



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS – UFA**

**CENTRO DE TECNOLOGIA – CTEC**



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**ISAIANE FERREIRA LIMA DE OLIVEIRA**

**Avaliação das Atividades Biológicas das Espécies *Moringa oleifera* e *Azadirachta indica* em Células HTR e Identificação de seus Compostos por meio de RMN.**

**Maceió, AL**

**2021**

**ISAIANE FERREIRA LIMA DE OLIVEIRA**

**Avaliação das Atividades Biológicas das Espécies *Moringa oleifera* e *Azadirachta indica* em Células HTR e Identificação de seus Compostos por meio de RMN.**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Alagoas como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre em Engenharia Química.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup>. Dra. Renata Maria Rosas Garcia Almeida

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup>. Dra. Tatiane Luciano Balliano

**Maceió, AL**

**2021**

**Catálogo na Fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

- O48a Oliveira, Isaiane Ferreira Lima de.  
Avaliação das atividades biológicas das espécies *Moringa oleifera* e *Azadirachta indica* em células HTR e identificação de seus compostos por meio de RMN / Isaiane Ferreira Lima de Oliveira. – 2021.  
99 f. : il. color.
- Orientadora: Renata Maria Rosas Garcia Almeida.  
Coorientadora: Tatiane Luciano Balliano.  
Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Tecnologia. Maceió, 2021.
- Bibliografia: f. 90-99.
1. Produtos biológicos. 2. Fitoterapia. 3. *Moringa oleifera*. 4. *Azadirachta indica*. 5. Placenta. 6. Ressonância Magnética Nuclear. 7. Microscopia de Força Atômica. I. Título.

CDU: 66.021:615

Isaiane Ferreira Lima de Oliveira

**Avaliação das Atividades Biológicas das Espécies *Moringa oleifera* e *Azadirachta indica* em Células HTR e Identificação de Compostos por meio de RMN**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Alagoas, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Engenharia Química.

Aprovada em: Maceió, 31 de Agosto de 2021.

**BANCA EXAMINADORA**



Documento assinado digitalmente  
Renata Maria Rosas Garcia Almeida  
Data: 02/09/2021 14:33:39-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Renata Maria Rosas Garcia Almeida (Orientadora - PPGEQ/UFAL)



Documento assinado digitalmente  
Tatiane Luciano Balliano  
Data: 18/10/2021 17:12:27-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Tatiane Luciano Balliano (Coorientadora - PPGEQ/UFAL)

Carlos Eduardo de Farias Silva  
Professor / UFAL  
SIAPE 3081569

Prof. Dr. Carlos Eduardo de Farias Silva (PPGEQ/UFAL)

Prof. Dr. Edson de Souza Bento (UFAL)



Documento assinado digitalmente  
GLORIA MARIA MARINHO SILVA  
Data: 01/10/2021 17:59:21-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Gloria Maria Marinho Silva (IFCE)

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus, porque não sou merecedora de tantas vitórias e mesmo assim Ele tem me concedido.

Ao meu esposo Johnnyson e a minha família que sempre me proporcionaram toda a estrutura e apoio para que eu pudesse crescer.

Aos professores Dr. Edson de Souza Bento, Dra. Tatiane Luciano Balliano e Dra. Renata Maria Rosas Garcia Almeida pelas orientações, incentivos, oportunidades e ensinamentos imprescindíveis para conclusão deste trabalho.

À Lays e Monique alunas e ao professor Dr. Alexandre Urban Borbely do Laboratório de Biologia Celular – UFAL e à Elaine aluna do pós doutorado PPGF-UFAL pela paciência, prestatividade, colaboração e suporte no desenvolvimento deste trabalho.

À Capes, UFAL, CTEC e IF pelo suporte para a realização deste trabalho.

E a todos os amigos que sempre acreditaram na minha competência e ajudaram direta e indiretamente para realização desse objetivo.

## RESUMO

Com a identificação de compostos líderes, resultando no desenvolvimento de novos fármacos, os produtos naturais representam uma importante fonte de compostos bioativos que podem atuar com inúmeras atividades, como anti-inflamatória, antifúngica, anti-hipertensiva, antitumoral, antioxidante, cicatrizante, entre outros. Neste contexto, o presente estudo teve por objetivo investigar as atividades biológicas de duas espécies de plantas medicinais: *Moringa oleifera* e *Azadirachta indica*, frente às células de placentas, visto que as gestantes são um alvo bastante sensível a qualquer tipo de tratamento medicinal. Foram realizados estudos de quantificação da viabilidade celular com a utilização dos extratos nas concentrações de 25, 50, 75 e 100% em linhagens de células trofoblásticas empregando o ensaio de MTT, análises de microscopia de força atômica das células com e sem tratamento, e análises de ressonância magnética nuclear dos extratos. De acordo com os dados obtidos, o extrato de *Moringa oleifera* obteve viabilidade celular nas concentrações de 25% e 50%, sendo tóxico acima de 50%, enquanto que o extrato de *Azadirachta indica* mostrou não ter viabilidade celular em nenhuma das concentrações, com a microscopia de força atômica observaram-se mudanças morfológicas, um aumento na elasticidade das células desencadeada pelo tratamento com *Moringa oleifera* e uma diminuição na elasticidade desencadeada pelo tratamento com *Azadirachta indica*, e com os espectros de ressonância magnética nuclear foram detectadas no extrato de *Azadirachta indica* a presença dos compostos: 2-hidroxiisobutirato, ácido acético, betaína, citrato, ácido fórmico, glucarato (sacarato), lactato, succinato e dimetil sulfona, e no extrato de *Moringa oleifera* a presença dos compostos: ácido fórmico, ácido fumárico, ácido orótico, betaína, glicerol e trigonelina. Portanto, as consequências do tratamento com a *Moringa oleifera* podem estar associadas ao rearranjo do citoesqueleto das células e o tratamento com a *Azadirachta indica* pode estar relacionado a um processo de morte celular, onde foram encontrados compostos que são tóxicos a esse tipo de célula utilizado no trabalho.

**Palavras-chave:** Produtos naturais, Fitoterápicos, *Moringa oleifera*, *Azadirachta indica*, Placenta, RMN, AFM.

## ABSTRACT

With the identification of leading compounds, resulting in the development of new drugs, natural products represent an important source of bioactive compounds that can act with numerous activities, such as anti-inflammatory, antifungal, antihypertensive, antitumor, antioxidant, healing, among others. In this context, this study aimed to investigate the biological activities of two species of medicinal plants: *Moringa oleifera* and *Azadirachta indica*, against placental cells, since pregnant women are a very sensitive target for any type of medicinal treatment. Cell viability quantification studies were carried out using extracts at concentrations of 25, 50, 75 and 100% in trophoblastic cell lines using the MTT assay, atomic force microscopy analysis of cells with and without treatment, and analysis of nuclear magnetic resonance of the extracts. According to the data obtained, the extract of *Moringa oleifera* obtained cell viability at concentrations of 25% and 50%, being toxic above 50%, while the extract of *Azadirachta indica* showed no cell viability at any of the concentrations, with the Atomic force microscopy showed morphological changes, an increase in cell elasticity triggered by treatment with *Moringa oleifera* and a decrease in elasticity triggered by treatment with *Azadirachta indica*, and with nuclear magnetic resonance spectra were detected in the extract of *Azadirachta indica* a presence of the compounds: 2-hydroxyisobutyrate, acetic acid, betaine, citrate, formic acid, glucarate (saccharate), lactate, succinate and dimethyl sulfone, and in the *Moringa oleifera* extract the presence of the compounds: formic acid, fumaric acid, orotic acid, betaine, glycerol and trigonelline. Therefore, the consequences of treatment with *Moringa oleifera* may be associated with the rearrangement of the cytoskeleton of cells and treatment with *Azadirachta indica* may be related to a process of cell death, where compounds that are toxic to this type of cell used in the Work.

**Keywords:** Natural products, Drugs, *Moringa oleifera*, *Azadirachta indica*, Pregnant women, NMR, AFM.

## Lista de Figuras

Figura 1 - Compostos relevantes presentes no óleo de Nim.....	25
Figura 2 - Ranking do mercado farmacêutico mundial. ....	29
Figura 3 - Gastos com P&D pela indústria farmacêutica internacional.....	30
Figura 4 - Mapa mundial de pesquisa clínica. ....	33
Figura 5 - Ranking dos medicamentos mais vendidos do Brasil. ....	34
Figura 6 - Algumas funções químicas de terpenos. ....	37
Figura 7 - Vias biossintéticas dos terpenos.....	38
Figura 8 - Estrutura química de terpenos e a “regra do isopreno”.....	39
Figura 9 - Diagrama de um espectrômetro de RMN com Transformada de Fourier. ....	43
Figura 10 - Deslocamentos químicos aproximados de RMN <sup>1</sup> H.....	44
Figura 11 - Deslocamentos químicos aproximados de RMN <sup>13</sup> C. ....	46
Figura 12 - Princípio de funcionamento do AFM. ....	49
Figura 13 - Reação de redução do MTT a formazan pela enzima desidrogenase mitocondrial.....	54
Figura 14 - Percentual de viabilidade celular do extrato de moringa.....	55
Figura 15 - Percentual de viabilidade celular do extrato de Nim. ....	56
Figura 16 - Estado das células com efeito das concentrações dos extratos de Nim indiano: a) controle, b) 25%, c) 50%, d) 75% e e) 100%; e Moringa: f) controle, g) 25%, h) 50%, i) 75% e j) 100%.....	57
Figura 17 - Imagens topográficas de AFM de células da linhagem HTR sem tratamento (controle). ....	60
Figura 18 - Imagens topográficas de AFM de células da linhagem HTR tratadas com Moringa. ....	60
Figura 19 - Imagens topográficas de AFM de células da linhagem HTR tratadas com Nim.....	60
Figura 20 - Curvas de força-distância geradas com AFM. ....	61
Figura 21 - Box plots dos módulos de Young das células controle e tratadas com Moringa e Nim. ....	62
Figura 22 - Espectro RMN <sup>1</sup> H do extrato de Nim (Azadirachta indica). ....	64
Figura 23 - Espectro RMN <sup>1</sup> H do extrato de Moringa (Moringa oleifera). ....	64

Figura 24 - Identificação do 2-Hidroxiisobutirato: a) Análise RMN 1H Chenomx, b) Espectro J-resolvido, c) Espectro 13C e d) Espectro HMBC. ....	65
Figura 25. Identificação do Ácido Acético: a) Análise RMN 1H Chenomx, b) Espectro J-resolvido, c) Espectro TOCSY.....	67
Figura 26. Identificação da Betaína: a) Análise RMN 1H Chenomx, b) Espectro J-resolvido, c) Espectro TOCSY.....	68
Figura 27. Identificação do Citrato: a) Distinção dos hidrogênios a e b causado pelo efeito anisotrópico, b) Análise RMN 1H Chenomx, c) Espectro J-resolvido, d) Espectro TOCSY, e) Espectro COSY, f) Espectro HSQC. ....	70
Figura 28. Identificação do Ácido Fórmico: a) Análise RMN 1H Chenomx, b) Espectro TOCSY.....	72
Figura 29. Identificação do Glucarato: a) Análise RMN 1H Chenomx, b) Espectro TOCSY, c) Espectro HMBC. ....	73
Figura 30. Identificação do Lactato: a) Análise RMN 1H Chenomx, b) Espectro J-resolvido, c) Espectro TOCSY, d) Espectro HMBC. ....	74
Figura 31. Identificação do Succinato: a) Análise RMN 1H Chenomx, b) Espectro J-resolvido, c) Espectro TOCSY, d) Espectro HSQC. ....	77
Figura 32. Identificação do Dimetil Sulfona: a) Análise RMN 1H Chenomx, b) Espectro J-resolvido, c) Espectro TOCSY.....	78
Figura 33. Identificação do Ácido Fórmico: a) Análise RMN 1H Chenomx, b) Espectro J-resolvido, c) Espectro TOCSY.....	80
Figura 34. Identificação do Ácido Fumárico: a) Análise RMN 1H Chenomx, b) Espectro J-resolvido, c) Espectro TOCSY.....	81
Figura 35. Identificação do Ácido Orótico: a) Análise RMN 1H Chenomx, b) Espectro TOCSY.....	82
Figura 36. Identificação da Betaína: a) Análise RMN 1H Chenomx, b) Espectro J-resolvido, c) Espectro TOCSY, d) Espectro HMBC.....	83
Figura 37. Identificação do Glicerol: a) Análise RMN 1H Chenomx, b) Espectro J-resolvido, c) Espectro COSY, d) Espectro HMBC. ....	85
Figura 38. Identificação da Trigonelina: a) Análise RMN 1H Chenomx, b) Espectro J-resolvido, c) Espectro COSY, d) Espectro HMBC, e) Espectro HSQC. ....	87

## Lista de Quadros

Quadro 1 - Ranking dos 20 grupos econômicos de maior faturamento farmacêutico. .....	30
Quadro 2 - Principais constituintes de alguns óleos essenciais. ....	36
Quadro 3 - Categorias de risco farmacológico na gravidez segundo a Food and Drug Administration.....	41
Quadro 4 - Compostos identificados nos extratos de Azadirachta indica e Moringa Oleifera.....	64

## Lista de abreviaturas

AC	Adenilil Ciclase
AFM	Microscopia de Força Atômica
AINEs	Anti-inflamatórios não esteroides
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ARMDs	Antirreumáticos Modificadores da Doença
COSY	Espectroscopia de Correlação Homonuclear
COX	Ciclo-oxigenase
CTEC	Centro de Tecnologia
DEPT	Aprimoramento sem distorção por transferência de polarização
DMAPP	Difosfato de dimetilalilo
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DXP	1-desoxilulose 5-fosfato
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
FDA	Food and Drug Administration
FID	Decaimento de Indução Livre
FINEP	Financiadora de Estudos e Projetos
HETCOR	Correlação heteronuclear
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMDB	Human Metabolome DataBase
HPLC-UV	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a ultravioleta.

HPLC-UV-MS Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a ultravioleta e espectrômetro de massas.

HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
Hz	Hertz
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
IPP	Isopentenil Pirofosfato
MMA	Ministério do Meio Ambiente
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H tetrazolato de bromo
NCE	Nova Entidade Química
NuBBE	Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecologia de Produtos Naturais
PGD2	Prostaglandina D2
PGE2	Prostaglandina E2
P&D	Pesquisa & Desenvolvimento
PLC	Fosfolipase C
PPM	Partes Por Milhão
PN	Produto Natural
RF	Radiofrequência
RMN 1D	Ressonância Magnética Nuclear Unidimensional
RMN 2D	Ressonância Magnética Nuclear Bidimensional
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
TMS	Tetrametilsilano
TOCSY	TOTal Correlated SpectroscopY
UFAL	Universidade Federal de Alagoas

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>15</b>
2.1	Geral	15
2.2	Específicos	15
<b>3</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	<b>16</b>
3.1	Produtos naturais	16
3.1.1	Aplicação dos produtos naturais	17
3.1.2	Impacto econômico	18
3.1.3	Biodiversidade brasileira	20
3.1.4	Caatinga	21
3.2	Moringa ( <i>Moringa oleifera</i> )	23
3.3	Nim indiano ( <i>Azadirachta indica</i> )	24
3.4	Fármacos: fitoterápicos e fitofármacos	25
3.4.1	Produção mundial	27
3.4.2	Produção brasileira	32
3.4.3	Anti-inflamatórios	34
3.4.4	Terpenos	36
3.5	Segurança na utilização de fármacos para gestantes	40
3.6	Método de caracterização de fármacos: RMN	42
3.6.1	RMN 1H	44
3.6.2	RMN 13C	45
3.6.3	RMN 2D	47
3.7	Microscopia de força atômica	47
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b>	<b>51</b>
4.1	Extrato aquoso de nim e moringa	51
4.2	Ensaio de viabilidade celular utilizando MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio)	51
4.3	Experimentos de microscopia de força atômica – AFM	51
4.4	Experimentos de RMN	53
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>	<b>54</b>
5.1	Ensaio de viabilidade celular utilizando MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio)	54
5.2	Experimentos de AFM	59

5.2.1	Imagens topográficas .....	59
5.2.2	Análise do módulo de young (elasticidade) .....	61
5.3	Experimentos de RMN .....	63
5.3.1	Identificação de compostos do nim (Azadirachta indica) .....	65
5.3.2	Identificação de compostos da moringa (Moringa oleifera) .....	79
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>90</b>
<b>7</b>	<b>PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>91</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>92</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Diante das perspectivas promissoras do uso de produtos naturais como fontes de biocompostos envolvendo inúmeras áreas de estudo, há pesquisas que citam várias atividades a partir da utilização destes produtos naturais, tais como anti-*Helicobacter pylori* (ALEIXO; GALBIATI; SCALON LEMOS, 2018), uso de ferramentas alternativas para o controle larvário de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (VIANA; SAMPAIO; MARTINS, 2018), propriedades conservantes para melhorar a segurança microbiológica e prolongamento do prazo de validade dos produtos do mar (BAPTISTA; HORITA; SANT'ANA, 2020), e como fitoterápico na cicatrização tecidual (MARTELLI; ANDRADE; SANTOS, 2018).

Observando esse crescente interesse, nos últimos anos, pelo uso de produtos naturais e dos respectivos extratos na terapêutica é preciso enfatizar se há garantia de segurança em relação a efeitos tóxicos e conhecimentos sobre efeitos secundários, interações, contraindicações, mutagenicidade e, também, a existência de ensaios farmacológicos e experimentação clínica que demonstrem eficácia para este tipo de medicamento (Araújo et al., 2007; Mendes et al., 2018).

Diante deste contexto, através do histórico do uso da fitoterapia, com destaque na importância do conhecimento popular, há a necessidade de um envolvimento científico para melhor aplicabilidade e uso dos produtos naturais e da biodiversidade (FIRMO *et al.*, 2011), assim este trabalho visa desenvolver um estudo que avalia a viabilidade da utilização de extratos das espécies *Moringa oleifera* e *Azadirachta indica* em células placentárias. E foram utilizados o método MTT para avaliar a citotoxicidade dos extratos nas células placentárias, a Microscopia de Força Atômica – AFM para analisar o perfil topográfico e a elasticidade das células placentárias com e sem os tratamentos, e a técnica de Ressonância Magnética Nuclear – RMN para identificar as classes de compostos que haviam nos extratos em estudo.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

- Avaliar a atividade citotóxica e anti-inflamatória de extratos das espécies de *Azadirachta indica* (Nim indiano) e *Moringa oleifera*, bem como identificar seus possíveis compostos a partir da técnica de RMN.

### **2.2 Específicos**

- Preparar extratos das plantas *Azadirachta indica* (folhas) e *Moringa oleifera* (folhas);
- Determinar a viabilidade celular com a utilização dos extratos em células de placenta empregando o ensaio com MTT (brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2- il) - 2,5-difeniltetrazólio);
- Avaliar as alterações morfológicas e elasticidade das células tratadas utilizando a técnica de Microscopia de Força Atômica – AFM;
- Identificar as classes dos compostos presentes nos extratos por meio de RMN;

### **3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

#### **3.1 Produtos naturais**

Desde os primórdios os produtos naturais são utilizados pela humanidade. A busca por alívio e cura de doenças pela ingestão de ervas e folhas talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais. A história do desenvolvimento das civilizações Oriental e Ocidental é rica em exemplos da utilização de recursos naturais na medicina, no controle de pragas e em mecanismos de defesa, merecendo destaque a civilização Egípcia, Greco-romana e Chinesa. A medicina tradicional chinesa desenvolveu-se com tal grandiosidade e eficiência que até hoje muitas espécies e preparados vegetais medicinais são estudados na busca pelo entendimento de seu mecanismo de ação e no isolamento dos princípios ativos (VIEGAS JR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

Produto natural é aquele produzido pela “natureza” ou conforme as “leis da natureza”, com a menor interferência humana possível, ou advindos diretamente de partes de vegetais ou de animais. Normalmente associa-se à produção artesanal ou não-industrial (GOMES, 2009). Contudo, esse conceito ainda é bastante controverso. A Organização Mundial da Saúde reconhece a importância dos produtos naturais no desenvolvimento de modernas drogas terapêuticas, com relevância para a pesquisa farmacológica, não somente quando os constituintes usados diretamente como agentes terapêuticos, mas também como matérias-primas para a síntese, ou modelos para compostos farmacologicamente ativos (OMS, 2008).

O papel dos produtos naturais (PN) no processo de descoberta da droga foi bem estabelecido ao longo de vários séculos. A possibilidade de encontrar novos medicamentos e precursores de fontes naturais é uma das razões mais comumente citadas para preservar a biodiversidade. Muitas publicações foram dedicadas para este assunto, descrevendo a relevância dos PN como fonte de diferentes e originais esqueletos moleculares. Além disso, são numerosas as classes de PN de plantas, de microrganismos e do mar. Desta grande variedade estrutural de PN bioativo, a classe dos alcaloides é muito representativa. Isto é possível reconhecer em muitos padrões moleculares de drogas, provenientes de várias classes diferentes de alcaloides (KINGSTON, 2011).

A importância dos produtos naturais na sociedade moderna é indiscutível. Os produtos naturais continuam a desempenhar um papel significativo no processo de descoberta e desenvolvimento de medicamentos (NEWMAN; CRAGG, 2016). Ainda que o Prêmio Nobel de Medicina de 2015 ter destacado a importância da química de produtos naturais no século XXI, vale mencionar que diversos outros Prêmios Nobel foram concedidos a pesquisadores atuantes direta ou indiretamente na química de produtos naturais, tais como, Emil Fischer, Robert Robinson, Robert B. Woodward, Heinrich O. Wieland, Adolf O. R. Windaus, Sir Walter N. Haworth e Paul Karrer, Richard Kuhn, Leopold Ruzicka e Louis F. Leloir (BERLINCK *et al.*, 2017).

### 3.1.1 Aplicação dos produtos naturais

O uso de produtos naturais como instrumento de defesa ou caça datam da Era Paleolítica, onde extratos vegetais foram aplicados à água e flechas envenenadas para a pesca, exemplos de gêneros botânicos utilizados naquele tempo incluem Derris, Euphorbia e Aconitum (GUPTA; KUMAR, 2016; PITSCHMANN, 2014). Além disso, do século IV a.C ao século XVI d.C, vários registros de comunidades na China e no Brasil relataram o uso de pimenta em pó e a fumaça da queima de seus frutos como armas para cegar, desorientar ou afugentar os múltiplos agressores (ANTONIO *et al.*, 2019).

Existem muitos exemplos de medicamentos mais vendidos que tiveram origem em produtos naturais. Alguns bons exemplos são: i) os agentes anti-colesterolêmicos sinvastatina, lovastatina, pravastatina e atorvastatina; ii) agentes anti-hipertensivos: captopril e enalapril; iii) os agentes imunossupressores da ciclosporina A, tacrolimus (FK506) e rapamicina; iv) os agentes antitumorais taxol, docetaxel e campotecina; v) os antibióticos e agentes antifúngicos: penicilina, eritromicina, claritomicina e anfotericina B (LI; VEDERAS, 2009).

A morfina foi um dos primeiros compostos oriundos de PN extraídos do ópio (*Papaver somniferum*) na forma pura no início do século XIX, sendo amplamente explorado até hoje como um padrão de analgésico especialmente para o câncer de pacientes. Desde o advento da morfina, os PN têm desempenhado um importante papel na descoberta de novos compostos químicos e são apresentados como fortes candidatos ao desenvolvimento de

novos medicamentos para o tratamento de dor crônica, como a dor oncológica (LI; VEDERAS, 2009). Os PN podem ser utilizados no descobrimento e desenvolvimento do fármaco final por causa dos mecanismos inovadores que eles podem apresentar para diferentes tipos de doenças e também devido à possibilidade de serem protótipos para a síntese e/ou semi-síntese de novas moléculas (NEWMAN; CRAGG, 2016).

Em face às perspectivas promissoras do uso de produtos naturais como fontes de biocompostos, Lima Júnior & Abreu (2018) em sua revisão descreveram os diversos estudos desenvolvidos nos últimos anos que relataram a obtenção e eficiência de produtos naturais como agentes coagulantes e floculantes de águas para abastecimento, com ênfase na quitosana, sementes da espécie *Moringa oleifera* e taninos vegetais, no qual também expos as limitações e malefícios dos coagulantes tradicionais a base de sais inorgânicos e polímeros sintéticos, bem como seus mecanismos de atuação, confrontando com os principais parâmetros físico-químicos utilizados no controle de qualidade de águas naturais e tratadas.

O uso dos produtos naturais envolve inúmeras áreas, podendo ser utilizados como produtos com atividade anti-*Helicobacter pylori* (ALEIXO; GALBIATI; SCALON LEMOS, 2018), como ferramentas alternativas para o controle larvário de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (VIANA; SAMPAIO; MARTINS, 2018), com propriedades conservantes para melhorar a segurança microbiológica e prolongamento do prazo de validade dos produtos do mar (BAPTISTA; HORITA; SANT'ANA, 2020), e como fitoterápico na cicatrização tecidual (MARTELLI; ANDRADE; SANTOS, 2018).

### 3.1.2 Impacto econômico

Dentre as principais razões que impulsionam o grande crescimento do mercado mundial de fitoterápicos a cada ano destaca-se a valorização de hábitos de vida mais saudáveis e, conseqüentemente, o consumo de produtos naturais; os evidentes efeitos colaterais dos medicamentos sintéticos; a descoberta de novos princípios ativos de plantas e a comprovação científica de suas atividades terapêuticas (MARTELLI; ANDRADE; SANTOS, 2018).

Entre os muitos exemplos de plantas nativas no Brasil, as que têm sido fonte de inovações de produtos cosméticos são babaçu (*Orbignya speciosa*),

murumuru (*Astrocaryum murumuru*), bacuri (*Platonia insignis*), buriti (*Mauritia flexuosa*), açai (*Euterpe oleracea*), umbu e umbu-cajá (*Spondias tuberosa*). Em 2008, um grupo de estudos formado por meio de uma parceria entre a Universidade Federal de Santa Catarina, a Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) e a empresa de cosméticos Natura, estudou o extrato de folhas de *Passiflora alata*, uma planta nativa do Brasil, o qual permitiu que a Natura desenvolvesse um produto cosmético inovador, denominado flavonoide de passiflora, que ainda é comercialmente disponível (CALIXTO, 2019).

Desde 1990, o Departamento de Farmacologia da Universidade de Santa Catarina estabeleceu uma estreita parceria com empresas farmacêuticas brasileiras para o desenvolvimento de novos fármacos a partir de produtos naturais, desenvolvendo mais de 100 projetos, resultando em cerca de 12 patentes aprovadas internacionalmente, muitas publicações e 3 produtos que se encontraram nas normas científicas de segurança, eficácia e qualidade e recebeu a aprovação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA): o analgésico e anti-inflamatório Acheflan®. Obtido a partir do óleo essencial de *Codia verbenacea*, Syntocalmy®, que é produzido a partir das folhas de *Passiflora incarnata* (uma planta europeia) e usado no tratamento da ansiedade e insônia (ambos comercializados pelo Aché Laboratórios) e Melagrião®, desenvolvido a partir das folhas de *Mikania glomerata* e usado na gestão da tosse e asma, comercializada no Brasil pela Catarinense Pharma. E de acordo com o IMS Brasil Saúde as vendas de Acheflan®, Syntocalmy® e Melagrião® em 2016 foram de 30,3, 28,6 e 23,6 milhões de reais, respectivamente (CALIXTO, 2019).

Trabalhos recentes sobre as frutas brasileiras levaram à isolamento de vários fenóis presentes na espécie *Spondias tuberosa*, através de uma combinação de HPLC-UV- MS (Cromatografia líquida de alta performance acoplada a ultravioleta e espectrometria de massas), HPLC-microfracionamento, seguido de ensaios biológicos destinados à localização de compostos ativos. Um procedimento de isolamento eficiente foi realizado com extrato de MeOH usando uma transferência de gradiente de condições analíticas de HPLC à separação preparativa MPLC-UV. Este permitiu o isolamento de sete compostos, incluindo dois novos produtos naturais que apresentaram alta atividade antioxidante e inibição da acetilcolinesterase. Esses dados foram publicados e uma patente foi

emitida (WO20160605807070A1), em acordo com uma empresa da Alemanha para possível desenvolvimento de um produto (ZERAİK *et al.*, 2016).

### 3.1.3 Biodiversidade brasileira

O Brasil é o país com a maior biodiversidade do mundo e vem tomando medidas para preservá-la, sendo a primeira nação a assinar a Convenção sobre Diversidade Biológica em 1992. Destaca-se por ter uma mega biodiversidade, responsável por mais de 15% de todas as espécies vivas do planeta. O Brasil tem uma área de 8.511.996 km<sup>2</sup> na qual estão distribuídos seis biomas terrestres (Floresta Amazônica, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pantanal e Pampas) e uma costa marítima de 7.491 km que abriga três ecossistemas marinhos e doze grandes regiões hidrográficas (MMA - MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2017).

Dado o número de espécies vegetais na Terra e as várias vias biosintéticas capazes de produzir uma extraordinária diversidade química, a biodiversidade em ambientes tropicais e equatoriais oferece um potencial particularmente rico em compostos biologicamente ativos que podem ser usados como modelos para a química medicinal e a descoberta de drogas (BOLZANI *et al.*, 2012).

Diversas são as plantas medicinais nativas da flora brasileira conhecidas pela etnofarmacologia e por apresentarem propriedades antimicrobianas e que, ao mesmo tempo, preenchem critérios de preservação ambiental e manejo autossustentável tais como: *Anacardium occidentale* (cajuzeiro), *Pterodone marginatus* (sucupira), *Copaifera langsdorffii* (copaíba), *Anadenanthera colubrina* (angico), *Myroxylon peruiferum* (bálsamo-do-peru), *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão), *Bixa orellana* (urucum), *Eugenia uniflora* (pitanga), *Psidium guajava* (goiabeira), *Mimosa tenuiflora* (tepezcuíte), *Ilex paraguariensis* (erva-mate), *Ocotea odorifera* (sassafrás), *Hymenaea courbaril* (jatobá), *Schinus terebinthifolia* (aroeira), *Genipa americana* (jenipapo), *Tabebuia avellanedae* (ipê-roxo) e *Casearia sylvestris* (guaçatonga) (MARTELLI; ANDRADE; SANTOS, 2018).

Associada à biodiversidade, há uma rica diversidade de compostos naturais com estruturas peculiares que ainda são uma das fontes mais sofisticadas de novos modelos moleculares para química medicinal,

desenvolvimento de novos medicamentos, agroquímicos, fragrâncias, cosméticos e suplementos alimentares. Entre os 1211 novos protótipos de baixo peso molecular (conhecidos como New Chemical Entities - NCE) introduzidos no mercado mundial como fármacos durante o período 1981-2014, 60% são derivados de produtos naturais, miméticos ou concebidos a partir de estruturas de produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2016).

Um programa recente para a biodiversidade é a Base de dados NuBBE (NUBBE<sub>DB</sub>): a base de dados de produtos naturais da biodiversidade brasileira. A diversidade química da espécie brasileira está sendo catalogada por este projeto criado em 2013, inicialmente com 640 compostos isolados e identificados pelo Grupo de Pesquisa Núcleo de Bioensaio, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (VALLI *et al.*, 2013). O NuBBE<sub>DB</sub> atualmente fornece dados de mais do que 2000 compostos de plantas, organismos marinhos, fungos, etc., e contém substâncias químicas (classe metabólica, estrutura química, propriedades físico-químicas, nome comum, nome IUPAC e molecular Massa), biológica (ocorrência, habitat, biodiversidade atividades), dados farmacológicos e espectroscópicos (PILON *et al.*, 2017). Esta base de dados é de livre acesso online, onde é possível pesquisar por propriedades, estrutura química, classe de produtos naturais ou uma combinação de critérios moleculares ou biológicos (NUBBEDB, 2017).

Dentre as principais políticas e programas nacionais voltados a plantas medicinais e fitoterápicos podemos citar o Rensus (Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde) no qual apresenta uma lista de 71 plantas medicinais que possuem potencial para gerar produtos de interesse ao SUS (Sistema Único de Saúde). Essa lista tem a finalidade de orientar estudos e pesquisas que possam subsidiar a elaboração da relação de fitoterápicos disponíveis para uso da população, com segurança e eficácia para o tratamento de determinada doença, como por exemplo os fitoterápicos derivados da espinheira santa, são oferecidos para tratar gastrites e úlceras, e de guaco, para tosses e gripes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

#### 3.1.4 Caatinga

Segundo Almeida *et al.* (2012) na Caatinga, 50% dos 20 extratos de plantas estudados apresentaram forte atividade antimicrobiana, 25% tiveram

atividade moderada e 15% tinham pouca atividade. Na Mata Atlântica, 28,5% dos 14 extratos de plantas estudados apresentaram forte atividade, com 14,5% com atividade moderada e 28,5% com baixa atividade. O microrganismo mais suscetível aos extratos da Caatinga, era *Mycobacterium smegmatis*; 85% das espécies testadas foram capazes de inibir seu crescimento. O organismo que era suscetível ao maior número de espécies vegetais (71%) da Mata Atlântica era *Staphylococcus aureus*. Logo, os extratos da Caatinga mostraram uma tendência de atividade antimicrobiana superior, comparada às espécies da Mata Atlântica, tanto em termos de inibição de uma maior variedade de microrganismos quanto em termos de demonstração de maior atividade contra estirpes susceptíveis.

Pereira et al. (2014) realizaram uma pesquisa de campo com 392 agricultores da zona rural da cidade de Jardim, localizada ao Sul do Ceará, na região do Cariri, sobre o potencial terapêutico de *Myracrodruon urundeuva* conhecida popularmente como aroeira do sertão. É uma espécie nativa ameaçada de extinção que ocorre tanto na caatinga, como na floresta pluvial. Como resultado, 32% (125) declararam nunca ter usado produtos de "aroeira", apesar de ter conhecimento de suas propriedades medicinais. Dos 68% (267) que usaram os produtos da "aroeira", a grande maioria afirmou ter obtido melhora na cicatrização, infecção de pele e outras patologias.

No Distrito de Aratama, no Município de Assaré, Ceará, foi feito um trabalho de levantamento etnobotânico das plantas medicinais, verificando a versatilidade das espécies utilizadas e o consenso de uso e/ou conhecimento entre os informantes, as informações etnobotânicas foram obtidas através de entrevistas estruturadas e semiestruturadas com os moradores locais. Foram citadas 116 espécies com fins medicinais pertencentes a 103 gêneros e 58 famílias com destaque para Fabaceae, Asteraceae e Lamiaceae. Entre as espécies levantadas, *Mentha spicata* L., *Rosmarinus officinalis* L., *Allium sativum* L., *Bauhinia cheilantha*, *Ximenia americana* L., se destacaram como as mais versáteis dentro da comunidade. A maioria das indicações terapêuticas citadas foram desordens mentais e comportamentais, afecções ou dores não definidas, os transtornos do sistema respiratório, as doenças de pele e do tecido celular subcutâneo, e os transtornos do sistema sensorial (ouvidos), onde os resultados

mostraram elevada riqueza da flora medicinal presente na caatinga (RIBEIRO *et al.*, 2014).

