



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA  
REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ  
*- PONTO FOCAL -*

**Avaliação pré-clínica dos efeitos toxicológicos agudos e ansiolíticos  
da riparina A e complexação com  $\beta$ -ciclodextrina.**

*ÉVERTON JOSÉ FERREIRA DE ARAÚJO*

TERESINA - PIAUÍ

2017

ÉVERTON JOSÉ FERREIRA DE ARAÚJO

**Avaliação pré-clínica dos efeitos toxicológicos agudos e ansiolíticos da riparina A e complexação com  $\beta$ -ciclodextrina.**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia - RENORBIO, ponto focal na Universidade Federal do Piauí, como requisito para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador:  
Prof. Dr. Francisco das Chagas Alves Lima.

Coorientador:  
Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira

TERESINA - PIAUÍ

2017

**Universidade Federal do Piauí**  
**Serviço de Processamento Técnico**  
**Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde**

Araújo, Éverton José Ferreira de.  
A658a Avaliação pré-clínica dos efeitos toxicológicos agudos e ansiolíticos da  
riparina A e complexação com  $\beta$ -ciclodextrina / Éverton José Ferreira de  
Araújo. -- Teresina, 2017.  
108 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-  
Graduação em Biotecnologia, 2017.

“Orientador: Prof. Dr. Francisco das Chagas Alves Lima.”

Bibliografia

1. Aniba. 2. Ansiolítico. 3. Complexação. I. Título. II. Teresina –  
Universidade Federal do Piauí.

CDD 615



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

## FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE TESE

**ALUNO:** EVERTON JOSÉ FERREIRA DE ARAÚJO

**TÍTULO DO PROJETO:** "Avaliação pré-clínica dos efeitos toxicológicos agudos e ansiolíticos da riparina A e complexação com  $\beta$ -ciclodextrina."

**PROFESSOR ORIENTADOR:** Prof. Dr. Francisco das Chagas Alves Lima

**BANCA EXAMINADORA:**

	CONCEITO	ASSINATURA
Prof. Dr. Francisco das Chagas Alves Lima - UESPI (Presidente)	<u>satisfatório</u>	<u>[Assinatura]</u>
Prof. Dr. Benedito Borges da Silva - UFPI (Examinador)	<u>SATISFATORIO</u>	<u>[Assinatura]</u>
Profa. Dra. Aldeídia Pereira de Oliveira - UFPI (Examinadora)	<u>satisfatório</u>	<u>[Assinatura]</u>
Prof. Dr Stanley Juan Chavez Gutierrez – UFPI (Examinador)	<u>satisfatória</u>	<u>[Assinatura]</u>
Profa. Dra. Cleide Maria da Silva Leite – UNILAB (Examinadora)	<u>Satisfatório</u>	<u>[Assinatura]</u>

**DATA DA AVALIAÇÃO:** 05 de maio de 2017.

**HORÁRIO:** 14:30h

**LOCAL:** Auditório do Núcleo de Pós Graduação (NPG) - UESPI

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ**

**REITOR**

Prof. Dr. José Arimateia Dantas Lopes

**VICE-REITORA**

Profa. Dra. Nadir Nascimento Nogueira

**PRÓ-REITOR DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO**

Prof. Dr. Helder Nunes da Cunha

**DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Prof. Dr. Viriato Campelo

**VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Profa. Dra. Carla Maria de Carvalho Leite

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA  
RENORBIO-UFPI**

Profa. Dra. Carla Eiras

**VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BIOTECNOLOGIA RENORBIO-UFPI**

Prof. Dr. Francisco das Chagas Alves Lima

### ***O Vencedor***

*Olha lá, quem vem do lado oposto  
Vem sem gosto de viver  
Olha lá, que os bravos são  
Escravos são e salvos de sofrer*

*Olha lá, quem acha que perder  
É ser menor na vida  
Olha lá, quem sempre quer vitória  
E perde a glória de chorar  
Eu que já não quero mais ser um vencedor  
Levo a vida devagar pra não faltar amor*

*Olha você e diz que não  
Vive a esconder o coração  
Não faz isso, amigo  
Já se sabe que você  
Só procura abrigo  
Mas não deixa ninguém ver  
Por que será?*

*Eu que já não sou assim  
Muito de ganhar  
Junto as mãos ao meu redor  
Faço o melhor que sou capaz  
Só pra viver em paz.*

---

# ***DEDICATÓRIA***

---

*À toda minha família e em especial à Teresa Bernarda (in memoriam). Você sempre me fez acreditar que eu era a pessoa mais capaz do mundo e apesar da despedida me ensinou a valorizar aquilo que realmente importa na vida.*

*Sinto muitas saudades.*

---

# ***AGRADECIMENTOS***

---

*A Deus, por sempre fortalecer meu espírito diante das adversidades, me tornar mais resiliente e iluminar minha mente tornando possível o término deste trabalho.*

*Aos meus pais, **José Ormano e Margarida Maria** e aos meus irmãos, **Élisson Tadeu e Thaiane Maria**, com imensa gratidão, por todo o apoio, evitando que eu por diversas vezes desistisse desta pesquisa e do curso de doutorado.*

*À minha esposa, **Danielle Yasmin**, por todo o estímulo e compreensão constantes e incondicionais, por estar sempre disposta a discutir comigo o andamento deste projeto, além de todo o carinho nos bons e maus momentos.*

*Ao meu padrinho e minha madrinha, **Orleans e Acinete** por sempre acreditarem no meu potencial e por sempre me incentivarem a procurar ascender como pessoa e profissional.*

*Ao meu orientador, **Prof. Dr. Francisco das Chagas Alves Lima**, pelos esclarecimentos, correções e compromisso com a orientação da minha pesquisa.*

*Ao meu coorientador, **Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira**, por auxiliar na organização da pesquisa e por ter assumido o papel de coorientador deste projeto.*

*Em memória do **Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas**, por toda a ajuda e ensinamentos, que não foram poucos, por todos os experimentos realizados no Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental (LAPNEX). Com certeza as coisas boas vão ficar! Obrigado por tudo professor!*

*Aos **professores da UFPI** que me ajudaram em algum momento do doutorado e que sempre me motivaram a seguir em frente nesta jornada acadêmica, sobretudo ao **Prof. Dr. Stanley Juan Chaves Gutierrez**, “pai das riparinas”, por sempre me ajudar em momentos de dúvida e por contribuir na síntese da riparina A e à **Profa. Dra. Kátia Bonfim Leite de Moura Servulo** e **Profa. MSc. Maria do Socorro Cordeiro Ferreira** por toda a torcida e colaboração na correção do meu texto.*

À **Prof. Dra. Adriana da Rocha Tomé**, da *Universidade Estadual do Ceará (UECE)* pelo auxílio prestado na realização dos ensaios histopatológicos, orientações e contribuições sempre acompanhadas de muito bom humor.

Ao **Prof. Dr. Vicente Galber Freitas Viana**, do *Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí*, por sua cooperação para a execução dos ensaios de microscopia eletrônica de varredura.

Aos meus colegas de doutorado do programa *RENORBIO*, sobretudo, aos amigos de sempre, **Mayara Coelho e Oskar Almeida** por todas as vezes em que discutimos e executamos experimentos, pelos inúmeros desabafos e por sempre me socorrerem nos momentos em que precisei.

Aos alunos de Farmácia da *UFPI* que torceram por mim, em especial aos discentes **Johanssy Oliveira, Layana Farias, Marcelo Júnior e Mário Rezende** pelo interesse no projeto e por participarem diretamente de alguns experimentos. Com certeza eu não concluiria esta importante etapa da minha vida sem a ajuda de vocês!

Ao amigo **Dr. Janyerson Dannys**, pesquisador nato, por compartilhar pensamentos, ouvir, debater e sanar vários dos meus questionamentos e por ser sempre solícito.

Aos amigos farmacêuticos, **Benedito Neto, Pablo Ricardo e Sean Teles** por me auxiliarem principalmente na reta final do meu doutorado, além dos momentos de amizade e descontração.

À *Universidade Federal do Piauí (UFPI)* por propiciar a realização e permitir que eu concluísse um curso desta grandeza perto dos meus amigos e familiares.

À *Farmácia Escola da UFPI* e ao *Núcleo de Tecnologia Farmacêutica da UFPI* pelo apoio técnico e por disponibilizarem a infraestrutura necessária para a execução de parte desta tese.

À *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Piauí (FAPEPI)* pelo auxílio financeiro concedido para a execução deste trabalho.

*À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte fornecido para realização de pesquisas e levantamentos bibliográficos.*

*E a todos que de alguma forma contribuíram, torceram e tornaram possível conclusão exitosa deste estudo, muito obrigado mesmo!*

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>BZP</b>	Benzodiazepínicos
<b>CED</b>	Calorimetria exploratória diferencial
<b>CE<sub>50</sub></b>	Concentração eficaz 50%
<b>CHGM</b>	Concentração de hemoglobina globular média
<b>CI<sub>50</sub></b>	Concentração Inibitória 50%
<b>CONCEA</b>	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
<b>DALYs</b>	<i>Disability-adjusted life years</i>
<b>DFT</b>	Teoria do funcional da densidade
<b>DL<sub>50</sub></b>	Dose letal 50%
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DRX</b>	Difração de raios X
<b>DZP</b>	Diazepam
<b>EDTA</b>	Ácido Etilenodiamino tetra-acético
<b>TEE</b>	Teste de Esconder Esferas
<b>E.P.M.</b>	Erro Padrão da Média
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>FLU</b>	Flumazenil
<b>GABA</b>	Ácido gama-aminobutírico
<b>GABA<sub>A</sub></b>	Receptor gabaminérgico A
<b>GHS</b>	<i>Globally Harmonised System</i>
<b>HGM</b>	Hemoglobina Globular Média
<b>HE</b>	Hematoxilina-eosina
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleucina-1-beta
<b>IV</b>	Espectroscopia de infravermelho
<b>LCE</b>	Labirinto em Cruz Elevado
<b>MEV</b>	Microscopia eletrônica de varredura
<b>MF</b>	Mistura física
<b>NEBA</b>	Número de entradas no braço aberto
<b>NEE</b>	Número de esferas escondidas

<b>NTC</b>	Número de transições entre os compartimentos
<b>OECD</b>	<i>Organisation for Economic Cooperation and Development</i>
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>PDB</b>	<i>Protein Data Bank</i>
<b>P, D&amp;I</b>	Pesquisa, desenvolvimento e inovação
<b>RMN <sup>1</sup>H</b>	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
<b>Rip-A</b>	Riparina A
<b>Rip-A/<math>\beta</math>-CD</b>	Complexo de inclusão obtido por aspersão
<b>REA</b>	Relação estrutura atividade
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>TCE</b>	Teste da caixa claro-escuro
<b>TEE</b>	Teste de esconder esferas
<b>TGO</b>	Transaminase glutâmico-oxalacética
<b>TGP</b>	Transaminase glutâmico-pirúvica
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral alfa
<b>TPBA</b>	Tempo de permanência no braço aberto
<b>TPCC</b>	Tempo de permanência no campo claro
<b>VGM</b>	Volume Globular Médio
<b><math>\Delta G^\circ</math></b>	Energia livre de Gibbs
<b><math>\beta</math>-CD</b>	Betaciclodextrina

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1.	Artigos científicos publicados na última década direcionados para a investigação de atividades centrais das riparinas.	29
Tabela 2.	Efeitos da administração aguda da riparina A no <i>screening</i> hipocrático durante 14 dias de observação.	55
Tabela 3.	Efeitos da administração aguda da riparina A em parâmetros fisiológicos de camundongos segundo o protocolo de toxicidade OECD 423.	56
Tabela 4.	Parâmetros hematológicos e bioquímicos de camundongos Swiss tratados com riparina A segundo o protocolo de toxicidade aguda da OECD diretriz 423.	57
Tabela 5.	Efeito da administração oral aguda da riparina A sobre o peso relativo do fígado, baço, rins e cérebro de camundongos 14 dias após o tratamento.	58
Tabela 6.	Valores de energia livre de Gibbs ( $\Delta G^\circ$ ) e da constante de inibição ( $K_i$ ) da riparina A e do diazepam obtidos na interação com o receptor GABA <sub>A</sub> .	64

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1.	Reação de Schotten-Bauman para síntese das riparinas A-F.	22
Figura 2.	Estrutura química das riparinas.	28
Figura 3.	Esquema resumitivo do processo de P,D&I de fármacos.	32
Figura 4.	Reação de síntese da riparina A.	42
Figura 5.	Gaiolas metabólicas para camundongos.	43
Figura 6.	Procedimento para determinação da toxicidade aguda da riparina A conforme OECD diretriz 423.	44
Figura 7.	Esquema de tratamento e modelos comportamentais.	45
Figura 8.	Ilustração do <i>spray-drying</i> (a) e do complexo de inclusão obtido por aspersão (b).	48
Figura 9.	Avaliação do tratamento com Tween 80 3% (10 mL Kg <sup>-1</sup> ) no baço (a), hipocampo (b), fígado (c) e rim (d) de camundongos Swiss adultos conforme protocolo OECD 423.	58
Figura 10.	Avaliação do tratamento com riparina A no baço (a), hipocampo (b), fígado (c) e rim (d) de camundongos Swiss adultos na dose de 300 mg kg <sup>-1</sup> (Rip-A 300) conforme protocolo OECD 423.	59
Figura 11.	Avaliação do tratamento com riparina A no baço (a), hipocampo (b), fígado (c) e rim (d) de camundongos Swiss adultos na dose de 2000 mg kg <sup>-1</sup> (Rip-A 2000) conforme protocolo OECD 423.	60
Figura 12.	Efeitos da riparina A em camundongos no teste do labirinto em cruz elevado.	61
Figura 13.	Efeitos da riparina A em camundongos no teste da caixa claro/escuro.	62
Figura 14.	Efeitos da riparina A em camundongos no teste de esconder esferas.	63
Figura 15.	Sítios de ligação da riparina A no receptor GABA <sub>A</sub> nas suas três conformações mais estáveis.	64
Figura 16.	Interações moleculares das principais conformações da riparina A no receptor GABA <sub>A</sub> .	65
Figura 17.	Varredura espectrofotométrica UV-Vis da Rip-A.	66
Figura 18.	Diagrama de solubilidade de fase de β-CD com Rip-A.	67
Figura 19.	Perfil de dissolução da Rip-A livre, MF e Rip-A/β-CD.	67

Figura 20.	Curva de calorimetria exploratória diferencial da Rip-A (a), $\beta$ -CD (b), MF (c) e Rip-A/ $\beta$ -CD (d).	68
Figura 21.	Difratograma de raios X da Rip-A (a), $\beta$ -CD (b), MF (c) e Rip-A/ $\beta$ -CD (d).	68
Figura 22.	Espectro de IV da Rip-A (a), $\beta$ -CD (b), MF (c) e Rip-A/ $\beta$ -CD (d).	69
Figura 23.	Espectros de RMN $^1\text{H}$ da $\beta$ -CD (a) e Rip-A/ $\beta$ -CD (b) em DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> (500 MHz).	70
Figura 24.	Dados dos espectros de RMN $^1\text{H}$ da $\beta$ -CD e Rip-A/ $\beta$ -CD.	71
Figura 25.	Fotografias de MEV da Rip-A (A e B), $\beta$ -CD (C e D), MF (E e F) e Rip-A/ $\beta$ -CD (G e H).	72
Figura 26.	Citotoxicidade da Rip-A livre e do complexo Rip-A/ $\beta$ -CD em <i>Artemia salina</i> após 24h de incubação.	73
Figura 27.	Estrutura molecular do receptor GABA <sub>A</sub> .	80
Figura 28.	Perfis de solubilidade de Higuchi e Connors.	83

**ARAÚJO, E.J.F. Avaliação pré-clínica dos efeitos toxicológicos agudos e ansiolíticos da riparina A e complexação com  $\beta$ -ciclodextrina.** 108p, 2017. Orientador: Prof. Dr. Francisco das Chagas Alves Lima. Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia. Rede Nordeste de Biotecnologia, RENORBIO. Universidade Federal do Piauí, UFPI, Teresina-Piauí.

## RESUMO

A N-(2-feniletil)benzamida ou riparina A (Rip-A) consiste em um derivado sintético das riparinas naturais extraídas da *Aniba riparia* (Nees) Mez, amidas caracterizadas por possuírem relevante atividade central. A presente tese buscou realizar a avaliação pré-clínica da toxicidade aguda e atividade ansiolítica da riparina A, assim como, obter e caracterizar o complexo de inclusão da referida substância com betaciclodextrina ( $\beta$ -CD). Foi realizada a síntese da riparina A mediante a reação de Schotten-Bauman seguido da execução do teste agudo de classe da *Organization for Economic Cooperation and Deveolpment*, diretriz n° 423 e avaliação dos seus efeitos bioquímicos, hematológicos e histopatológicos nas doses de 300 e 2000 mg kg<sup>-1</sup> em camundongos adultos linhagem Swiss. Procedeu-se com a investigação da atividade ansiolítica da Rip-A nos modelos animais clássicos do labirinto em cruz elevado (LCE), caixa claro-escuro (TCE) e do teste de esconder esferas (TEE) nas doses de 50, 100 e 200 mg kg<sup>-1</sup> seguido da elucidação das interações envolvidas com receptor farmacológico GABA<sub>A</sub> mediante estudo de docagem molecular. Por fim, foi obtido o complexo de inclusão Rip-A/ $\beta$ -CD por *spray-drying*, caracterizando-o através de diagrama de solubilidade de fases de Higuchi e Connors, estudo de solubilidade, análise térmica por calorimetria exploratória diferencial (CED), difração de raios X (DRX), espectroscopia de infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN <sup>1</sup>H) e microscopia eletrônica de varredura (MEV), além da verificação comparativa da atividade citotóxica artemicida da Rip-A isolada e do complexo de inclusão. O tratamento agudo com a Rip-A não causou sinais de toxicidade no *screening* hipocrático e não provocou mortes. A substância foi classificada como categoria 5, segundo *Globally Harmonised System*, com baixa toxicidade e DL<sub>50</sub> superior a 2000 mg kg<sup>-1</sup>. Houve elevação nos níveis de triglicerídeos e alterações histopatológicas no fígado e nos rins dos roedores envolvidos no estudo de toxicidade, com presença de degeneração hidrópica, esteatose, congestão vascular e trombos em ambos os grupos tratados e ausência de alterações hematológicas. A atividade ansiolítica foi preponderante com a dose de 200 mg kg<sup>-1</sup> com elevação no tempo de permanência nos braços abertos do LCE, aumento no número de transições entre os compartimentos no TCE e redução no total de esferas escondidas no TEE. O estudo *in silico* indicou que a Rip-A interage em sítio de ligação que envolve a subunidade  $\beta_1$  do receptor GABA<sub>A</sub> com participação do resíduo de aminoácido Tyr87, diferentemente do diazepam. A complexação, por sua vez, mostrou-se mais eficaz com a metodologia da secagem por aspersão o que gerou aumento da hidrossolubilidade da Rip-A e diagrama de solubilidade do tipo A<sub>L</sub>. A complexação foi constatada pela redução do pico endotérmico a 116,2°C na curva de CED, redução do sinal de ângulo 2 $\theta$  em 12,6° na análise por DRX, redução dos picos a 1544 cm<sup>-1</sup>, 2850 cm<sup>-1</sup> e 3344 cm<sup>-1</sup> na análise por IV e variação do deslocamento químico do H<sub>3</sub> da  $\beta$ -CD no espectro de RMN <sup>1</sup>H. O complexo tem morfologia distinta do aspecto cristalino da Rip-A livre e apresentou superior atividade artemicida (CI<sub>50</sub> de 117,2  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) devido melhor solubilidade da preparação. Os resultados obtidos corroboram a baixa toxicidade e a ação central da Rip-A, além de abrirem perspectivas para novas pesquisas nas áreas de farmacologia e de tecnologia farmacêutica com as riparinas complexadas.

**Palavras-chave:** aniba, ansiolítico, complexação, pré-clínico, riparina, toxicidade.

**ARAÚJO, E.J.F. Preclinical evaluation of the acute and anxiolytic toxicological effects of riparin A and its complexation with  $\beta$ -cyclodextrin.** 108p, 2017. Advisor: Prof. Dr. Francisco das Chagas Alves Lima. Doctoral thesis. Postgraduate Program in Biotechnology. Northeast Network in Biotechnology, RENORBIO. Federal University of Piauí, UFPI, Teresina-Piauí.

### ABSTRACT

N-(2-phenylethyl) benzamide or riparin A (Rip-A) consists of a synthetic derivative of the natural riparins extracted from *Aniba riparia* (Nees) Mez. These amides are characterized by having relevant central activity. The present thesis aimed to perform the preclinical evaluation of the acute toxicity and anxiolytic activity of Rip-A, and the obtention and characterization of the inclusion complex formed by this substance and beta-cyclodextrin ( $\beta$ -CD). The synthesis of Rip-A was made by the Schotten-Bauman reaction followed by the performance of the acute class test from the Organization for Economic Cooperation and Development, Guideline No. 423. It was evaluated the biochemical, hematological and histopathological effects at the doses of 300 and 2000 mg kg<sup>-1</sup> in adult mice of Swiss strain. Then, it was made the investigation of Rip-A anxiolytic activity by the elevated plus maze test (EPM), light/dark box test (LDB) and marble burying test (MB). These tests were made at the doses of 50, 100 and 200 mg kg<sup>-1</sup> followed by elucidation of the interactions involved with the pharmacological receptor GABA<sub>A</sub> through molecular docking study. Finally, it was obtained the Rip-A/ $\beta$ -CD inclusion complex by spray drying. *Its characterization was made by* phase solubility diagram of Higuchi and Connors, dissolution profile, differential scanning calorimetry (DSC), X-ray diffraction (XRD), Infrared spectroscopy (IR), Proton Nuclear Magnetic Resonance (<sup>1</sup>H NMR), and Scanning Electron Microscopy (SEM). In addition, it was made a comparative verification of the artemicidal property of the isolated Rip-A and the inclusion complex. The acute treatment with Rip-A showed no signs of toxicity in the hippocratic screening and caused no deaths. The substance was classified as category 5, according to the Globally Harmonized System, with low toxicity and LD<sub>50</sub> above 2000 mg kg<sup>-1</sup>. There were elevations in triglyceride levels and histopathological alterations in the liver and kidneys of the mice involved in the toxicity study. It was found hydropic degeneration, steatosis, vascular congestion and thrombi in both treated groups and absence of hematological alterations. The anxiolytic activity was predominant at the dose of 200 mg kg<sup>-1</sup> with increase of the time spent in the open arms of EPM, increase in the number of transitions between compartments of the LDB, and decrease in the number of hidden spheres in the MB. The *in silico* study indicated that the Rip-A interacts at a binding site that involves the  $\beta$ 1 subunit of the GABA<sub>A</sub> receptor with participation of the Tyr87 amino acid residue, unlike diazepam. The complexation was shown to be more efficient by the spray-drying methodology, which increased the water solubility of Rip-A with type solubility diagram A<sub>L</sub>. The complexation was confirmed by reduction of the endothermic peak at 116.2 °C in the DSC curve, reduction of the angle signal  $2\theta$  in 12.6° in the XRD analysis, reduction of the peak at 1544 cm<sup>-1</sup>, 2850 cm<sup>-1</sup> and 3344 cm<sup>-1</sup> in the IR analysis, and variation of chemical displacement in H<sub>3</sub> of  $\beta$ -CD in the <sup>1</sup>H NMR spectrum. The complex presented distinct crystalline morphology of free Rip-A and higher artemicidal activity (CI<sub>50</sub> of 117.0  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) due to its better solubility. The obtained results confirm the low toxicity and the central action of Rip-A. These findings create prospects for new research in the areas of pharmacology and pharmaceutical technology with the complexed riparins.

**Key words:** aniba, anxiolytic, complexation, preclinical, riparin, toxicity.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>21</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>27</b>
2.1	<i>Aniba riparia</i> (Nees) Mez e as riparinas .....	27
2.2	Pesquisa, desenvolvimento e inovação de fármacos .....	31
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>39</b>
3.1	Objetivo geral .....	40
3.2	Objetivos específicos .....	40
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>41</b>
4.1	Obtenção da riparina A .....	42
4.2	Toxicidade aguda da riparina A .....	42
4.3	Avaliação comportamental da riparina A .....	45
4.3.1	<i>Teste do labirinto em cruz elevado</i> .....	46
4.3.2	<i>Teste da caixa claro-escuro</i> .....	46
4.3.3	<i>Teste de esconder esferas</i> .....	47
4.4	Estudo de docagem molecular .....	47
4.5	Obtenção do complexo de inclusão da riparina A com betaciclodextrina .....	48
4.5.1	<i>Mistura física da riparina A com betaciclodextrina</i> .....	48
4.5.2	<i>Complexo de inclusão obtido por aspersão</i> .....	48
4.6	Caracterização do complexo de inclusão da riparina A com betaciclodextrina ..	49
4.6.1	<i>Diagrama de solubilidade de fases</i> .....	49
4.6.2	<i>Estudo de dissolução</i> .....	49
4.6.3	<i>Calorimetria diferencial exploratória</i> .....	49
4.6.4	<i>Difração de raios X</i> .....	50
4.6.5	<i>Espectroscopia de infravermelho</i> .....	50
4.6.6	<i>Espectroscopia magnética nuclear de hidrogênio</i> .....	50
4.6.7	<i>Microscopia eletrônica de varredura</i> .....	50
4.7	Atividade citotóxica da riparina A e complexo de inclusão Rip-A/ $\beta$ -CD .....	50
4.8	Análise estatística .....	51

<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>54</b>
5.1	Toxicidade aguda da riparina A .....	55
5.2	Efeitos comportamentais da riparina A .....	60
5.3	Estudo de docagem molecular .....	63
5.4	Caracterização do complexo de inclusão Rip-A/ $\beta$ -CD .....	66
5.5	Atividade citotóxica <i>in vitro</i> .....	73
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>74</b>
<b>7</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>91</b>
<b>8</b>	<b>PRODUÇÃO CIENTÍFICA</b> .....	<b>93</b>

## INTRODUÇÃO

Muitas áreas estão envolvidas na pesquisa de novas opções terapêuticas para o combate às doenças crônicas degenerativas. No Brasil, são inúmeros os trabalhos realizados na área de fitoquímica visando o isolamento, purificação e caracterização de princípios ativos. Entretanto, devido às baixas concentrações dessas substâncias no meio natural, a obtenção de formas sintéticas representa uma alternativa para viabilizar o desenvolvimento sustentável de produtos farmacêuticos com atributos terapêuticos (FRANÇA et al., 2008; FAUSTINO et al., 2010; MOREIRA et al., 2014).

Atualmente ocorre uma busca intensa por substâncias farmacologicamente ativas ou produtos farmacêuticos autênticos por intermédio de variados estudos químicos, farmacológicos, farmacotécnicos, de tecnologia farmacêutica e biotecnologia. Como ferramenta alternativa, a química computacional pode contribuir para a completa elucidação estrutural e compreensão de grupos farmacofóricos responsáveis pelo mecanismo de ação dos fármacos. Além disso, a utilização de complexos de inclusão e sistemas de vetorização que permitem melhorar a solubilidade, a biodisponibilidade e os efeitos terapêuticos de moléculas ativas são exemplos de recursos tecnológicos úteis na pesquisa e desenvolvimento de novas opções terapêuticas mais seguras e eficazes (ANSEL et al., 2000; LIMA, 2007).

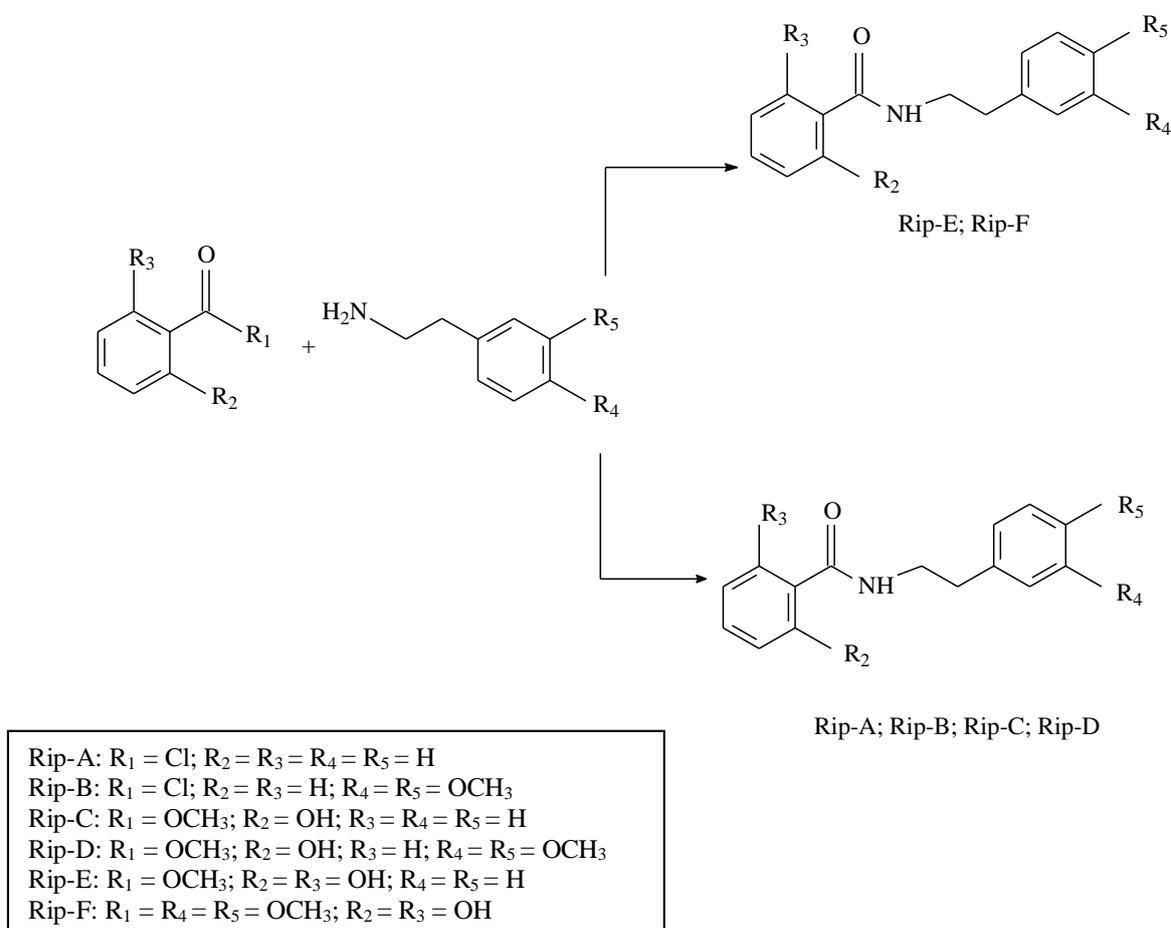
Esses diversos tipos de aprimoramentos farmacêuticos geralmente convergem com a finalidade de propiciar melhorias nas terapias que já vem sendo instituídas para os mais diversos agravos que assolam a sociedade contemporânea. Existe, desta forma, um interesse crescente em novos produtos que possam se tornar alternativas para tratamento de doenças infecciosas, imunossupressão, doenças metabólicas, câncer e distúrbios do Sistema Nervoso Central (SNC) (MACIEL et al., 2002; FILHO, 2006).

Outra vertente muito importante na avaliação de fármacos e no desenvolvimento de medicamentos consiste na avaliação das suas propriedades toxicológicas. Estudos com animais geram informações que tornam possível antever efeitos adversos de medicamentos, cosméticos, alimentos e derivados vegetais previamente à exposição de seres humanos em estudos clínicos. A observação do consumo de alimentos e variação de peso corporal, produção de excretas, de parâmetros bioquímicos, hematológicos e histopatológicos permite realizar uma análise preliminar da toxicidade pré-clínica em protocolos experimentais agudos, subcrônicos ou crônicos (STEINBERG, 1987; BRITO, 1994; DAVINO; BARROS, 2003).

