



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE LICENCIATURA PLENA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E FITOQUÍMICA E INVESTIGAÇÃO DAS
ATIVIDADES ANTIOXIDANTE, ANTIMICROBIANA, CITOTÓXICA E
IMUNOMODULADORA PROMOVIDAS PELO EXTRATO SALINO DAS FOLHAS
DE *Malpighia emarginata* DC (ACEROLEIRA)**

BÁRBARA RAFAELA DA SILVA BARROS

RECIFE

2018

BÁRBARA RAFAELA DA SILVA BARROS

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E FITOQUÍMICA E INVESTIGAÇÃO DAS
ATIVIDADES ANTIOXIDANTE, ANTIMICROBIANA, CITOTÓXICA E
IMUNOMODULADORA PROMOVIDAS PELO EXTRATO SALINO DAS FOLHAS
DE *Malpighia emarginata* DC (ACEROLA)**

Monografia apresentada ao Curso de
Licenciatura Plena em Ciências
Biológicas/UFRPE como requisito parcial
para obtenção do grau de Licenciado em
Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Cristiane
Moutinho Lagos de Melo

Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Maria dos
Anjos Carneiro Leão

RECIFE

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

B277c Barros, Barbara Rafaela da Silva

Caracterização estrutural e fitoquímica e investigação das atividades antioxidante, antimicrobiana, citotóxica e imunomoduladora promovidas pelo extrato salino das folhas de *Malpighia emarginata* DC (aceroleira) / Layza Ingrede Ferreira de Lima. – Recife, 2018.

86 f.: il.

Orientadora: Cristiane Moutinho Lagos de Melo.

Coorientadora: Ana Maria dos Anjos Carneiro Leão.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação). – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Bacharel em Ciências Biológicas, Recife, BR-PE, 2018.

Inclui referências e anexo(s).

1. Aceroleira - Uso terapêutico 2. Bactérias patogênicas 3. Fitoterapia
4. Plantas medicinais 4. Matéria Médica Vegetal 5. Imunologia I. Melo, Cristiane Moutinho Lagos de, orient. II. Leão, Ana Maria dos Anjos Carneiro, coorient. III. Título

CDD 574

BÁRBARA RAFAELA DA SILVA BARROS

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E FITOQUÍMICA E INVESTIGAÇÃO DAS
ATIVIDADES ANTIOXIDANTE, ANTIMICROBIANA, CITOTÓXICA E
IMUNOMODULADORA PROMOVIDAS PELO EXTRATO SALINO DAS FOLHAS
DE *Malpighia emarginata* DC (ACEROLA)**

Comissão Avaliadora:

Profa. Dra. Ana Maria dos Anjos Carneiro Leão – UFRPE
Presidente

Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia – UFPE
Titular

Profa. Dra. Raquel Pedrosa Bezerra - UFRPE
Titular

Prof. Dr. Admilson Ribeiro Toscano de Brito - UFRPE
Suplente

RECIFE
2018

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pelo dom da vida, e por me conduzir até aqui.

A meus pais Washington e Eunice, pelo carinho, amor e credibilidade.

A você minha mãe, por suas orações, carinho e investimento. Você é parte de mim.

À minha avó Louzinha. Sem você, seu amor e seus conselhos, não sei como seria. Obrigada por me conduzir até aqui. Obrigada por me amar tanto.

Ao meu amado esposo Heverson pelo cuidado, carinho, zelo, paciência, e toda ajuda a mim concedida. Obrigada por apostar em mim, por acreditar sempre. Obrigada pelo ombro amigo e por tua amizade. Você é incrível! Amo você.

À minha sogra e amiga Juraci, por meu encorajar sempre. Obrigada por acreditar tanto em mim e nos meus sonhos. Seus conselhos são um lugar de refúgio.

À minha tia Vânia, por sua ajuda durante toda a minha vida e por seus conselhos. Você é uma mãe para mim.

À minha orientadora Profa. Cristiane Moutinho. Pela força, pelo investimento a mim conferido, por seus conselhos, sua orientação tão valiosa, suas horas de conversas, amizade, torcida, por suas aulas incríveis e por me inspirar. Obrigada por tudo. Você é um exemplo para mim.

À minha co-orientadora Profa. Ana Maria, pela professora incrível, por acreditar em mim, por seus conselhos, ensinamentos e amizade. Obrigada por tudo, professora.

À professora Marlene Barbosa e equipe, por vossa atenção e destreza durante a deposição da “Malpighia” no Herbário da UFPE.

Minha gratidão ao Laboratório de Bioquímica de Proteínas, na pessoa do Prof. Dr. Thiago Napoleão pelo apoio, auxílio e orientações durante as análises e a Maiara Celine, pelo auxílio durante os ensaios microbiológicos.

Ao Laboratório de Biofísica, na pessoa da Profa Dra. Claudia Sampaio, Leylianne e Renan, pela ajuda e ensinamentos durante as análises.

Ao Laboratório de Biologia Molecular, na pessoa da Profa Dra. Tereza Correia e Bárbara Ramos por todo apoio durante os testes antioxidantes.

Ao Laboratório de Processos Biotecnológicos do Departamento de Antibióticos, na pessoa da Profa Ana Maria, Iranildo e Anastássia. Muito obrigada por todo apoio, dicas, conselhos e parceria durante meus experimentos e iniciação científica.

Meus votos de gratidão ao Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), na pessoa de Túlio Diego, pelas análises cromatográficas.

À Dra. Virgínia Lorena pela assistência técnica aos estudos imunológicos e ao Núcleo de Plataformas Tecnológicas do Instituto Ageu Magalhães, pelo suporte no uso do citômetro de fluxo.

A todos os meus colegas e companheiros de bancada do Laboratório de Análises Imunológicas e Antitumorais - LAIA. Vocês são incríveis!

Obrigada a Vanzinha e Day. Não tenho palavras para agradecer por todo apoio que vocês me deram.

Obrigada Leh, por tantas vezes me ajudar na coleta da “Malpighia”, por me ouvir sempre e por ser tão companheira.

Gratidão a Amandinha, pelos cafés, companhia e doçura. Ahhh! E também por nos trazer tanta alegria. Um destaque especial aos memes engraçados que somente você consegue encontrar.

Ao colega Bruno por toda ajuda durante os procedimentos no laboratório. Muito obrigada.

À minha amiga Duda, por ser tão companheira durante a nossa graduação. Obrigada por todos os conselhos, por me ouvir sempre e por tornar momentos difíceis, em momentos cheios de esperança. Saudades de você, minha amiga.

Grata à minha Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE (*Ruralinda*), na pessoa da reitora Profa Dra. Maria José de Sena. E ao vice-reitor Prof. Dr. Marcelo Carneiro Leão, por sua destreza, competência e atenção a todos os estudantes da universidade. E por tornarem a Rural numa mãe, literalmente, com o conforto e suporte almejados por qualquer estudante de graduação, bem como a atenção e acessibilidade dos colaboradores e professores da casa. Muito obrigada mesmo!

Ao Departamento de Biologia da UFRPE pelo suporte, bem como à Coordenação do curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, na pessoa da Profa Dra. Elisângela Santana e da servidora Sirlei Silvestre (Sirleizinha) pela paciência de sempre, e o carinho que nunca falta.

Agradeço aos meus professores da UFRPE em especial às professoras Dra. Margareth Mayer e Nara Freitas, pelo apoio e carinho durante minha graduação. Vocês são anjos na minha vida.

Muito obrigada a todos!

*À memória do meu amado pai e avô José Lopes.
Você é parte de mim. Para sempre te amarei.*

Sumário

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVO GERAL	19
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	20
3.1. DIVERSIDADE BOTÂNICA NACIONAL E ETNOFARMACOLOGIA.....	20
3.2. COMPOSIÇÃO ESTRUTURAL E BIOQUÍMICA DE PLANTAS	21
3.3. <i>Malpighia emarginata</i> DC	23
3.4. HOMEOSTASE E ESTUDO SOBRE ESTRESSE OXIDATIVO: A IMPORTÂNCIA DAS MOLÉCULAS ANTIOXIDANTES.....	26
3.5. INVESTIGAÇÃO ANTIMICROBIANA DE COMPOSTOS BIOATIVOS EXTRAÍDOS DE PLANTAS.....	28
3.6. SISTEMA IMUNOLÓGICO	30
4. MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1. BIOINFORMÁTICA - FILOGENIA.....	33
4.1.1. IDs de dados taxonômicos e montagem da árvore filogenética e cladograma circular.....	33
4.2. COLETA DO MATERIAL BOTÂNICO.....	33
4.3. PREPARAÇÃO DO EXTRATO SALINO DE FOLHAS DE <i>M. emarginata</i>	33
4.4. IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES ESTRUTURAIS E QUÍMICOS DA <i>Malpighia emarginata</i>	34
4.4.1. Determinação do peso seco e umidade das folhas de <i>Malpighia emarginata</i>	34
4.4.2. Quantificação de extrativos das folhas de <i>Malpighia emarginata</i>	34
4.4.3. Hidrólise das folhas de <i>M. emarginata</i> em H ₂ SO ₄ 72% (v·v-1)	35
4.4.4. Determinação do teor de lignina solúvel das folhas de <i>M. emarginata</i> ..	35
4.4.5. Determinação de carboidratos, ácido orgânicos, HMF e furfural na fração líquida.....	36

4.4.6. Determinação de lignina insolúvel em meio ácido, teor de cinzas de lignina e cinzas totais das folhas de <i>M. emarginata</i>	36
4.5. ANÁLISE DE COMPOSTOS FITOQUÍMICOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA PERFORMANCE ACOPLADA À ESPECTROMETRIA EM MASSA - UPLC-MS DO EXTRATO SALINO DE DAS FOLHAS DE <i>M. emarginata</i>	37
4.6. COMPOSTOS FITOQUÍMICOS <i>IN VITRO</i> DO EXTRATO SALINO DAS FOLHAS DE <i>M. emarginata</i>	38
4.6.1. Dosagem de Fenóis Totais	38
4.6.2. Dosagem de Flavonoides.....	38
4.7. DOSEAMENTO DE PROTEÍNAS TOTAIS E TESTE DE HEMAGLUTINAÇÃO DO EXTRATO SALINO DE <i>Malpighia emarginata</i>	39
4.7.1. Dosagem Proteica (Lowry).....	39
4.7.2. Atividade Hemaglutinante (AH).....	39
4.8. AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTES <i>IN VITRO</i>	40
4.8.1. Atividade Antioxidante Total.....	40
4.8.2. Sequestro de radicais livres pelo DPPH.....	40
4.8.3. Redução de Íons Férricos (FRAP)	40
4.9. ENSAIOS ANTIMICROBIANOS	41
4.9.1. Isolados bacterianos e fúngicos, condições de cultura e preparação da amostra	41
4.9.2. Determinação das concentrações mínima inibitória (CMI), mínima bactericida (CMB) e mínima fungicida (CMF)	41
4.9.3. Crescimento microbiano e formação de biofilme	42
4.10. ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR E PROLIFERAÇÃO FRENTE A ESPLÊNOCITOS DE CAMUNDONGOS BALB/c	43
4.10.1. Animais	43
4.10.2. Obtenção dos esplenócitos	43

4.10.3. Análise da viabilidade celular por Anexina V-FITC e Coloração com Iodeto de Propídio (PI)	44
4.10.4. Análise de proliferação celular usando coloração CFSE.....	45
4.10.5. Medição da produção de citocinas utilizando o kit Cytometric Bead Array (CBA)	45
4.10.6. Análise in vitro de nitritos presentes nos sobrenadantes de cultura dos esplenócitos de camundongos BALB/c.....	46
4.10.7. Análise Estatística	46
5. RESULTADOS	47
.....	47
5.2. INVESTIGAÇÃO DA ESTRUTURA ORGÂNICA DO MATERIAL VEGETAL A PARTIR DAS FOLHAS DE <i>Malpighia emarginata</i> DC.....	47
5.3. COMPOSTOS FENÓLICOS PRESENTES NO EXTRATO SALINO DE FOLHAS DE <i>M. emarginata</i>	49
5.4. EXTRATO SALINO DE FOLHAS DE <i>M. emarginata</i> APRESENTOU POTENCIAL ANTIOXIDANTE	50
5.5. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO SALINO DE FOLHAS DE <i>M. emarginata</i>	51
5.6. EXTRATO SALINO DE FOLHAS DA <i>M. emarginata</i> NÃO INDUZIU DANOS CITOTÓXICOS ÀS CÉLULAS E PROMOVEU A PROLIFERAÇÃO CELULAR EM CÉLULAS DE BAÇO DE CAMUNDONGOS	52
5.7. EXTRATO SALINO DAS FOLHAS DE <i>M. emarginata</i> INDUZ RESPOSTA ANTI-INFLAMATÓRIA EM CÉLULAS ESPLÊNICAS DE CAMUNDONGOS BALB/c.....	54
6. DISCUSSÃO	57
7. CONCLUSÃO.....	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
Anexo A: Parecer do Comitê de Ética em Animais	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Compostos e/ou derivados de plantas com suas respectivas propriedades farmacológicas	21
Tabela 2. Fatores de conversão dos componentes precursores de Celulose e Hemicelulose	34
Tabela 3. Determinação dos componentes estruturais encontrados nas folhas de <i>M. emarginata</i>	46
Tabela 4. Determinação da presença de íons nas folhas de <i>M. emarginata</i>	46
Tabela 5. Determinação de Açúcares e produtos de degradação das folhas de <i>M. emarginata</i>	47
Tabela 6. Análise espectral de UPLC-MS dos compostos encontrados no extrato salino de folhas da <i>M. emarginata</i>	48
Tabela 7. Atividades antioxidantes promovidas pelo extrato salino de folhas de <i>M. emarginata</i>	49
Tabela 8. Atividade antifúngica promovida pelo extrato salino de folhas de <i>Malpighia emarginata</i> frente a <i>Candida</i> spp.....	50
Tabela 9. Resultados da atividade antibiofilme do extrato salino de <i>Malpighia emarginata</i> , em porcentagem, frente a espécies de <i>Candida</i> spp.....	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Dados taxonômicos e filogenia da família Malpighiaceae.....	23
Figura 2. <i>Malpighia emarginata</i> DC. A – Vista integral da formação arbustiva, B - Flores e C – Fruto	24
Figura 3. Cromatograma obtido através de análise em UPLC-MS do extrato salino de folhas de <i>M. emarginata</i>	48
Figura 4. Viabilidade de esplenócitos de camundongos avaliada pela marcação com Anexina V e Iodeto de Propídio	51
Figura 5. Índice de proliferação de esplenócitos de camundongos avaliado por coloração com CFSE.....	52
Figura 6. Perfil de produção de citocinas nos sobrenadantes de cultura de esplenócitos de camundongos Balb/c em 24 e 48 horas de incubação tratadas com extrato salino de folhas de <i>M. emarginata</i>	53
Figura 7. Liberação de óxido nítrico promovido pelo extrato salino de folhas de <i>M. emarginata</i> em culturas de esplenócitos de Balb/c em 24 e 48 horas de incubação.....	54

RESUMO

A utilização de plantas na medicina popular, embora seja uma prática antiga, permanece em constante uso indiscriminado e sem uma investigação sobre possíveis efeitos tóxicos. Neste estudo, foram investigados os principais constituintes estruturais das folhas da planta e foram avaliadas as propriedades biológicas promovidas pelo extrato salino obtido de folhas de *Malpighia emarginata* DC (aceroleira). As propriedades biológicas avaliadas tiveram como objetivos avaliar o potencial antioxidante, antimicrobiano, citotóxico e imunomodulador do extrato. A caracterização estrutural identificou a umidade, açúcares constituintes e cinzas da planta e a caracterização fitoquímica identificou os compostos químicos como compostos fenólicos presentes no extrato. Para o potencial antioxidante, foram utilizados os métodos DPPH, ATT e FRAP. Os testes antibacterianos, antifúngicos e a análise de potencial antibiofilme foram realizados avaliando os parâmetros MIC₅₀, MIC₉₀, CMB e CMF. Os ensaios de citotoxicidade, proliferação e a análise de liberação de citocinas e óxido nítrico, foram realizadas usando esplenócitos de camundongos BALB/c. Os resultados encontrados apontam para grande presença de glicose (0,4 g/L), lignina (20%) e pectina (21%) no material orgânico, bem como prevalência dos íons Fe (103.10 µg/100g) e Mn (10.33 µg/100g). O extrato apresentou atividade hemaglutinante, sugerindo presença de lectina, apresentou grande quantidade de compostos fenólicos totais (51 mg GAE/g) e exibiu alto poder antioxidante (20 mg AAE/g). O extrato salino de folhas de *M. emarginata* não apresentou atividade antibacteriana, mas alto perfil antifúngico frente a algumas espécies de *Candida*. O ensaio de citotoxicidade demonstrou que o extrato promove mais de 90% de viabilidade celular, mesmo na concentração mais alta utilizada de 50 µg/mL e o perfil imunomodulador e anti-inflamatório do extrato pode ser comprovado pela indução de proliferação celular em 24 e 48 horas de cultura, com significativa produção de citocinas do tipo Th2 (IL-4, IL-10 e IL-6, sendo esta última pleiotrópica) e redução significativa de óxido nítrico. O extrato salino de folhas de *M. emarginata* possui potencial biológico para ser empregado em doenças como úlceras, feridas dérmicas, micoses e no auxílio de terapias antienvhecimento, assim como observado no uso etnofarmacológico.

Palavras-chave: Antimicrobiana, fitoquímico, folhas, imunomodulação, *Malpighia emarginata*.

1. INTRODUÇÃO

A cultura humana tem sido profundamente influenciada pela diversidade de espécies de plantas, particularmente aquelas usadas para fins terapêuticos. Atualmente, o conhecimento contínuo sobre as propriedades medicinais das plantas tem sido foco de várias investigações científicas em todo o mundo (Ekor, 2014; Afzal *et al.* 2015; Boniface *et al.* 2017; Sultana & Muhammad 2017). É importante e necessário o estudo de constituintes fitoquímicos, mecanismo de ação terapêutica e identificação de princípios ativos responsáveis por muitas atividades biológicas observadas em plantas medicinais (Lin *et al.* 2018). Além disso, muitos autores têm publicado evidências sobre a eficácia de plantas medicinais e seus constituintes na cura de doenças como o câncer (Shirzad *et al.* 2011), aterosclerose (Asgari *et al.* 2012) e diabetes (Asgary *et al.* 2011).