### **3.2 Moringa (*Moringa oleifera*)**

*Moringa oleifera*, comumente conhecida como Moringa, é uma espécie da família Moringaceae, oriunda do Himalaia, pode ser encontrada na Índia, Egito, Filipinas, Tailândia, Malásia, Paquistão, Singapura, Jamaica e Nigéria. Esta planta consegue se adaptar tanto em condições irrigadas quanto na seca, é pouco exigente em solos e fertilizantes, e no Brasil encontra-se disseminada na região nordeste, mas tem sua expansão em todo o território (SOUSA; MELO, 2019).

A Moringa tem sido utilizada desde 150 d.C. por antigos reis e rainhas em sua dieta para manter mente e pele saudáveis, suas folhas, vagens, sementes, gomas, casca e flores são usadas em mais de 80 países para aliviar deficiências minerais e vitamínicas, fortalecer o sistema cardiovascular, promover níveis normais de glicose no sangue, neutralizar e reduzir a malignidade dos radicais livres (MAHMOOD; MUGAL; HAQ, 2010).

Por ser uma planta muito valorizada, devido a sua composição nutricional e com uma grande variedade de usos medicinais, pode ser utilizada nos tratamentos de reumatismo e gota, ou como cicatrizantes de feridas, possui diversos benefícios farmacológicos para o consumo humano, incluindo a promoção do crescimento, efeitos antimicrobianos, terapêuticos e antioxidantes (OKUDA *et al.*, 2001), podendo ser também utilizada na prevenção de muitas doenças, como aterosclerose, câncer, dentre outras, que são causadas por radicais livres, podendo ser evitadas por agentes antioxidantes naturais (MBIKAY, 2012).

Várias partes desta planta, como as folhas, raízes, sementes, casca, frutas, flores e vagens imaturas agem como estimulantes cardíacos e circulatórios, possuem propriedades antitumoral, antipirético, antiepilético, anti-inflamatório, antiulceroso, antiespasmódico, atividades diurética, anti-hipertensiva, hipocolesterolemiantes, antioxidante, antidiabética, hepatoprotetora, antibacteriana e antifúngica, e estão sendo empregadas para o tratamento de mais de 300 tipos de doenças utilizadas pela tradicional medicina ayurveda (KUETE, 2017).

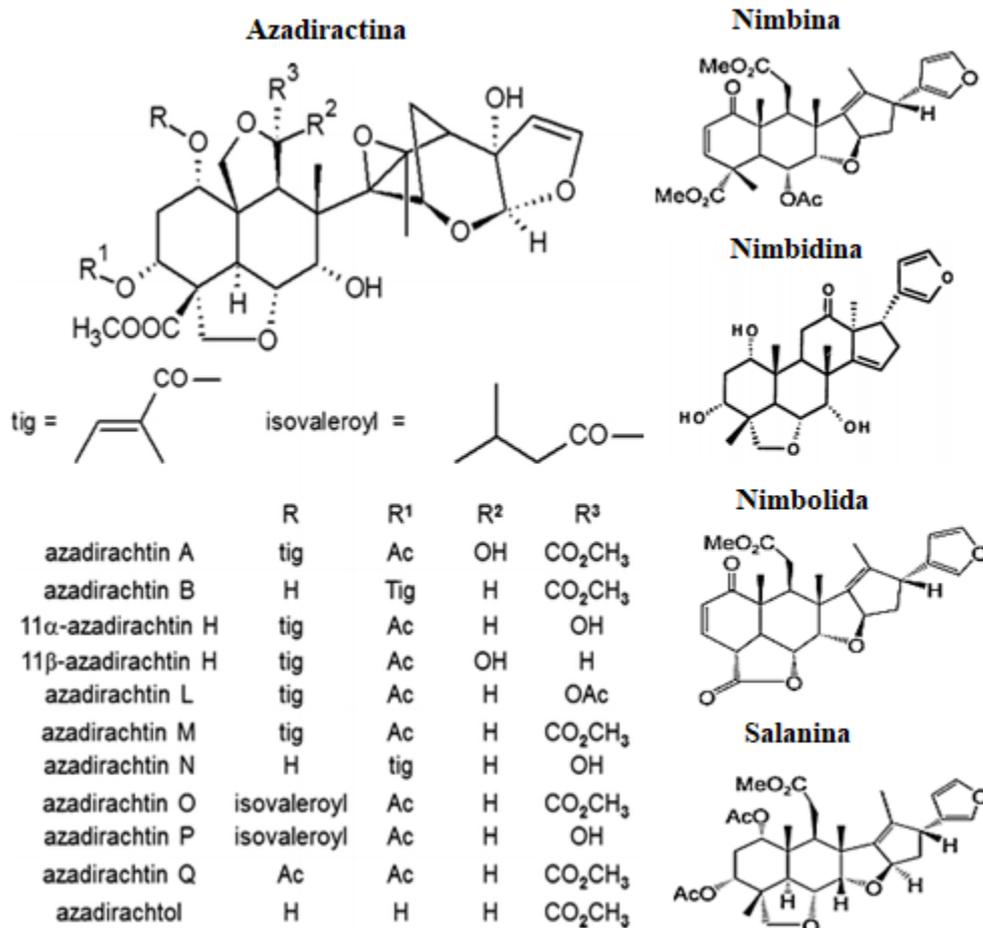
### 3.3 Nim indiano (*Azadirachta indica*)

É uma árvore pertencente à família Meliaceae, nativa das florestas tropicais do Nordeste da Índia e de partes da Ásia, além de ser comumente encontrada em cidades e vilas na parte norte da Nigéria (AA, 2012; NETO *et al.*, 2020). Possui grande quantidade de folhas sempre verdes, do tipo imparipenadas, alternadas, com folíolos de coloração verde-claro intenso, que caem somente em casos de seca extrema. As raízes penetram profundamente no solo e quando sofrem algum tipo de dano, produzem brotos. O sistema radicular da planta é composto por uma raiz pivotante, sua principal sustentação, possibilitando a retirada de água e nutrientes de grandes profundidades e de raízes laterais auxiliares, suas flores são pequenas, brancas, bissexuadas, brotam em feixes axiais, arranjando-se em inflorescências de cerca de 25 cm de comprimento; possuem um perfume semelhante ao mel e atraem muitas abelhas. Os frutos são lisos, glabos, elipsoides, com 1,5 cm x 2 cm de comprimento, de cor amarelada quando maduros, com uma polpa doce envolvendo as sementes, que são compostas por uma casca e um ou mais caroços. As sementes e as folhas são usualmente empregadas no controle de pragas. (MOSSINI & KEMMELMEIER, 2005).

A maioria dos componentes caracterizados da semente do Nim é limonoides, essa substância pertence à classe dos terpenos e são conhecidos como meliacinas por apresentarem gosto amargo. Dentre os limonoides presentes nas sementes, a azadiractina (Figura 01) tem maior importância por ser responsável pela maioria dos efeitos biológicos (AZEVEDO *et al.*, 2015).

A Azadiractina, possui fórmula molecular (C<sub>35</sub>H<sub>44</sub>O<sub>16</sub>), apresentando 16 estereoisômeros, 7 carbonos quaternários e 9 secundários (Figura 01). Seus grupos funcionais são: 4 ésteres, 2 grupos hidróxi, hemiacetal, epóxido e dihidrofurano. Logo, devido a este elevado número de grupos funcionais, suas proximidades e a presença de oxigênio nestes grupos, o composto Azadiractina é facilmente oxidado e bastante reativo (HORN, 2019)

Figura 1 - Compostos relevantes presentes no óleo de Nim



Fonte: Adaptado de (AA, 2012; BRAHMACHARI, 2004; RODRIGUES, 2019)

Alguns estudos relatam que o Nim possui efeito negativo na função reprodutiva de humanos e animais por causar um decaimento nos parâmetros seminais, como volume e concentração do ejaculado, motilidade e alterações morfológicas dos espermatozoides, ação espermicida e efeito contraceptivo vaginal, além de interferir no ciclo estral das fêmeas, no desenvolvimento embrionário precoce e promover aborto (BARROS BRASIL, 2013; GÓIS, 2018; URIBE-CLAVIJO *et al.*, 2012).

### 3.4 Fármacos: fitoterápicos e fitofármacos

Fármaco, conforme a Anvisa, é a principal substância na formulação de um medicamento, sendo responsável pelo efeito terapêutico, assim como, é um composto químico obtido de extração, purificação, síntese ou semi-síntese, dando origem aos medicamentos (IBECO FACULDADE, 2017). De acordo com

as definições oficiais que regulamentam a área de saúde no Brasil fármaco é a substância química que é o princípio ativo do medicamento (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1998).

A palavra fármaco é derivada do grego “phármakon” cujo significado é ser aquilo que pode transladar as impurezas, ou seja, para os gregos pode significar tanto remédio como veneno, podendo manter a vida ou causar a morte, sendo que o que interferia nas consequências do phármakon era a dose. Portanto, chegou-se ao atual conceito de fármacos, cujos são substâncias químicas com estrutura bem definida, com propriedades farmacológicas utilizadas com finalidade medicinal, determinando a prescrição da quantidade necessária e o tempo de uso pelo paciente (IBECO FACULDADE, 2017).

Dentre os medicamentos da biodiversidade incluem-se os fitoterápicos e os fitofármacos que são duas classes de medicamentos distintas. Segundo a ANVISA (2014), fitoterápicos são medicamentos obtidos empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais, caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Não se considera medicamento fitoterápico aquele que, na sua composição, inclua substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, nem as associações destas com extratos vegetais. Os fitofármacos diferem dos fitoterápicos por serem substâncias purificadas e isoladas a partir de matéria-prima vegetal com estrutura química definida e atividade farmacológica, sem sofrer qualquer etapa de semi-síntese ou modificação de sua estrutura química e são utilizados como ativos em medicamentos com propriedade profilática, paliativa ou curativa.

Com a identificação de compostos majoritários que resultam no desenvolvimento de novos fármacos, os produtos naturais são uma fonte rica em compostos bioativos que podem agir na terapêutica por causa das suas características que modulam vários processos bioquímicos. Vários exemplos de fármacos formulados a partir de fontes naturais estão disponíveis na medicina, como por exemplo, a reserpina (agente anti-hipertensivo), o tubocurarina (relaxante muscular) e os paclitaxel e maitansina (anticâncer) (MARQUES; VIEIRA, 2016).

Os fármacos são imprescindíveis para o tratamento de determinadas enfermidades e de suma importância para o reestabelecimento da saúde e

melhoria da qualidade de vida. Dentre as principais classes de maior consumo mundial destacam-se analgésicos, anti-inflamatórios, antibióticos, drogas psiquiátricas, anti-hipertensivos, contraceptivos hormonais, meios de contraste de raios x, entre outros (BARCELÓ, 2003; SILVA; COLLINS, 2011).

A produção de fármacos tem várias aplicações na indústria farmacêutica e principalmente na área da saúde, como a sua própria criação; também contam com a pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos para indústria; o desenvolvimento e produção de kits de reagentes para diagnósticos, o que favorece o setor das análises clínicas; além disso, visa a criação de novas vacinas e terapias gênicas, entre outras possibilidades que a biotecnologia favorece no setor da saúde (REIS *et al.*, 2009).

#### 3.4.1 Produção mundial

A indústria farmacêutica tem como objetivo primordial a produção de medicamentos, o que exige, constantemente, atividades de pesquisa e desenvolvimento (P&D), inovação, comercialização e distribuição de produtos. Embora tal indústria tenha se desenvolvido e expandido substancialmente, apenas a partir da década de 1920, suas origens como mercado global remontam ao final do século XIX, quando ocorreu a intensificação da pesquisa científica aplicada à indústria e à produção em maior escala (DUARTE *et al.*, 2015).

Foi no século XIX que se iniciou a procura pelos princípios ativos presentes nas plantas medicinais, criando assim, os primeiros medicamentos com as características que nós conhecemos atualmente. Friedrich Serturmer em 1806 foi o pioneiro e o primeiro a isolar o alcaloide morfina da papoula, fato que marcou uma busca constante por outros medicamentos a partir de plantas. Em 1824 Pierre-Jean Robiquet isolou a codeína (antitussígeno) também da papoula e, em 1848, George Fraz Merck isolou a papaverina, desta mesma planta. Entretanto, o marco histórico no processo de desenvolvimento da indústria farmacêutica mundial foi a descoberta da salicina (analgésico e antitérmico) por Rafaele Piria em 1829 a partir da planta *Salix alba*. A partir da salicina foi realizada a primeira modificação estrutural, originando o ácido salicílico em 1839, utilizado no tratamento da artrite reumatoide. A partir do ácido salicílico, Felix Hoffman sintetizou a aspirina (ácido acetilsalicílico) em 1897. Nasce então a

famosa e poderosa indústria farmacêutica da Alemanha e também a primeira patente que se tem conhecimento na área de medicamento (CALIXTO; JR, 2008).

Considera-se que dentre os mais diferentes setores industriais, o setor farmacêutico é um dos mais inovadores, e por conta disso há a necessidade dos altos investimentos em pesquisa e desenvolvimento (P&D) para a busca de novos fármacos. Em contrapartida, este setor também é um dos mais rentáveis em escala global, e, por isso, é um dos mais competitivos. Esta competição por aumento da rentabilidade vem levando as grandes multinacionais do setor a sucessivas fusões e/ou a adquirirem empresas menores, por isso dizemos que este setor é um oligopólio (PINTO; BARREIRO, 2013).

Observando os custos substanciais e o ritmo lento de descoberta de novos medicamentos, surge uma nova escalada na indústria farmacêutica: o reaproveitamento de "antigos" medicamentos para tratar doenças comuns e raras. Tornando-se cada vez mais uma proposta atraente porque envolve o uso de compostos, com custos gerais de desenvolvimento potencialmente mais baixos e desenvolvimento em uma linha de tempo mais curta. A exemplo disso, temos o Sildenafil que foi originalmente desenvolvido como um medicamento anti-hipertensivo, mas quando reaproveitado pela Pfizer foi utilizado para o tratamento de disfunção erétil e comercializado como *Viagra* (PUSHPAKOM *et al.*, 2018).

Com o alto custo dos medicamentos prescritos surge uma grande ameaça aos orçamentos da saúde, assim como em países sem saúde pública, o alto custo dos medicamentos prescritos representa também uma ameaça ao bolso dos pacientes. Aproximadamente 25% dos americanos encontram dificuldade em comprar medicamentos prescritos devido aos altos custos. As empresas farmacêuticas citam os altos preços dos medicamentos como sendo importante para sustentar a inovação, porém os altos preços de cada nova droga possivelmente diminuem o ritmo de inovação, uma vez que é menos arriscado desenvolver medicamentos com pequenas modificações de medicamentos existentes mostrando uma melhora incremental na eficácia ou segurança, ao invés de investir em medicamentos verdadeiramente inovadores, onde há um maior chance de fracasso (PAUL *et al.*, 2010).

No entanto, segundo os dados do IQVIA, os altos custos em medicamentos ainda não possuem um impacto negativo significativo, pois as vendas no mercado farmacêutico mundial em 2019 deverão ficar em torno de US\$ 1,26 trilhão. Em termos de ranking dos mercados mundiais (Figura 02), o Brasil, que ocupava o 8º lugar em 2013, passou a ocupar a 7ª posição em 2018 e as expectativas são que passará para o 5º lugar em 2023. Em 2018, o Brasil representou aproximadamente 2,6% do mercado farmacêutico mundial (SINDUSFARMA, 2019).

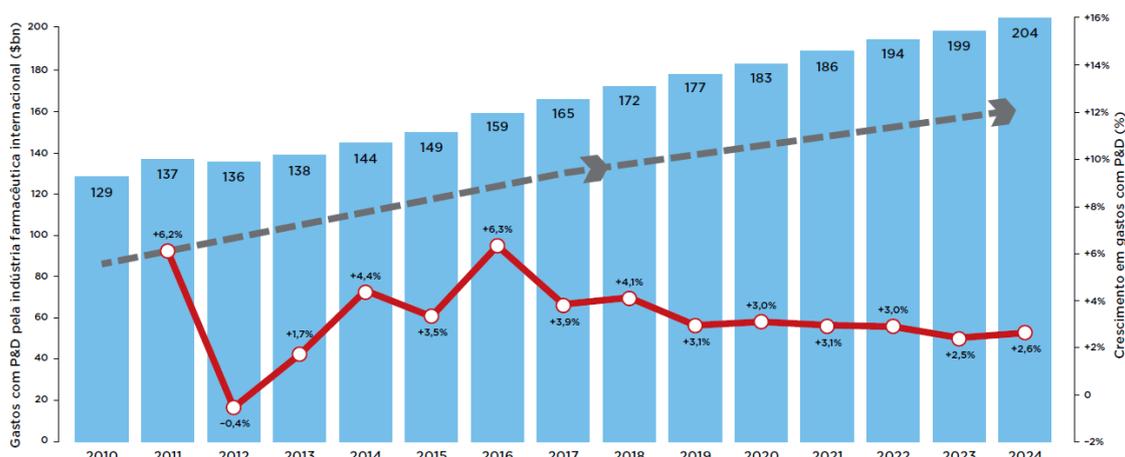
**Figura 2 - Ranking do mercado farmacêutico mundial.**

Rank	2013	Rank	2018	Rank	2023
1	Estados Unidos	1	Estados Unidos	1	Estados Unidos
2	China	2	China	2	China
3	Japão	3	Japão	3	Japão
4	Alemanha	4	Alemanha	4	Alemanha
5	França	5	França	5	<b>Brasil</b>
6	Itália	6	Itália	6	Itália
7	Reino Unido	7	<b>Brasil</b>	7	França
8	<b>Brasil</b>	8	Reino Unido	8	Reino Unido
9	Espanha	9	Espanha	9	Índia
10	Canadá	10	Canadá	10	Espanha

Fonte: Adaptado de (SINDUSFARMA, 2019).

Na área de pesquisa e desenvolvimento o setor farmacêutico ainda é um dos que mais investe no mundo. Foram dedicados US\$ 172 bilhões em 2018 – número que deve chegar a US\$ 204 bilhões em 2024 (Figura 03). Os elevados investimentos se justificam pelo risco da inovação e pela necessidade de novas terapias, uma vez que doenças crônicas e complexas estão se tornando mais frequentes com o envelhecimento da população.

**Figura 3 - Gastos com P&D pela indústria farmacêutica internacional.**



Fonte: (CARVALHAES et al., 2019)

Em 2018, o faturamento farmacêutico de seis grupos econômicos atingiu a faixa acima de 3 bilhões de reais e apenas três grupos apresentaram faturamento entre 2 e 3 bilhões de reais. O Grupo SANOFI/MEDLEY/GENZYME permaneceu o líder em faturamento, com mais de R\$ 3 bilhões de faturamento, seguido pelos grupos EMS/SIGMA/LEGRAND/NOVA QUÍMICA/GERMED e SANDOZ/NOVARTIS (Tabela 01). As três primeiras posições mantiveram-se idênticas a 2017. Destaque para os grupos Aché/Biosintética e Eurofarma/Momenta que subiram um ponto em relação a 2017 e para o total de 8 grupos nacionais entre os 20 maiores em faturamento (ANVISA, 2018).

**Quadro 1 - Ranking dos 20 grupos econômicos de maior faturamento farmacêutico.**

Ra nking	Grupo Econômico	Classifi cação
1	GRUPO SANOFI/MEDLEY/GENZYME (Internacional)	>= 3 bilhões
2	GRUPO E.M.S (E.M.S./SIGMA/LEGRAND/NOVA QUIMICA/GERMED) (Nacional)	>= 3 bilhões
3	GRUPO SANDOZ/NOVARTIS (Internacional)	>= 3 bilhões
4	GRUPO ACHÉ/BIOSINTÉTICA (Nacional)	>= 3 bilhões

<b>5</b>	GRUPO EUROFARMA/MOMENTA (Nacional)	>= 3 bilhões
<b>6</b>	GRUPO HYPERA (HYPERA/NEO QUÍMICA/BRAINFARMA/NEOLATINA/COSME D/MANTECORP) (Nacional)	>= 3 bilhões
<b>7</b>	GRUPO JOHNSON & JOHNSON/JANSSEN-CILAG (Internacional)	Entre 2 e 3 bilhões
<b>8</b>	GRUPO PFIZER/WYETH (Internacional)	Entre 2 e 3 bilhões
<b>9</b>	GRUPO MSD/SCHERING PLOUGH (Internacional)	Entre 2 e 3 bilhões
<b>10</b>	GRUPO GLAXO/STIEFEL (Internacional)	Entre 1 e 2 bilhões
<b>11</b>	GRUPO BAYER/SCHERING DO BRASIL (Internacional)	Entre 1 e 2 bilhões
<b>12</b>	GRUPO TAKEDA/MULTILAB (Internacional)	Entre 1 e 2 bilhões
<b>13</b>	GRUPO CRISTÁLIA (Nacional)	Entre 1 e 2 bilhões
<b>14</b>	GRUPO MERCK/SERONO (Internacional)	Entre 1 e 2 bilhões
<b>15</b>	GRUPO NOVO NORDISK (Internacional)	<= 1 bilhão
<b>16</b>	GRUPO CIMED/1FARMA (Nacional)	<= 1 bilhão
<b>17</b>	GRUPO FRESENIUS (Internacional)	<= 1 bilhão
<b>18</b>	GRUPO RANBAXY/SUN (Internacional)	<= 1 bilhão
<b>19</b>	GRUPO HIPOLABOR/SANVAL (Nacional)	<= 1 bilhão
<b>20</b>	GRUPO CIFARMA/MABRA (Nacional)	<= 1 bilhão

Fonte: (ANVISA, 2018)

### 3.4.2 Produção brasileira

No Brasil, o nascimento e o desenvolvimento da indústria farmacêutica estiveram consideravelmente atrelados ao Estado, que incentivou a produção de soros, vacinas e medicamentos, a fim de tratar questões de saúde pública e de promover práticas sanitárias de prevenção e de combate a doenças infectocontagiosas, como malária e febre amarela. Com a intensificação do ciclo do café, durante o século XIX e início do XX, a população brasileira teve um crescimento significativo, em razão das ondas de imigração e ampliação do processo de urbanização, que provocaram aumento no quantitativo de doenças e epidemias, causadas mormente pelas péssimas condições de higiene dos navios e cortiços da época (DUARTE *et al.*, 2015).

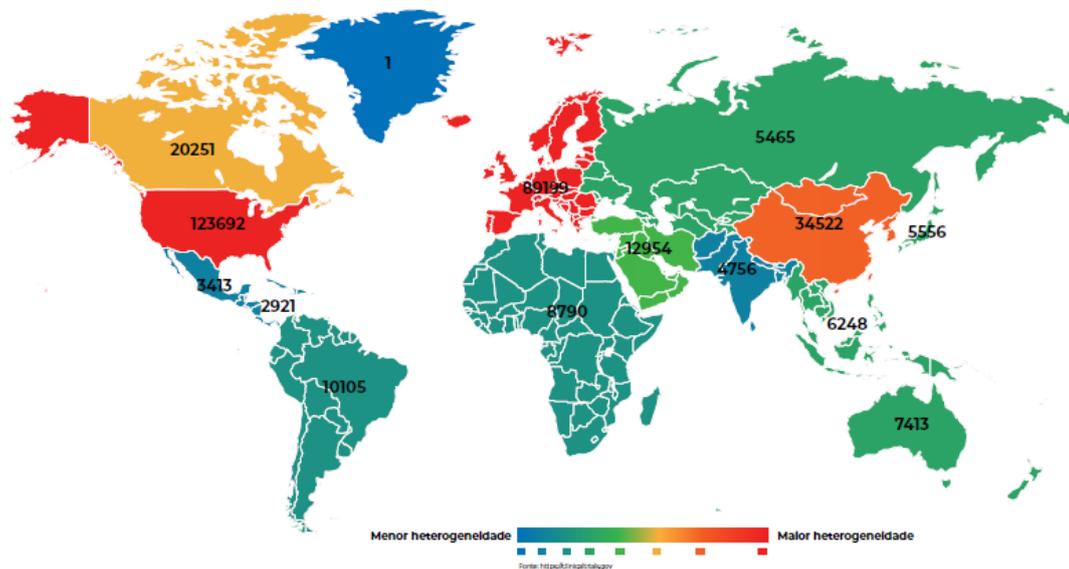
Assim esses fatores estimularam a demanda por medicamentos produzidos pela indústria farmacêutica nacional, que, aos poucos, evoluiu, surgindo duas instituições relevantes no cenário nacional responsáveis pela fabricação de produtos biológicos: i) o Instituto Butantã, que, inicialmente, produzia soro antiofídico e vacinas contra a peste e, ainda hoje, configura grande produtor de vacinas, sendo referência global na área; e ii) Instituto Manguinhos (atualmente Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz), destinado a produzir soro e vacinas para o tratamento da peste bubônica, além de pesquisas biomédicas. (DUARTE *et al.*, 2015).

Em 2019 o mercado brasileiro de medicamentos movimentou R\$ 69,04 bilhões, equivalentes a US\$ 17,50 bilhões (Canal Farmácia, valor líquido - desconto médio de 38,7%), segundo os levantamentos da consultoria IQVIA. Houve crescimento de 10,74%, em reais, em relação ao ano anterior, representando aproximadamente 2% do mercado mundial, sendo o 7º em faturamento no ranking das 20 principais economias. Na América Latina, é o principal mercado, estando à frente de México, Colômbia e Argentina (SINDUSFARMA, 2020).

Segundo dados de Carvalhaes et al. (2019), devido ao bom índice de heterogeneidade, o Brasil é um país atraente à pesquisa clínica (Figura 04). As variações de clima, cultura e condições socioeconômicas também aumentam a

atratividade do país, embora os entraves burocráticos dos processos tendam a prejudicar a inovação farmacêutica no país.

**Figura 4 - Mapa mundial de pesquisa clínica.**



Fonte: (CARVALHAES *et al.*, 2019)

Dentre os medicamentos mais vendidos no Brasil (Figura 05) o relaxante muscular Dorflex e o medicamento para tratar tromboembolismo venoso profundo Xarelto têm as vendas significativamente mais expressivas que o terceiro colocado no ranking mundial, chegando a ser 95% maior (CARVALHAES *et al.*, 2019).

**Figura 5 - Ranking dos medicamentos mais vendidos do Brasil.**

Rk	Laboratórios	MAT DEZ'2014		MAT DEZ'2015		MAT DEZ'2016		MAT DEZ'2017		MAT DEZ'2018	
		Rk	PPP								
1	DORFLEX (S.A)	1	373.255	1	416.568	1	470.304	1	506.473	1	554.422
2	XARELTO (BYP)	8	142.228	3	20.082	2	286.488	2	365.139	2	447.673
3	SAXENDA (N-N)	10.678	0	10.762	0	595	21.123	16	168.025	3	284.299
4	NEOSALDINA (TAK)	2	201.061	2	21.134	4	222.402	4	249.054	4	268.858
5	ADDERA D3 (MF+)	210	35.764	19	122.142	8	194.906	3	2.533	5	253.015
6	GLIFAGE XR (MCK)	3	175.115	5	193.876	7	202.536	8	212.387	6	246.794
7	TORSILAX (N.Q)	7	14.641	6	179.044	5	215.362	5	234.929	7	233.978
8	VICTOZA (N-N)	14	122.096	17	126.886	11	18.097	12	199.067	8	231.665
9	ANTHELIOS (LRP)	19	110.671	11	147.076	9	189.093	10	200.736	9	223.088
10	PURAN T-4 (S.A)	11	130.801	9	148.715	13	172.728	9	204.302	10	2.227
11	SELOZOK (AZN)	4	164.016	4	198.669	3	230.263	6	234.722	11	21.645
12	ARADOIS (BS2)	5	153.112	7	177.408	6	212.278	7	228.161	12	207.763
13	SAL DE ENO (GKC)	29	94.238	8	152.156	15	169.439	13	195.861	13	203.321
14	NOVALGINA (S.A)	40	83.536	31	100.888	22	123.416	21	140.788	14	200.325
15	JARDIANCE (B.I)	10.678	0	561	20.231	86	77.484	26	133.771	15	197.771
16	ALENIA (A4H)	52	75.591	30	101.573	17	134.102	20	156.161	16	179.919
17	PROLOPA (ROC)	48	774	34	99.373	20	129.614	18	157	17	174.482
18	GALVUS MET (NVR)	10	137.033	12	145.969	14	172.083	15	172.558	18	17.151
19	NINHO FASES 1+ (NES)	238	32.631	132	54.265	48	99.231	28	131.291	19	167.599
20	VENVANSE (SHI)	256	31.667	145	50.851	78	81.246	43	114.803	20	165.054

FONTE: (CARVALHAES *et al.*, 2019).

### 3.4.3 Anti-inflamatórios

A inflamação é uma resposta do sistema imunológico a uma infecção ou lesão dos tecidos. Nesse processo, há o aumento do fluxo sanguíneo para a região atingida, transportando células do sistema imunológico para combater o agente agressor. Assim, os anti-inflamatórios são medicamentos que têm a finalidade de impedir ou amenizar essa reação e minimizar sintomas comuns da inflamação, como calor e dor (VARELLA, 2019).

Os principais fármacos usados para tratar a inflamação podem ser divididos em cinco grupos principais: i) Fármacos que inibem a enzima ciclo-oxigenase (COX), por exemplo os anti-inflamatórios não esteroidais (AINE) e os coxibes; ii) Fármacos antirreumáticos, por exemplo os antirreumáticos modificadores da doença (ARMD), incluindo alguns imunossupressores; iii) Os glicocorticoides; iv) Anticiclinas e outros agentes biológicos; v) E outros fármacos que não pertencem a esses grupos, incluindo anti-histamínicos e fármacos usados para controlar a gota (RANG *et al.*, 2016).

Os anti-inflamatórios esteroides costumam ser indicados para doenças como asma e doenças inflamatórias autoimunes como o lúpus. Como também têm ação imunossupressora, também são usados em alguns casos de rinite e

conjuntivite alérgica, mas devem ser usados por períodos curtos e a retirada da medicação deve ser gradual, segundo orientação médica. Entre os medicamentos mais conhecidos desse tipo estão a cortisona e a prednisona. E os anti-inflamatórios não-esteroides em geral são mais usados para tratar problemas mais simples, como artrite reumatoide, artrose, gota, bursite, cólicas menstruais, traumas e contusões (VARELLA, 2019).

Os AINEs mais conhecidos e comercializados são o paracetamol, a dipirona, o ácido acetilsalicílico e o ibuprofeno. Estes carregam efeitos colaterais bastante parecidos, como toxicidade para as células do fígado e dos rins, gastrite e úlcera, comprometimento do fluxo sanguíneo renal. Ademais, tem-se evidenciado que o emprego destes medicamentos tem sido feito de forma irracional, causando grandes impactos na sociedade, inclusive mortes (RANG *et al.*, 2016).

A origem dos efeitos adversos observados no uso indiscriminado dessa classe de medicamento se baseia principalmente na inibição da produção de prostaglandinas. As prostaglandinas são produzidas a partir de fosfolipídios da membrana celular por uma cascata enzimática. O processo tem início com a conversão de fosfolipídios em ácido araquidônico pela enzima fosfolipase A2. O ácido araquidônico é convertido em prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos, a partir das enzimas ciclo-oxigenases, alvo dos AINEs (SILVA *et al.*, 2019).

Os efeitos colaterais importantes dos AINEs ocorrem no aparelho gastrointestinal, onde os mais comumente observados são dor abdominal, azia e diarreia. Esses efeitos colaterais resultam do bloqueio da COX-1 na mucosa gastrointestinal e na consequente inibição da produção de prostaciclina e prostaglandinas (PGE2 e PGD2) no estômago. Essas prostaglandinas servem como agentes citoprotetores da mucosa gastrointestinal; inibem a secreção ácida pelo estômago, aumentam o fluxo sanguíneo local e a secreção de muco protetor. O tratamento em longo prazo pode causar erosões e úlceras gástricas e duodenais (BATLOUNI, 2010).

Como a maioria dos fármacos anti-inflamatórios exercem inúmeros efeitos colaterais que podem restringir seu uso, uma alternativa a tais medicamentos são as plantas medicinais, que proporcionam uma importante expectativa na identificação de compostos bioativos.

A curcumina é um dos compostos ativos mais estudados, é um polifenol extraído dos rizomas da planta *Curcuma longa*, em que constatou-se que foi a planta medicinal com a maior quantidade de estudos publicados com potencial terapêutico anti-inflamatório (MARMITT *et al.*, 2015); um estudo feito a partir da ameixa-brava (*Ximenia americana L.*) foi isolado uma substância identificada como XM-Catechin, um flavonoide com atividades anti-inflamatórias em camundongos (DIAS *et al.*, 2018); e em um outro trabalho sobre a planta *Moringa oleifera* foi identificado flavonoides, alcaloides, diterpenos, taninos e clorogênicos que possuem atividades anti-inflamatórias (VELÁZQUEZ-ZAVALA *et al.*, 2016).

#### 3.4.4 Terpenos

De forma geral, os óleos essenciais são constituídos majoritariamente por terpenos ou seus derivados (Tabela 02) (FELIPE; BICAS, 2017).