Nesse contexto, a *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae), espécie popularmente conhecida como “louro” consiste em uma planta medicinal de ocorrência amazônica típica. Dos frutos verdes dessa espécie vegetal foram isolados alcaloides, do tipo alcanidas, denominados riparinas (I, II e III), que em estudos farmacológicos apresentaram atividades ansiolíticas e anticonvulsivantes, com menos efeitos colaterais que os medicamentos clássicos utilizados para esses fins, tendo em vista que não causam prejuízo motor ou sedação. A família Lauraceae engloba um número expressivo de plantas medicinais que são alvo de uma vasta exploração, o que as torna susceptíveis a sofrer processo de extinção em um futuro próximo (VIEIRA et al., 1997; LEITE, 2008).

Uma alternativa para novas pesquisas foi apresentada por Gutierrez (2006), com a obtenção de derivados estruturais sintéticos das riparinas naturais, denominados riparinas A, B, C, D, E e F (Rip-A, Rip-B, Rip-C, Rip-D, Rip-E e Rip-F) por meio da reação de Schotten-Bauman (Figura 1).

**Figura 1.** Reação de Schotten-Bauman para síntese das riparinas A-F.



Fonte: adaptado de Gutierrez, 2006.

A riparina A (Rip-A), por sua vez, demonstrou recentemente resultados promissores em estudos neurofarmacológicos pré-clínicos com modelos experimentais de avaliação da atividade locomotora espontânea de roedores e em ensaios antioxidantes indicando ser detentora de propriedade neuroprotetora antioxidante central sem causar prejuízos ao tônus muscular dos animais (NUNES et al., 2014; 2015). É notório o grande número de publicações com as riparinas naturais na caracterização das suas potencialidades farmacológicas. Entretanto, poucas pesquisas foram realizadas com as riparinas sintéticas, principalmente, para avaliar sua toxicidade. Dessa forma, essas moléculas surgem com a possibilidade de se tornarem novos fármacos centrais para a terapêutica da ansiedade, depressão ou epilepsia com menores reações adversas do que as drogas usuais (MELO et al., 2013; NUNES et al., 2013).

Dentre os transtornos psicossociais mais incidentes, a ansiedade consiste em um estado patológico de medo ou de vago sentimento de apreensão associado a situações de estresse, de perigo ou a outros estados patológicos. Esta condição em nível exacerbado exige intervenção farmacológica para tratamento e controle (CASTILLO et al., 2000). Machado-Alba e colaboradores (2015) afirmam que atualmente, os psicofármacos estão entre os medicamentos mais consumidos na América Latina, principalmente, os antidepressivos e os ansiolíticos, corroborando os dados de outros levantamentos que citam a depressão e a ansiedade como distúrbios mentais mais prevalentes no mundo (CHAKI et al., 2015).

O *Global Disease Burden* publicado em 2001 já elencava os transtornos mentais entre as 10 principais causas de incapacitação da população mundial. Seguindo esse panorama, no Brasil, os transtornos mentais estão entre os principais motivadores de concessão de benefícios previdenciários, sendo superados apenas por causas externas e doenças osteoarticulares (OMS, 2010; GAVIN, 2013). Estima-se que os problemas de caráter psicológico sejam responsáveis por 21,5% dos anos de vida perdidos ajustados por incapacidade (*Disability-adjusted life years – DALYs*) entre a população brasileira. Dados epidemiológicos ratificam a alta prevalência nacional de perturbações mentais que acometem, principalmente, indivíduos adultos, do sexo feminino e que compõem a população economicamente ativa com índices que variam de 20 a 56% o que justifica o fato da Organização Mundial da Saúde (OMS) enquadrar os estudos relacionados à saúde mental entre as prioridades para pesquisa em saúde no Brasil (OMS, 2009; 2014).

Assim, demonstra-se a relevância da busca por novos tratamentos para a ansiedade. Para tanto, modelos animais são bastante utilizados para subsidiar o desenvolvimento de novas opções em neurofarmacologia (GOMES et al., 2013; RÉUS et al., 2014). Neste caso, os ensaios do labirinto em cruz elevado, caixa claro-escuro, placa perfurada, campo aberto, barra giratória

e o teste de esconder esferas são classicamente empregados em vários estudos de avaliação do efeito ansiolítico de substâncias com atividade sobre o SNC de roedores, a fim de, fornecer subsídios para a investigação dos mecanismos neurobiológicos da patologia e da ação de novos candidatos a fármacos ansiolíticos para a posterior realização de ensaios clínicos racionais padronizados em seres humanos (CRUZ; LANDEIRA-FERNANDEZ, 2012; MOREIRA et al., 2014; MOKROV et al., 2015).

Logo, a presente tese visa realizar um estudo experimental e teórico da avaliação pré-clínica das propriedades toxicológicas da N-(2-feniletil)benzamida (riparina A) com ênfase nos seus efeitos ansiolíticos em camundongos, assim como realizar a obtenção e caracterização de um produto tecnológico viável derivado da riparina A a partir da sua complexação com betaciclodextrina.

## Referências

ANSEL, H.C. et al. **Farmacotécnica: Formas Farmacêuticas & Sistemas de Liberação de Fármacos**. São Paulo: Editorial Premier, 2000

BRITO, A.S. **Manual de ensaios toxicológicos *in vivo***. Campinas: Editora UNICAMP, 1994.

CASTILLO, A.R.G.L. et al. Transtornos de ansiedade. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v.22, Supl II, p. 20-23, 2000.

CHAKI, S. et al. Antidepressant/anti-anxiety potential and adverse effect liabilities of melanin-concentrating hormone receptor 1 antagonists in animal models. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, V. 135, p. 154-168, 2015.

CRUZ, A.P.M.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Modelos animais de ansiedade e o estudo experimental de drogas serotoninérgicas. In: LANDEIRA-FERNANDEZ, J; FUKUSIMA, S.S. **Métodos em Neurociências**. São Paulo: Manole, p. 192-217, 2012.

DAVINO, S.C.; BARROS, S.B.M. Avaliação da Toxicidade. In: OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**. 2ª ed. São Paulo: Ed. Atheneu, p. 57-67, 2003.

FAUSTINO, T.T. et al. Plantas medicinais no tratamento do transtorno de ansiedade generalizada: uma revisão dos estudos clínicos controlados. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 32, n.4, p. 429-436, 2010.

FILHO, S.B. **Pesquisa e desenvolvimento de fármacos no Brasil: estratégias de fomento**. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP. São Paulo, 2006.

FRANÇA, I.S.X. et al. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 61, n. 2, p. 201-208, 2008.

GAVIN, R.S. **Depressão, estresse e ansiedade: um enfoque sobre a saúde mental do trabalhador.** Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2013.

GOMES, V.C. et al. Behavioral evaluation of eighth rat lines selected for high and low anxiety-related responses. **Behavioural Brain Research**, v. 257, p.39-48, 2013.

GUTIERREZ, S.J.C. **Síntese do Bowdenol, um dihidrobenzofuranoide isolado de Bowdichia virgilioides e preparação de derivados da Riparina isolada de Aniba riparia com potencial atividade biológica.** Tese (Doutorado). Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2006.

LEITE C. P. **Avaliação dos efeitos farmacológicos de (o-metil)-n-2-hidroxi-benzoil tiramina (riparina II) de Aniba riparia (nees) mez (lauraceae) em modelos comportamentais de ansiedade e depressão em camundongos.** Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2008.

LIMA, L. M. Química medicinal moderna: desafios e contribuição brasileira. **Química Nova**, p. 1456-1468, v. 30, n.6, 2007.

MACHADO-ALBA, J.E.; ALZATE-CARVAJAL, V.; JIMENEZ-CANIZALES, C.E. Tendencias de consumo de medicamentos ansiolíticos e hipnóticos em una población colombiana, 2008-2013. **Revista Colombiana de Psiquiatria**, v.44, n.2, p. 93-99, 2015.

MACIEL, M.A.M. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, p. 429-438, 2002.

MELO, C.T.V. et al. Evidence for the involvement of the serotonergic, noradrenergic, and dopaminergic systems in the antidepressant-like action of riparin III obtained from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 27, p. 104-112, 2013.

MOREIRA, M.R.C. et al. Anxiolytic-like effects and mechanism of (-)-myrtenol: A monoterpene alcohol. **Neuroscience Letters**, v. 579, p. 119-124, 2014.

MOKROV, G.V. et al. Design, synthesis and anxiolytic-like activity of 1-arylpyrrolo[1,2-a]pyrazine-3-carboxamides. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 23, p.3368-3378, 2015.

NUNES, G.B.L. et al. Prospecção científica e tecnológica da *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae). **Cadernos de prospecção**, v.6, n.4, p. 447-458, 2013.

NUNES, G.B.L. et al. *In vitro* antioxidant and cytotoxic activity of some synthetic riparin-derived compounds. **Molecules**, v. 19, p. 4595-4607, 2014.

NUNES, G.B.L. et al. Behavioral tests and oxidative stress evaluation in mitochondria isolated from the brain and liver of mice treated with riparin A. **Life Sciences**, v.121, p. 57-64, 2015.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). World Organization of Family Doctors - WONCA. **Integração da saúde mental nos cuidados de saúde primários: uma perspectiva global.** Lisboa: World Health Organization, WONCA, 2009.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **World health statistics**. Geneva: World Health Organization, 2014.

RÉUS, G.Z. et al. Animal models of social anxiety disorder and their validity criteria. **Life Sciences**, v. 114, p. 1-3, 2014.

STEINBERG, M. The Use of Traditional Toxicologic Data in Assessing Neurobehavioral Dysfunction. **Neurotoxicology and Teratology**, v.9, p.403-409, 1987.

VIEIRA, C.M. et al. **Espécies de interesse conservacionista da Reserva Ecológica de Macaé de Cima**. Rio de Janeiro: Instituto de pesquisas do Jardim botânico do Rio de Janeiro, p. 297-306, 1997.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 *Aniba riparia* (Nees) Mez e as riparinas

A *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae), destaca-se por ser uma espécie pertencente a uma família com ampla importância medicinal. Várias pesquisas já foram divulgadas quanto aos efeitos farmacológicos das espécies do gênero *Aniba*, como por exemplo, a ação antiparasitária de *A. canelilla*, *A. duckei* e *A. hastmanniana*, os efeitos antiespasmódicos de *A. canelilla*, atividade antifúngica e sedativa de *A. rosaeodora* e ação larvicida de *A. duckei*. A *A. riparia*, por sua vez, possui como destaque efeitos centrais e antimicrobianos obtidos a partir de extratos hidroalcoólicos dos frutos e das flores cuja atividade farmacológica encontra-se relatada na literatura científica a partir de registros etnofarmacológicos. Conhecida popularmente como “louro” esta planta medicinal tem ocorrência típica da Amazônia e Guianas, podendo se estender para os Andes, montanhas do norte da Venezuela e regiões leste e sul do Brasil (MARQUES, 2001; SOUSA et al., 2008; AMAZONAS, 2012).

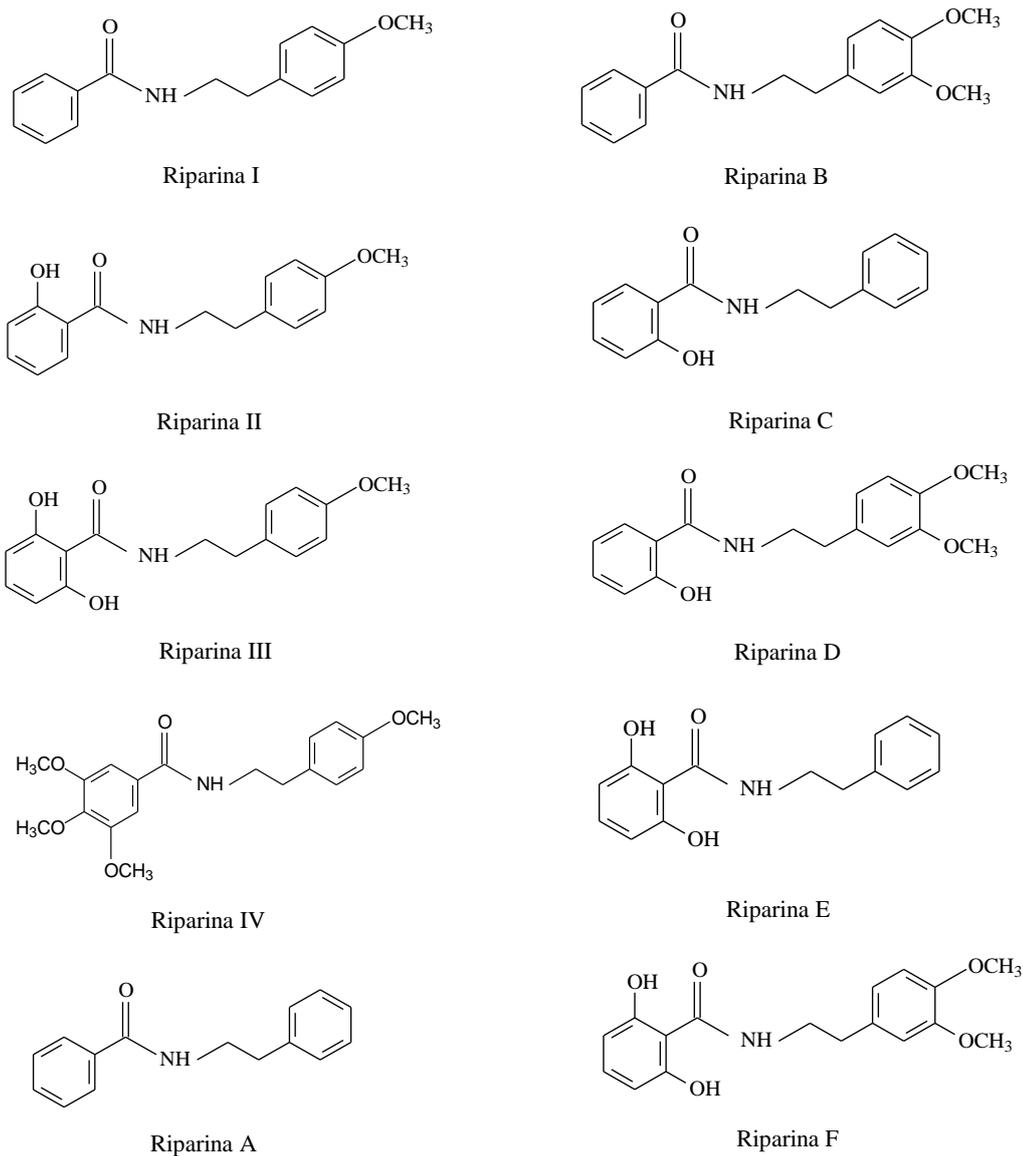
Existe grande relevância científica para alcalóides contendo a função alcalamida extraídos da *A. riparia*. Estas substâncias, feniletilamidas do ácido benzoico, encontram-se presentes no fruto verde da planta e após sua extração, isolamento e caracterização foram denominadas de riparinas I, II e III. A partir de análises fitoquímicas do vegetal foram encontrados também flavonoides, benzoilbenzoatos, benzaldeídos, neoglicanas, além de O-metiltiramina, principalmente nas cascas do caule da planta. Posteriormente, houve a obtenção da riparina IV, análogo sintético das riparinas naturais com mesmo núcleo estrutural (FERNANDES et al., 1978; FRANÇA et al., 1976; BARBOSA-FILHO et al., 1987; DIAS, 2012).

Diante das descrições científicas de bioatividade dos compostos naturais e/ou do análogo sintético derivado da *A. riparia* e em meio à busca por novas alternativas para o tratamento de doenças com grande impacto na saúde pública, Gutierrez (2006) obteve novos derivados das riparinas, denominados riparinas A e B e a partir da condensação de ésteres metílicos com as feniletilaminas substituídas, sintetizou as riparinas C, D, E e F (Figura 2). Esses novos derivados das riparinas podem ser preparados utilizando metodologia fundamentada na reação de Schotten-Bauman.

Essas substâncias apresentam algumas atividades farmacológicas comprovadas em estudos pré-clínicos como, por exemplo, a presença de ação ansiolítica e antidepressiva (riparinas I, II e III), efeito antinociceptivo (riparinas I e IV), efeito antimicrobiano bactericida (riparina III) ou bacteriostático contra cepas de *Staphylococcus aureus* (riparinas I e II), além

de, atividades antioxidante, anti-inflamatória e imunomoduladora (riparina A) (CASTELO-BRANCO et al., 2000; CATÃO et al., 2005; SOUSA et al., 2004; SOUSA, et al., 2005; MELO et al., 2006; SOUSA et al., 2007; LEITE, 2008; ARAÚJO et al., 2009; MELO et al., 2013; TEIXEIRA et al., 2013; SILVA et al., 2015).

**Figura 2.** Estrutura química das riparinas.



Fonte: arquivo pessoal.

A prospecção realizada por Araújo e colaboradores (2016) elenca as principais pesquisas envolvendo o estudo de atividades centrais das riparinas realizadas na última década (Tabela 1). A literatura científica enaltece a presença de efeitos relacionados ao Sistema Nervoso Central (SNC) de roedores com destaque para os efeitos ansiolíticos das riparinas

naturais (I, II e III). As riparinas naturais em todos os estudos realizados provocaram o aumento do número de entradas e do tempo de permanência dos roedores nos braços abertos do labirinto em cruz elevado, sem modificar o tônus muscular dos animais no teste do campo aberto ou o número de quedas no teste da barra giratória.

**Tabela 1.** Artigos científicos publicados na última década direcionados para a investigação de atividades centrais das riparinas.

Autor/Ano	Título	Periódico
Sousa et al., 2005.	Antianxiety effects of <b>riparin I</b> from <i>Aniba riparia</i> (Nees) Mez (Lauraceae) in mice.	<i>Phytotherapy Research</i>
Melo et al., 2006.	Anxiolytic-like effects of ( <i>O</i> -methyl)- <i>N</i> -2,6-dihydroxybenzoyl-tyramine ( <b>riparin III</b> ) from <i>Aniba riparia</i> (Nees) Mez (Lauraceae) in mice.	<i>Biological and Pharmaceutical Bulletin</i>
Sousa et al., 2007.	Evaluation of effects of <i>N</i> -(2-hydroxybenzoyl) tyramine ( <b>riparin II</b> ) from <i>Aniba riparia</i> (Nees) Mez (Lauraceae) in anxiety models in mice.	<i>Biological and Pharmaceutical Bulletin</i>
Melo et al., 2013.	Evidence for the involvement of the serotonergic, noradrenergic, and dopaminergic systems in the antidepressant-like action of <b>riparin III</b> obtained from <i>Aniba riparia</i> (Nees) Mez (Lauraceae) in mice.	<i>Fundamental &amp; Clinical Pharmacology</i>
Teixeira et al., 2013.	Antidepressant-like effect of <b>riparin II</b> from <i>Aniba riparia</i> in mice: evidence for the involvement of the monoaminergic system.	<i>Fundamental &amp; Clinical Pharmacology</i>
Sousa et al., 2014.	Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of <b>riparin I</b> from <i>Aniba riparia</i> (Nees) Mez (Lauraceae) in mice.	<i>Fundamental &amp; Clinical Pharmacology</i>
Nunes et al., 2015.	Behavioral tests and oxidative stress evaluation in mitochondria isolated from the brain and liver of mice treated with <b>riparin A</b> .	<i>Life Sciences</i>
Vasconcelos et al., 2015.	Subchronic administration of <b>riparin III</b> induces antidepressive-like effects and increases BDNF levels in the mouse hippocampus.	<i>Fundamental &amp; Clinical Pharmacology</i>

Fonte: Araújo et al., 2016.

Além das riparinas naturais, a Rip-A também demonstrou em modelos comportamentais que não promove comprometimento motor e não possui ação sedativa o que sugere menores efeitos adversos se comparados, por exemplo, com os benzodiazepínicos, fármacos classicamente utilizados no tratamento da ansiedade mas que podem promover sedação e astenia (SOUSA et al., 2007; NUNES et al., 2015).

Entretanto as riparinas, de modo geral, carecem de resultados seguros e consistentes que viabilizem o delineamento e a exploração comercial de produtos farmacêuticos que as contenham como princípios ativos. Assim, tendo em vista que as riparinas naturais têm potencial terapêutico e a necessidade da realização de estudos sustentáveis, é importante proceder com novas triagens das possíveis atividades farmacológicas, sobretudo centrais, e toxicológicas das riparinas sintéticas, iniciando prioritariamente pela riparina A, N-(2-feniletil)benzamida, que consiste na estrutura química fundamental de todas as demais riparinas, pois o que as distinguem são apenas os substituintes nos seus anéis aromáticos laterais (NUNES et al., 2013).

Nesse sentido, a riparina A, demonstrou em estudos recentes que é capaz de aumentar a atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase, e de reduzir os níveis de peroxidação lipídica em mitocôndrias cerebrais de camundongos na dose de 5 mg kg<sup>-1</sup>, sem alterar significativamente o padrão locomotor e o tônus muscular de roedores nos testes do campo aberto e do labirinto em cruz elevado, conforme citado anteriormente para as riparinas naturais. Esses dados indicam que a molécula possui efeitos antioxidantes, propriedade bastante singular quando se trata de fármacos de ação central dado o alto nível de exposição cerebral ao estresse oxidativo, principalmente durante o estabelecimento de doenças neurodegenerativas (NUNES et al., 2015). Além disso, existem relatos de que as riparinas A, B, C, D, E e F possuem atividade antioxidante *in vitro* contra a formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, íon nitrito e radical hidroxila nas concentrações de 1, 5, 10, 25 e 100 µg mL<sup>-1</sup> (NUNES et al., 2014).

No caso da Rip-A, ressalta-se ainda os resultados de Silva e colaboradores (2015) que demonstram a capacidade da substância em reduzir o edema ocasionado pela carragenina na pata de camundongos nas doses de 1, 3 e 10 mg kg<sup>-1</sup>. A riparina também reduziu as contagens de leucócitos e neutrófilos e os níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no fluido peritoneal dos animais com redução do estresse oxidativo ao diminuir significativamente os níveis de peroxidação lipídica corroborando parcialmente os resultados descritos por Nunes e colaboradores (2015).

Entretanto, apesar das atividades farmacológicas promissoras, a Rip-A, carece de estudos que abordem seus efeitos toxicológicos. As informações relacionadas à toxicidade constituem dados relevantes, pois a partir delas têm-se previamente o conhecimento a respeito dos efeitos deletérios de qualquer substância. Trata-se de avaliação preliminar sempre necessária para que ocorra o estudo posterior dos efeitos terapêuticos de futuros fármacos, a fim de, prosseguir com a realização racional e segura de ensaios pré-clínicos e clínicos de

moléculas ativas em modelos animais e em seres humanos, respectivamente (ARAÚJO et al., 2014).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) por meio do seu Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos, estabelece orientações para a condução de estudos de toxicidade aguda e doses repetidas, além dos ensaios de toxicidade reprodutiva, genotoxicidade, carcinogenicidade e toxicocinética. Estes ensaios fundamentam a realização de pesquisas clínicas em seres humanos e foram estabelecidos em conformidade às normas preconizadas pela *Organisation for Economic Cooperation and Development* – OECD (BRASIL, 2013).

Quanto às propriedades toxicológicas da *A. riparia* e das riparinas, existem poucas abordagens quanto aos efeitos deletérios das formas sintéticas frente a diferentes linhagens celulares com a ausência da determinação de valores de dose letal 50% (DL<sub>50</sub>). No que diz respeito às riparinas naturais, o estudo preliminar de Castelo-Branco e colaboradores (2000), indicou que as riparinas I, II e III administradas por via oral (v.o.) não causam a morte de camundongos na dose de 1 g kg<sup>-1</sup>. Da mesma maneira, por via intraperitoneal (i.p), as riparinas I e II também não causaram mortes, enquanto que a riparina III provocou mortes dependentes da dose administrada com DL<sub>50</sub> de 104,2 mg kg<sup>-1</sup>. Além disso, as três riparinas naturais não provocaram alterações no *screening* hipocrático realizado, não modificando as funções centrais, autônomas ou musculares dos roedores, conforme observado posteriormente com a Rip-A.

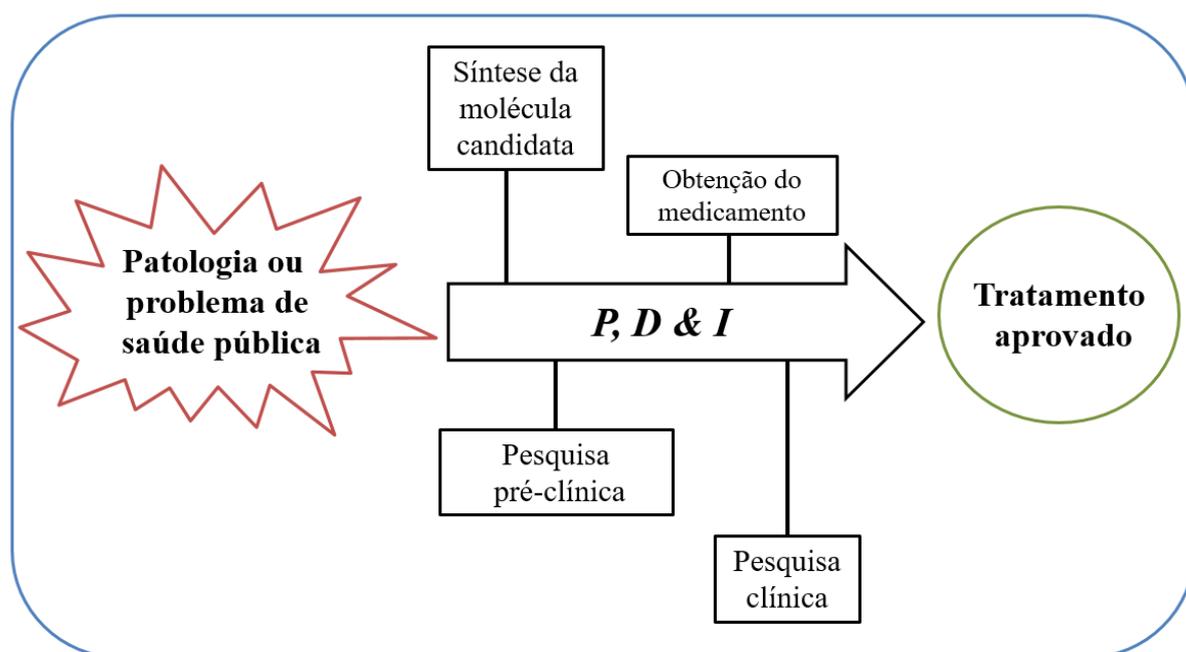
A prospecção científica e tecnológica de Nunes et al., 2013, confirmou o potencial farmacológico da *A. riparia*, ratificando a existência de grande quantidade de estudos quanto às atividades biológicas atribuídas à espécie ou às riparinas. O estudo destaca que apesar da planta ter caráter medicinal e ser utilizada empiricamente ou em indústrias de cosméticos, nenhum produto tecnológico havia sido registrado a partir da *A. riparia* ou das riparinas o que demonstra a possibilidade de maiores avanços na área de pesquisa, desenvolvimento e inovação (P,D&I) em bioprodutos ou medicamentos contendo derivados naturais ou sintéticos do “louro”.

## **2.2 Pesquisa, desenvolvimento e inovação de fármacos**

A pesquisa, desenvolvimento e inovação (P,D&I) consiste na base para o incremento do arsenal terapêutico disponível para as mais variadas necessidades clínicas. A obtenção de um novo medicamento é pautada em um processo longo e oneroso que vai desde a elucidação e o estudo de uma molécula com atividade terapêutica seguido da realização de ensaios pré-clínicos

e clínicos em várias fases, sendo que poucas moléculas que iniciam o processo alcançam a aprovação dos órgãos regulatórios para seu uso como medicamento (Figura 3) (LOMBARDINO; LOWE, 2004; FERREIRA et al., 2009; GUIDO et al., 2010).

**Figura 3.** Esquema resumitivo do processo de P,D&I de fármacos.



Fonte: arquivo pessoal.

Sabe-se que as grandes indústrias farmacêuticas emergiram no mundo de forma preponderante após a segunda guerra mundial. A partir de então incide, acima de tudo no exterior, constantes investimentos visando a descoberta de novas opções terapêuticas e principalmente de novos *blockbusters* para as mais variadas patologias. No Brasil, entretanto, os investimentos em P,D&I ficaram concentrados em laboratórios oficiais, que definham com o passar do tempo, e em laboratórios acadêmicos associados a programas de pesquisa universitários que contribuem para a formação de conhecimento técnico que em raros casos avança para a obtenção de novos medicamentos como foi o caso do anti-inflamatório tópico Acheflan® do Laboratório Aché, lançado em 2004 baseado em estudos acadêmicos realizados com a *Cordia verbenace* (CALIXTO; SIQUEIRA JR., 2008; ZHAO; CHEN, 2009; SACCARO JR, 2011).

A cadeia de inovação engloba a descoberta de novas entidades químicas candidatas a fármacos, assim como, o planejamento racional de novas moléculas. Nesse processo, há grande destaque para as informações obtidas a partir de estudos etnofarmacológicos, de pesquisas

decorrentes da modificação estrutural de moléculas já consagradas com desenvolvimento de fármacos denominados "*me-too*" ou daqueles provenientes de observações ocasionais identificadas no cotidiano ou em avaliações pré-clínicas e clínicas (SIMÕES; SCHENKEL, 2002; BARREIRO; FRAGA, 2005; BARREIRO; FRAGA, 2015).

Na pesquisa básica, os estudos de modelagem e docagem molecular, realizados antes mesmo da síntese da nova droga, representaram um significativo avanço na área da química medicinal para o desenvolvimento racional de fármacos. A criação do *Protein Data Bank* (PDB) juntamente com modelos computacionais de interação fármaco-receptor contribuíram para a comprovação de informações biológicas previamente descritas, para a realização de estudos de relação estrutura-atividade (REA) e de farmacodinâmica, além do planejamento e obtenção de fármacos dotados de maior especificidade. Os ensaios computacionais auxiliam na elucidação dos tipos de interações químicas e resíduos de aminoácidos envolvidos na ação do fármaco, avaliam o tamanho e o formato de grupos farmacofóricos, permitem análises conformacionais e o estudo das energias de ligação entre o fármaco, também denominado ligante e o seu alvo, representado por uma macromolécula de natureza proteica que pode ser o receptor farmacológico ou uma enzima relacionada com a patologia pesquisada (CARVALHO et al., 2003; LIMA, 2007; SANT'ANNA, 2009).

Já na avaliação pré-clínica é importante o estabelecimento prévio do perfil toxicológico do composto bioativo para a partir de então, realizar-se testes de atividade farmacológica. Nessa etapa, ressalta-se as possíveis alterações comportamentais, bioquímicas, fisiológicas e anatomopatológicas ocasionadas em modelos animais e que podem ser utilizadas para relacionar o uso das substâncias testadas com o risco associado à saúde humana (GOMES et al., 2001; LI et al., 2012). Juntamente com essas informações deve-se estabelecer o valor da dose letal 50% (DL<sub>50</sub>). Nesse contexto, o Ministério da Ciência e Tecnologia do Brasil publicou a resolução normativa nº 18 que reconhece métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no país em conformidade com determinações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA (BRASIL, 2014).

Além disso, análises sobre a influência de substâncias ativas no SNC são constantemente realizadas através de experimentos *in vivo*, dos quais se destacam os testes sensoriais, de função motora e neurocomportamentais-cognitivos como por métodos complementares *in vitro*, com o uso de culturas de células neuronais. Há também ensaios de avaliação de modificações qualitativas ou quantitativas das células do sistema nervoso e de componentes endógenos como, por exemplo, de sistemas enzimáticos de defesa antioxidantes,

neurotransmissores e catecolaminas endógenas (ABDULLA; CAMPBELL, 1993; SLIKKER JR; BOWYER, 2005).

Inserido constantemente no ciclo da P,D&I, o delineamento farmacêutico consiste em procedimentos farmacotécnicos envolvidos no desenvolvimento do novo medicamento em consonância com o fármaco obtido. Esta etapa envolve desde a escolha da forma farmacêutica mais apropriada para veicular o princípio ativo estudado até análises de aprimoramento farmacêutico visando incrementar a solubilidade ou a biodisponibilidade da molécula, parâmetros que estão diretamente relacionados com a qualidade de qualquer tratamento, por intermédio de recursos tecnológicos da área farmacêutica como por exemplo, nanocápsulas, micropartículas, lipossomas e complexos de inclusão. A aplicação dessas tecnologias encontra-se em ascensão no cenário científico com artigos publicados e patentes depositadas principalmente para o tratamento do câncer seguido de pesquisas relacionadas ao SNC (SALTÃO; VEIGA, 2001; DIMER et al., 2013).

