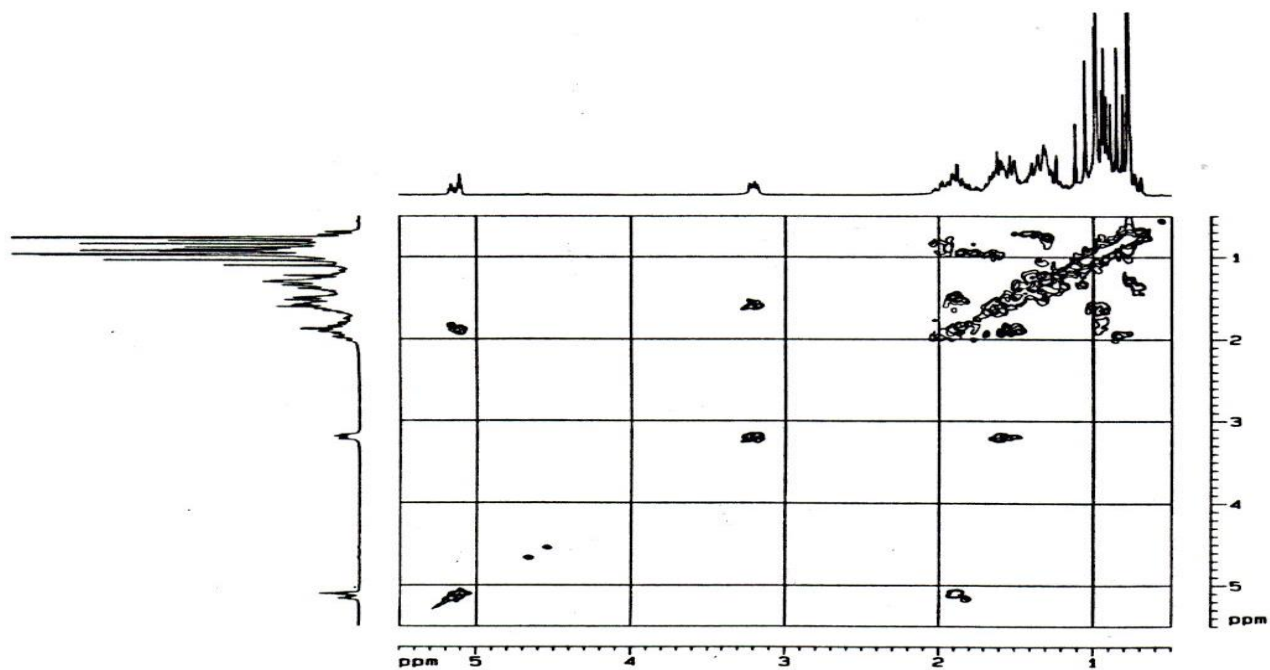


Figure S4. $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ 2D-HSQC (75 MHz, CDCl_3) spectrum for α,β -amyrin mixture.

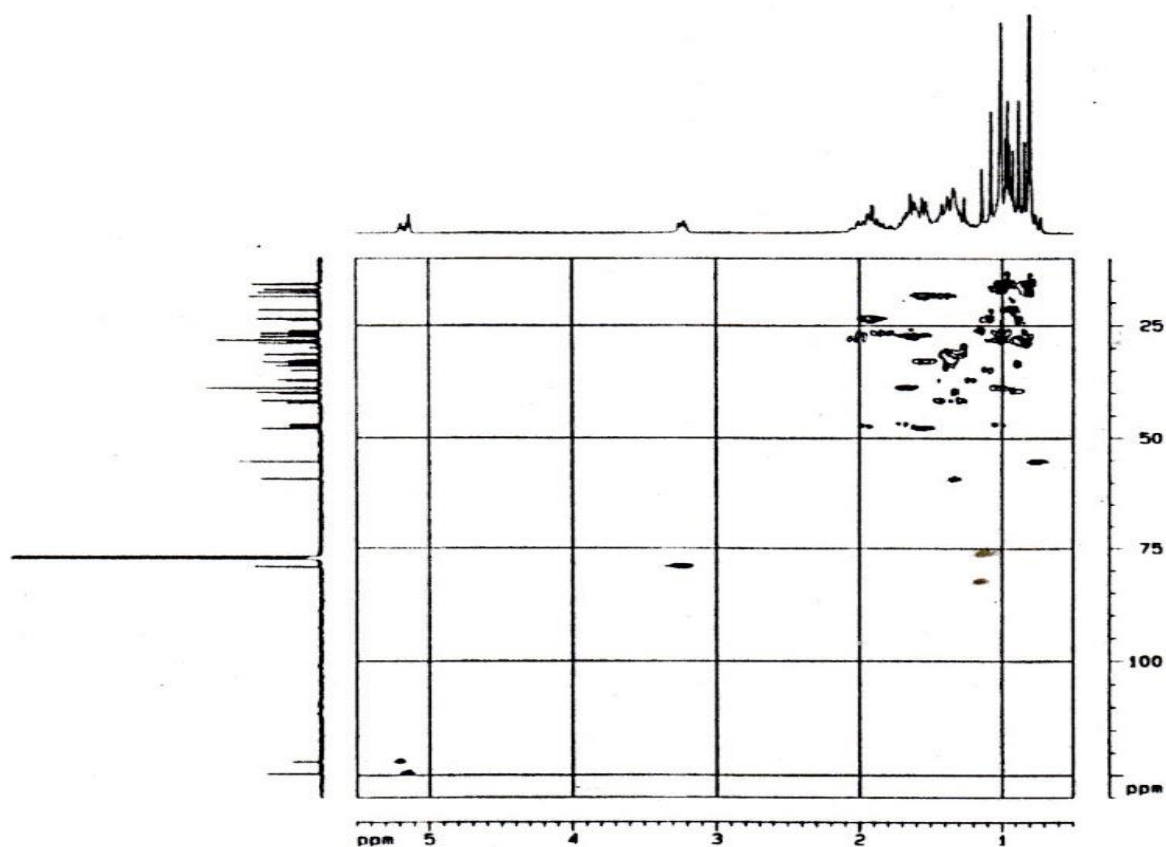


Figure S5. $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ 2D-HMBC (75 MHz, CDCl_3) spectrum for α,β -amyrin mixture.

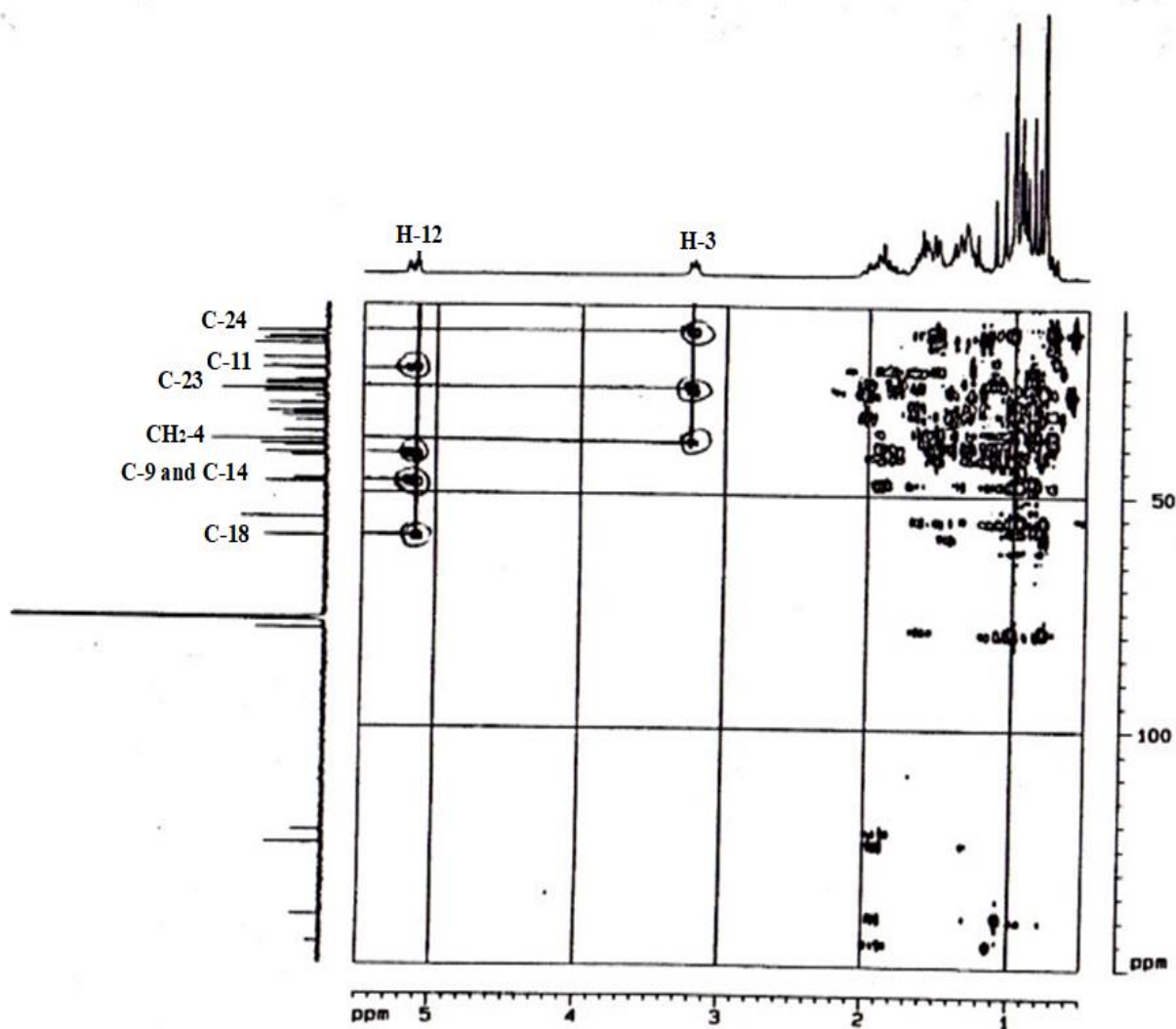


Figure S6. (A) Chromatogram for α,β -amyrin mixture. (B) Mass spectra for α -amyrin, and (C) Mass spectra for β -amyrin.

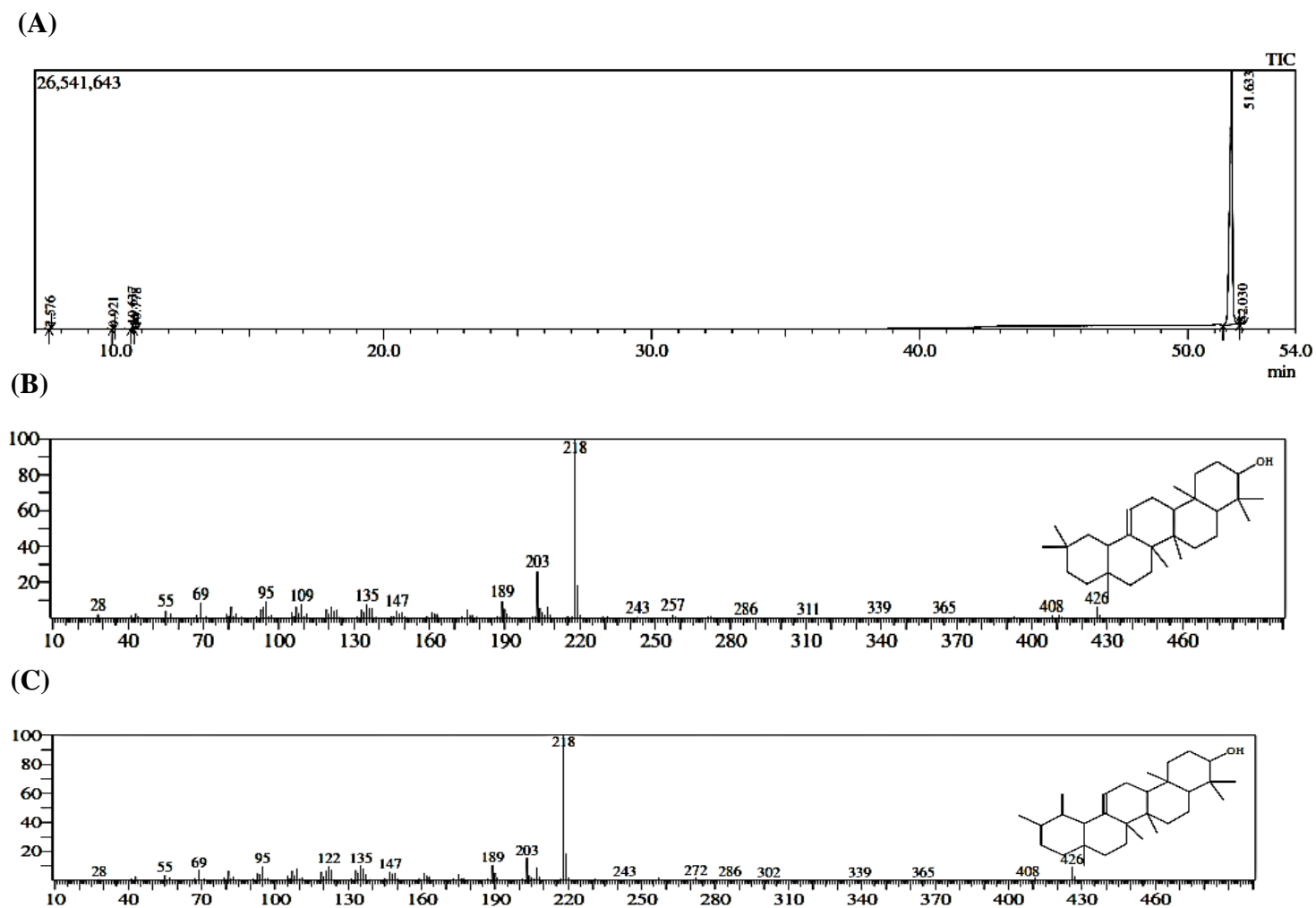


Figure S7. Optimized molecular structures obtained at B3LYP/6-311++G(d,p) level of theory for (a) α -amyrin, (b) β -amyrin, and (c) α,β -amyrin.

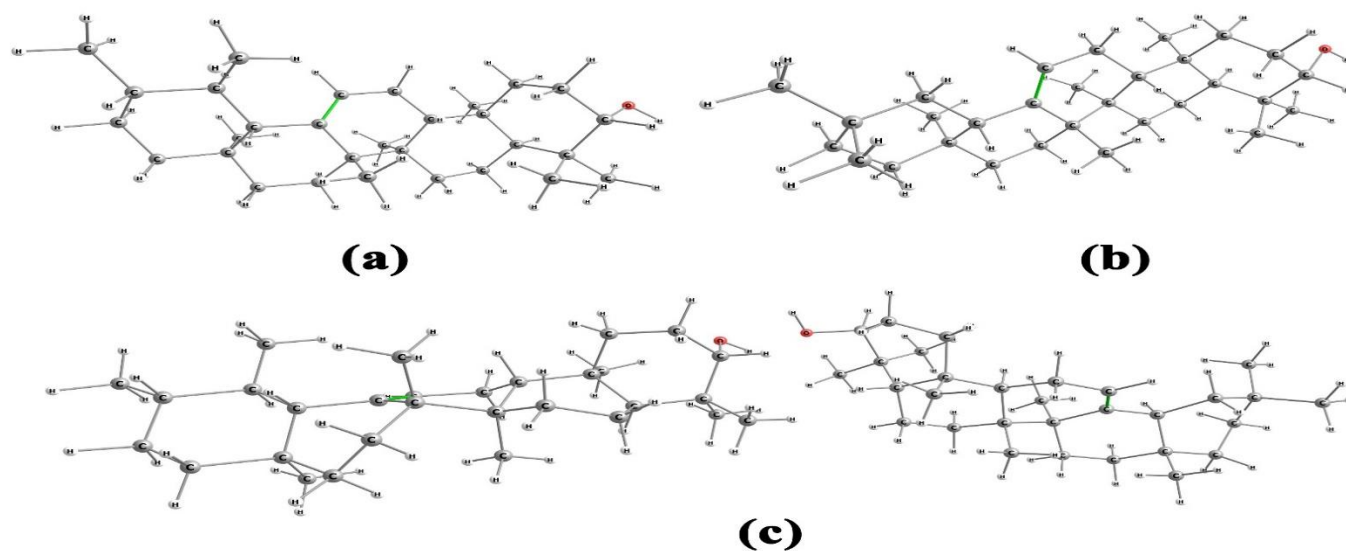


Figure S8. Experimental ATR-FTIR spectrum of α,β -amyrin.

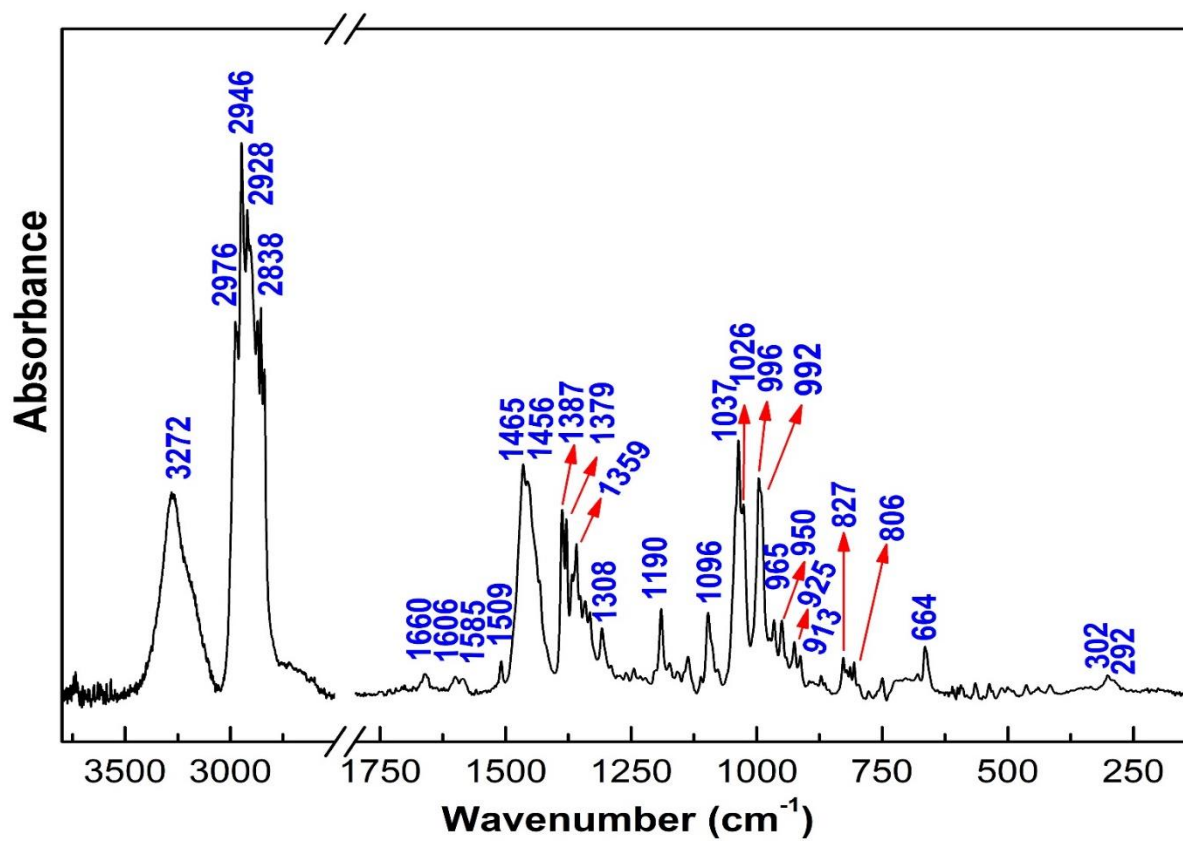


Figure S9. Experimental Raman spectrum of α,β -amyrin.

