

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA**

**CINTHIA COSTA DE LIMA**

**Estudo Químico e Avaliação do Potencial Biológico de Extratos e Compostos  
Isolados de Folhas e Caule de *Myrciaria ferruginea* O. Berg (Myrtaceae)**

**Maceió/AL  
2016**

**CINTHIA COSTA DE LIMA**

**Estudo Químico e Avaliação do potencial Biológico de Extratos e Compostos Isolados de Folhas e Caule de *Myrciaria ferruginea* O. Berg (Myrtaceae)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências. Este trabalho foi realizado sob a orientação da **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lucia Maria Conserva.**

**Maceió/AL  
2016**

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**

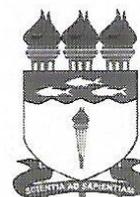
Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

- L732e Lima, Cinthia Costa de.  
Estudo químico e avaliação do potencial biológico de extratos e compostos isolados de folhas e caule de *Myrciaria ferruginea* O. Berg (Myrtaceae) / Cinthia Costa de Lima. – 2016.  
176 f.: il.
- Orientadora: Lucia Maria Conserva.  
Tese (Doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2016.
- Bibliografia: f. 156-176.
1. *Myrciaria ferruginea*. 2. Myrtaceae. 3. Antibacteriano . 4. Larvicida.  
5. Viabilidade celular. 6. Ácido hexametilcoruloelágico. 7. Triterpenos.  
I. Título.

CDU: 547.9: 615.281.9



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E**  
**BIOTECNOLOGIA**



BR 104 Km14, Campus A. C. Simões  
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins  
57072-970, Maceió-AL, Brasil  
Fone: (82) 3214-1144  
Email: ppgqb.ufal@gmail.com

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da comissão julgadora da defesa de tese da doutoranda **Cinthia Costa de Lima** intitulada: “**Estudo químico e avaliação do potencial biológico de extratos e compostos isolados de folhas e caule de Myrciaria ferruginea O. Berg (Myrtaceae)**”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas no dia 27 de agosto de 2016, às 08h30, na Sala de Reuniões do IQB, na Universidade Federal de Alagoas.

### COMISSÃO JULGADORA

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Lucia Maria Conserva  
Orientadora (PPGQB/IQB/UFAL)

Prof. Dr. Emiliano de Oliveira Barreto  
(ICBS/UFAL)

Profa. Dra. Éurica Adélia Nogueira Ribeiro  
(ESEN FAR/UFAL)

Prof. Dr. Dimas José da Paz Lima  
(PPGQB/IQB/UFAL)

Profa. Dra. Fabiane Caxico de Abreu Galdino  
(PPGQB/IQB/UFAL)

 <b>UFAL</b>	<b>Universidade Federal de Alagoas</b> <b>Instituto de Química e Biotecnologia</b> <b>Programa de Pós-Graduação em</b> <b>Química e Biotecnologia</b>  <a href="http://www.ufal.edu.br/unidadeacademica/iqb">www.ufal.edu.br/unidadeacademica/iqb</a>	Av. Lourival de Melo Mota, s/n Cidade Universitária Maceió-AL Brasil 57072-970 Tel. 55 82 3214-1144 e-mail: <a href="mailto:ppgqb.ufal@gmail.com">ppgqb.ufal@gmail.com</a>	 <b>IQB/PPGQB</b>
--	--	---	---

## DECLARAÇÃO

A Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas declara que **CINTHIA COSTA DE LIMA** cumpriu todos os requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências e, em sessão pública, no dia 27 de outubro de 2016, realizou sua Defesa de Tese de Doutorado intitulada: “**Estudo Químico e Avaliação do Potencial Biológico de Extratos e Compostos Isolados de Folhas e Caule de Myrciaria ferruginea O. Berg (Myrtaceae)**”, cuja Banca Julgadora, composta pelos professores doutores: Lucia Maria Conserva (Orientadora – PPGQB/IQB/Ufal), Emiliano de Oliveira Barreto (ICBS/Ufal), Eurica Adélia Nogueira Ribeiro (Esenfar/Ufal), Dimas José da Paz Lima (IQB/Ufal), Fabiane Caxico de Abreu (PPGQB/IQB/Ufal), considerou a candidata **APROVADA** para receber o título de **DOUTOR EM CIÊNCIAS** na Área de Concentração **Química Orgânica** e na Linha de Pesquisa **Produtos Naturais**.

Maceió, 30 de novembro de 2016.

  
 Prof. Dr. Mario R. Meneghetti  
 Coord. do PPGQB/IQB/Ufal  
 Siape: 13482RR  
 Prof. Dr. Mario Roberto Meneghetti  
 Coordenador do PPGQB/IQB/Ufal  
 3214-1144 ou 1744 [mmm@qui.ufal.br](mailto:mmm@qui.ufal.br) [www.iqb.ufal.br](http://www.iqb.ufal.br)

## DEDICATÓRIA

Dedico a realização deste trabalho ao ser em si, Deus-Amor, que se revela e dá a conhecer na ordem e beleza do mundo, trazendo luz, à busca do conhecimento e ao sentido da vida;

A minha família em especial aos meus pais *José A. de Lima (in memorian)* e *Josefa Sória C. de Lima (in memorian)*, pelo apoio, dedicação e amor durante toda a vida e por dignamente me apresentarem a importância da honestidade e persistência nos caminhos a serem trilhados.

## AGRADECIMENTOS

A *Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lucia Maria Conserva*, por compartilhar seus conhecimentos e oportunidade dada para realização deste trabalho;

Ao *Prof. Dr. Emiliano de Oliveira Barreto* e a *Doutoranda Jamylle Nunes T. Ferro*, pela disponibilidade, presteza e por colaborar de forma objetiva os experimentos nos ensaios de viabilidade celular, migração horizontal e antioxidante;

A botânica *Rosângela Pereira de Lyra Lemos*, do Instituto do Meio Ambiente/AL, pela coleta e identificação do material vegetal;

A *Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Lysete de A. Bastos*, da Escola de Enfermagem e Farmácia da Universidade Federal de Alagoas, pela colaboração nos ensaios antibacterianos;

A *Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Tereza Salles Trevisan* do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, da Universidade Federal do Ceará, pela colaboração nos ensaios anticolinesterásicos;

Ao *Sr. Nilo Pinto*, da Reserva de Proteção Ambiental da Usina Coruripe, pela grande contribuição na localização e coleta da espécie vegetal;

Ao *Prof. Dr. Edson de Souza Bento* e ao técnico *Adilson Rodrigues Sabino*, pelos espectros de RMN;

Aos amigos do LPqPN: *Rossiel Aslan, Jésus Costa, Jayran Almeida, Luana Barros, Luana Maria*, pela amizade, apoio e transmissão conhecimentos;

Aos técnicos *Fernando Maia* e *Aldy dos Santos*, pela disposição e acessibilidade;

Ao *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)*, *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas (FAPEAL)*, *Ministério da Ciência e Tecnologia-Instituto do Milênio do Semi-Árido (MCT-IMSEAR)* e *Banco do Nordeste-Rede Nordestina de Biotecnologia (BNB-RENORBIO)* e a *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)*, pelo apoio financeiro e bolsa concedida;

Aos *professores do Programa de Pós-Graduação em Química*, pelos ensinamentos transmitidos;

A todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Origem natural do fármaco e sua estrutura química.	21
Figura 2 -	Esquema de um corte de pele.	25
Figura 3 -	Representação gráfica da resposta normal da pele a feridas, mostrando o número relativo das principais células durante as fases do processo de cicatrização.	27
Figura 4 -	Ciclo de transmissão do vírus da dengue.	32
Figura 5 -	Ciclo de vida do mosquito.	33
Figura 6 -	Esquema de neurotransmissão colinérgica, reação de síntese e degradação da acetilcolina (ACh).	39
Figura 7 -	Princípios ativos de fármacos e pesticidas inibidores da AChE.	41
Figura 8 -	Monoterpenos e outros compostos identificados em óleos essenciais de espécies de <i>Calycolpus</i> , <i>Eugenia</i> , <i>Myrcia</i> e <i>Myrciaria</i> .	46
Figura 9 -	Sesquiterpenos e derivados fenólicos identificados em óleos essenciais de espécies de <i>Calycolpus</i> , <i>Eugenia</i> , <i>Myrcia</i> e <i>Myrciaria</i>	48
Figura 10 -	Outras classes de compostos identificados em espécies de <i>Calycolpus</i> , <i>Eugenia</i> , <i>Myrcia</i> e <i>Myrciaria</i> .	59
Figura 11 -	Fotos dos galhos, folhas e frutos (A-C) de <i>Myrciaria ferruginea</i> O. Berg.	45
Figura 12 -	Procedimento experimental efetuado com os extratos em acetona das folhas (A) e em etanol do caule (B).	65
Figura 13 -	Procedimento experimental efetuado com a fração em hexano das folhas.	67
Figura 14 -	Procedimento experimental efetuado com a fração em CHCl <sub>3</sub> das folhas.	69
Figura 15 -	Fluxograma do procedimento experimental efetuado com a fração em hexano do caule	70
Figura 16 -	Fluxograma do procedimento experimental efetuado com a fração em CHCl <sub>3</sub> do Caule	72

Figura 17 - Fluxograma do procedimento experimental efetuado com a fração em AcOEt do Caule	73
Figura 18 - Escala de Mcfarland.	76
Figura 19 - Preparo das cavidades nas placas de Petri e Medição de halos de inibição de crescimento com um paquímetro.	77
Figura 20 - Microplaca utilizada nos ensaios para determinação da CIM e reação de redução do CTT.	79
Figura 21 - Reação de redução do MTT	80
Figura 22 - Materiais de uso nos ensaios e fases evolutivas do <i>mosquito A. aegypti</i> .	84
Figura 23 - Estruturas dos compostos isolados e identificados.	87
Figura 24 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) das substâncias codificadas MfCH-1a e MfCH-1b (A) e expansão da região de δ 0,70 a δ 1,40 (B).	93 94
Figura 25 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> /CD <sub>3</sub> OD) da substância codificada de MfCH-2 (A) e expansão da região de δ 0,3 a δ 3,00 (B).	94-95
Figura 26 - Espectro de RMN <sup>13</sup> C (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) das substâncias codificadas de MfCH-1a e MfCH-1b (A) e expansão das regiões de δ 10,0 a δ 60,00 (B) e δ 10,0 a δ 25,0 (C).	95-96 95
Figura 27 - Espectro DEPT 135 (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) das substâncias codificadas de MfCH-1a e MfCH-1b (A) e expansão das regiões de δ 10,0 a δ 72,0 (B).	97
Figura 28- Espectro de RMN <sup>13</sup> C-DEPTQ (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> /CD <sub>3</sub> OD) da substância codificada de MfCH-2 (A) e expansão da região de δ 10,0 a δ 77,00 (B).	98
Figura 29 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da substância codificada de MfFH-1 (A) e expansão da região de δ 0,5 a δ 3,0 (B).	106
Figura 30 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) das Substâncias codificadas MfFC-4 (A) e expansão da região de δ 1,8 a δ 0,7 (B).	107
Figura 31 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) das Substâncias	108

	codificadas MfFC-2 (A) e expansão da região de $\delta$ 1,8 a $\delta$ 0,5 (B).	
Figura 32 -	Espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da Substância codificada de MfCC-2 (A) e expansão da região de $\delta$ 1,7 a $\delta$ 0,7 (B).	109
Figura 33 -	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da substância codificada de MfFH-1 (A) e expansão da região de $\delta$ 10,0 a $\delta$ 60,00 (B).	110
Figura 34 -	Espectro DEPT 135 (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da substância codificada de MfFH-1 (A) e expansão da região de $\delta$ 10,0 a $\delta$ 115,00 (B).	111
Figura 35 -	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da substâncias codificada de MfFC-4 (A) e expansão da região de $\delta$ 208,0 a $\delta$ 108,0 (B).	112
Figura 36 -	Expansão do espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) das substâncias codificadas de MfFC-4 (A) $\delta$ 80,0 a $\delta$ 45,0 (B) $\delta$ 44,0 a $\delta$ 14,0.	113
Figura 37 -	Espectro DEPT 135 (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da substância codificada de MfFC-4 (A) e expansão da região de $\delta$ 60,0 a $\delta$ 13,00 (B). MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância TrCaM-1 (Região de $\delta$ 5,0-7,0)	114
Figura 38 -	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância codificada de MfFC-2 (A) e expansão da região de $\delta$ 58,0 a $\delta$ 12,0 (B).	115
Figura 39 -	Espectro DEPT 135 (100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância codificada de MfFC-2 (A) e expansão da região de $\delta$ 56,0 a $\delta$ 13,00 (B).	116
Figura 40 -	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -DEPTQ (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da substância codificada de MfCC-2 (A) e expansão da região de $\delta$ 43,0 a $\delta$ 14,0 (B).	117
Figura 41 -	Expansão da região de $\delta$ 43,0 a $\delta$ 32,0 (A) $\delta$ 32,0 a $\delta$ 14,0 (B) do espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -DEPTQ (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da substância codificada de MfCC-2.	118
Figura 42 -	Espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da substância	122

	codificada de MfFH-2 (A) e expansão da região de $\delta$ 4,8 a $\delta$ 0,5 (B).	
Figura 43 -	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da substância codificada de MfFH-2 (A) e expansão da região de $\delta$ 64,0 a $\delta$ 56,0 (B).	123
Figura 44 -	Espectro DEPT 135 (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da substância codificada de MfFH-2 (A) e expansão da região de $\delta$ 63,0 a $\delta$ 61,0 (B).	124
Figura 45 -	Espectros HSQC ( $^1\text{H}$ : 400; $^{13}\text{C}$ : 100 MHz, $\text{CHCl}_3$ ) da substância codificada de MfFH-2 (A) e expansão da região $\delta$ 4,3 a $\delta$ 3,9 (B).	125
Figura 46 -	Espectros HMBC ( $^1\text{H}$ : 400; $^{13}\text{C}$ : 100 MHz, $\text{CHCl}_3$ ) da substância codificada de MfFH-2 (A) e expansão da região $\delta$ 4,3 a $\delta$ 4,4 (B).	126
Figura 47 -	Espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da Substância MfCC-3 (A) e expansão da região de $\delta$ 3,7 a $\delta$ 0,7 (B).	131
Figura 48 -	Expansão da região de $\delta$ 4,3 a $\delta$ 2,7 do espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da Substância codificada MfCC-3.	132
Figura 49 -	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da substância MfCC-3 (A) e expansão da região de $\delta$ 50,0 a $\delta$ 13,0 (B).	132 133
Figura 50 -	Espectro DEPT 135 (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da substância MfCC-3 (A) e expansão da região de $\delta$ 80,0 a $\delta$ 13,00 (B).	133 134
Figura 51 -	Espectro HSQC ( $^1\text{H}$ : 400; $^{13}\text{C}$ : 100 MHz, $\text{CHCl}_3$ ) da substância MfCC-3 (A) e expansão das regiões $\delta$ 3,8 a 3,2 (B) e $\delta$ 2,1 a 0,6 (C).	143 135
Figura 52 -	Espectro HMBC ( $^1\text{H}$ : 400; $^{13}\text{C}$ : 100 MHz, $\text{CHCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância MfCC-3 (A) e expansão da região $\delta$ 4,2 a 3,2 (B).	136
Figura 53 -	Representação esquemática da reação de redução do MTT	140
Figura 54 -	Efeito do extrato bruto em acetona e frações de partição das folhas de <i>M. ferruginea</i> sobre a viabilidade de células 3T3 pelo método do MTT. As barras expressam a media de três experimentos independentes e a linha tracejada representa a viabilidade de células não tratadas.	141
Figura 55 -	Efeito pelo método do MTT do extrato bruto em EtOH e	142

frações de partição do caule sobre a viabilidade de células 3T3. As barras expressam a média de três experimentos independentes e a linha tracejada representa a viabilidade de células não tratadas.

- Figura 56 - Efeito pelo método do MTT de MfFH-2 (*Ácido hexametilcoruololágico*) e da mistura MfFC-4 (*Lupeol e 3 $\beta$ -Betulinaldeído*) sobre a viabilidade de células 3T3. As barras expressam a média de três experimentos independentes e a linha tracejada representa a viabilidade de células não tratadas. 143
- Figura 57 - Efeito dos compostos MfFC-4 (mistura de *Lupeol e 3 $\beta$ -Betulinaldeído*), MfFH-2 (*Ácido hexametilcoruololágico*) e *3 $\beta$ -Betulinaldeído* sobre a viabilidade de células macrófagos (linhagem J774), durante 24 h, nas concentrações de 15,625, 32,25 ou 62,5  $\mu\text{g/mL}$ , usando o ensaio MTT. Os dados foram expressos como percentual de células viáveis em comparação com o grupo de células viáveis do grupo controle e foram apresentados como a média  $\pm$  desvio padrão. 144
- Figura 58 - Estrutura básica do lipídeo-A ligado ao núcleo interno LPS em uma bactéria Gram-negativa, a *E. coli*. 145
- Figura 59 - Efeito dos compostos MfFC-4 (*Lupeol e 3 $\beta$ -Betulinaldeído*; A) MfFH-2 (*Ác. hexametilcoruololágico*; B) e *3 $\beta$ -Betulinaldeído* (C) sobre a produção de EROs por macrófagos usando ensaio do nitroazul de tetrazólio. As células foram tratadas nas concentrações de 15,625 e 32,25  $\mu\text{g/mL}$  e expostas ao LPS e/ou tratamento durante 24 h. Os dados foram expressos como percentagem de células viáveis em comparação com o grupo de células viáveis do grupo controle e foram apresentados como a média  $\pm$  desvio padrão. 147
- Figura 60 - Estrutura química do *Temefós*. 150

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Dados de RMN das substâncias codificadas de MfCH-1a e MfCH-1b ( $^1\text{H}$ : 400; $^{13}\text{C}$ : 100 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ , $J$ em Hz), do <i>Sitosterol</i> e <i>Estigmasterol</i> .	91
Tabela 2-	Dados de RMN da substância codificada de MfCH-2 ( $^1\text{H}$ : 400; $^{13}\text{C}$ : 100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ , $J$ em Hz) e do <i>3-O-<math>\beta</math>-D-Glicopiranosilsitosterol</i> .	92
Tabela 3-	Dados de RMN ( $^1\text{H}$ : 400 MHz; $^{13}\text{C}$ : 100 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ , Hz) da substância MfFH-1 e comparação com dados da literatura do <i>Lupeol</i> .	102
Tabela 4-	Dados de RMN ( $^1\text{H}$ : 400 MHz; $^{13}\text{C}$ : 100 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ , Hz) da substância MfFC-4 e comparação com dados da literatura do <i>Lupeol</i> , <i>3<math>\beta</math>-</i> e <i>3<math>\alpha</math>-Betulinaldeído</i> .	103
Tabela 5-	Dados de RMN ( $^1\text{H}$ : 400; $^{13}\text{C}$ : 100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ , $J$ em Hz) da substância MfFC-2 e comparação com dados dos <i>Ácidos 3<math>\beta</math>-</i> e <i>3<math>\alpha</math>-betulínicos</i> .	104
Tabela 6-	Dados de RMN ( $^1\text{H}$ : 400; $^{13}\text{C}$ : 100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ , $J$ em Hz) da substância MfCC-2 e comparação com dados do <i>3<math>\beta</math>-Betulinol</i> .	105
Tabela 7-	Dados de RMN ( $^1\text{H}$ : 400 MHz; $^{13}\text{C}$ : 100 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ , Hz) de MfFH-2 e comparação com dados do <i>Ácido elágico</i> (125 MHz, $\text{DMSO-d}_6$ ) e do seu derivado pentametilado, o <i>Ácido 3,3',4,4',5-pentametilflavelágico</i> (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	121
Tabela 8-	Dados de RMN da substância MfCC-3 em comparação com dados do <i>Ácido 2<math>\beta</math>,3<math>\alpha</math>,23-trihidroxiurs-12-en-28-óico</i> (A; $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ), <i>2<math>\alpha</math>,3<math>\alpha</math>,23-Trihidroxiolean-12-en-28-oato de metila</i> (B) e <i>2<math>\alpha</math>,3<math>\alpha</math>,24-Trihidroxiolean-12-en-28-oato de metila</i> (C).	130
Tabela 9-	Diâmetro das zonas de inibição e suas respectivas concentrações inibitórias mínimas (CIM) de extratos e frações que forneceram os melhores resultados nos ensaios antibacterianos.	138

**Tabela 10- Resultados referentes aos ensaios larvicidas e 149  
anticolinesterásicos [Anti(ChE)] com extratos, frações e  
compostos isolados das folhas e do caule de *M. ferruginea*.**

#### **LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS**

Abs.	Absorbância
AChE	Acetilcolinesterase
Acetil-CoA	Acetil coenzima A
ANOVA	Análise de Variância
AMH	Agar Mueller Hinton
ATCC	American Type Culture Collection
CMH	Caldo de Mueller Hinton
CAT	Colina-acetiltransferase
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
CHIK	Chikungunya
CI <sub>95</sub>	Intervalo de Confiança de 95%
CIM	Concentração inibitória mínima
CL <sub>50</sub>	Concentração Letal capaz de eliminar 50% da população
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
dl	Dupleto largo
DA	Doença de Alzheimer
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DP	Desvio Padrão
DZI	Diâmetro da zona de inibição
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FBS	Fetal bovine serum
GF	Faores de crescimento
G	Grama
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation

HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
Hz	Hertz
J	Constante de acoplamento
LPS	Lipopolissacarídeo
L <sub>1</sub>	Primeira muda de larva
L <sub>2</sub>	Segunda muda de larva
L <sub>3</sub>	Terceira muda de larva
L <sub>4</sub>	Quarta muda de larva
MHz	Megahertz
m	Multiplete
mg	Miligrama
nm	Nanômetro
NOSI	Óxido nítrico sintase-induzida
PA	Pro Analyse
p.	Página
p.f	Ponto de fusão
PBS	Tampão fosfato salino
ppm	Partes por milhão
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono Treze
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
s	Simpleto
sl	Simpleto largo
T	Triplete
UFC	Unidade formadora de colônias
UV	Ultravioleta
WHO	Organização Mundial da Saúde
ZIKV	Virus Zica
δ	Deslocamento Químico
°C	Graus Celsius

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>19</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA: CONSIDERAÇÕES SOBRE INFECÇÕES BACTERIANAS, OS PROCESSOS DE CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS E DE INFLAMAÇÃO, DENGUE E OUTRAS ARBOVIROSES, ANTI-COLINESTERÁSICOS, A FAMÍLIA E O GÊNERO da Espécie em Estudo.</b>	<b>22</b>
2.1	Infecções Bacterianas	22
2.2	Considerações Sobre o Processo de Cicatrização de Feridas e de Inflamação	24
2.3	Considerações Sobre Dengue e Outras Arboviroses	30
2.4	Considerações Sobre Anticolinesterásicos	38
2.5	Considerações Sobre a Família Myrtaceae	41
2.5.1	Considerações Sobre o Gênero Myrciaria	44
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>61</b>
3.1	Objetivos Gerais.	61
3.2	Objetivos específicos	61
<b>4</b>	<b>EXPERIMENTAL</b>	<b>62</b>
4.1	Solventes, Materiais e Equipamentos	62
4.2	Coleta e Identificação do Material Vegetal	64
4.3	Preparação dos Extratos e Frações das Folhas e do Caule	64
4.4	Isolamento de Alguns dos Constituintes Químicos de Folhas e de Caule	66
4.4.1	Procedimento efetuado com as frações oriundas das folhas	66
4.4.2	Procedimento Experimental Efetuado com as Frações Oriundas da Partição do Extrato em Etanol do Caule.	69
4.5	Avaliação do Potencial Biológico de Extratos, Frações e Compostos Isolados	74
4.5.1	Avaliação da Atividade Antibacteriana de Extratos, Frações e Compostos Isolados	74
4.5.2	Avaliação da viabilidade de células fibroblasto (3T3) e de macrófagos (J774) e dos efeitos cicatrizante e anti-inflamatório in vitro de extratos	80

	e compostos Isolados	
4.5.2.1	Viabilidade Celular ou Citotoxicidade	80
4.5.2.2	Ensaio In Vitro de Cicatrização de Feridas de Compostos Isolados	81
4.5.2.3	Medida da Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) em Macrófagos – Efeito Antiinflamatório	82
4.5.3	Atividade Larvicida	83
4.5.4	Avaliação Qualitativa da Atividade Anticolinesterásica de extratos e Compostos Isolados	85
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>87</b>
5.1	Estudo Fitoquímico	87
5.1.1	Identificação Estrutural das Substâncias Isoladas	88
5.1.1.1	Identificação Estrutural das Substâncias Codificadas de <b>MfCH-1a</b> , <b>MfCH-1b</b> e <b>MfCC-1</b> .	88
5.1.1.2	Identificação Estrutural das Substâncias Codificadas de <b>MfFH-1</b> , <b>MfFC-2</b> , <b>MfFC-3</b> e <b>MfCC-2</b> .	99
5.1.1.3	Identificação estrutural da substância codificada de <b>MfFH-2</b> .	119
5.1.1.4	Identificação Estrutural da Substância Codificada de <b>MfCC-3</b> .	127
5.2	Resultados dos Ensaio Biológicos Efetuados	<b>137</b>
5.2.1	Atividade Antibacteriana de Extratos, Frações e Compostos Isolados.	137
5.2.2	Viabilidade celular ou citotoxicidade de extratos, frações e compostos isolados sobre células fibroblastos (3T3) e de macrófagos (J774).	140
5.2.2.1	Efeito sobre células fibroblastos (3T3).	140
5.2.2.2	Efeito de alguns dos compostos isolados sobre células de macrófagos (linhagem J774)	144
5.2.2.3	Efeito de Compostos Isolados Sobre a Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) por Macrófagos em Processos Inflamatórios Induzidos por LPS.	145
5.2.3	Larvicidas e Anticolinesterásicos.	148
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>155</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>156</b>

## RESUMO

Este trabalho descreve pela primeira vez o estudo químico e a avaliação do potencial biológico de extratos e compostos isolados das folhas e caule de *Myrciaria ferruginea* (Myrtaceae). Após secagem e trituração, folhas e caule foram submetidos a maceração com acetona e EtOH 90%, respectivamente. Após remoção dos solventes, os extratos brutos foram suspensos em solução MeOH-H<sub>2</sub>O e extraídos com hexano, CHCl<sub>3</sub> e AcOEt. As frações resultantes foram avaliadas quanto ao seu potencial antibacteriano frente à *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter aerogenes*, bem como quanto à viabilidade celular (células fibroblastos 3T3 e de macrófagos J774), Migração horizontal *in vitro*, inibição da produção de espécies reativas de oxigênio induzida pelo lipopolissacarídeo, larvicida (larvas do *Aedes aegypti*) e anticolinesterásicos. O estudo químico das frações ativas resultou no isolamento de três fitoesteroides ( $\beta$ -Sitosterol, Estigmasterol e 3-O- $\beta$ -D-glicopiranosil-sitosterol), cinco triterpenos (Lupeol, 3 $\beta$ -Betulinaldeído, Betulinol, Ácido betulínico e, possivelmente um novo produto natural, o Ácido 3 $\alpha$ ,2 $\beta$ ,23-Trihidroxiolean-12-en-óico) e de um derivado do ácido elágico (Ácido hexametilcoruloelágico) que está sendo descrito pela primeira vez na família Myrtaceae. Estes compostos tiveram suas estruturas identificadas com base na análise dos dados de RMN em uma e duas dimensões (HSQC e HMBC) e pela comparação com dados da literatura. Os extratos inibiram o crescimento de *S. aureus* e *S. epidermidis*, dois agentes infecciosos comumente encontrados em unidades de terapias intensivas e, com exceção da fração em MeOH-H<sub>2</sub>O das folhas que não apresentou efeito citotóxico na concentração de 15,625  $\mu$ g/mL, as demais foram citotóxicas frente a células 3T3 em todas as concentrações testadas (15,625 a 500  $\mu$ g/mL). O extrato bruto em EtOH e as frações em hexano e em MeOH-H<sub>2</sub>O do caule, nas concentrações de 15,625 a 62,5  $\mu$ g/mL, não apresentaram citotoxicidade frente a células fibroblastos 3T3 (viabilidade celular > 80%) e a fração em AcOEt não apresentou efeito citotóxico na menor concentração testada (15,625  $\mu$ g/mL). Quando comparadas com o grupo de células expostas somente ao meio de cultura, as células tratadas com os compostos isolados (mistura de Lupeol e 3 $\beta$ -Betulinaldeído, Ácido hexametilcoruloelágico e 3 $\beta$ -Betulinaldeído puro), nas concentrações de 15,625 a 32,25  $\mu$ g/mL, não causaram aumento na produção de EROs. Contudo, quando comparadas com o grupo de células tratadas com os compostos e as estimuladas com LPS, uma significativa redução da produção de EROs foi observada, sugerindo, portanto, que estes compostos interferem no processo inflamatório induzido pelo LPS. Nos ensaios larvicidas, amostras de folhas e caule exibiram de fraca a moderada atividade e, de modo análogo aos compostos isolados ( $\beta$ -Sitosterol e Estigmasterol, Lupeol e 3 $\beta$ -Betulinaldeído, Ácido hexametilcoruloelágico e Ácido betulínico), também foram ativos como anticolinesterásico.

**Palavras-chave:** *Myrciaria ferruginea*. Myrtaceae. Antibacteriana. Larvicida. Viabilidade celular. Ácido hexametilcoruloelágico. Triterpenos.

## ABSTRACT

This work describes for the first time chemical study and evaluation of the biological potential of extracts and isolated compounds from the leaves and stem *Myrciaria ferruginea* (Myrtaceae). After drying at room temperature and grinding, leaves and stems were subjected to maceration with acetone and 90% EtOH, respectively. After removal of the solvents under vacuum, crude extracts were suspended in MeOH-H<sub>2</sub>O solution and successively extracted with hexane, chloroform and ethyl acetate. The fractions resulting from this procedure were evaluated for their antibacterial effect against *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Enterobacter aerogenes*, as well as cytotoxic (fibroblasts 3T3 cells and macrophages J774), horizontal migration *in vitro*, inhibition of production of ROS induced by LPS, larvicidal (*Aedes aegypti* larvae) and anticholinesterasics. Phytochemical study from actives fractions resulted in the isolation of three phytosteroids ( $\beta$ -Sitosterol, Stigmasterol and 3-O- $\beta$ -D-glucopyranosylsitosterol), five triterpenes (*Lupeol*,  $3\beta$ -Betulinolaldehyde, *Betulinol*, *Betulinic acid* and  $3\alpha,2\beta,23$ -Trihydroxyolean-12-en-oic acid, very likely a new natural product) and an ellagic acid derivative (*Hexamethylcoruleoellagic acid*) which is being described for the first time in the Myrtaceae family. All isolated compounds had their structures identified on the basis of their NMR spectral data, including 2D experiments (HSQC and HMBC), and by comparison with literature data. Extracts also inhibited the growth of *S. aureus* and *S. epidermidis*, two infectious agents commonly found in intensive care units. With exception of MeOH-H<sub>2</sub>O fraction of the leaves that showed no cytotoxic effect at 15.625  $\mu$ g/mL, the remaining fractions exhibited cytotoxic activity against 3T3 cells at all tested concentrations (15.625 to 500  $\mu$ g/mL). The crude EtOH extract, hexane and MeOH-H<sub>2</sub>O fractions from stems at concentrations of 15.625 to 62.5  $\mu$ g/mL showed no cytotoxic effect against 3T3 cells (cell viability > 80%) and EtOAc fraction was cytotoxic at lower concentration tested (15.625  $\mu$ g/mL). When compared to the group exposed only to the cell culture medium, the cells treated with isolated compounds (mixture of *Lupeol* and  $3\beta$ -Betulinolaldehyde, *Hexamethylcoruleoellagic acid* and  $3\beta$ -Betulinolaldehyde), at concentrations from 15.625 to 32.25  $\mu$ g/mL, they did not increase ROS-production in a model of inflammation induced by LPS. However, when compared the group of cells treated with the compounds and the stimulated with LPS a significant reduction in ROS-production was observed. These results suggest that these compounds interfere with the inflammatory process induced by LPS. In larvicidal assays samples from leaves and stems exhibited weak to moderate activity and analogously to isolated compounds ( $\beta$ -sitosterol and Stigmasterol, *Lupeol* and  $3\beta$ -Betulinolaldehyde, *Hexamethylcoruleoellagic acid*, and *Betulinic acid*) they have provided positive results as anticholinesterase.

**Key-words:** *Myrciaria ferruginea*. Myrtaceae. Antibacterial. Larvicidal. Cell viability. *Hexamethylcoruleoellagic acid*. Triterpenes.



*...”E o seu fruto servirá de alimento e  
a sua folha para remédio”...*

*EZEQUIEL, 47:12.*

# 1. INTRODUÇÃO

---

---

A utilização de plantas medicinais para curar doenças está presente desde o início das civilizações, que possuíam suas próprias referências históricas quanto à realização desta prática. Naquela época a saúde era entendida como a harmonia entre o corpo, a mente e o espírito, relacionando-se à magia, da qual na maioria das vezes, as plantas eram consideradas como “um presente dos deuses” que por meio delas o ser humano poderia tratar os poderes maléficos oriundos da terra, neste caso as doenças que se manifestavam naquela população (ARAÚJO et al., 2014).

Os primeiros registros fitoterápicos datam do período de 2838-2698 a.C. quando o imperador chinês Shen Nung catalogou 365 ervas medicinais e venenos (FRANÇA et al., 2008). Outros registros foram encontrados no manuscrito Egípcio “*Ebers Papyrus*”, de 1.500 a.C., em que continham informações sobre 811 prescrições e 700 drogas. Muitas das espécies ainda são hoje utilizadas, como por exemplo, o “Ginseng” (*Panax* spp.), *Ephedra* spp., *Cassia* spp. e *Rheum palmatum* L., além de servir como fontes para indústrias farmacêuticas (FIRMO et al., 2011). A medicina da época adotava uma postura empírica, na qual o conhecimento era passado de geração em geração até a época atual (QUEIROZ; CANESQUI, 1986).

O período conhecido como civilização grega, no qual vários filósofos criaram obras sobre a história dos produtos naturais, como Teofrasto (372 a.C.), com várias obras sobre a história das plantas. É de sua propriedade, o registro da utilização da espécie *Papaver somniferum* L., cujo princípio ativo é a  **morfina (Figura 1)**, um opióide extraído do ópio que promove analgesia intensa e de longa duração (SILVA; SAKATA; ISSY, 2004). Outros de seus registros foram encontrados em sumerianos de 5000 a.C. e tabulas assírias (PINTO et al., 2002). Já no século XX, foi descoberto por Alexander Fleming o primeiro antibiótico, a **“penicilina” (Figura 1)**, isolada de um fungo do gênero *Penicilium*, responsável pela regressão da inflamação. A partir desta, houve a promoção e o desenvolvimento da quimioterapia e de diversos antibióticos que se somam ao arsenal terapêutico atual (CORREA, 1944). Outras substâncias de origem vegetal importantes são as anticarginogênicas, isoladas de

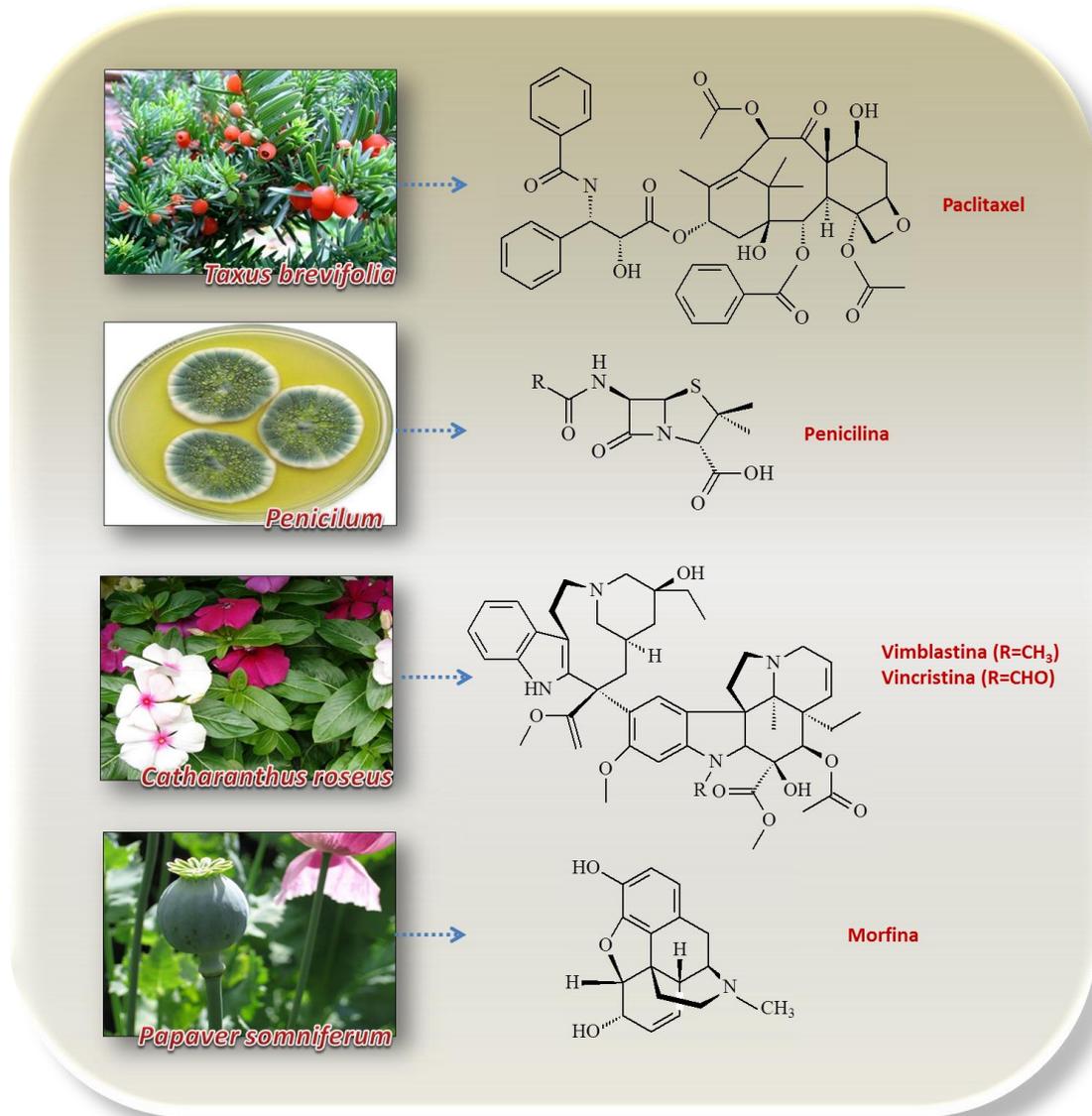
*Catharanthus roseus* (L.) G. Don, os alcalóides, **vimblastina** e **vincristina** (**Figura 1**) que são atualmente utilizados no tratamento de linfoma de Hodgkin, sarcoma de Kaposi, câncer de ovário e testículos e leucemia linfoblástica aguda infantil (BRANDÃO et al., 2010). Outro fármaco de grande importância é o **paclitaxel** (Taxol®) (**Figura 1**), extraído de *Taxus brevifolia* Nutt que é utilizado no combate aos cânceres de mama e ginecológicos (HOLANDA et al., 2008; GARCIA et al., 2009; COSTA-LOTUFO et al., 2010). Existem vários exemplos, de grande importância na medicina que servem também de protótipos na obtenção de novos fármacos (CALIXTO, 2003).

Segundo dados da organização Conservation International, estima-se que existam no Brasil cerca de 60 milhões espécies vegetais (22% do total mundial) (SALATI; SANTOS; KLABIN, 2007), englobando de 15-25% de todas as espécies vegetais que vêm sendo estudada sob vários aspectos ao longo de quase sessenta anos de pesquisas multidisciplinares (JOLY et al., 2011). Dentre essas espécies estima-se que cerca de 100.000 estão catalogadas e apenas 8.000 avaliadas quanto a sua composição química e 1.100 quanto as suas propriedades terapêuticas (NICOLETTI, 2010). Desta forma, o Brasil possui um dos maiores patrimônio biogenéticos do mundo (ANDRADE, 2013).

A busca do tratamento ideal para a cura das doenças e por novos fármacos evoluiu juntamente com a química dos produtos naturais, sendo as espécies vegetais a maior fonte de inspiração (COSTA-LOTUFO et al., 2010). Desta feita, os produtos naturais vêm ganhando espaço na indústria farmacêutica que busca novos padrões moleculares bioativos, bem como na utilização como fitoterápicos (JÚNIOR; BOLZANI, 2006). Atualmente, as plantas medicinais movem altos valores financeiros e representam o tipo de tratamento mais acessível para cerca de 80% da população (MOREIRA; SALGADO; PIETRO, 2010). O mercado mundial de fitoterápicos movimentam cerca de US\$ 22 bilhões/ano e no Brasil estima-se que este comércio seja de 5% em relação ao mercado total de medicamentos, avaliando-o em mais de US\$ 400 milhões (CZELUSNIAK et al., 2012). Entretanto, as pesquisas para a construção do conhecimento científico e inovações terapêuticas são ainda incipientes e existem lacunas referentes ao conhecimento científico de suas propriedades químicas, farmacológicas e toxicológicas a fim de assegurar a eficácia e a segurança do uso das plantas medicinais, repercutindo em uma realidade

brasileira, que apesar de possuir a maior diversidade vegetal do mundo e muitas plantas medicinais sejam de amplo conhecimento popular, o número de informações sobre essas plantas tem aumentado apenas 8% anualmente (BESSA et al., 2013).

**Figura 1 – Origem natural do fármaco e sua estrutura química.**



Fonte: Adaptado de AMARIZ, 2016.

Contudo, considerando as atividades biológicas observadas em algumas espécies da família Myrtaceae e a ausência de estudos químico e biológico sobre a espécie *Myrciaria ferruginea* O.Berg, será de grande relevância o estudo fitoquímico e biológico realizado com extratos brutos, frações e compostos isolados desta espécie.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA: CONSIDERAÇÕES SOBRE INFECÇÕES BACTERIANAS, OS PROCESSOS DE CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS E DE INFLAMAÇÃO, DENGUE E OUTRAS ARBOVIROSES, ANTICOLINESTERÁSICOS, A FAMÍLIA E O GÊNERO DA ESPÉCIE EM ESTUDO.**

---

---

### **2.1 Infecções Bacterianas**

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), as bactérias são a maior fonte causadora de infecções hospitalares e a quarta causa de mortes no mundo, depois das doenças cardiovasculares, câncer e violência. No Brasil, a taxa de infecção hospitalar é de 15% segundo o Ministério da Saúde (MS), mais alta do que em países da Europa e nos Estados Unidos, onde o mesmo índice é de 10% (FONTOURA, 2010). A maioria dessas infecções é causada por um desequilíbrio da relação existente entre a microbiota humana normal e os mecanismos de defesa do hospedeiro. Isto pode ocorrer devido à própria patologia de base do paciente, procedimentos invasivos e alterações da população microbiana, geralmente induzida pelo uso excessivo de antibióticos (AZAMBUJA; PIRES; VAZ, 2004; PEREIRA et al., 2005; ABEGG; SILVA, 2011).

O surgimento de microrganismos resistentes aos antimicrobianos ocorre em velocidade muito maior do que o aumento da capacidade do complexo industrial e de pesquisa biomédica em produzir novos agentes anti-infecciosos (PEDROSO; ROCHA, 2009). Esta resistência é irreversível, sendo consequência natural da adaptação da célula bacteriana a exposição aos antibióticos em humanos e animais (SANTOS, 2004). Entretanto, favorece a proliferação de bactérias, resultando em um quadro de infecções difíceis de serem tratadas (KADOSAKI; SOUZA; BORGES, 2012). Dentre os diversos micro-organismos envolvidos no processo de infecção hospitalar, as bactérias mais frequentes são as Gram-positivas como *Staphylococcus*

*aureus*, *S. epidermidis* e Gram-negativas como *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. Todas são resistentes a terapêutica existente (SARTORI, 2005; NOGUEIRA et al., 2009; ABEGG; SILVA, 2011).

As espécies de estafilococos são do grupo dos cocos Gram-positivos, podendo causar doenças que vão desde infecções cutâneas menores à bacteremia com risco de vida. Os dois principais patógenos oportunistas deste gênero são: *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis*. A espécie predominante, *S. epidermidis*, é bastante difundida em todo o ecossistema cutâneo, ao passo que o *S. aureus* é realizada principalmente em superfícies mucosas. Dentro deste contexto, estafilococos geralmente têm uma relação simbiótica benigna com seu hospedeiro. No entanto, a violação do sistema do órgão cutâneo por trauma, agulhas de inoculação, ou implantação direta de dispositivos médicos permite que os estafilococos ganhem uma porta de entrada no hospedeiro e adquirir o papel de um agente patogênico (GILL et al., 2005).

O *S. aureus* é uma bactéria capaz de infectar todos os tecidos do corpo, provocando doenças, que vão desde uma simples infecção (espinhas, furúnculos e celulites) até infecções graves (pneumonia, meningite, endocardite, síndrome do choque tóxico, septicemia e outras (SANTOS et al., 2007). O primeiro relato de resistência a meticiclina foi em 1961 e nas últimas décadas, a carga global de resistência à este agente tem aumentado consideravelmente. Estes foram denominados de *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) (CATÃO et al., 2013; HUNTER et al., 2016; LIN et al., 2016; MARTÍNEZ-MELÉNDEZA et al., 2016). *S. epidermidis* também tem emergido como um agente patogênico nosocomial no sangue, especialmente em infecções em pacientes acometidos do uso de dispositivos médicos de longa permanência (catéteres, sondas, próteses). O tratamento deste patógeno é difícil, devido a sua capacidade de formar biofilmes que dificultam a chegada de drogas antimicrobianas e até mesmo de células fagocíticas ao foco de infecção (GILL et al., 2005).

Pesquisas em hospitais brasileiros demonstram que os estafilococos, tanto *S. aureus* quanto o *S. epidermidis*, mostram-se resistentes à penicilina G, ampicilina e amoxicilina em mais de 70% das cepas isoladas. Além disto, estes germes vêm apresentando elevado índice de resistência à meticilina (portanto, também à

oxacilina e cefalosporinas), repetindo-se o observado em outros países. Relatos de hospitais em diferentes regiões brasileiras encontram 30-100% do *S. aureus* resistentes à oxacilina (TAVARES, 2000).

As bactérias Gram-negativas possuem, em sua composição, uma membrana externa que fisiologicamente se caracteriza por ser a primeira linha de defesa contra compostos tóxicos. Dificultando a ação dos agentes anti-infecciosos. Por exemplo, a espécie *P. aeruginosa* continua a ser uma das maiores causas de infecção nosocomial em hospitais brasileiros, onde diversos estudos têm associado sua presença a uma disseminação clonal da espécie. A infecção por esta bactéria caracteriza-se pela sua elevada resistência a agentes antibacterianos associados a uma difícil erradicação da doença, conseqüentemente com elevados índices de morbidade e mortalidade (NEVES et al., 2011). Além da mortalidade de pacientes com bacteremia provocada pela *P. aeruginosa* que manteve-se elevada ao longo das últimas décadas, com taxas de mortalidade variando de 33 a 61% (VITKAUSKIENĖ et al., 2010). Outra preocupação é a resistência cruzada desta espécie aos antimicrobianos, que resulta da co-resistência, ou seja, da presença de múltiplos mecanismos de resistência num único hospedeiro levando à resistência a múltiplos fármacos (FIGUEIREDO et al., 2007).

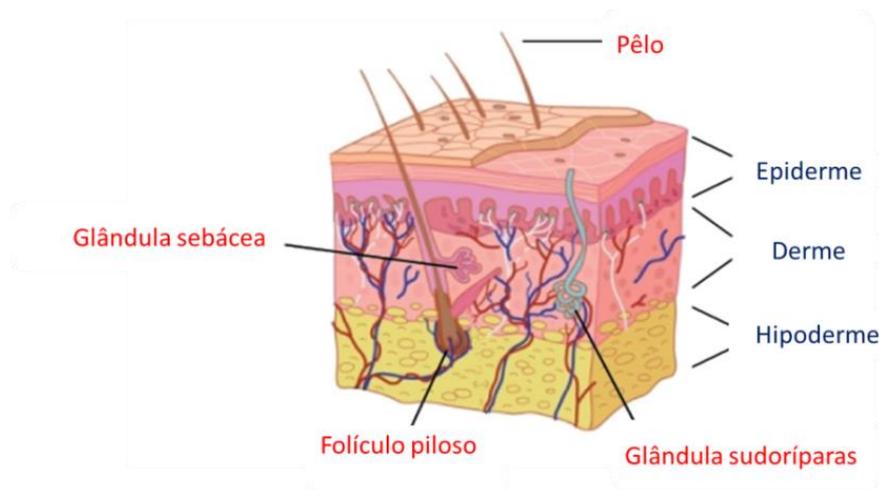
O bacilo *E. coli* outra bactéria Gram-negativa, é predominante na microbiota normal do intestino humano e em outras espécies animais. Entretanto, certos subgrupos de *E. coli* apresentam fatores de virulência que os tornam capazes de causar doenças intestinais e extraintestinais, como infecções no trato geniturinário, meningites e septicemias (CALDORIN et al., 2013).

Dados nacionais mostram, entretanto, que os Gram-negativos ainda são os vilões das infecções bacterianas em alguns hospitais brasileiros. Particularmente *E. coli* e *P.aeruginosa* que são as principais causas de infecção correspondendo a 52% em pacientes pediátricos com leucemia (COSTA, 2009).

## **2.2 Considerações Sobre o Processo de Cicatrização de Feridas e de Inflamação**

A pele é o maior órgão do corpo humano e desenvolve múltiplas funções, incluindo a barreira contra perda de água e agressão a irritantes, termorregulação, controle de infecção, imunovigilância e sensação tátil. Suas principais camadas são a epiderme, a derme e a hipoderme (subcutânea) (**Figura 2**). A principal célula componente da epiderme é o queratinócito, da derme é o fibroblasto e da hipoderme os adipócitos (PÓVOA; DINIZ, 2011; SANTOS; COSTA, 2015).

**Figura 2 - Esquema de um corte de pele.**



Fonte: adaptado de LIMA, 2016

A perda tecidual pode atingir a derme completa ou incompletamente, ou mesmo atingir todo o órgão, chegando ao tecido celular subcutâneo. É daí que vem a definição do tipo de ferida. Ferida de espessura parcial (derme incompleta): ocorre após muitos procedimentos dermatológicos como a dermoabrasão, o *resurfacing* por laser ou *peelings* químicos; pode também ser causada por traumatismos. A reparação faz-se pela re-epitelização dos anexos epiteliais ou epitélio derivado da pele adjacente não acometida. Como resultado final tem-se uma cicatriz praticamente imperceptível. Já as feridas de espessura total (derme completa ou estendida ao tecido celular subcutâneo) necessitam da formação de um novo tecido, o tecido de granulação. Neste caso, a cicatriz é totalmente perceptível e, muitas vezes, pronunciada (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003).

Quanto ao tempo de duração, as feridas classificam-se em agudas e crônicas. Agudas são aquelas onde ocorre a ruptura de vasos sanguíneos que levam ao

desencadeamento imediato do processo cicatricial. Incluem as feridas cirúrgicas e traumáticas, ocorrem em pessoas de todas as idades e geralmente cicatrizam sem complicações. As feridas crônicas são as que não cicatrizam facilmente, há déficit de tecido resultante, falta de re-epitelização e inflamação prolongada (ETHRIDGE et al., 2010). Vários são os mecanismos apontados como fatores importantes na diminuição do processo de cicatrização. Dentre os quais estão a produção excessiva de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), diminuição do Óxido Nítrico (NO), diminuição da resposta aos Fatores de Crescimento (GFs) e das proteínas da via de sinalização da insulina (LIMA; ARAÚJO, 2013).

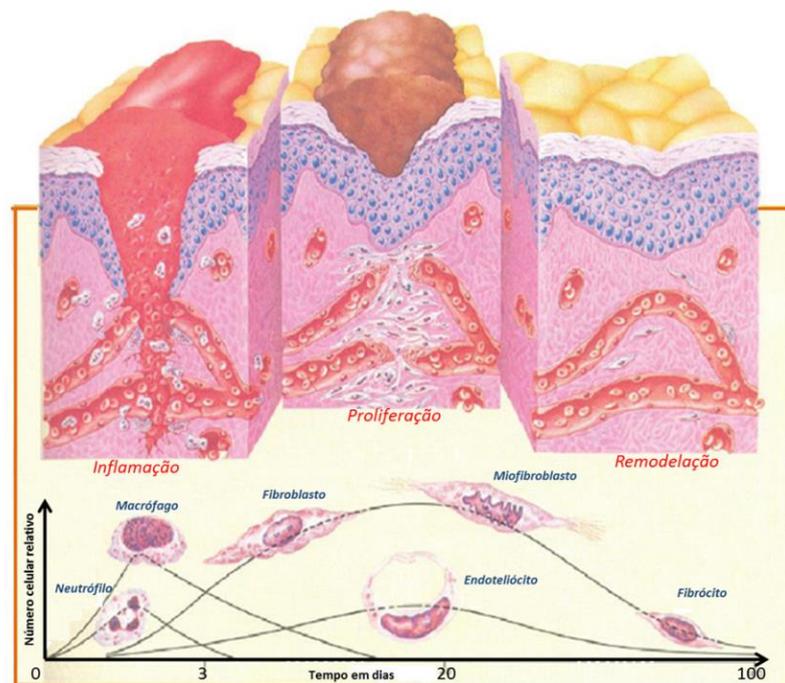
O tratamento de feridas busca o fechamento rápido da lesão de forma a se obter cicatriz funcional e esteticamente satisfatória (MENDONÇA; COUTINHO-NETO, 2009). Para tanto, é indispensável uma melhor compreensão do processo biológico envolvido na cicatrização de feridas e regeneração tecidual, que envolve alterações vasculares e celulares, proliferação epitelial, proliferação de fibroblastos, síntese de deposição de colágeno, a produção de elastina e proteoglicanos, revascularização e contração da ferida (BUSNARDO; BIONDO-SIMÕES, 2010).

O processo de cicatrização tem sido dividido em três fases que se sobrepõem de forma contínua e temporal: **a)** inflamatória; **b)** proliferativa ou fibroblástica e **c)** reparadora ou remodelagem. Sendo necessário o entendimento desse processo, uma vez que a evolução da ferida depende do tratamento adequado de cada fase (**Figura 3**) (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007).

**a) Fase inflamatória** - Durante a reação imediata a injúria tecidual ocorre homeostase e inflamação. A primeira é caracterizada pela formação do coágulo de fibrina e a segunda pela migração de leucócitos fagocitários, os quais removerão as substâncias estranhas e micro-organismos. A hemostasia é o conjunto de mecanismos envolvidos para cessar uma lesão, apresentando o vaso sanguíneo como componente básico no processo de hemostase, este por sua vez, é dotado de uma contractilidade e resistência a responder a uma lesão. Segundos após a lesão sua contractilidade inicial, abranda o fluxo sanguíneo para facilitar a participação das plaquetas, que é conhecido como hemostase primária, seguido pela hemóstase secundária, após duração de minutos conduzindo à formação de coágulo fibrina; no

entanto, este fenômeno será localizado no local da lesão, o que impede a extensão e assegura recanalização vascular e reperfusão de órgãos, os quais são responsáveis pelos sistemas fisiológicos anticoagulantes e fibrinolíticos, criando uma barreira contra invasão de micro-organismos (MÉNDEZ; GARCÍA, 2012).

**Figura 3 – Representação gráfica da resposta normal da pele a feridas, mostrando o número relativo das principais células durante as fases do processo de cicatrização.**



Fonte: Adaptado de ISAAC et al., 2010.

A inflamação é uma resposta de defesa do organismo após dano celular causado por micróbios, agentes físicos (radiação, trauma, queimaduras), químicos (toxinas, substâncias cáusticas), necrose tecidual e/ou reações imunológicas, estando intimamente ligada à hemóstase. Caracteriza-se por uma série de eventos inter-relacionados, entre os quais o aumento no fluxo sanguíneo e permeabilidade vascular na região afetada, exsudação de fluido (edema), dor localizada, migração e acúmulo de leucócitos inflamatórios dos vasos sanguíneos para dentro do tecido, formação de tecido de granulação e reparo tecidual (LIMA et al., 2007).

Inicialmente ocorre a migração de neutrófilos dos vasos sanguíneos para a ferida que tem a função de desbridar as superfícies da ferida e fagocitar as partículas antigênicas e corpos estranhos. Nas primeiras 24-48 horas após a lesão acontece o pico de polimorfonucleares, que possui ação antimicrobiana que ao ser ativados produz EROs. Nos dois a três dias seguintes ao trauma, há uma grande produção de macrófagos, e quando ativados ocorre produção de NO, que por sua vez reage com peróxidos e gera um agente ainda mais potente do que o primeiro. Nesta fase do processo de cicatrização, o NO também age na vasodilatação e no aumento da permeabilidade vascular, sendo majoritariamente produzido por enzimas intracelulares presentes em todos os tecidos (NOSi/NO-sintase induzida) (TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008; ISAAC et al., 2010).

**b) Fase proliferativa ou fibroblástica** - Esta fase caracteriza-se por fibroplasia, angiogênese e reepitelização. A fibroplasia começa no terceiro dia após o ferimento e dura de cerca de duas semanas. É caracterizada pela proliferação fibroblástica e migração celular para dentro da matriz provisória, concomitante à síntese de novos componentes da matriz extracelular (MENDONÇA; COUTINHO-NETO, 2009). No nível macroscópico, esta fase da ferida pode ser visto como uma abundante formação de tecido de granulação, cujo processo se dá da seguinte maneira: após lesão, fibroblastos e miofibroblastos no tecido circundante são estimulados a proliferar durante os três primeiros dias. Eles, então, migram para dentro da matriz, proliferam e produzem proteínas ácido hialurônico, fibronectina, proteoglicanos e procolágeno tipo 1 e 3. No final da primeira semana, a matriz extracelular acumula abundantemente os fibroblastos e apóia ainda mais a migração celular, que é essencial para o processo de reparação, na qual fibroblastos sofrem modulação fenotípica para miofibroblastos. Nesta fase, ocorre anexo de fibronectina e colágeno na contração da ferida, matriz extracelular. É um acontecimento importante no processo reparador que ajuda a aproximar as bordas da ferida, formando um tecido conjuntivo mais forte e mais elástico (VELNAR; BAILEY; SMRKOLJ; 2016).

A angiogênese acontece concomitantemente a fibroplasia. Nesta, ocorre a formação de novos vasos sanguíneos a partir dos adjacentes à ferida. O processo é auxiliado por um pequeno número de medula óssea derivadas de células precursoras endoteliais que migram para a ferida, depois, o colágeno combina com

fibrina e fibronectina no plasma; este matriz provisória fornece uma estrutura para crescimento de mais fibroblastos. E na reepitalização que tem função de reestruturar as funções da epiderme que foram perdidas com a ocorrência da lesão, há a reestruturação dos estratos de queratinócitos: basal, espinhoso, granuloso, lúcido e córneo, que possuem quantidades crescentes de queratina (ISAAC, 2010; VELNAR; BAILEY; SMRKOLJ; 2016).

**c) Fase Reparadora ou de remodelagem** - Ao final da primeira semana após o surgimento da ferida, ocorre restauração de 3% da resistência da pele íntegra; da terceira semana, 30%, e de três meses, 80%. Entretanto a ferida nunca atingirá 100% de sua resistência fisiológica (ISAAC et al., 2010). Isto é reflexo do equilíbrio de produção e destruição das fibras de colágeno neste período, por ação da colagenase. Se ocorrer o desequilíbrio desta relação favorece o aparecimento de cicatrizes hipertróficas e quelóides (TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008). Esta é a fase mais longa, constitui-se da mudança do tipo de colágeno que a compõe e de sua disposição. Na pele íntegra coexistem síntese e degradação de colágeno; na lesada, ocorre alterações nessas taxas. O colágeno é sintetizado, forma ligações cruzadas e depois é depositado na região cicatricial, de onde é removido, moldando a reparação, sem cicatrização excessiva. O fibroblasto é considerado uma célula reguladora devido à sua dupla função de síntese e reabsorção do colágeno, já que procura manter equilíbrio quantitativo e qualitativo desta proteína (GONÇALVES; PARIZOTTO, 1998).

Entretanto o processo cicatricial pode não cessar sendo potencialmente danoso, uma vez que a manifestação inflamatória pode se instalar e lesar o próprio organismo, de forma mais deletéria que o próprio agente injuriante. Pode ser desencadeado por influências sistêmicas (pessoas com problemas de cicatrização cutânea, por má nutrição, incidência de doenças crônicas, imunodepressão, etc.) ou por influências locais (presença de infecção, traumas, manejo inapropriado, isquemia e etc.) (GONÇALVES; PARIZOTTO, 1998; NASCIMENTO; NAMBA, 2009). Não obstante, a busca e a aplicação de fitoterápicos na cicatrização de lesões de tecidos, têm sido amplamente avaliadas em estudos experimentais. Nos últimos anos têm aumentado às investigações, no emprego de drogas no tratamento das mais diversas afecções; tanto no desenvolvimento de fármacos sintéticos, como na

tentativa cada vez mais frequente de isolar princípios ativos de plantas e animais com tais propriedades terapêuticas (SILVA et al., 2010; SANTOS et al., 2013).

### 2.3 Considerações Sobre Dengue e Outras Arboviroses

A dengue, considerada uma das mais importantes doenças virais transmitidas por artrópodes, tem se destacado entre as enfermidades re-emergentes. Atualmente é a arbovirose mais prevalente no mundo, colocando cerca de 40% da população em risco (VIANA; IGNOTTI, 2013). Surgiu na África durante o comércio marítimo da indústria de navegação nos séculos XV a XIX e se distribuiu na Ásia nos séculos XVIII e XIX. Até a metade da década de 1990, o Sudeste Asiático se constituía na região do mundo mais atingida por dengue. A partir de então, os países das Américas Central e do Sul começaram a se destacar nesse cenário e passaram a contribuir com muito mais da metade dos casos notificados dessa doença no mundo. Naquela década, em apenas um único ano (1998), o Brasil registrou mais de 700 mil casos (SIMMONS et al., 2012; BARRETO; TEIXEIRA, 2008).

Os transmissores do vírus da dengue são fêmeas de mosquitos do gênero *Aedes* (*A. aegypti*, *A. albopictus* e *A. polynesiensis* - endêmico da polinésia), subgênero *Stegomyia* (BRAGA; VALLE, 2007). O mais importante vetor da dengue é o *A. aegypti*, encontrado, principalmente, no meio urbano, colonizado em depósitos de armazenamento de água e pequenas coleções temporárias. O *A. albopictus*, um nativo do sudeste Ásia, que nas últimas décadas tem invadido a África, as Américas e Europa do Sul, foi-lhe conferido agora de maneira consistente como um importante vetor rural e semi-urbano do vírus da dengue nos trópicos (BLAGROVE et al., 2012), que vem causando surtos de dengue, como consequência de uma rápida mudança na sua distribuição global (REZZA, 2012).

O vírus da dengue se classifica como um arbovírus, mantendo-se na natureza pela multiplicação em mosquitos hematófagos do gênero *Aedes*. Integrante do gênero Flavivírus e família Flaviviridae (SANCHEZ et al., 2006; MURUGAN et al., 2007; STRODE et al., 2008; CRUZ et al., 2016), o mesmo gênero do vírus da febre amarela (BRITO et al., 2014), do zica (ZAMMARCHI et al., 2015) e possível do chikungunya (RICHARD; PAOAAFAITE; LORMEAU, 2016; DONALISIO; FREITAS;

2015; ALKHAIBARI et al., 2016). O complexo dengue, até 2014 era formado por quatro diferentes sorotipos (DEN-1, DEN-2, DEN-3, e DEN-4), gerando uma sucessão de manifestações clínicas, que incluem a dengue clássica e a febre hemorrágica da dengue (GARCEZ et al., 2013; CARVALHO et al., 2015).

Estudos recentes relataram mais outro sorotipo do vírus dengue, o DENV. Que segundo dados do Ministério do Sistema de Informação de Saúde de Notificação (SINAN) há pelo menos 44.814 mil casos e 25 mortes atribuídas a DENV em Mato Grosso (HEINEN et al., 2015). Já em 2016, foram processadas 7.021 amostras para isolamento do vírus da dengue, sendo 2.204 positivas, das quais 90,1% foram positivas para o sorotipo viral DENV1 (BRASIL, 2016). DENV possui mais quatro sorotipos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (ROCHA et al., 2014; CARVALHO et al., 2015), esta viremia pode causar desde a forma clássica a forma mais grave da doença, sendo considerado o que mais causa morbidade e mortalidade no mundo inteiro (DUONG et al., 2015).

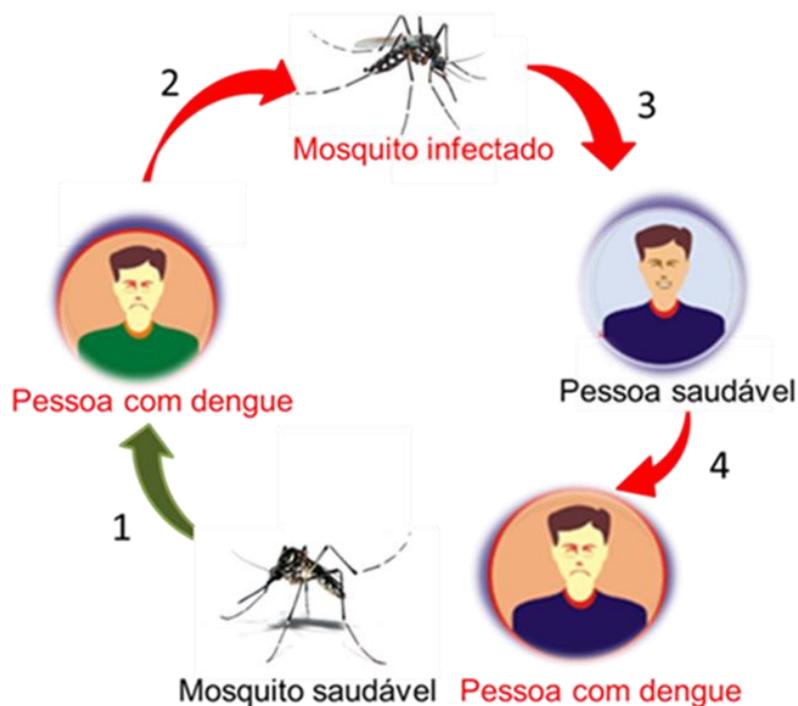
O ciclo de transmissão do dengue inclui o homem doente, qualquer dos quatro sorotipos do vírus, o mosquito vetor e o homem suscetível. A transmissão ao homem suscetível se dá pela picada da fêmea de mosquitos do gênero *Aedes* infectados pelo vírus. O período de incubação no homem (período de incubação intrínseco) é de 3-15 dias, geralmente em torno de 5-6 dias. O período de viremia no hospedeiro humano, quando o repasto sanguíneo torna o mosquito infectado, inicia-se um dia antes do aparecimento da febre e permanece até o sexto dia da enfermidade. O período de incubação no mosquito é de 8-11 dias, momento a partir do qual ele se torna infectante, assim permanecendo pelo resto da vida (PONTES; NETO, 1994).