A *Malpighia emarginata* DC é uma planta encontrada em toda a América Central e do Sul. É uma espécie tropical originária da região do Caribe, sendo conhecida como a cereja das Antilhas (Oliveira *et al.* 2012; Moreira *et al.* 2016). No Brasil a fruta é conhecida como acerola e possui alto teor de ácido ascórbico (vitamina C), carotenoides, antocianinas, tiamina, riboflavina, niacina, proteínas e sais minerais, principalmente ferro, cálcio e fósforo, sendo considerado um alimento funcional (Mezquita e Vigoa, 2000; Rosso *et al.* 2008; Alvarez-Suarez *et al.* 2017). Essa planta possui ainda outros constituintes fitoquímicos, como flavonoides, ácidos fenólicos e polifenóis (Bataglion *et al.* 2015; Malegori *et al.* 2017).

Todos esses compostos, também conhecidos como metabólitos secundários, são capazes de minimizar o dano oxidativo causado pelas espécies reativas de oxigênio e nitrogênio no organismo animal (Oliveira *et al.* 2012) e prevenir algumas doenças crônicas, como o câncer, por exemplo (Mezadri *et al.* 2008; Leffa *et al.* 2014). Além disso, essas moléculas também exibem potencial efeito terapêutico no tratamento de lesão pulmonar aguda (Favarin *et al.* 2013), como anti-inflamatórios (Yan *et al.* 2013; Lee *et al.* 2014), anticancerígeno (Singh & Patra 2018), anti-helmíntico (Zangueu *et al.* 2018), anti-hiperglicêmico, hepatoprotetor (Liu *et al.* 2014) e diminuem os riscos de doenças cardiovasculares (Sultana & Muhammad 2017; Saljoughian *et al.* 2017).

Comunidades locais, especialmente no nordeste do Brasil, usam o suco de acerola principalmente para doenças respiratórias como gripe e bronquite (Beltreschi

et al. 2018). No entanto, alguns relatos demonstraram que as folhas da *Malpighia emarginata* são usadas para fazer chá e o xarope, para o tratamento dos sintomas da gripe (Ribeiro *et al.* 2017), redução de colesterol e hipertensão (Vásquez, 2014). Além disso, estudos biológicos demonstraram que o consumo de acerola não é tóxico para as células humanas (Nunes *et al.*, 2011; Nunes *et al.*, 2013).

Com isso, é necessário ratificar a grande importância que tem sido atribuída ao estudo e investigação biológica de vários tipos de extratos (fenólico, alcóolico, salino, por exemplo), envolvendo os diversos órgãos de *M. emarginata* DC. Silva (2014), realizou os estudos da eficácia de resposta à atividade antimicrobiana contra os microrganismos *Listeria sp.* e *Escherichia coli* K12, a partir de nanopartículas encapsuladas, do extrato fenólico (obtido através de uma solução de etanol-água na proporção de 70:30) da polpa do fruto de acerola (*M. emarginata*).

Estudos semelhantes também podem ser encontrados na literatura, utilizando o extrato fenólico da polpa da acerola, realizado por Oliveira (2015), que obteve resultados significativos frente a bactérias Gram negativas e Gram positivas.

Rezende *et al.* (2018) demonstraram a potencial atividade antioxidante presente também no extrato alcóolico microencapsulado do fruto da acerola. Embora a maior parte dos estudos com a *M. emarginata* esteja direcionado ao fruto, há na literatura poucos estudos relacionados com as folhas da planta. Um exemplo são os estudos que demonstram a capacidade antitumoral do extrato hexânico e do acetato de etila feito a partir das folhas de *M. emarginata* DC, contra algumas linhagens de câncer, demonstrando ainda baixa toxicidade em fibroblastos humanos (Motohashi *et al.* 2004; Dos Santos Júnior *et al.* 2010). Isso apenas ratifica a necessidade de mais pesquisas relacionadas com as folhas da *M. emarginata*, uma vez que os estudos sobre esse órgão ainda são muito escassos, embora já apresentem indícios de grande relevância nos testes já existentes (Liu *et al.* 2014; Cruz, 2017)

M. emarginata tem sido usada na cultura popular, como planta medicinal, para produção de chás e no tratamento dos sintomas de doenças relacionadas ao sistema respiratório, cardiovascular e no combate ao colesterol (Ribeiro *et al.* 2017). Entretanto, a população tem o hábito de usar indiscriminadamente as plantas em geral, em diversas preparações como chás, infusões, pomadas de macerados e extrações alcóolicas dentro do contexto da automedicação (Giraldi & Hanazaki 2010).

Os estudos dos constituintes dessa planta, bem como seus mecanismos de ação terapêutica, são de suma importância para correlacionar o uso etnofarmacológico com os achados científicos. Nesse sentido, este estudo visa fazer uma análise sobre o perfil fitoquímico, antioxidante, citotóxico, antimicrobiano e imunomodulador de um extrato salino obtido das folhas de *M. emarginata* DC.

2. OBJETIVO GERAL

Investigar a composição estrutural das folhas de *Malpighia emarginata* DC e efetuar análises fitoquímicas e biológicas do extrato salino obtido de folhas da planta.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 2.1.1. Identificar os constituintes estruturais e químicos das folhas da planta.
- 2.1.2. Obter um extrato salino (NaCl 0.15 M) a partir de folhas de *M. emarginata*.
- 2.1.3. Realizar a caracterização fitoquímica do extrato salino através de UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography).
- 2.1.4. Identificar a taxa de compostos primários e secundários do extrato salino.
- 2.1.5. Investigar a possível presença de proteínas específicas como lectinas, através de ensaios de hemaglutinação e moléculas bioativas como ligninas e pectinas.
- 2.1.6. Avaliar a capacidade antioxidante do extrato salino.
- 2.1.7. Investigar a atividade antimicrobiana do extrato salino frente a espécies de microrganismos clinicamente importantes.
- 2.1.8. Investigar a citotoxicidade do extrato salino em células esplênicas de camundongos BALB/c.
- 2.1.9. Investigar a capacidade imunoestimulatória promovida pelo extrato salino através de testes de proliferação celular, produção de citocinas e liberação de óxido nítrico em esplenócitos de BALB/c.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. DIVERSIDADE BOTÂNICA NACIONAL E ETNOFARMACOLOGIA

No Brasil, a aquisição de conhecimentos sobre os usos de plantas para fins terapêuticos, está diretamente associada à grande diversidade de espécies presentes em solo nacional (Perna & Nascimento 2015). Essa diversidade botânica foi encontrada pelos primeiros europeus que entraram no país, culminando com a aquisição dos saberes sobre os usos da flora local, que acabou se fundindo com àqueles trazidos da Europa e por escravos africanos (Giraldi & Hanazaki 2010). Entre as diversas espécies, a flora presente no país tem sido corriqueiramente utilizada por comunidades para uso no tratamento de diversas doenças, servindo como suporte na medicina popular, por diversos povos (Vásquez *et al.* 2014).

O Brasil é conhecido como um dos países com maior biodiversidade vegetal, possuindo seis principais biomas de destaque, como a Amazônia, Mata Atlântica, Cerrado, Caatinga, Pantanal e Pampa, totalizando 8,5 milhões de km² (Pilatti *et al.* 2011). A floresta amazônica se destaca por ser o maior bioma do país, considerada um santuário natural, localizada no norte da América do Sul, com um território de 4,196.943 milhões de km² (IBGE, 2004) e abrigando mais de 2.500 espécies de árvores e 30.000 de plantas (Ministério do Meio Ambiente, Brasil 2018).

Mas não apenas no norte do país, como em todo o seu território, é importante considerar a diversidade florística presente também em áreas de Mata Atlântica, que embora esteja em constante pressão antrópica, exibe grande riqueza e diversidade, apresentando atualmente, cerca de 20 mil espécies vegetais (Ministério do Meio Ambiente, Brasil 2018).

De acordo com Rodrigues & Carvalho (2011), essas regiões abrigam grandes grupos de comunidades indígenas, quilombolas, ribeirinhos, pescadores, pequenos produtores rurais e extrativistas, que possuem e fazem uso de um vasto conhecimento sobre a utilização de plantas na medicina popular. E esse conhecimento tem sido passado de gerado a geração, fazendo parte da cultura e costumes dessas comunidades (Giraldi & Hanazaki 2010).

Diante disso, muitas áreas estão envolvidas na pesquisa de novas substâncias oriundas de plantas, como a fitoquímica, que trabalha no isolamento, purificação e caracterização de princípios ativos, a etnofarmacologia e a etnobotânica, que

buscam estudar e analisar os saberes populares sobre o uso de plantas e os achados científicos (Beltreschi *et al.* 2018).

3.2. COMPOSIÇÃO ESTRUTURAL E BIOQUÍMICA DE PLANTAS

A composição bioquímica das plantas é constituída basicamente por metabólitos primários e secundários, que realizam as mais diversas funções (Zangueu *et al.* 2018). Dentre os metabólitos primários, estão os ácidos nucleicos, carboidratos, lipídios e proteínas (Vizzotto, *et al.* 2010). Algumas destas proteínas, tais como as lectinas, estão relacionadas com seus mecanismos de defesa, uma vez que várias evidências demonstram a sua capacidade em desempenhar esse papel (Da Silva, 2014).

Lectinas são proteínas de origem não imune que estão amplamente distribuídas na natureza, e que possuem a capacidade de ligação às estruturas glicanas nas superfícies celulares de maneira específica, porém reversível (Nakagawa & Yukishige 2012). Nas plantas, as lectinas estão presentes em vários tecidos como sementes, folhas, flores, cascas, rizomas e raízes, e possuem diferentes propriedades biológicas (Hivrale & Ingale 2013).

Além disso, as lectinas apresentam potencial aplicabilidade biotecnológica, desencadeando vários processos celulares importantes na sinalização celular. Dentre as propriedades biológicas estudadas, como as antimicrobianas (Moura *et al.* 2015), antifúngicas (Gomes *et al.* 2012; Regente *et al.* 2014), antiparasitárias (Albuquerque *et al.* 2014), antitumorais (De Oliveira Figueiroa *et al.* 2017), inclusive inseticida (De Araújo *et al.* 2012), o potencial imunomodulador dessas proteínas, tem sido um dos principais alvos de estudo (Salazar *et al.* 2013; De Siqueira Patriota *et al.* 2017).

Devido a capacidade característica de ligação das lectinas, modulando a resposta imunológica através das ligações a receptores do tipo Toll-Like na superfície das células imunológicas, essas proteínas podem ser ferramentas no reconhecimento de microrganismos através de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (Ballal & Inamdar 2018). Como também na potencialização de liberação de citocinas, óxido nítrico, e ativação e proliferação celular (Abu-Rish *et al.* 2017). Nesse sentido, estudos envolvendo a purificação e caracterização dessa

classe de proteínas, vêm sendo realizados de forma crescente (Nakagawa & Yukishige 2012).

Os metabólitos secundários, são representados por compostos como: terpenóides, flavonoides, taninos, saponinas, sesquiterpeno, alcaloides, betacarotenos, entre outros compostos (O'Connor, 2015). Esses compostos secundários servem inicialmente para uso da própria planta, possuindo diversas funções, tais como a capacidade de atração de animais polinizadores (promovida pelos compostos de natureza mais volátil), toxicidade contra alguns insetos, fitopatógenos e até mesmo alguns animais herbívoros (como forma de defesa da própria planta), e outros são capazes de suprimir o crescimento de plantas vizinhas, ou muito próximas a ela, como uma forma de evitar a competição por recursos (French *et al.* 2018).

Grande parte da atividade terapêutica das plantas está relacionada aos metabólitos secundários biologicamente ativos presentes nelas (Barboza *et al.* 2018), como os polifenóis, em especial os flavonóides e ácidos fenólicos, que são responsáveis por diversas atividades como antioxidante, anticâncer e anti-lipoxigenase (O'Connor, 2015; Ghasemzadeh *et al.* 2015). Muitos desses compostos e suas funções biológicas elucidadas no âmbito científico podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1: Compostos e/ou derivados de plantas com suas respectivas propriedades farmacológicas

Composto	Planta de Origem	Nome Popular	Atividades Biológicas	Referências
Capsaicina	<i>Capsicum spp.</i>	Pimenta-vermelha	Antitumoral	Bode & Dong, 2011
Aspirina	<i>Salix alba</i> L.	Salgueiro-branco	Analgésico / Antitumoral	Mahdi <i>et al.</i> 2006
Morfina	<i>Papaver somniferum</i> L.	Papoula	Analgésico	Rosenblun <i>et al.</i> 2008
Quinina	<i>Cinchona</i>	Cinchona	Antimalárico	Renslo, 2013
Pilocarpina	<i>Pilocarpus jaborandi</i> <i>Pilocarpus microphyllus</i>	Jaborandi	Hipertensão intraocular	Santos & Moreno, 2004
Colchinina	<i>Colchicum autumnale</i>	Açafrão	Tratamento de Gota	Larsson & Ronsted, 2014
Etoposido	<i>Pelargonium peltatum</i> L.	Mandrágora	Antitumoral	Montecucco <i>et al.</i> 2015
Masoprocol	<i>Larrea divaricata</i> Cav.	Jarilla	Anti-inflamatório/ Antioxidante	Son <i>et al.</i> 2005

Metformina	<i>Galega officinalis</i>	Arruda-caprária	Controle de Glicemia	Bailey, 2017
Levodopa	<i>Mucuna pruriens</i>	Feijão-da-florida	Tratamento de Parkinson	Min <i>et al.</i> 2015
Dicumarol	<i>Melissa officinalis</i>	Melilotus	Anticoagulante	Apostolakis <i>et al.</i> 2011
Vinblastine	<i>Catharanthus roseus</i>	Vinca / Boa-noite	Antitumoral	Noble <i>et al.</i> 1958
Solamargine	<i>Vitis vinifera</i>	Videira	Antitumoral	Tyagi & Prasad, 2015
Taxol	<i>Taxus brevifolia</i>	Teixo do Pacífico	Antitumoral	Elias, 1992.
Artemisinina	<i>Artemisia annua</i>	Artemísia	Antimalárico	Su & Miller, 2015
Maitansine	<i>Maytenus ovatus</i>	Maytenus	Antitumoral	Kupchan <i>et al.</i> 1972
Irinotecano	<i>Cyanea acuminata</i>	Árvore Feliz	Antitumoral	Potmesil, 1994
Arglabina	<i>Artemisia glabella</i> Kar.	Absinto / Artemísia	Antitumoral	Tyagi & Prasad, 2015
Vinorelbina	<i>Catharanthus roseus</i>	Vinca / Boa noite	Antineoplásico	Bahadori <i>et al.</i> 2014
Vinflunina	<i>Catharanthus roseus</i>	Vinca / Boa noite	Antitumoral	Fahy <i>et al.</i> 2008

3.3. *Malpighia emarginata* DC

A *Malpighia emarginata* DC conhecida popularmente como “aceroleira”, trata-se de uma planta de origem tropical proveniente da região do Caribe, onde é conhecida como cereja das Antilhas, por produzir um fruto arredondado e de cor vermelha. Ela foi trazida de Porto Rico a Pernambuco/Brasil, pela pesquisadora e engenheira agrônoma Maria Celene Ferreira Cardoso da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, que trouxe consigo 289 sementes de acerola que foram germinadas na sementeira da UFRPE, em 1958 (Martins, 2007; Shinohara *et al.* 2015).

Posteriormente, nos anos 80 a UFRPE decidiu promover um programa de reconhecimento dos valores nutricionais da acerola, com a finalidade de sua conservação e adoção em solo brasileiro (Shinohara *et al.* 2015). Com isso puderam estabelecer uma relação de grande importância também com o envolvimento do mercado nacional, que até hoje utiliza a acerola como uma das principais produções rurais, devido à grande utilização do fruto não apenas dentro do país, mas também, segundo Freitas *et al.* (2014) e Neto *et al.* (2014), como o maior produtor, consumidor e exportador de acerola no mundo.

Entre as frutas produzidas no Brasil, a acerola vem se destacando como uma das frutas mais comercializadas e produzidas, contando com plantios em vários estados brasileiros, em especial no Nordeste do país, com 60% da produção nacional de acerola, alcançando cerca de 10.000 hectares de produção do fruto (Furlaneto & Nasser 2015).

Pertence ao *clado* das Pentapetalae e à *taxa* Rosidae (Fig. 1), por possuir flores com verticilos de 5 peças. Integrante da família Malpighiaceae, a *M. emarginata* DC é uma arbustiva que pode alcançar entre 3 a 4 metros de altura. Seu tronco se ramifica desde a base, apresentando uma copa densa com muitas folhas de coloração verde-escura brilhante (Fig. 2A) (Souza & Lorenzi 2008). As suas flores são do tipo inflorescência corimbo de flores com simetria zigomorfa, despontando a partir da axila foliar, entre duas e 6 flores. A diferenciação do botão floral ocorre entre 7 e 10 dias, e sua antese é diurna e ocorre entre 15 e 17 dias (Fig. 2B). Sua corola é dialipétala, contendo 5 pétalas franjadas com cores variando entre o branco e diversas tonalidades de rosa, e seu cálice é dialissépalo, contendo 5 sépalas de coloração verde em cuja base podem ser encontrados entre seis a 10 elaióforos, com 10 estames e um ovário súpero tricarpetal e unilocular (Medeiros *et al.* 2011; De Oliveira *et al.* 2015). A flor é bissexuada e o sistema de reprodução é realizado principalmente por abelhas (Medeiros de Siqueira *et al.* 2011). O grão de pólen é esferoidal, de tamanho médio (com diâmetro entre 20 e 30 μm) e simetria radial (Souza & Lorenzi 2008).

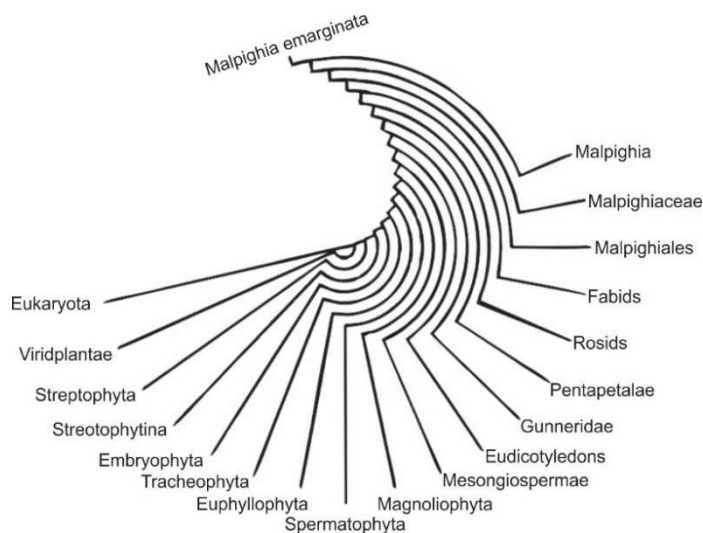


Figura 1 - Dados taxonômicos e filogenia da família Malpighiaceae.