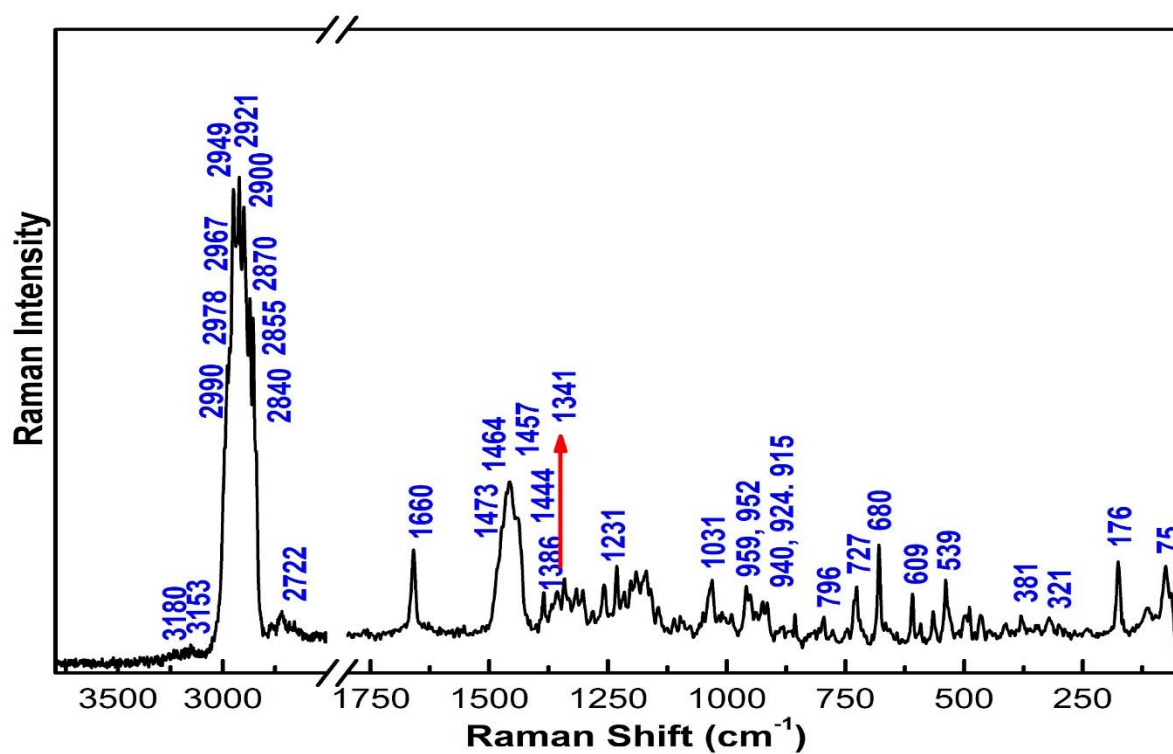
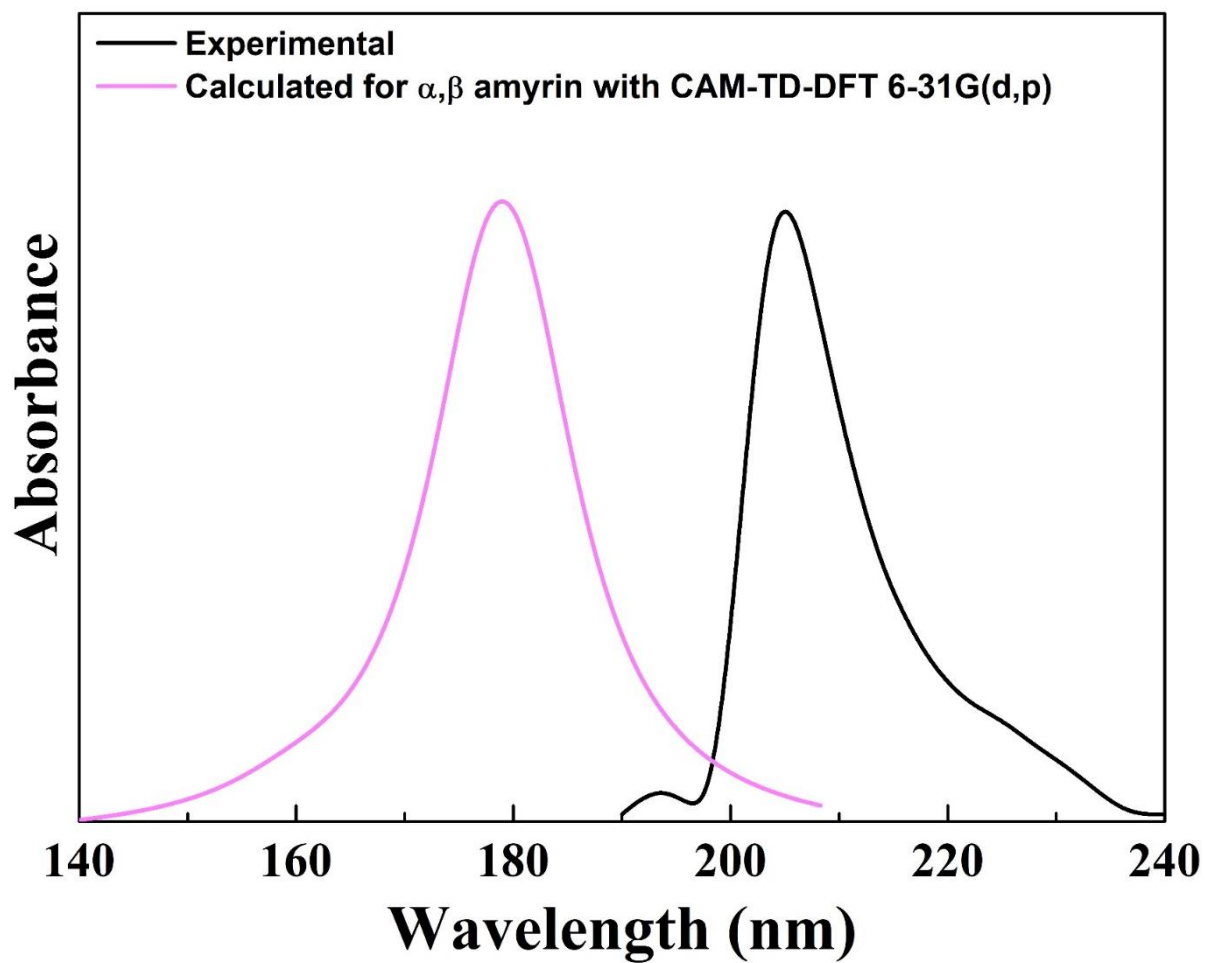


Figure S10. UV absorption spectra (experimental and calculated) of α,β -amyrin.



CAPÍTULO 4 – MANUSCRITO 2

MANUSCRITO: *In silico* and *in vitro* evaluation of efflux pumps inhibition of α,β -amyrin

Raissa C. Oliveira^a, Paulo N. Bandeira^b, Telma L.G. Lemos^c, Hécio S. dos Santos^{a,b}, Jackelyne R. Scherf^a, Janaina E. Rocha^a, Raimundo L.S. Pereira^a, Thiago S. Freitas^a, Priscila R. Freitas^a, Francisco N. Pereira- Junior^d, Márcia M. Marinho^c, Emanuelle M. Marinho^f, Emmanuel S. Marinho^g, Carlos E.S. Nogueira^{a,h}, Henrique D.M. Coutinho^a, Alexandre M.R. Teixeira^{a,h,*}

^a Departamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri, Crato, CE, Brasil

^b Centro de Ciências e Tecnologia - Curso de Química, Universidade Vale do Acaraú, Sobral, CE, Brasil

^c Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil

^d Centro de Ciências Agrárias e da Biodiversidade, Universidade Federal do Cariri, Juazeiro do Norte, CE, Brazil

^e Faculdade de Educação, Ciências e Letras de Iguatu, Universidade Estadual do Ceará, Iguatu, CE, Brasil

^f Departamento de Química Analítica e Físico-Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil

^g Universidade Estadual do Ceará, Grupo Teórico e Química Eletroquímica, Limoeiro do Norte, Ceará, Brasil

^h Departamento de Física, Universidade Regional do Cariri, Juazeiro do Norte, CE, Brasil

*Corresponng author. Postgraduate Program in Biological Chemistry, Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri, Campus Pimenta II, CEP: 63.100-000, Crato, CE, Brazil. E-mail addresses: alexandre.teixeira@urca.br

Abstract

The use of the bacterial efflux pump mechanism to reduce the concentrations of antibiotics in the intracellular to the extracellular region is one of the main mechanisms by which bacteria acquire resistance to antibiotics. The present study aims to evaluate the antibacterial activity of the α,β -amyrin mixture isolated from *Protium heptaphyllum* against the multidrug-resistant strains of *Escherichia coli* 06 and *Staphylococcus aureus* 10, and to verify the inhibition of the efflux resistance mechanisms against the strains of *Staphylococcus aureus* 1199B and K2068, carrying the NorA and MepA efflux pumps, respectively. The α,β -amyrin did not show clinically relevant direct bacterial activity. However, the α,β -amyrin when associated with the gentamicin antibiotic presented synergistic effect against the multidrug-resistant bacterial strain of *S. aureus* 10. In strains with efflux pumps, α,β -amyrin was able to inhibit the action of the efflux protein NorA against Ethidium Bromide. However, this inhibitory effect was not observed in the MepA efflux pump. In addition, when evaluating the effect of standard efflux pump inhibitors, clorptomazine and CCCP, α,β -amyrin showed a decrease in MIC, demonstrating the presence of the efflux mechanism through synergism. Docking studies indicate that α,β -amyrin have a higher affinity energy to MepA, and NorA than ciprofloxacin and norfloxacin. Also, α,β -amyrin bind to the same region of the binding site as these antibiotics. It was concluded that the α,β -amyrin has the potential to increase antibacterial activity with the association of antibiotics, together with the ability to be a strong candidate for an efflux pump inhibitor.

Keywords: α,β -amyrin mixture; Antibacterial activity; Efflux pump; Molecular docking.

1. Introduction

The emergence of multidrug-resistant pathogens (MDR) has become a worldwide problem causing harm to the effective treatment of a wide variety of infectious diseases. These pathogens acquire resistance mainly due to the indiscriminate use of antibiotics [1]. The World Health Organization (WHO) has published a list of priority pathogens that urgently need the development of new antimicrobial agents, which are strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) or susceptible to vancomycin and strains of the *Enterobacteriaceae* family resistant to carbapenem and producers of extended-spectrum beta lactamase (ESBL) are among the main microorganisms that cause clinical infections [2], causing an estimated 700.000 deaths per year [3].

Staphylococcus aureus is a human bacterial pathogen characterized by Grampositive cocci capable of living in aerobic to facultative anaerobic conditions, usually found in various locations in the human microbiota such as skin, nostrils and gastrointestinal tract, and sharing a benign or commensal relationship with the host. However, it can become an opportunistic pathogen, as it penetrates host tissues through injury, syringe inoculation, or by direct implantation with medical devices [4]. It is frequently associated with hospital and community infections, causing infectious diseases that are difficult to treat, mainly due to its wide capacity to produce virulence factors and the ability to acquire resistance against multiple classes of antibiotics, including resistance to β -lactam, aminoglycosides, macrolides, lincosamides, fluoroquinolones, chloramphenicol, sulfonamides, streptomycin and tetracycline [5-7]. It is the main pathogen that causes bloodstream infections [8].

Escherichia coli is a Gram-negative anaerobic bacterium that is found in the human microbiota, living commensally in the intestinal tract [9] and has the potential to cause extra-intestinal pathologies, especially urinary tract infections [10], various intraabdominal, pulmonary infections, skin, soft tissue and bloodstream [11]. In addition, *E. coli* is the leading cause of life-threatening diarrheal diseases worldwide [12].

The evolution of the resistance mechanisms of these microorganisms has become a relevant factor in the fight against the spread of infectious diseases. Resistance can be intrinsic or acquired, through spontaneous mutations or due to the horizontal transfer of genes from donor bacteria, phages, or free DNA. Actions associated with intrinsic or acquired resistance include preventing antibiotics from penetrating the bacterial cell wall; removal by means of specific efflux pumps (EP); deactivation or degradation of antibiotics [13].

In recent decades, multi-drug efflux pumps have gained the attention of researchers due to their potential association with clinical multidrug resistance [14]. The use of the bacterial efflux pump mechanism to reduce the concentrations of antibiotics in the intracellular to the extracellular region is one of the main mechanisms by which bacteria acquire resistance to antibiotics [14].

In addition to antibiotics, efflux pumps can also extrude a wide variety of compounds: bacterial metabolites and compounds produced by plants [15]. A viable strategy is using compounds of plant origin as drug resistance reversal agents, specially efflux pump inhibitors [16,17] These compounds may have their own antimicrobial activity or have the ability to increase the activity of ineffective antibiotics through inhibition/modulation of efflux pumps [16].

Strains of *Staphylococcus aureus*, 1199-B and K2068, which overexpress the NorA and MepA genes, respectively, which code for the NorA and MepA efflux pumps, play an important role in resistance to different antimicrobial agents [18,19]. NorA and MepA efflux pumps act against antibiotics of the fluoroquinolone class [20]. Thus, our choice was based on their action on the antibiotics that were tested; norfloxacin for the NorA pump and ciprofloxacin for the MepA efflux pump. These efflux pumps have been frequently used as a microbial model to assess whether a compound acts as an efflux pump inhibitor Furthermore, the norA and mepA genes have a high prevalence in *S. aureus* strains [21]. In addition, the NorA efflux pump is known to mediate ethidium bromide extrusion [22] a substrate used in tests to assess the activity of efflux pump inhibitors.

In order to suppress the advance of bacterial resistance, research centers are based on the synergistic interaction of natural compounds with antibiotics already available [23], such as, new compounds capable of neutralizing resistance mechanisms when associated with resistance modifying agents. along with active drugs [24,25]. In this scenario, the inhibition of bacterial efflux pumps by plant-derived compounds was investigated as a therapeutic strategy for the treatment of infections caused by multidrugresistant bacteria [26].

Phytochemical studies carried out with the resin of the species *Protium heptaphyllum* (Aubl) Marchand, belonging to the family Burseraceae, popularly known as “breu branco” and “almecegueira”, and located mainly in the Amazon region [25], identified the majority presence of the terpene compound α,β -amyrin, chemically formed by the mixture of two pentacyclic triterpenoid components, α -amyrin (ursane) and β -amyrin (olean) [27,28]. There are a wide variety of studies that contemplate the interest in these compounds, the justification is due to innumerable biological activities already described in the literature, among these activities, the

anti-inflammatory effect, activities in the central nervous system, action were more frequently described in the metabolism and in the digestive tract [28].

Based on the knowledge that compound terpenes have already demonstrated antimicrobial biological activity [29] and the association of some terpenes with conventional antibiotics has increased antibiotic activity [30]. The present study aims to evaluate the antibacterial activity of the α , β -amyrin mixture *in vitro* against the multidrug-resistant strains of *Escherichia coli* 06 (EC 06) and *Staphylococcus aureus* 10 (SA 10), and to investigate its potential as efflux pump inhibitor of *S. aureus* strains 1199B and K2068, which are carriers of the NorA and MepA efflux pumps, respectively.

2. Material and Methods

2.1 Isolation of the binary mixture of α , β -amyrin

The mixture of α , β -amyrin was isolated from the *Protium heptaphyllum* resin. The resin (20g) was fractionated by silica gel column chromatography with hexane, chloroform, ethyl acetate and methanol. Fractions obtained with chloroform (5.2g), were repeatedly chromatographed on silica gel and eluted with increasing amounts of hexane:ethyl acetate. Fractions obtained from hexane: acetate (1:1) were analyzed by TLC and contained 450mg of α - and β -amyrin [31].

2.1 Bacterial strains

The microorganisms used for the determination of antibacterial activities were the multidrug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* 10 and *Escherichia coli* 06. They were obtained from clinical isolates of rectal swab and uroculture, respectively. The *S. aureus* 10 was provided by Prof. Humberto Medeiros Barreto of the Department of Parasitology and Microbiology from Federal University of Piauí, and *E. Coli* 06 was provided by Vicente Lemos Laboratory (Crato-CE, Brazil). The bacterial source and antibiotic resistance profile is shown in Table 1, as reported in the study by Lima and collaborators [32].

The analysis of bacterial resistance and the analysis of the efflux pump inhibition were performed using the strains of *Staphylococcus aureus* 1199B and K2068, which are carriers of the NorA and MepA efflux pumps, respectively. The *S. aureus* 1199B was ceded by Prof. S. Gibbons from University of London, and the *S. aureus* K2068 was ceded by Prof. Glenn Kaatz

from University School of Medicine. The bacterial strains were maintained on Brain Infusion Heart agar (BHIA) at 4 °C, and before the assay the cells were cultured overnight at 37 °C in Brain Heart Infusion (BHI). The samples were transferred from the solid medium to test tubes containing 3 mL of sterile 0.9 % NaCl solution, and turbidity was evaluated using a value of 0.5 on the McFarland scale, corresponding to 10⁵ CFU.

2.2 Drugs

The ampicillin, ciprofloxacin and gentamicin antibiotics were used against the multidrug-resistant strains of *S. aureus* 10 and *E. coli* 06, to evaluate the activity of α , β - amyryin. The sulbactam+ampicillin antibiotic and carbonylcyaneto-3-chlorophenylhydrazine (CCCP) were used as test controls. The *S. aureus* 1199B and K2068 strains were tested with the norfloxacin and ciprofloxacin antibiotics, respectively, in order, to also evaluate the antibacterial activity of the α , β -amyryin mixture against these strains. The ethidium bromide substrate, the carbonylcyanide-3-chlorophenylhydrazine (CCCP) and chlorpromazine (CPZ) efflux pump inhibitors were used as test controls. The ampicillin, ciprofloxacin and gentamicin antibiotics, as well as α , β -amyryin, were dissolved initially in dimethyl sulfoxide (DMSO), and subsequently they were diluted in sterile distilled water, CCCP was dissolved in methanol/water, while ethidium bromide, sulbactam was dissolved in sterile distilled water. Chlorpromazine was also diluted initially in DMSO and subsequently in water. All drugs were prepared in initial concentrations of 1.024 μ g/mL and diluted in series in test tubes. All drugs were purchased from SIGMA Chemical Co. (St. Louis, USA).

