

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Determinação de ácidos triterpênicos na casca de *Malus × domestica* e avaliação do potencial de seus derivados semissintéticos como inibidores da Ca²⁺-ATPase (*PfATP6*)

ANDREIA CRISTINA WILDNER CAMPOS LOPES

Porto Alegre, 2017.

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

Determinação de ácidos triterpênicos na casca de *Malus × domestica* e avaliação do potencial de seus derivados semissintéticos como inibidores da Ca²⁺-ATPase (PfATP6)

Tese apresentada por **Andreia Cristina Wildner Campos Lopes** para obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Maria Bergold
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Simone Baggio Gnoatto

Porto Alegre, 2017.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 24 de agosto de 2017, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof^a. Dr^a. Aline Zimmer

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Prof^a. Dr^a. Claudia Elizabeth Thompson

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA)

Prof. Dr. Daniel Fábio Kawano

Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

CIP - Catalogação na Publicação

Wildner Campos Lopes, Andreia Cristina
Determinação de ácidos triterpênicos na casca de
Malus x domestica e avaliação do potencial de seus
derivados semissintéticos como inibidores da Ca²⁺-
ATPase (PfATP6) / Andreia Cristina Wildner Campos
Lopes. -- 2017.

205 f.

Orientadora: Ana Maria Bergold.

Coorientadora: Simone Gnoatto.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-
Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-
RS, 2017.

1. Química Farmacêutica. 2. Modelagem Molecular.
3. LC-MS. 4. Triterpenos. I. Bergold, Ana Maria,
orient. II. Gnoatto, Simone, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Química Farmacêutica do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFRGS, no Laboratório do Grupo de Química Teórica do Instituto de Química da UFRGS e no Centro Nacional de Supercomputação – CESUP/UFRGS. A autora recebeu bolsa CAPES.

Dedicatória

Aos meus pais, Pedro e Lisa, pelo constante incentivo.

AGRADECIMENTOS

Ao meu marido João e filhos, Thiago e Camila. Sem vocês seria impossível enfrentar qualquer desafio. Eu amo muito vocês.

À Prof^a. Dra. Ana Maria Bergold pela orientação, confiança, exemplo de vida, ensinamentos que transcendem o ambiente de trabalho e pela amizade.

À Prof^a Dr^a Simone Baggio Gnoatto pela co-orientação, revisão crítica e palavras de estímulo que tornaram essa caminhada mais leve e prazerosa.

Ao Prof. Dr. Paulo Augusto Netz, pela contribuição inestimável, atenção e oportunidade de trabalhar em seu laboratório, sem os quais esse trabalho não seria possível e que me proporcionou crescimento profissional.

À Equipe da EMBRAPA – Uva e Vinho, pela cordial receptividade, todo o empenho e contribuição que tornaram esse estudo possível.

À colega Vanessa Petry do Canto, pela imensa ajuda, paciência, tempo e amizade que proporcionaram aprender mais e ousar em outro campo do conhecimento.

À colega Pâmela Ferreira pela ampla colaboração, amizade e consolo nas horas difíceis.

Aos colegas Luis Andre Baptista, Sendy S. Oliveira, Ícaro Simon, Tiago Espinosa, Felipe D'Avila, Maíra K. Santos, Graciela Carlos, Ricardo Rocha, Fernanda Salazar, Marcella Oliveira, Vanessa Argoud pela colaboração, momentos de alegria e discussões científicas.

Aos funcionários e amigos Inélia, Viviane e Mariele pela colaboração e amizade.

A todos que colaboraram de alguma maneira para a conclusão desta tese e que não foram citados.

RESUMO

Determinação de ácidos triterpênicos na casca de *Malus × domestica* e avaliação do potencial de seus derivados semissintéticos como inibidores da Ca^{2+} -ATPase (PfATP6).

Esta tese alia dois enfoques principais dentro da Química Farmacêutica. Por um lado, busca explorar uma nova fonte de insumos naturais, cascas de *Malus × domestica*, com vistas a obtenção dos triterpenos ácidos ursólico (AU) e betulínico (AB); e por outro lado, estuda a relação dos derivados triterpênicos semissintéticos obtidos com a proteína-alvo (PfATP6) destacada atualmente na literatura da terapia da malária com vistas ao planejamento de novos antimaláricos.

O primeiro Capítulo inclui o desenvolvimento de um método eficiente, fácil e extremamente rápido onde são combinadas as técnicas de extração por ultrassom (UAE) e análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Detector de Espectroscopia de Massas (LC-MS), para identificação e doseamento dos ácidos ursólico (AU) e betulínico (BA) em extratos de cascas frescas de maçã de cinco clones das cultivares Gala e Fuji (“Baigent”, “Fuji Mishima”, “Fuji Suprema”, “Fuji Select” and “Maxi Gala”) oriundas da Região Sul do Brasil. Os parâmetros cromatográficos do método analítico incluem: ionização por eletro spray em modo positivo (ESI+), fluxo de 1,0 mL/min, em modo de eluição isocrático, consistindo de 80% acetonitrila e 20% acetato de amônio 10 mM em pH 6,0 e temperatura ambiente. O método desenvolvido foi validado e mostrou ser seletivo, sensível (LOD e LOQ de 0,087 e 0,266 µg/mL para BA, e 0,398 e 2,117 µg/ mL para UA), coeficiente de regressão linear ($r > 0.99$), preciso, exato e robusto para os analitos de interesse. A otimização do método combinado de UAE com LC-MS permitiu concluir os procedimentos de extração e análise em tempo inferior a 4 h, uma vez que o método não requer a secagem da amostra, etapa que demanda longos tempos de processamento. Este método foi aplicado e forneceu a primeira caracterização fitoquímica dos cinco clones de maçã estudados. Os resultados demonstraram que o método combinado de UAE-LC-MS é adequado às práticas do controle de qualidade.

O segundo Capítulo apresenta o estudo da interação dos ligantes semissintéticos derivados dos AU e AB, sintetizados pelo nosso grupo de pesquisa, com a proteína Ca^{2+} -ATPase do *Plasmodium falciparum* (PfATP6), através do emprego da técnica de

Docking Molecular. A PfATP6 é descrita como um importante alvo para novos antimaláricos como Artemisinina (ART), cujo mecanismo de ação inclui, dentre outros, a modulação da homeostasia do cálcio intracelular. Investigações conduziram à hipótese do extravasamento do cálcio, do interior do retículo sarco-endoplasmático como mecanismo plausível para ação dos derivados triterpênicos do AU e AB. Os escores de energia determinados no *Docking*, de cada um dos nove ligantes (derivados triterpênicos) e quatro compostos de controle (ácidos ursólico e betulínico, artemisinina (ART) e tapsigargina (TPG) foram determinados (análises realizadas em triplicata) e correlacionados com os valores de IC₅₀, para a atividade antimalárica. Os resultados mostraram excelente correlação entre os escores de energia (com a PfATP6) e os valores de IC₅₀, superior a 80% ($r > 0,83360$). O estudo fornece fortes evidências de que a PfATP6 pode constituir um alvo para os derivados pentacíclicos do estudo, bem como permitiu identificar o perfil conformacional dos ligantes e os principais resíduos do sítio de ligação (SL) da PfATP6 envolvidos nas interações; bem como, contribuiu para a melhor compreensão das propriedades envolvidas na interação do ligante com o receptor e mecanismo de ação.

O terceiro Capítulo faz uso de Métodos Clássicos e Quânticos para descrever as mudanças conformacionais da proteína PfATP6. As simulações de Dinâmica Molecular do receptor na forma isolada e complexada com os ligantes foram realizadas durante 10 ns. As conformações finais obtidas para os receptores foram avaliadas em termos RMSD, efeito da presença dos ligantes no sítio de ligação e tipos de interações estabelecidas entre o ligante e o receptor. Os resultados mostraram que as proteínas PfATP6 e SERCA tendem a manter sua conformação nativa e que o modelo utilizado é adequado aos propósitos do estudo. O monitoramento dos resíduos da região citoplasmática das proteínas permitiu evidenciar o efeito alostérico da presença dos ligantes AU e ART no SL, sobre os domínios A e N, da PfATP6. Esse efeito reproduz as conformações E1 e E2, bem estabelecidas para PfATP6, na presença e ausência de Ca²⁺. As análises de Dinâmica Molecular corroboram os achados do Capítulo II ao evidenciarem o estabelecimento de interações de hidrogênio com os resíduos importantes do SL da PfATP6. Esses resultados fundamentam os indícios de que as bombas de Ca²⁺-ATPase (SERCA), possam ser de fato, um alvo para os derivados triterpênicos dos AU e AB.

Palavras chave: Ácido ursólico, ácido betulínico, *Malus × domestica*, LC-MS, Modelagem Molecular, *Docking Molecular*, Dinâmica Molecular, PfATP6

ABSTRACT

Determination of triterpenic acids in the apple peel of *Malus × domestica* and evaluation of the potential of their semi-synthetic derivatives as Ca²⁺-ATPase inhibitors (*PfATP6*).

This thesis combines two main focuses within Pharmaceutical Chemistry. On the one hand, it seeks to explore a new source of natural inputs, bark of *Malus domestica*, in order to obtain ursolic (UA) and betulinic acid (BA) triterpenes. On the other hand, it studies the relation of the semi-synthetic triterpenic derivatives obtained with the target proteins (*PfATP6*), currently highlighted in the literature on malaria therapy with a view to planning new antimalarial drugs.

The first chapter includes the development of an efficient, easy and extremely fast method where ultrasonic extraction techniques (UAE) and high-performance liquid chromatography coupled to mass spectroscopy (LC-MS) are combined for identification and assay of ursolic acid (UA) and betulinic acid (BA) in fresh apple peel extracts from five clones of the Gala and Fuji cultivars (Baigent, Fuji Mishima, Fuji Suprema, Fuji Select and Maxi Gala ") in the Southern Region of Brazil. Chromatographic parameters of the analytical method include: electrospray ionization (ESI +), flow rate of 1.0 mL/min in isocratic elution mode, consisting of 80% acetonitrile and 20% 10 mM ammonium acetate at pH 6.0 and room temperature. The method was validated and proved to be selective, sensitive (LOD and LOQ of 0.087 and 0.266 µg/mL for BA, and 0.398 and 2.117 µg/mL for UA), linear regression coefficient ($r > 0.99$), accurate, robust for analytes of interest. The optimization of the combined method of UAE with LC-MS allowed to complete the procedures of extraction and analysis in less than 4 h, since the method does not require drying the sample, a stage that demands long processing times. This method was applied and provided the first phytochemical characterization of the five apple clones studied. The results demonstrated that the combined UAE-LC-MS method is suitable for quality control practices.

The second chapter presents the study of the interaction of the semi-synthetic ligands derived from the UA and BA, synthesized by our research group, with the *Plasmodium falciparum* Ca²⁺-ATPase protein (*PfATP6*), using the Molecular *Docking* technique. *PfATP6* is described as an important target for new antimalarials such as Artemisinin

(ART), whose action mechanism includes, among others, the modulation of intracellular calcium homeostasis. Investigations led to the hypothesis of extravasation of calcium from the interior of the sarco-endoplasmic reticulum as a plausible mechanism for the action of the triterpenic derivatives of UA and BA. The *Docking* energy scores (binding energy) of each of the nine ligands (triterpenic derivatives) and four control compounds (ursolic and betulinic acids, artemisinin (ART) and taspigargin (TPG)) with PfATP6, were calculated (analyses performed in triplicate) and correlated with its antimalarial IC₅₀ value. The results showed an excellent correlation between energy scores (with PfATP6) and IC₅₀ values, higher than 80% ($r > 0.83360$). The study supplies strong evidence that PfATP6 may be a target for the pentacyclic derivatives of the study, and also allowed identifying the conformational profile of the ligands and the main residues of the PfATP6 binding site (BS) involved in the interactions. It further contributed to a better understanding of the properties involved in the interaction of the ligand with the receptor and its action mechanism.

The third chapter uses Classical and Quantum Methods to describe the conformational changes of the PfATP6 protein. The Molecular Dynamics simulations of the receptor in the isolated and complexed form with the ligands were performed for 10 ns. The final conformations obtained for the receptors were evaluated in RMSD terms, effect of the presence of ligands at the binding site and types of interactions established between the ligand and the receptor. The results showed that the PfATP6 and SERCA proteins tend to maintain their native conformations and that the model used is adequate for the purposes of the study. The monitoring of the residues of the cytoplasmic region of the proteins allowed evidencing the allosteric effect of the presence of UA and ART ligands in BS, on the A- and N-domains of PfATP6. This effect reproduces the well-established E1 and E2 conformations for PfATP6, in the presence and absence of Ca²⁺, respectively. Molecular Dynamics analyses corroborate the findings of Chapter II, by showing the possibility of establishing hydrogen interactions with the important residues of PfATP6 BS. These results support the evidence that Ca²⁺-ATPase (SERCA) pumps may be a target for the triterpenic derivatives of UA and BA.

Keywords: Ursolic acid, betulinic acid, *Malus × domestica*, LC-MS, Molecular Modeling, Molecular *Docking*, Molecular Dynamics, PfATP6

LISTA DE FIGURAS

Figura-3.1: Cultivares Gala (A) e Fuji (B). Fonte EMBRAPA/RS – Uva e vinho.

Figura-3.2: Representação das estruturas dos triterpenos pentacíclicos AU (A) e AB (B).

Figura 3.3: Representação da estrutura do derivado do AU que demonstrou atuar na r na modulação da homeostasia do Ca^{2+} .

Figura-3.4: Países endêmicos para a malária em 2000 e 2016.

Figura-3.5: Dados Epidemiológicos para Malária na Região Amazônica.

Figura-3.6: Dados Epidemiológicos para Malária na Região Extra-Amazônica.

Figura-3.7: Estrutura da enzima SERCA do músculo esquelético de mamífero (A) e modelo obtido por homologia da PfATP6 (B).

Figura-3.8: Representação esquemática do ciclo de transporte do Ca^{2+} na PfATP6 e conformações correlatas (E1 e E2).

Figura-3.9: Principais etapas do Método Modelagem por Homologia.

Figura-4.1: Clones das cultivares Gala e Fuji: Baigent, Fuji Mishima, Fuji Suprema, Fuji Select, Maxi Gala.

Figura-4.2: Cromatogramas típicos dos clone e soluções da SQR's obtidos através do desenvolvido por LC–MS.

Figura-4.3: Representação em gráfico de barras do conteúdo de cada analito nos clones estudados.

Figura-5.1: Sobreposição das estruturas das proteínas PfATP6 (1U5N) e SERCA (1SU4).

Figura-5.2: Descrição da estrutura da proteína PfATP6.

Figura-5.3: Representação esquemática da estrutura dos compostos triterpênicos.

Figura-5.4: Sobreposição das estruturas 3D das proteínas PfATP6 e SERCA (em azul), com a indicação dos resíduos do SL para antimaláricos clássicos.

Figura-5.5: Representação esquemática da estratégia de *Docking* adotada neste trabalho.

Figura-5.6: Gráfico da comparação dos resultados *in silico* x *in vitro*.

Figura-5.7: Representação do *Docking* do ligante AU no Sítio de ligação da PfATP6.

Figura-5.8: Representação das conformações mais favoráveis dos ligantes ART (A) e TPG (B).

Figura-5.9: Representação da conformação mais favorável do ligante AU10, no SL da PfATP6.

Figura-5.10: Representação dos sítios de ligação dos compostos triterpênicos na PfATP6.

Figura-6.1: Representação das estruturas de partida dos ligantes utilizados nas simulações de dinâmica molecular.

Figura-6.2: Sobreposição das estruturas inteiras das proteínas PfATP6 e SERCA antes e depois da simulação de 10 ns.

Figura-6.3. Sobreposição das quatro estruturas inteiras das proteínas PfATP6 e SERCA antes e depois da simulação de 10 ns.

Figura-6.4: Sobreposição dos frames dos domínios citosólicos das proteínas PfATP6 e SERCA antes e depois da simulação de 10 ns.

Figura-6.5: Sobreposição dos frames da proteína PfATP6 antes e depois da simulação de 50 ns

Figuras-6.6: Frames do complexo PfATP6-AU10 nos instantes iniciais e aos 10 ns de simulação.

Figuras-6.7: Frames do complexo PfATP6-ART nos instantes iniciais e aos 10 ns de simulação.

Figura-6.8: Gráficos de RMSD no tempo de simulação de 10ns.

Figura-6.9: Gráfico do RMSD no tempo de simulação de 50ns, para a proteína PfATP6.

Figura-6.10: Gráfico do RMSD no tempo de simulação de 50ns, para o sítio de ligação da proteína PfATP6.

Figura-6.11: Sobreposição da região do capacete citosólico da proteína PfATP6.

Figura-6.12: Gráfico do monitoramento das distâncias entre os domínios A e N das proteínas PfATP6 (preto) e SERCA (vermelho).

Figura-6.13: Gráfico do monitoramento das distâncias entre os domínios A e N, da proteína PfATP6, em 10 ns simulação.

Figura-6.14: Estrutura da proteína PfATP6 e destaque para sítio de ligação com os resíduos monitorados em 10 ns de simulação.

Figura-6.15: Gráficos do monitoramento das distâncias entre os pares de resíduos do sítio de ligação da PfATP6.

Figura-6.16. Representação das estruturas dos compostos AU10 e ART, utilizadas no monitoramento das distancias no SL da PfATP6.

Figura-6.17: Gráficos das distâncias entre o átomo **C18** do ligante AU10 e os resíduos do sítio de ligação da PfATP6.

Figura-6.18: Gráficos das distâncias entre o átomo **C4** do ligante ART e os resíduos do sítio de ligação da PfATP6.

Figura-6.19: Representação das estruturas dos ligante AU10 e ART e os resíduos selecionados para verificação das ligações de hidrogênio.

Figura-6.20: Distribuição das ligações de hidrogênio dos complexos estudados.

Figura-6.21: Gráficos das distâncias entre o AU10 e os resíduos do SL da PfATP6.

Figura-6.22: Gráficos das distâncias entre o grupamento amino terminal de AU10 e os resíduos do SL da PfATP6.

Figura-6.23: Gráficos das distâncias entre o átomo **O1** do ligante ART e os resíduos do sítio de ligação da PfATP6.

Figura-6.24: Gráficos das distâncias entre o átomo **O3** do ligante ART e os resíduos do sítio de ligação da PfATP6.

Figura-6.25: Gráficos das distâncias entre o átomo **O4** do ligante ART e os resíduos do sítio de ligação da PfATP6.

Figura-7.1: Espectros de massa obtidos em modo SIM com ionização positiva das SQR's.

Figura-7.2: Representação do ligante AU10 no SL da PfATP6, após 10 ns de simulação.

LISTA DE TABELAS

Tabela-3.1: Resumo das principais técnicas analíticas apresentadas na literatura para detecção e doseamento de AB e AB.

Tabela-3.2: Alvos dos medicamentos antimaláricos

Tabela-3.3: Resolução e associação com informação estrutural.

Tabela-4.1: Calibration results of the LC-MS method for pentacyclic triterpene acid.