**Quadro 2 - Principais constituintes de alguns óleos essenciais.**

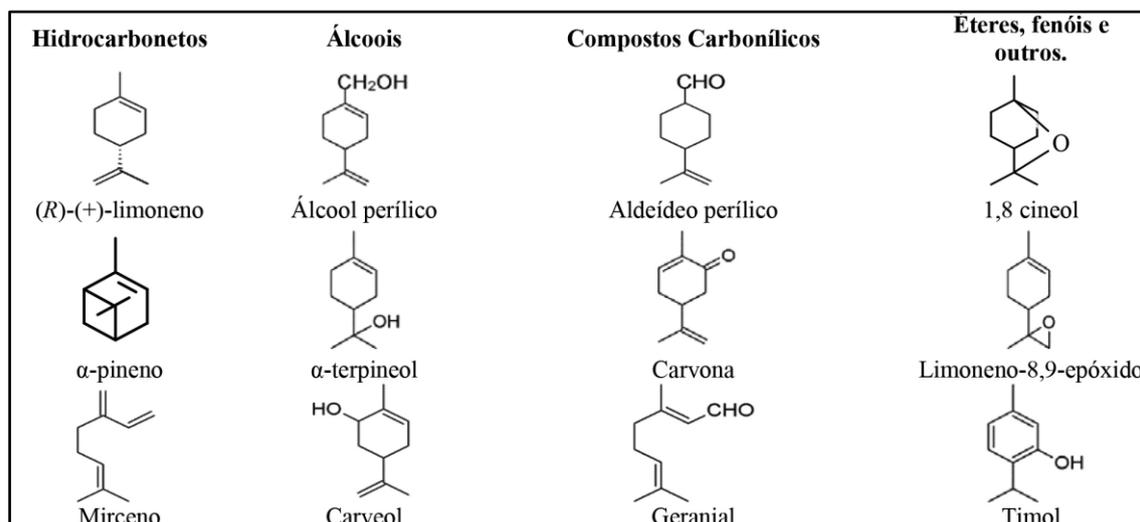
<b>Óleo essencial</b>	<b>Principais Constituintes</b>
<b>Arnicas-da-Serra</b>	Sesquiterpenos (AR-diidroturnerona, AR-curcumeno, AR-turmerol, bisabolol, cadinol, cariofileno, nerolidol, orto acetoxi bisabolol, sesquicineol).
<b>Casca de laranja</b>	Monoterpenos (limoneno, mirceno); sesquiterpenoides ( $\beta$ -sinensal, $\alpha$ -sinensal), sesquiterpeno (valenceno); monoterpenoides (decanal, linalol, neral, geranial, citronelal), outros compostos (octanal).
<b>Copaíba</b>	Sesquiterpeno: $\beta$ -cariofileno
<b>Cravo</b>	Sesquiterpenos ( $\alpha$ -humuleno, cariofileno); compostos fenólicos (eugenol, eugenil acetato).
<b>Gengibre</b>	Sesquiterpenos (zingibereno, AR-curcumeno, $\beta$ -sesquifelandreno, bisaboleno); monoterpenos (canfeno, $\beta$ -felandreno), monoterpenoide (1,8-cineol)

<b>Limão</b>	Monoterpenos (limoneno, $\beta$ -pineno, $\gamma$ -terpineno); monoterpênicos (geranial, neral, citronelal, linalol); outros compostos (neril acetato, geranil acetato, nonanal).
<b>Pimenta</b>	Monoterpeno (sabineno).
<b>Pinus</b>	Monoterpenos (pírenos, car-3-eno, limoneno, mirceno).
<b>Toranja</b>	Monoterpenos (limoneno, mirceno), monoterpênicos (decanal, linalol, citronelol, neral, geranial); sesquiterpênicos (nootkatona, $\beta$ -sinensal); outro composto (octanal).

Fonte: Adaptado de (FELIPE; BICAS, 2017).

Quimicamente, os terpenos podem ser definidos como “alcenos naturais”, isto é, apresentam uma dupla ligação carbono-carbono sendo caracterizado como um hidrocarboneto insaturado (MCMURRY, 2005). Por outro lado, se um terpeno contém oxigênio, o mesmo é denominado de terpenoide, podendo apresentar diferentes funções químicas (Figura 06), entre as quais: ácidos, álcoois, aldeídos, cetonas, éteres, fenóis ou epóxidos terpênicos (FELIPE; BICAS, 2017).

**Figura 6 - Algumas funções químicas de terpenos.**

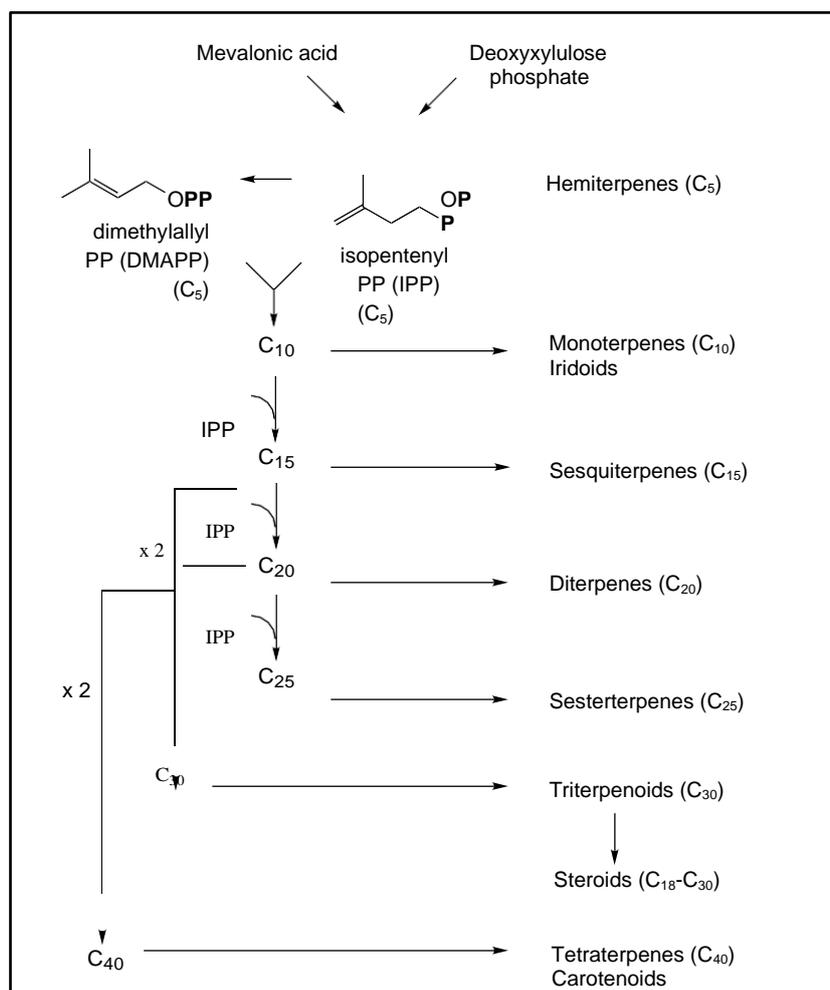


Fonte: (FELIPE; BICAS, 2017).

Os terpenos constituem a maior classe de produtos naturais, com mais de 55.000 compostos conhecidos (CHANG *et al.*, 2010). Estes produtos químicos são parte do metabolismo secundário de espécies vegetais e animais e a

derivação da sua estrutura química em unidades de isoprenos (C<sub>5</sub>), comum aos terpenos, é resultado da sua origem bioquímica, já que todos os seus carbonos são provenientes do isopentenil pirofosfato (IPP) ou de seu isômero dimetilalil pirofosfato (DMAPP), sendo caracterizado pela chamada “regra do isopreno”, que se unem através de ligações cabeça-cauda, ligação 1-4, por duas vias biossintéticas (Figura 07), via do mevalonato e via do 1-desoxilulose 5-fosfato (DXP) (DEWICK, 2002).

**Figura 7 - Vias biossintéticas dos terpenos.**



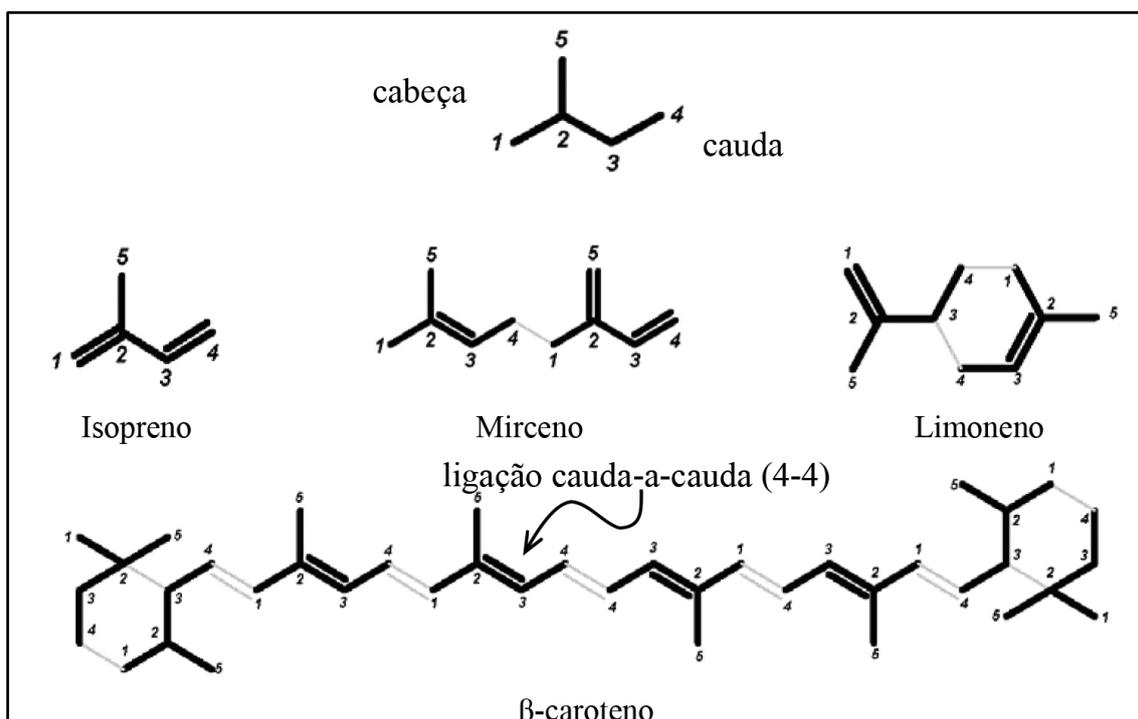
Fonte: (DEWICK, 2002)

As estruturas típicas dos terpenos contêm um esqueleto carbônico representado por (C<sub>5</sub>)<sub>n</sub>, sendo classificados de acordo com a quantidade de resíduos de isoprenos: como hemiterpenos (C<sub>5</sub>), monoterpenos (C<sub>10</sub>), sesquiterpenos (C<sub>15</sub>), diterpenos (C<sub>20</sub>), sesterterpenos (C<sub>25</sub>), triterpenos (C<sub>30</sub>), tetraterpenos (C<sub>40</sub>) e politerpenos (C<sub>>40</sub>). E Além desta classificação, os

terpenos podem ser sub-classificados em termos do grau de ciclização da molécula, ou seja, como acíclicos (moléculas abertas), monocíclicos ou bicíclicos (DEWICK, 2002).

Os chamados “terpenos irregulares” são aqueles com ligações diferentes, como por exemplo, o  $\beta$ -caroteno (Figura 08), que apresenta uma ligação “cauda-a-cauda” (ligação 4-4) e terpenos cíclicos, como o limoneno (Figura 5), também podem apresentar outras ligações (“ligações cruzadas”) (FELIPE; BICAS, 2017).

**Figura 8 - Estrutura química de terpenos e a “regra do isopreno”.**



Fonte: (FELIPE; BICAS, 2017).

Considerado o primeiro fitomedicamento genuinamente nacional, o Acheflan® é constituído por sesquiterpenos (trans-cariofileno,  $\alpha$ -humuleno, allo-aromadendreno) obtidos do óleo essencial da “erva baleeira” (*Cordia verbenacea*), os quais são detentores de propriedades analgésica e anti-inflamatória. Este medicamento, lançado pelo grupo Aché Laboratórios Farmacêuticos em junho de 2005, tem apresentado boa aceitação da classe médica e uma quota de mercado superior a 40% desde o final de 2007 (FERNANDES *et al.*, 2007; PASSOS *et al.*, 2007).

### 3.5 Segurança na utilização de fármacos para gestantes

Após o grande desastre provocado pela talidomida, iniciou-se uma grande preocupação em relação ao uso de fármacos durante a gravidez. A talidomida foi sintetizada em 1953, causando um dos mais dramáticos episódios no uso de fármacos. Foi considerado um excelente composto no tratamento dos enjoos causados pela gravidez, tornando-se rapidamente popular em diversos países. Entretanto, em 1960 foi sugerido que a talidomida estava associada com neuropatias e mais tarde descobriu-se que o uso deste medicamento durante a gestação estava causando malformações em recém-nascidos. A talidomida foi retirada do mercado em 1961, depois de somar um saldo trágico de mais de 8.000 crianças com malformação congênita em diversos países, inclusive no Brasil. Foi a partir dessa tragédia, que a comunidade científica sugeriu que fármacos deveriam ser cuidadosamente estudados antes de serem aceitos para o uso terapêutico em gestantes (LARINI, 2008).

A escolha de prescrever um fármaco para uma gestante é difícil. As alterações gravídicas no corpo da gestante influem na absorção, distribuição, metabolismo e excreção dos fármacos, podendo alterar a resposta esperada. Ainda, deve-se considerar os riscos e benefícios do uso do fármaco para a mãe e o filho, pesando-se os riscos de não tratar adequadamente a doença durante a gestação e lactação. A avaliação de risco não pode focar apenas em malformações estruturais (teratogenicidade), mas também em alterações funcionais, alterações na dinâmica da gestação (alterações no peso fetal, abortamento, prematuridade e óbito neonatal), e complicações após o parto (ARAGÃO; TOBIAS, 2019).

A dificuldade ética de se realizar ensaios clínicos com gestantes e as dúvidas quanto aos riscos para o conceito são argumentos que contrastam com a necessidade de medicar mulheres grávidas. Nesse sentido, se destaca a importância de abordagens epidemiológicas sobre a utilização de medicamentos em gestantes que possam subsidiar a prescrição dos mesmos (ANDRADE *et al.*, 2017).

Sabe-se que as substâncias farmacológicas são capazes de atravessar a placenta e atingir o feto, algumas em maior grau do que outras. No entanto, esse processo depende de alguns fatores como: propriedades físico-químicas do fármaco; velocidade e quantidade de ativo que atravessa a placenta; duração da

exposição ao fármaco; características de distribuição nos tecidos fetais, estágio do desenvolvimento gestacional, sinergismo ou antagonismo com outros fármacos simultaneamente administrados, constituição genética, suscetibilidade particular do feto, estado de nutrição e saúde da mãe (ANDRADE *et al.*, 2017; HEBERT, 2013).

Visando evitar a administração de fármacos com risco potencial e facilitar a sua prescrição durante a gestação, foram desenvolvidos diversos sistemas de classificação, baseados em dados em animais e humanos, sendo que o mais conhecido é o sistema de classificação de risco do uso de fármacos em gestantes americano (US Food and Drug Administration – FDA) (ARAGÃO; TOBIAS, 2019). E no Brasil, as regras de classificação de medicamentos seguem as mesmas cinco categorias de risco descritas pelo FDA.

**Quadro 3 - Categorias de risco farmacológico na gravidez segundo a Food and Drug Administration.**

CATEGORIAS	INTERPRETAÇÃO
<b>A</b>	Estudos controlados mostram risco ausente. Estudos bem controlados, adequados, em mulheres grávidas, não demonstram risco para o feto.
<b>B</b>	Nenhuma evidência de risco em humanos. Achados em animais mostraram risco, mas em humanos não, ou se estudos humanos adequados não foram feitos, e os achados em animais foram negativos.
<b>C</b>	Risco não pode ser excluído. Não existem estudos positivos em humanos e em animais para risco fetal ou inexistem estudos. Contudo, os benefícios potenciais justificam o risco potencial.
<b>D</b>	Evidência positiva de risco. Dados de investigação ou após liberação no mercado mostram risco para o feto. Mesmo assim, os benefícios potenciais podem sobrepujar o risco.

<b>X</b>	Contraindicado na gravidez. Estudos em animais e humanos, ou relatos de investigação ou após liberação no mercado, mostraram risco fetal que claramente é maior que os benefícios potenciais.
----------	---

Fonte: (ARAGÃO; TOBIAS, 2019)

A utilização das plantas medicinais de forma correta se faz necessária em todas as fases da vida, as mulheres no período gestacional, tanto no campo da ciência como de forma empírica necessita de cuidados especiais, devido ser uma fase que as mulheres ficam mais expostas à influência de pessoas íntimas sobre orientações de remédios caseiros sendo considerados pelos os mesmos benéficos a saúde (SANTOS *et al.*, 2016).

Por causa da restrição de medicamentos ou até mesmo por orientação médica, as mulheres tendem a escolherem produtos naturais para tratar disfunções provenientes do período gravídico, porém pode-se afirmar através de dados científicos de que dentre as plantas medicinais existem algumas espécies com potencial efeito teratogênico, embriotóxicos e abortífero (GORRIL *et al.*, 2016).

Há comprovações científicas de que várias plantas podem oferecer riscos a gestação devido estimular a motilidade uterina e proporcionar o aborto, dentre elas babosa (*Aloe ferox*), angélica (*Angelica archangelica*), arnica (*Arnica montana*), cânfora (*Cinnamomum camphora*), confrei (*Symphytum officinalis*), eucalipto (*Eucalyptus globulus*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*), gengibre (*Zingiber officinalis*) e sene (*Cassia angustifolia* e *Cassia acutifolia*) (PONTES *et al.*, 2012); o boldo é uma alternativa terapêutica contra indicada no período gestacional, pois pode ser considerada uma abortiva (Araújo *et al.*, 2016); e a arruda (*Ruta graveolens L.*) que é uma espécie na qual contém componentes tóxicos, proporcionando, também, a motilidade do útero, resultando na morte fetal (Campos *et al.*, 2016).

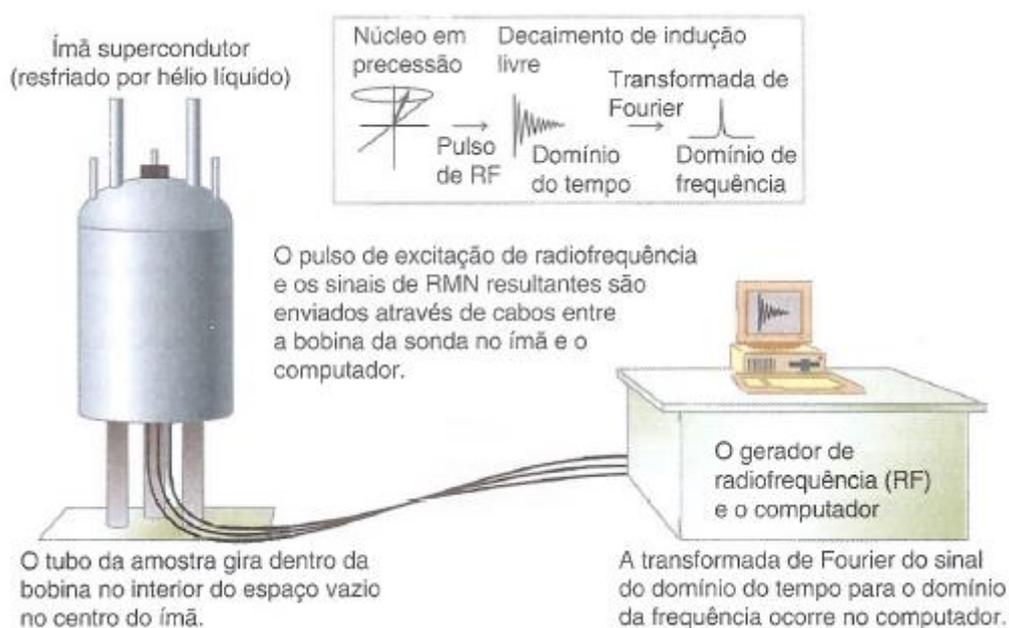
### **3.6 Método de caracterização de fármacos: RMN**

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear é de fundamental importância na área de produtos naturais, e atualmente vem sendo aplicada não apenas para a elucidação estrutural de uma substância pura, como também para

o estudo de misturas complexas, na qual vários núcleos podem ser estudados, sendo que os mais comuns são hidrogênio e carbono (PAVIA *et al.*, 2010).

O aparelho de RMN moderno é denominado espectrômetro de pulso com transformada de Fourier, e na sua maioria utiliza ímãs supercondutores que têm forças de campo magnético muito elevadas. Os ímãs supercondutores operam em um banho de hélio líquido a 4,3 graus acima do zero absoluto e têm forças de campo magnético mais de 100.000 vezes mais fortes que o campo magnético da Terra. Quanto mais forte é a força do campo magnético em um espectrômetro, mais sensível é o instrumento. O pulso de RF (radiofrequência) com curta duração é capaz de excitar todos os núcleos no mesmo momento, sobre a presença de um campo magnético constante. Os prótons absorvem frequência necessária para entrarem em ressonância, ou seja, excitar seus spins e ao retornarem ao equilíbrio produzem um sinal que é denominado de decaimento de indução livre (FID - Free Induction Decay) que corresponde a uma frequência  $\Delta E$ . Os núcleos perdem a energia que ganharam do pulso de RF, com isso, a intensidade do sinal cai. Um computador coleta todas as informações e transforma os dados de intensidade versus tempo em intensidade versus frequência, por meio da transformada de Fourier (SOLOMONS; FRYHLE, 2012).

**Figura 9 - Diagrama de um espectrômetro de RMN com Transformada de Fourier.**



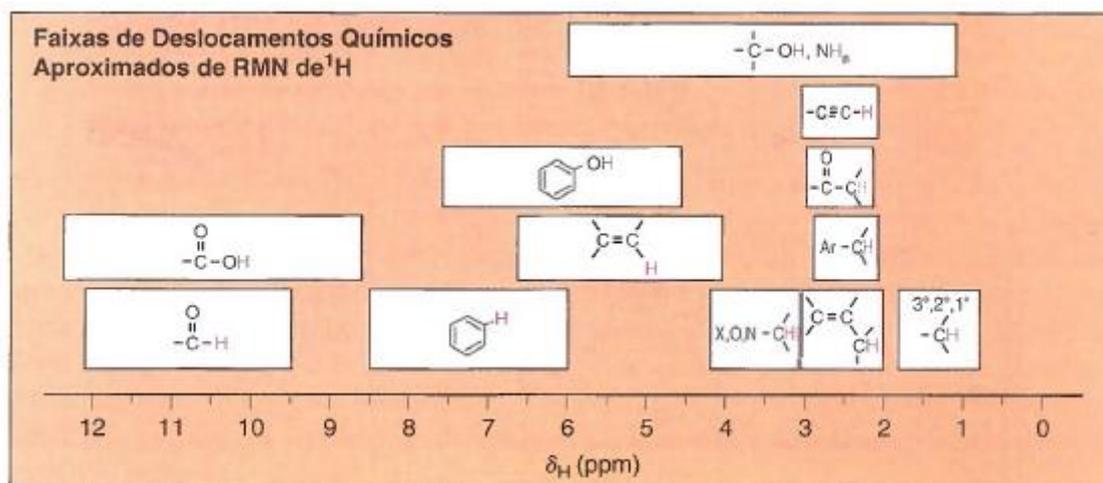
Fonte: (SOLOMONS; FRYHLE, 2012).

### 3.6.1 RMN <sup>1</sup>H

Entre os experimentos de RMN-1D utilizados destaca-se o experimento de RMN de hidrogênio (RMN-<sup>1</sup>H), que devido a facilidade (abundância natural do próton de 98%) de aquisição dos dados que duram em média 10 – 15 minutos por aquisição (em função do número de pulsos aplicados - 64, 128 e 256) e pela facilidade de digitalização dos dados para aplicação dos métodos quimiométricos (LEISS *et al.*, 2009).

A partir de quatro características do espectro de RMN de próton de uma molécula podemos obter informações valiosas (Figura 10) sobre a estrutura de qualquer molécula que seja estudada: i) O número de sinais no espectro nos diz quantos conjuntos diferentes de prótons existem na molécula; ii) A posição dos sinais no espectro ao longo do eixo x nos fala sobre o ambiente magnético de cada conjunto de prótons, que é devido, em grande parte, à densidade eletrônica neste ambiente; iii) A área sob o sinal nos diz a respeito de quantos prótons existem no conjunto que está sendo medido e; iv) A multiplicidade (ou padrão de desdobramento) de cada sinal nos diz sobre o número de prótons nos átomos adjacentes àquele conjunto, cujo sinal está sendo medido (SOLOMONS; FRYHLE, 2012).

**Figura 10 - Deslocamentos químicos aproximados de RMN <sup>1</sup>H.**



Fonte: (SOLOMONS; FRYHLE, 2012).

Tipicamente, um espectro de RMN-1H de um extrato de produto natural apresenta uma enorme quantidade de metabólitos (50 – 100 metabólitos) que ocasiona sobreposição de sinais, dificultando a identificação desses metabólitos.

O problema da sobreposição dos sinais no espectro de RMN-1H pode ser solucionado através da técnica de RMN J-resolvido 1H-1H, onde na dimensão horizontal tem-se o deslocamento químico do hidrogênio e na dimensão vertical tem-se a constante de acoplamento (J) em Hz. Este experimento é muito útil, pois soluciona os problemas de sobreposição de sinais encontrados no RMN-1H, visto que todos os sinais passam a ser “singletos” tornando-se possível assinalar os deslocamentos químicos e se obter as constantes de acoplamento, J, em Hertz (Hz) (AUE; KARHAN; ERNST, 1976; LUDWIG; VIANT, 2010).

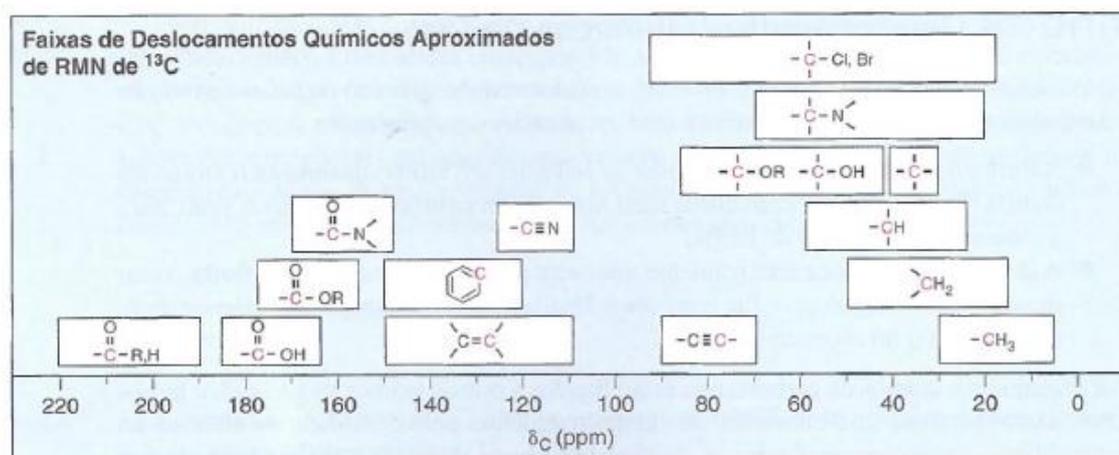
### 3.6.2 RMN $^{13}\text{C}$

O isótopo mais importante do carbono, o carbono-12 ( $^{12}\text{C}$ ), por outro lado, com uma abundância natural de cerca de 99%, não tem spin magnético líquido e, portanto, não pode produzir sinais de RMN. E embora, o  $^{13}\text{C}$  represente apenas 1,08% do carbono que ocorre naturalmente, ele é detectável por RMN, pois seu spin nuclear é  $I = \frac{1}{2}$ , assim o fato de o  $^{13}\text{C}$  produzir um sinal de RMN é de grande importância para a análise de compostos orgânicos (PAVIA *et al.*, 2010).

Os espectros de  $^{13}\text{C}$  são, geralmente, menos complexos e mais fáceis de interpretar do que os espectros de RMN de  $^1\text{H}$ . Caso seja utilizada a técnica de desacoplamento aos prótons, a interpretação dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  é muito simplificada, pois cada carbono distinto produz um único pico e os desdobramentos de sinais não são observados nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  (SOLOMONS; FRYHLE, 2012).

A maioria das ressonâncias de  $^{13}\text{C}$  está entre 0 e 220 ppm (Figura 11) deslocada da linha de referência do TMS, uma faixa muito maior que do que nos prótons  $^1\text{H}$  (0 – 12 ppm). Por causa da faixa de valores muito elevada, quase todo átomo de carbono não equivalente em uma molécula orgânica gera um pico com um deslocamento químico distinto. Picos raramente se sobrepõem, diferente do que acontece em um RMN de prótons (MCMURRY, 2005; PAVIA *et al.*, 2010).

Figura 11 - Deslocamentos químicos aproximados de RMN  $^{13}\text{C}$ .



Fonte: (SOLOMONS; FRYHLE, 2012).

Uma técnica que torna possível obter mais informações a partir de espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  é a chamada DEPT-RMN, distortionless enhancement by polarization transfer, a qual torna possível distinguir os sinais  $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}$  e carbonos quaternários. Isto é, o número de hidrogênios ligados a cada carbono na molécula pode ser determinado (PAVIA *et al.*, 2010).

Um experimento DEPT é normalmente feito em três estágios. O primeiro estágio é a varredura de um espectro comum (denominado espectro desacoplado de hidrogênio) para localizar os deslocamentos químicos de todos os carbonos presentes. O próximo estágio, um segundo espectro chamado DEPT-90 é obtido, usando-se as condições especiais sob as quais somente os sinais de carbonos  $\text{CH}$  aparecem. Os sinais de  $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2$  e os carbonos quaternários estão ausentes. Finalmente, um terceiro espectro intitulado DEPT-135 é obtido, utilizando-se as condições sob as quais as ressonâncias de  $\text{CH}_3$  e  $\text{CH}$  surgem como sinais positivos, e as ressonâncias de  $\text{CH}_2$  aparecem como sinais negativos, isto é, como picos invertidos baseados na linha base, e os carbonos quaternários estão novamente ausentes. Agrupando as informações de todos os três espectros, torna-se possível dizer o número de hidrogênios ligados a cada carbono. Os carbonos  $\text{CH}$  estão identificados no espectro DEPT-90, os carbonos  $\text{CH}_2$  estão identificados como picos negativos no espectro de DEPT-135, os carbonos  $\text{CH}$  estão identificados pela subtração dos picos  $\text{CH}$  dos picos positivos no espectro de DEPT-135 e os carbonos quaternários são

identificados pela subtração de todos os picos no espectro de DEPT-135, a partir dos picos no espectro desacoplado de hidrogênio (MCMURRY, 2005).

### 3.6.3 RMN 2D

Em um experimento unidimensional o sinal é apresentado como uma função de um único parâmetro, em geral o deslocamento químico. Em um experimento bidimensional, há dois eixos coordenados. Geralmente, esses eixos também representam faixas de deslocamento químico. O sinal é apresentado como uma função de cada uma dessas faixas de deslocamento químico. Os dados são registrados como uma grade: um eixo representa uma faixa de deslocamento químico, o segundo eixo representa a segunda faixa de deslocamento químico, e a terceira dimensão constitui a magnitude (intensidade) do sinal observado. O resultado é uma forma de curva de nível em que as linhas de contorno correspondem à intensidade do sinal (PAVIA *et al.*, 2010).

Quando o RMN 2D é aplicado ao RMN  $^1\text{H}$  ele é chamado de espectroscopia de correlação  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (em inglês  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  correlation spectroscopy, daí a abreviatura pela qual esta técnica também é conhecida: COSY). Os espectros COSY são excepcionalmente úteis para a dedução das relações de acoplamento próton-próton, e este acoplamento ocorre através de duas até três ligações (SOLOMONS; FRYHLE, 2012).

Podem também ser obtidos espectros de RMN 2D que indicam acoplamentos entre os hidrogênios e os carbonos aos quais eles estão ligados. Nesse caso ele é chamado de espectroscopia de correlação heteronuclear (em inglês, heteronuclear correlation spectroscopy, daí a abreviatura pela qual esta técnica também é conhecida: HETCOR). Há dois tipos de experimentos HETCOR bastante utilizados: o HMBC e o HSQC. O HMBC revela a correlação heteronuclear à longa distância (duas ou mais ligações), já o HSQC mostra a correlação direta entre os núcleos  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , assim é possível detectar quais carbonos estão diretamente ligados aos hidrogênios presentes numa molécula (KAISER, 2000; SOLOMONS; FRYHLE, 2012).

## 3.7 Microscopia de força atômica

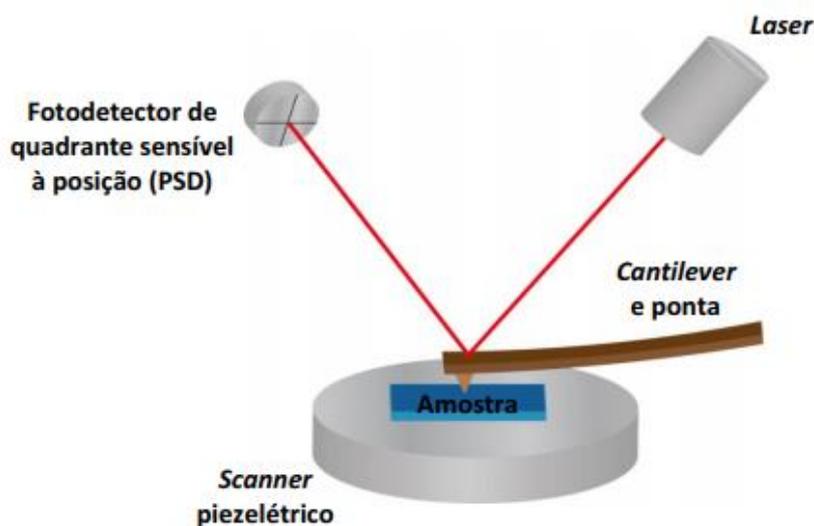
Desde sua invenção na década de 1980 por Gerd Binnig, Calvin Quate e Christoph Gerber, o AFM passou a ser usado em todos os campos das

ciências, como química, biologia, física, ciência dos materiais, nanotecnologia, astronomia e medicina, nos quais laboratórios governamentais, acadêmicos e industriais contam com AFM para entregar imagens quantitativas de alta resolução, com grande flexibilidade nas amostras que podem ser estudadas (BINNIG; QUATE; GERBER, 1986; EATON; WEST, 2010).

O AFM é bastante diferente de outros microscópios, porque não forma uma imagem focalizando luz ou elétrons em uma superfície, como um microscópio óptico ou eletrônico, a forma de construção de uma imagem por AFM é um processo físico em que uma sonda afiada toca a superfície da amostra, construindo um mapa que possibilita a medição da altura, comprimento, largura e volume da superfície da amostra (EATON; WEST, 2010).

O princípio de funcionamento do microscópio de força atômica (Figura 12) é semelhante a uma agulha de toca-discos (vinil), onde, no lugar da agulha, se encontra o cantilever, uma haste flexível em cuja parte inferior é crescida uma ponta com dimensão de 100 a 500  $\mu\text{m}$ . Para percorrer a amostra e formar uma imagem, há um sistema de posicionamento que utiliza cerâmicas piezoelétricas, em que o cantilever é capaz de realizar movimentos nas três direções (x y z), com precisão de angstroms ( $\text{\AA}$ ). Além disso, durante esta varredura, é utilizado um sistema de alinhamento, onde um feixe de laser incide sobre o cantilever e reflete em um sensor de quatro quadrantes, fornecendo informação de posição para o sistema de controle, para que haja a correção da posição do cantilever de forma a manter o contato com a amostra durante a varredura e permitir a obtenção do seu perfil topográfico (FILHO; MATTOSO, 2003).