2.3 Determination of the minimum inhibitory concentration (MIC)

The minimum inhibitory concentration test (MIC) was performed using the broth microdilution method [33]. Bacterial cultures kept on agar under refrigeration at -80 °C were grown in brain and heart infusion broth (BHI) and incubated at 37 °C for 24 h. Then, each inoculum was prepared with BHI 10% in the proportion of 1: 9. Soon after, 100 μ L of the inoculum in medium was added to wells of a plate containing 96 wells with 100 μ L of the substance in concentrations ranging from 1.024 to 8 μ g/mL, followed by incubation at 37 °C for 24 h. Positive controls (medium + inoculum) were included in the last wells of the plate. After incubation, a sodium resazurin solution at a concentration 400 μ g/mL was added to each well, followed by an additional 1 h incubation period at room temperature. The change in color

from blue to red in the solution, caused by the reduction of resazurin, was used to detect bacterial growth. MIC was defined as the lowest concentration at which no bacterial growth was observed. All experiments were carried out in triplicate for all bacterial strains.

2.5 Modulating effect of antibiotic resistance by α , β -amyrin

The modulating effect of the association of the antibiotic with the compound α , β - amyrin was evaluated by calculating the MICs of the antibiotics ampicillin, ciprofloxacin and gentamicin (Sigma, MO, USA) against resistant strains of *E. coli* and *S. aureus*, norfloxacin was tested only for *S. aureus*, in the presence or absence of the compound in subinhibitory concentrations (MIC/8) [34]. All experiments were carried out in triplicate for all bacterial strains.

2.6 Efflux pump inhibition analysis

The efflux pump inhibition analysis was performed by assessing the ability of α , β -amyrin to reduce the MIC of norfloxacin or ethidium bromide against strains of *S. aureus* 1199B and ciprofloxacin or ethidium bromide against strains of *S. aureus* K2068. Strains that express genes that encode efflux proteins associated with antibiotic resistance to norfloxacin and ciprofloxacin, respectively. For this purpose, the MIC of antibiotics and ethidium bromide were calculated in the presence or absence of subinhibitory concentrations of the pentacyclic triterpene α , β -amyrin [34,35]. The bacterial inoculants were prepared as previously described, and α , β -amyrin was added in a concentration equivalent to its MIC / 8. In each well of the plate containing 96 wells, 100 μ L of the treatment solution were filled and then ethidium bromide or antibiotics were added to the wells in concentrations ranging from 1.024 to 0.5 μ g/mL. The efflux pump mechanism is evidenced comparing the ethidium bromide control with the ethidium bromide + standard inhibitor association. A reduction in MIC of ethidium bromide or antibiotics are interpreted as an inhibition of the efflux pump.

2.7 Computational procedures

2.7.1 Computational details

The simulations were performed on the 64-bit software operating system. The codes that were used: UCSF Chimera TM [36], Autodocktools TM [37], AutoDockVina TM [38], Avogadro TM (<http://avogadro.cc/>) [39], Discovery studio visualizer TM viewer [40] and Marvin TM 19.8, 2020, (<http://www.chemaxon.com>) [41]. All codes used are free for academic use.

2.7.2 Preparation and optimization of ligands

The structures of α -amylin and β -amylin (Figure 1) were rendered using the MarvinSketch code (<https://chemaxon.com/products/marvin>) and then subjected to structural optimization using the classic MMFF94 force field formalism (Merck Molecular Force Field 94) [42]. The optimization calculations were performed using the Avogadro® code [39], conFigure d to perform MMFF94 force field simulations, using the *Steepest Descent* algorithm [43], 500 numeric steps and a convergence parameter $10e^{-7}$ [44].

2.7.3 Obtaining and preparing protein structures

Following the methodology proposed by Siqueira et al. [45] the amino acid sequence of MepA and NorA of *S. aureus* 1199B were obtained from the Universal Protein Resource database - UniProt (<http://www.uniprot.org>) [46], where they were deposited under NCTC code 8325 and Q03325 respectively (Table S1-supplementary material). To build the protein models the SWISS-MODEL server (<https://swissmodel.expasy.org/>) [47] was used configured to perform searches for structural models through alignment tests performed by the HMM-HMM-based lightning algorithm -fast iterative sequence search (HHBlits) [48]. After alignment, the most similar structures were chosen to build the protein model. For MepA, the structure of the multi-drug and toxic compound extrusion (MATE) transporter of the *Bacillus halodurans* (PDB-ID: 5C6N) [49] was used as a template for NorA *E. coli* YajR transporter (PDBID:3WDO) [50].

2.7.4 General Docking procedures

The docking simulations were performed using the Local Search global optimizer [38] available in the AutoDock Vina code (version 1.1.2) using 3 multithreading routes [51]. In the simulations with the MepA grid box it was centered in the whole protein and defined with the parameters of $70\text{\AA} \times 76\text{\AA} \times 84\text{\AA}$ and dimensions (x, y, z) = (9.189, -18.945, -21.94), with NorA

the simulations used grid box centered in all protein with the parameters of 80Åx68Åx70Å and dimensions (x, y, z) = (5.074,-2.171,-19.126).

As a standard procedure, 50 independent simulations were performed, obtaining 20 poses each [52], using the Exhaustiveness criteria equal to 64. At the end of the coupling simulations, several ligand binding energies were obtained with their respective conformations; the stable conformation, which corresponds to the lowest energy bond, was chosen as the best pose and was used in the docking analysis [53]. To assess the stability of the protein / ligand complex, affinity energy was used as a parameter, with ideality parameters values below -6.0 kcal/mol [54]. Emphasizing that all simulations were with the same parameters to obtain comparative data with the antibiotics Ciprofloxacin and Norfloxacin for MepA and NorA respectively.

2.7.5 Medicinal chemistry properties and SAR estimate

The properties of medicinal chemistry of molecular weight (MW), lipophilicity (log*P*), H-bond acceptors (HBA) and donors (HBD), polarity (TPSA) and number of rotating bonds (Nrotb), as well as structural fraction properties carbon sp³ (Fsp³), number of rings (NRING) and stereo centers (SC) were calculated using the ADMETlab 2.0 web server (<https://admetmesh.scbdd.com/>) [55] to estimate the structure / activity ratio (SAR) of α, β-amyrin analogs.

For the quantitative estimate of drug-likeness (QED), equation 2 was used, embedded in the web server.

$$QED = \exp\left(\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \ln d_i\right) \quad \text{eq. 2}$$

where *d_i* indicates the properties within the drug-likeness desirability spectrum and *n* = 8 is the quantity of drug-likeness properties related: MW, log*P*, HBA, HBD, TPSA, Nrotb, number of aromatic rings (N_{AR}) and number of reactive functional group alerts. Thus, a substance has great viability as a medicine as the QED values approach 1.0 [56].

The mathematical model of medicinal chemistry evolution in 2018 (MCE18) is embedded in the web server to predict the structural complexity of α, β-amyrin analogues according to the properties expressed in scores from 0 to 1, in equation 3

$$MCE18 = (AR + NAR + CHIRAL + SPIRO + \frac{sp3 + Cyc - Acyc}{1 + sp3}) \times Q^1 \quad \text{eq. 3}$$

where AR is the presence of aromatic rings, NAR is the presence of aliphatic or heteroaliphatic rings, CHIRAL is the chiral center, SPIRO is the presence of spiro structures, sp³ is the fraction of sp³ hybridization carbons, Cyc is the fraction of carbons of sp³ hybridization involved in cyclic chains, Acyc is the fraction of carbons with sp³ hybridization in acyclic chains and Q¹ is the adjusted quadratic regression [57].

The substance's contributions, as well as its relationship to the activity, were predicted by Brenk's screening mechanism, integrated to the SwissADME server (<http://www.swissadme.ch/>) [58]. While the characteristic collateral effects of terpenes were evaluated by the similarity test with compounds from the PASS Online server database (<http://way2drug.com/PassOnline/index.php>).

2.7.6 Acute rodent toxicity prediction by the QSAR models

Acute toxicity was predicted by the LD50 estimate (mg / kg) of the applicability domain of the GUSAR Acute Rat Toxicity tool (<http://www.way2drug.com/gusar/acutoxpredict.html>) [59]. The similarity mechanism based on the quantitative electrotopological neighborhood of atoms (QNA) descriptors of the web server was used to quantify the structure / activity relationship (QSAR) of substances α,β -amyrin for oral, subcutaneous (SC) routes of administration, intravenous (IV) and intraperitoneal (IP).

2.8 Statistical analysis

The data are expressed as geometric mean \pm standard deviation and were analyzed with two-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Bonferroni's post-test in the GraphPad Prism software version 7.00. Statistical significance was considered when $p < 0.05$.

3. Results

The α,β -amyrin mixture did not show clinically relevant direct antibacterial activity, with a MIC value ≥ 1024 mg / mL compared to all tested strains. In tests to assess the effect of α,β -amyrin in combination with the antibiotics ampicillin, ciprofloxacin and gentamicin against the strain of *S. aureus* 10, as shown in Figure 2, it was possible to observe that there was an antagonistic effect when associated with ampicillin. However, when the combination ampicillin and sulbactam, an β -lactam antimicrobial agent and a β -lactamase inhibitor [60], respectively,

there was a decrease in MIC (64 to 8 µg/mL), corroborating the existence of an enzyme mechanism involved, and when evaluated with chlorpromazine, an efflux pump inhibitor, there was no significance.

Bacteria usually have efflux pumps that can be sensitive to chlorpromazine (CPZ), and carbonylcyanide-3-chlorophenylhydrazone (CCCP), or both. We used these two standard inhibitors to better track bacterial sensitivity. CPZ and CCCP have different pump inhibition mechanisms. While CPZ is an inhibitor that acts by competition with the efflux protein site responsible for intracellular uptake of the microbial agent, CCCP acts by inhibiting the motive force that drives the efflux protein. Thus, using these two inhibitors, we can infer the mechanism responsible for inhibiting the efflux pump by which the tested substances act.

The result of the association of α,β -amyrin with gentamicin showed a reduction in MIC from 322 µg/mL to 203 µg/mL when compared to the control, showing that synergism occurred. Meanwhile, the result of the standard inhibitor chlorpromazine with gentamicin was not significant, which shows that there is no inhibition of the efflux pump [17].

As for the analysis of the association of α,β -amyrin with ciprofloxacin, the result was not significant, with no change in MIC when compared to the control. However, the result of the standard inhibitor chlorpromazine with ciprofloxacin showed a reduction in MIC from 128 to 80.63 µg/mL suggesting a possible mechanism of inhibition of the efflux pump [17].

In tests designed to evaluate the *in vitro* efficacy of triterpenoids and their synergistic effect with antibiotics against strains of *S. aureus*, the result obtained in general was that different combinations between triterpenoids and antibiotics showed 95% - 46% ($P < 0.05$) of reduction in antibiotic MICs compared to results when antibiotics were used alone [61]. Strengthening that triterpene compounds have antibacterial activity against multi-resistant strains of *Staphylococcus aureus* [62]. The association of antibiotics with α,β -amyrin was tested against the strain of *Escherichia coli* 06, represented in Figure 3, it was possible to observe that there was no reduction in the MICs. Therefore, the analysis of chlorpromazine with all the antibiotics evaluated also obtained a non-significant result. However, a reduction in the MIC was revealed when investigated with ampicillin+sulbactam demonstrating a reduction from 1024 to 64 µg/mL, showing a 16-fold reduction. According to the results of Figure 4, the inhibition potential of the MepA efflux pump by α,β -amyrin associated with ciprofloxacin and ethidium bromide against the multi-resistant strains *S. aureus* K2068, which overexpress the MepA gene is confirmed by the reduction in the MIC of chlorpromazine (322.54 to 203.19 µg/mL), and by the carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP). When the association with ethidium bromide (BrEt) was evaluated, the MIC reduction was from 322.54 µg/mL to

80.63 $\mu\text{g/mL}$. However, the compound α,β -amyrin did not interact with the efflux pump of the strain SA-K2068, suggesting that it is not an inhibitor of the efflux pump, besides, it did not cause the expulsion of BrEt to the extracellular medium of the bacterium, which corroborates the antagonism caused by the association of the compound α,β -amyrin with BrEt. The association with ciprofloxacin revealed an efflux pump sensitive to the chlorpromazine inhibitor, but not for CCCP, however, the association with the study compound had no significant result.

The best poses for dockings between MepA/ α -amyrin and MepA/ β -amyrin showed RMSD (Root Mean Square Deviation) values between 1.895 Å and 2.827 Å, respectively. The calculated affinity energy was -8.9, -8.2 and -7.8 kcal/mol for α -amyrin/MepA, β -amyrin/MepA and Ciprofloxacin/MepA respectively. Regarding the interactions of the formed ligand-protein complexes (figure 6), the α -amyrin/MepA complex presented hydrophobic interactions with the residues Thr 29A (3.88Å), Tyr 35A (3.67Å), Tyr 35A (3.88Å), Leu 59A (3.74Å), Phe 62A (3.84Å), Phe 62A (3.65Å), Phe 153A (3.67Å) and one strong Hydrogen bond with residue Tyr 138A (2.39Å). β -amyrin/MepA complex presented interactions hydrophobic with the residues Thr 29A (3.57Å), Tyr 35A (3.45Å), Leu 59A (3.27Å), Phe 153A (3.54Å), Phe 153A (3.44Å), Phe 280A (3.61 Å), Arg 281A (3.37 Å) and one Hydrogen bond strong with residue Tyr 29A (2.66 Å). Ciprofloxacin/MepA complex presented hydrophobic interaction with the residue Val 33A (3.83Å), π -Stacking with the residue Tyr 35A (4.83 Å), Salt Bridge with residue Arg 281A (3.57Å) and weak Hydrogen bond with residue Tyr 138A (3.06 Å) (Table 2) (Figure S1-supplementary material).

The inhibition capacity of the NorA efflux pump by α,β -amyrin associated with norfloxacin and ethidium bromide, against the multidrug-resistant strain SA 1199B, obtained the result shown in Figure 5. For the effect of the association of α,β -amyrin with the antibiotic norfloxacin did not present a significant result. However, when evaluating the effect of standard efflux pump inhibitors, chlorpromazine and CCCP, both obtained a decrease in MIC, demonstrating the presence of the efflux mechanism through synergism. The CCCP reduced from 322.54 $\mu\text{g/mL}$ to 256 $\mu\text{g/mL}$ in the test with norfloxacin and in BrEt with the change from 512 $\mu\text{g/mL}$ to 322 $\mu\text{g/mL}$. Chlorpromazine, on the other hand, decreased from 322.54 $\mu\text{g/mL}$ to 203 $\mu\text{g/mL}$ in the test with norfloxacin and with EtBr, it decreased from 512 $\mu\text{g/mL}$ to 256 $\mu\text{g/mL}$. As for the results of the association of the compound α,β -amyrin and BrEt it was possible to observe that there was a reduction of 21%, going from 512 $\mu\text{g/mL}$ to 406 $\mu\text{g/mL}$, proving that the compound α,β -amyrin was active on the effluent pump of strain 1199B when associated with BrEt, exemplified by the reduction in MIC. Therefore, α,β -amyrin acts by

inhibiting the 1199B efflux pump, making this compound a potential candidate for an efflux pump inhibitor.

Regarding the interactions, the α -amyrin/NorA complex showed only hydrophobic interactions, being an interaction with the Leu 224A (3.72 Å), two interactions with the Pro 27A residue with distances of 3.48 Å and 3.70 Å and with the Leu 227A, with 3.49 Å and 3.79 Å, three interactions with the Leu 40A, with distances ranging from 3.59 to 3.83 Å. Regarding the β -amyrin /NorA complex, it was possible to observe the formation of three hydrophobic interactions (Ile 23A (3.55 Å), Leu 40A (3.96Å), Phe 140A (3.76 Å)) and a moderate hydrogen bond with Ser 226A (3.16 Å)). The reference antibiotic Norfloxacin showed three hydrophobic interactions (Glu 222A (3.72Å), Glu 222A (3.74Å), Tyr 225A (3.55Å), two H-Bonds (Phe 140A (2.87 Å)), Leu 218A (2.87 Å), π -Stacking Phe 306A, 5.01 Å) and a Salt Bridges with the Val 302A residue with a distance of 3.58 Å (Table 3). The calculated affinity energy for the complexes, was -8.2 and -8.3 kcal/mol for the α - and β -amyrin/NorA complexes, and -7.8 kcal/mol for Norfloxacin/NorA complex. The complexes presented RMSD values in the order of 2.417, 2.257 and 2.184 Å for α - and β -amyrin / NorA complexes, Norfloxacin/NorA respectively (Figure 7) (Figure S2-supplementary material).

3.1 SAR properties and medicinal chemistry

In Figure 8 (A) it is possible to observe the lipophilicity and polarity map of the α , β -amyrin analogues, where the TPSA value in the order of 20.23 Å² is associated with the hydroxyl group of the substances, as the only heteroatom donor of hydrogen bonding (HBD), while the logP value between 7.6-7.7 suggests that the surface of the two molecules are predominantly lipophilic. Thus, the values of $\log P > 3$ and $\text{TPSA} < 75 \text{ Å}^2$ indicate that the substances can be toxic by administration, according to the conditions imposed by the criteria of Pfizer [63]. In addition, the golden triangle graph in Figure 8 (B) shows that, under physiological conditions (pH 7.4), lipophilicity evaluated by the distribution coefficient ($\log D$) between 5.8 - 6.0 and molecular weight (MW) in the order of 426.39 g / mol suggest that α , β -amyrin analogs have low permeability, which limits their absorption, efflux and metabolic clearance attributes [64].

The physicochemical properties commonly used in drug discovery were applied to the quantitative estimate of drug-likeness (QED), as shown in equation 2, where the approximate value of 0.38 of the α analogs, β -amyrin suggests that the substances have limitations of drug stability, being slightly below the ideal medicinal aesthetics for a highly effective bioactive.

Such limitation is due to the high lipophilicity of the substances, which, combined with the low polarity indexes, result in a low desirability of the pharmacokinetic attributes of solubility and permeability (Table 4) [65].

In addition, the structural parameters of unsaturation were applied to the model of medicinal chemistry evolution, 2018 (MCE18), as shown in equation 3, where the ratio between the number of rings (in the order of 5) and the fraction of sp³ hybridization carbons (Fsp³) in the order of 0.93, together with the contributions of the stereocenters (SC) in the order of 8 and 10 (α - and β -amyrin, respectively), resulted in an MCE18 > 78, which suggests that a visual inspection may evaluate substances for their viability as a medicine (Table 4).

It is also worth noting that the hydrogen bond donor hydroxyl group suggests the existence of charged microspecies at physiological pH, constituting a region of Strong hydrogen interaction. Furthermore, the isolated alkene, screened by the Brenk library, indicates a chemically reactive molecular fragment that results in the decline of the pharmacokinetic attributes of the two substances [66].