Os frutos da acerola são do tipo drupa, com a casca fina e lisa, e polpa carnosa, suculenta e aromática (Fig. 2C). Seu amadurecimento ocorre entre 21 e 25 dias após a antese e chegam a pesar entre 2 e 10 g, variando em virtude do potencial genético da planta e as condições de cultivo e clima. A coloração dos frutos inicia-se na cor verde, passando para o amarelo-alaranjado e em alguns tipos de aceroleira, chegam a ficar vermelho escuros, quando bem maduros. A estrutura interna dos frutos consiste em 3 sementes, onde cada uma é envolvida num endocarpo reticulado e trilobado (Souza & Lorenzi 2008; Adriano, 2011).

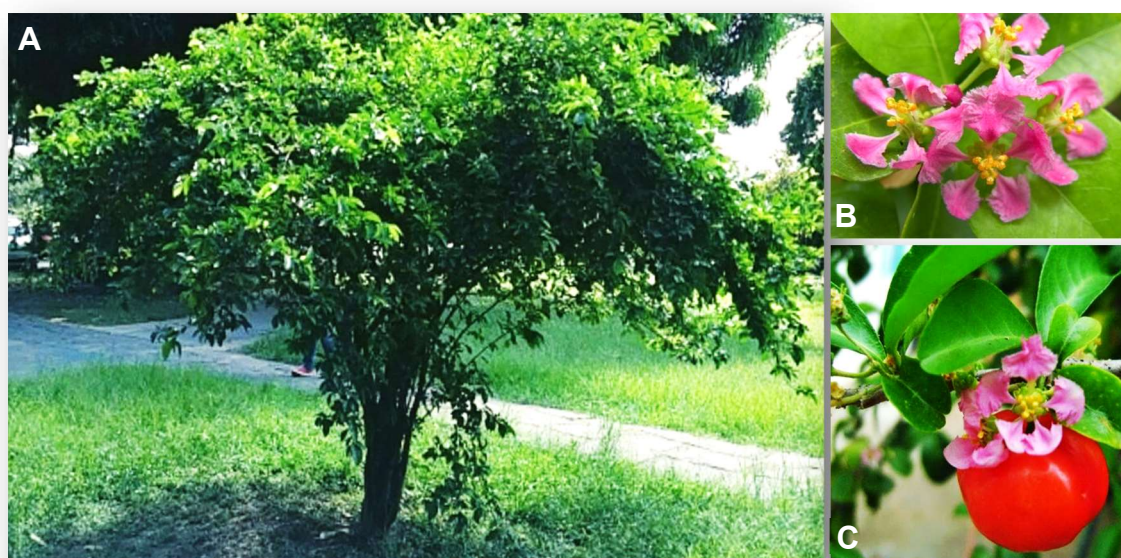


Figura 2 - *Malpighia emarginata* DC. **A** – Vista integral da formação arbustiva, **B** - Flores e **C** - Fruto. Fontes: a autora e <http://denisegomesludwig.blogspot.com.br>

A grande procura pelo consumo da acerola ocorre em decorrência das propriedades antioxidantes do fruto que apresenta alto teor de ácido ascórbico (vitamina C). Segundo pesquisas, o suco da acerola possui em média de 50 a 100 vezes mais vitamina C do que o suco do limão e da laranja, respectivamente (Barboza *et al.*, 1996; Martins *et al.*, 2013). Como já se sabe, o ácido ascórbico é uma vitamina cuja principal propriedade está relacionada diretamente com o sequestro de espécies reativas de oxigênio, o que as torna inativas, evitando danos irreversíveis às células (Pohanka *et al.* 2012). Além disso, estudos demonstraram que a vitamina C possui propriedade antiviral contra o vírus influenza, além de ser comumente usada no tratamento de sintomas provocados por doenças respiratórias (Banerjee & Kaul 2010; Alvarez-Suarez *et al.* 2017; Beltreschi *et al.* 2018).

3.4. HOMEOSTASE E ESTUDO SOBRE ESTRESSE OXIDATIVO: A IMPORTÂNCIA DAS MOLÉCULAS ANTIOXIDANTES

Na natureza, os seres vivos estão em constante busca pelo equilíbrio fisiológico e metabólico. Isso porque suas células precisam de um ambiente homeostático, para que todos os processos biológicos aconteçam de forma equilibrada, a fim de que a vida seja mantida (Ramsay & Woods 2014). O interessante é que esse processo é interminável, pois a vida cria e busca manter a ordem (equilíbrio), em um universo que está sempre tendencioso a manter a desordem. E essa desordem é explicada pela *segunda Lei da Termodinâmica*.

A *segunda Lei da Termodinâmica* afirma que em processos espontâneos no universo ou mesmo em sistemas isolados, o grau de desordem só tende a crescer (Mady, 2014). Isso se explica pelo fato de que para manter a ordem por exemplo em um ambiente qualquer, é necessário que seja aplicado um esforço sobre ele, para que a organização aconteça (Vieira *et al.* 2014; Lemos 2017). A mesma coisa ocorre nos processos metabólicos dos organismos vivos, por isso, a homeostasia permite a garantia da manutenção celular, e consequentemente a conservação desses elementos fisiológicos e do metabolismo, através dos seus mecanismos de regulação (Alberts *et al.* 2010; Mady *et al.* 2014).

Durante toda a vida, as células executam uma série de reações químicas, que resultam na produção de moléculas químicas relacionadas ao metabolismo, como os carboidratos, proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, por exemplo, que vão servir para a constituição das próprias células e na manutenção dos tecidos e órgãos os quais elas compõem (Ribeiro 2018). Tudo isso é executado a fim de que todas as propriedades características dos sistemas vivos sejam cumpridas, desde o seu nascimento até a sua morte. Como por exemplo a obtenção de energia obtida através da oxidação de moléculas orgânicas, como ocorre da respiração celular (Cotinguiba *et al.* 2015; Ribeiro 2018).

A glicose ($C_6H_{12}O_6$) é um monossacarídeo cuja principal função é servir como fonte de energia primária para as células (Alberts *et al.* 2010). E essa energia é utilizada pelas células justamente no processo de respiração, onde a glicose será paulatinamente degradada em moléculas menores, por meio de uma série de reações químicas, liberando a energia necessária para se manter. Essa energia se

dá por meio de transferência de elétrons durante o processo de quebra das ligações químicas na glicólise (Nelson *et al.* 2014).

Como consequência da fosforilação oxidativa durante o processo do metabolismo mitocondrial, algumas moléculas com elétrons de valência não pareados e possuindo ligações instáveis chamadas espécies reativas de oxigênio (EROs) são constantemente formadas (Alberts *et al.* 2010; Bento 2015). Todos os tipos de EROs, sejam os ânions superóxido ou peróxido de hidrogênio, possuem oxigênios muito reativos e que podem trazer consequências funcionais muitas vezes irreversíveis, quando em altas concentrações, reagindo com outras moléculas essenciais para a vida, como proteínas, lipídios, carboidratos e ácidos nucleicos (Marinho *et al.*, 2014).

As formações de EROs não são exclusivamente do processo respiratório celular, mas todos os processos metabólicos em geral, podem produzir essas espécies reativas (Venditti *et al.* 2013; Holzerová & Prokisch 2015). Como se sabe hoje, várias enzimas que participam do metabolismo, podem estimular a produção de EROs, bem como algumas organelas que produzem EROs como um subproduto metabólico (Brieger *et al.* 2012).

Em alguns casos, as EROs são formadas pelo organismo propositalmente, como é o caso das NADPH oxidases, que são verdadeiras fontes de EROs. As NADPH oxidases são complexos enzimáticos presentes nas membranas celulares plasmáticas e das organelas citoplasmáticas (Brieger *et al.* 2012). Elas são enzimas responsáveis pela transferência de elétrons através das membranas. É durante esses processos, que a formação de EROs acontece praticamente como um produto intencional das reações (Zuo *et al.* 2015; Jiang *et al.* 2016).

As NADPH oxidases possuem algumas isoformas que são conhecidas na literatura como enzimas NOX, que mantém um padrão entre os diversos tecidos, mas variam em algumas funções específicas, que em geral, estão sempre voltadas para a defesa do organismo, contra patógenos (Brieger *et al.* 2012; Zuo *et al.* 2015; Jiang *et al.* 2016).

Muito embora as EROs possuam também suas funções vitais para os seres vivos, como citado por diversos estudiosos, é necessário que haja sempre um controle dessas espécies (homeostase), entre a produção de EROs e as frequentes ações antioxidantes pelas células, para que os possíveis danos

sejam evitados (Zuo *et al.* 2015; Jiang *et al.* 2016). Isso porque como são altamente reativas, podem gerar grandes danos, sendo associadas, inclusive, ao surgimento de várias doenças (Liochev 2013).

Em casos de estresse oxidativo, quando há um desequilíbrio entre espécies oxidantes em maior quantidade do que espécies redutoras no meio intracelular, para que não aja um dano irreversível na célula, o organismo animal utiliza-se de uma defesa natural contra ROS, que consiste em enzimas antioxidantes como a glutathione sintetase, a tioredoxina e a peroxirredoxina, por exemplo (Liochev 2013). Mas os antioxidantes mais predominantes na natureza, são de origem alimentar (Brieger *et al.* 2012).

Os polifenóis, por exemplo, que estão presentes em diversas plantas são muito descritos na literatura por possuírem propriedade antioxidante (Kasote *et al.* 2015). Esses compostos atuam na redução dos danos oxidativos causados no organismo pelas EROs, prevenindo o surgimento de doenças crônicas não transmissíveis, como câncer (Sassa *et al.* 2013), doenças pulmonares (Zuo *et al.* 2013), cardiovasculares (Zuo *et al.* 2014) e distúrbios neurodegenerativos (Mitsumoto *et al.* 2014; Zuo *et al.* 2015).

3.5. INVESTIGAÇÃO ANTIMICROBIANA DE COMPOSTOS BIOATIVOS EXTRAÍDOS DE PLANTAS

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS 2018), as doenças infecciosas são objetos de grande relevância na investigação clínica, pois acometem milhares de pessoas em todo o mundo, desenvolvendo diversas doenças. De acordo com dados apresentados pela OMS (2018), em 2016, cerca de 3 milhões de pessoas morreram no mundo, por infecções pulmonares. E dentre as doenças infecciosas, as que afetam o sistema respiratório, são as que causam o maior número de mortes até hoje, devido à alta resistência e patogenicidade dos microrganismos, como a tuberculose que está entre as 10 principais causas de morte no mundo, por doenças infecciosas. Também segundo a OMS, a taxa de mortalidade por doenças diarreicas em 2016, foi de 1,3 milhões.

Bactérias e fungos são responsáveis por diversas doenças clinicamente importantes (Li *et al.* 2014; Schelenz *et al.* 2015). São doenças envolvendo infecções do trato urinário e de feridas, bacteremia, pneumonia, rinite crônica atrófica, artrites,

enterites, meningites e sepse, causadas por bactérias como a *Klebsiella pneumoniae*, que vem sendo alvo de estudos devido aos diversos relatos de infecção hospitalar e alta resistência a antibióticos, afetando principalmente o sistema respiratório (Xiong *et al.* 2016; Alencar *et al.* 2017).

Microrganismos de infecção por via alimentar que causam diversas disfunções no sistema gastrointestinal, também são considerados alvos de grande importância epidemiológica, pois acometem diversas pessoas, promovendo surtos em comunidades em todo o mundo, principalmente em decorrência do fácil contágio por meio de água e alimentos contaminados, como ocorre no contágio pela bactéria *Salmonella enteritidis*, por exemplo (Inns *et al.* 2015; Wright *et al.* 2016).

Outros casos de grande relevância médica, são os estudos voltados para as diversas espécies clinicamente relevantes de fungos, como os microrganismos do gênero *Candida* spp. que representam um dos agentes patogênicos mais comuns que acometem humanos (Felton *et al.*, 2014). Mas um dos maiores problemas envolvendo o patógeno, trata-se de seu potencial de promover infecções invasivas, cujas estimativas apontam uma taxa de mortalidade média por candidemia de 30 a 54%, especialmente em indivíduos imunossuprimidos (Andes *et al.*, 2012; Bassetti *et al.* 2014).

Atualmente, as micoses nem sempre são tratadas com sucesso devido à limitação dos medicamentos antifúngicos disponíveis, o que os torna muitas vezes ineficazes, estimulando ainda mais a resistência de muitos patógenos fúngicos (Innocente, 2014). O desenvolvimento de cepas de fungos resistentes em resposta ao uso extensivo de drogas antifúngicas nas últimas décadas, é susceptível a causar sérios problemas no futuro. Consequentemente, existe uma necessidade urgente de desenvolver agentes antimicóticos eficientes e não tóxicos com um espectro específico de atividade (Ostrosky-Zeichner, 2010).

Uma das principais fontes de tratamento natural bastante utilizadas são as plantas, pois muitos de seus metabólitos secundários presentes, que são moléculas farmacologicamente ativas, funcionam como tratamento a diversos problemas de saúde, inclusive a doenças causadas por microrganismos patogênicos (Herrera-Arellano *et al.*, 2013).

Alguns compostos secundários produzidos por plantas, apresentam-se potencialmente ativos contra microrganismos (Motohashi *et al.*, 2004). Os taninos,

por exemplo, além de possuírem atividade antioxidante, são amplamente conhecidos por sua ação antimicrobiana (Yang & Liu, 2014). Os elagitaninos são metabólitos secundários pertencentes ao grupo dos taninos hidrolisáveis, assim como os alcaloides, cumarinas, isoflavonoides, poliacetilenos, quinonas e terpenos, também possuem grande potencial antimicrobiano (Reichling 2018).

3.6. SISTEMA IMUNOLÓGICO

A imunologia é a ciência que estuda as defesas do organismo contra a invasão antigênica e quebra da homeostase por transformações celulares diversas (Abbas *et al.*, 2015). Inicialmente, a pele é a primeira barreira que os seres vivos possuem, para evitar a entrada de patógenos. Sua composição constituída de células queratinizadas e justapostas, tornam o epitélio uma barreira impenetrável para os microrganismos (Delves *et al.* 2017). Mas não apenas a pele, como também as mucosas produzidas pelo epitélio que recobre o sistema respiratório e gastrointestinal, são as primeiras defesas físicas e químicas eficazes contra a entrada desses microrganismos (Murphy, 2016).

Os microrganismos que rompem essa barreira, se deparam com células imunes e moléculas, que inicialmente irão reconhecer o invasor por meio de receptores do tipo Toll-Like que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (Epelman *et al.* 2015; Campos *et al.* 2018), permitindo que essas células possam diferenciar o próprio, do não próprio, iniciando assim uma resposta imune inata contra o invasor e evitando que o mesmo se instale no organismo e desenvolva a doença (Abbas 2014; Murphy, 2016).

A resposta imune inata consiste numa ação imediata, não específica e de natureza efetora, cujas células estão sempre preparadas para a eliminação de qualquer invasor. Seu objetivo é acima de tudo, a eliminação direta dos patógenos reconhecidos por meio de mecanismos diversos como degranulação e fagocitose, embora seja um tipo de resposta que não persista a longo prazo (Cruvinel *et al.* 2010).

Muitas infecções são controladas pela imunidade inata, sem que a doença seja sequer desenvolvida (Murphy, 2016). Mas nos casos em que a resposta inata não consegue solucionar, as suas atividades passam a estimular uma resposta adaptativa, por meio de apresentação do antígeno às células especializadas da

linhagem linfocitária, que após o controle da infecção, direciona essa resposta para a elaboração de uma memória imunológica duradoura, que poderá evitar a doença com eficácia, caso haja uma reinfecção pelo mesmo antígeno (Mesquita Júnior *et al.* 2010).

Portanto, a resposta imune adaptativa é mais tardia, e seu principal objetivo consiste inicialmente no combate à infecção com base no reconhecimento específico associado à geração de memória imunológica, a fim de adaptar as defesas do indivíduo, especificamente contra cada patógeno, através da seleção clonal de células imunes antígeno-específicas (Cruvinel *et al.* 2010; Murphy, 2016).

Muitas células e moléculas estão envolvidas nestes dois tipos de resposta imune (inata e adaptativa), como monócitos, basófilos, mastócitos, neutrófilos, eosinófilos, células dendríticas, macrófagos, células da linhagem linfocitária (CD4, CD8, NK, Treg), sistema complemento, imunoglobulinas, interleucinas, mediadores químicos diversos (óxido nítrico, histaminas leucotrienos, bradicinina, peptídeos antigênicos, entre outros) (Cruvinel *et al.* 2010; Kenneth 2014).

Os linfócitos T CD4 possuem uma capacidade de diferenciação em várias subpopulações de células efectoras, que são funcionalmente distintas, e estão particularmente associadas a perfis de citocinas específicos. As subpopulações funcionais conhecidas são as células TH1, TH2, TH17 e Treg, e são definidas de acordo com as combinações de citocinas secretadas por elas (Murphy, 2016).

Mas o que chama atenção para o estudo de compostos bioativos e sua relação com o sistema imune, está na capacidade imunomoduladora promovida por vários compostos presentes em plantas, que podem estimular as células do sistema imune a responderem efetivamente contra diversas doenças (Djafoua *et al.* 2015; Martel *et al.* 2017).

Dentre as propriedades biológicas estudadas, como as antimicrobianas, antiparasitárias e antitumorais, o potencial imunomodulador de alguns compostos bioativos como as lectinas, tem sido um dos principais alvos de estudo (de Oliveira Silva *et al.* 2011).