**Figura 12 - Princípio de funcionamento do AFM.**



Fonte: (Silva, 2019)

Durante a varredura da amostra há duas forças que podem atuar variando em função da distância entre o cantilever e a amostra: forças de atração e repulsão. As forças de atração podem ter origem tanto em fatores físicos, como a capilaridade, ou químicos como a afinidade entre o cantilever e a amostra e a força de repulsão, deve-se a interação coulombiana (FILHO; MATTOSO, 2003).

Conforme as interações atrativas e repulsivas entre a ponta e a superfície da amostra define-se três modos de operação da técnica de AFM: i) modo contato: o cantilever está sempre em contato com a superfície da amostra e é mais indicado para amostras rígidas onde a varredura da agulha do cantilever não danifica a amostra; ii) modo não-contato: o cantilever oscila sobre a amostra sem tocá-la e neste caso não há contaminação da agulha, com material retirado da amostra, porém as imagens geradas apresentam menos detalhes do que aquelas obtidas utilizando os modos contato e contato intermitente; e iii) contato intermitente: também chamado de TappingMode, a agulha do cantilever oscila sobre a superfície da amostra tocando-a suavemente, mas não continuamente (Campos, 2017; Filho & Mattoso, 2003; Silva, 2019).

O AFM é uma ferramenta que tem sido amplamente utilizada para análises celulares. Comumente, as células são estudadas por microscopia óptica permitindo obter informações gerais sobre a morfologia e contagem. No AFM contudo, é possível obter informações de outras propriedades através da obtenção de imagens tridimensionais de alta resolução, como detalhes

nanoestruturais e propriedades biomecânicas, onde essas propriedades são características para deduzir o estado fisiológico ou doente de células (BOTELHO *et al.*, 2019; LEE; LIM, 2007).

## **4 METODOLOGIA**

### **4.1 Extrato aquoso de nim e moringa**

Em um bécker foi colocado 5g de folha (Nim e Moringa) e 100mL de água, levando ao banho maria até atingir a temperatura de 100°C, medida com o auxílio de um termômetro, e deixada a mistura nesta temperatura por 3min. Em seguida, a mistura foi colocada em repouso para atingir a temperatura ambiente, foi filtrada com papel filtro e o extrato obtido foi armazenado em um tubo Falcon esterilizado.

### **4.2 Ensaio de viabilidade celular utilizando MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio)**

As células, derivadas de células trofoblásticas extravilosas do primeiro trimestre da gestação, foram plaqueadas em placas de 96 poços em iguais quantidades para cada poço ( $1 \times 10^4$  células por poço) e tratadas com os extratos diluídos em meio DMEM/F12 (Meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium com mistura de nutrientes F12 - 10% de soro fetal bovino (SFB), contendo antibióticos penicilina 1 U/mL e estreptomicina 1 µg/mL) em diferentes concentrações (25%, 50%, 75% e 100%) e posteriormente cultivadas por 24h. Após esse período foi acrescentado o MTT na proporção de 5 mg/mL, que agiu por 4 horas. Depois, o sobrenadante foi descartado e foi acrescentado 150µL de DMSO. A leitura da absorbância do MTT foi medida espectrofotometricamente a 540 nm. A porcentagem da viabilidade celular foi definida em comparação aos grupos controle através do programa GraphPad Prism (BOTELHO *et al.*, 2019).

### **4.3 Experimentos de microscopia de força atômica – AFM**

No preparo das amostras para medidas de Microscopia de Força Atômica, a linhagem celular HTR-8SV/neo foi plaqueada na concentração de  $2 \times 10^5$  células/poço sob lamínulas de vidro circulares de 18 mm, em meio DMEM / F12 (Merck / Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) suplementado com 2% de soro fetal bovino (SBF) (da Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 24 h. Após adesão, as células foram submetidas ao tratamento por 24h com os extratos de Moringa e Nim (ambos na concentração de 25%), diluídos em meio DMEM / F12 suplementado com 2% de SBF . Em seguida, a solução

foi retirada e as células lavadas com (PBS) (5 min), fixadas em Glutaraldeído 0,05% (5 min), lavadas com água Miliq (5 min) e deixadas à temperatura ambiente para secagem (24 h) (BOTELHO *et al.*, 2019).

As imagens de AFM da morfologia e as medidas de elasticidade das células foram obtidas utilizando um microscópio de força atômica Multiview 1000™ (Nanonics, Israel) acoplado a um microscópio óptico BXFM (Olympus, Japão). Esta combinação permitiu o posicionamento lateral da ponta de AFM sobre a região nuclear da célula com precisão de escala sub-micrométrica. O sistema de AFM foi isolado acusticamente e mecanicamente para reduzir qualquer interferência de ruídos ambiente durante as medições. Os experimentos foram realizados usando uma ponta de varredura com um raio típico de curvatura < 10 nm em um cantilever de 125 µm de comprimento, com constante de mola de 13-77 N/m e uma frequência nominal de 200-400 kHz. A topografia celular foi imageada (256x256 pixels) no modo de contato intermitente com uma taxa de varredura de 0,3-1 Hz.

As medidas de elasticidades foram realizadas utilizando uma ponta com um raio típico de curvatura ~ 2,5 µm em um cantilever de 450 µm de comprimento, com constante de mola de 0,29 N/m e uma frequência nominal de 15 kHz. A constante de mola do cantilever foi calibrada ajustando-se o espectro de potência a um oscilador harmônico simples, e uma força de indentação máxima para o cantilever foi ajustada em 20 nN (BURNHAM *et al.*, 2002). Essas medidas foram realizadas na região nuclear das células, na qual a ponta do cantilever era movida em direção à amostra com uma velocidade constante de 5 µm/s. Cinquenta (50) curvas foram adquiridas para cada amostra, e todos os experimentos foram realizados com a mesma ponta. O modelo de Hertz foi utilizado para caracterizar as curvas de força-distância para obter a indentação elástica das células. Ajustando esse modelo aos dados, foi possível calcular o módulo de Young médio das amostras (HERTZ, 1881).

Na análise estatística, os dados foram expressos como média ± desvio padrão. Para mostrar que todos os dados são normalmente distribuídos, o teste Kolmogorov-Smirnov foi realizado e a significância estatística das diferenças no módulo de elasticidade entre os três grupos de células (controle, tratamento com *Moringa oleifera* e tratamento com *Azadirachta indica*) foi avaliada usando ANOVA e o teste *post hoc* de Tukey com 95% de nível de confiança ( $p < 0,05$ ).

#### **4.4 Experimentos de RMN**

Os extratos de Nim e Moringa foram pré-concentrados por meio de uma evaporação simples em banho maria e em seguida liofilizados para que os extratos ficassem totalmente desidratados. Então, foi pesado 50mg do extrato seco e solubilizado com 1 mL de água deuterada, em seguida a solução foi filtrada com algodão e colocada em um tubo de RMN.

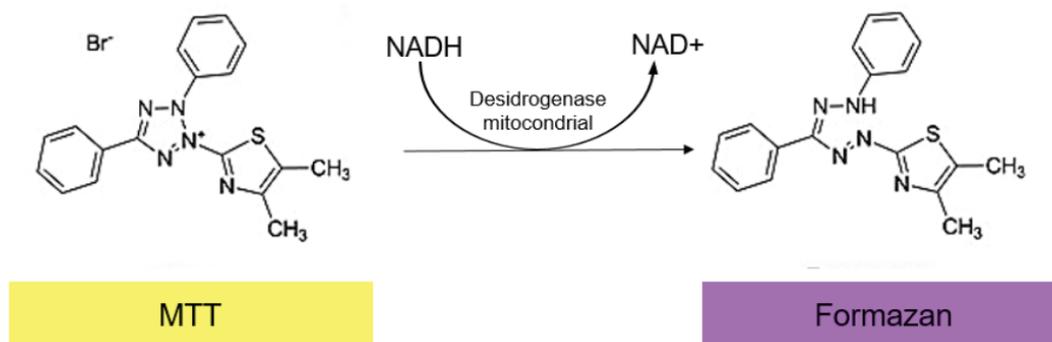
Os experimentos de RMN foram executados a 20°C em espectrômetro Bruker AVANCE operando na frequência de 600 MHz para hidrogênio. A água deuterada (D<sub>2</sub>O) foi usada como solvente para o chaveamento do campo magnético ("lock"). A sequência de impulso de pré-saturação NOESYGPPR (para supressão do sinal da água) foi usado para otimização de cada espectro de RMN-1H, que foi realizado com 128 pulsos (10 min e 26 s), o tempo de aquisição = 2,72 s, largura espectral = 16 ppm, tamanho do fid = 32K, largura de pulso (P1) de 30° (10,5 µs) e atraso de relaxamento (delay-d1) de 2 s. Os espectros foram processados com o emprego do programa TopSpin, versão 3.2, da empresa Bruker, com o emprego de processos de correção de fase e correção de linha de base.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Ensaio de viabilidade celular utilizando MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio).

Dentre os métodos de citotoxicidade de agentes químicos, o teste do MTT é um dos mais utilizados por causa da sua sensibilidade de detecção de citotóxicos. Ele quantifica o dano induzido por um agente no metabolismo celular por meio da avaliação da atividade de desidrogenases mitocondriais. Ou seja, a viabilidade mitocondrial e, conseqüentemente, a viabilidade celular, é então quantificada pela redução do sal MTT de coloração amarelada a cristais violetas de formazan, pela atividade das enzimas desidrogenases (Figura 13). Portanto, a redução do MTT a formazan, quantidade de cristais formados, é diretamente proporcional à atividade mitocondrial e ao número de células viáveis.

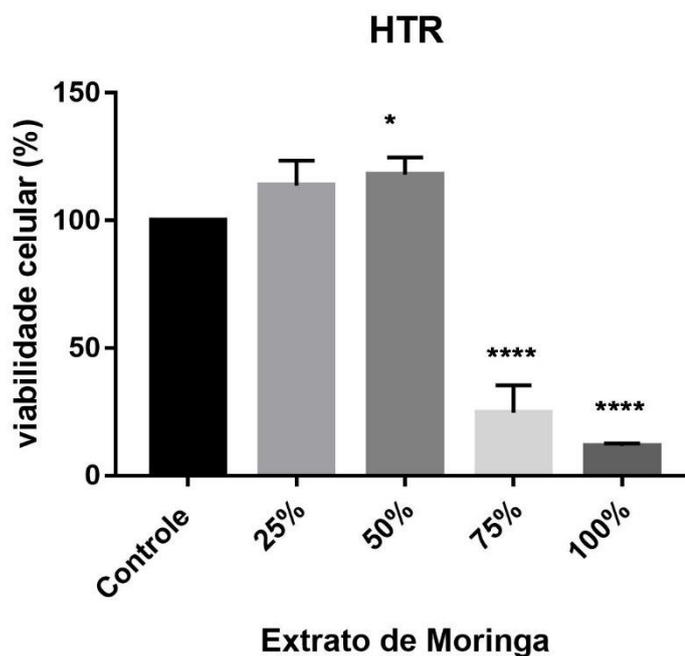
**Figura 13 - Reação de redução do MTT a formazan pela enzima desidrogenase mitocondrial.**



Fonte: (MAGALHÃES; THÁ; LEME, 2018)

Com base nas leituras de absorbâncias dos ensaios, calculam-se os percentuais de viabilidade celular para cada extrato utilizado, com diferentes concentrações, por meio do programa GraphPad Prism, como apresentado nos gráficos das Figura 14 e 15.

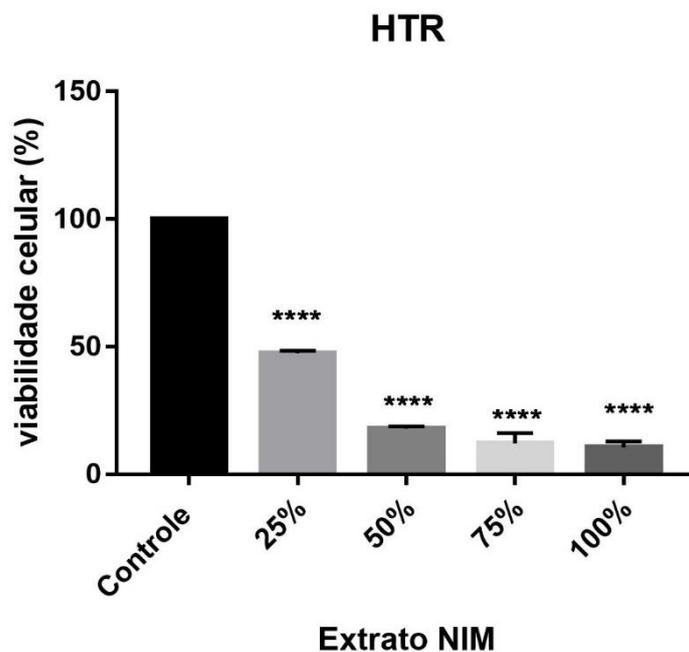
Figura 14 - Percentual de viabilidade celular do extrato de moringa.



Fonte: Autor (2020).

Para o extrato de Moringa oleífera observa-se que nas concentrações 25% e 50% (Figura 14 e 16) houve uma viabilidade celular com pouca diferença estatística (\*) em relação ao controle (apenas células e meio de cultura), porém acima de 100%, ou seja, obteve-se não só uma viabilidade celular significativa, como também crescimento celular. No entanto, em concentrações mais altas (75% e 100%), a viabilidade celular teve uma diferença estatística significativa (\*\*\*\*), decaindo abruptamente, ficando em torno de 25% das células vivas (Figura 14 e 16).

Figura 15 - Percentual de viabilidade celular do extrato de Nim.



Fonte: Autor (2020).

Para o extrato de Nim obteve-se uma diferença estatística significativa (\*\*\*\*) na viabilidade celular em relação ao controle, decaindo para em torno de 50% de células vivas na menor concentração (25%) e ao aumentar a concentração do extrato a viabilidade celular continuou diminuindo (Figura 15 e 16).

**Figura 16 - Estado das células com efeito das concentrações dos extratos de Nim indiano: a) controle, b) 25%, c) 50%, d) 75% e e) 100%; e Moringa: f) controle, g) 25%, h) 50%, i) 75% e j) 100%.**

a)



f)



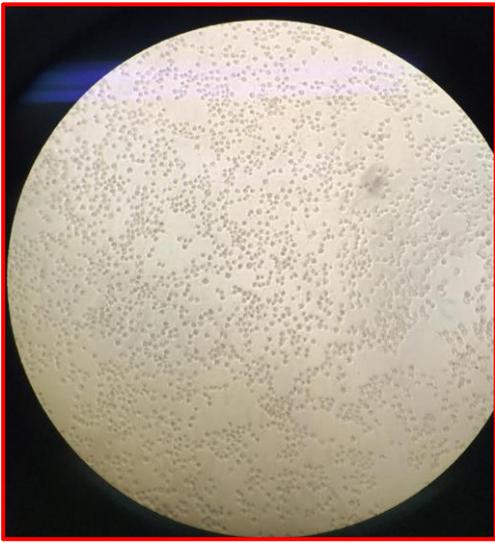
b)



g)



c)



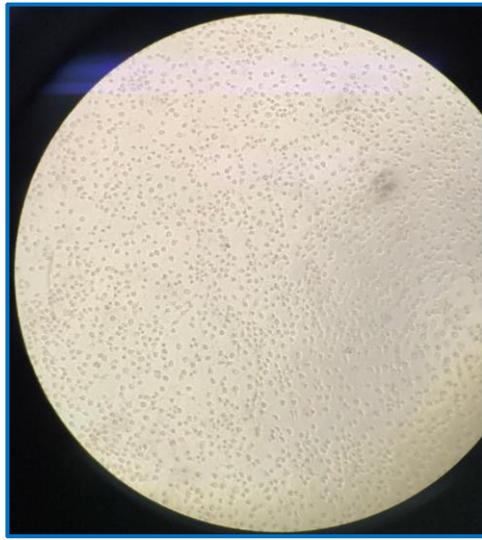
h)



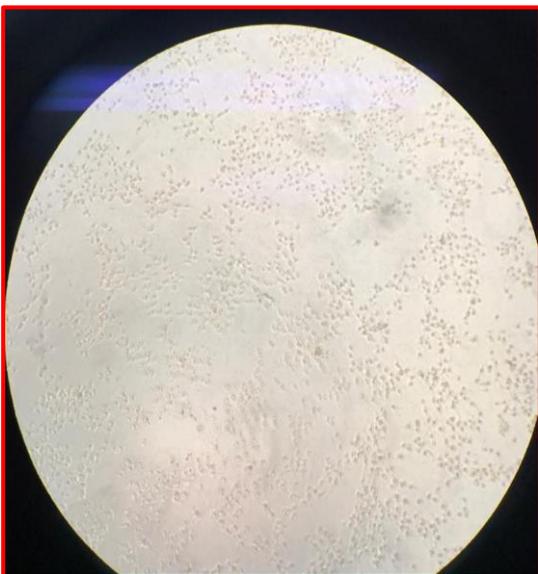
d)



i)



e)



j)



Fonte: Autora (2021).

Esse efeito negativo frente as células de placenta pode ser corroborado com estudos citados na literatura, nos quais relatam que o Nim possui efeito negativo na função reprodutiva de humanos e animais por causar um decaimento nos parâmetros seminais, como volume e concentração do ejaculado, motilidade e alterações morfológicas dos espermatozoides, ação espermicida e efeito contraceptivo.

## 5.2 Experimentos de AFM

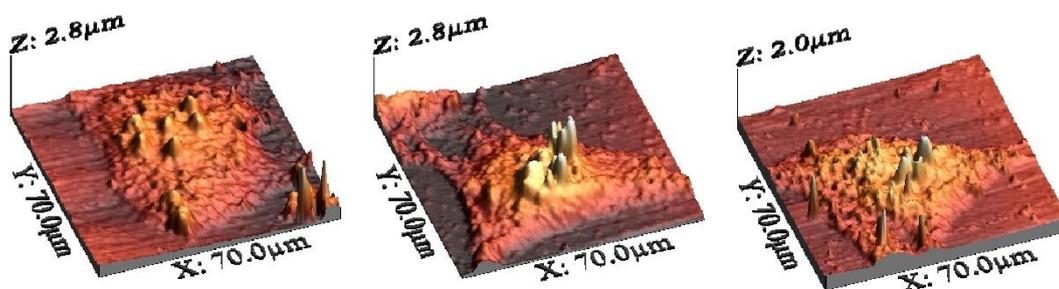
Com o objetivo de inferir a interação e a atividade anti-inflamatória entre os extratos e alterações nas superfícies das células HTR, foram conduzidas análises comparativas por AFM sobre células com e sem tratamento. Há estudos como o de Botelho et al., 2019, e o de Campos et al., 2012, em que avaliou-se as propriedades biomecânicas e funcionais das células trofoblásticas expostas a *Streptococcus* bem como os efeitos benéficos do tratamento com uvaol, e o potencial antimicrobiano da goma do cajueiro em bactérias Gram positivas.

### 5.2.1 Imagens topográficas

Após verificar se os extratos da Moringa e Nim eram capazes de modificar a viabilidade das células da linhagem HTR-8/ SVneo, a concentração de 25% de ambos foi considerada a melhor candidata para as análises de AFM. Inicialmente, o AFM foi utilizado para observar a morfologia das células e avaliar as possíveis alterações morfológicas induzidas pelos tratamentos com Moringa e Nim. Com base nas imagens obtidas, foi observado que as células sem tratamento (controle) exibiram um formato espreado com superfície bastante rugosa, morfologia fusiforme, emissões de prolongamentos citoplasmáticos extensos e nucléolos bem evidentes (Figura 17). O tratamento com Moringa promoveu alterações expressivas na morfologia, embora as células incubadas sejam fusiformes, é possível verificar uma concentração do citoplasma na região central e a conseqüente redução dos prolongamentos, dando à célula uma altura mais elevada em comparação aos perfis exibidos pelas células controle (Figura 18). Já as células tratadas com Nim exibiram um formato mais arredondado, com

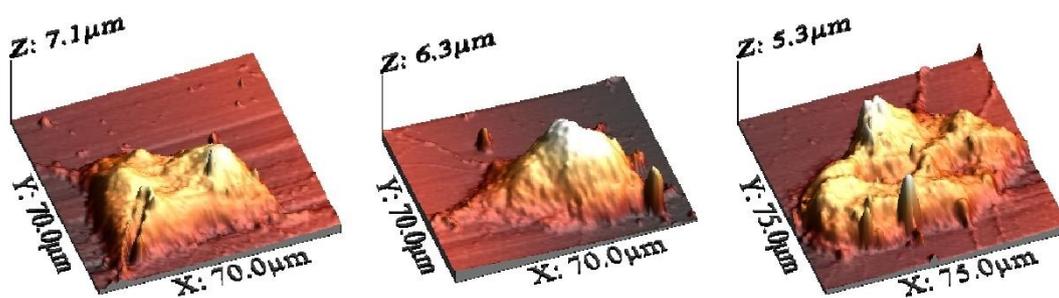
células de diâmetros bem menores e superfície pouco rugosa em comparação ao grupo controle (Figura 19).

**Figura 17 - Imagens topográficas de AFM de células da linhagem HTR sem tratamento (controle).**



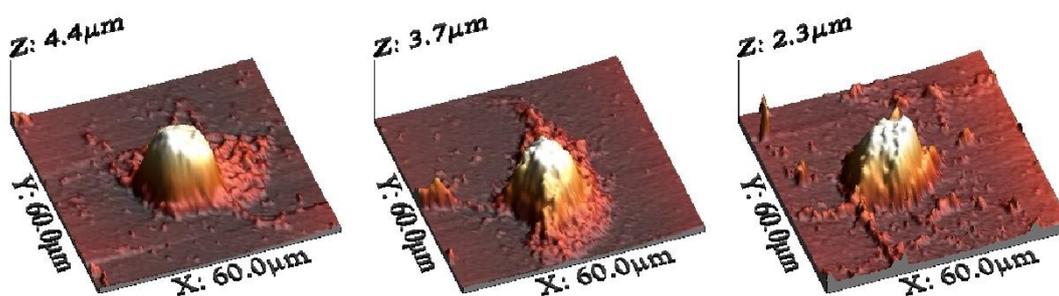
Fonte: Autora (2021).

**Figura 18 - Imagens topográficas de AFM de células da linhagem HTR tratadas com Moringa.**



Fonte: Autora (2021)

**Figura 19 - Imagens topográficas de AFM de células da linhagem HTR tratadas com Nim.**



Fonte: Autora (2021)

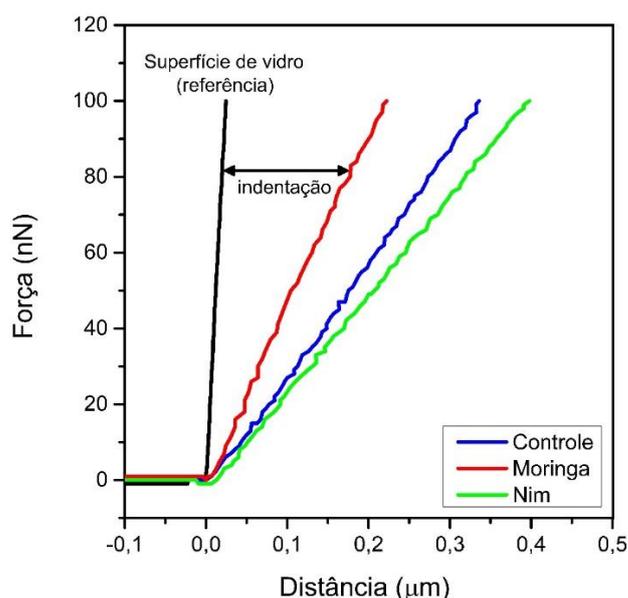
Em resumo, as células tratadas (Moringa e/ou Nim) apresentaram perfis topográficos completamente distintos em comparação às células do grupo

controle, o que indica que os tratamentos foram capazes de promover alterações significativas na morfologia das células.

### 5.2.2 Análise do módulo de young (Elasticidade)

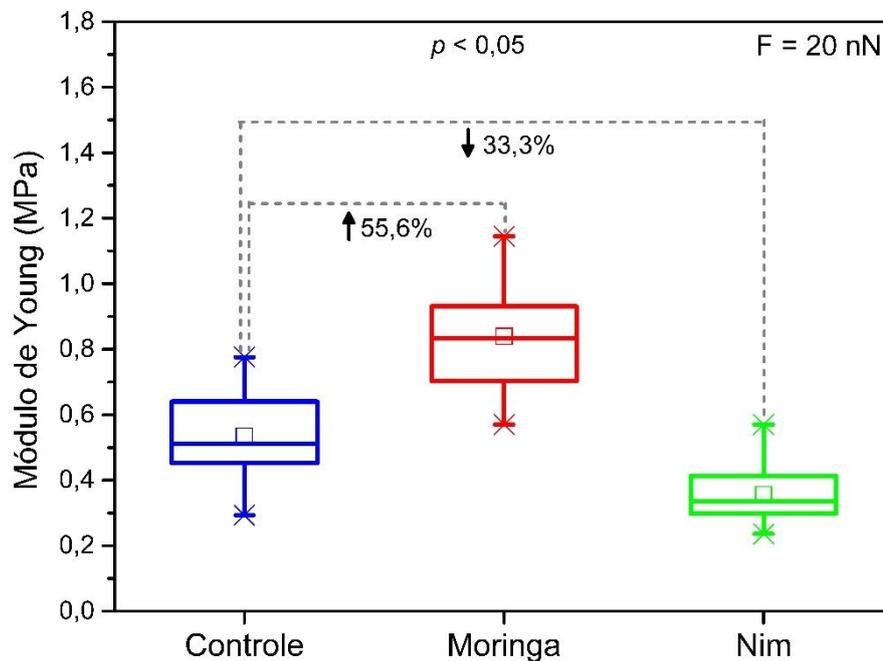
As medidas de nanoindentação AFM foram realizadas para investigar a influência dos tratamentos com Moringa e Nim no módulo de Young das células. Através dessas medidas é possível revelar características biofísicas do citoesqueleto e da membrana em nano escala. Antes da realização das indentações nas células, uma curva de força foi tomada no substrato de vidro e gravada como referência. O modelo de Hertz foi ajustado às curvas de força-distância obtidas durante o experimento (Figura 20). Como resultado, as células sem tratamento (controle) exibiram um módulo de Young médio de  $0,54 \pm 0,13$  MPa. Já as células tratadas com Moringa exibiram um módulo de Young médio de  $0,84 \pm 0,16$  MPa, revelando um aumento de 55,6% no módulo de elasticidade médio em comparação com as células controle (Figura 21). Em contraste, o grupo tratado com Nim apresentou módulo de Young médio de  $0,36 \pm 0,08$  MPa, correspondendo a uma diminuição de 33,3% no valor do módulo de elasticidade médio em comparação com as células controle (Figura 21). O tratamento com Moringa, portanto, aumentou a rigidez da membrana das células, enquanto o tratamento com Nim diminuiu essa rigidez.

**Figura 20 - Curvas de força-distância geradas com AFM.**



Fonte: Autora (2021)

**Figura 21 - Box plots dos módulos de Young das células controle e tratadas com Moringa e Nim.**



Fonte: Autora (2021)

A elasticidade é uma propriedade mecânica vital das células que fornece informações sobre a membrana celular, mas também sobre outros componentes subcelulares e da membrana, tais como organelas, citoesqueleto e o núcleo. Entre estes, há um consenso de que o citoesqueleto é crucial na determinação da elasticidade celular (VICENTE-MANZANARES; SÁNCHEZ-MADRID, 2004). Com base nos resultados obtidos, pode-se inferir que a elasticidade aumentada observada nas células tratadas com Moringa pode surgir como resultado da reorganização do citoesqueleto, pois as células dependem principalmente do citoesqueleto para manter sua morfologia e funções básicas (HUANG *et al.*, 2014).

Portanto, uma vez que o AFM é uma ferramenta que pode avaliar as modificações da membrana celular e os diferentes tipos de mortes celulares, no contexto da gestação ainda há poucos estudos na aplicação da AFM. Este trabalho utilizou a linhagem HTR-8/ SVneo, células trofoblásticas de primeiro

trimestre gestacional, a fim de entender a citotoxicidade e as possíveis modificações biofísicas dos extratos da Moringa e Nim sob este modelo.

Como as células placentárias são sensíveis a diversos estímulos, pois desempenham papéis no transporte seletivo de substâncias ao embrião e em sua proteção, é compreensível que este modelo celular seja mais susceptível a alterações após a administração de extratos naturais ou fármacos. Dessa forma, o extrato da Moringa demonstrou efeitos adversos menores às células HTR-8/SVneo, possivelmente reduzindo o seu fenótipo migratório, pois permite às células uma elevada rigidez da membrana e como consequência, há uma diminuição na emissão dos prolongamentos citoplasmáticos. Esse resultado é importante, pois o extrato da Moringa poderia ser investigado no contexto de algumas doenças placentárias, como os Distúrbios do Espectro da Placenta Acreta (Placenta Accreta Spectrum Disorder), caracterizada, entre outros fatores, pela migração exacerbada das células trofoblásticas (EINERSON *et al.*, 2020).

Já o extrato do Nim não foi interessante à aplicação biológica no contexto da gestação, pois além de modificar a morfologia e topografia das células, gerou uma menor elasticidade de sua membrana, indicando que esse grupo é mais sensível à eventos de morte celular ou efeitos deletérios provocados por patógenos. Além disso, a redução no módulo elástico pode ser comparada ao aumento da permeabilidade na membrana de células neoplásicas (HAYASHI; IWATA, 2015; LEKKA; LAIDLER, 2009).

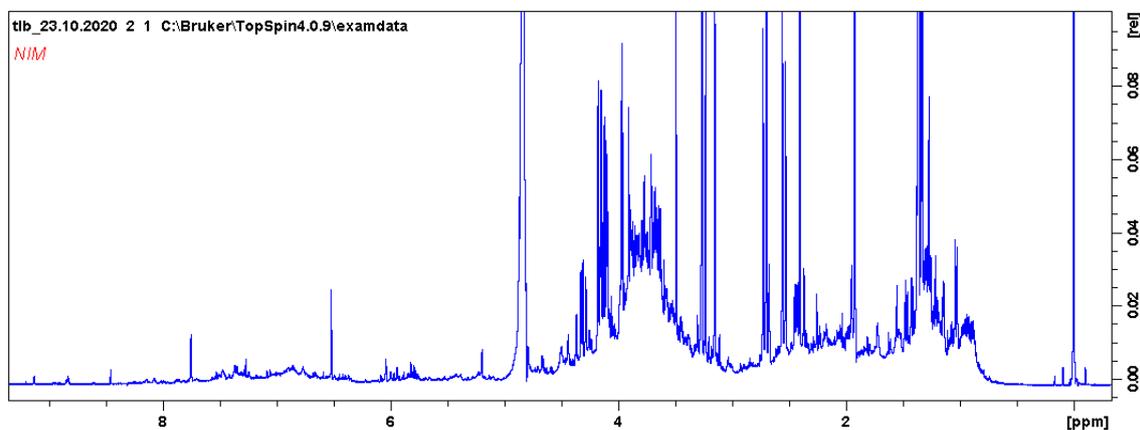
Diante disso, foi possível compreender os efeitos dos extratos sob o modelo de células placentárias do primeiro trimestre gestacional e mais estudos são necessários para avaliar o potencial dessas substâncias em outros contextos celulares e patologias.

### **5.3 Experimentos de RMN**

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  de extrato de plantas geralmente é dividido em 4 regiões características de deslocamentos químicos: aminoácidos (0.5 – 2 ppm), ácidos orgânicos (2 – 3 ppm), açúcares (3 – 5 ppm) e compostos aromáticos (6 – 8 ppm). A análise dos espectros utilizando somente o experimento de hidrogênio unidimensional é muito complexa devido à sobreposição de sinais de

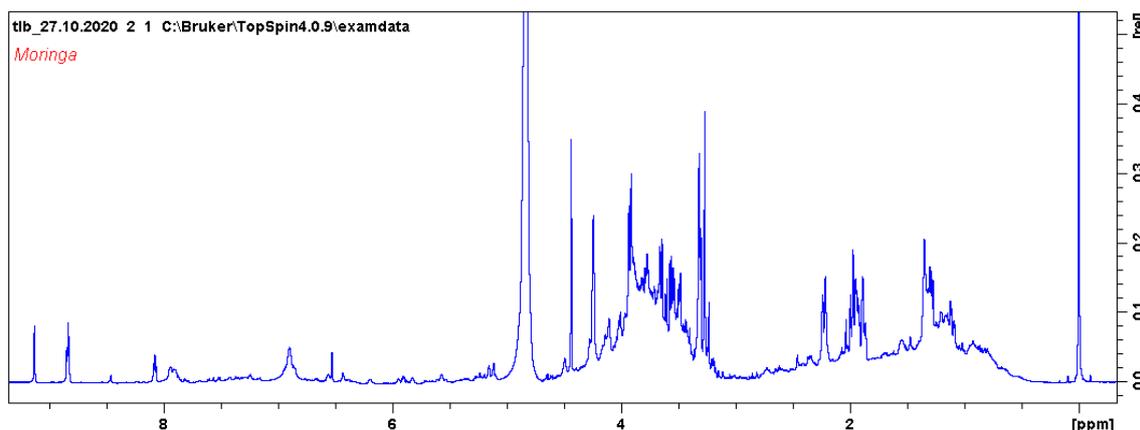
vários metabólitos, sendo difícil a identificação dos mesmos, conforme pode ser visualizado nas Figuras 22 e 23. Assim, para obter melhores dados, afim de identificar alguns compostos, foram realizados experimentos bidimensionais.

**Figura 22 - Espectro RMN 1H do extrato de Nim (*Azadirachta indica*).**



Fonte: Autora (2021)

**Figura 23 - Espectro RMN 1H do extrato de Moringa (*Moringa oleifera*).**



Fonte: Autora (2021)

A Identificação de alguns compostos (Tabela 4) foi realizada com o auxílio do programa Chenomx, os espectros de RMN 1D e 2D, e os bancos de dados HMDB (Human Metabolome Data Base) e BMRB (Biological Magnetic Resonance Data Bank).