3.2 Acute rat toxicity (LD50) by the QSAR domains

In the graph in Figure 9, it is possible to observe the lethal dose values (LD50) of the substances α , β -amyrin, predicted through the self-consistent regression of the QSAR models of the quantitative electrotopological neighborhood descriptors of atoms (QNA). The similarity tests found that the LD50 values < 2000 mg/kg associated with the molecules, indicate that they can result in toxicity if swallowed, in case of administration by oral route (class 4) (Table 5) [67]. It is worth noting that the difference in the position of the substituted methyl group between carbons 19 and 20 guarantees greater control of the oral dose of the substance β -amyrin, while the best form of administration foreseen for α -amyrin is injection intraperitoneal, according to the models of the domain of applicability of the server (Figure 9).

4. Discussion

This compound is formed by a mixture of two terpene components, these are characterized by different carbon skeletons and classified according to the number of isoprene units (C₅H₈), in the present study the analyzed class is triterpene (six isoprenoid units). The test substance α,β -amyrin is a representative of the chemical class pentacyclic triterpene, formed by a mixture of two components of the same class, α -amyrin (3 α -hydroxyurs-12-ene)

and β -amyrin (3 β -hydroxiolean-12-ene) [68], represented in Figure 1. Previous studies showed that terpenes present antimicrobial activity and that the association of some terpenes with antibiotics result in the potentiation of antibiotic activity, reversing the antibiotic resistance observed experimentally [30].

Gentamicin is an antibiotic of the broad-spectrum aminoglycoside class. Its mechanism of action involves the inhibition of protein synthesis, with high affinity to the 30S ribosome [69]. In addition to its interaction with bacterial ribosomes, gentamicin has also been shown to have membrane destabilizing properties [69]. It is likely that the synergism expressed by the association of α , β -amyrin, and the antibiotic gentamicin facilitated the entry of the antibiotic into the cell membrane or acting on a target that potentiates the action of this aminoglycoside.

According to CLSI (2019), if there is a decrease in MIC in 3 times or more, it proves the production of β -lactamase [33], thus the studied *E. coli* strain has the ability to produce β -lactamase. In short, in this work the compound, α , β -amyrin, had a greater efficacy against Gram-positive strains, considering the results with *S. aureus*.

The 1199B strain expresses the NorA efflux pump in a basal form, it is part of the MFS (Major Facilitator Superfamily) family of efflux pump. Being able to translocate hydrophilic fluoroquinolones, such as norfloxacin, and dyes with ethidium bromide [70,71]. Since the ethidium bromide's mechanism of action consists of binding with bacterial DNA [72], this compound needs to enter the cell and remain long enough to cause cellular damage, therefore substances capable of preventing the bacteria from pumping the bromide into the extracellular media are considered to be efflux pump inhibitors.

The lipophilicity of some terpene compounds enables affinity with biological membranes, where the accumulation of terpene compounds can substantially interact in the structural and functional properties of these membranes [73]. Other studies indicate that compounds of the sesquiterpenes class can interrupt the biological function of the bacterial cell membrane, admitting the permeability in the cell of exogenous solutes, such as ethidium bromide and some antibiotics, this effect is more pronounced for grampositive bacteria, probably due to the absence of additional permeability barriers, particularly Gram-negative bacteria [74]. The results obtained in the present study of the tests with the multiresistant bacteria strains SA 10 and EC 06 associated with the antibiotic ciprofloxacin, are in agreement with the results exposed with the strain SA K2068, showing that the α , β -amyrin for both models, gram-positive and gram-negative, it was inert, having no antagonistic or synergistic effect when associated with the antibiotic.

The main mechanism of resistance to the ciprofloxacin antibiotic is the efflux pump, for protecting bacterial DNA by extruding the antibiotic that acts on DNA gyrase, inhibiting DNA synthesis [75]. The MepA efflux protein is encoded by a gene of the same name MepA, it is part of the transporters of the MATE family-Multidrug and Toxic Compound Extrusion. The substrates of this protein are quinolones and fluoroquinolones, such as ciprofloxacin, norfloxacin and dyes such as Ethidium bromide, among others [76,77]. The inactivation of the MepA efflux pump in multiresistant *S. aureus* resulted in decreases in the MICs of various antimicrobial agents [78].

Diterpene like ferruginol extracted from the species *Chamaecyparis lawsoniana*, known as “white cedar”, demonstrated modulatory efflux activity in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, another result found was a reduction of up to 40% in the efflux of ethidium bromide by a *Staphylococcus* strain multi-resistant aureus housing the NorA efflux pump [79]. Furthermore, investigating the activity of ethidium bromide efflux pump inhibition by triterpenes isolated from *Mesua ferrea* against *Staphylococcus aureus* 1199B strains that overexpressed NorA, revealed a modulation of the EtBr MIC by ≥ 2 times, confirmed significant inhibition of triterpenes as inhibitors of the NorA efflux pump [80]. The complexes formed had very close affinity energy, however they had a slightly different interaction profile where α -amyrin showed eight hydrophobic interactions, predominantly related by the presence of methyl groups, while β -amyrin showed only three hydrophobic interactions (also mostly related to the presence of methyl groups) and a moderate H-bond interaction. It is worth mentioning the hydrophobic interaction of the methyl group of β -amyrin with PHE140A, as this residue belongs to the binding site in Norfloxacin. Observing the region of coupling of the triterpenes, close to the Norfloxacin site (Figure 7), the favorable values of affinity energy and the interactions, one can affirm the viability in the formation of these α , β -amyrin complexes, these being NorA modulators.

In preliminary studies carried out with the compounds isolated from the mixture in question, α -amyrin showed antibacterial activity against methicillin-resistant and methicillin-sensitive strains of *S. aureus*, both with MIC of 64 $\mu\text{g/mL}$ [26]. A mixture of pentacyclic triterpenes, α -amyrin, β -amyrin and ursolic acid, isolated from *Diopsyros melanoxylon* exhibited antimicrobial activity against Gram-negative and Gram-positive bacteria, including *E. coli* and *S. aureus* (MICs of 90 $\mu\text{g/mL}$) [81], in addition, α -amyrin obtained from *Trichoderma amplexicaule* showed activity in both bacteria [82]. However, the β -amyrin compound isolated from the *Acacia polyacantha* leaf, showed MICs between 128 $\mu\text{g/mL} \leq \text{MIC}$

$\leq 512 \mu\text{g/mL}$, this result indicates that the compound has the ability to inhibit the growth of bacterial strains of *Staphylococcus* multiresistant [83].

Molecular docking studies indicate that in the formation of complexes with MepA, α,β -amyrin have a higher affinity energy than ciprofloxacin. We observed interactions with a hydrophobic patch of the protein composed of residues Thr 29A, Tyr 35A, Leu 59A, Phe 62A, Phe 153A, Phe 280A, Arg 281A. It should be noted that the Tyr 35A residue that also interacts with Ciprofloxacin through π - Stacking. Another key residue is Arg 281A that interacts through a Salt Bridge with ciprofloxacin and hydrophobically with triterpenes and Tyr 138A displays a strong hydrogen with ciprofloxacin (3.06 Å). On the other hand, it also interacts with α -amyrin through a strong interaction involving the hydroxyl group, of the order of only 2.36 Å distance. Comparing the triterpenes with Ciprofloxacin, analyzing not only the value of the affinity energy, but also the number of interactions, type and distance, we can infer that they have a high affinity for MepA, binding to the same region as Ciprofloxacin (Figure 6).

In the literature, it is possible to observe studies of antibacterial activity where the *in silico* prediction methods, together with studies of the interaction of compounds with various microbial efflux pump enzymes, present a good correlation with *in vitro* parameters evaluated [84-86]. In this study, *in silico* techniques showed the optimized viability of druggability of amyirin analogues on reported antibacterial activity [87-89].

In order to optimize the availability of new drugs, it is more advantageous to evaluate the pharmacological activity and the solubility and permeability attributes during the drug discovery process. In this way, a qualitative approach was developed by medicinal chemists to determine the relationship between structure and activity/property (SAR / SPA) [90,91]. Knowing that a good pharmacological active ingredient is strongly attributed to the structural properties of a compound, drug planning techniques based on physicochemical properties have been improved over the years, such as the quantitative drug-likeness estimation method (QED) and the mathematical model of medicinal chemistry evolution, 2018 (MCE18) which use a comprehensive number of physicalchemical parameters based on criteria used over the years, establishing a very efficient quantitative estimate [92]. With the mathematical models of structure/activity ratio (SAR) it was possible to establish a quantitative estimate of the viability of the α,β -amyrin analogs as a therapeutic agent in its best route of administration. Substitutions of methyl groups between carbons 19 and 20, as well as the calculated physicochemical properties, guarantee the application of the substance β -amyrin as an oral drug with low toxicological risk, while α -amyrin is more viable as a substance of intraperitoneal injection.

Acute toxicity values of IC₅₀ or LD₅₀ for certain terpenes vary with time and dose administered, which may result in a cytotoxic effect caused by ruptures of cell membranes [93,94]. This activity is verified in the similarity test with the compounds from the in vivo dataset of the PASS Online tool, where the activity potentials (*Pa*) Membrane integrity antagonist in the order of 0.91 and 0.84, α - and β -amyrin respectively, indicate their capabilities to damage membranes.

Conclusion

It was concluded that the pentacyclic triterpenoids α , β -amyrin has the potential to increase antibacterial activity with the association of antibiotics, together with the ability to be a strong candidate for an efflux pump inhibitor. This effect may constitute a valuable group of therapeutic agents in the future. Therefore, the use of current antibiotics could be maintained in combination with terpene antibacterial agents as a therapeutic option in the treatment of *S. aureus* infections.

Declarations section

Ethics approval and consent to participate

This research does not involve the use of human or animal material.

Consent for publication

Not applicable.

Availability of supporting data

All the theoretical data from this work were obtained using the Molecular Docking methodology. All the data generated and discussed during this work are included in this published article and in the supplementary information file.

Competing interests

All the authors declare that they have no competing interests.

Funding

This study was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES (Finance code 001 for R.C. Oliveira), by the Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico - FUNCAP. (Grants#: N° BP2-0107 00026.01.00/15 for H.S. Santos, and N° BP4-00172-00065.01.01/20 for C.E.S. Nogueira), and by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (Grants#: N° 305719/2018-1 for A.M.R. Teixeira, N° 426995/2018-0).

Credit Author Statement

Raíssa C. Oliveira: Investigation; Formal analysis; Writing - review and editing. **Paulo Nogueira Bandeira:** Co-supervision; Conceptualization. **Telma Leda G. Lemos:** Project administration; Conceptualization. **Hélcio Silva dos Santos:** Project administration; Formal analysis; Writing - review and editing. **Jackelyne R. Scherf:** Methodology; Data curation. **Janaína E. Rocha:** Methodology; Data curation. **Raimundo L.S. Pereira:** Methodology; Data curation. **Thiago S. Freitas:** Methodology; Data curation. **Priscila R. Freitas:** Methodology; Data curation. **Francisco N. Pereira- Junior:** Methodology; Data curation. **Márcia M. Marinho:** Software; Validation. **Emanuelle M. Marinho:** Formal analysis; Writing - review and editing. **Emmanuel S. Marinho:** Software; Formal analysis; Writing - review and editing. **Carlos E.S. Nogueira:** Formal analysis; Writing - review and editing. **Henrique D.M. Coutinho:** Project administration; Resources; Funding. **Alexandre M.R. Teixeira:** Supervision; Formal analysis, Writing - review and editing. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Acknowledgements

The authors thanks to the Centro Nacional de Processamento de Alto Desempenho (CENAPAD-UFC) of the UFC for the computational resources.

References

1. Watkins RR, Bonomo RA (2016) Overview: Global and Local Impact of Antibiotic Resistance. *Infectious Disease Clinics of North America* 30(2):313-322. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2016.02.001>

2. World Health Organization. The burden of health care-associated infection worldwide. *Infect Prev Control* (2011).
3. O'Neill J (2016) Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations. Review on Antimicrobial Resistance.
4. Reddy PN, Srirama K, Dirisala VR (2017) An Update on Clinical Burden, Diagnostic Tools, and Therapeutic Options of *Staphylococcus aureus*. *Infectious Diseases: Research and Treatment* 10:1179916117703999. <https://doi.org/10.1177/1179916117703999>
5. Akanbi OE, Njom HA, Fri J, Otigbu AC, Clarke AM (2017) Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Isolated from Recreational Waters and Beach Sand in Eastern Cape Province of South Africa. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 14(9). <https://doi.org/10.3390/ijerph14091001>
6. Schindler BD, Jacinto P, Kaatz GW (2013) Inhibition of drug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*: current status of potentiating existing antibiotics. *Future Microbiology* 8(4):491-507. <https://doi.org/10.2217/fmb.13.16>
7. Lakhundi S, Zhang K (2018) Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. *Clinical Microbiology Reviews* 31(4):e00020-00018. <https://doi.org/10.1128/CMR.00020-18>
8. Kern WV, Rieg S (2020) Burden of bacterial bloodstream infection—a brief update on epidemiology and significance of multidrug-resistant pathogens. *Clinical Microbiology and Infection* 26(2):151-157. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.10.031>
9. Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB (2013) Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews* 26(4):822. <https://doi.org/10.1128/CMR.00022-13>
10. Tamadonfar KO, Omattage NS, Spaulding CN, Hultgren SJ (2019) Reaching the End of the Line: Urinary Tract Infections. In: *Bacteria and Intracellularly*. American Society of Microbiology.
11. Denamur E, Clermont O, Bonacorsi S, Gordon D (2021) The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology* 19(1):37-54. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0416-x>
12. Vipin Madhavan TP, Sakellaris H (2015) Chapter Five - Colonization Factors of Enterotoxigenic *Escherichia coli*. In: Sariaslani S, Gadd GM (eds) *Advances in Applied Microbiology*, vol 90. Academic Press, pp 155-197.
13. Varela MF, Stephen J, Lekshmi M, Ojha M, Wenzel N, Sanford LM, Hernandez AJ, Parvathi A, Kumar SH (2021) Bacterial Resistance to Antimicrobial Agents. *Antibiotics* 10(5):593. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10050593>
14. Shriram V, Khare T, Bhagwat R, Shukla R, Kumar V (2018) Inhibiting Bacterial Drug Efflux Pumps via Phyto-Therapeutics to Combat Threatening Antimicrobial Resistance. *Frontiers in Microbiology* 9(2990). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02990>

15. Pasqua M, Grossi M, Zennaro A, Fanelli G, Micheli G, Barras F, Colonna B, Prosseda G (2019) The Varied Role of Efflux Pumps of the MFS Family in the Interplay of Bacteria with Animal and Plant Cells. *Microorganisms* 7(9):285. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7090285>
16. Dwivedi GR, Tyagi R, Sanchita, Tripathi S, Pati S, Srivastava SK, Darokar MP, Sharma A (2018) Antibiotics potentiating potential of catharanthine against superbug *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 36(16):4270-4284. <https://doi.org/10.1080/07391102.2017.1413424>
17. Almeida RS, Freitas PR, Araújo ACJ, Alencar Menezes IR, Santos EL, Tintino SR, Moura TF, Filho JR, Ferreira VA, Silva ACA, Silva LE, do Amaral W, Deschamps C, Iriti M, Melo Coutinho HD (2020) GC-MS Profile and Enhancement of Antibiotic Activity by the Essential Oil of *Ocotea odorífera* and Safrole: Inhibition of *Staphylococcus aureus* Efflux Pumps. *Antibiotics* 9(5):247 <https://doi.org/10.3390/antibiotics9050247>
18. Rao M, S. P, Dipin KM, Kumar S, Nayak BB, Varela MF (2018) Antimicrobial Compounds of Plant Origin as Efflux Pump Inhibitors: New Avenues for Controlling Multidrug Resistant Pathogens. *Journal of Antimicrobial Agents* 04(01). <https://doi.org/10.4172/2472-1212.1000159>
19. Schindler BD, Kaatz GW (2016) Multidrug efflux pumps of Gram-positive bacteria. *Drug Resistance Updates* 27:1-13. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2016.04.003>
20. López Y, Tato M, Gargallo-Viola D, Cantón R, Vila J, Zsolt I (2020) Comparative activity of ozenoxacin and other quinolones in *Staphylococcus aureus* strains overexpressing the efflux pump-encoding genes *mepA* and *norA*. *International Journal of Antimicrobial Agents* 56(3):106082. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.106082>
21. Astolfi A, Felicetti T, Iraci N, Manfroni G, Massari S, Pietrella D, Tabarrini O, Kaatz GW, Barreca ML, Sabatini S, Cecchetti V (2017) Pharmacophore-Based Repositioning of Approved Drugs as Novel *Staphylococcus aureus* NorA Efflux Pump Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* 60(4):1598-1604. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01439>
22. dos Santos Barbosa CR, Scherf JR, de Freitas TS, de Menezes IRA, Pereira RLS, dos Santos JFS, de Jesus SSP, Lopes TP, de Sousa Silveira Z, de Moraes Oliveira-Tintino CD, Júnior JPS, Coutinho HDM, Tintino SR, da Cunha FAB (2021) Effect of Carvacrol and Thymol on NorA efflux pump inhibition in multidrug-resistant (MDR) *Staphylococcus aureus* strains. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. <https://doi.org/10.1007/s10863-021-09906-3>
23. Chung PY, Navaratnam P, Chung LY (2011) Synergistic antimicrobial activity between pentacyclic triterpenoids and antibiotics against *Staphylococcus aureus* strains. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 10(1):25. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-10-25>
24. Stavri M, Piddock LJV, Gibbons S (2007) Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 59(6):1247-1260. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl460>

25. Ayaz M, Ullah F, Sadiq A, Ullah F, Ovais M, Ahmed J, Devkota HP (2019) Synergistic interactions of phytochemicals with antimicrobial agents: Potential strategy to counteract drug resistance. *Chemico-Biological Interactions* 308:294-303. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.05.050>
26. de Sousa Andrade LM, de Oliveira ABM, Leal ALAB, de Alcântara Oliveira FA, Portela AL, de Sousa Lima Neto J, de Siqueira-Júnior JP, Kaatz GW, da Rocha CQ, Barreto HM (2020) Antimicrobial activity and inhibition of the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus* by extract and isolated compounds from *Arrabidaea brachypoda*. *Microbial Pathogenesis* 140:103935. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103935>
27. Rüdiger AL, Veiga-Junior VF (2013) Chemodiversity of Ursane- and Oleanane-Type Triterpenes in Amazonian Burseraceae Oleoresins. *Chemistry & Biodiversity* 10(6):1142-1153. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201200315>
28. Nogueira AO, Oliveira YIS, Adjafre BL, de Moraes MEA, Aragão GF (2019) Pharmacological effects of the isomeric mixture of alpha and beta amyrin from *Protium heptaphyllum*: a literature review. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 33(1):4-12. <https://doi.org/10.1111/fcp.12402>
29. Mahizan NA, Yang S-K, Moo C-L, Song AA-L, Chong C-M, Chong C-W, Abushelaibi A, Lim S-HE, Lai K-S (2019) Terpene Derivatives as a Potential Agent against Antimicrobial Resistance (AMR) Pathogens. *Molecules* 24(14):2631. <https://doi.org/10.3390/molecules24142631>
30. Paduch R, Kandefer-Szerszeń M, Trytek M, Fiedurek J (2007) Terpenes: substances useful in human healthcare. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 55(5):315. <https://doi.org/10.1007/s00005-007-0039-1>
31. Bandeira PN, Lemos TLG, Costa SMO, Santos HSD (2007) Obtenção de derivados da mistura triterpenoídica alfa- e beta-amirina. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 17(2):204-208. <https://doi.org/10.1590/s0102-695x2007000200012>
32. Lima VN, Oliveira-Tintino CDM, Santos ES, Moraes LP, Tintino SR, Freitas TS, Geraldo YS, Pereira RLS, Cruz RP, Menezes IRA, Coutinho HDM (2016) Antimicrobial and enhancement of the antibiotic activity by phenolic compounds: Gallic acid, caffeic acid and pyrogallol. *Microbial Pathogenesis* 99:56-61. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.08.004>
33. CLSI. CLSI M100-ED29 : Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing (2019). 29th Edition edn.
34. Coutinho HDM, Costa JGM, Lima EO, Falcão-Silva VS, Siqueira-Júnior JP (2008) Enhancement of the Antibiotic Activity against a Multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and Chlorpromazine. *Chemotherapy* 54(4):328-330. <https://doi.org/10.1159/000151267>
35. Tintino SR (2018) Avaliação da inibição de bombas de efluxos em linhagens de *Staphylococcus aureus* por substâncias sintéticas de origem natural. Universidade Federal de

Pernambuco - Tese de Doutorado - Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO.

36. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE (2004) UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry* 25(13):1605-1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>
37. Huey R, Morris GM, Forli S (2012) Using autodock 4 and autodock vina with autodocktools : a tutorial 2012.
38. Trott O, Olson AJ (2010) AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry* 31(2):455-461. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>
39. Hanwell MD, Curtis DE, Lonie DC, Vandermeersch T, Zurek E, Hutchison GR (2012) Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *Journal of Cheminformatics* 4(1):17. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17>
40. Biovia DS (2017) Discovery Studio Visualizer. Dassault Systemes, BIOVIA Corp., San Diego, CA, USA.
41. Csizmadia P (1999) MarvinSketch and MarvinView: Molecule Applets for the World Wide Web. <https://doi.org/10.3390/ecsoc-3-01775>
42. Halgren TA (1996) Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. *Journal of Computational Chemistry* 17(5-6):490-519. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(199604\)17:5/6<490::AID-JCC1>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(199604)17:5/6<490::AID-JCC1>3.0.CO;2-P)
43. Meza JC (2010) Steepest descent. *WIREs Computational Statistics* 2(6):719-722. <https://doi.org/10.1002/wics.117>
44. da Silva WMB, de Oliveira Pinheiro S, Alves DR, de Menezes JESA, Magalhães FEA, Silva FCO, Silva J, Marinho ES, de Moraes SM (2020) Synthesis of Quercetin-Metal Complexes, In Vitro and In Silico Anticholinesterase and Antioxidant Evaluation, and In Vivo Toxicological and Anxiolytic Activities. *Neurotoxicity Research* 37(4):893-903. <https://doi.org/10.1007/s12640-019-00142-7>
45. Siqueira MMR, Freire PdTC, Cruz BG, de Freitas TS, Bandeira PN, Silva dos Santos H, Nogueira CES, Teixeira AMR, Pereira RLS, Xavier JdC, Campina FF, dos Santos Barbosa CR, Neto JBdA, da Silva MMC, Siqueira-Júnior JP, Douglas Melo Coutinho H (2021) Aminophenyl chalcones potentiating antibiotic activity and inhibiting bacterial efflux pump. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 158:105695. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105695>
46. Bateman A (2019) UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Research*, vol 47. The UniProt, Consortium.
47. Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, Studer G, Tauriello G, Gumienny R, Heer FT, de Beer TA P, Rempfer C, Bordoli L, Lepore R, Schwede T (2018) SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research* 46(W1):W296-W303. <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>

48. Remmert M, Biegert A, Hauser A, Söding J (2012) HHblits: lightning-fast iterative protein sequence searching by HMM-HMM alignment. *Nature Methods* 9(2):173-175. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1818>
49. Radchenko M, Symersky J, Nie R, Lu M (2015) Structural basis for the blockade of MATE multidrug efflux pumps. *Nature Communications* 6(1):7995. <https://doi.org/10.1038/ncomms8995>
50. Jiang D, Zhao Y, Wang X, Fan J, Heng J, Liu X, Feng W, Kang X, Huang B, Liu J, Zhang XC (2013) Structure of the YajR transporter suggests a transport mechanism based on the conserved motif A. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(36):14664. <https://doi.org/10.1073/pnas.1308127110>
51. Trott O, Olson AJ (2010) Software News and Update AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading. *Journal of Computational Chemistry* 31(2):455-461. <http://dx.doi.org/10.1002/jcc.21334>
52. Marinho EM, Batista de Andrade Neto J, Silva J, Rocha da Silva C, Cavalcanti BC, Marinho ES, Nobre Júnior HV (2020) Virtual screening based on molecular docking of possible inhibitors of Covid-19 main protease. *Microbial Pathogenesis* 148:104365. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104365>
53. Yusuf D, Davis AM, Kleywegt GJ, Schmitt S (2008) An Alternative Method for the Evaluation of Docking Performance: RSR vs RMSD. *Journal of Chemical Information and Modeling* 48(7):1411-1422. <https://doi.org/10.1021/ci800084x>
54. Shityakov S, Foerster C (2014) In silico predictive model to determine vector-mediated transport properties for the blood–brain barrier choline transporter. *Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry*:23. <https://doi.org/10.2147/aabc.s63749>
55. Xiong G, Wu Z, Yi J, Fu L, Yang Z, Hsieh C, Yin M, Zeng X, Wu C, Lu A, Chen X, Hou T, Cao D (2021) ADMETlab 2.0: an integrated online platform for accurate and comprehensive predictions of ADMET properties. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab255>
56. Bickerton GR, Paolini GV, Besnard J, Muresan S, Hopkins AL (2012) Quantifying the chemical beauty of drugs. *Nature Chemistry* 4(2):90-98. <https://doi.org/10.1038/nchem.1243>
57. Ivanenkov YA, Zagribelnyy BA, Aladinskiy VA (2019) Are We Opening the Door to a New Era of Medicinal Chemistry or Being Collapsed to a Chemical Singularity? *Journal of Medicinal Chemistry* 62(22):10026-10043. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b00004>
58. Brenk R, Schipani A, James D, Krasowski A, Gilbert IH, Frearson J, Wyatt PG (2008) Lessons Learnt from Assembling Screening Libraries for Drug Discovery for Neglected Diseases. *ChemMedChem* 3(3):435-444. <https://doi.org/10.1002/cmdc.200700139>

59. Lagunin AA, Zakharov AV, Filimonov DA, Poroikov VV (2007) A new approach to QSAR modelling of acute toxicity. SAR and QSAR in Environmental Research 18(3-4):285-298. <https://doi.org/10.1080/10629360701304253>
60. Onita T, Ikawa K, Nakamura K, Nishikawa G, Kobayashi I, Ishihara N, Tamaki H, Yano T, Naora K, Morikawa N (2021) Prostatic Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Evaluation of Ampicillin-Sulbactam for Bacterial Prostatitis and Preoperative Prophylaxis. The Journal of Clinical Pharmacology 61(6):820-831. <https://doi.org/10.1002/jcph.1800>
61. Hamza M., Nadir M., Mehmood N, Farooq, A. (2016). In vitro effectiveness of triterpenoids and their synergistic effect with antibiotics against Staphylococcus aureus strains. Indian journal of pharmacology, 48(6), 710–714. <https://doi.org/10.4103/0253-7613.194851>
62. Wu P, Tu B, Liang J, Guo S, Cao N, Chen S, Luo Z, Li J, Zheng W, Tang X, Li D, Xu X, Liu W, Zheng X, Sheng Z, Roberts AP, Zhang K, Hong WD (2021) Synthesis and biological evaluation of pentacyclic triterpenoid derivatives as potential novel antibacterial agents. Bioorganic Chemistry 109:104692. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.104692>
63. Hughes JD, Blagg J, Price DA, Bailey S, DeCrescenzo GA, Devraj RV, Ellsworth E, Fobian YM, Gibbs ME, Gilles RW, Greene N, Huang E, Krieger-Burke T, Loesel J, Wager T, Whiteley L, Zhang Y (2008) Physiochemical drug properties associated with in vivo toxicological outcomes. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 18(17):4872-4875. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.07.071>
64. Johnson TW, Dress KR, Edwards M (2009) Using the Golden Triangle to optimize clearance and oral absorption. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 19(19):5560-5564. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.08.045>
65. Wager TT, Hou X, Verhoest PR, Villalobos A (2010) Moving beyond Rules: The Development of a Central Nervous System Multiparameter Optimization (CNS MPO) Approach To Enable Alignment of Druglike Properties. ACS Chemical Neuroscience 1(6):435-449. <https://doi.org/10.1021/cn100008c>
66. Pires DEV, Kaminskas LM, Ascher DB (2018) Prediction and Optimization of Pharmacokinetic and Toxicity Properties of the Ligand. In: Gore M, Jagtap UB (eds) Computational Drug Discovery and Design. Springer New York, New York, NY, pp 271-284.
67. Lagunin A, Zakharov A, Filimonov D, Poroikov V (2011) QSAR Modelling of Rat Acute Toxicity on the Basis of PASS Prediction. Molecular Informatics 30(2-3):241-250. <https://doi.org/10.1002/minf.201000151>
68. Mahato SB, Kundu AP (1994) ¹³C NMR Spectra of pentacyclic triterpenoids—a compilation and some salient features. Phytochemistry 37(6):1517-1575. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)89569-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)89569-2)
69. Kadurugamuwa JL, Clarke AJ, Beveridge TJ (1993) Surface action of gentamicin on Pseudomonas aeruginosa. Journal of Bacteriology 175(18):5798. <https://doi.org/10.1128/jb.175.18.5798-5805.1993>

70. Yoshida H, Bogaki M, Nakamura S, Ubukata K, Konno M (1990) Nucleotide sequence and characterization of the *Staphylococcus aureus* *norA* gene, which confers resistance to quinolones. *Journal of Bacteriology* 172(12):6942. <https://doi.org/10.1128/jb.172.12.6942-6949.1990>
71. Neyfakh AA, Borsch CM, Kaatz GW (1993) Fluoroquinolone resistance protein NorA of *Staphylococcus aureus* is a multidrug efflux transporter. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 37(1):128. <https://doi.org/10.1128/AAC.37.1.128>
72. Banerjee A, Majumder P, Sanyal S, Singh J, Jana K, Das C, Dasgupta D (2014) The DNA intercalators ethidium bromide and propidium iodide also bind to core histones. *FEBS Open Bio* 4(1):251-259. <https://doi.org/10.1016/j.fob.2014.02.006>
73. Sikkema J, de Bont JA, Poolman B (1995) Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Reviews* 59(2):201
74. Vaara M (1992) Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiological Reviews* 56(3):395
75. Cardoso AR, Carneiro LPT, Cabral-Miranda G, Bachmann MF, Sales MGF (2021) Employing bacteria machinery for antibiotic detection: Using DNA gyrase for ciprofloxacin detection. *Chemical Engineering Journal* 409:128135. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.128135>
76. Kuroda T, Tsuchiya T (2009) Multidrug efflux transporters in the MATE family. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1794(5):763-768. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.11.012>
77. Kaatz GW, McAleese F, Seo SM (2005) Multidrug Resistance in *Staphylococcus aureus* Due to Overexpression of a Novel Multidrug and Toxin Extrusion (MATE) Transport Protein. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49(5):1857. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.5.1857-1864.2005>
78. McAleese F, Petersen P, Ruzin A, Dunman PM, Murphy E, Projan SJ, Bradford PA (2005) A Novel MATE Family Efflux Pump Contributes to the Reduced Susceptibility of Laboratory-Derived *Staphylococcus aureus* Mutants to Tigecycline. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49(5):1865. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.5.1865-1871.2005>
79. Smith ECJ, Williamson EM, Wareham N, Kaatz GW, Gibbons S (2007) Antibacterials and modulators of bacterial resistance from the immature cones of *Chamaecyparis lawsoniana*. *Phytochemistry* 68(2):210-217. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.10.001>
80. Roy SK, Kumari N, Pahwa S, Agrahari UC, Bhutani KK, Jachak SM, Nandanwar H (2013) NorA efflux pump inhibitory activity of coumarins from *Mesua ferrea*. *Fitoterapia* 90:140-150. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2013.07.015>
81. Mallavadhani UV, Mahapatra A, Jamil K, Reddy PS (2004) Antimicrobial Activity of Some Pentacyclic Triterpenes and Their Synthesized 3-O-Lipophilic Chains. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 27(10):1576-1579. <https://doi.org/10.1248/bpb.27.1576>

82. Singh B, Singh S (2003) Antimicrobial activity of terpenoids from *Trichodesma amplexicaule* Roth. *Phytotherapy Research* 17(7):814-816. <https://doi.org/10.1002/ptr.1202>
83. Ashu FA, Na-Iya J, Wamba BEN, Kamga J, Nayim P, Ngameni B, Beng VP, Ngadjui BT, Kuete V (2020) Antistaphylococcal Activity of Extracts, Fractions, and Compounds of *Acacia polyacantha* Wild (Fabaceae). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2020:2654247. <https://doi.org/10.1155/2020/2654247>
84. Jhanji R, Bhati V, Singh A, Kumar A (2020) Phytomolecules against bacterial biofilm and efflux pump: an in silico and in vitro study. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 38(18):5500-5512. <https://doi.org/10.1080/07391102.2019.1704884>
85. Nidhi S, Arti S, Ruchika S, Anoop K (2020) Repurposing of Auranofin Against Bacterial Infections: An In-silico and In-vitro Study. *Current Computer-Aided Drug Design* 16:1-15. <http://dx.doi.org/10.2174/1386207323666200717155640>
86. Ritika R, Ruchika S, Anoop K (2019) Repurposing of Fluvastatin Against *Candida albicans* CYP450 Lanosterol 14 α -demethylase, a Target Enzyme for Antifungal Therapy: An In silico and In vitro Study. *Current Molecular Medicine* 19(7):506-524. <http://dx.doi.org/10.2174/1566524019666190520094644>
87. Navyashree V, Kant K, Kumar A (2021) Natural chemical entities from *Arisaema* genus might be a promising break-through against Japanese encephalitis virus infection: a molecular docking and dynamics approach. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 39(4):1404-1416. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1731603>
88. Bhimaneni SP, Bhati V, Bhosale S, Kumar A (2021) Investigates interaction between abscisic acid and bovine serum albumin using various spectroscopic and in-silico techniques. *Journal of Molecular Structure* 1224:129018. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.129018>
89. Meenakshi G, Ruchika S, Anoop K (2020) Docking Techniques in Toxicology: Na Overview. *Current Bioinformatics* 15(6):600-610. <http://dx.doi.org/10.2174/1574893614666191003125540>
90. Melkemi N, Belaidi S (2014) Structure-Property Relationships and Quantitative Structure-Activity Relationship Modeling of Detoxication Properties of Some 1,2-Dithiole-3-Thione Derivatives. *Journal of Computational and Theoretical Nanoscience* 11(3):801-806. <https://doi.org/10.1166/jctn.2014.3431>
91. Belaidi S, Youcef O, Salah T, Lanez T (2015) In Silico Approach for Conformational Analysis, Drug-Likeness Properties and Structure Activity Relationships of 12-Membered Macrolides. *Journal of Computational and Theoretical Nanoscience* 12(11):4855-4861. <https://doi.org/10.1166/jctn.2015.4451>
92. Segall MD, Champness EJ (2014) Multiparameter Optimization of ADMET for Drug Design. In: *Predictive ADMET*. pp 145-166
93. Kant K, Rawat R, Bhati V, Bhosale S, Sharma D, Banerjee S, Kumar A (2021) Computational identification of natural product leads that inhibit mast cell chymase: na

exclusive plausible treatment for Japanese encephalitis. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 39(4):1203-1212. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1726820>

94. Agus HH (2021) Chapter 4 - Terpene toxicity and oxidative stress. In: Patel VB, Preedy VR (eds) *Toxicology*. Academic Press, pp 33-42.

CAPTION FOR THE FIGURES:

Figure 1. Molecular structures of the α - β -amyrin compounds: (a) α -amyrin (3 α -hidroxiurs-12-eno) and (b) β -amyrin (3 β -hidroxiolean-12-eno).

Figure 2. Effect of the α - β -amyrin in association with ampicillin, ciprofloxacin, and gentamicin against the multidrug-resistant bacterial strain of *S. aureus* 10.

Figure 3. Effect of the α - β -amyrin in association with ampicillin, ciprofloxacin, and gentamicin against the multidrug-resistant bacterial strain of *E. coli* 06.

Figure 4. Effect of the α - β -amyrin in association with ciprofloxacin, and ethidium bromide on the MepA efflux pump. Each result presents the geometric mean of three MIC values of simultaneous experiments. The data were analyzed with two-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Bonferroni's post-test. $p < 0.0001$ vs control. CCCP = Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone.

Figure 5. Effect of the α - β -amyrin in association with norfloxacin, and ethidium bromide on the NorA efflux pump. Each result represents the geometric mean of three MIC values of simultaneous experiments. The data were analyzed with two-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Bonferroni's post-test. $p < 0.0001$ vs control. CCCP = Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone.

Figure 6. Complex of interaction of the MepA efflux pump receptor with the ligands (A); Map of hydrophobic interactions of the drug ciprofloxacin (B), the ligand α -amyrin (C) and β -amyrin (D) with the MepA efflux pump.

Figure 7. Complex of interaction of the NorA efflux pump receiver with the ligands (A); Map of hydrophobic interactions of the α - β -amyrin ligand (B), the drug norfloxacin (C) and the α , β -amyrin ligand (D) with the NorA efflux pump

Figure 8. (A) Lipophilic surface map (logP) and (B) Golden triangle to estimate the permeability potential of the α - and β -amyrin compounds.

Figure 9. Graph of the expected lethal doses for the different routes of administration.

CAPTION FOR THE TABLES:

Table 1. Bacterial source and antibiotic resistance profile.

Table 2. Interactions between the MepA with the α -amyirin, β -amyirin, and ciprofloxacin.

Table 3. Interactions between the NorA with the α -amyirin, β -amyirin, and norfloxacin.

Table 4. Medicinal chemistry and SAR properties from amyirin analogs.

Table 5. Acute rodent toxicity of different administration routes of LD₅₀ by the QSAR models of the GUSAR Online tool.

Figure 1. Molecular structures of the α - β -amyrin compounds: (a) α -amyrin (3 α -hidroxiurs-12-eno) and (b) β -amyrin (3 β -hidroxiolean-12-eno).