A transmissão da doença se dá quando fêmeas adultas dos mosquitos por precisarem de sangue para a sua ovogênese, ao picar humanos infectados pelo vírus, se contaminam e os desenvolvem no seu interior. Posteriormente injeta-os em pessoas suscetíveis ao ataque (**Figura 4**). O vírus ao entrar na corrente sanguínea ocasiona sintomas como dores de cabeça, ossos, articulações, musculares, erupção cutânea e leucopenia (OTERO; SOLARI, 2010).

O ciclo de vida do mosquito *A. aegypti* compreende quatro fases: ovo, larva (4 estádios), pupa e adulto (**Figura 5**). Os ovos são depositados em lugares quentes e

úmidos. Em condições adequadas os embriões que estão dentro dos ovos levam de 2 a 3 dias para se desenvolverem para larva, que em ótimas condições compreende um período de no máximo 6 dias. A fase larvária, quando em baixa temperatura e ausência de alimentos podem se estender para além de 6 dias, até se tornarem pupas que é a fase sem alimentos, onde acontece a transformação para a fase adulta (mosquito) (SILVA; MARIANO; SCOPEL, 2008).

**Figura 4 - Ciclo de transmissão do vírus da dengue**

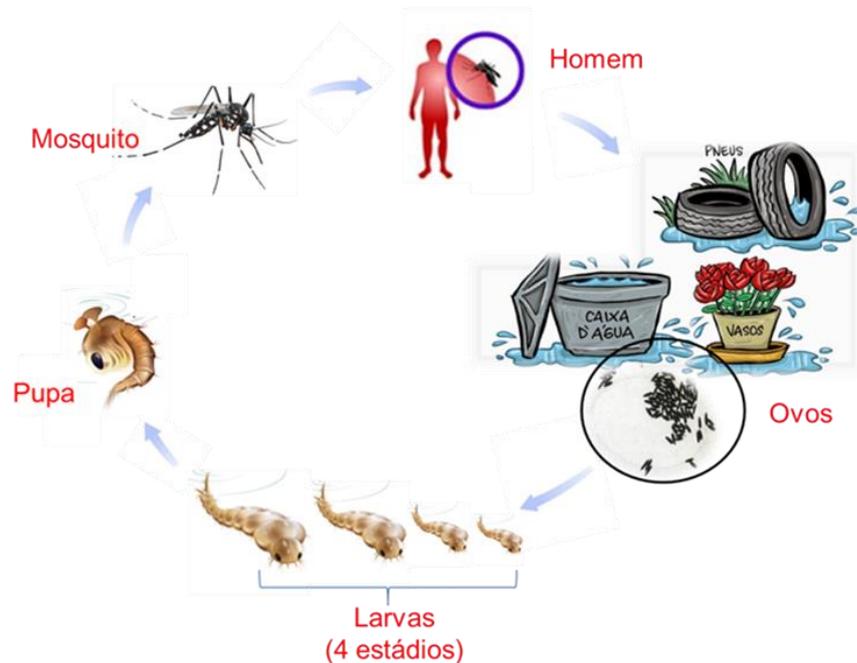


Fonte: Adaptado de MARCIA, 2016.

Atualmente a doença está disseminada em todo o mundo. Em 2016, foram registrados 1.294.583 casos prováveis de dengue no Brasil até a Semana Epidemiológica (SE) 21 (3/1/2016 a 28/5/2016). Nesse período, a região Sudeste registrou o maior número de casos prováveis (772.842 casos; 59,7%) em relação ao total do país, seguida das regiões Nordeste (264.438 casos; 20,4%), Centro-Oeste

(139.952 casos; 10,8%), Sul (83.559 casos; 6,5%) e Norte (33.792 casos; 2,6%). Foram descartados 390.534 casos suspeitos de dengue no período (BRASIL, 2016).

**Figura 5 - Ciclo de vida do mosquito.**



Fonte: Adaptado de FOUND, 2016.

A atenção recente foi dada para uma epidemia mundial de Zica Vírus (ZIKV). Até 2007, havia poucos relatos de casos de zica em humanos, quando um surto ocorreu em Yap, Micronésia, depois houve um grande surto em 2013 na Polinésia Francesa (IOOS et al., 2014). A infecção por este vírus vem se espalhando rapidamente nas Américas e outro surto em 2015 no Brasil trazendo uma relação com casos de microcefalia (LI et al., 2016).

Este flavivírus foi isolado pela primeira vez em 1947 na floresta de Zika (daí o nome do vírus), no Uganda, a partir de uma amostra de soro de um macaco *Rhesus* que servia de sentinela para estudo da febre-amarela (MACNAMARA, 1954; SIMPSON, 1964). Em Janeiro de 1948, um segundo isolamento foi feito a partir de mosquitos, *A. (Stegomyia) africanus* Theo., enquanto que em 1954 relataram o isolamento do vírus Zika em seres humanos durante um surto de icterícia na África Ocidental (BOORMAN; PORTERFIELD, 1956; WEINBREN; WILLIAMS, 1958).

O ZIKV até então, tinha causado doença febril, acompanhada por discreta ocorrência de outros sintomas gerais, tais como cefaléia, exantema, mal estar, edema e dores articulares, por vezes intensas. Entretanto, mais recentemente na Polinésia Francesa e no Brasil, quadros severos, incluindo comprometimento do sistema nervoso central (Síndrome de Guillain-Barré, mielite transversa e meningite) associado ao Zika têm sido registrados (VASCONCELOS, 2015), além dos casos de microcefalia (WHO, 2016).

A transmissão do ZIKV se dá por diferentes espécies de mosquitos *Aedes* (*A. aegypti* e *A. albopictus*). Além da transmissão inter-humana direta que tem sido relatada como perinatal, neonatal, através de transfusão de sanguínea e sexualmente. A transmissão ocupacional na configuração de laboratório também tem sido relatada (ZAMMARCHI et al., 2015; LUZ et al., 2015).

A confirmação dos primeiros casos de ZIKV no Brasil foi em maio de 2015, em Pernambuco, com o registro de 141 casos suspeitos de microcefalia em novembro do mesmo ano. Depois um número de casos apareceu em outros estados do Nordeste (Paraíba e Rio Grande do Norte). Os primeiros meses de gestação de mães de crianças que nasceram com microcefalia, correponderam ao período de maior circulação do vírus zika na região, sem haver correlação com histórico de doença genética na família ou exames com padrão de outros processos infecciosos conhecidos nestas gestantes (OLIVEIRA; VASCONCELOS, 2016).

O Instituto Evandro Chagas (IEC) iniciou as pesquisas e fez a detecção do ZIKV no fluido cerebral espinhal, cérebro e nos fragmentos de várias vísceras (coração, pulmão, fígado, baço e rim) de um recém-nascido com microcefalia, que evoluiu a óbito logo após o nascimento. Estes resultados se somam a detecção do vírus em 12 crianças que nasceram com a doença. Posteriormente, uma outra contribuição importante para elucidar a relação causal foi a identificação do ZIKV no líquido amniótico de duas gestantes da Paraíba com histórico de fetos com microcefalia. A partir desta evidência, estudos adicionais foram realizados, o que possibilitou o sequenciamento do vírus isolado do líquido amniótico relacionando o nexo-causal e transmissão perinatal (OLIVEIRA; VASCONCELOS, 2016).

Dados da World Health Organization (WHO) de 13 de julho deste ano reportou a ocorrência da infecção do zika vírus em 65 países. Destes, onze deles

(Argentina, Canadá, Chile, Peru, Estados Unidos da América, França, Alemanha, Itália, Portugal, Espanha e Nova Zelândia) reportaram a transmissão do vírus via sexual. Outros treze relataram casos de microcefalia e outros do sistema nervoso central (SNC) como malformações associadas com a infecção pelo ZIKV ou sugestivos de infecção congênita, sendo o Brasil o de maior número de casos (1687 casos). Onze desses países (Brasil, Colômbia, República Dominicana, El Salvador, Guiana Francesa, Polinésia Francesa, Honduras, Jamaica, Martinique, Suriname, e Venezuela) reportaram a Síndrome de Guillain-Barré como resultado da potencial infecção por ZIKV (WHO, 2016).

Contudo, há crescente preocupação sobre a associação da infecção ZIKV com os casos microcefalia fetais e neonatais e com complicações neurológicas graves em adultos, como a síndrome de Guillain-Barré. Devido a esta ameaça global, a OMS declarou uma emergência de saúde pública de preocupação internacional no dia 1º de Fevereiro do corrente ano (HEYMANN et al., 2016; Li et al., 2016).

A transmissão autóctone de febre pelo vírus Zika, no Brasil, foi confirmada no mês de abril de 2015, com três óbitos e em 2016, até a SE 23, foram registrados 165.932 casos prováveis de febre pelo vírus Zika distribuídos em 1.850 municípios, dos quais 66.180 casos foram confirmados (BRASIL, 2016).

A febre do Chikungunya (CHIK) é uma doença emergente causada por um vírus pertencente ao gênero *Alphavirus* e família *Togaviridae*, conhecido como vírus Chikungunya (CHIKV). A doença também é transmitida por mosquitos *A. aegypti* e *A. Albopictus* (WOSHINGTON, 2011; BRASIL, 2014; VASCONCELOS, 2014; USA, 2014; VOGEL; BROWN; STRAND, 2015). Os mosquitos adquirem o vírus de um hospedeiro virêmico e após um período de incubação intrínseca (em humanos) de 2 a 7 dias, maior período de viremia (2 antes e 10 depois da febre) e menor período de incubação extrínseca (no mosquito) de 10 dias. Acredita-se que, uma vez exposto ao CHIKV, indivíduos desenvolverão uma imunidade que os protegerá contra uma nova infecção (BRASIL, 2014; DONALÍSIO; FREITAS, 2015).

Chikungunya, cujo nome deriva de uma palavra em Makonde que significa “curvar-se ou tornar-se contorcido ou aqueles que se dobram” (BRASIL, 2014;

AZEVEDO; OLIVEIRA; VASCONCELOS, 2015; DONALISIO; FREITAS, 2015), se caracteriza por quadros de febre associados à dor articular intensa e debilitante, cefaleia e mialgia. Embora possua sintomas semelhantes aos da dengue, chama a atenção a poliartrite/artralgia simétrica (principalmente punhos, tornozelos e cotovelos), que, em geral, melhora após 10 dias, mas que pode durar meses após o quadro febril. Porém, em uma pequena proporção de casos, as dores nas articulações podem se tornar crônicas e persistirem por anos (AGUIAR, 2014).

O primeiro isolamento do vírus CHIKV ocorreu em soro humano durante surto de doença febril na Tanzânia em 1953. Casos importados, alguns virêmicos, surgiram no Brasil a partir de junho de 2014 e em setembro do mesmo ano foi detectado o primeiro caso com transmissão autóctone no país, no estado do Amapá (AZEVEDO; OLIVEIRA; VASCONCELOS, 2015). Em 2015, dados da semana epidemiológica (SE) 1 a SE 52, foram notificados 38.332 casos prováveis de febre de chikungunya, distribuídos em 696 municípios, dos quais 13.236 foram confirmados. Houve também confirmação de seis óbitos [Bahia (3 óbitos), Sergipe, São Paulo e Pernambuco (1 óbito cada)]. SE 23 foram registrados 14.277 casos prováveis de febre de chikungunya, com uma incidência de 7,0 (número de casos/100 mil hab.). Já em 2016, até a SE 23, foram registrados 137.808 casos prováveis no país, distribuídos em 2.054 municípios; destes, 32.679 casos foram confirmados. A análise da taxa de incidência de casos prováveis (número de casos/100 mil hab.), por regiões geográficas, demonstra que a região Nordeste apresentou a maior taxa de incidência: 213,2 casos/100 mil hab. e foram confirmados laboratorialmente 17 óbitos (BRASIL, 2016).

De acordo com a análise feita pelo Ministério da Saúde neste ano, a qual foi apresentada os dados de casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika demonstra que essa tríplice viremia é considerada de emergência nacional, sendo de extrema importância o controle do seu principal vetor, para o enfrentamento da grave situação epidemiológica apresentada no Brasil, desde um desenvolvimento tecnológico à mobilização social (BRASIL, 2016).

A prevenção das infecções pelo vírus do dengue é promissora, onde a produção de uma vacina contra os sorotipos não está disponível à população (RASIC, et al., 2015). Neste contexto, a principal medida de prevenção é controle

das populações do vetor (*A. aegypti*). Uma estratégia que vem atraindo atenção de cientistas, proposta para ajudar a controlar a crescente carga de vetor da doença é de reposição da população do *Aedes*, por uma que resistente aos vírus e/ou com menor taxa de reprodução. Um dos métodos é a utilização de infecções por bactéria do gênero *Wolbachia* no vetor macho e liberá-los no ambiente, o qual pode tornar-se infértil (RASIC et al., 2015). Esse cenário impõe algumas reflexões e ponderações, pois na literatura não há ainda relatos de eficácia dessa metodologia na profilaxia da dengue (WERMELINGER; FERREIRA; HORTA, 2014).

Os tipos de controles mais utilizados até o momento são o químico, o biológico e o mecânico. Destes, o controle químico ainda é o mais utilizado, sendo seus principais agentes o **Temefós** e o **Methoprene** (BRAGA et al., 2005). Entretanto, aplicação de inseticidas de forma inadequada tem conduzido a um desenvolvimento de resistência (RASIC et al., 2015). O controle biológico, é feito por exemplo, com o uso de predadores de larvas do *Aedes*, como o peixe "*Gambusia affinis*" conhecido como peixe-mosquito-do-oeste; a bactéria "*Bti (Bacillus thuringiensis israelensis)*" e etc, também tem sido utilizado; enquanto que o controle mecânico, como colocação de armadilhas, eliminação de criadouros, instalação de telas em portas e janelas, uso de mosquiteiros em camas e etc, é simples, mas depende da conscientização da população, o que pode ser feito por mobilizações sociais (BRAGA; VALLE, 2007) e implementação de ações governamentais, principalmente saneamento básico. Desta forma o controle integrado de vetores consiste na utilização racional e sinérgica das diferentes técnicas e dos diferentes métodos de controle (TALIBERTIL; ZUCCHI, 2010).

Tendo em vista a grande diversidade de vegetais existente no Brasil, é de grande importância estudos a partir de extratos vegetais com a expectativa de novas substâncias com propriedades inseticidas e simultaneamente seletivas para serem usadas em futuras formulações de um produto comercial (PEREIRA et al., 2014).

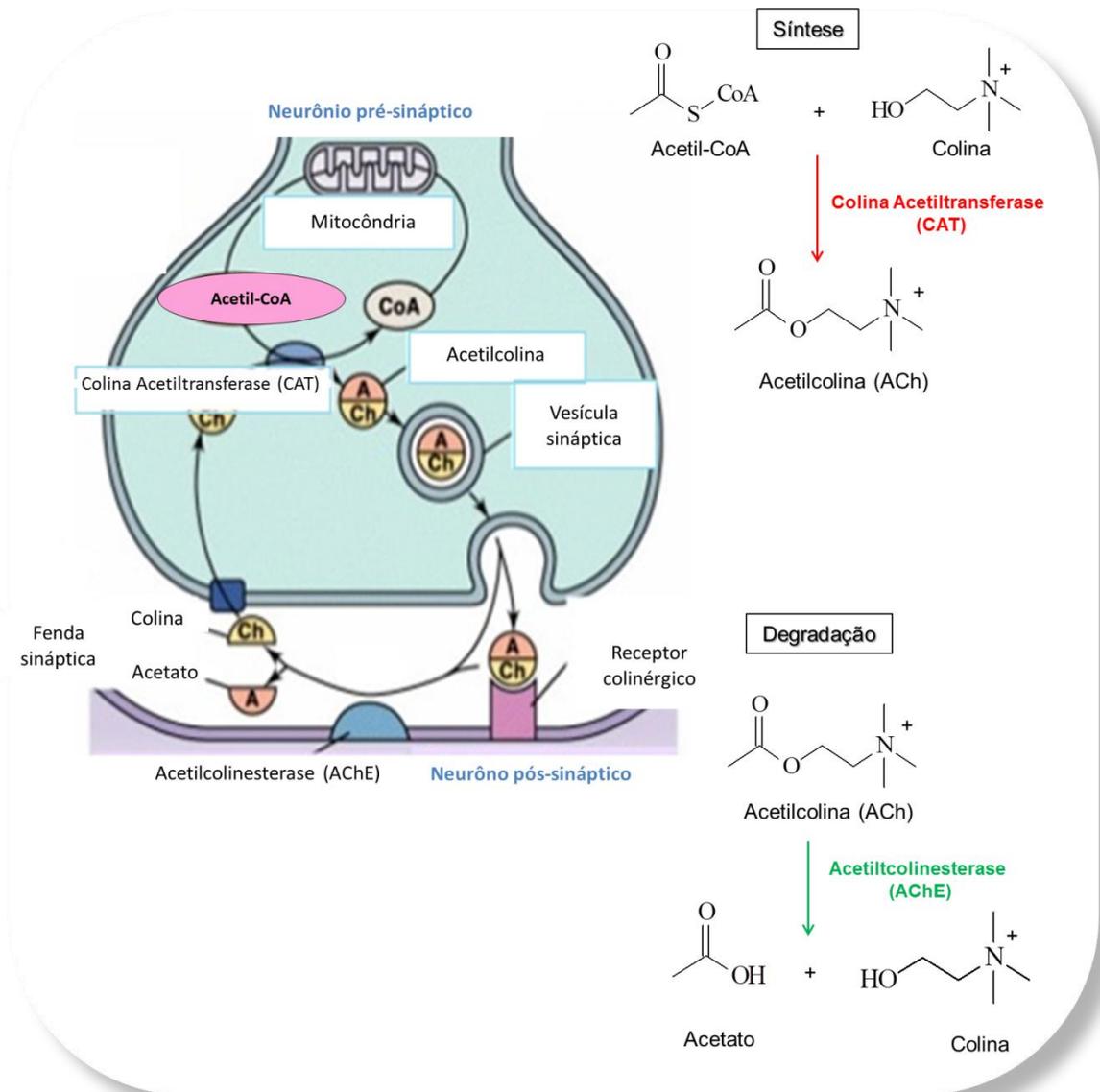
## 2.4 Considerações Sobre Anticolinesterásicos

A Doença de Alzheimer (DA) corresponde a cerca de 50-70% de todas as demências, o que a torna a causa principal da demência (NETO; TAMELINI; FORLENZA, 2005; MONTANO, 2009). A demência caracteriza-se por uma decadência progressiva e global da memória e da reflexão, associada ao déficit de uma ou mais funções cognitivas, com uma intensidade que pode interferir no desempenho social diário ou ocupacional do indivíduo (ARAÚJO; NICOLI, 2010).

A DA é uma afecção neurodegenerativa irreversível associada à idade, cujas manifestações cognitivas e neuropsiquiátricas resultam em uma deficiência progressiva e uma eventual incapacitação de raciocínio (SMITH, 1999; SERENIKI; VITAL, 2008). Atinge primeiramente a memória e, posteriormente, a capacidade de raciocínio e a comunicação. O quadro de sinais e sintomas dessa patologia está associado à redução de neurotransmissores cerebrais e o seu tratamento é sintomático e consiste na tentativa de restauração da função colinérgica. Dessa forma, um dos mais promissores caminhos para tratar esta doença é aumentar o nível da acetilcolina no cérebro, apresentando como estratégias colinérgicas a utilização dos inibidores das colinesterases (AChEs) (TREVISAN et al., 2006).

A acetilcolina (ACh) é um mediador químico de sinapses do sistema nervoso central (SNC), do sistema nervoso periférico e também da junção neuromuscular. A ACh, seus receptores e o aparato enzimático responsável por sua síntese e degradação constituem o sistema de neurotransmissão colinérgica (VENTURA et al., 2010). Sua biossíntese por parte dos neurônios colinérgicos se dá pela acetilação da colina, catalisada pela enzima colina-acetiltransferase (CAT), com acetil coenzima A (acetil-CoA) funcionando como doador de grupos acetil. Uma vez sintetizada, parte da ACh é transportada e armazenada em vesículas sinápticas. Após ser liberada no terminal sináptico, a ACh interage com seus receptores e é hidrolisada em colina e acetato. A colina é então recaptada para o neurônio pré-sináptico pelo transportador de colina de alta afinidade (CHT1) e utilizada para a síntese de novas moléculas de ACh (PRADO et al., 2002; RIBEIRO et al., 2006; VENTURA et al., 2010) (**Figura 6**).

**Figura 6 – Esquema de neurotransmissão colinérgica, reação de síntese e degradação da acetilcolina (ACh).**



Fonte: adaptado de SILVERTHORN, 2003.

O mercado brasileiro dispõe de quatro medicamentos licenciados pela ANVISA [tacrina (Cognex®), donepezil (Aricept®), rivastigmina (Exelon®) e galantamina (Reminyl®) (**Figura 7**)] inibidores de AChE para tratamento da DA, que atuam estimulando os receptores nicotínicos e muscarínicos cerebrais. No entanto, a doença continua em progressão (EGENLHARDT et al., 2005; SERENIKI; VITAL, 2008). A terapêutica utilizada com a introdução das drogas anticolinesterásicas, possibilitou uma intervenção sobre os sintomas cognitivos característicos da DA,

embora os benefícios associados ao uso desses medicamentos não seja suficiente para causar melhoria sintomatológica significativa (ALMEIDA, 1998; SERENIKI; VITAL, 2008).

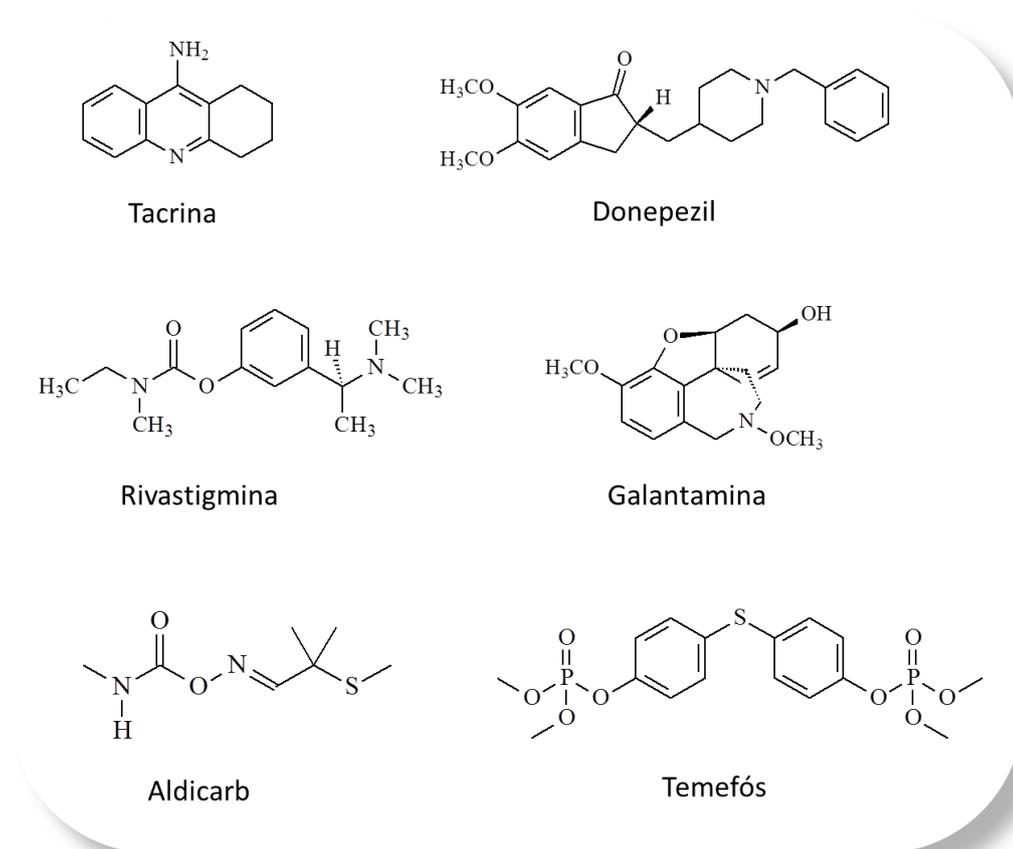
Os inibidores da AChE apresentam outras atividades, tais como antiglaucoma, antiblastoma, neurotrópica, anti-helmíntica, antiviral, antiartereosclerose, antialérgica, antibacteriana, analgésica, antiartrite e anti-hipoglicêmica (BARBOZA et al., 2010). Os organofosforados e carbamatos representam a principal classe de pesticidas anticolinesterásicos (CALDAS, 2000; PATRICK, 2008; OLIVEIRA; BURIOLA, 2009; MANDOUR, 2013) e possuem uma vasta gama de aplicações, dentre as quais estão inseticidas, acaricidas, herbicidas, nematicidas e fungicidas (BARBOZA et al., 2010). O acúmulo destes agentes no organismo acarretam alterações no funcionamento dos sistemas muscular, nervoso, endócrino e imunológico (MELO; OLIVEIRA; LAGO, 2002; NERO, 2007; MELO et al., 2008). No Brasil, dados do Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX) mostraram que esta classe de inseticidas está relacionada com os mais diversos casos de intoxicação notificados nos Centros de Informações e Assistência Toxicológica espalhados pelo país (OLIVEIRA; BURIOLA, 2009).

Existem no mercado cerca de 200 inseticidas organofosforados e 25 carbamatos. Dentre os carbamatos mais conhecidos está o aldicarb (Temik®) (**Figura 7**), conhecido popularmente por “chumbinho” (MORAIS; D’AMARAL, 2007), com finalidade acaricida, inseticida e nematicida. Este é comercializado ilegalmente como raticida, apresentando alto risco de intoxicação, sendo considerada uma importante causa de morbidade e mortalidade (ANVISA, 2006).

Um organofosforado bastante usado como princípio ativo dos produtos Abate®, Difos®, Biothion®, Abathion®, Nimitex® e Swebate®, é o **temefós (Figura 7)** é um larvicida bastante utilizado em várias partes do mundo no controle de vetores transmissores de diversas doenças. Entretanto, não é seletivo, agride o meio ambiente e apresenta efeitos tóxicos agudos e crônicos sobre invertebrados e vertebrados, resultantes da exposição prolongada as suas diferentes moléculas (MELO et al., 2008). Foi observada nos últimos anos a necessidade de dosagens

cada vez mais altas de **temefós** para o controle do *A. aegypti* devido à resistência das larvas de mosquitos coletadas em várias cidades (CRIVELENTI et al., 2011).

**Figura 7 – Princípios ativos de fármacos e pesticidas inibidores da AChE.**



Fonte: Autora desta tese, 2016.

## 2.5 Considerações Sobre a Família Myrtaceae

Myrtaceae constitui uma das mais importantes famílias das angiospermas. Compreende cerca de 140 gêneros, com aproximadamente 5.650 espécies (GOMES et al., 2009; BIFFIN et al., 2010; MORAIS et al., 2014), distribuídas em regiões tropicais e subtropicais (VIEIRA et al., 2004; STEPHENS et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2006). Esta família apresentava somente duas subfamílias: Myrtoideae, de ampla ocorrência na América tropical e Leptospermoideae que ocorre principalmente na Austrália, Malásia e Polinésia. Contudo, uma nova classificação baseada em estudos filogenéticos foi proposta e identificam as duas

subfamílias: Myrtoideae (gêneros *Eugenia*, *Myrcia*, *Myrciaria*, *Myrtus*, *Psidium*, *Pimenta*, *Pseudocaryophyllus* e *Syzigium*) e Psiloxylodeae (*Eucalyptus*, *Leptospermum* e *Malaleuca*) (BIFFIN et al., 2010).

As Mirtáceas estão inseridas na ordem Myrtales distribuídas em 17 tribos: Backhousieae, Chamelaucieae, Eucalypteae, Kanieae, Leptospermeae, Lindsayomyrteae, Lophostemoneae, Melaleuceae, Metrosidereae, Myrteae, Osbornieae, Syncarpieae, Syzygieae, Tristanieae, Xanthostemoneae. A família é reconhecida com facilidade por especialistas, mas a identificação e delimitação das espécies e gêneros se mostram, por vezes, bastante difícil, devido a sua complexa classificação nas tribos, e como resultado, a classificação interna do grupo tem sofrido importantes alterações nos últimos anos, sendo melhor compreendida a partir do desenvolvimento de estudos filogenéticos atuais, baseados em análise de DNA (SANTOS et al., 2015).

No Brasil, todos os representantes nativos pertencem à subfamília Myrtoideae, a qual é constituída apenas pela tribo, Myrteae, que se divide em três subtribos, Eugeniinae, Myrciinae e Myrtinae (LIMBERGER et al., 2004; GRESSLER et al., 2006). A família é representada por aproximadamente 1.000 espécies e 24 gêneros (FORZZA et al., 2010; LOURENÇO; BARBOSA, 2012), sendo considerada uma das famílias mais importantes do Brasil por apresentar espécies nativas e exóticas e pelo valor da sua abundância na flora brasileira (SIQUEIRA et al., 2013).

Economicamente, Myrtaceae é uma família muito importante. A Silvicultura brasileira, especialmente com o gênero *Eucalyptus spp.* vem se destacando em nível mundial principalmente pela alta produtividade e pela competitividade dos custos de produção (GUIMARÃES et al., 2015). O gênero pode ser usado na produção de óleos essenciais, produtos apícolas, celulose e papel, madeira serrada, postes e moirões, laminados, compensados, carvão e lenha, com concentração principal na produção de celulose e carvão vegetal utilizado principalmente na siderurgia. Os segmentos do setor florestal brasileiro ocupam posição de destaque no ranking dos maiores produtores e exportadores mundiais (SOARES et al., 2010). As exportações de espécies de *Eucalyptus* contribuem com a renda do país e do ponto de vista social favorece a produção de emprego (ABRAF, 2013).

Algumas espécies de Myrtaceae são ornamentais, outras podem ser usadas como especiarias, tais como *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry, conhecido como "cravo-da-índia" ou cravo (CASCAES et al., 2015). Várias outras espécies produzem frutos comestíveis para fazer sucos, licores e doces. O fruto brasileiro comestível mais comercializado é a goiaba (*Psidium guajava* L.). No entanto, há também a jabuticaba [*Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel] a pitanga (*Eugenia uniflora* L.) (LUCENA et al., 2014) e o jambo (*Syzygium* spp) (CASCAES et al., 2015).

Espécies de Myrtaceae são utilizadas na medicina popular como antidiarréico, antimicrobiano, antioxidante, antirreumático, agente anti-inflamatório e para diminuir o colesterol no sangue (LUCENA, 2014). O extrato aquoso das folhas de *Myrcia lundiana* Kiaersk tem sido utilizado como adstringente e diurético, no tratamento de diabetes *mellitus*, para tratar a hipertensão e úlceras (ALVES et al., 2016); *Myrcia* spp. são frequentemente consideradas úteis para controlar o diabetes (LUCENA, 2014). Estudos revelam que as espécies deste gênero são uma importante fonte de óleos essenciais, apresentando composição química predominante em mono- e sesquiterpenos. Os compostos não-voláteis isolado deste gênero são geralmente flavonóides, derivados da acetofenona e triterpenos (CASCAES et al., 2015).

Outras espécies como a "guavira" ou "gabirola", *Campomanesia* SP., possuem ação anti-inflamatória, antidiarreica e antisséptica das vias urinárias, também é utilizada contra reumatismo e como desobstruente do fígado (CAMPOS et al., 2012). Outra espécie de uso etnomedicinal bastante difundido é a espécie *Eugenia jambolana* Lam. (jambolão), cujos frutos são úteis para controle da diabetes, dislipidemia e inflamação. Estas propriedades terapêuticas foram associadas com a presença de ácidos fenólicos, flavonóides, terpenos e antocianinas presentes na polpa e nas cascas (BEZERRA et al., 2014).

Um produto natural produzido por várias espécies de *Eucalyptus* spp. é o **1,8-cineol (Figura 8)**. Este composto apresenta atividade anti-inflamatória em asma e também atua como agente mucolítico e nas doenças das vias aéreas inferiores (JUERGENS et al., 2003), além de atividade acaricida frente a carrapatos (CHAGAS et al., 2002).

Estudos realizados através de CG-EM visando à identificação dos componentes químicos presentes nos óleos essenciais de diferentes espécies dos

gêneros *Calycorectes*, *Calycolpus*, *Eugenia*, *Myrcia*, *Neomitranthes* e *Syzygium* resultaram na identificação de um grande número de monoterpenos (**Figura 8**), sesquiterpenos e alguns derivados fenólicos (**Figura 9**) e de outras classes de compostos (**Figura 10**) (REYNERTSON et al., 2008; SCHNEIDER et al., 2008; PEREIRA et al., 2010; APEL et al., 2013).

### 2.5.1 Considerações Sobre o Gênero *Myrciaria*

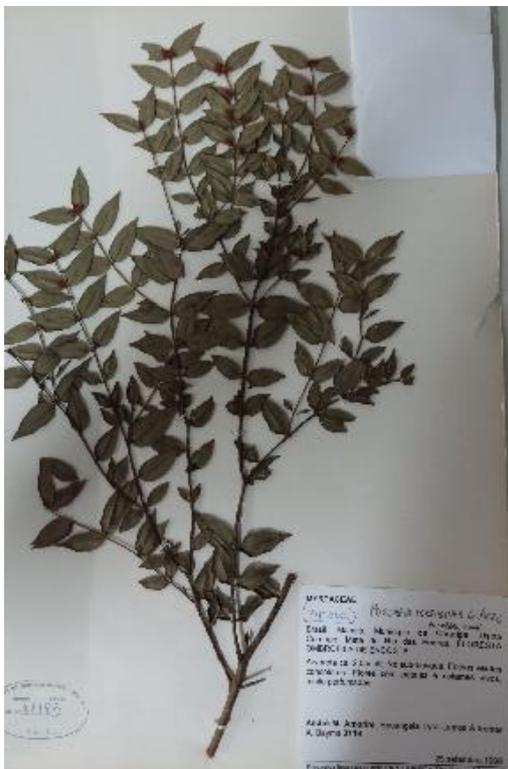
O gênero *Myrciaria* compreende aproximadamente 30 espécies distribuídas no México, América Central, América do Sul, oeste da Índia, Norte da Argentina e Uruguai (KAWASAKI, 2011). No Brasil, o gênero encontra-se distribuído em todas as regiões, com domínios fitogeográficos na Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Pampa (SOBRAL et al., 2015) e está representado por 22 espécies nativas, incluindo *Myrciaria ferruginea* O.Berg. (FORZZA et al., 2010; SOBRAL et al., 2015).

Espécies de *Myrciaria* apresentam algumas propriedades medicinais, tal como *M. dubia* (H.B.K.) Mc Vaugh conhecida como “camu-camu”, cujos frutos são considerados a maior fonte natural de vitamina C (2,7 g/100 g de polpa) (SMIDERLE; SOUZA, 2008; YUYAMA, 2011) e de muitos compostos fenólicos, incluindo antocianinas e flavonoides (AGUIAR; SOUZA, 2015). Podem ser usado por suas propriedades funcionais, tal como redução da dislipidemia, obesidade e diabetes (AGUIAR; SOUZA, 2015). Apresenta atividade antioxidante (NASCIMENTO et al., 2013), antígenotóxica (SILVA et al., 2012) e anti-inflamatória (YAZAWA et al., 2011). Estudos revelaram que *M. floribunda* (H. West ex Willd.) O. Berg, popularmente conhecida como “camboim amarelo”, “camboim”, “jabuticabinha”, “murta”, “duque”, “goiabarana” e “araçazeiro”, apresenta atividades inseticida (TIETBOHL et al., 2014) e antimicrobiana (VAZ et al., 2012). Assim como o extrato de *M. cauliflora* O. Berg., conhecida como “jabuticaba paulista”, “jabuticaba assú” ou “jabuticaba ponhem”, apresenta atividades antimicrobiana (MACEDO-COSTA et al., 2009; CARVALHO et al., 2009), antifúngica (DINIZ et al., 2010), antiproliferativa contra células de câncer bucal (WANG et al., 2014), antioxidante (SANTACRUZ et al., 2012), vasodilatadora (SÁ et al., 2014) e hepatoprotetora (SILVA, 2015). *M. glomerata* O.Berg., conhecida como “cabeludinha”, é usada na medicina popular

como anti-inflamatória (SILVA; DONATO, 2016). Outras espécies deste gênero apresentam, entre outras, atividades anti-inflamatória, antioxidante, hipoglicêmica, antifúngica, antiproliferativa, antibacteriana, anticolinesterásica, antiplasmódica e gastroprotetora (BORGES et al., 2014).

Dentre as 22 espécies *Myrciaria* nativas do Brasil, cinco delas [*M. tenella* (ANDRADE et al., 2006; SCHNEIDER et al., 2008), *M. floribunda* (TIETBOHL et al., 2012; 2014), *M. cordata* (UENO; MIYAJI, 2014) e *M. glomerata* (SOBRINHO et al., 1955)] tiveram seus constituintes químicos investigados. Não há relato quanto ao estudo químico das demais espécies. Assim, o presente trabalho visa o estudo químico de *Myrciaria ferruginea* (Figura 11), bem como a avaliação de seu potencial biológico. Esta espécie se distribui no Nordeste e no Sudeste, com domínio fitogeográfico na Mata Atlântica. Sua vegetação é do tipo floresta ombrófila (floresta pluvial) e restinga (SOBRAL et al., 2015).

**Figura 11 – Fotos dos galhos, folhas e frutos (A-C) de *Myrciaria ferruginea* O. Berg.**



**A**

Fonte: Autora desta tese, 2016.



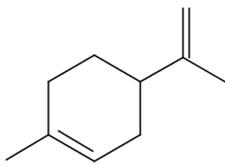
**B**



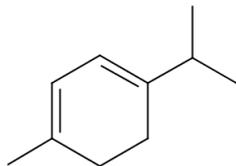
**C**

Fonte: POPOVKIN, 2010

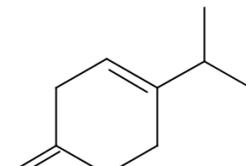
**Figura 8 – Monoterpenos e outros compostos identificados em óleos essenciais de espécies de *Calycolpus*, *Eugenia*, *Myrcia* e *Myrciaria*.**



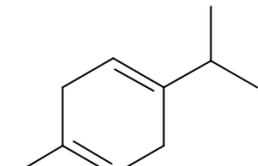
**Limoneno (1)**



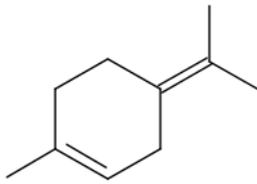
**$\alpha$  Terpineno (2)**



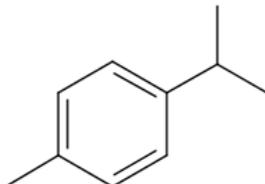
**$\beta$ -Terpineno (3)**



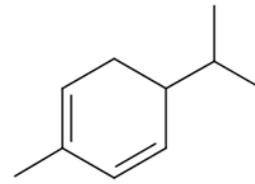
**$\gamma$ -terpineno (4)**



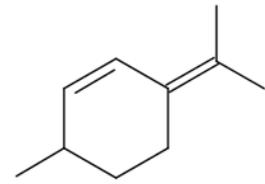
**Terpinoleno (5)**



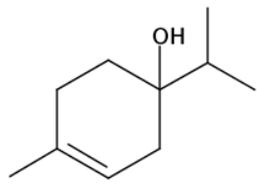
**p-Cimeno (6)**



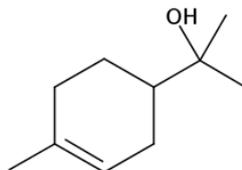
**$\alpha$ -Felandreno (7)**



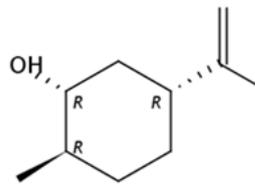
**p-Menta-2,4(8)-dieno (8)**



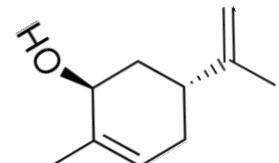
**Terpine-4-ol (9)**



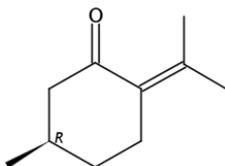
**$\alpha$ -Terpineol (10)**



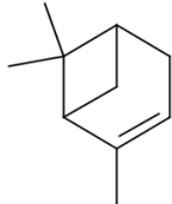
**Dihidrocarveol (11)**



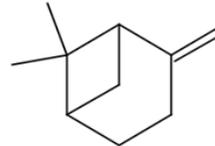
**Carveol (12)**



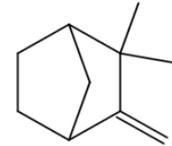
**Pulegona (13)**



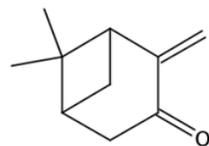
**$\alpha$ -Pineno (14)**



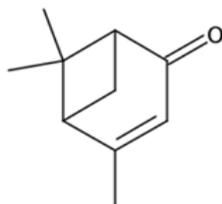
**$\beta$ -Pineno (15)**



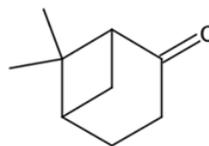
**Canfeno (16)**



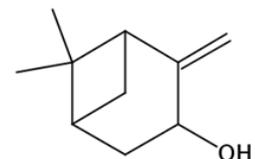
**Pinocarvona (17)**



**Verbenona (18)**

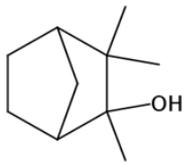


**Nopinona (19)**

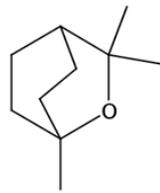


**Pinocarveol (20)**

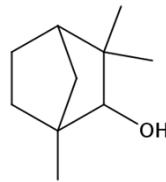
## Continuação da Figura 8.



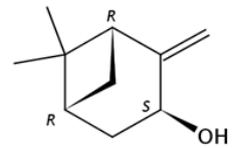
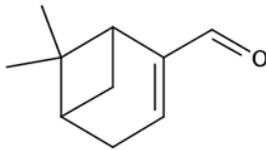
3-Metilcanfenilol (21)



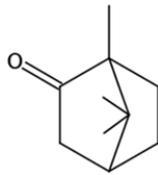
1,8-Cineol (22)



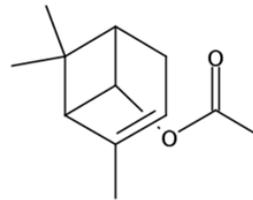
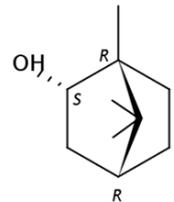
Fenchol (23)

*trans*-Pinocarveol (24)

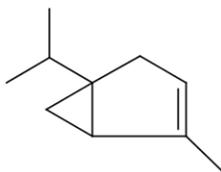
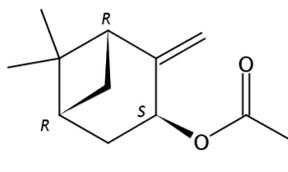
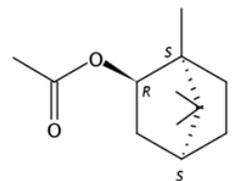
Mirtenal (25)



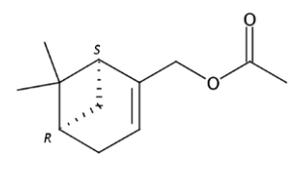
Cânfora (26)

Acetato de *cis*-crisantenil (27)

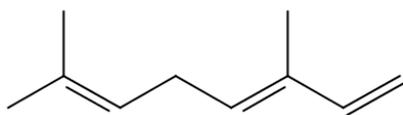
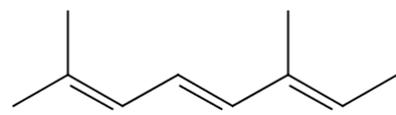
Borneol (28)

 $\alpha$ -Tujeno (29)Acetato de *trans*-pinocarvil (30)

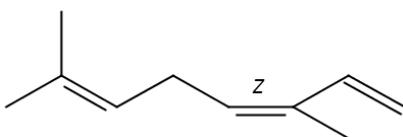
Acetato de bornila (31)



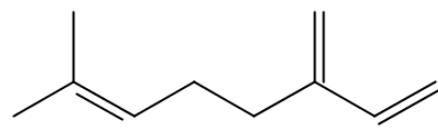
Acetato de mirtenil (32)

 $\beta$ -Ocimeno (33)

allo-Ocimeno (34)



(Z)-Ocimeno (35)



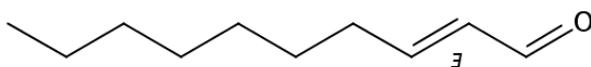
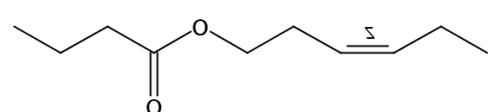
Mirceno (36)



Nonanal (37)

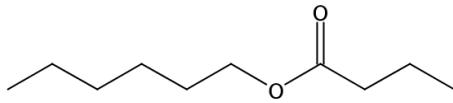


(2E)-Nonenal (38)

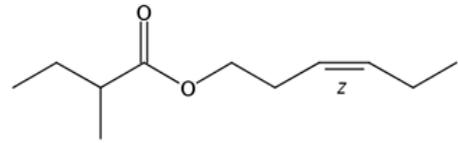
*trans*-2-Decenal (39)

hexenil do ácido butanoico, 3Z (40)

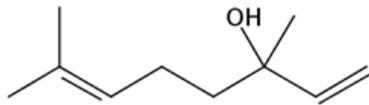
Continuação da Figura 8.



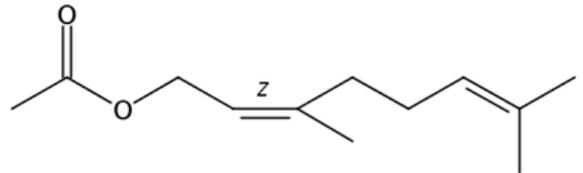
Butanoato de hexila (41)



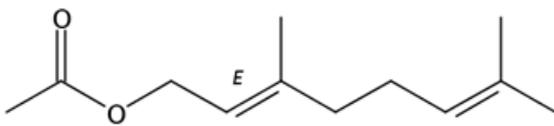
(42)



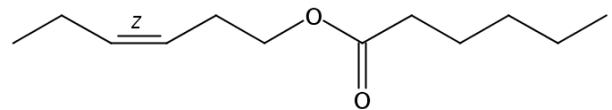
Linalool (43)



Acetato de nerila (44)

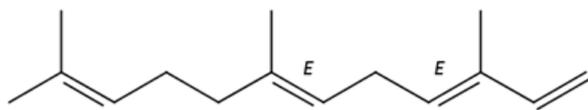


Acetato de geranila (45)

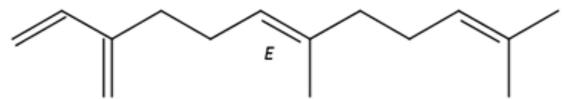


(Z)-3-hexanoato de hexenila (46)

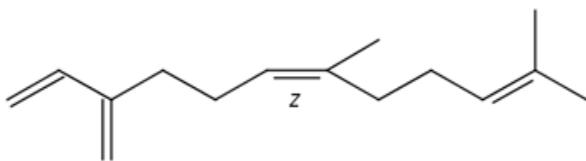
Figura 9 – Sesquiterpenos e derivados fenólicos identificados em óleos essenciais de espécies de *Calycolpus*, *Eugenia*, *Myrcia* e *Myrciaria*



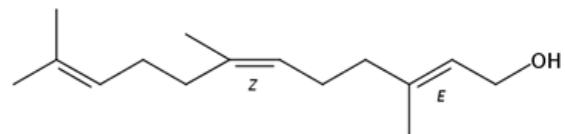
$\alpha$ -Farneseno (47)



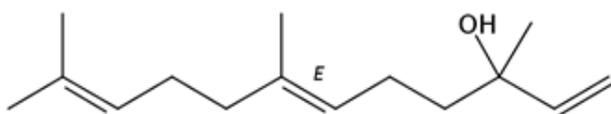
(E)- $\beta$ -Farneseno (48)



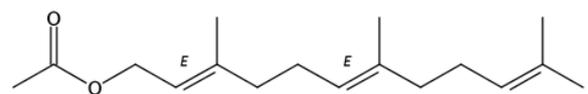
(Z)- $\beta$ -Farneseno (49)



(2E,6Z)-Farnesol (50)

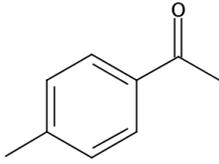
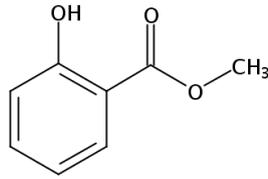
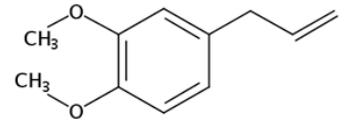
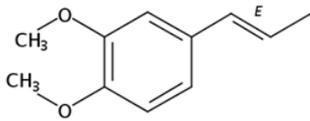
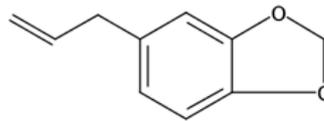
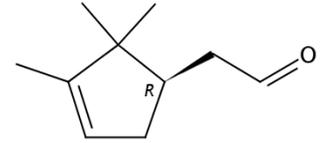
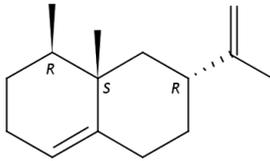
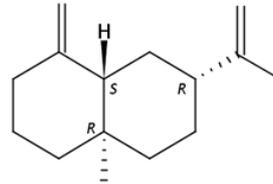
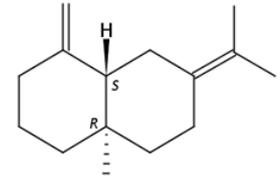
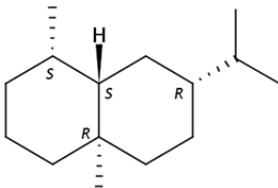
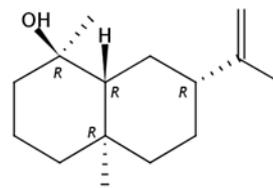
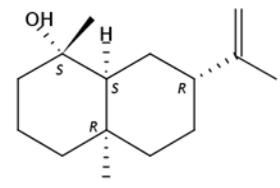
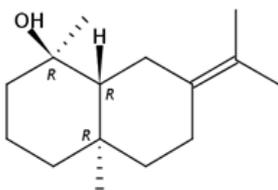
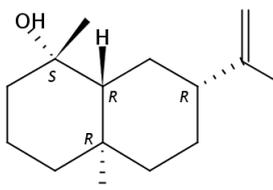
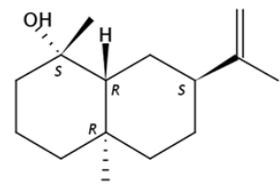
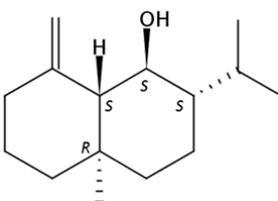
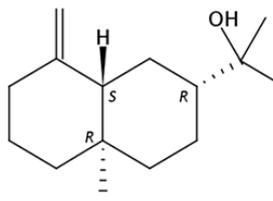
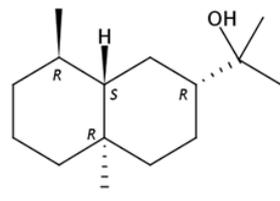


(6E)-Nerolidol (51)

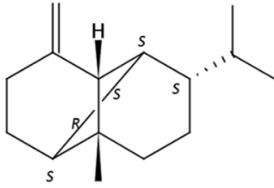


Acetato de (2E, 6E)-farnesila (52)

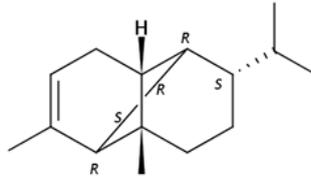
## Continuação Figura 9.

**p-Metilacetofenona (53)****Salicilato de metila (54)****Metil eugenol (55)****soeugenol (56)****Safrol (57)** **$\alpha$ -Carfolenal (58)****Valenceno (59)** **$\beta$ -Selineno (60)** **$\gamma$ -Selineno (61)****Selinano (62)****Selin-11-en-4 $\alpha$ -ol (63)****5-epi-Neointermedeol (64)****Eudesm-7(11)-en-4-ol (65)****Neo-Intermedeol (66)****Paradisiol (67)****Junenol (68)** **$\beta$ -Eudesmol (69)****Eudesmol (70)**

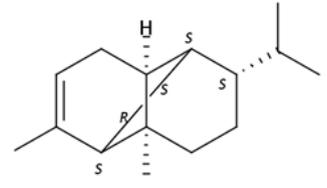
Continuação da Figura 9.



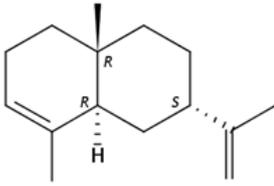
$\beta$ -Copaeno (71)



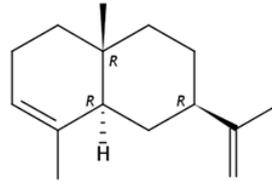
$\alpha$ -Ylangeno (72)



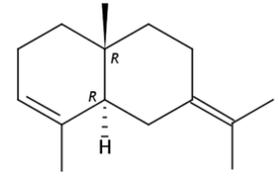
$\alpha$ -Copaeno (73)



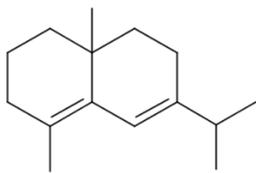
7-epi- $\alpha$ -Selineno (74)



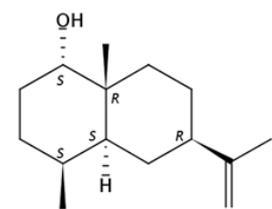
$\alpha$ -Selineno (75)



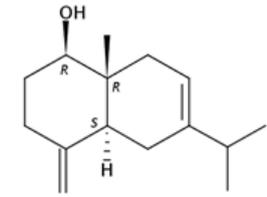
Selina-3,7(11)-dieno (76)



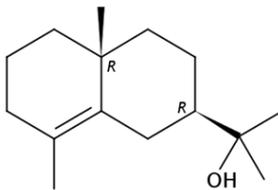
$\delta$ -Selineno (77)



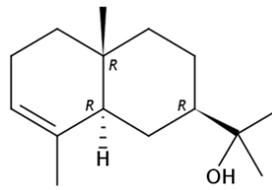
(78)



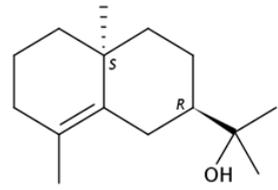
Eudesma-4(15),7-dien-1 $\beta$ -ol (79)



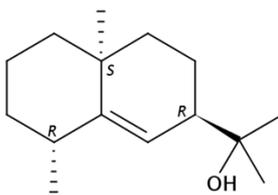
$\gamma$ -Eudesmol (80)



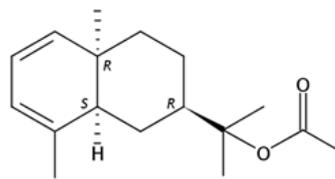
$\alpha$ -Eudesmol (81)



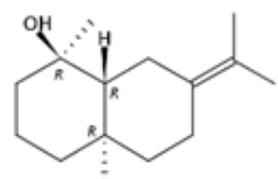
10-epi- $\gamma$ -Eudesmol (82)



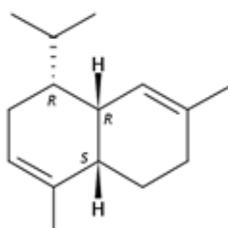
Rosifoliol (83)



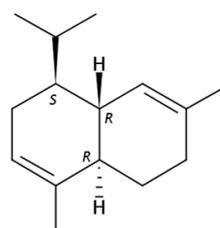
Acetato de *cis*-dihidro-ocidentalol (84)



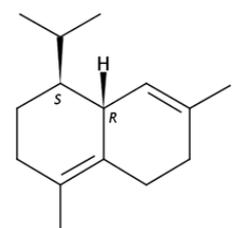
Juniper canfora (85)



$\alpha$ -Amorfeno (86)

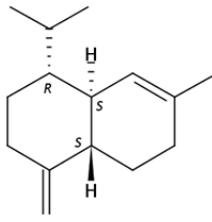


$\alpha$ -Cadineno (87)

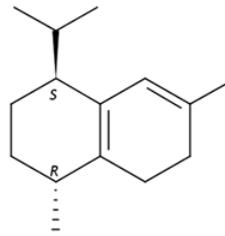


$\delta$ -Cadineno (88)

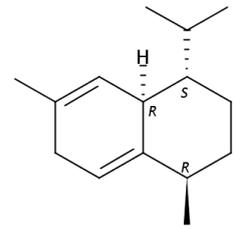
Continuação da Figura 9.



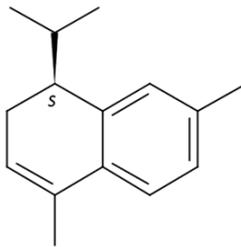
$\gamma$ -Cadineno (89)



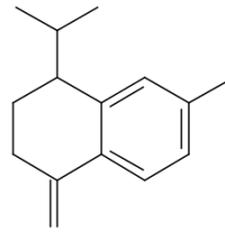
*trans*-Cadina-1(6),4-dieno (90)



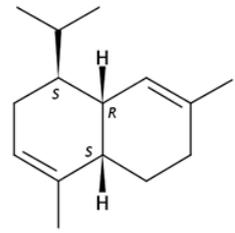
*trans*-Cadina-1,4-dieno (91)



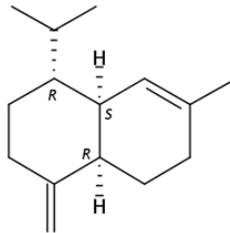
$\alpha$ -Calacoreno (92)



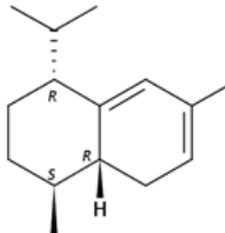
$\beta$ -Calacoreno (93)



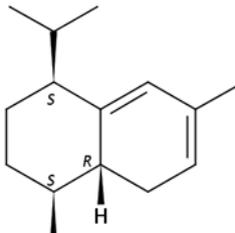
$\alpha$ -Muuroleno (94)



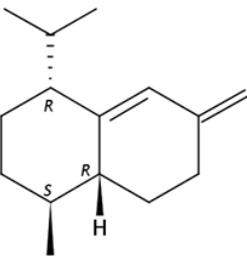
$\gamma$ -Muuroleno (95)



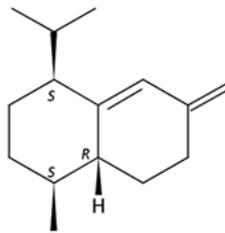
*trans*-Muurola-3,5-dieno (96)



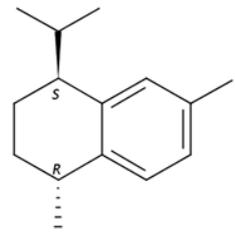
*cis*-Muurola-3,5-dieno (97)



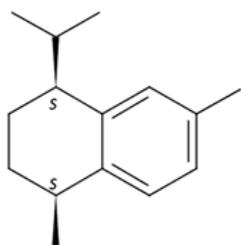
*trans*-Muurola-4(14),5-dieno (98)



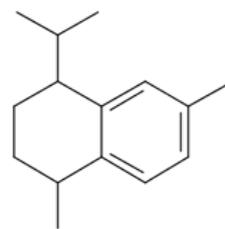
*cis*-Muurola-4(14),5-dieno (99)



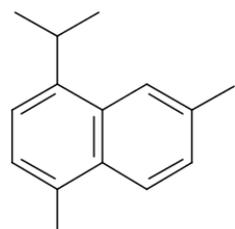
*trans*-Calameneno (100)



*cis*-Calameneno (101)

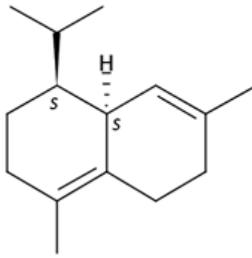


Calameneno (102)

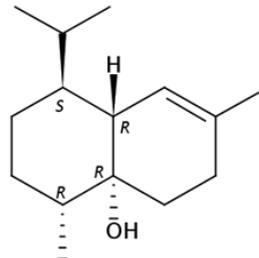


Cadaleno (103)

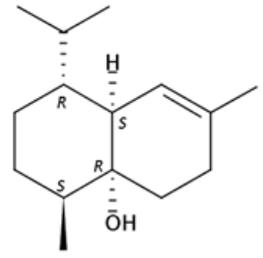
Continuação da Figura 9.



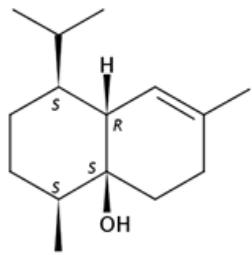
$\delta$ -Amorfenol (104)



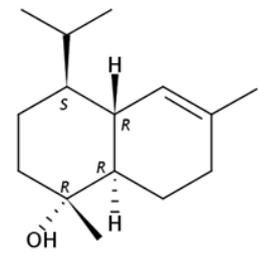
Cubenol (105)



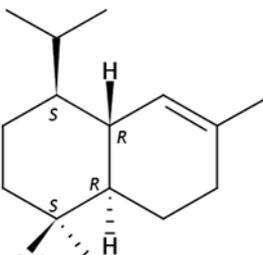
1-epi-Cubenol (106)



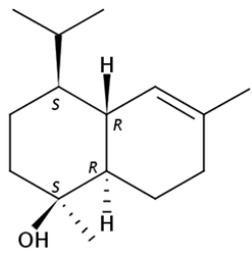
1,10-di-epi-cubenol (107)



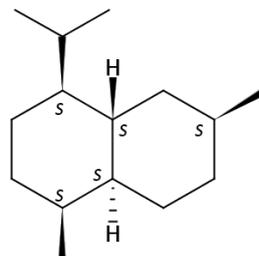
$\alpha$ -Cadinol (108)



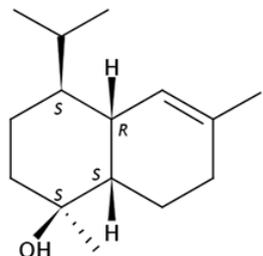
$\tau$ -Cadinol (109)



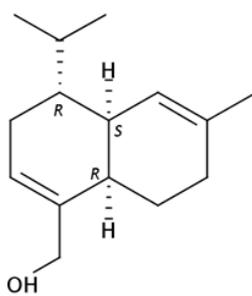
epi- $\alpha$ -Cadinol (110)



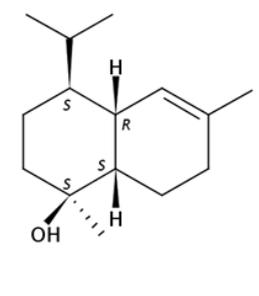
Cadinano (111)



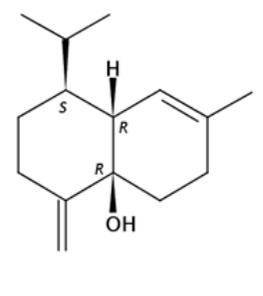
epi- $\alpha$ -Muurolol (112)



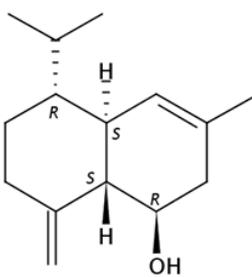
14-Hidroxi- $\alpha$ -muuroleno (113)



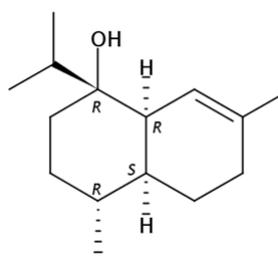
$\tau$ -Muurolol (114)



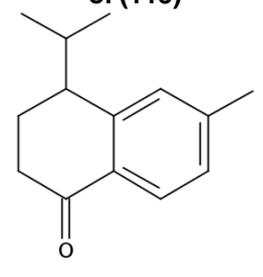
Muurola-4,10(14)-dien-1 $\beta$ -ol (115)



Khusinol (116)

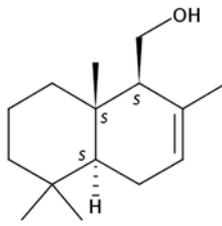


(117)

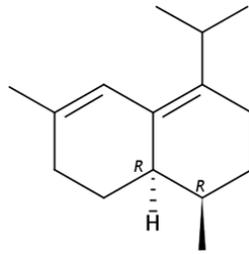


(118)

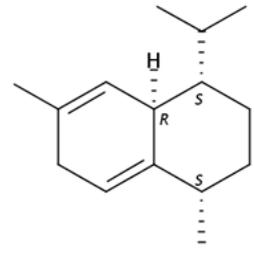
Continuação da Figura 9.