**Quadro 4 - Compostos identificados nos extratos de *Azadirachta indica* e *Moringa Oleifera*.**

Nim ( <i>Azadirachta indica</i> )		Moringa ( <i>Moringa oleifera</i> )	
Compostos	$\delta_H$ (ppm)	Compostos	$\delta_H$ (ppm)

2- <i>Hidroxiisobutirato</i>	1.367 (s)	<i>Ácido Fórmico</i>	8.465 (s)
<i>Ácido Acético</i>	1.92 (s)	<i>Ácido Fumárico</i>	6.51 (s)
<i>Betaína</i>	3.27 e 3.91 (s)	<i>Ácido Orótico</i>	6.2 (s)
<i>Citrato</i>	2.72 e 2.55 (d)	<i>Betaína</i>	3.3 e 3.9 (s)
<i>Ácido Fórmico</i>	8.46 (s)	<i>Glicerol</i>	3.55, 3.65 e 3.78 (m)
<i>Glucarato</i> ( <i>sacarato</i> )	3.97 (t), 4.09 (dd), 4.15 (d) e 4.17 (d)	<i>Trigonelina</i>	4.4 (s), 8.1 (m), 8.8 (m) e 9.1 (s)
<i>Lactato</i>	1.32 (d) e 4.12 (m)		
<i>Succinato</i>	2.409 (s)		
<i>Dimetil Sulfona</i>	3.15 (s)		

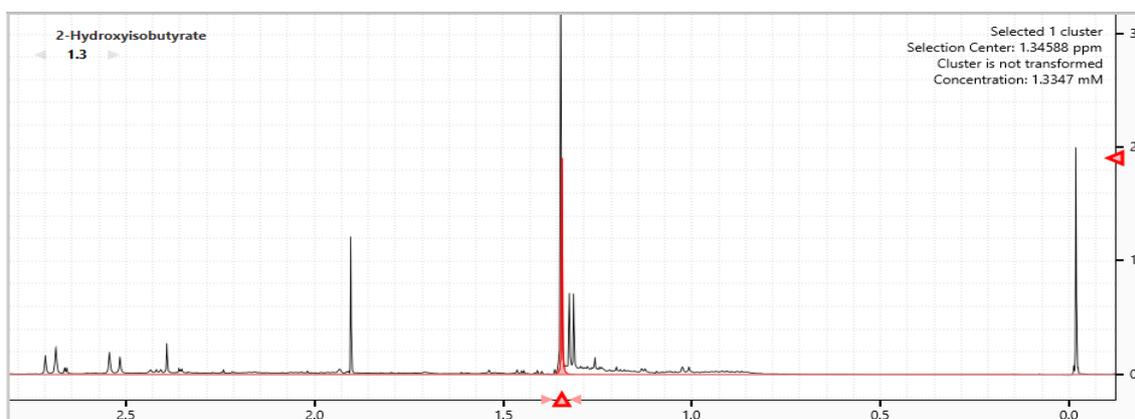
Fonte: Autora (2021)

### 5.3.1 Identificação de compostos do nim (*Azadirachta indica*)

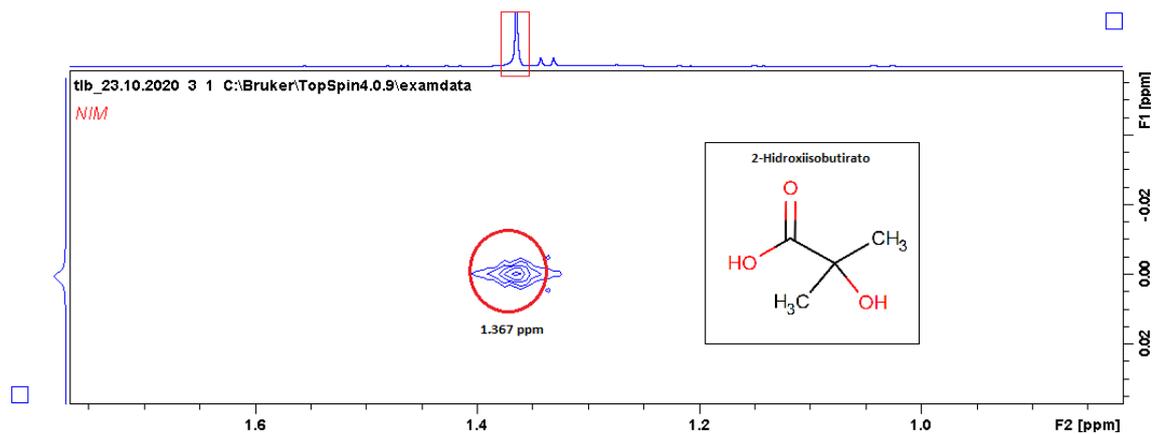
O Composto *2-Hidroxiisobutirato* foi identificado a partir do seu pico de hidrogênio singleto característico em 1.3 ppm (Figura 24a e b), pois os hidrogênios das duas metilas são simétricos e não ocorre acoplamento, e na região entre 0.7 – 1.7 ppm é onde tipicamente ocorre as absorções de hidrogênios de alcanos alifáticos por serem hidrogênios com o próton mais blindado (valores de deslocamentos químicos mais baixos, sinal em campo alto).

**Figura 24 - Identificação do 2-Hidroxiisobutirato: a) Análise RMN 1H Chenomx, b) Espectro J-resolvido, c) Espectro 13C e d) Espectro HMBC.**

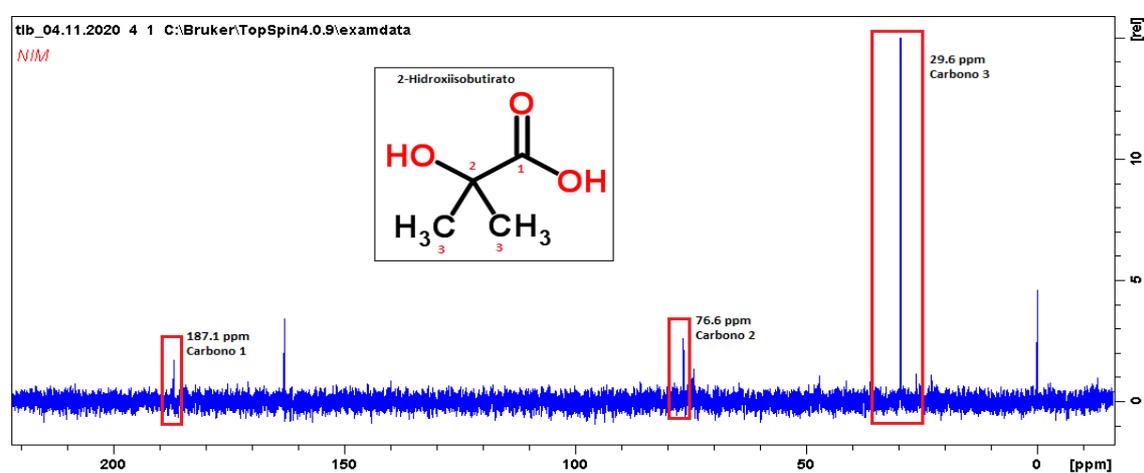
a)



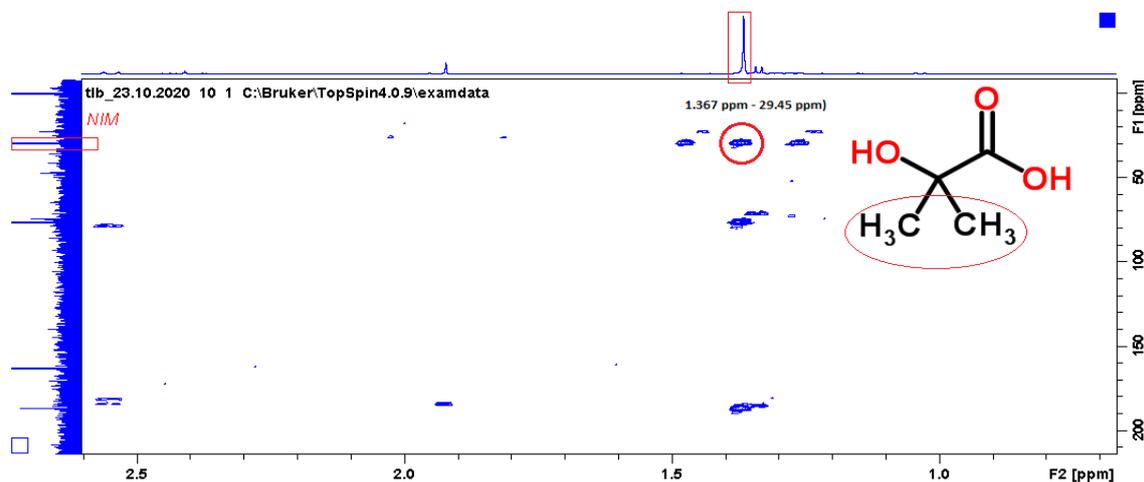
b)



c)



d)



Fonte: Autora (2021)

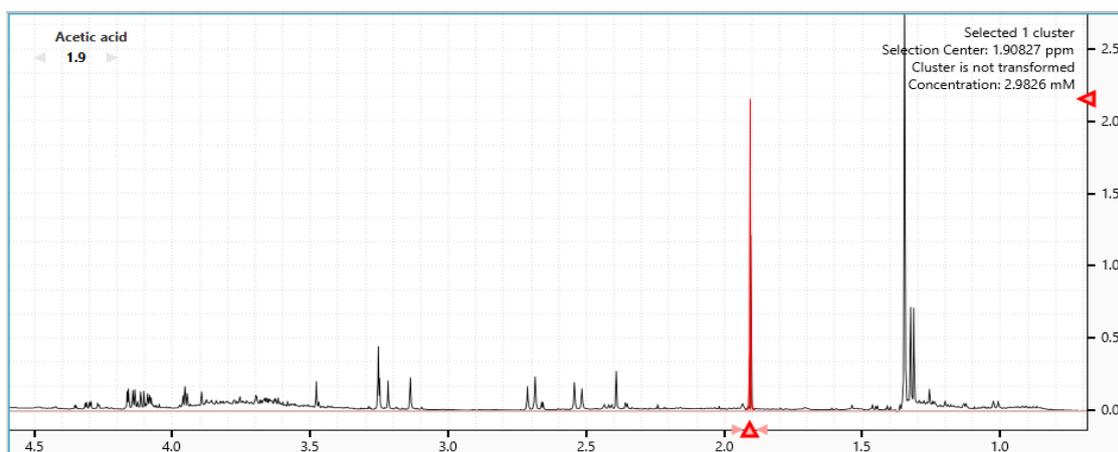
No espectro de <sup>13</sup>C (Figura 24c) o carbono 3 do grupo metila não tem grupos eletronegativos diretamente ligados a ele, logo ele apresenta um pico em 29.6 ppm, pois as alquilas primárias R-CH<sub>3</sub> aparecem numa região entre 0 – 40

ppm, o carbono 2 ligado a hidroxila apresenta um pico em 76.6 ppm, pois o oxigênio do grupo hidroxila é um átomo eletronegativo tornando o carbono mais desblindado e carbonos ligados a hidroxilas aparecem numa região entre 50 – 90 ppm, e o carbono 1 ligado a um grupo carboxílico apresenta um pico em 187 ppm, pois é um grupo ainda mais eletronegativo, desblindando ainda mais o carbono e carbonos ligados a grupos carboxílicos aparecem numa região entre 160 – 190 ppm. E com o espectro HMBC (Figura 24d) podemos ratificar o acoplamento que ocorre entre os hidrogênios em 1.36 ppm e o carbono em 29.5 ppm, referentes as metilas CH<sub>3</sub>.

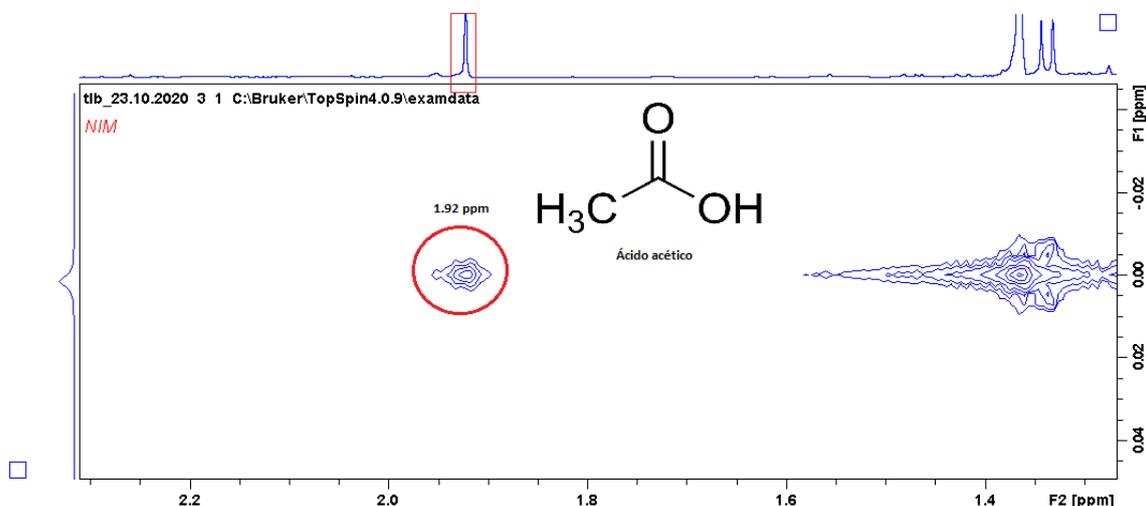
O composto *Ácido Acético* foi identificado (Figura 25) pelo seu pico de hidrogênio característico em 1.9 ppm.

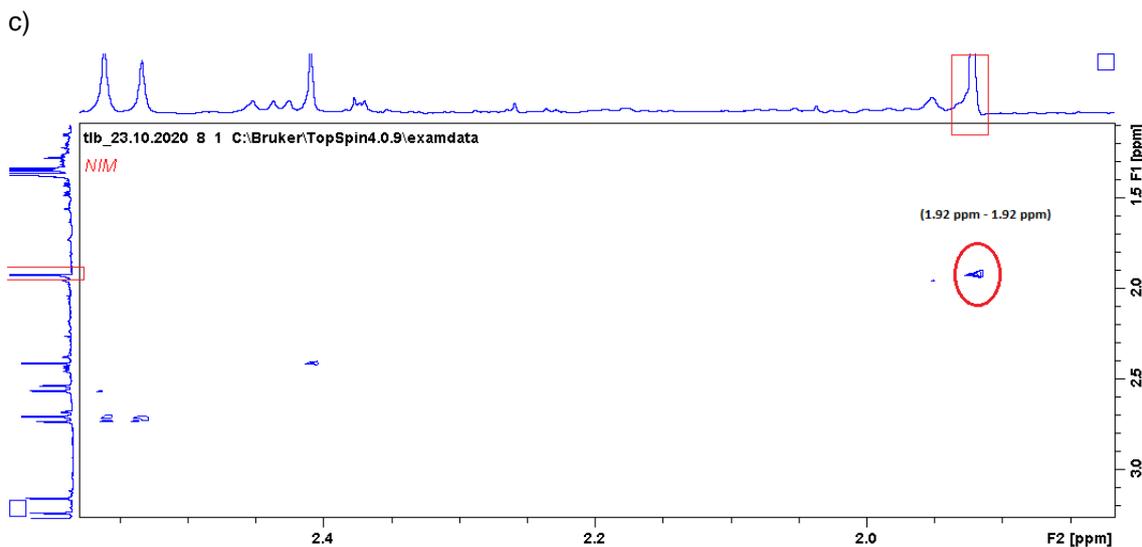
**Figura 25. Identificação do Ácido Acético: a) Análise RMN 1H Chenomx, b) Espectro J-resolvido, c) Espectro TOCSY.**

a)



b)





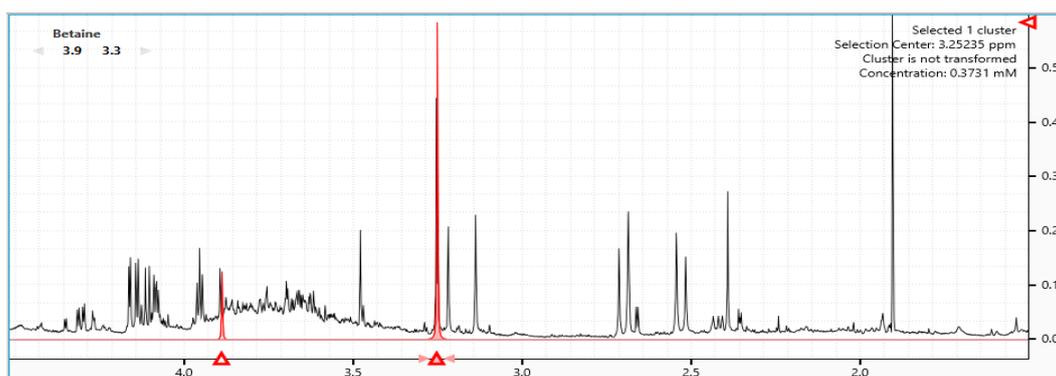
Fonte: Autora (2021)

Hidrogênios adjacentes a um grupo carboxílico aparecem na região entre 2 – 2,5 ppm, por serem levemente desblindados. Os espectros J-resolvido e TOCSY (Figura 25 b, c) nos provaram que se trata de um singlete, pois os hidrogênios da metila não acoplam com nenhum outro.

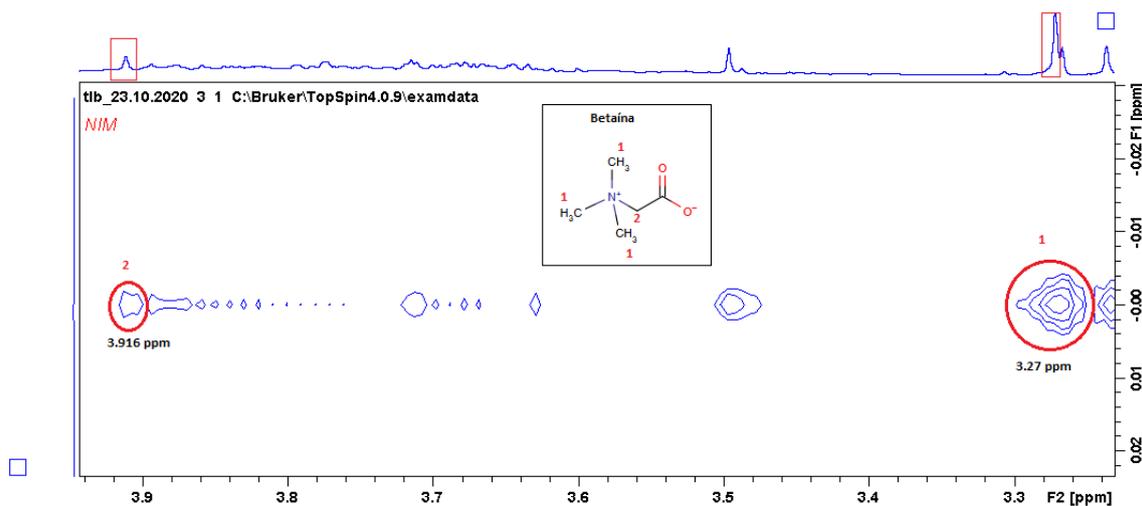
O composto *Betaína* (Figura 26) foi identificado por seus picos de hidrogênios característicos em 3.27 e 3.91 ppm. Hidrogênios de carbonos ligados a um átomo de Nitrogênio geralmente aparecem na região de 2,2 – 2,9 ppm, porém como essa molécula possui também um grupo carboxílico ligado a esses hidrogênios, então seus picos sofreram ainda mais desblindagem, sendo encontrados numa região entre 3,0 – 4,0 ppm.

**Figura 26. Identificação da Betaína: a) Análise RMN 1H Chenomx, b) Espectro J-resolvido, c) Espectro TOCSY.**

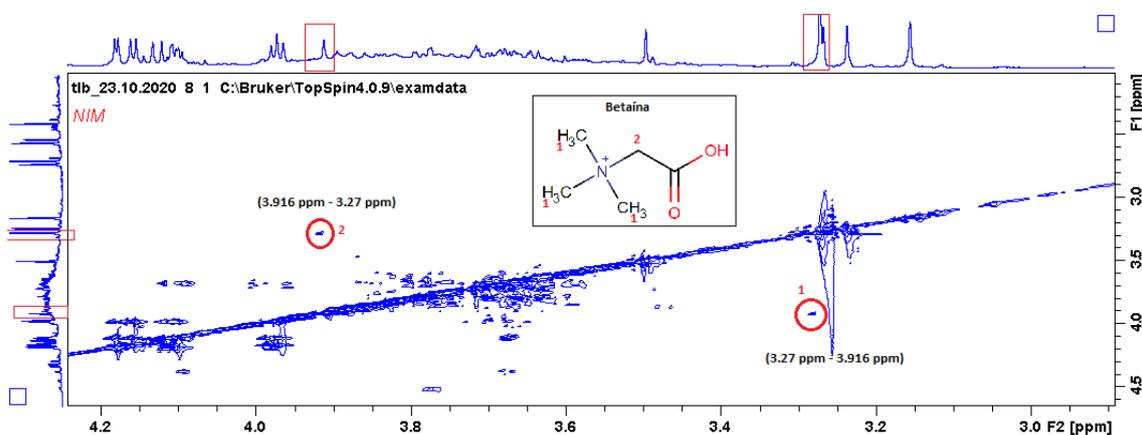
a)



b)



c)



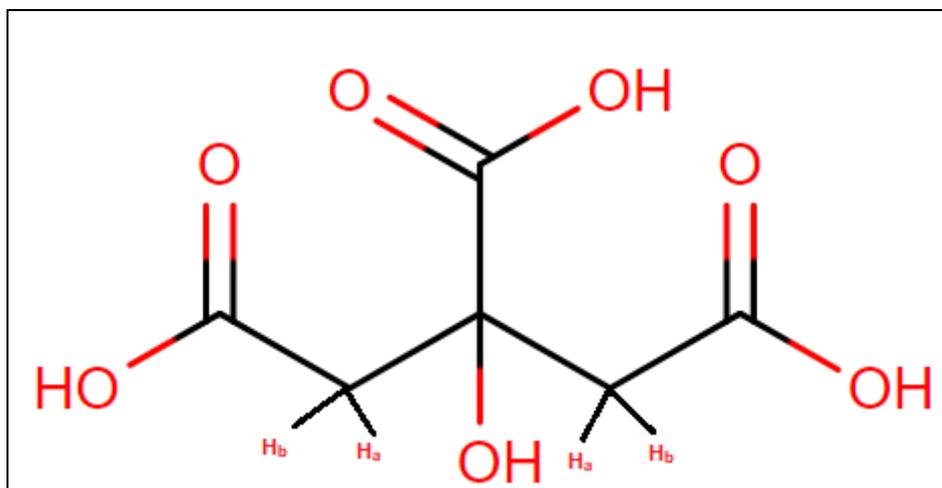
Fonte: Autora (2021).

Com o espectro de J-resolvido podemos observar que os dois picos são singletos, pois não acoplam com nenhum outro hidrogênio, porém com o espectro de TOCSY consegue-se observar um acoplamento entre esses dois sinais pois o TOCSY nos mostra também acoplamentos que ocorrem com mais de três ligações.

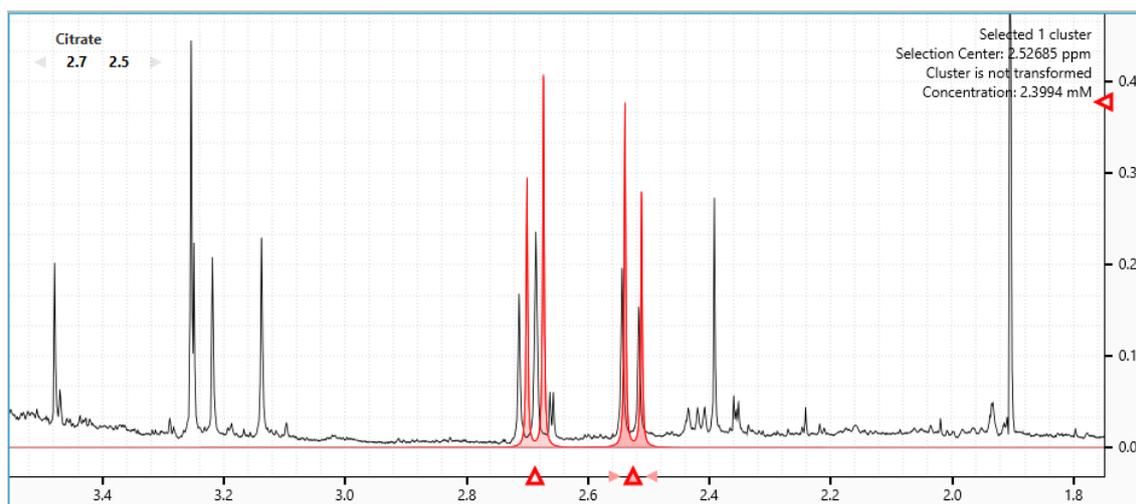
O composto *Citrato* (Figura 27) foi identificado por seus picos de hidrogênios característicos em 2.55 e 2.72 ppm.

Figura 27. Identificação do Citrato: a) Distinção dos hidrogênios a e b causado pelo efeito anisotrópico, b) Análise RMN 1H Chenomx, c) Espectro J-resolvido, d) Espectro TOCSY, e) Espectro COSY, f) Espectro HSQC.

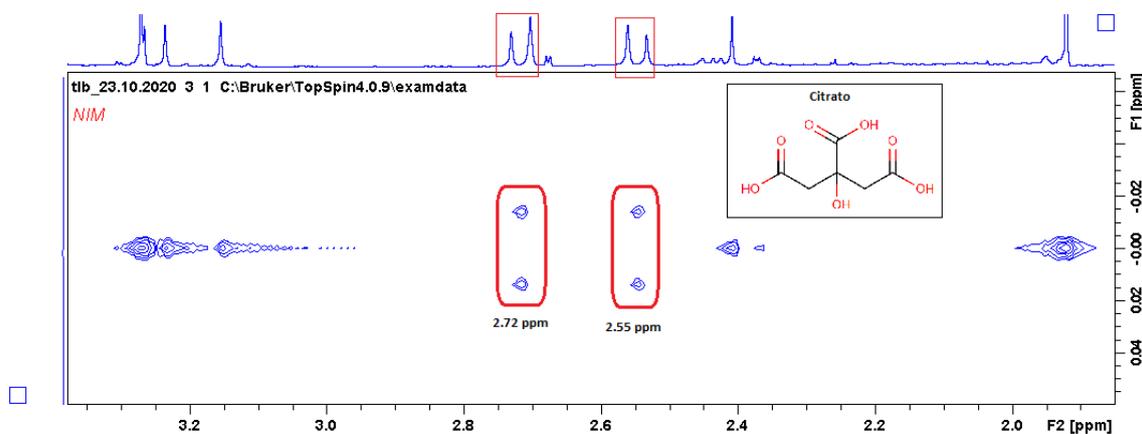
a)



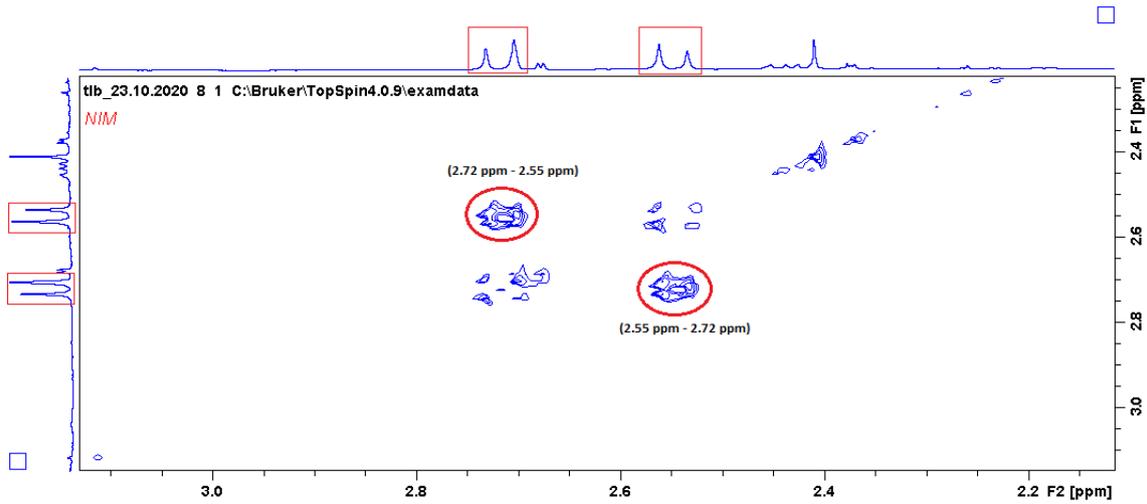
b)



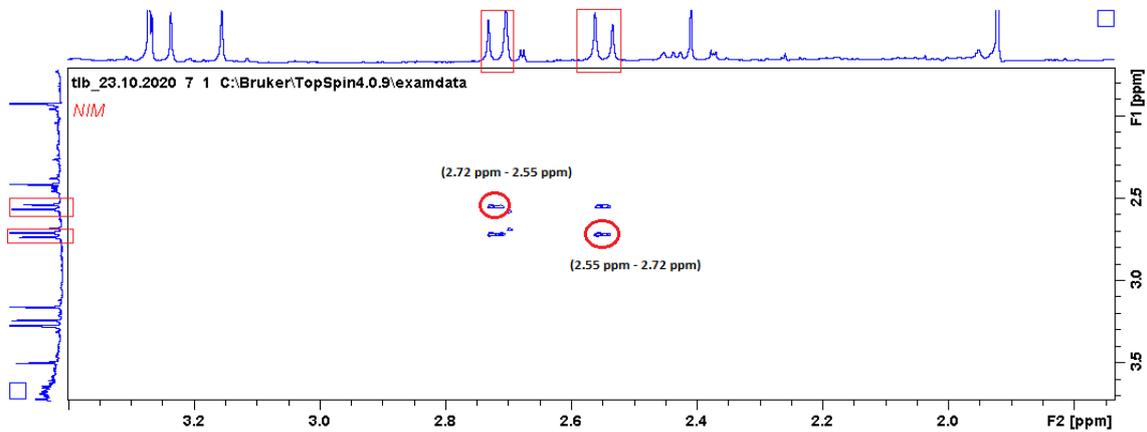
c)



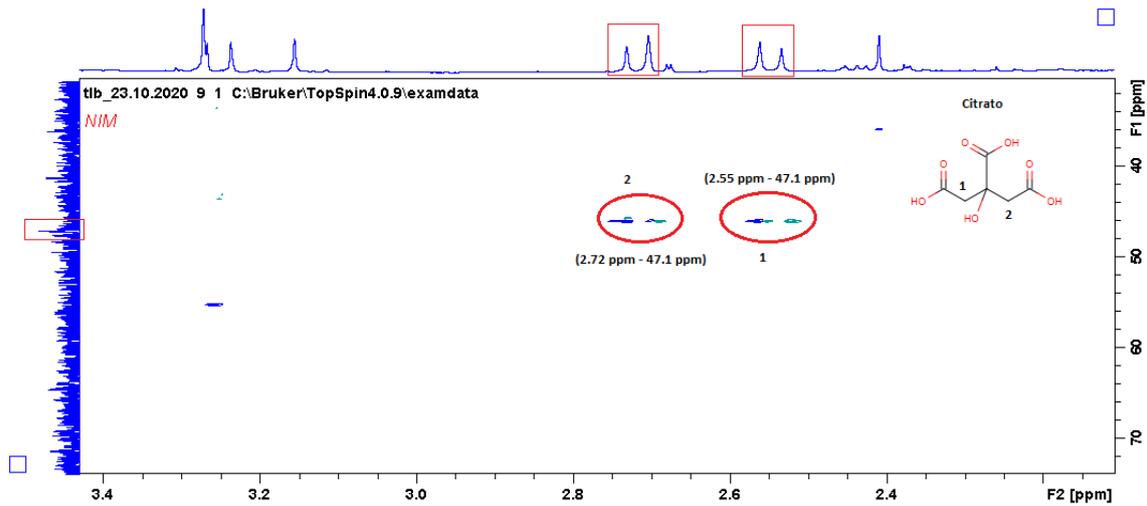
d)



e)



f)



Fonte: Autora (2021)

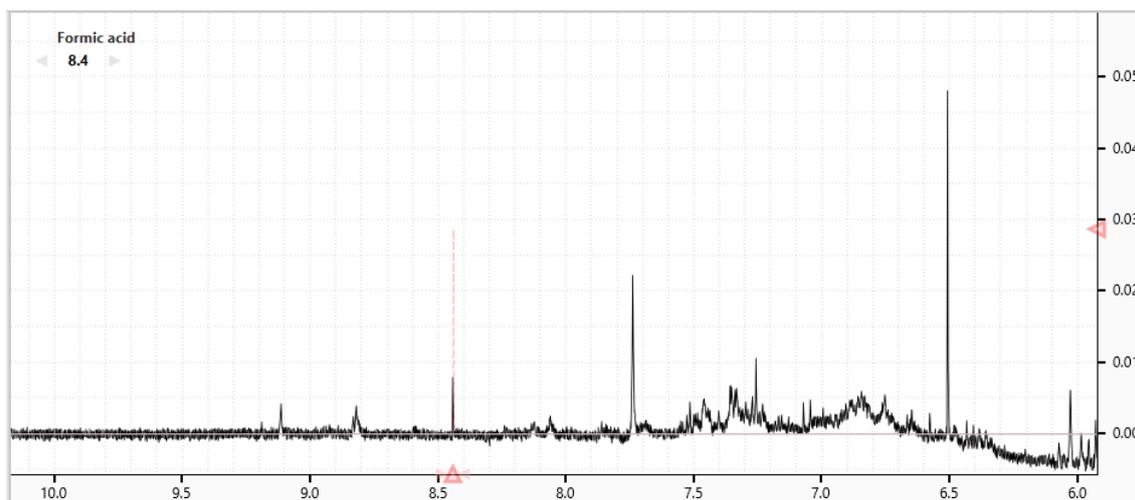
Os hidrogênios adjacentes a um grupo carboxílico geralmente aparecem na região entre 2 – 2,5 ppm, por serem levemente desblindados. Essa molécula

(Figura 27.a) possui um comportamento específico em seu desdobramento de sinais devido ao efeito anisotrópico gerado pelas ligações  $\pi$  das carbonilas, que blindam um dos hidrogênios do  $\text{CH}_2$  fazendo com que haja ambientes químicos diferentes, onde o hidrogênio “b” é mais blindado mesmo estando ligados ao mesmo carbono, e assim o hidrogênio “a” acopla com o “b” e vice-versa, gerando dois dupletos, ao invés de um singlete.