Tabela-4.2: Precision, accuracy and robustness of the LC-MS method for PCT acids in APE.

Tabela-5.1. Resíduos do SL da ART na SERCA e da região análoga na PfATP6.

Tabela-5.2: Escores de energia obtidos com o *Docking* do grid da região transmembrana.

Tabela-5.3: Resultados do *Docking fino* com a PfATP6.

Tabela-5.4: Resultados do *Docking fino* com a SERCA.

Tabela-5.6: Resultados do *blind Docking* com PfATP6.

Tabela-5.7: Resultados do *blind Docking* com SERCA.

Tabela-6.1: Lista de resíduos monitorados da região citosólica dos receptores PfATP6 e SERCA.

Tabela-6.2: Esquema dos sistemas analisados com os respectivos tempos de simulação.

Tabela-7.1: Esquema dos sistemas analisados e as simulações concluídas.

LISTA DE ABREVIATURAS

AB	Ácido betulínico
ADT	AutoDock Tools
APE	Extrato de casca de maçã
ART	Artemisinina
AU	Ácido ursólico
DW	Peso seco
ESI	Ionização por “electrospray”
FDA	Food and Drug Administration
FJ	Cultivar Fuji
GA	Cultivar Gala
HB	Ligação de hidrogênio
IE	Interação Eletrostática
MD	Dinâmica Molecular
PDB	Protein data bank
PCT	Pentaciclos tritepênicos
PfATP6	Enzima do retículo endoplasmático do <i>P. falciparum</i> (ATPase Ca ²⁺)
RMSD	Desvio Médio Quadrático
SERCA	Enzima do Retículo Sarco-endoplasmático de mamífero (ATPase Ca ²⁺)
SL	Sítio de Ligação
TPG	Tapsigargina
VDW	Van Der Waals
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	31
OBJETIVOS	37
2.1 OBJETIVO GERAL	39
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	41
3.1. MAÇÃ	43
3.1.1. ORIGEM	43
3.1.2. ORIGEM	43
3.1.3. CARACTERÍSTICAS	43
3.2. IMPORTÂNCIA ECONÔMICA	44
3.3. ASPECTOS NA SAÚDE	44
3.4. TRITERPENOS	45
3.5. EXTRATOS TRITERPÊNICOS.....	48
3.6. METODOLOGIAS ANALÍTICAS	49
3.7. MALÁRIA	52
3.7.1. ALVOS DOS ANTIMALÁRICOS	56
3.7.2. Ca ²⁺ -ATPase PfATP6 ALVO NOVOS ANTIMALÁRICOS	58
3.8. PfATP6	58
3.9. QUÍMICA COMPUTACIONAL	61
3.9.1. DOCKING MOLECULAR	62
3.9.2. DINÂMICA MOLECULAR	63
3.9.3. MODELAGEM POR HOMOLOGIA	65
4. CAPÍTULO I - DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO	71
4.1. INTRODUCTION	74
4.2. EXPERIMENTAL	75
4.2.1. CHEMICALS AND STANDARDS	75
4.2.2. PREPARATION OF REFERENCE SOLUTIONS	75
4.2.3. FRUIT MATERIAL	76
4.2.4. GRAVIMETRIC ANALYSIS	76
4.2.5. PREPARATION OF APPLE PEEL EXTRACTS (APE)	76
4.2.6. APPARATUS	77
4.2.7. METHOD VALIDATION	77
4.2.8. METHOD APPLICATION	79

4.3. RESULTS AND DISCUSSION	79
4.3.1. LC-MS METHOD OPTIMIZATION	79
4.3.2. LC-MS METHOD VALIDATION	81
4.3.3. EXTRACTION METHOD	83
4.3.4. LC-MS ANALYSIS OF APPLE PEEL EXTRACTS	84
4.5. CONCLUSION	86
5. CAPÍTULO II – <i>Docking Molecular</i> COM PfATP6 e SERCA	87
5.1. INTRODUÇÃO	89
5.2. MATERIAIS E MÉTODOS	92
5.2.1. CONSTRUÇÃO DOS LIGANTES	92
5.2.2. OBTENÇÃO DAS ESTRUTURAS DAS PROTEÍNAS	94
5.2.3. DOCKING MOLECULAR	95
5.2.4. METODOLOGIA	96
5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	97
5.4. CONCLUSÃO	110
6. CAPÍTULO III - DINÂMICA MOLECULAR	113
6.1 INTRODUÇÃO	115
6.2 MATERIAIS E MÉTODOS	116
6.2.1 SELEÇÃO DOS COMPLEXOS	116
6.2.2. OTIMIZAÇÃO E TOPOLOGIA DOS LIGANTES	117
6.2.3. DINÂMICA MOLECULAR	117
6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	119
6.3.1 ANÁLISE ESTRUTURAIS DAS PROTEÍNAS.....	119
6.3.2 DESVIO QUADRÁTICO MÉDIO (RMSD)	126
6.3.3 DISTÂNCIA ENTRE OS DOMÍNIOS	128
6.3.4 DISTÂNCIA ENTRE OS RESÍDUOS DO SL.....	132
6.3.5 LIGAÇÕES DE HIDROGÊNIO	138
6.4. CONCLUSÃO	147
7. DISCUSSÃO GERAL	149
8. CONCLUSÃO GERAL	161
9. REFERÊNCIAS	165

10. ANEXOS	181
ANEXO A:	183
ANEXO B:	185
ANEXO C:	187

Apresentação

A presente tese foi redigida na forma de capítulos, em conformidade com as normas vigentes no Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

A tese está organizada da forma como segue:

- Introdução e Relevância do Tema
- Objetivos: Geral e Específicos
- Revisão Bibliográfica
- Capítulos 1 a 3 artigos publicados e estudo em fase de conclusão.
- Discussão Geral
- Conclusão Geral
- Referências
- Anexos: Informação suplementar dos Artigo I e II.

A descoberta e o desenvolvimento de novos fármacos estão essencialmente fundamentados no isolamento, identificação e modificação de estruturas de compostos provenientes de fontes naturais. Cerca de 40% dos fármacos disponíveis atualmente são originários de plantas (BARNES; KUMAR; DAVIS, 2016). Nesta perspectiva, o controle de qualidade do material vegetal e das substâncias dele derivados assume vital importância para garantia da atividade farmacológica e utilização terapêutica destes medicamentos (CHANDRAN; SINGH, 2007; DOMINGUES et al., 2014; GORDALIZA, 2007; NEWMAN; CRAGG, 2012).

Os compostos triterpênicos, como ácidos ursólico (AU) e betulínico (AB) são metabólitos secundários de ampla ocorrência na natureza e reconhecida importância terapêutica, devido aos resultados promissores apresentados em estudos *in vitro* e *in vivo*, aliados à baixa toxicidade relativa para células eucarióticas. Recentemente, estas substâncias passaram a constituir matéria de extensivos estudos científicos, direcionados a descoberta de novos agentes bioativos (BRONIATOWSKI et al., 2014; HSU et al., 2015; KALANI et al., 2015; KASHYAP; TULI; SHARMA, 2016; SHANMUGAM et al., 2012). Dentre as propriedades terapêuticas destacadas na literatura científica recente, para os ácidos AB e AU e seus derivados, se encontram: atividade como antimaláricos (KALANI et al., 2015; VETAL; SHIRPURKAR; RATHOD, 2014; WOŹNIAK; SKĄPSKA; MARSZAŁEK, 2015; (MAZUMDER; TANAKA; FUKASE, 2013; MERTENS-TALCOTT et al., 2013) anti-inflamatórios (HUSSAIN et al., 2017; LEE et al., 2017) e antidiabéticos (SILVA, 2015; WU et al., 2014).

AU e AB são fitoconstituintes de ocorrência predominante nas cascas das frutas. Dentre as principais fontes promissoras de compostos triterpênicos bioativos, a maçã, espécie *Malus × domestica*, aparece entre as mais citadas, tendo em vista, o potencial favorável de extração da matriz, o crescente número de evidências terapêuticas associadas ao consumo da fruta e por tratar-se de uma fonte sustentável para obtenção de moléculas de interesse que sirvam ao propósito da semi-síntese: - novos derivados triterpênicos para fins terapêuticos (CHEN et al., 2015; DAR et al., 2016; DOMINGUES et al., 2014; JÄGER et al., 2009; WOZNIK; SKAPSKA;

MARSZALEK, 2015). As propriedades farmacoterapêuticas dos extratos triterpênicos das cascas de maçã são reconhecidas e têm orientado muitos estudos, *in vitro* e *in vivo* de avaliação da atividade terapêutica e identificação do mecanismo de ação dessas substâncias, bem como avaliação da contribuição de seus fitocompostos, para os efeitos observados. Dentre os efeitos benéficos para a saúde, reportados na literatura, incluem-se: a prevenção de diferentes tipos de câncer (BISHAYEE et al., 2011; LIBY; YORE; SPORN, 2007), ação antimicrobiana (HIRAMATSU et al., 2015; JYOTI et al., 2015) e anti-inflamatória (LINGARAJU et al., 2015; RÍOS, 2010). Contudo, até o momento, não se constatou a existência de um método analítico próprio, para determinação dos AU e AB em extratos de *M. domestica*, o que compromete a consistência dos teores dessas espécies na matriz e restringe a garantia da qualidade para o uso seguro desses extratos (FARMACOPÉIA, 2010).

A busca por novos antimaláricos constitui uma necessidade premente, tendo em vista, não só o caráter devastador da doença, mas a propriedade dos agentes etiológicos (*Plasmodium spp*) de desenvolverem resistência aos fármacos disponíveis. Segundo o relatório anual da Organização Mundial de Saúde (WHO), “*Malaria Report 2016*”, os índices de 2016, apontam 438 mil mortes e 214 milhões de novos diagnósticos positivos para a doença. Diante do exposto, o emprego da química computacional constitui um aliado poderoso à identificação de novos alvos antimaláricos, à compreensão do mecanismo de ação de novos derivados triterpênicos e ao estabelecimento dos requisitos essenciais para obtenção de novos agentes antimaláricos, mais eficazes e menos tóxicos (DA SILVA et al., 2013; PINK et al., 2005; ROSENTHAL, 2003; SILVA et al., 2015; WHO, 2016).

Estudos recentes realizados por nosso grupo de pesquisa evidenciaram o provável envolvimento de duas novas séries de antimaláricos, derivados dos AU e AB, na modulação da homeostasia do cálcio intracelular do *P. falciparum* (DA SILVA et al., 2013; INNOCENTE et al., 2012a). Investigações realizadas sobre a busca de novos alvos antimaláricos, através do emprego de ferramentas da química computacional, mostraram a ligação da artemisinina (ART), um antimalárico clássico, à enzima PfATP6 e destacam o papel fundamental desse alvo, na homeostasia do cálcio no *Plasmodium*

spp. (ECKSTEIN-LUDWIG et al., 2003a; JÄGER et al., 2009; O'NEILL; BARTON; WARD, 2010; SAFE et al., 2012; SHANDILYA et al., 2013; SUN et al., 2013).

Tendo em vista o potencial terapêutico promissor dos derivados dos AU e AB, e considerando-se tanto a necessidade do estabelecimento de uma metodologia analítica própria para detecção e doseamento dos precursores desses triterpenos nos extratos de *M. domestica*; bem como, de investigar o provável mecanismo de ação desses novos antimaláricos; esta tese apresenta o desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, acoplada com Detector de Espectroscopia de Massas (LC-MS) para a identificação e doseamento dos principais triterpenos pentacíclicos presentes naquela matriz. E finalmente, apresenta um estudo, onde se avalia através de ensaio *in silico*, o potencial da enzima PfATP6 como alvo desses novos antimaláricos.

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar metodologia analítica para identificação e quantificação simultânea dos ácidos ursólico e betulínico em extratos de casca de *Malus × domestica*, das cultivares GA e FJ, com vistas ao estudo Químico Farmacêutico de novos antimaláricos. E avaliar através de estudo *in silico*, o potencial dos derivados triterpênicos sintetizados pelo grupo de pesquisa GNOATTO, de interagirem com a proteína ATPase de Ca^{2+} de *Plasmodium falciparum* (PfATP6).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver e padronizar protocolo analítico para tratamento das amostras de cascas de maçã e extração dos analitos de interesse;
- Estabelecer e validar um método multianalito simples e sensível para análise de AU e AB em amostras de extrato de maçã, cultivares GA e FJ, por LC-MS;
- Aplicar o método na análise de extratos de cascas de maçã, de diferentes clones das cultivares Gala e Fuji;
- Estudar, através do emprego de métodos quânticos, como *Docking Molecular*, as interações entre os derivados triterpênicos do AU e AB (sintetizados pelo grupo de pesquisa GNOATTO) e o receptor PfATP6, a fim de identificar o possível sítio de ligação e o perfil conformacional dos ligantes.
- Utilizar métodos clássicos e quânticos para avaliar o perfil conformacional do complexo receptor-ligante, a partir da análise da estrutura tridimensional gerada por *Docking Molecular*.
- Consolidar protocolos de uso de ferramentas clássicas e quânticas para a análise da interação molecular entre os derivados semissintéticos com potencial antimalárico e o receptor PfATP6.

3.1. MAÇÃ

3.1.2. ORIGEM

A maçã (*Malus × domestica* Borkh) constitui uma das mais importantes culturas de frutas de ampla distribuição global (MCGHIE et al., 2012). A fruta faz parte da dieta de muitos povos e os primeiros relatos do cultivo para consumo humano, datam de cerca de 4000 anos, época em que foi introduzida na Europa e Norte da África (ZOHARY; HOPF; WEISS, 2000). A origem da maçã tal como a conhecemos atualmente é reportada à *Malus sieversii*, espécie silvestre identificada como ancestral progenitor e originária das florestas Tian Shan, na Ásia Central (CORNILLE et al., 2012). A evolução filogenética da *M. domestica*, em vários cultivares, está intimamente vinculada à história das migrações humanas e as relações comerciais (HARRIS; ROBINSON; JUNIPER, 2002; ROBINSON; HARRIS; JUNIPER, 2001).

3.1.3 CARACTERÍSTICAS

A espécie *M. domestica* pertence à família Rosaceae e compreende grande número de cultivares, atualmente são descritas mais de 7.000, porém poucas apresentam importância comercial. Dentre as principais, destacam-se: *Red Delicious*, *Golden Delicious*, *Granny Smith*, *Fuji*, *Gala*, *Braeburn*, *Pink Lady*, *Jonagold Elstar* (LV; TAHIR; OLSSON, 2016).

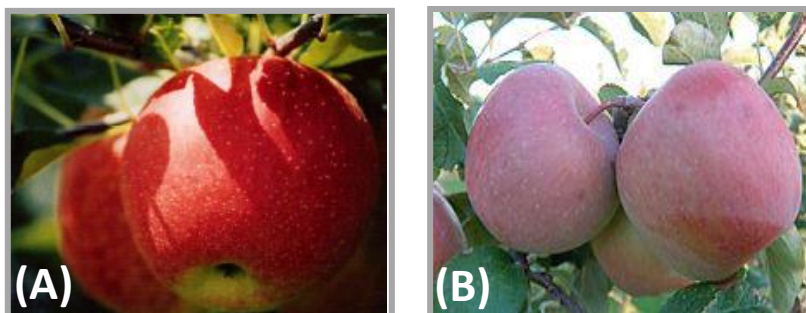
A macieira é uma árvore perene de clima temperado, que pode atingir 12 metros de altura, na idade adulta. As flores são brancas ou róseas e aromáticas. O fruto apresenta forma arredondada, coloração vermelha ou verde podendo apresentar pequenas manchas esverdeadas ou amareladas (AQUINO; BENITEZ, 2005). A colheita geralmente ocorre entre os meses de fevereiro a abril, podendo algumas cultivares precoces atingirem a maturação em dezembro. É uma planta sazonal, de clima temperado e tem como característica entrar em dormência (inativação fisiológica) no mês de julho, para florescer no mês de agosto. As baixas temperaturas nesta época são essenciais para garantir a uniformidade de brotação e floração (HAWERROTH et al., 2010; IUCHI et al., 2002). Apesar das inúmeras

variedades existentes, uma mesma árvore pode oferecer frutos com diferentes aproveitamentos, conforme suas características (TOBERGTE; CURTIS, 2013).

3.2. IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

A maçã está entre as três frutas de maior consumo no mundo (HODGSON et al., 2016). Estima-se que a produção mundial seja da ordem de 80 milhões toneladas/ano, por essa razão a maleicultura detém significativo valor econômico e social (LV; TAHIR; OLSSON, 2016; USDA, 2017). A produção brasileira em 2015 atingiu cerca de 1,2 mil toneladas, enquanto o Rio Grande do Sul contribui com cerca de 51% desse montante, com destaque para as cultivares *Gala* e *Fuji*, as quais compreendem as principais diversidades varietais do estado (**Figura-3.1**) (Site Oficial do Estado do RS, acessado em 02/08/2017).

Figura-3.1: Cultivares Gala (A) e Fuji (B). Fonte EMBRAPA/RS – Uva e vinho.



Do ponto de vista da importância para a dieta, a maçã é a terceira fruta mais consumida no Brasil e se estima que o consumo per capita seja da ordem de 6 Kg/habitante/ano (ABPM, 2017); valor ainda muito aquém do preconizado pela OMS, 14,6 Kg/habitante/ano.

3.3. ASPECTOS NA SAÚDE

Estudos epidemiológicos recentes têm associado o consumo da maçã à redução do risco de desenvolvimento de doenças crônicas como diabetes tipo II, doença cardiovascular (BABALOLA; SHODE, 2013), asma (LEE; MOON; KIM, 2010) e inclusive, o câncer (MERTENS-TALCOTT et al., 2013) (DING et al., 2004). Tais propriedades são associadas à grande quantidade de compostos

fenólicos e triterpenos, grupos de metabólitos secundários predominantemente encontrados na maçã (ANDRE et al., 2012).

Análises dos frutos da *M. domestica* sugerem a existência de maior concentração de fitoconstituintes na casca em comparação à polpa, cuja constituição inclui predominantemente, água e carboidratos (ESCARPA; GONZALEZ, 1998) (LEONTOWICZ et al., 2003). Por outro lado, a casca da maçã apresenta uma diversidade muito maior de substâncias e nutrientes, dentre os quais se destacam o elevado conteúdo de compostos triterpênicos, como: ácido ursólico, betulínico, oleanólico, maslínico e uvaol, como também alto teor de compostos fenólicos, entre eles: catequina, epicatequina (flavanol), quercetina (flavonol) e conjugados, rutina (flavonol glicosilado), floridzina (chalcona); antocianidinas. Além de vitaminas, proteínas e alguns metais (potássio, magnésio, cálcio) (AMZAD HOSSAIN et al., 2009; MA et al., 2005; SZAKIEL et al., 2012).