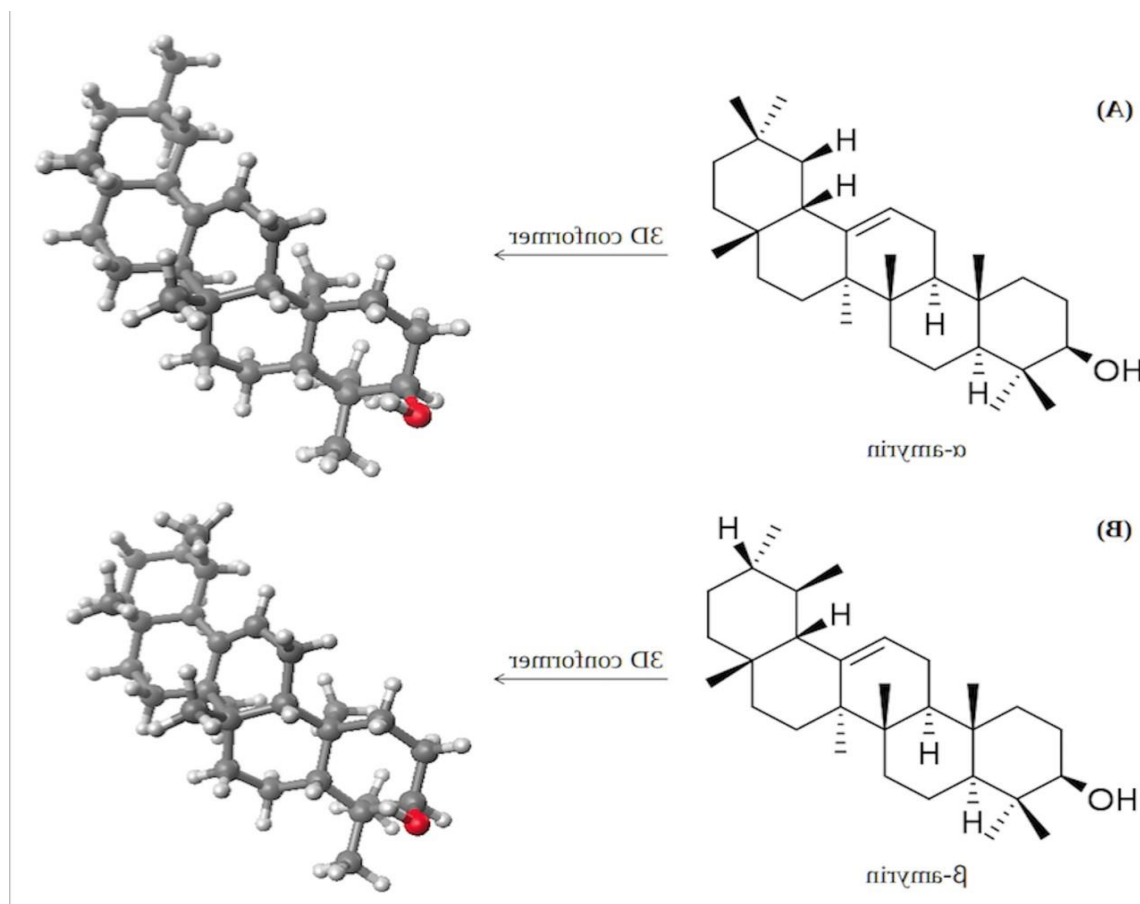


Figure 2. Effect of the α - β -amyrin in association with ampicillin, ciprofloxacin, and gentamicin against the multidrug-resistant bacterial strain of *S. aureus* 10.

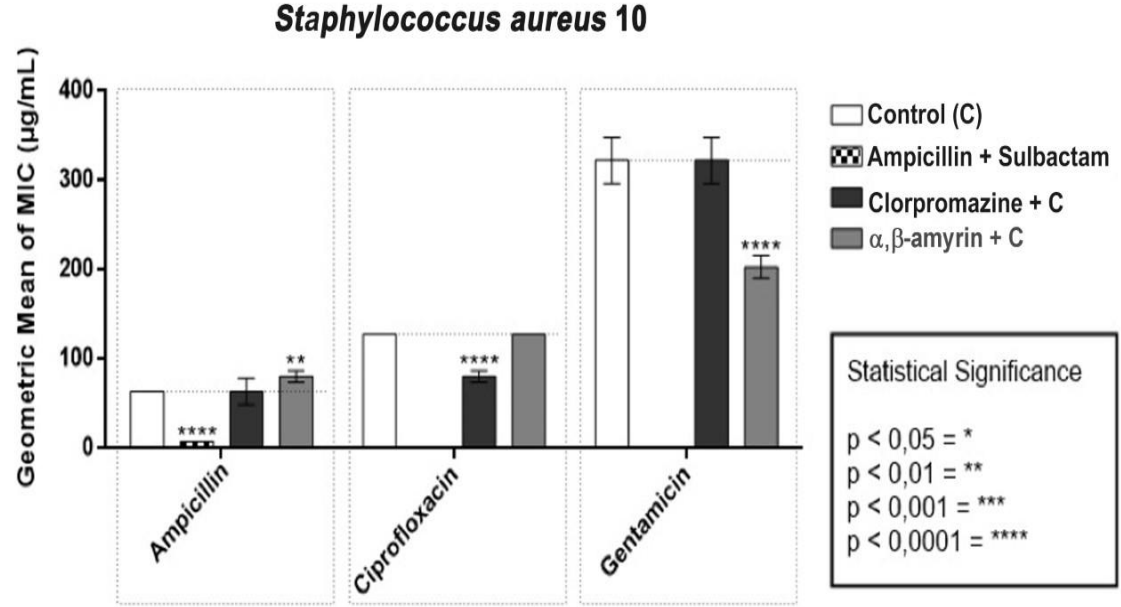


Figure 3. Effect of the α - β -amyrin in association with ampicillin, ciprofloxacin, and gentamicin against the multidrug-resistant bacterial strain of *E. coli* 06.

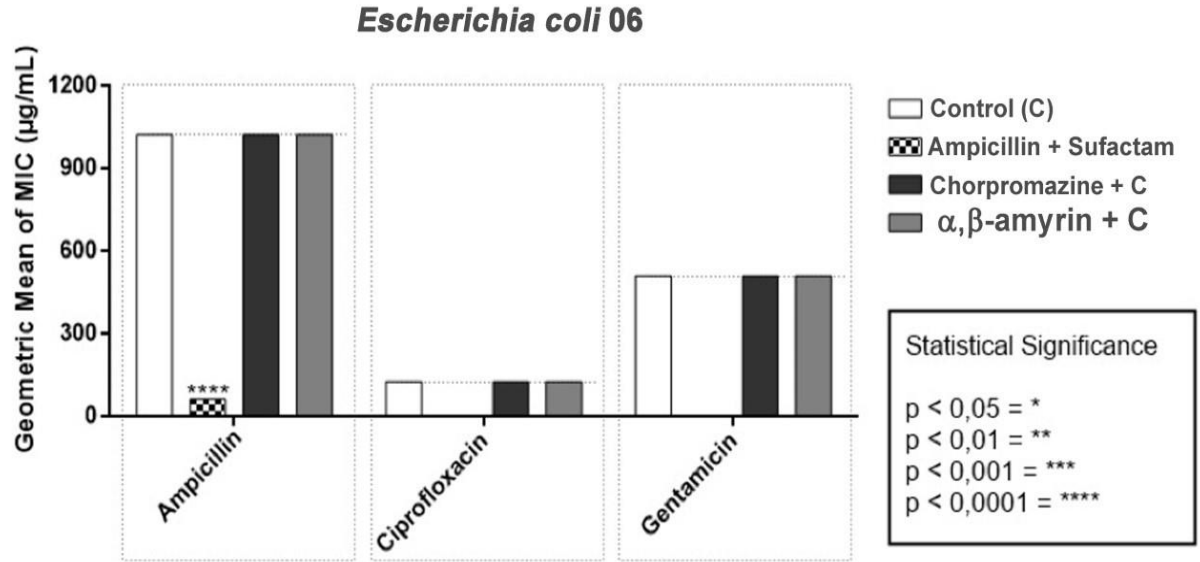


Figure 4. Effect of the α - β -amyrin in association with ciprofloxacin, and ethidium bromide on the MepA efflux pump. Each result presents the geometric mean of three MIC values of simultaneous experiments. The data were analyzed with two-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Bonferroni's post-test. $p < 0.0001$ vs control. CCCP = Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone.

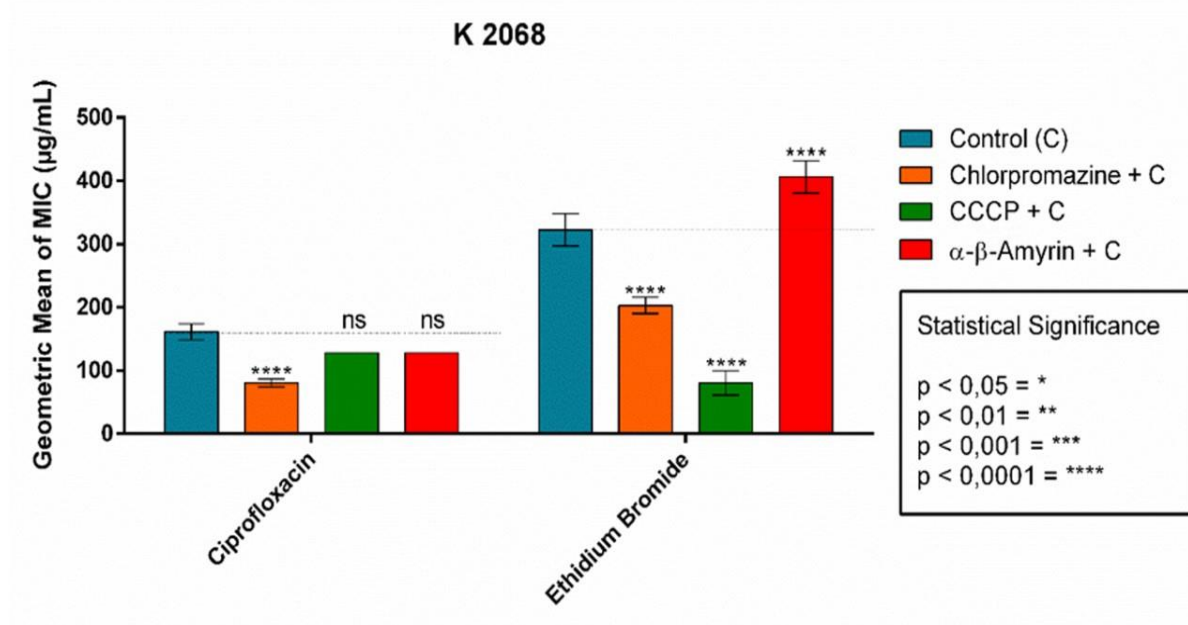


Figure 5. Effect of the α - β -amyrin in association with norfloxacin, and ethidium bromide on the NorA efflux pump. Each result represents the geometric mean of three MIC values of simultaneous experiments. The data were analyzed with two-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Bonferroni's post-test. $p < 0.0001$ vs control. CCCP = Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone.

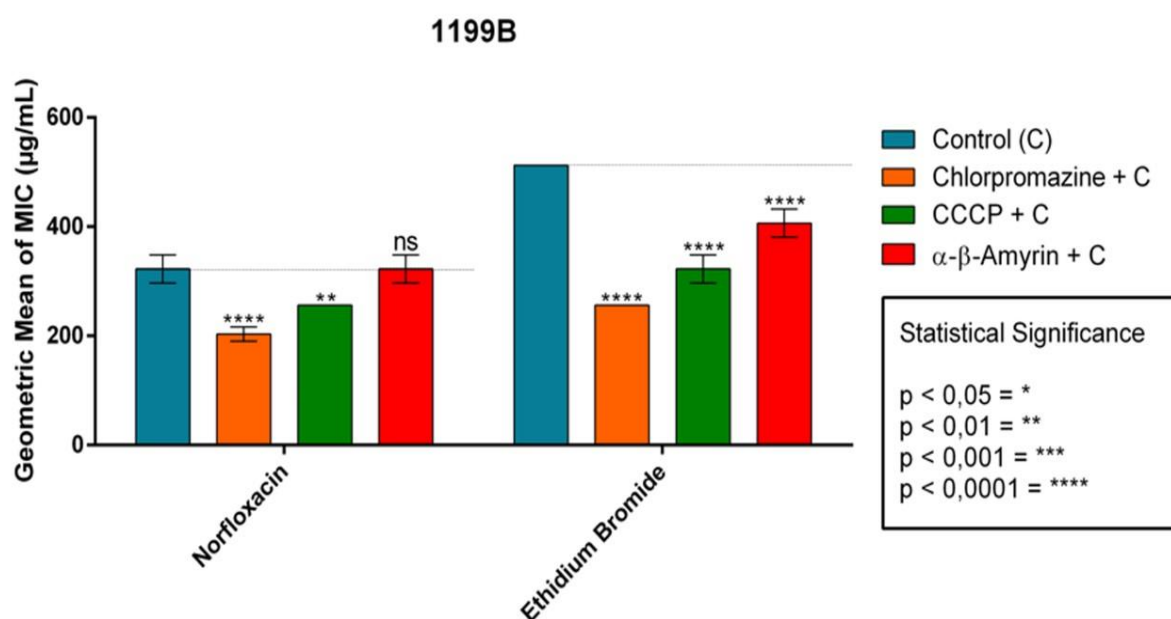


Figure 6. Complex of interaction of the MepA efflux pump receptor with the ligands (A); Map of hydrophobic interactions of the drug ciprofloxacin (B), the ligand α -amyrin (C) and β -amyrin (D) with the MepA efflux pump.

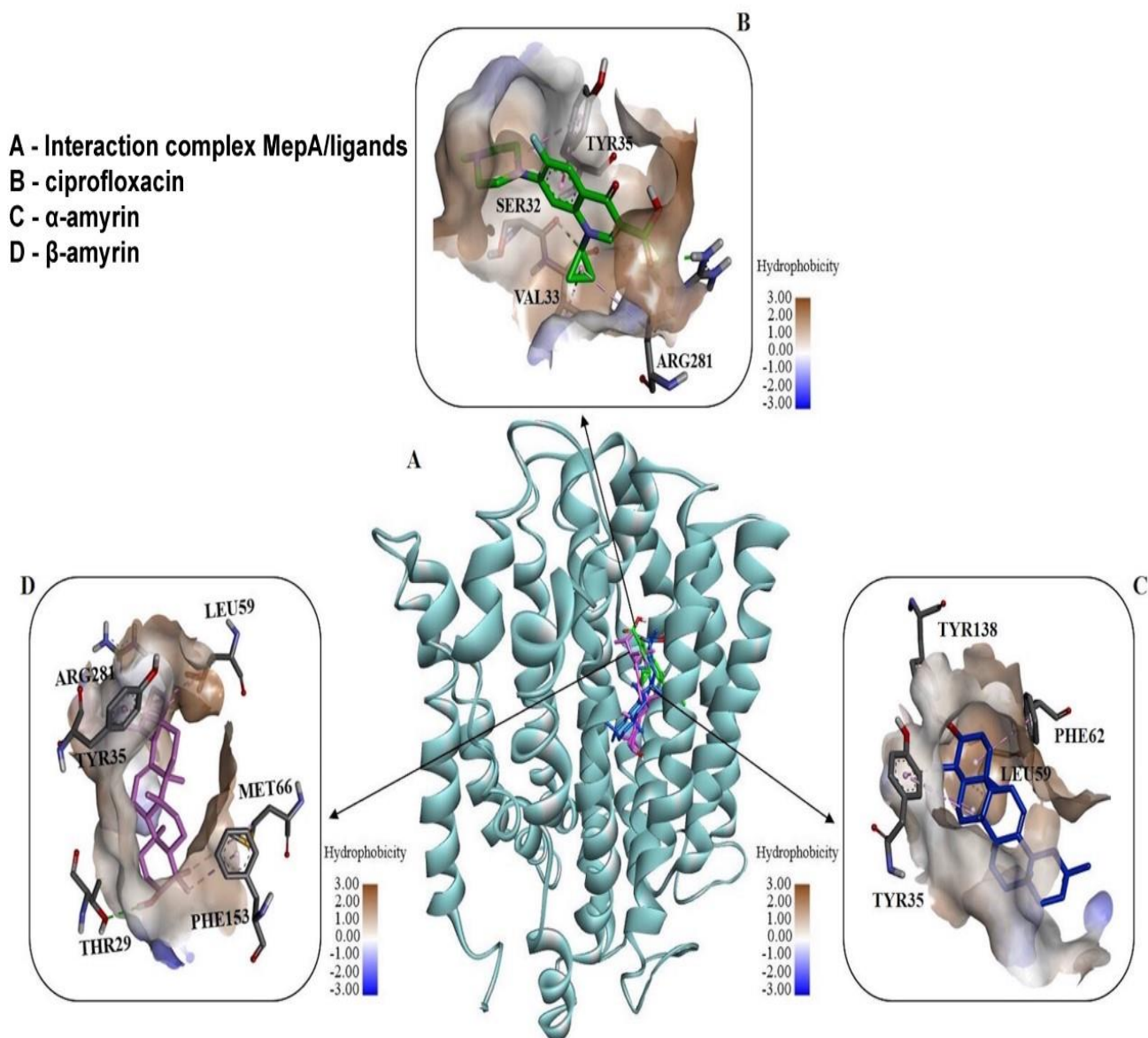


Figure 7. Complex of interaction of the NorA efflux pump receiver with the ligands (A); Map of hydrophobic interactions of the α - β -amyrin ligand (B), the drug norfloxacin (C) and the α , β -amyrin ligand (D) with the NorA efflux pump

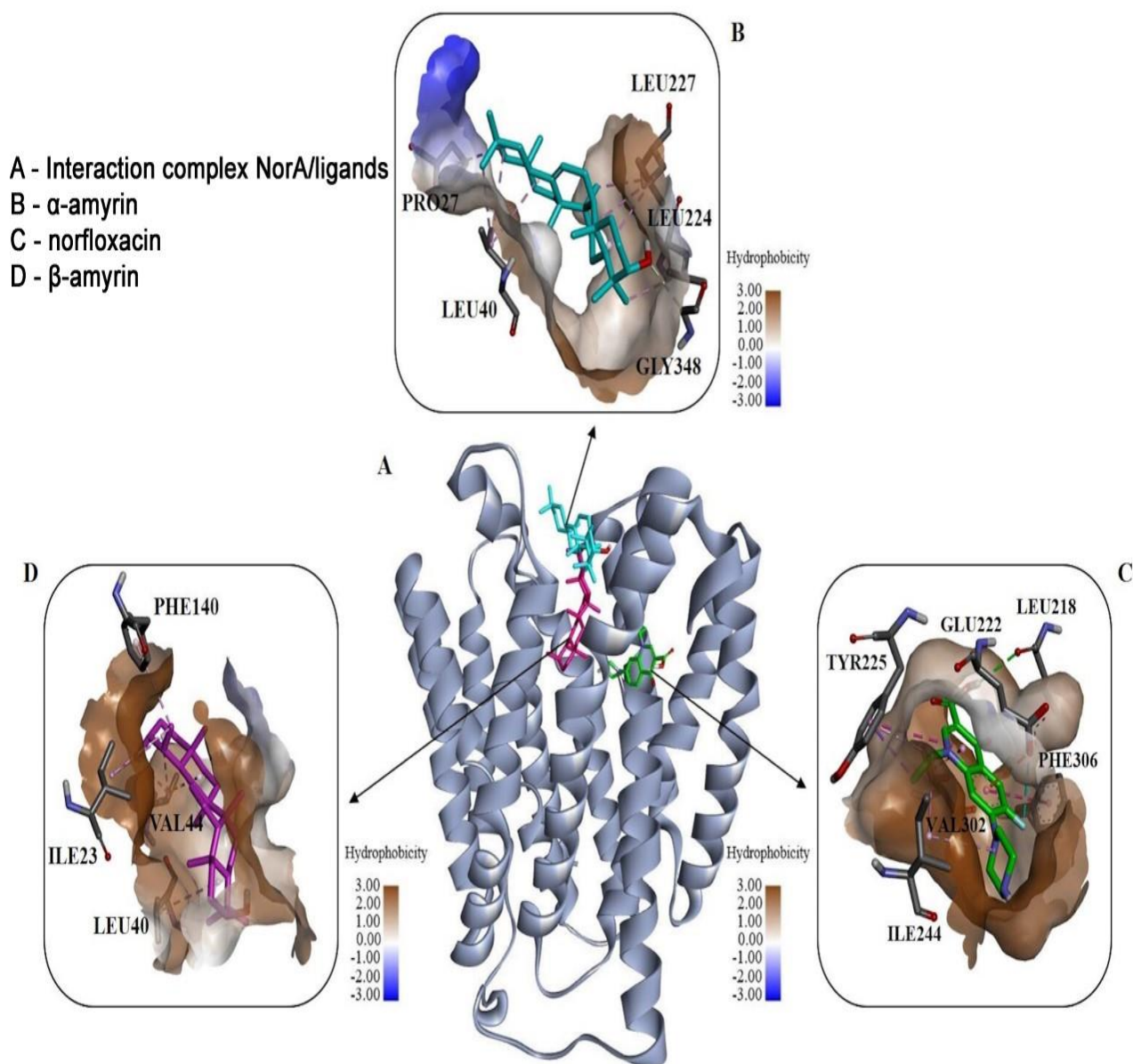


Figure 8. (A) Lipophilic surface map (logP) and (B) Golden triangle to estimate the permeability potential of the α - and β -amyrin compounds.