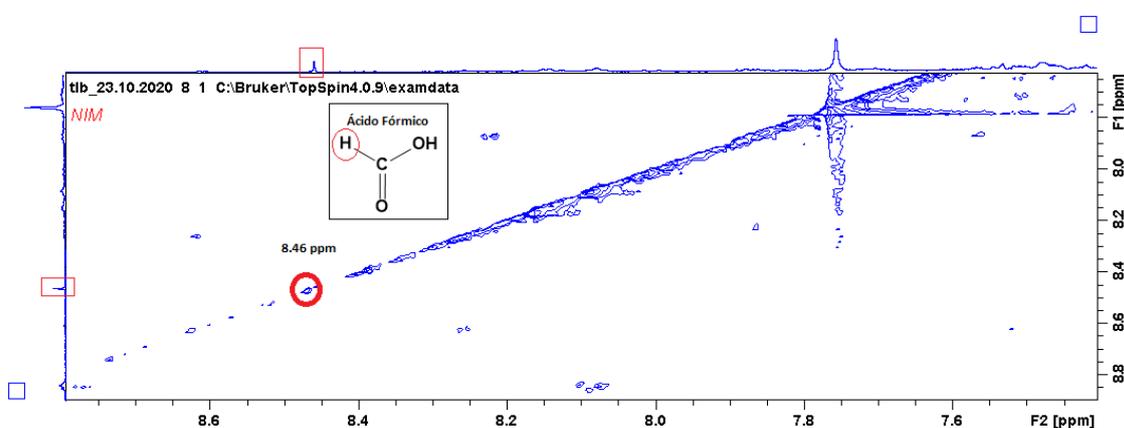
O composto *Ácido Fórmico* foi identificado (Figura 28) por seu pico de hidrogênio característico em 8.46 ppm referente ao hidrogênio ligado a um grupo carboxílico e apresenta um sinal singlete por não possuir acoplamento com outro hidrogênio.

**Figura 28. Identificação do Ácido Fórmico: a) Análise RMN 1H Chenomx, b) Espectro TOCSY.**

a)



b)

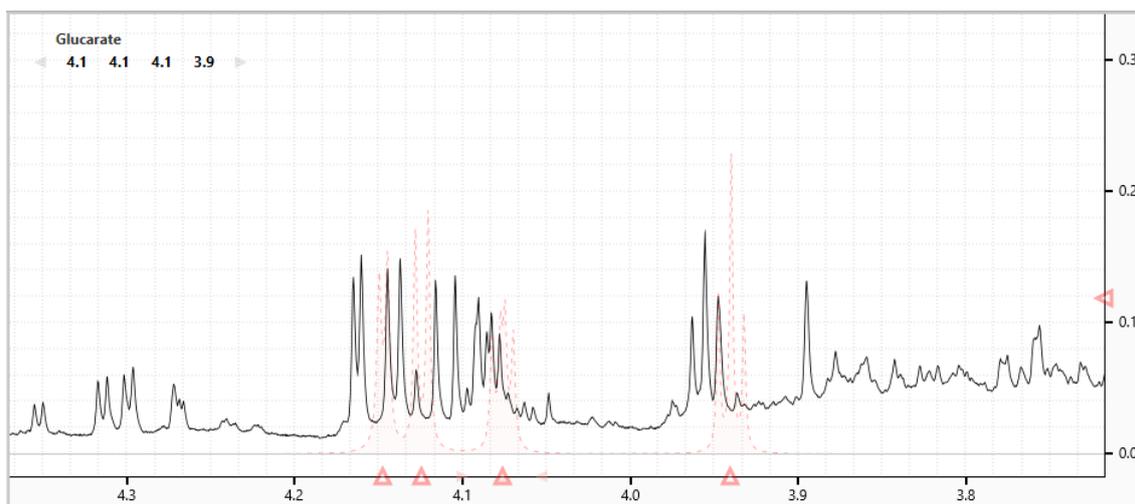


Fonte: Autora (2021)

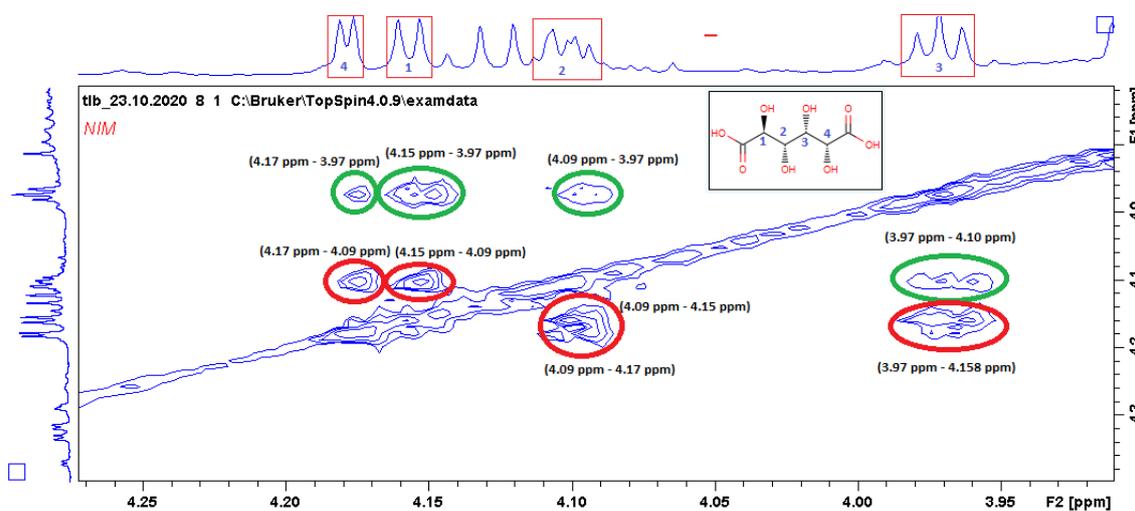
O composto *Glucarato* foi identificado (Figura 29) por seus picos de hidrogênios característicos em 3.97, 4.09, 4.15 e 4.17 ppm.

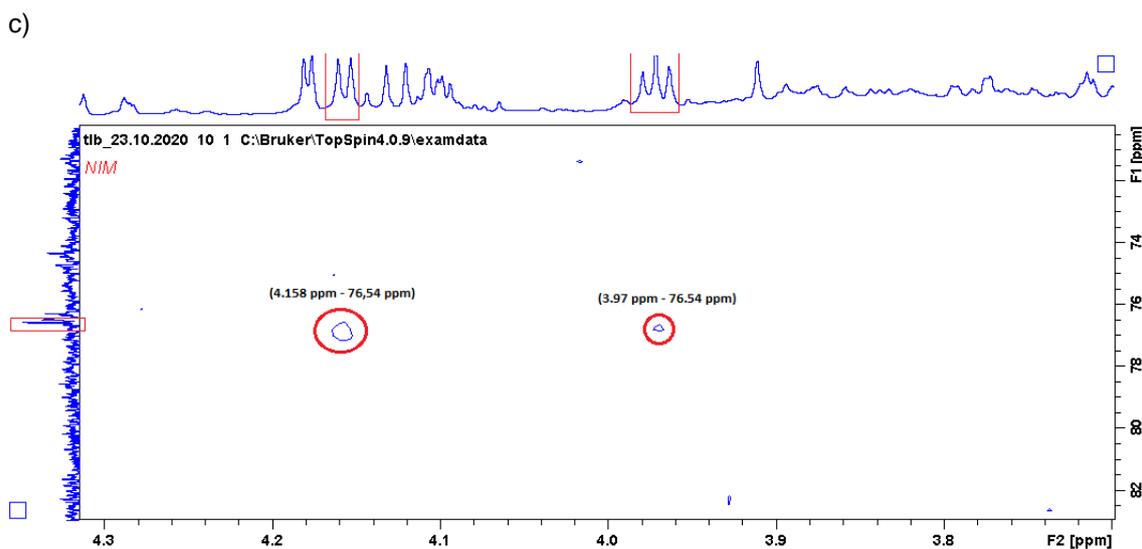
**Figura 29. Identificação do Glucarato: a) Análise RMN 1H Chenomx, b) Espectro TOCSY, c) Espectro HMBC.**

a)



b)





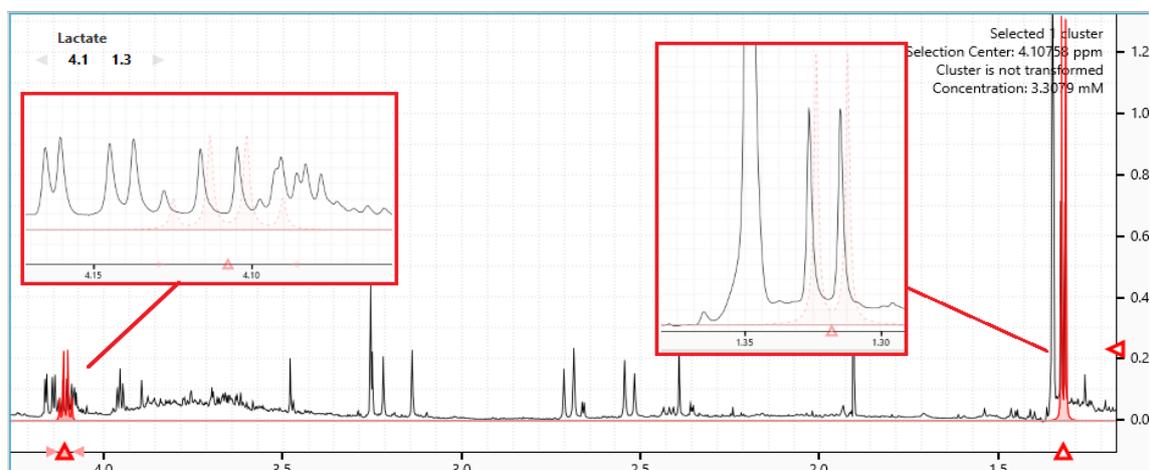
Fonte: Autora (2021).

Os hidrogênios ligados à grupos alcóolicos geralmente aparecem na região de 3,2 – 3,8 ppm, assim pode-se observar que os hidrogênios dos carbonos 2 e 3 aparecem nessa região enquanto que os hidrogênios dos carbonos 1 e 4 aparecem mais desblindados porque estão ligados a grupos carboxílicos também.

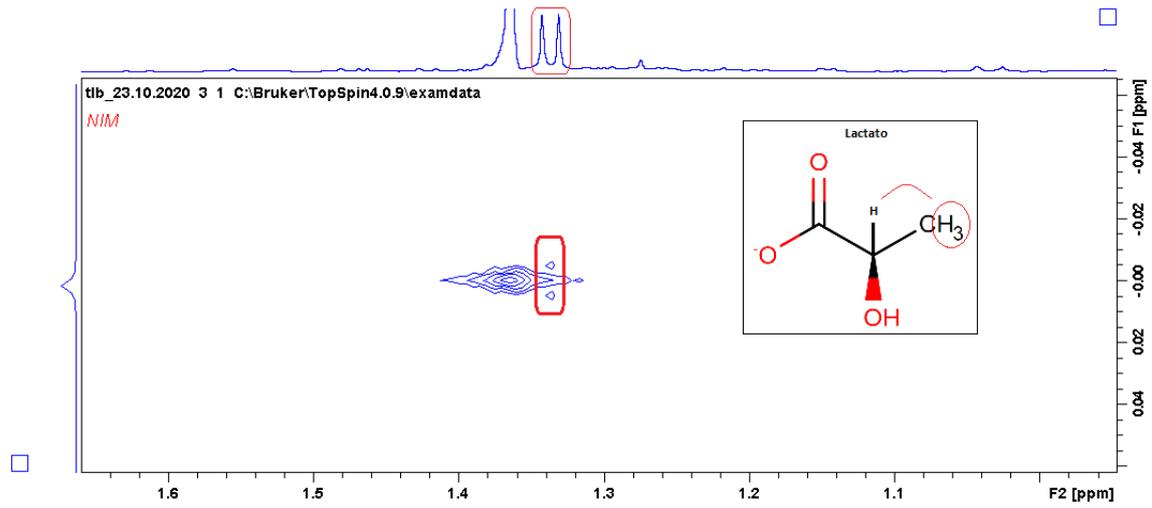
O composto *Lactato* foi identificado (Figura 30) por seus picos de hidrogênios característicos em 1.32 e 4.12 ppm.

**Figura 30. Identificação do Lactato: a) Análise RMN 1H Chenomx, b) Espectro J-resolvido, c) Espectro TOCSY, d) Espectro HMBC.**

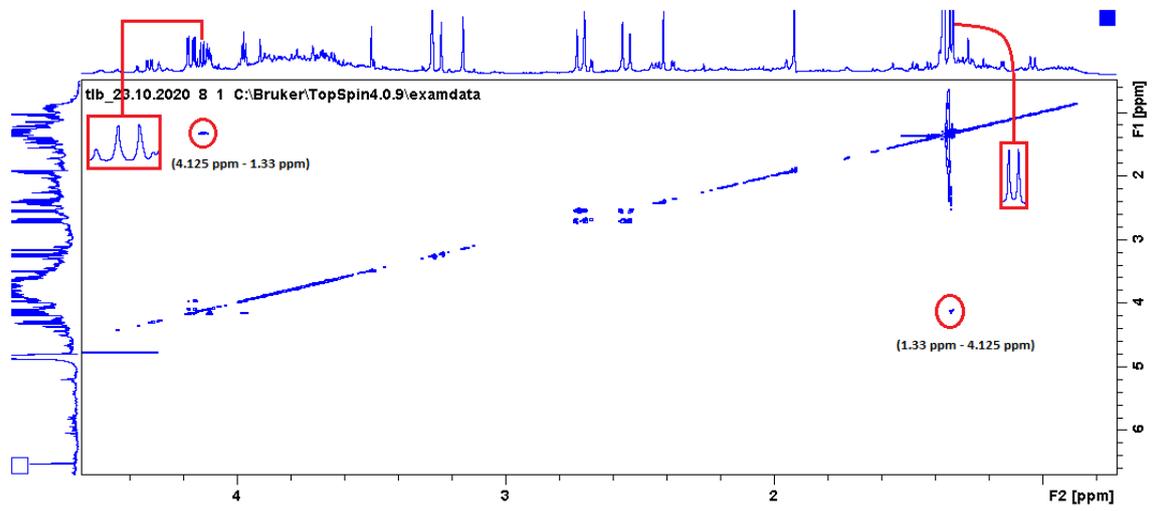
a)



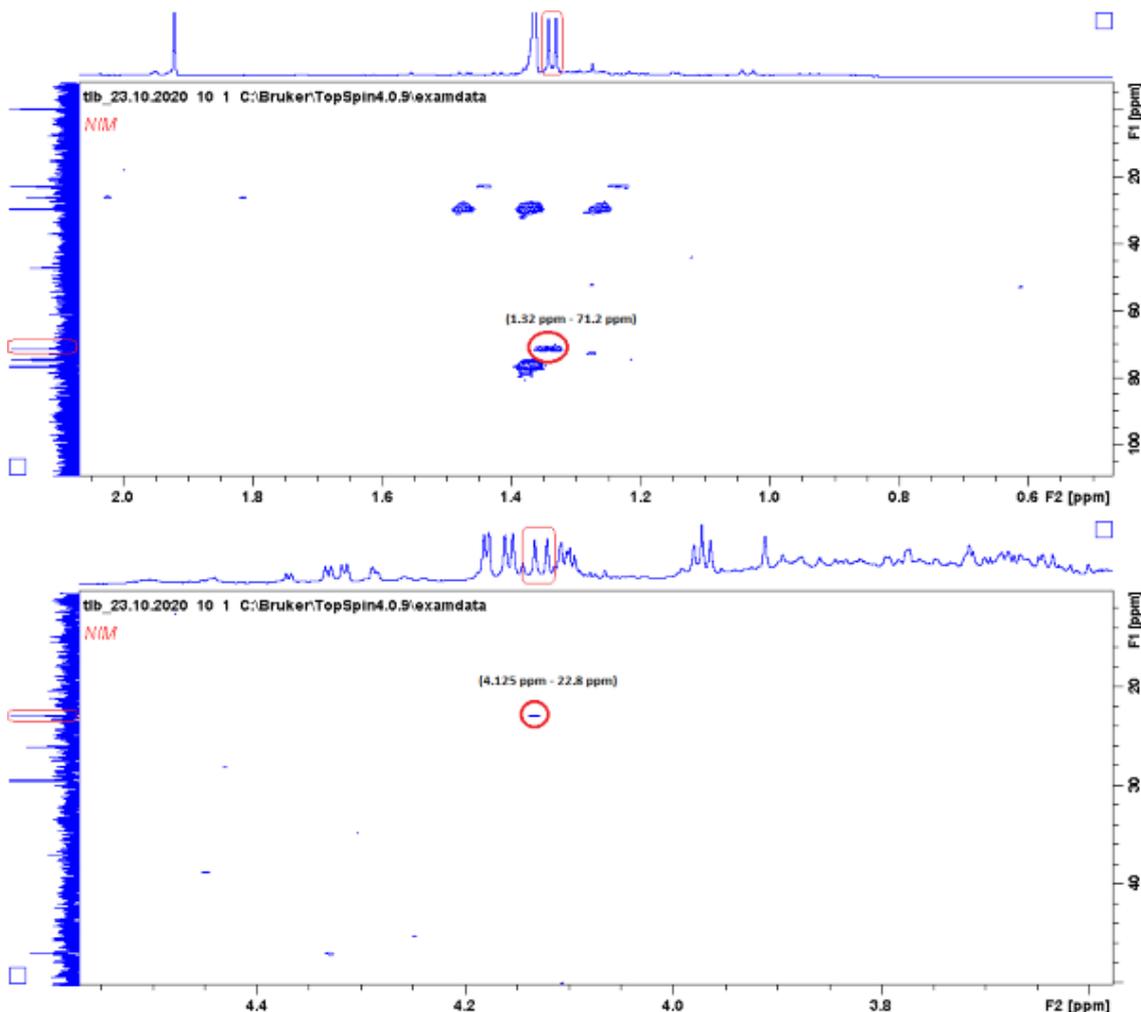
b)



c)



d)



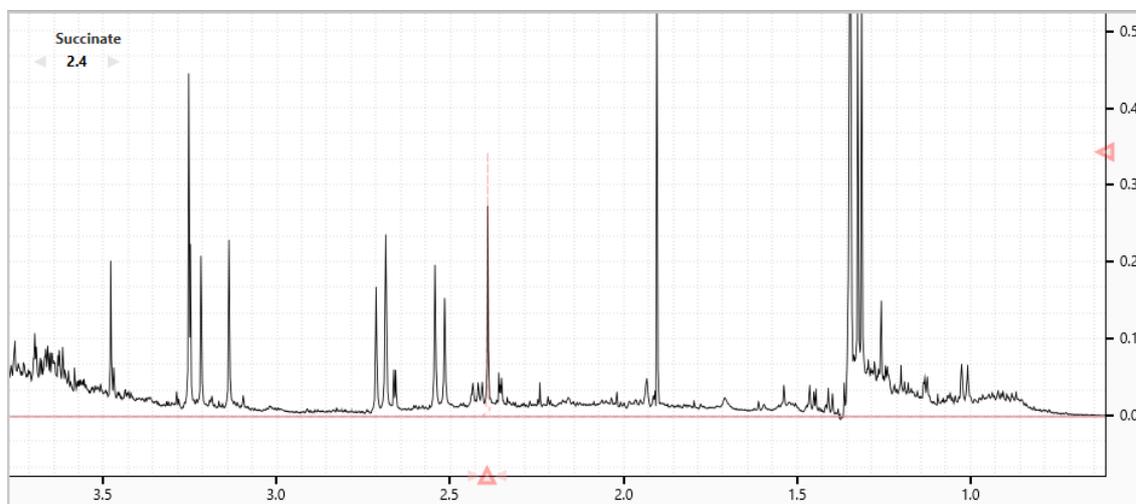
Fonte: Autora (2021)

Os grupos metila frequentemente são picos isolados que aparecem na região de 0,7 – 1,3 ppm, o lactato possui uma metila que aparece como um duplete, pois está acoplado com o hidrogênio do CH adjacente, que por sua vez acopla com a metila gerando um quarteto numa região característica de hidrogênios ligados a grupos alcóolicos, sendo que nessa região o extrato apresentou muitos sinais sobrepostos fazendo com que não possa identificar visualmente o quarteto. Porém, com os espectros de TOCSY pode-se observar a correlação entre os hidrogênios desses dois picos e o HMBC que nos mostra a correlação entre os hidrogênios e seus carbonos, respectivamente.

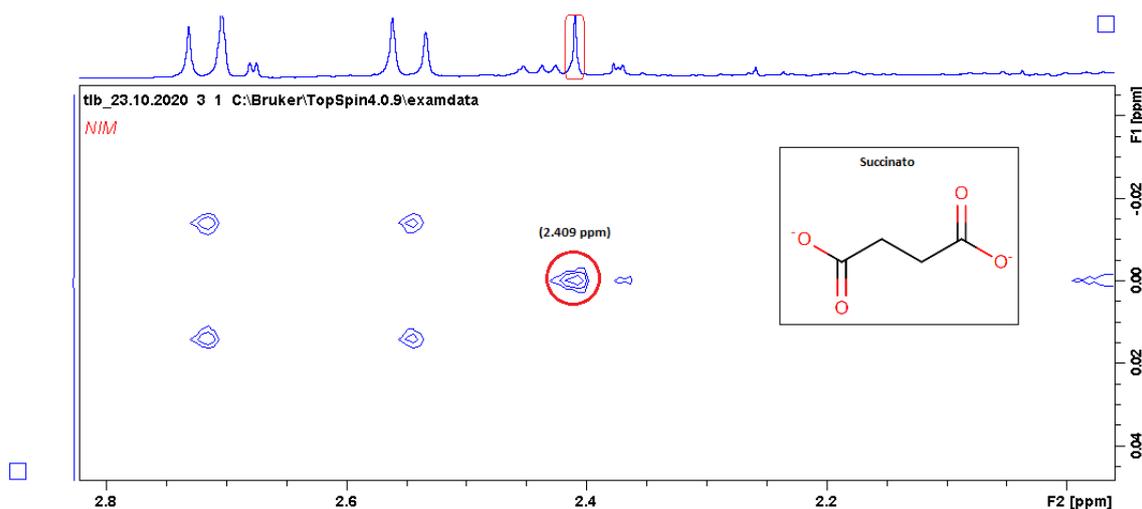
O composto *Succinato* foi identificado (Figura 31) por seu pico de hidrogênio característico em 2.409 ppm.

**Figura 31. Identificação do Succinato: a) Análise RMN 1H Chenomx, b) Espectro J-resolvido, c) Espectro TOCSY, d) Espectro HSQC.**

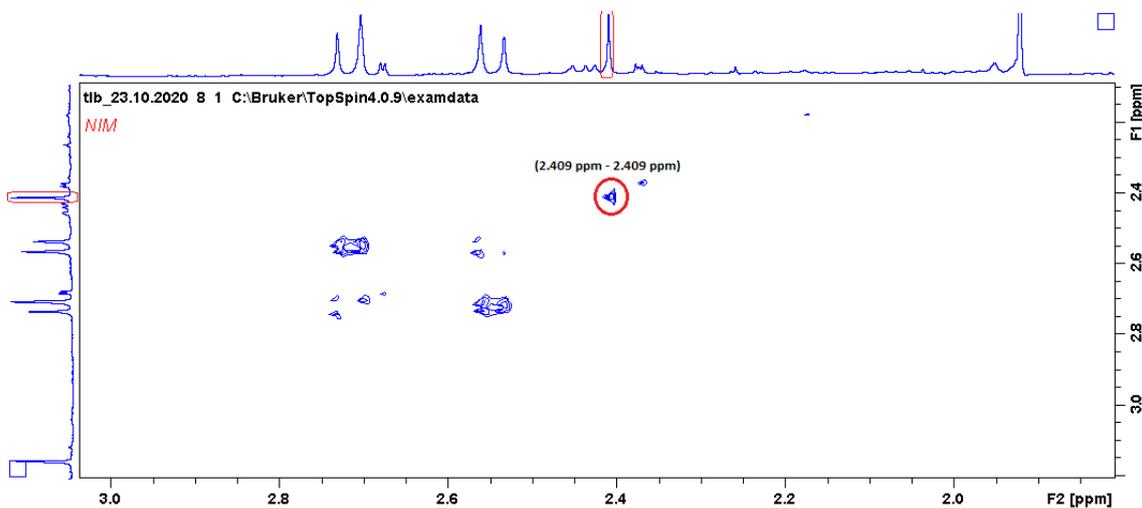
a)



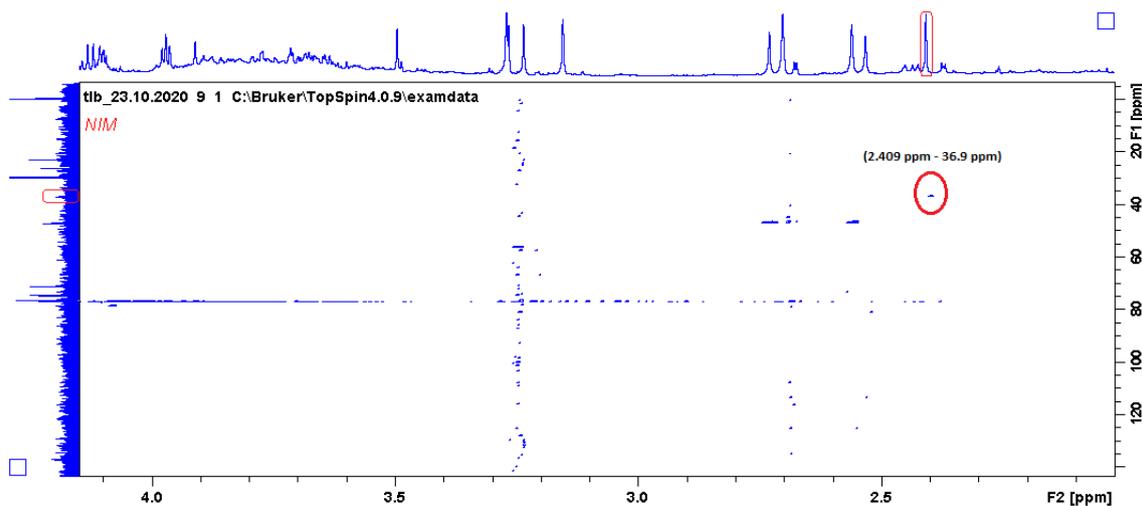
b)



c)



d)



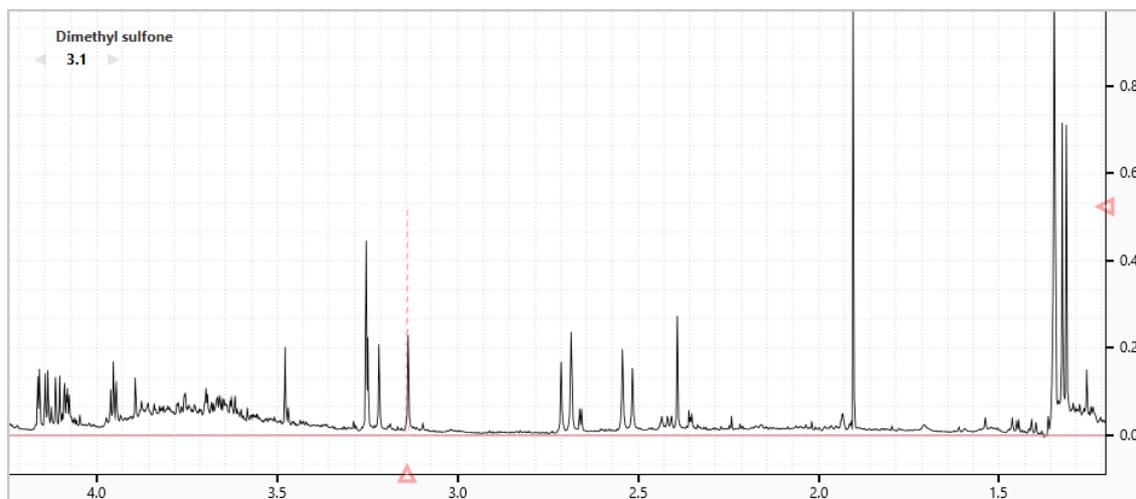
Fonte: Autora (2021)

Embora possua dois grupos metilênicos ( $\text{CH}_2$ ), esse composto é uma molécula simétrica o que resulta em apenas um sinal (singleto) que por serem hidrogênios adjacentes ao grupo carboxílico possuem uma leve desblindagem, podendo ser identificados numa região entre 2.10 e 2.50 ppm.

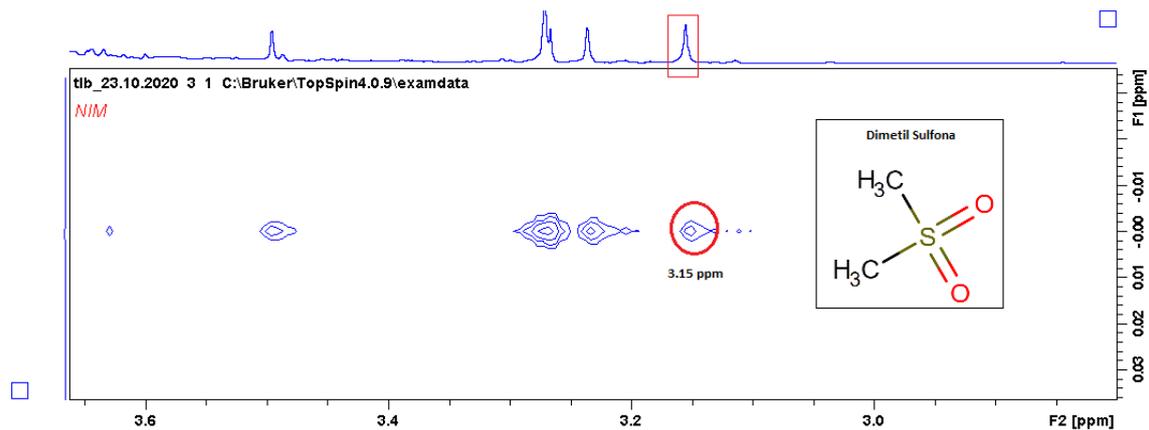
O composto *Dimetil Sulfona* foi identificado (Figura 32) por seu pico de hidrogênio característico em 3.15 ppm.

**Figura 32. Identificação do Dimetil Sulfona: a) Análise RMN 1H Chenomx, b) Espectro J-resolvido, c) Espectro TOCSY.**

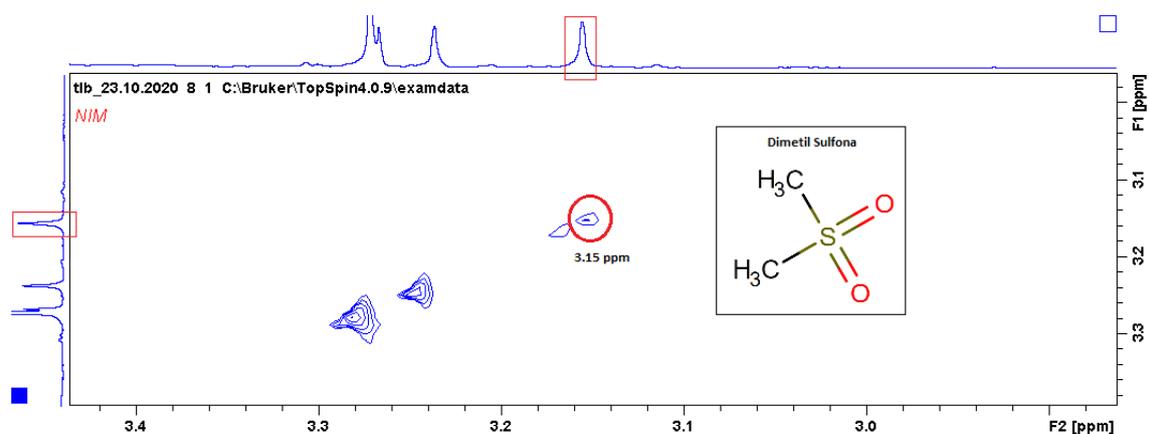
a)



b)



c)



Fonte: Autora (2021)

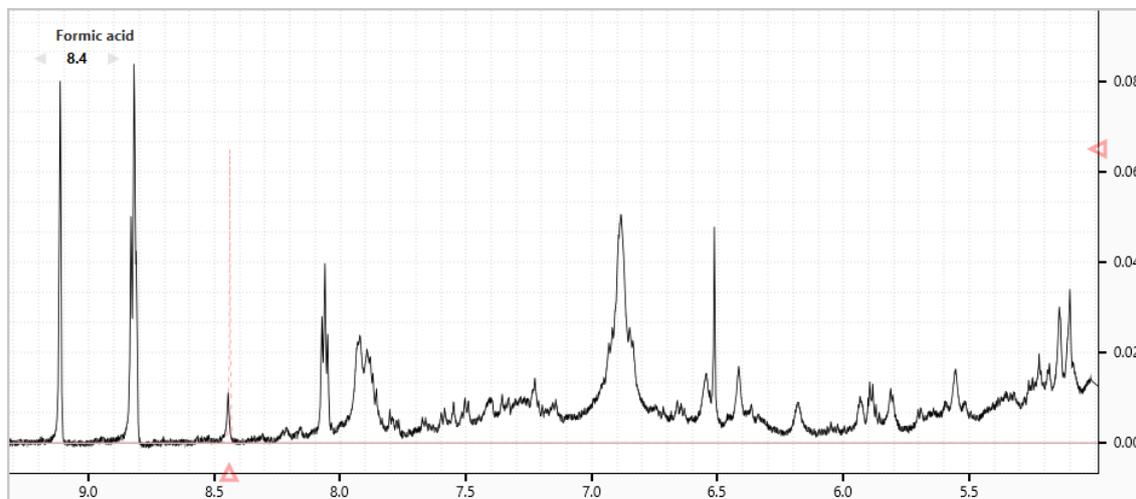
Por ser uma molécula simétrica observa-se que suas metilas geram apenas um sinal singleto e que pelo efeito eletronegativo do enxofre ser igual ao do iodo então o sinal aparecerá na região de 2,0 – 4,0 ppm.