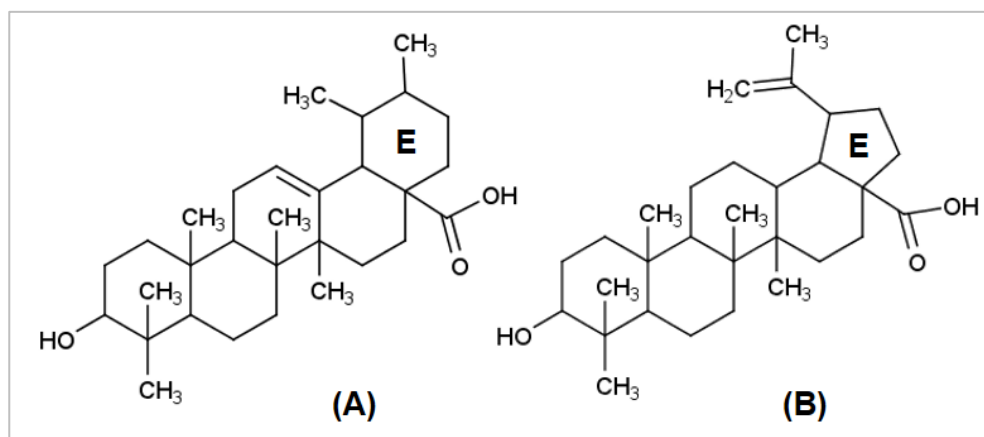
Contudo, se sabe que os valores nutricionais e a concentração dos fitoconstituintes da maçã são suscetíveis à influência de diversos fatores, como: condições de plantio, forma de colheita, variações meteorológicas, espécie, condições de armazenamento, dentre outras (ANDRE et al., 2012) (GRIGORAS et al., 2013) (LV; TAHIR; OLSSON, 2016).

3.4. TRITERPENOS

No reino vegetal, os triterpenos representam uma ampla família de compostos naturais, encontrados entre as camadas poliméricas epicuticular e intracuticular da película de cera que reveste as cascas das frutas, sementes, folhas e cascas de troncos. Aproximadamente 20 mil desses metabólitos secundários foram identificados até o momento (DZUBAK et al., 2006; HILL; CONNOLLY, 2013). Dentre estes, os triterpenos pentacíclicos emergiram como único grupo associado a distintas propriedades terapêuticas, demonstradas através dos promissores resultados obtidos em estudos *in vitro* e *in vivo* (SHANMUGAM et al., 2012; SHENG; SUN, 2011).

Os triterpenos pentacíclicos de maior importância, do ponto de vista farmacêutico, incluem os derivados da α -amirina, como ácido ursólico (AU) com anel-E, de 6C e o ácido betulínico (AB) com anel-E, de 5C. A estrutura desses compostos é caracterizada pelos 30 átomos de carbono constituintes e um núcleo triterpênico (**Figura-3.2**) (SOICA et al., 2014). Essas características determinam um amplo espectro de propriedades biológicas, dentre as quais se destaca a ação sobre membranas celulares, onde atuam alterando a permeabilidade ou causando sua destruição (SIMÕES et al., 1999).

Figura-3.2: Representação das estruturas dos triterpenos pentacíclicos AU (A) e AB (B).

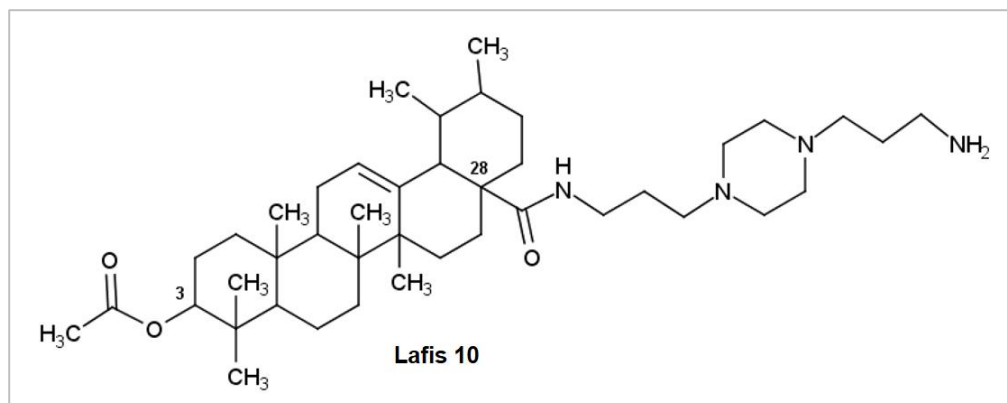


Aos triterpenos AU e AB e seus derivados têm sido reportado na literatura atividade contra muitas doenças importantes, como: antidiabético (SILVA, 2015), antitumoral (YANG., et al., 2014; HSU et al., 2015), anti-HIV (KASHIWADA et al., 2000), antimicrobiano (WANG et al., 2016) e antimalárico (KALANI et al., 2013a), inclusive envolvendo ensaios *in vitro* e *in vivo* (SELIM; LITINAS, 2015; WU et al., 2014; ZHU et al., 2001). Dentre esses trabalhos, destaca-se um estudo desenvolvido por XIANG e colaboradores (2015), onde é demonstrado o efeito antimetastático do AU e derivados contra várias cepas de células de câncer humano (fígado e melanoma). Segundo os autores o AU inibiu a proliferação de nove linhagens celulares (MHCC-97H, MHCC-97L, HepG2, M619, MDA-MB-231, MCF-7, HT29, SW620 e B16-F10), com valores de IC₅₀ entre 31,65-60,11 μ M. Outro estudo realizado com cultura de células PC-3 de câncer de próstata, mostrou

o efeito do AB e derivados, na inibição do crescimento celular e estimulação de apoptose. Nesse mesmo trabalho, o estudo conduzido *in vivo* com camundongos SCID, com câncer de próstata, estimulado pela inoculação de células da linhagem PC-3 e tratados com administração subcutânea, de derivados do AB (5 µg/g, 3 vezes na semana por 50 dias), mostraram inibição do crescimento celular (com valores de IC₅₀ = 17,2 µM para o AB e para seus derivados triterpênicos, IC₅₀ entre 39 - 64 µM) e efeito de redução do tamanho dos tumores (LI et al., 2015).

Recentemente, a atividade hipoglicemiante do AU foi investigada por SILVA e colaboradores (2015a), ao realizarem estudo *in vivo* com camundongos Wistar, tratados com dieta hiperglicêmica. Os autores sugerem, como mecanismo de ação do AU, o envolvimento na regulação da homeostasia da glicose, via modulação da secreção de insulina, através da sensibilização dos canais de cálcio. Em outro estudo, o triterpeno natural AU mostrou atividade antimicrobiana *in vitro* contra *Bacillus cereus* na concentração inibitória mínima (MIC) de 2 µg/mL; e efeito sinérgico aos antimicrobianos β-lactâmicos ampicilina e tetraciclina contra *Staphylococcus aureus*, segundo os autores os triterpenos exercem atividade antimicrobiana através de um mecanismo diferente dos β-lactâmicos e por essa razão são considerados agentes terapêuticos promissores (WANG et al., 2016). Aos triterpenos pentacíclicos AU, AB e seus derivados têm sido reportado importante efeito antimalárico. Derivados semissintéticos dos AU e AB com modificações em C3 e C28 mostraram atividade importante contra cepas 3D7 de *P. falciparum* sensíveis à cloroquina com IC₅₀ = 0,25 nM, sem apresentar citotoxicidade. Estes derivados foram cerca de cinco vezes mais ativos do que os compostos precursores naturais (DA SILVA et al., 2013). Estudo semelhante, revelou o envolvimento dos derivados semissintéticos do AU na modulação da homeostasia do cálcio. Segundo os autores, o novo derivado semissintético promoveu o aumento do cálcio intracelular no *P. falciparum* (INNOCENTE et al., 2012; SILVA et al.; 2015b) (**Figure 3.3**).

Figura 3.3: Representação da estrutura do derivado do AU ($IC_{50} = 175$ nM), que demonstrou atuar na modulação de uma ou mais vias de cálcio em *P. falciparum* (3D7) (INNOCENTE et al., 2012a). b



3.5. EXTRATOS TRITERPÊNICOS

A presença de compostos triterpênicos, em especial ácidos ursólico e betulínico, na casca da maçã é reconhecida e tem orientado a investigação sobre sua contribuição para o benefício da saúde humana. Recentemente, estas substâncias passaram a atrair atenção da comunidade científica, graças ao potencial farmacológico promissor dos extratos (fração dos triterpenos) obtidos a partir daquela matriz, apresentados tanto em estudos *in vitro* como *in vivo*, na terapia de doenças importantes. Dentre as propriedades farmacológicas reportadas aos extratos de cascas de maçã e associadas aos constituintes triterpênicos incluem-se: a prevenção de diferentes tipos de câncer (BISHAYEE et al., 2011; LIBY; YORE; SPORN, 2007; SALVADOR et al., 2012) ação antimicrobiana (SELIM; LITINAS, 2015) e anti-inflamatória (RÍOS, 2010). A exemplo, YOON e colaboradores (2012) reportam, em ensaio *in vitro*, a propriedade dos extratos de casca de maçã de bloquearem a ativação das células NF- κ B induzidas por células TNF- α , em células de câncer de mama da linhagem MCF-7. Por sua vez, DING e colaboradores (2013), demonstraram a propriedade antioxidante do extrato de casca de maçã em ratos e o efeito antiproliferativo sobre células de câncer JB6, em estudos *in vitro* e *in vivo*. Como antimicrobiano, JYOTI e colaboradores (2015), em estudo *in vitro* reportam, atividade inibitória do AU frente a cepas resistentes

de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (American type culture collection, ATCC 27294), através do emprego de “Ensaio colorimétrico de resazurina” e “Sistema MGIT 960 de detecção”, segundo os autores, para os dois métodos, a partir da concentração de 10,0 µg/mL, o AU inibiu o crescimento de H37Ra. Outro importante trabalho realizado por ANDRE e colaboradores (2012) destaca os resultados de estudo *in vitro*, onde foram comparados o potencial anti-inflamatório das frações fenólica e triterpênica de extratos de casca de maçã. Os autores constataram que extratos ricos em AU, AB e ácido oleanólico inibiram a atividade da citosina pró-inflamatória TN- α , com IC₅₀ de 13,2 e 11,7 µM respectivamente. Esses achados atribuem à fração triterpênica das cascas de maçã potencial anti-inflamatório superior à fração fenólica. Além disso, estudos recentes com humanos e animais sugerem que a ingestão de maçã pode afetar positivamente o metabolismo dos lipídios (NAGASAKO-AKAZOME et al., 2007; RAVNHAREN et al., 2013), o controle do peso (CONCEIÇÃO DE OLIVEIRA; SICHIERI; SANCHEZ MOURA, 2003) e a função vascular (GASPER et al., 2014). Mais recentemente, surgiram evidências a respeito dos mecanismos pelos quais os compostos triterpênicos, entre eles AU e AB, atuam na doença cardiovascular; esses achados sugerem a modulação da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO), através do estímulo à enzima óxido nítrico sintase (MARICA BAKOVIC, 2015; WALDBAUER et al., 2016).

3.6. METODOLOGIAS ANALÍTICAS

Muitas técnicas analíticas são apresentadas na literatura para identificação e doseamento de triterpenos pentacíclicos. Contudo, até o momento, os métodos analíticos apresentados na literatura para determinação de AU e AB em cascas de maçã, envolvem invariavelmente: a) longo tempo de preparo das amostras (Etapa Extração), b) o uso de agentes derivatizantes (aumento da complexidade) e c) longos tempos de corrida (superiores a 20 minutos). Neste sentido, dada a importância terapêutica dos extratos triterpênicos de cascas de maçã torna-se necessária a disposição de uma ferramenta eficiente, simples e rápida, adequada à

prática diária do controle de qualidade, para assim, garantir a qualidade dos extratos, a consistência dos compostos farmacologicamente ativos e uso seguro dessa matéria-prima para fins farmacêuticos (ZHANG et al., 2016).

Em virtude da ausência de grupamentos cromóforos fortes para os detectores de ultravioleta e fluorescência, a técnica de cromatografia a líquido acoplada ao detector de espectroscopia de massas (LC-MS) têm sido a mais explorada nos estudos envolvendo a detecção e doseamento de AU e AB em diferentes matrizes (ANDRE et al., 2012; LV; TAHIR; OLSSON, 2016; MCGHIE et al., 2012). Um resumo das principais técnicas analíticas e condições cromatográficas é apresentado na **Tabela-3.1**.

Tabela-3.1: Resumo das principais técnicas analíticas apresentadas na literatura para detecção e doseamento de AU e AB.

MÉTODO	ANALITO	MATRIZ	COLUNA	FASE MÓVEL	Tempo de Corrida	AUTOR
LC-DAD	Ácido ursólico; (derivatizante: brometo de 4-bromofenacil).	Extrato aquoso Ilex paraguariensis.	Novapack® FR, C18, (150 x 3,9 mm, 4 µm).	Água/Acetonitrila (70:30,v/v) Modo isocrático (λ = 254 nm). Temperatura: ambiente	20 min	(GNOATTO; SCHENKEL; BASSANI, 2005).
LC-DAD	Ácido ursólico e ácido oleanólico	Extrato alcoólico alcalino de casca de maçã	Waters © Symmetry Shield FR18 (250 x 4,6 mm, 5 µm)	Acetonitrila/ác. fosforico 1,25% (98:2 v/v) Modo isocrático (λ=206 nm), Temperatura = 30 °C	35 min	(TOSTES et al., 2016)
LC-DAD	Ácido ursólico, ácido oleanólico e ácido betulínico	Extrato de casca de maçã (etanol/ acetona)	Phenomenex© C18 (2) Luna (250 x 4.6 mm, 5 µm) (Torrance, CA, USA)	Metanol/água/ácido fosforico (88:11,95:0,5, v/v/v) Modo isocrático (λ = 210 nm) Temperatura: 35 °C	20 min	(ANDRE et al., 2013)
LC-MS	Ácidos ursólico, oleanólico, betulínico	Extrato etanólico de casca da maçã.	Agilent® Zorbax SB C18 (2.1 x 100 mm, 1.8 µm)	(A)Água/ác. fórmico (0.5%); (B) Acetonitrile Modo gradiente Temperatura: 50 °C	40 min	(MCGHIE et al., 2012)
LC-MS	Ácidos ursólico, maslínico, oleanólico, betulínico, corosólico, macássico, asiático, alfitólico.	Extrato metanólico de Ugni molinae	Merck® GmbH Hibar Purospher Star FR C18 (250 x 4 mm, 5 µm)	(A)Água/ác.fórmico (0,1%) (B) Acetonitrila/ác. fórmico (0,1%). Modo gradiente Temperatura: ambiente	55 min	(AGUIRRE; DELPORTE, 2013)
LC-MS	Betulina, ácidos ursólico, oleanólico, oleanólico-3-cis-cafeato betulínico, betulínico-3-cis-cafeato,	Extrato etanólico de casca da maçã; Extrato etanólico da polpa da maçã.	Agilent© ZORBAX SB-C18 (50 x 2.1 mm, 1.8 µm)	(A)Água/ácido formico (100:0.1, v/v) (B) Metanol Modo gradiente. Temperatura: 30 °C	20 min	(HE et al., 2014)
LC-CAD	Ácidos ursólico, oleanólico, betulínico	Ácidos ursólico, oleanólico, betulínico	Acclaim™ C30, (250 x 4.6 mm, 5 µm)	(A)Água/acetato de amônio (1%) (B)Acetonitrila/methanol (750 : 250) Modo Gradiente Temperatura: ambiente	25 min	(PLANTE et al., 2012)

3.7. MALÁRIA

A malária é uma doença infecciosa de caráter agudo e crônico, causada por protozoários do gênero *Plasmodium spp.* (RUDRAPAL, 2011). O homem é o principal reservatório com importância epidemiológica para a malária humana. A doença é devastadora, evolui rapidamente e pode se manifestar como “malária clínica”, com episódios cíclicos de febre elevada, tremores intensos, calafrios, náusea, vômitos e dor generalizada. Contudo, algumas vezes, pode evoluir para “malária neurológica”, a forma mais severa, com alta taxa de letalidade, caracterizada pela síndrome neurológica, que pode levar ao coma, além de anemia aguda, hemorragia, edema pulmonar, comprometimento cardíaco, falência renal e hipoglicemia (FONTES, 2010; MILLER et al., 2002, 2013)

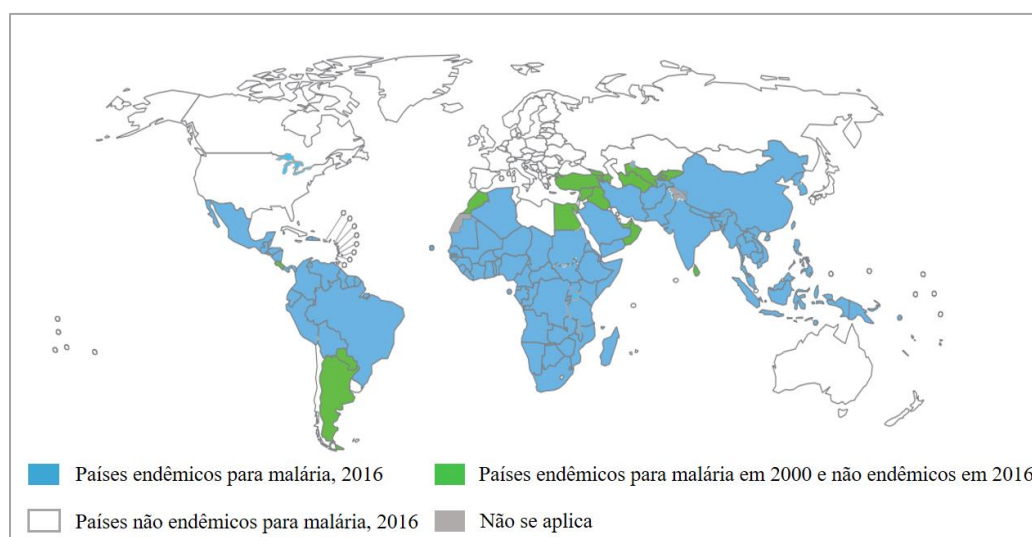
Quatro espécies de *Plasmodium* podem causar a malária humana: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale* (ORGANIZATION, 2015). Dentre elas, somente três são encontradas no Brasil: *P. vivax*, a espécie de maior frequência mundial, inclusive no Brasil; *P. falciparum*, a espécie responsável pela forma mais virulenta da doença, malária severa e *P. malariae*, única espécie cujo ciclo é quartano (três dias); nas demais o ciclo é terciano (dois dias), essa espécie é associada à malária benigna, por apresentar sintomas menos intensos, dentre as três (FONTES, 2010).

A infecção natural em humanos ocorre através da inoculação dos *esporozoítos*, no momento da picada das fêmeas do mosquito *Anopheles*, infectadas por *Plasmodium spp.* O mosquito é o hospedeiro principal, ao picar uma pessoa infectada, os *plasmódios* circulantes no sangue humano (fase de *gametócitos*) são sugados pelo inseto, etapa essencial no ciclo evolutivo do parasito, que permite a maturação dos *gametócitos* em *esporozoítos* (forma infectante do *Plasmodium*), no chamado ciclo *esporogônico*. Contudo, a malária também pode ser adquirida por meio do contato direto com o sangue de pessoas infectada, caso de transfusões sanguíneas, transmissão congênita, transplante de órgãos ou ainda pelo compartilhamento de seringas entre usuários de drogas injetáveis (FONTES, 2010).