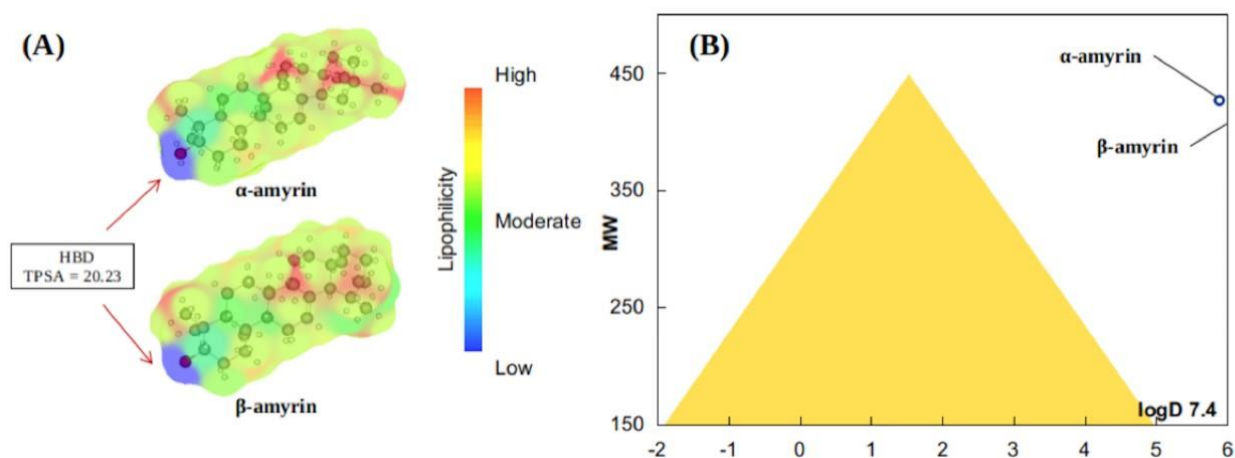


Figure 9. Graph of the expected lethal doses for the different routes of administration.

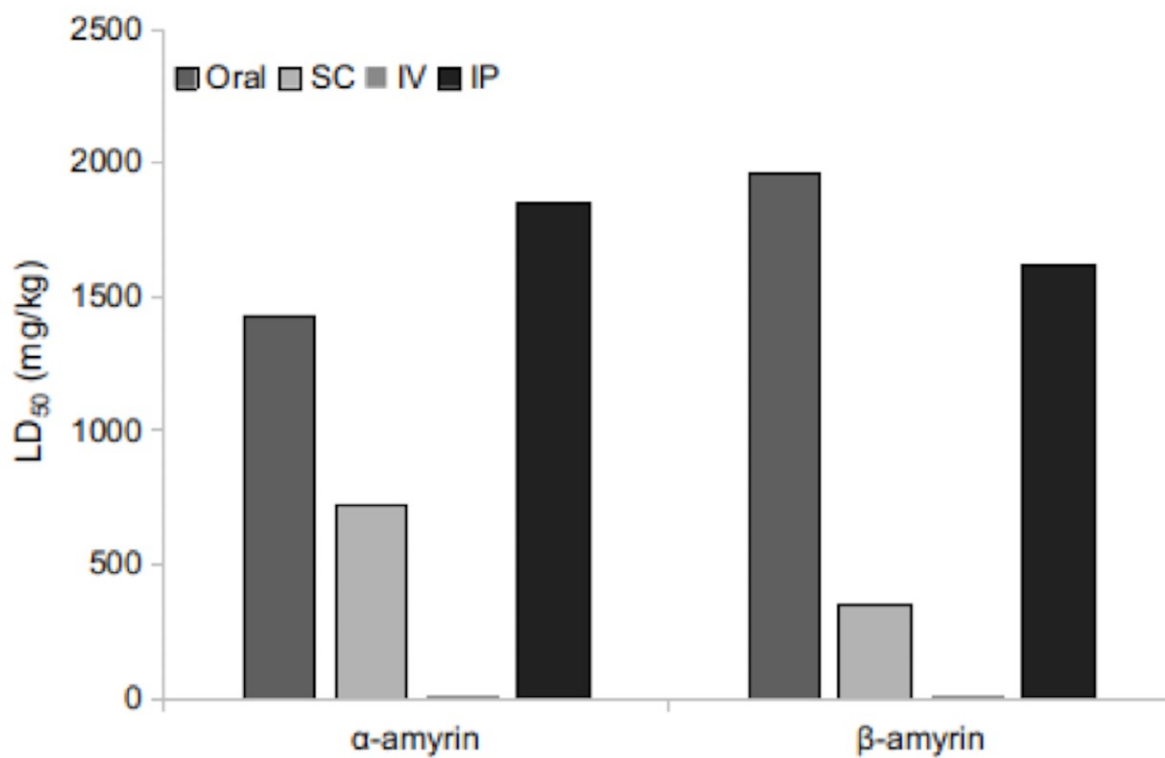


Table 1. Bacterial source and antibiotic resistance profile.

Bacterial strain	Origin	Resistance profile
<i>Staphylococcus aureus</i> 10	Rectum swab	Ca, Cef, Cf, Oxa, Pen, Amp, Amox, Mox, Cip, Lev, Asb, Amc, Eri, Cla, Azi,
<i>Escherichia coli</i> 06	Urine culture	Cf, Cef, Ca, Cro,

Amp - Ampicillin; Amox - Amoxicillin; Asb - Ampicillin + Sulbactam; Azi - Azithromycin; Ca - Cefadroxil; Cef - Cephalexin; Cf - Cephalotin; Cip - Ciprofloxacin; Clarithromycin; Clin - Clindamycin; Cro - Ceftriaxone; ; Cla - Clarithromycin; Cro - Ceftriaxone; Ery - Erythromycin; Lev - levofloxacin; Mox - Moxifloxacin; Oxa - oxacillin; Pen - Penicillin.

Table 2. Interactions between the MepA with the α -amylin, β -amylin, and ciprofloxacin.

ligands	receptor	interaction	Distance (Å)
α -amylin	THR29A	Hydrofobic	3.88
	TYR35A	Hydrofobic	3.67
	TYR35A	Hydrofobic	3.88
	LEU59A	Hydrofobic	3.74
	PHE62A	Hydrofobic	3.84
	PHE62A	Hydrofobic	3.65
	PHE153A	Hydrofobic	3.67
	TYR138A	Hydrogen Bonds	2.36
β -amylin	THR29A	Hydrofobic	3.57
	TYR35A	Hydrofobic	3.45
	LEU59A	Hydrofobic	3.27
	PHE153A	Hydrofobic	3.54
	PHE153A	Hydrofobic	3.44
	PHE280A	Hydrofobic	3.61
	ARG281A	Hydrofobic	3.37
	THR29A	H-Bond	2.66
Ciprofloxacin	VAL33A	Hydrofobic	3.83
	TYR138A	H-Bond	3.06
	TYR35A	π -Stacking	4.83
	ARG281A	Salt Bridges	3.57

Table 3. Interactions between the NorA with the α -amyrin, β -amyrin, and norfloxacin.

ligands	receptor	interaction	Distance (Å)
α -amyrin	PRO27A	Hydrofobic	3.48
	PRO27A	Hydrofobic	3.70
	LEU40A	Hydrofobic	3.83
	LEU40A	Hydrofobic	3.79
	LEU40A	Hydrofobic	3.59
	LEU224A	Hydrofobic	3.72
	LEU227A	Hydrofobic	3.79
	LEU227A	Hydrofobic	3.46
β -amyrin	ILE23A	Hydrofobic	3.55
	LEU40A	Hydrofobic	3.96
	PHE140A	Hydrofobic	3.76
	SER226A	H-Bond	3.16
Norfloxacin			
	GLU222A	Hydrofobic	3.72
	GLU222A	Hydrofobic	3.74
	TYR225A	Hydrofobic	3.55
	VAL302A	Salt Bridges	3.58
	PHE140A	H-Bond	2.87
	LEU218A	H-Bond	2.87
	PHE306A	π -Stacking	5.01

Table 4. Medicinal chemistry and SAR properties from amylin analogs.

Compounds	Medicinal chemistry properties							Structure/activity relationships (SAR)				
	MW	logP	logD	HBA	HBD	TPSA	N _{rotb}	F _{sp3}	N _{RING}	SC	QED	MCE18
α-amylin	426.390	7.713	5.888	1	1	20.230	0	0.933	5	8	0.387	102.207
β-amylin	426.390	7.603	6.085	1	1	20.230	0	0.933	5	10	0.389	99.517
Optimal values	100~600	0~3	1~3	0~12	0~7	0~140	0~11	≥ 0.42	0~6	≤ 2	> 0.67	≥ 45

Note: MW (Molecular weight in g/mol); logP (Partitioning coefficient); logD (Distribution coefficient); HBA (H-bond acceptor); HBD (H-bond donor); TPSA (Topological polar surface area in Å²); N_{rotb} (Number of rotatable bonds); F_{sp3} (Fraction of carbon sp³); N_{RING} (Number of rings); SC (Stereo centers); QED (Quantitative estimate drug-likeness); MCE18 (Medicinal chemistry evolution in 2018).

Table 5. Acute rodent toxicity of different administration routes of LD₅₀ by the QSAR models of the GUSAR Online tool.

Compound	Oral	Class	SC	Class	IV	Class	IP	Class
α -amylin	1426.000	4	721.100	4	4.348	2	1851.000	Non toxic
β -amylin	1960.000	4	351.300	4	4.430	2	1623.000	Non toxic

Note: SC (Subcutaneous route); IV (Intravenous route); IP (Intraperitoneal route).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

In vitro and in silico analysis of antibacterial activity and from the potential efflux pump inhibitor of α,β -amylin isolated from *Protium heptaphyllum*

Raíssa C. Oliveira^a, Paulo N. Bandeira^b, Telma L.G. Lemos^c, Hécio S. dos Santos^{a,b}, Jackelyne R. Scherf^a, Janaina E. Rocha^a, Raimundo L.S. Pereira^a, Thiago S. Freitas^a, Priscila R. Freitas^a, Francisco N. Pereira-Junior^d, Márcia M. Marinho^e, Emanuelle M. Marinho^f, Emmanuel S. Marinho^g, Carlos E.S. Nogueira^{a,h}, Henrique D.M. Coutinho^a, Alexandre M.R. Teixeiraa,^{h*}

^aDepartamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri, Crato, CE, Brasil

^bCentro de Ciências e Tecnologia - Curso de Química, Universidade Vale do Acaraú, Sobral, CE, Brasil

^cDepartamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil

^dCentro de Ciências Agrárias e da Biodiversidade, Universidade Federal do Cariri, Juazeiro do Norte, CE, Brazil

^eFaculdade de Educação, Ciências e Letras de Iguatu, Universidade Estadual do Ceará, Iguatu, CE, Brasil

^fDepartamento de Química Analítica e Físico-Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil

^gUniversidade Estadual do Ceará, Grupo Teórico e Química Eletroquímica, Limoeiro do Norte, Ceará, Brasil

^hDepartamento de Física, Universidade Regional do Cariri, Juazeiro do Norte, CE, Brasil

*Corresponding author. Postgraduate Program in Biological Chemistry, Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri, Campus Pimenta II, CEP: 63.100-000, Crato, CE, Brazil. E-mail addresses: alexandre.teixeira@urca.br

Table S1- Protein sequence of MepA and NorA

Protein	Sequence Fasta
MepA	<p>>sp Q2G140 MEPA_STAA8 Multidrug export protein MepA OS=Staphylococcus aureus (strain NCTC 8325 / PS 47) OX=93061 GN=mepA PE=1 SV=1</p> <p>MKDEQLYYFEKSPVFKAMMHFSLPMMIGTLLSVIYGILNIYFIGFLE DSHMISAIISLTLPVFAILMGLGNLFGVGAGTYISRLLGAKDYSKSKF VSSFSIYGGIALGLIVILVTLPSDQIAAILGARGETLALTSNYLKVMF LSAPFVILFFILEQFARAIGAPMVSMIGMLASVGLNIILDPIIFGFDL NVVGAALGTAISNVAAALFFIIYFMKNSDVVSVNIKLAKPNKEMLS EIFKIGIPAFLMSILMGFTGLVLNLFLAHYGNFAIASYGISFRLVQFPE LIIMGLCEGVVPLIAYNFMANKGRMKDVIKAVIMSIGVIFVVCMSA VFTIGHHMOVGLFTTDDQAIVEMATFILKVTMASLLLNGIGFLFTGML QATGQGRGATIMAILQGAIIPVLFIMNALFGLTGVIWSLIAESLCAL AAMLIVYLLRDRLTVDTSELIEG</p>
NorA	<p>tr Q03325 Q03325_STAAU Quinolone resistance protein NorA OS=Staphylococcus aureus OX=1280 GN=norA1199 PE=3 SV=1</p> <p>MNKQILVLYFNIFLIFLGIGLVIPVLPVYLKDLGLTGSDLGLLVAAFA LSQMIISPFGGTLADKLGKKLIICIGLILFSVSEFMFAIGQNFLILMLSR VIGGMSAGMVMPGVTGLIADISPSHQKAKNFGYMSAIINSGFILGPG IGGFMAEVSHRMPFYFAGALGILAFIMSIVLIHDPKKVSTNGFQKLE PQLLTKINWKVFITPVILTLVLSFGLSAFETLYSLYTADKVNYSKDI SIAITGGGIFGALFQIYFFDKFMKYFSELTFIAWSLIYSVIVLVLLVIA DGYWTIMVISFVVFIFGDMIRPAITNYFSNIAGDRQGFAGGLNSTFT SMGNFIGPLIAGALFDVHIEAPIYMAIGVSLAGVVIVLIEKQHRACL KQQDL</p>

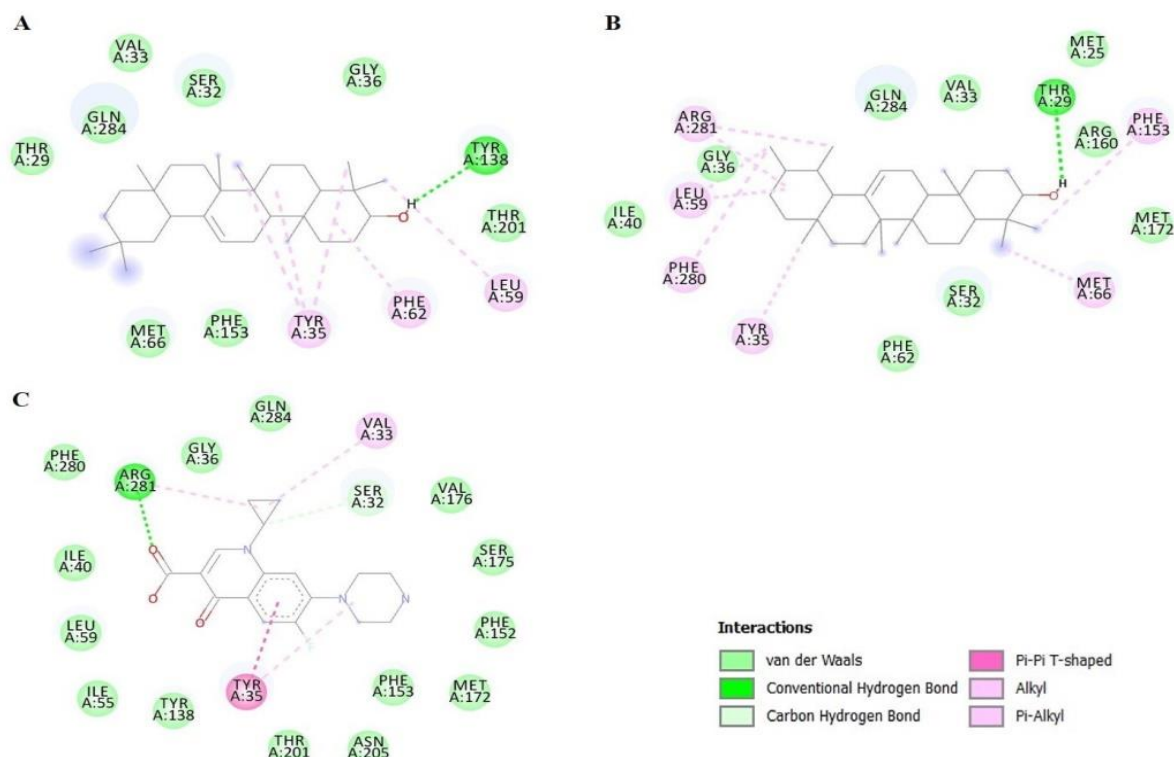


Figure S1: 2D map of the interactions involved in the formation of the complexes α -amyrin / mepA (A), β -amyrin/MepA (B) and Ciprofloxacin/MepA (C)