### 5.3.2 Identificação de compostos da moringa (Moringa oleifera)

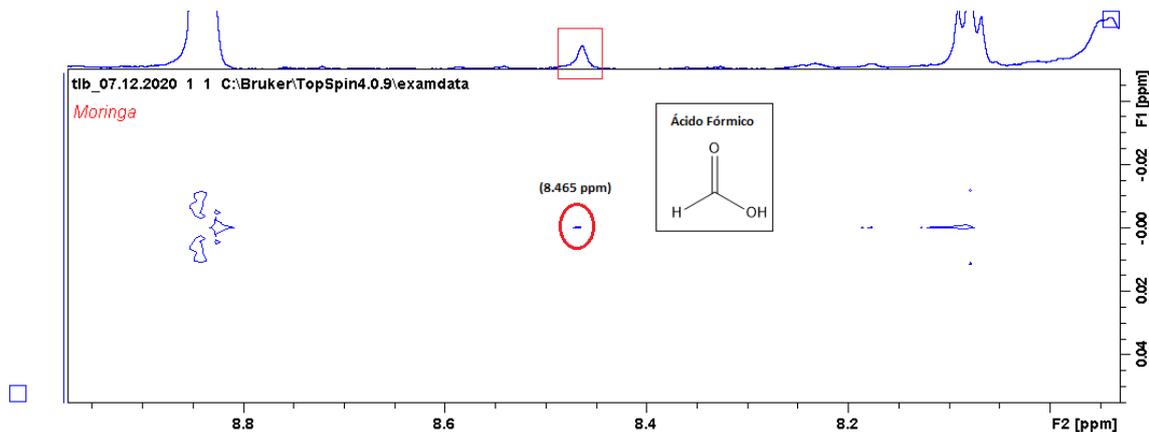
O composto *Ácido Fórmico* foi identificado (Figura 33) por seu pico de hidrogênio característico em 8.46 ppm.

Figura 33. Identificação do Ácido Fórmico: a) Análise RMN 1H Chenomx, b) Espectro J-resolvido, c) Espectro TOCSY.

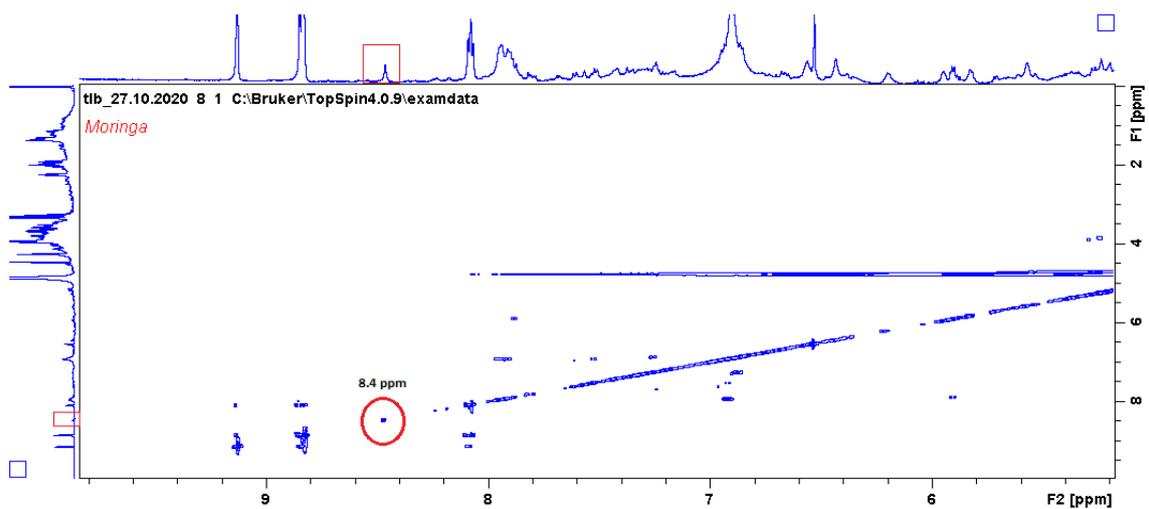
a)



b)



c)



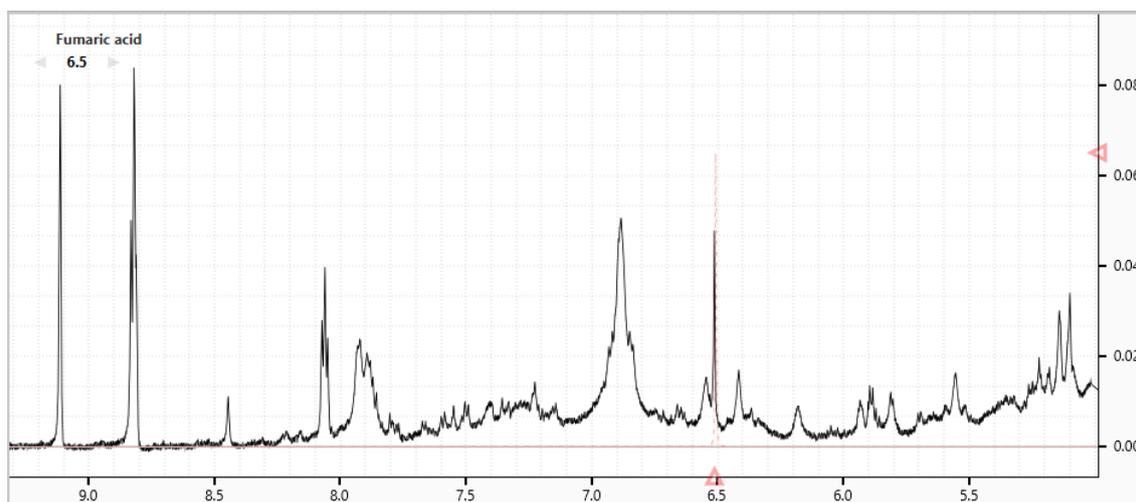
Fonte: Autora (2021)

Esse sinal característico refere-se ao hidrogênio ligado ao grupo carboxílico e apresenta um sinal singleto por não possuir acoplamento com outro hidrogênio.

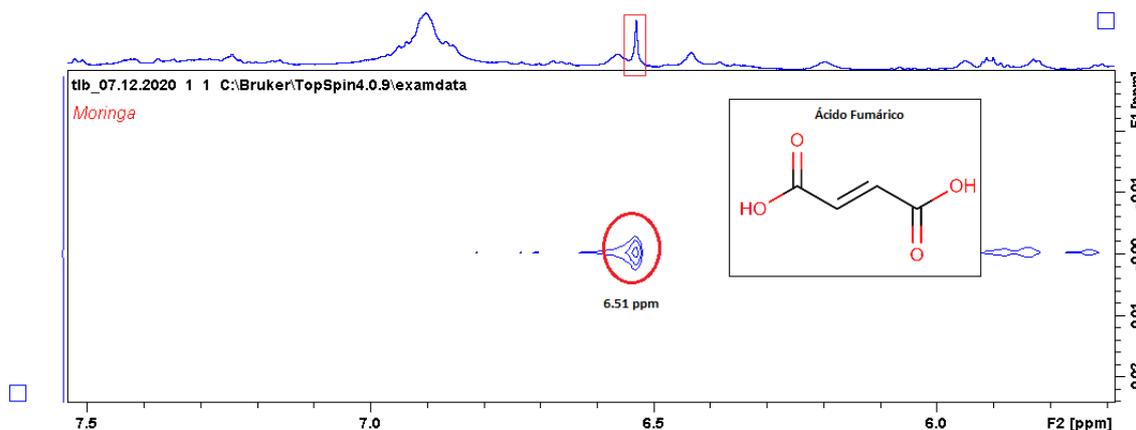
O composto *Ácido Fumárico* foi identificado (Figura 34) por seu pico de hidrogênio característico em 6.51 ppm, em que os hidrogênios ligados a uma ligação dupla (hidrogênios vinílicos) são desblindados pela anisotropia da ligação dupla adjacente e são encontrados geralmente na região de 4,5 – 6,5 ppm.

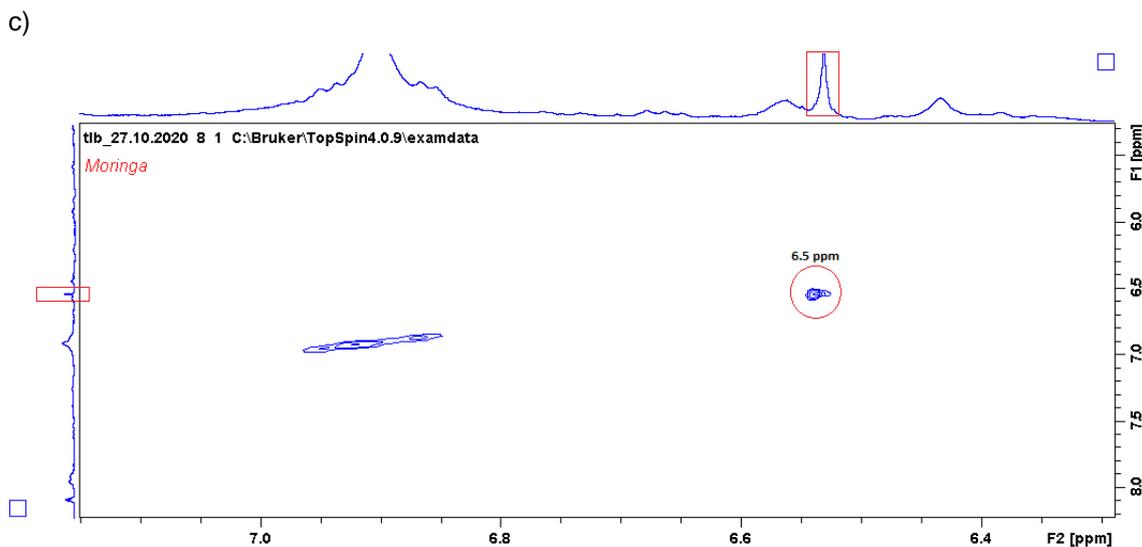
**Figura 34. Identificação do Ácido Fumárico: a) Análise RMN 1H Chenomx, b) Espectro J-resolvido, c) Espectro TOCSY.**

a)



b)





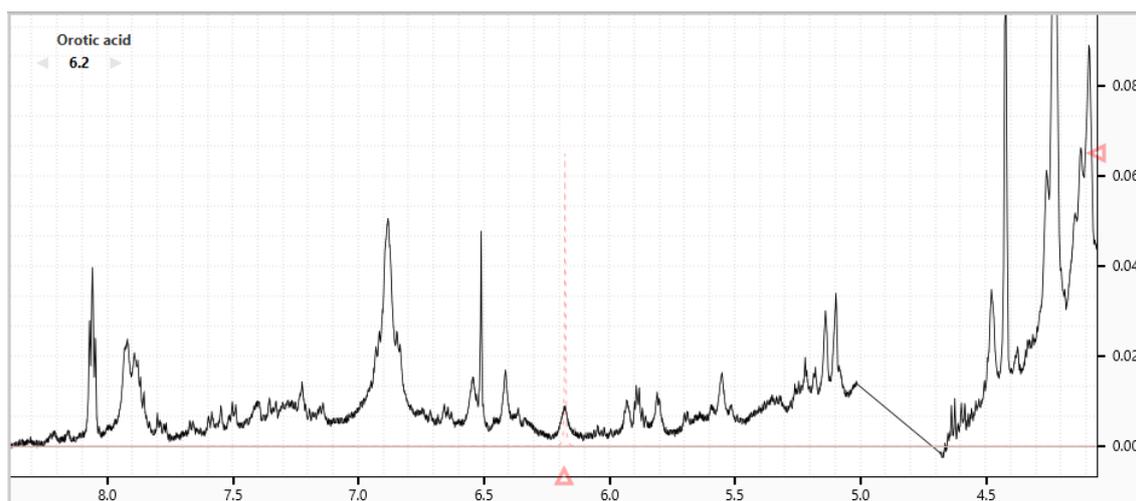
Fonte: Autora (2021)

Os espectros J-resolvido e TOCSY mostraram também que é realmente um singlete e que não acopla com nenhum outro hidrogênio.

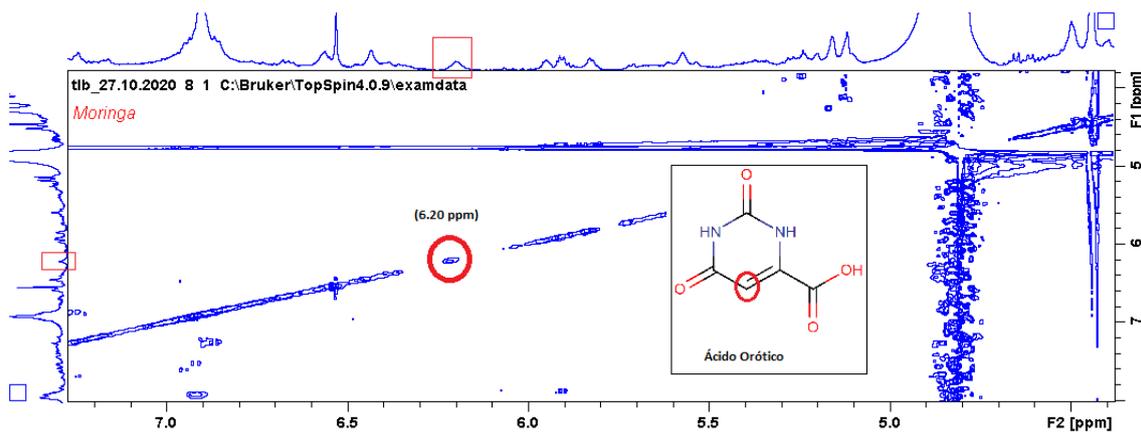
O composto *Ácido Orótico* foi identificado (Figura 35) por seu pico de hidrogênio em 6.2 ppm.

**Figura 35. Identificação do Ácido Orótico: a) Análise RMN 1H Chenomx, b) Espectro TOCSY.**

a)



b)



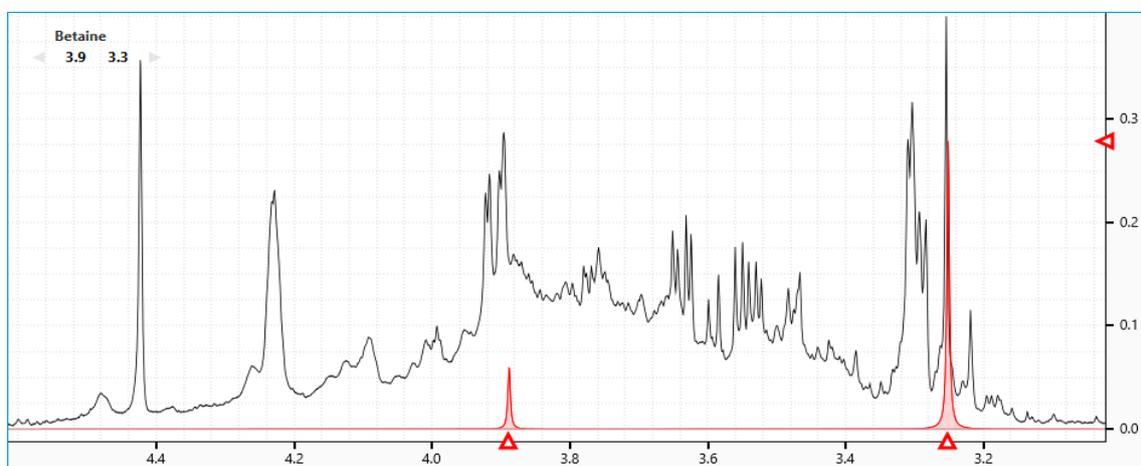
Fonte: Autora (2021)

Esse sinal é uma característica de hidrogênios ligados a um anel aromático (benzenoide), nos quais são desblindados pelo grande campo anisotrópico gerado pelos elétrons do sistema  $\pi$  do anel, aparecendo numa região de 6,0 – 8,0 ppm.

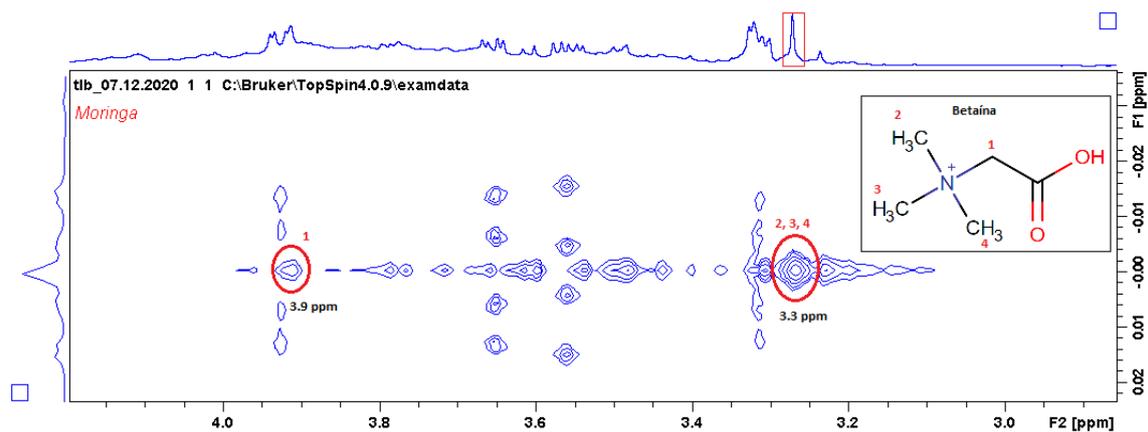
O composto *Betaína* foi identificado (Figura 36) por seus picos de hidrogênios característicos em 3.3 e 3.9 ppm. Hidrogênios de carbonos ligados a um átomo de Nitrogênio geralmente aparecem na região de 2,2 – 2,9 ppm, porém como essa molécula possui também um grupo carboxílico ligado a esses hidrogênios, então seus picos sofreram ainda mais desblindagem, sendo encontrados numa região entre 3,0 – 4,0 ppm.

**Figura 36. Identificação da Betaína: a) Análise RMN 1H Chenomx, b) Espectro J-resolvido, c) Espectro TOCSY, d) Espectro HMBC.**

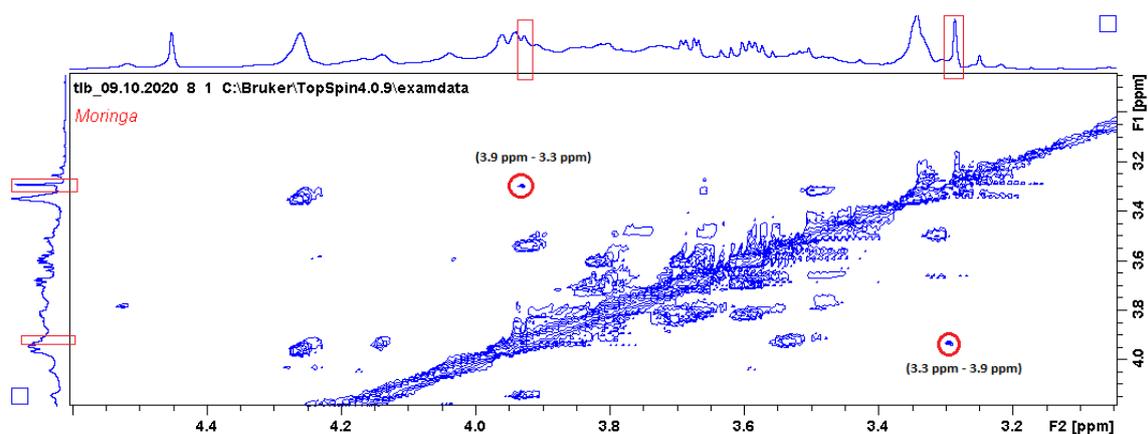
a)



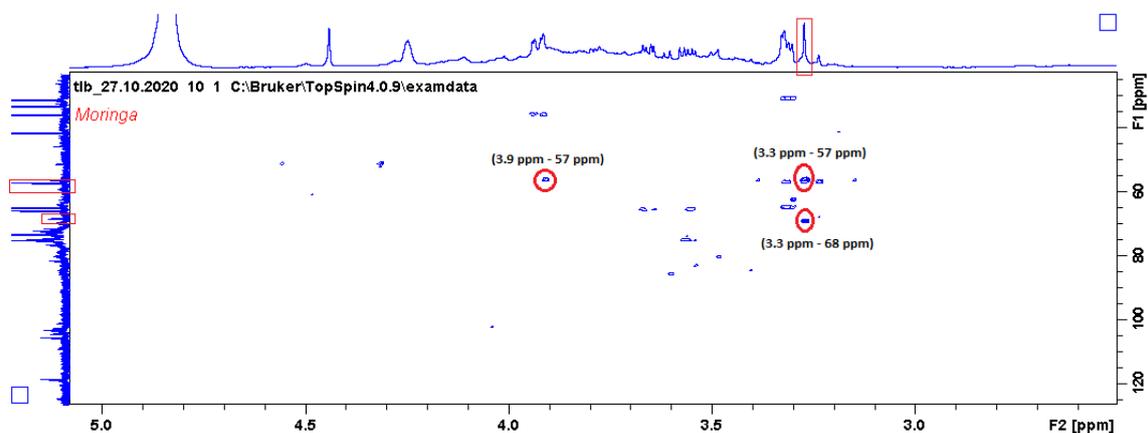
b)



c)



d)



Fonte: Autora (2021)

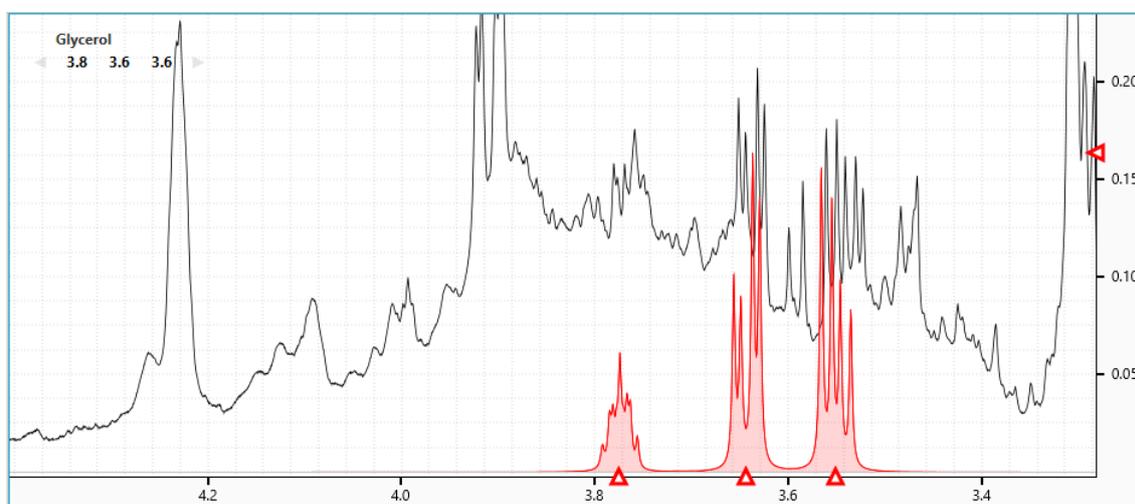
Com o espectro de J-resolvido pode-se observar que os dois picos são singletos pois não acoplam com nenhum outro hidrogênio, porém com o espectro de TOCSY consegue-se observar um correlacionamento entre esses dois sinais, pois o TOCSY mostra também correlacionamentos que ocorrem com mais de

três ligações. E o HMBC mostrou as correlações entre os hidrogênios e seus carbonos de acordo com o banco de dados HMDB.

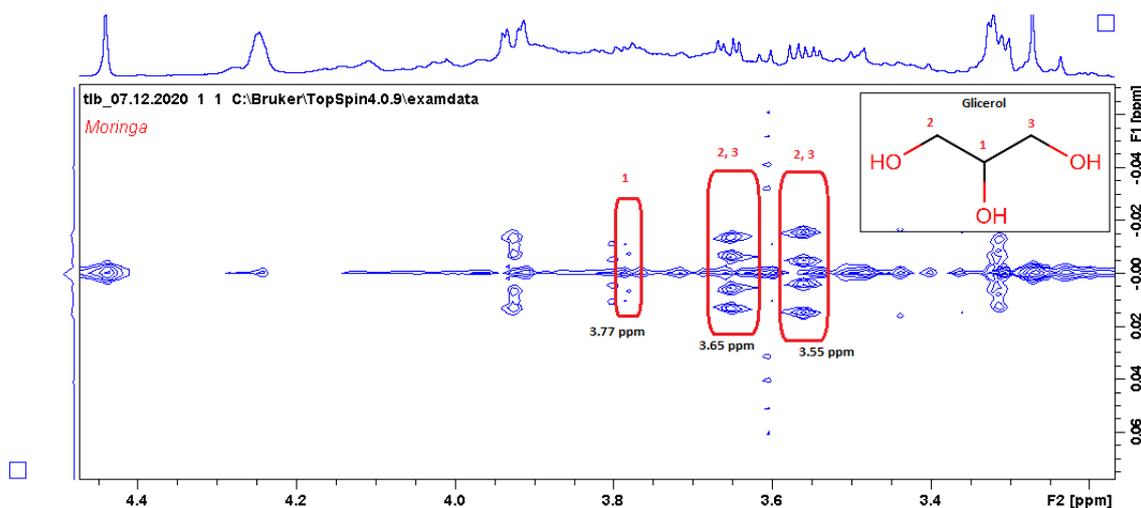
O composto *Glicerol* foi identificado (Figura 37) por seus picos de hidrogênios característicos em 3.55, 3.65 e 3.78 ppm. Os hidrogênios ligados a grupos alcólicos geralmente aparecem na região de 3,2 – 3,8 ppm, pois são hidrogênios desblindados pelo átomo de oxigênio eletronegativo.

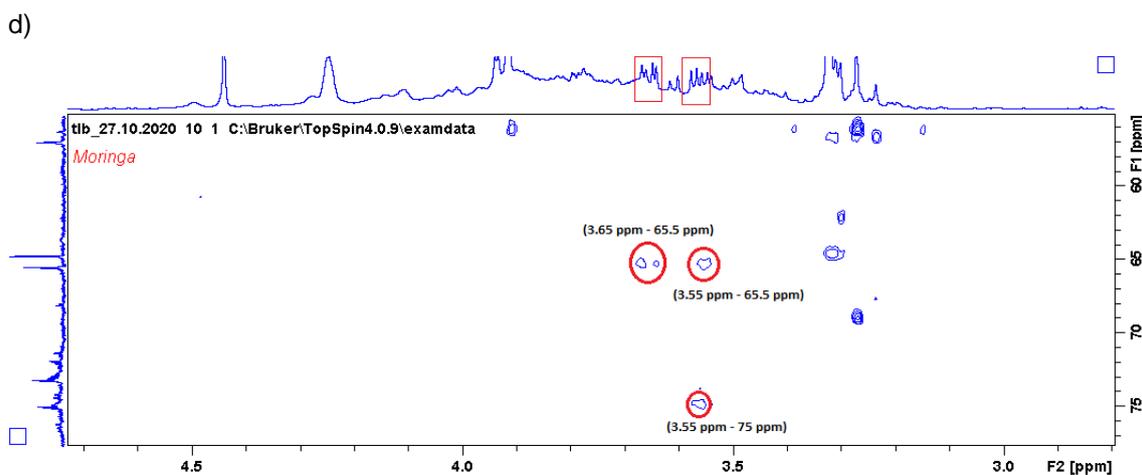
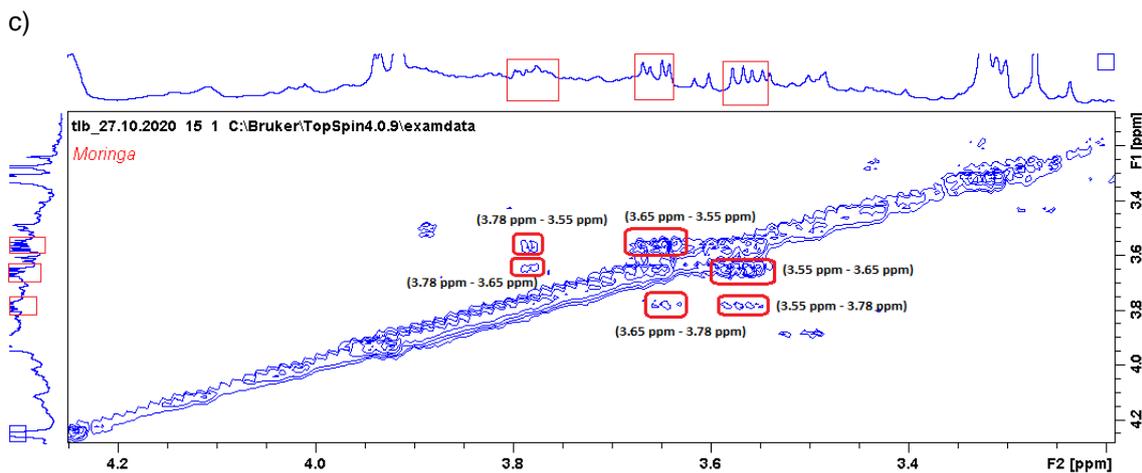
**Figura 37. Identificação do Glicerol: a) Análise RMN 1H Chenomx, b) Espectro J-resolvido, c) Espectro COSY, d) Espectro HMBC.**

a)



b)





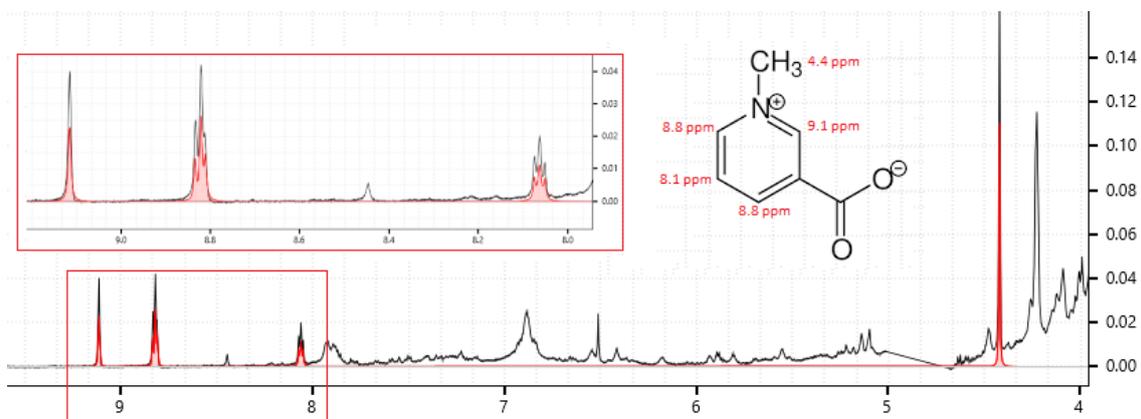
Fonte: Autora (2021)

O espectro J-resolvido confirmou que os três sinais são multipletos, o COSY mostrou a correlação entre os hidrogênios dos três sinais e o HMBC a correlação entre os sinais de hidrogênios e seus carbonos de acordo com o banco de dados do HMDB.

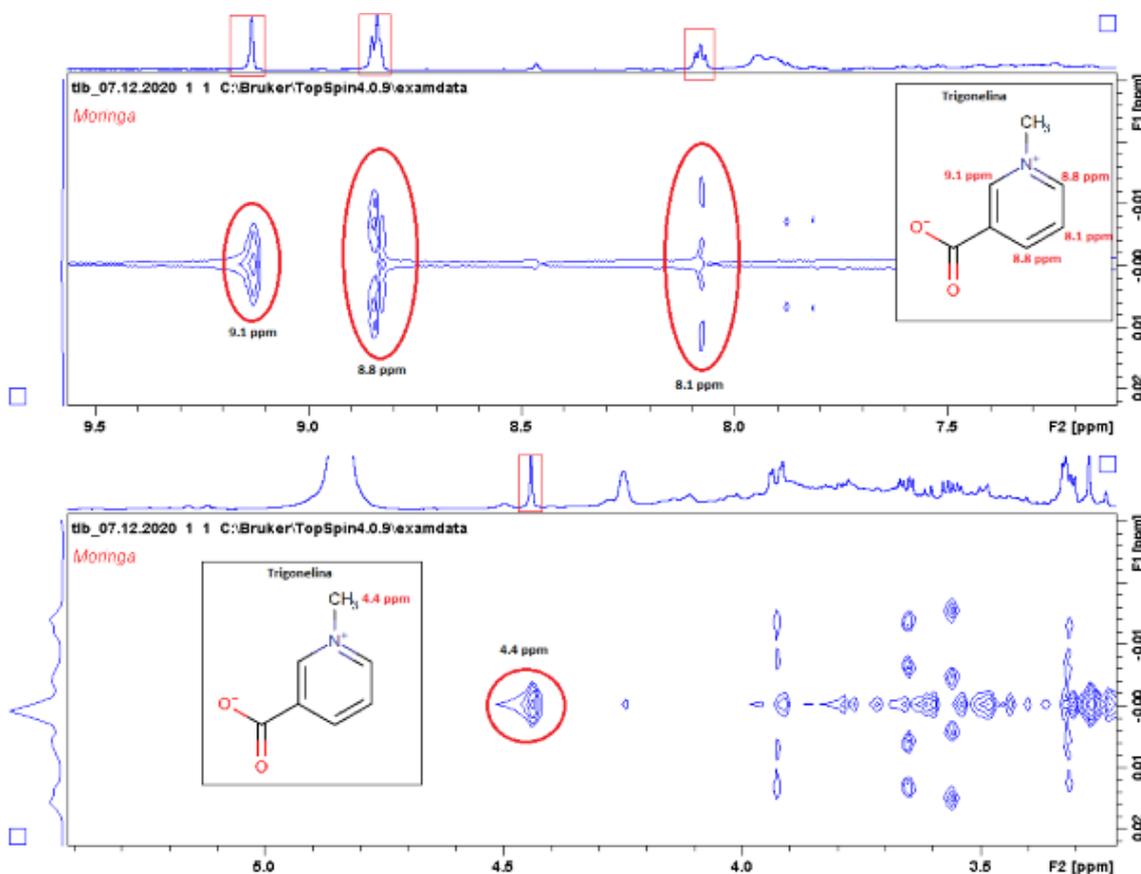
O composto *Trigonelina* foi identificado por seus picos de hidrogênios característicos em 4.4, 8.1, 8.8 e 9.1 ppm.