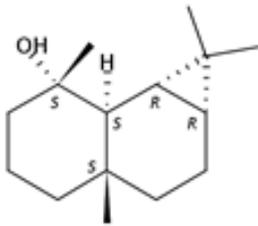
Drimenol (119)



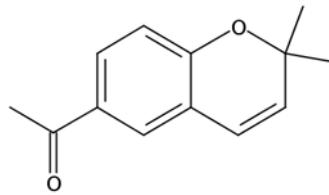
Zonareno (120)



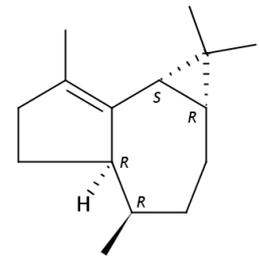
Cadina-1,4-dieno (121)



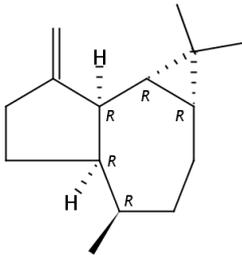
Maalaiol (122)



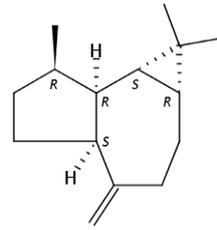
Desmetoxiencocalina (123)



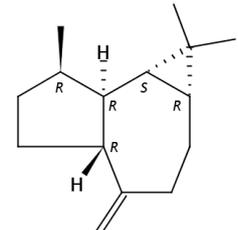
$\alpha$ -Gurjuneno (124)



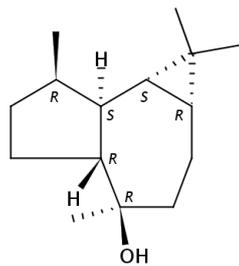
$\beta$ -Gurjuneno (125)



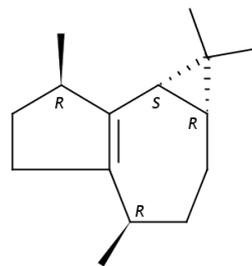
allo-Aromadendreno (126)



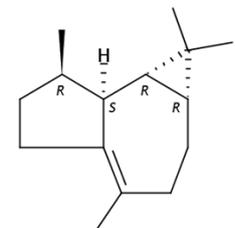
Aromadendreno (127)



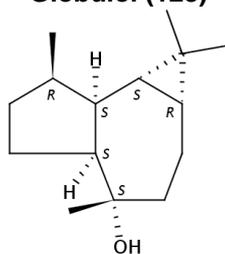
Globulol (128)



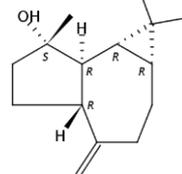
Isoledeno (129)



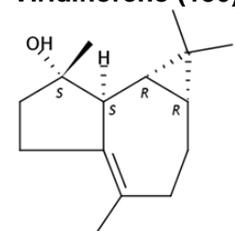
Viridifloreno (130)



Viridiflorol (131)

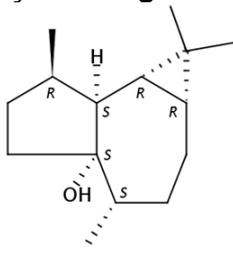


Espatulenol (132)

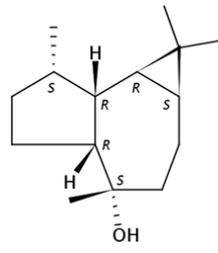


Iso-espatulenol (133)

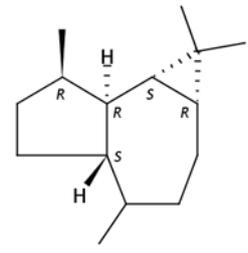
Continuação da Figura 9.



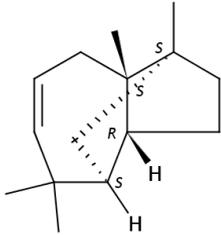
**Palustrol (134)**



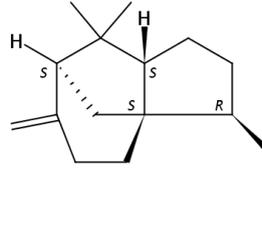
**Ledol (135)**



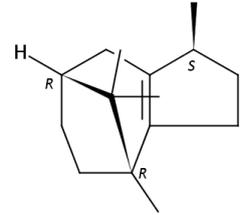
**(136)**



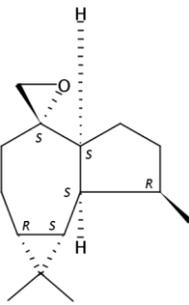
**4-Longiborneno (137)**



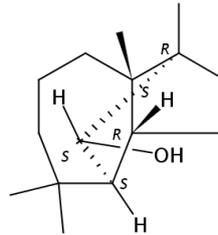
**$\beta$ -Cedreno (138)**



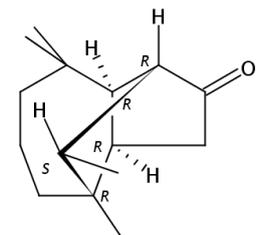
**$\beta$ -Patchouleno (139)**



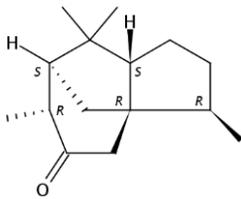
**Epoxido allo-aromadendreno (140)**



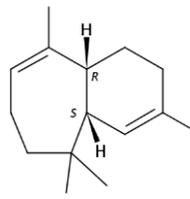
**Longiborneol (141)**



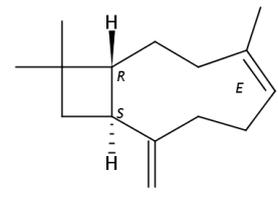
***trans*-Isolongifolanono (142)**



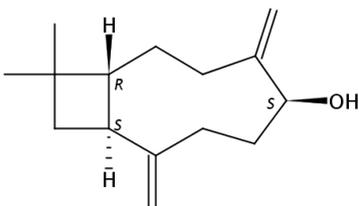
**Cedranona (143)**



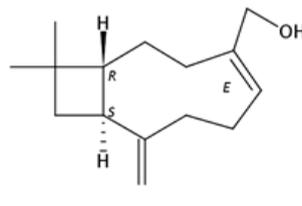
**$\gamma$ -Himachaleno (144)**



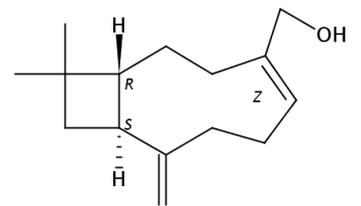
**$\beta$ -Cariofileno (145)**



**Cariofila-4(12),8(13)-dien-5 $\beta$ -ol (146)**

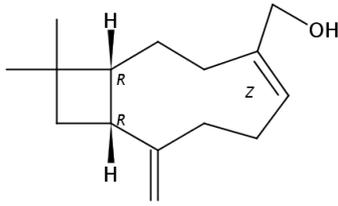


**14-Hidroxi- $\beta$ -cariofileno (147)**

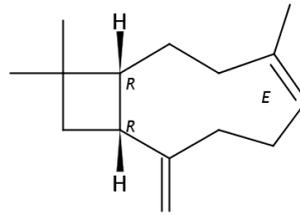


**14-Hidroxi- $\beta$ -cariofileno (148)**

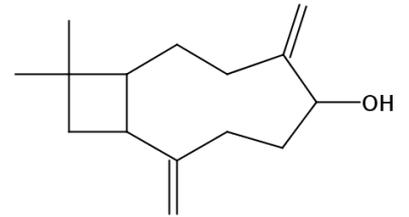
Continuação da Figura 9.



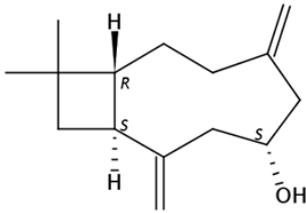
14-Hidroxi-9-epi- $\beta$ -cariofileno (149)



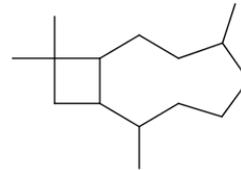
9-epi- $\beta$ -Cariofileno (150)



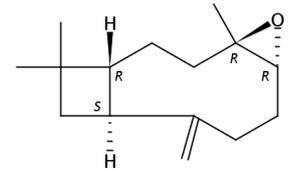
Cariofileno (151)



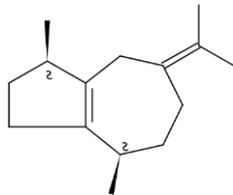
Cariofila-4(14), 8(15)-dien-5 $\alpha$ -ol (152)



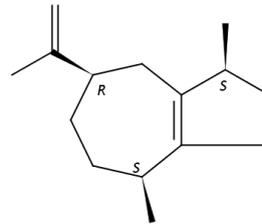
D1—OH  
Cariofiladienol (153)



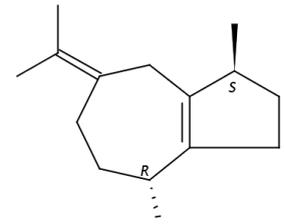
Óxido de cariofileno (154)



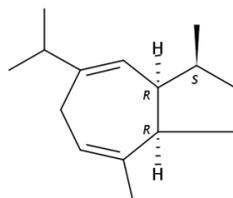
cis- $\beta$ -Guaieno (155)



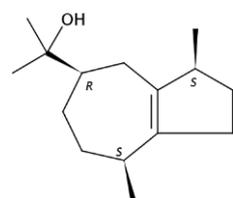
$\alpha$ -Guaieno (156)



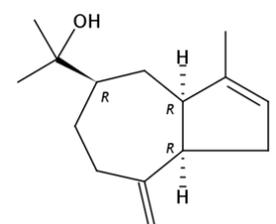
trans- $\beta$ -Guaieno (157)



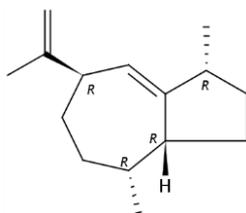
6,9-Guaiadieno (158)



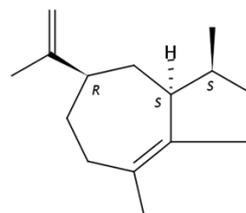
Guaiol (159)



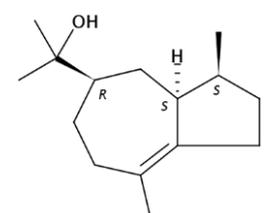
Guaia-3,10(14)-dien-11-ol (160)



$\gamma$ -Gurjuneno (161)

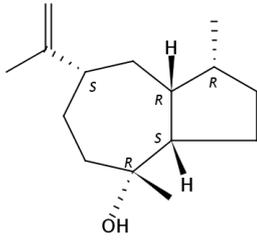


$\alpha$ -Bulneseno (162)

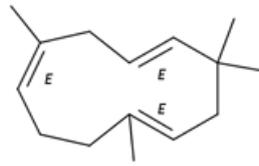


Bulnesol (163)

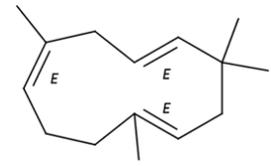
Continuação da Figura 9.



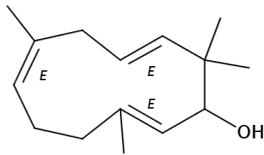
**Pogostol (164)**



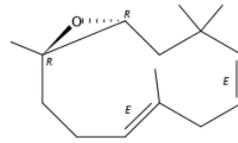
**Humuleno (165)**



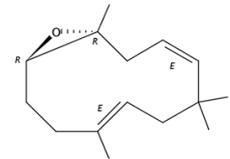
**α-Humuleno (166)**



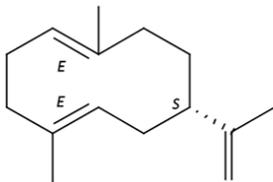
**14-Hidroxi-α-humuleno (167)**



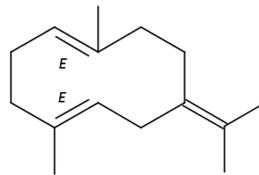
**Epóxido de humuleno (168)**



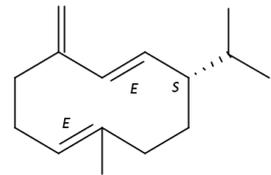
**Epóxido de humuleno II (169)**



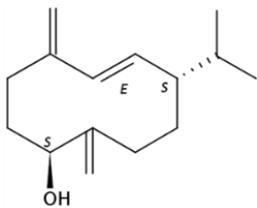
**Germacreno A (170)**



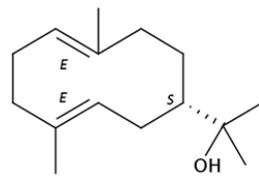
**Germacreno B (171)**



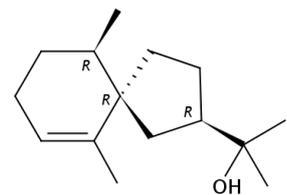
**Germacreno D (172)**



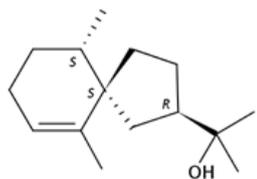
**Germacra-4(15),5,10(14)-trien-1α-ol (173)**



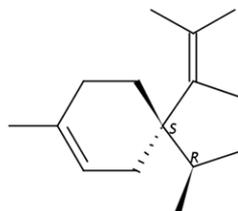
**Hedicariol (174)**



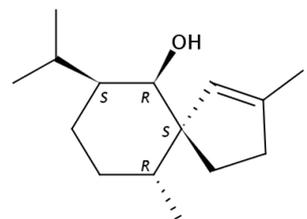
**Agarospirol (175)**



**Hinesol (176)**

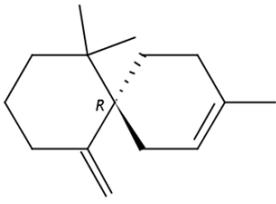


**α-Alaskeno (177)**

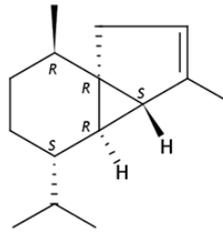


**Glenol (178)**

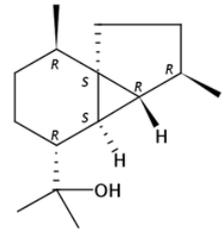
Continuação da Figura 9



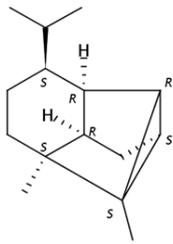
**$\beta$ -Chamigreno (179)**



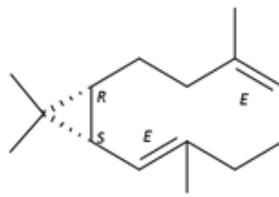
**$\alpha$ -Cubebeno (180)**



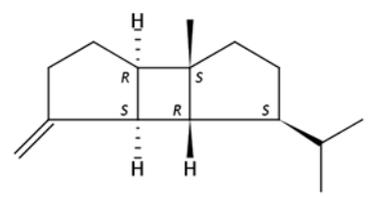
**Cubeban-11-ol (181)**



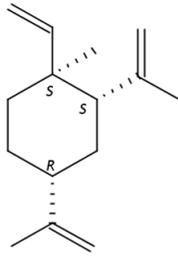
**Ciclosativeno (182)**



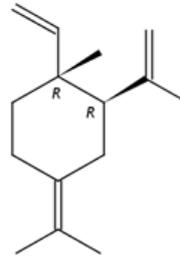
**Biclogermacreno (183)**



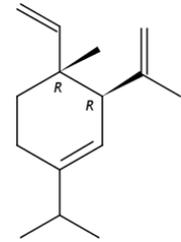
**$\beta$ -Bourboneno (184)**



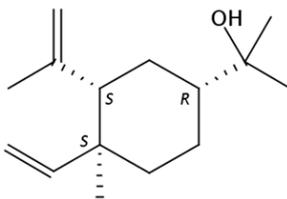
**$\beta$ -Elemeno (185)**



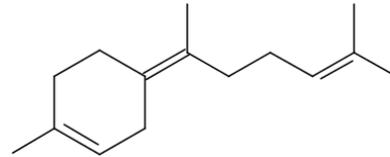
**$\gamma$ -Elemeno (186)**



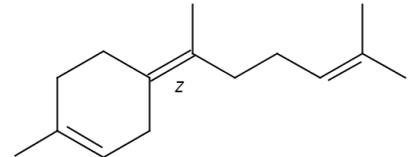
**$\delta$ -Elemeno (187)**



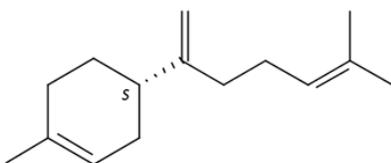
**Elemol (188)**



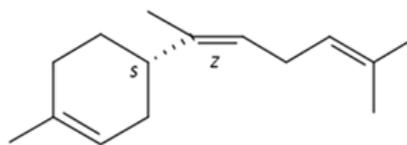
**Bisaboleno (189)**



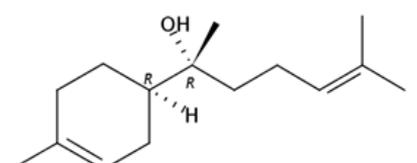
**(Z)- $\gamma$ -Bisaboleno (190)**



**$\beta$ -Bisaboleno (191)**

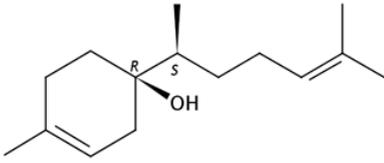


**(192)**

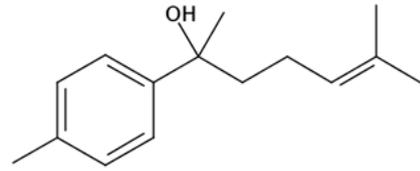


**$\alpha$ -Bisabolol (193)**

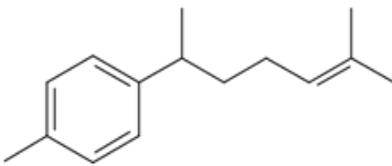
Continuação da Figura 9



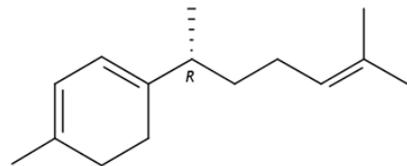
**epi-β-Bisabolol (194)**



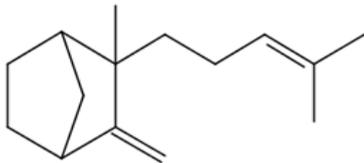
**Gossonorol (195)**



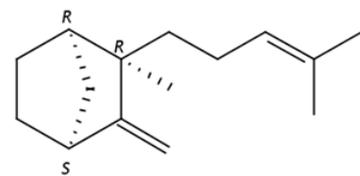
**α-Curcumeno (196)**



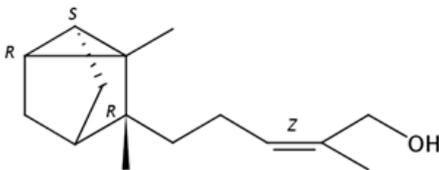
**γ-Curcumeno (197)**



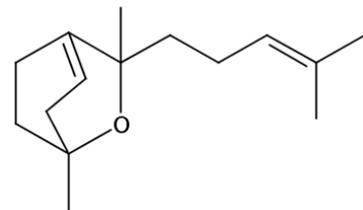
**β-Santaleno (198)**



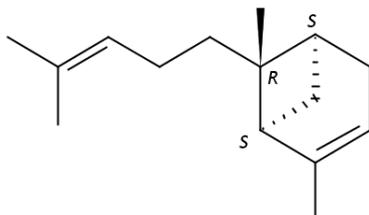
**epi-β-Santaleno (199)**



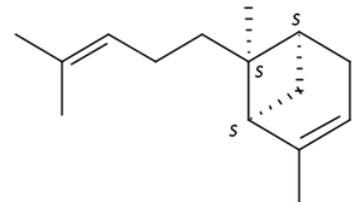
**(Z)-α-Santalol (200)**



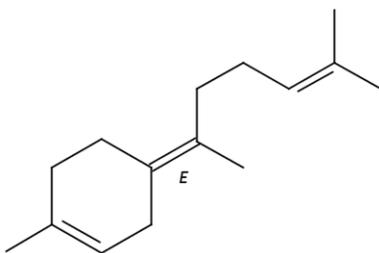
**(201)**



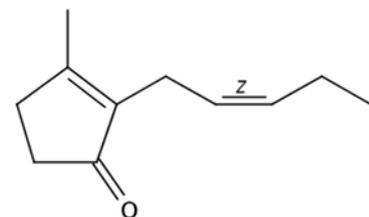
**trans-α-Bergamoteno (202)**



**cis-α-Bergamoteno (203)**

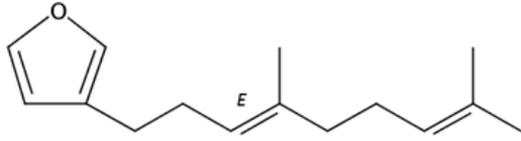


**(204)**

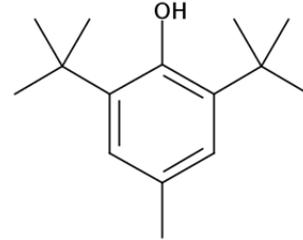


**Jasmona (205)**

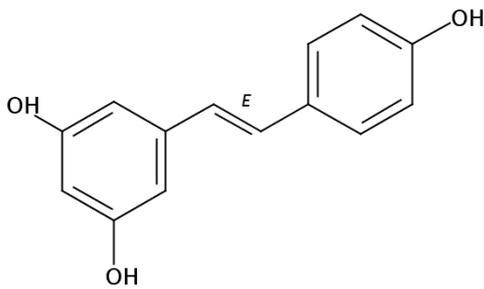
**Figura 10 – Outras classes de compostos identificados em espécies de *Calycolpus*, *Eugenia*, *Myrcia* e *Myrciaria*.**



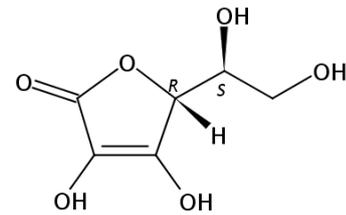
**Dendrolasina (206)**



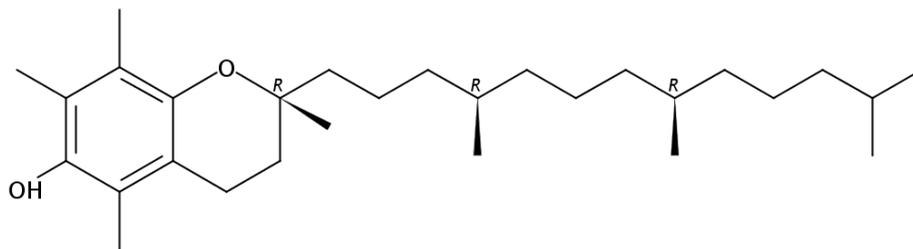
**2,6-Di-tert-butyl-p-cresol (207)**



**Resveratrol (208)**

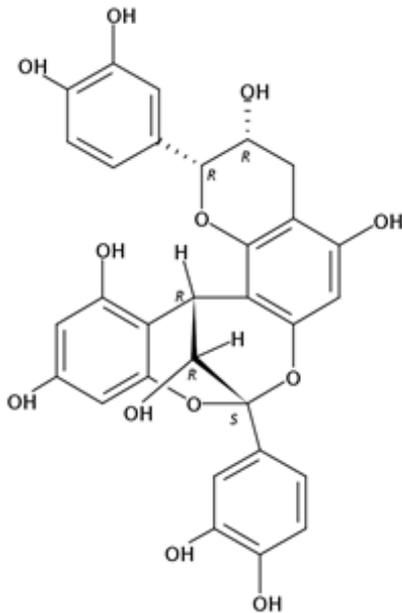


**Vitamina C (210)**

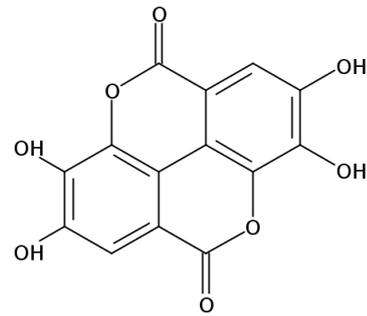


**Vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) (211)**

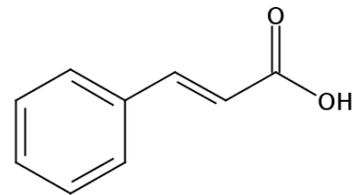
Continuação da figura 10.



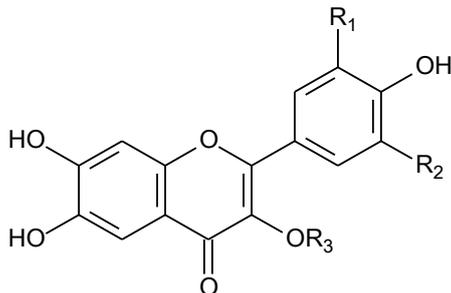
Litchiderm LS 9704 (209)



Ácido elágico (211)



Ácido trans-cinâmico (212)



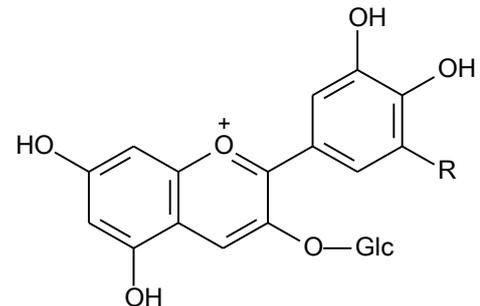
Kaempferol (215)  $R_1 = R_2 = R_3 = H$

Miricetina (216)  $R_1 = OH; R_3 = Rha$

Quercetina (217)  $R_1 = OH; R_2 = R_3 = H$

Miricetina (218)  $R_1 = OH; R_2 = H; R_3 = Rha$

Quercetin (219)  $R_1 = OH; R_2 = H; R_3 = Rut$



Cianidina 3-Glc  $R = H$  (213)

Delfinidina 3-Glc  $R = OH$  (214)

Legenda: Glc = Glicosídeo; Rha = raminose; Rut = Rutenosídeo

## 3 OBJETIVOS

---

### 3.1. Geral

Conhecer e ampliar o perfil químico e avaliar o potencial larvicida (larvas do *Aedes aegypti*), antibacteriano, migração horizontal e de inibição de espécies reativas de oxigênio (EROS) de extratos, frações e das substâncias isoladas, da espécie *Myrciaria ferruginea* O. Berg (Myrtaceae).

### 3.2. Específicos

- Avaliar o potencial antibacteriano (*Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*) de extratos, frações e compostos isolados;
- Avaliar a viabilidade de células fibroblasto 3T3 e o potencial de migração horizontal *in vitro* das substâncias isoladas;
- Avaliar a viabilidade de células macrófagos (J774) e o potencial de inibição de espécies reativas de oxigênio (EROS);
- Avaliar o potencial larvicida (larvas do 4º estágio do *A. aegypti*) e anticolinesterásico de extratos, frações e substâncias isoladas;
- Isolar os constituintes químicos dos extratos e frações ativos nos ensaios efetuados;
- Identificar as substâncias isoladas utilizando a técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e pela comparação com dados da literatura.

## 4. EXPERIMENTAL

---

### 4.1. Solventes, Materiais e Equipamentos

- Na preparação dos extratos brutos por maceração foram utilizados maceradores de aço inoxidável e solventes extratores o etanol e a acetona;
- Nas partições e separações cromatográficas foram utilizados solventes destilados no próprio laboratório ou P.A. (Vetec, Dinâmica, Synth e Quimex), sílica gel 60 (70-230 mesh, ASTM Merck) e Sephadex LH-20 (Pharmacia<sup>®</sup>);
- A concentração de grandes volumes de solventes foi efetuada em evaporadores rotatórios (BÜCHI<sup>®</sup> R-114, IKA WERKE<sup>®</sup> RV06-ML e IKA RV10), enquanto que soluções com pequenos volumes foram concentradas à temperatura ambiente em capela de exaustão da Permution<sup>®</sup>;
- Nas cromatografias em camada delgada (CCD) foram utilizadas placas analíticas de 0,50 mm de espessura preparadas com gel de sílica 60 PF<sub>254</sub> da Merck<sup>®</sup>. Essas cromatoplasmas foram preparadas utilizando-se suspensões do gel de sílica em água destilada, a qual foi distribuída sobre as placas por meio de um espalhador mecânico e foram ativadas a 100°C, em estufa Biomatic<sup>®</sup>;
- As pesagens foram efetuadas em balança eletrônica analítica AX 200 Shimadzu<sup>®</sup> e balança semi-analítica BEL<sup>®</sup>;
- Nas solubilizações de amostras utilizou-se ultrassom da Brason<sup>®</sup> 1210;
- A secagem da vidraria foi realizada em estufa de esterilização universal (Fabbe-Primar, modelo 219);
- Na revelação de cromatogramas, utilizou-se lâmpada ultravioleta da Spectroline<sup>®</sup> (modelo ENF-260C/F), com comprimentos de onda de 254 e 366 nm e por imersão em cubas de vidro contendo vapores de iodo ou borrifadas com solução ácida de sulfato cérico;
- Os pontos de fusão (p.f.) foram determinados em aparelho MQAPF-302 da microquímica, com capacidade máxima de aquecimento 340°C;

- Os experimentos de RMN ( $^1\text{H}$ : 400 MHz;  $^{13}\text{C}$ : 100 MHz) foram efetuados em espectrômetro Brüker Avance 400 do Instituto de Química e Biotecnologia (IQB) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL). A referência interna utilizada nos espectros foi o tetrametilsilano (TMS) ou o sinal residual do solvente deuterado (clorofórmio puro ou em mistura com metanol) utilizados na dissolução das amostras;
- Na avaliação da atividade larvídica utilizou-se na dissolução das amostras dimetilsulfóxido (DMSO), autoclave vertical (modelo 415 Fanem) para esterilização da ração animal e glicose anidra P.A. (Amresco<sup>®</sup>);
- Nos ensaios antibacterianos foram utilizados meios de cultivos Agar Mueller Hinton (AMH), Mueller Hinton Caldo (MHC), adquiridos da Acumedia Manufacturers Inc. (MI, USA); brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT), Cremofor<sup>®</sup>, ceftriaxona (30  $\mu\text{g}$ ) e ciprofloxacina (5  $\mu\text{g}$ ), adquiridos da Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Co., Brasil) e cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio 0,5% (CTT) adquirido da Inlab (Interlab - Distribuidora de Produtos Científicos, São Paulo-SP); pipetas automáticas de volumes variáveis, ponteiros de polietileno, placas de Petri descartáveis de 9 cm de diâmetro (Global Trade Technology), microplacas de poliestireno com 96 orifícios estéreis (JET BIOFIL<sup>®</sup> Tissue Culture Plates), além de vidrarias diversas, pinças, alças de platina e papel Whatman<sup>®</sup> n<sup>o</sup> 1. Cepas de bactérias da American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 (NEWPROV Produtos para Laboratório, Pinhais/PR, Brasil; Cefar Diagnóstica Ltda, São Paulo/SP, Brasil); paquímetro mecânico (Starret Company, Athol/MA/USA), autoclave vertical e estufa bacteriológica (modelos Q316M2 e Q290 Quimis<sup>®</sup> respectivamente), capela de fluxo laminar (Biohazard Safety Cabinet, JSR-JS Research, Veco do Brasil Indústria e Comércio de Equipamentos Sociedade Ltda, Campinas/SP, Brasil);
- Nos ensaios de viabilidade celular e dos efeitos de migração horizontal e inibição da produção de EROS foram utilizados brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), Cremofor<sup>®</sup>, meio de cultivo RPMI-1640 (do inglês Roswell

Park Memorial Institute medium), suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de L-glutamina e 40 µg/mL gentamicina, meio DMEM (do inglês Dulbecco's Modified Eagle Medium) contendo 10% soro fetal bovino (FBS – do inglês fetal bovine serum), tampão fosfato salina (PBS; do inglês Phosphate Buffered Saline), fator de crescimento (PDGF; do inglês Platelet Derived Growth Factor), paraformaldeído, 4',6-diamino-2-fenilindol e Nitroazul de tetrazólio (NBT – do inglês Nitroblue Tetrazolium), adquiridos da Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Co., Brasil), microplacas de poliestireno com 96 orifícios estéreis (JET BIOFIL<sup>®</sup> Tissue Culture Plates); multileitor de placas ELISA, espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm; multileitor de placas ELISA; programa GraphPad Prism<sup>®</sup> software, version 5.0 (San Diego, CA, USA).

## 4.2. Coleta e Identificação do Material Vegetal

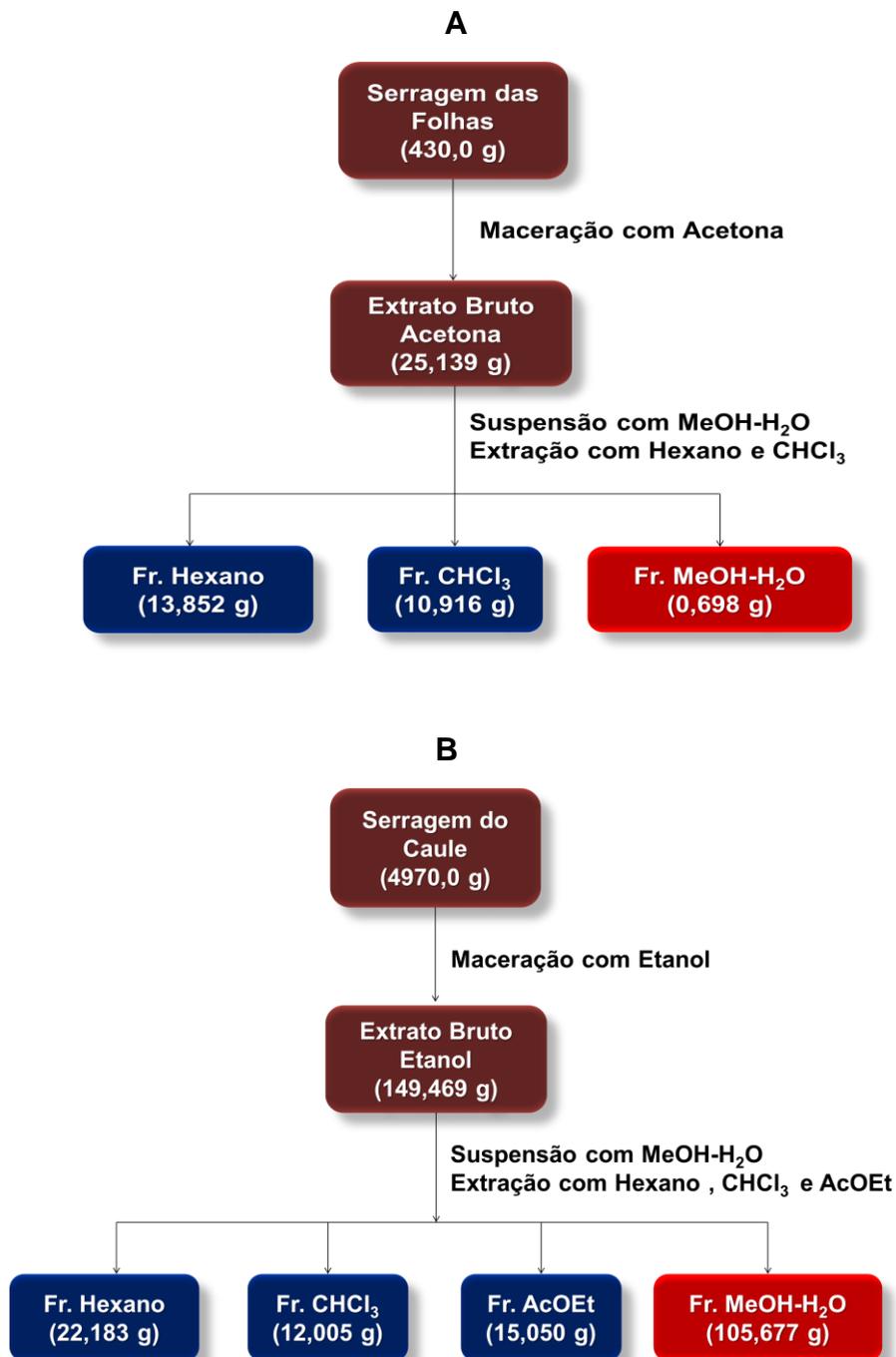
Folhas e caule da espécie *Myrciaria ferruginea* O.Berg (**Figura 11**) foram coletados pelo Sr. *Nilo Pinto de Sousa*, em novembro de 2011, na Área de Proteção Ambiental da Usina Coruripe, município de Coruripe-AL, e identificada pela botânica *Rosângela P. de Lyra Lemos*, do Instituto do Meio Ambiente do Estado de Alagoas, onde um exemplar do referido material se encontra catalogado (MAC-11183).

## 4.3. Preparação dos Extratos e Frações das Folhas e do Caule

Após secagem à temperatura ambiente e trituração, materiais das folhas (430 g) e do caule (4900 g) foram individualmente extraídos através de maceração com acetona e etanol a 90%, respectivamente. Após concentração das soluções em evaporadores rotativos e secagem a temperatura ambiente, foram obtidos os extratos brutos [folhas (acetona: 25,14 g) e caule (EtOH: 159,14 g)]. Estes extratos foram individualmente suspensos em solução MeOH-H<sub>2</sub>O (3:2) e extraídos sucessivamente com hexano, clorofórmio e acetato de etila (**Figura 12**). Após concentração das soluções em evaporador rotativo obteve-se as frações de partição das folhas [hexano (13,852 g), CHCl<sub>3</sub> (10,916 g) e MeOH-H<sub>2</sub>O (0,698 g)] e de caule [hexano (22,183 g), CHCl<sub>3</sub> (12,005 g), AcOEt (15,050 g) e MeOH-H<sub>2</sub>O (105,677 g)], que foram armazenadas em freezer até o momento do uso nos estudos fitoquímicos e biológicos.

Posteriormente, tanto os extratos brutos quanto as frações provenientes de partição das folhas foram avaliados com ensaios antibacteriano, viabilidade celular, migração horizontal e inibição das espécies reativas de oxigênio pelo lipossacarídeo, frente as células fibroblasto 3T3 e de macrófagos (J774) e o efeito larvicida, frente a larvas do 4º estágio do mosquito *A. aegypti*, e anticolinesterásico direcionando-os desta forma à investigação fitoquímica, que resultou no isolamento de nove compostos (**Figura 23**).

**Figura 12 – Procedimento experimental efetuado com os extratos em acetona das folhas (A) e em etanol do caule (B).**



## 4.4. Isolamento de Alguns dos Constituintes Químicos de Folhas e de Caule

### 4.4.1. Procedimento efetuado com as frações oriundas das folhas

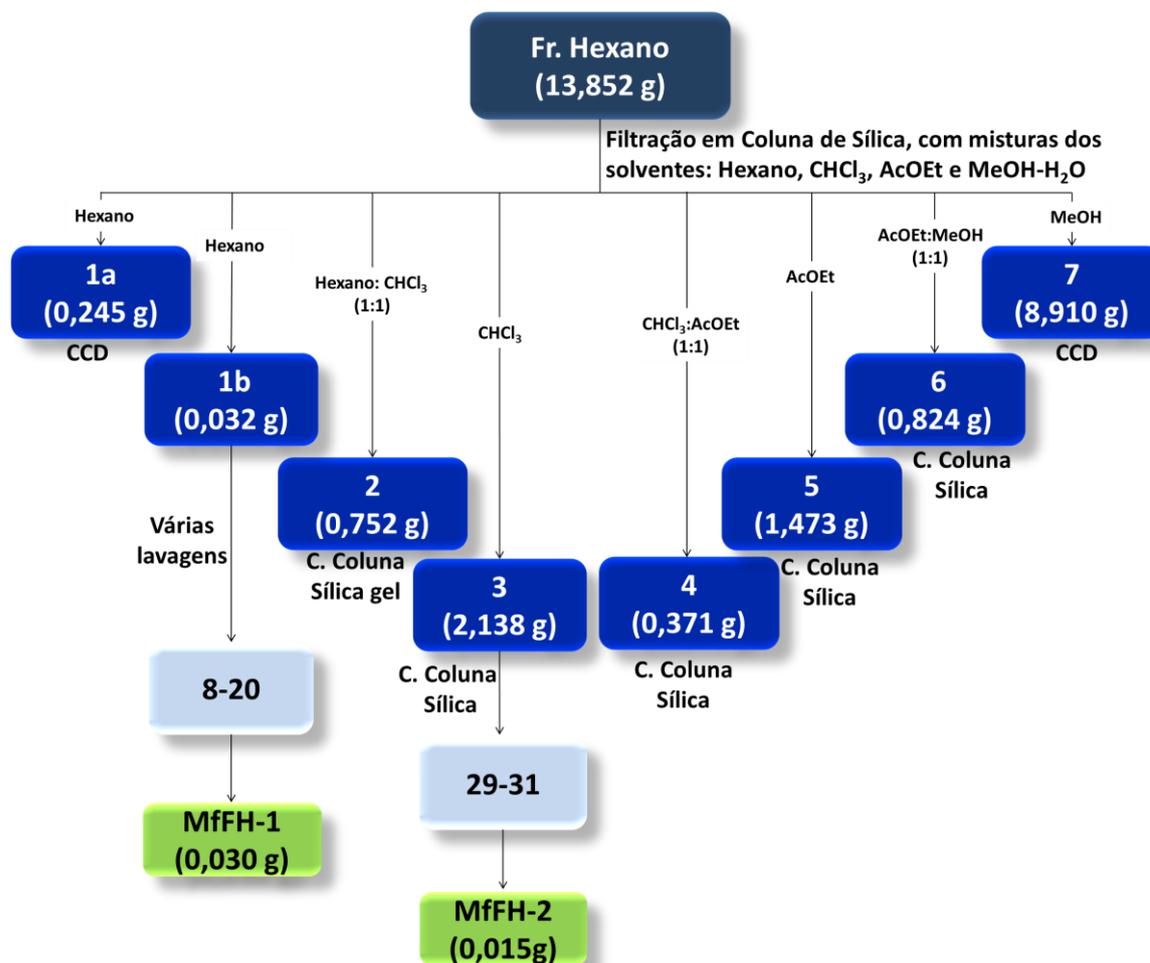
#### ❖ Fração em Hexano

A fração em hexano das folhas (13,852 g) foi submetida à filtração em gel de sílica utilizando os seguintes eluentes puros ou em proporções crescentes de polaridade: Hexano (**1a** e **1b**); Hexano-CHCl<sub>3</sub> (1:1; **2**); CHCl<sub>3</sub> (**3**); CHCl<sub>3</sub>-AcOEt (1:1; **4**); AcOEt (**5**); AcOEt-MeOH (1:1; **6**) e MeOH (**7**) (**Figura 13**). As sete frações resultantes (**1-7**) foram analisadas através de CCD, utilizando diferentes sistemas eluentes e revelações com luz ultravioleta (254 e 366 nm) e por vapores de iodo. Após esta análise comparativa, as frações (**2-6**) foram individualmente fracionadas de gel de sílica 60 (70-230 mesh) e as subfrações resultantes, após análise comparativa através de CCD, em diferentes sistemas eluentes, foram agrupadas. A fração **1b** (0,032 g), proveniente da filtração com hexano, apresentou-se como um sólido levemente esverdeado. Este material, após sucessivas lavagens a frio com hexano forneceu um sólido amorfo branco, p.f. 194-196 °C, que foi codificado de **MfFH-1** (0,030 g).

A fração **3** (2,138 g), oriunda da filtração com CHCl<sub>3</sub> foi fracionada em coluna de gel de sílica e o material cristalino oriundo da reunião das subfrações (29-31), mostrou uma única mancha na presença de luz UV e em vapores de iodo. Este material foi codificado de **MfFH-2** (0,015 g).

As frações **2** (0,752 g), **4** (0,371 g), **5** (1,473 g) e **6** (0,824 g), obtidas da filtração com os eluentes Hexano-CHCl<sub>3</sub> (1:1), CHCl<sub>3</sub>-AcOEt (1:1), AcOEt e AcOEt-MeOH (1:1), respectivamente, foram fracionadas em coluna de gel de sílica com misturas binárias de solventes contendo Hexano, CHCl<sub>3</sub>, AcOEt e MeOH em ordem crescente de polaridade. Após inúmeras tentativas de purificação, estas frações não conduziram ao isolamento de substâncias com grau de pureza adequado para obtenção dos dados espectrais. Ainda, as frações em hexano **1a** (0,245 g) e **7** (8,910 g), apresentaram-se como materiais oleosos, que ao serem submetidos a CCD em diferentes sistemas de eluentes, não apresentaram boa definição das manchas e, por esta razão, não foram fracionadas em coluna de gel de sílica.

Figura 13 – Procedimento experimental efetuado com a fração em hexano das folhas.



#### ❖ Fração em $\text{CHCl}_3$

A fração em  $\text{CHCl}_3$  das folhas (10,916 g) foi filtrada em gel de sílica com misturas de solventes em proporções crescentes de polaridade [Hexano, Hex- $\text{CHCl}_3$  (1:1),  $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3$ -AcOEt (1:1), AcOEt, AcOEt-MeOH (1:1) e MeOH], 1 a 7, respectivamente]. Estas frações foram submetidas à análise através de CCD, utilizando diferentes sistemas eluentes, e revelações com luz ultravioleta (254 e 366 nm) e vapores de iodo. Após análise, todas as frações (1-7) foram fracionadas, analisadas em CCD e agrupadas (Figura 14).

A fração 2 (1,798 g), oriunda da filtração com Hexano- $\text{CHCl}_3$  (1:1), foi submetida a fracionamento cromatográfico em gel de sílica. Foi coletado um total de 115 subfrações contendo aproximadamente 10 mL cada. As subfrações reunidas 22-

23 (0,017 g) e 52-57 (0,047g) apresentaram duas manchas em CCD e foram individualmente submetidas à CCD preparativa resultando no isolamento de duas substâncias, de p.f. 185-187 °C e 254-256 °C, que foram codificadas de **MfFC-1** (0,012 g) e de **MfFC-2** (0,010 g), respectivamente. A análise dos dados de RMN de **MfFC-1** revelou que se tratava de quantidade adicional de **MfFH-1**.

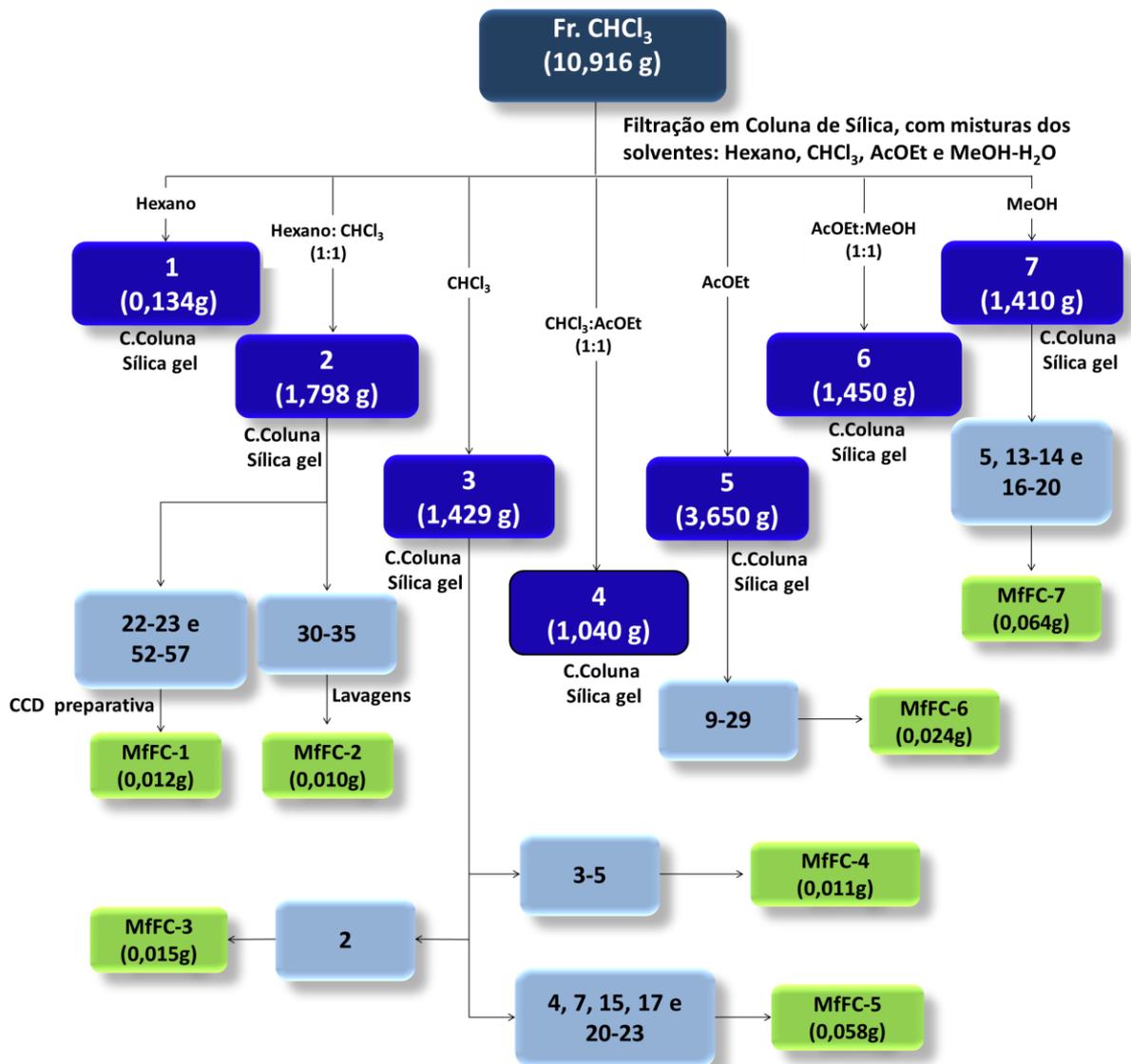
O material da fração **3** (1,429 g), oriunda da filtração (CHCl<sub>3</sub>), foi fracionada em gel de sílica utilizando hexano e acetato de etila em gradiente crescente de polaridade. Foram coletados 82 subfrações com um volume médio de aproximadamente 10 mL cada. O material da subfração 2 (0,010 g) foi codificado de **MfFC-3**, cujos dados de RMN mostrou tratar-se de quantidade adicional de **MfFC-1**. O material das subfrações reunidas 3-5 (0,042 g), após sucessivas recristalizações com MeOH, resultou no isolamento de um material de p.f. 169-173 °C que foi codificado de **MfFC-4** (0,011 g). Posteriormente, os espectros de RMN revelou que este material era composto por uma mistura constituída por **MfFC-4** e **MfFC-1**.

A análise comparativa através de CCD e de RMN dos materiais das subfrações 4 (0,010 g), 7 (0,011 g), 15 (0,013 g), 17 (0,011 g) e 20-23 (0,013 g), codificados de **MfFC-5**, se mostraram constituídos principalmente pelo componente isolado anteriormente codificado de **MfFC-2**.

A fração **5** (3,650 g), oriunda da filtração em AcOEt, foi fracionada em gel de sílica, obtendo-se 110 subfrações com volume médio de aproximadamente 10 mL cada. As subfrações reunidas 9-29 (0,024 g) mostrou tratar-se do componente isolado anteriormente codificado de **MfFC-1** (0,024 g). O fracionamento cromatográfico em coluna de gel de sílica da subfração 7 (1,410 g) conduziu ao isolamento de quantidade adicional da substância **MfFC-1** (0,064 g).

Os materiais das frações **1** (0,134 g); **4** (1,040 g) e **6** (1,450 g), obtidas da filtração Hexano, CHCl<sub>3</sub>-AcOEt (1:1) e AcOEt-MeOH (1:1), respectivamente, foram fracionadas em coluna de gel de sílica, contudo não resultou na obtenção de material com grau de pureza satisfatório para análise de RMN.

Figura 14 – Procedimento experimental efetuado com a fração em  $\text{CHCl}_3$  das folhas.



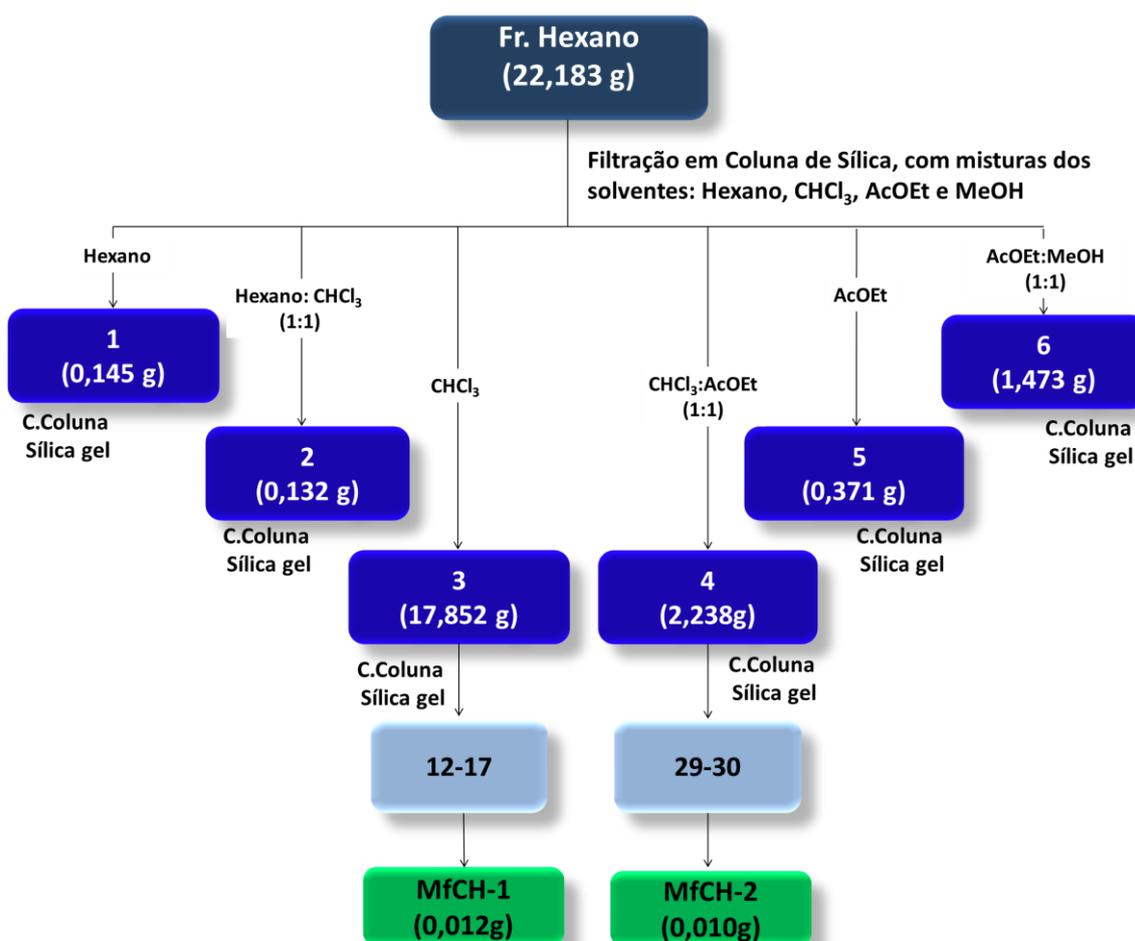
#### 4.4.2. Procedimento Experimental Efetuado com as Frações Oriundas da Partição do Extrato em Etanol do Caule

##### ❖ Fração em Hexano

A fração em hexano do caule (22,183 g) foi submetida à filtração em gel de sílica utilizando solventes de diferentes proporções crescentes de polaridade: Hexano (1), Hexano- $\text{CHCl}_3$  (1:1; 2);  $\text{CHCl}_3$  (3),  $\text{CHCl}_3$ -AcOEt (1:1; 4); AcOEt (5) e AcOEt-MeOH (1:1; 6) (Figura 15). As frações resultantes (1-6) foram submetidas à análise

através de CCD, utilizando-se diferentes sistemas eluentes e revelações com luz ultravioleta (254 e 366 nm), bem como vapores de iodo. Após análise, as frações 2-6 foram fracionadas em coluna de gel de sílica 60 (70-230 mesh) e suas subfrações, após análise comparativa através de CCD, em diferentes sistemas eluentes, foram agrupadas.

**Figura 15 – Fluxograma do procedimento experimental efetuado com a fração em hexano do caule**



A fração **3** (17,852 g), oriunda da filtração com eluente  $\text{CHCl}_3$ , foi fracionada em coluna de gel de sílica, com diferentes sistemas de eluentes, da qual foram coletados 102 subfrações com volume médio de 10 mL cada. O material das subfrações (12-17) resultaram no isolamento da substância de p.f. 139-141°C codificada de **MfCH-1** (0,012 g).

O material da subfração **4** (2,238 g), oriunda da filtração com eluente  $\text{CHCl}_3$ -AcOEt (1:1) foi fracionada em coluna de gel de sílica eluída com misturas de hexano e AcOEt em proporções crescentes de polaridade. Foram coletados um total de 90 subfrações com volume médio de 10 mL cada. O material da subfração 29-30, resultou no isolamento da substância codificada de **MfCH-2** (0,010g) (p.f. 164-167 °C).

Os materiais das frações **1** (0,145 g), **2** (0,132 g), **5** (0,371 g) e **6** (1,473 g), provenientes da filtração com Hexano, Hexano- $\text{CHCl}_3$  (1:1), AcOEt; e AcOEt-MeOH (1:1), respectivamente, foram submetidas a sucessivas cromatografias em coluna de gel de sílica e eluída com misturas de hexano,  $\text{CHCl}_3$ , AcOEt e MeOH em gradiente crescente de polaridade. Estas frações, após inúmeras tentativas de purificação, não conduziram ao isolamento de substâncias com grau de pureza adequado para obtenção dos dados espectrais.

#### ❖ Fração em $\text{CHCl}_3$

O material da fração em  $\text{CHCl}_3$  do caule (12,005 g) foi submetida a filtração em gel de sílica, utilizando-se misturas de solventes em proporções crescente de polaridade [Hexano- $\text{CHCl}_3$  (1:1; **1**);  $\text{CHCl}_3$ , (**2**);  $\text{CHCl}_3$ -AcOEt (1:1; **3**); AcOEt (**4**); AcOEt-MeOH (1:1; **5**) e MeOH (**6**)]. As frações resultantes (**1-6**) foram analisadas através de CCD, utilizando diferentes sistemas eluentes e revelações com luz ultravioleta (254 e 366 nm) e vapores de iodo. A análise comparativa sugeriu que todas as frações (**1-6**) possuíam componentes químicos diferentes (**Figura 16**).

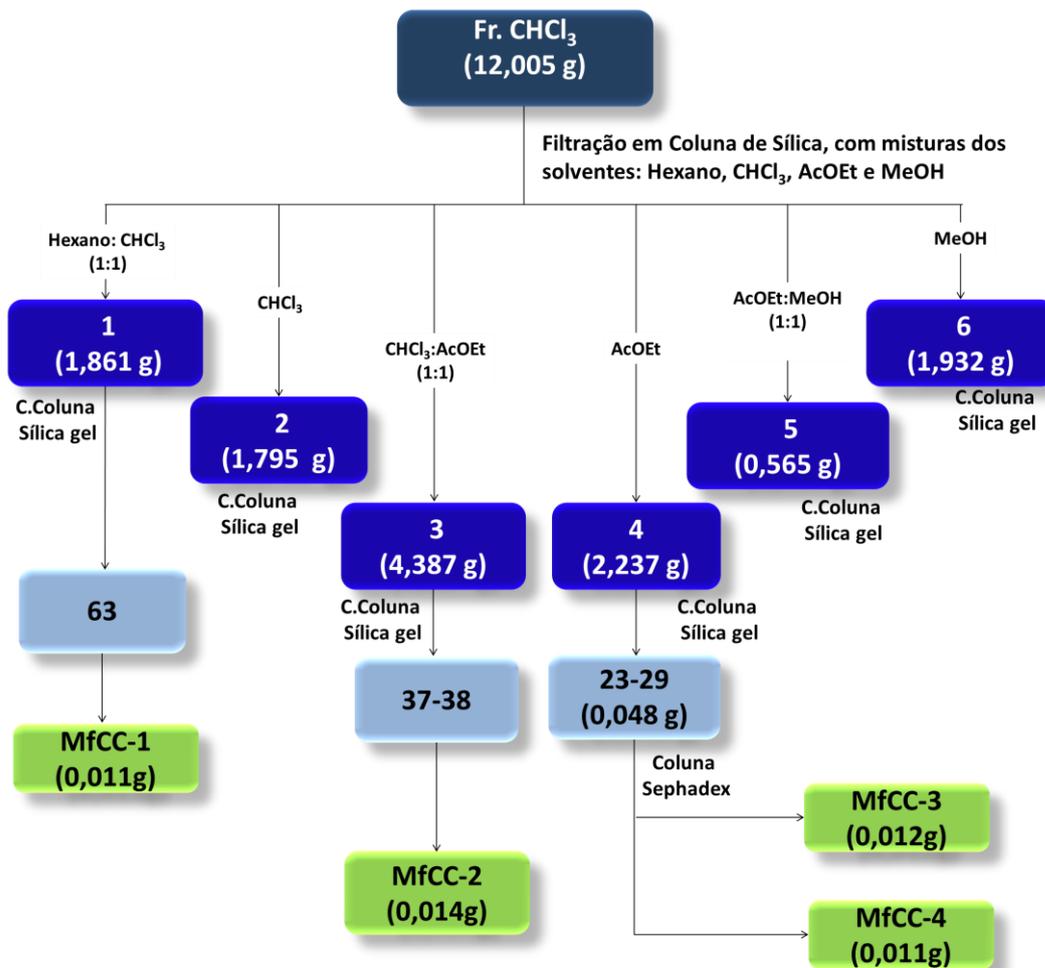
Os materiais das frações **1** (1,861 g) e **3** (4,387g), oriundas da filtração com eluente Hexano- $\text{CHCl}_3$  (1:1) e  $\text{CHCl}_3$ -AcOEt (1:1), foram fracionadas em gel de sílica utilizando misturas de Hexano-AcOEt em gradiente crescente de polaridade. Foi coletado um total de 92 e 90 subfrações, respectivamente, com volume médio de 10 mL cada. Estes procedimentos resultaram na purificação direta de materiais de p.f. 226-228 °C e 224-226 °C que foram codificados de **MfCC-1** (0,011 g) e **MfCC-2** (0,014 g) respectivamente.

O material da fração **4** (2,237 g), oriunda da filtração com AcOEt, após fracionamento cromatográfico em gel de sílica, utilizando misturas de  $\text{CHCl}_3$  e AcOEt

em proporções crescente de polaridade e Sephadex LH-20 com MeOH resultou no isolamento das substâncias codificadas de **MfCC-3** (0,012 g) e **MfCC-4** (0,011 g), sendo que esta último se tratava de quantidade adicional de **MfCC-1**.

Os materiais das frações **2** (1,795 g), **5** (0,565 g) e **6** (1,932 g), oriundas da filtração com  $\text{CHCl}_3$ , AcOEt-MeOH (1:1) e MeOH foram submetidas a cromatografia em coluna de gel de sílica usando como eluentes misturas de Hexano,  $\text{CHCl}_3$ , AcOEt e MeOH em gradiente crescente de polaridade. Após inúmeras tentativas de purificação, estas frações não conduziram ao isolamento de substâncias com grau de pureza satisfatório para obtenção dos dados de RMN.

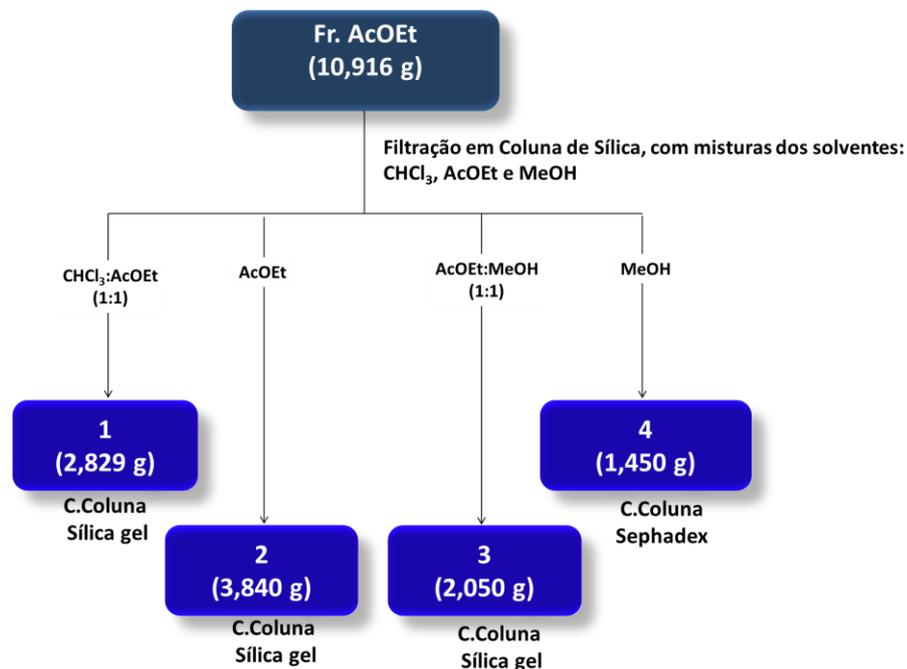
**Figura 16 – Fluxograma do procedimento experimental efetuado com a fração em  $\text{CHCl}_3$  do Caule**



### ❖ Fração em AcOEt

O material da fração em AcOEt do caule (10,916 g) foi submetido a filtração em gel de sílica utilizando eluentes misturas de  $\text{CHCl}_3$ -AcOEt (1:1; 1), AcOEt (2), AcOEt-MeOH (1:1; 3) e MeOH (4) (**Figura 17**). As frações resultantes (1-4) foram submetidas à análise através de CCD, utilizando-se diferentes sistemas eluentes, revelações com luz ultravioleta (254 e 366 nm) e vapores de iodo. Os materiais destas subfrações (1-4), insolúveis em MeOH, foram submetidas a sucessivos fracionamentos cromatográficos em gel de sílica 60 (70-230 mesh) e/ou a Sephadex LH-20. Após inúmeras tentativas de purificação não resultou no isolamento de componentes com grau de pureza satisfatório e/ou quantidade adequada para obtenção de dados espectrais.

**Figura 17 – Fluxograma do procedimento experimental efetuado com a fração em AcOEt do Caule**



## 4.5. Avaliação do Potencial Biológico de Extratos, Frações e Compostos Isolados

### 4.5.1. Avaliação da Atividade Antibacteriana de Extratos, Frações e Compostos Isolados

Os ensaios para avaliação da atividade antimicrobiana foram realizados em colaboração com a *Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Lysete de Assis Bastos*, do Laboratório de Pesquisa e Tratamento de Feridas, da Escola de Enfermagem e Farmácia (ESENFAR) da Universidade Federal de Alagoas.