Por isso, devido a capacidade das lectinas, de direcionar a modulação da resposta imunológica através das ligações a receptores tipo Toll-Like e respectivos PAMPs nos microrganismos (da Silva & Correia, 2014), indução da liberação de citocinas e óxido nítrico, e estimulação para a ativação e proliferação celular, estudos envolvendo a purificação, caracterização e aplicabilidade biotecnológica dessa

classe de proteínas, vêm sendo constantemente realizados (de Melo *et al.* 2010; de Oliveira Silva *et al.* 2011).

Mas, embora o perfil de citocinas nos aponte qual o tipo de resposta gerada através de estudos com Th1, Th2, Th9, Th17, Th22 (entre outros), compreender quais as vias de sinalização essas proteínas atuam, torna-se importante para o direcionamento da aplicação clínica da lectina propriamente dita (Singh & Zimmerli, 2013).

De fato, algumas lectinas se destacam por sua capacidade imunomoduladora, como a lectina ArtinM que induziu a produção das citocinas IL-10, IL-12, TNF- α e IFN- γ , através de sua interação com alguns N-glicanos, presentes na superfície celular de macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e mastócitos (Souza *et al.* 2013). Park *et al.* (2010), investigaram as atividades imunoestimuladoras da KML-C, que induziu uma resposta do tipo Th1, pela produção de IL-12 e TNF- α , mostrando ser um potencial ativador de TLR-4 em macrófagos. A lectina PHA, também induziu resposta do tipo Th1 pela produção de IL-2 e IFN- γ com estimulação de TLR extracelulares, em especial TLR-2, -4 e -6 (Souza *et al.* 2013).

Outras moléculas presentes nas plantas, antes estudadas apenas como componentes pertencentes ao perfil estrutural do vegetal, vêm ganhando destaque no mundo científico dos produtos bioativos. Entre essas moléculas estão as ligninas e as pectinas. Estudos recentes com as ligninas LIG e CN-Bio-Lignina, realizados por Jha & Kumar (2017) e por Morganti *et al.* (2017), demonstraram importante atividade antifúngica contra *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* e baixa citotoxicidade contra queratinócitos humanos. Além disso, Reesi *et al.*, (2017) encontrou potencial cicatrizante em modelo *in vivo* em uma lignina de nanofibras (Lig-NFs) e Bayar *et al.* (2017) demonstraram o excelente perfil antioxidante de uma pectina isolada de cladódios da *Opuntia ficus indica* (popularmente denominada Palma gigante).

Estudos sobre moléculas bioativas e de importância farmacológica podem oferecer uma alternativa para o surgimento de novos fármacos que visam, entre outras funções, combater o aumento da resistência de cepas microbianas aos medicamentos atuais (de Oliveira Silva *et al.* 2011; Singh & Zimmerli, 2013).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. BIOINFORMÁTICA - FILOGENIA

4.1.1. IDs de dados taxonômicos e montagem da árvore filogenética e cladograma circular

Para análise das IDs dos grupos taxonômicos das espécies de *M. emarginata* foi utilizado o banco de dados público UniProt Taxonomy (ID: 151847). Em seguida, os dados foram manipulados pelo banco de dados público de biodiversidade da Enciclopédia of Life (Parr et al, 2014) com hierarquia taxonômica para *M. emarginata* (Species 2000 e ITIS, 2013). O software Notepad++ foi utilizado para montar a base da programação para fazer o cladograma circular, a partir do roteiro dessa espécie de planta (Page, 1996; Don Go, 2003). A montagem da árvore filogenética foi realizada de acordo com Peterson e Colosimo (2007) e foi utilizado o software TreeViemJ para montar o cladograma a partir do roteiro escrito pelo software Notepad++. Finalmente, a modelagem de árvore filogenética foi feita em forma circular através do software Dendroscope 3 (Huson et al, 2012).

4.2. COLETA DO MATERIAL BOTÂNICO

As folhas de *Malpighia emarginata* foram coletadas na cidade de Recife, estado de Pernambuco, Brasil. A identificação botânica foi realizada pela professora doutora Marlene Barbosa, no dia 30 de maio de 2017, no Herbário Geraldo Mariz, localizado no Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, por meio de exsicata depositada sob número de registro 82.615.

4.3. PREPARAÇÃO DO EXTRATO SALINO DE FOLHAS DE *M. emarginata*

As folhas foram mantidas à temperatura ambiente para secagem por 4 dias. As folhas secas foram trituradas em Black Oster Inversa para obtenção do material pulverizado (20 g). Este material foi utilizado para identificação dos constituintes estruturais e químicos e para a produção do extrato salino (0,15M) da planta. Para a produção do extrato, 20 g do material orgânico foi diluído em NaCl 0,15 M (200 mL) na proporção de 10% (p / v) e com o auxílio de um agitador magnético (Lab.

Companion™ IS-971), o material foi mantido sob agitação (400 rpm) em temperatura constante (28 °C) por 16 horas. Após o tempo de agitação, o material foi filtrado usando filtro de papel e centrifugado (10.000 G, por 15 min). O sobrenadante obtido foi coletado e denominado extrato salino de folhas de *Malpighia emarginata*. Em seguida, o extrato foi liofilizado e obteve-se 9,2 g de material bruto (o que denota um rendimento de 46%). O material foi armazenado a -20 ° C até ser utilizado.

4.4. IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES ESTRUTURAIS E QUÍMICOS DA *Malpighia emarginata*

A determinação da composição química das folhas de *M. emarginata* foi realizada segundo Rocha *et al.* (2012).

4.4.1. Determinação do peso seco e umidade das folhas de *Malpighia emarginata*

Utilizou-se a metodologia do peso constante, onde 2 g de biomassa foram secas em estufa (Tecnal, TE-393/1), a 105 ± 2 °C, e pesados em intervalos regulares de tempo, até atingirem peso constante. O peso seco foi calculado em relação à massa inicial do material. A umidade das folhas da *M. emarginata* foi determinada pela equação: $\%U = (1 - M_{seca}/M_{úmida}) \times 100$. Sendo: $\%U$ = Percentual de umidade; M_{seca} = Massa seca (g); $M_{úmida}$ = Massa úmida (g) (Sluiter *et al.*, 2005).

4.4.2. Quantificação de extrativos das folhas de *Malpighia emarginata*

Usando as folhas “*in natura*”, foi realizada uma extração em um aparelho de Soxhlet, utilizando como solvente extrator o sistema Cicloexano: etanol 1:1 por 8 h. Ao final do processo, o material foi seco em estufa (Tecnal, TE-393/1) a 105 ± 2 °C, até atingirem peso constante.

O percentual de extrativos foi calculado por diferença de massa através da equação: $\%Ext. = (1 - M_{ce} - M_{le}/M_a) \times 100$. Sendo: M_{ce} = Massa da amostra com extrativos (g); M_{le} = Massa da amostra livre de extrativos (g); M_a = massa da amostra inicial seca (g) (Sluiter *et al.*, 2005).

4.4.3. Hidrólise das folhas de *M. emarginata* em H_2SO_4 72% (v·v-1)

Amostras de 2 g de folhas de *M. emarginata* livre de extrativos foram transferidas para béqueres de 100 mL e tratadas com 12 mL de H_2SO_4 72% (v/v), sob agitação durante 8 minutos, a uma temperatura de 45 ± 3 °C em banho termostático (Tecnal, TE-2005). Em seguida foram adicionados 50 mL de água destilada. Transferiram-se as amostras para frascos Erlenmeyer de 500 mL e adicionaram-se 225 mL de água destilada. O sistema foi levado à autoclave durante 30 min a 121 °C (1,05 atm.) e resfriado a 25 °C. O material hidrolisado foi filtrado por filtração em papel de filtro previamente seco e pesado. O hidrolisado foi recolhido em balão volumétrico de 500 mL e o sólido, contido no papel de filtro, foi lavado com porções de 50 mL de água destilada até completar o volume do balão. Após a separação da fração líquida, o sólido retido no papel de filtro, foi lavado com 1500 mL de água destilada para a remoção de ânions sulfato. As frações obtidas (hidrolisado e sólido) foram utilizados para a quantificação de lignina solúvel, insolúvel e determinação de açúcares, ácidos orgânicos e Hidroximetilfurfural (HMF) e furfural (Gouveia *et al.*, 2009; Rocha *et al.*, 2011).

4.4.4. Determinação do teor de lignina solúvel das folhas de *M. emarginata*

Para a determinação da lignina solúvel, uma alíquota de 5 mL do hidrolisado em H_2SO_4 72% (v·v⁻¹) foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL e corrigida com 1,5 mL de uma solução de NaOH 6 M para obter solução com pH 12. Completou-se o volume do balão com água destilada obtendo assim uma diluição de 1:20. Em seguida foi realizada a leitura de absorbância do hidrolisado em espectrofotômetro (Hewlett-Packard, modelo 8453), a 280 nm. A concentração da lignina solúvel foi obtida através das equações $C.LigS = [4,187 \times 10^{-2} (A_{t280} - A_{pd280}) - 3,279 \times 10^{-4}]$ e $A_{pd280} = [(C_{Furf} \times \epsilon_{Furf}) + (C_{HMF} \times \epsilon_{HMF})]$. Sendo: *C. LigS*: Concentração de lignina solúvel;

A_{t280} : Absorbância da solução de lignina junto com os produtos de degradação em 280 nm; A_{pd280} : Absorbância, em 280 nm, dos produtos de decomposição dos açúcares (furfural e HMF); C_{Furf} : Concentração de furfural; C_{HMF} : Concentração de

HMF; ϵ_{Furf} : Absortividade furfural 146, 85 L·g⁻¹·cm⁻¹; ϵ_{HMF} : Absortividade HMF 114,0 L·g⁻¹·cm⁻¹ (Rocha *et al.*, 2011).

4.4.5. Determinação de carboidratos, ácido orgânicos, HMF e furfural na fração líquida.

A identificação e quantificação dos compostos presentes no hidrolisado, obtido a partir da hidrólise com H₂SO₄ 72% (v/v) (item 4.3.3), foi realizada em cromatógrafo líquido de alta eficiência (Agilent, série 1100), coluna Aminex HPX87H (Bio-Rad), temperatura de 60 °C, fase móvel: H₂SO₄ 5mM, fluxo de 0,6 mL·min⁻¹ e detector de índice de refração (IR) para a identificação e quantificação de celobiose, glicose, xilose, arabinose, ácido fórmico e ácido acético. A concentração de furfural e HMF foi determinada utilizando-se uma coluna de fase reversa (C-18) (Agilent Technologies), com uma fase móvel composta por uma solução de acetonitrila-água-ácido acético 1:8:1 utilizando-se um detector de UV/Vis (274 nm) a 25 °C (Sluiter *et al.*, 2006). As amostras foram filtradas em membrana 0,22 µm antes do procedimento analítico. Para a determinação da quantidade final dos polissacarídeos (celulose e hemicelulose), utilizou-se uma correção através os fatores de conversão encontrados na Tabela 2.

Tabela 2. Fatores de conversão dos componentes precursores de Celulose e Hemicelulose.

	COMPONENTES	FATOR DE CONVERSÃO
Precusores de Celulose	Celobiose	0,95
	Glicose	0,90
	Ácido Fórmico	3,52
	Hidroximetilfurfural	1,29
Precusores de Hemicelulose	Xilose	0,88
	Arabinose	0,88
	Ácido Acético	0,72
	Furfural)	1,37

FONTE: Adaptado de ROCHA, (2000); SLUITER *et al.* (2008).

4.4.6. Determinação de lignina insolúvel em meio ácido, teor de cinzas de lignina e cinzas totais das folhas de *M. emarginata*

O material insolúvel retido no papel de filtro, proveniente da etapa de hidrólise ácida, após lavagem com 1500 mL de água destilada, foi seco em estufa (Tecnal, TE-393/1) a 105 ± 2 °C até massa constante. Em seguida, o material seco foi

transferido quantitativamente para cadinhos de porcelana, previamente secos e pesados. Posteriormente, as amostras foram calcinadas a 300 °C por aproximadamente 1 h e, em seguida, a 800 °C por 2 h. Ao final do processo, os cadinhos, contendo as cinzas (equação 5), foram resfriados em dessecador e a massa de cinzas, presente na lignina insolúvel, foi quantificada em balança analítica (Ohaus, modelo, PA214CP).

Os resultados foram obtidos a partir da equação: Cinzas I (g) = $M_{cc} - M_{cd}$. Sendo: M_{cc} : Massa de cinzas + massa do cadinho (g) e M_{cd} : Massa do cadinho (g). A porcentagem de lignina insolúvel em meio ácido foi calculada pela equação em relação à massa de material lignocelulósico seco, subtraindo-se a massa de cinzas presente na lignina. O teor de lignina insolúvel em meio ácido é dado pela equação: $LigI (\%) = [(M_{pr} - (M_c + M_{fp}) / M_a] \times 100\%$. Sendo: $LigI (\%)$ = Porcentagem de lignina insolúvel; M_{pr} = Massa do papel de filtro com os resíduos sólidos + massa de cinzas (g); M_c = Massa de cinzas insolúveis em meio ácido (g); M_{fp} = Massa do papel de filtro (g) e M_a = Massa da amostra inicial seca (g) (Gouveia *et al.*, 2009; Rocha *et al.*, 2011)

Para determinação do teor de cinzas totais, foram pesados aproximadamente 2 g do material vegetal (folhas) seco em cadinhos de porcelana previamente secos e tarados (em triplicata). Estes materiais foram inicialmente calcinados a 300 °C por aproximadamente 1 h e, então, a 800 °C por 2 h. Após a calcinação, os cadinhos foram resfriados em dessecador e a massa de cinzas determinada em balança analítica (Ohaus, modelo, PA214CP) (Gouveia *et al.*, 2009; Rocha *et al.*, 2011).

4.5. ANÁLISE DE COMPOSTOS FITOQUÍMICOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA PERFORMANCE ACOPLADA À ESPECTROMETRIA EM MASSA - UPLC-MS DO EXTRATO SALINO DE DAS FOLHAS DE *M. emarginata*

A Cromatografia Líquida de Ultra Performance (UPLC) foi realizada com uma Acquity H-Class (Waters) empregando uma coluna BEH de 2,1 x 100 mm com um tamanho de partícula de 1,7 µm. A coluna foi mantida sob temperatura constante de 40 °C e o auto injetor a 10 °C. Foi utilizada uma solução aquosa (eluente A) contendo 2% de metanol (MeOH), 5 mM de formato de amônio e 0,1% de ácido fórmico e uma solução de metanol (eluente B) contendo 0,1% de ácido fórmico, que foram bombeados a uma vazão de 0,3 ml / minutos. Dez microlitros do extrato salino de *M. emarginata* foram injetados. A eluição foi realizada em modo gradiente e a condição

inicial (98% A / 2% B) foi mantida por 0,25 minutos. A relação B aumentou linearmente para 99% em 8,5 minutos, permanecendo em 99% B por um minuto, seguido de diminuição imediata para 2% B, onde foi mantido por até 11 minutos. O sistema UPLC foi acoplado a um único espectrômetro de massa quadripolar SQ Detector 2 (Waters®). Os dados foram obtidos no modo fullscan, analisando massas entre 100 e 1000 Da, em ionização negativa. A aquisição dos cromatogramas e espectros de massa foi obtida através do software MassLynx™ (Waters®).

4.6. COMPOSTOS FITOQUÍMICOS *IN VITRO* DO EXTRATO SALINO DAS FOLHAS DE *M. emarginata*

4.6.1. Dosagem de Fenóis Totais

Os fenóis totais foram determinados pelo método de Folin-Ciocalteu segundo Hua-Bin Li, *et al.* (2008) com algumas modificações. A amostra do extrato salino das folhas da *M. emarginata* em 1 mg/mL foram dissolvidas em água. Foi adicionado 2 mL da solução de Folin (1:10 v/v) a 0,2 mL das amostras diluídas. Após 4 minutos no escuro, 1,6 mL de carbonato de sódio (7,5%) foi adicionado e incubado por 120 minutos no escuro a temperatura ambiente. Após esse período as absorbâncias das amostras foram medidas à 765 nm contra um branco (reagente adicionado ao solvente da amostra). Uma curva de calibração foi preparada através da representação gráfica da absorbância em função da concentração de ácido gálico (0 – 100 µg/mL) e então encontrada a equação linear ($y = 0,0048x + 0,0016$. $R^2 = 0,9999$). Os fenóis foram expressos em equivalente de ácido gálico (mg EAG / g de extrato).

4.6.2. Dosagem de Flavonoides

Para determinação de Flavonoides totais foram adicionados 1,5 mL da solução de $AlCl_3$ em Álcool à 2%, à 1,5 mL da amostra (0,5 mg/mL). Após 1 hora à temperatura ambiente, a absorbância foi medida em 420 nm e uma cor amarela indicou a presença de Flavonoides. Uma curva padrão de Quercetina (0 – 0,5 mg / mL) foi realizada para obter a equação $y = 0,023x + 0,1509$ $R^2 = 0,9956$. O ensaio foi

realizado em quintuplicata. O teor de flavonoide é expresso em equivalente de quercetina (mg QE / g de amostra).

4.7. DOSEAMENTO DE PROTEÍNAS TOTAIS E TESTE DE HEMAGLUTINAÇÃO DO EXTRATO SALINO DE *Malpighia emarginata*

4.7.1. Dosagem Proteica (Lowry)

A dosagem de proteína foi realizada pelo método de Lowry (1951). Em tubo de ensaio foi adicionado 0,2 mL do extrato salino ou água (controle) e 1 mL de solução A (Solução em proporção 50:1 (V/V) de NaCO_3 a 2% + NaOH a 0,1% e CuSO_4 a 0,5% + $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ a 1%), seguido de agitação vigorosa e incubação a 25°C durante 10 minutos. Após a incubação adicionou-se 0,9 mL de solução B (Solução em proporção 1:1 (v/v) de água e reagente de Folin) seguido de agitação vigorosa e incubação de 45 minutos. A leitura dos tubos foi realizada a 720 nm. Após a leitura em espectrofotômetro, a absorbância foi adicionada a equação $y = 0,009X + 0,0612$, $R^2 = 0,9877$ da curva padrão, para o cálculo da dosagem de proteína.

4.7.2. Atividade Hemaglutinante (AH)

Utilizando o método descrito por Correia e Coelho (1995), foi realizada a atividade hemaglutinante dos extratos com eritrócitos glutarizados. A atividade hemaglutinante (AH) foi efetuada em placas de microtitulação onde foram adicionados 50 μL de NaCl (0,15M) e, em seguida, 50 μL do extrato foram adicionados ao segundo poço procedendo-se diluições seriadas. Ao término das diluições foram adicionados 50 μL de solução de eritrócitos em todos os poços.