Assim, após os estudos de elucidação e aprimoramento molecular, triagem pré-clínica e obtenção do produto farmacêutico, inicia-se a etapa clínica envolvendo seres humanos, etapa fundamental para que o novo medicamento supere as fronteiras acadêmicas e experimentais. A pesquisa clínica é classicamente dividida em quatro fases: fase I, que visa caracterizar a posologia e a tolerância ao novo princípio ativo em seres humanos saudáveis; fase II, na qual, baseado nas doses definidas na fase I, realiza-se estudos de farmacocinética em um número maior de indivíduos acometidos com a doença a ser tratada; fase III, em que, busca-se avaliar a eficácia e a segurança a longo prazo e o estabelecimento do perfil terapêutico da molécula e fase IV, que busca a detecção de eventos adversos após registro em órgão regulatório e comercialização (QUENTAL; FILHO, 2006; FERREIRA, 2009).

Apesar dos avanços na P,D&I de medicamentos, países em desenvolvimento ainda apresentam resultados pouco expressivos se comparados com Japão e Estados Unidos, países líderes na incorporação da ciência e tecnologia produzida. Houve, por exemplo, um aumento no número de novas entidades químicas e biotecnológicas autorizadas pelo *Food and Drug Administration* (FDA) passando de 21 fármacos inovadores aprovados em 2010 para 41 em 2014. Além disso, as pesquisas envolvendo questões de saúde pública realizadas nos centros detentores de conhecimento científico devem ser nomeadamente fortalecidas se for considerado o fato do setor farmacêutico movimentar mais de U\$\$ 800 bilhões por ano e do Brasil ser o 6º maior mercado consumidor de medicamentos no mundo. Esses dados ratificam a importância e a necessidade de investimentos maiores e constantes no estudo de novos fármacos no país

bem como da manutenção de parcerias entre governo, laboratórios públicos e privados e instituições de pesquisa (ABDI, 2013; PINTO; BARREIRO, 2013; SANTOS et al., 2015).

## Referências

ABDULA, E.M.; CAMPBELL, I.C. In Vitro Tests of Neurotoxicity. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v.29, p.69-75, 1993.

ABDI, Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial. **Relatório de acompanhamento setorial – análise de nichos estratégicos para indústria de base química e biotecnológica em saúde no Brasil**. Brasília: ABDI, 2013.

AMAZONAS, D.R. **Variabilidade química e atividade antimicrobiana de espécimes indicadas como pau-rosa (*Aniba rosaedora* Ducke) do oeste do Pará**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Oeste do Pará. Santarém, 2012.

ARAUJO, F.L. et al. Antinociceptive effects of (O-methyl)-N-benzoyl tyramine (Riparin I) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v.380, p. 337-344, 2009.

ARAÚJO, É.J.F. et al. Aspectos toxicológicos da planta medicina *Casearia sylvestris* Swartz: revisão de literatura. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, n.3, p.355-361, 2014.

ARAÚJO, É.J.F. et al. Atividades centrais das riparinas para tratamento de transtornos mentais: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Farmácia**, n.97, supl. 45-60, 2016.

BARBOSA-FILHO, J.M. et al. Benzoyl esters and amides, styrylpyrones and neolignans from the fruits of *Aniba riparia*. **Phytochemistry**. v. 26, n. 9, p. 2615-2617, 1987.

BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M. A questão da inovação em fármacos no Brasil: proposta de criação do programa nacional de fármacos (PRONFAR). **Química Nova**, v. 28, supl. S56-S63, 2005.

BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M. **Química medicinal: as bases moleculares da ação de fármacos**. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2015.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia – GESEF. **Guia para condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos**. Brasília (DF), 2013.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. **Resolução normativa nº 18, de 24 de setembro de 2014**. Reconhece métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil, nos termos da Resolução Normativa nº 17, de 03 de julho de 2014, e dá outras providências. DOU. Poder Executivo, Brasília, DF, 25 set. 2014.

CALIXTO, J. B.; SIQUEIRA JÚNIOR, J. M. Desenvolvimento de medicamentos no Brasil: desafios. **Gazeta Médica da Bahia**. Bahia, v.78, supl. 1, p.98-106, 2008.

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

CASTELO-BRANCO, U.V. et al. Preliminary pharmacological studies on three benzoyl amides constituents of *Aniba riparia* (Ness) Mez (Lauraceae). **Acta Farmaceutica Bonarense**, v.19, p.197-202, 2000.

CATAO, R.M.R. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de riparinas sobre cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* multirresistentes. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 37, n. 4, p. 247-249, 2005.

DIAS, M.L. **Atividade antinociceptiva da riparina IV: participação dos receptores TRPV1, TRPM8, receptores glutamaérgicos e do óxido nítrico**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2012.

DIMER, F.A. et al. Impactos da nanotecnologia na saúde: produção de medicamentos. **Química Nova**, v. 36, n. 10, p. 1520-1526, 2013.

FERNANDES, J.B. et al. Chemosystematic implications of flavonoids in *Aniba riparia*. **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 6, p.55-58, 1978.

FERREIRA, F. G. et al. Fármacos: do desenvolvimento à retirada do mercado. **Revista Eletrônica de Farmácia**. Goiás, v. 6, n. 1, p.14-24, 2009.

FRANÇA, N.C. et al. Tri-O-methylgalangin from *Aniba riparia*. **Phytochemistry**. v. 15, p. 572-573, 1976

GOMES, E.C. et al. Plantas medicinais com características tóxicas usadas pela população do município de Morretes, PR. **Revista Visão Acadêmica**, v.2, n.2, p.77-80, 2001.

GUIDO, R.V.C. et al. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Revista Estudos Avançados, São Paulo**, v.24, n.70, p.81-98, 2010.

GUTIERREZ, S.J.C. **Síntese do Bowdenol, um dihidrobenzofuranoide isolado de Bowdichia virgilioides e preparação de derivados da Riparina isolada de Aniba riparia com potencial atividade biológica**. Tese (Doutorado) Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2006.

LEITE C. P. **Avaliação dos efeitos farmacológicos de (o-metil)-n-2-hidroxi-benzoil tiramina (riparina II) de Aniba riparia (nees) mez (lauraceae) em modelos comportamentais de ansiedade e depressão em camundongos**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2008.

LI, A.A. et al. Integration of epidemiology and animal neurotoxicity data for risk assessment. **Neurotoxicology**, v. 33, p. 823-832, 2012.

LIMA, L. M. Química medicinal moderna: desafios e contribuição brasileira. **Química Nova**, p. 1456-1468, v. 30, n.6, 2007.

LOMBARDINO, J. G.; LOWE, J. A. The role of the medicinal chemist in drug Discovery – then and now. **Nature Reviews Drug Discovery**. London, v.3, n.10, p.853-862, 2004.

MARQUES, C.A. Importância econômica da família Lauraceae Lindl. **Floresta e Ambiente**. v. 8, n.1, p.195, 2001.

MELO, C.T.V. et al. Anxiolytic-like effects of (O-methyl)-N-2,6-dihydroxybenzoyl-tyramine (Riparin III) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 3, p. 451-454, 2006.

MELO, C.T.V. et al. Evidence for the involvement of the serotonergic, noradrenergic, and dopaminergic systems in the antidepressant-like action of riparin III obtained from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 27, p. 104-112, 2013.

NUNES, G.B.L. et al. Prospecção científica e tecnológica da *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae). **Cadernos de prospecção**, v.6, n.4, p. 447-458, 2013.

NUNES, G.B.L. et al. *In vitro* antioxidant and cytotoxic activity of some synthetic riparin-derived compounds. **Molecules**, v. 19, p. 4595-4607, 2014.

NUNES, G.B.L. et al. Behavioral tests and oxidative stress evaluation in mitochondria isolated from the brain and liver of mice treated with riparin A. **Life Sciences**, v.121, p. 57-64, 2015.

PINTO, A.C.; BARREIRO, E.J. Desafios da indústria farmacêutica brasileira. **Química Nova**, v. 36, n. 10, p. 1557-1560, 2013.

QUENTAL, C.; FILHO, S.S. Ensaio clínico: capacitação nacional para a avaliação de medicamentos e vacinas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.9, n.4, p.408-424, 2006.

SACCARO JR., N.L. A regulamentação de acesso a recursos genéticos e repartição de benefícios: disputas dentro e fora do Brasil. **Ambiente e sociedade**, v. 14, p. 229-244, 2011.

SALTÃO, R.; VEIGA, F. Ciclodextrinas em novos sistemas terapêuticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.37, p.1-17, 2001.

SANT'ANNA, C.M.R. Métodos de modelagem molecular para estudo e planejamento de compostos bioativos: uma introdução. **Revista virtual de química**, v. 1, n. 1, p. 49-57, 2009.

SANTOS, W.C. et al. Os novos fármacos aprovados em 2014 pelo *Food Drug Administration*: análise do relatório de 2015. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 4, p.1535-1551, 2015.

SILVA, R.O. et al. Riparin A, a compound from *Aniba riparia*, attenuate the inflammatory response by modulation of neutrophil migration. **Chemico-Biological Interactions**, v. 229, p.55-63, 2015.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.12, p.35-40, 2002.

SLIKKER JR.,W.; BOWYER, J.F. Biomarkers of adult and developmental neurotoxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.206, n.2, p.255-260, 2005.

SOUSA, F.C.F. et al. Antianxiety and antidepressant effects of riparin III from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 78, n. 1, p. 27-33, 2004.

SOUSA, F.C.F. et al. Antianxiety effects of riparin I from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Phytotherapy Research**, v. 19, p. 1005-1008, 2005.

SOUSA, F.C.F. et al. Evaluation of effects of *N*-(2-hydroxybenzoyl) tyramine (**riparin II**) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in anxiety models in mice. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, p. 1212-1216, 2007.

SOUSA, F.C.F. et al. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: uma revisão da biodiversidade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p.642-654, 2008.

SOUSA, F.C.F. et al. Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of riparin I from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 28, p.95-103, 2014.

TEIXEIRA, C.P. et al. Antidepressant-like effect of riparin II from *Aniba riparia* in mice: evidence for the involvement of the monoaminergic system. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 27, n. 2, p.129-37, 2013.

VASCONCELOS, A.S. et al. Subchronic administration of riparin III induces antidepressive-like effects and increases BDNF levels in the mouse hippocampus. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 29, p. 394-403, 2015.

ZHAO, G.; CHEN, W. Enhancing R&D in science-based industry: An optimal stopping model for drug discovery. **International Journal of Project Management**, v. 27, p. 754-764, 2009.

---

## ***OBJETIVOS***

---

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Realizar a avaliação pré-clínica da toxicidade aguda e atividade ansiolítica da riparina A (Rip-A), bem como a obter e caracterizar o complexo de inclusão da riparina A com  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD).

#### 3.2 Objetivos específicos

✓ Avaliar a toxicidade da Rip-A mediante teste agudo de classe (TAC) da *Organization for Economic Cooperation and Devevolpment* - OECD, diretriz n° 423, com estimativa da dose letal 50% (DL<sub>50</sub>) da substância, bem como, dos seus efeitos hematológicos, bioquímicos e histopatológicos;

✓ Investigar a atividade ansiolítica da Rip-A nos modelos animais clássicos do Labirinto em Cruz Elevado (LCE), Teste da Caixa Claro-Escuro (TCE) e Teste de Esconder Esferas (TEE);

✓ Analisar por intermédio de cálculos de docagem molecular as possíveis interações envolvidas entre a Rip-A e o receptor farmacológico central GABA<sub>A</sub>;

✓ Obter um complexo de inclusão da riparina A com  $\beta$ -ciclodextrina (Rip-A/ $\beta$ -CD) por *spray-drying* e caracterizar a preparação mediante diagrama de solubilidade de fases, estudo de solubilidade, calorimetria exploratória diferencial, difração de raios X, espectroscopia de infravermelho, ressonância magnética nuclear de hidrogênio e microscopia eletrônica de varredura;

✓ Verificar a atividade citotóxica artemicida da Rip-A isolada e do complexo de inclusão Rip-A/ $\beta$ -CD obtido.

---

# ***MATERIAL E MÉTODOS***

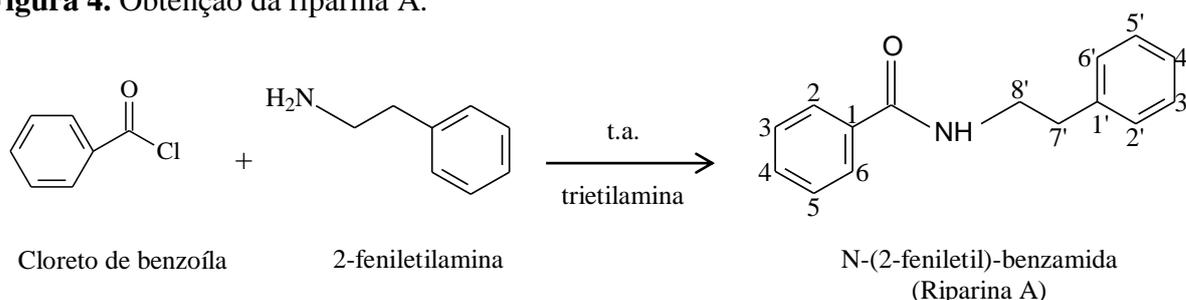
---

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Obtenção da riparina A

A partir da reação de Schotten-Bauman, para obtenção de amidas, misturou-se em balão volumétrico 0,41 mL de cloreto de benzoíla com 0,89 mL de 2-feniletilamina com trietilamina mantendo-se a mistura obtida sob agitação constante em agitador magnético durante 30 minutos à temperatura ambiente (t.a.) a 25°C (Figura 4). Posteriormente, realizou-se a purificação da riparina A produzida a partir da condensação dos reagentes em cromatografia em coluna com rendimento de 84%. A confirmação da síntese foi realizada por cromatografia em camada delgada a partir de um padrão pré-definido e caracterizado por ressonância magnética nuclear de hidrogênio.

**Figura 4.** Obtenção da riparina A.



Fonte: adaptado de Gutierrez, 2006.

### 4.2 Toxicidade aguda da riparina A

Foram utilizados camundongos albinos *Mus musculus* linhagem Swiss, fêmeas adultas nulíparas e não grávidas com 8 a 12 semanas de idade, pesando aproximadamente entre 25 e 30 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Piauí (UFPI). Todos os animais foram mantidos sob condições monitoradas de temperatura equivalente a  $22 \pm 3$  °C, com livre acesso a ração tipo Purina® e água potável, mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas, sendo a fase clara de 6h:00min. às 18h:00min. O protocolo experimental foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da UFPI (n° 022/14).

Para o estudo da toxicidade aguda, foi adotada a metodologia preconizada pelo guia para ensaios toxicológicos *Guideline for Testing of Chemicals* da OECD, diretriz 423 (OECD, 2001). Com base no seguinte protocolo, a dose inicial administrada nos animais foi de 300 mg

kg<sup>-1</sup> (Grupo Rip-A 300), considerando que a substância ainda não foi testada em nenhum outro estudo e que os dados relacionados a sua toxicidade não são conhecidos ou descritos na literatura. A dose inicial foi administrada uma única vez em três animais via oral por gavagem seguido de observação por 14 dias. Em virtude da não ocorrência de óbitos envolvendo os primeiros animais tratados repetiu-se em sequência o procedimento em outros três animais. Antes da administração da riparina A todos os animais foram mantidos em processo de aclimatação durante 5 dias.

Após a administração da Rip-A os animais sofreram restrição alimentar por 2 horas e foram observados após 30 minutos, 1h, 2h e 4h após a administração da substância e a partir de então, diariamente, até o 14º dia após o tratamento. Foram avaliados os seguintes sinais seguindo *screening* hipocrático diário: atividade geral, irritabilidade, resposta ao toque, resposta ao aperto de cauda, contorção abdominal, reflexo de endireitamento, força para agarrar, reflexo auricular, reflexo corneal, tremores, convulsões, ptose, piloereção, cianose e morte além da variação do peso corporal, consumo de água e ração e produção de excretas (micção e defecação) em gaiolas metabólicas conforme ilustrado na figura 6 (LUCIO et al., 2000).

**Figura 5.** Gaiolas metabólicas para camundongos

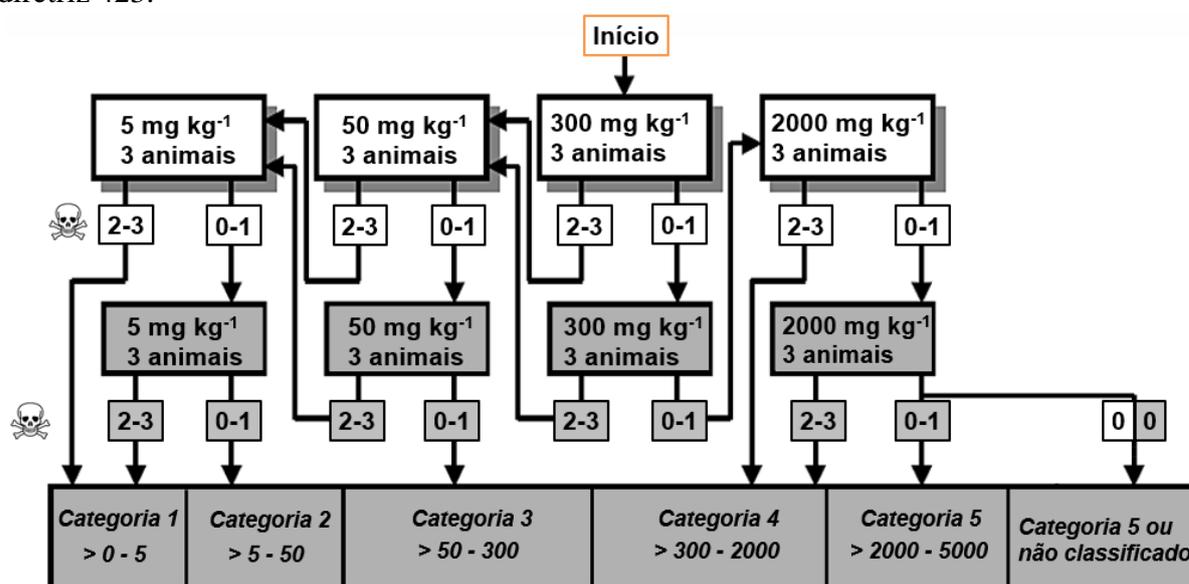


Fonte: arquivo pessoal.

Na ocasião, devido à ausência de mortes, procedeu-se com a administração da riparina A na dose de 2000 mg kg<sup>-1</sup> (Grupo Rip-A 2000) em outros seis animais, três por vez, conforme descrito para a dose de 300 mg kg<sup>-1</sup> (Figura 6). A administração das doses obedeceu ao limite de 10 mL kg<sup>-1</sup> de peso corporal dos roedores, solubilizando-se a riparina em Tween 80 a 3% em água Milli-Q (GASSANI et al., 2010).

Concomitantemente, foi administrado o veículo (Tween 80 a 3%) a um grupo controle pela mesma via. Ao término do experimento, em função da ausência ou do número de mortes contabilizadas no experimento, estimou-se a faixa de  $DL_{50}$  conforme os padrões da *Globally Harmonised System* (GHS). Ao fim dos 14 dias de observação, todos os animais utilizados foram anestesiados com pentobarbital  $40 \text{ mg kg}^{-1}$  i.p. para coleta de sangue total por rompimento do plexo retro-orbital com tubo capilar para a avaliação hematológica e bioquímica.

**Figura 6.** Procedimento para determinação da toxicidade aguda da riparina A conforme OECD diretriz 423.



Fonte: adaptado de OECD, 2001.

A avaliação hematológica foi realizada observando os seguintes parâmetros: contagem total de hemácias, leucócitos e plaquetas, dosagem de hemoglobina, verificação de hematócrito e dos índices hematimétricos, hemoglobina globular média (HGM), volume globular médio (VGM) e concentração de hemoglobina globular média (CHGM) em sangue total contendo o anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) em analisador automático de células hematológicas *SDH-3 Vet Labtest*. Para a análise bioquímica a amostra coletada foi centrifugada a 10.000 rpm durante 5 minutos e, em seguida, determinados os parâmetros glicemia sérica, triglicerídeos, colesterol total, creatinina, ureia, bilirrubina direta, bilirrubina indireta e bilirrubina total, transaminase glutâmico-oxalacética (TGO) e transaminase glutâmico-pirúvica (TGP) no aparelho *Labmax Plenno Labtest*.

Em seguida, procedeu-se com a eutanásia por deslocamento cervical e remoção do cérebro, baço, fígado e rins dos animais para a obtenção do peso relativo e a realização das

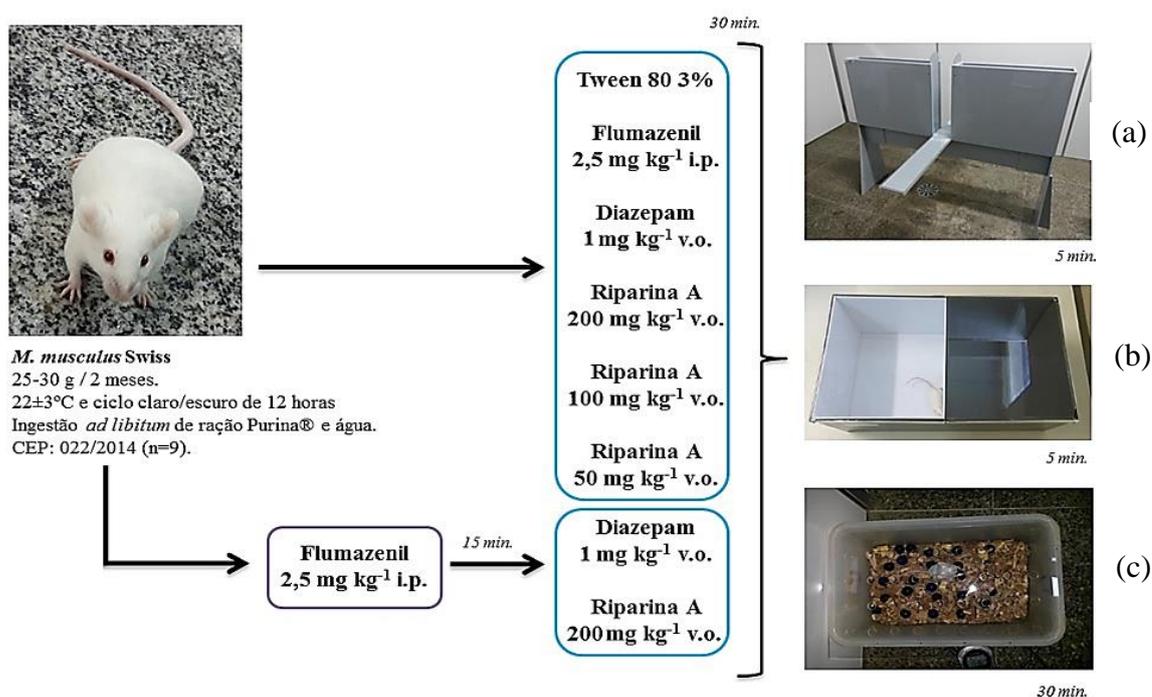
análises histopatológica por microscopia óptica (*Olympus*, Tóquio, Japão). Os órgãos foram fixados em formol tamponado a 10%, processados para inclusão em parafina, seccionados em micrótomo e corados pela técnica de hematoxilina-eosina (HE) para posterior análise.

### 4.3 Avaliação comportamental da riparina A

A riparina A, foi solubilizada com Tween 80 3% dissolvido em água Milli-Q. Os roedores foram divididos em grupos de nove animais ( $n=9$ ) e tratados nas doses de 50, 100 e 200 mg kg<sup>-1</sup>, via oral (v.o.), 30 minutos antes dos experimentos. O grupo controle negativo recebeu veículo (Tween 80 3%) em um volume constante de 10 mL kg<sup>-1</sup>, via oral por gavagem. Diazepam (DZP) 1 mg kg<sup>-1</sup> (União Química, Brasil) e flumazenil (FLU) 2,5 mg kg<sup>-1</sup> (União Química, Brasil), utilizados como padrão ansiolítico e antagonista benzodiazepínico, foram administrados, respectivamente, por via oral e por via intraperitoneal (i.p.).

Após este procedimento, realizou-se a avaliação da possível participação do sítio benzodiazepínico dos receptores GABA<sub>A</sub> na atividade central da Rip-A. Para este fim, dois grupos ( $n=9$ ) foram pré-tratados com flumazenil 2,5 mg kg<sup>-1</sup> i.p., seguido 15 minutos depois da administração do diazepam 1 mg kg<sup>-1</sup> v.o. (FLU + DZP) ou da riparina A 200 mg kg<sup>-1</sup> v.o. (FLU + Rip-A) conforme ilustrado na figura 7.

**Figura 7.** Esquema de tratamento e modelos comportamentais.



Fonte: arquivo pessoal.

Para a avaliação comportamental foram utilizados camundongos albinos *Mus musculus* linhagem Swiss, machos adultos, mantidos nas mesmas condições descritas no protocolo experimental de toxicidade aguda supracitado. Transcorridos 30 minutos após cada tratamento, foram realizados os ensaios comportamentais do labirinto em cruz elevado (LCE), caixa claro-escuro (TCE) e teste de esconder esferas (TEE) (ROMANINI et al., 2006; GALDINO et al., 2012; MACHADO et al., 2015).

#### **4.3.1 Teste do labirinto em cruz elevado**

O labirinto em cruz elevado (LCE) é feito de acrílico e consiste em dois braços aberto (30 x 5 cm) e dois fechados (30 x 5 x 25 cm) cruzados perpendicularmente, no qual o animal é colocado 60 cm acima do solo exatamente na interseção dos braços (plataforma central 5 x 5 cm) com a cabeça voltada para a entrada dos braços fechados (Figura 7a). (LISTER, 1987; ALMEIDA et al., 2012). Os animais foram colocados na interseção entre os braços do labirinto 30 minutos após os tratamentos e observados durante 5 minutos. Os parâmetros quantificados no experimento foram o número de entradas nos braços abertos (NEBA) e o tempo de permanência nos braços abertos em segundos (TPBA). O experimento foi realizado com um animal de cada vez e ao término de cada teste o labirinto era higienizado com toalha de papel umedecida em álcool 70% para a remoção de qualquer vestígio deixado pelos animais.

#### **4.3.2. Teste da caixa claro-escuro**

Para o teste da caixa claro-escuro (TCE), os animais foram divididos em oito grupos conforme descrito anteriormente para o ensaio do labirinto em cruz elevado. Após os tratamentos, os animais foram colocados, um por vez, em uma caixa de acrílico dividido em 2 compartimentos (campo claro e campo escuro) que se comunicam por meio de uma pequena passagem (Figura 7b) (CRAWLEY, 1981; HEREDIA et al., 2014). O campo escuro (acrílico preto, 27 x 18 x 29 cm) é pobremente iluminado. O campo claro (acrílico transparente, 27 x 18 x 29 cm) é iluminado pela luz do ambiente. Os animais foram observados por 5 minutos e após cada ensaio o aparato era higienizado com álcool 70% para remover qualquer vestígio deixado pelos animais. Os parâmetros utilizados foram o tempo de permanência no campo claro (TPCC) expresso em segundos e o número de transições entre os compartimentos (NTC).

### 4.3.3 Teste de esconder esferas

Após a realização dos tratamentos seguindo o esquema preconizado nos outros ensaios comportamentais, os animais foram colocados individualmente em caixas de policarbonato (27 x 16 x 13 cm) forradas com uma camada de 5 cm de serragem sobre a qual foram distribuídas uniformemente 25 esferas de vidro com 1,5 cm de diâmetro para proceder com o teste de esconder esferas (TEE) (Figura 7c). Depois de transcorridos 30 minutos, foram contabilizados o total de esferas escondidas pelos animais, considerando as esferas totalmente recobertas pela serragem ao término do teste. Após cada sessão de teste individual, todas as esferas foram higienizadas com álcool 70% e a serragem substituída para remover qualquer vestígio deixado pelos animais. O parâmetro utilizado para a avaliação da atividade ansiolítica neste experimento foi o número de esferas escondidas (NEE) pelos roedores após os tratamentos (POLING et al., 1981; PIRES et al., 2013).

### 4.4 Estudo de docagem molecular

Foi realizada a docagem molecular com o receptor GABA<sub>A</sub> para a análise das propriedades energéticas da molécula, pesquisa das interações ligante-receptor mais estáveis e identificação dos resíduos de aminoácidos envolvidos. A estrutura do receptor farmacológico heteropentamérico foi adquirida a partir das sequências de aminoácidos das subunidades  $\alpha_2$  (código: Q544G1),  $\beta_1$  (código: Q53WT3) e  $\gamma_2$  (código: P22723) do receptor gabaérgico de *Mus musculus* extraídos do banco de dados *UniProt*. O modelo tridimensional foi construído utilizando o servidor de modelagem de estrutura protéica *Swiss-model* e os programas computacionais *Modeller* e *Chimera*. Posteriormente, para a etapa de docagem foi utilizado o programa *Auto Dock* 4.2.6. (PETTERSEN et al., 2004; ORIO et al., 2009).

A estrutura molecular da riparina A foi otimizada a partir da teoria DFT (Teoria do Funcional da Densidade) utilizando o pacote computacional Gaussian 03 (FRISCH et al., 2004). O funcional híbrido B3LYP (LEE et al., 1988) foi combinado com o conjunto de base 6-31+G(d,p) para a obtenção de 50 conformações estruturais da riparina A.

## 4.5 Obtenção do complexo de inclusão da riparina A com betaciclodextrina

### 4.5.1 Mistura física da riparina A com betaciclodextrina

A mistura física (MF) foi obtida por homogeneização durante 30 min em gral de porcelana com auxílio de pistilo na proporção molar 1:1 de riparina A (Rip-A) e betaciclodextrina ( $\beta$ -CD, *ISP Technologies*, São Paulo, Brasil, Lote: B701118). Posteriormente os produtos foram tamisados em malha de 250  $\mu\text{m}$  e armazenados em dessecador até a realização da análises de caracterização (ABARCA et al., 2016).

### 4.5.2 Complexo de inclusão obtido por aspersão

Quantidades equimolares de Rip-A e  $\beta$ -CD (*ISP Technologies*, São Paulo, Brasil, Lote: B701118) foram solubilizadas em temperatura ambiente em etanol P.A. e em água destilada, respectivamente. As soluções foram homogeneizadas com o auxílio de um agitador magnético por 30 minutos. As soluções foram posteriormente injetadas no aparelho *spray-drying* de bancada (*BUCHI B-290*) com uma pressão de entrada de 0,9 Bar, temperatura de entrada de 95 °C e fluxo da amostra de 3 mL min<sup>-1</sup>. Foi obtido o complexo Rip-A/ $\beta$ -CD com rendimento em peso de 62% (Figura 8). Em seguida o complexo foi armazenado em dessecador até a realização das análises de caracterização (AGUIAR et al., 2014).

**Figura 8.** Ilustração do *spray-drying* (a) e do complexo de inclusão obtido por aspersão (b).



(a)



(b)

Fonte: arquivo pessoal.

## 4.6 Caracterização do complexo de inclusão da riparina A com betaciclodextrina

### 4.6.1 Diagrama de solubilidade de fases

O estudo de solubilidade foi realizado de acordo com o método descrito por Higuchi e Connors (1965), adicionando-se excesso de Rip-A nos tubos de ensaio contendo soluções aquosas com concentrações crescentes de betaciclodextrina ( $\beta$ -CD 0, 2, 4, 6, 8 e 10 mM). As amostras foram mantidas em agitação constante durante 72 horas à temperatura de  $50 \pm 2$  °C. Em seguida, foram filtradas em membranas de 0,22  $\mu$ m e analisadas em espectrofotômetro UV-Vis (*Shimadzu UV – 1800*) no comprimento de onda de 225 nm, utilizando a mistura água destilada:etanol P.A. (1:9) como branco. Os experimentos foram realizados em triplicata para cada concentração de  $\beta$ -CD testada. A constante de estabilidade (Kst) foi calculada usando a seguinte fórmula:  $Kst = \text{Inclinação} / S_0 \times (1 - \text{Inclinação})$ , a qual considera a inclinação da reta obtida na construção do diagrama e a solubilidade intrínseca ( $S_0$ ) da Rip-A (AGUIAR et al., 2014; SANTOS et al., 2015).