#### ❖ *Microrganismos, Condições de Cultivo e Preparo do Inóculo*

Cepas de bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212) e Gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, e *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048) foram avaliadas. Todas as cepas usadas foram padronizadas e distribuídas pela American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) e cultivadas no meio Agar Mueller Hinton (AMH) a 35°C, distribuído pela CEFAR Diagnostics Ltda., São Paulo. As cepas bacterianas foram cultivadas em meio Caldo Müeller Hinton (CMH) (Difco Laboratories, Detroit, MI) e a cultura incubada por 24 horas a 35°C. Após este período, foram semeadas com auxílio de uma alça sobre a superfície de placas de Petri contendo meio Agar Müller Hinton (AMH) e reincubadas nas mesmas condições, para o ajuste da turbidez da cultura em solução salina estéril a 0,9% (9 g/L de cloreto de sódio) (diluição 1:1000) de acordo com Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012a).

Para a padronização da densidade do inóculo, foi utilizado o controle de turbidez óptica de bário (BaSO<sub>4</sub>), equivalente a uma solução da escala padrão de turvação de McFarland. Ao final, os inóculos foram padronizados em solução salina estéril para uma concentração de 1,5 x 10<sup>8</sup> UFC/mL de bactérias, de acordo com a turbidez do tubo 0,5 da escala de McFarland, sendo o inóculo final necessário de aproximadamente 10<sup>6</sup> UFC/mL para bactérias (CLSI, 2012a).

### ❖ Preparo de Meios de Cultivos e Soluções Utilizadas nos Ensaio

- **Ágar Mueller-Hinton** (AMH, HIMEDIA<sup>®</sup>): Meio sólido recomendado para a determinação de susceptibilidade de microrganismos para agentes antimicrobianos, que apresenta boa reprodutibilidade e suporta o crescimento da maioria dos microrganismos. Foi utilizado no cultivo das bactérias. Segundo o fabricante, este meio é composto por (g/L): infusão de carne bovina (300,0), Caseína ácida hidrolizada (17,5), amido (1,5) e Ágar (17,0). O meio foi preparado diluindo-se 38,0 g do pó em um litro de água destilada, sob agitação manual com auxílio de um bastão de vidro. Após completa dissolução, a solução foi esterilizada em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Em seguida, aproximadamente 25 mL do meio, ainda quente (temperatura em torno de 35 °C) e homogeneizado, foi distribuído em placas de Petri (9 cm de diâmetro). O pH final foi de  $7,3 \pm 0,2$  a 25°C.

- **Salina Tamponada**: Utilizada para diluir o inóculo visando obter o equivalente a  $1,5 \times 10^8$  Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/mL. Esta solução foi preparada utilizando os sais: cloreto de sódio (5,61 g), cloreto de potássio (0,11 g), fosfato de potássio monobásico (1,0 g) e fosfato dibásico de sódio (2,0 g). Sob agitação manual, auxílio de um bastão de vidro, todos os componentes foram dissolvidos em água destilada (1 L). Após completa dissolução, a solução foi transferida para um erlenmeyer, o qual foi vedado com rolha de algodão com gaze protegida com papel alumínio. Após esterilização em autoclave a 121°C durante 15 minutos e ajuste do pH ( $7,4 \pm 0,2$  a 25 °C), armazenou-se em refrigerador a uma temperatura de 2-8 °C, até o momento do uso. Posteriormente, a cada bateria de testes a solução foi redistribuída em erlenmeyer de 50 mL e, novamente esterilizada, para receber os inóculos ativos. A turbidez desta suspensão foi comparada com a turbidez do tubo 5 da Escala de MacFarland ( $1,5 \times 10^6$  UFC/mL), obtendo-se assim, a suspensão microbiana para semeadura das placas testes (BASTOS, 2011).

- **Solução de Sulfato de Bário da Escala de MacFarland** - Foram utilizadas soluções padrão de turbidez de sulfato de bário, denominada Escala de McFarland (**Figura 18**). Esta escala é utilizada para padronização da densidade do inóculo dos microrganismos para testes *in vitro*, e ajuste do número de UFC/mL. A escala foi preparada adicionando-se em 10 tubos de ensaio, sequencialmente, quantidades

crecentes de solução de cloreto de bário a 1% (0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1,0 mL). Em seguida, a cada tubo foi adicionado quantidade suficiente de ácido sulfúrico a 1% para completar 10 mL.

**Figura 18 – Escala de Mcfarland.**



Fonte: Autora desta tese, 2016

#### ❖ Ensaio Antibacteriano pelo Método de Difusão em Agar

Os extratos brutos e suas respectivas frações de partição foram inicialmente avaliados pelo método de difusão em Agar ou de perfuração em Agar (remoção do meio de cultura sólido com auxílio de cilindros de 7 mm de diâmetro para a formação de poços) conforme descrito por Karaman e cols. (2003) e Ostrosky e cols. (2008).

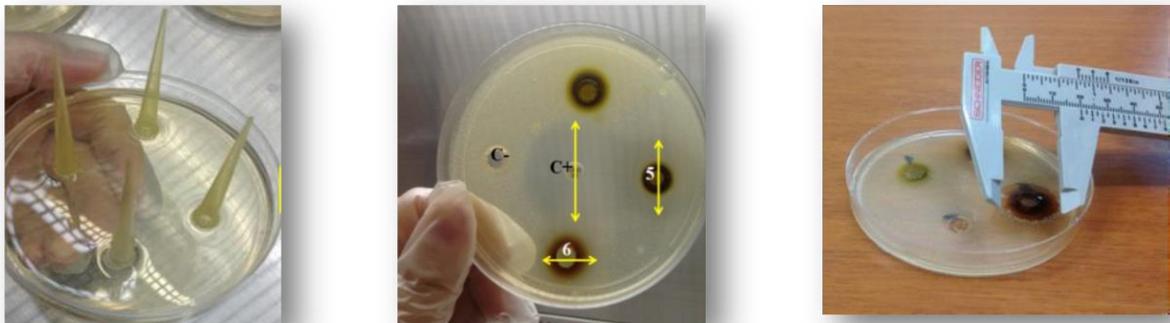
Para confecção das cavidades em cada placa de Petri, bases de ponteiros de 7 mm de diâmetro, de forma invertida, sobre uma fina camada de AMH foram utilizadas. Em seguida, verteu-se uma solução contendo 1 mL da suspensão microbiana e 20 mL de AMH, resfriado a 45-50 °C, nas placas de Petri, ainda com as ponteiros invertidas para a formação das cavidades (**Figura 19**). Após a solidificação do meio, as ponteiros foram retiradas e 50 µL dos extratos em DMSO a 10% ou em Cremophor® (Sigma-Aldrich) a 10% e q.s.p. de solução salina estéril, obtendo-se uma solução com concentração final de 100 mg/mL foram depositados em cada cavidade (AYRES et al., 2008; KARAMAN et al., 2003).

Com objetivo de avaliar a sensibilidade das cepas frente à ação dos solventes e controles negativos foram utilizados 50 µL de DMSO a 10% ou de Cremophor® a

10%. Discos de antibióticos de ceftriaxona (CRO, 30  $\mu$ g) e ciprofloxacina (CIP, 5  $\mu$ g), selecionados de acordo com o grupo de agentes antibacterianos sugeridos pelo FDA Clinical Indications por meio dos Laboratórios de Microbiologia Clínica dos Estados Unidos (CLSI, 2012b), foram utilizados como controles positivos. Os resultados foram expressos em termos da média do diâmetro da zona de inibição (DZI: < 9 mm, inativo; 9-14 mm, parcialmente ativo; 14-17 mm, ativo; > 17 mm, muito ativo (AYRES *et al.*, 2008). As amostras que apresentaram resultados promissores (DZI > 9 mm ou parcialmente ativo) frente a qualquer microrganismo pelo método de difusão em Agar foram submetidos ao teste de microdiluição em caldo.

O sistema foi incubado em estufa a 35 °C por 24 h para as bactérias (CLSI, 2012a). Após o término do período de incubação, foram medidos os halos de inibição de crescimento com auxílio de um paquímetro (**Figura 19**).

**Figura 19 – Preparo das cavidades nas placas de Petri e Medição de halos de inibição de crescimento com um paquímetro.**



Fonte: Autora desta tese, 2016.

#### ❖ **Ensaio Antibacteriano pela Técnica de Microdiluição em Caldo - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)**

Os ensaios antibacterianos utilizando a técnica de microdiluição em caldo envolve o uso de pequenos volumes de caldo colocados em placas de plástico estéreis, próprias para microdiluição, que possuem poços de fundo redondo ou cônico. Para tanto, os extratos, frações que apresentaram resultados promissores nos ensaios utilizando a técnica de difusão em Agar foram submetidos ao teste de

microdiluição em caldo para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de acordo com a metodologia descrita por Ayres e cols. (2008) e as normas padrão do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012a).

Foi preparado um volume de 200  $\mu\text{L}$  dos extratos, frações e compostos isolados a serem testadas, na concentração de 2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , empregando-se DMSO a 10%. Os inóculos foram padronizados em solução salina estéril e a suspensão bacteriana McFarland 0,5 ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL) foi diluída 1:10 para se conseguir uma diluição  $10^7$  UFC/mL. Ao inocular 5  $\mu\text{L}$  dessa suspensão no caldo a concentração final de bactérias é de  $5 \times 10^5$  UFC/mL (ou  $5 \times 10^4$  UFC/poço).

O ensaio foi realizado em microplacas estéreis contendo 96 poços de 330  $\mu\text{L}$  (**Figura 20**). Os orifícios da placa foram preenchidos com 100  $\mu\text{L}$  de Caldo Müller Hinton (CMH) duas vezes concentrado. Em seguida, uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  das amostras foi adicionada na linha A da coluna de 1-9. As colunas 10-12 foram destinadas aos controles positivo, negativo e de esterilidade. O conteúdo de cada orifício da linha A foi transferido para os orifícios da linha B, e após homogeneização, o mesmo volume foi transferido para a linha C, repetindo-se este procedimento até a linha H, e desprezando-se após homogeneização o excesso da diluição, obtendo-se assim concentrações decrescentes dos extratos a partir de 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (linha A); 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (linha B); 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (linha C), e assim por diante. Um volume de 5  $\mu\text{L}$  ( $5 \times 10^4$  UFC/poço) dos inóculos bacterianos diluídos, foram depositados em cada um dos orifícios das linhas A-H e colunas de 1-9.

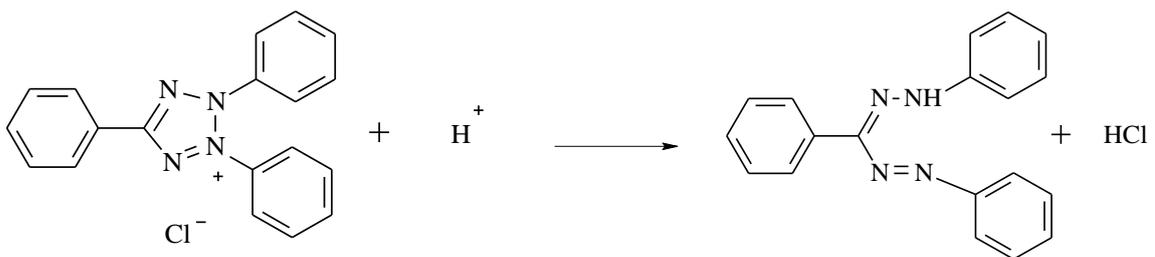
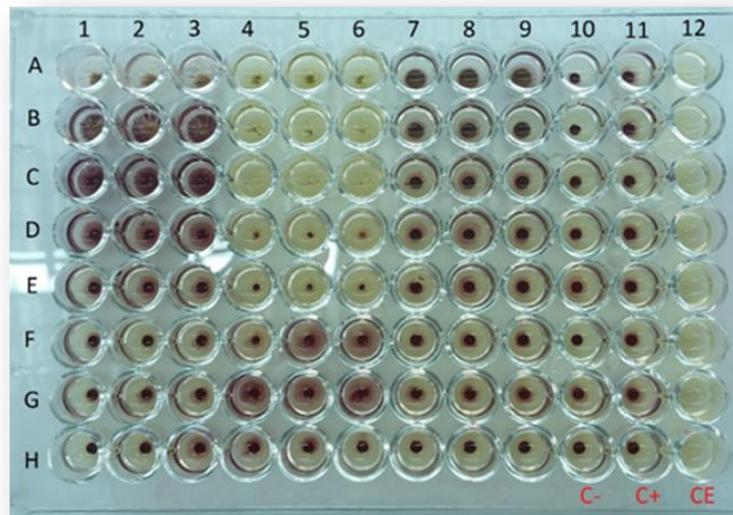
Os orifícios das colunas 10 (foram reservados para o controle negativo da atividade inibitória do diluente DMSO a 10%) e 11 (caldo CMH e o inóculo microbiano, permitindo o controle positivo da viabilidade microbiana) e 12 (apenas o caldo para verificação da esterilidade da placa) foram destinados para os controles do experimento.

As microplacas foram seladas com tampas de plástico e incubadas a  $35^\circ\text{C}$  durante 18 h. Após este tempo, foram acrescentados a cada um dos orifícios 20  $\mu\text{L}$  de uma solução aquosa de cloreto de trifeniltetrazólio a 0,5% (CTT), corante que promove a coloração das colônias sem comprometer sua viabilidade. As microplacas foram novamente re-incubadas por mais 3 h a  $35^\circ\text{C}$ . Após este tempo, a presença de

coloração vermelha nos orifícios foi interpretada como prova negativa do efeito inibitório do extrato, enquanto a ausência da coloração vermelha foi considerada prova positiva da ação inibitória sobre os microrganismos testados (**Figura 20**).

O teste foi considerado válido na constatação de crescimento microbiano nos poços destinados ao controle positivo e a CIM foi definida como a menor concentração do extrato em  $\mu\text{g/mL}$  capaz de inibir completamente o crescimento microbiano nos poços de microdiluição conforme detectado a olho nu, ou seja, o aparecimento da coloração vermelha. Os valores de CIM foram determinados como as menores concentrações capazes de inibirem o crescimento dos microrganismos e o grau de atividade foi determinado de acordo com os seguintes critérios: CIM < 100  $\mu\text{g/mL}$ : boa atividade; de 100 a 500  $\mu\text{g/mL}$ : moderada atividade; de 500 a 1000  $\mu\text{g/mL}$ : fraca atividade; e CIM  $\geq$  1000  $\mu\text{g/mL}$ : inativo (HOLETZ et al., 2002).

**Figura 20 – Microplaca utilizada nos ensaios para determinação da CIM e reação de redução do CTT.**



Fonte: Autora desta tese, 2016

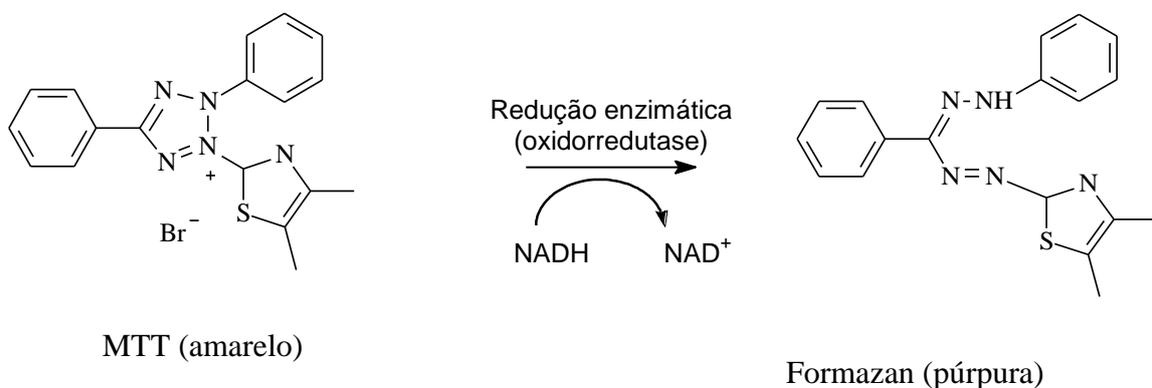
#### 4.5.2. Avaliação da Viabilidade de Células Fibroblastos (3T3) e de Macrófagos (J774) e dos Efeitos de Migração Horizontal e Inibição de Espécies Reativas de Oxigênio (EROS) *in vitro* de Extratos e Compostos Isolados

Os ensaios para avaliação da viabilidade celular, migração horizontal e de inibição das EROS foram realizados em colaboração com o *Prof. Dr. Emiliano Oliveira Barreto*, do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Instituto de Ciências Biológicas (ICBS) da Universidade Federal de Alagoas.

##### 4.5.2.1. Viabilidade Celular

Foram avaliados extratos e frações das folhas e do caule, bem como compostos isolados **MfFC-4** (*Lupeol* e *3 $\beta$ -Betulinaldeído*), **MfFH-2** (*Ác. hexametil-coruoloelágico*) e *3 $\beta$ -Betulinaldeído* [isolado pelo nosso grupo de *Swartia apetala* (Leguminosae), sobre a viabilidade de células fibroblasto (3T3) e de macrófagos (J774) usando o método do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT), de acordo com a metodologia descrita por Mosmann (1983). É um método colorimétrico rápido, considerado sensível e barato, cuja análise se baseia na conversão do sal de MTT em azul de formazan (**Figura 21**).

**Figura 21 – Reação de redução do MTT**



Fonte: RIBEIRO, et al., 2013.

As células de fibroblastos ou de macrófagos ( $1,2 \times 10^5$  células/poço) foram cultivadas durante 24 h em placas de 96 poços contendo meio de RPMI-1640,

suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de L-glutamina e 40 µg/mL gentamicina, mantidas em estufa a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, os extratos foram testados em concentrações que variaram de 15,625 a 500 µg/mL enquanto que os compostos **MfFC-4** (*Lupeol e 3β-Betulinaldeído*) **MfFH-2** (*Ác. Hexametilcoruololágico*) e *3β-Betulinaldeído*) nas concentrações de 15,625, 32,25 ou 62,5 µg/mL, durante 24 h. Após a incubação, o meio de cultivo foi substituído por RPMI fresco contendo 5 mg/mL de MTT (sal de tetrazolium), e as placas foram incubadas por 3 h. Após 15 min. De incubação a 37°C, foram adicionados 150 µL/poço de DMSO e realizada a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm. MTT foi preparado na concentração de 5 mg/mL e 10 µL desta solução foi adicionado em cada poço e incubado durante 24 h. A viabilidade celular foi expressa em percentagem relativa à absorbância as células do grupo controle determinada a 540 nm em um multileitor de placas ELISA de acordo com Webler e cols. (2015). Para cada amostra, quatro poços foram utilizados por tratamento, em dois experimentos independentes, e a atividade redutora do MTT foi determinada em percentagem relativa à absorbância determinada nas células controle. Os dados foram analisados segundo a média ± desvio-padrão da média da porcentagem de inibição do crescimento celular, usando o programa GraphPad Prism® software, version 5.0 (San Diego, CA, USA).

$$\left[ \frac{\text{Abs. das células tratadas}}{\text{Abs. das células não tratadas}} \times 100 \right]$$

#### 4.5.2.2 Ensaios *In Vitro* de Cicatrização de Feridas de Compostos Isolados

A capacidade de espalhamento e migração celular de fibroblastos (3T3) de alguns dos compostos isolados foi avaliada usando o método de cicatrização de risco *in vitro* de acordo com Fronza e cols. (2009). As células foram cultivadas em placas contendo 24 poços contendo lamelas pré-revestidas com colágeno tipo I (40 µg/mL), durante 2 h a 37°C, a uma concentração de 3×10<sup>5</sup> células/mL e cultivadas em meio DMEM (do inglês Dulbecco's modified Eagle Medium) contendo 10% soro fetal bovino (FBS – Fetal bovine serum) para formar monocamadas de células quase confluentes. A seguir, um risco linear foi gerado na monocamada com uma pipeta plástica estéril de 100 µL e todos os detritos celulares foram removidos pela lavagem das lamelas

com tampão fosfato salina (PBS; do inglês phosphate buffered saline). O meio DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium) contendo DMSO (0,25%) (grupo controle), os fibroblastos foram estimulados com um fator de crescimento (PDGF; do inglês platelet derived growth factor; 2 ng/mL), como controle positivo. Os compostos isolados [**MfFC-4** (*Lupeol* e *3 $\beta$ -Betulinaldeído*), **MfFH-2** (*Ác. Hexametilcoruolo-elágico*) e *3 $\beta$ -Betulinaldeído*] foram adicionados (15,625, 31,25 e 62,5  $\mu$ g/mL) a um conjunto de lamelas de três por dose e incubados durante 24 h a 37°C e umidificada com atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>. As células foram fixadas com paraformaldeído a 4% durante 15 min e coradas com 4',6-diamino-2-fenilindol, durante 24 h. Os experimentos foram realizados em duplicatas e três imagens de cada área riscada foram fotografadas para estimar as migrações relativas das células.

#### ❖ **Análise estatística**

Os dados foram analisados segundo a média  $\pm$  desvio-padrão da média da porcentagem de inibição do crescimento celular, usando o programa GraphPad Prism® software, version 5.0 (San Diego, CA, USA). Comparações entre os grupos testes foram efetuadas por ANOVA seguido pelo teste de Tukey. Valores de *P* menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes. Os experimentos foram realizados em triplicata.

#### **4.5.2.3. Medida da Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) em Macrófagos – Efeito Antioxidante**

A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) foi medida usando o reagente nitroazul de tetrazólio (NBT – em inglês, Nitroblue Tetrazolium), conforme descrito por Cruz e cols. (1997). Os macrófagos ( $1,2 \times 10^5$  células/poço) foram incubados em placas contendo 96 poços com 200  $\mu$ L de meio de cultura (RPMI-1640, do inglês Roswell Park Memorial Institute, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% L-glutamina e 40  $\mu$ g/mL gentamicina) a 37°C em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>, durante 24 h. Em seguida, as células foram tratadas com os compostos **MfFC-4** (*Lupeol* e *3 $\beta$ -Betulinaldeído*), **MfFH-2** (*Ác. Hexametilcoruoloelágico*) e *3 $\beta$ -Betulinaldeído* em concentrações que variaram entre 15,625 ou 32,25  $\mu$ g/mL durante 24 h e/ou lipopolossacarídeo bacteriano (LPS; 500 ng/mL) em meio de cultura livre de

soro, durante 24 h. Após tratamento, foram adicionados 200 µL as células da solução do reagente nitroazul de tetrazólio (NBT; do inglês Nitroblue tetrazolium; 1 mg/mL) durante 1 h. O grupo controle recebeu somente 200 µL de soro fetal bovino (FBS; em inglês Fetal Bovine Serum). Após 1 h, o sobrenadante foi descartado e 200 µL de solução de KOH + DMSO foi adicionada durante 10 min. A absorbância do NBT foi medida espectrofotometricamente a 630 nm. Quatro poços individuais foram utilizados por tratamento e a redução da atividade do NBT foi determinada como percentagem da produção de EROs.

#### 4.5.3. Atividade Larvicida

Os extratos brutos das folhas e do caule, bem como as frações oriundas de partição destes extratos, foram submetidos a ensaios frente larvas do quarto estágio do mosquito *A. aegypti*. Os ensaios foram realizados no insetário do Laboratório de Pesquisa em Química dos Produtos Naturais (LPqPN) do IQB/UFAL, de acordo com as recomendações da Organização Mundial de Saúde (WHO, 1981), com algumas modificações.

#### ❖ **Criação e manutenção das larvas e insetos adultos**

Larvas do 4º estágio de mosquitos *A. aegypti* foram obtidas a partir de ovos depositados em papéis de filtro por fêmeas adultas criadas e mantidas no insetário (**Figura 22**). Os insetos foram mantidos a uma temperatura média de  $27,1 \pm 4,0^\circ\text{C}$ , umidade relativa do ar de  $69,9 \pm 7,8\%$  e fotoperíodo de aproximadamente de 12 horas. Ovos coletados três dias após o repasto sanguíneo foram colocados em bacias plásticas contendo água destilada para ocorrer à eclosão das larvas e seu desenvolvimento nos diferentes estádios (1º, 2º, 3º e 4º). Após eclosão, as larvas foram alimentadas com ração para gatos autoclavada e mantidas em bacias até o desenvolvimento das pupas. A seguir, com auxílio de pipetas plásticas, as pupas foram manualmente separadas das larvas, acondicionadas em copos descartáveis e colocadas em gaiolas teladas para posterior emergência dos insetos adultos (**Figura 22**). Estes foram alimentados com solução de glicose anidra a 10%, em chumaços de algodão trocados diariamente. O repasto sanguíneo para as fêmeas, visando à

maturação dos ovos, foi realizado utilizando pombos da espécie *Columbia livia* ou *Streptopelia decaocto* (Burguesa).

**Figura 22 – Materiais de uso nos ensaios e fases evolutivas do mosquito *A. aegypti*.**



**Gaiola para criação**



**Bacias com larvas**



**Copo com pupas**



**Ovos**



**Pupas e larvas**



**Mosquito adulto**

Fonte: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/kid dengue/epidemiologia/>; Acessado em 24/07/2016.

#### ❖ **Ensaio para Avaliação da Atividade Larvicida**

Os ensaios preliminares com extratos e frações foram realizados em triplicata na concentração de 250 µg/mL. Para tanto, cada amostra (75 mg) foi dissolvida em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) e diluída em água destilada para um volume de 300 mL. Para o controle negativo utilizou-se uma solução aquosa de DMSO a 0,33 % e para o controle positivo uma solução de **temefós** reformulado a 1% na concentração de 3 µg/mL. As soluções foram distribuídas em copos descartáveis (três para cada amostra), onde foram adicionados em todos os copos grupos de quinze larvas jovens (cabeça esbranquiçada) do 4º estágio que foram mantidas sob as mesmas condições do teste. A cada recipiente contendo larvas adicionou-se 1/3 de um grão de ração, para eliminar qualquer dúvida quanto à eventual mortalidade de larvas por ausência de alimento. A exposição das larvas as soluções testes e dos controles ocorreu

durante 48 horas, sendo a leitura do ensaio realizada a cada 24 horas a partir do início do teste.

De acordo com o percentual de mortalidade das larvas observado, as amostras foram classificadas como: promissoras (mortalidade superior a 75%), parcialmente promissoras (mortalidade  $\geq 50$  e  $\leq 75\%$ ), fracamente promissoras (mortalidade  $\geq 25$  e  $\leq 50\%$ ) e inativas (mortalidade inferior a 25%).

As amostras com resultados promissores e parcialmente promissores nestes ensaios preliminares (250  $\mu\text{g/mL}$ ) foram testadas em concentrações menores (200, 150, 100, 50 e 25  $\mu\text{g/mL}$ ) com o fim de obter a concentração letal (CL) capaz de matar 50% das larvas ( $\text{CL}_{50}$ ). Posteriormente, os resultados obtidos em cada concentração foram analisados pelo método de Próbitos de análise (FINNEY, 1972) para determinação da  $\text{CL}_{50}$  e do intervalo de confiança de 95% ( $\text{IC}_{95}$ ).

#### **4.5.4. Avaliação Qualitativa da Atividade Anticolinesterásica de extratos e Compostos Isolados**

As frações que apresentaram resultados promissores e parcialmente promissores nos ensaios larvicidas na concentração de 250  $\mu\text{g/mL}$  [Frs. em hexano das folhas e caule e em AcOEt do caule e alguns dos compostos isolados (**MfFC-4** (*Lupeol* e *3 $\beta$ -Betulinaldeído*), **MfFH-2** (*Ácido hexametilcoruluoelágico*), (**MfFH-1** (*Lupeol*), (**MfFC-3** (*Ácido betulínico*), *Ácido flavoelágico*)] foram submetidos a ensaios anticolinesterásicos. Estes foram efetuados no Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará em colaboração com a *Profa. Dr<sup>a</sup>. Maria Teresa Salles Trevisan*.

#### **❖ Soluções utilizadas nos ensaios anticolinesterásicos**

**a) Solução Tampão 50 mmol de Tris/HCl (pH 8,0)** - Foram dissolvidos 6,057 g de hidrocloreto de tris-(hidroximetil)-aminometano em aproximadamente 700 mL de água destilada. A esta solução adicionou-se 3 mL de HCl concentrado até pH 8 e o volume foi completado com água destilada até 1000 mL.

- b) **Solução Tampão a 50 mmol/L de Tris/HCl** (pH 8,0), contendo 0,1% de albumina sérica bovina (**BSA**). A 250 mL da solução (**a**) adicionou-se 250 mg de BSA.
- c) **Solução 1 mmol/L do Ácido 5,5'-Ditiobis-(2-nitrobenzóico)** (DTNB ou Reagente de Ellman). Foram dissolvidos 19,818 mg em 50 mL da solução tampão (**a**).
- d) **Solução 1 mmol/L de Iodeto de acetilcolina** (ATCI – do inglês acetylcholine iodate, Substrato) - Foram dissolvidos 14,459 mg em 50 mL de água destilada milipore.
- e) **Solução 100 U/mL de acetilcolinesterase** (AchE - Solução Estoque) - Dissolveu-se a enzima AchE liofilizada na solução tampão (**a**) e a deixou em repouso durante 20 minutos. Após tempo, a solução foi agitada durante 10-15 min. para obtenção de uma solução homogênea. Para as diluições posteriores utilizou-se a solução tampão (**b**). Diluiu-se a solução estoque de até obter a concentração de 18 U/mL para utilizar nas placas.

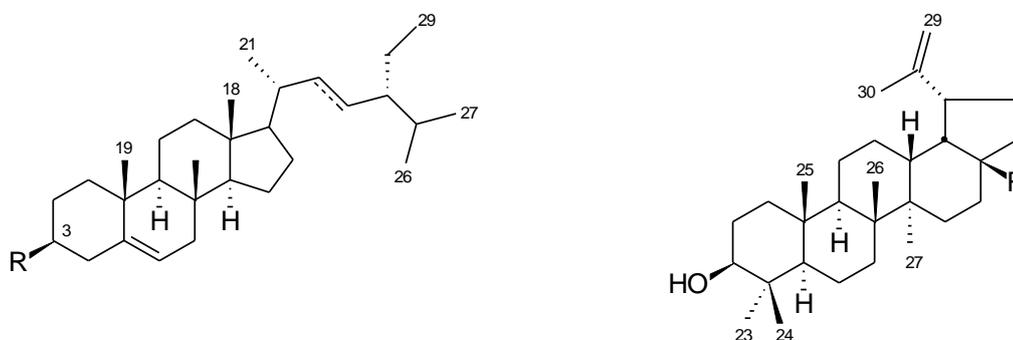
É considerado um método colorimétrico rápido e sensível para a seleção de amostras que atuam inibindo a ação da enzima AchE. O método pode ser útil tanto para análise qualitativa quanto quantitativa, mas neste trabalho foi utilizado somente qualitativamente. A técnica foi baseada no ensaio enzimático descrito por Ellman (1961) e modificado para cromatografia em camada delgada por Rhee e cols. (2001). A metodologia consiste em aplicar 5 µL das soluções de extratos, frações (10 mg/mL) e compostos isolados (2 mg/mL) em uma cromatoplaça (DC-Alufolien, Silicagel 60 F254, 0,2 mm Merck) que após a evaporação do solvente pulverizou-se o substrato (ATCI, 1 mM em tampão **d**) e o reagente de Ellman (DTNB, 1 mM em tampão **c**). Após completa secagem das amostras borrifou-se uma mistura na proporção de 1:1 da enzima AchE (dissolvida na solução tampão **e**) a uma concentração de 18 U/mL. Após 10 minutos, observou-se o aparecimento de halos esbranquiçados (20-30 min a coloração desaparece) em torno dos pontos de aplicação das amostras sugerindo que ocorreu inibição da enzima AchE, responsável pela hidrólise do substrato. Foi feita uma análise comparativa dos halos brancos das amostras com o sal de eserina (2 mg/mL) como indicativo de atividade anticolinesterásica e como controle negativo utilizou-se o solvente utilizado na dissolução das amostras (metanol).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Estudo fitoquímico

O estudo fitoquímico efetuado com alguns dos extratos das folhas e do caule que apresentaram resultados promissores nos ensaios biológicos efetuados resultou no isolamento de nove compostos que foram codificados de acordo com o nome da espécie [*M. ferruginea* (**Mf**)], parte da planta (**F** = folhas e **C** = caule) e frações das quais foram isolados (**A** = Acetato de etila, **C** = clorofórmio e **H** = hexano). Esses compostos tiveram suas estruturas identificadas (**Figura 23**) com base na análise dos dados obtidos dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , incluindo experimento DEPT 135 ou DEPTQ, HMBC e HSQC bem como comparação com dados dos compostos correspondentes descritos na literatura.

**Figura 23 – Estruturas dos compostos isolados e identificados.**



**MfCH-1a** R = OH,  $\Delta^{22}$  diidro

**MfCH-1b** R = OH,  $\Delta^{22}$

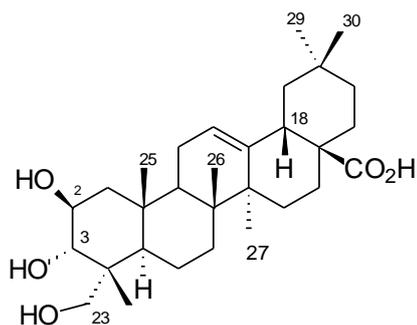
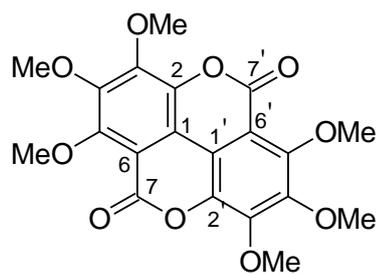
**MfCH-2** R = OGlc,  $\Delta^{22}$  diidro

**MfFC-1 = MfFH-1** R = Me

**MfFC-4** R = CHO

**MfFC-2 = MfCC-1** R = CO<sub>2</sub>H

**MfCC-2** R = CH<sub>2</sub>OH

**MfCC-3****MfFH-2**

### 5.1.1. Identificação Estrutural das Substâncias Isoladas

Algumas das frações oriundas da partição de extratos das folhas e do caule, com resultados positivos nos ensaios biológicos efetuados, após sucessivos fracionamentos cromatográficos em gel de sílica e Sephadex LH-20 conduziram ao isolamento de três fitoesteróides identificados como sendo  $\beta$ -sitosterol (**MfCH-1a**), estigmasterol (**MfCH-1b**) e 3-O- $\beta$ -D-glicopiranosilsterol (**MfCH-2**), quatro triterpenos pentacíclicos da série lupano identificados como *lupeol* (**MfFC-1/MfFH-1**), *betulinaldeído* (**MfFC-4**), *betulinol* (**MfCC-2**) e *ácido betulínico* (**MfFC-2/MfCC-1**) e um da série oleanano, identificado como sendo o *ácido 2 $\beta$ ,3 $\alpha$ ,23-trihidroxi-olean-12-en-28-óico* (**MfCC-3**) e um polifenol metilado derivado do ácido elágico, o *ácido hexametilcoruleoelágico* (**MfFH-2**).

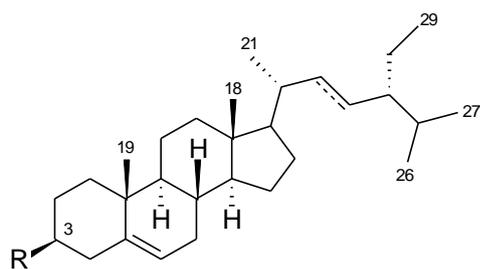
#### 5.1.1.1. Identificação Estrutural das Substâncias Codificadas de **MfCH-1a**, **MfCH-1b** e **MfCC-1**

As substâncias codificadas de **MfCH-1** e **MfCH-2** foram identificadas como sendo fitoesteróides da série estigmastano com base na análise dos dados obtidos dos respectivos espectros de RMN, bem como pela comparação com dados dos respectivos compostos descritos na literatura. A análise dos dados do espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância codificada de **MfCH-1** revelou que a mesma era constituída por uma mistura de dois componentes que foram codificados de **MfCH-1a** e **MfCH-1b**.

Os dados obtidos dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  das substâncias codificadas de **MfCH-1a** e **MfCH-1b** (Figura 24; Tabela 01) e de **MfCH-2** (Figura 25; Tabela 02) permitiram reconhecer valores de deslocamentos químicos compatíveis com a presença de hidrogênios carbinólicos [**MfCH-1a**:  $\delta$  3,54 (m, H-3); **MfCH-1b**: 3,51 (m, H-3) e **MfCH-2**:  $\delta$  3,40 (m, H-3)], hidrogênios olefínicos [**MfCH-1a**:  $\delta$  5,37 (m, H-6), **MfCH-1b**:  $\delta$  5,38 (m, H-6) e **MfCH-1b**: 5,16 e 5,03 (m, H-22 e H-23); **MfCH-2**:  $\delta$  5,34 (m, H-6)] e para vários grupos metilas ( $\delta$  0,70 a  $\delta$  1,03). Adicionalmente, foram observados no espectro de **MfCH-2** sinais condizentes com a presença de uma unidade glicopiranosídica (Tabela 02). Estes dados permitiram sugerir para os três componentes esqueletos de fitoesteróides do tipo estigmastano.

A análise conjunta dos dados obtidos dos respectivos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figuras 26; Tabelas 01 e 02) e DEPT 135 (Figura 27) ou DEPTQ (Figura 28) revelou para os três componentes valores de deslocamentos químicos compatíveis com a presença de carbonos carbinólicos [**MfCH-1a** e **MfCH-1b**:  $\delta$  71,82 (CH); **MfCH-2**:  $\delta$  79,37 (CH)], de uma ligação dupla trissubstituída [**MfCH-1a** e **MfCH-1b**:  $\delta$  140,75 (C, C-5) e  $\delta$  121,72 (CH, C-6); **MfCH-2**:  $\delta$  140,50 (C, C-5) e  $\delta$  122,37 (CH, C-6)] e de uma dissubstituída [**MfCH-1b**:  $\delta$  138,32 (CH, C-22) e  $\delta$  129,28 (CH, C-23)] (Tabelas 01 e 02), compatíveis com ligações duplas entre C-5/C-6 e C-22/C-23, respectivamente, de um núcleo estigmastano (MACARI; EMERENCIANO; FERREIRA, 1990). Estes espectros também evidenciaram a presença de uma unidade  $\beta$ -D-glicopiranosídica [ $\delta$  61,93 (CH<sub>2</sub>), 70,21, 73,73, 75,97, 76,60 (todos CH) e 101,25 (CH)].

A análise conjunta dos dados espectrais discutidos permitiu identificar **MfCH-1a**, **MfCH-1b** e **MfCH-2**, respectivamente, como sendo os fitoesteróides conhecidos como  $\beta$ -sitosterol (*estimasta-5-en-3 $\beta$ -ol*; **MfCH-1a**), estigmasterol (*5,22-estimastadien-3 $\beta$ -ol*; **MfCH-1b**) e daucosterol (*3-O- $\beta$ -D-Glicopiranosilsitosterol*; **MfCH-2**). Estas propostas estruturais foram confirmadas pela comparação dos dados de RMN  $^{13}\text{C}$  obtidos com os dos compostos correspondentes descritos na literatura (MACARI; EMERENCIANO; FERREIRA, 1990; MARQUES, 2001; KHATUN; BILLAH; QUADER, 2012).



**MfCH-1a** R = OH,  $\Delta^{22}$  diidro

**MfCH-1b** R = OH,  $\Delta^{22}$

**MfCH-2** R = OGlc,  $\Delta^{22}$  diidro

**Tabela 01** – Dados de RMN das substâncias codificadas de **MfCH-1a** e **MfCH-1b** ( $^1\text{H}$ : 400;  $^{13}\text{C}$ : 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ,  $J$  em Hz, referência interna TMS), do **Sitosterol** (MACARI; EMERENCIANO; FERREIRA, 1990) e **Estigmasterol** (MARQUES, 2001).

Posição	MfCH-1a	MfCH-1b	MfCH-1a	MfCH-1b	$\beta$ -Sitosterol	Estigmasterol
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$
<b>C</b>						
5	140,75	140,75			140,7	140,7
10	36,51	36,51			36,4	36,5
13	42,29	42,22			42,3	42,2
<b>CH</b>						
3	71,82	71,82	3,54 (m)	3,51 (m)	71,7	71,7
6	121,72	121,72	5,37 (sl)	5,38 (m)	121,6	121,6
8	31,90	31,90			31,8	31,9
9	50,14	50,14			50,1	50,1
14	56,78	56,87			56,7	56,7
17	56,08	55,96			56,1	56,0
20	36,15	40,49			36,0	40,4
24	45,85	51,24			45,8	51,2
25	29,15	31,90			29,1	31,9
<b>CH<sub>2</sub></b>						
1	37,26	37,26			37,2	37,2
2	31,66	31,66			31,6	31,6
4	42,29	39,68			42,3	39,7
7	31,90	31,66			31,8	31,6
11	21,21	21,08			21,1	21,0
12	39,77	39,68			39,7	39,7
15	24,30	24,36			24,2	24,29
16	28,25	28,92			28,1	28,2
22	33,95	<b>138,32(CH)</b>		5,16 (m)	33,9	<b>138,2(CH)</b>
23	26,08	<b>129,28(CH)</b>		5,03 (m)	26,1	<b>129,2(CH)</b>
28	23,07	25,41			23,0	25,3
<b>CH<sub>3</sub></b>						
18	11,98	11,86	0,71 (s)	0,70 (s)	11,9	11,8
19	19,39	19,03	0,80 (s)	0,80 (s)	19,3	19,0
21	18,78	21,21	1,05 (s)	1,03 (s)	18,7	21,2
26	19,81	21,21	0,94 (s)	0,93 (s)	19,6	21,2
27	18,98	18,78	0,82 (s)	0,84 (d, $J = 6,6$ )	18,9	18,7
29	12,25	12,75	0,86	0,86	11,9	12,2

**Nota:** m = multipeto; s = simpleto; d = dupleto;

**Tabela 02** – Dados de RMN da substância codificada de **MfCH-2** ( $^1\text{H}$ : 400;  $^{13}\text{C}$ : 100 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$ ,  $J$  em Hz, referência interna TMS) e do **3-O- $\beta$ -D-Glicopiranosilsitosterol** (KHATUN; BILLAH; QUADER, 2012).

Posição	MfCH-2		3-O- $\beta$ -D-Glicopiranosilsitosterol	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
<b>C</b>				
5	<b>140,50</b>		<b>139,98</b>	
10	36,83		36,27	
13	42,50		41,88	
<b>CH</b>				
3	79,37	3,40 (m)	78,61	3,13 (m)
6	<b>122,37</b>	5,34 (sl)	<b>121,54</b>	5,09 (dl)
8	32,02		31,46	
9	50,38		49,83	
14	56,93		56,36	
17	56,23		55,66	
20	36,34		35,70	
24	46,04		45,49	
25	29,29		28,74	
<b>CH<sub>2</sub></b>				
1	37,46		36,85	
2	29,84		29,12	
4	38,86		42,12	
7	32,12		31,41	
11	21,22		20,21	
12	39,91		38,20	
15	24,44		23,90	
16	28,41		27,76	
22	34,10		33,51	
23	26,18		25,64	
28	23,20		22,60	
<b>CH<sub>3</sub></b>				
18	11,99	0,66 (dl)	11,27	0,62 (s)
19	19,10	1,24 (s)	19,10	0,94 (s)
21	18,91	0,99 (s)	18,69	0,84 (d, $J = 6.3$ )
26	19,94	0,83 (dl)	18,69	0,75 (d, $J = 7.7$ )
27	19,46	0,80 (dl)	18,35	0,73 (d, $J = 1.6$ )
29	12,08	0,90 (t)	12,29	0,77 (t, $J = 6.9$ )

**Legenda:** m = multipeto; dl = dupeto largo; s = simpleto.

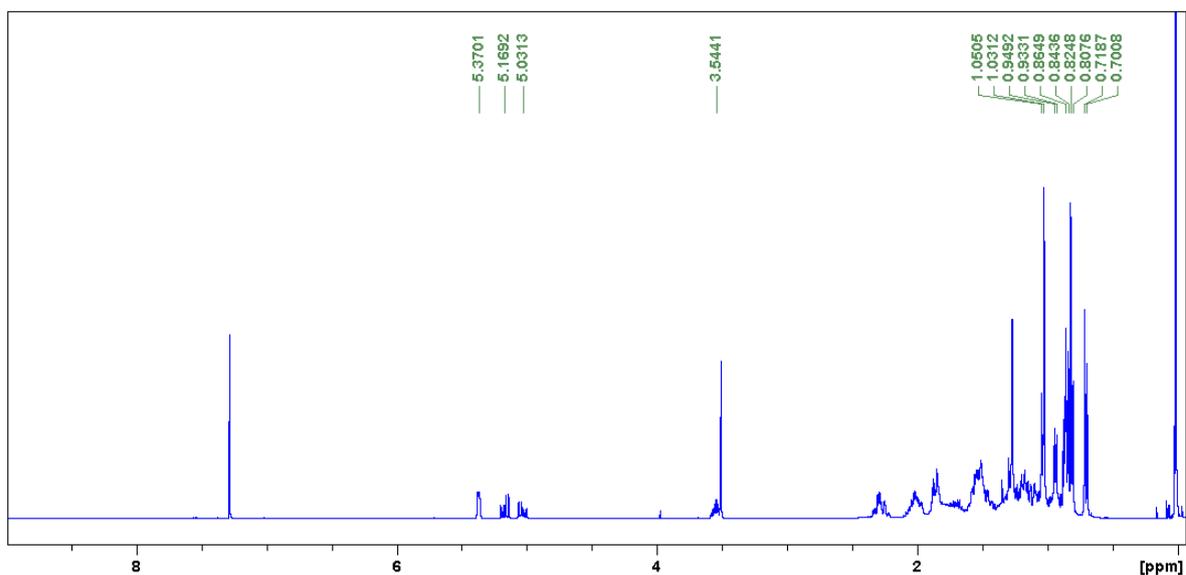
Tabela 02 (Continuação)

CH				
1'	101,25	4,38 (d, J = 7,5l)	100,74	4,11 (d, J = 7,8)
2'	73,73	3,56 (m)	73,21	3,14 (m)
3'	76,60	3,56 (m)	76,18	3,14 (m)
4'	70,21	3,56 (m)	69,90	3,14 (m)
5'	75,97	3,32 (m)	75,62	3,06 (m)
CH <sub>2</sub>				
6'	61,93		61,36	

Legenda: m = multipeto; d = dupeto.

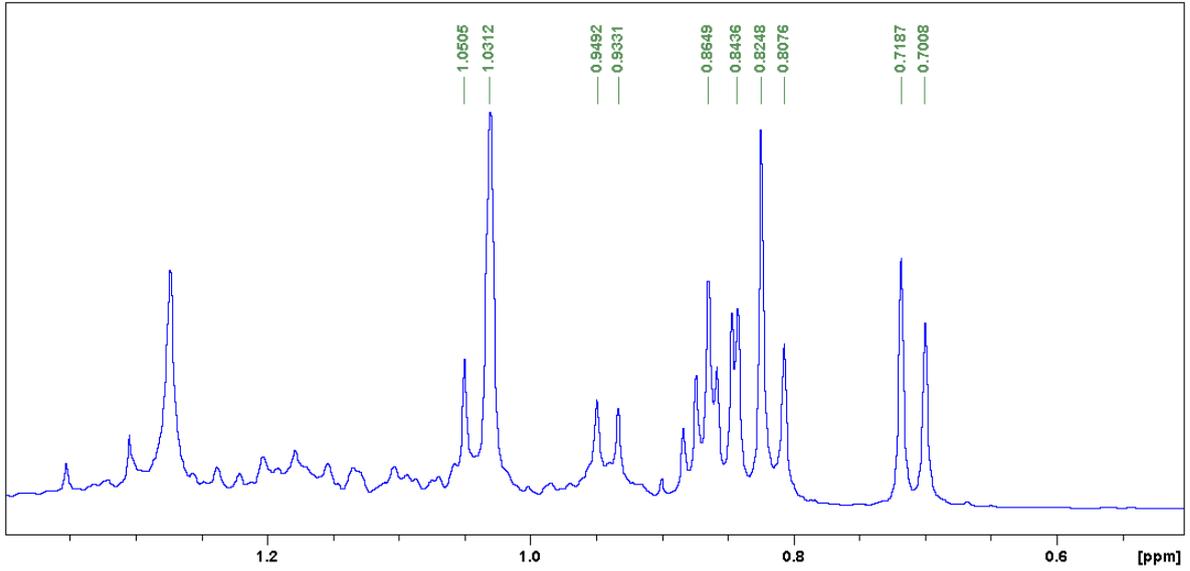
Figura 24 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) das substâncias codificadas **MfCH-1a** e **MfCH-1b** (A) e expansão da região de δ 0,70 a δ 1,40 (B).

A



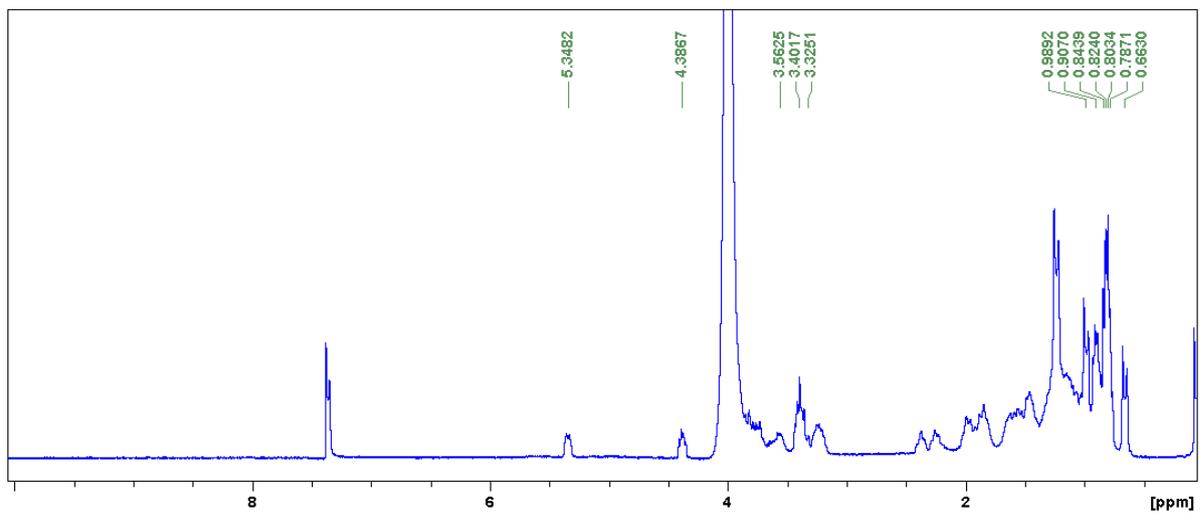
Continuação da Figura 24:

**B**



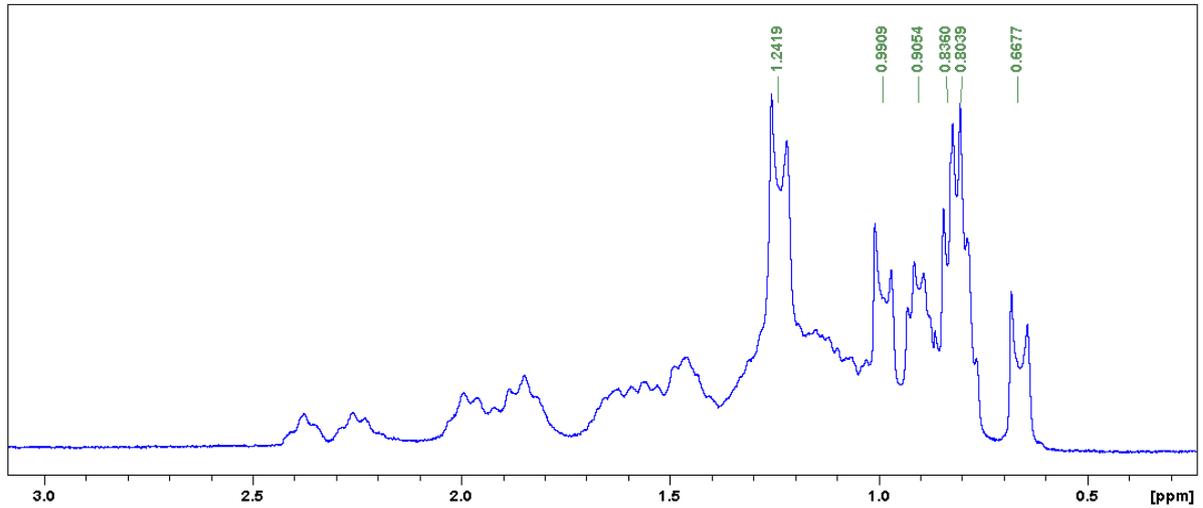
**Figura 25** – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância codificada de **MfCH-2** (A) e expansão da região de  $\delta$  0,3 a  $\delta$  3,00 (B).

**A**



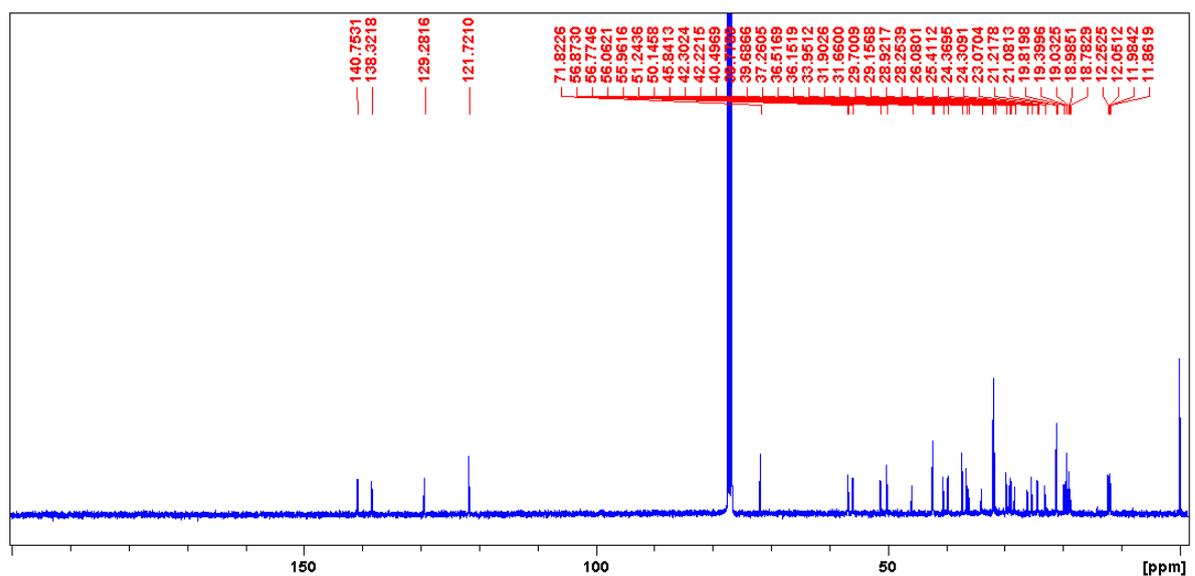
Continuação da Figura 25:

**B**



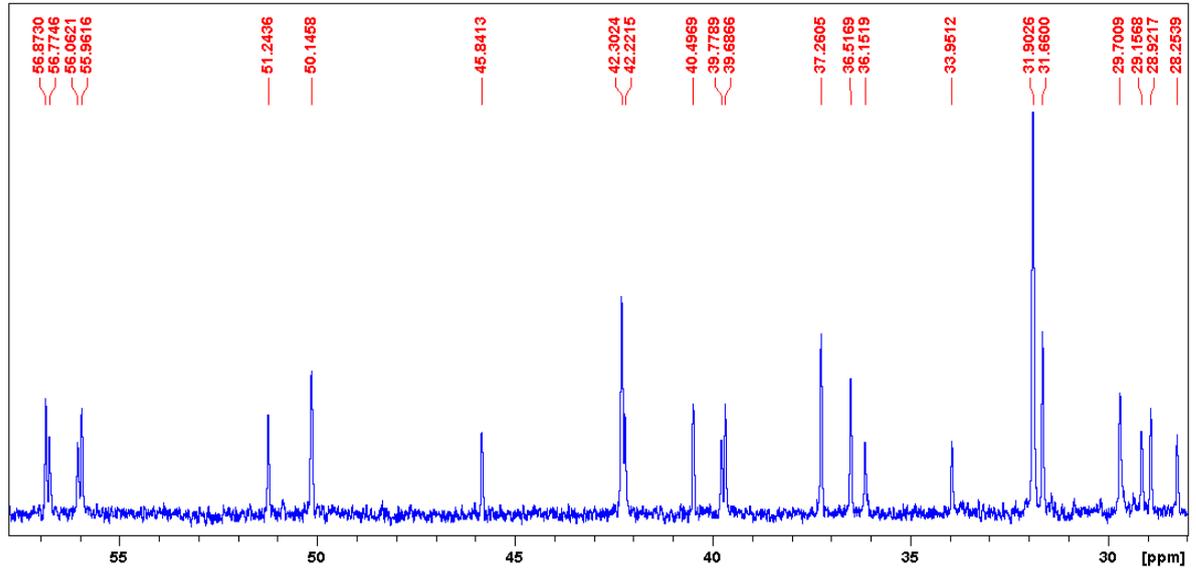
**Figura 26** – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) das substâncias codificadas de **MfCH-1a** e **MfCH-1b** (A) e expansão das regiões de  $\delta$  10,0 a  $\delta$  60,00 (B) e  $\delta$  10,0 a  $\delta$  25,0 (C).

**A**

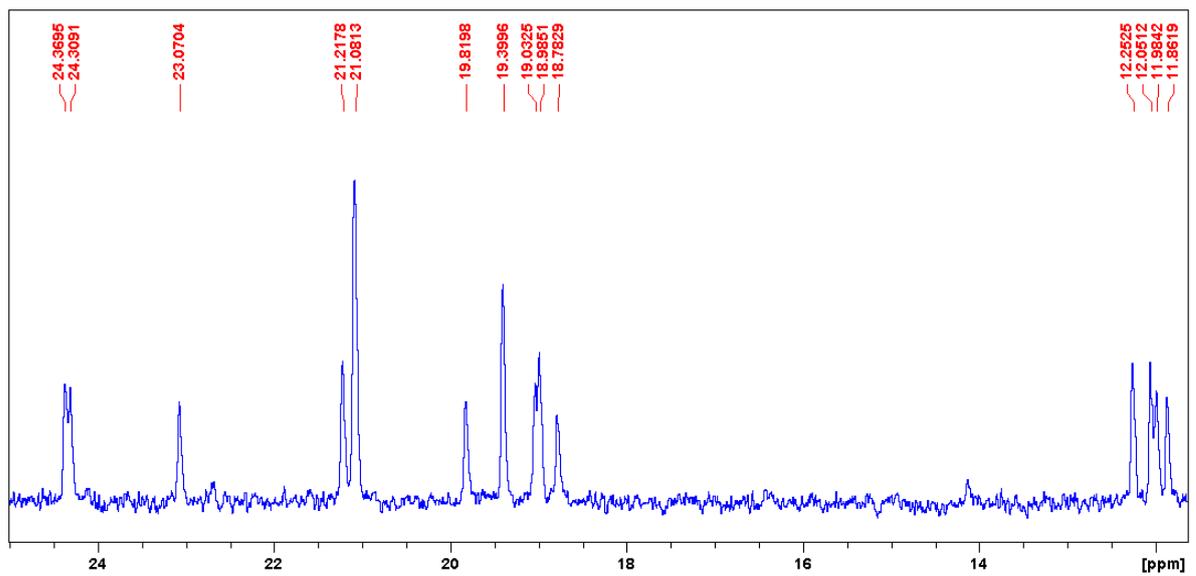


Continuação da Figura 26:

B

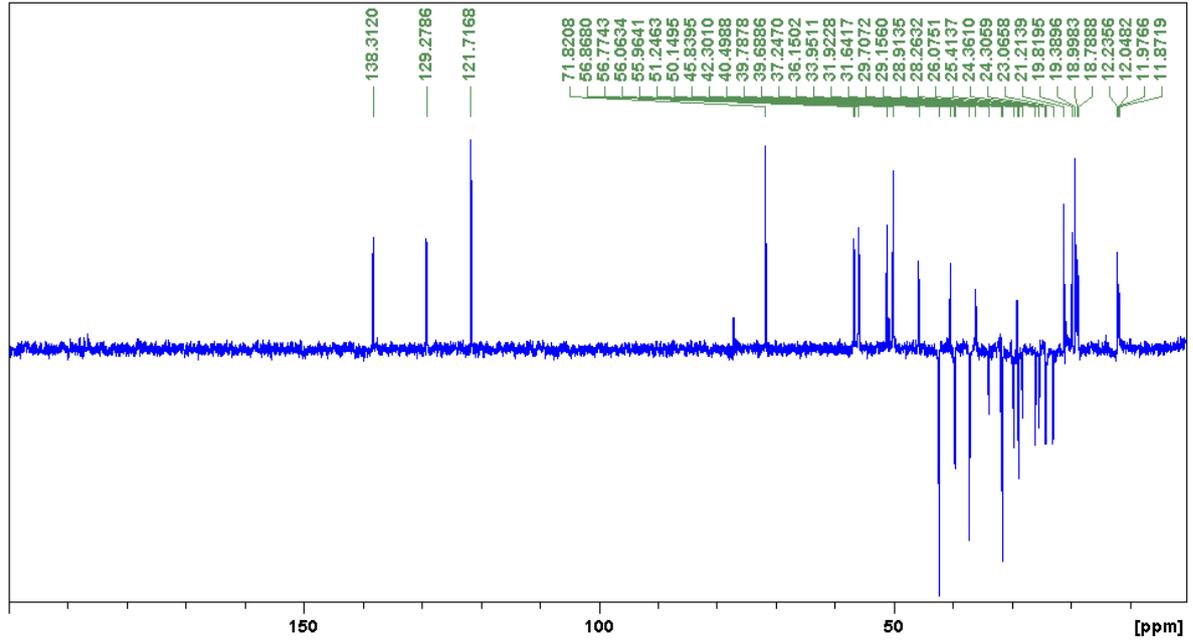


C

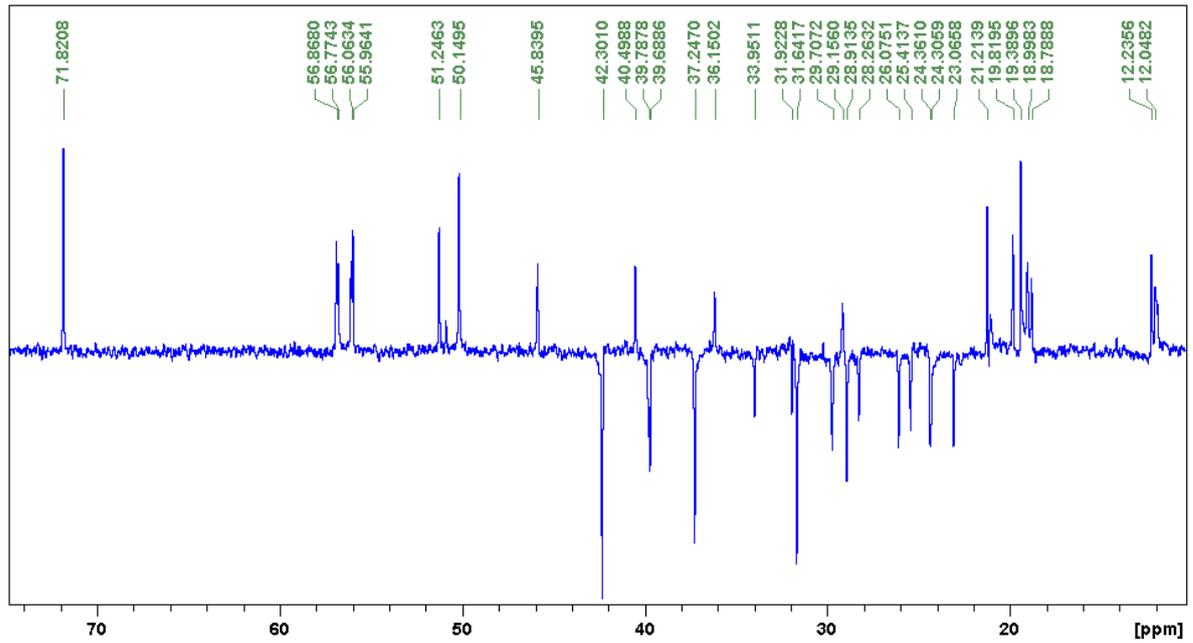


**Figura 27** – Espectro DEPT 135 (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) das substâncias codificadas de **MfCH-1a** e **MfCH-1b** (A) e expansão das regiões de  $\delta$  10,0 a  $\delta$  72,0 (B).