O primeiro poço funcionou como controle. A placa foi mantida em repouso durante 45 minutos em temperatura ambiente. A atividade hemaglutinante foi definida como o inverso do título correspondente a maior diluição em que foi observada aglutinação.

A atividade hemaglutinante específica foi obtida pela razão da atividade hemaglutinante pela dosagem de proteína.

4.8. AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTES *IN VITRO*

4.8.1. Atividade Antioxidante Total

A atividade antioxidante total foi determinada em função do Ácido ascórbico, composto considerado com 100% de atividade. 0,3 mL do extrato salino de *M. emarginata* e do ácido ascórbico (1 mg/mL) foi adicionado a 3 mL da solução de fosfomolibdênio (600 mM de ácido sulfúrico, 28 mM de fosfato de sódio e 4 mM de molibdato de amônio), e incubados em água a 95 °C por 90 minutos. Em temperatura ambiente, as absorbâncias foram medidas a 695 nm contra um branco (3 mL de solução de fosfomolibdênio e 0,3 mL de água). A atividade antioxidante total calculada pela fórmula $ATT (\%) = [(Aa - Ac) / (Aaa - Ac)] \times 100$, onde: Ac = Absorbância do controle, Aa = Absorbância da amostra e Aaa = Absorbância do ácido ascórbico.

4.8.2. Sequestro de radicais livres pelo DPPH

A atividade antioxidante do extrato salino foi medida através do radical estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) (Blois, 1958). Foi misturado 2,5 mL da solução de DPPH (1 mM) em 0,2 mL de diferentes concentrações do extrato (3,9; 7,81; 15,62; 31,25; 62,5; 125; 255; 500 e 1000 µg/mL). Após 25 minutos no escuro foi medida a absorbância em 517 nm. O controle foi o DPPH adicionado a 0,2 mL de água. O sequestro de radicais DPPH foi calculado pela fórmula: $SRL [DPPH] (\%) = [(Aa - Ac) / Ac] \times 100$. Onde: Aa = Absorbância da amostra e Ac = Absorbância do controle. Uma curva de calibração foi preparada através da representação gráfica da absorbância em função da concentração de DPPH (0 – 100 µg/mL) e então encontrada a equação linear ($y = 0,0044x + 0,0106$. $R^2 = 0,9922$).

4.8.3. Redução de Íons Férricos (FRAP)

A solução estoque do FRAP foi preparada com 300 mM de tampão acetato (3,1 g CH₃COONa e 16 mL CH₃COOH) a pH 3,6, 10 mM TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina) solubilizado em HCl 40 mM e 20 mM Solução de FeCl₃ conforme descrito por Benzie *et al.* (1996). A solução de trabalho foi preparada misturando o tampão acetato, TPTZ

e FeCl_3 numa proporção de 10: 1: 1 (v / v / v) e incubou-se durante 5 min a 37 °C. Extrato salino (25 μL em 1 mg / mL) foi adicionado em 0,180 mL de reagente FRAP e deixado em repouso por 30 minutos a 37 ° C no escuro. Posteriormente a absorbância foi medida a 593 nm. Uma curva padrão com FeSO_4 (0 - 1000 $\mu\text{g mL}$) foi realizada para obter a equação $Y = 0,0024 x + 0,0019$, $R^2 = 0,9953$. Os resultados foram expressos em mg EFeSO_4 (II) / g de extrato.

4.9. ENSAIOS ANTIMICROBIANOS

4.9.1. Isolados bacterianos e fúngicos, condições de cultura e preparação da amostra

As cepas fúngicas foram obtidas na Micoteca do Departamento de Micologia (URM) e as bacterianas obtidas na coleção de microrganismos do Departamento de Antibióticos (UFPEDA), ambos pertencentes ao Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco. As culturas em estoque foram mantidas sob refrigeração (-20 °C) em leite desnatado esterilizado contendo 10% (v / v) de glicerol ou 30% (v / v) de caldo de glicerol Mueller Hinton. As cepas bacterianas e fúngicas utilizadas neste estudo são: *Candida albicans* (URM 5901), *Candida krusei* (URM 6391), *Candida tropicalis* (URM 6551), *Candida parapsilosis* (URM 6951), *Candida glabrata* (URM 4246), *Escherichia coli* (UFPEDA 224), *Klebsiella pneumoniae* (UFPEDA 396), *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 416), *Salmonella enteritidis* (UFPEDA 414), *Staphylococcus aureus* (UFPEDA 02), *Staphylococcus saprophyticus* (UFPEDA 833).

Para ensaios de atividade antimicrobiana, espécies bacterianas e fúngicas foram cultivadas em ágar Mueller Hinton e Sabouraud Dextrose, respectivamente, durante 24 horas a 36 °C e, posteriormente, as colônias foram ressuspensas em solução salina estéril (NaCl 0,15 M) e ajustadas turbidimetricamente a Comprimento de onda de 600 nm (DO600) para obter a suspensão equivalente a 10^6 unidades formadoras de colônias (UFC) por mL. Para o ensaio, o extrato salino foi filtrado no filtro de seringa de fluoreto de polivinilideno (PVDF) estéril de 13 mm x 0,22 μm .

4.9.2. Determinação das concentrações mínima inibitória (CMI), mínima bactericida (CMB) e mínima fungicida (CMF)

A concentração mínima inibitória (CMI) do extrato salino foi determinada pelo ensaio de microtitulação proposto pelo Instituto de Normas Laboratoriais e Clínicas (CLSI - *Clinical and Laboratory Standards*, 2012). Em placas de microtitulação de 96 poços, a amostra foi adicionada (80 µl) no quarto poço a partir do qual foi diluída seriadamente em água Milli-Q estéril até o décimo segundo poço da mesma fileira.

Posteriormente, 40 µl do meio caldo Mueller Hinton (bactéria) ou Sabouraud Dextrose (levedura) foi adicionado em todos os poços, exceto no primeiro, que foi preenchido com 200 µl do meio de cultura, correspondendo ao controle de esterilidade. Os antibióticos ampicilina e tetraciclina (8 µg/ml) e o antifúngico Fluconazol (64 µg/ml) foram usados como controles positivos no segundo poço. Finalmente, a suspensão bacteriana e fúngica (80 µl; 10^6 UFC/ml) foi acrescentada no segundo poço até o último poço da fileira. O terceiro poço (que contém microrganismos na ausência da amostra) correspondeu ao controle de crescimento de 100%.

As placas foram incubadas a 36°C e a densidade óptica foi medida no tempo zero e após 24 h de incubação usando um leitor de microplacas. O CMI₉₀ e CMI₅₀ correspondeu a menor concentração da amostra capaz de promover a redução de $\geq 90\%$ ou $\geq 50\%$, respectivamente, na densidade óptica, em comparação ao controle de crescimento 100%.

Para a determinação do CMB e CMF, alíquotas (10 µl) dos poços contendo concentrações da amostra $\geq$ CMI₅₀ foram inoculados em placas de petri contendo meio Mueller Hinton ou Sabouraud Dextrose ágar, que foram posteriormente incubados a 36 °C por 24 horas. O CMB e CMF corresponderam a menor concentração da amostra capaz de reduzir o número de UFC em 99,9% em relação ao inóculo inicial. Cada ensaio foi realizado em triplicata e três experimentos independentes foram realizados.

4.9.3. Crescimento microbiano e formação de biofilme

O crescimento fúngico foi obtido pela diferença entre a densidade óptica a 600 nm (DO₆₀₀) determinada no tempo zero e após o tempo de incubação (36 °C por 24 horas) e a formação do biofilme foi avaliada pelo método do cristal violeta de acordo com Trentin *et al.* (2011) em placas de microtitulação de poliestireno de fundo plano.

Em cada poço foi adicionado 80 µL de água Milli-Q, 40 µL do meio Sabouraud Dextrose e 80 µL da suspensão fúngica (10^8 UFC/mL; em solução salina estéril), respectivamente. A DO_{600} foi realizada nesse momento (tempo zero) usando um leitor de microplacas e as placas foram incubadas a 36 °C por 24 horas. Após esse período, as placas foram lidas novamente para se determinar o crescimento bacteriano e/ou fúngico a 600 nm. A etapa sequencial correspondeu à análise da formação do biofilme que ocorre após a remoção das células planctônicas (células não aderidas) de cada poço da placa.

Adicionalmente, os poços foram lavados com NaCl 0,15 M estéril (três vezes) e os biofilmes (células aderidas à placa de poliestireno) foram pré-fixados em metanol por 20 minutos, seguido de uma fixação a 50 °C por 60 minutos e, em seguida, marcados com cristal violeta 0,4% (p/v) por 25 min a 25°C. Os poços foram lavados com água para remoção do cristal violeta não aderido e, posteriormente, o corante aderido ao biofilme foi solubilizado em etanol absoluto (20 minutos) e a absorbância foi mensurada a 570 nm. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.10. ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR E PROLIFERAÇÃO FRENTE A ESPLÊNOCITOS DE CAMUNDONGOS BALB/c

4.10.1. Animais

Camundongos fêmeas BALB/c (6-8 semanas de idade, 5 animais) foram criados e mantidos nas instalações de animais do Laboratório de Imunologia de Keizo Asami - LIKA, localizado na Universidade Federal de Pernambuco, Brasil. Os camundongos foram mantidos em condições laboratoriais padrão (20-22 ° C e 12 horas ciclo diurno e noturno) com acesso gratuito a uma dieta padrão (Labina / Purina, Campinas, Brasil) e água. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com o Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal de Pernambuco (número de protocolo: 0048/2016 – APÊNDICE A).

4.10.2. Obtenção dos esplenócitos

Este procedimento foi realizado de acordo com Melo *et al.* (2011). Os camundongos foram anestesiados com 10 mg/Kg de xilazina e 115 mg/Kg de quetamina, seguido de deslocamento cervical e remoção asséptica dos baços. O baço de cada camundongo foi colocado num tubo Falcon contendo RPMI 1640 com soro fetal bovino (meio completo). Em uma câmara de fluxo laminar, cada baço foi macerado em um douncer. As suspensões celulares obtidas a partir de cada baço foram transferidas para tubos Falcon contendo aproximadamente 10 ml de meio completo. Os homogenatos de baço foram sobrepostos numa camada de Ficoll-Paque TM PLUS, com a densidade ajustada para 1,077 g/mL e centrifugadas a 2500 x *g* à temperatura ambiente durante 25 minutos. A camada celular de interface contendo células imunes foi recuperada por pipeta Pasteur, lavada duas vezes em solução salina tamponada com fosfato (PBS 1X) e centrifugada duas vezes a 500 x *g* durante 10 min para obtenção do pélate. As células foram contadas numa câmara de Neubauer, e a viabilidade celular foi determinada pelo método de exclusão do azul de tripan. As células foram usadas apenas quando a viabilidade foi > 98%.

4.10.3. Análise da viabilidade celular por Anexina V-FITC e Coloração com Iodeto de Propídio (PI)

Os esplenócitos dos camundongos (10^6 células) foram tratados com extrato salino de folhas de *M. emarginata* em concentrações crescentes de 3 a 50 µg/mL e mantidos em placas de 24 poços por 24 horas para análise de viabilidade celular. As células apenas em meio de cultura foram utilizadas como controle negativo. Após o tempo de incubação, os esplenócitos foram centrifugados em temperatura ambiente, em 2000 rpm, durante 10 minutos. Após descartar o sobrenadante, 1 ml de PBS 1X foi adicionado ao precipitado e centrifugado mais uma vez em temperatura ambiente, em 2000 rpm, durante 10 minutos. Após o descarte do sobrenadante, o precipitado celular foi ressuspenso em uma tampão do kit de viabilidade celular (Becton Dickinson Biosciences), contendo Anexina V conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) e Iodeto de Propídio conjugado ao PI. Em seguida, foram adicionados para cada tubo de citometria marcado e lidos em citômetro de fluxo FACS Calibur (Becton Dickinson Biosciences) com análise pelo software Cell Quest Pro (Becton Dickinson). O resultado da análise foi realizado em gráficos do tipo Dot Plot. As células positivas para AnexinaV-FITC e negativas para IP-PE, foram

consideradas apoptóticas. As células negativas para AnexinaV-FITC e positivas para IP-PI foram consideradas necróticas e duplo negativas foram consideradas células viáveis.

4.10.4. Análise de proliferação celular usando coloração CFSE

O mesmo protocolo para a obtenção dos esplenócitos foi utilizado para o ensaio de proliferação celular. Após a obtenção dos esplenócitos, a solução celular foi centrifugada a 2000 rpm, em temperatura ambiente, durante 5 min com PBS 1X estéril adicionado ao SFB 5% (pH 7,2). Depois disto, a solução celular foi ajustada para 10^6 células/mL e recebeu 5 mM de éster 5(6) éster de N-succinimidil de diacetato de carboxifluoresceína (CFSE). As células foram incubadas durante 10 min em temperatura ambiente no escuro. As células foram centrifugadas duas vezes a 2000 rpm, em temperatura ambiente, durante 5 min com PBS 1X estéril, e logo após, foram cultivadas em placas de 24 poços por 24 e 48 horas com 12,5 µg/mL de extrato salino de folhas de *M. emarginata* em meio RPMI 1640 completo. As células apenas em meio de cultura foram utilizadas como controle negativo. Após o término dos tempos de cultura, as células foram centrifugadas (2000 rpm, em temperatura ambiente, durante 5 min), transferidas para os tubos de citometria e levadas para a leitura na plataforma FACSCalibur (Becton Dickinson Biosciences). Todos os resultados foram analisados utilizando o software Cell Quest Pro (Becton Dickinson).

4.10.5. Medição da produção de citocinas utilizando o kit Cytometric Bead Array (CBA)

Os sobrenadantes das culturas tratadas com 12,5 µg/mL de extrato salino de folhas de *M. emarginata* durante 24 horas e 48 horas, assim como as células do controle negativo, foram coletados para a medição da produção de citocinas e ensaios de liberação óxido nítrico. A avaliação das citocinas foi realizada utilizando as citocinas Th1/Th2/Th17 de camundongos (Becton Dickinson Biosciences, EUA) para a detecção simultânea das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interferon gama (IFN- γ). A medição de citocinas baseou-se no princípio da tecnologia Cytometric Bead Array (CBA) e todos os dados foram adquiridos na plataforma FACSCalibur. Resumidamente, as amostras de teste

(50 μ L) e anticorpo de detecção de ficoeritrina foram incubadas com as beads de captura e reagente de detecção durante 2 horas no escuro à temperatura ambiente. Todos os anticorpos não ligados foram lavados (1,0 mL de tampão de lavagem) e ressuspensos em 300 μ L de tampão de fixação antes da aquisição de dados na plataforma FACSCalibur. Cada citocina tinha um pico único e bem separado, e sete curvas padrão de citocinas individuais (0-5000 pg/mL) foram executadas em cada ensaio.

4.10.6. Análise in vitro de nitritos presentes nos sobrenadantes de cultura dos esplenócitos de camundongos BALB/c

Os sobrenadantes de culturas de células incubadas ou não com 12,5 μ g/mL de extrato salino de folhas de *M. emarginata* durante 24 e 48 horas foram utilizados para análise de nitrito pelo método colorimétrico de Griess (DING *et al.*, 1988). A concentração de óxido nítrico foi estimada usando uma curva padrão (3,12-100 μ mol / mL). A leitura foi realizada num espectrofotômetro (Bio-Rad 3550, Hercules, CA) a 595 nm.

4.10.7. Análise Estatística

Para testar a normalidade da hipótese das variáveis envolvidas no estudo, o teste de Shapiro-Wilke foi aplicado. As médias das amostras foram avaliadas através de testes não paramétricos. A diferença estatística entre os grupos foi analisada pelo teste de Wilcoxon entre três ou mais grupos pela análise de variância da plataforma ANOVA. Todos os resultados foram expressos como Média $\pm$ Desvio Padrão e com um nível de significância de 5%. Para a análise estatística foi usado o software GraphPad Prim 5.01

5. RESULTADOS

5.1. DADOS TAXONÔMICOS E FILOGENÉTICA DA *Malpighia emarginata* DC

A árvore filogenética montada confirma a posição da *Malpighia emarginata* DC como uma planta pertencente à família Malpighiaceae, e apresenta a sua descendência e demais dados taxonômicos (Figura 1).

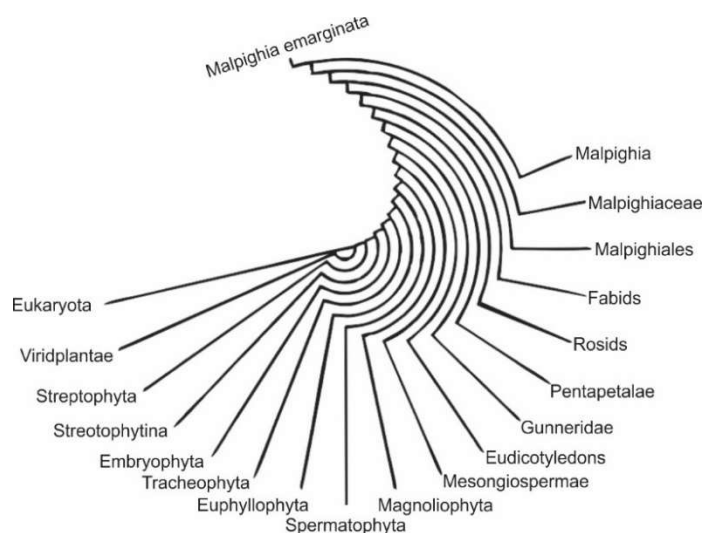


Figura 1 - Dados taxonômicos e filogenia da família Malpighiaceae.

5.2. INVESTIGAÇÃO DA ESTRUTURA ORGÂNICA DO MATERIAL VEGETAL A PARTIR DAS FOLHAS DE *Malpighia emarginata* DC

A análise físico-química das folhas de *M. emarginata*, pelos métodos de extração química dos metabólitos, demonstrou e quantificou em percentuais a estrutura orgânica basal do material vegetal estudado. Os resultados demonstraram uma umidade consideravelmente alta retida pela planta (65% do peso fresco), com presença significativa de lignina total (25%) e de pectina (21%) (Tabela 3).