### 4.6.2 Estudo de dissolução

Os estudos de dissolução foram conduzidos no dissolutor *Ethik technology* modelo 299 a 50 rpm e  $37 \pm 0,5$  °C. As amostras da Rip-A isolada, MF e complexo Rip-A/ $\beta$ -CD foram adicionadas com peso equivalente de 10 mg de riparina A. O meio do ensaio foi 1000 mL de água destilada a fim de avaliar a variação de solubilidade aquosa com análises realizadas por espectrofotometria UV-VIS (*Shimadzu UV – 1800*) a 225 nm em intervalos de 5, 10, 15, 20, 30, 45 e 60 min. após filtração das amostras em triplicata. O perfil de dissolução foi determinado baseado na eficiência de dissolução no tempo de 60 minutos (FREITAS et al., 2012; SOARES-SOBRINHO et al., 2011).

### 4.6.3 Calorimetria Diferencial Exploratória

Para análises por calorimetria exploratória diferencial (CED), as amostras de Rip-A,  $\beta$ -CD, MF e Rip-A/ $\beta$ -CD foram colocadas em cadinhos fechados e aquecidas entre 50 °C e 400 °C na razão de 10 °C/min em atmosfera de nitrogênio (*DSC-2920 - TA Instruments*).

#### 4.6.4 Difração de Raios X

Os difratogramas das amostras de RipA,  $\beta$ -CD, MF e RipA/ $\beta$ -CD foram obtidos em difratômetro de raios X, *Rigaku*, modelo *Miniflex* ( $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ ). Os difratogramas de DRX foram obtidos com ângulo  $2\theta$  variando entre  $3^\circ$  a  $120^\circ$  a uma razão de  $2^\circ/\text{min}$ .

#### 4.6.5 Espectroscopia de Infravermelho

A obtenção dos espectros vibracionais no infravermelho (IV) foi realizada com amostras sólidas de RipA,  $\beta$ -CD, MF, e RipA/ $\beta$ -CD em pastilhas de KBr (*Perkin Elmer Frontier 1420*) com varreduras no intervalo de  $400$  a  $4000 \text{ cm}^{-1}$ . Os espectros foram suavizados e a linha de base corrigida automaticamente utilizando o software do equipamento.

#### 4.6.6 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

Os espectros das amostras de RipA,  $\beta$ -CD, MF, e RipA/ $\beta$ -CD foram obtidos a partir de Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  (RMN  $^1\text{H}$ ) operando a  $500 \text{ MHz}$  (*Bruker Avance III*) com as amostras solubilizadas em dimetilsulfóxido deuterado (DMSO- $d_6$ ) à temperatura ambiente.

#### 4.6.7 Microscopia Eletrônica de Varredura

Os padrões morfológicos das amostras foram analisadas no microscópio eletrônico *Shimadzu SSX-550 Superscan* a fim de realizar a visualização das superfícies da Rip-A,  $\beta$ -CD, MF e Rip-A/ $\beta$ -CD. As partículas foram fixadas em suporte metálico sob vácuo com posterior metalização de uma fina película de ouro. As microfotografias de MEV foram obtidas em diferentes magnificações utilizando voltagens de aceleração de  $8$  a  $15 \text{ kV}$ .

### 4.7 Atividade citotóxica artemicida da riparina A e do complexo de inclusão Rip-A/ $\beta$ -CD

Para a avaliação da atividade citotóxica foi realizada a exposição de microcrustáceos da espécie *Artemia salina* Leach a diferentes concentrações da riparina A livre e do complexo de inclusão utilizando-se metodologia de Meyer et al. (1982) adaptada. Foi realizado previamente a eclosão de ovos do microcrustáceo em salina ( $\text{NaCl } 36 \text{ g L}^{-1}$ ) por  $48\text{h}$ , com a aeração a  $25^\circ\text{C}$ .

Empregou-se dez larvas de *A. salina* em cada um dos experimentos, realizados em triplicata, seguidos da exposição à riparina A livre e complexada nas concentrações 50, 100, 250, 500 e 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  solubilizadas em solução salina e dicromato de potássio 0,1% como controle positivo. Após 24h de exposição foram contabilizados o número de microcrustáceos mortos, realizando-se a obtenção das concentrações inibitórias médias ( $\text{CI}_{50}$ ).

#### 4.8 Análise estatística

Todos os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.). Os dados obtidos foram avaliados por meio da análise de variância (ANOVA) seguida do teste Neuman-Keuls como *post hoc* teste por meio do *software GraphPad Prism* (versão 5.0). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ .

#### Referências

- ABARCA, R.L. Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing an essential oil component. **Food Chemistry**, v. 196, p. 968-975, 2016.
- AGUIAR, U.N. et al. Preparação e caracterização do complexo de inclusão do óleo essencial de *croton zehntneri* com  $\beta$ -ciclodextrina, **Química Nova**, v.37, n.1, p.50-55, 2014.
- ALMEIDA, A. A. C. et al. Evaluation of acute toxicity of a natural compound (+)-limonene epoxide and its anxiolytic-like action. **Brain Research**, v. 1448, n. 11, p. 56-62, 2012.
- CRAWLEY, J.N. Neuropharmacologic specificity of a simple model for the behavioural actions of benzodiazepines. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 15, p. 695-699, 1981.
- FREITAS, M.R. et al. Inclusion complex of methyl- $\beta$ -cyclodextrin and olanzapine as potential drug delivery system for schizophrenia. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, p. 1095-1100, 2012.
- FRISCH, M.J. et al. **Gaussian 03, Revision E.01, Wallingford CT**, 2004.
- GALDINO, P.M. et al. The anxiolytic-like effect of an essential oil derived from *Spiranthera odoratissima* A. St. Hil. leaves and its major component,  $\beta$ -caryophyllene, in male mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 38, p.276-284, 2012.
- GASSANI, B.C.A. et al. Is the sulphonamide radical in the celecoxib molecule essential for its analgesic activity? **Pharmacological Research**, v. 62, p. 439-443, 2010.
- GUTIERREZ, S.J.C. **Síntese do Bowdenol, um dihidrobenzofuranoide isolado de Bowdichia virgilioides e preparação de derivados da Riparina isolada de Aniba riparia**

**com potencial atividade biológica.** Tese (Doutorado). Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2006.

HEREDIA, L. et al. Assessing anxiety in C57BL/6J mice: A pharmacological characterization of the open-field and light/dark tests. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v.69, p.108-114, 2014.

HIGUCHI, T., CONNORS, K.A. Phase-solubility techniques. **Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation**, v. 4, p.117-212, 1965.

LEE, C., YANG, W., PARR, R.G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. **Physical Review B**, v. 37, n.2, p. 785-789, 1988.

LISTER, R.G. The use of a plus maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 25, p. 180-185, 1987.

LUCIO, E.M.R.A. et al. Avaliação toxicológica aguda e *screening* hipocrático da epiisopilosina, alcaloide secundário de *Pilocarpus microphyllus* Stapf. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 9/10, p. 23-25, 2000.

MACHADO, K.C. et al. Anticonvulsant and behavioral effects observed in mice following treatment with an ester derivative of ferulic acid: Isopentyl ferulate. **Chemico-Biological Interactions**, v. 242, p. 273-279, 2015.

MEYER, B.N. et al. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v. 45, p. 31-34, 1982.

OECD Guidelines for Testing of Chemical, 2001. OECD 423. **Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method**. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

ORIO, M. et al. Density functional theory. **Photosynthesis Research**, v. 102, n.2-3, p. 443-453, 2009.

PETTERSEN, E.F. et al. UCSF Chimera – A visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, p.1605-1612, 2004.

PIRES, L.F. et al. Anxiolytic-like effects of carvacryl acetate, a derivative of carvacrol in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 112, p. 42-48, 2013.

POLING, A. et al. Burying by rats in response to aversive and non-aversive stimuli. **Journal of the Experimental Analysis of Behavior**, v. 35, n. 1, p. 31-44, 1981.

ROMANINI, C.V. et al. Avaliação da atividade ansiolítica e antidepressiva do extrato fluido e fração aquosa de folhas de *Passiflora alata* Curtis em camundongos. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, v. 28, n. 2, p. 159-164, 2006.

SANTOS, E.H. et al. Characterization of carvacrol beta-cyclodextrin inclusion complexes as delivery systems for antibacterial and antioxidant applications. **Food Science and Technology**, v. 60, p. 583-592, 2015.

SOARES-SOBRINHO, J. L. et al. Improving the solubility of the antichagasic drug benznidazole through formation of inclusion complexes with cyclodextrins. **Quimica Nova**, v. 34, p. 1534-1538, 2011.

---

# ***RESULTADOS***

---

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Toxicidade aguda da riparina A

Durante a execução do ensaio de toxicidade aguda com dose única da riparina A, não foi observado a presença de nenhuma alteração comportamental, modificação nos reflexos ou morte de animais tratados com ambas as doses testadas, equiparando-se macroscopicamente os grupos Rip-A 300 e Rip-A 2000 ao grupo controle (Tabela 2).

**Tabela 2.** Efeitos da administração aguda da riparina A no *screening* hipocrático durante 14 dias de observação.

Via	Grupo (mg kg <sup>-1</sup> )	Alterações no <i>screening</i> hipocrático	Mortes
v.o	Controle (Tween 80 3%)	Sem alterações	0/6
	Riparina A 300 mg kg <sup>-1</sup> (Rip-A 300)	Sem alterações	0/6
	Riparina A 2000 mg kg <sup>-1</sup> (Rip-A 2000)	Sem alterações	0/6

Não houve nenhuma variação indicativa de toxicidade quanto ao peso corporal, volume de água e peso de ração consumido ou volume de urina e quantidade de fezes excretadas com aumento do peso dos animais do grupo Rip-A 2000 (Tabela 3). Obteve-se, em função da ausência de mortes nos grupos tratados após os 14 dias de observação, o valor de DL<sub>50</sub> acima de 2000 mg kg<sup>-1</sup> com a classificação da riparina A como substância de baixa toxicidade aguda, categoria 5 ou sem classe segundo GHS, cujo *cut-off* da dose letal seria de 5000 mg kg<sup>-1</sup>.

No presente estudo foi verificado também que a riparina A não provocou alterações significativas nos parâmetros hematológicos (Tabela 4) dos roedores 14 dias após o tratamento por via oral tanto com a dose de 300 mg kg<sup>-1</sup> quanto com a dose de 2000 mg kg<sup>-1</sup> quando comparados ao grupo controle que recebeu apenas o veículo. A partir da análise dos resultados dos hemogramas, pode-se perceber que a riparina A não causou danos ou alterações morfológicas nos elementos figurados do sangue periférico (hemácias, leucócitos e plaquetas), assim como permitiu a manutenção dos índices hematimétricos HGM, VGM e CHGM.

**Tabela 3.** Efeitos da administração aguda da riparina A em parâmetros fisiológicos de camundongos segundo o protocolo de toxicidade OECD 423.

Parâmetros	Período de acompanhamento após tratamento (Dias)			
	0	1°	7°	14°
<b>Controle (Tween 80 3%)</b>				
Peso corporal (g)	25,33 ± 1,05	25,28 ± 0,89	25,70 ± 0,29	24,88 ± 0,28
Consumo de água (mL)	-	7,67 ± 0,50	6,78 ± 0,64	7,56 ± 0,81
Consumo de ração (g)	-	2,94 ± 0,22	3,37 ± 0,42	3,17 ± 0,32
Urina (mL)	-	1,04 ± 0,09	0,80 ± 0,21	0,75 ± 0,11
Fezes (g)	-	0,73 ± 0,11	0,71 ± 0,14	0,86 ± 0,08
<b>Riparina A 300 mg kg<sup>-1</sup> (Rip-A 300)</b>				
Peso corporal (g)	25,98 ± 0,38	25,55 ± 0,58	28,54 ± 0,82	28,38 ± 1,13
Consumo de água (mL)	-	8,94 ± 0,65	8,67 ± 0,33	7,28 ± 0,58
Consumo de ração (g)	-	3,26 ± 0,32	4,63 ± 0,27 <sup>a</sup>	3,34 ± 0,26
Urina (mL)	-	0,98 ± 0,27	1,02 ± 0,11	0,73 ± 0,18
Fezes (g)	-	0,69 ± 0,13	0,83 ± 0,12	1,12 ± 0,09
<b>Riparina A 2000 mg kg<sup>-1</sup> (Rip-A 2000)</b>				
Peso corporal (g)	27,72 ± 1,06	27,74 ± 0,49	30,22 ± 1,01 <sup>a</sup>	29,14 ± 0,87 <sup>a</sup>
Consumo de água (mL)	-	9,11 ± 0,55	10,67 ± 0,47 <sup>a</sup>	8,11 ± 0,63
Consumo de ração (g)	-	3,81 ± 0,2	4,16 ± 0,61	4,93 ± 0,23 <sup>a,b</sup>
Urina (mL)	-	1,15 ± 0,13	1,38 ± 0,06 <sup>a</sup>	1,13 ± 0,09
Fezes (g)	-	0,80 ± 0,06	0,94 ± 0,15	1,06 ± 0,10

Valores obtidos após tratamento com Tween 80 3% dissolvido em água Milli-Q e riparina A nas doses de 300 e 2000 mg kg<sup>-1</sup> (n = 6 por grupo). Os valores representam a média ± E.P.M. dos valores obtidos na variação do peso corporal, volume de água consumida, peso de ração ingerida, volume de urina e fezes excretadas durante o 1°, 7° e 14° dias de experimento comparado aos valores do controle do respectivo dia. <sup>a</sup>p<0,05 quando comparado ao grupo controle (veículo) no mesmo período de acompanhamento. <sup>b</sup>p<0,05 quando comparado ao grupo Rip-A 300 no mesmo período de acompanhamento (ANOVA e teste *Newman-Keuls*).

Quanto às provas bioquímicas executadas, pode-se perceber a ausência de diferença estatística entre os grupos tratados e o grupo controle para a maioria das análises realizadas, exceto para os triglicérides, com elevação nos níveis do analito em ambos os tratamentos realizados (Tabela 4).

**Tabela 4.** Parâmetros hematológicos e bioquímicos de camundongos Swiss tratados com riparina A segundo o protocolo de toxicidade aguda da OECD diretriz 423.

Parâmetros	Veículo (Tween 80 3%)	Riparina A 300 mg kg <sup>-1</sup> (Rip-A 300)	Riparina A 2000 mg kg <sup>-1</sup> (Rip-A 2000)
Hemácias (x10 <sup>6</sup> /μL)	8,3 ± 0,4	9,1 ± 0,4	9,3 ± 0,4
Hemoglobina (g/dL)	11,6 ± 0,8	12,9 ± 0,5	13,8 ± 0,7
Hematócrito (%)	39,0 ± 1,4	42,1 ± 1,8	41,9 ± 1,5
HGM (pg)	13,9 ± 0,2	14,3 ± 0,3	14,7 ± 0,5
VGM (fL)	49,3 ± 1,0	50 ± 0,5	52 ± 1,2
CHGM (g/dL)	27,8 ± 0,6	28,6 ± 0,4	28,2 ± 0,2
Leucócitos (x10 <sup>3</sup> /μL)	4,1 ± 0,2	3,4 ± 0,5	4,2 ± 0,4
Plaquetas (x10 <sup>6</sup> /μL)	0,9 ± 0,2	0,9 ± 0,1	0,8 ± 0,1
Glicose (mg dL <sup>-1</sup> )	104,3 ± 5,8	109,5 ± 6,2	106,8 ± 4,6
Triglicerídeos (g dL <sup>-1</sup> )	83,7 ± 4,5	108,5 ± 3,9 <sup>a</sup>	105,3 ± 3,2 <sup>a</sup>
Colesterol total (g dL <sup>-1</sup> )	81,5 ± 5,1	75,0 ± 2,2	78,5 ± 6,7
Creatinina (mg dL <sup>-1</sup> )	0,23 ± 0,01	0,28 ± 0,04	0,29 ± 0,02
Ureia (mg dL <sup>-1</sup> )	61,7 ± 2,3	57,3 ± 3,6	55,2 ± 4,4
Bilirrubina direta (mg dL <sup>-1</sup> )	0,05 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,05 ± 0,01
Bilirrubina indireta (mg dL <sup>-1</sup> )	0,08 ± 0,03	0,06 ± 0,02	0,05 ± 0,02
Bilirrubina total (mg dL <sup>-1</sup> )	0,13 ± 0,03	0,09 ± 0,02	0,11 ± 0,02
TGO (U L <sup>-1</sup> )	116,3 ± 3,9	134,3 ± 4,8	122,3 ± 5,6
TGP (U L <sup>-1</sup> )	53,5 ± 2,2	44,8 ± 5,6	54,5 ± 4,3

Valores obtidos após tratamento com Tween 80 3% dissolvido em água Milli-Q (n = 6) e riparina A nas doses de 300 e 2000 mg kg<sup>-1</sup> (n = 6 por grupo). Os valores representam a média ± E.P.M. do número de animais usados nos experimentos. Os valores representam a média ± E.P.M. do número de animais usados nos experimentos. <sup>a</sup>p<0,05 quando comparados ao grupo veículo. (ANOVA e teste *Newman-Keuls*). Legenda: HGM = Hemoglobina globular média; VGM = Volume globular médio; CHGM = Concentração de hemoglobina globular média; TGO = Transaminase glutâmico-oxalacética; TGP = Transaminase glutâmico-pirúvica.

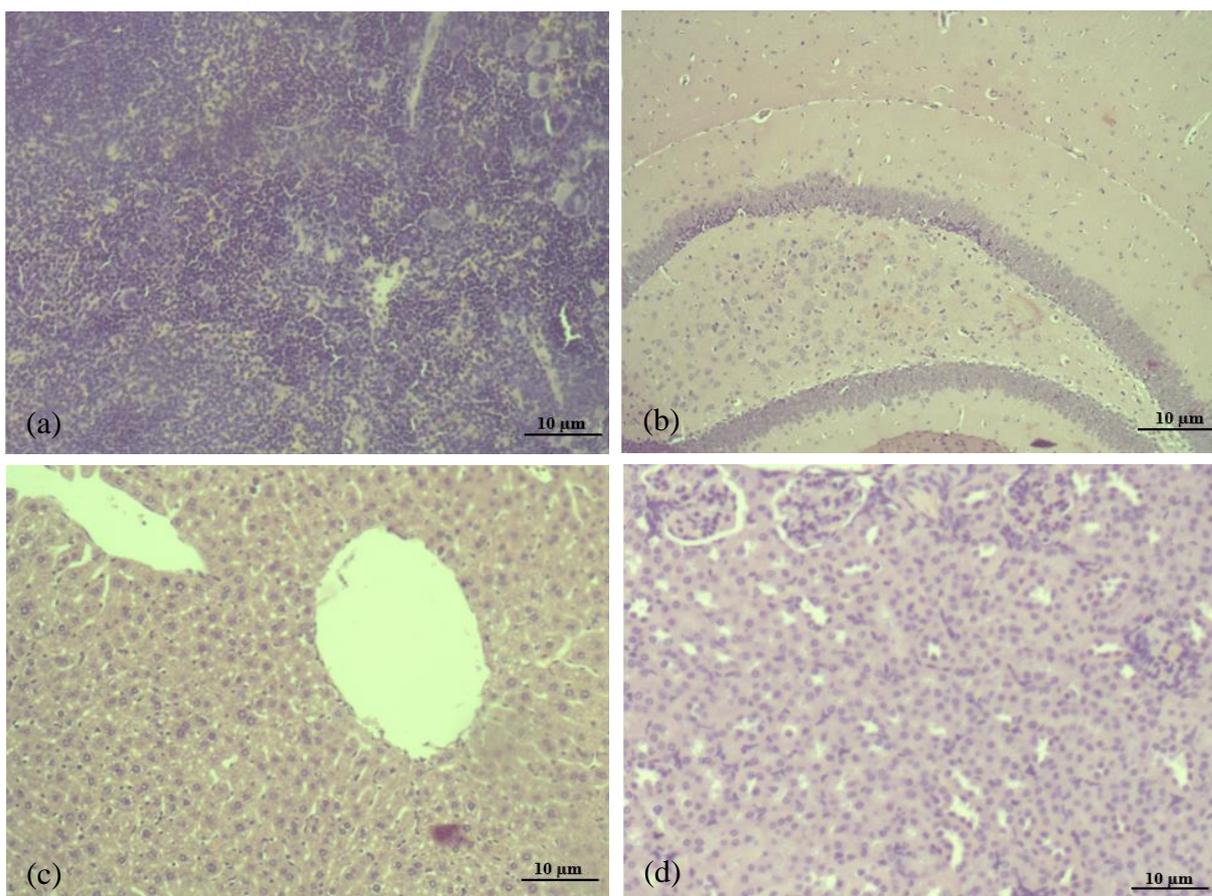
Na aferição do peso relativo dos órgãos coletados no experimento houve ausência de variações significativas ou alterações macroscópicas (Tabela 5).

**Tabela 5.** Efeito da administração oral aguda da riparina A sobre o peso relativo do fígado, baço, rins e cérebro de camundongos 14 dias após o tratamento.

Órgãos	Controle (Tween 80 3%)	Riparina A 300 mg kg <sup>-1</sup> (Rip-A 300)	Riparina A 2000 mg kg <sup>-1</sup> (Rip-A 2000)
Baço	0,53 ± 0,01	0,51 ± 0,09	0,51 ± 0,13
Cérebro	1,44 ± 0,01	1,49 ± 0,07	1,45 ± 0,09
Fígado	5,18 ± 0,32	5,77 ± 0,19	5,53 ± 0,32
Rins	1,47 ± 0,08	1,48 ± 0,02	1,66 ± 0,14

A análise histopatológica dos órgãos removidos confirmou a ausência de alterações histológicas relevantes no grupo controle negativo (Figura 9).

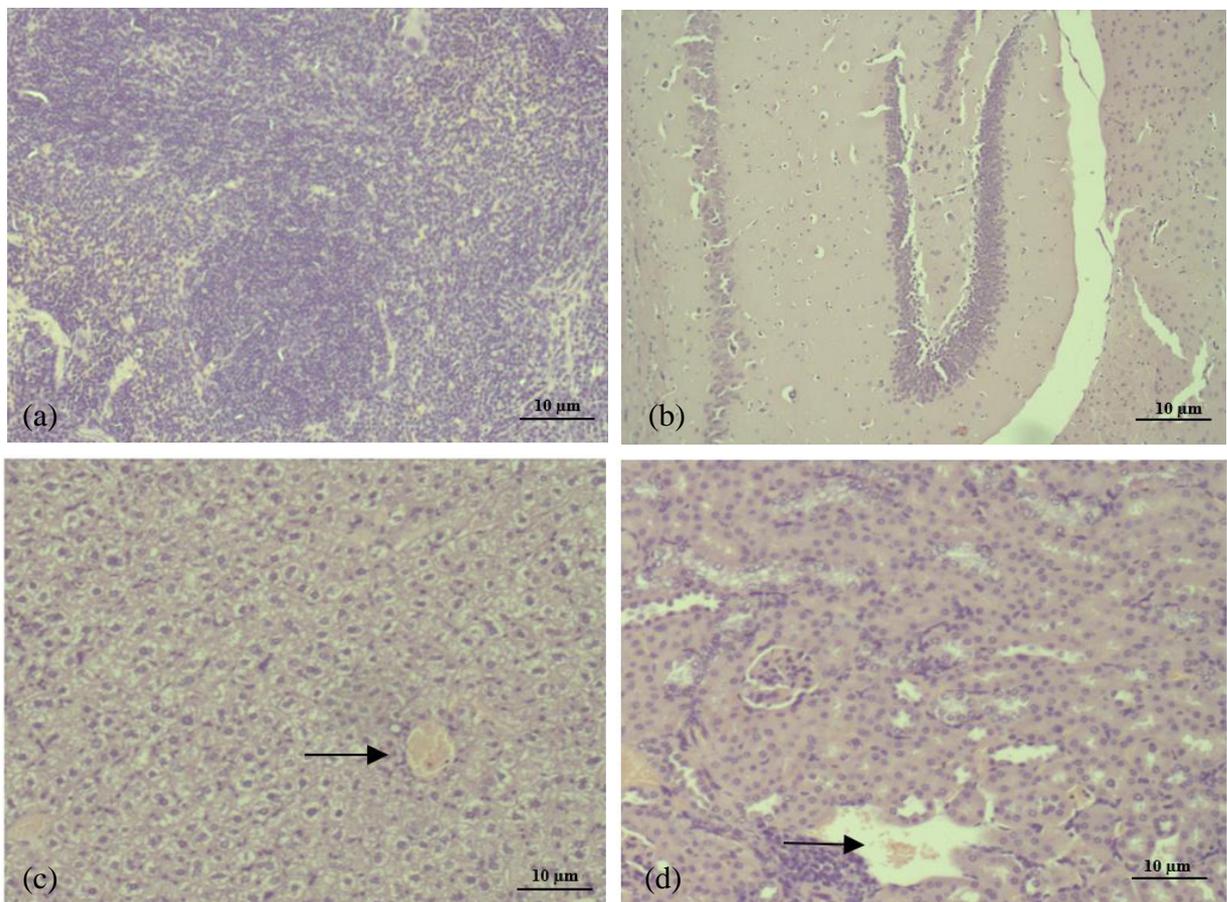
**Figura 9.** Avaliação do tratamento com Tween 80 3% (10 mL kg<sup>-1</sup>) no baço (a), hipocampo (b), fígado (c) e rim (d) de camundongos Swiss adultos conforme protocolo OECD 423.



Análise histopatológica após tratamento agudo com Tween 80 3% (1 mL 100g<sup>-1</sup>). Tecidos corados com Hematoxilina-Eosina (HE, X10). Fonte: arquivo pessoal.

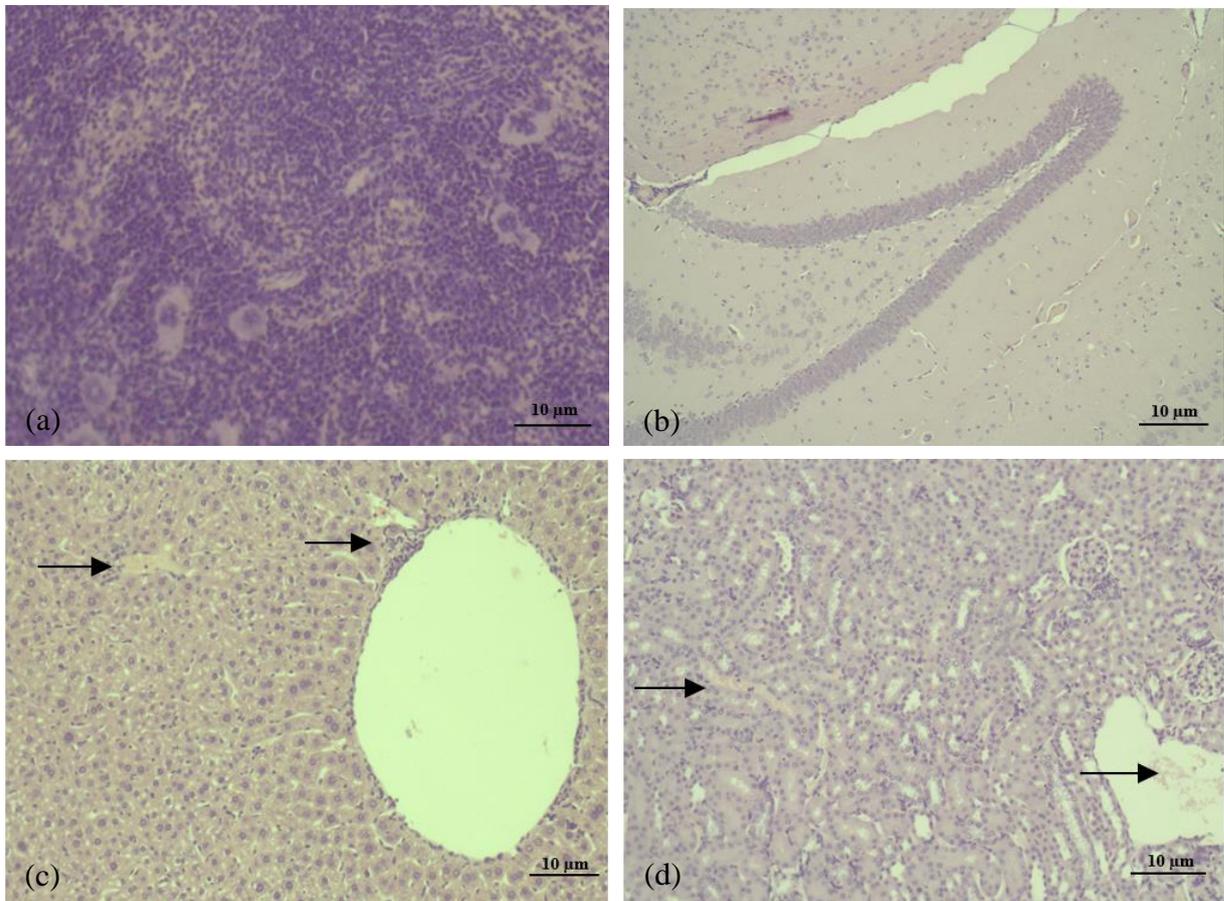
Quanto aos grupos tratados foi possível perceber variações histopatológicas nos tecidos hepático e renal (Figuras 10 e 11, respectivamente). Observou-se a presença de degeneração hidrópica, esteatose e congestão vascular no tecido hepático dos grupos tratados. Foi verificado resultado similar no tecido renal dos animais tratados com a presença de trombos e congestão vascular. Logo, deve-se enfatizar que, apesar das provas bioquímicas indicarem funções hepática e renal dentro da normalidade houve indicadores histológicos de lesão hepatocelular e discreto comprometimento renal nos grupos tratados.

**Figura 10.** Avaliação do tratamento com riparina A no baço (a), hipocampo (b), fígado (c) e rim (d) de camundongos Swiss adultos na dose de  $300 \text{ mg kg}^{-1}$  (Rip-A 300) conforme protocolo OECD 423.



Análise histopatológica após tratamento agudo com riparina A  $300 \text{ mg kg}^{-1}$ . Tecidos corados com Hematoxilina-Eosina (HE, X10). Fonte: arquivo pessoal.

**Figura 11.** Avaliação do tratamento com riparina A no baço (a), hipocampo (b), fígado (c) e rim (d) de camundongos Swiss adultos na dose de 2000 mg kg<sup>-1</sup> (Rip-A 2000) conforme protocolo OECD 423.