(A)

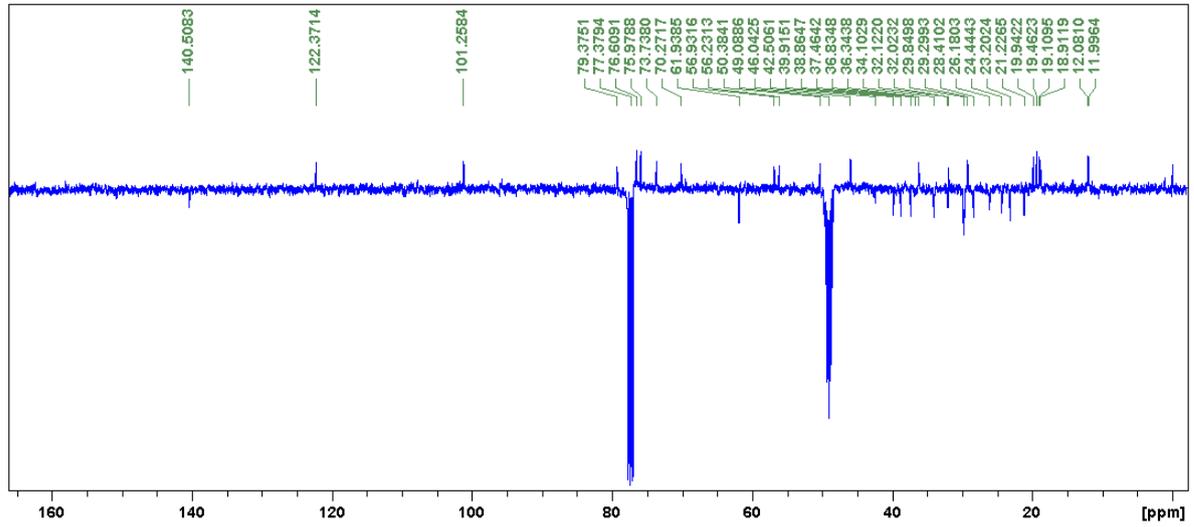


(B)

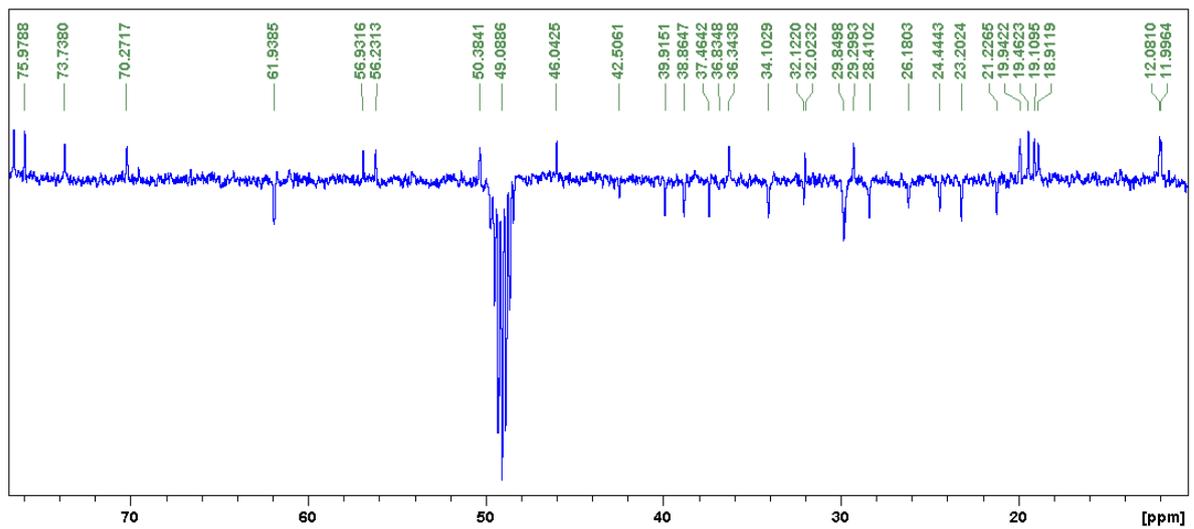


**Figura 28** – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPTQ (100 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância codificada de **MfCH-2** (A) e expansão da região de  $\delta$  10,0 a  $\delta$  77,00 (B).

**A**



**B**



### 5.1.1.2. Identificação Estrutural das Substâncias Codificadas de **MfFH-1**, **MfFC-2**, **MfFC-3** e **MfCC-2**

As substâncias codificadas de **MfFH-1**, **MfFC-2**, **MfFC-4** e **MfCC-4** foram identificadas como sendo triterpenos pentacíclicos da série lupano com base na análise dos dados obtidos dos respectivos espectros de RMN, bem como pela comparação com os dados dos compostos correspondentes descritos na literatura. Conforme pode ser observado nas Figuras 29-41 e Tabelas 03-06, as substâncias codificadas de **MfFC-4** e **MfCC-2** foram obtidas em mistura com **MfFH-1** e **MfFC-2**, respectivamente. Vale salientar que a análise não foi prejudicada, pois os principais sinais estavam duplicados.

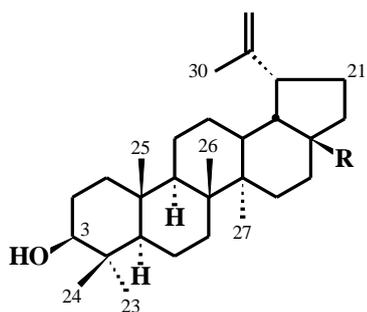
Os respectivos espectros de RMN  $^1\text{H}$  obtidos a 400 MHz (**Figuras 29-32; Tabelas 03-06**), permitiu reconhecer para todos a presença de vários sinais simples entre  $\delta$  0,75 a 1,02 (**MfFH-1**),  $\delta$  0,75 a 0,97 (**MfFC-4**),  $\delta$  0,75 a 0,90 (**MfFC-3**) e  $\delta$  0,75 a 1,02 **MfCC-2** atribuídos a grupos metílicos angulares e sinais simples em  $\delta$  1,68 (**MfFH-1**),  $\delta$  1,69/1,68 (**MfFC-4**),  $\delta$  1,61 (**MfFC-2**) e  $\delta$  1,68 **MfCC-2** atribuídos a hidrogênios de grupos metilas ligados a carbono  $\text{sp}^2$ . Adicionalmente, foram observados nos respectivos espectros sinais múltiplos em  $\delta$  3,18 (**MfFH-1**),  $\delta$  3,20/3,17 (**MfFC-4**),  $\delta$  3,12 (**MfFC-2**) e  $\delta$  3,76 (d,  $J = \text{Hz}$ ) **MfCC-2** que foram atribuídos a hidrogênios oximetínicos e sinais alargados atribuídos a hidrogênios olefínicos [**MfFH-1**:  $\delta$  4,68 e  $\delta$  4,56 (sl cada); **MfFC-4**:  $\delta$  4,72 e  $\delta$  4,60 (sl cada); **MfFC-2**:  $\delta$  4,66 e  $\delta$  4,53 (sl, cada), e **MfCC-2**:  $\delta$  4,54 e  $\delta$  4,64 (sl cada)]. Os espectros de **MfFC-4** e **MfCC-2** evidenciaram ainda um sinal largo em  $\delta$  9,68 e um múltiplo em  $\delta$  3,00, sugerindo a presença de um grupo aldeído e um outro hidrogênio oximetínico, respectivamente. Essa feição espectral associada aos demais valores de deslocamentos químicos permitiu sugerir para as quatro substâncias esqueletos de triterpenos pentacíclico da série lupano.

A análise dos dados obtidos dos respectivos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  (**Figuras 33-39; Tabelas 03-06**) e DEPTQ (**Figuras 40-41**), permitiu reconhecer um total de trinta sinais de átomos de carbono. Destes, seis (**MfFH-1**) e sete (**MfFC-4**, **MfFC-2** e **MfCC-2**) são não hidrogenados, seis (**MfFH-1** a **MfFC-2**) e sete (**MfCC-2**) são monohidrogenados, onze (**MfFH-1**, **MfFC-4** e **MfFC-2**) e dez (**MfCC-2**) são

dihidrogenados e sete (**MfFH-1**) e seis (**MfFC-4**, **MfFC-2** e **MfCC-2**) são trihidrogenados (**Tabelas 03-06**). Dentre esses carbonos foi possível reconhecer para todos os compostos a presença de ligação dupla do tipo metileno terminal [**MfFH-1**:  $\delta$  150,96 (C) e  $\delta$  109,36 (CH<sub>2</sub>); **MfFC-4**:  $\delta$  149,71/150,97 (C) e  $\delta$  110,17/109,33 (CH<sub>2</sub>); **MfFC-2**:  $\delta$  150,41 (C) e  $\delta$  109,68 (CH<sub>2</sub>) e **MfCC-2**:  $\delta$  150,82 (C) e  $\delta$  109,69 (CH<sub>2</sub>)], além de sinais para carbonos oximetínicos [**MfFH-1**:  $\delta$  78,99 (CH); **MfFC-4**:  $\delta$  78,99/79,0 (CH), **MfFC-2**:  $\delta$  79,03 (CH) e **MfCC-2**:  $\delta$  78,94 (CH)], além de uma carbonila de aldeído em **MfFC-4** ( $\delta$  206,76, C), de um grupo carboxila em **MfFC-2** ( $\delta$  181,05) e de um oximetilênico em **MfCC-2** ( $\delta$  59,95, CH<sub>2</sub>). Estes deslocamentos químicos permitiram confirmar para as substâncias esqueletos de triterpenos pentacíclico da série lupano.

Os valores de deslocamentos químicos atribuídos ao C-3 (**MfFH-1**:  $\delta$  78,99; **MfFC-4**:  $\delta$  78,99/79,0, **MfFC-2**:  $\delta$  79,03 e **MfCC-2**:  $\delta$  78,94) e ao C-5 (**MfFH-1**:  $\delta$  55,27; **MfFC-4**:  $\delta$  55,30; **MfFC-2**:  $\delta$  55,34 e **MfCC-2**:  $\delta$  55,48), bem como a proteção observada para o C-24 (**MfFH-1**:  $\delta$  15,40; **MfFC-4**:  $\delta$  15,37; **MfFC-2**:  $\delta$  15,34 e **MfCC-2**:  $\delta$  15,48) permitiram sugerir para grupo hidroxila em C-3 das quatro substâncias uma configuração *beta*-equatorial, pois se fossem *alfa*-axial, o C-3 (em torno de  $\delta$  75,0) e o C-5 (próximo de  $\delta$  49,0) seriam mais protegidos, enquanto que o C-24 seria desprotegido como em **3 $\alpha$ -betulinaldeído** ( $\delta$  22,2) e **ácido 3 $\alpha$ -betulínico** ( $\delta$  22,5) (MAHATO & KUNDU, 1994) (**Tabelas 03-06**).

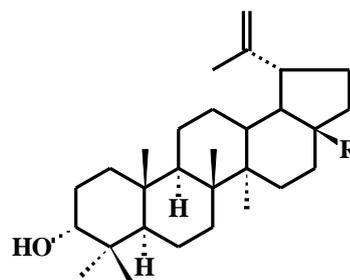
A análise comparativa dos valores de deslocamentos químicos atribuídos ao C-17 (**MfFH-1**:  $\delta$  43,0; **MfFC-4**:  $\delta$  59,33/43,02; **MfFC-2**:  $\delta$  56,33 e **MfCC-2**:  $\delta$  47,83) quando comparados com o correspondente do **Lupeol** ( $\delta$  43,0; **Tabela 03**), **3 $\beta$ -Betulinaldeído** ( $\delta$  59,33; **Tabela 04**) e **Ácido 3 $\beta$ -betulínico** ( $\delta$  56,33; **Tabela 05**) permitiram sugerir para **MfFC-4**, **MfFC-2** e **MfCC-2** a presença de grupos funcionais aldeído, carboxílico e hidroxílico, respectivamente, em C-28. Estas observações, associada aos valores de deslocamentos químicos dos demais carbonos e comparação com dados da literatura dos compostos correspondentes (**Tabelas 03-06**) permitiram sugerir estruturas dos triterpenos pentacíclicos conhecidos como **Lupeol** (**MfFH-1**), **3 $\beta$ -Betulinaldeído** (**MfFC-4**), **Ácido 3 $\beta$ -betulínico** (**MfFC-2**) e **3 $\beta$ -Betulinol** (**MfCC-2**).



**Lupeol** R = Me (MfFH-1)

**3 $\beta$ -Betulinaldeído** R = CHO (MfFC-4)

**Ácido 3 $\beta$ -betulínico** R = CO<sub>2</sub>H (MfFC-2)



**3 $\alpha$ -Betulinaldeído** R = CHO

**Ácido 3 $\alpha$ -betulínico** R = CO<sub>2</sub>H

**3 $\beta$ -Betulinol** R = CH<sub>2</sub>OH (MfCC-2)

**Tabela 03** – Dados de RMN ( $^1\text{H}$ : 400 MHz;  $^{13}\text{C}$ : 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , Hz, referência interna, TMS) da substância **MfFH-1** e comparação com dados da literatura do **Lupeol** (MAHATO & KUNDU, 1994).

Posição	MfFH-1		Lupeol	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
<b>C</b>				
4	38,85			38,8
8	40,81			40,8
10	37,15			37,1
14	42,81			42,8
17	43,00			43,0
20	150,96			150,9
<b>CH</b>				
3	<b>78,99</b>	3,18 (m)	3,20 (dd, $J = 5,0$ )	<b>78,9</b>
5	<b>55,27</b>			<b>55,3</b>
9	50,41			50,4
13	38,02			38,0
18	48,27			48,2
19	47,98			47,9
<b>CH<sub>2</sub></b>				
1	38,69			38,7
2	27,43			27,4
6	18,32			18,3
7	34,26			34,2
11	20,92			20,9
12	25,10			25,1
15	27,39			27,4
16	35,57			35,5
21	29,83			29,8
22	40,00			40,0
29	109,36	4,56 (sl); 4,68 (sl)	4,54 (sl); 4,67 (sl)	109,3
<b>CH<sub>3</sub></b>				
23	<b>28,00</b>	0,96 (3H, s)	0,97 (3h, s)	<b>28,0</b>
24	<b>15,40</b>	0,75 (3H, s)	0,76 (3H, s)	<b>15,4</b>
25	16,13	0,82 (3H, s)	0,83 (3H, s)	16,1
26	15,97	1,02 (3H, s)	1,03 (3H, s)	15,9
27	14,55	0,94 (3H, s)	0,94 (3H, s)	14,5
28	18,01	0,78 (3H, s)	0,79 (3H, s)	18,0
30	19,31	1,68 (3H, s)	1,68 (3H, s)	19,3

Nota: s = simpleto; sl = simpleto largo; m = multipleteo.

**Tabela 04** – Dados de RMN ( $^1\text{H}$ : 400 MHz;  $^{13}\text{C}$ : 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , Hz, referência interna TMS) da substância **MfFC-4** e comparação com dados da literatura do **Lupeol**, **3 $\beta$ -Betulinaldeído** e **3 $\alpha$ -Betulinaldeído** (MAHATO & KUNDU, 1994).

Posição	MfFC-4	MfFH-1		Lupeol	3 $\beta$ - Betulinaldeído	3 $\alpha$ - Betulinaldeído
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$
<b>C</b>						
4	38,85	38,85		38,8	38,8	37,5
8	40,82	40,82		40,8	40,8	41,0
10	37,16	37,16		37,1	37,1	37,7
14	42,55	42,84		42,8	42,5	42,6
17	59,33	43,02		43,0	59,3	59,3
20	<b>149,71</b>	<b>150,97</b>		150,9	<b>149,7</b>	<b>149,8</b>
28	<b>206,76</b>	-	9,68 (sl)		<b>205,6</b>	<b>205,6</b>
<b>CH</b>						
3	<b>78,99</b>	<b>79,00</b>	3,20/3,17 (m)	<b>78,9</b>	<b>78,9</b>	<b>76,4</b>
5	55,30	55,30		55,3	55,5	49,9
9	50,46	50,41		50,4	50,4	50,0
13	38,73	38,06		38,0	38,7	38,7
18	48,06	48,31		48,2	48,0	48,0
19	47,53	47,98		47,9	47,7	47,5
<b>CH<sub>2</sub></b>						
1	38,70	38,70		38,7	38,7	33,6
2	27,36	27,37		27,4	27,3	25,9
6	18,26	18,32		18,3	18,2	18,4
7	34,32	34,28		34,2	34,3	34,4
11	20,74	20,92		20,9	20,7	20,8
12	25,53	25,14		25,1	25,5	25,6
15	29,25	27,44		27,4	29,2	29,5
16	28,80	35,59		35,5	28,8	28,8
21	29,85	29,85		29,8	29,8	30,0
22	<b>33,22</b>	<b>40,00</b>		<b>40,0</b>	<b>33,2</b>	<b>33,2</b>
29	<b>110,17</b>	<b>109,33</b>	4,72/4,60 (sl)	<b>109,3</b>	<b>110,1</b>	<b>110,1</b>
<b>CH<sub>3</sub></b>						
23	27,98	27,98	0,97 (s)	28,0	27,9	28,2
24	15,37	15,35	0,76/0,75 (s)	15,4	15,4	22,2
25	15,89	16,11	0,82/0,81 (s)	16,1	15,9	15,9
26	16,13	15,98	1,02 (s)	15,9	16,1	16,1
27	14,26	14,54	0,96 (s)	14,5	14,2	14,2
28	-	18,00	0,78 (s)	18,0	-	-
30	19,00	18,32	1,69/1,68 (s)	19,3	19,0	19,0

**Nota:** s = simpleto; sl = simpleto largo; m = multipeto.

**Tabela 05** – Dados de RMN ( $^1\text{H}$ : 400;  $^{13}\text{C}$ : 100 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $J$  em Hz, referência interna TMS) da substância **MfFC-2** e comparação com dados dos **Ácidos 3 $\beta$ -** e **3 $\alpha$ -betulínicos** (MAHATO & KUNDU, 1994; ANDRADE, 1997).

Posição	MfFC-2		Ácido betulínico (3 $\beta$ )	Ácido betulínico (3 $\alpha$ )	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$
<b>C</b>					
4	38,85			38,8	39,0
8	40,69			40,7	41,2
10	37,20			37,2	37,7
14	42,43			42,4	42,9
17	<b>56,33</b>			<b>56,3</b>	<b>56,6</b>
20	<b>150,41</b>			<b>150,3</b>	<b>151,2</b>
28	<b>181,06</b>			<b>180,5</b>	<b>178,7</b>
<b>CH</b>					
3	<b>79,03</b>	3,12 m	3,13 m	<b>78,9</b>	<b>75,5</b>
5	<b>55,34</b>			<b>55,3</b>	<b>49,3</b>
9	50,51			50,5	50,7
13	38,39			38,4	38,5
18	46,89			46,8	47,7
19	49,26			49,2	49,7
<b>CH<sub>2</sub></b>					
1	37,05			37,8	34,0
2	27,37			27,4	23,2
6	18,28			18,3	18,6
7	34,32			34,3	34,8
11	20,84			20,8	21,0
12	25,50			25,5	26,1
15	30,56			30,5	31,2
16	32,14			32,1	32,8
21	30,16			29,7	29,9
22	37,05			37,0	37,5
29	<b>109,68</b>	4,66 e 4,53 (sl)	4,66 (d, $J = 2,2$ ) e 4,50 sl	<b>109,6</b>	<b>109,8</b>
<b>CH<sub>3</sub></b>					
23	27,98	0,86 (s)	0,88 (s)	27,9	29,2
24	<b>15,34</b>	0,75 (s)	0,75 (s)	<b>15,3</b>	<b>22,5</b>
25	16,04	0,81 (s)	0,77 (s)	16,0	16,4
26	16,11	0,89 (s)	0,89 (s)	16,1	16,4
27	14,68	0,90 (s)	0,95 (s)	14,7	14,9
30	19,36	1,61 (s)	1,59 (s)	19,4	19,4

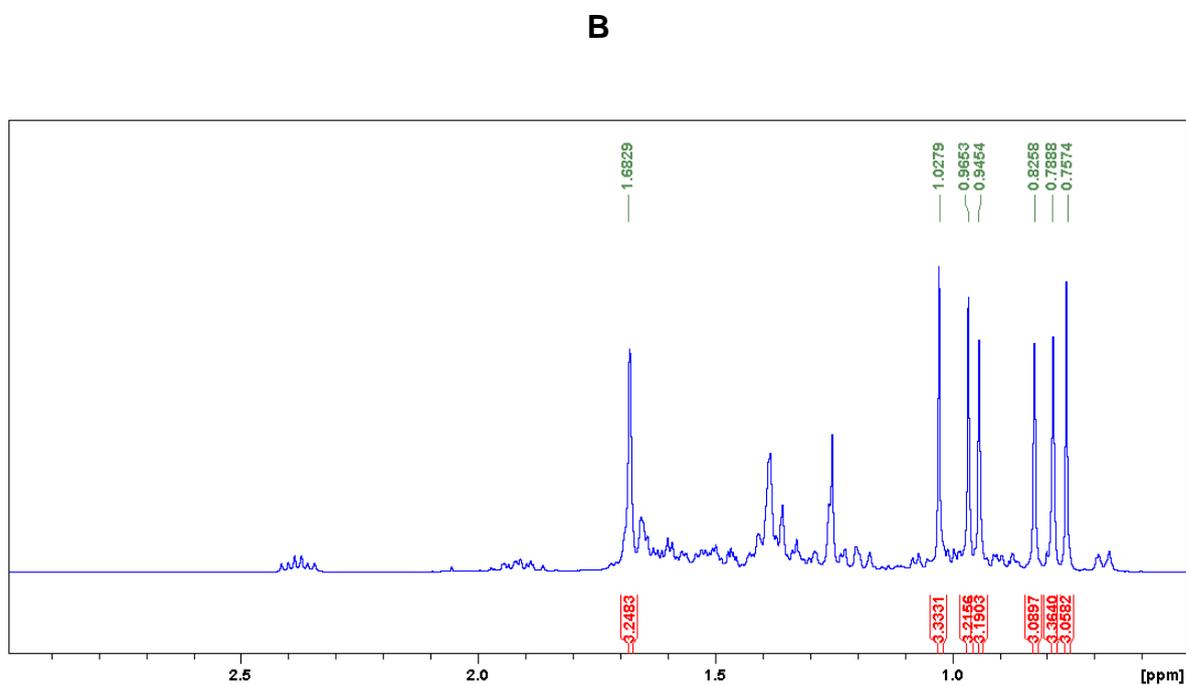
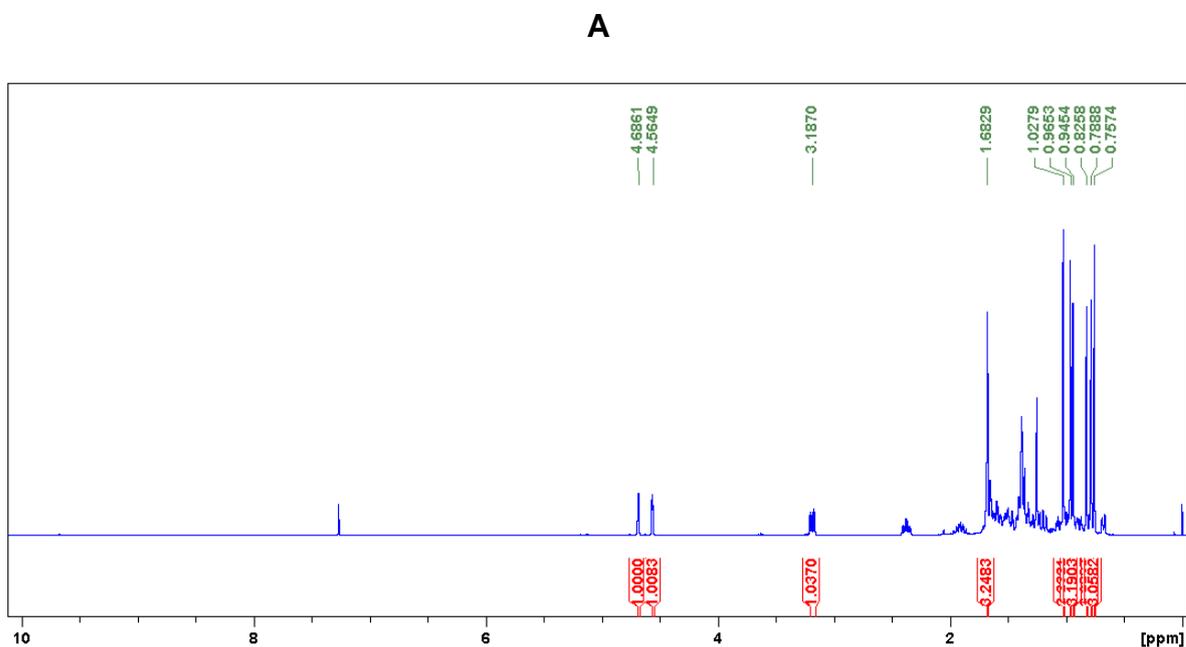
**Nota:** s = simpleto; sl = simpleto largo; m = multipleteo.

**Tabela 06** – Dados de RMN ( $^1\text{H}$ : 400;  $^{13}\text{C}$ : 100 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $J$  em Hz, referência interna TMS) da substância **MfCC-2** e comparação com dados do  **$3\beta$ -Betulinol** (MAHATO & KUNDU, 1994; UDDIN *et al.*, 2011).

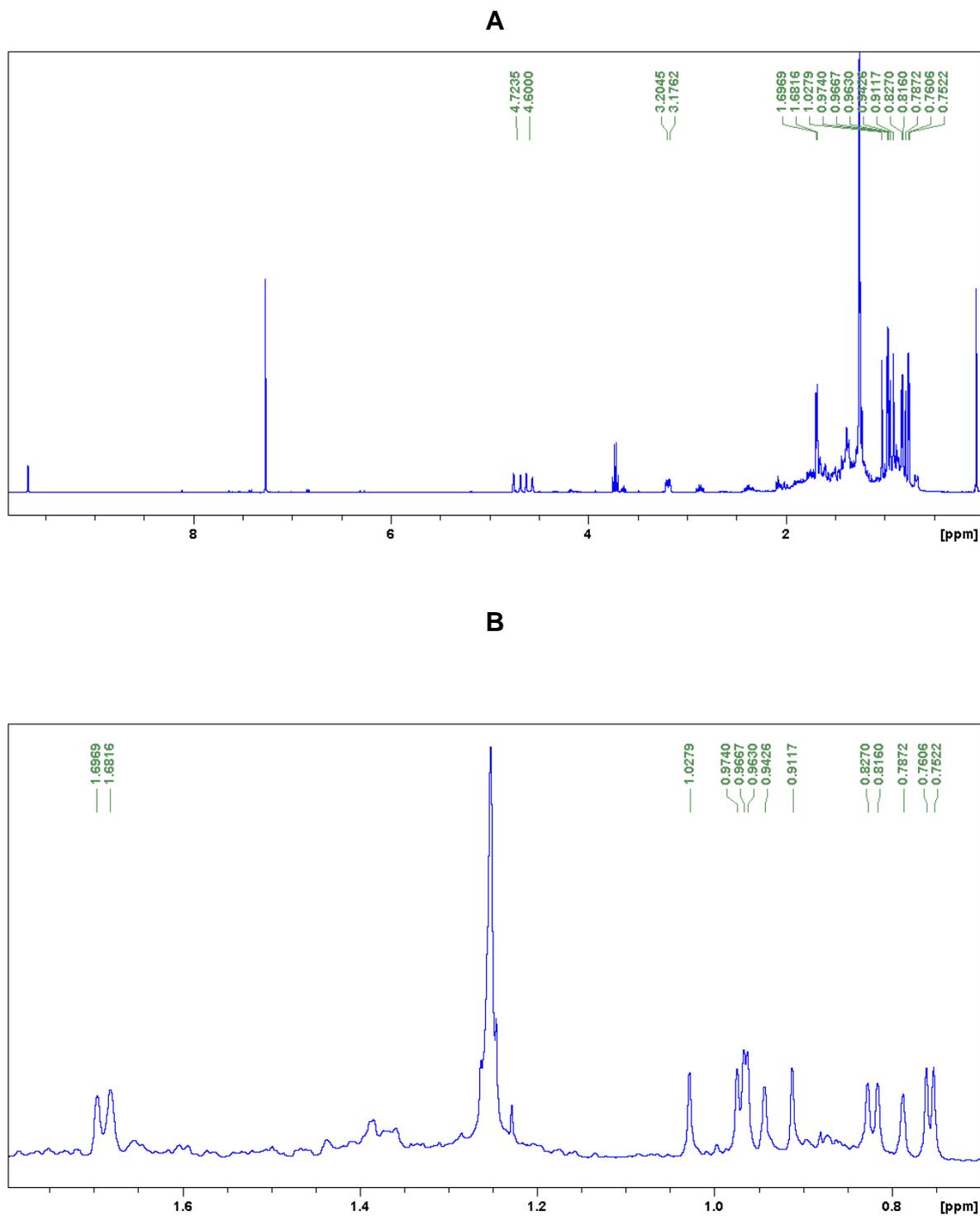
Posição	MfFC-2		MfCC-2		$(3\beta)$ -betulinol		$(3\beta)$ -Ác. betulinico
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$
<b>C</b>							
4	38,95		38,93			38,9	38,8
8	40,82		41,03			40,9	40,7
10	37,26		37,26			37,2	37,2
14	42,59		42,82			42,7	42,4
17	56,40		47,83			47,8	56,3
20	150,93		150,82			150,6	150,3
28	179,42	9,48 (sl)	-			-	180,5
<b>CH</b>							
3	<b>78,94</b>	3,16 (m)	78,94	3,76 (d)	3,79 (dd)	78,9	78,9
5	55,54		55,48			55,3	55,3
9	50,71		50,55			50,4	50,5
13	38,46		37,44			37,3	38,4
18	47,17		48,92			48,8	46,8
19	49,35		47,96	2,39 (m)	2,39 (m)	47,8	49,2
<b>CH<sub>2</sub></b>							
1	37,32		34,36			34,0	37,8
2	27,07		27,07			27,2	27,4
6	18,44		18,44			18,3	18,3
7	34,48		34,48			34,3	34,3
11	20,97		21,04			20,9	20,8
12	25,69		25,37			25,3	25,5
15	30,72		27,07			27,0	30,5
16	32,43		29,29			29,2	32,1
21	29,82		29,82			29,8	29,7
22	37,32		34,08			34,0	37,0
28	-		59,95	3,00 (m)		60,2	-
29	109,61	4,56 (sl)/4,68 (d)	109,69	4,54 (sl)/ 4,64 (d)		109,6	109,6
<b>CH<sub>3</sub></b>							
23	27,99	0,95 (s)	27,99	0,95 (s)	0,94 (s)	28,0	27,9
24	15,48	0,82 (s)	15,48	0,82 (s)	0,80 (s)	15,4	15,3
25	15,99	0,74 (s)	15,99	0,75 (s)	0,74 (s)	16,1	16,0
26	16,20	0,97 (s)	16,20	0,98 (s)	0,96 (s)	16,0	16,1
27	14,77	0,93 (s)	14,83	1,02 (s)	1,00 (s)	14,8	14,7
30	19,38	1,26 (s)	19,15	1,68 (s)	1,66 (s)	19,1	19,4

**Nota:** m = mutipletto; sl = simpleto largo; dd = duplo dupletto.

**Figura 29** – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância codificada de **MfFH-1** (A) e expansão da região de  $\delta$  0,5 a  $\delta$  3,0 (B).

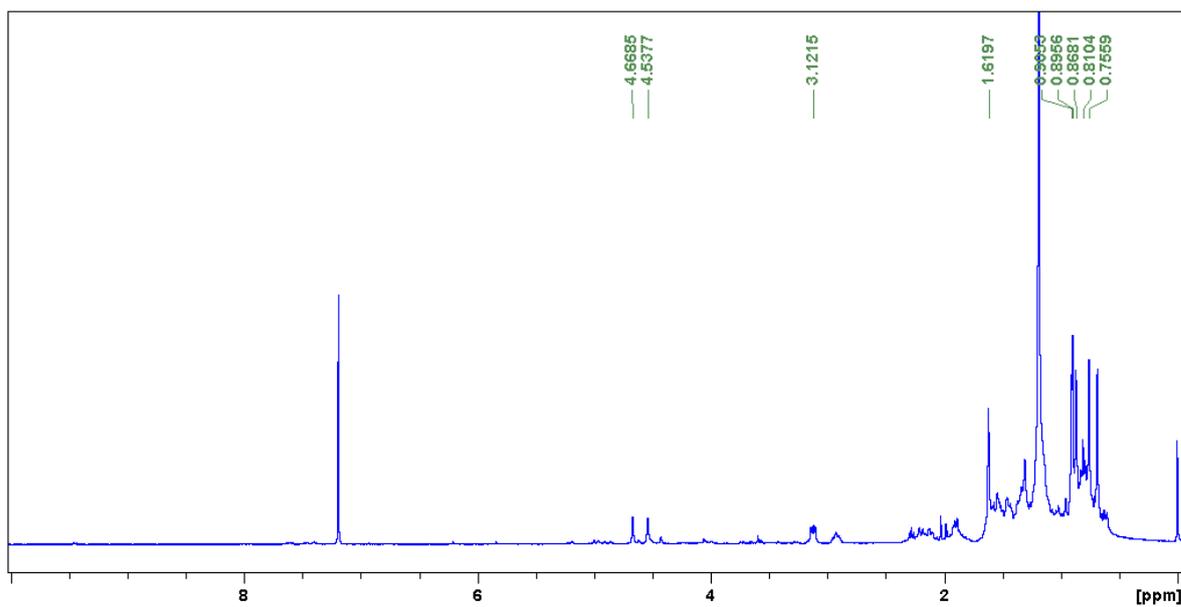


**Figura 30** – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) das Substâncias codificadas **MfFC-4** (A) e expansão da região de  $\delta$  1,8 a  $\delta$  0,7 (B).

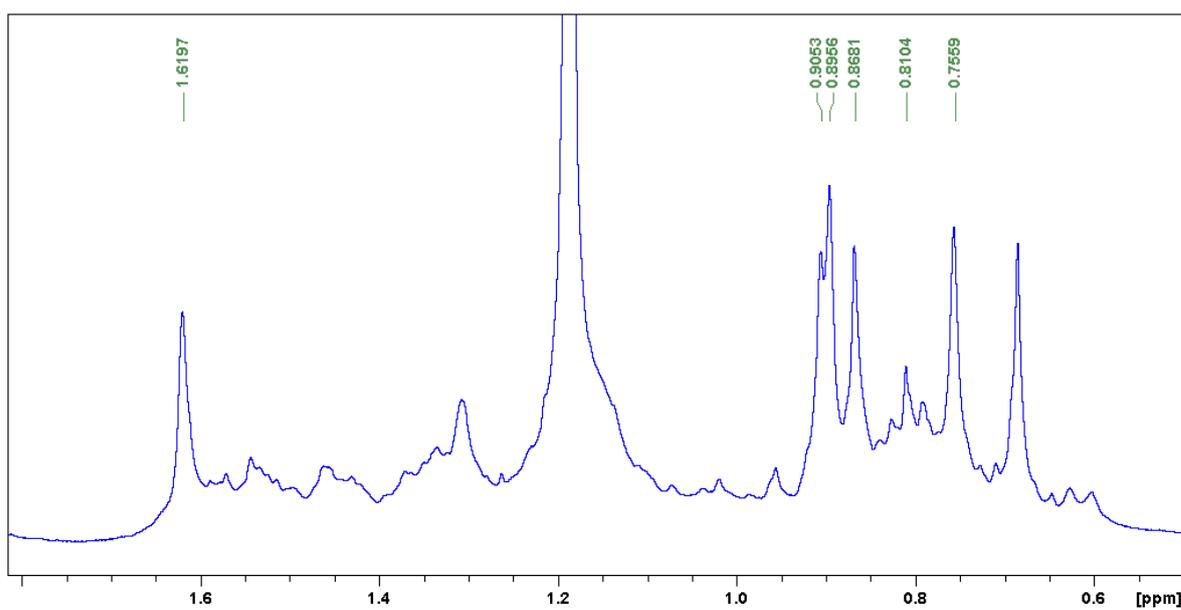


**Figura 31** – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) das Substâncias codificadas **MfFC-2** (A) e expansão da região de  $\delta$  1,8 a  $\delta$  0,5 (B).

**A**

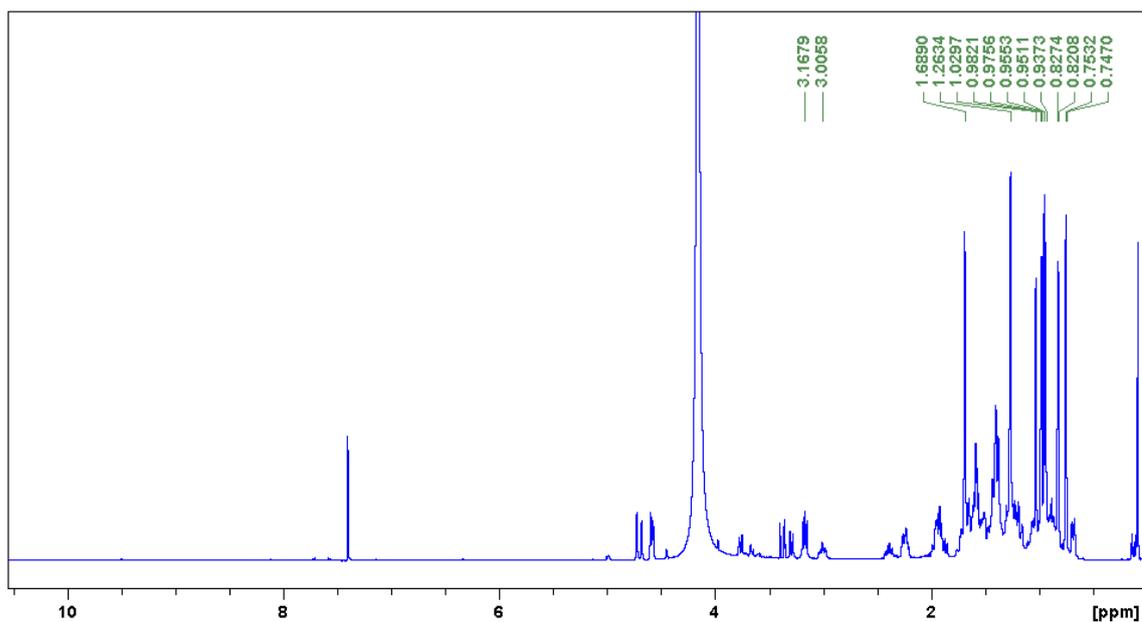


**B**

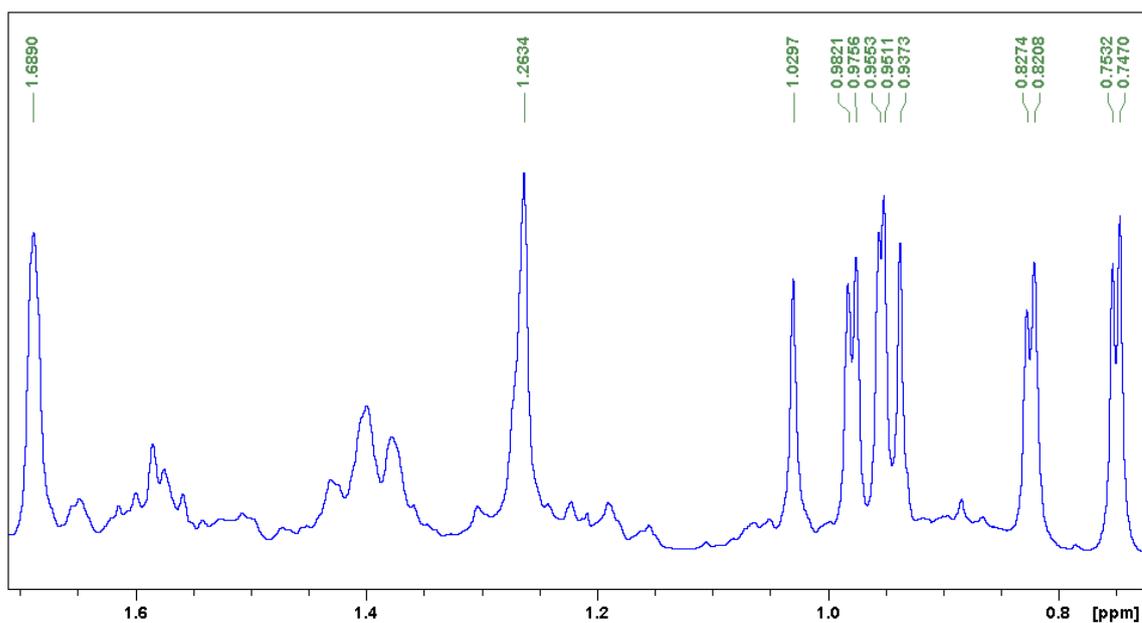


**Figura 32** – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da Substância codificada de **MfCC-2** (A) e expansão da região de  $\delta$  1,7 a  $\delta$  0,7 (B).

**A**

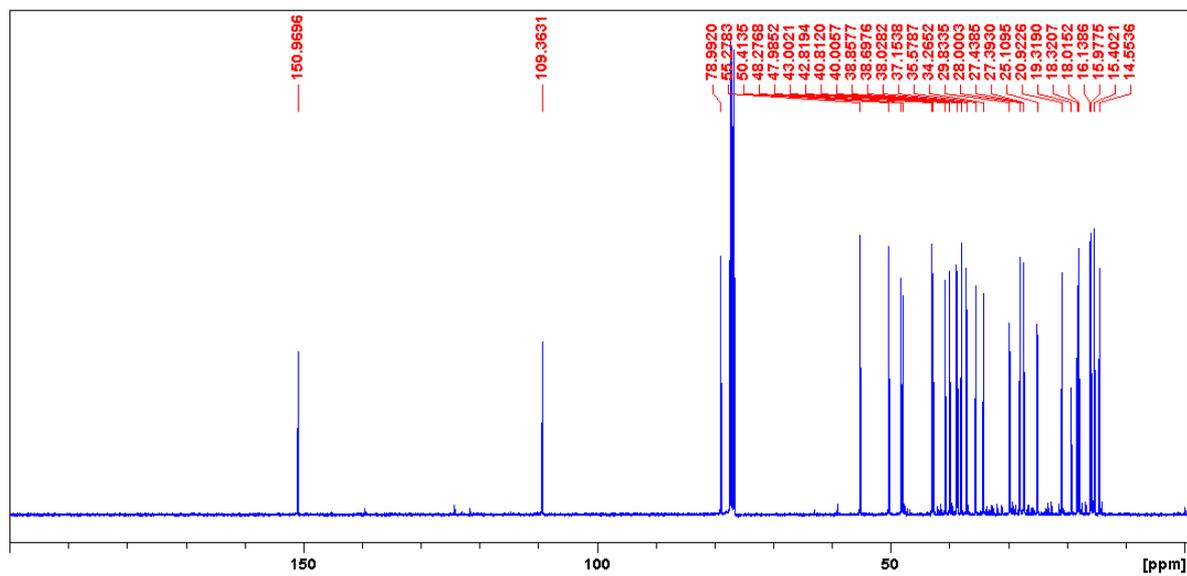


**B**

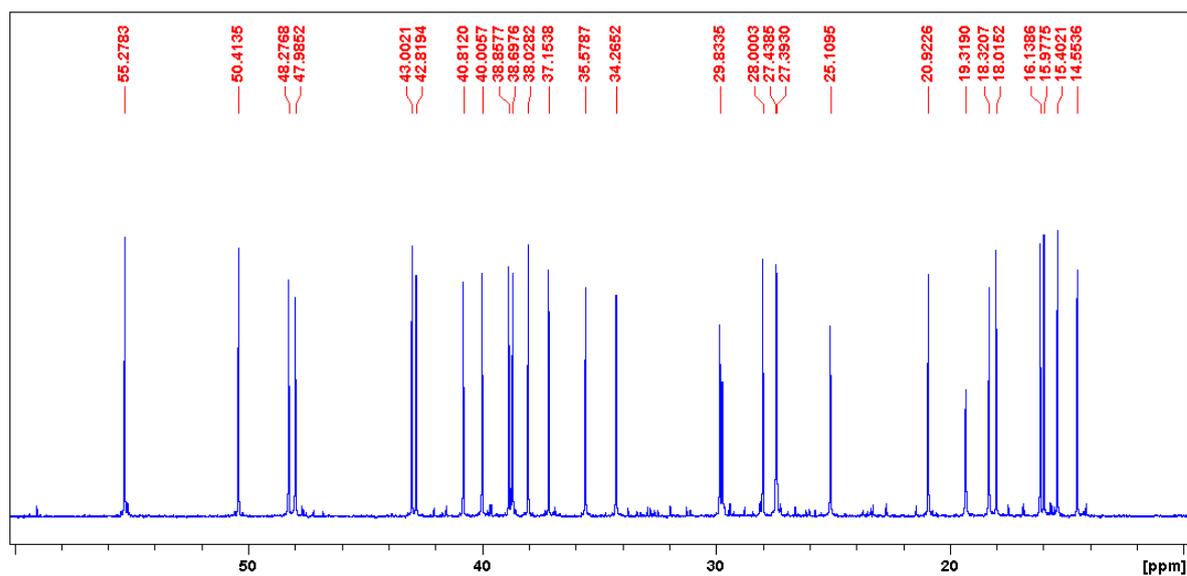


**Figura 33** – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância codificada de **MfFH-1** (A) e expansão da região de  $\delta$  10,0 a  $\delta$  60,00 (B).

**A**

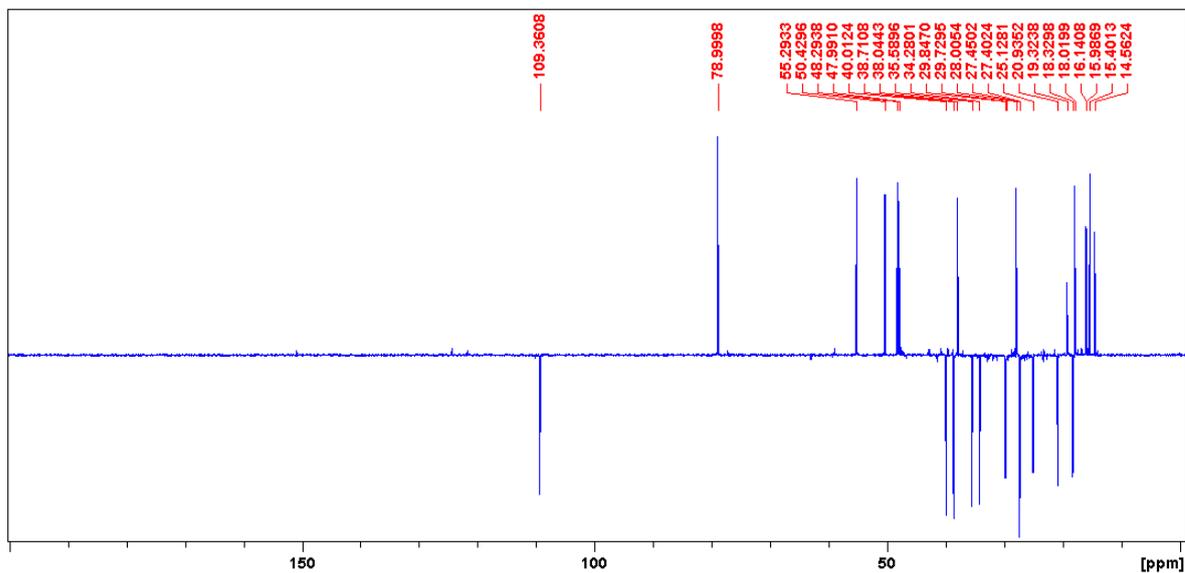


**B**



**Figura 34** – Espectro DEPT 135 (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância codificada de **MfFH-1** (A) e expansão da região de  $\delta$  10,0 a  $\delta$  115,00 (B).

**A**



**B**

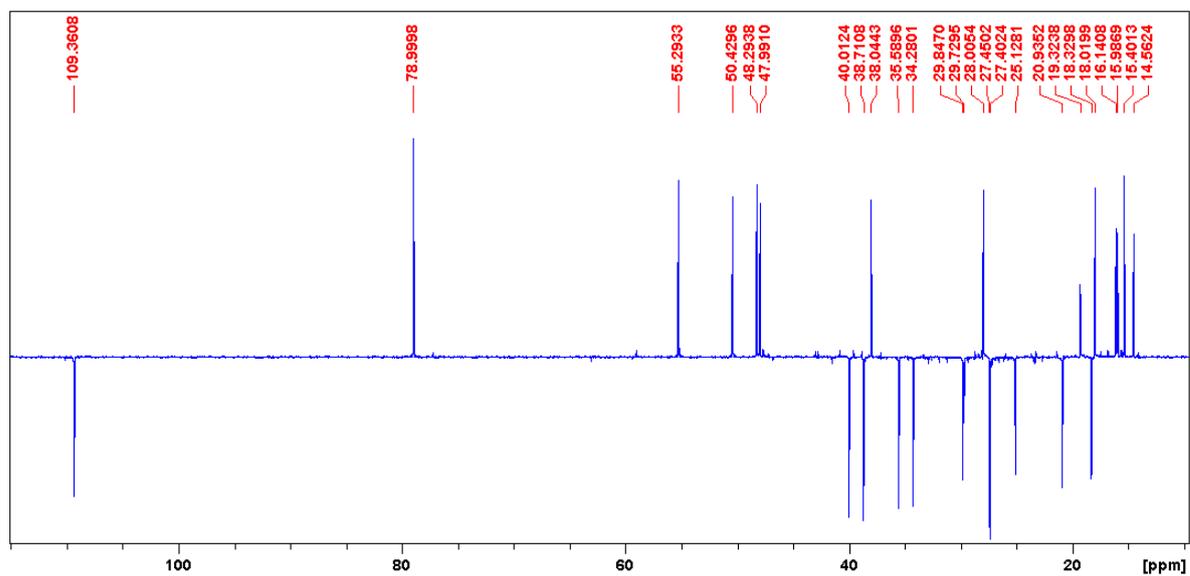
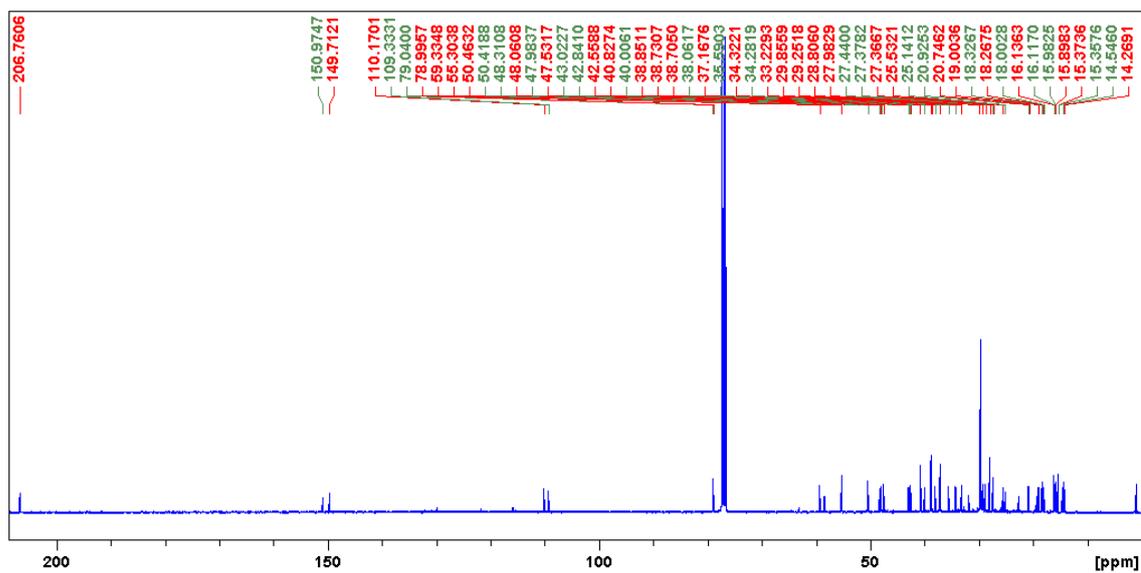
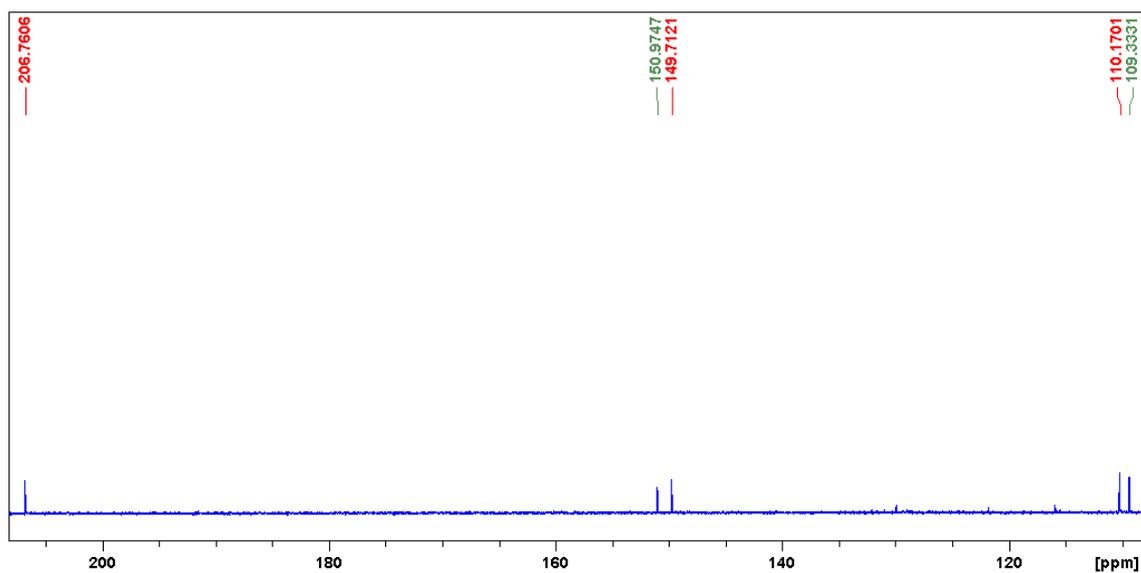


Figura 35 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substâncias codificada de **MfFC-4** (A) e expansão da região de  $\delta$  208,0 a  $\delta$  108,0 (B).

A

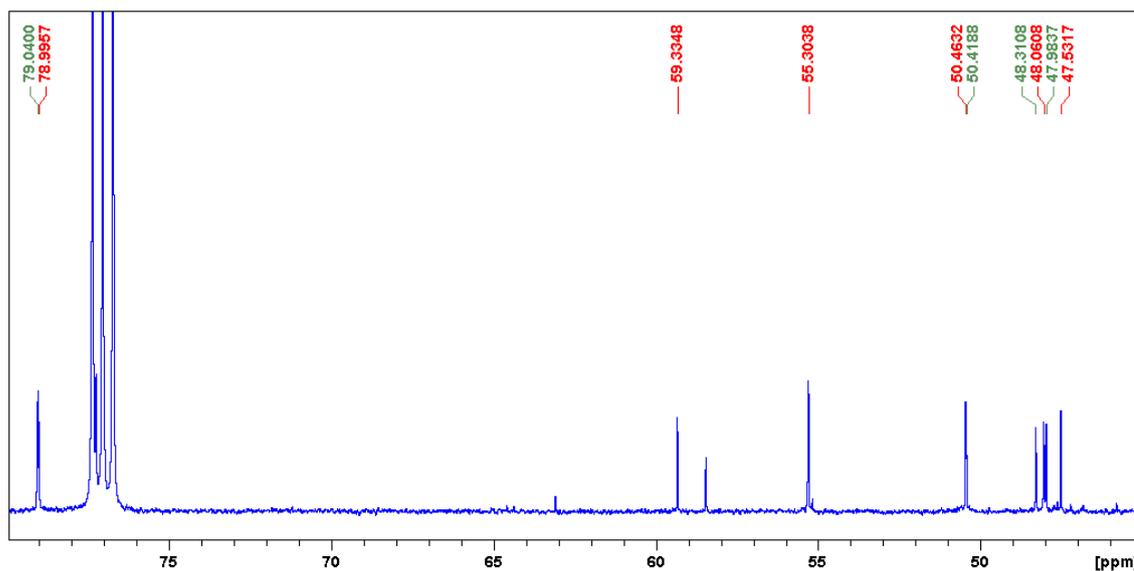


B



**Figura 36** – Expansão do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) das substâncias codificadas de **MfFC-4** (A)  $\delta$  80,0 a  $\delta$  45,0 (B)  $\delta$  44,0 a  $\delta$  14,0.

**A**



**B**

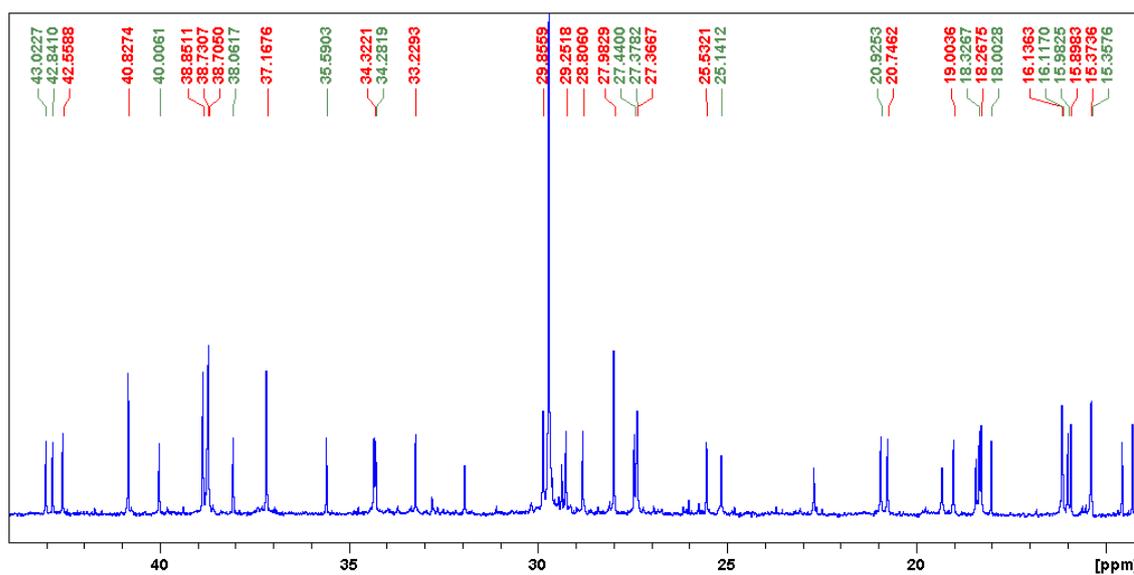
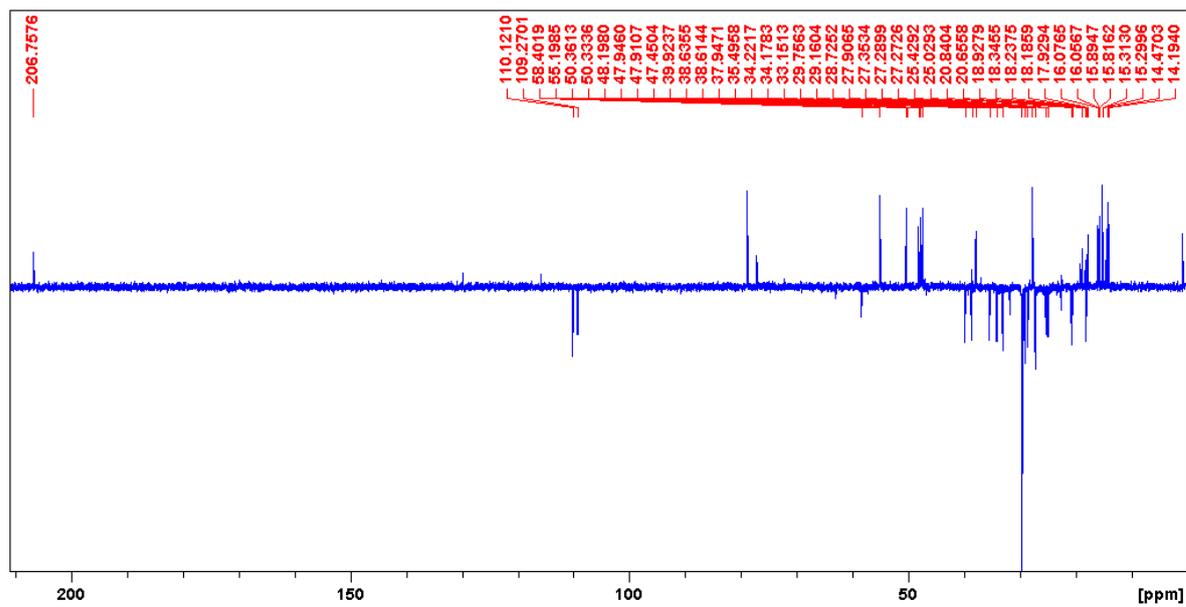
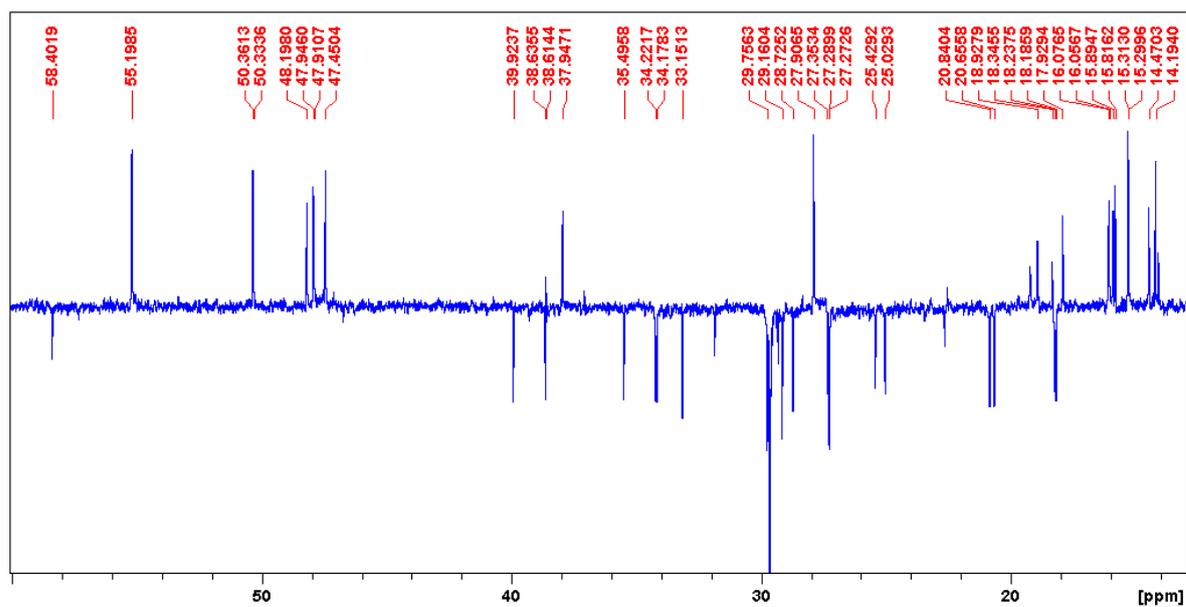


Figura 37 – Espectro DEPT 135 (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância codificada de **MfFC-4** (A) e expansão da região de  $\delta$  60,0 a  $\delta$  13,00 (B).

A

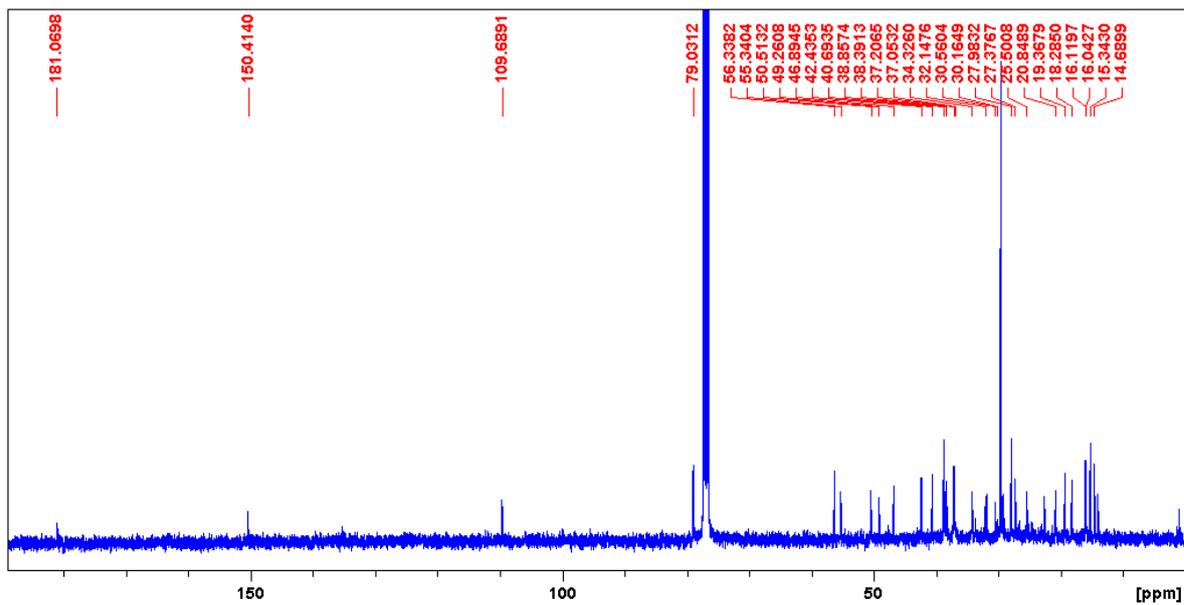


B

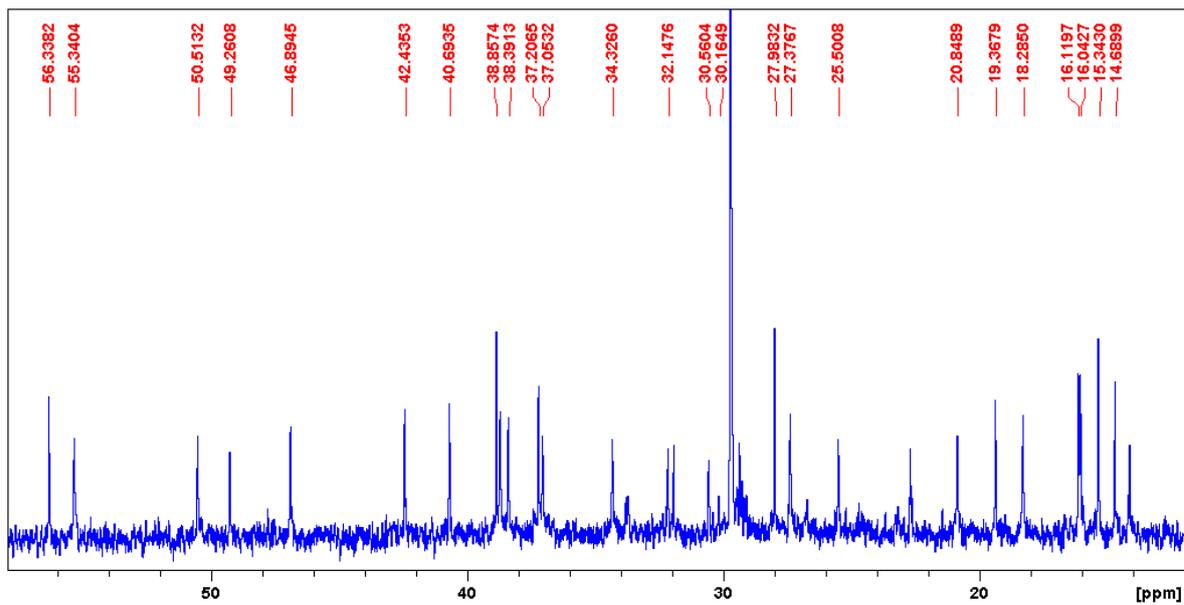


**Figura 38** – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância codificada de **MfFC-2** (A) e expansão da região de  $\delta$  58,0 a  $\delta$  12,0 (B).