Tabela 3 – Determinação dos componentes estruturais encontrados nas folhas de *M. emarginata*

Componente (%)	M ± DP
Lignina total	25,77 ± 4,86
Lignina solúvel	8,45 ± 0,03
Lignina insolúvel	17,32 ± 9,69
Celulose	26,18 ± 0,16
Hemicelulose	18,84 ± 0,18
Pectinas	21,37 ± 3,63
Extrativos	10,43 ± 0,01
Cinzas Totais	3,98 ± 0,03
Umidade	65,18 ± 0,34

Além disso, a obtenção das cinzas das folhas da planta revelou a presença predominante dos íons Fe (103.10 µg/100g) e Mn (10.33 µg/100g) (Tabela 4).

Tabela 4 – Determinação da presença de íons nas folhas de *M. emarginata*

Íons	Unidades de medida	concentrações
K	mg/100 g	0.14 ± 0.04
Na		nd
Zn	µg/100 g	2.54 ± 0.13
Mn		10.33 ± 3.96
Fe		103.10 ± 14.54
Cu		3.92 ± 2.69
Cr		0.00 ± 0.00
Cd		0.00 ± 0.00
Pb		0.00 ± 0.00
Ni		0.00 ± 0.00

A investigação quanto aos açúcares estruturais pertencentes à planta demonstrou que as folhas de *M. emarginata* possuem Glicose em grande quantidade (0,4 g/L) e traços de Furfural (0,002 g/L). Além disso, pode ser observada uma baixa presença de ácido galacturônico (0,15 g/L), um composto reconhecido na literatura por desencadear efeitos imunossupressores (Tabela 5).

Tabela 5 – Determinação de Açúcares e produtos de degradação das folhas de *M. emarginata*

Componente	Média (g/L)
Glicose	0,4
Celobiose	Nd
Ácido Fórmico	Nd
HMF	0,006
Xilose	0,3
Arabinose	Nd
Ácido Acético	Nd
Furfural	0,002
Ácido Galacturônico	0,15

5.3. COMPOSTOS FENÓLICOS PRESENTES NO EXTRATO SALINO DE FOLHAS DE *M. emarginata*

Os resultados sobre a presença de compostos fenólicos no extrato salino de *M. emarginata* demonstraram alta prevalência de fenóis totais ($51,14 \pm 0,21$ mg GAE/g), sendo os flavonoides alguns destes compostos ($9,67 \pm 0,08$ mg QE/g). Os resultados da análise em UPLC-MS sobre a caracterização fitoquímica do extrato salino das folhas de *M. emarginata* (Figura 3) também demonstram a prevalência destes compostos fenólicos e terpenóides conforme lista dos 18 compostos representados na Tabela 6.

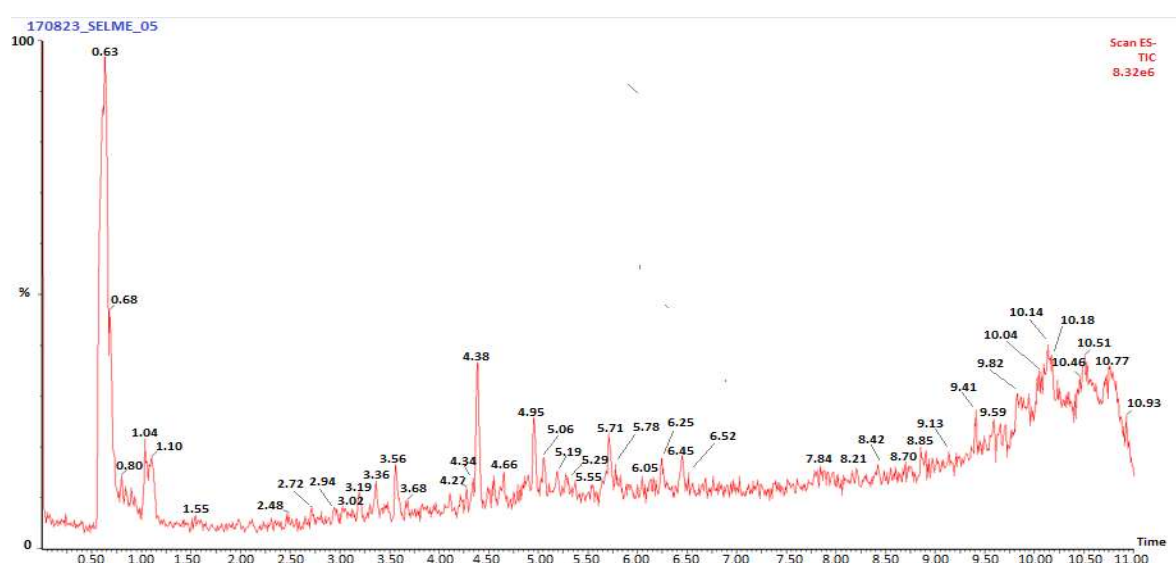
**Figura 3** - Cromatograma obtido através de análise em UPLC-MS do extrato salino de folhas de *M. emarginata*.

Tabela 6 - Análise espectral de UPLC-MS dos compostos encontrados no extrato salino de folhas da *M. emarginata*.

COMPOSTOS	TEMPO DE RETENÇÃO (min.)	FÓRMULA MOLECULAR	ÁREA	MASSA	[M-H]-
Ácido Rinocerotínico	0.63	C ₂₀ H ₃₀ O ₃	5.756.062	318.457	317.211
Ácido Quínico	1.06	C ₇ H ₁₂ O ₆	105.468.063	192.063	192.063
Dimetoxicurcumina	2.72	C ₂₃ H ₂₄ O ₆	5.840.279	396.439	395.149
Ácido Protocatecuico	3.36	C ₇ H ₆ O ₄	16.625.830	154.026	153.018
Tolipodiol	3.60	C ₂₈ H ₄₀ O ₅	6.356.449	456.623	455.279
Pauciflorol A	3.90	C ₂₀ H ₃₄ O ₂	73.426.766	306.255	305.248
Ácido gentísico	4.25	C ₇ H ₆ O ₄	5.425.569	154.026	153.018
Matricin	4.38	C ₁₇ H ₂₂ O ₅	73.426.766	306.358	305.138
Galocatequina	4.38	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	7.342.677	306.27	305.066
Ácido 11a-hidroxi-3,7- dioxo-5a-lanosta-8,24 (E) -dien-26-oico	4.49	C ₃₀ H ₄₄ O ₅	7.038.835	484,318	483,311
Ácido Protocatecuico	4.65	C ₇ H ₆ O ₄	5.425.569	154.121	153.018
Cicutoxina	5.19	C ₁₇ H ₂₂ O ₂	6.584.033	258.355	225.164
Ácido salicílico	5.71	C ₇ H ₆ O ₃	31.334.580	138.031	137.023
2,5 Di- hidroxibenzaldeído	5.71	C ₇ H ₆ O ₃	31.334.580	138.031	137.023
Apigenina-7-O- glucosídeo	8.86	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	6.690.703	432.105	431.097
Magnossalicina	8.87	C ₂₄ H ₃₂ O ₇	6.690.703	432.513	431.207
Apigenina-8-O- glucosídeo	8.87	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	6.690.703	432.381	431.097
Isotriptopenolide	9.85	C ₂₀ H ₂₄ O ₃	50.121.777	312.409	311.164

5.4. EXTRATO SALINO DE FOLHAS DE *M. emarginata* APRESENTOU POTENCIAL ANTIOXIDANTE

O extrato salino das folhas de *M. emarginata* apresentou significativo poder antioxidante, sendo cinco vezes superior à molécula padrão hidroxitolueno butilado (BHT). O extrato salino também foi capaz de aumentar o sequestro de radicais livres e promoveu maior redução de íons férricos (Tabela 7).

Tabela 7 - Resultados das atividades antioxidantes promovidas pelo extrato salino de folhas de *M. emarginata*.

	<i>M. emarginata</i>	BHT	Ácido Ascórbico
Sequestro de radicais livres pelo DPPH (% mg/mL)	38,59 ± 1,20	93,13 ± 0,58	90,04 ± 0,16
Capacidade antioxidante total (mg AAE/g)	20,32 ± 0,89	4,12 ± 0,10	100
Redução de Íons Férricos (EFeSO ₄ (II)/g)	416,11 ± 0,46	679,17 ± 25,98	1215,00 ± 48,55

Os resultados, envolvendo a detecção da presença de proteínas e se existia a possível atividade lectínica no extrato salino, demonstraram que o extrato apresentou 20,9 mg/mL de proteínas totais, com 16 UH^b x 100µL⁻¹ de atividade hemaglutinante total, sendo 0,8 UH/mg de proteína, de atividade hemaglutinante específica.

5.5. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO SALINO DE FOLHAS DE *M. emarginata*

As seis espécies bacterianas testadas não foram sensíveis ao extrato. No entanto, o extrato salino inibiu 90% da capacidade de crescimento de *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* e *Candida tropicalis* em baixas concentrações (Tabela 8). Além disso, também é possível observar que o extrato salino apresentou resultados mais significativos como antifúngico contra *C. albicans* e *C. parapsilosis*, comparativamente às demais espécies. A espécie *C. glabrata* foi completamente resistente ao extrato salino.

Tabela 8 - Atividade antifúngica promovida pelo extrato salino de folhas de *Malpighia emarginata* frente a *Candida* spp.

Cepas	Fluconazol (µg/mL)	Extrato salino de folhas de <i>M. emarginata</i> (µg/mL)		
	MIC ₅₀	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MFC
<i>C. albicans</i>	0.25	0.51	0.52	ND
<i>C. parapsilosis</i>	ND	0.51	0.51	0.51
<i>C. krusei</i>	32	8.36	8.36	ND
<i>C. tropicalis</i>	4	0.13	0.26	1.05

<i>C. glabrata</i>	64	ND	ND	ND
--------------------	----	----	----	----

O extrato salino de *M. emarginata* foi testado quanto à atividade antibiofilme em concentrações de MICs determinadas em: 64 MIC, 16 MIC, 4 MIC, MIC, 1/4 MIC, 1/16 MIC e 1/64 MIC e os resultados estão ilustrados na Tabela 9.

Tabela 9 - Resultados da atividade antibiofilme do extrato salino de *Malpighia emarginata*, em porcentagem, frente a espécies de *Candida spp.*

Valor % do crescimento (DO600) de <i>Candida spp.</i>								
	Controle	64 MIC	16 MIC	4 MIC	1 MIC	1/4 MIC	1/16 MIC	1/64 MIC
<i>C. albicans</i>	100	104,3	105,5	105,1	109,1	105,3	120,5	122,6
<i>C. krusei</i>	100	99	112,4	110,4	111,3	116,1	121,4	109,3
<i>C. tropicalis</i>	100	94	95,6	102,5	110,2	99,7	98,4	83,1
<i>C. parapsilosis</i>	100	118,7	116,4	112,2	109	104,3	96,6	116,8

Valor % da biomassa de biofilme de <i>Candida spp.</i>								
	Controle	64 MIC	16 MIC	4 MIC	1 MIC	1/4 MIC	1/16 MIC	1/64 MIC
<i>C. albicans</i>	100	93,4	85,5	87,7	88,7	89,2	87,2	85,8
<i>C. krusei</i>	100	85	92,7	92	95,4	104,9	107	111,9
<i>C. tropicalis</i>	100	107,9	109,7	117,3	118	115	119,6	118,6
<i>C. parapsilosis</i>	100	90,5	85,3	74,3	77,2	70,4	77,5	73,3

Os resultados da atividade antibiofilme confirmam os testes antimicrobianos realizados. O extrato salino de *Malpighia emarginata* apresentou considerável redução na formação de biofilme das espécies *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*, conforme descrito na tabela 9.

5.6. EXTRATO SALINO DE FOLHAS DA *M. emarginata* NÃO INDUZIU DANOS CITOTÓXICOS ÀS CÉLULAS E PROMOVEU A PROLIFERAÇÃO CELULAR EM CÉLULAS DE BAÇO DE CAMUNDONGOS

As células do baço de camundongos BALB/c tratadas com o extrato salino em diferentes concentrações (50, 25, 2,5, 6 e 3 $\mu\text{g/mL}$), não sofreram morte celular significativa, tanto para apoptose quanto para necrose, em nenhuma das concentrações avaliadas (Figura 4). De fato, o extrato salino de folhas de *M. emarginata* promoveu maior viabilidade celular, com uma taxa de sobrevivência superior a 90%.

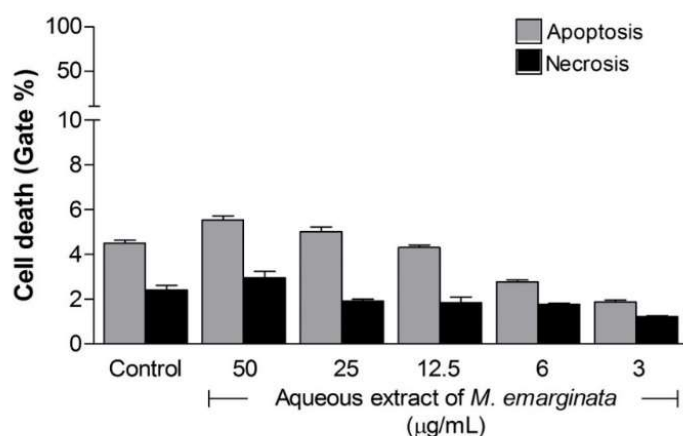


Figura 4 - Viabilidade de esplenócitos de camundongos avaliada pela marcação com Anexina V e Iodeto de Propídio. O extrato salino de folhas de *M. emarginata* não promoveu morte celular significativa em nenhuma concentração avaliada. Barras horizontais representam a média de dois experimentos independentes realizados em triplicata.

Para aferir se o extrato salino foi capaz de ativar, *in vitro*, as células imunes dos baços dos animais, outro ensaio foi realizado para investigar o índice de proliferação dessas células desafiadas com apenas uma concentração do extrato (12,5 $\mu\text{g/mL}$), durante dois dias de cultura celular. Os resultados mostraram que o extrato salino das folhas de *M. emarginata* teve uma ação reconhecidamente mitogênica nos dois tempos avaliados (Figura 5).

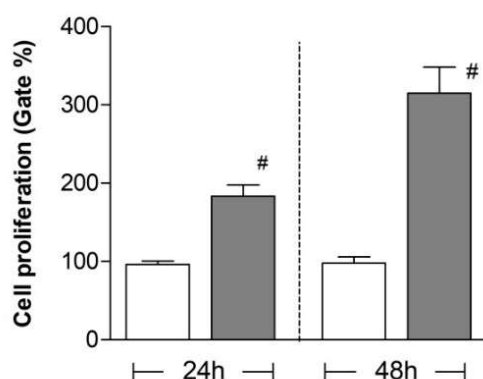


Figura 5 - Índice de proliferação de esplenócitos de camundongos avaliado por coloração com CFSE. Extrato salino de folhas de *M. emarginata* promoveu a proliferação em esplenócitos de camundongos em ambos os tempos avaliados (24 e 48 horas de ensaio). Barras brancas verticais representam células de controle negativo (células + meio de cultura) e barras verticais escuras representam o extrato salino na concentração de 12,5 µg/mL. Este ensaio foi realizado utilizando dois experimentos independentes realizados em triplicata. # $p = 0,003$.

5.7. EXTRATO SALINO DAS FOLHAS DE *M. emarginata* INDUZ RESPOSTA ANTI-INFLAMATÓRIA EM CÉLULAS ESPLÊNICAS DE CAMUNDONGOS BALB/c

Foram investigadas sete citocinas que compreenderam os perfis Th1, Th2 e Th17 (Figura 6A-D). O extrato salino induziu a produção, de forma significativa, da maioria das citocinas anti-inflamatórias, ou seja, do perfil Th2, como as citocinas IL-4, IL-10 e IL-6, sendo esta última de caráter pleiotrópico. A citocina IL-2 também foi produzida de forma significativa, especialmente em 48 horas de cultura celular, mas pela condução dos resultados obtidos com a proliferação celular, é sugestivo sua participação na indução de mitogenicidade dos linfócitos analisados.

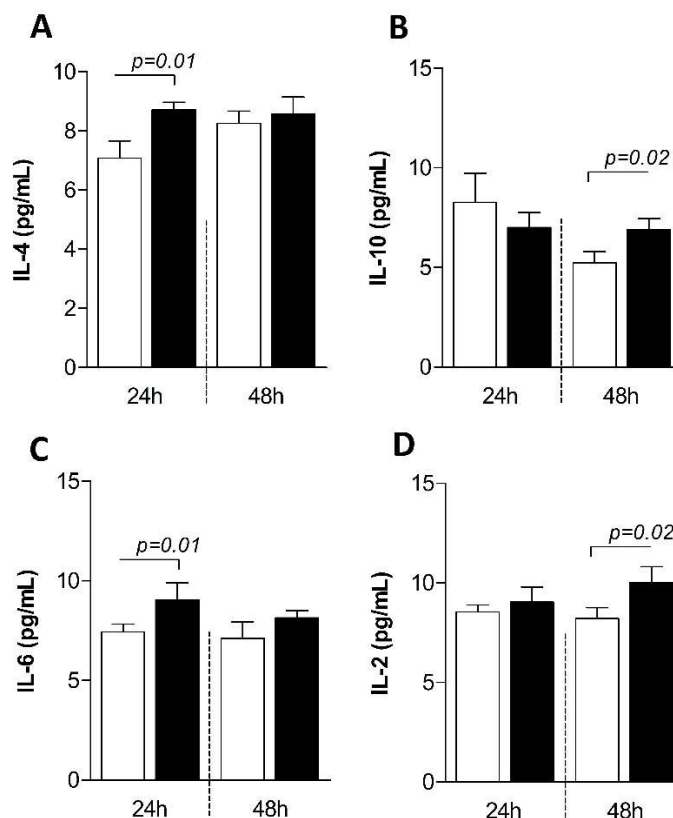


Figura 6 - Perfil de produção de citocinas nos sobrenadantes de cultura de esplenócitos de camundongos Balb/c em 24 e 48 horas de incubação tratadas com extrato salino de folhas de *M. emarginata*. Resultados significativos foram encontrados para as citocinas em diferentes tempos amostrais. Barras brancas verticais representam células de controle negativo (células + meio de cultura) e barras verticais pretas representam o extrato salino na concentração de 12,5 µg/mL. Este ensaio foi realizado utilizando dois experimentos independentes realizados em triplicata.