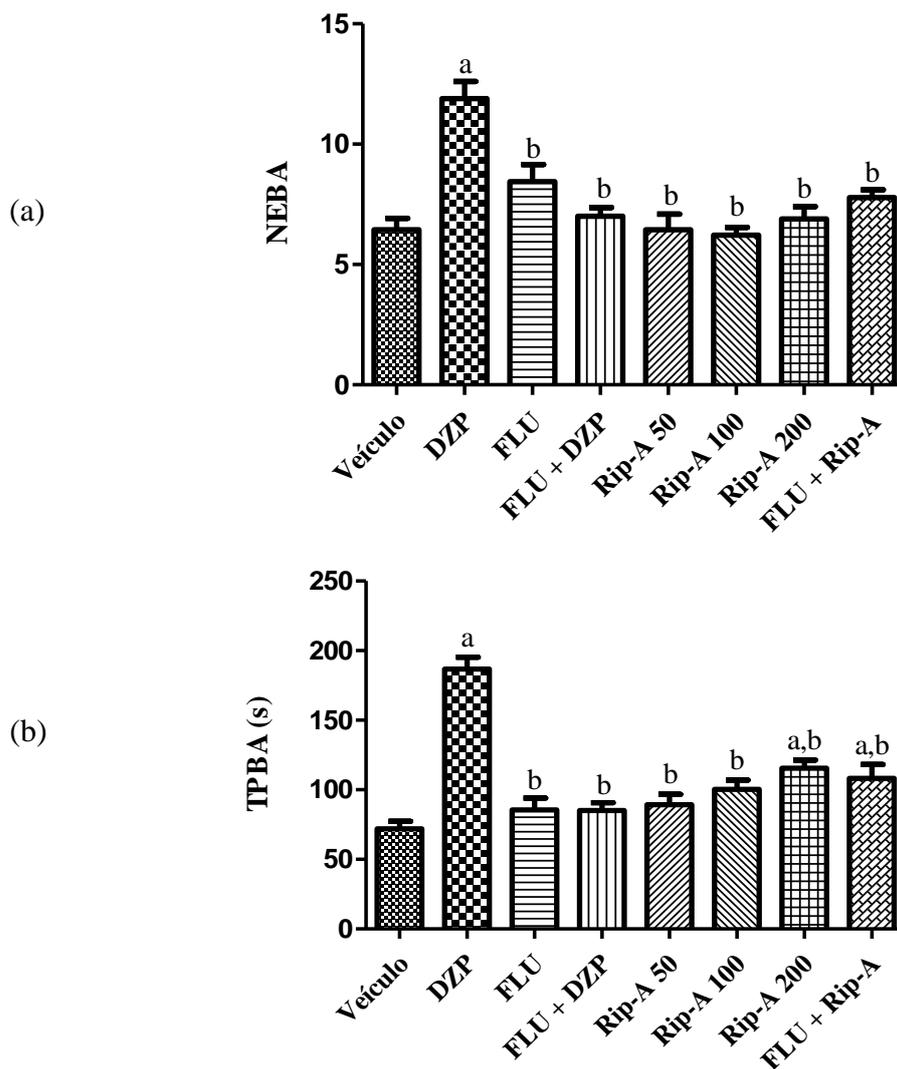


Análise histopatológica após tratamento agudo com riparina A 2000 mg kg<sup>-1</sup>. Tecidos corados com Hematoxilina-Eosina (HE, X10). Fonte: arquivo pessoal.

## 5.2 Efeitos comportamentais da riparina A

Os resultados do ensaio do labirinto em cruz elevado demonstram que o DZP elevou o número de entradas nos braços abertos (NEBA) do labirinto quando comparado ao grupo que recebeu apenas o veículo. Já os grupos FLU, FLU + DZP, FLU + Rip-A e todos aqueles tratados apenas com riparina A nas diferentes doses testadas, apresentaram diferença estatística apenas em relação ao diazepam com resultados inferiores. No que concerne ao tempo de permanência nos braços abertos (TPBA) houve comportamento similar àquele obtido no NEBA, exceto no grupo Rip-A 200, visto que houve diferença estatística tanto em relação diazepam quanto em relação ao controle negativo indicando a presença de atividade ansiolítica, porém, inferior àquela apresentada pelo ansiolítico de referência utilizado como controle positivo (Figura 12).

**Figura 12.** Efeitos da riparina A em camundongos no teste do labirinto em cruz elevado.

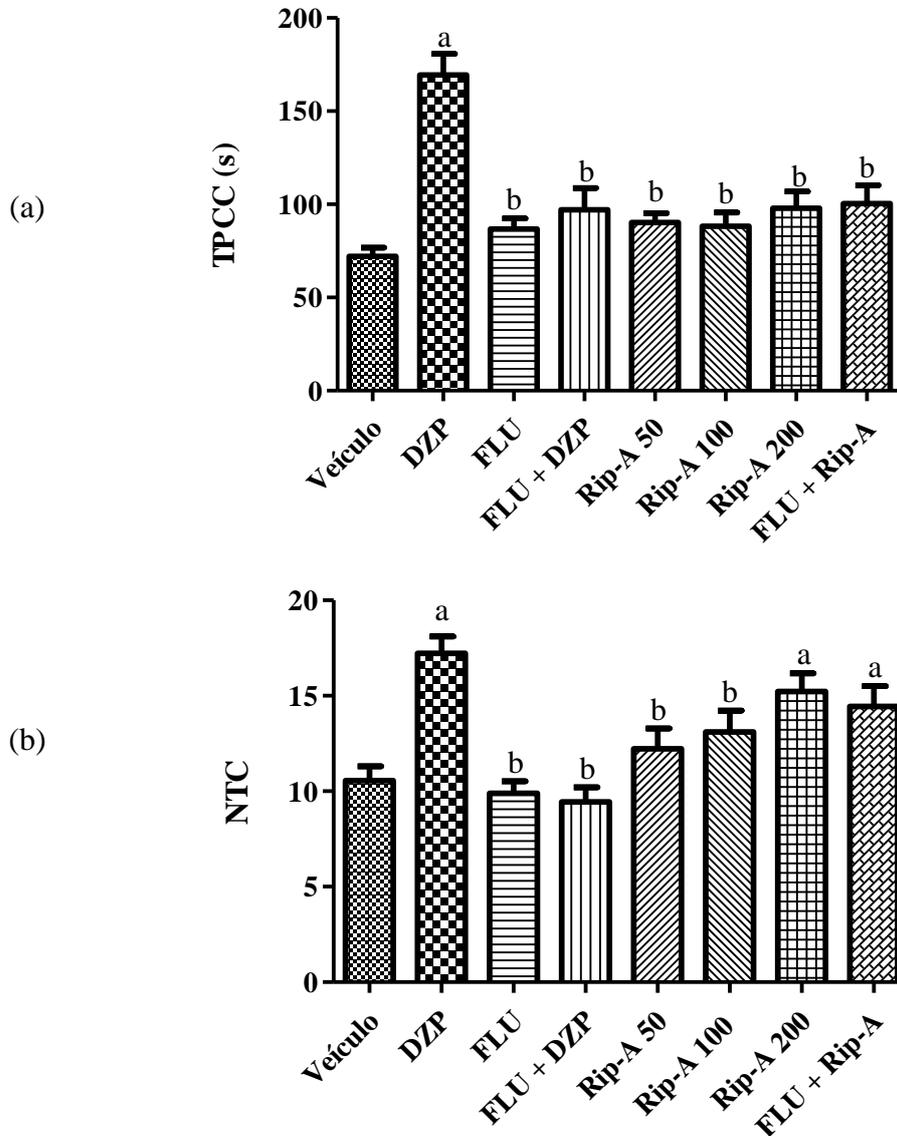


Os valores foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M. ( $n=9$  animais/grupo) sobre o número de entradas nos braços abertos – NEBA (a), tempo de permanência nos braços abertos em segundos – TPBA (b). <sup>a</sup> $p<0,05$  comparado ao veículo (Tween 80 3%) (ANOVA e Neuman-Keuls como *post hoc* teste). <sup>b</sup> $p<0,05$  (ANOVA e Neuman-Keuls como *post hoc* teste), quando comparado ao grupo diazepam. Fonte: arquivo pessoal.

Os resultados obtidos com a riparina A no teste da caixa claro/escuro são ilustrados na figura 13. Pode-se perceber que o TPCC da caixa claro/escuro ratifica a atividade ansiolítica do diazepam conforme observado no parâmetro do NEBA do ensaio do labirinto em cruz elevado, uma vez que, o fármaco aumentou significativamente o tempo de permanência no campo claro. Entretanto, ao avaliar o NTC, nota-se que os animais tratados com a Rip-A 200 obtiveram resultado equivalente ao do grupo DZP e superior ao grupo tratado somente com o veículo, o que sugere atividade ansiolítica com aumento do comportamento exploratório dos animais. Esse resultado se repetiu no grupo que recebeu o pré-tratamento com flumazenil (FLU + Rip-A) indicando que a atividade da riparina A não ocorre devido a interação da molécula no sítio

benzodiazepínico do sistema gabaérgico (BOURIN; HASCOET, 2003; ACEVEDO et al., 2014).

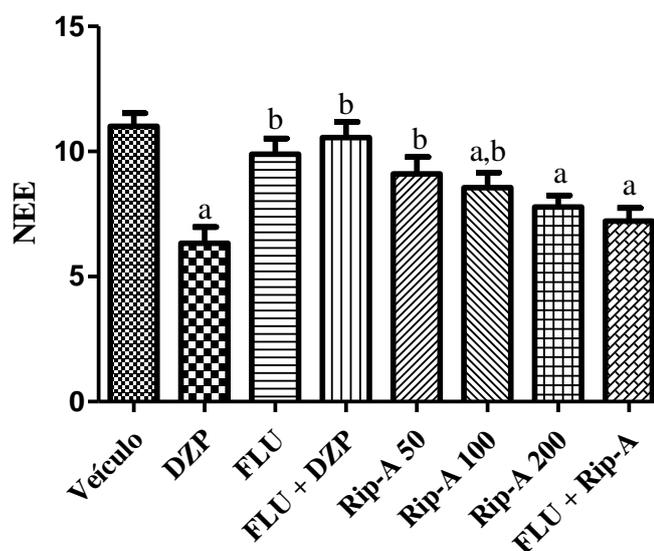
**Figura 13.** Efeitos da riparina A em camundongos no teste da caixa claro/escuro.



Os valores foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M. (n=9 animais/grupo) sobre o tempo de permanência no campo claro em segundos – TPCC (a) e sobre o número de transições realizadas entre os compartimentos do aparato – NTC (b). <sup>a</sup>p<0,05 comparado ao veículo (Tween 80 3%) (ANOVA e Neuman-Keuls como *post hoc* teste). <sup>b</sup>p<0,05 (ANOVA e Neuman-Keuls como *post hoc* teste), quando comparado ao grupo diazepam. Fonte: arquivo pessoal.

Para complementar a análise dos possíveis efeitos ansiolíticos da Rip-A, foi realizado o teste de esconder esferas. Os resultados obtidos com a riparina A no teste de esconder esferas encontram-se ilustrados na figura 14.

**Figura 14.** Efeitos da riparina A em camundongos no teste de esconder esferas.



Os valores foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M. ( $n=9$  animais/grupo) sobre o número de esferas escondidas – NEE. <sup>a</sup> $p<0,05$  comparado ao veículo (Tween 80 3%) (ANOVA e Neuman-Keuls como *post hoc* teste). <sup>b</sup> $p<0,05$  (ANOVA e Neuman-Keuls como *post hoc* teste), quando comparado ao grupo diazepam. Fonte: arquivo pessoal.

Os resultados obtidos no teste de esconder esferas revelam que a Rip-A apresentou padrão ansiolítico, neste caso, a partir da dose de  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  corroborando a presença de atividade central, uma vez que, neste modelo experimental houve redução do número de esferas escondidas pelos roedores a partir da dose intermediária administrada.

### 5.3 Estudo de docagem molecular

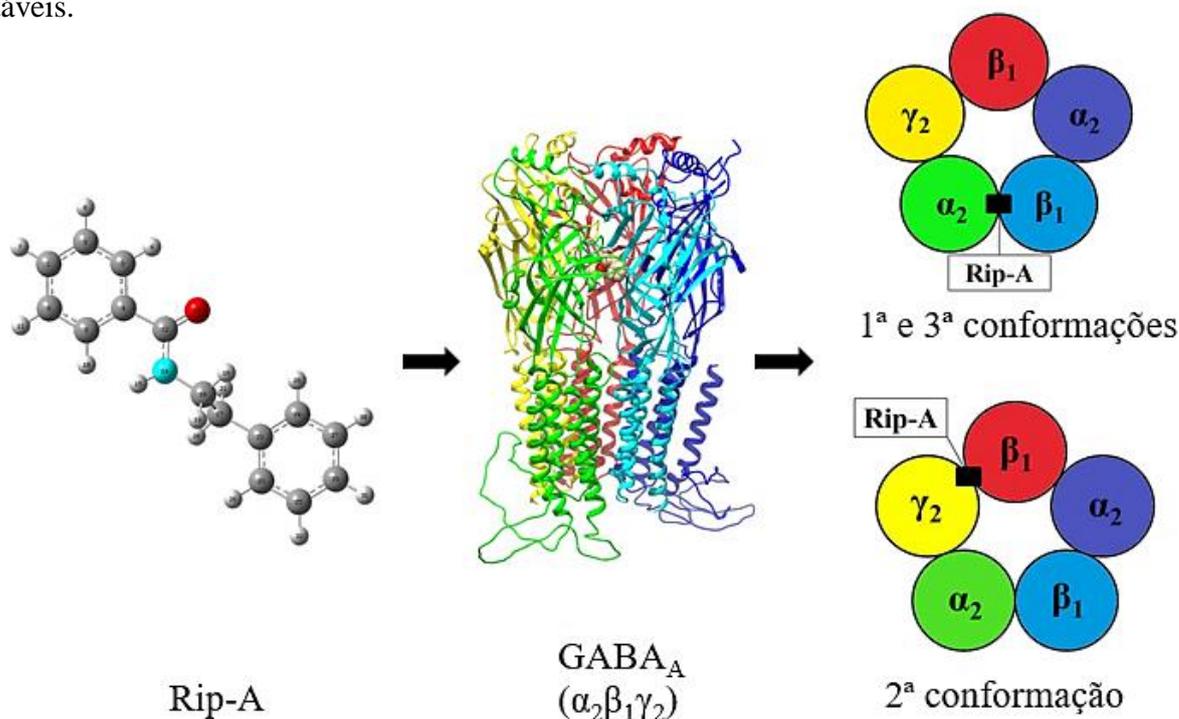
A tabela 6 elenca os valores de energia livre de Gibbs ( $\Delta G^\circ$ ) e da constante de inibição ( $K_i$ ) da riparina A e do diazepam obtidos a partir das três conformações mais estáveis das moléculas durante a interação com o receptor  $\text{GABA}_A$ . Os resultados obtidos demonstram que a interação da riparina A com o receptor apresenta magnitude similar àquela obtida com o diazepam visto que ambas as interações ocorreram na escala de micromolar e que ambos os ligantes interagem de maneira energeticamente favorável se considerado os valores negativos de  $\Delta G^\circ$ .

**Tabela 6.** Valores da energia livre de Gibbs ( $\Delta G^\circ$ ) e da constante de inibição ( $K_i$ ) da riparina A e do diazepam obtidos na interação com o receptor  $GABA_A$ .

Molécula	Conformação	$\Delta G^\circ$ (kcal/mol)	$K_i$ ( $\mu M$ )
Riparina A	1ª conformação	- 6,57	15,25
	2ª conformação	-6,57	15,31
	3ª conformação	- 6,54	16,18
Diazepam	1ª conformação	- 7,88	1,68
	2ª conformação	-7,69	2,30
	3ª conformação	-7,58	2,79

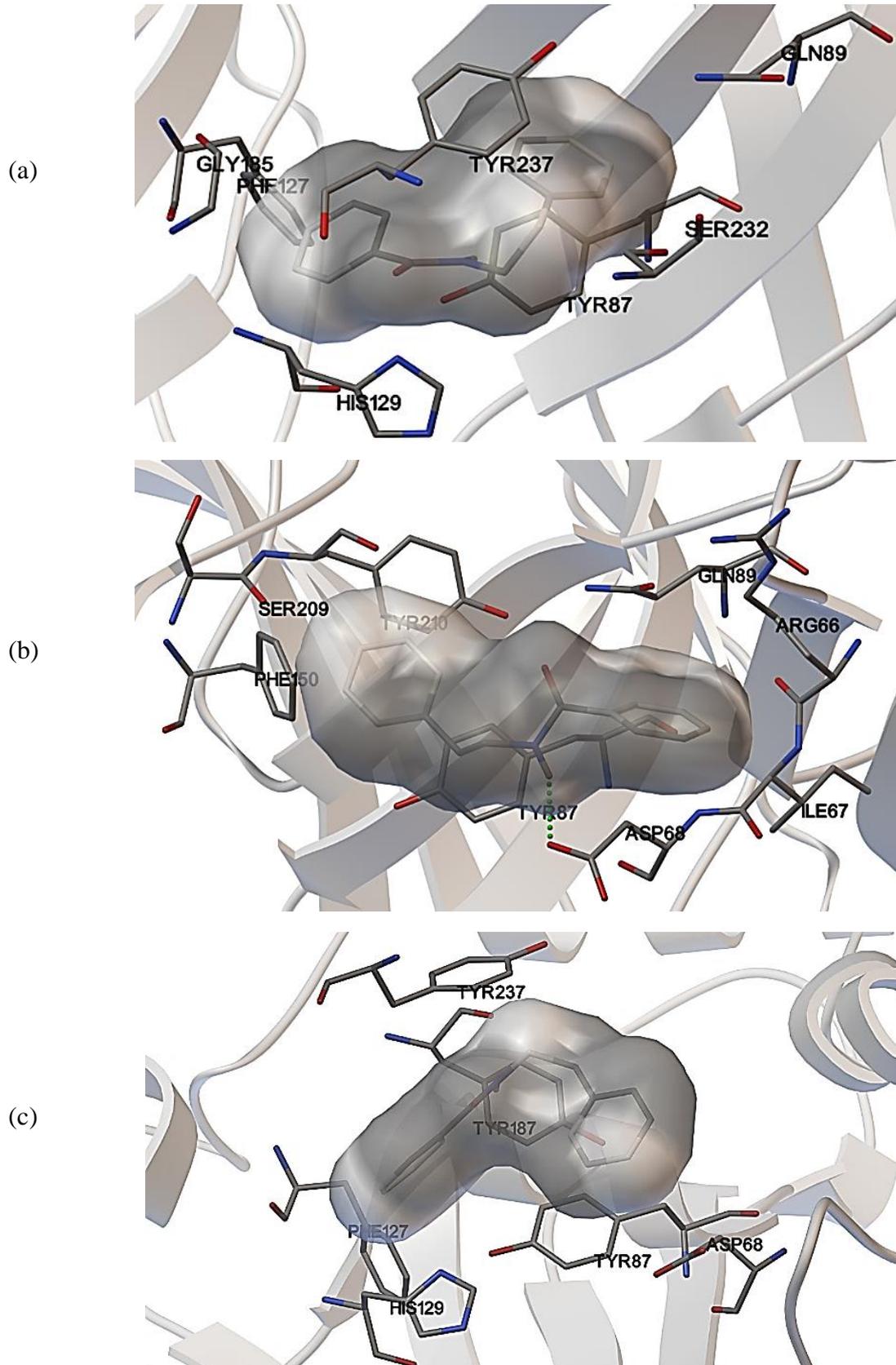
Complementando a análise, a figura 15 apresenta dados topográficos dos sítios de ligação da Rip-A ao receptor gabaérgico enquanto a figura 16 demonstra as possíveis interações ligante-receptor em nível molecular. Foi verificado que há, prevalentemente, a interação da Rip-A com o resíduo de aminoácido tirosina da posição 87 da subunidade  $\beta_1$  (Tyr87), presente em todas as conformações mais prováveis com sítios de ligação presentes entre as subunidades  $\alpha_2$  e  $\beta_1$ , assim como entre as subunidades  $\gamma_2$  e  $\beta_1$  (Figura 16).

**Figura 15.** Sítios de ligação da riparina A no receptor  $GABA_A$  nas suas três conformações mais estáveis.



Fonte: arquivo pessoal.

**Figura 16.** Interações moleculares das principais conformações da riparina A no receptor GABA<sub>A</sub>.

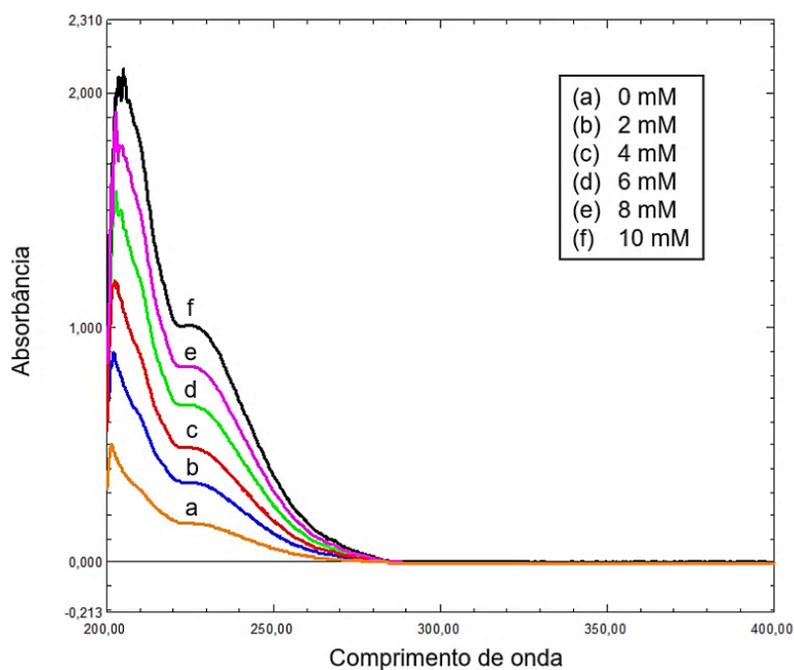


Fonte: arquivo pessoal.

#### 5.4 Caracterização do complexo de inclusão Rip-A/ $\beta$ -CD

A figura 17 apresenta o espectro de absorção UV-Vis da Rip-A em concentrações crescentes. A riparina apresenta absorção em aproximadamente 225 nm em água:etanol (1:9). A análise da varredura UV-Vis da Rip-A permitiu a obtenção da curva de calibração com equação da reta:  $y = 0,1664x + 0,0008$  ( $r^2 = 0,9992$ ), conforme ilustrado na figura 18. Os resultados obtidos permitiram o cálculo da constante de estabilidade (Kst) no valor de 373 L mol<sup>-1</sup>.

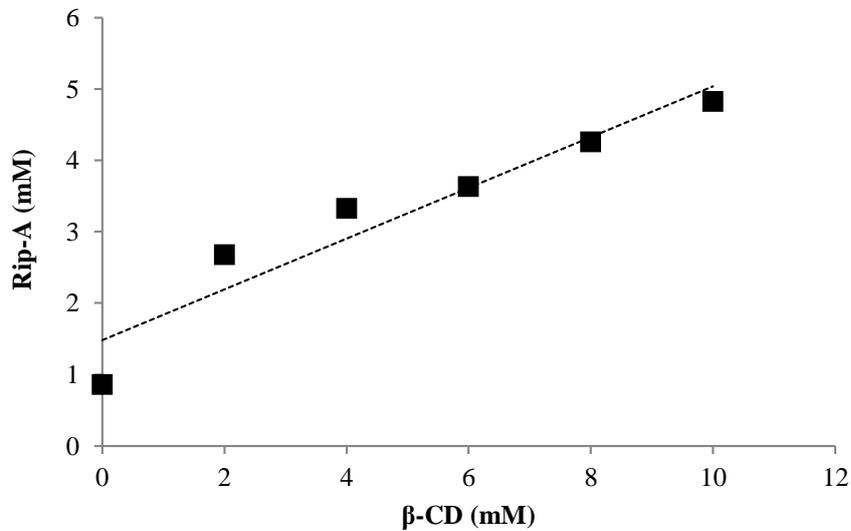
**Figura 17.** Varredura espectrofotométrica UV-Vis da Rip-A.



Fonte: arquivo pessoal.

No ensaio realizado foi verificado a solubilidade intrínseca da Rip-A ( $S_0$ ) com valor de 1,48 mM e melhoria de 240,2% na solubilidade da riparina mediante o acréscimo de  $\beta$ -CD com perfil do diagrama de solubilidade do tipo  $A_L$ . Os resultados indicam a existência de interação entre as moléculas da Rip-A e  $\beta$ -CD o que sugere a formação de complexo de inclusão com a possível inserção total ou parcial da Rip-A na cavidade da ciclodextrina. A formação de um complexo solúvel foi corroborada com o estudo da dissolução (Figura 19).

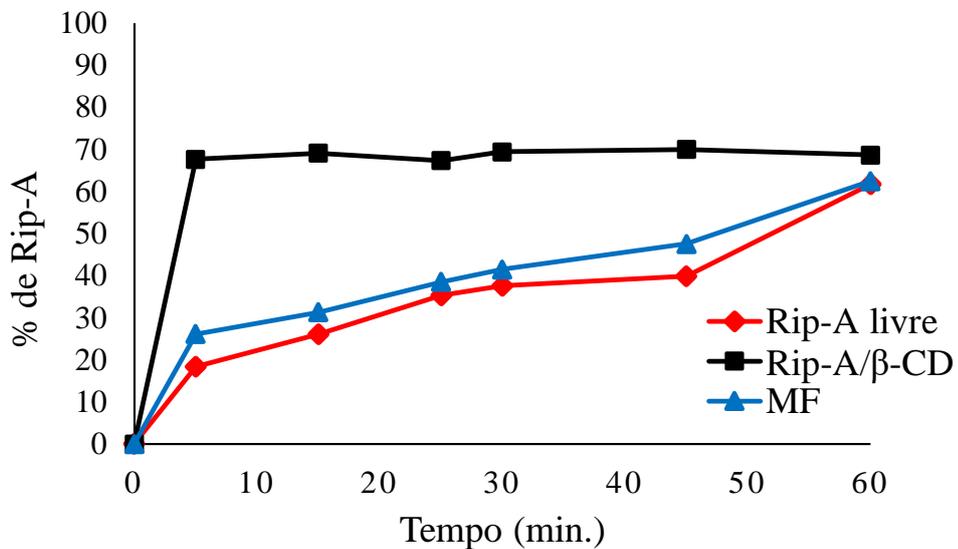
**Figura 18.** Diagrama de solubilidade de fase de  $\beta$ -CD com Rip-A.



Fonte: arquivo pessoal.

A figura 19 apresenta as curvas de dissolução da Rip-A livre, do complexo Rip-A/ $\beta$ -CD e da MF em água. A análise do resultado do estudo de dissolução permite observar que após os 5 minutos iniciais do ensaio, a Rip-A livre apresentou 18,4% de dissolução frente a 67,6% de dissolução com o complexo Rip-A/ $\beta$ -CD e 26,1% com a MF. Ao término do experimento as referidas amostras apresentaram 61,7%, 68,7% e 62,5% de porcentagem de dissolução, respectivamente.

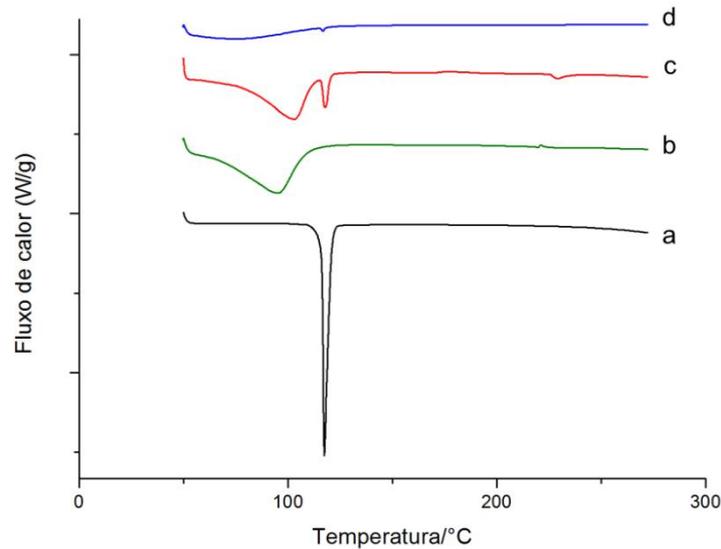
**Figura 19.** Perfil de dissolução da Rip-A livre, Rip-A/ $\beta$ -CD e MF.



Fonte: arquivo pessoal.

A figura 20 ilustra os termogramas de CED das amostras analisadas com variações sugestivas da formação do complexo de inclusão em virtude da redução do pico a 116,2°C característico da Rip-A, sobretudo na preparação obtida por aspersão.

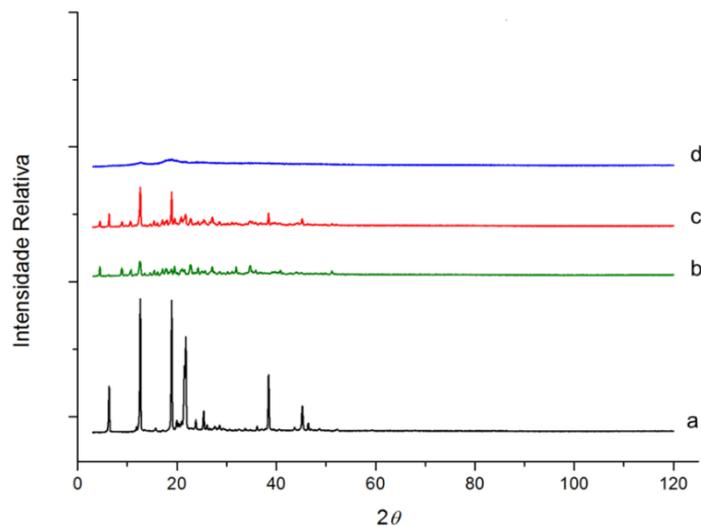
**Figura 20.** Curva de calorimetria exploratória diferencial da Rip-A (a),  $\beta$ -CD(b), MF (c) e Rip-A/ $\beta$ -CD (d).



Fonte: arquivo pessoal.

A figura 21, por sua vez, apresenta o difratograma das análises realizadas por DRX.

**Figura 21.** Difratograma de raios X da Rip-A (a),  $\beta$ -CD (b), MF (c) e Rip-A/ $\beta$ -CD (d).

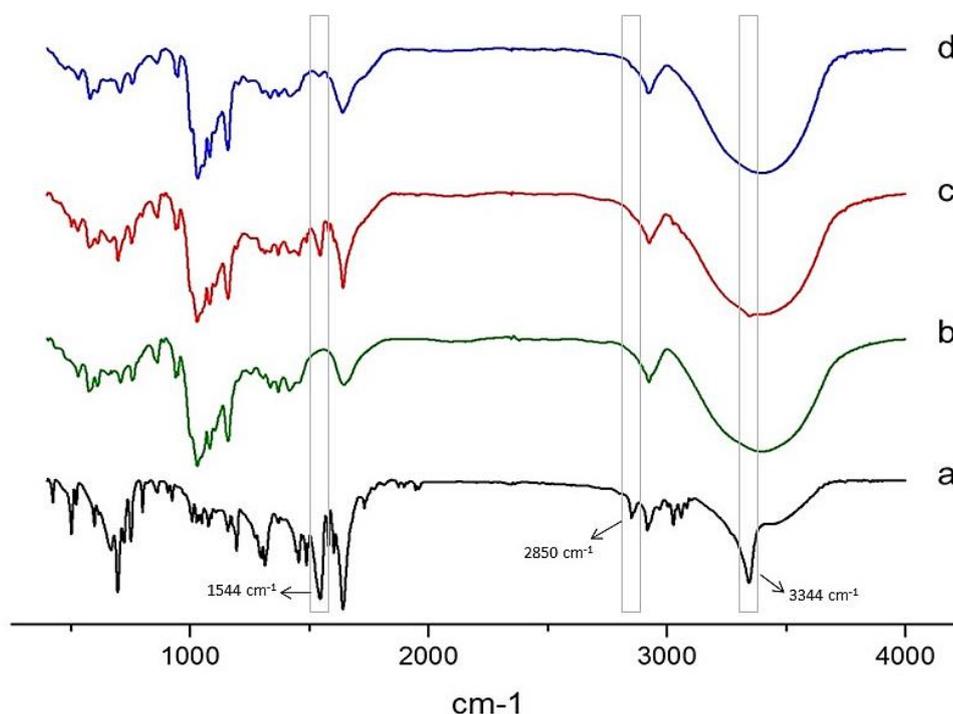


Fonte: arquivo pessoal.

O perfil de difração das amostras demonstra a cristalinidade da Rip-A com a presença de um pico intenso de ângulo de difração  $2\theta$  em  $12,6^\circ$  seguido dos picos secundários em  $6,3^\circ$ ,  $18,9^\circ$ ,  $21,48^\circ$ ,  $21,78^\circ$ ,  $38,46^\circ$  e  $45,22^\circ$ .

A análise por espectroscopia de infravermelho das amostras gerou os espectros apresentados na figura 22.