**A**

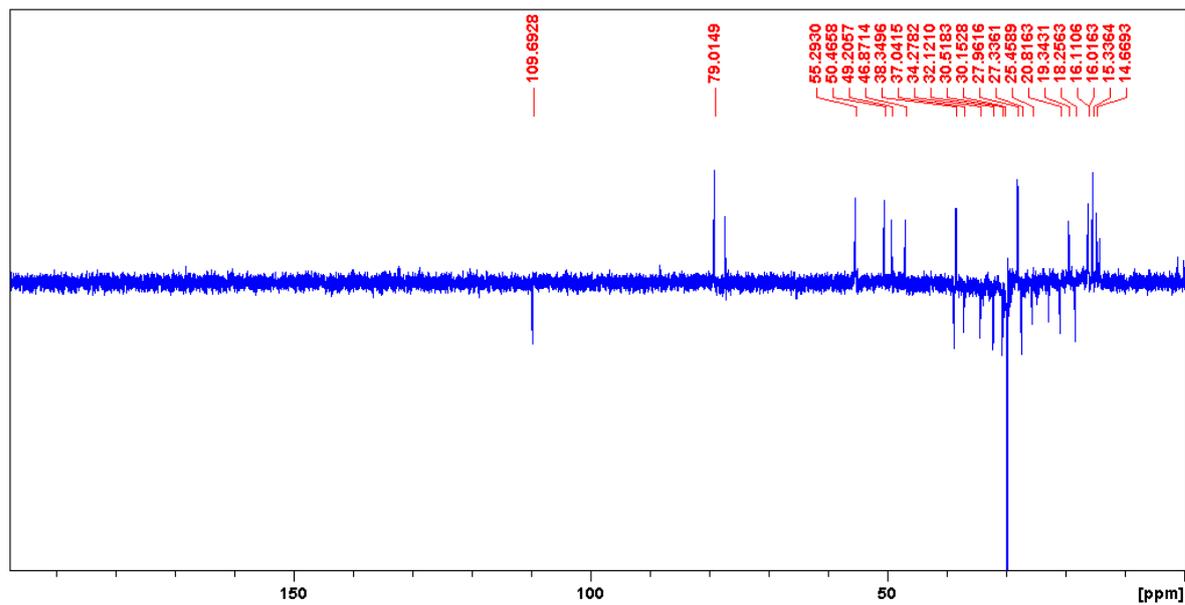


**B**



**Figura 39** – Espectro DEPT 135 (100 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância codificada de **MfFC-2** (A) e expansão da região de  $\delta$  56,0 a  $\delta$  13,00 (B).

**A**



**B**

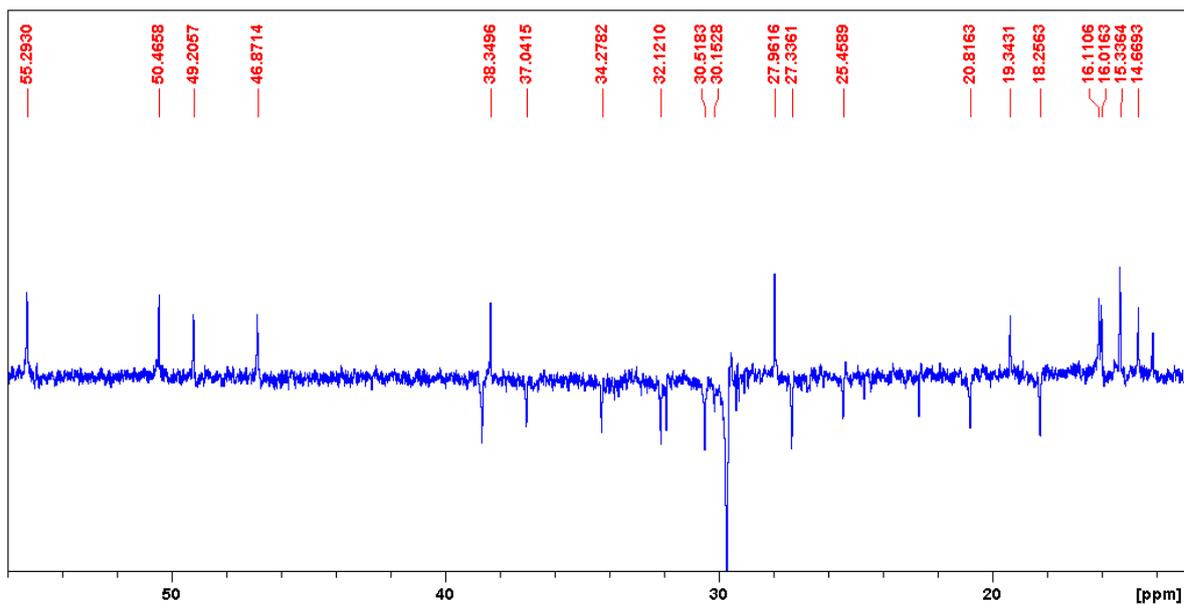
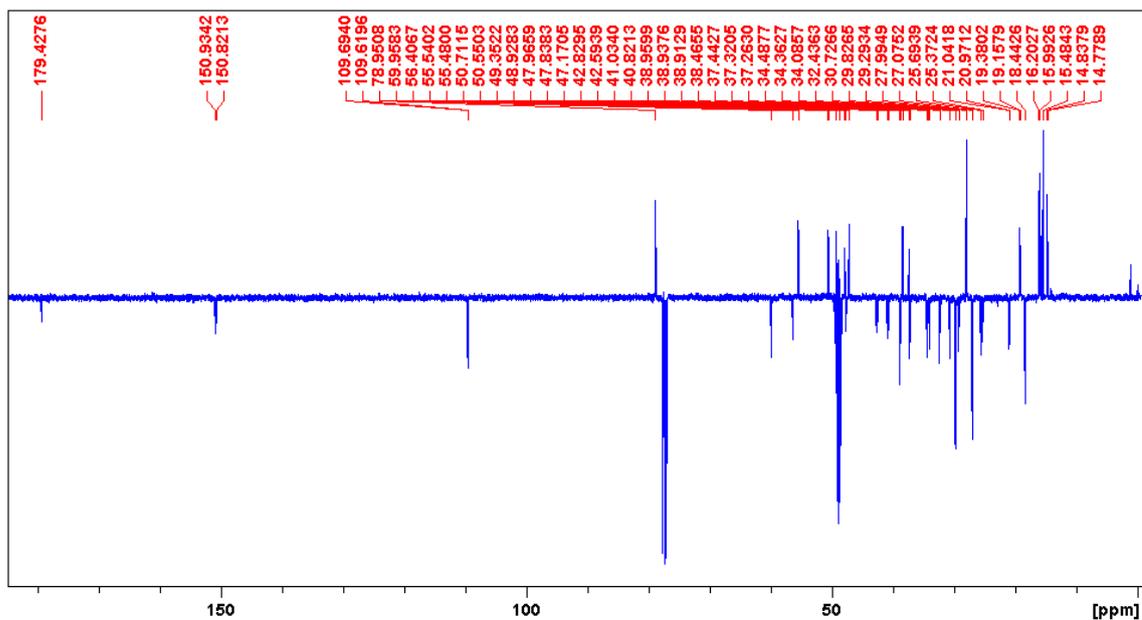
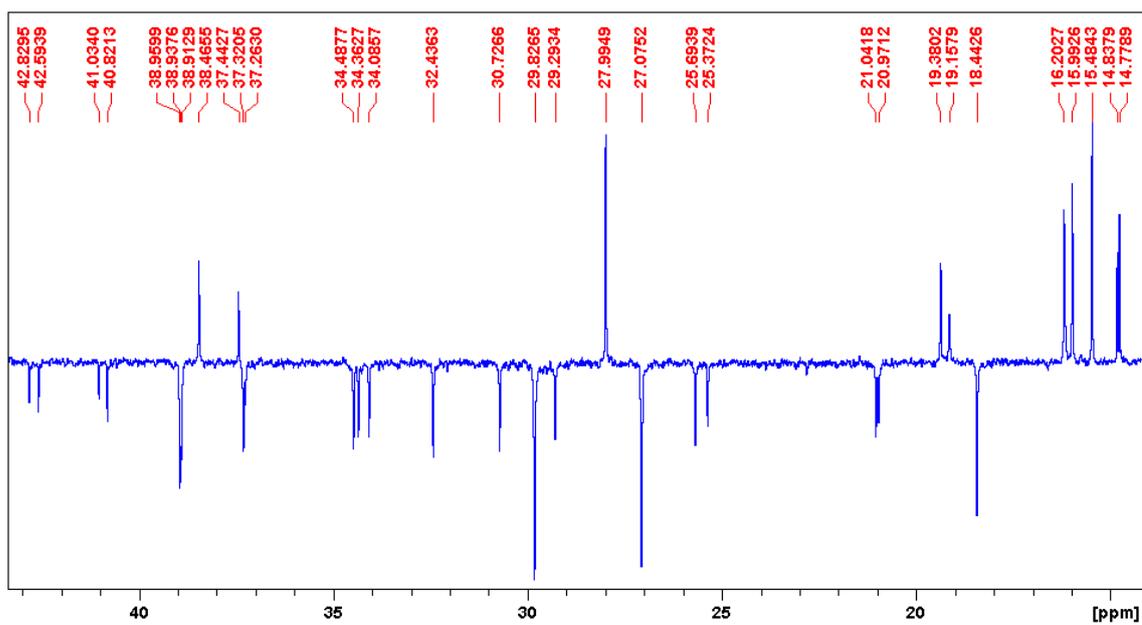


Figura 40 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPTQ (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância codificada de MfCC-2 (A) e expansão da região de  $\delta$  43,0 a  $\delta$  14,0 (B).

A

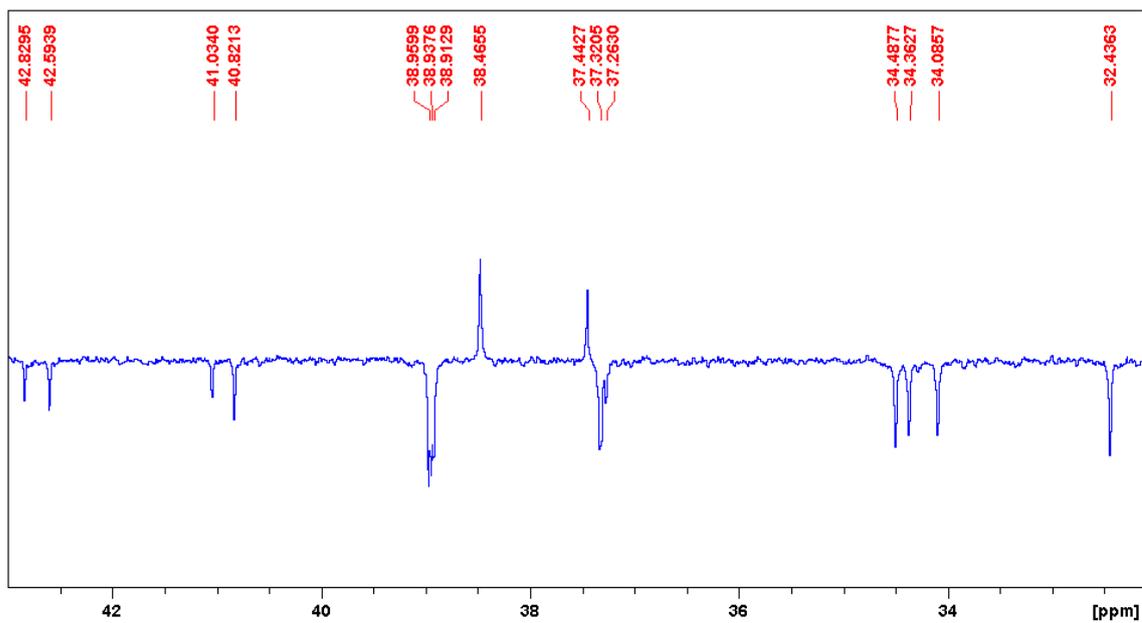


B

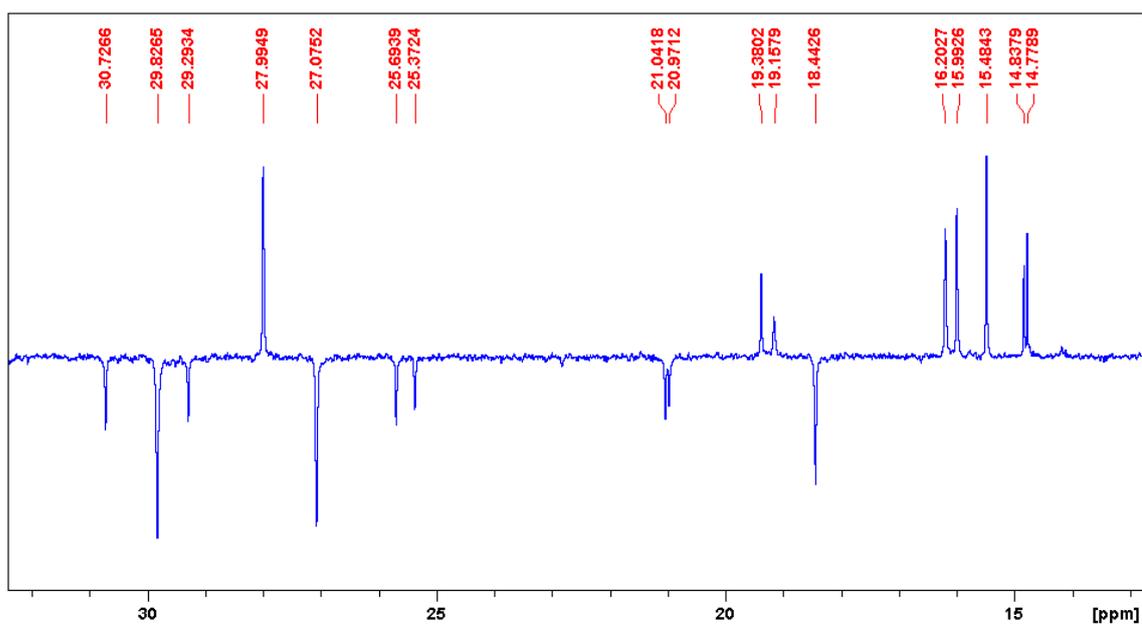


**Figura 41** – Expansão da região de  $\delta$  43,0 a  $\delta$  32,0 (A)  $\delta$  32,0 a  $\delta$  14,0 (B) do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPTQ (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância codificada de **MfCC-2**.

(A)



B



### 5.1.1.3. Identificação estrutural da substância codificada de MfFH-2

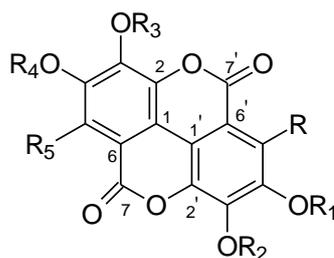
A substância codificada de **MfFH-2** foi identificada como sendo um polifenol metilado derivado do ácido elágico com base na análise dos dados obtidos dos espectros de RMN (Figuras 42-46), bem como pela comparação com dados da literatura de compostos modelos.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  obtido a 400 MHz (**Figura 42; Tabela 07**), evidenciou exclusivamente a presença de três sinais simples ( $\delta$  4,28;  $\delta$  4,03 e  $\delta$  4,02), cujos valores de deslocamentos químicos estão compatíveis com a presença de grupos metoxilas ligados a núcleos aromáticos.

A análise dos dados obtidos dos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  (**Figura 43; Tabela 07**) e DEPT (**Figura 44**), permitiu reconhecer um total de dez sinais de átomos de carbono. Destes, sete são não hidrogenados e três tri-hidrogenados (**Tabela 07**). Essa feição espectral, associada à ausência no espectro de RMN  $^1\text{H}$  de sinais para hidrogênios aromáticos, permitiu deduzir que se tratava de um composto contendo esqueleto do tipo  $\text{C}_6\text{C}_1$ , totalmente substituído. Contudo, os valores de deslocamentos químicos atribuídos aos grupos metoxilas ( $\delta$  62,36;  $\delta$  62,05 e  $\delta$  62,01) sugeriram que todos se encontram em posição *orto*-dissubstituídos. A ausência de sinais para carbonila de éster ( $\delta$ 166,8) ou de ácido carboxílico ( $\delta$ 168,7) (AL-ZAHRANI, 2012) permitiu sugerir esqueleto de um composto simétrico, tal como um derivado metilado do *Ácido elágico*.

A análise conjunta dos dados de RMN discutidos permitiu identificar **MfFH-2**, como sendo um derivado hexametilado do *Ácido corulelágico*, o *Ácido hexametilcorulelágico*. Esta proposta estrutural foi confirmada pela comparação dos dados de RMN  $^{13}\text{C}$  obtidos (**Tabela 07**) com os do composto modelo 3,3',4,4',5-Pentametoxiflavelágico.

As correlações observadas a uma (HSQC; **Figura 45**) e a três ligações no espectro HMBC (**Figura 46**) dos sinais correspondentes aos grupos metoxilas  $\delta$  4,02 e  $\delta$  4,28 e  $\delta$  4,03 com os carbonos oxigenados que absorvem em  $\delta$  148,59,  $\delta$  146,85, e  $\delta$  153,41, respectivamente, permitiram atribuir inequivocamente os valores de deslocamentos químicos dos carbonos que sustentam estes grupos.



**MfFH-2** R = R<sub>5</sub> = OMe, R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = R<sub>4</sub> = Me

**Ácido elágico** R = R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = R<sub>4</sub> = R<sub>5</sub> = H

**Ácido corulelágico** R = R<sub>5</sub> = OH, R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = R<sub>4</sub> = H

**3,3',4,4',5-Pentametoxiflavelágico** R = H, R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = R<sub>4</sub> = Me, R<sub>5</sub> = OMe

O ácido hexametilcorulelágico (**MfFH-2**) foi isolado previamente somente em espécies das famílias Dipterocarpaceae [*Shorea worthingtonii*, *S. magistophylla*, *S. lysophylla*, *Vatica obscura* (GEEVANANDA *et al.*, 1979; 1980) e *Vateria copallifera* (RATNASOORIYA *et al.*, 2006)] e Putranjivaceae [*Drypetes hieranensis*; CHEN *et al.*, 1999)]. Portanto, este trabalho relata pela primeira vez sua ocorrência na família Myrtaceae. Até o momento, a literatura não relata qualquer atividade biológica para o ácido hexametilcorulelágico. No presente trabalho, **MfFH-2** foi avaliado frente a bactéria Gram-positiva, *S. epidermidis*, na viabilidade de células fibroblasto 3T3 e de macrófagos (J774), na migração horizontal *in vitro* e na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs).

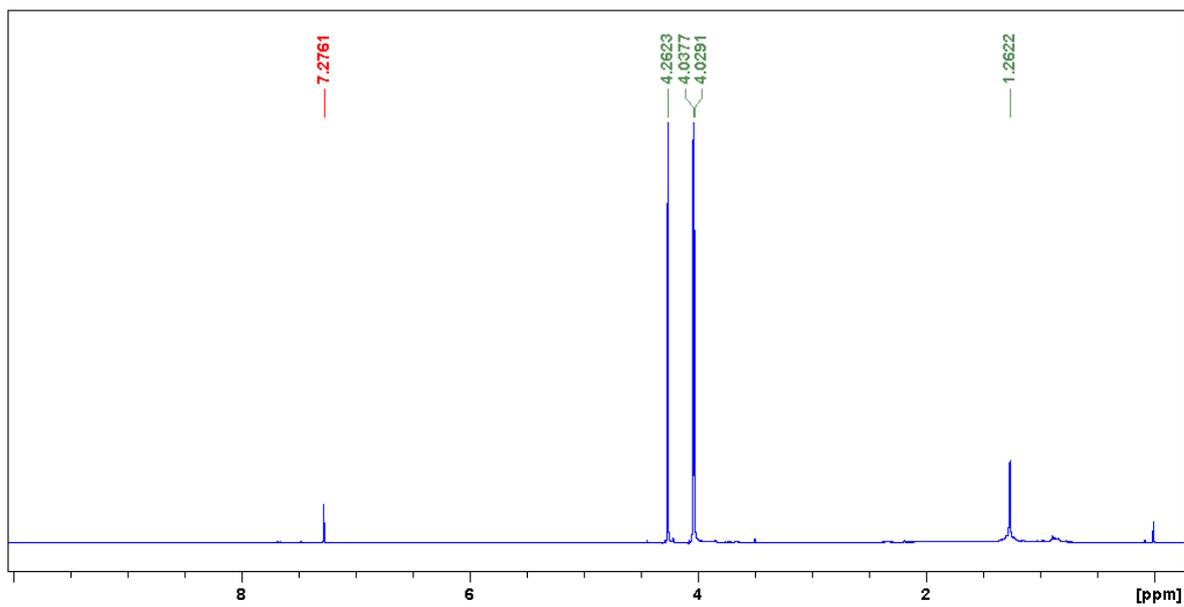
**Tabela 07** – Dados de RMN ( $^1\text{H}$ : 400 MHz;  $^{13}\text{C}$ : 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , Hz, referência interna TMS) de **MfFH-2** e comparação com dados do **Ácido elágico** (125 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ; SILVA *et al.*, 2007) e do seu derivado pentametilado, o **Ácido 3,3',4,4',5-pentametilflavelágico** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ; MILITÃO *et al.*, 1993).

Posição	MfFH-2		Ácido 3,3',4,4',5-pentametoxiflavelágico	Ácido elágico
	$\delta_c$	$\delta_H$ (HMBC)	$\delta_c$	$\delta_c$
<b>C</b>				
1	<b>114,15</b>		<b>113,09</b>	<b>112,4</b>
2	138,09		148,21	136,4
3	148,59	4,02	141,46	139,7
4	146,85	4,28	137,58	148,5
5	153,41	4,03	147,30	110,2
6	106,29		105,73	107,5
7	<b>155,26</b>		<b>155,34</b>	<b>159,2</b>
1'	<b>114,15</b>		<b>114,55</b>	112,4
2'	138,09		153,88	136,4
3'	148,59	4,02	141,58	139,7
4'	146,85	4,28	154,74	148,5
5'	153,41	4,03	107,47	110,2
6'	106,29		112,93	107,5
7'	<b>155,26</b>		<b>158,78</b>	<b>159,2</b>
<b>MeO</b>				
3	62,36	4,02 (s)	62,36	-
3'	62,36	4,02 (s)	62,09	-
4	62,01	4,28 (s)	62,04	-
4'	62,01	4,28 (s)	56,70	-
5	62,05	4,03 (s)	61,89	-
5'	62,05	4,03 (s)		

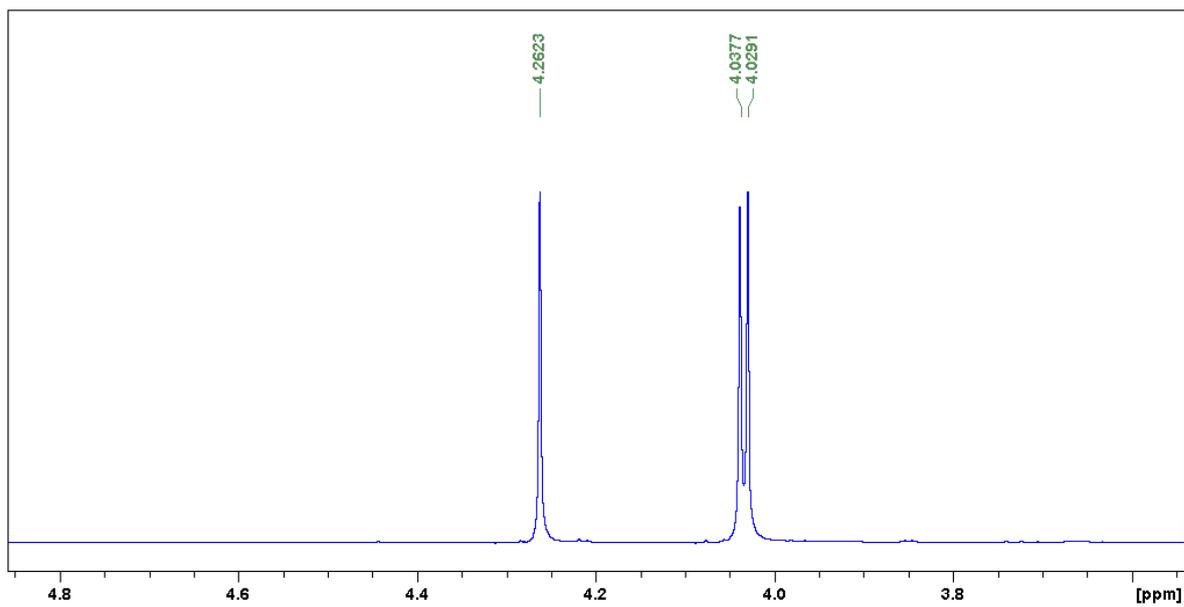
**Legenda:** s = simpleto.

**Figura 42** – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância codificada de **MfFH-2** (**A**) e expansão da região de  $\delta$  4,8 a  $\delta$  0,5 (**B**).

**A**

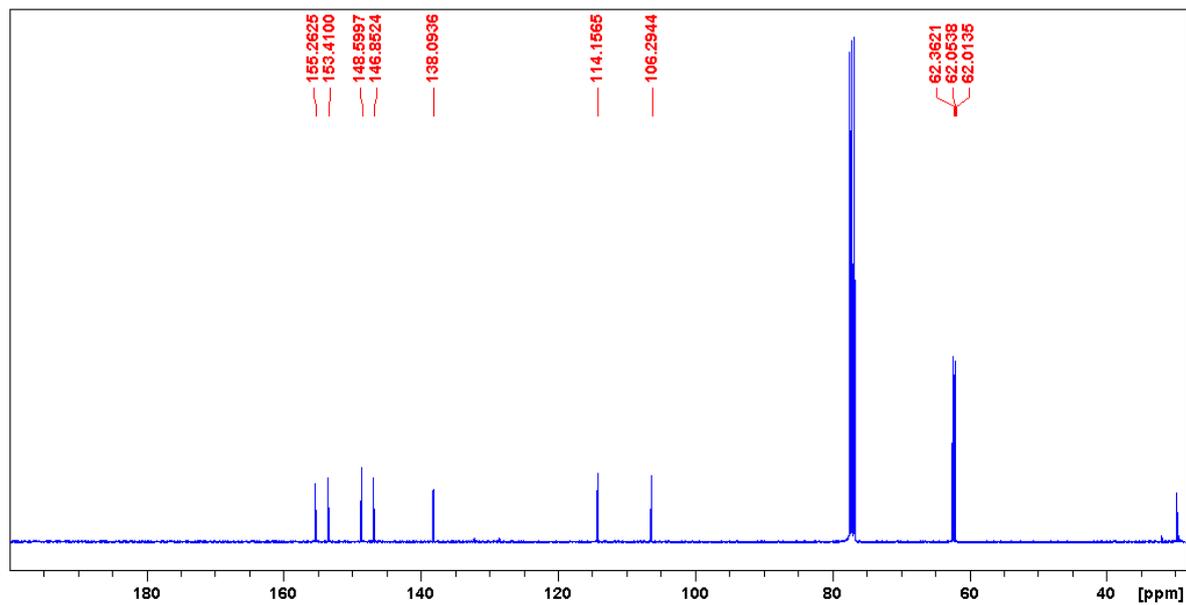


**B**

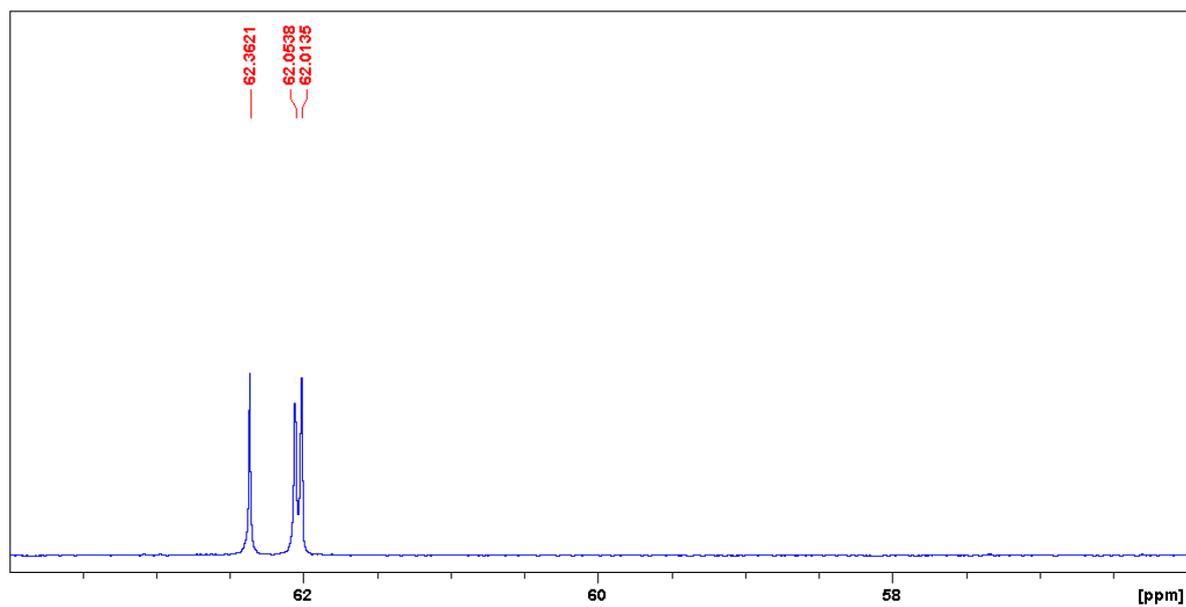


**Figura 43** – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância codificada de **MfFH-2** (A) e expansão da região de  $\delta$  64,0 a  $\delta$  56,0 (B).

**A**

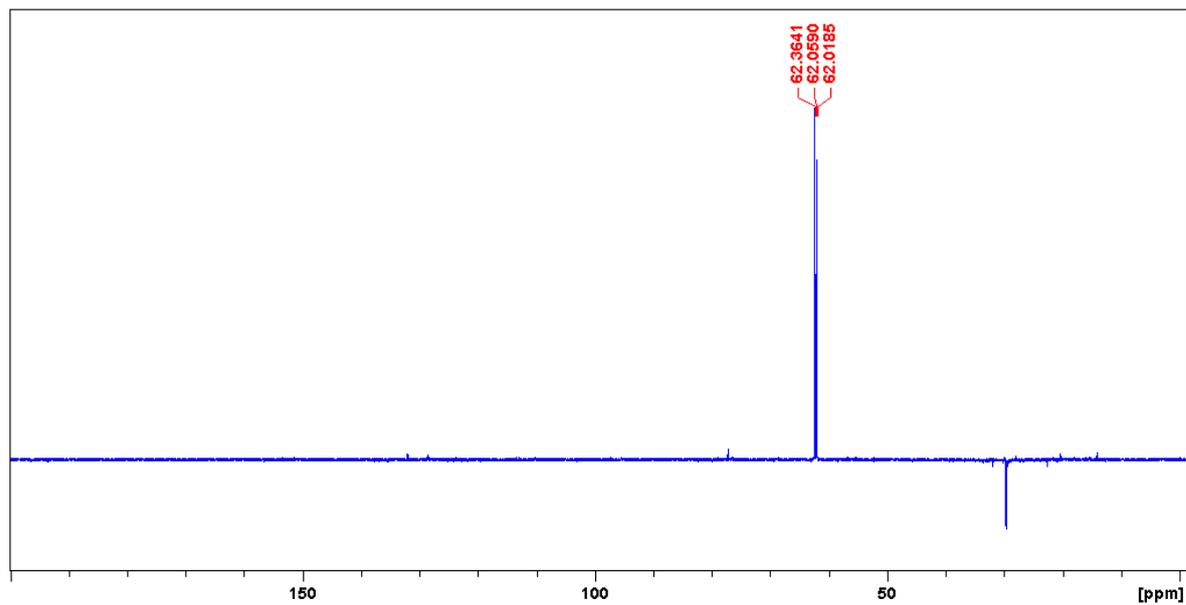


**B**

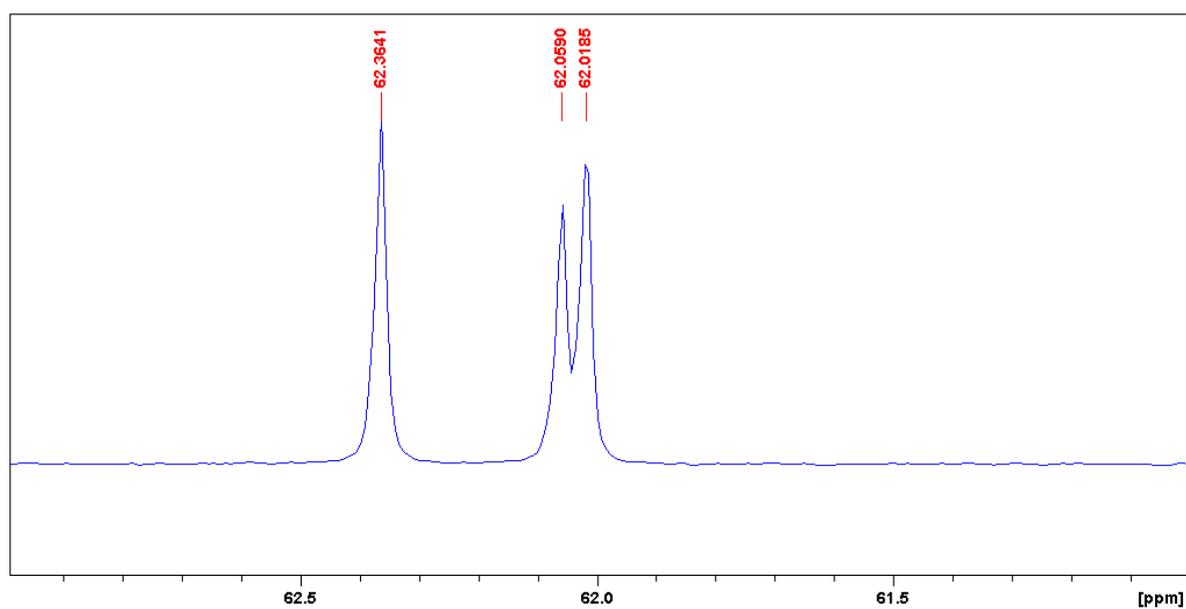


**Figura 44** – Espectro DEPT 135 (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância codificada de **MfFH-2** (A) e expansão da região de  $\delta$  63,0 a  $\delta$  61,0 (B).

**A**

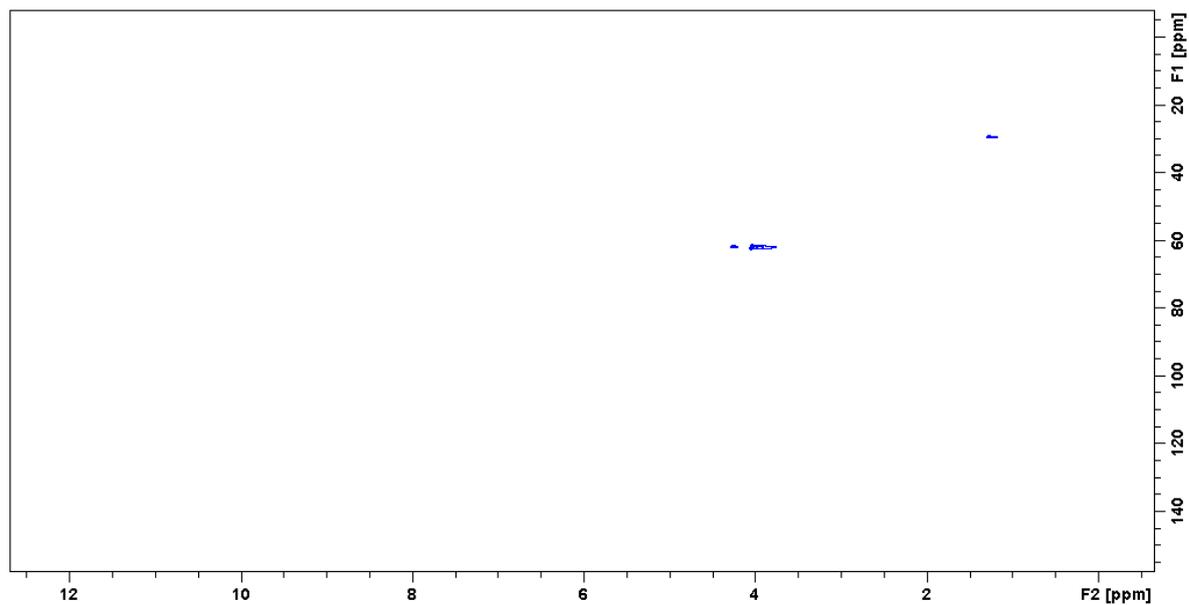


**B**

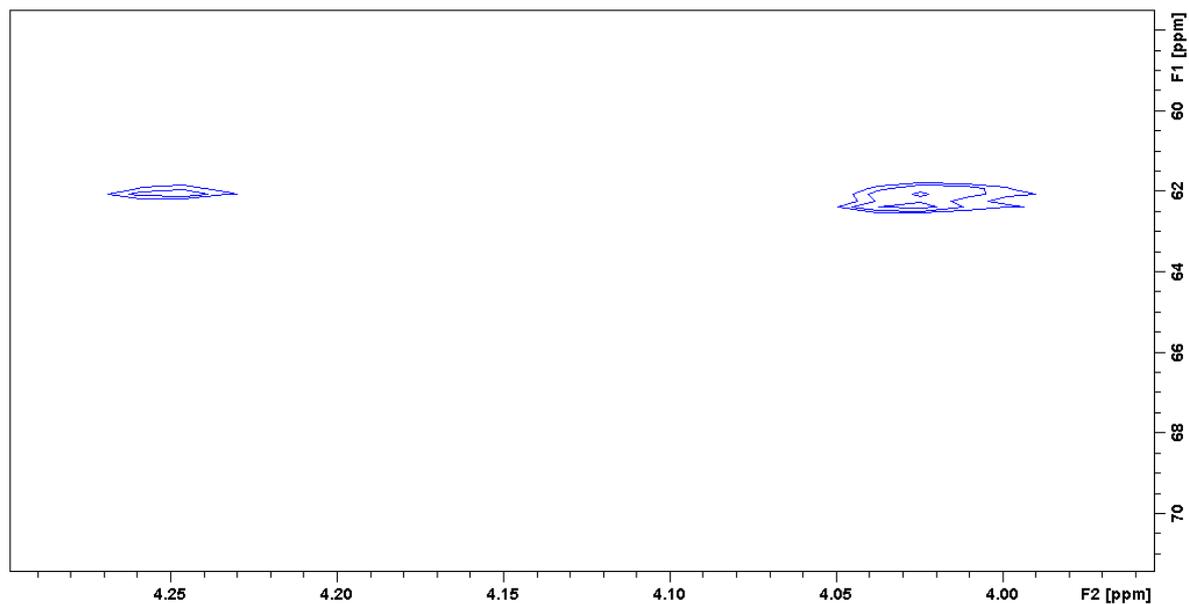


**Figura 45** – Espectros HSQC ( $^1\text{H}$ : 400;  $^{13}\text{C}$ : 100 MHz,  $\text{CHCl}_3$ ) da substância codificada de **MfFH-2 (A)** e expansão da região  $\delta$  4,3 a  $\delta$  3,9 (**B**).

**A**

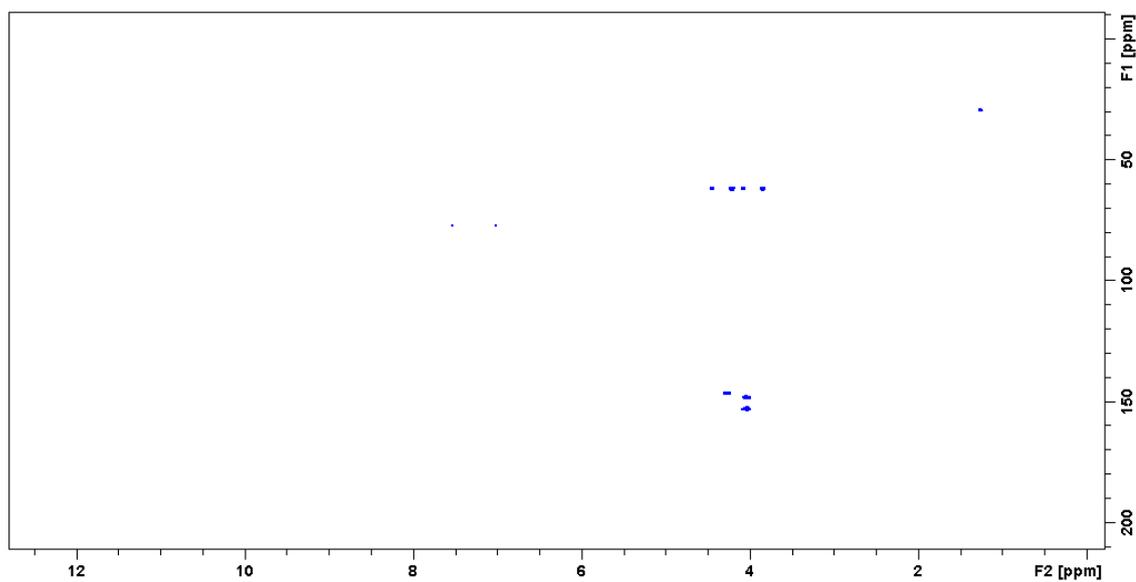


**B**

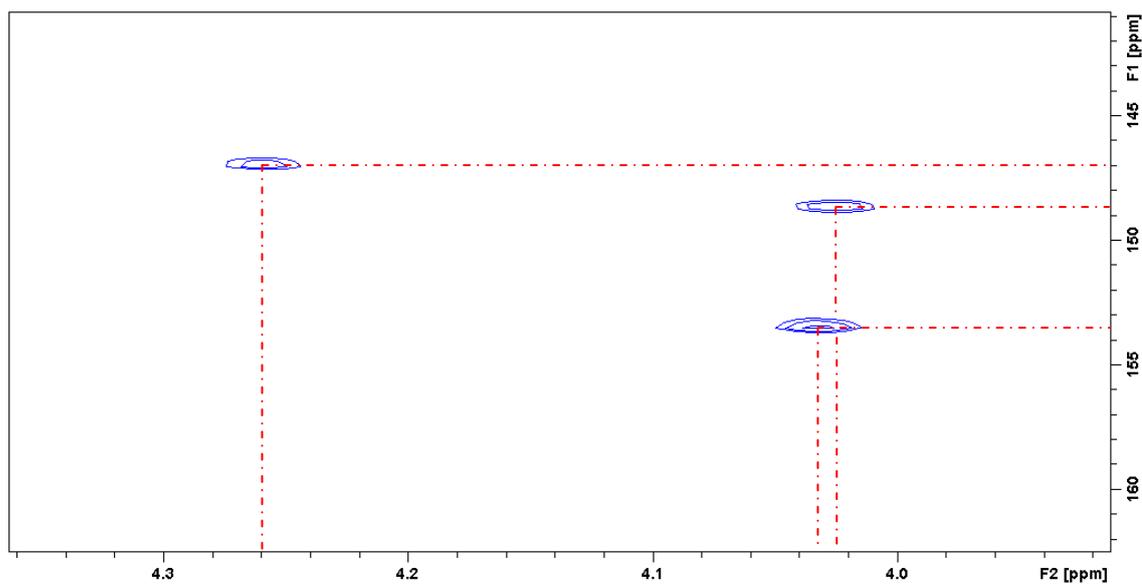


**Figura 46** – Espectros HMBC ( $^1\text{H}$ : 400;  $^{13}\text{C}$ : 100 MHz,  $\text{CHCl}_3$ ) da substância codificada de **MfFH-2 (A)** e expansão da região  $\delta$  4,3 a  $\delta$  4,4 (**B**).

**A**



**B**



#### 5.1.1.4. Identificação Estrutural da Substância Codificada de MfCC-3

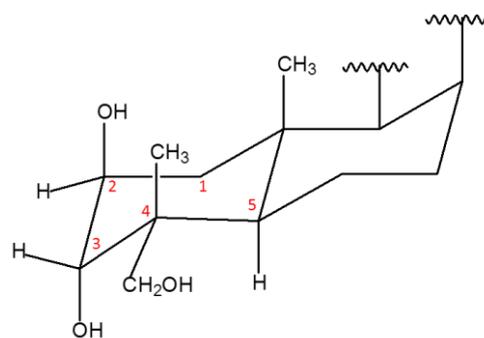
O composto codificado de **MfCC-3** teve sua estrutura elucidada como sendo um triterpeno pentacíclico da série oleanano com base na análise dos dados obtidos dos espectros de RMN, bem como pela comparação com dados de compostos modelos descritos na literatura.

A análise dos dados obtidos espectro de RMN  $^1\text{H}$  (**Figuras 47-48**) evidenciou a presença de um hidrogênio olefínico [ $\delta_{\text{H}}$  5,27 (sl)], dois hidrogênios oximetínicos [ $\delta_{\text{H}}$  3,35 (multiplicidade encoberta pelo sinal do solvente, H-3) e 3,71 (m, H-2)], dois hidrogênios oximetínicos [3,29 (d,  $J = 11,1$  Hz, H-23a) e 3,52 (d,  $J = 11,1$  Hz, H-23b)], sinais simples para seis grupos metílicos [ $\delta_{\text{H}}$  0,74; 0,79; 0,90; 0,93; 1,02 e 1,16 (s, cada)], além de vários sinais múltiplos para hidrogênios de grupos metínicos e metilênicos de carbonos alifáticos saturados (**Tabela 08**). Essa feição espectral associada à presença de um duplete alargado em  $\delta$  2,85 ( $J = 7,5$  Hz) atribuído ao H-18, cuja feição espectral associada aos demais deslocamentos químicos permitiram sugerir para **MfCC-3** esqueleto de um triterpeno pentacíclico da série oleanano.

A análise conjunta dos dados dos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  (**Figura 49**), DEPT 135 (**Figura 50**) e HSQC (**Figura 51**) permitiu reconhecer um total de trinta átomos de carbonos (08 não hidrogenados, 06 monohidrogenados, 10 dihidrogenados e 06 trihidrogenados). Dentre esses carbonos foi possível identificar valores de deslocamentos químicos condizentes com a presença de uma ligação dupla trissubstituída [ $\delta$  122,58 (CH  $\rightarrow$   $\delta_{\text{H}}$  5,27) e  $\delta$  144,51 (C)] cujos valores de deslocamentos químicos estão compatíveis com os carbonos correspondentes de um triterpeno pentacíclico de esqueleto oleanano (MAHATO & KUNDU, 1994), dois carbonos oximetínicos que absorvem em  $\delta_{\text{C}}$  68,90 e  $\delta_{\text{C}}$  78,89 que mostram correlação no mapa de contorno do espectro HSQC com os sinais em  $\delta_{\text{H}}$  3,71 e  $\delta_{\text{H}}$  3,39, respectivamente, um carbono oximetilênico ( $\delta_{\text{C}}$  67,14 que correlacionam com  $\delta_{\text{H}}$  3,29 e  $\delta_{\text{H}}$  3,52), seis grupos metílicos ( $\delta_{\text{H}}$  0,74; 1,02; 0,79; 1,16; 0,90 e 0,93 que correlacionam com  $\delta_{\text{C}}$  13,30; 17,26; 17,24; 23,78; 26,17 e 33,32, respectivamente) (**Tabela 08**). Essas correlações a uma ligação no mapa de contorno do espectro HSQC (**Figura 51**) definiram as correlações dos grupos hidroxilas, ligação dupla e das metilas presentes com seus respectivos carbonos.

A comparação dos valores de deslocamentos químicos atribuídos aos carbonos oxigenados C-2 ( $\delta$  68,90) e C-3 ( $\delta$  78,89) sugeriu configurações relativas *trans*, dos tipos  $2\beta$  ( $\delta$  68,9),  $3\alpha$ -*di*axiais ( $\delta$  78,2), para os grupos hidroxilas em C-2 e C-3, respectivamente. Caso a configuração fosse  $2\alpha$ ,  $3\beta$ - ou  $2\alpha$ ,  $3\alpha$ - ou  $2\beta$ ,  $3\beta$ -, estes carbonos absorveriam em  $\delta$  68,8 e  $\delta$  83,8;  $\delta$  66,5 e  $\delta$  78,9 e  $\delta$  71,0 e  $\delta$  78,4, respectivamente (MAHATO & KUNDU, 1994). De acordo com Kogima e Ogura (1986), a diferença de configuração em C-2 e C-3 pode ser observada não somente pelos deslocamentos químicos destes carbonos, mas principalmente pelos efeito  $\gamma$ -*gauche* de proteção sobre C-1 ( $\delta$  41,7 a 46,7) e C-5 ( $\delta$  42,8 a 51,0) (**Quadro 01**).

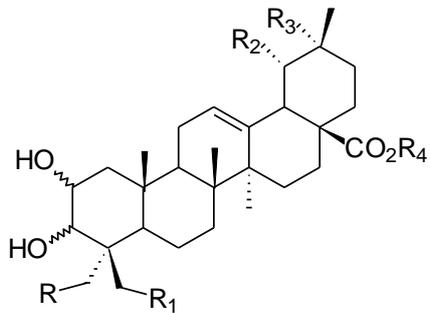
As correlações a duas e três ligações observadas no mapa de contorno do espectro HMBC (**Figura 52**), especialmente entre H-23a ( $\delta$  3,29) e H-23b ( $\delta$  3,52) com C-3 e C-5, do H-3 ( $\delta$  3,34) com C-2 e C-5 e do H-12 (5,27) com C-9, C-14 e C-18 (**Tabela 08**), além de definir as posições dos grupos hidroxilas, permitiu também atribuir sem equívoco os deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos oximetínicos e olefínico no esqueleto da molécula de **MfCC-3**.



**Anéis A e B de MfCC-3**

A análise dos dados de RMN  $^{13}\text{C}$  obtidos e a comparação dos dados de compostos modelos contendo grupos hidroxilas em C-2 e C-3 em diferentes arranjos configuracionais, possuindo ou não grupo hidroxila em C-23 ou C-24, tais como ***2\alpha,3\alpha*-dihidroxiurs-12-en-28-oato de metila**, ***2\alpha,3\alpha,23*-trihidroxiolean-12-en-28-oato de metila**, ***2\alpha,3\alpha,24*-trihidroxiolean-12-en-28-oato de metila** e ***Asiatato de metila*** (**Quadro 01**) permitiu propor para **MfCC-3** a estrutura do ***Ácido 2\beta,3\alpha,23*-trihidroxi-olean-12-en-28-óico**, possivelmente um novo produto natural.

**Quadro 01** – Comparação de deslocamentos químicos de RMN  $^{13}\text{C}$  de **MfCC-3** com compostos modelos (KOGIMA & OGURA, 1986; MAHATO & KUNDU, 1994; SONG et al., 2007).

				
	C-1	C-5	C-23	C-24
	$\delta$	$\delta$	$\delta$	$\delta$
<b><i>2<math>\beta</math>,3<math>\alpha</math>-dihidroxiolean-12-en-28-óico (MfCC-3)</i></b> R = OH, R <sub>1</sub> = R <sub>2</sub> = R <sub>4</sub> = H, R <sub>3</sub> = Me	<b>46,70</b>	<b>48,06</b>	67,14	13,30
<b><i>Ácido 2<math>\beta</math>,3<math>\alpha</math>,23-trihidroxiurs-12-en-28-óico</i></b> R = OH, R <sub>1</sub> = R <sub>2</sub> = R <sub>4</sub> = H, R <sub>3</sub> = Me	47,9	47,8	<b>66,3</b>	<b>14,4</b>
<b><i>Ácido 2<math>\alpha</math>,3<math>\alpha</math>,23-trihidroxiolean-12-en-28-óico</i></b> R = OH, R <sub>1</sub> = R <sub>2</sub> = R <sub>3</sub> = R <sub>4</sub> = H	41,7	42,6	<b>71,5</b>	<b>17,5</b>
<b><i>2<math>\alpha</math>,3<math>\alpha</math>,24-trihidroxiolean-12-en-28-oato de metila</i></b> R <sub>1</sub> = OH, R = R <sub>2</sub> = H, R <sub>3</sub> = R <sub>4</sub> = Me	42,0	49,0	<b>23,7</b>	<b>66,0</b>
<b><i>Ácido 2<math>\beta</math>,3<math>\beta</math>,23-trihidroxiolean-12-en-28-óico</i></b> R = OH, R <sub>1</sub> = R <sub>2</sub> = H, R <sub>3</sub> = R <sub>4</sub> = CO <sup>2</sup> H	44,8	48,5	<b>67,8</b>	<b>14,4</b>
<b><i>2<math>\alpha</math>,3<math>\alpha</math>-dihidroxiolean-12-en-28-oato de metila</i></b> R = R <sub>1</sub> = R <sub>2</sub> = H, R <sub>3</sub> = R <sub>4</sub> = Me	41,7	48,1	<b>28,5</b>	<b>21,9</b>
<b><i>2<math>\alpha</math>,3<math>\alpha</math>-dihidroxiurs-12-en-28-oato de metila</i></b> R = R <sub>1</sub> = R <sub>3</sub> = H, R <sub>2</sub> = R <sub>4</sub> = Me	42,2	48,5	<b>28,6</b>	<b>22,2</b>
<b><i>Asiatato de metila (2<math>\alpha</math>,3<math>\beta</math>)</i></b> R = OH, R <sub>1</sub> = R <sub>3</sub> = H, R <sub>2</sub> = R <sub>4</sub> = Me,	46,7	48,8	<b>69,3</b>	<b>13,1</b>

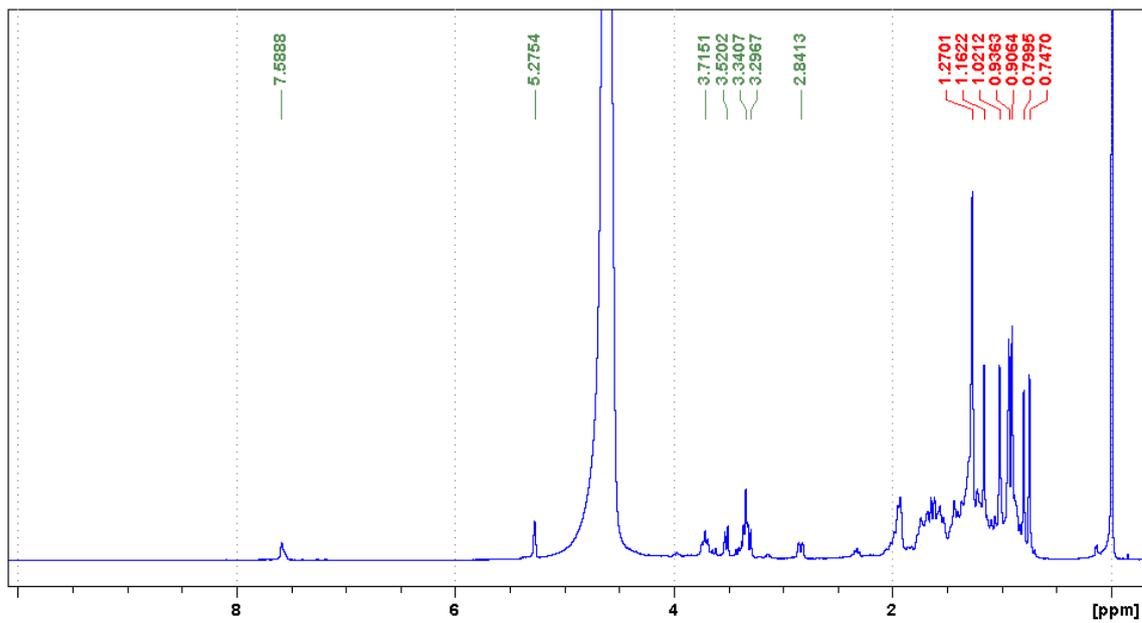
**Tabela 08** – Dados de RMN da substância **MfCC-3** em comparação com dados do **Ácido 2β,3α,23-trihidroxiurs-12-en-28-óico** (A; C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N; SONG et al., 2007), **2α,3α,23-Trihidroxiolean-12-en-28-oato de metila** (B) e **2α,3α,24-Trihidroxiolean-12-en-28-oato de metila** (C) (MAHATO & KUNDU, 1994).

Posição	δ <sub>c</sub>	MfCC-3 δ <sub>H</sub> /(HSQC)	HMBC J <sup>2</sup> H e J <sup>3</sup> H	A δ <sub>c</sub>	B δ <sub>c</sub>	C δ <sub>c</sub>
<b>C</b>						
4	46,86			43,7	41,1	41,4
8	41,79			40,0	39,7	39,3
10	38,41			38,3	38,2	38,0
13	144,51			139,3	144,4	143,7
14	42,29			42,5	42,0	41,6
17	46,70			48,1	47,0	46,6
20	31,06			39,4	30,8	30,6
28	181,32			180,1	178,7	178,2
<b>CH</b>						
2	68,90	3,71(m)		68,9	66,7	66,2
3	78,89	3,34*	C-2 e C-24	78,0	78,8	78,3
5	48,06			47,8	42,6	48,6
9	48,10			48,1	47,7	47,4
12	122,58	5,27 (s)	C-9, C-14 e C-18	125,5	122,4	121,9
18	41,79	2,85 (dl, J = 11,2)	C-12, C-13	53,5	41,6	41,4
<b>CH<sub>2</sub></b>						
1	46,70	2,32 (dl, J = 7,5); 1,33 (m)		47,9	41,7	41,4
6	18,57			18,5	18,0	18,2
7	33,04			31,2	32,6	32,7
11	23,44			23,8	23,2	23,4
15	28,08			28,6	27,9	27,5
16	23,91			24,9	23,6	22,9
19	46,46			39,5	46,2	45,7
21	34,31			31,1	34,1	33,7
22	32,62			33,2	32,4	32,2
23	<b>67,14</b>	3,29 e 3,52 (d, J = 11,1)	C-3 e C-24	<b>66,3</b>	<b>71,5</b>	-
<b>CH<sub>3</sub></b>						
23	-	-		-	-	<b>22,0</b>
24	<b>13,30</b>	0,74 (s)		<b>14,4</b>	<b>17,5</b>	<b>65,5 (CH<sub>2</sub>)</b>
25	17,26	1,02 (s)		17,6	16,8	16,6
26	17,24	0,79 (s)		17,5	17,1	16,6
27	26,17	1,16 (s)		23,9	26,2	25,9
29	33,32	0,90 (s)		21,4	33,2	33,0
30	23,78	0,93 (s)		17,6	23,8	23,5

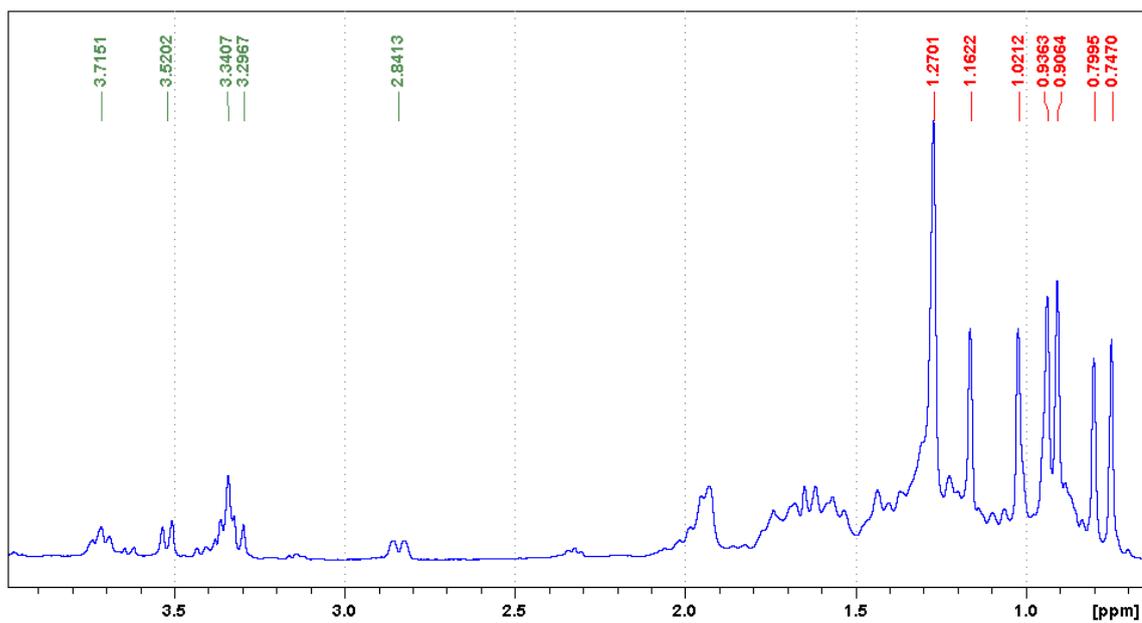
Nota: (<sup>1</sup>H: 400; <sup>13</sup>C: 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD); s = simpleto; sl = simpleto largo; m = multipeto; \* sobreposto com o sinal do solvente.

**Figura** – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da Substância **MfCC-3** (A) e expansão da região de  $\delta$  3,7 a  $\delta$  0,7 (B).

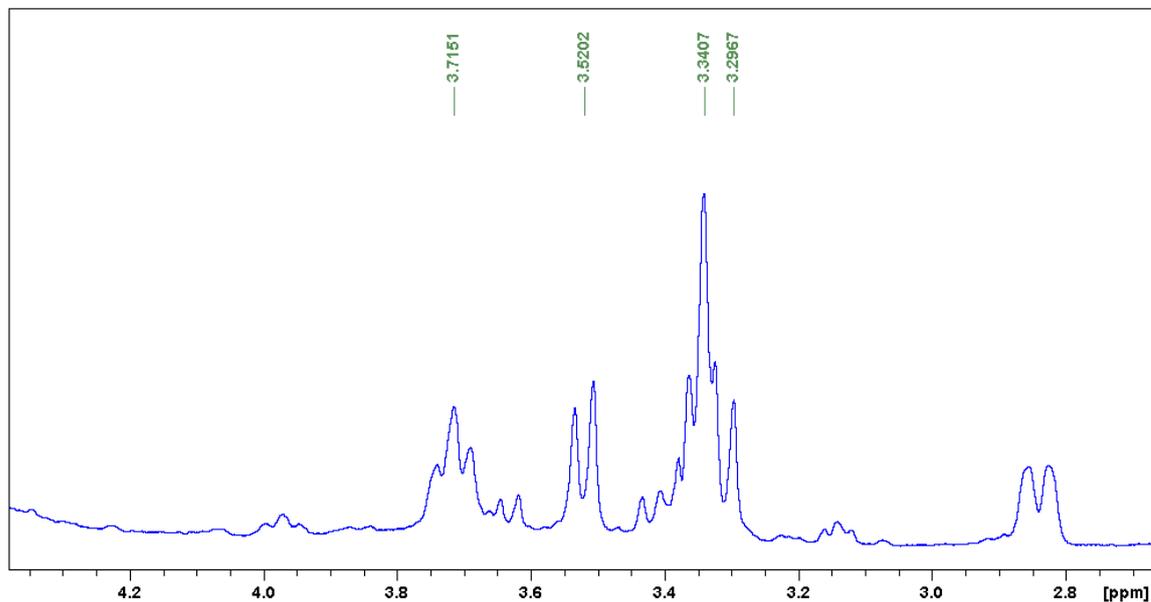
(A)



(B)

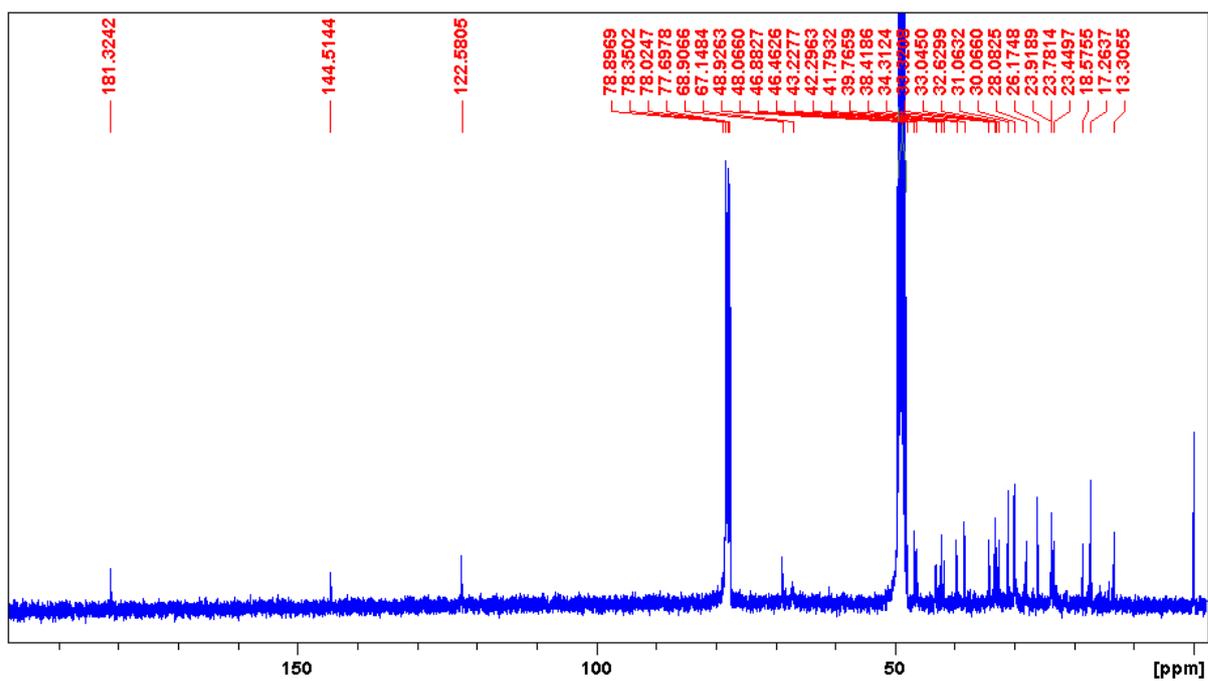


**Figura 48** – Expansão da região de  $\delta$  4,3 a  $\delta$  2,7 do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da Substância codificada **MfCC-3**



**Figura 49** – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância **MfCC-3** (A) e expansão da região de  $\delta$  50,0 a  $\delta$  13,0 (B).