A malária permanece ainda como uma ameaça à vida humana. De acordo com a

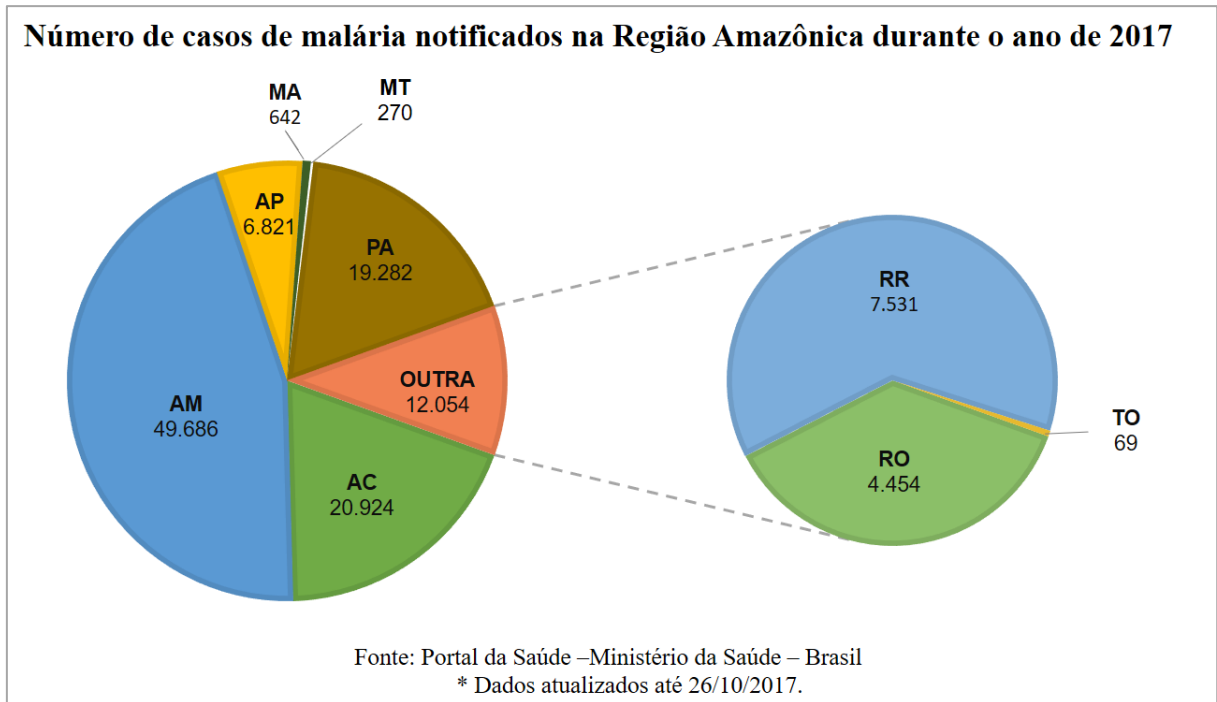
Organização Mundial de Saúde (OMS) a doença é endêmica em 95 países e responsável por mais de 214 milhões de novos diagnósticos positivos para a doença, 438 mil mortes em 2015, sendo deste montante, 306 mil óbitos de crianças com idade inferior a 5 anos de idade (WHO, 2016). A OMS estima a predominância de diagnósticos positivos na Região Africana (88%), seguida pela Região Sudeste da Ásia (10%) e Região Oriental do Mediterrâneo (2%). De forma semelhante, a estimativa de óbitos no cenário global concentra-se na Região Africana (90%), em continuidade a Região Sudoeste da Ásia (7%) e Região Oriental do Mediterrâneo (2%) (WHO, 2016). Figura-3.4.

Figura-3.4: Países endêmicos para a malária em 2000 e 2016.



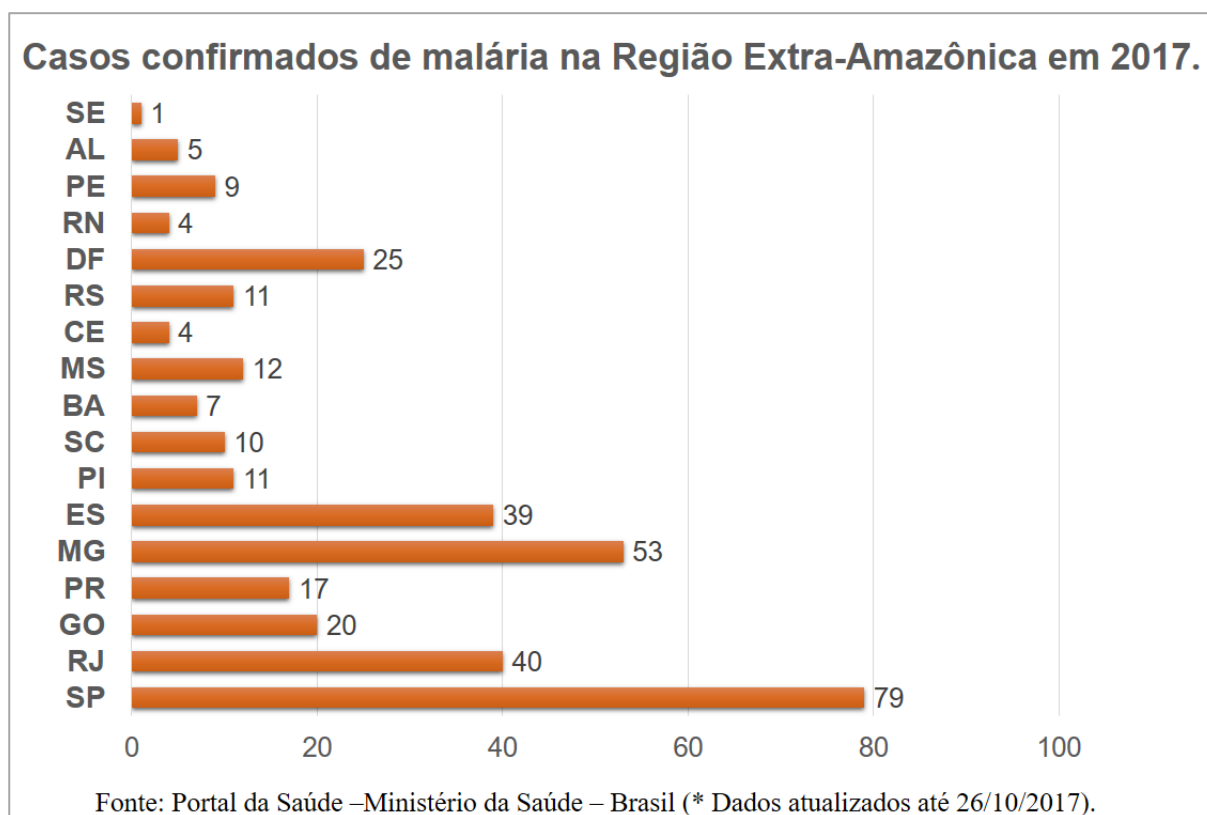
* Adaptado de “WHO-World Malaria Report 2016”.

O Brasil está incluído no rol dos países endêmicos para a malária (WHO, 2016). De acordo com o Ministério da Saúde (MS), a doença é mais prevalente na Região Amazônica representada pelos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins, envolvendo um total de 808 municípios. Esta região concentra 99% dos casos autóctones do país (MS-BRASI, 2016). Um resumo dos dados epidemiológicos sobre a malária na Região Amazônica, para o ano de 2017 até 27/10/2017 é exibido no gráfico da Figura-3.5.

Figura-3.5: Dados Epidemiológicos para Malária na Região Amazônica.

Os demais estados compõem a Região Extra-Amazônica. Conforme o MS, mais de 80% dos casos registrados na Região Extra-Amazônica são importados dos estados pertencentes à municípios localizados na Região Amazônica Brasileira, de outros países amazônicos, do continente africano, ou do Paraguai. Um resumo dos dados epidemiológicos sobre a malária na Região Amazônica, para o ano de 2017 até 27/10/2017 é exibido no gráfico da Figura-3.6.

Os dados epidemiológicos de 2017 divulgados até o momento (17/10/2017) estimam 110.026 casos notificados em todo o país. Sendo 109.679 casos registrados na Região Amazônica e 347 para a Região Extra-Amazônica. Comparados a 2016, o MS estima um aumento de cerca de 37% no número de casos notificados para o país. Esse aumento pode estar associado ao fato da malária ser uma doença com alto potencial epidêmico e suscetível a variações bruscas de acordo com alterações climáticas, socioambientais, e, principalmente, variações na qualidade e quantidade de intervenções de controle (FARIA, ANA CAROLINA. SANTELLI, SILVIA. PINTO, CAMILA.. PETERKA, CASSIO LEONEL. BARBOSA, 2016).

Figura-3.6: Dados Epidemiológicos para Malária na Região Extra-Amazonica.

Os dados apresentados expõem a dimensão global de abrangência da malária e as dramáticas consequências sobre suas vítimas, pois a doença afeta desproporcionalmente pessoas pobres e desfavorecidos, que têm acesso limitado aos serviços de saúde e, onde a maioria são crianças (MILLER et al., 2002). Muitos esforços têm sido realizados no sentido de controlar a doença. Segundo a OMS, em 2014 o programa de financiamento global para a malária mobilizou mais de 2,5 bilhões de dólares. Contudo, a erradicação da doença esbarra nas deficiências dos sistemas de saúde em países com maior carga de malária, no caráter epidêmico da doença e na propriedade do *Plasmodium* de prontamente adquirir resistência aos antimaláricos clássicos (WHO, 2016). Portanto, se faz necessário e urgente o desenvolvimento de novos medicamentos antimaláricos que possam enfrentar a ameaça de resistência adquirida, tratar a malária grave para reduzir a morte e complicações da doença, além de matar os *gametócitos* para bloquear a transmissão (BLASCO; LEROY; FIDOCK, 2017).

3.7.1. ALVOS DOS ANTIMALÁRICOS

Os primeiros antimaláricos foram descobertos ao acaso (quinolina e artemisina), ou obtidos a partir do desenvolvimento de derivados de moléculas conhecidas (cloroquina e artesunato), sem que houvesse uma profunda avaliação do seu modo de ação e onde atuavam (GUPTA; SAXENA, 2015). Em decorrência, um desconcertante conjunto de alvos quimioterápicos putativos foram gerados, sem que tivessem sido validados e, portanto, poucos geraram compostos efetivos e seguros (OLLIARO; YUTHAVONG, 1999).

Mais recentemente a escassa diversidade de agentes antimaláricos, em uso, e a alta capacidade do *P. falciparum* de sofrer mutação, contribuíram para que prontamente o parasito desenvolvesse resistência aos medicamentos (ASHLEY et al., 2014; BLASCO; LEROY; FIDOCK, 2017)

As estratégias da quimioterapia dos antimaláricos têm como alvo as funções e estruturas organelares do *Plasmodium*. De especial importância estão o lisossomo (vacúolo digestivo), local de extensa degradação da hemoglobina; o apicoplasto (plastídio – simbionte de algas verdes) e a mitocôndria (sistema de transporte de elétrons) (FIDOCK et al., 2004; ROSENTHAL, 2003). Um resumo dos principais alvos dos antimaláricos é apresentado na Tabela-3.2.

Tabela-3.2. Alvos dos medicamentos antimaláricos

Localização do alvo	Mecanismo	Molécula alvo	Antimalárico
Citosol	Metabolismo do folato	Diidrofolato redutase	pirimetamina, proguanil, sulfadoxina, dapsona,
	Glicólise	Diidrofolato sintase	
	Síntese de proteínas	Lactato desidrogenase	
	Metabolismo da glutatona	Timidilato sintase	
	Transdução de sinal	Glutaciona redutase Proteínas quinases	
Reticulo endoplasmático	Desconhecido	Ca ²⁺ ATPase	artemisinina
Membrana do parasito	Síntese de fosfolipídios	Transportador de colina	nucleosídeos dímeros
	Transporte pela membrana	Transportador de hexose Canais unicos	
Vacúolo digestivo	Polimerização do heme	Hemozoína	quinolinas
	Hidrólise de hemoglobina	Plasmepsina	artemisinina
	Geração de radicais livres		
Mitocôndria	Transporte de elétrons	Citocromo C oxireductase	atovacona
Apicoplasto	Síntese de proteínas	Apicoplasto ribossoma	antimicrobianos quinolonas rifampicina tiolactomicina triclosan
	Síntese de DNA	DNA girasse	
	Transcrição	RNA polimerase	
		FabH	
		FabI	
Extracelular	Invasão de eritrócito	Subtilisin (serina protease)	Inibidores de proteases

*Adaptado de Fidock et al., 2004.

Com a proposta de obter medicamentos mais potentes, seguros e menos tóxicos, a pesquisa por novos antimaláricos, voltou-se à identificação de novos alvos terapêuticos, a partir do estudo metabolismo básico, dos processos bioquímicos do *Plasmodium* e na validação dos novos alvos, realizados através da comparação com agentes inibidores, aplicação de técnicas de biologia molecular, realização de estudos *in vitro*, *in vivo* e recentemente, com o advento da química computacional, estudos *in silico* (MILLER et al., 2013).

A química computacional aliada ao estudo dos sistemas biológicos tem se mostrado uma ferramenta valiosa no planejamento de fármacos, pois oferece dentre outras vantagens a possibilidade de realizar a triagem virtual de diferentes alvos e direcionar a seleção de moléculas com características químicas adequadas à modulação da atividade biológica (FERREIRA; OLIVA; ANDRICOPULO, 2011; RODRIGUES et al., 2012). Através do emprego de técnicas como Docking Molecular, Dinâmica Molecular e análise estatística, os processos contínuos de planejamento são significativamente acelerados e permitem a busca racional de novos candidatos a fármacos e alvos terapêuticos (KALANI et al., 2013b; SILVA et al., 2016). A partir da

combinação de estudos *in vitro* e *in silico* foi possível identificar que a artemisinina, um antimalárico clássico poderia apresentar um mecanismo de ação alternativo à queação do Fe^{2+} , ao atuar na inibição da proteína Ca^{2+} ATPase do *P. falciparum* (SHANDILYA et al., 2013).

3.7.2. Ca^{2+} -ATPase PfATP6 COMO ALVO PARA NOVOS ANTIMALÁRICOS

A observação de que os novos derivados dos AU e AB podem atuar na modulação da homeostasia do cálcio intracelular do *P. falciparum*, suscitou a hipótese de um mecanismo de ação, para o efeito antimalárico destes compostos (INNOCENTE et al., 2012a). Esse achado coincide com a descoberta de que a artemisinina (ART) pode atuar por uma via alternativa e promover efeito similar, ao causar a morte do parasita, através da inibição da enzima PfATP6 e por consequência ocasionar o aumento da concentração do Ca^{2+} intracelular (ALTSHULER et al., 2012; BRINI; CARAFOLI, 2009; O'NEILL; BARTON; WARD, 2010). Neste contexto, a investigação da enzima PfATP6, como alvo dos novos antimaláricos adquire grande importância para o esclarecimento e compreensão dos aspectos envolvidos na interação destas moléculas com o receptor, haja vistas a necessidade premente de se desenvolver agentes antimaláricos capazes de vencer o desafio imposto pela alta capacidade do parasito da malária de desenvolver resistência aos medicamentos disponíveis.

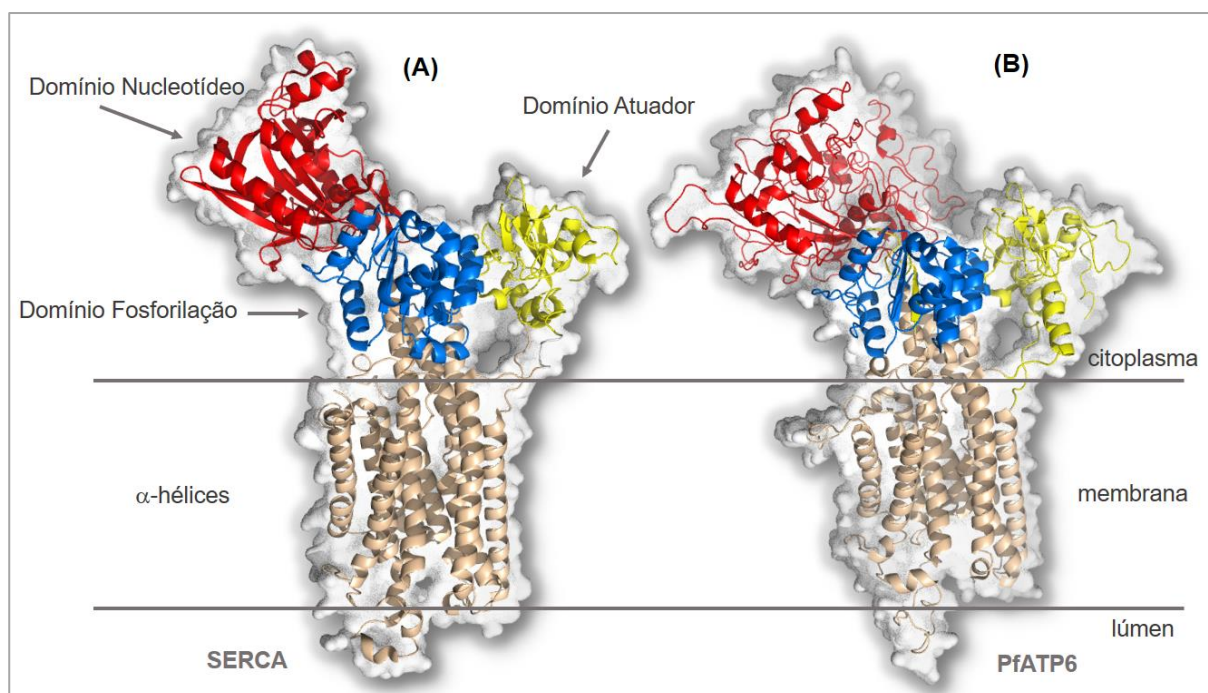
3.8. PfATP6

PfATP6 é uma enzima do tipo SERCA (Canal de cálcio do Retículo Sarcoplasmático) presente no parasita da malária. Essa proteína é ortóloga da SERCA encontrada no músculo esquelético de alguns mamíferos (HAYNES et al., 2007). As enzimas dessa família, Ca-ATPase do retículo sarco-endoplasmático, bombeiam Ca^{2+} para o interior do lúmen do retículo através da hidrólise de ATP. Desta forma as enzimas SERCA, modulam a concentração de Ca^{2+} entre os diversos compartimentos dos organismos.