**Figura 22.** Espectro de IV da Rip-A (a),  $\beta$ -CD (b), MF (c) e Rip-A/ $\beta$ -CD (d).



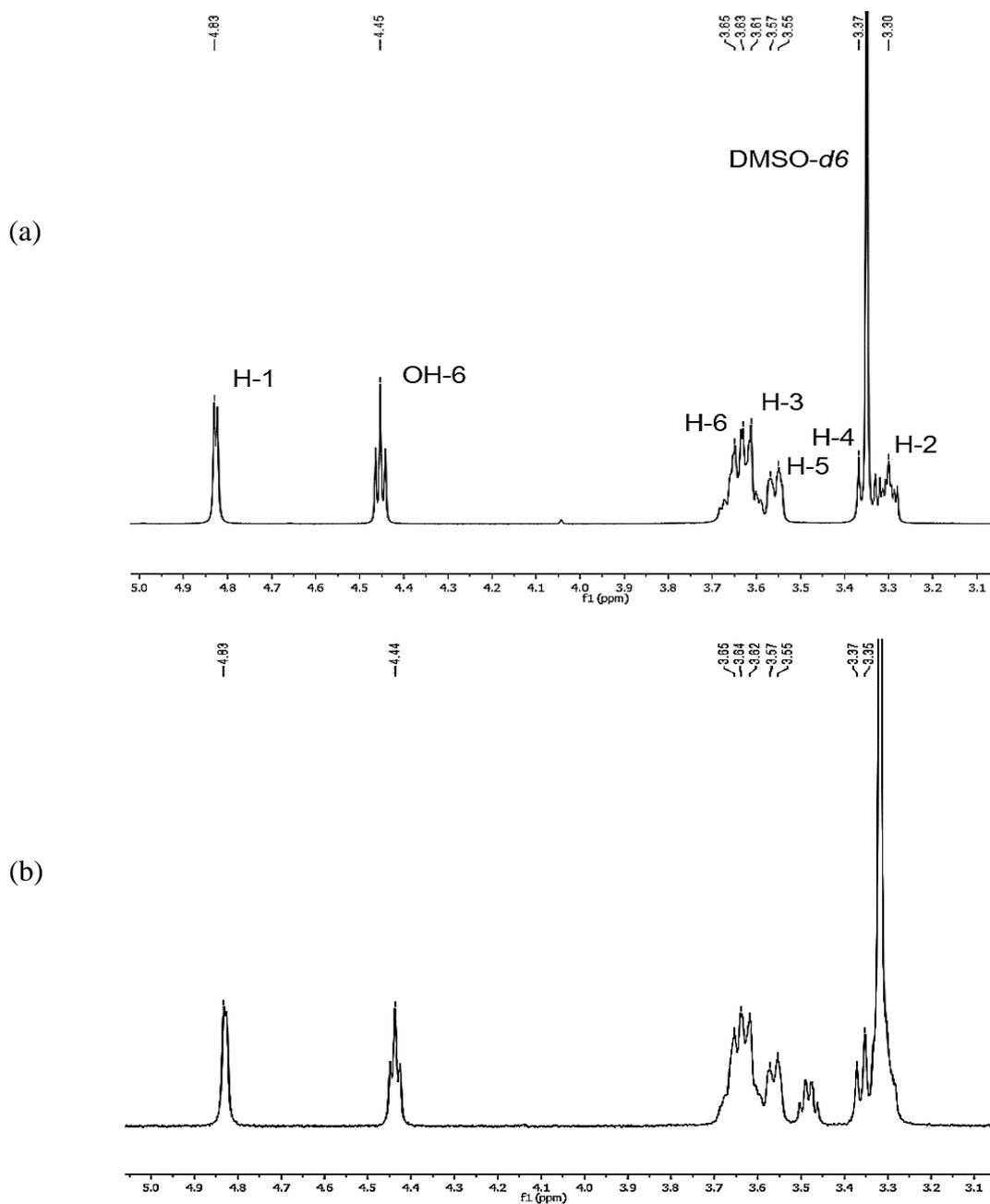
Fonte: arquivo pessoal.

O espectro de IV da Rip-A apresenta picos na região de  $3344\text{ cm}^{-1}$  e  $1640\text{ cm}^{-1}$  referentes ao estiramento simétrico das ligações N—H e C=O do grupo funcional amida, respectivamente. Os modos vibracionais C—H de carbono alifático e aromático apresentam absorções em  $2850\text{ cm}^{-1}$  e  $3026\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente. Além disso, há deformação angular fora do plano de C—H dos anéis monossustituídos em  $694$  e  $750\text{ cm}^{-1}$  e absorção em  $1544\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento C=C de anel aromático. A  $\beta$ -CD isolada apresentou um largo sinal a  $3400\text{ cm}^{-1}$  correspondente aos grupamentos O—H e bandas de absorção em  $2923\text{ cm}^{-1}$ ,  $1157\text{ cm}^{-1}$  e  $1028\text{ cm}^{-1}$  referente a estiramentos C—H, C—O e C—O—C, respectivamente.

A figura 23 apresenta os dados de espectroscopia de prótons da  $\beta$ -CD e do complexo Rip-A/ $\beta$ -CD. A descrição do espectro de ressonância magnética da Rip-A, por sua vez, encontra-se em concordância com a literatura. Destaca-se na Rip-A um duplete em  $7,82\text{ ppm}$

referente aos hidrogênios das posições 2 e 6, um tripleto em 7,45 ppm referente aos hidrogênios das posições 3, 4 e 5, um duplete em 7,24 ppm referente aos hidrogênios de 2' e 6' e um tripleto em 7,30 ppm correspondente aos hidrogênios de 3', 4' e 5'. Em 2,85 ppm, verificou-se um tripleto e em 3,47 ppm um multipletto referentes aos hidrogênios de 7' e 8', respectivamente. Em 8,57 ppm observou-se um multipletto alusivo ao grupamento funcional da molécula e indica o grupo NH.

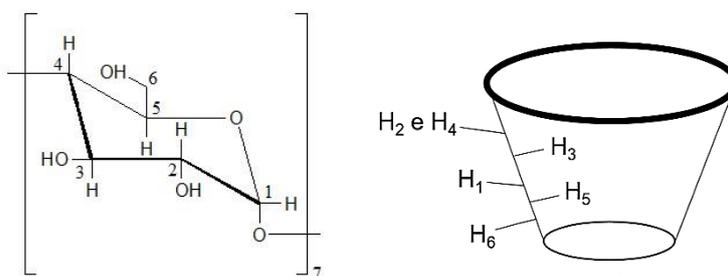
**Figura 23.** Espectros de RMN  $^1\text{H}$  da  $\beta$ -CD (a) e Rip-A/ $\beta$ -CD (b) em  $\text{DMSO-}d_6$  (500 MHz).



Fonte: arquivo pessoal.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  da  $\beta$ -CD demonstra os sinais específicos da CD conforme a literatura científica e indica a interação com a molécula hospedeira em função de variações espectrais e deslocamentos químicos com alterações no interior da CD decorrentes da complexação, representados pelos hidrogênios internos  $\text{H}_3$  e  $\text{H}_5$  da molécula. No complexo Rip-A/ $\beta$ -CD obtido pode-se perceber variação de 0,01 ppm no  $\text{H}_3$  da cavidade da  $\beta$ -CD (Figura 24).

**Figura 24.** Dados dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  da  $\beta$ -CD e Rip-A/ $\beta$ -CD em  $\text{DMSO-}d_6$  (500 MHz).

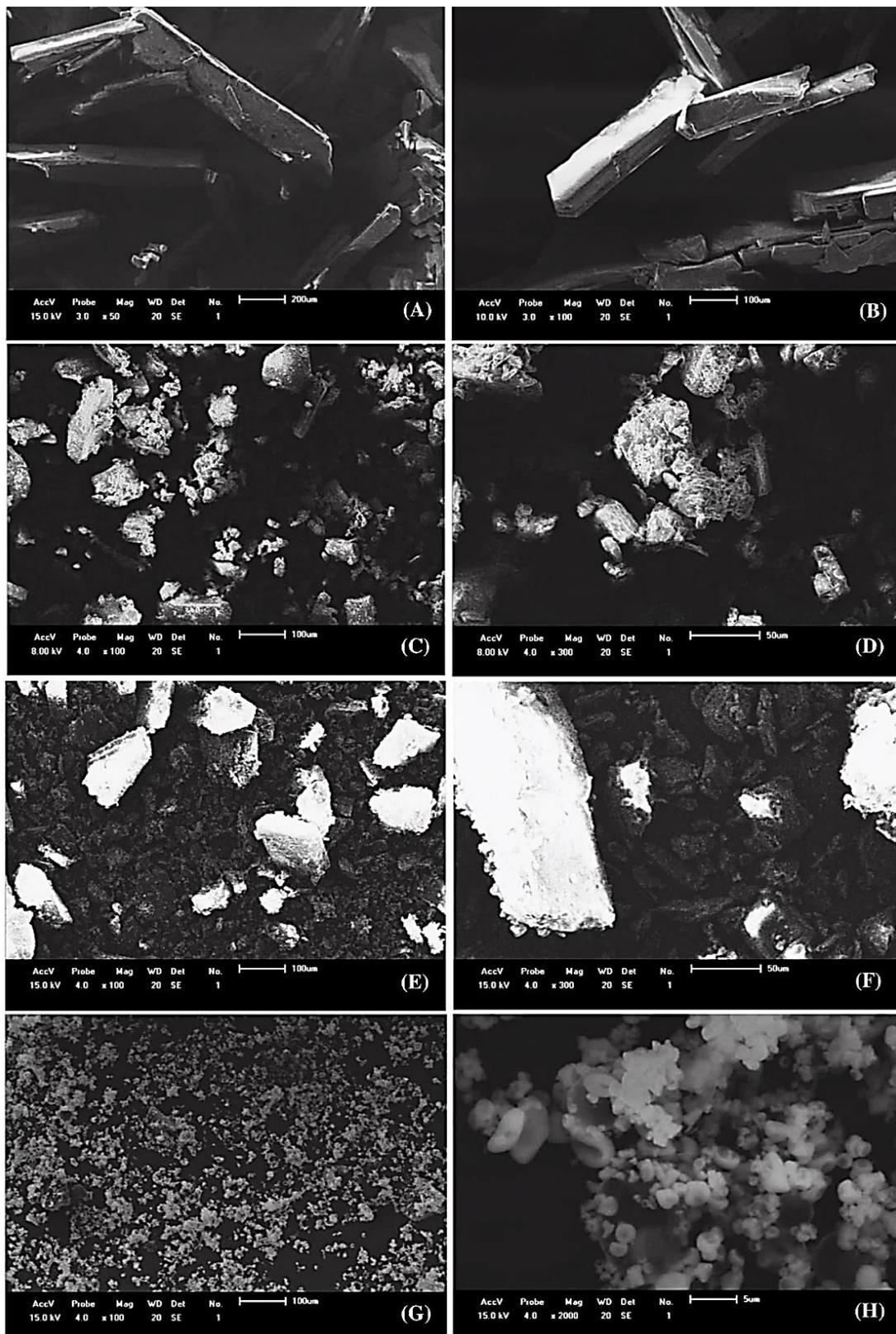


H ( $\delta$ )	$\beta$ -CD (ppm)	Rip-A/ $\beta$ -CD (ppm)
1	4,83	4,83
2	3,30	3,35
3	3,61	3,62
4	3,37	3,37
5	3,55	3,55
6	3,63	3,64

Fonte: arquivo pessoal.

Por fim, a MEV permitiu analisar qualitativamente a formação do complexo de inclusão. As imagens obtidas (Figura 25) demonstram a morfologia das amostras isoladas de Rip-A e  $\beta$ -CD, assim como da MF e do complexo Rip-A/ $\beta$ -CD com variação na estrutura cristalina da riparina e da estrutura globular da ciclodextrina, podendo-se perceber que a mistura física forma material distinto do complexo obtido no *spray-drying*.

**Figura 25.** Fotografias de MEV da Rip-A (A e B),  $\beta$ -CD (C e D), MF (E e F) e Rip-A/ $\beta$ -CD (G e H).

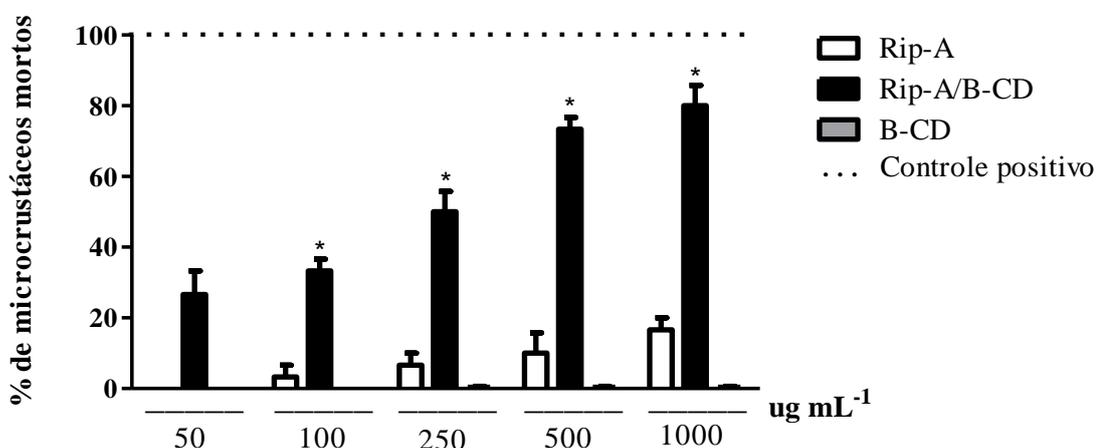


Fonte: arquivo pessoal.

### 5.5 Atividade citotóxica *in vitro*

No que concerne à atividade citotóxica da Rip-A e do complexo Rip-A/ $\beta$ -CD, os resultados do bioensaio realizado encontram-se apresentados na figura 26, constatando-se aumento da atividade citotóxica em virtude do aumento da concentração da substância testada. Pode-se constatar valores de  $CI_{50}$  de  $346,7 \mu\text{g mL}^{-1}$  para a Rip-A, enquanto o complexo Rip-A/ $\beta$ -CD obteve o valor de  $117,2 \mu\text{g mL}^{-1}$  ratificando a maior atividade citotóxica do complexo ( $p < 0,05$ ), enquanto a  $\beta$ -CD isolada não ocasionou mortes significativas.

**Figura 26.** Citotoxicidade da Rip-A livre e do complexo Rip-A/ $\beta$ -CD em *Artemia salina* após 24h de incubação.



Os resultados correspondem à média da porcentagem de inibição  $\pm$  erro padrão da média de experimentos independentes ( $n = 3$ ). Dicromato de potássio 0,1% foi usada como controle positivo. \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo Rip-A livre por ANOVA seguido por *Neuman-Keuls*. Fonte: arquivo pessoal.

---

# ***DISCUSSÃO***

---

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 Toxicidade aguda da riparina A

Há no meio popular forte apelo ao uso de substâncias naturais dotadas de propriedades terapêuticas em função da equivocada concepção de que derivados de plantas medicinais são inócuos ou totalmente seguros. Entretanto, *Peumus boldus* Molina, por exemplo, consiste em uma planta da família Monimiaceae amplamente consumida no Brasil que apresenta registros na literatura de efeitos teratogênicos, abortivos e hepatotóxicos em modelos animais (ALMEIDA et al., 2000; PAYDAR et al., 2014). Este tipo de informação ratifica a importância da realização de ensaios toxicológicos prévios com toda substância que pode vir a ser utilizada com fins terapêuticos, principalmente em seres humanos independente da origem ou da natureza da substância.

O *screening* hipocrático dos grupos tratados com riparina A (Rip-A) durante o ensaio de toxicidade não apresentou variações relevantes, com poucas alterações nos parâmetros fisiológicos analisados (Tabela 2). Ressalta-se, apenas, o ganho de peso dos animais tratados com a maior dose da Rip-A em relação grupo controle, fato justificável pelo aumento do consumo de ração o que indica aumento do apetite dos animais em virtude do tratamento realizado (Tabela 3). A ausência de alterações no *screening* hipocrático, assim como, a inobservância de sinais de toxicidade no acompanhamento das gaiolas metabólicas, como, por exemplo, diarreia e perda de peso, indicam de forma preliminar a baixa interferência da substância-teste em parâmetros fisiológicos dos animais e sua baixa toxicidade (BARROS; DAVINO, 2008).

Ensaio toxicológico preliminar realizado por Castelo-Branco e colaboradores (2000) demonstrou que as riparinas naturais (riparinas I, II e III) não promovem alterações comportamentais em camundongos, assim como indicado por Nunes et al. (2015) em pesquisa realizada com a Rip-A, fato confirmado por este estudo. Os pesquisadores relataram que a administração aguda das riparinas naturais em doses de até 1000 mg kg<sup>-1</sup> pelas vias oral e intraperitoneal não causam a morte de camundongos, exceto com a riparina III, a qual obteve valor de DL<sub>50</sub> de 104,2 mg kg<sup>-1</sup>, valor muito inferior ao da Rip-A. Esses resultados indicam que a Rip-A apresenta toxicidade aguda inferior às riparinas de origem natural, apesar de ser uma substância sintética.

Destaca-se ainda que até o presente momento não existem estudos toxicológicos publicados com as riparinas sintéticas (Riparinas A-F). Entretanto, as pesquisas de avaliação

toxicológica precedem os testes de atividade farmacológica, principalmente em modelos *in vivo*, pois permitem o estabelecimento de doses seguras a partir dos valores de DL<sub>50</sub> definidos. Nesse contexto, Jonsson et al. (2013) utilizando o mesmo desenho experimental relatado nesta pesquisa, testaram a toxicidade aguda da moniliformina, micotoxina de ocorrência global produzida por fungos do gênero *Fusarium* presente em altas concentrações em cereais consumidos pelo homem, sobretudo o milho. De acordo com os pesquisadores, a moniliformina é altamente tóxica em roedores com classificação 2 da GHS e DL<sub>50</sub> de 25 mg kg<sup>-1</sup>, além de promover fraqueza muscular e dano histológico no músculo cardíaco.

A Rip-A, entretanto, apresentou resultado similar àquele obtido com o extrato hidroetanólico das folhas da *Casearia sylvestris*, planta medicinal com vasta aplicação na medicina popular brasileira e que consta na Relação Nominal de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS), quanto ao valor elevado de DL<sub>50</sub> e consequente baixa toxicidade. Ameni e colaboradores (2015), utilizando o mesmo protocolo experimental de avaliação da toxicidade aguda verificaram que o extrato da *C. sylvestris*, assim como a riparina A não promovem alterações comportamentais significativas em roedores, bem como pode ser classificada segundo a GHS, como substâncias de baixa toxicidade aguda com valor de DL<sub>50</sub> acima de 2000 mg kg<sup>-1</sup>.

Quanto às análises clínicas empregadas não houve variação significativa nos hemogramas realizados (Tabela 4). Os hemogramas sugerem que a administração aguda da substância não promove alterações na medula óssea no que diz respeito ao processo de hematopoese e nem alterações celulares decorrentes de danos periféricos (SILVA et al., 2014; XU et al., 2015). Quanto às provas bioquímicas, a evidência de alterações nos triglicérides (Tabela 4) sugere que a Rip-A promove alterações sobre o metabolismo lipídico, pois, os triglicérides são formas importantes de armazenamento e transporte de ácidos graxos. Além disso, os resultados implicam ainda na ausência de ação hepatotóxica e nefrotóxica, visto que, não houve alterações nos níveis das transaminases (TGO e TGP), assim como, manutenção da creatinemia (MOTTA, 2009; LUKA et al., 2014).

Outra observação que endossa a ausência de atividade hepatotóxica e citotóxica específica para as hemácias, consiste na ausência de variação estatística nos níveis de bilirrubina direta e indireta nos animais tratados, respectivamente. A bilirrubina consiste em produto de degradação da hemoglobina intraeritrocitária. Esta substância pode ser conjugada a moléculas polares para promover sua excreção, sendo assim denominada bilirrubina direta ou conjugada. Caso se mantenha insolúvel ligada à albumina a bilirrubina passa ser transportada via corrente sanguínea para o fígado, onde será metabolizada, sendo nestes casos denominada bilirrubina

indireta ou não-conjugada. Desta forma elevações na bilirrubina direta estão associadas distúrbios hepatobiliares enquanto que elevações na bilirrubina indireta têm relação com distúrbios hemolíticos (COSTA et al., 2012; LUSTOSA et al., 2016).

A análise dos pesos relativos dos órgãos coletados (Tabela 5) constatou a ausência de alterações macroscópicas nos órgãos removidos, assim como, a inobservância de variação significativa no peso relativo decorrentes de hepatoesplenomegalia ou aumento renal ou cerebral (BESERRA et al., 2010). Destaca-se que apesar de não haver variações estatisticamente significativas nas análises clínicas realizadas ou no peso relativo dos órgãos dos roedores, houve alterações microscópicas no fígado e nos rins dos animais tratados, sem modificações do parênquima esplênico e do hipocampo cerebral (Figuras 10 e 11). Foi verificado a incidência de congestão vascular no fígado dos roedores dos grupos tratados, além de, degeneração hidrópica e esteatose em microgotas (Figuras 10c e 11c).

A degeneração hidrópica consiste em edema celular decorrente da hiper-hidratação e acúmulo de água no interior do hepatócito. Já a esteatose corresponde ao aumento da concentração de gordura no tecido. A presença de discretas microgotas de gordura no fígado pode ser decorrente da modificação da mobilização dos triglicerídeos, sobretudo, se considerado a elevação dos níveis séricos desses lipídios. Além disso a presença de trombos e congestão vascular renal também sugere a presença de atividade vascular atribuída à Rip-A (Figuras 10d e 11d) (CASTRO et al., 2002; MAIR; HERNANDEZ, 2006; FIGUEIREDO et al., 2013).

Os resultados apresentados sugerem que a riparina A é uma substância de baixa toxicidade, de acordo com o protocolo de toxicidade aguda, diretriz 423 da OECD. Entretanto, o uso da Rip-A exige cautela, pois, apesar da administração aguda não ter provocado redução funcional dos órgãos internos analisados, foi verificado a presença de lesões histológicas que podem evoluir com o uso crônico da substância causando, principalmente, comprometimento hepático e renal.

## **6.2. Efeitos comportamentais da riparina A**

Há uma concentração de pesquisas no meio científico voltadas para as atividades centrais atribuídas às riparinas naturais (riparinas I, II e III) extraídas da *A. riparia*, sobretudo quanto aos seus efeitos ansiolíticos e antidepressivos em animais (SOUSA et al., 2014; VASCONCELOS et al., 2015). Além disso, tanto as riparinas naturais como a própria Rip-A, já demonstraram em modelos comportamentais com roedores que não promovem

comprometimento do tônus muscular e não possuem ação sedativa o que sugere menores efeitos adversos se comparados, por exemplo, com os benzodiazepínicos, fármacos classicamente utilizados no tratamento da ansiedade mas que podem promover sedação e astenia. Desta forma, o fato da riparina A consistir no núcleo fundamental estrutural das riparinas estimula a realização de novas pesquisas com esta substância quanto a seus efeitos sobre o SNC (SOUSA et al., 2007; NUNES et al., 2015).

O labirinto em cruz elevado (LCE) é um modelo experimental utilizado para avaliar o estado de ansiedade e o comportamento exploratório de animais, permitindo classificar as drogas testadas em ansiolíticas ou ansiogênicas. O princípio fundamental do experimento consiste na aversão natural que os roedores apresentam para ambientes abertos e desprotegidos. Desta forma, drogas ansiolíticas, como o diazepam (DZP), tendem a aumentar o tempo de permanência (TPBA) e o número de vezes que o animal adentra nos braços abertos do labirinto (NEBA) (BOURIN et al., 2007; JASTRZEBSKA-WIESEK et al., 2014).

Os efeitos da Rip-A no ensaio do LCE encontram-se ilustrados na figura 12 com indicativo de atividade ansiolítica principalmente na dose de 200 mg kg<sup>-1</sup> quando analisado o parâmetro do TPBA. Outras pesquisas utilizando o método do labirinto em cruz elevado revelaram a presença de atividade ansiolítica para as riparinas naturais (riparinas I, II e III). Sousa e colaboradores (2005) demonstraram que a riparina I administrada em camundongos nas doses de 25 mg kg<sup>-1</sup> v.o. e 50 mg kg<sup>-1</sup> i.p. emulsionada em Tween 80 3% foi capaz de aumentar tanto o NEBA quanto o TPBA, equiparando-se ao DZP.

A pesquisa de Melo e colaboradores (2006) sobre os efeitos centrais da riparina III, obteve resultados similares aos descritos por Sousa et al., 2005. O estudo revelou que a riparina III nas doses 25 e 50 mg kg<sup>-1</sup> v.o. também elevou o NEBA e o TPBA em roedores de modo equivalente ao DZP. Pesquisa anterior realizada por Sousa e colaboradores (2004) já havia descrito a capacidade da riparina III veiculada em Tween 80 2% na dose de 50 mg kg<sup>-1</sup> i.p. aumentar de maneira significativa apenas o NEBA quando comparado ao veículo. Quanto à riparina II, a pesquisa de Sousa e colaboradores (2007) indicou o mesmo padrão de resposta ansiolítica com a substância administrada nas doses de 75 mg kg<sup>-1</sup> v.o. e 25 mg kg<sup>-1</sup> i.p. com aumento no NEBA e no TPBA.

No teste da caixa claro-escuro (TCE), por sua vez, avalia-se o tempo de permanência no campo claro (TPCC) e o número de transições entre os campos claro e escuro (NTC) realizadas pelo animal. Drogas com caráter ansiolítico tendem a aumentar o comportamento exploratório espontâneo dos roedores elevando o TPCC e o NTC. O grupo Rip-A 200 novamente foi o único

a apresentar padrão de resposta ansiolítico quando analisado o parâmetro do número de transições entre os campos da caixa (Figura 13) (GOMES et al., 2011; COSTA et al., 2014).

Já o teste de esconder esferas (TEE) caracteriza a atividade ansiolítica em função da redução do NEE e assim como no TCE, houve aumento na atividade com a elevação da dose administrada com significância estatística na maior dose em relação ao controle negativo, equiparando-se, também ao DZP. Destaca-se, porém, que no referido ensaio a Rip-A apresentou efeitos ansiolíticos a partir da dose de  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  (Figura 14). Além disso, os valores apresentados pelo grupo FLU + Rip-A não sofreram variação significativa em relação ao grupo Rip-A 200 indicando, conforme observado nos ensaios comportamentais anteriores, que a substância não atua com o mesmo mecanismo de ação do DZP.

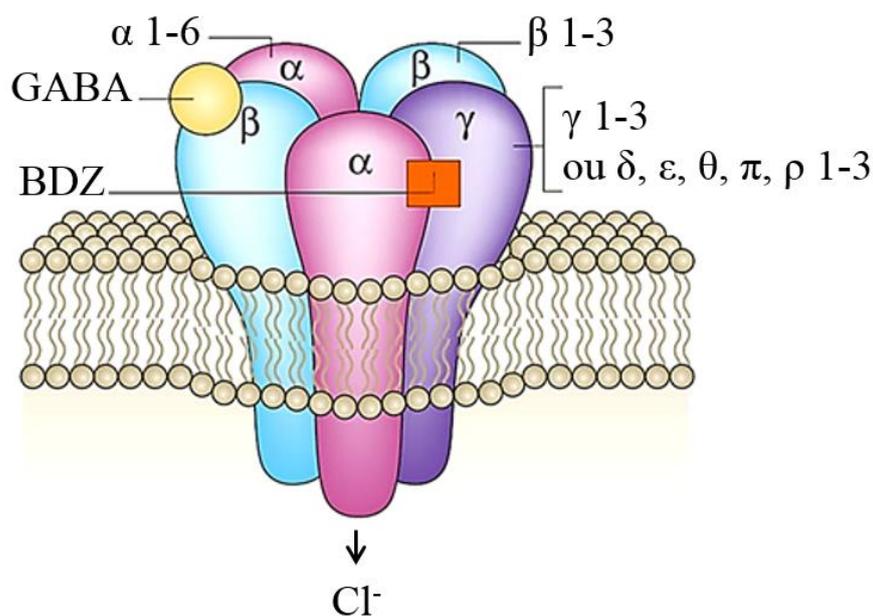
Cabe ressaltar os resultados de Nunes e colaboradores (2015) em que a administração aguda da riparina A durante 7 dias nas doses de 5, 10 e  $20 \text{ mg kg}^{-1}$  v.o. provocou proteção cerebral antioxidante juntamente com um aumento significativo no comportamento exploratório de roedores no teste do campo aberto, assim como, elevou o tempo de permanência, com conseqüente redução do número de quedas dos roedores sobre a barra giratória do *rota rod* em relação ao DZP ( $1 \text{ mg kg}^{-1}$  i.p.). Estes dados corroboram os resultados descritos no TCE apesar da Rip-A ter sido administrada em dose 10 vezes superior àquela utilizada por Nunes et al. (2015) ratificando a baixa toxicidade da substância.

Os resultados reforçam a capacidade de atuação da Rip-A sobre o SNC o que justifica as pesquisas prévias realizadas com as substâncias extraídas do “louro”. O uso dos derivados sintéticos pode garantir a realização de novas pesquisas sem expor a espécie vegetal ao risco de extinção. Há, notadamente, a partir dos resultados prévios do teste do labirinto em cruz elevado descritos na literatura juntamente com os resultados apresentados na presente tese, indícios de ação ansiolítica vinculada às riparinas naturais (I, II, III) e à Rip-A. Este dado, juntamente com a observação da estrutura molecular dessas substâncias (Figura 2) demonstram que a atividade central pode estar associada ao grupamento funcional amida comum em todas as riparinas. Da mesma forma, as diferenças apresentadas entre essas riparinas quanto ao efeito ansiolítico pode ser atribuída a fatores farmacocinéticos e farmacodinâmicos decorrentes dos substituintes presentes nos anéis aromáticos laterais das moléculas.

### 6.3 Estudo de docagem molecular

O GABA<sub>A</sub> é o receptor de neurotransmissão inibitória prevalente no cérebro dos mamíferos. Trata-se de macromolécula alvo de uma grande variedade de fármacos incluindo os benzodiazepínicos, barbitúricos e antiepiléticos. O receptor é formado a partir da associação de cinco subunidades que resultam na estrutura de um canal pentamérico de íons cloreto. Atualmente já foram elucidados 19 tipos de subunidades ( $\alpha$  1-6,  $\beta$  1-3,  $\gamma$  1-3,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\pi$ ,  $\theta$ ,  $\rho$  1-3) com maioria constituída por duas subunidades  $\alpha$ , duas subunidades  $\beta$  e uma subunidade  $\gamma$  (Figura 27). Os benzodiazepínicos atuam predominantemente em receptores heteropentaméricos dos tipos  $\alpha_1\beta\gamma_2$ ,  $\alpha_2\beta\gamma_2$ ,  $\alpha_3\beta\gamma_2$  e  $\alpha_5\beta\gamma_2$  com sítio de ligação situado entre as subunidades  $\alpha$  e  $\gamma$ , diferentemente do ligante endógeno (Ácido  $\gamma$ -aminobutírico, GABA) que interage na interface  $\alpha$ - $\beta$  (SIGEL; STEINMANN, 2012; MILLER; ARICESCU, 2014).

**Figura 27.** Estrutura molecular do receptor GABA<sub>A</sub>.



Fonte: adaptado de Jacob et al., 2008.

Por conseguinte, visando elucidar as possíveis interações moleculares envolvidas no mecanismo da ação ansiolítica da Rip-A, foi realizada a docagem molecular da substância com o receptor GABA<sub>A</sub> ( $\alpha_2\beta_1\gamma_2$ ). Foram obtidos os valores da energia livre de Gibbs ( $\Delta G^\circ$ ) e da constante de inibição ( $K_i$ ) da riparina A e do diazepam conforme apresentado na tabela 6. A análise dos valores de  $\Delta G^\circ$  e  $K_i$  permite avaliar as melhores interações do complexo Rip-A/GABA<sub>A</sub> destacando as conformações com complementariedade química e espacial mais

favoráveis. Os valores negativos da energia demonstram que há espontaneidade relevante nas interações existentes tanto da riparina A quanto do diazepam com o receptor.