**A**



Continuação da Figura 49:

(B)

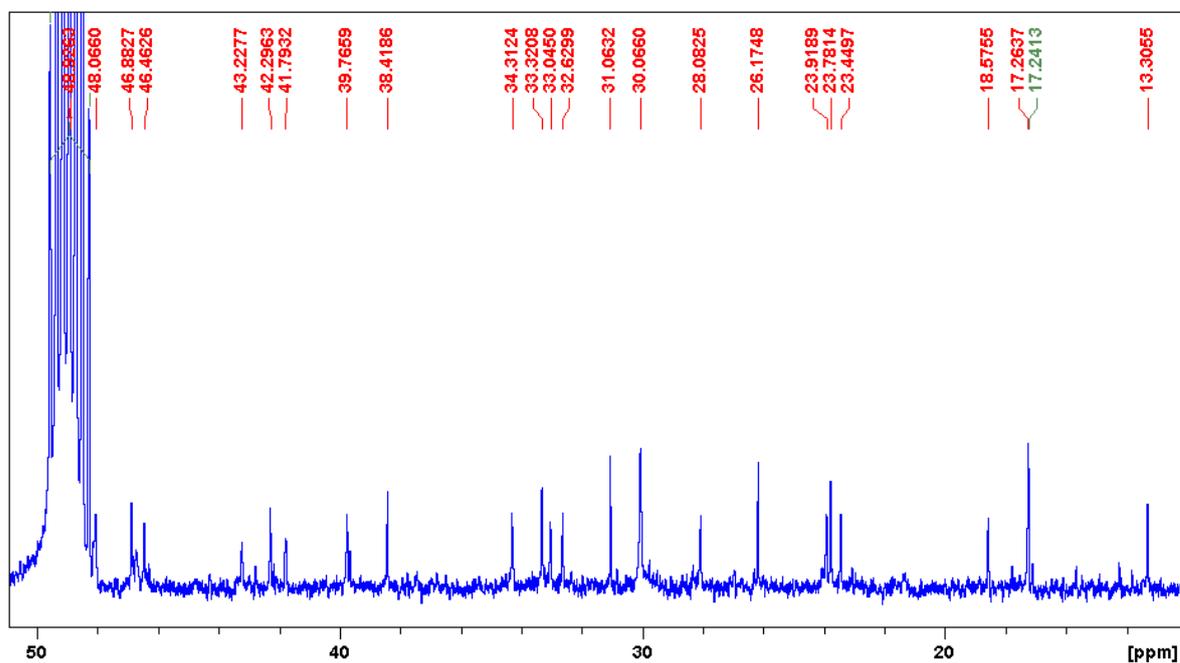
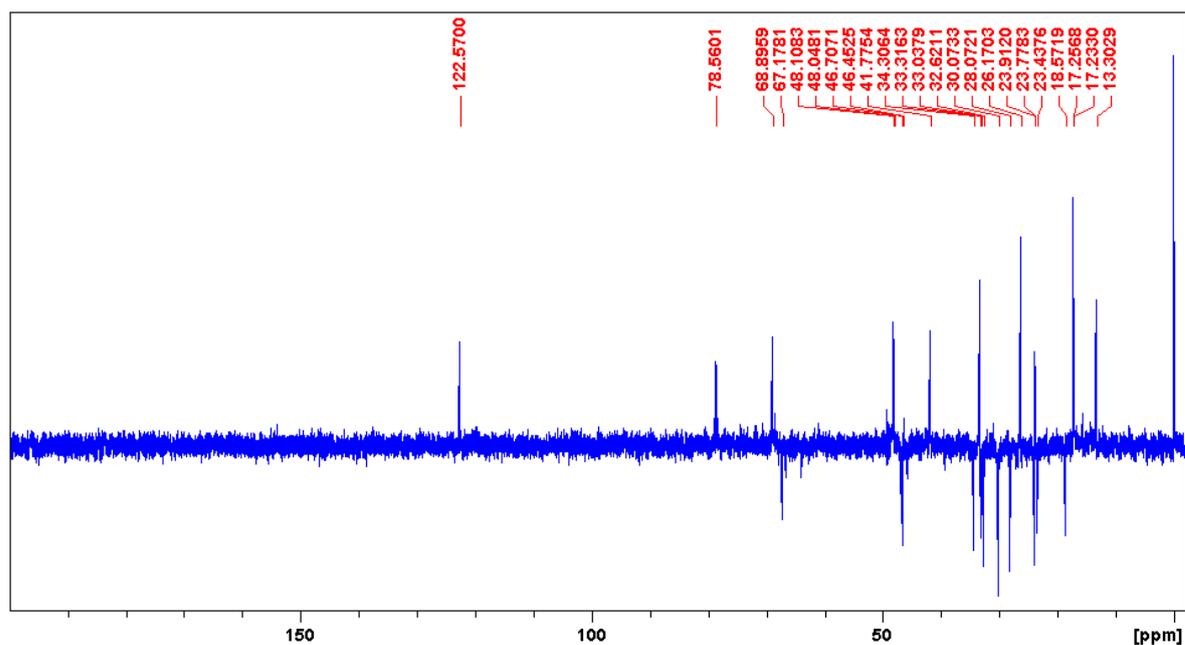


Figura 50 – Espectro DEPT 135 (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da substância MfCC-3 (A) e expansão da região de  $\delta$  80,0 a  $\delta$  13,00 (B).

A



Continuação da Figura 50:

(B)

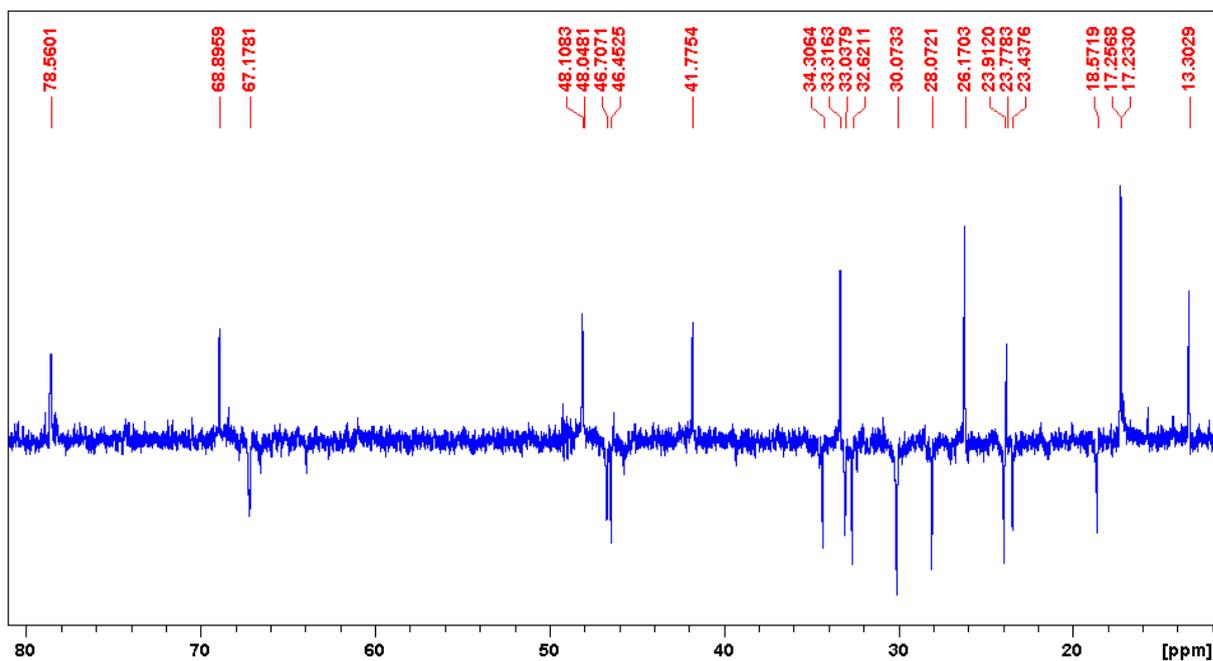
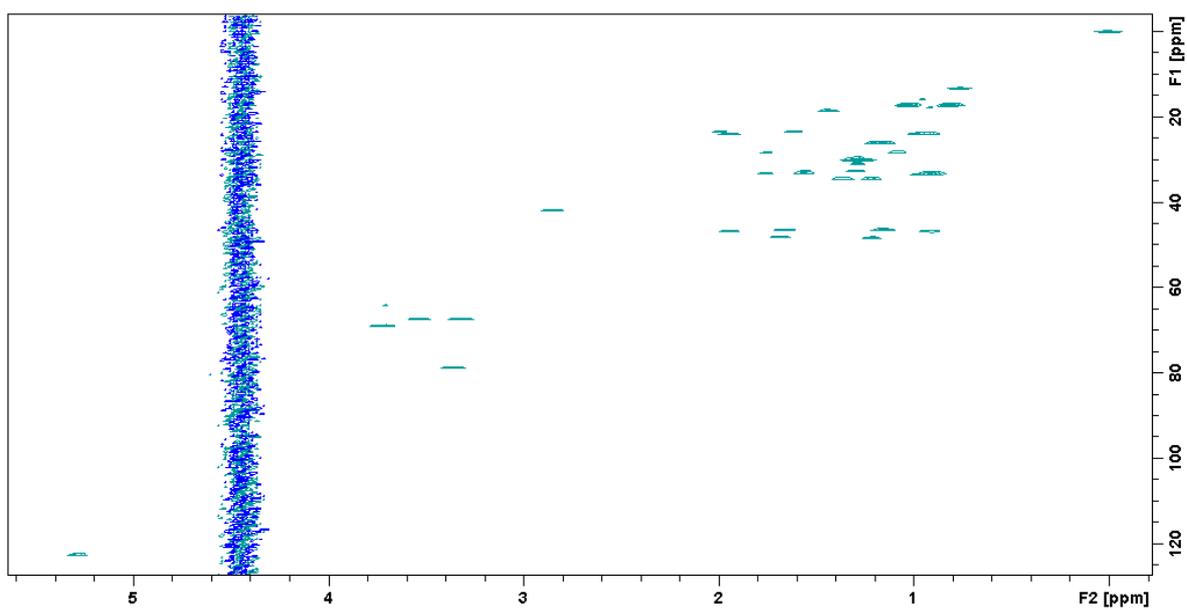


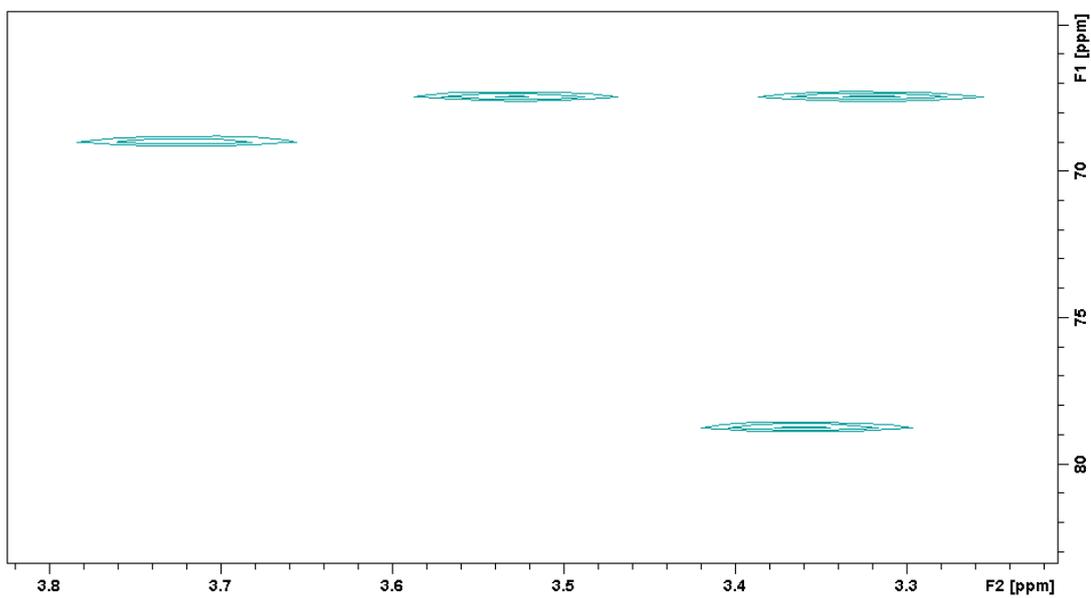
Figura 51 – Espectro HSQC ( $^1\text{H}$ : 400;  $^{13}\text{C}$ : 100 MHz,  $\text{CHCl}_3$ ) da substância **MfCC-3** (A) e expansão das regiões  $\delta$  3,8 a 3,2 (B) e  $\delta$  2,1 a 0,6 (C).

(A)

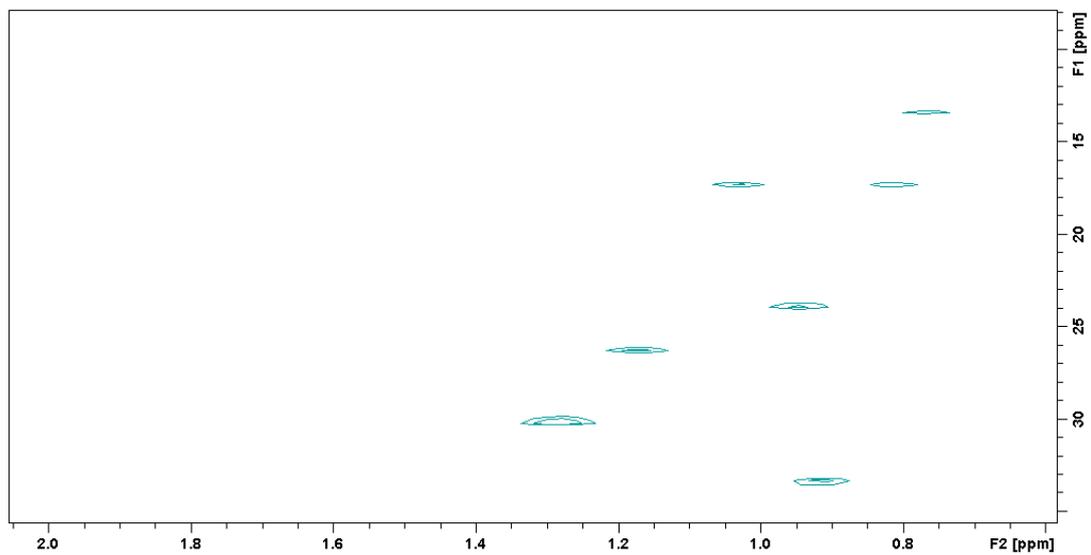


Continuação da Figura 51:

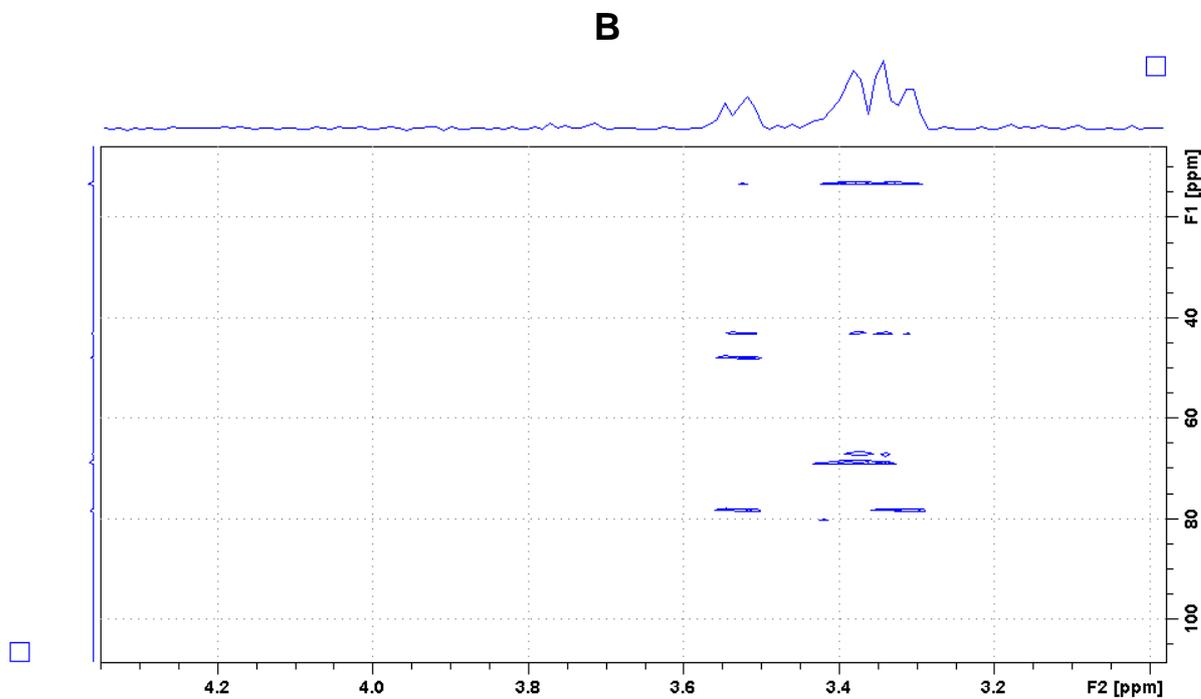
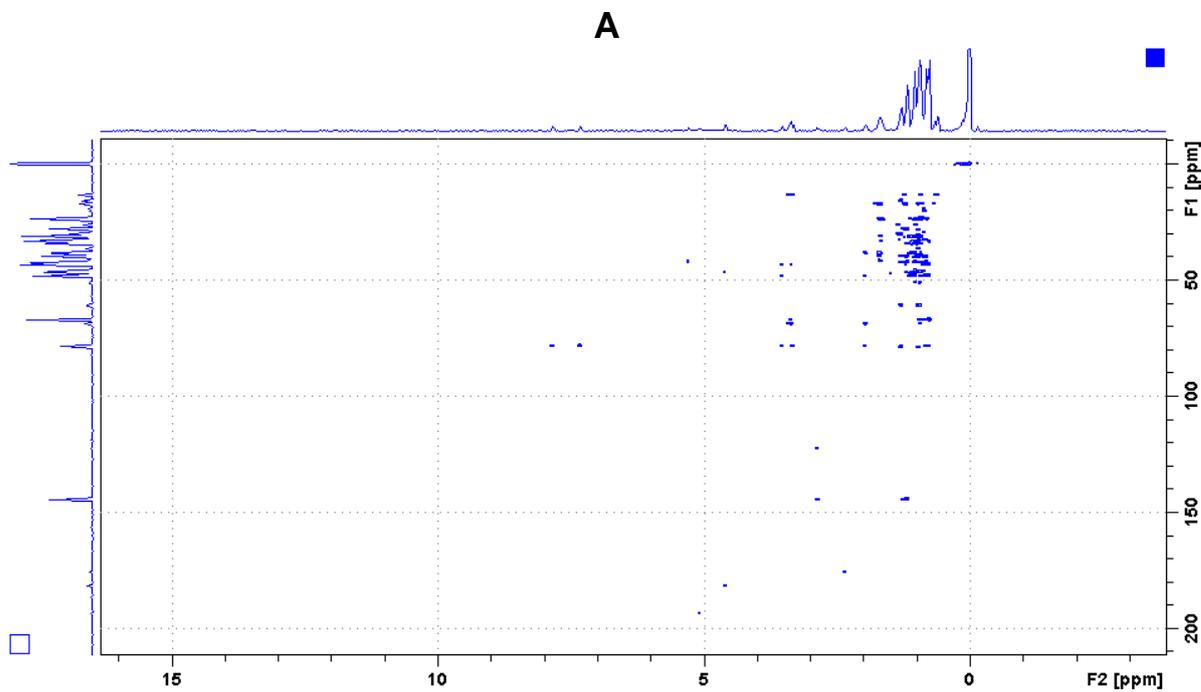
(B)



(C)



**Figura 52** – Espectro HMBC ( $^1\text{H}$ : 400;  $^{13}\text{C}$ : 100 MHz,  $\text{CHCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância **MfCC-3** (A) e expansão da região  $\delta$  4,2 a 3,2 (B).



## 5.2. Resultados dos Ensaio Biológicos Efetuados

### 5.2.1. Atividade Antibacteriana de Extratos, Frações e Compostos Isolados.

A atividade antibacteriana de extratos brutos e frações de partição das folhas caule de *M. ferruginea* foi inicialmente avaliada pelo método de difusão em Ágar e a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) das amostras que forneceram resultados promissores frente a cepas de bactérias testadas (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. faecalis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *E. aerogenes*) foi realizada segundo a metodologia da microdiluição em caldo descrita por Ayres e cols. (2008) e as normas padrão do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012a).

A **Tabela 09** mostra os resultados desses ensaios. Dentre as amostras avaliadas, o extrato bruto em acetona das folhas mostrou moderada atividade frente a *S. epidermidis* (CIM 125 µg/mL) e a fração em hexano proveniente deste extrato também evidenciou moderada atividade frente ao mesmo microrganismo (CIM 125 µg/mL). Desta fração, os compostos identificados como *Lupeol* (**MfFH-1**), ácido hexacoruloelágico (**MfFH-2**) foram isolados. Por outro lado, as frações em CHCl<sub>3</sub> e em MeOH-H<sub>2</sub>O provenientes da partição deste extrato apresentaram somente fraca atividade frente à *S. epidermidis* (CIM 500 µg/mL). Da fração em CHCl<sub>3</sub> foram isolados, além do *Lupeol* puro (**MfFH-1**) e em mistura com o *3β-Betulinaldeído* (**MfFC-4**)/(**MfFH-1**), o *Ácido 3β-Betulínico* (**MfFC-2**). Estes compostos também foram avaliados frente a *S. epidermidis* e não mostraram qualquer atividade inibitória até a concentração de 1000 µg/mL. Esses resultados sugerem que outros constituintes químicos com potencial antibacteriano podem estar presentes nas amostras ativas. Os demais extratos e frações oriundas das folhas foram inativos para todas as demais bactérias Gram-positivas e Gram-negativas testadas (zona de inibição < 9 mm ou CIM ≥ 1000 µg/mL). Os resultados relacionados com as bactérias Gram-negativas podem ser atribuídos à resistência da membrana externa destes microrganismos que serve como barreira de impermeabilidade para certos antibióticos.

O extrato bruto em EtOH do caule exibiu fraca atividade frente a *S. aureus* (CIM 500 µg/mL) e moderada frente a *S. epidermidis* (CIM 125 µg/mL). Este extrato foi particionado e as frações resultantes também se mostraram efetivas frente a estes microrganismos [*S. aureus* [AcOEt (CIM 500 µg/mL) e a *S. epidermidis*

[Hexano (500 µg/mL), CHCl<sub>3</sub> e AcOEt (CIM 7,8 µg/mL) e MeOH (CIM 125 µg/mL); (Tabela 09). Destas frações, alguns compostos foram isolados como **MfCH-1a**, **MfCH-1b** e **MfCH-2**, identificados respectivamente como: *β-sitosterol*, *stigmasterol* e *daucosterol*; **MfCC-2** como sendo o *3β-Betulinol* e **MfCC-3** possivelmente como *Ácido 2β,3α,23-trihidroxi-olean-12-en-28-óico*.

**Tabela 09 –Diâmetro das zonas de inibição e suas respectivas concentrações inibitórias mínimas (CIM) de extratos e frações que forneceram os melhores resultados nos ensaios antibacterianos.**

Amostras <sup>a</sup>	<i>Microrganismos</i>			
	<i>S. aureus</i>		<i>S. epidermidis</i>	
	Zona de inibição (mm ± DP) <sup>c</sup>	CIM (µg/mL)	Zona de inibição (mm ± DP) <sup>c</sup>	CIM (µg/mL)
<b>Folhas</b>				
Ext. acetona	12,0 ± 0,0	1000	22,3 ± 0,5	125
Fr. Hexano	12,0 ± 0,0	1000	21,0 ± 0,0	125
Fr. CHCl <sub>3</sub>	(-)	1000	15,7 ± 3,4	500
Fr. MeOH-H <sub>2</sub> O	15,7 ± 1,8	1000	22,3 ± 3,3	500
<b>Caule</b>				
Ext. EtOH <sup>b</sup>	17,0 ± 1,6	500	14,0 ± 0,0	125
Fr. Hexano <sup>b</sup>	9,0 ± 0,0	1000	25,3 ± 0,5	500
Fr. CHCl <sub>3</sub>	13,3 ± 1,3	1000	10,7 ± 0,5	7,8
Fr. AcOEt	14,0 ± 0,8	500	10,3 ± 0,5	7,8
Fr. MeOH-H <sub>2</sub> O	16,0 ± 1,6	1000	12,0 ± 0,0	125

(-) Ausência de zona de inibição; <sup>a,b</sup> solventes usados na dissolução das amostras (<sup>a</sup> DMSO 10% ou <sup>b</sup> cremofor 10% – controles negativos); <sup>c</sup> halos de inibição de crescimento em mm [média ± desvio padrão (DP; resultados experimentais representam a média de triplicata)]. Controles positivos utilizados: ciprofloxacina (5 µg; 37 mm/*P. aeruginosa* e 42 mm/*E. coli*) e ceftriaxona (30 µg; 32 mm/*S. aureus* e *S. epidermidis*). (Fonte: Autora desta Tese, 2016).

O uso de plantas medicinais para tratamento de feridas, doenças infecciosas causadas por bactérias, fungos e vírus tem sido uma prática comum (KUMAR & VIDYASAGAR, 2008). Embora tenham ocorrido muitos avanços tecnológicos, o uso de medicamentos para tratamento de doenças baseado em produtos de origem natural ainda é de uso frequente (DAVIS; PEREZ, 2009). Ademais, o uso indiscriminado de antibióticos para tratamento de doenças infecciosas e a prevalência da resistência de bactérias patogênicas a múltiplas drogas vem aumentando e tem tornado necessário o desenvolvimento de novos agentes antibacterianos (NOVAIS et al., 2003).

Nos ensaios antibacterianos, dos seis microrganismos testados, os extratos mostraram atividade somente contra as bactérias *S. aureus* e *S. epidermidis*, agentes infecciosos mais comumente encontrados em unidades de terapias intensivas (UTIs) (MICHELIM et al., 2005). Suas ocorrências em hospitais, clínicas médicas e UTIs são consideradas importantes problema no Brasil e no mundo. Ademais, estafilococos incluem uma série de espécies patogênicas oportunistas que normalmente causam infecções nosocomial (OTTO, 2004). Estes tipos de infecções estão associados a um grande número de morbidade e mortalidade (INWEREGBU, DAVE & PITTARD, 2005; DOGANLI, 2016) e a um aumento crescente na resistência de antibióticos associados com as infecções em UTIs. Assim, doenças infecciosas, incluindo as bacterianas, continuam a ser um sério problema de saúde pública e isto justifica a pesquisa em busca de novos agentes terapêuticos de fonte natural.

De um modo geral, independente do método de avaliação utilizado, os melhores resultados, tanto com extratos das folhas quanto do caule, foram obtidos frente às bactérias Gram-positivas *S. aureus* e *S. epidermidis*. Em relação a *E. faecalis* e as bactérias Gram-negativas testadas, todos os extratos se mostraram inativos (total ausência de sensibilidade ou zona de inibição < 9 mm ou CIM igual a 1000 µg/mL). Embora a ceftriaxona (controle positivo utilizado) tenha apresentado um significativo halo de inibição (32 mm), os resultados obtidos, especialmente frente a *S. epidermidis*, também podem ser considerados promissores uma vez que a droga de referência se encontra pura enquanto que os extratos/frações são constituídos por misturas complexas de diferentes substâncias químicas, presentes nestes em baixa concentração e, portanto, não apresentando resultados próximos ou superiores aos da droga controle utilizada. Desta feita, os resultados do presente

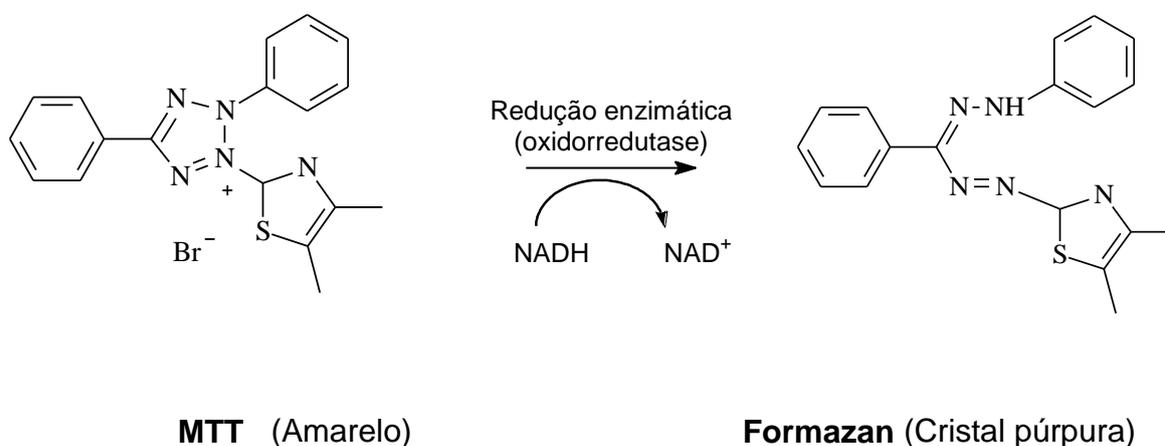
trabalho sugerem que *M. ferruginea* tem potencial para combater a resistência e as infecções bacterianas causadas principalmente por *S. epidermidis*. Entretanto, estudos posteriores complementares com os constituintes majoritários isolados serão necessários para uma melhor confirmação e conclusão dos resultados.

## 5.2.2. Viabilidade celular de extratos, frações e compostos isolados sobre células fibroblastos (3T3) e de macrófagos (J774)

### 5.2.2.1 Efeito sobre células fibroblastos (3T3)

Com objetivo de avaliar a viabilidade celular de extratos brutos, frações e alguns dos compostos isolados sobre a viabilidade de células fibroblastos (3T3) e de macrófagos (J774) ensaios utilizando o método do MTT foram efetuados. O MTT é um método colorimétrico rápido, considerado sensível e barato e amplamente utilizado para avaliar este tipo de efeito tanto em extratos quanto em compostos puros (ARAUJO et al., 2014; BONFIM et al., 2014), cuja análise se baseia na conversão do sal de MTT em azul de formazan (**Figura 53**) a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. A avaliação indireta da viabilidade celular ocorre através do dano causado na mitocôndria, uma vez que a enzima succinato desidrogenase, presente nesta organela, é responsável pela clivagem do sal tetrazólio, resultando na formação de cristais de formazan, responsáveis pela coloração roxa, presente nas células vivas.

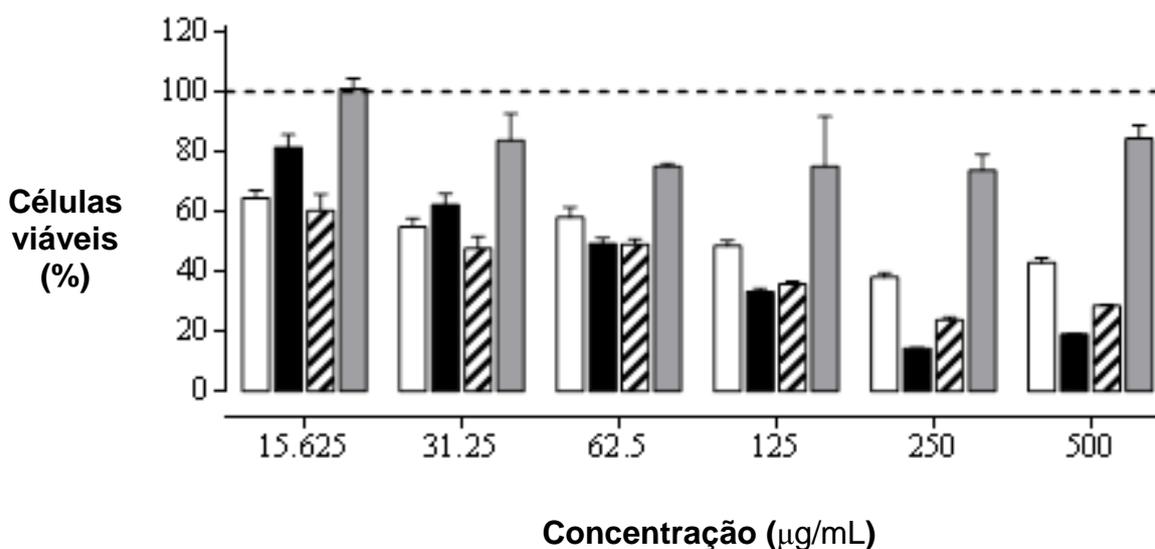
**Figura 53 – Representação esquemática da reação de redução do MTT**



Fonte: RIBEIRO, et al., 2013.

Conforme pode ser observado na **Figura 54**, o extrato bruto em acetona, bem como a fração em  $\text{CHCl}_3$  das folhas não apresentaram boa viabilidade celular em nenhuma das concentrações testadas (15,625 a 500  $\mu\text{g/mL}$ ). Para o extrato bruto, e a fração  $\text{CHCl}_3$  o percentual de células viáveis variaram em torno de 65 a 40% nas concentrações de 15,625 a 500  $\mu\text{g/mL}$ , enquanto que para as frações em hexano variaram entre 80 e 20% em concentrações de 15,625 a 500  $\mu\text{g/mL}$ . Por outro lado, a fração hidroalcóolica mostrou uma ligeira redução da viabilidade celular de (80%) para concentrações de 31,2 a 500  $\mu\text{g/mL}$  entretanto na menor concentração avaliada (15,625  $\mu\text{g/mL}$ ) apresentou boa viabilidade.

**Figura 54** – Efeito do extrato bruto em acetona e frações de partição das folhas de *M. ferruginea* sobre a viabilidade de células 3T3 pelo método do MTT. As barras expressam a media de três experimentos independentes e a linha tracejada representa a viabilidade de células não tratadas.

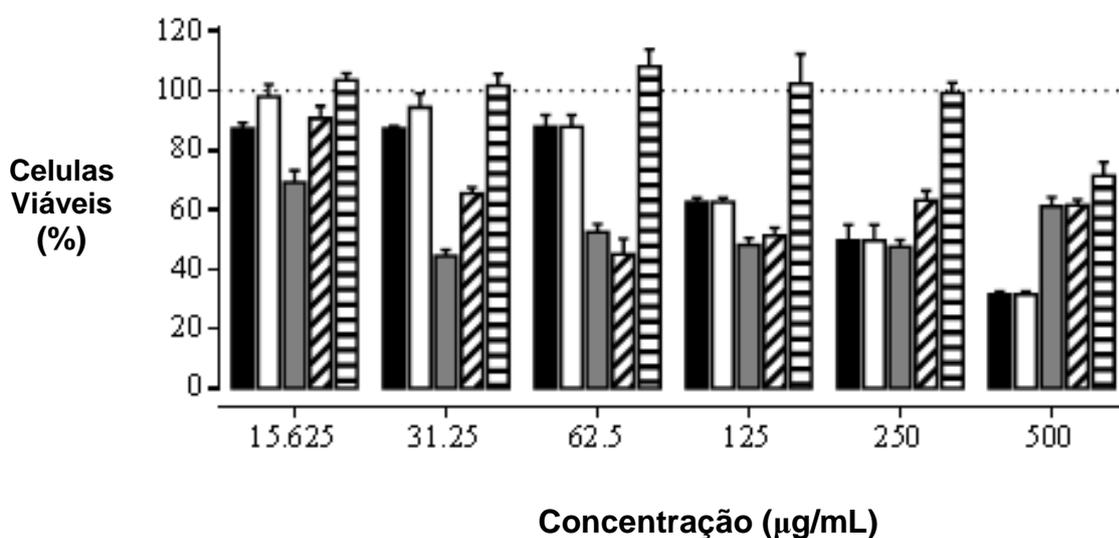


**Legenda:** □ Ext. Acetona    ■ Fr. Hexano    ▨ Fr.  $\text{CHCl}_3$     ■ MeOH- $\text{H}_2\text{O}$

Conforme mostra a **Figura 55**, o extrato bruto em EtOH do caule, bem como sua fração em hexano, nas concentrações de 15,625, 31,25 e 62,5  $\mu\text{g/mL}$ , mantiveram o nível de viabilidade celular acima de 80% enquanto que nas concentrações de 125, 250 e 500  $\mu\text{g/mL}$  essas amostras reduziram a viabilidade celular para valores inferiores a 60%. A fração em AcOEt apresentou-se promissora na menor concentração testada (15,625  $\mu\text{g/mL}$ ), porém em concentrações superiores a 31,25  $\mu\text{g/mL}$  a viabilidade celular foi reduzida para valores inferiores a

60%. Por outro lado, a fração em  $\text{CHCl}_3$ , em todas as concentrações testadas, a redução da viabilidade celular variou de 70% a 40% e a fração em MeOH- $\text{H}_2\text{O}$ , nas concentrações de 15,625 a 125  $\mu\text{g/mL}$  apresentou-se viável, no entanto na concentração de 500  $\mu\text{g/mL}$  a viabilidade celular diminuiu para 70% (Figura 55).

**Figura 55 – Efeito pelo método do MTT do extrato bruto em EtOH e frações de partição do caule sobre a viabilidade de células 3T3. As barras expressam a média de três experimentos independentes e a linha tracejada representa a viabilidade de células não tratadas.**



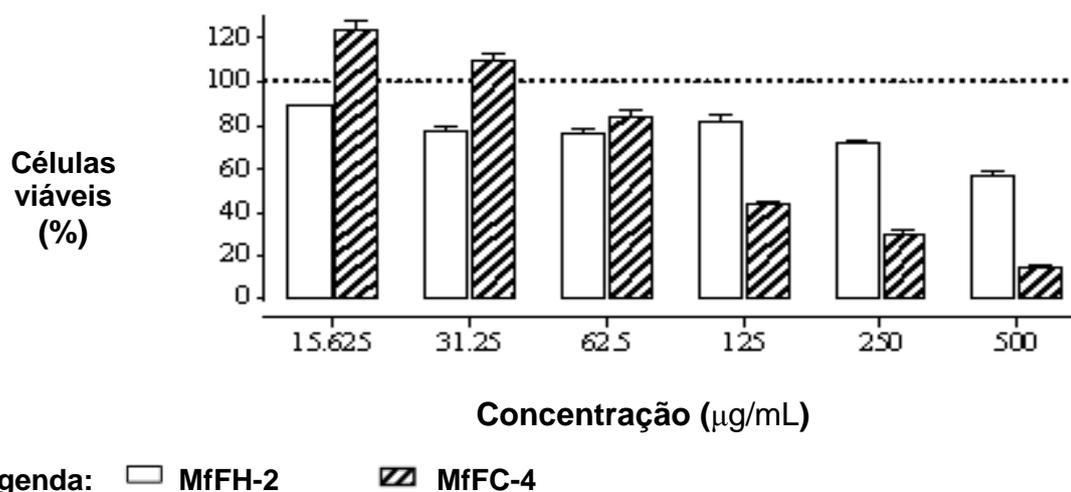
**Legenda:** ■ Ext. EtOH □ Fr. Hexano ■ Fr.  $\text{CHCl}_3$  ▨ Fr. AcOEt ▩ MeOH- $\text{H}_2\text{O}$

Os processos infecciosos cutâneos são essenciais na homeostase da pele e quando não são bem regenerados podem ocasionar infecção e doenças crônicas resultando em diminuição da qualidade de vida e morbidade (ESPOSITO *et al.*, 2013). Fibroblastos são os principais tipos de células envolvidas na regulação de angiogênese que ocorre durante o processo de cicatrização de feridas. Este processo é complexo e dinâmico no qual a proliferação e a migração desempenham papéis fundamentais na regeneração de feridas (DARBY *et al.*, 2014). Embora a cicatrização de feridas raramente seja vista como um problema em indivíduos saudáveis, a crescente incidência de doenças como diabetes e obesidade poderá acarretar um aumento da ocorrência de feridas crônicas (PONNUSAMY *et al.*, 2015). Apesar dos avanços na indústria farmacêutica, a disponibilidade de medicamentos capazes de estimular o processo de cicatrização de feridas ainda é limitada. Além

disso, o elevado custo da terapia e a presença de efeitos secundários indesejados tornam o tratamento de feridas crônicas um outro problema importante (BASTOS et al., 2011). Conseqüentemente, há um crescente interesse em encontrar extratos de plantas e/ou compostos isolados eficazes para o processo de cicatrização de feridas.

Embora os resultados envolvendo as frações em hexano e em  $\text{CHCl}_3$  das folhas não tenham sido promissores em relação a viabilidade de células fibroblastos 3T3, compostos puro e em mistura binária isolados destas frações foram avaliados. Os resultados mostraram que o tratamento das células com o composto codificado de **MfFH-2** (*Ácido hexametilcoruleoelágico*), em concentrações que variaram de 15,625 a 500  $\mu\text{g/mL}$ , inibiu a viabilidade celular (**Figura 56**) enquanto que a amostra codificada de **MfFC-4**, contendo a mistura de *Lupeol* e *3 $\beta$ -Betulinaldeído* mostrou inibição da viabilidade celular somente em concentrações superiores a 62,5  $\mu\text{g/mL}$  (**Figura 56**).

**Figura 56** – Efeito pelo método do MTT de MfFH-2 (*Ácido hexametilcoruolaelágico*) e da mistura MfFC-4 (*Lupeol* e *3 $\beta$ -Betulinaldeído*) sobre a viabilidade de células 3T3. As barras expressam a média de três experimentos independentes e a linha tracejada representa a viabilidade de células não tratadas.



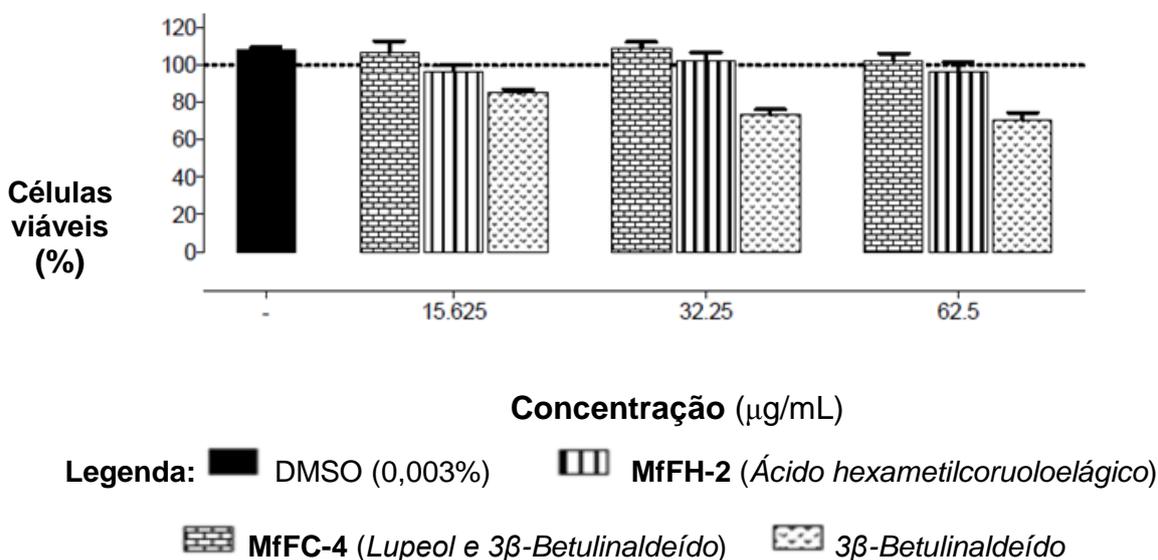
Em função destes resultados, a mistura contendo os compostos *Lupeol* e *3 $\beta$ -Betulinaldeído* (**MfFC-4**) foi avaliada *in vitro* quanto a capacidade de espalhamento e de migração celular de fibroblastos (3T3) utilizando a técnica do risco descrita por

Fronza e cols. (2009), em concentrações de 15,625, 32,25 e 62,5  $\mu\text{g/mL}$ , durante 24 h. Os resultados obtidos mostraram que esta mistura de compostos não apresentou bom percentual de migração celular (resultado não apresentado), sendo, portanto, ineficaz em um efetivo tratamento do processo de cicatrização de feridas.

### 5.2.2.2 Efeito de alguns dos compostos isolados sobre células de macrófagos (linhagem J774)

Os efeitos de viabilidade celular de alguns dos compostos **MfFC-4** (mistura de *Lupeol* e *3 $\beta$ -Betulinaldeído*), **MfFH-2** (*Ácido hexametilcoruololágico*) e *3 $\beta$ -Betulinaldeído* puro frente células macrófagos também foram avaliados através do método da redução do sal MTT. A **Figura 57** mostra que estes compostos não evidenciaram efeito citotóxico pela exposição das células durante 24 h nas concentrações testadas (15,625 e 32,25  $\mu\text{g/mL}$ ); enquanto que o tratamento com *3 $\beta$ -Betulinaldeído* puro mostrou uma significativa redução na viabilidade dessas células de 85, 73 e 70% nas concentrações de 15,625, 32,25 e 62,5  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente.

**Figura 57** – Efeito dos compostos MfFC-4 (mistura de *Lupeol* e *3 $\beta$ -Betulinaldeído*), MfFH-2 (*Ácido hexametilcoruololágico*) e *3 $\beta$ -Betulinaldeído* sobre a viabilidade de células macrófagos (linhagem J774), durante 24 h, nas concentrações de 15,625, 32,25 ou 62,5  $\mu\text{g/mL}$ , usando o ensaio MTT. Os dados foram expressos como percentual de células viáveis em comparação com o grupo de células viáveis do grupo controle e foram apresentados como a média  $\pm$  desvio padrão.



### 5.2.2.3 Efeito de Compostos Isolados Sobre a Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) por Macrófagos em Processos Inflamatórios Induzidos por LPS

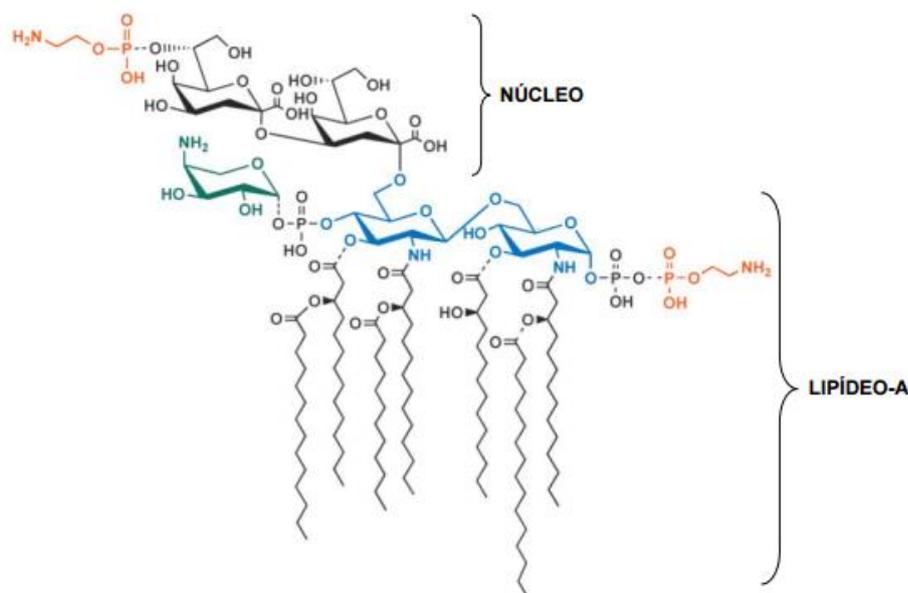
A ausência de citotoxicidade observada para alguns dos compostos isolados frente células macrófagos (**Figura 57**) nos motivaram a avaliar o potencial desses compostos sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) por macrófagos.

Os monócitos constituem 3 a 8% dos leucócitos circulantes que, no tecido conjuntivo ou parênquima de órgãos, dão origem a macrófagos. Estes podem permanecer no tecido por meses a anos e, além de seu papel na imunidade, processam e apresentam antígenos que estimulam a resposta mediada por linfócitos T. Durante o processo inflamatório, os macrófagos atuam como células apresentadoras de antígenos, potencializando a ativação de linfócitos T e B, liberando citocinas pró-inflamatórias (como IL-1, IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$  e quimiocinas). Também produzem espécies reativas de oxigênio (EROs - como ânion superóxido, radical hidroxila e peróxido de hidrogênio) e de nitrogênio (óxido nítrico) (CRUVINEL et al., 2010). Durante o estresse oxidativo as EROs são geradas em grande quantidade e afetam moléculas como proteínas, carboidratos, lipídeos e ácido nucleicos e também estão envolvidas na produção de citocinas por macrófagos nos processos inflamatórios provocados por lipopolisacarídeo (LPS - do inglês *Lipopolysaccharide Binding Protein*; **Figura 58**).

O LPS é uma endotoxina bacteriana conhecida como um importante ativador da resposta imunológica que age induzindo os macrófagos a liberar citocinas, tal como o Fator de Necrose Tumoral (TNF; do inglês *Tumor necrosis factor*) e Interleucinas 1, 6 e 8 (IL-1, IL-6 e IL-8). Essas citocinas influenciam diversos neurotransmissores centrais, tais como noradrenalina, acetilcolina, serotonina, ácido *gama*-aminobutírico (GABA; do inglês *Gamma-AminoButyric Acid*), vários neuropeptídeos e outros, promovendo respostas inflamatórias, febre, vasodilatação, entre outras (CORREIA; FERNANDES; BERNARDI, 2008). Também tem sido considerado um dos mais potentes iniciadores de inflamação e o principal fator responsável pelas manifestações tóxicas de infecções por bactérias Gram-

negativas, bem como por inflamação sistêmica (BANKS; ERICKSON, 2010; CRUZ-MACHADO, 2010). Durante o processo inflamatório há aumento na produção de EROs.

**Figura 58 – Estrutura básica do lipídeo-A ligado ao núcleo interno LPS em uma bactéria Gram-negativa, a *E. coli*.**

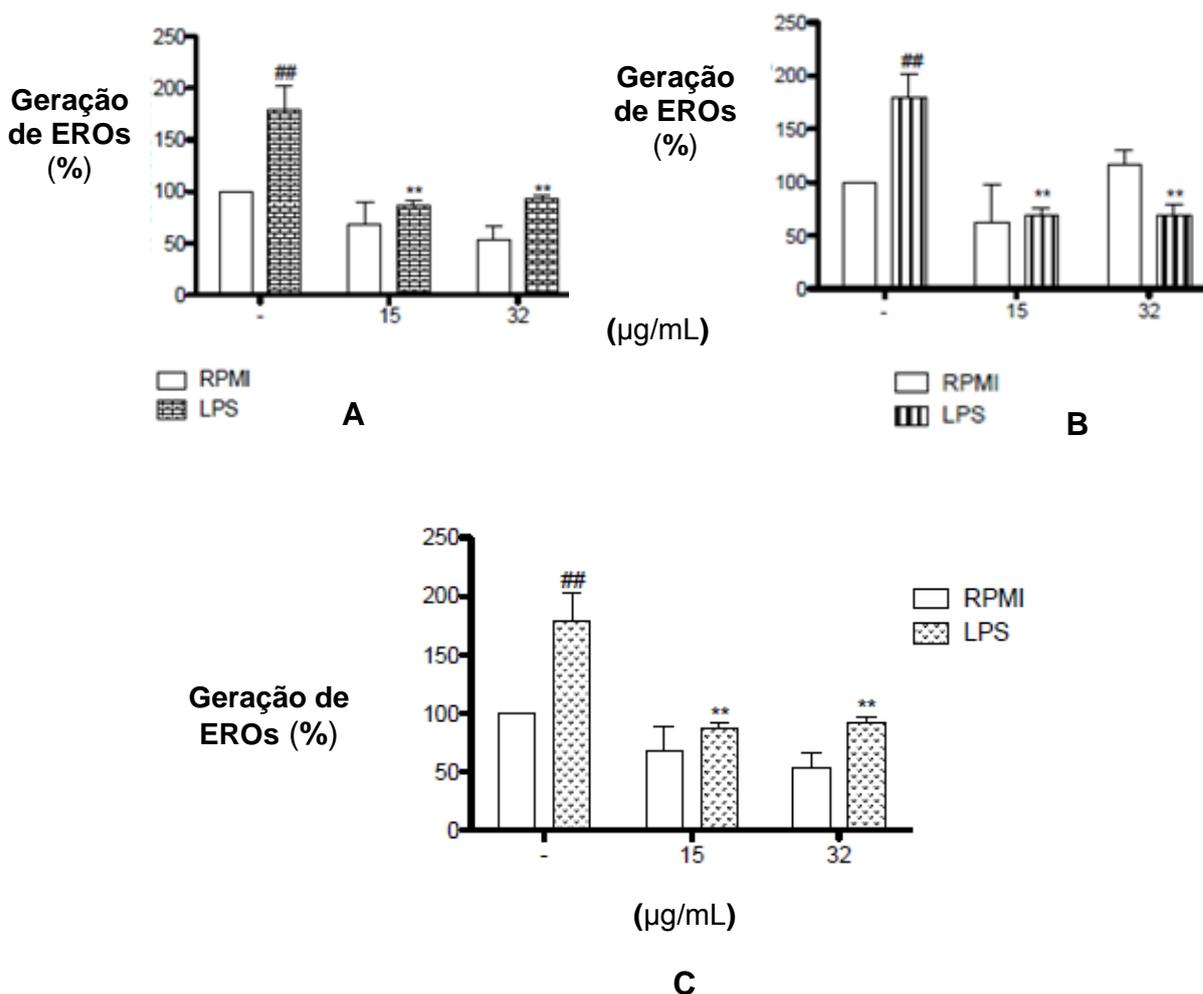


Fonte: RAETZ *et al.*, 2007.

Neste contexto, o presente trabalho teve também como objetivo avaliar um possível efeito de alguns dos compostos isolados [**MfFC-4** (mistura de *Lupeol* e  $3\beta$ -*Betulinaldeído*), **MfFH-2** (*Ácido hexametilcoruololágico*) e  $3\beta$ -*Betulinaldeído* [composto puro isolado do caule de *Swartzia apetala* Raddi (Fabaceae), por Osmarino Jataí Sobreira, em 2009] no envolvimento de EROs em processos inflamatórios provocados por LPS, utilizando linhagens de macrófagos (J774). Para tanto, estas células foram incubadas com LPS, na presença de concentrações de 15,625 e 32,25  $\mu\text{g/mL}$ , durante 24 h. A **Figura 59**, mostra os efeitos dos compostos isolados sobre a produção de EROs. Observa-se nesta figura que as células macrófagos estimuladas com LPS exibiram um intenso aumento na produção de EROs. Quando comparadas com o grupo de células expostas somente ao meio de cultura, as células tratadas com os compostos **MfFC-4** (mistura de *Lupeol* e  $3\beta$ -*Betulinaldeído*; **Fig. 59 A**), **MfFH-2** (*Ácido hexametilcoruololágico*; **Fig. 59 B**) e  $3\beta$ -

*Betulinaldeído* (Fig. 59 C), nas concentrações de 15,625 e 32,25  $\mu\text{g/mL}$ , não causaram aumento na produção de EROs. No entanto, quando comparadas com o grupo de células tratadas com os compostos e as estimuladas com LPS, uma significativa redução da produção de EROs foi observada (Figura 59). Estes resultados sugerem que estes compostos apresentam efeito antioxidante na produção de EROS induzido pelo lipopolissacarídeo, envolvido no processo inflamatório.

Figure 59 – Efeito dos compostos MfFC-4 (*Lupeol* e *3 $\beta$ -Betulinaldeído*; A) MfFH-2 (*Ác. hexametilcoruololáigico*; B) e *3 $\beta$ -Betulinaldeído* (C) sobre a produção de EROs por macrófagos usando ensaio do nitrozul de tetrazólio. As células foram tratadas nas concentrações de 15,625 e 32,25  $\mu\text{g/mL}$  e expostas ao LPS e/ou tratamento durante 24 h. Os dados foram expressos como porcentagem de células viáveis em comparação com o grupo de células viáveis do grupo controle e foram apresentados como a média  $\pm$  desvio padrão.



### 5.2.3. Larvicidas e Anticolinesterásicos

Existem diversos relatos na literatura sobre a atividade biológica de extratos vegetais, bem como de seus compostos isolados, frente larvas do mosquito *A. aegypti* e como inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE). Considerando que até o presente não foi encontrado relato destas atividades em espécies de *Myrciaria*, extratos e frações das folhas e do caule desta espécie foram avaliados frente larvas do quarto estágio do *A. aegypti* e como inibidor da enzima acetilcolinesterase através do uso do Reagente de Ellman (ELLMAN *et al.*, 1961) com o objetivo de buscar um larvicida alternativo para o controle de mosquitos *A. aegypti*, vetor da dengue e das febres amarela e do chikungunya, bem como da Zica-vírus.

Conforme observado na **Tabela 10**, dentre os extratos brutos e frações de partição das folhas (acetona) e do caule (etanol), bem como suas respectivas frações oriundas de partição, avaliados na concentração de 250 µg/mL, durante 48 h de exposição de larvas do 4º estágio de *A. aegypti*, somente as frações em hexano (71,11%) e em AcOEt (73,33%) do caule foram consideradas parcialmente promissoras (mortalidade entre 50 e 75%). As demais amostras avaliadas foram consideradas inativas (mortalidade inferior a 25%). Vale ressaltar que durante os ensaios, o controle positivo utilizado (solução de **Temefós** reformulado na concentração de 3 µg/mL) exibiu um percentual de mortalidade de 100% e não foi observada mortalidade no controle negativo (solução de DMSO a 0,33%) utilizado. Estas frações tiveram suas concentrações letais (CL<sub>50</sub>) e os respectivos intervalos de confiança em nível de 5% (IC<sub>95</sub>) determinados (**Tabela 10**).

Embora as amostras testadas não tenham apresentado uma resposta muito significativa como larvicidas, poderão, contudo, interferir nos processos fisiológicos das larvas que poderão ser avaliados através da exposição destas amostras em posteriores ensaios para determinar a viabilidade larval, pupal, de longevidade e de reprodução das larvas (SILVA *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2014) que deverão ser efetuados oportunamente.

**Tabela 10 – Resultados referentes aos ensaios larvicidas e anticolinesterásicos [Anti(ChE)] com extratos, frações e compostos isolados das folhas e do caule de *M. ferruginea*.**

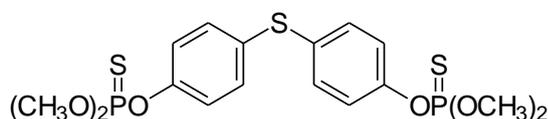
<b>Amostras</b>	<b>%Mortalidade (250 ou 200 µg/mL)</b>	<b>Grau de Atividade</b>	<b>CL<sub>50</sub> (IC<sub>95</sub>, µg/mL)</b>	<b>Anti(ChE)</b>
<b>Folhas</b>				
Ext. Acetona e Frs. Hexano, CHCl <sub>3</sub> e MeOH- H <sub>2</sub> O	0,00-2,22	Inativo	-	<b>NT</b>
Fr. Hexano	35,55	Fraca	-	<b>NT</b>
<b>Caule</b>				
Ext. Bruto (EtOH), Frs. CHCl <sub>3</sub> e MeOH-H <sub>2</sub> O	0,00-13,33	Inativo	-	<b>NT</b>
<b>Fr. Hexano</b>	<b>71,11</b>	Parcial	<b>272,1</b> (195,9-932,2)	<b>Positivo</b>
<b>Fr. AcOEt</b>	<b>73,33</b>	Parcial	<b>140,9</b> (106,1-176,3)	<b>Positivo</b>
Temefós reformulado	100,00	Ativo	<b>8,7</b> (7,0-10,2)	
<b>Compostos Isolados</b>				
MfFH-1, MfC-4 e MfC-3	0,00-6,66	inativo	-	<b>Positivo</b>
MfFH-2	NT		NT	<b>Positivo</b>
Metanol				<b>Negativo</b>
Eserina				<b>Positivo</b>

**Legenda:** NT = Não testado; Parcial = Parcialmente promissor (**Fonte:** A própria autora desta tese, 2016).

Dentre as viroses transmitidas por vetores, os vírus da dengue, chycungunia e zika são os que têm causado no Brasil maior impacto em termos de morbidade e

mortalidade. A principal estratégia para controle desses vetores ainda tem sido o uso intensivo de inseticidas pertencentes principalmente aos grupos dos organofosforados, carbamatos ou piretróides que atuam sobre o Sistema Nervoso Central (SNC) dos insetos. Por ser biodegradável e não se acumular nos tecidos, o temefós é o único organofosforado larvicida com uso generalizado no controle de larvas de *A. aegypti* (BRAGA & VALLE, 2007). Contudo, um dos principais problemas enfrentados pelos programas de controle é a resistência que os insetos adquirem após um longo período de exposição e uso indiscriminado de inseticidas, inviabilizando o controle por esta estratégia de ação e favorecendo a transmissão de doenças (CARVALHO *et al.*, 2004; CRIVELENTI *et al.*, 2011). No Brasil, a resistência ao larvicida **Temefós (Figura 60)** já foi detectada em alguns estados, incluindo Alagoas (LIMA *et al.*, 2006). Esse fato destaca a necessidade de busca de larvicidas alternativos e mais eficazes em programas de controle de vetores da dengue e de outras doenças.

**Figura 60** – Estrutura química do **Temefós**.



Sabendo que a enzima acetilcolinesterase (AChE) é considerada uma das mais importantes e necessárias ao funcionamento do sistema nervoso de humanos, de outros vertebrados e de insetos, as frações que apresentaram resultados parcialmente promissores nos ensaios larvicidas, bem como os seus compostos isolados, foram submetidos a ensaios anticolinesterásicos (**Tabela 10**). Como todo inseticida do grupo dos organofosforados, o **Temefós**, atua se ligando ao centro esterásico desta enzima, impossibilitando-a de exercer sua função, ou seja, hidrolisar o neurotransmissor acetilcolina, em colina e ácido acético. Esta enzima é fosforilada pelo inseticida, ficando irreversivelmente inativada. A inibição de AChE resulta no acúmulo de acetilcolina nas junções nervosas, o que impede a interrupção da propagação do impulso elétrico. Conseqüentemente, o SNC continuará sendo

estimulado, desencadeando o processo de paralisia que pode culminar com a morte do inseto (GARCEZ *et al.*, 2013).

De acordo com OLIVEIRA *et al.* (2010) e SANTOS *et al.* (2008), serão considerados bons agentes larvicidas extratos que apresentam valores de  $CL_{50}$  inferiores a 100  $\mu\text{g/mL}$ . Além disto, quando comparados com a  $CL_{50}$  do controle positivo usado (temefós reformulado;  $CL_{50}$  8,7  $\mu\text{g/mL}$ ), os resultados obtidos (**Tabela 10**) sugerem efeitos de fraco ( $CL_{50}$  272,1  $\mu\text{g/mL}$ ) a moderado ( $CL_{50}$  140,9  $\mu\text{g/mL}$ ) para as amostras de caule testadas. Por outro lado, quando comparados com a  $CL_{50}$  do controle positivo utilizado (**temefós** reformulado;  $CL_{50}$  8,7  $\mu\text{g/mL}$ ), os resultados não sugeriram um bom efeito larvicida. Contudo, os resultados obtidos nos ensaios anticolinesterásicos (**Tabela 10**) sugeriram que esses extratos, bem como os compostos isolados testados, embora não tenham apresentado um efeito larvicida pronunciado, poderão atuar de forma análoga ao larvicida **Temefós**, impedindo a ação da enzima AChE em hidrolisar o neurotransmissor acetilcolina.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

---

Os resultados obtidos no presente trabalho envolvendo o estudo químico e a avaliação de algumas atividades biológicas de extratos, frações e substâncias isoladas da espécie *Myrciaria ferruginea* O. Berg (Myrtaceae) permitiram relacionar as seguintes conclusões:

Alguns dos extratos brutos e frações de partição das folhas e do caule de *M. ferruginea* exibiram atividades nos ensaios frente a duas bactérias Gram-positivas, citotoxicidade para células fibroblastos 3T3 e larvicida frente a larvas do 4º estágio do *Aedes aegypti*;

O estudo químico das frações ativas conduziram ao isolamento de nove substâncias que foram identificadas como sendo três fitoesteroides (***β-sitosterol***, ***estigmasterol*** e ***3-O-β-D-glicopiranosilsitosterol***), quatro triterpenos pentacíclicos da série lupano (***lupeol***, ***3β-betulinaldeído***, ***3β-betulinol*** e ***ácido betulínico***), um triterpeno pentacíclico da série oleanano (***ácido 3α,2β,23-trihidroxiolean-12-en-28-óico***) e um derivado do ácido elágico (***ácido hexametilcoruleoelágico***). As substâncias isoladas estão sendo descritas pela primeira vez na espécie em estudo, o ***ácido hexametilcoruleoelágico*** está sendo descrito pela primeira vez na família Myrtaceae e o triterpeno elucidado como ***ácido 3α,2β,23-trihidroxiolean-12-en-28-óico*** é possivelmente um novo produto natural;

O ***ácido hexametilcoruleoelágico*** não apresentou atividade antibacteriana significativa, mostrou frente a células fibroblasto 3T3 efeito citotóxico de maneira concentração dependente em todas as concentrações testadas (15,625 a 500 µg/mL) e nos ensaios de migração horizontal *in vitro* este composto não aumentou a população de fibroblasto em concentrações inferiores a 62,5 µg/mL e nas concentrações de 15,625 e 32,25 µg/mL não causou aumento na produção de EROs. No entanto, quando comparado com o grupo de células tratadas com as estimuladas com LPS, apresentou uma significativa redução da produção de EROs.