**Figura 38. Identificação da Trigonelina: a) Análise RMN 1H Chemomx, b) Espectro J-resolvido, c) Espectro COSY, d) Espectro HMBC, e) Espectro HSQC.**

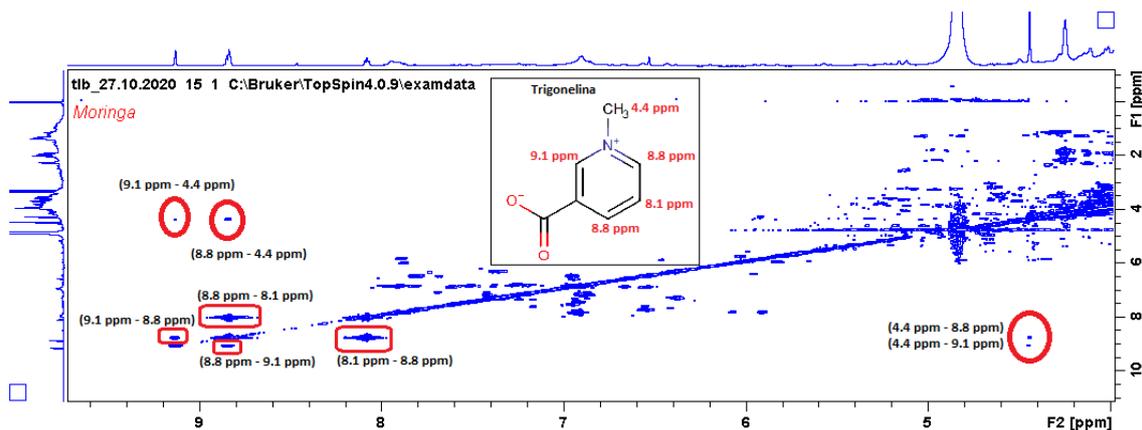
a)



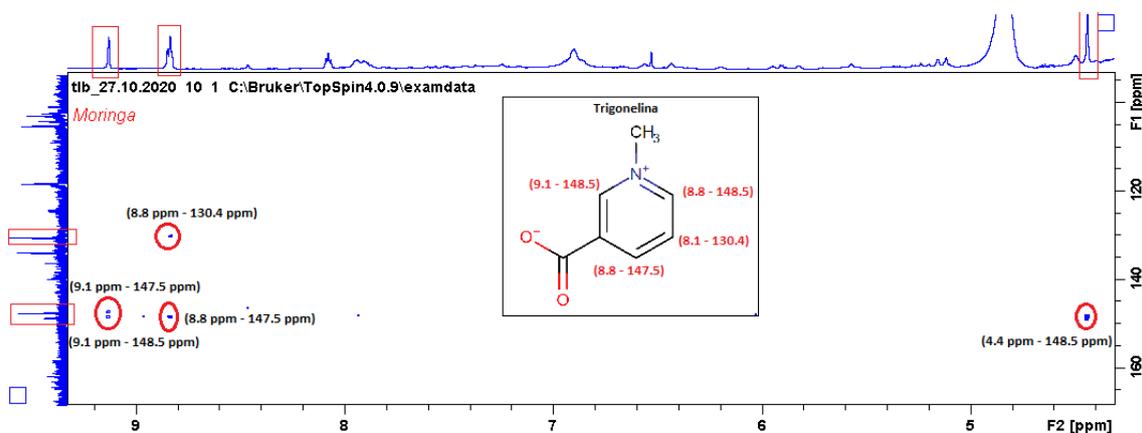
b)



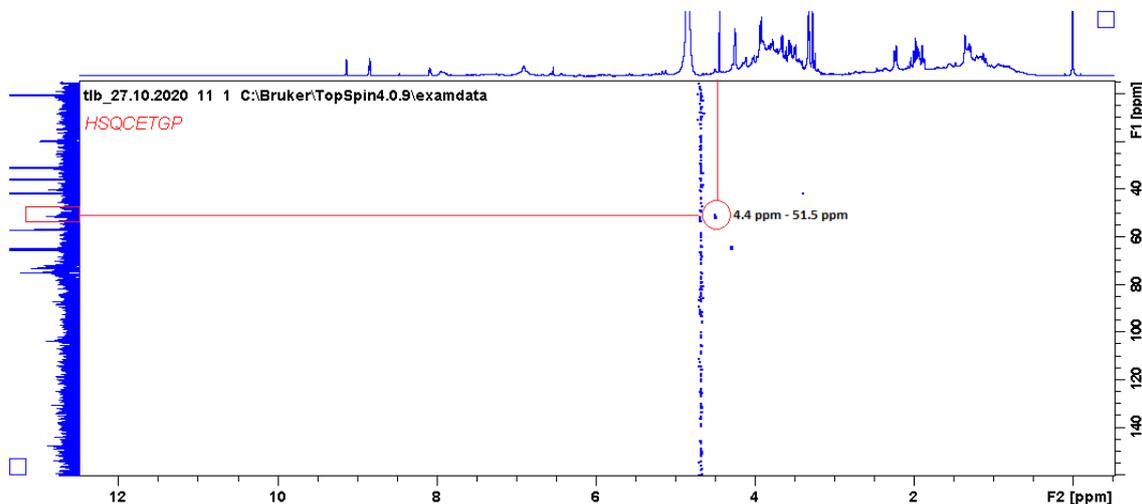
c)



d)



e)



Fonte: Autora (2021)

O sinal 4.4 ppm é correspondente a metila pois está ligada a um anel aromático causando sua desblindagem por meio da anisotropia do anel aromático e da ressonância, fazendo com que apareça numa região de 3,0 – 5,0 ppm. Os sinais 8.1, 8.8 e 9.1 são hidrogênios que estão ligados diretamente ao

anel aromático (benzenoide) sendo encontrados em uma região de 6,5 – 8,0 ppm, porém com a presença de mais um grupo carboxílico ligado ao anel, há uma maior desblindagem desses sinais. Com o espectro J-resolvido confirmamos a multiplicidade dos sinais, o COSY nos confirmou a correlação entre os hidrogênios dos quatro sinais e os espectros HMBC e HSQC a correlação entre os hidrogênios e os carbonos de acordo com o banco de dados HMDB.

## 6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados das análises de viabilidade celular, pode-se identificar que o extrato de Moringa obteve um resultado mais positivo quando comparado ao extrato de Nim, ou seja, com menor toxicidade frente a células de placenta, embora identificado um limite de concentração de até 50%.

Nos experimentos de AFM foi possível investigar os efeitos do tratamento com Moringa e Nim nas propriedades biomecânicas de células da linhagem HTR através da microscopia de força atômica. Ao examinar a morfologia e a elasticidade celular, verificou-se que tais características celulares foram moduladas pelos tratamentos. Os resultados obtidos indicaram mudanças morfológicas em ambos os grupos de células tratadas, um aumento na elasticidade das células desencadeada pelo tratamento com Moringa que pode estar associado ao rearranjo do citoesqueleto, e uma diminuição na elasticidade desencadeada pelo tratamento com Nim que pode estar relacionado a um processo de morte celular. Estes resultados de AFM são pertinentes porque relacionam a morfologia e a elasticidade das membranas celulares com alterações do citoesqueleto, demonstrando a importância do estudo de propriedades biomecânicas através do AFM.

E com os espectros de RMN 1D e 2D foram detectadas no extrato de Nim a presença dos compostos: 2-hidroxiisobutirato, ácido acético, betaína, citrato, ácido fórmico, glucarato (sacarato), lactato, succinato e dimetil sulfona, e no extrato de Moringa a presença dos compostos: ácido fórmico, ácido fumárico, ácido orótico, betaína, glicerol e trigonelina.

## **7 PERSPECTIVAS FUTURAS**

A descoberta de compostos líderes para o desenvolvimento de um fármaco como produto final é um processo multidisciplinar e de alta complexidade, tendo que haver várias e longas etapas de ensaios e testes clínicos. Assim, uma das etapas a se trabalhar após os estudos tratados neste trabalho é a identificação dos possíveis alvos macromoleculares de inflamação que as possíveis substâncias encontradas nos extratos estudados podem atacar.

## 8 REFERÊNCIAS

AA, W. Medicinal and Cosmetic Potential of Neem (*Azadiracta Indica*) Seed Oil: A Review. **Research & Reviews: Journal of Medicinal Chemistry**, v. 1, n. 1, p. 5–8, 2012.

ALEIXO, M. L. M.; GALBIATI, C.; SCALON LEMOS, L. M. Produtos naturais anti - *Helicobacter pylori*: revisão. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v. 9, n. 1, p. 56–72, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.6008/CBPC2179-6858.2018.001.0005>

ALMEIDA, C. de F. C. B. R. de; CABRAL, D. L. de V.; ALMEIDA, C. C. B. R. de; AMORIM, E. L. C. de; ARAÚJO, J. M. de; ALBUQUERQUE, U. P. de. Comparative study of the antimicrobial activity of native and exotic plants from the Caatinga and Atlantic Forest selected through an ethnobotanical survey. **Pharmaceutical biology**, England, v. 50, n. 2, p. 201–207, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.3109/13880209.2011.596205>

ANDRADE, A. M.; RAMALHO, A. A.; OPITZ, S. P.; MARTINS, F. A.; KOIFMAN, R. J. Farmacocinética e mecanismos de teratogenicidade dos medicamentos na gestação: uma revisão da literatura. **Infarma - Ciências Farmacêuticas**, p. 100–107, 2017.

ANTONIO, A.; FONSECA, G.; MENDES, Á.; WIEDEMANN, L.; VEIGA-JUNIOR, V.; ANTONIO, A. S.; FONSECA, G. D.; MENDES, Á. J. B.; WIEDEMANN, L. S. M.; VEIGA-JUNIOR, V. F. Perspectives and Applications of Natural Products as Civilian Defense Devices. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 6, p. 1115–1129, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190028>. Acesso em: 17 dez. 2019.

ANVISA. RDC N° 26, DE 13 DE MAIO DE 2014. 2014.

ANVISA. **Anuário Estatístico do Mercado Farmacêutico - 2018 - Busca - Anvisa**. [s. l.], 2018. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/resultado-de-busca?p\\_p\\_id=101&p\\_p\\_lifecycle=0&p\\_p\\_state=maximized&p\\_p\\_mode=view&p\\_p\\_col\\_id=column-1&p\\_p\\_col\\_count=1&\\_101\\_struts\\_action=%2Fasset\\_publisher%2Fview\\_content&\\_101\\_assetEntryId=5730944&\\_101\\_type=document&redirect=http](http://portal.anvisa.gov.br/resultado-de-busca?p_p_id=101&p_p_lifecycle=0&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&_101_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&_101_assetEntryId=5730944&_101_type=document&redirect=http). Acesso em: 11 jun. 2020.

ARAGÃO, F. F. de; TOBIAS, A. F. Tratamento farmacológico da dor na gestante. **Brazilian Journal Of Pain**, v. 2, n. 4, p. 374–380, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.5935/2595-0118.20190068>

ARAÚJO, C. R. F. de; SANTIAGO, F. G.; PEIXOTO, M. I.; DE OLIVEIRA, J. O. D.; COUTINHO, M. de S. Use of medicinal plants with teratogenic and abortive effects by pregnantwomen in a city in northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia**, v. 38, n. 3, p. 127–131, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1055/s-0036-1580714>

ARAÚJO, E. C. de; OLIVEIRA, R. A. G. de; CORIOLANO, A. T.; ARAÚJO, E. C. de. Uso de plantas medicinais pelos pacientes com câncer de hospitais da Rede Pública de Saúde em João Pessoa (PB). **Espaço. saúde (Online)**, v. 8, n. 2, p. 44–52, 2007.

AUE, W. P.; KARHAN, J.; ERNST, R. R. Homonuclear broad band decoupling and two-dimensional J-resolved NMR spectroscopy. **The Journal of Chemical Physics**, v. 64, n. 10, p. 4226–4227, 1976. Disponível em: <https://doi.org/10.1063/1.431994>. Acesso em: 14 jul. 2020.

BAPTISTA, R. C.; HORITA, C. N.; SANT'ANA, A. S. Natural products with preservative properties for enhancing the microbiological safety and extending the shelf-life of seafood: A review. **Food Research International**, v. 127, p. 108762, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2019.108762>. Acesso em: 17 dez. 2019.

BARCELÓ, D. Emerging pollutants in water analysis. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 10, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(03\)01106-3](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(03)01106-3)

BARROS BRASIL, R. Aspectos Botânicos, Usos Tradicionais e Potencialidades de *Azadirachta indica* (NEEM). **Enciclopédia Biosfera - centro Científico Conhecer**, v. v. 9, n. 17, p. 3252, 2013.

BATLOUNI, M. Anti-inflamatórios não esteroides: Efeitos cardiovasculares, cérebro-vasculares e renais. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 94, n. 4, p. 556–563, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0066-782x2010000400019>

BERLINCK, R. G. S.; BORGES, W. de S.; SCOTTIC, M. T.; VIEIRA, P. C. A QUÍMICA DE PRODUTOS NATURAIS DO BRASIL DO SÉCULO XXI. **Química Nova**, v. Vol. 40, p. 706–710, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170070>

BINNIG, G.; QUATE, C. F.; GERBER, C. Atomic force microscope. **Physical Review Letters**, v. 56, n. 9, p. 930–933, 1986. Disponível em: <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.56.930>

BOLZANI, V. da S.; VALLI, M.; PIVATTO, M.; VIEGAS, C. Natural products from Brazilian biodiversity as a source of new models for medicinal chemistry. **Pure and Applied Chemistry**, v. 84, p. 1837, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1351/PAC-CON-12-01-11>

BOTELHO, R. M. *et al.* Biomechanical and functional properties of trophoblast cells exposed to Group B Streptococcus in vitro and the beneficial effects of uvaol treatment. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1863, n. 9, p. 1417–1428, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2019.06.012>

BRAHMACHARI, G. Neem - An omnipotent plant: A retrospection.

**ChemBioChem**, v. 5, n. 4, p. 408–421, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cbic.200300749>

BURNHAM, N. A.; CHEN, X.; HODGES, C. S.; MATEI, G. A.; THORESON, E. J.; ROBERTS, C. J.; DAVIES, M. C.; TENDLER, S. J. B. Comparison of calibration methods for atomic-force microscopy cantilevers. **Nanotechnology**, v. 14, n. 1, p. 1–6, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1088/0957-4484/14/1/301>

CALIXTO, J. B. The role of natural products in modern drug discovery. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, n. suppl 3, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0001-3765201920190105>. Acesso em: 17 dez. 2019.

CALIXTO, J. B.; JR, J. M. S. Desenvolvimento de Medicamentos no Brasil: Desafios. **Gazeta Médica da Bahia**, 2008.

CAMPOS, D. A.; RIBEIRO, A. C.; COSTA, E. M.; FERNANDES, J. C.; TAVARIA, F. K.; ARARUNA, F. B.; EIRAS, C.; EATON, P.; LEITE, J. R. S. A.; PINTADO, M. M. Study of antimicrobial activity and atomic force microscopy imaging of the action mechanism of cashew tree gum. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 1, p. 270–274, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.05.034>

CAMPOS, J. V. **Avaliação da Atividade Antimicrobiana e Análise Morfológica por Microscopia de Força Atômica (AFM) da Ação de Extratos de Própolis Verde sobre Staphylococcus aureus e Escherichia coli**. 2017. - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2017.

CAMPOS, S. .; SILVA, C. .; CAMPANA, P. R. .; ALMEIDA, V. . Toxicidade de espécies vegetais. **Rev. Bras. Pl. Med**, v. 18, n. 1, p. 373–382, 2016. Disponível em: [https://doi.org/10.1590/1983-084X/15\\_057](https://doi.org/10.1590/1983-084X/15_057)

CARVALHAES, E. de; NUNES, O.; HIRAI, S.; MARQUES, G.; FOLLI, B. **GUIA 2019 INTERFARMA - Associação da Indústria farmacêutica de Pesquisa**. [s. l.], 2019. Disponível em: <https://www.interfarma.org.br/public/files/biblioteca/guia-interfarma-2019-interfarma2.pdf>. Acesso em: 9 jun. 2020.

CHANG, T. H.; HSIEH, F. L.; KO, T. P.; TENG, K. H.; LIANG, P. H.; WANG, A. H. J. Structure of a heterotetrameric geranyl pyrophosphate synthase from mint (*Mentha piperita*) reveals intersubunit regulation. **Plant Cell**, v. 22, n. 2, p. 454–467, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1105/tpc.109.071738>

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products A Biosynthetic Approach**. 2th ed. [S. l.]: John Wiley & Sons Ltd, 2002. *E-book*. Disponível em: <http://www.wiley.co.uk>. Acesso em: 13 jun. 2020.

DIAS, T. L. M. F. ; *et al.* Atividades Antinociceptivas e Anti-inflamatórias do Extrato Etanólico, das Frações e da Epicatequina Isolada da Casca do Caule da *Ximenia americana* L. (Oleaceae). **Rev. Virtual Quim**, v. 10, n. 1, p. 1–86, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20180009>. Acesso em: 12 jun. 2020.

DUARTE, A. C.; RESENDE, C. C. de; MURAHOVSKI, D.; VASCONCELOS, F. P. de J. Análise da Indústria Farmacêutica - Perspectivas e Desafios. **Núcleo de Estudos e Pesquisas/CONLEG/Senado**, 2015. Disponível em: [www.senado.leg.br/estudos](http://www.senado.leg.br/estudos). Acesso em: 10 jun. 2020.

EATON, P.; WEST, P. **Atomic Force Microscopy**. 1ª ed. New York: Oxford University Press, 2010.

EINERSON, B. D.; COMSTOCK, J.; SILVER, R. M.; BRANCH, D. W.; WOODWARD, P. J.; KENNEDY, A. Placenta Accreta Spectrum Disorder: Uterine Dehiscence, Not Placental Invasion. **Obstetrics and gynecology**, v. 135, n. 5, p. 1104–1111, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000003793>. Acesso em: 17 ago. 2021.

FELIPE, L. O.; BICAS, J. L. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. **Química Nova**, São Paulo, v. 39, p. 120–130, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.21577/0104-8899.20160068>. Acesso em: 12 jun. 2020.

FERNANDES, E. S.; PASSOS, G. F.; MEDEIROS, R.; DA CUNHA, F. M.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M. M.; PIANOWSKI, L. F.; CALIXTO, J. B. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **European Journal of Pharmacology**, v. 569, n. 3, p. 228–236, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.04.059>

FILHO, R. B.; MATTOSO, L. H. C. Estudo de Polímeros por Microscopia de Força Atômica. **Comunicado Técnico 53. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento**, p. 2–5, 2003.

FIRMO, W. da C. A.; MENEZES, V. de J.; PASSOS, C. E. de C.; DIAS, C. N.; ALVES, L. P. L.; DIAS, I. C. L.; NETO, M. S.; OLEA, R. S. G. Contexto Histórico, Uso Popular e Concepção Científica sobre Plantas Medicinais. **Caderno de Pesquisa**, São Luís, v. 18, 2011.

GÓIS, R. C. de S. Toxicidade reprodutiva da semente de neem (*azadirachta indica* A. Juss.) Em codorna (*coturnix coturnix japônica linnaeus*, 1758) macho: Características seminais, estudo histopatológico e Histomorfométrico do parênquima testicular. **Repositório UFERSA-RN**, 2018.

GOMES, A. N. O novo consumidor de produtos naturais: Consumindo conceitos muito mais do que produtos. **3º Encontro ESPM de Comunicação e Marketing**, 2009.

GORRIL, L. E.; JACOMASSI, E.; MELLA JUNIOR, S. E.; DALSENTER, P. R.; GASPAROTTO JUNIOR, A.; LOURENÇO, E. L. B. Risco das Plantas Medicinais na Gestação: Uma Revisão dos Dados de Acesso Livre em Língua Portuguesa. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 20, n. 1, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.25110/arqsaude.v20i1.2016.5515>

GUPTA, S. M.; KUMAR, K. Stinging plants: as future bio-weapon. **Journal of complementary & integrative medicine**, Germany, v. 13, n. 3, p. 217–219, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1515/jcim-2015-0108>

HAYASHI, K.; IWATA, M. Stiffness of cancer cells measured with an AFM indentation method. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 49, p. 105–111, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.JMBBM.2015.04.030>

HEBERT, M. F. Impact of pregnancy on pharmacokinetics of medications. **Journal of Population Therapeutics & Clinical Pharmacology**, v. 20, n. 3, 2013.

HERTZ, V. H. H. Über den kontakt elastischer korper. **Journal für die reine und angewandte Mathematik**, v. v. 92, n. n. 156, p. 245–260, 1881.

HORN, M. B. Nano-Microencapsulamento por Precipitação Polimérica do Óleo de Nim: Caracterizações e Aplicações para o Controle de Ácaro Tetranychus Urticae. **Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da PUCRS**, 2019.

HUANG, X.; HE, J.; LIU, M.; ZHOU, C. The influence of aminophylline on the nanostructure and nanomechanics of T lymphocytes: an AFM study. **Nanoscale Research Letters**, v. 9, n. 1, p. 518, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1556-276X-9-518>

IBECO FACULDADE. **Você sabe o que é fármaco?**. [s. l.], 2017. Disponível em: <https://ibeco.com.br/voce-sabe-o-que-e-farmaco/>. Acesso em: 9 jun. 2020.

KAISER, C. R. RMN 2D: Detecção Inversa e Gradiente de Campo na Determinação Estrutural de Compostos Orgânicos. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p. 1–6, 2000.

KINGSTON, D. G. I. Modern natural products drug discovery and its relevance to biodiversity conservation. **Journal of natural products**, United States, v. 74, n. 3, p. 496–511, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/np100550t>

KUETE, V. **Medicinal Spices and Vegetables from Africa - Therapeutic Potential against Metabolic, Inflammatory, Infectious and Systemic Diseases**. [S. l.: s. n.]. *E-book*. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/309209214\\_Medicinal\\_Spices\\_and\\_Vegetables\\_from\\_Africa\\_1st\\_Edition\\_Therapeutic\\_Potential\\_against\\_Metabolic\\_Inflammatory\\_Infectious\\_and\\_Systemic\\_Diseases](https://www.researchgate.net/publication/309209214_Medicinal_Spices_and_Vegetables_from_Africa_1st_Edition_Therapeutic_Potential_against_Metabolic_Inflammatory_Infectious_and_Systemic_Diseases). Acesso em: 12 jun. 2020.

LARINI, L. **Fármacos e Medicamentos**. 1ª edição ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

LEE, G. Y. H.; LIM, C. T. Biomechanics approaches to studying human diseases. **Trends in biotechnology**, Singapore-MIT Alliance, 4 Engineering Drive 3, Singapore 117576, Singapore., v. 25, n. 3, p. 111–118, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2007.01.005>

LEISS, K. A.; CHOI, Y. H.; ABDEL-FARID, I. B.; VERPOORTE, R.; KLINKHAMER, P. G. L. NMR Metabolomics of Thrips (*Frankliniella occidentalis*) Resistance in Senecio Hybrids. **J Chem Ecol**, v. 35, p. 219–229, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10886-008-9586-0>

LEKKA, M.; LAIDLER, P. **Applicability of AFM in cancer detection**. England: [s. n.], 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nnano.2009.004>

LI, J. W.-H.; VEDERAS, J. C. Drug Discovery and Natural Products: End of an Era or an Endless Frontier? **Science**, v. 325, n. 5937, p. 161–165, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1168243>. Acesso em: 17 dez. 2019.

LIMA JÚNIOR, R. N.; ABREU, F. O. M. S. Produtos Naturais Utilizados como Coagulantes e Floculantes para Tratamento de Águas: Uma Revisão sobre Benefícios e Potencialidades. **Revista Virtual de Química**, v. v. 10, p. 709–735, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20180052>

LUDWIG, C.; VIANT, M. R. Two-dimensional J-resolved NMR spectroscopy: Review of a key methodology in the metabolomics toolbox. **Phytochemical Analysis**, v. 21, n. 1, p. 22–32, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/pca.1186>

MAGALHÃES, W. L. E.; THÁ, E. L.; LEME, D. M. **Método de determinação de concentrações não citotóxicas para avaliação da capacidade protetora da lignina contra danos ao DNA**. Colombo - PR: [s. n.], 2018. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1104215/1/CT4271572final2.pdf>.

MAHMOOD, K. T.; MUGAL, T.; HAQ, I. U. Moringa oleifera: A natural gift-a review. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 2, p. 775–781, 2010.

MARMITT, D. J.; REMPEL, C.; GOETTERT, M. I.; SILVA, A. C. Plantas Medicinais da RENISUS Com Potencial Anti-inflamatório: Revisão Sistemática Em Três Bases de Dados Científicas. Medicinal Plants RENISUS With Potential Anti-inflammatory: Systematic Review In Three Scientific Databases. **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, v. 9, n. 2, p. 73–159, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.5935/2446-4775.20150011>

MARQUES, E. F.; VIEIRA, P. C. ALCALOIDES ACRIDÔNICOS INIBEM CATEPSINA L E V. **Química Nova**, v. 39, p. 58–62, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20150176>. Acesso em: 9 jun. 2020.

MARTELLI, A.; ANDRADE, T. A. M. de; SANTOS, G. M. T. dos. Perspectivas na utilização de fitoterápicos na cicatrização tecidual: revisão sistemática. **Arch Health Invest**, v. v. 7, p. 344–350, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.21270/archi.v7i8.3047>

MBIKAY, M. Therapeutic potential of Moringa oleifera leaves in chronic hyperglycemia and dyslipidemia: A review. **Frontiers in Pharmacology**, v. 3 MAR, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00024>

MCMURRY, J. **Química Orgânica**. 6ª edição ed. [S. l.]: Tomson, 2005.

MENDES, V. A.; STOCCO, P.; LARA, A. C. de; OLIVEIRA, C. M. de; LISBOA, H. C. F. Avaliação do uso de produtos naturais na prática do profissional de saúde. **Revista Saúde (Santa Maria)**, v. v. 44, 2018. Disponível em: <https://periodicos.ufsm.br/revistasaude/article/view/19092>

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria Nº 3.916, De 30 de Outubro de 1998. **Ministério da Saúde**, 1998.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **MS elabora Relação de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS**. [S. l.: s. n.].

**MMA - Ministério do Meio Ambiente**. . [s. l.], 2017. Disponível em: [www.mma.gov.br/portabio](http://www.mma.gov.br/portabio). Acesso em: 17 dez. 2019.

NETO, I. F. da S.; LEITE, I. B.; AGUIAR, A. M.; SILVA, M. R. Bioprospecção Farmacológica: Avaliação Fitoquímica do Nim Indiano (*Azadirachta indica* A. Juss.). **Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management**, v. v. 16, 2020.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of natural products**, United States, v. 79, n. 3, p. 629–661, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b01055>

NUBBEDB. **NUBBE Data Base**. [s. l.], 2017.

OKUDA, T.; BAES, A. U.; NISHIJIMA, W.; OKADA, M. Isolation and characterization of coagulant extracted from Moringa oleifera seed by salt solution. **Water Research**, v. 35, n. 2, p. 405–410, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(00\)00290-6](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00290-6)

OMS. Traditional medicine: definitions. **Organização Mundial de Saúde**, 2008.

PASSOS, G. F.; FERNANDES, E. S.; DA CUNHA, F. M.; FERREIRA, J.; PIANOWSKI, L. F.; CAMPOS, M. M.; CALIXTO, J. B. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, n. 2, p. 323–333, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.09.032>

PAUL, S. M.; MYTELKA, D. S.; DUNWIDDIE, C. T.; PERSINGER, C. C.; MUNOS, B. H.; LINDBORG, S. R.; SCHACHT, A. L. How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. **NATURE REVIEWS | DRUG DISCOVERY**, v. 9, p. 203, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrd3078>. Acesso em: 18 ago. 2020.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à espectroscopia**. 4ª edição ed. [S. l.]: CENGAGE, 2010. E-book. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?id=cYwgRAAACAAJ>

PEREIRA, P. S.; BARROS, L. M.; BRITO, A. M.; DUARTE, A. E.; MAIA, A. J. Uso da Myracrodruon urundeuva Allemão (aroeira do sertão) pelos agricultores no tratamento de doenças. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. v. 19, p. 51–60, 2014.

PILON, A. C.; VALLI, M.; DAMETTO, A. C.; PINTO, M. E. F.; FREIRE, R. T.; CASTRO-GAMBOA, I.; ANDRICOPULO, A. D.; BOLZANI, V. S. NuBBEDB: an updated database to uncover chemical and biological information from Brazilian biodiversity. **Scientific reports**, England, v. 7, n. 1, p. 7215, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07451-x>

PINTO, A. C.; BARREIRO, E. J. DESAFIOS DA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA BRASILEIRA. **Quim. Nova**, v. 36, n. 10, p. 1557–1560, 2013.

PITSCHMANN, V. Overall View of Chemical and Biochemical Weapons. **Toxins**, v. 6, n. 6, p. 1761–1784, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/toxins6061761>. Acesso em: 17 dez. 2019.

PONTES, S. M.; SOUZA, A. P. M.; BARRETO, B. F.; OLIVEIRA, H. S. B.; OLIVEIRA, L. B. P. de; SARAIVA, A. M.; COSTA, D. A. da; CARMO, E. S. Utilização de plantas medicinais potencialmente nocivas durante a gestação na cidade de Cuité-PB. **Com. Ciências Saúde**, v. 23, n. 4, p. 305–311, 2012.

PUSHPAKOM, S. *et al.* Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. **NATURE REVIEWS | DRUG DISCOVERY**, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.168>. Acesso em: 18 ago. 2020.

RANG, H. P.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON, G. **Farmacologia**. 8ª edição ed. [S. l.]: ELSEVIER, 2016.

REIS, C.; CAPANEMA, L. X. de L.; PALMEIRA FILHO, P. L.; PIERONI, J. P.; SOUZA, J. O. B. de; SILVA, L. G. da. Biotecnologia para saúde humana: tecnologias, aplicações e inserção na indústria farmacêutica. 2009.

RIBEIRO, D. .; MACÊDO, D. G.; OLIVEIRA, L. G. S.; SARAIVA, M. E.; OLIVEIRA, S. F.; SOUZA, M. M. A.; MENEZES, I. R. . Potencial terapêutico e uso de plantas medicinais em uma área de Caatinga no estado do Ceará, nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 4, p. 912–930, 2014. Disponível em: [https://doi.org/10.1590/1983-084X/13\\_059](https://doi.org/10.1590/1983-084X/13_059). Acesso em: 15 nov. 2019.

RODRIGUES, M. P. Efeitos do óleo de neem (*Azadirachta indica*) sobre o crescimento in vitro e produção de ocratoxina A por cepas de *Aspergillus carbonarius*. **Repositório UFMG**, 2019.

SANTOS, S. L. F. dos; ALVES, H. H. da S.; BARROS, K. B. N. T.; PESSOA, C.

V. Uso de Plantas Medicinais nos Serviços do Sistema Único de Saúde: Uma Revisão Narrativa. **RSC online**, 2016.

SILVA, C. G. A. da; COLLINS, C. H. Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes. **Química Nova**, v. 34, n. 4, p. 665–676, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422011000400020>

SILVA, E. C. O. da. **Avaliação in vitro de alterações biomecânicas e bioquímicas induzidas por fármacos em células utilizando microscopia de força atômica**. 2019. - UFAL, Maceió, 2019.

SILVA, M. M.; OLIVEIRA, M. C.; COUTO, V. F.; MOREIRA, T. M.; COELHO, Y. N.; NUNES, C. P. O Uso Crônico de Anti-Inflamatórios não-esteroidais e seus Efeitos Adversos. **Cadernos da Medicina - UNIFESO**, v. v. 2, 2019.

SINDUSFARMA. **RELATÓRIO ANUAL SINDUSFARMA 2019**. [s. l.], 2019. Disponível em: [https://sindusfarma.org.br/uploads/Publicacoes/RAA\\_2020\\_pdf\\_01mar20.pdf](https://sindusfarma.org.br/uploads/Publicacoes/RAA_2020_pdf_01mar20.pdf). Acesso em: 11 jun. 2020.

SINDUSFARMA. **Perfil da indústria farmacêutica - SINDUSFARMA 2020**. [s. l.], 2020. Disponível em: [https://sindusfarma.org.br/uploads/Publicacoes/Perfil\\_IF2020\\_PORT.pdf](https://sindusfarma.org.br/uploads/Publicacoes/Perfil_IF2020_PORT.pdf). Acesso em: 11 jun. 2020.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica**. 10ª edição ed. Rio de Janeiro: LTC, 2012.

SOUSA, L. F. B. de; MELO, A. de. Benefícios da Moringa oleifera para a Saúde Humana e Meio Ambiente. **Revista Faculdades do Saber**, v. 04, p. 472–484, 2019.

URIBE-CLAVIJO, M.; OSPINA-MEDINA, L. F.; ÁLVAREZ-GOMEZ, Á. M.; CORTÉS-MANCERA, F. M.; CADAVID-JARAMILLO, Á. P.; CARDONA-MAYA, W. D. Espermicidas: Una Alternativa de Anticoncepción para Considerar. **Rev. TecnoLógicas**, n. 28, p. 129–145, 2012.

VALLI, M.; SANTOS, R. N. dos; FIGUEIRA, L. D.; NAKAJIMA, C. H.; CASTRO-GAMBOA, I.; ANDRICOPULO, A. D.; BOLZANI, V. S. Development of a natural products database from the biodiversity of Brazil. **Journal of natural products**, United States, v. 76, n. 3, p. 439–444, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/np3006875>

VARELLA, D. **Principais tipos de anti-inflamatórios**. [s. l.], 2019. Disponível em: <https://drauziovarella.uol.com.br/medicamentos/principais-tipos-de-anti-inflamatorios/>. Acesso em: 12 jun. 2020.

VELÁZQUEZ-ZAVALA, M.; PEÓN-ESCALANTE, I. E.; ZEPEDA-BAUTISTA, R.; JIMÉNEZ-ARELLANES, M. A. Moringa (Moringa oleifera Lam.): Potential uses in

agriculture, industry and medicine. **Revista Chapingo, Serie Horticultura**, v. 22, n. 2, p. 95–116, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2015.07.018>

VIANA, G. D. A.; SAMPAIO, C. D. G.; MARTINS, V. E. P. Produtos naturais de origem vegetal como ferramentas alternativas para o controle larvário de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. **Journal of Health & Biological Sciences**, v. 6, n. 4, p. 449, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.12662/2317-3076jhbs.v6i4.2079.p449-462.2018>. Acesso em: 17 dez. 2019.

VICENTE-MANZANARES, M.; SÁNCHEZ-MADRID, F. Role of the cytoskeleton during leukocyte responses. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 2, p. 110–122, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nri1268>

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. da S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326–337, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000200025>. Acesso em: 21 nov. 2019.

ZERAIK, M. L.; QUEIROZ, E. F.; MARCOURT, L.; CICLET, O.; CASTRO-GAMBOA, I.; SILVA, D. H. S.; CUENDET, M.; BOLZANI, V. da S.; WOLFENDER, J.-L. Antioxidants, quinone reductase inducers and acetylcholinesterase inhibitors from *Spondias tuberosa* fruits. **Journal of Functional Foods**, v. v. 21, p. 396–405, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.12.009>