Deve-se salientar, porém, que pautado nos valores de  $K_i$ , a Rip-A não supera o DZP quanto à afinidade pelo  $GABA_A$ , o que confirma os resultados observados nos modelos animais de atividade ansiolítica, nos quais a riparina não se mostrou superior ao controle positivo realizado com diazepam. Assim, os valores elevados da constante de inibição indicam, em relação ao diazepam, que a Rip-A apresenta menor especificidade ligante-receptor do que o benzodiazepínico utilizado nos ensaios comportamentais corroborando os resultados dos modelos experimentais (MORRIS, et al., 1998; KITCHEN, et al., 2004; XIE, et al., 2013).

No modelo de complexo ligante-receptor proposto, observa-se que a Rip-A interagiu preferencialmente entre as subunidades  $\alpha_2$  e  $\beta_1$  (1ª e 3ª conformações mais favoráveis) e entre as subunidades  $\beta_1$  e  $\gamma_2$  (2ª conformação mais favorável) do receptor farmacológico (Figura 15). Esse resultado indica um sítio de ligação no domínio extracelular do receptor diferente daquele ocupado pelo diazepam (Figura 27), o que justifica o fato do flumazenil, antagonista competitivo benzodiazepínico, não ter revertido os efeitos da riparina nos ensaios comportamentais realizados, assim como, os efeitos ansiolíticos inferiores ao do fármaco de referência.

A literatura relata que há forte correlação entre o efeito ansiolítico dos benzodiazepínicos com a presença da subunidade  $\alpha_2$  no receptor gabaérgico. Em modelos computacionais já bem descritos, baseados no receptor  $\alpha_1\beta_1\gamma_2$ , pode-se perceber que a afinidade benzodiazepínica resulta da ocorrência de interações com alguns resíduos de aminoácidos, principalmente de histidina (His102) nas subunidades  $\alpha_1$  e fenilalanina (Phe77) na subunidade  $\gamma_2$ . Estudos de docagem com o diazepam demonstram a formação de ponte de hidrogênio entre fármaco e o resíduo His102 e de interações hidrofóbicas com a Phe77 (JOHNSTON, 2005; CI; REN; SU, 2008; XIE, et al., 2013).

No caso da Rip-A percebe-se que a molécula sofre discreta torção durante as interações com o receptor gabaérgico, fenômeno possivelmente ocasionado pela presença do grupamento funcional amida no centro da molécula. Este compõe o grupo farmacofórico da substância, o qual pode interagir por intermédio de ligação de hidrogênio com resíduos de aminoácidos do receptor, mas preferencialmente com o resíduo Tyr87 (Figura 16). Os demais aminoácidos envolvidos nas interações moleculares do complexo Rip-A/ $GABA_A$ , por sua vez, promovem interações hidrofóbicas mais fracas.

Os resultados demonstram, portanto, que a Rip-A consiste em uma molécula com atividade ansiolítica capaz de interagir com o receptor gabaérgico em sítio ativo distinto daquele

ocupado por fármacos benzodiazepínicos. Desta forma, a riparina A demonstra ser uma molécula candidata a novos estudos farmacêuticos, a fim de, ensinar o desenvolvimento de novos produtos ou formulações que aprimorem suas propriedades farmacocinéticas.

#### **6.4 Caracterização do complexo de inclusão Rip-A/ $\beta$ -CD**

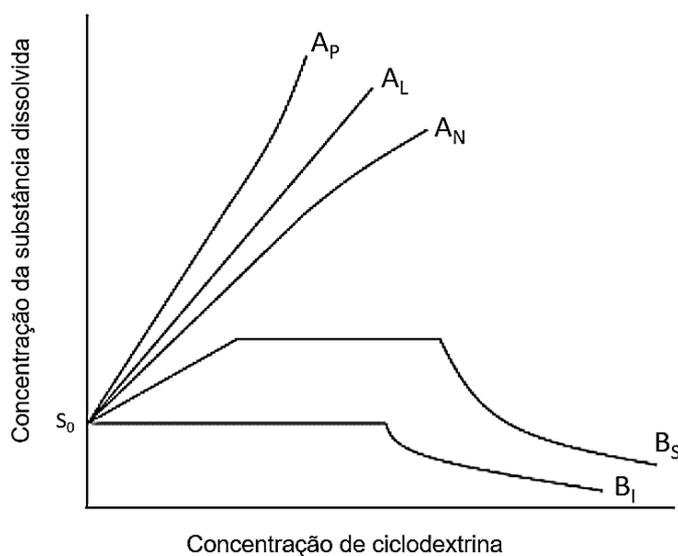
A complexação consiste na interação de uma molécula hospedeira, representado pela  $\beta$ -CD com outra molécula hóspede que no estudo realizado consiste na Rip-A. A aplicação das ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão apresenta grande notoriedade no meio farmacêutico devido ao incremento da solubilidade aquosa do fármaco complexado na cavidade da  $\beta$ -CD o que favorece sua veiculação. Várias pesquisas foram realizadas nos últimos anos visando a obtenção de complexos de inclusão com substâncias ativas, como por exemplo, o neurotransmissor dopamina, o hormônio epinefrina e o aminoácido neuroativo tiramina. A complexação melhora a estabilidade e parâmetros farmacêuticos, além de otimizar propriedades farmacológicas. O método de Higuchi e Connors (1965) consiste em uma metodologia amplamente citada na literatura para a realização do diagrama de solubilidade de fases e análise do complexo de inclusão formado a partir do aumento da solubilidade da Rip-A em função de concentrações crescentes de  $\beta$ -CD (VEIGA et al., 2006; ROY et al., 2016).

A varredura espectrofotométrica UV-Vis da Rip-A em 225 nm indicou que não houve leitura espectral de absorção da  $\beta$ -CD, o que demonstra que a ciclodextrina não interfere na análise espectrofotométrica da riparina (Figura 17) (BULANI et al., 2016). Houve aumento linear da solubilidade aquosa da Rip-A com a elevação crescente das concentrações de  $\beta$ -CD (Figura 18) sugerindo a formação de complexo de inclusão com proporção molar 1:1 (Rip-A: $\beta$ -CD), relação estequiométrica presente na maioria dos complexos obtidos com  $\beta$ -CD nos quais a molécula hóspede apresenta usualmente peso molecular entre 100 e 400 Da, semelhante a Rip-A (225,29 Da) (VEIGA et al., 2006; AGUIAR et al., 2014).

A constante  $K_{st}$  indica a presença de significativa interação entre a Rip-A e a  $\beta$ -CD com formação de complexo de inclusão estável. Baixos valores de  $K_{st}$  assinala fraca interação e grande quantidade da molécula hóspede livre. Os valores de  $K_{st}$  são considerados ideais quando situados entre 100 e 1000 L mol<sup>-1</sup>, assim como foi constatado no diagrama de solubilidade obtido no qual o valor da constante foi de 373 L mol<sup>-1</sup> (WANG et al., 2011; SANTOS et al., 2015).

O diagrama de solubilidade permite a classificação de complexos em dois perfis: A e B, no qual tipo A consiste em complexos solúveis e tipo B, complexos de solubilidade limitada (Figura 27).

**Figura 28.** Perfis de solubilidade de Higuchi e Connors



Fonte: Adaptado de Cunha-Filho; Sá-Barreto, 2007.

Os diagramas do tipo A podem ainda ser subclassificados em  $A_P$ , diagrama com desvio positivo, em que a solubilização é mais eficaz em altas concentrações de ciclodextrina;  $A_L$ , diagrama linear, em que a solubilidade do fármaco aumenta linearmente com o aumento da concentração de ciclodextrina, tal como observado para a Rip-A;  $A_N$ , diagrama com desvio negativo, em que a ciclodextrina é proporcionalmente menos efetiva em altas concentrações devido a interações complexas entre soluto-soluto e soluto-solvente o que não permite generalizações na interpretação deste tipo de diagrama. Os diagramas do tipo B, por sua vez, podem ser dos tipos:  $B_S$ , diagrama com precipitação do complexo insolúvel com o aumento da ciclodextrina após aumento inicial da solubilidade da substância hóspede e  $B_I$ , referente a um complexo altamente insolúvel sem a possibilidade de aumento inicial na solubilidade da substância hóspede (BREWSTE; LOFTSSON, 2007; CUNHA-FILHO; SÁ-BARRETO; GUEDES et al., 2008).

Observou-se em sequência, no estudo de dissolução, que tanto a Rip-A livre quanto a MF preparada apresentaram aumento na porcentagem de riparina em solução à medida em que se elevou o tempo de dissolução, atingindo porcentagens máximas após 1 hora de ensaio de 61,7% e 62,5%, respectivamente (Figura 19). Ficou evidente que o complexo Rip-A/ $\beta$ -CD

apresentou maiores concentrações de Rip-A em solução superando o máximo de dissolução das demais amostras a partir dos primeiros 5 minutos de experimento atingindo 68,7% de riparina dissolvida. O aumento na dissolução é decorrente da interação da Rip-A com a  $\beta$ -CD e consequente redução da tensão interfacial da riparina com o meio de dissolução empregado melhorando sua hidrossolubilidade (FERNANDES et al., 2008; FREITAS et al., 2012; TANG et al., 2015).

As técnicas termoanalíticas são outras análises preliminares que permitem verificar alterações decorrentes de eventos térmicos, degradação e alteração da estabilidade das amostras e do complexo formado auxiliando na constatação da presença de complexação. Na análise por CED é possível perceber variação nos pontos de fusão, ebulição e sublimação ou o desaparecimento desses registros devido a incorporação da molécula hóspede na cavidade da  $\beta$ -CD (ÉHEN et al., 2005; ABARCA et al., 2016).

A curva de calorimetria da  $\beta$ -CD apresenta um pico endotérmico largo a 95,8°C relativo à perda de água da molécula, enquanto que o termograma da Rip-A apresenta um pico endotérmico característico, intenso e bem definido à 116,2°C decorrente da fusão da substância e da sua natureza cristalina (Figura 20). O pico de fusão da Rip-A inexistente na curva da  $\beta$ -CD e se encontra presente e parcialmente diminuído no termograma da MF com acentuada redução na curva do complexo Rip-A/ $\beta$ -CD indicando a incorporação da riparina na molécula da ciclodextrina em ambos os métodos, porém com melhor eficiência pelo método do *spray-drying*. Pode-se perceber que a curva da MF corresponde à associação das curvas da  $\beta$ -CD com a curva da Rip-A diferentemente do termograma Rip-A/ $\beta$ -CD sugerindo que na MF houve menor interiorização da Rip-A na cavidade da  $\beta$ -CD (REN et al., 2016; LIAO et al., 2016).

A técnica da DRX, por sua vez, possibilita a análise estrutural em função do espalhamento de raios X disparados sobre a amostra (GAO et al., 2015). Ocorre no difratograma obtido (Figura 21) a ausência de sinal dos picos característicos da Rip-A no complexo Rip-A/ $\beta$ -CD indicando sucesso na complexação da riparina com modificação da natureza cristalina da amostra para um padrão amorfo diferentemente do difratograma da MF pois, verifica-se a manutenção dos picos da Rip-A, porém com intensidade reduzida indicando uma complexação menos eficaz conforme sugerido na análise por CED (FREITAS et al., 2012; WANG et al., 2015).

Há na literatura vasta aplicação da espectroscopia de RMN e de IV para análise confirmatória da obtenção de complexos de inclusão constatando a região da molécula hóspede que se encontra alojada no interior da  $\beta$ -CD, pois ambas são ferramentas de elucidação estrutural. A técnica do IV permite a geração de bandas características mediante a absorção de

radiação infravermelha do espectro eletromagnético e consequente vibração molecular, envolvendo comprimentos de onda superiores àqueles relacionados com a luz visível (400 a 800 nm). Os espectros de IV da MF e do complexo Rip-A/ $\beta$ -CD confirmam a presença da complexação, sobretudo, em virtude da ausência das absorções referentes às ligações N—H, C—H alifática e estiramento C=C de anel aromático da Rip-A em  $3344\text{ cm}^{-1}$ ,  $2850\text{ cm}^{-1}$  e  $1544\text{ cm}^{-1}$  respectivamente, indicando o envolvimento da região central da molécula na formação do complexo de inclusão com provável inserção dos anéis aromáticos na cavidade da  $\beta$ -CD (Figura 22) (LOPES; FASCIO, 2004; LIMA et al., 2008).

Já a técnica da RMN  $^1\text{H}$  permite analisar o número de átomos de hidrogênio presentes em uma molécula exposta a um campo magnético. Yang e colaboradores (2014) apontam que deslocamentos químicos de 0,01 a 0,03 ppm apesar de mínimos são significativos para a análise da formação de complexos de inclusão. Pode-se perceber que a complexação com a Rip-A gerou alterações nos valores de  $\delta$  de  $\text{H}_2$ ,  $\text{H}_3$  e  $\text{H}_6$  com destaque para o deslocamento de  $\text{H}_3$  (0,01 ppm) o que demonstra interação da Rip-A com a cavidade da  $\beta$ -CD na sua porção mais larga que pode ser derivada de pontes de hidrogênio envolvendo o grupamento amida da Rip-A e os átomos de oxigênio da  $\beta$ -CD (Figuras 23 e 24).

Por fim, a microscopia eletrônica de varredura demonstrou as variações morfológicas da Rip-A após a complexação. Esta variação indica a presença de interação entre as moléculas hóspede e hospedeira. Na MF, verifica-se padrão morfológico similar ao observado na  $\beta$ -CD indicando que o contato físico da amostra nas condições realizadas foi menos eficaz na formação de complexo de inclusão. As imagens da preparação obtida no *spray-dring*, por sua vez, demonstram uma alteração do padrão morfológico com a formação de material amorfo característico de complexo de inclusão corroborando os resultados verificados no DRX (TANG et al., 2015).

### 6.5. Atividade citotóxica *in vitro*

O bioensaio de pesquisa da atividade artemicida consiste em teste rápido de fácil execução baseado no aspecto quantitativo do número de espécimes mortos após a exposição à substância teste. *A. salina* consiste em microcrustáceo de fácil obtenção entre aquaristas, uma vez que, serve como alimento para algumas espécies de peixes ornamentais. Os resultados demonstram a atividade da riparina complexada frente à substância livre com ausência de atividade da  $\beta$ -CD e elevada citotoxicidade do  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  (Figura 26). No ensaio realizado pode-se perceber menores valores de  $\text{CI}_{50}$  para a riparina A complexada por aspersão quando

comparada com a riparina livre. Este resultado é decorrente da melhor hidrossolubilidade do complexo de inclusão em relação à Rip-A livre o que, por sua vez, ratifica a melhoria dessa propriedade em virtude da complexação (SHAKIR et al., 2012; ROCHA-FILHO et al., 2015).

Além do exposto, este resultado consiste em um dado promissor, pois sugere que outras atividades farmacológicas atribuídas à riparina A, como por exemplo, seus efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e leishmanicidas podem sofrer incrementos em virtude da complexação da molécula, sobretudo a atividade antitumoral, se considerado que o bioensaio artemicida é um modelo experimental prévio de avaliação *in vitro* de potenciais substâncias ativas contra diversos tipos de tumores sólidos humanos, fato viabilizado desde que a substância-teste apresente  $CI_{50}$  inferior a  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  perante as artemias, como foi o caso da Rip-A em ambas as apresentações avaliadas (COELHO et al., 2011; LEITE et al., 2015).

## Referências

- ABARCA, R.L. Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing an essential oil component. **Food Chemistry**, v. 196, p. 968-975, 2016.
- AGUIAR, U.N. et al. Preparação e caracterização do complexo de inclusão do óleo essencial de *croton zehntneri* com  $\beta$ -ciclodextrina, **Química Nova**, v.37, n.1, p.50-55, 2014.
- ALMEIDA, E.R. et al. Toxicological evaluation of the hydro-alcohol extract of the dry leaves of *Peumus boldus* and boldine in rats. **Phytotherapy Research** v. 14, p. 99-102, 2000.
- AMENI, A.Z. et al. Toxicity study about a medicinal plant *Casearia sylvestris*: A contribution to the Brazilian Unified Health System (SUS). **Journal of Ethnopharmacology**, n. 175, p. 9-13, 2015.
- BARROS, S.B.M.; DAVINO, S.C. Avaliação da Toxicidade. In: OGA, S.; CAMARGO, M.M.A.; BATISTUZZO, J.A.O. **Fundamentos de Toxicologia**. 3 ed. São Paulo: Ed. Atheneu, p. 64-65, 2008.
- BESERRA, A.M.S.S. et al. Avaliação toxicológica do ácido elágico em roedores. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.91, n.1, p.16-24, 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Relação Nominal de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS - RENISUS**. Brasília (DF), 2009.
- BREWSTER, M.E.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p.645-666, 2007.
- BOURIN, M. et al. Animal models of anxiety in mice. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 21, p. 567-574, 2007.

BULANI, V.D. et al. Inclusion complex of ellagic acid with  $\beta$ -cyclodextrin: Characterization and in vitro anti-inflammatory evaluation. **Journal of Molecular Structure**, v. 1105, p. 308-315, 2016.

CASTELO-BRANCO, U.V. et al. Preliminary pharmacological studies on three benzoyl amides constituents of *Aniba riparia* (Ness) Mez (Lauraceae). **Acta Farmaceutica Bonarense**, v.19, p.197-202, 2000.

CASTRO, A.F. et al. Achados histológicos em 48 pacientes transplantados do fígado: biópsias do enxerto pós-reperfusão (tempo zero) e de três a 15 dias pós-transplante. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.38, n.4, p. 301-306, 2002.

CI, S.; REN, T.; SU, Z. Investigating the putative binding-mode of GABA and diazepam within GABA<sub>A</sub> receptor using molecular modeling. **The Protein Journal**, v. 27, p. 71-78, 2008.

COELHO, A.G. et al. Extração e caracterização do óleo essencial das raízes e testes de atividade biológica do extrato hidroalcoólico de *Operculina alata* (Ham) Urban. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. VIII, n.3, p.1-9, 2011.

COSTA, J.P. et al. Avaliação da toxicidade aguda e das alterações histopatológicas em camundongos tratados com fitol. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.33, n.3, p.421-428, 2012.

COSTA, J.P. et al. Anxiolytic-like effects of phytol: Possible involvement of GABAergic transmission. **Brain Research**, v. 1547, p. 34-32, 2014.

CUNHA-FILHO, M.S.S.; SÁ-BARRETO, L.C.L. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, p.1-9, 2007.

ÉHEN, Z. et al. Thermal characterization of natural and modified cyclodextrins using TG-MS combined technique. **Journal of thermal analysis and calorimetry**, v. 80, n. 2, p. 419-424, 2005.

FERNANDES, L. et al. Solid state studies on molecular inclusions of *Lippia sidoides* essential oil obtained by spray drying. **Journal of thermal analysis and calorimetry**, v. 95, n. 3, p. 855-863, 2009.

FIGUEIREDO, C.R.L.V. et al. Avaliação histopatológica e histoquímica das células claras em lesões odontogênicas císticas. **Revista cubana de estomatología**, v.49, n.2, p.183-191, 2013.

FREITAS, M.R. et al. Inclusion complex of methyl- $\beta$ -cyclodextrin and olanzapine as potential drug delivery system for schizophrenia. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, p.1095-1100, 2012.

GAO, R. et al. Study of stability and drug-excipient compatibility of estradiol and pharmaceutical excipients. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 120, n. 1, p. 839-845, 2015.

GOMES, K. M. et al. Evaluation of light/dark cycle in anxiety-and depressive-like behaviors after regular treatment with methylphenidate hydrochloride in rats of different ages. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 33, n. 1, p. 55-58, 2011.

GUEDES, F.L. et al. Ciclodextrinas: como adjuvantes tecnológicos para melhorar a biodisponibilidade de fármacos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.89, n.3, p.220-225, 2008.

HIGUCHI, T.; CONNORS, K.A. Phase-solubility techniques. **Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation**, v. 4, p. 117-212, 1965.

JACOB, T.C.; MOSS, S.J.; JURD, R. GABA<sub>A</sub> receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. **Nature Reviews Neuroscience**, v.9, n. 5, p.331-343, 2008.

JASTRZEBSKA-WIESEK, M. et al. Pharmacological evaluation of the anxiolytic-like effects of EMD 386088, a partial 5-HT<sub>6</sub> receptor agonist, in the rat elevated plus-maze and Vogel conflict tests. **Neuropharmacology**, v. 85, p. 253-262, 2014.

JOHNSTON, G.A.R. GABA<sub>A</sub> receptor channel pharmacology. **Current Pharmaceutical Design**, v. 11, p. 1867-1885, 2005.

JONSSON, M. et al. Application of OECD guideline 423 in assessing the acute oral toxicity of moniliformin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 53, p. 27-32, 2013.

KITCHEN, D.B. et al. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n.11, p. 935-949, 2004.

LEITE, A.S. et al. Evaluation of toxic, cytotoxic, mutagenic, and antimutagenic activities of natural and technical cashew nut shell liquids using the *Allium cepa* and *Artemia salina* bioassays. **Biomed Research International**, p.1-16, 2015.

LIAO, Y. et al. Inclusion complexes of HP- $\beta$ -cyclodextrin with agomelatine: Preparation, characterization, mechanism study and *in vivo* evaluation. **Carbohydrate Polymers**, v. 147, n. 20, p. 415-425, 2016.

LIMA, A.A.N. et al. Alternative technologies to improve solubility of poorly water soluble drugs. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 5, p. 789-97, 2008.

LOPES, W.A.; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 670-673, 2004.

LUKA, J. et al. Acute toxicity study and effect of prolonged administration (28days) of crude ethanolic root extract of *Diospyros mespiliformis* Hochst (Ebenaceae) on clinical, haematological and biochemical parameters of albino rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 153, p. 268-273, 2014.

LUSTOSA, A.K.M.F. et al. Immunomodulatory and toxicological evaluation of the fruit seeds from *Platonia insignis*, a native species from Brazilian Amazon Rainforest. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.26, p.77-82, 2016.

MAIR, J. O.; HERNANDEZ, L. A. **Anatomia patológica general**. Barcelona:Univers, 2006.

- MELO, C.T.V. et al. Anxiolytic-like effects of (O-methyl)-N-2,6-dihydroxybenzoyl-tyramine (Riparin III) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 3, p. 451-454, 2006.
- MILLER, P.S.; ARICESCU, A.R. Crystal structure of a human GABA<sub>A</sub> receptor. **Nature**, v. 512, n. 7514, p. 270-275, 2014.
- MORRIS, G.M. et al. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. **Journal of Computational Chemistry**, v. 19, n.14, p.1639-1662, 1998.
- MOTTA, V.T. **Bioquímica clínica para o laboratório – princípios e interpretações**. 5ª ed. Rio de Janeiro: MedBook, 2009.
- NUNES, G.B.L. et al. Behavioral tests and oxidative stress evaluation in mitochondria isolated from the brain and liver of mice treated with riparin A. **Life Sciences**, v.121, p. 57-64, 2015.
- PAYDAR, M. et al. Evaluation of cytotoxic and chemotherapeutic properties of boldine in breast cancer using *in vitro* and *in vivo* models. **Drug Design, Development and Therapy**, v.8, p. 719-733, 2014.
- REN, Y. et al. Host-guest inclusion system of oleanolic acid with methyl-β-cyclodextrin: Preparation, characterization and anticancer activity. **Journal of Molecular Structure**, v. 1117, p. 1-7, 2016.
- ROCHA-FILHO, C.A.A. et al. Assessment of toxicity of *Moringa oleifera* flower extract to *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni* and *Artemia salina*. **Chemosphere**, v. 132, p. 188-192, 2015.
- ROY, M.N. et al. Exploration of inclusion complexes of neurotransmitters with β-cyclodextrin by physicochemical techniques. **Chemical Physics Letters**, v.655-656, p. 43-50, 2016.
- SANTOS, E.H. et al. Characterization of carvacrol beta-cyclodextrin inclusion complexes as delivery systems for antibacterial and antioxidant applications. **Food Science Technology**, v. 60, p. 583-592, 2015.
- SHAKIR L. et al. Ecotoxicological risks associated with tannery effluente Wastewater. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 3, n. 4, p. 180-191, 2012.
- SIGEL, E.; STEINMANN, M. Structure, function, and modulation of GABA<sub>A</sub> receptors. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 48, p. 40224-40231, 2012.
- SILVA, A.R.H. et al. Biochemical and hematological effects of acute and sub-acute administration to ethyl acetate fraction from stem bark *Scutia buxifolia* Reissek in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 153, p. 908-916, 2014.
- SOUSA, F.C.F. et al. Antianxiety and antidepressant effects of riparin III from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 78, p.27-33, 2004.

SOUSA, F.C.F. et al. Antianxiety effects of riparin I from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Phytotherapy Research**, v. 19, p. 1005-1008, 2005.

SOUSA, F.C.F. et al. Evaluation of effects of *N*-(2-hydroxybenzoyl) tyramine (**riparin II**) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in anxiety models in mice. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, p. 1212-1216, 2007.

SOUSA, F.C.F. et al. Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of riparin I from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 28, p.95-103, 2014.

TANG, P. et al. Inclusion complexes of chlorzoxazone with  $\beta$ - and hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin: Characterization, dissolution, and cytotoxicity. **Carbohydrate Polymers**, v. 131, p. 297-305, 2015.

VASCONCELOS, A.S. et al. Subchronic administration of riparin III induces antidepressive-like effects and increases BDNF levels in the mouse hippocampus. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 29, p. 394-403, 2015.

VEIGA, F. et al. As ciclodextrinas em tecnologia farmacêutica. Coimbra: Minerva, 2006.

WANG, L. et al. Characterization and evaluation of synthetic riluzole with  $\beta$ -cyclodextrin and 2,6-di-O-methyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes. **Carbohydrate Polymers**, v. 129, n. 9-16, 2015.

XIE, H-B. et al. Some insights into the binding mechanism of the GABA<sub>A</sub> receptor: a combined docking and MM-GBSA study. **Journal of Molecular Modeling**, v. 19, p. 5489-5500, 2013.

XU, K. et al. Evaluation of safety of iridoids rich fraction from *Valeriana jatamansi* Jones: Acute and sub-chronic toxicity study in mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 172, p.386-394, 2015.

YANG, R. et al. Inclusion complex of GA-13316 with  $\beta$ -cyclodextrin: Preparation, characterization, molecular modeling, and in vitro evaluation. **Carbohydrate Polymers**, v. 111, p. 655-662, 2014.

---

## ***CONSIDERAÇÕES FINAIS***

---

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presente tese apresentou evidências da baixa toxicidade aguda da riparina A, substância sintética derivada das riparinas naturais que pode ter aplicações terapêuticas e ser uma alternativa à exploração predatória à planta medicina *A. riparia*. A substância demonstrou ter alto valor de  $DL_{50}$ , superior a  $2000 \text{ mg kg}^{-1}$  com discretas alterações em parâmetros bioquímicos. Ressalta-se, porém, os danos histopatológicos renais e hepáticos decorrentes do tratamento agudo com a substância o que inspira cuidados na sua administração e sobretudo, a realização de novas pesquisas quanto ao caráter toxicológico subcrônico e crônico da substância.

Foi possível observar a partir dos modelos comportamentais realizados que de maneira semelhante às demais riparinas naturais (riparinas I, II e III), a riparina A apresenta atividade ansiolítica, que neste caso foi mais evidente na dose de  $200 \text{ mg kg}^{-1}$  o que sugere que esta propriedade encontra-se relacionada com a estrutura química fundamental comum a todas as riparinas e que corresponde justamente à estrutura molecular da riparina A. A docagem molecular validou a possibilidade de interação da substância com o receptor gabaérgico, entretanto em sítio de ligação distinto daquele ocupado pelos fármacos benzodiazepínicos mediante a interação com o resíduo de aminoácido Tyr87, predominantemente. Este dado justificou o fato da riparina A não apresentar reversão dos seus efeitos ansiolíticos quando administrada juntamente com o antagonista flumazenil.

Além disso, foi constatado que é viável a obtenção de um complexo de inclusão da riparina A com betaciclodextrina. Este produto pode ser empregado em novos ensaios visando melhores resultados quanto às atividades farmacológicas da riparina A, uma vez que, melhorou sua hidrossolubilidade. Da mesma maneira abre perspectivas para a realização de novas pesquisas para investigação dos efeitos toxicológicos da Rip-A e demais riparinas quando complexadas. Deve-se enaltecer o fato de existirem outras ciclodextrinas substituídas de destaque, como por exemplo, a hidroxipropilciclodextrina, que também podem ser utilizadas na obtenção de novos complexos de inclusão com as riparinas visando o incremento das suas atividades farmacológicas ou redução dos seus efeitos toxicológicos.

---

***PRODUÇÃO CIENTÍFICA***

---

### Éverton José Ferreira de Araújo (ARAÚJO, E. J. F.)

Bacharel em Farmácia pela Universidade Federal do Piauí - UFPI (2009). Especialista em Análises Clínicas pelo Instituto Brasileiro de Pós-Graduação e Extensão - IBPEX (2011). Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal do Piauí (2013). Atualmente é professor assistente da UFPI ministrando a disciplina de Hematologia Clínica para o curso de graduação em Farmácia.

#### Artigos completos publicados em periódicos

ARAÚJO, É. J. F.; LIMA, L.K.F.; JÚNIOR, L.M.R.; JÚNIOR, M.P.S.; FREITAS, R.M.; LIMA, F. C. A. Atividades centrais das riparinas para tratamento de transtornos mentais: revisão de literatura. *Revista Brasileira de Farmácia / Brazilian Journal of Pharmacy*, v. 97, p. 45-60, 2016.

ARAÚJO, É. J. F.; LIMA, L.K.F.; SILVA, O.A. ; JÚNIOR, L.M.R. ; GUTIERREZ, S. J. C. ; LIMA, F. C. A. ; PESSOA, C. ; FREITAS, R.M. ; FERREIRA, P.M.P. . In vitro antioxidant, antitumor and leishmanicidal activity of riparin A, an analog of the Amazon alkaloids from *Aniba riparia* (Lauraceae). *Acta Amazonica* (online), v. 46, p. 309/3-314, 2016.

ARAÚJO, E. J. F.; ALMEIDA, A. A. C.; SILVA, O. A.; COSTA, I. H. F.; REZENDE JUNIOR, L. M. ; LIMA, F. C. A. ; CAVALHEIRO, A. J. ; PESSOA, C. ; MORAES, M. O. ; FERREIRA, P. M. P. . Physiological behavioral changes induced by a fraction with antitumor diterpenes from an Atlantic forest Brazilian plant and computational intermolecular interactions with neuron receptors. *Journal of Ethnopharmacology*, p. 460-467, 2017.

#### Artigos completos submetidos em periódicos

ARAÚJO, É.J.F.; REZENDE-JÚNIOR, L.M.; LIMA, L.K.F.; JÚNIOR, M.P.S.; NETO, B.S.; GUTIERREZ, S.J.C.; TOMÉ, A, R.; FERREIRA, P.M.P.; LIMA, F.C.A. Has a leishmanicidal riparins anxiolytic effects? *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2017.

ARAÚJO, E.J.F.; SILVA, O.A.; JÚNIOR, L.M.R.; SOUSA, I.J.O.; ARAÚJO, D.Y.M.L.; CARVALHO, R.B.C.; PEREIRA, S.T.; FERREIRA, P.M.P.; GUTIERREZ, S.J.C.; LIMA, S.J.C. Obtention, characterization and cytotoxic evaluation of the inclusion complex of riparin A with  $\beta$ -cyclodextrin. *Journal of Molecular Structures*, 2017.

#### Apresentações de trabalhos

ARAÚJO, É. J. F.; AZEVEDO, P.S.S.; JÚNIOR, L.M.R.; JÚNIOR, A.L.G. ; FREITAS, R.M.; GUTIERREZ, S. J. C. ; CAVALCANTE, A.A.C.M. Avaliação do potencial antioxidante in vitro de um novo candidato a fármaco semissintético derivado das riparinas naturais. In: II Encontro Estratégico em Ciências Farmacêuticas. II Seminário Ibero Americano de P & D de Medicamentos, 2015.

ARAÚJO, É. J. F.; LIMA, L.K.F. ; JÚNIOR, L.M.R. ; FREITAS, R.M. ; GUTIERREZ, S. J. C. ; CARVALHO, F.A.A. ; CARVALHO, T.P. Avaliação da atividade leishmanicida de um novo candidato a fármaco semissintético derivado das riparinas naturais. In: II Encontro Estratégico em Ciências Farmacêuticas. II Seminário Ibero Americano de P & D de Medicamentos, 2015.