A estrutura da proteína é composta por quatro domínios funcionais constituídos de uma única cadeia polipeptídica. Esses domínios são denotados como M, N, P e A

(Figura-3.5.) (ARNOU et al., 2011). Onde o domínio M se refere a região transmembrana, descrita como a região onde se localiza o sítio de ligação do cálcio. Esse domínio apresenta sua maior porção voltada para o lúmen do retículo sarcoendoplasmático e compreende dez α -hélices (M1–M10), que abrangem parte da membrana, excluindo alguns laços do espaço luminal. Situados no sarcoplasma (citoplasma), os domínios N (nucleotídeo), P (fosforilação) e A (atuador) são associados principalmente a hidrólise do ATP; todos eles são constituídos por uma combinação de α -hélices e folhas- β . O sítio catalítico está localizado na junção dos domínios A e P, enquanto o sítio de ligação é formado pelo domínio N e o resíduo fosforilado, Asp-351, localizado no domínio-P (BUBLITZ et al., 2010).

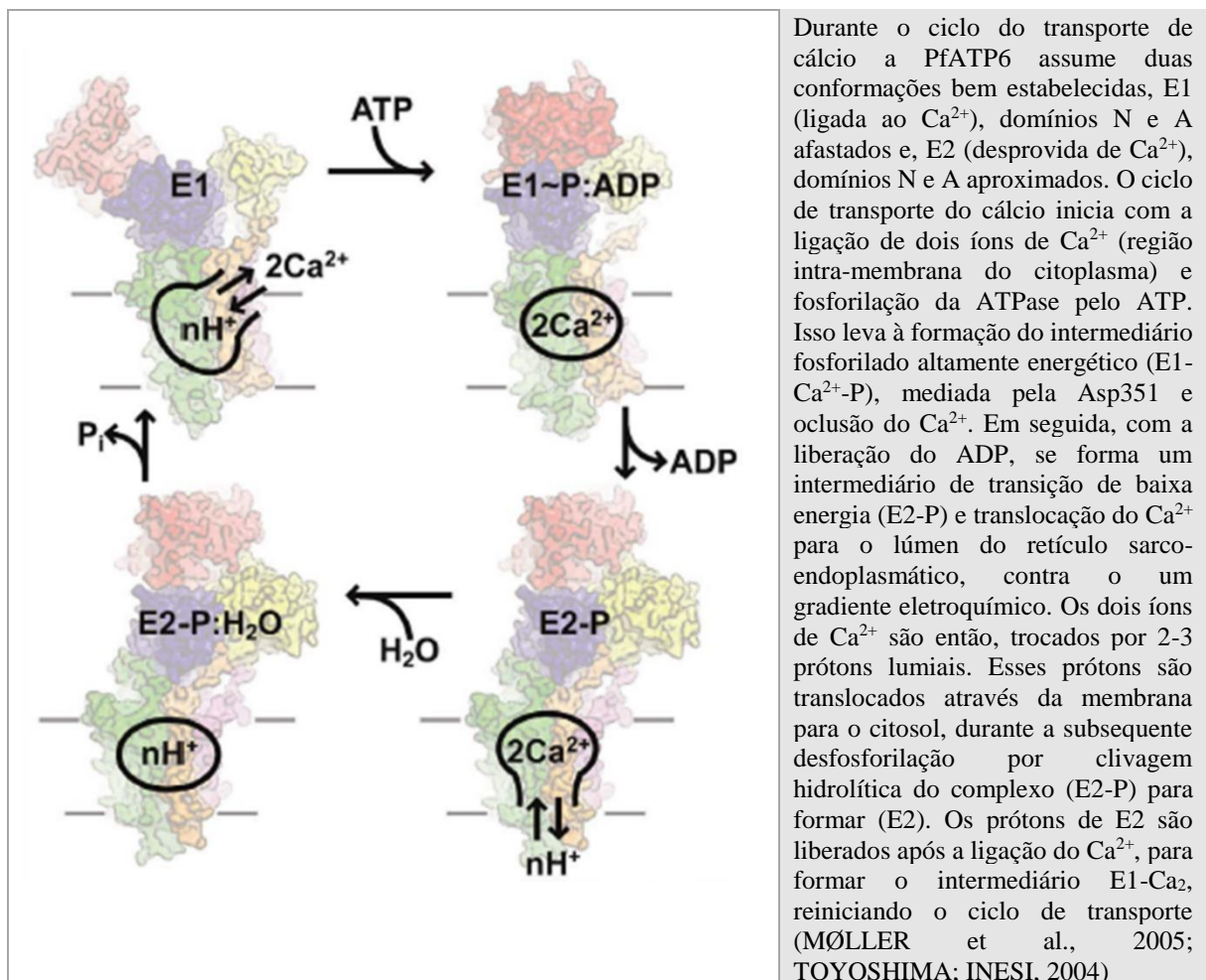
Figura-3.7: Estrutura da enzima SERCA do músculo esquelético de mamífero (A) e modelo obtido por homologia da PfATP6 (B). Em vermelho o domínio nucleotídeo (N), azul o domínio de fosforilação (P), amarelo o domínio atuador (A) e marrom as α -hélices do domínio transmembrana (M).



Como as demais proteínas da família ATPase tipo-P, a PfATP6 conserva as propriedades funcionais distribuídas entre os domínios M, N, P e A. O domínio-N tem a função de reconhecer e posicionar as cadeias γ -fosforil do ATP para o ataque nucleofílico, enquanto o aspartato do domínio-P aceita o grupo fosforil e o converte em

um intermediário altamente energético, aspartil-fosfato. O glutamato do domínio-A captura uma molécula de água para subsequente hidrólise e liberação do grupo fosforil . Os domínios citoplasmáticos estão conectados ao domínio transmembrana por cinco regiões de ligação, formando uma conexão estrutural crucial para liberação e conservação de energia (em dois passos no lado citoplasmático) e translocação física de cátions através da bicamada lipídica da membrana (Figura-3.6(KÜHLBRANDT, 2004; MØLLER et al., 2005).

Figura-3.8: Representação esquemática do ciclo de transporte do Ca^{2+} na PfATP6 e conformações correlatas (E1 e E2), E1 na presença de Ca^{2+} e E2 na ausência de Ca^{2+} . Domínio N, em vermelho; e domínio P, em azul; domínio A, em amarelo e segmentos transmembrana (verde, laranja e violeta).



*Adaptado de MØLLER et al., 2005.

O Ca^{2+} têm importância substancial para a manutenção da vida do *P. falciparum*; o Ca^{2+} participa na invasão das células do eritrócito, no desenvolvimento do parasito dentro das células do hospedeiro e até mesmo na mobilidade do parasito, dentre outros processos (ALLEVA; KIRK, 2001).

Evidências acerca da inibição da PfATP6 pela ART foram obtidas através de estudos realizados em oócitos, que expressam heterolagamente a PfATP6 e em culturas de parasitos. Esses estudos demonstraram que a PfATP6 foi inibida pela ART e que a tapsigargina (TPG), um inibidor clássico da SERCA, além de inibir a mesma enzima, exerce ação antagonista à ART. Este achado permitiu aos autores sugerir que TPG e ART atuaram no mesmo sítio de ligação da PfATP6 (ECKSTEIN-LUDWIG et al., 2003b).

Considerando-se o exposto, os estudos computacionais conduzidos com o propósito de avaliar o potencial da PfATP6 como alvo de novos antimaláricos utilizam como estratégia de confirmação dos resultados a correspondência com a enzima SERCA de mamíferos, devido à ausência de estrutura cristalográfica depositada para a PfATP6 (GUPTA; SAXENA, 2015; NAIK et al., 2011; SHANDILYA et al., 2013).

3.9. QUÍMICA COMPUTACIONAL

A Química Computacional compreende as áreas do conhecimento da química e física com o propósito de promover o entendimento dos processos à nível molecular (SANT'ANNA, 2009). A contribuição dos resultados obtidos através do emprego de métodos da química computacional é reconhecida e tem proporcionado avanços significativos nas áreas de planejamento de novos compostos bioativos, descoberta de novas substâncias, desenvolvimento de fármacos mais eficientes, bem como proporcionado a descoberta de novos alvos terapêuticos e auxiliado na compreensão dos fenômenos envolvidos nas interações entre o ligante-receptor (KITCHEN et al., 2004).

Dentre os métodos computacionais mais utilizados para reconhecimentos de novos alvos e investigação do modo de interação de novos compostos bioativos

incluem-se o *Docking Molecular* e a *Dinâmica Molecular* (MARTÍNEZ; MARTÍNEZ, 2003).

3.9.1. DOCKING MOLECULAR

O *Docking Molecular* é um método computacional, que consiste na predição do modo de ligação (conformação e orientação) de um ligante (inibidor) na região de ligação de um alvo molecular, proteína (receptor). Uma vez formados os complexos proteína-ligante, estes são ordenados a partir de uma função de pontuação, isto é, um modelo, para classificar a afinidade ou a energia livre de ligação entre o ligante e a proteína (ΔG°). Essa metodologia tem um papel importante no planejamento de novos fármacos (MORGON; COUTINHO, 2007).

A metodologia de *Docking* requer um método de busca para o espaço conformacional disponível e um método para avaliar a energia de cada conformação. Nesse contexto, os programas de *Docking* são compostos, de modo genérico, por um *algoritmo de busca* e uma *função de score*. Diferentes algoritmos são utilizados para busca da melhor conformação entre o ligante e o receptor. De acordo com a flexibilidade do ligante, os métodos podem ser divididos em métodos sistemáticos, ou estocásticos (CAVASOTTO; ORRY, 2007).

Os métodos sistemáticos exploram, sistematicamente todo o *espaço de fases*, mas quando o ligante apresenta muitos graus de liberdade, pode ocorrer “*explosão combinatorial*”. Os métodos estocásticos (aleatórios) utilizam alterações randômicas para cada ligante, as conformações são avaliadas e classificadas pela *função de score*. Algoritmos genéticos são exemplos de algoritmos estocásticos (BROOIJMANS; KUNTZ, 2003).

Os algoritmos genéticos têm se mostrado uma ferramenta eficaz para exploração aleatória do espaço de fases. Esses algoritmos são baseados na evolução natural das espécies, onde cada indivíduo representa uma determinada posição do ligante e a solução adaptativa corresponde à melhor conformação do complexo (ligante-receptor). Inicialmente é gerada uma população de ligantes posicionados aleatoriamente no espaço, após é realizada uma estimativa da energia de interação entre um indivíduo e o

receptor. Desta análise são selecionados os progenitores, isto é, aqueles cujas as interações são melhores. Esses progenitores sofrerão mutação ou *crossing-over*, a partir da aplicação de operadores genéticos. Se a interação deste novo indivíduo com o receptor for melhor do que aquela com o progenitor, ele será selecionado para substituir os indivíduos da geração anterior, cujas interações sejam menos favoráveis. Esse processo é realizado sucessivamente até chegar ao número máximo de gerações ou avaliações de energia, definidos previamente (MORGON; COUTINHO, 2007).

O algoritmo de busca vasculha exaustivamente o espaço de fases na procura das possíveis conformações entre o ligante e o receptor. Os resultados são avaliados pela *função de escore*, onde cada modo de ligação (conformação) é pontuado, da melhor conformação à pior, ordenando-as em um ranking. Essa metodologia permite identificar as conformações mais favoráveis do ligante em relação ao receptor (MARTÍNEZ; MARTÍNEZ, 2003).

3.9.2. DINÂMICA MOLECULAR

A Dinâmica Molecular (DM) é uma técnica computacional fundamentada nos princípios da Mecânica Clássica, e permite estudar a evolução temporal do comportamento dinâmico dos átomos individuais de um sistema (KITCHEN et al., 2004).

Neste método, as partículas integrantes do sistema, inicialmente dispostas em uma determinada configuração, movimentam-se sob a influência de potenciais intermoleculares. A partir do conhecimento das posições e velocidades de todas as partículas, em um dado instante t_0 , pode-se computar as forças resultantes em cada partícula, devido às interações com as demais e assim, determinar as posições e velocidades em um instante posterior $t_0 + \delta t$, através das equações de movimento Newtonianas (MORGON; COUTINHO, 2007).

Na área de planejamento de fármacos, as simulações de DM têm sido empregadas para investigar a estrutura e função de biomoléculas e as interações desses complexos. Diferentemente das simulações por *Docking Molecular*, onde a proteína é mantida rígida e somente o ligante tem liberdade de movimento, a DM considera a flexibilidade do

ligante e do receptor e assim permite melhor explorar as interações do complexo e reforçar a complementaridade entre eles. Além disso, nas simulações, moléculas de solvente são incorporadas ao sistema receptor-ligante. Esse processo é muito importante, pois propicia um melhor entendimento do papel da água e seus efeitos sobre a estabilidade de complexos proteína-inibidor (B-RAO; SUBRAMANIAN; SHARMA, 2009). Outro aspecto importante a ser considerado é a característica da DM de permitir estabelecer forte correspondência com estudos experimentais, como uma espécie de validação cruzada. Desta forma, as simulações de DM contribuem para a interpretação de resultados de estudos *in vitro* e *in vivo* (DE AMORIM; NETZ; GUIMARÃES, 2010). Muitos estudos apresentam as simulações de DM como alternativa atrativa de refinamento dos resultados obtidos pelo *Docking* de complexos proteína-ligante. Pois, além de agregar flexibilidade às entidades em um meio solvatado, a evolução durante o curso temporal das simulações fornece indícios da estabilidade e viabilidade dos complexos formados (ALONSO; BLIZNYUK; GREASY, 2006; SANDER et al., 2011; SANDER; LILJEFORS; BALLE, 2008).

A estabilidade estrutural dos complexos é um parâmetro muito importante para avaliação da qualidade dos resultados obtidos nas simulações, pois estruturas ancoradas de forma incorreta tendem a produzir trajetórias instáveis e podem levar a ruptura do complexo; por outro lado, complexos realistas apresentam comportamentos mais estáveis.

O monitoramento da estabilidade das macromoléculas e seus complexos é realizado através da representação gráfica do desvio quadrático médio (RMSD), como uma função do tempo. Este parâmetro representa um desvio, em massa-ponderada, da geometria do sistema (ou um subconjunto do sistema) em um determinado tempo, em relação a uma geometria de referência. Quando o sistema se aproxima da estabilidade, o RMSD se aproxima de um patamar horizontal com pequenas oscilações, em torno de uma posição de equilíbrio. Enquanto, mudanças bruscas nesse valor, em um dado momento da DM, indicam a troca de conformação. Dessa forma ao monitorar o RMSD é possível identificar o momento em que as transições conformacionais ocorrem (DE AMORIM; NETZ; GUIMARÃES, 2010).

Outro critério importante, utilizado na DM é a observação do estabelecimento de interação do tipo ligação de hidrogênio entre os resíduos da proteína e o ligante. De acordo com o critério geométrico, o mais amplamente utilizado, a ligação de hidrogênio ocorre sempre quando a distância entre o doador e o acceptor é menor, ou igual a um valor fixo (usualmente 0,35 nm) e o ângulo, entre eles, é menor ou igual a um ângulo fixo (geralmente 30°). No estudo de dinâmica molecular, o número e a geometria das ligações de hidrogênio intramoleculares (proteína-proteína) e intermoleculares (água-proteína ou proteína-ligante), bem como, a dinâmica e a termodinâmica das ligações de hidrogênio constituem informação valiosa para a descrição do sistema (BISSANTZ; KUHN; STAHL, 2010; DE AMORIM; NETZ; GUIMARÃES, 2010).

3.9.3. MODELAGEM POR HOMOLOGIA

A avaliação de potenciais alvos terapêuticos, por meio de métodos *in silico* incorpora o conhecimento acurado da estrutura 3D de proteínas, como base molecular para a formação dos complexos ligante-receptor.

Estruturas tridimensionais de proteínas (estruturas secundária e terciária) com alta resolução de refinamento ($< 2,5 \text{ \AA}$) estão disponíveis em uma fração muito pequena dentre as proteínas conhecidas (ALEXANDER et al., 2008; RAVAL et al., 2012; SHEN; BAX, 2015). Esta lacuna, se deve a complexidade do processo de elucidação das estruturas, onde a parte das tecnologias disponíveis atualmente [cristalografia de raios-X, laser de raio-X de elétrons livres (XFEL), ressonância magnética nuclear (RMN) e microscopia eletrônica de 3D (3DEM)], a própria natureza do sistema em estudo constitui um desafio; quer seja pela dificuldade de se obter amostra em quantidade suficiente para os ensaios, ou porque os cristais obtidos não apresentam qualidade adequada às práticas experimentais. Além disso, certas classes de proteínas, como as proteínas de membrana, caso da PfATP6, objeto de estudo deste trabalho, raramente cristalizam e dificilmente podem ser tratadas de modo satisfatório por RMN (SCHWEDE et al., 2003; PDB:101, 2018).

A quantidade e a qualidade das informações que podem ser auferidas sobre uma proteína está associada à resolução do cristal obtido por métodos experimentais (BIASINI et al., 2014; BORDOLI et al., 2009; KRIEGER et al., 2009). Um resumo das informações associadas à resolução do cristal é apresentado na Tabela-3,3.

Tabela-3.3: Resolução e Conhecimento estrutural

Resolução (Å)	Informação Estrutural
4,0	Alguma informação sobre a estrutura secundária e dobras globais;
3,5	Estrutura secundária;
3,0	A maioria das cadeias são posicionadas;
2,5	Todas as cadeias laterais, ângulos phi-psi constrictos e localização das águas;
1,5	Ângulos phi-psi bem definidos, começam a aparecer os átomos de hidrogênio;
1,0	Hidrogênios são visíveis;

**Adaptado de Swiss Institute of Bioinformatics*

Na ausência de estruturas tridimensionais experimentais, métodos computacionais têm sido utilizados de modo satisfatório na predição de modelos 3D de proteínas e auxiliado na obtenção de novas informações sobre sua estrutura e propriedades funcionais. Os métodos computacionais são classificados em três categorias: *a*) Modelagem por Homologia ou Comparativa (construção do modelo a partir da sequência de aminoácidos e alinhamento com uma proteína conhecida de estrutura similar); *b*) Reconhecimento de dobras (predição das dobras gerais da proteína) e *c*) técnicas de *ab initio* (infere a estrutura 3D da proteína somente utilizando a sequência de aminoácidos e os campos de força) (BENKERT; BIASINI; SCHWEDE, 2011; LAMBERT et al., 2002).