As outras citocinas pertencentes ao perfil Th1 também foram produzidas pelo extrato salino, porém em valores similares ao controle em 24 horas de cultura (IL-17 = $7,28 \pm 0,45$ / $7,89 \pm 0,23$; TNF- α = $8,41 \pm 0,45$ / $9,36 \pm 0,85$; IFN- γ = $7,38 \pm 0,68$ / $6,96 \pm 0,30$ para células controle e tratadas com o extrato salino, respectivamente), e em 48 horas de cultura (IL-17 = $7,76 \pm 0,32$ / $8,04 \pm 0,75$; TNF- α = $6,60 \pm 0,81$ / $6,70 \pm 0,47$; IFN- γ = $6,83 \pm 0,35$ / $6,55 \pm 0,45$ para células controle e tratadas com o extrato salino, respectivamente).

A confirmação do perfil anti-inflamatório promovido pelo extrato salino está nos resultados de inibição da produção de óxido nítrico pelas células tratadas com o extrato salino na concentração de 12,5 µg/mL (Figura 7). Nos dois tempos amostrais houve redução significativa na detecção de nitrito nos sobrenadantes de cultura.

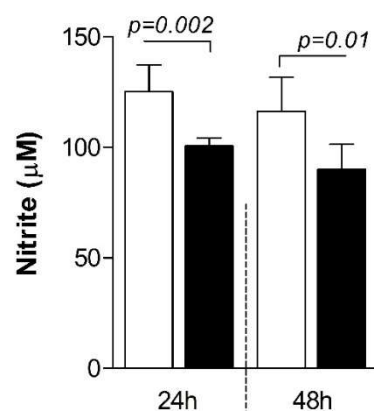


Figura 7 - Liberação de óxido nítrico promovido pelo extrato salino de folhas de *M. emarginata* em culturas de esplenócitos de Balb/c em 24 e 48 horas de incubação. Nos dois tempos experimentais, a concentração de 12,5 μg/mL do extrato foi capaz de reduzir a liberação deste mediador nos sobrenadantes de cultura. Barras brancas verticais representam células de controle negativo (células + meio de cultura) e barras verticais pretas representam o extrato salino na concentração de 12,5 μg/mL. Este ensaio foi realizado utilizando dois experimentos independentes realizados em triplicata.

6. DISCUSSÃO

O uso de plantas medicinais para o tratamento, cura e prevenção de certas doenças é uma das formas mais antigas de prática medicinal da humanidade e é apoiado por um conhecimento consolidado por séculos de observação em diferentes partes do mundo. No entanto, a cultura popular colabora com o uso indiscriminado de plantas medicinais no contexto da automedicação, exigindo o estudo de seus constituintes, o mecanismo de ação terapêutica e a identificação de princípios ativos responsáveis pelas diversas atividades biológicas relatadas pela população (Ford *et al.*, 2014).

A acerola apresenta uma gama de estudos publicados até o momento, sendo a maioria desses estudos de especulação antioxidante e nutricional (Martins *et al.*, 2013; Rosso *et al.* 2008; Alvarez-Suarez *et al.* 2017). Aqui, usamos um extrato salino obtido a partir de folhas de *M. emarginata* DC. A proposta foi investigar se um extrato da planta, feito com solução fisiológica (NaCl 0,15M), é citotóxico para células e microrganismos, e se esse extrato também é capaz de ser antioxidante e imunomodulador. Um outro viés foi a investigação da presença de moléculas bioativas em sua composição como ligninas, pectinas e lectinas para planejamentos futuros de isolamento dessas moléculas e investigação de suas funções biológicas.

Os resultados sobre os componentes estruturais da planta demonstram uma alta capacidade de retenção de água, presença significativa de ligninas, pectinas, glicose, proteínas e íons diversos como Fe, Mn e Cu. Esses achados são de suma importância para nortear novos estudos utilizando a folha da planta e não apenas o fruto, uma vez que as folhas estão presentes de forma abundante na planta e têm ampla disponibilidade ao longo do ano para possível aplicabilidade farmacológica (Carpentieri-Pípulo *et al.* 2008; Medeiros de Siqueira *et al.* 2011).

Ligninas são compostos de caráter fenólico e que auxiliam na manutenção na manutenção da parede de celulose das plantas, ou seja, auxiliam na integridade da matriz de celulose/hemicelulose/pectina (Calvo-Flores e Dobado, 2010). Entretanto, menos de 2% de aproximadamente 70 milhões de toneladas de lignina produzida durante a extração de celulose é aproveitado na elaboração de produtos (Sen *et al.*, 2013). Pectinas são heteropolissacarídeos comumente utilizados como gelificantes em compotas e geleias e estabilizantes em sucos de frutas e bebidas lácteas (Wikiera *et al.*, 2018).

Alguns estudos recentes trazem o perfil imunomodulador de ligninas e pectinas. Tsuji *et al.* (2017) avaliando uma lignina rica em enzima denominada LREL, demonstraram uma potente ação imunoestimulatória frente a células dendríticas. Morganti *et al.* (2017), indicaram em seus estudos com uma bio lignina que a mesma foi capaz de promover reparo cicatrizante *in vitro* e comportamento anti-inflamatório. Além disso, alguns estudos trazem o uso de pectinas como criopreservantes de leucócitos humanos (Zaitseva *et al.*, 2018) e como moléculas de perfil anti-inflamatório e analgésico por reduzirem edema de pata em camundongos albinos Swiss (Mzhoughi *et al.*, 2018).

Em semelhança aos resultados encontrados por Wong *et al.* (2008) e Nowotarska *et al.* (2017), foram identificados 18 compostos fitoquímicos no extrato salino das folhas de *M. emarginata*. Destes compostos, a grande maioria pertence à classe de compostos fenólicos e terpenóides. Entre os compostos descritos estão os flavonóides apigenina-7-O-glicosídeo e Apigenina-8-C-glucósido extensivamente estudados e descritos na literatura por sua potencial aplicabilidade como agentes anti-inflamatórios (Kowalski *et al.*, 2005) e antitumorais (Bankeu *et al.*, 2017; Smiljkovic *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2017). Além disso, a Apigenina-8-C-glicosídeo é uma molécula biologicamente ativa com potencial efeito anti-hipertensivo, antidepressivo, antiespasmódico e antioxidante (Ele *et al.*, 2016).

O extrato salino de folhas de *M. emarginata* apresentou significativo potencial antioxidante, principalmente quando comparado ao hidroxitolueno butilado (BHT), conhecido como composto antioxidante padrão (Pasa *et al.*, 2016; Nascimento *et al.*, 2017). Sugerimos que este potencial antioxidante, é devido a maiores quantidades de compostos fenólicos previamente descritos em vários estudos com moléculas antioxidantes (Zengin *et al.*, 2018). Semelhante aos nossos resultados, outros estudos também demonstraram que plantas ricas em compostos fenólicos possuem potencial antioxidante, como os extratos de *Ficus beecheana* (Yen *et al.*, 2018), *Punica granatum* (Russo *et al.*, 2018) e *Saccharum officinarum* (Abbas *et al.*, 2014). Além disso, em 2017, Nascimento *et al.* analisaram a atividade antioxidante de frutos de *Malpighia glabra* em vários estágios de maturação, encontrando altos níveis de atividade antioxidante e, conseqüentemente, a presença de compostos fenólicos.

Extratos orgânicos de vários órgãos de *M. emarginata* possuem atividade antimicrobiana contra diferentes espécies de bactérias patogênicas, conforme descrito por Motohashi *et al.* (2004) e Silva *et al.* (2014). Embora tais solventes

(orgânicos) promovam a extração de substâncias que promovem alta toxicidade para microrganismos (Yung *et al.*, 2016), o uso indiscriminado desses solventes também está associado à intoxicação, seja por ingestão ou inalação, causando sérios danos ao indivíduo, como lesão pulmonar grave e hepatotoxicidade (Ford *et al.*, 2014; Tormohelen *et al.*, 2014; Connellan, 2017).

Os resultados obtidos neste estudo não indicaram ação contra as espécies de bactérias testadas. No entanto, o extrato salino de folhas de *M. emarginata* apresentou potencial ação fungicida, fungistática e antibiofilme, sugerindo essa capacidade, mais uma vez, à presença de compostos fenólicos (Haghdoost *et al.*, 2016; Barral *et al.*, 2017; Jara *et al.* 2017; Wang *et al.*, 2018).

Como descrito por Khan *et al.* (2014) e Glorybai *et al.* (2015) as plantas são comumente usadas pela medicina tradicional como fonte de cura para várias doenças. Entretanto, o uso irracional ou a concepção de que um produto natural não causa danos à saúde pode ser prejudicial ao indivíduo, estando associado a diversos problemas como envenenamento e choques anafiláticos (Lin *et al.*, 2018), sendo a toxicologia nos estudos de plantas medicinais, de grande relevância para a segurança do indivíduo (Saleh-e-In & Staden, 2018).

Aqui também investigamos o perfil de citotoxicidade promovido pelo extrato salino de folhas de *M. emarginata* em esplenócitos de camundongos e os resultados mostraram que, mesmo em maiores concentrações, este extrato não é citotóxico. Além disso, o extrato de *M. emarginata* também promoveu a proliferação em linfócitos em 24 e 48 horas de incubação, sugerindo propriedades imunoestimuladoras. Estudos recentes demonstraram que extratos de várias espécies de *Byrsonima spp.* (Malpighiaceae) em diferentes concentrações (12,5 e 50 µg/mL) não foram citotóxicas contra células RAW 264-7 (Fraige *et al.*, 2018) e que o extrato aquoso de frutos de *Malpighia glabra* Linnaeus não promoveram citotoxicidade, *in vitro* e *in vivo*, em células derivadas da medula óssea de ratos Wistar (Düsman *et al.* 2016).

Estudos recentes com diferentes espécies pertencentes ao gênero *Byrsonima spp.* (família Malpighiaceae) não apresentaram ação citotóxica contra diferentes linhagens celulares humanas (monócitos e células do epitélio gástrico primário), mas demonstraram uma potencial capacidade citotóxica contra linhagens celulares de câncer de cólon (HT29) e carcinoma hepatocelular (HepG2) (Specian *et al.*, 2016, Verdam *et al.*, 2014).

Outros extratos de plantas, também pertencentes à família Malpighiaceae, apresentam outras propriedades farmacológicas potenciais, como antimicrobianos, cicatrização de feridas e antitumorais (Düsman *et al.*, 2016; Specian *et al.*, 2016). Nossos resultados associados a esses achados sugerem a possibilidade de futuras investigações sobre respostas antitumorais, cicatriciais e imunológicas promovidas pelo extrato salino de folhas de *M. emarginata*.

7. CONCLUSÃO

Extrato salino de folhas de *M. emarginata* mostrou a presença de considerável concentração de compostos fenólicos totais, dentre eles alguns flavonóides e ácidos fenólicos. Além disso, apresentou propriedades antioxidantes e antifúngicas, estimulou esplenócitos de camundongos através da indução da proliferação e promoveu resposta anti-inflamatória em células esplênicas de camundongos BALB/c. Esses resultados são promissores e reforçam a busca por novos compostos naturais contra diferentes doenças e condições, a exemplo da imunossupressão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas SR, Sabir SM, Ahmad SD, Boligon AA, Athayde ML. Phenolic profile, antioxidant potential and DNA damage protecting activity of sugarcane (*Saccharum officinarum*). **Food chemistry**, v. 147, p. 10-16, 2014.

Abbas, Ak, Lichtman, Ah, & Pillai, S. (2015). **Imunologia Celular E Molecular. E-Book**. Elsevier Health Sciences.

Abu-Rish, E. Y.; Elhayek, S. Y.; Mohamed, Y. S.; Hamad, I.; Bustanji, Y. Evaluation of Immunomodulatory Effects of Lamotrigine in BALB/C Mice. **Acta pharmaceutica**, v. 67, n. 4, p. 543-555, 2017.

Adriano, E. **Fenologia, Produção E Qualidade Dos Frutos De Aceroleira Cultivar Olivier, Em Junqueirópolis /SP**. 2011. 60 P. Tese (Doutorado). Universidade Estadual Paulista.

Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J. D. (1994) **Biologia Molecular Da Célula**. Porto Alegre: Artes Médicas, p. 62-77.

Afzal, K.; Uzair, M. U. H. A. M. M. A. D.; Chaudhary, B. A.; Ahmad, A.; Afzal, S. A. M. I. N. A.; Saadullah, M. Genus Ruellia: Pharmacological And Phytochemical Importance In Ethnopharmacology. **Acta poloniae pharmaceutica drug research**, v. 72, n. 5, p. 821-827, 2015.

Alberts, B. Et Al. **Biologia Molecular da Célula**. 5ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

Albuquerque, L. P., Pontual, E. V., de Sá Santana, G. M., Silva, L. R. S., dos Santos Aguiar, J., Coelho, L. C. B. B.; Napoleão, T. H. Toxic effects of Microgramma vacciniifolia rhizome lectin on Artemia salina, human cells, and the schistosomiasis vector Biomphalaria glabrata. **Acta tropica**, v. 138, p. 23-27, 2014.

Alencar, M.; Silva, J.; Vidal, M.; Vandesmet, L. *Klebsiella Pneumoniae*: Uma Revisão Bibliográfica. **Mostra científica em biomedicina**, v. 1, n. 1, 2017.

Alvarez-Suarez, J. M.; Giampieri, F.; Gasparrini, M.; Mazzoni, L.; Santos-Buelga, C.; González-Paramás, A. M.; Battino, M. The Protective Effect of Acerola (*Malpighia emarginata*) Against Oxidative Damage in Human Dermal Fibroblasts Through the Improvement of Antioxidant Enzyme Activity and Mitochondrial Functionality. **Food & function**, v. 8, n. 9, p. 3250-3258, 2017.

Andes D. R., et al. Impact of treatment strategy on outcomes in patients with candidemia and other forms of invasive candidiasis: a patient-level quantitative review of randomized trials. **Clin. Infect. Dis.**, v. 54, p. 1110–1122, 2012.

Apostolakis S.; Lip G. Y. H.; Lane D. A.; Shantsila E. The Quest for New Anticoagulants: From Clinical Development to Clinical Practice. **Cardiovascular ther**, v. 29, n. 6, p. E12–22, 2011.

Asgari S, Setorki M, Rafieian-Kopaei M, Heidermico E, Shahinfard N, Ansari E, Forouzandeh Z. Postprandial hypolipidemic and hypoglycemic effects of *Allium hertifolium* and *Sesamum indicum* on hypercholesterolemic rabbits. **Afr. J. Pharm. Pharmacol.**, v. 6, p. 1131-1135, 2012.

Asgary S, Moshtaghian SJ, Setorki M, Kazemi S, Rafieian-Kopaei M, Adelnia A, Shamsi F. Hypoglycaemic and hypolipidemic effects of pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) on alloxan-induced diabetic rats. **Afr. J. Pharm. Pharmacol.**, v. 5, p. 2620-2626, 2011.

Bahadori F, Ropçu G, Eroglu Ms, Onyuksel H. A New Lipid-Based Nano Formulation of Vinorelbine. **Aaps pharm sci tech**, v. 15, n. 5, p. 1138-48, 2014.

Bailey J. C. Metformin: Historical Overview. **Diabetologia**, v. 60, n. 9, p. 1566-1576, 2017.

Ballal, S.; Inamdar, S. R. An Overview of Lectin–Glycan Interactions: A Key Event in Initiating Fungal Infection and Pathogenesis. **Archives of microbiology**, v. 200, n. 3, p. 371-382, 2018.

Balick, M.J.; Cox, P.A. Plants, People and Culture. **New York: Scientific American Library**, 1997.

Barboza, S.B.S.C.; Tavares, E.D.; Melo, M.B. de. **Instruções para o cultivo da acerola. Aracaju. EMBRAPA-CPATC**, 1996.

Banerjee, D.; Kaul, D. Combined Inhalational and Oral Supplementation of Ascorbic Acid May Prevent Influenza Pandemic Emergency: A Hypothesis. **Nutrition**, v. 26, n. 1, p. 128-132, 2010.

Bankeu KJJ, Dietagoum MS, Kumar R, Ali MS, Lenta NB, Yousuf S. Crystal structure and Hirshfeld surface analysis of 3-oxours-12-ene-27a,28-dioic acid (quafrinoic acid). **Acta Crystallographica Section E: Crystallographic Communications**, v. 73, n. 5, p. 763-766, 2017.

Barboza, B. R., da Silva Barros, B. R., de Azevedo Ramos, B., de Moura, M. C., Napoleão, T. H., dos Santos Correia, M. T.; Nerys, L. D. C. R.; De Melo, C. M. L. Phytochemical bioprospecting, antioxidant, antimicrobial and cytotoxicity activities of saline extract from *Tithonia diversifolia* (Hemsl) A. Gray leaves. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 8, n. 5, p. 245, 2018.

Barral B, Chillet M, Minier J, Lechaudel M, Schorr-Galindo S. Evaluating the response to *Fusarium ananatum* inoculation and antifungal activity of phenolic acids in pineapple. **Fungal Biology**, v. 121, p. 1045-1053, 2017.

Bataglion GA, Silva FMA, Eberlin MN, Koolen HHF. Determination of the phenolic composition from Brazilian tropical fruits by UHPLC–MS/MS. **Food Chemistry**. 180, 280-287, 2015.

Bassetti, M.; Righi, E.; Ansaldi, F.; Merelli, M.; Cecilia, T.; De Pascale, G.; Trecarichi, E. M. A Multicenter Study of Septic Shock Due to Candidemia: Outcomes and Predictors of Mortality. **Intensive care medicine**, v. 40, n. 6, p. 839-845, 2014.

Beltreschi, L.; De Lima, R. B.; Da Cruz, D. D. Traditional Botanical Knowledge Of Medicinal Plants In A “Quilombola” Community In The Atlantic Forest Of Northeastern Brazil. **Environment, development and sustainability**, p. 1-19, 2018.

Bento, R. N. **Estudo Em Tempo Real E In Vivo Da Regulação Do Metabolismo Da *Saccharomyces cerevisiae* pelo H₂O₂**. 2015. Tese De Doutorado.

Benzie IFF, Strain JJ. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70–76, 1996.

Blois, M.S. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. **Nature**, v. 181, p. 1199-1200, 1958.

BRASIL. Ministério Do Meio Ambiente.

Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/amazônia>> . Acesso em: 25 de maio de 2018.

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.

Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 25 de maio de 2018.