ARAÚJO, É. J. F.; SILVA, O.A.; JÚNIOR, L.M.R.; AZEVEDO, P.S.S.; GUTIERREZ, S. J. C.; FREITAS, R.M.; FERREIRA, P.M.P. Avaliação da atividade antitumoral de derivados semissintéticos das riparinas naturais. In: I Simpósio Nordestino de Recursos Naturais e Potencialidades Terapêuticas, 2015.

ARAÚJO, É. J. F.; LIMA, L.K.F.; JÚNIOR, L.M.R.; JÚNIOR, M.P.S.; FREITAS, R.M.; GUTIERREZ, S. J. C.; LIMA, F. C. A. Avaliação da toxicidade oral aguda da N-(2-feniletil)-benzamida (riparina A) em camundongos. In: III Simpósio Latino-americano de Biotecnologia do Nordeste. III Encontro Luso Brasileiro de Biotecnologia, 2015.

JÚNIOR, L.M.R.; ARAÚJO, É. J. F.; LIMA, L.K.F.; JÚNIOR, M.P.S.; FREITAS, R.M.; GUTIERREZ, S. J. C.; ARAÚJO, D.Y.M.L.; AZEVEDO, P.S.S.; SILVA, O.A.; LIMA, F. C. A. . Análise computacional da complexação da N-(2-feniletil)-benzamida (Riparina A) com beta-ciclodextrina. In: III Simpósio Latino-americano de Biotecnologia do Nordeste. III Encontro Luso Brasileiro de Biotecnologia, 2015.

#### **Prêmios e títulos**

Premiação de 2º lugar em apresentação do trabalho científico “Avaliação da atividade ansiolítica da riparina A: estudo teórico e experimental” na modalidade banner, durante sessão pública realizada no II Congresso Nacional de Farmácia do Piauí. IV Jornada Acadêmica de Farmácia, 2016.

Premiação de 2º lugar em apresentação do trabalho científico “Obtenção e caracterização do complexo de inclusão da riparina A com betaciclodextrina” na modalidade comunicação oral, durante sessão pública realizada no II Congresso Nacional de Farmácia do Piauí. IV Jornada Acadêmica de Farmácia, 2016.

#### **Projetos de pesquisa**

Avaliação pré-clínica da atividade ansiolítica da riparina A com ênfase na obtenção de um novo produto farmacêutico de ação central. Projeto aprovado no edital FAPEPI nº 006/2015. Termo de concessão 002/2016.

**Atividades centrais das riparinas para tratamento de transtornos mentais:  
revisão de literatura.**

Éverton José Ferreira de Araújo<sup>1,2,3,4\*</sup>; Layana Karine Farias Lima<sup>2,3</sup>; Luis Mário Rezende Júnior<sup>2,3</sup>,  
Marcelo Pereira da Silva Júnior<sup>3</sup>; Rivelilson Mendes de Freitas<sup>1,2,3</sup> &  
Francisco das Chagas Alves Lima<sup>1,4</sup>.

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Centro de Ciências da Saúde, *Campus* Ministro Petrônio Portella, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil, CEP 64049-550.

<sup>2</sup>Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental (LAPNEX), Núcleo de Tecnologia Farmacêutica, Centro de Ciências da Saúde, *Campus* Ministro Petrônio Portella, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil, CEP 64049-550.

<sup>3</sup>Curso de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, *Campus* Ministro Petrônio Portella, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil, CEP 64049-550.

<sup>4</sup>Laboratório de Química Quântica Computacional e Planejamento de Fármaco (LQQC&PF), Centro de Ciências da Natureza, Departamento de Química, Universidade Estadual do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil, CEP 64002-150.

\*Autor correspondente: Prof. MSc. Éverton José Ferreira de Araújo, Curso de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Piauí, Avenida Universitária, bairro Ininga, CEP 64.049-550, Teresina, Piauí. Telefone: 3215-5953. Email: everton\_araujo@ufpi.edu.br

## ***In vitro* antioxidant, antitumor and leishmanicidal activity of riparin A, an analog of the Amazon alkaloids from *Aniba riparia* (Lauraceae)**

Éverton José Ferreira de ARAÚJO<sup>1,2,3</sup>, Layana Karine Farias LIMA<sup>3</sup>, Oskar Almeida SILVA<sup>1</sup>, Luís Mário REZENDE JÚNIOR<sup>2</sup>, Stanley Juan Chavez GUTIERREZ<sup>3</sup>, Fernando Acácio de Amorim CARVALHO<sup>1,4</sup>, Francisco das Chagas Alves LIMA<sup>1,5</sup>, Cláudia PESSOA<sup>6</sup>, Rivelilson Mendes de FREITAS<sup>1,2,3</sup> (*In Memoriam*), Paulo Michel Pinheiro FERREIRA<sup>1,7\*</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-Graduação da Rede Nordeste em Biotecnologia, 64049-550, Teresina, Brasil

<sup>2</sup> Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental, 64049-550, Teresina, Brasil

<sup>3</sup> Universidade Federal do Piauí, Curso de Farmácia, 64049-550, Teresina, Brasil

<sup>4</sup> Universidade Federal do Piauí, Núcleo de Pesquisa em Plantas Mediciniais, Departamento de Bioquímica e Farmacologia, 64049-550, Teresina, Brasil

<sup>5</sup> Universidade Estadual do Piauí, Departamento de Química, 64002-150, Teresina, Brasil

<sup>6</sup> Universidade Federal do Ceará, Departamento de Fisiologia e Farmacologia / Fundação Oswaldo Cruz, 60.430-270, Fortaleza, Brasil

<sup>7</sup> Universidade Federal do Piauí, Departamento de Biofísica e Fisiologia, Laboratório de Cancerologia Experimental, 64049-550, Teresina, Brasil

\* Corresponding author: [pmpf@ufpi.edu.br](mailto:pmpf@ufpi.edu.br)

### **ABSTRACT**

*Aniba riparia* (Lauraceae) is an important medicinal plant found in the Amazon region and presents alkaloids of the type alkaloid known as riparins. Riparin A is structurally represented as the fundamental core of all Amazon riparins. This work aimed to assess the *in vitro* antioxidant, antitumor and antileishmanial effects of riparin A. Riparin A presented weak antioxidant capacity by techniques of DPPH• (EC50 of 296.2 µg mL<sup>-1</sup>) and ABTS•+ (EC50 of 450.1 µg mL<sup>-1</sup>), showed moderate activity against colon carcinoma (HCT-116: IC50 of 21.7 µg mL<sup>-1</sup>) and leishmanicidal activity on promastigotes of *L. amazonensis* (IC<sub>50</sub> of 307.0 ± 79.6, 193.7 ± 44.3 and 81.8 ± 11.2 µg mL<sup>-1</sup>, respectively, after 24, 48 and 72 h of incubation). Then, in addition to its structural simplicity, riparin A revealed promising biological activities and remarkable *in vitro* leishmanicidal action, an important result in epidemiological point of view to control leishmaniasis in Brazil, including in the Amazon region.

**KEYWORDS:** Bioprospecting, Chemoprevention, Cytotoxicity, Antiparasitic drug.

## **Atividade antioxidante, antitumoral e leishmanicida *in vitro* da riparina A, um análogo das alcaloides amazônicas de *Aniba riparia* (Lauraceae)**

### **RESUMO**

*Aniba riparia* (Lauraceae) é uma importante planta medicinal encontrada na região amazônica que apresenta alcaloides do tipo alcaloide e conhecidos como riparinas. Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos antioxidantes, antitumorais e leishmanicidas *in vitro* da riparina A. Riparina A apresentou fraca capacidade antioxidante pelas técnicas do DPPH• (CE50 de 296,2 µg mL<sup>-1</sup>) e ABTS•+ (CE50 de 450,1 µg mL<sup>-1</sup>), mostrou moderada atividade contra carcinoma de cólon (HCT-116: CI50 de 21,7 µg mL<sup>-1</sup>) e atividade leishmanicida sobre formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (CI<sub>50</sub> de 307,0 ± 79,6; 193,7 ± 44,3 e 81,8 ± 11,2 µg mL<sup>-1</sup>, respectivamente, após 24, 48 e 72 h de incubação). Assim, além de sua simplicidade estrutural, a riparina A revelou atividades biológicas promissoras e significativa ação leishmanicida *in vitro*, resultado importante diante da relevância epidemiológica para controle da leishmaniose no Brasil, inclusive na região amazônica.

**PALAVRAS-CHAVE:** Bioprospecção, Quimioprevenção, Citotoxicidade, Droga antiparasitária.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jep](http://www.elsevier.com/locate/jep)

## Behavioral effects induced by antitumor clerodane diterpenes from *Casearia sylvestris* and *in silico* interactions with neuron receptors



Éverton José Ferreira de ARAÚJO<sup>a,b</sup>, Antônia Amanda Cardoso de ALMEIDA<sup>c</sup>, Oskar Almeida SILVA<sup>c</sup>, Iwysen Henrique Fernandes da COSTA<sup>b</sup>, Luis Mário REZENDE-JÚNIOR<sup>b</sup>, Francisco das Chagas Alves LIMA<sup>c,d</sup>, Alberto José CAVALHEIRO<sup>e</sup>, Cláudia PESSOA<sup>f</sup>, Manoel Odorico de MORAES<sup>f</sup>, Paulo Michel Pinheiro FERREIRA<sup>a,c,g,\*</sup>

<sup>a</sup> Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Piauí, Teresina, Brazil

<sup>b</sup> Department of Pharmacy, Federal University of Piauí, Teresina, Brazil

<sup>c</sup> Postgraduate Program in Biotechnology (RENORBIO), Federal University of Piauí, Teresina, Brazil

<sup>d</sup> Quantum Computational Chemistry Laboratory, Department of Chemistry, State University of Piauí, Teresina, Piauí, Brazil

<sup>e</sup> Department of Organic Chemistry, Chemistry Institute, State University of São Paulo Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, Brazil

<sup>f</sup> Department of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil

<sup>g</sup> Department of Biophysics and Physiology, Laboratory of Experimental Cancerology, Federal University of Piauí, Teresina, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Casearins  
Physiological parameters  
Anxiolytic action  
Acute toxicity

### ABSTRACT

**Ethnopharmacological relevance:** *Casearia sylvestris* is a medicinal plant traditionally used to treat snakebites, wounds, inflammation and gastric ulcers and scientific supports for have demonstrated its antitumor, antihyperlipidemic and antiparasitic properties.

**Aim of the study:** To assess the effects of a fraction with casearins (FC) on adult mice using classical experimental models of animal behavior and theoretical calculations to verify the interaction of Casearin X (Cas X) with neuron receptors.

**Materials and methods:** Animals divided in 6 groups (n=9/group) were intraperitoneally treated with vehicle (DMSO 4%), FC (2.5, 5, 10 and 25 mg/kg/day) and diazepam (2 mg/kg) for 7 days. Thirty minutes after the last dose of treatment, acute toxicity and behavioral experiments were performed.

**Results:** The highest dose of FC (25 mg/kg/day) caused diarrhea, weight loss and death of one animal. Elevated plus maze test showed that lower doses [2.5 mg/kg/day (36.4 ± 5.1 s) and 5 mg/kg/day (43.9 ± 6.2 s)] increased the time spent in open arms (TSOA). Open field test revealed reduction in the number of crossings (54.9%, 51.1%, 48% and 67.7% for 2.5, 5, 10 and 25 mg/kg/day, respectively) in all doses of FC studied and decrease of rearings at 25 mg/kg/day (p < 0.05). Computational calculations showed that the inhibition constant (K<sub>i</sub>) for the Cas X-D<sub>1</sub> complex is up to 1000-fold more favourable than the Cas X-GABA<sub>A</sub> complex. All ΔG° values obtained for Cas X-D<sub>1</sub> complexes were more negative than those seen with Cas X-GABA<sub>A</sub> complexes.

**Conclusions:** Findings indicate a probable anxiolytic action of the FC since it reduces the number of crossings and rearings and prolonged the time spent in open arms, without sedative and myorelaxant effects, probably due to the interaction of Cas X with dopaminergic system.

### 1. Introduction

Medicinal plants and their derivatives may modify animals' behavior, since some of them are used to induce or treat anxiety, depression or seizures. Then, herbal medicines, whose pharmacological potential is evaluated in animals and neurochemical models, have become a new therapeutic option in clinical psychiatry. The popular usage of such preparations and pharmaceutical derivatives in the treatment of

neurological disorders is driven by the fact that these substances are from a natural origin and some activity on central nervous system is available (Zhang, 2004; Silva et al., 2011; Souto-Maior et al., 2011; Almeida et al., 2012; Moreno et al., 2014).

*Casearia sylvestris* Swartz (Salicaceae), a plant known as “guaçatonga”, is popularly used in the treatment of snake poisons, injury, inflammation and gastric ulcers. Phytochemical analyzes demonstrate that a significant portion of ethanol extract of “guaçatonga”

\* Corresponding author at: Laboratory of Experimental Cancerology, Department of Biophysics and Physiology, Federal University of Piauí, Teresina, Brazil.  
E-mail address: [pmfp@ufpi.edu.br](mailto:pmfp@ufpi.edu.br) (P.M.P. FERREIRA).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2017.01.006>

Received 17 October 2016; Received in revised form 4 January 2017; Accepted 6 January 2017

Available online 07 January 2017

0378-8741/© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.



### Has a leishmanicidal riparin anxiolytic effects?

Journal:	<i>Journal of Pharmacy and Pharmacology</i>
Manuscript ID	Draft
Wiley - Manuscript type:	Research Paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Araújo, Éverton ; Universidade Federal do Piauí Rezende-Júnior, Luís; Universidade Federal do Piauí Lima, Layana; Universidade Federal do Piauí Silva-Júnior, Marcelo; Universidade Federal do Piauí Silva, Oskar; Universidade Federal do Piauí Sousa Neto, Benedito; Universidade Federal do Piauí Gutierrez, Stanley ; Universidade Federal do Piauí Tomé, Adriana; State University of Ceará, Faculty of Veterinary Lopes, Luciano Ferreira , Paulo; Universidade Federal do Piauí, Biophysics and Physiology Lima, Francisco ; Universidade Estadual do Piauí
Keywords:	In vivo/in vitro Correlation < Biopharmaceutics and Drug Disposition, Biological Characterisation of Novel Molecules < Biomedical Chemistry
Abstract:	<p>Objectives We have reported Riparin A as a promising antiparasitic molecule against <i>Leishmania amazonensis</i> promastigotes. This work evaluated the acute oral toxicity of Riparin A and its anxiolytic effects using in vivo models and computational tools.</p> <p>Methods Mice were submitted to acute oral toxicity tests (Guideline OECD 423). Later, anxiolytic activity assays with Riparin A (50, 100 and 200 mg/kg: elevated plus maze, light/dark box and marble burying) were performed. Theoretical calculations analyzed interaction of Riparin A with gamma-amino butyric acid (GABA) receptors.</p> <p>Key findings Only Riparin A at 2000 mg/kg alter body weight, food and water consumption and urine production after 7 and/or 14 days treatment and increased serum triglycerides. There was increase in the time spent in the open arms (TSOA) and number of transitions between compartments (NTC) and decrease in number of hidden balls (NHB) in Riparin A-treated animals at 200 mg/kg (<math>P &lt; 0.05</math>). The functional amide of Riparin A interacted with the GABAA receptor mainly at subunits <math>\alpha 2</math> and <math>\beta 1</math> and presented strong interaction with the Tyr87 residue, which is part of the pharmacophore group.</p> <p>Conclusions Riparin A caused slight toxicity and probably interacts with Tyr87 residues of the benzodiazepines' receptors by hydrogen bonds.</p>



## Synthesis, characterization and cytotoxic evaluation of inclusion complexes between Riparin A and $\beta$ -cyclodextrin



Éverton José Ferreira de Araújo<sup>a,b,\*</sup>, Oskar Almeida Silva<sup>a</sup>, Luís Mário Rezende-Júnior<sup>b</sup>, Ian Jhemes Oliveira Sousa<sup>b,c</sup>, Danielle Yasmin Moura Lopes de Araújo<sup>d</sup>, Rusbene Bruno Fonseca de Carvalho<sup>a</sup>, Sean Telles Pereira<sup>b</sup>, Stanley Juan Chavez Gutierrez<sup>b</sup>, Paulo Michel Pinheiro Ferreira<sup>c</sup>, Francisco das Chagas Alves Lima<sup>a,e</sup>

<sup>a</sup> Postgraduate Program in Biotechnology (RENORBO), Federal University of Piauí, 64049-550, Teresina, Piauí, Brazil

<sup>b</sup> Department of Pharmacy, Federal University of Piauí, 64049-550, Teresina, Piauí, Brazil

<sup>c</sup> Laboratory of Experimental Oncology, Department of Biophysics and Physiology, Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Piauí, 64049-550, Teresina, Piauí, Brazil

<sup>d</sup> Postgraduate Program in Family Health, Federal University of Piauí, 64049-550, Teresina, Piauí, Brazil

<sup>e</sup> Laboratory of Computational Quantum Chemistry, Department of Chemistry, State University of Piauí, 64002-150, Teresina, Piauí, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 24 February 2017

Received in revised form

8 April 2017

Accepted 10 April 2017

Available online 18 April 2017

#### Keywords:

Pharmaceutical formulation

Electron microscopy

Water solubility

Artemia salina

Riparin

### ABSTRACT

This study performed a physicochemical characterization of the inclusion complex generated between Riparin A and  $\beta$ -cyclodextrin (Rip A/ $\beta$ -CD) and compared the cytotoxic potential of the incorporated Rip A upon *Artemia salina* larvae. Samples were analyzed by phase solubility diagram, dissolution profile, differential scanning calorimetry, X-ray diffraction, infrared spectroscopy, proton nuclear magnetic resonance, scanning electron microscopy and artemicidal action. Riparin A/ $\beta$ -cyclodextrin complexes presented increased water solubility,  $A_2$  type solubility diagram and Kst constant of 373 L/mol. Thermal analysis demonstrated reduction of the melt peak of complexed Rip A at 116.2 °C. Infrared spectroscopy confirmed generation of inclusion complexes, <sup>1</sup>H NMR pointed out the interaction with H-3 of  $\beta$ -CD cavities, alterations in the crystal line natures of Rip A when incorporated within  $\beta$ -CD were observed and inclusion complexes presented higher cytotoxic on *A. salina* nauplii, with  $CI_{50}$  value of 1172 (84.9–161.8)  $\mu$ g/mL. So, Rip A was incorporated into  $\beta$ -CDs with high efficiency and water solubility of Rip A was improved. Such solubility was corroborated by cytotoxic evaluation and these outcomes support the improvement of biological properties for complexes between Riparin A/ $\beta$ -cyclodextrin.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Riparins are natural isolated for the first time from *Aniba riparia* (Ness) Mez fruits. Thenceforth, new potentially active molecules derived from them revealed as promising options for novel drugs. Riparin A (Rip-A) – N-(2-phenylethyl)benzamide – a synthetic alkamide, is the fundamental structural of all riparins (Fig. 1) [1,2].

Recently, we have shown biological *in vitro* properties attributed to the Riparin A, such as antioxidant activity against TBARS, cytotoxic action on HCT-116 colon carcinoma cells and leishmanicidal

potential upon *Leishmania amazonensis* promastigotes. Additionally, it exhibits anti-inflammatory properties in carrageenan-induced paw edemas and reduces levels of inflammatory mediators as myeloperoxidase, tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-1 $\beta$  [3–5].

Cyclodextrins (CDs) have been used to develop new drugs with new therapeutic systems and produce optimized pharmaceutical formulations since they often increase pharmacological activity and improve physical and chemical properties of drugs. They are macrocyclic oligosaccharides generated by the enzyme glycosyltransferase (CGTase) action on the starch. CDs work as pharmaceutical excipients of natural sources constituted by six ( $\alpha$ -CD), seven ( $\beta$ -CD) or eight monomers ( $\gamma$ -CD) of  $\alpha$ -D-glucopyranose connected by  $\alpha$ -1,4 bonds. However, there are semisynthetic CDs

\* Corresponding author. Department of Pharmacy, Federal University of Piauí, 64049-550, Ininga, Teresina, Piauí, Brazil.

E-mail address: [everton\\_araujo@ufpiedubr.br](mailto:everton_araujo@ufpiedubr.br) (É.J.F. Araújo).

# Certificado



II EECF  
Encontro Estratégico em Ciências Farmacêuticas

**II Encontro Estratégico  
em Ciências Farmacêuticas  
II Seminário Ibero Americano  
de P & D de Medicamentos**



Certificamos que **ARAÚJO, E.J.F., AZEVEDO, P.S.S., JÚNIOR, L.M.R., JÚNIOR, A.L.G, FREITAS., R.M.F., GUTIERREZ, S.J.C., CAVALCANTE, A.A.C.M** apresentaram o trabalho "**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE IN VITRO DE UM NOVO CANDIDATO A FÁRMACO SEMISSINTÉTICO DERIVADO DAS RIPARINAS NATURAIS**" na sessão painel durante o II Encontro Estratégico em Ciências Farmacêuticas / II Seminário Ibero Americano de P & D de Medicamentos / I Simpósio Internacional de Farmácia Clínica, realizado no período de 9 a 11 de abril de 2015, no Blue Tree Towers Rio Poty na cidade de Teresina, Piauí, Brasil.

Teresina, Piauí, 11 de abril de 2015.

*Ruelson Mendes de Freitas*

Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas  
Coordenador Geral

*Dirceu César D. Nunes*

Prof. Dr. Lívio César Cunha Nunes  
Sub-coordenador Geral

*Stelvio Rocho e Silva*

Prof.a Dra. Hillis Rocha e Silva  
Coordenadora Comissão Científica



Patrocinadores:



Apoio institucional:



Co-organizadores:



# Certificado



II Encontro Estratégico em Ciências Farmacêuticas

## II EECF

**II Encontro Estratégico em Ciências Farmacêuticas**  
**II Seminário Ibero Americano de P & D de Medicamentos**



Certificamos que **ARAÚJO, E.J.F., LIMA, L.K.F., JÚNIOR, L.M.R., FREITAS, R.M.F., GUTIERREZ, S.J.C., CARVALHO, F.A.A., CARVALHO, T.P.** apresentaram o trabalho "**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE UM NOVO CANDIDATO A FÁRMACO SEMISSINTÉTICO DERIVADO DAS RIPARINAS NATURAIS**" na sessão painel durante o II Encontro Estratégico em Ciências Farmacêuticas / II Seminário Ibero Americano de P & D de Medicamentos / I Simpósio Internacional de Farmácia Clínica, realizado no período de 9 a 11 de abril de 2015, no Blue Tree Towers Rio Poty na cidade de Teresina, Piauí, Brasil.

Teresina, Piauí, 11 de abril de 2015.

*Ruilton Mendes de Freitas*

Prof. Dr. Ruilton Mendes de Freitas  
Coordenador Geral

*Dirceu Cesar C. Nunes*

Prof. Dr. Dirceu Cesar Cunha Nunes  
Sub-coordenador Geral

*Hiliris Rocha e Silva*

Prof. Dra. Hiliris Rocha e Silva  
Coordenadora Comissão Científica



Patrocinadores:



Apoio Institucional:



Co-organizadores:





## SIMPÓSIO NORDESTINO DE RECURSOS NATURAIS E POTENCIALIDADES TERAPÊUTICAS

### CERTIFICADO

Certifico que o resumo expandido intitulado “Avaliação da atividade antitumoral de derivados semissintéticos das riparinas naturais.” de autoria de Éverton José Ferreira de Araújo, Oskar Almeida Silva, Luís Mário Rezende Júnior, Pedro Simão da Silva Azevedo, Stanley Juan Chavez Gutierrez, Rivellison Mendes de Freitas, Paulo Michel Pinheiro Ferreira. foi apresentado na modalidade **Banner** no I Simpósio Nordeste de Recursos Naturais e Potencialidades Terapêuticas, realizado no período de 17 a 19 de junho de 2015.

Teresina, 19 de junho de 2015.

Prof.ª. Dra. Alcideia Pereira de Oliveira

**Presidente do I RENAPTE**

REALIZAÇÃO:



APOIO:





III SIMPÓSIO LATINO – AMERICANO DE  
BIOTECNOLOGIA DO NORDESTE - III SLAB  
ENCONTRO LUSO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA  
De 11 a 13 de dezembro de 2015 | Parnaíba-PI

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado "Avaliação da toxicidade oral aguda da N-(2-fenetil)-benzamida (riparina A) em camundongos." de autoria de Everton José Ferreira de Araújo, Layana Karine Farias Lima, Luis Mário Rezende Júnior, Marcelo Pereira da Silva Júnior, Rivellison Mendes de Freitas, Stanley Juan Chavez Gutierrez, Francisco das Chagas Alves Lima foi apresentado no III Simpósio Latino – Americano de Biotecnologia do Nordeste – III SLAB, realizado de 11 a 13 de dezembro de 2015, na categoria pôster.

Teresina, PI, 13 de dezembro de 2015

Presidente do III SLAB  
Dr. José Roberto de Almeida Leite

Diretor GPI Cursos  
Stanley Jome Nogueira Candeira

REALIZAÇÃO





III SIMPÓSIO LATINO – AMERICANO DE  
BIOTECNOLOGIA DO NORDESTE - III SLAB  
ENCONTRO LUSO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA  
De 11 a 13 de dezembro de 2015 | Parnaíba-PI

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado "Análise computacional da complexação da N-(2-fenetil)-benzamida (Riparina A) com 2-ciclodextrina" de autoria de Luis Mão Rezende Júnior, Everton José Ferreira de Araújo, Layana Karine Farias Lima, Marcelo Pereira da Silva Júnior, Rivelilson Mendes de Freitas, Stanley Juan Chavez Gutierrez, Danielle Yasmin Moura Lopes de Araújo, Pedro Simão da Silva Azevedo, Oskar Almeida Silva, Francisco das Chagas Alves Lima foi apresentado no III Simpósio Latino – Americano de Biotecnologia do Nordeste – III SLAB, realizado de 11 a 13 de dezembro de 2015, na categoria pôster.

Teresina, PI, 13 de dezembro de 2015

  
Presidente do III SLAB  
Dr. Jose Roberto de Almeida Leite

  
Diretor GPI Cursos  
Stanley Jone Nogueira Candeira

REALIZAÇÃO








**CERTIFICADO**

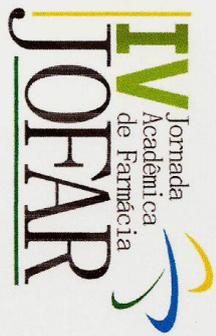
A União Independente de Farmacêuticos e Acadêmicos de Farmácia do Piauí, por meio da comissão organizadora do II CONFARPI, seguindo as prerrogativas descritas no item 01/2016, seus aditivos e retificações que estabelecem este evento de nível nacional, vem certificar que o trabalho intitulado: **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANSIOLÍTICA DA RIPARINA A: ESTUDO TEÓRICO E EXPERIMENTAL**, da autoria de: **LUIZ MÁRIO REZENDE JÚNIOR; ÉVERTON JOSÉ FERREIRA DE ARAÚJO; DANIELLE YASMIM MOURA LOPES DE ARAUJO; OSKAR ALMEIDA SILVA; MARCELO PEREIRA DA SILVA JÚNIOR; STANLEY JUAN CHAVEZ GUTIERREZ; FRANCISCO DAS CHAGAS ALVES LIMA**;; recebeu premiação como 2º Lugar modalidade Banner, durante a seção pública de apresentação de trabalhos do CONFARPI, cuja a programação ocorreu durante: **16,17,18 e 19 de Novembro de 2016**

**Teresina-PI 19/11/2016**

 <b>Profª Drª Mayara Ladeira Coêlho</b> <i>Presidente – Divisão Profissional</i>	 <b>Adriana Rodrigues de Oliveira</b> <i>Presidente – Divisão Acadêmica</i>	 <b>Rodrigo Lopes Gomes Gonçalves</b> <i>Presidente da UIFARPI</i>	
--	--	---	--

Para verificar a autenticidade deste certificado acesse: <http://autenticidade.uifarpi.com.br/> e informe o código do selo






**CERTIFICADO**

A União Independente de Farmacêuticos e Acadêmicos de Farmácia do Piauí, por meio da comissão organizadora do II CONFARPI, seguindo as prerrogativas descritas no item 01/2016, seus aditivos e retificações que estabelecem este evento de nível nacional, vem certificar que o trabalho intitulado: **OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO DA RIPARINA A COM BETACICLODEXTRINA**, da autoria de: **JUÍZ MÁRIO REZENDE JÚNIOR; ÉVERTON JOSÉ FERREIRA DE ARAÚJO; DANIELLE YASMIN MOURA LOPES DE ARAÚJO; OSKAR ALMEIDA SILVA; SEAN TEILES PEREIRA; STANLEY JUAN CHAVEZ GUTIERREZ; FRANCISCO DAS CHAGAS ALVES LIMA**; recebeu premiação como 2º Lugar Apresentação Oral, durante a sessão pública de apresentação de trabalhos do CONFARPI, cuja a programação ocorreu durante: **16,17,18 e 19 de Novembro de 2016**

**Teresina-PI 19/11/2016**

*Profª Drª Moyara Ladeira Coelho*  
Presidente – Divisão Profissional

*Adriana Rodrigues de Oliveira*  
Presidente – Divisão Acadêmica

*Rodrigo Lopes Gomes Gonçalves*  
Presidente da UIFARPI

Para verificar a autenticidade deste certificado acesse: <http://autenticidade.uifarpi.com.br/> e informe o código do selo



## GOVERNO DO ESTADO DO PIAUÍ

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DO PIAUÍ



### Projeto

#### 1. Proposta/Inscrição

**Edital:** EDITAL FAPEPI N.º 006/2015  
**Título:** Avaliação pré-clínica da atividade ansiolítica da riparina A com ênfase na obtenção de um novo produto farmacêutico de ação central.  
**Protocolo:** 3036.UNI207.58854.31072015  
**Coordenador:** éverton José Ferreira de Araújo  
**E-mail:** everton\_jfa@hotmail.com  
**Faixa de Valor:** Faixa B(R\$ 0,00 à R\$ 20.000,00)  
**Área de Conhecimento 1:** Ciências da Saúde » Farmácia  
**Área de Conhecimento 2:** Ciências Biológicas » Farmacologia » Neuropsicofarmacologia  
**Área de Conhecimento 3:**  
**Instituição Executora:** UFPI-TERESINA - Universidade Federal do Piauí  
**Unidade Executora:** [Piauí/PI] Ufpi-teresina  
**Início Previsto:** 04/09/2015  
**Duração:** 24 Meses  
**Cotação do Dólar:** 0,00

#### 1.1. Arquivos

Nome	Tipo
DECLARAÇÃO DE ANUÉ...	Anexo II - Termo de Anuência
CONTRACHEQUE UFPI...	Comprovante de vínculo
CERTIFICADO MESTRA...	Comprovante de Titulação
DOCUMENTOS PESSOAI...	Documentos Pessoais
PLANO DE TRABALHO ...	Modelo Plano de Trabalho
PRODUÇÃO CIENTÍFIC...	Formulário II - Produção Científica
DECLARAÇÃO DE AUSÉ...	Modelo de Declaração
LATTES.pdf	Currículo Lattes
EDITAL FAPEPI 06-2...	Formulário I - Edital FAPEPI N° 06/2015

#### 2. Plano de Apresentação de Proposta/Inscrição:

##### 2.1. Resumo da Proposta/Inscrição de Projeto:

A A. riparia (Ness) Mez, árvore da família Lauraceae, conhecida como 'louro', destaca-se pela sua importância econômica, sendo algumas espécies utilizadas na medicina popular e nas indústrias de cosméticos e produtos químicos, podendo-se dela obter extrato dos frutos e dos cálices dotados de atividade farmacológica comprovada cientificamente. A Aniba riparia (Ness) Mez (Lauraceae), destaca-se pelas atividades farmacológicas atribuídas às riparinas naturais I, II e III. Os derivados sintéticos dessas substâncias (riparinas A-E) atualmente representam uma fonte de pesquisas para obtenção de novos pedidos de registro de depósito de patente. Diante da diversidade de atividades relacionadas à espécie e aos seus derivados naturais fica evidente a necessidade de realizar estudos que