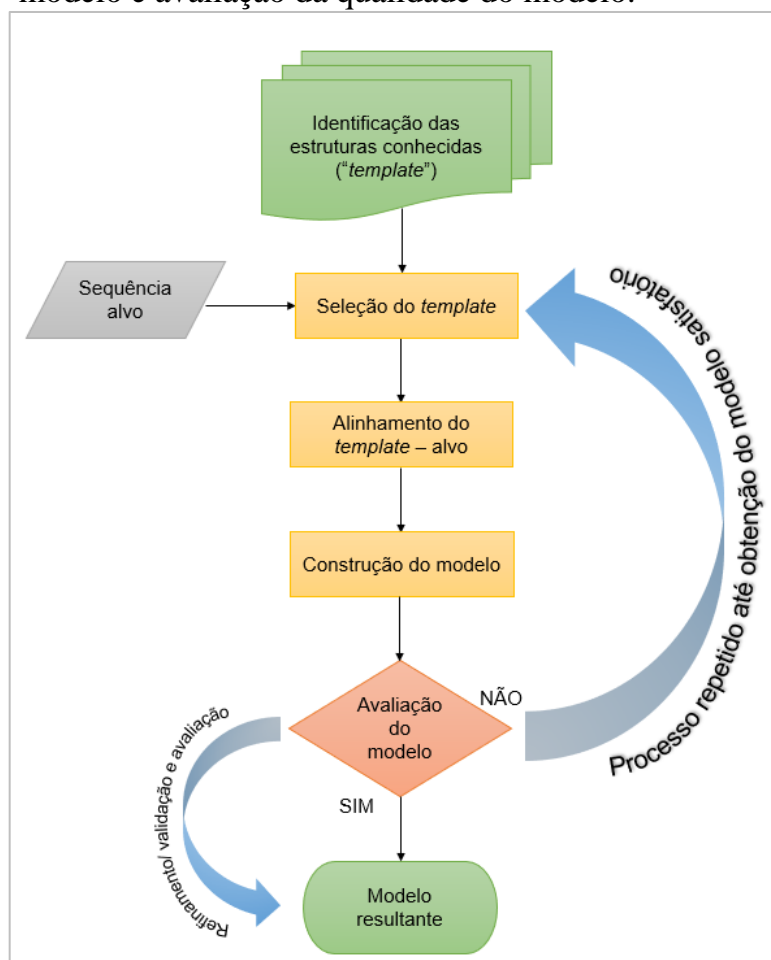
O método mais acurado e amplamente utilizado é a Modelagem por Homologia. Esta abordagem toma em consideração alguns padrões gerais observados, entre as famílias celulares, quanto à origem biológica e o sua relação evolucionária: *a*) sequências de aminoácidos homólogas implicam em semelhança estrutural e funcional; *b*) proteínas homólogas apresentam regiões internas conservadas (elementos de estrutura secundária semelhantes: α -hélices e folhas- β); *c*) as principais diferenças

estruturais entre proteínas homólogas ocorrem nas regiões externas, constituídas principalmente por alças (“loops”), que ligam os elementos de estruturas secundárias (BIASINI et al., 2014; SANTOS FILHO; BICCA DE ALENCASTRO, 2003).

A Modelagem por Homologia consiste resumidamente em quatro etapas principais: (i) Identificação da (s) proteína (s) com relação evolucionária semelhante (sequência polipeptídica semelhante), cuja estrutura experimental seja bem resolvida e que possam ser usadas como *molde* (“*template*”) para a modelagem da proteína alvo de interesse; a sequência-alvo é utilizada para se fazer uma varredura em bancos de dados de estruturas de proteínas, utilizando-se algoritmos de busca por similaridade. (ii) Mapeamento dos resíduos correspondentes da sequência alvo e da (s) estrutura (s) modelo (s) por meio de métodos de alinhamento de sequência e ajuste manual; (iii) Construção do modelo tridimensional com base no alinhamento com a proteína *molde*, a partir da substituição e/ou inserção/deleção de aminoácidos na estrutura tridimensional da(s) proteína(s) *molde*(s); e (iv) Refinamento, validação e avaliação - a qualidade do modelo resultante é verificada quanto aos aspectos conformacionais e pode ser corrigido e/ou ter sua energia minimizada (Figura-3.9). Existem diversos métodos, softwares e/ou servidores online diferentes e apropriados para cada uma das etapas. Este procedimento pode ser repetido até a obtenção de um modelo satisfatório (ARNOLD et al., 2006; BORDOLI et al., 2009; SCHWEDE et al., 2003).

A modelagem comparativa da estrutura de uma proteína depende da relação evolucionária entre as proteínas alvo e modelo. Os potenciais *templates* são identificados através da pesquisa em bibliotecas de estruturas proteicas, experimentalmente determinadas, como: SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/SWISS-MODEL.html>), Protein Model Portal (<http://proteinmodelportal.org>), Modbase (<http://modbase.compbio.ucsf.edu>) e PDB (<https://www.rcsb.org/>). Da lista resultante de possíveis estruturas candidatas, uma estrutura é escolhida com base em sua adequação, de acordo a vários critérios, como o nível de similaridade das sequências de resíduos, a qualidade experimental das estruturas resolvidas, ou ainda a presença de ligantes ou cofatores (SCHWEDE et al., 2003).

Figura-3.9: Quatro passos principais do método Modelagem por Homologia: seleção do molde “*template*”; alinhamento do modelo; construção do modelo e avaliação da qualidade do modelo.



Uma vez que os modelos, por definição, constituem uma abstração e, portanto, podem conter erros, dependendo do grau de similaridade da sequência e da qualidade do alinhamento, a resolução pode ser considerada como um parâmetro qualitativo para assegurar a precisão do modelo construído. De forma que, ao comparar as estruturas experimental real e modelo por homologia, se admite resolução de até 1~2 Å para o RMSD dos átomos de C_{α} (desvio da raiz quadrática média das distâncias entre os átomos de C_{α} , correspondentes) (CAVASOTTO; PHATAK, 2009; VYAS et al., 2012).

Dentre as etapas do processo de construção do modelo por homologia, a validação é considerada crucial, por assegurar a correção de erros eventuais e favorecer

a obtenção de modelos mais precisos e confiáveis. A validação do modelo pode ser realizada através de uma abordagem geral, onde a proteína é analisada como um todo, ou restrita a apenas algumas regiões individuais (domínios) (SANTOS FILHO; BICCA DE ALENCASTRO, 2003; VYAS et al., 2012).

Na etapa de validação são avaliados os aspectos, como: a qualidade do empacotamento global da proteína, os parâmetros estereoquímicos e os possíveis erros estruturais em regiões localizadas (BORDOLI et al., 2009; SANTOS FILHO; BICCA DE ALENCASTRO, 2003). Os erros no modelo são geralmente estimados, através: (i) sobreposição do modelo na estrutura nativa com o emprego de softwares de alinhamento e cálculo de RMSD de átomos de carbono- α ; (ii) geração de Z-score, uma medida de significância estatística entre estruturas correspondentes para o modelo (pontuações no valor de quatro, indicam boa similaridade estrutural); (iii) desenvolvimento de uma função de pontuação capaz de discriminar modelos bons e ruins, através da utilização de programas que avaliam a localização de cada resíduo no modelo com relação ao ambiente esperado, conforme encontrado na estrutura de alta resolução obtida por métodos experimentais (CAVASOTTO; ORRY, 2007; VYAS et al., 2012)

Os programas de validação são geralmente classificados em duas categorias, conforme a natureza da análise: Tipo-1) verificação da estereoquímica das proteínas, simetria e geometria (quiralidade, comprimento das ligações, ângulos de adesão, modelos de ângulos e de torção; e Tipo-2) verificação da adequação da sequência à estrutura e atribuição de uma pontuação para cada resíduo adequado ao seu ambiente atual (VYAS et al., 2012).

Um modelo é considerado válido apenas quando apenas algumas distorções em contatos atômicos estão presentes. Como regra geral, os modelos construídos com mais de 50% de identidade entre as sequenciais são considerados precisos e adequados para aplicações voltadas à descoberta de novos fármacos e aqueles com resolução entre 25 e 50% de identidade podem ser empregados para avaliar a capacidade de ancoramento (*Docking Molecular*), bem como o desenho de alvos terapêuticos (LAMBERT et al., 2002) (CAVASOTTO; PHATAK, 2009) (VYAS et al., 2012).





O texto completo do Capítulo I, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 76 – 85, foi suprimido por tratar-se de artigo aceito e em fase de publicação no periódico *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, sob o título “Variation of Ursolic and Betulinic Acid in Five *Malus x domestica* clones from Southern Brazil”.

,

**5. CAPÍTULO II – *Docking Molecular* dos derivados
triterpênicos com Ca²⁺-ATPase PfATP6 e SERCA**

5.1. INTRODUÇÃO

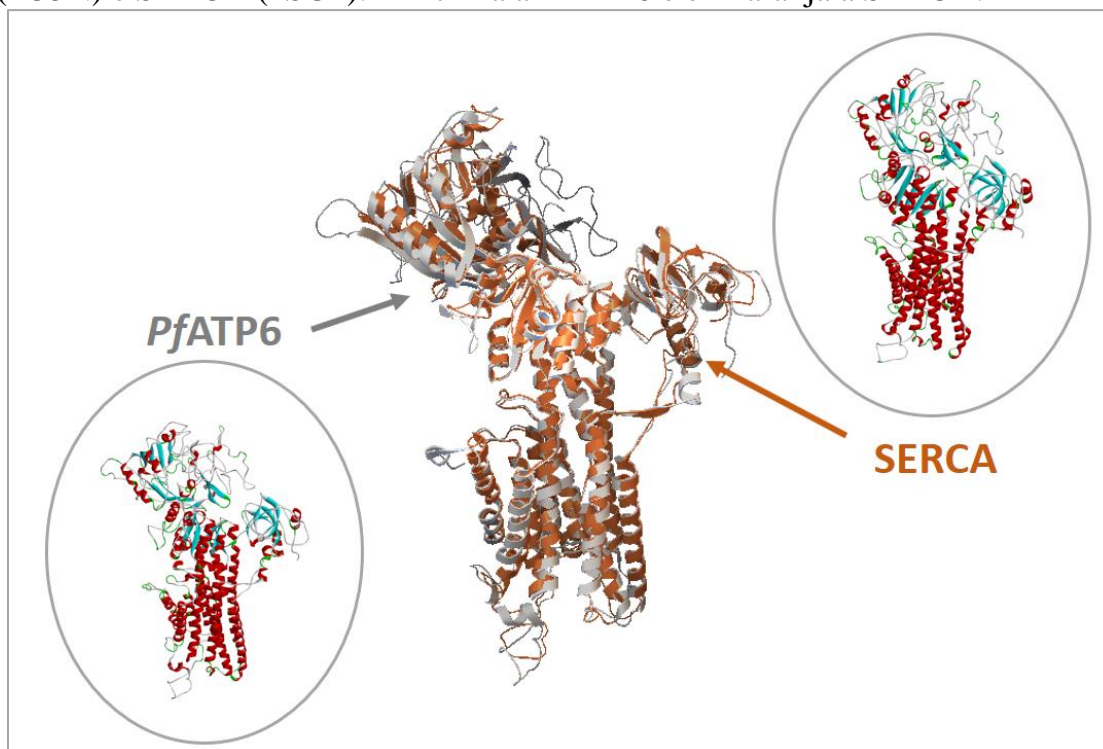
O conhecimento do modo de ação das moléculas com potencial antimalárico pode contribuir significativamente para o desenvolvimento e otimização de novas estratégias terapêuticas. Recentemente, uma nova proposta de alvo para antimaláricos emergiu com a descoberta de que a artemisinina (ART), um antimalárico clássico, exerce ação via PfATP6, uma proteína do tipo SERCA (Canal de cálcio do Retículo Sarcoplasmático) presente no parasito da malária (CUI et al., 2012; ECKSTEIN-LUDWIG et al., 2003a; VALDERRAMOS et al., 2010). Essa proteína é ortóloga da SERCA encontrada no músculo esquelético de alguns mamíferos (HAYNES et al., 2007). No caso específico da artemisinina, a inibição da enzima PfATP6 causa uma perturbação na homeostasia do Ca^{2+} e conduz à morte do parasita através do aumento da concentração do Ca^{2+} intracelular (ALTSHULER et al., 2012; BRINI; CARAFOLI, 2009; O'NEILL; BARTON; WARD, 2010). A modulação da homeostasia do cálcio foi observada por pesquisadores ao realizarem estudos *in vitro* com antimaláricos derivados dos ácidos ursólico (AU) e betulínico (AB) (SILVA et al., 2015). Nosso grupo de pesquisa, recentemente desenvolveu duas séries de novos derivados triterpênicos, AU e AB, com atividade antimalárica, na faixa de nanomolar, frente às cepas resistentes e sensíveis à cloroquina de *P. falciparum* 3D7, onde se observou novamente, a interferência destes compostos na homeostasia do cálcio intracelular do parasito. **Figura-5.1** (INNOCENTE et al., 2012; SILVA et al.; 2013).

Estudos computacionais de *Docking Molecular* da ART com a PfATP6 demonstram haver afinidade do antimalárico por esse receptor e que ART se liga fortemente à PfATP6. Em paralelo, foram conduzidos estudos semelhantes com a enzima SERCA de mamíferos e seu inibidor clássico, a taspigargina (TPG), com o propósito de avaliar os resultados de *Docking*. Essa estratégia tem sido explorada por muitos autores, tendo em vista a estrutura tridimensional da PfATP6 ainda não ter sido determinada (GUPTA; SAXENA, 2015; NAIK et al., 2011; SHANDILYA et al., 2013).

Para realização de *Docking Molecular* foram selecionadas duas estruturas bem documentadas na literatura, cuja a taxa de similaridade é estimada em 51%. A

sobreposição das duas proteínas SERCA (PDB-ID 1SU4, de mamífero) e PfATP6 (PDB-ID 1U5N, modelo teórico) obtidas do *Protein Data Bank* (PDB), demonstra o grau de similaridade e alinhamento das estruturas, **Figura-5.1**.

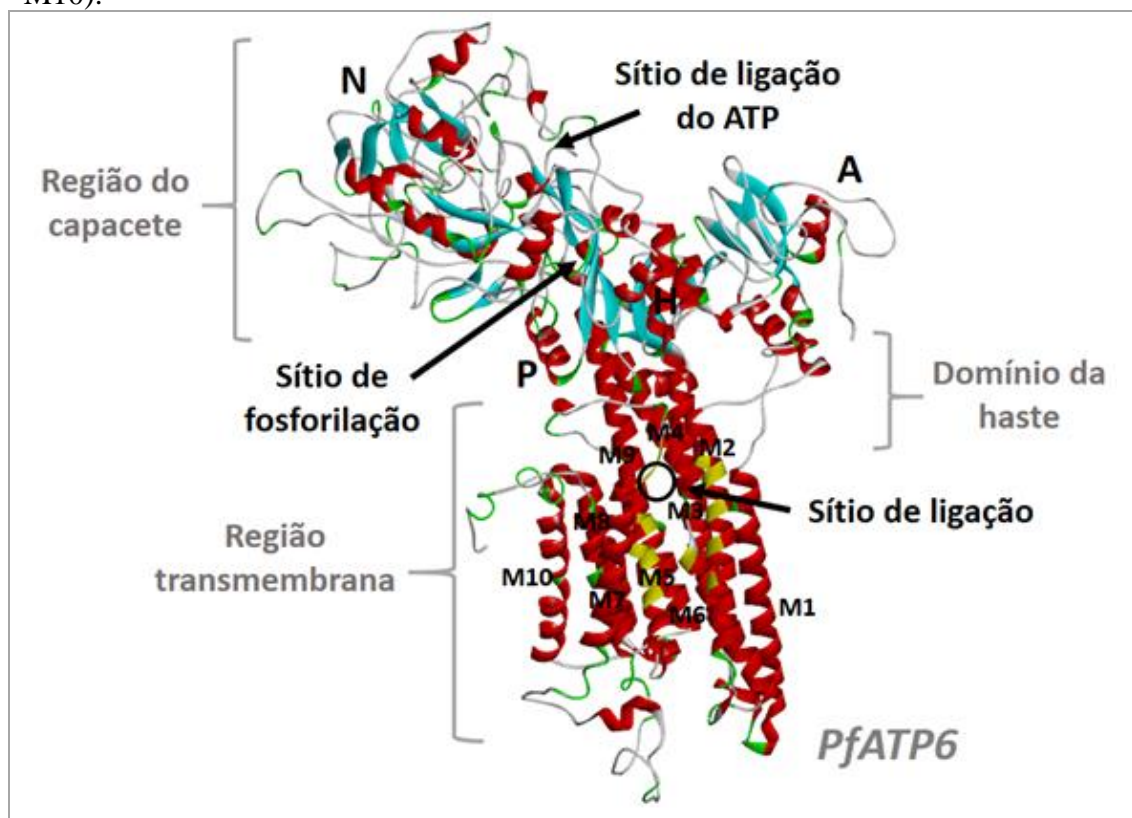
Figura-5.1: Alinhamentos e sobreposição das estruturas das proteínas PfATP6 (1U5N) e SERCA (1SU4). Em cinza a PfATP6 e em laranja a SERCA.



A PfATP6 é uma proteína de membrana, de massa molecular de 139,4 kDa e constituída de 1228 resíduos de aminoácido. O alinhamento da sequência de aminoácidos com a SERCA1a, presente no músculo esquelético de mamíferos, demonstra que a PfATP6 conserva todas as propriedades da família das Ca-ATPase SERCA (NAIK et al., 2011b). A estrutura da PfATP6 compreende três partes principais: a capacete (porção citoplasmática), o domínio da haste e o domínio transmembrana. A região do capacete é composta principalmente pelo domínio de fosforilação (P), domínio de ligação do nucleotídeo (N), domínio da dobradiça (H) e o domínio atuador (A) ou região C-terminal. A região transmembrana é formada por dez α -hélices (M1-M10). O sítio de ligação (SL) da ART está localizado próximo ao centro de quatro α -hélices da região transmembrana (ARNOU et al., 2011) (**Figura-5.2**). Segundo SHANDYLIA e colaboradores (2013), ao avaliarem os complexos ART-

PfATP6, obtidos por *Docking*, através de simulações por dinâmica molecular, observaram que pequenas mudanças nas hélices podem levar à ruptura da ligação do Ca^{2+} ao seu sítio e à alteração do movimento dos íons para o citosol, ou espaço lumial.

Figura-5.2: Estrutura da PfATP6, domínio de ligação nucleotídeo (N), domínio atuador (A), domínio de fosforilação (P), domínio (H) e região transmembrana (M1-M10).



*Adaptado de SHANDYLIA *et al.*, 2013.

Diante do exposto, esse trabalho tem como propósito investigar o potencial da enzima PfATP6, de constituir um alvo, para os novos derivados semissintéticos dos AU e AB, através de *Docking Molecular*, bem como, obter as estruturas mais favoráveis do complexo ligante-PfATP6, para posterior estudo através de dinâmica molecular.

O texto completo do Capítulo II, que na versão completa da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 94 – 110, foi suprimido por tratar-se de artigo publicado no periódico *Chemico-Biological interactions*, sob o título “SERCA plays a crucial role in the toxicity of a betulinic acid derivative with potential antimalaria activity.

Parte dos resultados deste capítulo compõem o manuscrito em fase de preparação para submissão a periódico científico.

6. CAPÍTULO III - DINÂMICA MOLECULAR

O texto completo do Capítulo II, que na versão completa da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 115 – 183, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em fase de preparação para submissão a periódico científico.