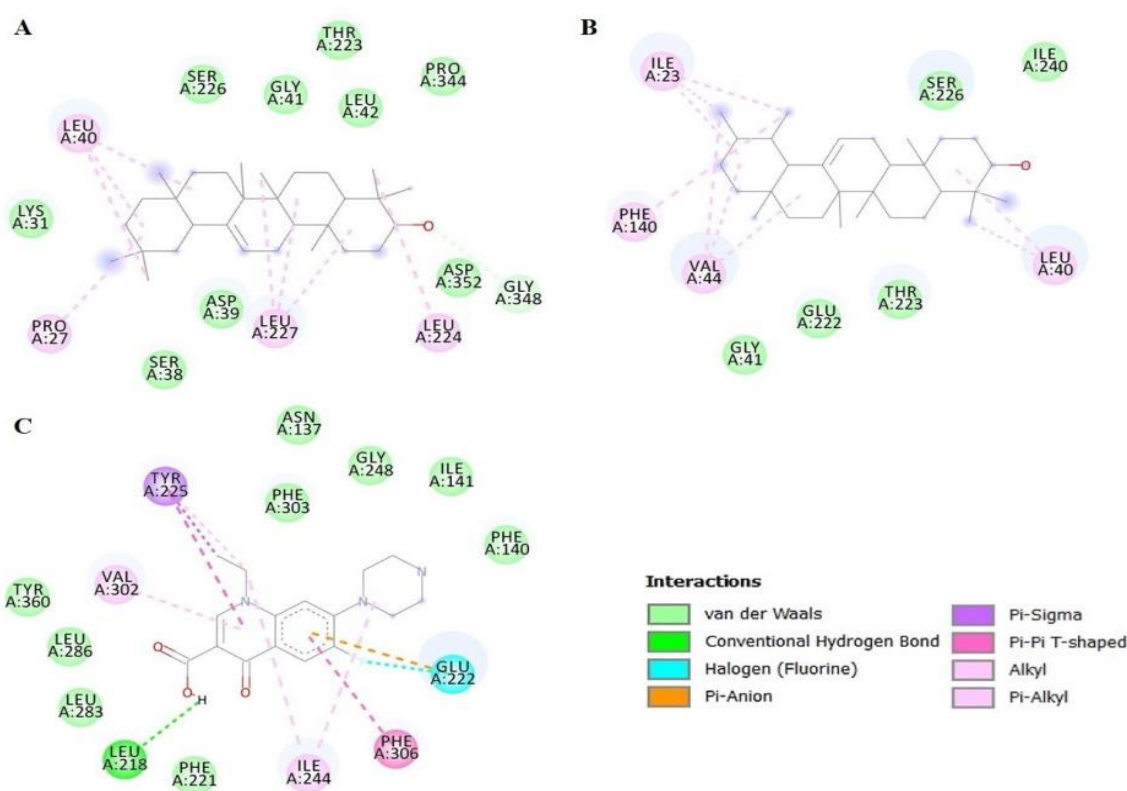


Figure S2: 2D map of the interactions involved in the formation of the complexes α -amyrin / NorA (A), β -amyrin/ NorA (B) and Ciprofloxacin/ NorA (C).

5. CAPÍTULO 5 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

5.1 DISCUSSÃO GERAL

Análises estruturais de confirmação das estruturas da mistura isomérica triterpênica pentacíclica por Ressonância Magnética Nuclear ^1H e ^{13}C foram correlacionados e foram fundamentais para também entender as conformações estruturais da α,β -amirina.

Os espectros experimentais ATR-FTIR e o FT-RAMAN da mistura α,β -amirina foram obtidos, e seus modos vibracionais foram analisados por análise comparativa do espectro experimental de absorbância no infravermelho com os espectros teóricos escalonados pelo fator de escala 0,9613 dos compostos isolados, e da mistura binária α,β -amirina, e posteriormente correlacionados com as bandas Raman. Os dados experimentais apresentam uma razoável concordância com os valores computados no nível de aproximação B3LYP/6-31 G(d,p).

O modo de estiramento OH aparece no espectro infravermelho experimental em 3277 cm^{-1} . Este modo também está presente nos espectros de absorção calculados dos componentes químicos da mistura, que aparecem em 3668 cm^{-1} . Entretanto, observa-se que no espectro de absorção calculado da mistura isomérica aparecem dois modos de estiramento da hidroxila, um a 3651 cm^{-1} , e outro a 3594 cm^{-1} . Este efeito de não coincidência no modo de alongamento OH é esperado na mistura binária devido a diferenças na força de interação entre moléculas vizinhas na célula da unidade do cristal de α,β -amirina. No espectro de absorção experimental, estas duas bandas estão sobrepostas. Observa-se também que o modo de estiramento OH não aparece no espectro Raman experimental. As bandas de absorção de infravermelho observadas em 1600 e 1585 cm^{-1} não são encontradas nos espectros de absorção de infravermelho calculados dos constituintes químicos da mistura isomérica, e nem no espectro de absorbância calculado da mistura de α,β -amirina; portanto, eles foram atribuídos como modos de interação intermolecular.

O espectro de absorção experimental UV-Vis de α,β -amirina revelou três bandas de energia de excitação correspondendo a três estados singletes para esta mistura binária. As bandas de absorbância centradas em 226 nm ($5,49\text{ eV}$), 205 nm ($6,05\text{ eV}$) e 194 nm ($6,40\text{ eV}$) correspondem ao primeiro, segundo e terceiro estados singlete, respectivamente.

Para o estudo *in silico* ADME realizou-se os calculados teóricos de pKa, Log P, Log D_{7.4}, Log S e PSA, que são propriedades físico-químicas utilizadas como descritores. Em seguida, a α -amirina e β -amirina foram submetidas à previsão de propriedades farmacocinéticas pelos modelos ADME do servidor online SwissADME. Para a análise da absorção e

distribuição foram estabelecidas utilizando a absorção intestinal humana (HIA), a permeabilidade da barreira hematoencefálica (BBB) e os gráficos do substrato da glicoproteína P (P-gp) no método de permeação da estimativa do cérebro ou intestino (BOILED-Egg) através de descritores moleculares de lipofilicidade (WlogP) e polaridade (PSA). Em seguida os modelos de metabolismo e excreção foram previstos através da inibição de isoenzimas citocromo P450 (CYP450). O efeito cardiotoxico também foi presumido para as moléculas.

Na análise dos resultados do estudo ADME, observou-se que as moléculas possuem carga fisiológica neutra, o que sugere que os compostos não possuem grupos ionizáveis em meio fisiológico. São essencialmente lipofílicos e permanecem constante entre pH 2-14. O Log D_{7,4} sugere que as moléculas são muito lipofílicas e pouco permeáveis, o valor Log S presumi que as moléculas são pouco solúveis em água e invariáveis em função do pH. As substâncias apresentaram valores que sugerem baixa absorção intestinal e não atingem o sistema nervoso central, por não serem permeáveis à membrana hematoencefálica, não serem substratos da P-gp e, portanto, características limitantes de seus volumes de distribuição na corrente sanguínea após a absorção intestinal.

Pelos resultados da avaliação do metabolismo é possível observar que o composto α,β -amirina constitui menor risco de toxicidade hepática por ativação metabólica. No entanto, eles são compostos muito lipofílicos e tendem a ter uma meia-vida mais longa no corpo humano antes de serem excretados. Além disso, os compostos não apresentam risco cardiotoxico devido à inibição dos canais iônicos hERG.

A α,β -amirina não apresenta atividade antibacteriana direta, mas quando avaliada associada a gentamicina, demostro efeito sinérgico contras *S. aureus* 10. É provável que o sinergismo facilite a entrada do antibiótico na membrana celular ou atue em um alvo que potencialize a ação desse aminoglicosídeo. Comprovando que a associação de alguns terpenos com antibióticos resulta na potencialização da atividade antibiótica, revertendo a resistência aos antibióticos.

Quando avaliada a atividade da α,β -amirina como alternativa para reversão do mecanismo de resistência de bomba de efluxo, pode-se observar que em relação a bactéria *Staphylococcus aureus* que possui a bomba de efluxo NorA, a mistura α,β -amirina agiu no mecanismo de efluxo do brometo de etídio, atuando semelhante a clorpromazina,e CCCP inibidores de bomba utilizados como controle positivo. Estando de encontrado com a investigação da atividade da inibição da bomba de efluxo de brometo de etídio por triterpenos isolados de *Mesua ferrea* contra cepas de *Staphylococcus aureus* 1199B que superexpressam

NorA, revelou uma modulação da MIC de EtBr em ≥ 2 vezes, confirmou a inibição significativa de triterpenos como inibidores da bomba de efluxo de NorA.

Pra melhor avaliar a capacidade dessas moléculas frente as bactérias onde houve uma redução da CIM do brometo etidio, foi feito a docagem molecular com as proteínas NorA e MepA, os complexos formados tinham energia de afinidade muito próxima, porém eles tinham um perfil de interação ligeiramente diferente. Observando a região de acoplamento dos triterpenos, próximo ao sítio de Norfloxacin, os valores favoráveis de energia de afinidade e as interações, pode-se afirmar a viabilidade na formação desses complexos α , β -amirina, sendo estes moduladores NorA.

5.2 CONCLUSÕES GERAIS

Foram obtidos os espectros vibracionais ATR-FTIR e FT-Raman da mistura α , β -amirina. Sendo pela primeira vez apresentado o espectro Raman desta mistura. Trinta bandas foram selecionadas e uma análise comparativa foi realizada.

A análise vibracional mostrou que há um número de bandas idênticas nos espectros infravermelho e Raman, principalmente em números de onda, enquanto outras apresentaram diferenças de intensidade e número de onda. Foram também identificadas as bandas características de alguns grupos intrínsecos presentes na mistura.

Em relação a atividade antibacteriana a α , β -amirina não apresenta atividade direta, entretanto, em associação com antibióticos tem potencial para aumentar a atividade antibacteriana. A α , β -amirina pode ser utilizada como alternativa na reversão do mecanismo de resistência de bomba de efluxo, sendo um forte candidato a inibidor da bomba de efluxo.

O cálculo das propriedades físico-químicas teóricas também foi fundamental para justificar o comportamento farmacocinético das moléculas que, apesar da diminuição de suas respectivas biodisponibilidades, são compostos químicos promissores e de menor risco toxicológico por ativação metabólica.

5.3 PERSPECTIVAS

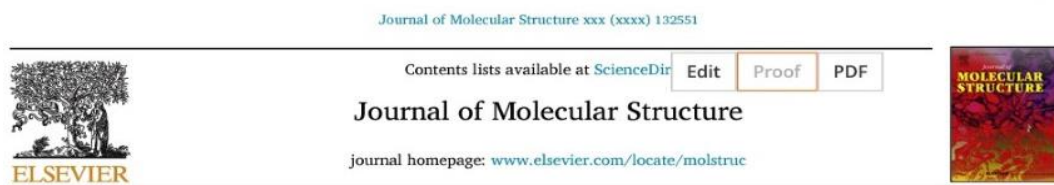
Como perspectiva de continuidade do desenvolvimento desta pesquisa podemos enumerar as seguintes sugestões de trabalhos futuros:

- i) Crescer cristais de α,β -amirina para investigar propriedades de estado sólido, e identificar suas interações intermoleculares;
- ii) Avaliar a atividade antibacteriana frente a outras cepas de bactérias tanto Gram-positiva quanto negativas, portadoras de outros mecanismos de resistência e comparar os resultados obtidos da mistura α,β -amirina com futuros testes dos compostos isolados α -amirina e β -amirina, adicionando outras classes de antibióticos.

ANEXOS

ANEXO A

Manuscrito 01 aceito para publicação em JOURNAL OF MOLECULAR STRUCTURE:



Spectroscopic, physicochemical, and pharmacokinetic analysis of α,β -amyryn mixture obtained from protium heptaphyllum (Aubl.) marchand resin

Raíssa C. Oliveira^a, Paulo N. Bandeira^b, Telma G. Lemos^c, Hécio S. dos Santos^{a,b,h}, Murilo S.S. Julião^b, Emmanuel S. Marinho^{e,h}, Francisco Flávio da S. Lopes^h, Selene Maia de Moraes^h, João Pedro da Hora^b, Ana J. de Moraes Bento^a, Igor K.C. Lima^a, Carlos E.S. Nogueira^{a,f}, Gilberio D. Saraiva^f, Antônio C.H. Barreto^g, Raimundo Braz-Filho^h, Alexandre M.R. Teixeira^{a,d,h,i,*}

^a Departamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri, Crato, CE, Brazil

^b Centro de Ciências e Tecnologia - Curso de Química, Universidade Vale do Acaraú, Sobral, CE, Brazil

^c Departamento de Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

^d Departamento de Física, Universidade Regional do Cariri, Juazeiro do Norte, CE, Brazil

^e Grupo de Química Teórica e Eletroquímica, Universidade Estadual do Ceará, Campus FAFIDAM, Limoeiro do Norte, Ceará, Brazil

^f Departamento de Física, Universidade Estadual do Ceará, Quixadá, Ceará, Brazil

^g Departamento de Física, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

^h Universidade do Norte Fluminense - Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

ⁱ Centro de Ciência e Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 April 2021

Received in revised form 16 December 2021

Accepted 3 February 2022

Keywords:

Isomeric mixture

NMR

ATR-FTIR

FT-Raman

UV-Vis

ADMET

ABSTRACT

In the present study, the α,β -amyryn mixture was obtained from *Protium heptaphyllum* resin, and its molecular structure was determined by one- and two-dimensional Nuclear Magnetic Resonance (NMR) techniques and Mass spectroscopy. This natural compound was also characterized by Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared spectroscopy (ATR-FTIR), Fourier Transform Raman (FT-Raman), and Ultraviolet-Visible (UV-Vis) spectroscopy. Vibrational wavenumber and wavevector have been predicted using the Density Functional Theory (DFT) calculations, and the comparison with experimental data allowed us to assign most of the normal modes of this isomeric binary mixture. The absorption wavelengths and oscillator strengths for the three singlet states of this binary mixture were calculated using time-dependent density functional theory (TD-DFT). The electrochemical behavior was also evaluated. The physical-chemical parameters for ionization constant (pKa), partition coefficient (log P), distribution coefficient (log D), solubility coefficient (log S), and Polar Surface Area (PSA) were predicted. The cardiotoxic effect was also evaluated using the Pred-HERG computational tool. Furthermore, the pharmacokinetic behavior of the α -amyryn and β -amyryn molecules was evaluated by studies of absorption, distribution, metabolism and excretion, and toxicity (ADMET). From the study of the physical-chemical properties, it was possible to infer that the α -amyryn and β -amyryn compounds do not possess ionizable groups in physiological environment. They are essentially lipophilic and remain constant between pH 2–14. From the study of the pharmacokinetic properties of AMDE, it was observed that the α -amyryn and β -amyryn had values that suggest low intestinal absorption and do not reach the central nervous system. It was also verified that they present a lower risk of hepatic toxicity by metabolic activation and do not present cardiotoxic risk.

© 2021

ANEXO B

Artigo publicado em JOURNAL OF BIOMOLECULAR STRUCTURE AND DYNAMICS
com DOI: <https://doi.org/10.1080/07391102.2021.1976277>

JOURNAL OF BIOMOLECULAR STRUCTURE AND DYNAMICS
<https://doi.org/10.1080/07391102.2021.1976277>



In silico and *in vitro* evaluation of efflux pumps inhibition of α,β -amyrin

Raissa C. Oliveira^a, Paulo N. Bandeira^b, Telma L. G. Lemos^c, Hécio S. dos Santos^{a,b}, Jackelyne R. Scherf^a, Janaina E. Rocha^a, Raimundo L. S. Pereira^a, Thiago S. Freitas^a, Priscila R. Freitas^a, Francisco N. Pereira-Junior^d, Márcia M. Marinho^e, Emanuelle M. Marinho^f, Emmanuel S. Marinho^g, Carlos E. S. Nogueira^{a,h}, Henrique D. M. Coutinho^a and Alexandre M. R. Teixeira^{a,h}

^aGraduate Program in Biological Chemistry, Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri, Crato, CE, Brazil; ^bScience and Technology Centre, Course of Chemistry, State University Vale do Acaraú, Sobral, CE, Brazil; ^cDepartment of Organic and Inorganic Chemistry, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil; ^dCenter of Agricultural Sciences and of the Biodiversity, Federal University of Cariri, Juazeiro do Norte, CE, Brazil; ^eFaculty of Education, Sciences and Letters of Iguatu, State University of Ceará, Campus FECLJ, Iguatu, CE, Brazil; ^fDepartment of Analytical Chemistry and Physical Chemistry, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil; ^gGroup of Theoretical Chemistry and Electrochemistry, State University of Ceará, Campus FAFIDAM, Limoeiro do Norte, CE, Brazil; ^hDepartment of Physics, Regional University of Cariri, Juazeiro do Norte, CE, Brazil

Communicated by Ramaswamy H. Sarma

ABSTRACT

The use of the bacterial efflux pump mechanism to reduce the concentrations of antibiotics in the intracellular to the extracellular region is one of the main mechanisms by which bacteria acquire resistance to antibiotics. The present study aims to evaluate the antibacterial activity of the α,β -amyrin mixture isolated from *Protium heptaphyllum* against the multidrug-resistant strains of *Escherichia coli* 06 and *Staphylococcus aureus* 10, and to verify the inhibition of the efflux resistance mechanisms against the strains of *S. aureus* 11998 and K2068, carrying the NorA and MepA efflux pumps, respectively. The α,β -amyrin did not show clinically relevant direct bacterial activity. However, the α,β -amyrin when associated with the gentamicin antibiotic presented synergistic effect against the multidrug-resistant bacterial strain of *S. aureus* 10. In strains with efflux pumps, α,β -amyrin was able to inhibit the action of the efflux protein NorA against Ethidium Bromide. However, this inhibitory effect was not observed in the MepA efflux pump. In addition, when evaluating the effect of standard efflux pump inhibitors, cloptomazine and CCCP, α,β -amyrin showed a decrease in MIC, demonstrating the presence of the efflux mechanism through synergism. Docking studies indicate that α,β -amyrin have a higher affinity energy to MepA, and NorA than ciprofloxacin and norfloxacin. Also, α,β -amyrin bind to the same region of the binding site as these antibiotics. It was concluded that the α,β -amyrin has the potential to increase antibacterial activity with the association of antibiotics, together with the ability to be a strong candidate for an efflux pump inhibitor.

ARTICLE HISTORY

Received 24 May 2021
Accepted 29 August 2021

KEYWORDS

α,β -amyrin mixture;
antibacterial activity; efflux
pump; molecular docking

1. Introduction

to facultative anaerobic conditions, usually found in various