Este resultado indica que este composto tem potencial antioxidante no processo inflamatório. Contudo, ensaios complementares ainda serão necessários;

Os extratos do caule e das folhas de *M. ferruginea* mostraram atividade frente a dois agentes infecciosos comumente encontrados em unidades de terapias intensivas, *S. aureus* e *S. epidermidis*;

O extrato bruto em acetona das **folhas**, bem como as frações em hexano e em CHCl<sub>3</sub>, não apresentaram uma boa viabilidade frente a células 3T3 em todas as concentrações testadas e a fração hidroalcoólica mostrou apenas uma ligeira redução da viabilidade celular em concentrações superiores a 31,2 µg/mL e na menor concentração avaliada (15,625 µg/mL) não apresentou efeito citotóxico;

O extrato bruto em EtOH e a fração em hexano do **caule** nas concentrações de 15,625 a 62,5 µg/mL apresentaram uma viabilidade (> 80%) frente a células 3T3. A fração em AcOEt apresentou uma boa viabilidade apenas na menor concentração testada (15,625 µg/mL), porém em concentrações superiores a 31,25 µg/mL a viabilidade celular foi reduzida (< 60%). A fração em MeOH-H<sub>2</sub>O, nas concentrações de 15,625 a 250 µg/mL apresentou uma boa viabilidade celular;

Embora os resultados com as frações em hexano e em CHCl<sub>3</sub> das folhas não tenham sido promissores em relação a viabilidade de células 3T3, o composto identificado como sendo o **Ácido hexametilcoruleoelágico**, em concentrações que variaram de 15,625 a 500 µg/mL, inibiu a viabilidade celular de maneira concentração dependente e a mistura de **Lupeol** e **3β-Betulinaldeído** inibiu a viabilidade celular somente em concentrações superiores a 62,5 µg/mL;

Em função dos resultados acima, a mistura contendo os dois compostos foi avaliada *in vitro* quanto a capacidade de espalhamento e de migração celular de fibroblastos (3T3) utilizando a técnica do risco, em concentrações de 15,625 a 62,5 µg/mL. Os resultados indicaram que esses compostos não apresentaram um bom percentual de migração celular sendo, portanto, ineficientes para tratamento de cicatrização de feridas;

Os efeitos de **MfFC-4 (Lupeol e 3 $\beta$ -Betulinaldeído)**, **MfFH-2 (Ácido hexametilcoruoloelágico)** frente células macrófagos (J774) foram avaliados e os resultados mostraram que quando comparados com o controle negativo, estes compostos não diminuíram a viabilidade celular nas concentrações testadas (15,625 e 32,25  $\mu\text{g/mL}$ ); enquanto que o tratamento com **3 $\beta$ -Betulinaldeído** puro mostrou uma significativa redução na viabilidade dessas células nas mesmas concentrações;

Quando comparadas com o grupo de células expostas somente ao meio de cultura, as células tratadas com **MfFC-4 (Lupeol e 3 $\beta$ -Betulinaldeído)**, **MfFH-2 (Ácido hexametilcoruoloelágico)** e **3 $\beta$ -Betulinaldeído**, nas concentrações de 15,625 e 32,25  $\mu\text{g/mL}$ , não causaram aumento na produção de EROs. Contudo, quando comparadas com o grupo de células tratadas com os compostos e as estimuladas com lipopolissacarídeo, uma significativa redução da produção de EROs foi observada. Estes resultados sugerem que estes compostos interferem no processo inflamatório induzido pelo LPS;

Dentre as frações das **folhas** e do **caule** avaliadas frente larvas do 4<sup>o</sup> estágio de *A. aegypti*, somente em hexano (71,11%;  $\text{CL}_{50}$  272,1  $\mu\text{g/mL}$ ) e em AcOEt (73,33%; 140,9  $\mu\text{g/mL}$ ) do **caule** apresentaram de fraca a moderada atividade. Embora esses resultados não tenham sido muito significativos, poderão, contudo, interferir nos processos fisiológicos das larvas (viabilidade larval, pupal, de longevidade das larvas e de reprodução dos insetos adultos);

Embora estas frações não tenham apresentado um efeito larvicida pronunciado, foram avaliados juntamente com os seus compostos isolados [**MfFH-1 ( $\beta$ -Sitosterol e Estigmsterol)**, **MfFC-4 (Lupeol e 3 $\beta$ -Betulinaldeído)**, **MfFH-2 (Ácido hexametilcoruoloelágico)** e **MfFC-3 (Ácido betulínico)**] como anticolinesterásicos e forneceram resultados positivos, sugerindo, portanto, que de forma análoga ao larvicida **Temefós**, poderão atuar impedindo a ação da enzima AChE em hidrolisar o neurotransmissor acetilcolina.

## REFERÊNCIAS

- ABEGG, P. T. G. M.; SILVA, L. L. Controle de infecção hospitalar em unidade de terapia intensiva: estudo retrospectivo. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 32, n. 1, p. 47- 58, 2011.
- ABRAF - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS. **Anuário estatístico ABRAF**, ano base 2012, p. 148, 2013.
- AGUIAR, J.; SOUZA, F. Antioxidants, Chemical Composition and Minerals in Freeze-Dried Camu-Camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) Mc Vaugh) Pulp. **Journal off Food and Nutrition Sciences**, v. 6, p. 869 - 874, 2015.
- AGUIAR, R. Notícias do Brasil. Conheça melhor a doença que está chegando ao Brasil e pode causar uma epidemia pelo país. **Revista Ciência e Cultura**, v. 66, n. 4, p. 10-11, 2014.
- ALKHAIBARI, A. M.; CAROLINO, A. T.; YAVASOGLU, S. I.; MAFFEIS, T.; MALTOSO, T. C.; BULL, J. C.; SAMUELS, R. I.; BUTT, T. M. *Metarhizium brunneum* Blastospore Pathogenesis in *Aedes aegypti* Larvae: Attack on Several Fronts Accelerates Mortality. **PLOS Pathogens** | DOI:10.1371/journal.ppat.1005715, 2016.
- ALMEIDA, O. P. Mini exame do estado mental e o diagnóstico de demência no Brasil. **Arquivo de Neuropsiquiatria**, v. 56, n. 3B, p. 605-612, 1998.
- ALVES, M. F.; NIZIO, D. A. C.; SAMPAIO, T. S.; JUNIOR, A. F. N.; BRITO, F. A.; MELO, J. O.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; GAGLIARDI, P. R.; MACHADO, S. M. F.; BLANK, A. F. *Myrcia lundiana* Kiaersk native populations have different essential oilcomposition and antifungal activity against *Lasiodiplodia theobromae*. **Industrial Crops and Products**, v. 85 p. 266–273, 2016.
- AL-ZAHRANI, S. H. M. Antibacterial activities of gallic acid and gallic acid methyl ester on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of American Science*, v. 8, n. 2, 2012.
- AMARIZ, M. Ópio. Disponível em <<http://www.infoescola.com/drogas/opio/>> Acesso em 07 de jul. 2016.
- ANDRADE, M. R. **Constituintes químicos das cascas, folhas e frutos de *Clusia nemorosa* Mey. (Guttiferae)**. Maceió- AL, 1997, 125p. Dissertação. Universidade Federal de Alagoas, Instituto de Química e Biotecnologia.
- ANDRADE, E. H.; ZOGHBI, M. G. B.; SILVA, A. C. M. Constituents of the essential oil of *Myrciaria tenella* (DC.) O. Berg. **Journal of Essential Oil Research**, v. 18, n. 1, 2006.
- ANDRADE, R. C. O patrimônio genético e a biodiversidade. Uma ênfase nas formas internacionais de proteção contra a biopirataria. **Revista da Faculdade de Direito da UERJ-RFD**, v.1, n. 23, 2013.

ANVISA, Agência Nacional de vigilância Técnica. Nota Técnica da Reavaliação do Ingrediente Ativo Aldicarbe. Disponível em <  
<http://portalanvisa.gov.br/wps/wcm/connect/5c720f80474591b499c8dd3fbc4c6735/al-dicarbe.pdf?MOD=AJPERES>> Acesso em: 07 ago. 2016.

APEL, M. A.; LIMA, M. E. L.; SOBRAL, M.; YOUNG, M. C. M.; CORDEIRO, I.; SCHAPOVAL, E. E. S.; HENRIQUE, A. T.; MORENO, P. R. Anti-inflammatory activity of essential oil from leaves of *Myrciaria tenella* and *Calycorectes sellowianus*. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, n. 4, p.433-438, 2010.

ARAÚJO, C. L. O.; NICOLI, J. S. Uma revisão bibliográfica das principais demências que acometem a população brasileira. **Revista Kairós Gerontologia**, v. 13, n. 1, p. 231-244, 2010.

ARAÚJO, C. R. F.; SILVA, A. B.; TAVARES, E. C.; COSTA, E. P.; MARIZ, S. R. Perfil e prevalência de uso de plantas medicinais em uma unidade básica de saúde da família em Campina Grande, Paraíba, Brasil. **Revista de Ciências Farmacêutica Básica e Aplicada**, v. 35, n. 2, p. 233-238, 2014.

ARAUJO, S.S.; SANTOS, M.I.S.; DIAS, A.S.; FERRO, J.N.S.; LIMA, R.N.; BARRETO, E.; CORREA, C.B.; ARAUJO, B.S.; LAUTON-SANTOS, S.; SHAN, A.Y.K.; ALVES, P.; SANT'ANA A.E.G.; THOMAZZI, S.M.; ANTONIOLLI, A.R.; ESTEVAM, C.S. Chemical composition and cytotoxicity analysis of the essential oil from leaves of *Croton argyrophyllus* Kunth. **The Journal of Essential Oil**, v. 26, n.6, p. 446-451, 2014.

AYRES, M.C.C.; BRANDÃO, M. S.; VIEIRA-JÚNIOR, G. M.; MENOR, J. C. A. S.; SILVA, H. B.; SOARES, M. J. S.; CHAVES, M. H. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 1, p. 90-97, 2008.

AZAMBUJA, E. P.; PIRES, D. P.; VAZ, M. R. C. Prevenção e controle da infecção hospitalar: as interfaces com o processo de formação do trabalhador. **Texto Contexto Enfermagem**, v. 13, p. 79 – 86, 2004.

AZEVEDO, R. S. S.; OLIVEIRA, C. S.; VASCONCELOS, P. F. C. Chikungunya risk for Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 49, n. 58, 2015.

BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, n. 1, 2005.

BANKS, W. A.; ERICKSON, M. A. The blood-brain barrier and immune function and dysfunction. Elsevier: **Journal Neurobiology of Disease**, v. 37, p.26–32, 2010.

BARBOZA, H. T. G.; SOARES, A. G.; FONSECA, M. J. O.; COSTA, J. B. N.; SARQUIS, M. I. M. Teste de inibição da enzima acetilcolinesterase de compostos organofosforados com potencial ação fungicida na cultura de mamão (*Carica papaya* L.). Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2010.

BARRETO, M. L.; TEIXEIRA, M. G. Recent Shift in Age Pattern of dengue Hemorrhagic Fever, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.14, n.10, p.1663, 2008.

BASTOS, M.L.A.; HOULY, R.L.S.; CONSERVA, L.M.; ANDRADE, V.S.; ROCHA, E.M.M.; LEMOS, R.P.L. Antimicrobial and wound healing activities of *Piper hayneanum*. **Journal of Chemical Pharmaceutical Research**, v. 3, n. 4, p. 213-222, 2011.

BESSA, N. G. F.; BORGES, J. C. M.; BESERRA, F. P.; CARVALHO, R. H. A.; PEREIRA, M. A. B.; FAGUNDES, R.; CAMPOS, S. L. ; RIBEIRO, L. U.; QUIRINO, M. S.; CHAGAS JÚNIOR, A. F.; ALVES, A. Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde – Tocantins. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 4, p. 692-707, 2013.

BEZERRA, M. F.; JAMISON, B. Y.; GOMADA, Y.; BORGES, K. C.; CORREIA, R. T. P.; VATTEM, D. A. *Eugenia jambolana* Lam. Increases lifespan and ameliorates experimentally induced neurodegeneration in *C. elegans*. **International Journal of Applied Research in Natural Products**, v. 7, n. 4, p. 39- 48, 2014.

BIFFIN, E.; LUCAS, E. J.; CRAVEN, L. A.; COSTA, I. R.; HARRINGTON, M. G.; CRISP, M. D. Evolution of exceptional species richness among lineages of fleshy-fruited Myrtaceae. **Annals of Botany**, v. 106, p. 79 - 93, 2010.

BLAGROVE, M. S. C.; GOET, C. A.; FAILLOUX, A. B.; SINKINSA, S. P. Wolbachia strain wMel induces cytoplasmic incompatibility and blocks dengue transmission in *Aedes albopictus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America – PNAS/USA**, v. 109, n. 1, p. 255 - 260, 2012.

BONFIM, R.; PAIVA-SOUZA, I.; MORAES, J.; PEREIRA, D.; SANTOS, C.A.; SANTANA, D.; THOMAZZI, S.M.; FERRO, J.N.S.; BARRETO, E.; SOUSA, D.P.; CAMARGO, E.A. Isopropoxy-Carvacrol, a derivative obtained from carvacrol, reduces acute inflammation and nociception in rodents. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 115, p. 237-243, 2014.

BOORMAN, J. P. T.; PORTERFIELD, J. S. A simple technique for infection of mosquitoes with viruses - transmission of zika virus. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 50, n. 3, p. 238 - 242, 1956.

BORGES, L. L.; CONCEIÇÃO, E. C.; SILVEIRA, D. Active compounds and medicinal properties of *Myrciaria* genus. **Food Chemistry**, v. 153, p. 224 – 233, 2014.

BRAGA, I. A.; MELLO, C. B.; PEIXOTO, A. A.; VALLE, D. Evaluation of methoprene effect on *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae) development in laboratory conditions. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 4, 2005.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 16, n. 4, p. 279-293, 2007.

BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359 - 1369, 2010.

BRASIL, Boletim Epidemiológico - Secretaria de Vigilância em Saúde – **Ministério da Saúde**. V. 47, n. 27, 2016.

BRASIL, Preparação e Resposta à Introdução do Vírus Chikungunya no Brasil. Ministério da Saúde - **Secretaria de Vigilância em Saúde - Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis**, 2014.

BRITO, L. B. M.; SANTOS, J. A.; GOMES, A. L. P.; MARCOS, A. J. F. YELLOW FEVER A REVIEW OF LITERATURE. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research – BJSCR**. v. 8, n. 3, p. 61 – 65, 2014.

BUSNARDO, V. L.; BIONDO-SIMÕES, M. L. P. Effects of low-level helium-neon laser on induced wound healing in rats. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v. 14, n. 1, p. 45 – 51, 2010.

CALDAS, L. Q. A. Intoxicações exógenas agudas por carbamatos, organofosforados, compostos biperidílicos e piretóides. Centro de Controle de Intoxicações - HUAP-UFF, Rio de Janeiro, 2000.

CALDORIN, M.; ALMEIDA, I. A. Z. C.; PERESI, J. T. M.; ALVES, E. C. Ocorrência de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) no Brasil e sua importância em saúde pública. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 10, n. 110, p. 4 – 20, 2013.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 3, p. 37 - 39, 2003.

CAMPOS, A. C. L.; BORGES-BRANCO, A.; GROTH, A. K. CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS. **Arquivos Brasileiros De Cirurgia Digestiva**, v. 20, n. 1, p. 51- 8, 2007.

CAMPOS, R. P.; HIANE, P. A.; RAMOS, M. I. L.; FILHO, M. M. R.; MACEDO, M. L. R. Conservação pós-colheita de *Gouania* (*Camponesia sp.*). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 34, n. 1, p. 41- 49, 2012.

CARVALHO, M. S. L.; CALDAS, E. D.; DEGALLIER, N.; VILARINHOS, P. T. R.; SOUZA, L. C. K. R.; YOSHIZAWA, M. A. C.; KNOX, M. B.; OLIVEIRA, C. Susceptibilidade de larvas de *Aedes aegypti* ao inseticida temefós no Distrito Federal. *Revista de Saúde Pública*. São Paulo, v. 38, p. 623-629, 2004.

CARVALHO, C.M.; MACÊDO-COSTA, M.R., PEREIRA, M.S.V.; HIGINO, J.S.; CARVALHO, L.F.P.C.; COSTA, L.J. Efeito antimicrobiano in vitro do extrato de jabuticaba [*Myrciaria cauliflora* (Mart.)O.Berg.] sobre *Streptococcus* da cavidade oral. **Revista Brasileira de plantas Mediciniais**, v.11, n.1, p.79 - 83, 2009.

CARVALHO, K. S.; CRUZ, R. C. D.; SILVA, S. L. C.; GUALBERTO, S. A. Atividade larvicida dos extratos aquosos e do hidrolato das folhas de *Croton tetradenius* sobre o *Aedes aegypti*. **Enciclopédia biosfera**, v.11 n. 21; p. 2815, 2015.

CASCAES, M. M.; GUILHON, G. M. S. P.; ANDRADE, E. H. A.; ZOGHBI, M. G. B.; SANTOS, L. S. S. Constituents and Pharmacological Activities of *Myrcia* (Myrtaceae): A Review of an Aromatic and Medicinal Group of Plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, 2015.

CATÃO, R. M. R.; SILVA, P. M. F.; FEITOSA, R. J. P.; PIMENTEL, M. C.; PEREIRA, H. S. Prevalência de infecções hospitalares por *staphylococcus aureus* e perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos prevalence of hospital-acquired infections caused by *staphylococcus*. **Revista de Enfermagem - UFPE on line**, v. 7, n. 8, p. 5257- 5264, 2013.

CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard. 3. ed. **CLSI document M07-A9**. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012a.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 22. ed. Informational Supplement. **CLSI document M100-S22**. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012b.

CHAGAS, A. C. S.; PASSOS, W. M.; PRATES, H. T.; LEITE, R. C.; FURLONG, J.; FORTES, I. C. P. Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus spp.* em *Boophilus microplus*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 39, n. 5, p. 247 - 253, 2002.

CORREA, O. La penicilina. Sus propiedades y usos, **Revista Chilena de Pediatría**, v.15, n.1, p. 59 – 74, 1944.

COSTA-LOTUFO, V.; MONTENEGRO, R. C.; ALVES, A. P. N. N.; MADEIRA, S. V. F.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O. A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 47 - 58, 2010.

COSTA, S. F. Por que os gram-negativos ainda predominam como causa de infecção bacteriana nos pacientes hematológicos no Brasil. **Revista Brasileira de hematologia – Hemoter**, v. 31, n. 2, p. 60 -61, 2009.

CRIVELENTI, L. Z.; GUILHERME, L. C.; MORELLI, S.; BORIN, S. Toxicidade do Inseticida Organofosforado Abate® em Alevinos de *Poecilia reticulata*. **Journal Brazilian Society of ecotoxicology**, v. 6, n. 1, p. 65-68, 2011.

CRUZ, A. C. D.; TORRE, A.; TRONCOS, G.; LAMBRECHTS, L.; LEGUIA, M. Targeted full-genome amplification and sequencing of dengue virustypes 1–4 from Sout America. **Journal of Virological Methods**, v. 235, p. 158 – 167, 2016.

CRUZ, T.; GASPAR, R.; DONATO, A.; LOPES, C. Interaction between polyalkylcyano-acrylate nanoparticles and peritoneal macrophages: MTT metabolism, NBT reduction, and NO production. **Pharmaceutical Research**, v. 14, p. 73-79, 1997.

CRUZ-MACHADO, S.S. Lipopolissacarídeo (LPS): ativador e regulador da transcrição gênica via fator de transcrição NFκB. **Revista da Biologia** v.4, 40-43, 2010.

CORREIA, M.S.F.; FERNANDES, S.R.C.; BERNARDI, M.M. Efeitos da exposição de ratos adultos ao lipopolissacarídeo (LPS) no comportamento estereotipado e na catatonia experimental. **Revista do Instituto de Ciências da Saúde**, v. 26, n. 2, p. 215-220, 2008.

CRUVINEL, W. M.; JÚNIOR, D. M.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S.; SILVA, N. P.; ANDRADE, L. E. P. Sistema Imunitário – Parte I : Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 4, p. 434-461, 2010.

CZELUSNIAK, K. E.; BROCCO, A.; PEREIRA, D. F.; FREITAS, G.B.L. Farmacobotânica, fitoquímica e farmacologia do Guaco: revisão considerando *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schulyz Bip. ex Baker. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 2, p. 400-409, 2012.

DARBY, I. A.; LAVERDET, B.; BONTÉ, F.; DESMOULIÈRE, A. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clin, Cosmet Investigat Dermatol* **7**, 301-311, 2014.

DAVIS, S.C.; PEREZ R. Cosmeceuticals and natural products: wound healing. **Clinics in Dermatology**, v.27, n. 5, p. 502-506, 2009.

DINIZ, D. N.; MACEÊDO-COSTA, M. R.; PEREIRA, M. S. V.; PEREIRA, J. V.; HIGINO, J. S. Efeito antifúngico in vitro do extrato da folha e do caule de *Myrciaria cauliflora* berg. sobre microrganismos orais. **Revista de odontologia - UNESP**, Araraquara, v. 30, n. 3, p. 151 – 156, 2010.

DONALISIO, M. R.; FREITAS, A. R. R. Chikungunya no Brasil: um desafio emergente. **Revista brasileira de epidemiologia**, v. 18, n. 1, p. 283 – 285, 2015.

DOGANLI, G.A. Phenolic content and antibiofilm activity of *Propolis* against clinical MSSA strains. **Records on Natural Products**, v.10, n. 5, p. 617-627, 2016.

DUONG, V.; LAMBRECHTS, L.; PAUL, R. E.; LY, S.; LAY, R. S.; LONG, K. C.; HUY, R.; TARANTOLA, A.; SCOTT, T. W.; SAKUNTABHAI, A.; BUCHY, P. Asymptomatic humans transmit dengue virus to mosquitoes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America – PNAS/USA**, v. 112, n. 47, 2015. Disponível em <[www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1508114112/-/DCSupplemental](http://www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1508114112/-/DCSupplemental)> acesso em 04/07/2016.

ELLMAN G. L.; COURTNEY K. D.; ANDRES V. JR.; FEATHERSTONE R. M.; A New and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v.7, p. 88-95, 1961.

ENGELHARDT, E.; BRUCKI, S. M. T.; CAVALCANTI, J. L. S.; FORLENZA, O. V.; LAKS, J.; VALE, F. A. C.; Tratamento da doença de Alzheimer. **Arquivo de Neuropsiquiatria**, v.63, n.4, p. 1104-1112, 2005.

ESPOSITO, D.; MUNAFO JR., J.P.; LUCIBELLO, T.; BALDEON, M.; KOMARNYTSKY, S.; GIANFAGNA, T.J. Steroidal glycosides from the bulbs of Easter lily (*Lilium longiflorum* Thunb.) promote dermal fibroblast migration *in vitro*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.148, p. 433-440, 2013.

DOCTOR-FOUND. Como identificar o mosquito da dengue?  
Disponível em: <http://blog.doctorfound.com/como-e-o-mosquito-da-dengue>  
Acesso: 20 de jun. 2016.

ETHRIDGE, R. T.; LEONG, M.; PHILLIPS, M. T. Cicatrização de feridas. In: TOWNSEND, C. M. et al. **Tratado de cirurgia**, Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

FIGUEIREDO, E. A. P.; RAMOS, H.; MACIEL, M. A. V.; VILAR, M. C. M.; LOUREIRO, N. G.; PEREIRA, R. G. Pseudomonas Aeruginosa: Frequência de Resistência a Múltiplos Fármacos e Resistência Cruzada entre Antimicrobianos no Recife/PE. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 19, n. 4, 2007.

FINNEY, D. J. Probit analyses. Cambridge: **University Press**, 1972.

FIRMO, W.C. A.; MENEZES, V. J. M.; PASSOS, C. E.C.; DIAS, C. N.; ALVES, L. P.; DIAS, I. C. L.; NETO, M. S.; VARGA, I. V. Contexto histórico, uso popular e concepção científica Sobre plantas medicinais. **Caderno de Pesquisa**, v. 18, 2011.

FORZZA, R. C.; BAUMGRATZ, J. F. A.; BICUDO, C. E. M.; JÚNIOR, A. A. C.; COSTA, A.; COSTA, D. P.; HOPKINS, M.; LEITMAN, P. M.; LOHMANN, L. G.; MAIA, L. C.; MARTINELLI, G.; MENEZES, M.; MORIM, M. P.; COELHO, M. A. N.; PEIXOTO, A. L.; PIRANI, J. R.; PRADO, J.; QUEIROZ, L. P.; SOUZA, V. C.; STEHMANN, J. R.; SYLVESTRE, L. S.; WALTER, B. M. T.; ZAPPI, D. Catálogo de plantas e fungos do Brasil, Rio de Janeiro : Andrea Jakobsson Estúdio : **Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, v. 2, p. 1301-1330, 2010.

FONTOURA, R. Infecção Hospitalar. **Instituto Oswaldo cruz – FIOCRUZ**, 2010.  
<http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=926&sid=32>

FRANÇA, I. S. X.; SOUZA, J. A.; BAPTISTA, R. S.; BRITTO, V. R. S. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. **Revista Brasileira de Enfermagem**, Brasília, v. 61, n. 2, p. 201 – 208, 2008.

FRONZA, M.; HEINZMANN, B.; HAMBURGER, M.; LAUFER, S.; MERFORT, I. Determination of the wound healing effect of Calendula extracts using the scratch assay with 3T3 fibroblasts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 126, p. 463–467, 2009.

GARCÍA, J. L. S.; PÉREZ, M. L.; ALBUERNELL, N. B.; GONZÁLEZ, J. G.; PANQUI, S. M. Evaluación del uso del esquema de paclitaxel con carboplatino en pacientes con cáncer de mama metastásico. **Revista Cubana de Medicina**, v. 48, n. 2, 2009.

GARCEZ, W. S.; GARCEZ, F. R.; SILVA, L. M. G. E.; SARMENTO, U. C. Substâncias de Origem Vegetal com Atividade Larvicida Contra *Aedes aegypti*. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 3, p. 363-393, 2013.

GEEVANANDA, Y. A.; GUNAWARDANA, P.; SULTANBAWA, M. U. Distribution of some triterpenes and phenolic compounds in the extractives of endemic dipterocarpaceae species of sri Lanka. Amsterdam: Elsevier. **Photochemistry**, v. 19, pp. 1099-1102, 1980.

GEEVANANDA, Y. A.; GUNAWARDANA, P.; KUMAR, N. S. Three hydroxy ellagic acid methyl ethers, chrysophanol and scopoletin from *Shorea worthingtonii* and *Vatica obscura*. Amsterdam: Elsevier. **Photochemistry**, v. 18, pp. 1017-1019, 1979.

GILL, S. R.; FOUSTS, D. E.; ARCHER, G. L.; MONGODIN, E. F.; DEBOY, R. T.; RAVEL, J.; PAULSEN, I. T.; KOLONAY, J. F.; BRINKAC, L.; BEANAN, M.; DODSON, R. J.; DAUGHERTY, S. C.; MADUPU, R.; ANGIUOLI, S. V.; DURKIN, A. S.; HAFT, D. H.; MADUPU, R.; ANGIUOLI, S. V.; DURKIN, A. S.; HFT, D. H.; VAMATHEVAN, J.; KHOURI, H.; UTTERBACK, T.; LEE, C.; DIMITROV, G.; JIANG, L.; QIN, H.; WEIDMAN, J.; TRAN, K.; KANG, K.; HANCE, I. R.; NELSON, K. E.; FRASER, C. M. Insights on Evolution of Virulence and Resistance from the Complete Genome Analysis of an Early Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strain and a Biofilm-Producing Methicillin-Resistant *Staphylococcus epidermidis* Strain. **Journal of Bacteriology**, p. 2426–2438, 2005.

GOMES, S. M.; SOMAVILLA, N. S. D. N.; BEXERRA, K. M. G.; MIRANDA, S. C.; De-CARVALHO, P. S.; RIBEIRO, D. G. Anatomia foliar de espécies de Myrtaceae: contribuições à taxonomia e filogenia. **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, n. 1, p. 223 – 238, 2009.

GONÇALVES, G.; PARIZOTTO, N. A. Fisiopatologia da Reparação Cutânea: Atuação da Fisioterapia. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v. 3, n. 1, 1998.

GRESSLER, E.; PIZO, M. A.; MORELLATO, P. C. Polinização e dispersão de sementes em Myrtaceae do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 29, n.4, p. 509 - 530, 2006.

GUIMARÃES, C. C.; FLORIANO, E. P.; VIEIRALL, F. C. B. Chemical constraints to initial growth of *Eucalyptus saligna* in sandy soils of Pampa Gaúcho: a case study. **Ciência Rural**, v.45, n.7, p.1183 - 1190, 2015.

HEINEN, L. B. S.; ZUCHI, N.; CARDOSO, B. F.; SANTOS, M. A. M.; NOGUEIRA, M. L.; DEZENGRINI-SLHESSARENKO, R. Dengue outbreak in mato grosso state, midwestern brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, Sao Paulo, v. 57, n. 6, p. 489 - 496, 2015.

HEYMANN, D.L.; HODGSON, A.; SALL, A.A.; FREEDMAN, D.O.; STAPLES, J.E.; ALTHABE, F.; BARUAH, K.; MAHMUD, G.; KANDUN, N.; VASCONCELOS, P.F.; BINO, S.; MENON, K. U. Zika virus and microcephaly: why is this situation a PHEIC? **The Lancet**, v. 387, p. 719 - 721, 2016.

HOLANDA, C. M. C. X.; OLIVEIRA, E. H.; ROCHA, L. G.; BARBOSA, V. S. A.; SPYRIDES, M. H. C.; ARAGÃO, C. F. S.; MEDEIROS, A. C. Effect of Paclitaxel (Taxol®) on the Biodistribution of Sodium Pertechnetate (Na<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub>) in Female Wistar Rats. Resultados da procura. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, p.191-196, 2008.

HOLETZ F.B.; PESSINI, G.L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**. v. 97, n. 7, p.1027-1031, 2002.

HUNTER, C.; ROSENFELD, L.; SILVERSTEIN, E.; PETROU-ZENIOU, P. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections: A Comprehensive Review and a Plastic Surgeon's Approach to the Occult Sites. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 138, n. 2, p. 515 – 523, 2016.

IOOS, S.; MALLETT, H. P.; GOFFART, I. L.; GAUTHIER, V. CARDOSO, T.; HERIDA, M. Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. **Médecine et maladies infectieuses**, v. 44, p. 302 – 307, 2014.

ISAAC, C.; LADEIRA, P. R. S.; RÊGO, F. M. P.; ALDUNATE, J. C. B.; FERREIRA, M. C. Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. **Revista de medicina, São Paulo**, v. 89, n. ¾, p. 125 – 131, 2010.

INWEREGBU, K.; DAVE, J.; PITTARD A. Nosocomial infections. Continuing education in anaesthesia. **Critical Care & Pain**, v.5, n. 1, 14-17, 2005.

JOLY, C. A.; HADDAD, C. F. B.; VERDADE, L. M.; OLIVEIRA, M. C.; BOLZANI, V. S.; BERLINCK, R. G. S. Diagnóstico da pesquisa em biodiversidade no Brasil. **Revista USP**, São Paulo, n. 89, p. 114 - 133, 2011.

JUERGENS U. R.; DETHLEFSEN, U.; STEINKAMP, G.; GILLISSEN, A.; REPGES, R.; VETTER, H. Anti-inflammatory activity of 1.8-cineol (eucalyptol) in bronchial asthma: a double-blind placebo-controlled trial. **Respiratory Medicine**. V. 97, n. 3, p. 250-256, 2003.

JÚNIOR, C. V.; BOLZANI, V. S. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

KAWASAKI, M. L. A new species of *Myrciaria* (MYRTACEAE) from Ecuador. **Harvard papers in botany**, v. 16, n. 1, p. 163-165, 2011.

KADOSAKI, L. L.; SOUZA, S. F.; BORGES, J. C. M. Análise do uso e da resistência bacteriana aos antimicrobianos em nível hospitalar. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 93, n. 2, p. 128-135, 2012.

KARAMAN, I.; SAHIN, F.; GULLUCE, M.; OGUTÇU, H.; SENGUL, M.; ADIGUZEL, A. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 85, p. 231-235, 2003.

KHATUN, M.; BILLAH, M.; QUADER, Md. A. Sterols and Sterol Glucoside from *Phyllanthus* Species. **Dhaka University Journal of Science**, v. 60, n. 1, pp. 5-10, 2012.

KOJIMA, H.; OGIJRA, H. Triterpenoids from *Prunella vulgaris*. **Phytochemistry**, v. 25, n.3, p. 129-733, 1986.

KUMAR, P.; VIDYASAGAR, G.M. Traditional knowledge on medicinal plants used for the treatment of skin diseases in Bidar district, Karnataka. **Indian Journal of Traditional Knowledge**, v. 7, p. 273-276, 2008.

LI, C.; XU, D.; YE, Q.; SHI, L.; QIN, C. F.; XU, Z. Zika Virus Disrupts Neural Progenitor Development and Leads to Microcephaly in Mice. **Cell Stem Cell**, v. 19, p. 120-126, 2016.

LIMA, R. B. A pele. Esquema de um corte de pele. Disponível em <http://www.dermatologia.net/wp-content/uploads/2014/05/apele.jpg> acesso em 12/07/2016.

LIMA, R. R.; COSTA, A. M. R.; SOUZA, R. D.; GOMES-LEAL, W. Inflamação em doenças neurodegenerativas. **Revista Paraense de Medicina**, v. 2, n. 2, 2007.

LIMA, M. H. M.; ARAÚJO, E. P. Diabetes mellitus e o processo de cicatrização cutânea. **Cogitare Enfermagem**, v. 18, n. 1, p. 170 - 172, 2013.

LIMA, E.P.; OLIVEIRA FILHO, A.M.; LIMA, J.W.O.L.; RAMOS JÚNIOR, A.N.; CAVALCANTI, L.P.G.; PONTES, J.S. Resistência do *A. aegypti* ao temefós em municípios do Estado do Ceará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.39, n.3, p. 259-263, 2006.

LIMBERGER, R. P.; SOBRAL, M.; HENRIQUES, A. T. Óleos voláteis de espécies de *Myrcia* nativas do Rio Grande do Sul. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 916 - 919, 2004.

LIN, J.; PENG, Y.; XU, P.; ZHANG, T.; BAI, C.; LIN, D. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Nasal Colonization in Chinese Children: A Prevalence Meta-Analysis and Review of Influencing Factors. **Public Library of Science - PLoS ONE**, v. 11, n. 7, 2016.

LOURENÇO, A. R.; BARBOSA, M. R. V. Myrtaceae em restingas no limite norte de distribuição da Mata Atlântica, Brasil Myrtaceae in the restinga vegetation at the northern limit of the Atlantic coastal forest. **Brazil Rodriguésia**, v. 63, n. 2, p. 373 – 393, 2012.

LUZ, K. G.; SANTOS, G. I. V.; VIEIRA, R. M. Febre pelo vírus Zika. **Epidemiologia e Serviço de Saúde**, Brasília, v. 24, n. 4, p. 785 - 788, 2015.

LUCENA, E. M. P.; ALVES, R. E.; ZEVALLOS, L. C.; LUZ, E. W. M.; BRITO, E. S. Biodiversidade das Myrtaceae Brasileiras Adaptadas à Flórida, EUA. **Revista Brasileira de Geografia Física**, v. 7, n. 2, p. 327 -340, 2014.

MACARI, P. A. T.; EMERECIANO, V. P.; FERREIRA, Z. G. M. S. Identificação dos triterpenos de *Miconia albicans* Triana, através de análise por microcomputador. **Quim. Nova**, v. 13, p. 260-262, 1990.

MACÊDO-COSTA, M. R.; DINIZ, D. N.; CARVALHO, C. M.; PEREIRA, M. S. V.; PEREIRA, J. V.; HIGINO, J. S.; Eficácia do extrato de *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg. (jabuticabeira) sobre bactérias orais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2B, p. 565 - 571, 2009.

MACNAMARA, F. N. Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. **Transactions of the royal society of tropical medicine and hygienil**, v. 48, n. 2, 1954.

MAHATO, S. B.; KUNDU, A. P. <sup>13</sup>C NMR Spectra of pentacyclic triterpenoids – A compilation some salient features. **Phytochemistry**, v. 47, p. 1517-1575, 1994.

MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrization: current concepts and auxiliary resources -Part I. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 78, n. 4, p. 393 - 410, 2003.

MANDOUR, R. A. Environmental risks of inseticides cholinestease inibitours. **Toxoclogy international**, v.20, n.1, p. 30-34, 2013.

Marques, V. L. L. "**Derivados dicromenoxantônicos e terpenoídicos das raízes de *Tovomita brasiliensis* (Guttiferae).**" **Derivados dicromenoxantônicos e terpenoídicos das raízes de *Tovomita brasiliensis* (Guttiferae)**, Maceió, p. 70. Dissertação de mestrado – Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, 2001.

MARTÍNEZ-MELÉNDEZA, A.; MORFÍN-OTEROB, R.; VILLARREAL-TREVINO, L.; CAMACHO-ORTÍZ, A.; GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, G.; LLACA-DÍAZF, J.; RODRÍGUEZ-NORIEGAB, E.; GARZA-GONZÁLEZ, E. article Molecular epidemiology of coagulase-negative blood stream isolates: detection of *Staphylococcus epidermidis* ST2, ST7 and linezolid-resistant ST23. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, 2016.

MARCIA, P. Dengue modo de transmissão. Disponível em <<http://marciakalel.blogspot.com.br/2015/04/dengue-modo-de-transmissao-texto.html>> Acesso: 20 de jul. 2016.

MELO, M. M.; OLIVEIRA, N. F.; LAGO, L. A. Intoxicações causadas por pesticidas em cães e gatos. Parte I: Organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides. **Continuous Education Journal**, v.5, n.2, p. 188-195, 2002.

MÉLO, M. E. B.; MERLO, K. C.; FERNANDES, R. R. C.; LUNA, C. F.; DINIZ, G. T. N.; CATANHO, M. T. J. A.; REGIS, L. Ação mutagênica do inseticida organofosforado temefós em células de medula óssea de camundongos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 67, n. 3, p. 196-201, 2008.

MÉNDEZ, D. N.; GARCÍA, D. N. Hemostasia normal y coagulación intravascular diseminada en obstetrícia. **MEDISAN**, v. 16, n. 3, p. 401, 2012.

MENDONÇA, R. J.; COUTINHO-NETTO, J. Aspectos celulares da cicatrização. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n. 3, p. 257 - 262, 2009.

MICHELIM, L.; LAHUDE, M.; ARAÚJO, P.R.; GIOVANAZ, D.S.H.; MÜLLER, G.; DELAMARE A.P.L.; DA COSTA, S.O.P.; ECHEVERRIGARAY, S. Pathogenic factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus epidermidis* associated with nosocomial infections occurring in intensive care units. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 17-23, 2005.

MILITÃO, J. S. L. T.; ANDRADE, C. H. S.; SILVEIRA, E. R. Investigação química de *Thiloa glaucocarpa* e *Combretum sp.* Química Nova, v. 16, n. 1, 1993.

MONTANO, M. B. M. M. envelhecimento e demência: epidemiologia e tratamento. **Boletim do Instituto de Saúde** (impr.) n. 47, São Paulo, abr. 2009.

MORAIS, L. M. F.; CONCEIÇÃO, G. M.; NASCIMENTO, J. M. Família myrtaceae: análise morfológica e distribuição geográfica. de uma coleção botânica. **Agrarian Academy**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.1, n. 1, p. 318, 2014.

MORAIS, S. T.; D'AMARAL, R. K. K. Intoxicação exógena por carbamatos: assistência de enfermagem. **Revista de Enfermagem**, UNISA, v. 8, p. 58-61, 2007.

MOREIRA, T. M. S.; SALGADO, H. R. N.; PIETRO, R. C. L. R. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 3, p. 435 - 440, 2010.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, **Jounal Immunological Methods**. v. 65, p. 55-63, 1983.

MURUGAN, K.; MURUGAN, P.; NOORTHEEN, A. Larvicidal and repellent potential of *Albizzia amara* Boivin and *Ocimum basilicum* Linn against dengue vector, *Aedes aegypti* (Insecta:Diptera:Culicidae). **Bioresource Technology**, v. 98, p.198 - 201, 2007.

NASCIMENTO, A. R.; NAMBA, M. Aspecto da ferida: avaliação de enfermagem. **Revista de Enfermagem**, UNISA, v. 10, n. 2, p. 118 - 123, 2009.

NASCIMENTO, O. V.; BOLETI, A. P.; YUYAMA, L. K.; LIMA, E. S. Effects of diet supplementation with Camu-camu (*Myrciaria dubia* HBK McVaugh) fruit in a rat model of diet-induced obesity. *Academia Brasileira de Ciências*, v. 85, n. 1, p. 355 – 363, 2013.

NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; NETTO, D. P.; FRANCO, B. D. G. M. Organofosforados e carbamatos no leite produzido em quatro regiões leiteiras no Brasil: Ocorrência e ação sobre *Listeria monocytogenes* e *Salmonella spp.* **Ciência Tecnologia e Alimentos**, v.27, n.1, p. 201-204, 2007.

NETO, J. G.; TAMELINI, M. G.; FORLENZA, O. V. Diagnóstico diferencial das demências. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v.32, n.3, p. 119-130, 2005.

NEVES, P. R.; MAMIZUKA, E. M.; LEVY, C. E.; LINCOPAN, N. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 4, p. 409 - 420, 2011.

NICOLLETI, M. A.; CARVALHO, K. C.; OLIVEIRA, J. M. A.; BERTASSO, C. C.; CAPOROSSI, P. Y.; TAVARES, A. P. L. Uso popular de medicamentos Contendo drogas de origem vegetal e /ou plantas medicinais: principais interações decorrentes. **Revista da Saúde - UNG**, v. 4, n. 1, p. 25 e 35, 2010.

NOGUEIRA, P. S. F.; MOURA, E. R. F.; COSTA, M. M. F.; MONTEIRO, W. M. S.; BRONDI, L. Perfil da infecção hospitalar em um hospital universitário. *Revista de Enfermagem-UERJ*, v. 17, n. 1, p. 96 – 101, 2009.

NOVAIS, T.S; COSTA, J.F.O.; DAVID, J.P.L.; DAVID, J.M.; QUEIROZ, L.P.; FRANÇA, F.; GIULIETTI, A.M.; SOARES, M.B.P.; SANTOS, R.R. Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, supl 2, p. 05-08, 2003.

OLIVEIRA, A. M.; HUMBERTO, M. M. S.; SILVA, J. M.; ROCHA, R. F. A.; SANT'ANA, A. E. G. Estudo fitoquímico e avaliação das atividades moluscicida e larvicida dos extratos da casca do caule e folha de *Eugenia malaccensis* L. (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n. Supl., p. 618-624, 2006.

OLIVEIRA, M. L. F.; BURIOLA, A. A. Gravidade das intoxicações por inseticidas inibidores das colinesterases no noroeste do estado do paraná, Brasil. **Revista Gaúcha de Enfermagem**, Porto Alegre (RS), v.30, n.4, p. 648-655, 2009.

OLIVEIRA, P.V.; JÚNIOR, J.C.F.; MOURA, F.S.; LIMA, G.S.; OLIVEIRA, F.M.; OLIVEIRA, P.E.S.; CONSERVA, L.M.; GIULIETTI, A.M.; LEMOS, R.P.L. Larvicidal activity of 94 extracts from tem plant species of northeastern of Brazil against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, v. 107, p. 403-407, 2010.

OLIVEIRA, G.P.; SILVA, S.L.C.; GUALBERTO, S.A.; CRUZ, R.C.D.; CARVALHO, K.S. Atividade larvicida do extrato etanólico da raiz de *croton linearifolius* sobre *aedes aegypti*. Centro Científico Conhecer - Goiânia. **Enciclopédia biosfera**, v.10, n.18, p. 442, 2014.

OLIVEIRA, C. S.; VASCONCELOS, P. F. C. Microcephaly and Zika vírus. **Jornal de Pediatria – RJ**, v. 92, n. 2, p. 103 - 105, 2016.

OTERO, M.;SOLARI, H. G. Stochastic eco-epidemiological model of dengue disease transmission by *Aedes aegypti* mosquito. **Mathematical Biosciense**, v. 223, p. 32 - 46, 2010.

OSTROSKY, E.A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAVA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais.

**Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 18, n. 2, p. 301-307, abr. / jun. 2008.

OTTO, M. Virulence factors of the coagulase-negative staphylococci. **Frontiers in Bioscience**, v.9, p. 841-863, 2004.

PATRICK, G. L. An Introduction to Medicinal Chemistry. Second Edition, Oxford, Cap. 22, p. 604, 2008.

PEDROSO, E. P.; ROCHA, M. O. C. Infecções emergentes e reemergentes. **Revista de Medicina - Minas Gerais**, v. 19, n. 2, p. 140 – 150, 2009.

PEREIRA, R. A.; ZOGHBI, M. G. B.; BASTOS, M. N. C.; Essential oils of twelve species of Myrtaceae growing wild in the sandbank of the Resex Maracana, State of Para, Brazil. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 13, n. 4, p. 440 – 450, 2010.

PEREIRA, A. I. S.; PEREIRA, A. G. S.; SOBRINHO, O. P. L.; CANTANHEDE, E. K. P.; SIQUEIRA, L. F. S. Atividade antimicrobiana no combate as larvas do mosquito *Aedes aegypti*: Homogeneização dos óleos essenciais do linalol e eugenol. **Educação química**, v. 25, n. 4, p. 446 - 449, 2014.

PEREIRA, M. S.; SOUZA, A. C. S.; TIPPLE, A. F. V.; PRADO, M. A. Infecção hospitalar e suas implicações para o cuidar da Enfermagem. **Texto Contexto Enfermagem**, v. 14, n. 2, p. 250 – 257, 2005.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFÂNIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 45 - 61, 2002.

PONTES, R. J. S.; NETTO, A. R. Dengue em localidade urbana da região sudeste do Brasil: aspectos epidemiológicos. **Revista de Saúde Pública**, v. 28, n. 3, p. 218 - 227, 1994.

PONNUSAMY, Y.; CHEAR, N.J.; RAMANATHAN, S.; LAI, C. Polyphenols rich fraction of *Dicranopteris linearis* promotes fibroblast cell migration and proliferation in vitro. *J Ethnopharmacol* 168, 305-314, 2015.

POPOVKIN, A.; Fotos de exemplares de *Myrciaria ferrugínea*, 2010. Disponível em <[https://www.flickr.com/photos/plants\\_of\\_russian\\_in\\_brazil/5145691184/in/photostream/](https://www.flickr.com/photos/plants_of_russian_in_brazil/5145691184/in/photostream/)> Acesso em 07/07/2016.

PÓVOA, G.; DINIZ, L. M. Growth Hormone System: skin interactions. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 6, p. 1159 - 1165, 2011.

PRADO, M. A. M.; REIS, R. A. M.; PRADO, V. F.; DE MELLO, M. C.; GOMEZ, M. V.; DE MELLO, F. G. Regulation of acetylcholine synthesis and storage. **Neurochemistry International**, v.41, p. 291-299, 2002.

QUEIROZ, M. S.; CANESQUI, A. M. Antropologia da medicina: uma revisão teórica. **Revista de Saúde Pública – SP**, v. 20, n. 2, p. 152 - 164, 1986.

RAETZ, C. R. H.; REYNOLDS, M. S. T.; BISHOP, R. E. Lipid A Modification Systems in Gram-Negative Bacteria. **Annual Review of Biochemistry**, v. 76, p. 295-329, 2007.

RATNASOORIYA, W. D.; LELWALA, L. H. D. S.; KANNANGARA, K. N. K.; SANDANAYAKA, S. D. D.; EDIRIWEERA, E. R. H. S. S. Sedative activity os stem batk of the Sri Lankan endemic plant, *Valteria copallifera*. **Elsevier: Fitoterapia**, v. 77, pp. 331-332, 2006.

RASIC, G.; HARSHMAN, N. E.; TANTOWIJOYO, W.; GOUNDAR, A.; WHITE, V.; YANG, Q.; FILIPOVIC, I.; JOHNSON, P.; HOFFMANN, A. A.; ARGUNI, E. *Aedes aegypti* has spatially structured and seasonally stable populations in Yogyakarta, Indonesia. **Parasites & Vectors**, v. 8, p. 610, 2015.

REYNERTSON, K. A.; YANG, H.; JIANG, B.; BASILE, M. J.; KENNELLYA, E. J. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. **Food Chemistry**, v. 109, n. 4, p. 883 – 890, 2008.

REZZA, G. *Aedes albopictus* and the reemergence of Dengue. **BMC Public Health**, v. 12, n. 72, 2012.

RHEE, I.K. ; VAN DE MEENT, M.; INGGANINAN, K.; VERPOORTE, R. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. **Journal of Chromatography**, v.915, p. 217-23, 2001.

RIBEIRO, F. M.; BLACK, S. A. G.; PRADO, V. F.; RYLETT, R. J.; FERGUSON, S. S. G.; PRADO, M. A. M. The "ins" and "outs" of the high-affinity choline transporter CHT1. **Journal of Neurochemistry**, v.97, p. 1-12, 2006.

RIBEIRO, A. R. C.; MOURA, L. F. W. G.; OLIVEIRA, M. V.; LIMA, D. R.; MOTA, J. G. S. M.; MAGALHÃES, F. E. A. Bioprospecção de atividade álcool desidrogenase (adh) de fungos anemófilos isolados do centro vocacional tecnológico do município de Tauá-CE, **Revista de Biologia e Farmácia – Biofar**. Campina Grande/PB, v. 9, n. 1, p. 01-12, 2013.

RICHARD, V.; PAOAAFAITE, T.; LORMEAU, V. M. C. Vector Competence of *Aedes aegypti* and *Aedes polynesiensis* Populations from French Polynesia for Chikungunya Virus. **PLOS Neglected Tropical Diseases** | DOI:10.1371/journal.pntd.0004694, 2016.

ROCHA, L. G. B.; CUNHA, R. V. LICHS, G. G. C.; FABBRO, M. M. F. J. D.; CASTRO, A. R. C. M. Introduction of the dengue virus type 4 in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Caderno de Saúde Pública, RJ**, v. 30, n. 8, p. 1789 - 1792, 2014.

SÁ, L. Z. C. M.; CASTRO, P. F. S.; LINO, F. M. A.; BERNARDES, M. J. C.; VIEGAS, J. C. J.; DINIS, T. C. .P.; SANTANA, M. J.; ROMÃO, W.; VAZ, B. G.; LIÃO, L. M.; GHEDINI, P. C.; ROCHA, M. L.; GIL, E. S. Antioxidant potential and vasodilatory

activity of fermented beverages of jaboticaba berry (*Myrciaria jaboticaba*). **Journal of Functional Foods**, v. 8, p. 169 – 179, 2014.

SALATI, E.; SANTOS, A. A.; KLABIN, I. Relevant environmental issues. **Estudos Avançados**, v. 21, n. 56, 2007.

SANCHEZ, R. M.; HAYDEN, M.; JANES, C.; ANDERSON, G. A web-based multimedia spatial information system to document *Aedes aegypti* breeding sites and dengue fever risk along the US–Mexico border. **Health & Place**, v. 12, p.715 - 727, 2006.

SANTACRUZ, L.; CARRIAZO, J. G.; ALMANZA, O.; OSORIO, C. Anthocyanin Composition of Wild Colombian Fruits and Antioxidant Capacity Measurement by Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 6, p. 1397 – 1404, 2012.

SANTOS, R. B.; COLE, E. R.; LACERDA, V. J.; REZENDE, H. R. Atividade larvicida, inseticida e repelente do óleo essencial dos frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi. **31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**; <http://sec.s bq.org.br/cdrom/31ra/resumos/T0873-2>, 2008.

SANTOS, S. R.; SIEGLOCH, A. M.; MARCHIORI, J. N. C. Análise de agrupamento de 16 gêneros e 71 espécies de myrteae, com base em dados da anatomia da madeira. **BALDUINIA**, n. 47, p. 24 - 33, 30-III-2015.

SANTOS, S. V.; COSTA, R. Prevenção de lesões de pele em recém-nascidos: o conhecimento da equipe de enfermagem. **Texto Contexto Enfermagem**, Florianópolis, v. 24, n. 3, p. 731 - 739, 2015.

SANTOS, O. J.; MALAFAIA, O.; RIBAS-FILHO, J. M.; CZECZKO, N. G.; SANTOS, R. H. P.; SANTOS, R. A. P. Influence of schinus terebinthifolius raddi (aroeira) and *carapa guianensis* aublet (andiroba) in the healing process of gastrorrhaphies. **ABCD Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, v. 26, n. 2, p. 84 - 91, 2013.

SANTOS, N. Q. A RESISTÊNCIA BACTERIANA NO CONTEXTO DA INFECÇÃO HOSPITALAR. **Texto Contexto Enfermagem**, v. 13, p. 64 – 70, 2004.

SANTOS, A. L.; SANTOS, D. O.; FREITAS, C. C.; FERREIRA, B. L. A.; AFONSO, I. F.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 413 - 423, 2007.

SARTORI, M. R. K. **Atividade antimicrobiana de frações de extratos e compostos puros obtidos das flores da *Acmela brasiliensis* SPRENG (*wedelia paludosa*) (ASTERACEAE)**. 2005. 81 f. dissertação (Mestrado em Ciências farmacêuticas) universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, SC, 2005.

SCHNEIDER, N. F. Z.; MOURA, N. F.; COLPO, T.; MARINS, K.; MARAGONI, C.; FLACH, A. Estudo dos compostos voláteis e atividade antimicrobiana da *Myrciaria tenella* (cambuí). **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 89, n. 2, p. 131-133, 2008.

SERENIKI, A.; VITAL, M. A. B. F. A doença de Alzheimer: aspectos fisiopatológicos e farmacológicos. **Revista de Psiquiatria –RS**, v.30, (1 Supl), 2008.

SILVERTHORN, D. U. Fisiologia humana: uma abordagem integrada, Editora Manole, 2ª edição, p. 820, 2003.

SMITH, M. A. C. Doença de Alzheimer. **Revista Brasileira de Psiquiatria – Genética**, v.21, p. 03 - 07, 1999.

SIQUEIRA, H. F.; SOUZA, L. F., AMARAL, E. V. E. J.; JÚNIOR, V. Q. S. A FAMÍLIA MYRTACEAE NO BRASIL. **64º Congresso Nacional de Botânica Belo Horizonte**, 10-15 de Novembro de 2013.

SILVA, M. A. C. **Atividade hepatoprotetora do extrato hidroalcolólico do resíduo agroindustrial de jabuticaba (*Myrciaria cauliflora* O. Berg), e do extrato etanólico das folhas de fruta-pão (*Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg), em camundongos**. 2015. 57 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2015.

SILVA, N. S.; SAKATA, R. K.; ISSY, A. M.; Efeitos Observados com Diferentes Doses de Morfina Subaracnóidea em Ratos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 54, n. 1, 2004.

SILVA, F. C.; ARRUDA, A.; LEDEL, A.; DAUTH, C.; ROMÃO, N. F.; VIANA, R. N.; BARROS, A. F. F.; PICADA, J. N.; PEREIRA, P. Antigenotoxic effect of acute, subacute and chronic treatments with Amazonian camu-camu (*Myrciaria dubia*) juice on mice blood cells. **Food Chemistry Toxicology**, v. 50, n. 7, p. 2275 – 2281, 2012.

SILVA, N. V. P.; DONATO, A. M. Morpho-anatomy of the leaf of *Myrciaria glomerata*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, p. 275 – 280, 2016.

SILVA, S. L. C. E.; CARVALHO, M. G.; GUALBERTO, S. A.; CARNEIRO-TORRES, D. S.; VASCONCELOS, K. C. F.; OLIVEIRA, N. F. Bioatividade do extrato etanólico do caule de *Croton linearifolius* Mull. Arg. (Euphorbiaceae) sobre *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). **Acta Veterinaria Brasilica**, Mossoró, v. 4, n. 4, p. 252-258, 2010.

SIMMONS, C. P.; FARRAR, J. J.; CHAU, N. V. V.; WILLS, B. Dengue. **The New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 15, p.1423, 2012.

SIMPSON, D. I. H. Zika virus infection in man. **Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene**, v. 58, n. 4, 1964.

SILVA, H. R.; SILVA, C. C. M.; NETO, L. B. C.; LOPES, J. A.; CITÓ, A. M. G. L.; CHAVES, M. H. Constituintes químicos das cascas do caule de *cenostigma macrophyllum*: ocorrência de colesterol. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1877-1881, 2007.

SILVA, J. S.; MARIANO, Z. F.; SCOPEL, I. A dengue no brasil e as políticas de combate ao aedes aegypti: da tentativa de erradicação às políticas de controle.

**HYGEIA - Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**, v. 3, n. 6, p. 163 - 175, 2008.

SILVA, M. I.; RIBAS-FILHO, J. M.; MALAFAIA, O.; NASSIF, P. A. N.; RIBAS, M. M.; VARASCHIM, M.; CZECHKO, E. A UTILIZAÇÃO DA *Pfaffia glomerata* no processo de cicatrização de feridas da pele. **ABCD Arquivo Brasileiro de Cirurgia Digestiva**, v. 23, n. 4, p. 228 - 233, 2010.

SOARES, N. S.; SILVA, M. L.; REZENDE, J. L. P.; GOMES, M. F. M. Competitividade da cadeia produtiva da madeira de eucalipto no Brasil. **Revista Árvore, Viçosa-MG**, v. 34, n. 5, p. 917 - 928, 2010.

SOBRAL, M. P.; SOUZA, C.; MAZINE, C.; LUCAS, F. E. Myrtaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB10787>> Acesso: 30 de jun. 2016.

SOBRINHO, J. S.; GURGEL, J. T. A.; PELEGRINO, D.; LEME-JÚNIOR, J.; MALAVOLTA, E. Vitamin C content in fruits of *Myrciaria glomerata*. **Boletim Técnico do Instituto Agrônomo** do estado de SP, v. 14, n. 19, 1955.

SONG, M. C.; YANG, H. J.; LEE, D. Y.; AHN, E. M.; KIM, D. K.; KIM, J. Y.; CHUNG, D. K.; BAEK, N. I. Triterpenoids from *Trapa pseudoincisa*. **Journal Applied Biological Chemistry**, v. 50, n. 4, p. 259-263, 2007.

SMIDERLE, O. J.; SOUZA, R. C. P. Teor de vitamina C e características físicas do camu-camu em dois estádios de maturação. **Revista Agro@ambiente On-line**, v. 2, n. 2, p. 61 - 63, 2008 . Disponível em [www.agroambiente.ufrb.br](http://www.agroambiente.ufrb.br) Acesso em 05 de julho de 2016.

STEPHENS, J. M. C.; MOLAN, P. C.; CLARKSON B. D. Review of *Leptospermum scoparium* (Myrtaceae) in New Zealand. **New Zealand Journal of Botany**. V. 43, p. 431 - 449, 2005.

STRODE, C.; WONDJI, C. S.; DAVID, J. P.; HAWKES, N. J.; LUMJUAN, N.; NELSON, D. R.; DRANE, D. R.; PARAKRAMA, K.; HEMINGWAY, J.; BLACK, W. C.; RANSON, H. Genomic analysis of detoxification genes in the mosquito *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, p.113 - 123, 2008.

TALIBERTI, H.; ZUCCHI, P. C. Custos diretos do programa de prevenção e controle da dengue no Município de São Paulo em 2005. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 27, n. 3, 2010.

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n.3, p. 281-301, 2000.

TAZIMA, M. F. G. S.; VICENTE, Y. A. M. V. A.; MORIYA, T. Biologia da ferida e cicatrização. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 41, n. 3, p. 259 – 264, 2008.

- TIETBOHL, L. A. C.; BARBOSA, T.; FERNANDES, C. P.; SANTOS, M. G.; MACHADO, F. P.; SANTOSE, K. T.; MELLOB, C. B.; ARAÚJO, H. P.; GONZALEZ, M. S.; FEDER, D.; ROCHA, L. Laboratory evaluation of the effects of essential oil of *Myrciaria floribunda* leaves on the development of *Dysdercus peruvianus* and *Oncopeltus fasciatus*. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 24, p. 316 – 321, 2014.
- TIETBOHL, L. A. C.; LIMA, B. G.; FERNANDES, C. P.; SANTOS, M. G. SILVA, F. E. B.; DENARDIN, E. L. G.; BACHINSKI, R.; ALVES, G. G.; SILVA-FILHO, M. V.; ROCHA, L. Comparative Study and Anticholinesterasic Evaluation of Essential Oils from Leaves, Stems and Flowers of *Myrciaria floribunda* (H.West ex Willd.) O. Berg. **Latin American Journal Of Pharmacy**, v. 31, n. 4, p. 637- 641, 2012.
- TREVISAN, M.T.S.; MACEDO, F.V.V.; VAN DE MEENT, M.; RHEE, I.K.; VERPOORTE, R. Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para tratamento da doença de Alzheimer. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 301-304, 2003.
- TREVISAN, M. T. S.; BEZERRA, M. Z. B.; SANTIAGO, G. M. P.; FEITOSA, C. M. Atividades larvicida e anticolinesterásica de plantas do gênero *Kalanchoe*. **Química nova**, v.29, n.3, p. 415-418, 2006.
- USA, Chikungunya: Information for healthcare providers. Centers for Disease Control and Prevention – CDC, 22/07/2014. disponível em <[http://www.cdc.gov/chikungunya/pdfs/CHIKV\\_Clinicians.pdf](http://www.cdc.gov/chikungunya/pdfs/CHIKV_Clinicians.pdf)> acesso 12/07/2016.
- UDDIN, G.; WALIULLAH; SIDDIQUI, B. S.; ALAM, M.; SADAT, A.; AHMAD, A.; UDDIN, A. Chemical constituents and phytotoxicity of solvent extracted fractions of stem bark of *Grewia optiva* Drummond ex Burret. Middle-East. **Journal of Scientific Research**, v. 8, n. 1, p. 85-91, 2011.
- UENO, S.; MIYAJI, N. Deglycation-promoting agent containing natural components, and skin composition containing the same. Patente JP 2014076957 (01/05/2014)
- VASCONCELOS, P. F. C. Doença pelo vírus Zika: um novo problema emergente nas Américas? **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 6, n. 2, p. 9 - 10, 2015.
- VASCONCELOS, P. F. C. Emergência do vírus Chikungunya: risco de introdução no Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 5, n. 3, p. 9 - 10, 2014.
- VAZ, A. B. M.; BRANDÃO, L. R.; VIEIRA, M. L. A.; PIMENTA, R. S.; MORAIS, P. B.; SOBRAL, M. E. G.; ROSA, L. H.; ROSA, C. A. Diversity and antimicrobial activity of fungal endophyte communities associated with plants of Brazilian savanna ecosystems. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 13, p. 3173-3185, 2012.
- VELNAR, T.; BAILEY, T.; SMRKOLJ, V. The Wound Healing Process: an Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms. **The Journal of International Medical Research**, v. 37, p. 1528 - 1542 [first published online as 37(5) 12], 2009.
- VENTURA, A. L. M.; ABREU, P. A.; FREITAS, R. C. C.; SATHLER, P. C.; LOUREIRO, N.; CASTRO, H. C. Sistema colinérgico: revisitando receptores,

regulação e a relação com a doença de Alzheimer, esquizofrenia, epilepsia e tabagismo. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v.37, n.2, p. 66-72, 2010.

VIANA, D. V.; IGNOTTIL, E. A ocorrência da dengue e variações meteorológicas no Brasil: revisão sistemática. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 16, n. 2, p. 240 - 256, 2013.

VIEIRA, T. R.; BARBOSA, L. C. A.; MALTHA, C. R. A. Constituintes químicos de *Melaleuca alternifolia* (MYRTACEAE). **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 536 - 539, 2004.

VITKAUSKIENĖ, A.; SKRODENIENĖ, E.; DAMBRAUSKIENĖ, A.; MACAS, A.; SAKALAIUSKAS, R. *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: resistance to antibiotics, risk factors, and patient mortality. **Medicina (Kaunas)**, v. 46, n. 7, p. 490- 495, 2010.

VOGEL, K. J.; BROWN, M. R.; STRAND, M. R. Ovary ecdysteroidogenic hormone requires a receptor tyrosine kinase to activate egg formation in the mosquito *Aedes aegypti*. **PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 16, p. 5057 – 5062, 2015.

WANG, W. H.; TYAN, Y. C.; CHEN, Z. S.; LIN, C. G.; YANG, M. I.; YUAN, S. S.; TSAI, W. C.; Evaluation of the antioxidant activity and antiproliferative effect of the jaboricaba (*Myrciaria cauliflora*) seed extracts in oral carcinoma cells. **BioMed Research International**, 2014.

WASHINGTON, D.C. Preparedness and Response for Chikungunya Virus: Introduction in the Americas Pan American Health Organization (PAHO) / **Centers for Disease control and Prevention (CDC)**. 2011. Disponível em <[http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_download&gid=16984&Itemid=&lang=em](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=16984&Itemid=&lang=em)> acesso em 18/07/2016.

WEBLER, G. D.; CORREIA, A. C. C.; BARRETO, E.; FONSECA, E. Mg-doped biphasic calcium phosphate by a solid state reaction route: Characterization and evaluation of cyto toxicity. **Material Chemistry and Physics**, v. 162, p. 177-181, 2015.

WEINBREN, M. P.; WILLIAMS, M. C. Zika virus : further isolations in the zika area, and some studies on tile strains isolated. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 52, n. 3, 1958.

WERMELINGER, E. D.; FERREIRA, A. P.; HORTA, M. A. The use of modified mosquitoes in Brazil for the control of *Aedes aegypti*: methodological and ethical constraints. **Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro**, v. 30, n. 11, p. 2259 – 2261, 2014.

WHO-World Health Organization - Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticide. **WHO/VBC**, v. 81, n. 807, p. 1-6, 1981.

WHO - **World Health Organization**. Situation report Zika virus Microcephaly Guillain-barré Syndrome, 2016.

YAZAWA, K.; SUGA, K.; HONMA, A.; SHIROSAKI, M.; KOYAMA, T. Anti-inflammatory effects of seeds of the tropical fruit camu-camu (*Myrciaria dubia*).

**Journal of Nutritional Science and Vitaminology** (Tokyo), v. 57, n. 1, p. 104 – 107, 2011.

YUYAMA, K. A cultura de camu-camu no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 2 p.335 - 690, 2011.

ZAMMARCHI, L.; STELLA, G.; MANTELLA, A.; BORTOLOZZI, D.; TAPPI, D.; GUNTHER, S.; OSTEREICH, L.; CADAR, D.; FONTELA, C. M.; BARTOLONI, A.; CHANASIT, J. S. Zika virus infections imported to Italy: Clinical, immunological and virological findings, and public health implications. **Journal of Clinical Virology**, v. 63, p. 32 – 35, 2015.