8. CONCLUSÃO GERAL

- Associação Brasileira de Produtores de Maçã-ABPM. Disponível em: <<http://www.abpm.org.br>>. Acesso em: 03 de agosto de 2017.
- AGUIRRE, M. C.; DELPORTE, C. An HPLC-UV and HPLC-ESI-MS based method for identification of anti-inflammatory triterpenoids from the extracts of *Ugni molinae*. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 12, n. 1, p. 108–116, 2013.
- ALEXANDER, N. et al. De Novo High-Resolution Protein Structure Determination from Sparse Spin-Labeling EPR Data. **Structure**, v. 16, n. 2, p. 181–195, 2008.
- ALLEVA, L. M.; KIRK, K. Calcium regulation in the intraerythrocytic malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 117, n. 2, p. 121–8, 2001.
- ALONSO, H.; BLIZNYUK, A. A.; GREASY, J. E. Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design. **Medicinal Research Reviews**, v. 26, n. 5, p. 531–568, 2006.
- ALTSHULER, I. et al. The Evolutionary History of Sarco(endo)plasmic Calcium ATPase (SERCA). **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, p. 1–6, 2012.
- AMZAD HOSSAIN, M. et al. Sinensetin, rutin, 3,5,7-trimethoxy-4-hydroxyflavone and rosmarinic acid contents and antioxidative effect of the skin of apple fruit. **Food Chemistry**, v. 113, n. 1, p. 185–190, 2009.
- ANDRE, C. M. et al. Anti-inflammatory procyanidins and triterpenes in 109 apple varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 42, p. 10546–10554, 2012.
- ANDRE, C. M. et al. Unusual immuno-modulatory triterpene-caffeates in the skins of russeted varieties of apples and pears. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 11, p. 2773–2779, 2013.
- ANVISA. Resolução anvisa - RE nº 899. p. 12, 2003.
- AQUINO, F. M. ;; BENITEZ, R. M. C a d e i a P r o d u t i v a d a M a ç ã. **BRDE**, 2005.
- ARNOLD, K. et al. The SWISS-MODEL workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. **Bioinformatics**, v. 22, n. 2, p. 195–201, 2006.
- ARNOU, B. et al. The *Plasmodium falciparum* Ca²⁺-ATPase PfATP6: insensitive to artemisinin, but a potential drug target. **Biochemical Society Transactions**, 2011.
- ASHLEY, E. A. et al. Spread of Artemisinin Resistance in *Plasmodium falciparum* Malaria. **New England Journal of Medicine**, 2014.
- B-RAO, C.; SUBRAMANIAN, J.; SHARMA, S. D. Managing protein flexibility in docking and its applications. **Drug Discovery Today**, v. 14, n. 7–8, p. 394–400, 2009.

- BABALOLA, I. T.; SHODE, F. O. Ubiquitous Ursolic Acid: A Potential Pentacyclic Triterpene Natural Product. **IC Journal Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 8192, n. 2, p. 2668735–5, 2013.
- BAGNARESI, P. et al. Intracellular proteolysis of kininogen by malaria parasites promotes release of active kinins. **Malaria journal**, v. 11, p. 156, 2012.
- BARNES, E. C.; KUMAR, R.; DAVIS, R. A. The use of isolated natural products as scaffolds for the generation of chemically diverse screening libraries for drug discovery. **Nat. Prod. Rep.**, v. 33, n. 3, p. 372–381, 2016.
- BARROS, L. C. et al. Biochemical and biological evaluation of gyroxin isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 17, p. 23–33, 2011.
- BARS-CORTINA, D. et al. Phytochemical Profiles of New Red-Fleshed Apple Varieties Compared with Traditional and New White-Fleshed Varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 8, p. 1684–1696, 2017.
- BENKERT, P.; BIASINI, M.; SCHWEDE, T. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. **Bioinformatics**, v. 27, n. 3, p. 343–350, 2011.
- BERO, J. et al. In vivo antimalarial activity of *Keetia leucantha* twigs extracts and in vitro antiplasmodial effect of their constituents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 149, n. 1, p. 176–183, 2013.
- BIASINI, M. et al. SWISS-MODEL: Modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. W1, p. 252–258, 2014.
- BISHAYEE, A. et al. Triterpenoids as potential agents for the chemoprevention and therapy of breast cancer. **Front. Biosci-Landmark**, v. 16, p. 980–996, 2011.
- BISSANTZ, C.; KUHN, B.; STAHL, M. A medicinal chemist's guide to molecular interactions. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 14, p. 5061–5084, 2010.
- BLASCO, B.; LEROY, D.; FIDOCK, D. A. Antimalarial drug resistance: linking *Plasmodium falciparum* parasite biology to the clinic. **Nature Medicine**, 2017.
- BORDOLI, L. et al. Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace. **Nature Protocols**, v. 4, n. 1, p. 1–13, 2009.
- BRENDOLISE, C. et al. An unusual plant triterpene synthase with predominant α -amyrin- producing activity identified by characterizing oxidosqualene cyclases from *Malus × domestica*. **FEBS Journal**, v. 278, n. 14, p. 2485–2499, 2011.
- BRINI, M.; CARAFOLI, E. Calcium pumps in health and disease. **Physiological reviews**, v. 89, n. 4, p. 1341–78, 2009.
- BRONIATOWSKI, M. et al. Interactions of pentacyclic triterpene acids with cardiolipins and related phosphatidylglycerols in model systems. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1838, n. 10, p. 2530–2538, 2014.

- BROOIJMANS, N.; KUNTZ, I. D. Molecular recognition and docking algorithms. **Annual review of biophysics and biomolecular structure**, v. 32, p. 335–373, 2003.
- BUBLITZ, M. et al. **In and out of the cation pumps: P-Type ATPase structure revisited** **Current Opinion in Structural Biology**, 2010.
- CARGNIN, S. T. et al. Anti-Trichomonas vaginalis activity of Hypericum polyanthemum extract obtained by supercritical fluid extraction and isolated compounds. **Parasitology International**, v. 62, p. 112–117, 2013.
- CAVASOTTO, C. N.; ORRY, A. J. Ligand Docking and Structure-based Virtual Screening in Drug Discovery. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 10, p. 1006–1014, 2007.
- CAVASOTTO, C. N.; PHATAK, S. S. Homology modeling in drug discovery: current trends and applications. **Drug Discovery Today**, v. 14, n. 13–14, p. 676–683, 2009.
- CHAKRABORTY, B. et al. Synthesis and biological evaluation of a novel betulinic acid derivative as an inducer of apoptosis in human colon carcinoma cells (HT-29). **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 102, p. 93–105, 2015.
- CHAN, A. K. C. et al. Utility of aPTT in monitoring unfractionated heparin in children. **Thrombosis Research**, v. 122, n. 1, p. 135–136, jul. 2017.
- CHANDRAN, S.; SINGH, R. S. P. Comparison of various international guidelines for analytical method validation. **Die Pharmazie**, v. 62, n. 1, p. 4–14, 2007.
- CHEN, H. et al. Evolution in medicinal chemistry of ursolic acid derivatives as anticancer agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 92, p. 648–655, 2015.
- CONCEIÇÃO DE OLIVEIRA, M.; SICHIERI, R.; SANCHEZ MOURA, A. Weight loss associated with a daily intake of three apples or three pears among overweight women. **Nutrition**, v. 19, n. 3, p. 253–256, 2003.
- CORNILLE, A. et al. New insight into the history of domesticated apple: Secondary contribution of the European wild apple to the genome of cultivated varieties. **PLoS Genetics**, v. 8, n. 5, 2012.
- CUI, L. et al. Malaria in the Greater Mekong Subregion: Heterogeneity and complexity. **Acta Tropica**, v. 121, n. 3, p. 227–239, 2012.
- DA LUZ, G. et al. Triterpene derivative: A potential signaling pathway for the fern-9(11)-ene-2 α ,3 β -diol on insulin secretion in pancreatic islet. **Life Sciences**, v. 154, n. 11, p. 58–65, 2016.
- DA SILVA, G. N. et al. Two series of new semisynthetic triterpene derivatives: differences in anti-malarial activity, cytotoxicity and mechanism of action. **Malaria Journal**, v. 12, n. 1, p. 89, 2013.
- DAR, B. A. et al. Synthesis and screening of ursolic acid-benzylidene derivatives as potential anti-cancer agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 111, p. 26–32, 2016.

- DE AMORIM, H. L. N.; NETZ, P. A.; GUIMARÃES, J. A. Thrombin allosteric modulation revisited: A molecular dynamics study. **Journal of Molecular Modeling**, v. 16, n. 4, p. 725–735, 2010.
- DE OLIVEIRA, B. H.; SANTOS, C. A. M.; ESPÍNDOLA, A. P. D. M. Determination of the triterpenoid, betulinic acid, in *Doliocarpus schottianus* by HPLC. **Phytochemical Analysis**, v. 13, n. 2, p. 95–98, 2002.
- DIMARINO, D. et al. Characterization of the differences in the cyclopiazonic acid binding mode to mammalian and *P. Falciparum* Ca²⁺ pumps: A computational study. **Proteins: Structure, Function and Bioinformatics**, v. 83, n. 3, p. 564–574, 2015.
- DING, M. et al. Inhibition of AP-1 and Neoplastic Transformation by Fresh Apple Peel Extract. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 11, p. 10670–10676, 2004.
- DOMINGUES, R. et al. Bioactive Triterpenic Acids: From Agroforestry Biomass Residues to Promising Therapeutic Tools. **Mini-Reviews in Organic Chemistry**, v. 11, n. 3, p. 382–399, 2014.
- DZUBAK, P. et al. Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. **Natural Product Reports**, v. 23, n. 29, p. 394–411, 2006.
- ECKSTEIN-LUDWIG, U. et al. Artemisinins target the SERCA of *Plasmodium falciparum*. **Nature**, v. 424, n. 6951, p. 957–961, 2003a.
- ECKSTEIN-LUDWIG, U. et al. Artemisinins target the SERCA of *Plasmodium falciparum*. **Nature**, v. 424, n. 6951, p. 957–961, 2003b.
- ERIKSSON, E. S. E.; ERIKSSON, L. A. Identifying the sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺ ATPase (SERCA) as a potential target for hypericin - a theoretical study. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 14, n. 36, p. 12637–12646, 2012.
- ESCARPA, A.; GONZALEZ, M. C. High-performance liquid chromatography with diode-array detection for the determination of phenolic compounds in peel and pulp from different apple varieties. **Journal of Chromatography A**, v. 823, n. 1–2, p. 331–337, 1998.
- FAN, J.-P.; LIAO, D.-D.; ZHANG, X.-H. Ultrasonic assisted extraction of ursolic acid from apple pomace: A novel and facile technique. **Separation Science and Technology**, v. 51, n. 8, p. 1344–1350, 2016.
- FARIA, ANA CAROLINA. SANTELLI, SILVIA. PINTO, CAMILA. PETERKA, CASSIO LEONEL. BARBOSA, P. Plano de eliminação de malária no Brasil. p. 1–6, 2016.
- FARMACOPÉIA, A. N. D. V. S. Farmacopeia Brasileira. **Farmacopeia Brasileira**, 5ª edição, v. 1, p. 1–523, 2010.
- FARNETI, B. et al. Is there room for improving the nutraceutical composition of apple? **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 10, p. 2750–2759,

2015.

FERREIRA, R. S.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Integrating Virtual and High-Throughput Screening: Opportunities and Challenges in Drug Research and Development. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1770–1778, 2011.

FIDOCK, D. A. et al. Antimalarial drug discovery: efficacy models for compound screening. **Nature Reviews Drug Discovery**, 2004.

FONTES, J. F. **Guia prático de tratamento da malária no Brasil**. [s.l.: s.n.]. v. 1

FRISCH, M. J. et al. **GAUSSIAN 03 (Revision D.02)**Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2004.

FURUYAMA, W. et al. An Interplay Between 2 Signaling Pathways: Melatonin-cAMP and IP3-Ca²⁺ Signaling Pathways Control Intraerythrocytic Development of the Malaria Parasite Plasmodium falciparum. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 446, n. 1, p. 125–131, 2014.

GASPER, A. et al. Consumption of both low and high (-)-epicatechin apple puree attenuates platelet reactivity and increases plasma concentrations of nitric oxide metabolites: A randomized controlled trial. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 559, n. June, p. 29–37, 2014.

GASTEIGER, J.; MARSILI, M. Iterative partial equalization of orbital electronegativity—a rapid access to atomic charges. **Tetrahedron**, v. 36, n. 22, p. 3219–3228, 1980.

GEHLERT, S.; BLOCH, W.; SUHR, F. **Ca²⁺-Dependent Regulations and Signaling in Skeletal Muscle: From Electro-Mechanical Coupling to Adaptation**International Journal of Molecular Sciences , 2015.

GNOATTO, S. C. B. et al. Evaluation of ursolic acid isolated from Ilex paraguariensis and derivatives on aromatase inhibition. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 9, p. 1865–1877, 2008a.

GNOATTO, S. C. B. et al. Pharmacomodulation on the 3-acetylursolic acid skeleton: Design, synthesis, and biological evaluation of novel N-{3-[4-(3-aminopropyl)piperazinyl]propyl}-3-O-acetylursolamide derivatives as antimalarial agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 2, p. 771–782, 2008b.

GNOATTO, S. C. B.; SCHENKEL, E. P.; BASSANI, V. L. HPLC method to assay total saponins in Ilex paraguariensis aqueous extract. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 4, p. 723–726, 2005.

GORDALIZA, M. Natural products as leads to anticancer drugs. **Clinical and Translational Oncology**, v. 9, n. 12, p. 767–776, 2007.

GRIGORAS, C. G. et al. Evaluation of apple pomace extracts as a source of bioactive compounds. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 794–804, 2013.

GUPTA, A. K.; SAXENA, A. K. Molecular modelling based target identification for endo-peroxides class of antimalarials. **Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening**, v. 18, n. 2, p. 199–207, 2015.

- HARRIS, S. A.; ROBINSON, J. P.; JUNIPER, B. E. Genetic clues to the origin of the apple. **Trends in Genetics**, v. 18, n. 8, p. 426–430, 2002.
- HAWERROTH, F. J. et al. Dormência em frutíferas de clima temperado. p. 57, 2010.
- HAYNES, R. K. et al. The Fe²⁺-mediated decomposition, PfATP6 binding, and antimalarial activities of artemisone and other artemisinins: The unlikelihood of C-centered radicals as bioactive intermediates. **ChemMedChem**, v. 2, n. 10, p. 1480–1497, 2007.
- HE, Q. Q. et al. Chemical constituents of gold-red apple and their α -glucosidase inhibitory activities. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 10, p. C1970–C1983, 2014.
- HELAL, M. A.; AVERY, M. A. Combined receptor-based and ligand-based approach to delineate the mode of binding of guaianolide-endoperoxides to PfATP6. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 17, p. 5410–5414, 2012.
- HILL, R. A.; CONNOLLY, J. D. Triterpenoids. **Nat. Prod. Rep.**, v. 30, n. 7, p. 1028–1065, 2013.
- HIRAMATSU, R. et al. Betulinic acid and oleanolic acid, natural pentacyclic triterpenoids, interfere with N-linked glycan modifications to intercellular adhesion molecule-1, but not its intracellular transport to the cell surface. **European Journal of Pharmacology**, v. 767, p. 126–134, 2015.
- HODGSON, J. M. et al. Apple intake is inversely associated with all-cause and disease-specific mortality in elderly women. **The British journal of nutrition**, v. 115, n. 5, p. 860–7, 2016.
- HSU, T.-I. et al. A novel derivative of betulinic acid, SYK023, suppresses lung cancer growth and malignancy. **Oncotarget**, v. 6, n. 15, p. 13671–13687, 2015.
- HUEY, R. et al. A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation. **Journal of Computational Chemistry**, v. 28, n. 6, p. 1145–1152, abr. 2007.
- HUSSAIN, H. et al. Ursolic acid derivatives for pharmaceutical use: a patent review (2012-2016). **Expert opinion on therapeutic patents**, v. 0, n. 0, p. 1–12, 2017.
- ICH. ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. **International Conference on Harmonization**, v. 1994, n. November 1996, p. 17, 2005.
- INNOCENTE, A. M. et al. Synthesis and antiplasmodial activity of betulinic acid and ursolic acid analogues. **Molecules**, v. 17, n. 10, p. 12003–12014, 2012a.
- INNOCENTE, A. M. et al. Synthesis and antiplasmodial activity of betulinic acid and ursolic acid analogues. **Molecules**, v. 17, n. 10, p. 12003–12014, 2012b.
- IUCHI, V. L. et al. Quebra da dormência da macieira (*Malus domestica* Borkh) em São Joaquim-SC. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 1, p. 168–174,

2002.

JACOTET-NAVARRO, M. et al. Ultrasound versus microwave as green processes for extraction of rosmarinic, carnosic and ursolic acids from rosemary. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 27, p. 102–109, 2015.

JÄGER, S. et al. Pentacyclic triterpene distribution in various plants - rich sources for a new group of multi-potent plant extracts. **Molecules**, v. 14, n. 6, p. 2016–2031, 2009.

JANG, S. E. et al. Ursolic acid isolated from the seed of cornus officinalis ameliorates colitis in mice by inhibiting the binding of lipopolysaccharide to toll-like receptor 4 on macrophages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 40, p. 9711–9721, 2014.

JUNG, M. et al. Three-dimensional structure of Plasmodium falciparum Ca²⁺-ATPase(PfATP6) and docking of artemisinin derivatives to PfATP6. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, n. 12, p. 2994–2997, 2005.

JYOTI, M. A. et al. In vitro effect of ursolic acid on the inhibition of Mycobacterium tuberculosis and its cell wall mycolic acid. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v. 33, p. 17–24, 2015.

KALANI, K. et al. Role of Isoprenoid Compounds on Angiogenic Regulation: Opportunities and Challenges. **PLoS ONE**, v. 23, n. 9, p. 115–119, 2013a.

KALANI, K. et al. In Silico and In Vivo Anti-Malarial Studies of 18 β Glycyrrhetic Acid from Glycyrrhiza glabra. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. 1–11, 2013b.

KALANI, K. et al. QSAR-guided semi-synthesis and in vitro validation of antiplasmodial activity in ursolic acid derivatives. **RSC Adv.**, v. 5, n. 41, p. 32133–32143, 2015.

KAMEL, A. M.; BROWN, P. R.; MUNSON, B. Effects of mobile-phase additives, solution pH, ionization constant, and analyte concentration on the sensitivities and electrospray ionization mass spectra of nucleoside antiviral agents. **Analytical Chemistry**, v. 71, n. 24, p. 5481–5492, 1999.

KASHIWADA, Y. et al. Anti-AIDS Agents 38. Anti-HIV Activity of 3-O-Acylursolic acid Derivatives. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 12, p. 1619–1622, 2000.

KASHYAP, D.; TULI, H. S.; SHARMA, A. K. Ursolic acid (UA): A metabolite with promising therapeutic potential. **Life Sciences**, v. 146, p. 201–213, 2016.

KITCHEN, D. B. et al. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nat Rev Drug Discov**, v. 3, n. 11, p. 935–949, 2004.

KRIEGER, E. et al. Improving physical realism, stereochemistry, and side-chain accuracy in homology modeling: Four approaches that performed well in CASP8. **Proteins: Structure, Function and Bioinformatics**, v. 77, n. SUPPL. 9, p. 114–122, 2009.

- KRISHNA, S. et al. Artemisinins and the biological basis for the PfATP6/SERCA hypothesis. **Trends in Parasitology**, v. 26, n. 11, p. 517–523, 2010.
- KRISHNA, S. et al. Pumped up: Reflections on PfATP6 as the target for artemisinins. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 35, n. 1, p. 4–11, 2014.
- KÜHLBRANDT, W. Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 2004.
- LAMBERT, C. et al. ESyPred3D: Prediction of proteins 3D structures. **Bioinformatics**, v. 18, n. 9, p. 1250–1256, 2002.
- LEE, J. Y. et al. Anti-inflammatory effects of ursolic acid-3-acetate on human synovial fibroblasts and a murine model of rheumatoid arthritis. **International Immunopharmacology**, v. 49, n. November 2016, p. 118–125, 2017.
- LEE, J. Y.; MOON, H.; KIM, C. J. Effects of hydroxy pentacyclic triterpene acids from *Forsythia viridissima* on asthmatic responses to ovalbumin challenge in conscious guinea pigs. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 33, n. 2, p. 230–237, 2010.
- LEONTOWICZ, M. et al. Apple and pear peel and pulp and their influence on plasma lipids and antioxidant potentials in rats fed cholesterol-containing diets. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 19, p. 5780–5785, 2003.
- LI, D. et al. Potent inhibitory effect of terpenoids from *Acanthopanax trifoliatum* on growth of PC-3 prostate cancer cells in vitro and in vivo is associated with suppression of NF- κ B and STAT3 signalling. **Journal of Functional Foods**, v. 15, p. 274–283, 2015.
- LIBY, K. T.; YORE, M. M.; SPORN, M. B. Triterpenoids and rexinoids as multifunctional agents for the prevention and treatment of cancer. **Nature reviews. Cancer**, v. 7, n. 5, p. 357–369, 2007.
- LINGARAJU, M. C. et al. Betulinic acid attenuates renal oxidative stress and inflammation in experimental model of murine polymicrobial sepsis. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 70, p. 12–21, 2015.
- LV, Y.; TAHIR, I. I.; OLSSON, M. E. Factors affecting the content of the ursolic and oleanolic acid in apple peel: Influence of cultivars, sun exposure, storage conditions, bruising and *Penicillium expansum* infection. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 6, p. 2161–2169, 2016.
- MA, C.-M. et al. The cytotoxic activity of ursolic acid derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 40, n. 6, p. 582–589, 2005.
- MARICA BAKOVIC, N. H. Biologically Active Triterpenoids and Their Cardioprotective and Anti- Inflammatory Effects. **Journal of Bioanalysis & Biomedicine**, v. 01, n. s12, 2015.
- MARTÍNEZ, J. M.; MARTÍNEZ, L. Packing optimization for automated generation of complex system's initial configurations for molecular dynamics and docking. **Journal of Computational Chemistry**, v. 24, n. 7, p. 819–825, 2003.
- MAZUMDER, K.; TANAKA, K.; FUKASE, K. Cytotoxic activity of ursolic acid

- derivatives obtained by isolation and oxidative derivatization. **Molecules**, v. 18, n. 8, p. 8929–8944, 2013.
- MCGHIE, T. K. et al. Apple peels, from seven cultivars, have lipase-inhibitory activity and contain numerous ursenoic acids as identified by LC-ESI-QTOF-HRMS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 1, p. 482–491, 2012.
- MERTENS-TALCOTT, S. U. et al. Betulinic acid decreases ER-negative breast cancer cell growth in vitro and in vivo: Role of Sp transcription factors and microRNA-27a: ZBTB10. **Molecular Carcinogenesis**, v. 52, n. 8, p. 591–602, 2013.
- MILLER, L. H. et al. The pathogenic basis of malaria. **Nature**, v. 415, n. 6872, p. 673–679, 2002.
- MILLER, L. H. et al. Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. **Nature Medicine**, v. 19, n. 2, p. 156–167, 2013.
- MITSUDA, S. et al. Ursolic acid, a natural pentacyclic triterpenoid, inhibits intracellular trafficking of proteins and induces accumulation of intercellular adhesion molecule-1 linked to high-mannose-type glycans in the endoplasmic reticulum. **FEBS Open Bio**, v. 4, p. 229–239, 2014.
- MØLLER, J. V. et al. **Transport mechanism of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase pump** *Current Opinion in Structural Biology*, 2005.
- MORRIS, G. M. et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of Computational Chemistry**, v. 30, n. 16, p. 2785–2791, dez. 2009.
- NAGASAKO-AKAZOME, Y. et al. Apple Polyphenols Influence Cholesterol Metabolism in Healthy Subjects with Relatively High Body Mass Index. **Journal of Oleo Science**, v. 56, n. 8, p. 417–428, 2007.
- NAIK, P. K. et al. The binding modes and binding affinities of artemisinin derivatives with Plasmodium falciparum Ca²⁺-ATPase (PfATP6). **Journal of Molecular Modeling**, v. 17, n. 2, p. 333–357, 2011a.
- NAIK, P. K. et al. The binding modes and binding affinities of artemisinin derivatives with Plasmodium falciparum Ca²⁺-ATPase (PfATP6). **Journal of Molecular Modeling**, v. 17, n. 2, p. 333–357, 2011b.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 311–335, 2012.
- O'NEILL, P. M.; BARTON, V. E.; WARD, S. A. The molecular mechanism of action of artemisinin - The debate continues. **Molecules**, v. 15, n. 3, p. 1705–1721, 2010.
- OECD. **Test No. 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method**. [s.l.] OECD Publishing, 2001.
- OLESEN, C. et al. The structural basis of calcium transport by the calcium pump. **Nature**, v. 450, n. 7172, p. 1036–1042, 2007.

- OLLIARO, P. L.; YUTHAVONG, Y. **An overview of chemotherapeutic targets for antimalarial drug discovery** *Pharmacology and Therapeutics*, 1999.
- ORGANIZATION, W. H. World malaria report 2015. **Geneva: WHO**, 2015.
- OSUNSANMI, F. O. et al. Anti-platelet aggregation of mixtures of betulinic oleanolic and maslinic acids and derivatives from medicinal plants. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 15, n. 8, p. 1613–1619, 2016.
- PAI, S. R. et al. Determination of betulinic acid, oleanolic acid and ursolic acid from *Achyranthes aspera* L. using RP-UFLC-DAD analysis and evaluation of various parameters for their optimum yield. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 54, n. 3, p. 196–202, 2016.
- PATIL, R. et al. Optimized Hydrophobic Interactions and Hydrogen Bonding at the Target-Ligand Interface Leads the Pathways of Drug-Designing. **PLOS ONE**, v. 5, n. 8, p. e12029, ago. 2010.
- PINK, R. et al. Opportunities and challenges in antiparasitic drug discovery. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 4, n. September, p. 727–740, 2005.
- PLANTE, M. et al. Sensitive HPLC method for triterpenoid analysis using charged aerosol detection with improved resolution. **Thermo Scientific Inc.**, p. 1–7, 2012.
- RASHID, S. et al. Synthesis and biological evaluation of ursolic acid-triazolyl derivatives as potential anti-cancer agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 66, p. 238–245, 2013.
- RAVAL, A. et al. Refinement of protein structure homology models via long, all-atom molecular dynamics simulations. **Proteins: Structure, Function and Bioinformatics**, v. 80, n. 8, p. 2071–2079, 2012.
- RAVN-HAREN, G. et al. Intake of whole apples or clear apple juice has contrasting effects on plasma lipids in healthy volunteers. **European Journal of Nutrition**, v. 52, n. 8, p. 1875–1889, 2013.
- RHOURI-FRIH, B. et al. Analysis of pentacyclic triterpenes by LC-MS. A comparative study between APCI and APPI. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 44, n. 1, p. 71–80, 2009.
- RÍOS, J. L. Effects of triterpenes on the immune system. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, n. 1, p. 1–14, 2010.
- ROBINSON, J. P.; HARRIS, S. A.; JUNIPER, B. E. Taxonomy of the genus *Malus* mill. (Rosaceae) with emphasis on the cultivated apple, *Malus domestica* Borkh. **Plant Systematics and Evolution**, v. 226, n. 1–2, p. 35–58, 2001.
- RODRIGUES, R. P. ; et al. Estratégias de Triagem Virtual no Planejamento de Fármacos Virtual Screening Strategies in Drug Design. v. 4, n. 6, p. 739–776, 2012.
- ROSENTHAL, P. J. Antimalarial drug discovery: old and new approaches. **Journal of Experimental Biology**, v. 206, n. 21, p. 3735–3744, 2003.
- RUDRAPAL, M. A Brief Review on Malaria and Current Antimalarial Drugs.

- CPR, v. 1, n. 3, p. 286–292, 2011.
- SAFE, S. H. et al. Unifying mechanisms of action of the anticancer activities of triterpenoids and synthetic analogs. **Anti-cancer agents in medicinal chemistry**, v. 12, n. 10, p. 1211–20, 2012.
- SALVADOR, J. A. R. et al. Ursane-type pentacyclic triterpenoids as useful platforms to discover anticancer drugs. **Natural Product Reports**, v. 29, n. 12, p. 1463, 2012.
- SANDER, T. et al. New insights into the GABA A receptor structure and orthosteric ligand binding: Receptor modeling guided by experimental data. **Proteins: Structure, Function and Bioinformatics**, v. 79, n. 5, p. 1458–1477, 2011.
- SANDER, T.; LILJEFORS, T.; BALLE, T. Prediction of the receptor conformation for iGluR2 agonist binding: QM/MM docking to an extensive conformational ensemble generated using normal mode analysis. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 26, n. 8, p. 1259–1268, 2008.
- SANT’ANNA, C. M. R. Molecular modeling methods in the study and design of bioactive compounds: An introduction. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 1, p. 49–57, 2009.
- SANTOS FILHO, O. A.; BICCA DE ALENCASTRO, R. Modelagem de proteínas por homologia. **Química Nova**, v. 26, n. 2, p. 253–259, 2003.
- SCHWEDE, T. et al. SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 13, p. 3381–3385, 2003.
- SECRETARIA DE POLÍTICA AGRÍCOLA (MAPA). Cenário da cadeia produtiva da maçã. **Informativo Secretaria de Política Agrícola Informativo da Secretaria de Política Agrícola**, v. 54, n. 6, p. 7, 2013.
- SELIM, Y.; LITINAS, K. Cytotoxic and antibacterial activities of two new triterpenoids from the peels of local Egyptian *Malus domestica* L. **Medicinal Chemistry Research**, v. 24, n. 12, p. 4016–4022, 2015.
- SHANDILYA, A. et al. A plausible mechanism for the antimalarial activity of artemisinin: A computational approach. **Scientific Reports**, v. 3, n. 1, p. 2513, 2013.
- SHANMUGAM, M. K. et al. Targeted inhibition of tumor proliferation, survival, and metastasis by pentacyclic triterpenoids: Potential role in prevention and therapy of cancer. **Cancer Letters**, v. 320, n. 2, p. 158–170, 2012.
- SHEN, Y.; BAX, A. Homology modeling of larger proteins guided by chemical shifts. **Nature Methods**, v. 12, n. 8, p. 747–750, 2015.
- SHENG, H.; SUN, H. Synthesis, biology and clinical significance of pentacyclic triterpenes: a multi-target approach to prevention and treatment of metabolic and vascular diseases. **Natural Product Reports**, v. 28, n. 3, p. 543, 2011.
- SILVA, F. R. M. ENA B. The mechanism of action of ursolic acid as insulin secretagogue and insulinomimetic is mediated by cross-talk between calcium and

- kinases to regulate glucose balance. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1850, n. 1, p. 51–61, 2015.
- SILVA, G. N. S. et al. Investigation of antimalarial activity, cytotoxicity and action mechanism of piperazine derivatives of betulinic acid. **Tropical Medicine and International Health**, v. 20, n. 1, p. 29–39, 2015.
- SOICA, C. et al. **New Improved Drug Delivery Technologies for Pentacyclic Triterpenes: A Review** *Protein & Peptide Letters*, 2014.
- SUN, D.-P. et al. Gypenosides induce apoptosis by Ca^{2+} overload mediated by endoplasmic-reticulum and store-operated Ca^{2+} channels in human hepatoma cells. **Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals**, v. 28, n. 4, p. 320–6, 2013.
- SZAKIEL, A. et al. Fruit cuticular waxes as a source of biologically active triterpenoids. **Phytochemistry Reviews**, v. 11, n. 2–3, p. 263–284, 2012.
- THILAKARATHNA, S. H.; RUPASINGHE, H. P. V.; NEEDS, P. W. Apple peel bioactive rich extracts effectively inhibit in vitro human LDL cholesterol oxidation. **Food Chemistry**, v. 138, n. 1, p. 463–470, 2013.
- TOBERGTE, D. R.; CURTIS, S. **O produtor pergunta, a Embrapa responde**. [s.l.: s.n.]. v. 53
- TOSTES, J. B. F. et al. Efficient and selective method to separate triterpene acids by direct treatment of apple peels with alkaline ethanol. **Separation Science and Technology (Philadelphia)**, v. 51, n. 12, p. 1986–1993, 2016.
- TOYOSHIMA, C.; INESI, G. Structural Basis of Ion Pumping by Ca^{2+} -ATPase of the Sarcoplasmic Reticulum. **Annual Review of Biochemistry**, 2004.
- USDA. Fresh Deciduous Fruit (Apples , Grapes , & Pears): World Markets and Trade. **United States Department of Agriculture**, p. 9, 2017.
- VALDERRAMOS, S. G. et al. Investigations into the role of the Plasmodium falciparum SERCA (PfATP6) L263E mutation in artemisinin action and resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 9, p. 3842–3852, 2010.
- VETAL, M. D.; SHIRPURKAR, N. D.; RATHOD, V. K. Three phase partitioning coupled with ultrasound for the extraction of ursolic acid and oleanolic acid from Ocimum sanctum. **Food and Bioproducts Processing**, v. 92, n. 4, p. 402–408, 2014.
- VYAS, V. et al. Homology modeling a fast tool for drug discovery: Current perspectives. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 74, n. 1, p. 1, 2012.
- WALDBAUER, K. et al. Triterpenic Acids from Apple Pomace Enhance the Activity of the Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 1, p. 185–194, 2016.
- WANG, C. M. et al. Antibacterial and synergistic activity of pentacyclic triterpenoids isolated from Alstonia scholaris. **Molecules**, v. 21, n. 2, p. 1–11, 2016.

- WHO. World Malaria Report. 2016.
- WINTHER, A. M. L. et al. Critical roles of hydrophobicity and orientation of side chains for inactivation of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase with thapsigargin and thapsigargin analogs. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 37, p. 28883–28892, 2010.
- WÓJCIAK-KOSIOR, M. et al. Effect of different extraction techniques on quantification of oleanolic and ursolic acid in *Lamii albi flos*. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 373–377, 2013.
- WOZNIAK, L.; SKAPSKA, S.; MARSZALEK, K. Ursolic acid - A pentacyclic triterpenoid with a wide spectrum of pharmacological activities. **Molecules**, v. 20, n. 11, p. 20614–20641, 2015.
- WU, P. P. et al. In vitro and in vivo evaluation of the antidiabetic activity of ursolic acid derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 80, p. 502–508, 2014.
- XIE, P. et al. Antithrombotic effect and mechanism of *Rubus* spp. Blackberry. **Food & Function**, v. 8, n. 5, p. 2000–2012, 2017.
- YANG, S. J. et al. Synthesis and in vitro antitumor evaluation of betulin acid ester derivatives as novel apoptosis inducers. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 102, p. 249–255, 2015.
- ZHANG, S. et al. Determination of triterpenic acids in fruits by a novel high performance liquid chromatography method with high sensitivity and specificity. **Food Chemistry**, v. 146, p. 264–269, 2014.
- ZHU, Y. et al. Synthesis and Anti-HIV Activity of Oleanolic Acid Derivatives. v. 11, p. 3115–3118, 2001.

ANEXO A:

O artigo originado a partir do trabalho apresentado no Capítulo I desta Tese foi aceito para publicação no Periódico “*Journal of Applied Pharmaceutical Science*”. (Figura A-1).

Figura A-1: Confirmação do aceite do artigo para publicação no Periódico JAPS.

The screenshot displays the JAPS website interface. At the top, the journal title "JAPS Journal of Applied Pharmaceutical Science" is visible. Below the title, there is a navigation menu with links: Home, About the Journal, Editorial Board, Author's Guidelines, Submit Manuscript, and Contact. A secondary navigation bar contains icons for Home/About, Guide for Authors, Switch Journal, Submit New Manuscript, Status of my Articles, Personal Information, Help, Author Courses, and LOGOUT (Andrea Cristina Wildner). The main content area is titled "Accepted Manuscripts" and contains a table with the following data:

Title	Authors	Status
[Variation of Ursolic and Betulinic Acid in Five Malus x domestica clones from Southern Brazil]	Andrea Wildner Campos, Pâmela Lukasewicz Ferreira, Sedy Sales Oliveira, Simone Baggio Gnoatto, Ana Maria Bergold	Acceptance letter in PDF

Below the table, a message states: "Your article is being prepared for your proof".

The email body text is as follows:

May 12, 2018

Dear Andrea Wildner Campos,

I am pleased to inform you that your manuscript titled as "Variation of Ursolic and Betulinic Acid in Five Malus x domestica clones from Southern Brazil" (Manuscript Number: JAPS-2017-10-1138) was accepted for publication in the Journal of Applied Pharmaceutical Science.

ANEXO B:

Informações Suplementares do artigo apresentado no CAPÍTULO II.

Supplementary Information

**Desenvolvimento e Validação de Metodologia Analítica para Determinação
de Ácidos Triterpênicos em extratos de cascas de *Malus × domestica***

**Andreia C. Wildner^{1*}, Pâmela L. Ferreira¹, Sendy S. Oliveira², Simone B.
Gnoatto¹, Ana M. Bergold¹**

¹*Universidade Federal do Rio Grande do Sul/Programa de Pós-graduação em
Ciências Farmacêuticas, Av. Ipiranga, 2752, Porto Alegre, RS 90610-000, Brazil*






²*Universidade Federal do Rio Grande do Sul/Faculdade de Farmácia, Porto
Alegre/RS, Brazil*

*Corresponding author, e-mail: andreiacwcl@gmail.com

Supplementary Information

ANEXO C:

Artigo originado com o estudo de *Docking* apresentado no Capítulo II e publicado no Periódico “*Chemico-Biological Interactions*”.

	<p>Chemico-Biological Interactions</p> <p>Volume 287, 1 May 2018, Pages 70-77</p>	
<p>SERCA plays a crucial role in the toxicity of a betulinic acid derivative with potential antimalarial activity</p>		
<p>Denise Diedrich ^{a, 1}, Andreia C. Wildner ^{a, 1}, Thayse F. Silveira ^a, Gloria N.S. Silva ^a, Francine dos Santos ^a, Elenilson F. da Silva ^a, Vanessa P. do Canto ^b, Fernanda Visioli ^b, Grace Gosmann ^a, Ana M. Bergold ^a, Aline R. Zimmer ^a, Paulo A. Netz ^c, Simone C.B. Gnoatto ^a  </p>		
<p> Show more</p>		
<p>https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.03.014</p>		<p>Get rights and content</p>