Brieger, K.; Schiavone, S.; Miller Jr, F. J.; Krause, K. H. Reactive Oxygen Species: From Health to Disease. **Swiss medical weekly**, v. 142, w13659, 2012.

Bode A. M.; Dong Z. The Two Faces of Capsaicin. **Cancer res**, v. 71, n. 8, p. 2809-14, 2011.

Boniface, P. K.; Ferreira, S. B.; Kaiser, C. R. Current State of Knowledge On the Traditional Uses, Phytochemistry, And Pharmacology of the Genus *Hymenaea*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 206, p. 193-223, 2017.

Campos, M. B.; Do Rêgo Lima, L. V.; De Lima, A. C. S.; Dos Santos, T. V.; Ramos, P. K. S.; De Castro Gomes, C. M.; Silveira, F. T. Toll-Like Receptors 2, 4, And 9 Expressions Over the Entire Clinical And Immunopathological Spectrum Of American

Cutaneous Leishmaniasis Due To *Leishmania* (V.) *Braziliensis* And *Leishmania Amazonenses* (L.). **Plos one**, v. 13, n. 3, p. E0194383, 2018.

Calvo-Flores, F. G.; Dobado, J. A. Lignin as Renewable Raw Material. **Chemsuschem**, v. 3, n. 11, p. 1227-1235, 2010.

Carpentieri-Pípolo, V., Neves, C. S. V. J., Bruel, D. C., de Souza, S. G. H., & Garbúglio, D. D. Frutificação e desenvolvimento de frutos de aceroleira no norte do Paraná. **Ciência Rural**, v. 38, n. 7, p. 1871-1876, 2008.

Cotinguiba, G. G.; Do Nascimento Silva, J. R.; De Sá Azevedo, R. R.; Rocha, T. J. M.; Dos Santos, A. F. Método De Avaliação Da Defesa Antioxidante: Uma Revisão De Literatura. **Journal of health sciences**, v. 15, n. 3, 2015.

Connellan SJ. Lung diseases associated with hydrocarbon exposure. **Respiratory Medicine**, v. 126, p. 46-51, 2017.

Correia, M. T., & Coelho, L. C. Purification of a glucose/mannose specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu bean). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 55, n. 3, p. 261-273, 1995.

Cruvinel, W. D. M., Mesquita Júnior, D., Araújo, J. A. P., Catelan, T. T. T., Souza, A. W. S. D., Silva, N. P. D., & Andrade, L. E. C. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, 2010.

Cruz, R. G. D. Potencial De Metabólitos Da Acerola (*Malpighia emarginata*) Como Antioxidantes Em Diferentes Sistemas Oxidativos Mediados Por Radicais Livres. 2017. Doctoral Dissertation, Universidade De São Paulo.

Da Silva, L. C. N.; Correia, M. T. D. S. Plant Lectins and Toll-Like Receptors: Implications for Therapy Of Microbial Infections. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 20, 2014.

Delves, P. J.; Martin, S. J.; Burton, Dr; Roitt, I. M. (2017). **Imunologia Essencial**. John Wiley & Sons.

De Araújo, R. M. S., da Silva Ferreira, R., Napoleão, T. H., das Graças Carneiro-da-Cunha, M., Coelho, L. C. B. B., dos Santos Correia, M. T.; Paiva, P. M. G. *Crataeva tapia* bark lectin is an affinity adsorbent and insecticidal agent. **Plant science**, v. 183, p. 20-26, 2012.

De Melo, C. M. L.; De Castro, M. C. A. B.; De Oliveira, A. P.; Gomes, F. O. S.; Pereira, V. R. A.; Correia, M. T. S.; Paiva, P. M. G. Immunomodulatory Response Of Cramoll 1, 4 Lectin On Experimental Lymphocytes. **Phytotherapy research**, v. 24, n. 11, p. 1631-1636, 2010.

De Oliveira Figueiroa, E., Albuquerque da Cunha, C. R., Albuquerque, P., de Paula, R. A., Aranda-Souza, M. A., Alves, M. S.; Tereza, M. Lectin-carbohydrate interactions: implications for the development of new anticancer agents. *Current medicinal chemistry*, v. 24, n. 34, p. 3667-3680, 2017.

De Oliveira Silva, F.; Das Neves Santos, P.; De Melo, C. M. L.; Teixeira, E. H.; De Sousa Cavada, B.; Pereira, V. A. R.; Almeida, A. C. Immunostimulatory Activity Of Conbr: A Focus On Splenocyte Proliferation And Proliferative Cytokine Secretion. **Cell and tissue research**, v. 346, n. 2, p. 237-244, 2011.

De Oliveira, J. E. M.; Nicodemo, D.; De Oliveira, F. F. Contribuição da polinização entomófila para a produção de frutos de aceroleira. **Pesquisa Agropecuária Tropical (Agricultural Research in the Tropics)**, v. 45, n.1, 2015.

De Siqueira Patriota, L. L., Procópio, T. F., de Santana Brito, J., Sebag, V., de Oliveira, A. P. S., de Araújo Soares, A. K.; Paiva, P. M. G. *Microgramma vacciniifolia* (Polypodiaceae) fronds contain a multifunctional lectin with immunomodulatory properties on human cells. **International journal of biological macromolecules**, v. 103, p. 36-46, 2017.

Demographic and Disease Characteristics. **Amyotroph lateral scler frontotemporal degener**, v. 15, p. 192–203, 2015.

Djafoua, Y. M.; Mouokeu, R. S.; Tume, C.; Kamtchueng, M. O.; Kuate, J. R. Immunomodulatory Activity of Methanol Leaf Extracts of Cameroonian Medicinal Plants. **Journal of complementary and integrative medicine**, v. 12, n. 4, p. 267-275, 2015.

Dos Santos Júnior, H. M.; Oliveira, D. F.; De Carvalho, D. A.; Pinto, J. M. A.; Campos, V. A. C.; Mourão, A. R. B.; Costa-Lotufo, L. V. Evaluation of Native and Exotic Brazilian Plants for Anticancer Activity. **Journal of natural medicines**, v. 64, n. 2, p. 231-238, 2010.

Düsman E, Almeida IV, Tonin LTD, Vicentini VEP. In vivo antimutagenic effects of the Barbados cherry fruit (*Malpighia glabra* Linnaeus) in a chromosomal aberration assay. **Genetics and Molecular Research.**, v. 15, n. 4, 2016.

Ele M, Min JW, Kong WL, Ele XH, Li JX, Peng BW. A review of the pharmacological effects of Vitexin and isovitexin. **Phytotherapy**, v. 115, p. 74-85, 2016.

Ekor, M. The Growing Use Of Herbal Medicines: Issues Relating To Adverse Reactions And Challenges In Monitoring Safety. **Frontiers in pharmacology**, v. 4, p. 177, 2014.

Elias T. S.; Korzhenevsky V. V. The Presence of Taxol and Related Compounds in *Taxus Baccata* Native to The Ukraine (Crimea), Georgia, And Southern Russia. Aliso: **J. Syst Evol Bot**, v. 13, n. 3, p. 463-470, 1992.

Epelman, S.; Liu, P. P.; Mann, D. L. Role of Innate and Adaptive Immune Mechanisms in Cardiac Injury and Repair. **Nature reviews immunology**, v. 15, n. 2, p. 117, 2015.

Fahy J; Hellier P; Breillout F; Bailly C. Vinflunine: Discovery and Synthesis of A Novel Microtubule Inhibitor. **Semin oncol**, v. 35, n. 3, p. S3-5, 2008.

Favarin, C. D.; Oliveira, R. J.; Oliveira, J. F. C.; De Paula, R. A. Potential Effects of Medicinal Plants and Secondary Metabolites On Acute Lung Injury. **Biomed Research International**, 2013.

Felton, T; Troke, P. F.; Hope, W. W. Tissue penetration of Antifungal agents. **Clin. Microbiol. Ver.**, p. 68-88, 2014.

Freitas, C. A. S., Maia, G. A., da Costa, J. M. C., de Figueiredo, R. W., & de Sousa, P. H. M. (2014). Acerola: produção, composição, aspectos nutricionais e produtos. **Current Agricultural Science and Technology**, v. 12, n. 4, 2014.

French, K. E.; Harvey, J.; Mccullagh, J. S. Targeted and Untargeted Metabolic Profiling of Wild Grassland Plants Identifies Antibiotic and Anthelmintic Compounds Targeting Pathogen Physiology, Metabolism and Reproduction. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1695, 2018.

Ford JB, Sutter ME, Owen K, Albertson TE. Volatile Substance Misuse: An Updated Review of Toxicity and Treatment. Clin. **Reviews in Allergy & Immunology**, v. 46, p. 19-33, 2014.

Furlaneto, F. P. B.; Nasser, M. D. Panorama Da Cultura Da Acerola No Estado De São Paulo. **Pesquisa & tecnologia**, v. 12, n. 1, 2015.

Ghasemzadeh, A., Jaafar, H. Z., Rahmat, A., & Ashkani, S. (2015). Secondary metabolites constituents and antioxidant, anticancer and antibacterial activities of *Etlingera elatior* (Jack) RM Sm grown in different locations of Malaysia. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 15, n. 1, p. 335, 2015.

Giraldi, M.; Hanazaki, N. Uso E Conhecimento Tradicional De Plantas Medicinais No Sertão Do Ribeirão, Florianópolis, Sc, Brasil. **Acta botanica brasílica**, v. 24, n. 2, p. 395-406, 2010.

Glorybai L, Kannan KB, Arasu MV, Al-Dhabi NA, Agastian P, 2015. Some biological activities of *Epaltes divaricata* L. - an in vitro study. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 14, p. 18, 2015.

Gomes, B. S., Siqueira, A. B. S., Maia, R. D. C. C., Giampaoli, V., Teixeira, E. H., Arruda, F. V. S.; Porto, A. L. F. (2012). Antifungal activity of lectins against yeast of vaginal secretion. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 770-778, 2012.

Gorton, H. C; Jarvis, K. The Effectiveness Of Vitamin C In Preventing And Relieving The Symptoms Of Virus-Induced Respiratory Infections. **Journal of manipulative & physiological therapeutics**, v. 22, n. 8, p. 530-533, 1999.

Gouveia, E. R.; Nascimento, R. T.; Souto-Maior, A. M.; Rocha, G. J. M. Validação de Metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1500-1503, 2009.

Haghdoust NS, Salehi TZ, Khosravi A, Sharifzadeh A. Antifungal activity and influence of propolis against germ tube formation as a critical virulence attribute by clinical isolates of *Candida albicans*. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 26, n. 4, p. 298-305, 2016.

Herrera-Arellano, A; et al. Use of Antifungal Saponin SC-2 of *Solanum chrusotrichum* for the treatment of vulvovaginal Candidiasis: *In Vitro* Studies and clinical experiences. **Afr J Tradit Compl. Altern. Med.**, v. 10(3), pp. 410-417, 2013.

Hivrale, A. U., & Ingale, A. G. Plant as a plenteous reserve of lectin. **Plant signaling & behavior**, v. 8, n. 12, e26595, 2013.

Holzerová, E.; Prokisch, H. Mitochondria: Much Ado About Nothing? How Dangerous Is Reactive Oxygen Species Production? **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 63, p. 16-20, 2015.

Innocente, A; et al. Synthesis of Isosteric Triterpenoid derivatives and antifungal activity. **Chemical Biology & Drug Des.**, v 83, p. 344-349, 2014.

Inns, T.; Lane, C.; Peters, T.; Dallman, T.; Chatt, C.; Mcfarland, N.; Elson, R. A Multi-Country Salmonella Enteritidis Phage Type 14b Outbreak Associated With Eggs From A German Producer: 'Near Real-Time' application Of Whole Genome Sequencing And Food Chain Investigations, United Kingdom, May To September 2014. **Eurosurveillance**, v. 20, n. 16, 21098, 2015.

Jara C, Leyton M, Osorio M, Silva V, Fleming F, Paz M. Antioxidant, phenolic and antifungal profiles of *Acanthus mollis* (Acanthaceae). *Natural Product Research.*, v. 31, n.19, 2017.

Jha, A.; Kumar, A. Deciphering The Role of Sodium Lignosulfonate Against Candida Spp. As Persuasive Anticandidal Agent. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, p. 1212-1219, 2018.

Jiang, T.; Sun, Q.; Chen, S. Oxidative Stress: A Major Pathogenesis and Potential Therapeutic Target of Antioxidative Agents in Parkinson's Disease and Alzheimer's Disease. **Progress in neurobiology**, v. 147, p. 1-19, 2016.

Kasote, D. M.; Katyare, S. S.; Hegde, M. V.; Bae, H. Significance of Antioxidant Potential of Plants and Its Relevance to Therapeutic Applications. **International journal of biological sciences**, v. 11, n. 8, p. 982, 2015.

Khan N, Abbasi AM, Dastagir G, Nazir A, Shah GM, Shah MM, Shah MH. Ethnobotanical and antimicrobial study of some selected medicinal plants used in Khyber Pakhtunkhwa (KPK) as a potential source to cure infectious diseases. *BMC complement altern med.*, v. 14, p. 122, 2014.

Kowalski J, Samojedny A, Paul M, Pietsz G, Wilczok T, 2005. Effect of apigenin, kaempferol and resveratrol on the expression of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha genes in J774.2 macrophages. **Rep. Pharmacol.** 57(3), 390-394, 2005.
Kupchan S. M.; Komoda Y.; Court W. A.; Thomas G. J.; Smith R. M.; Karim A. Maytansine. A Novel Antileukemic Ansa Macrolide from Maytenus Ovatus. **J am chem soc.**, v. 94, n. 4, p. 1354-6, 1972.

Larsson S.; Ronsted N. Reviewing Colchicaceae Alkaloids – Perspectives of Evolution On Medicinal Chemistry. **Curr top med chem**, v. 14, n. 2, p. 274-289, 2014.

Lee, D. S.; Keo, S.; Ko, W.; Kim, K. S.; Ivanova, E.; Yim, J. H.; Oh, H. Secondary Metabolites Isolated from *Castilleja rubra* Exert Anti-Inflammatory Effects Through NF-Kb Inactivation On Lipopolysaccharide-Induced RAW2647 Macrophages. **Archives of pharmacal research**, v. 37, n. 7, p. 947-954, 2014.

Leffa DD, Silva J, Daumann F, Dajori ALF, Longaretti, LM, Damiani AP, Lira F, Campos F, Ferraz ABF, Correa DS, Andrade VM. Corrective effects of acerola (*Malpighia emarginata* DC.) juice intake on biochemical and genotoxic parameters in mice fed on a high-fat diet. **Mutat Res.**, v. 770, p. 144-52, 2014.

Lemos, C. G. O. Teoremas De Flutuação e Sistemas Magnéticos Fora Do Equilíbrio Termodinâmico. 2017.

Li, L., Mendis, N., Trigui, H., Oliver, J. D., & Faucher, S. P. The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. **Frontiers in microbiology**, v. 5, p. 258, 2014.

Lin L, Liu YC, Huang JL, Liu XB, Qing ZX, Zeng JG, Liu ZY. Medicinal plants of the genus *Macleaya* (*Macleaya cordata*, *Macleaya microcarpa*): A review of their phytochemistry, pharmacology, and toxicology. **Phytother res.**, v. 32, n. 1, p. 19-48, 2018.

Liu, J. Q., Deng, Y. Y., Li, T. Z., Han, Q., Li, Y., & Qiu, M. H. Three New Tetranorditerpenes from Aerial Parts of Acerola Cherry (*Malpighia emarginata*). **Molecules**, v. 19, n. 2, p. 2629-2636, 2014.

Liochev, S. I. Reactive Oxygen Species and The Free Radical Theory of Aging. **Free radical biology and medicine**, v. 60, p. 1-4, 2013.

Lowry, O. H. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biology and Chemistry**. V. 193, n. 2, p. 265-275, 1951.

Mady, C. E. K. **Desenvolvimento Termodinâmico Do Corpo Humano E Seus Subsistemas: Aplicações À Medicina, Desempenho Esportivo E Conforto Térmico**. 2014. Tese (Doutorado). Escola Politécnica Da Universidade De São Paulo, Departamento De Engenharia Mecânica, São Paulo.

Mady, C.E.K.; Ferreira, M.S.; Yanagihara, J.I.; De Oliveira, S. Human Body Exergy Analysis And The Assessment Of Thermal Comfort Conditions. **International journal of heat and mass transfer**, v. 77, p. 577–584, 2014.

Mahdi J. G.; Mahdi A. J.; Mahdi A. J.; Bowen I. D. The Historical Analysis Of Aspirin Discovery, Its Relation To The Willow Tree And Antiproliferative And Anticancer Potential. **Cell prolifer**, v. 39, n. 2, p. 147–155, 2006.

Martins, A.G.; Rosário D.L.; Barros, M.N.; Jardim, M.A.G. Levantamento Etnobotânico De Plantas Medicinais, Alimentares E Toxicas Da Ilha Do Combu, Município De Belém, Estado Do Pará. **Revista brasileira de farmacognosia**, v. 86, p. 31-30, 2007.

Martins, C. A **Exposição Sobre a Engenheira Agrônoma Maria Celene Cardoso de Almeida**. Academia Pernambucana de Ciência Agronômica, v.10, 102-109, 2013.

Marinho, H. S.; Real, C.; Cyrne, L.; Soares, H.; & Antunes, F. Hydrogen Peroxide Sensing, Signaling And Regulation Of Transcription Factors. **Redox biology**, v. 2, p. 535-562, 2014.

Martel, J.; Ko, Y. F.; Ojcius, D. M.; Lu, C. C.; Chang, C. J.; Lin, C. S.; Young, J. D. Immunomodulatory Properties of Plants and Mushrooms. **Trends in Pharmacological Sciences**, 2017.

Martins, C. **Mulheres Pioneiras, Mulheres De Renome: As Engenheiras**

Agrônomas Pernambucanas Da Primeira Metade Do Século XX (Década De 40).

Brasília/DF, Brasil. Publicado Nos Anais Da Academia Pernambucana De Ciência Agronômica, v.4, 2007.

Malegori C, Nascimento MEJ, de Freitas ST, Pimentel MF, Pasquini C, Casiraghi E. Comparing the analytical performances of Micro-NIR and FT-NIR spectrometers in the evaluation of acerola fruit quality, using PLS and SVM regression algorithms. **Talanta**, v. 165, p. 112-11, 2017.

Medeiros De Siqueira, K.; Feitosa Martins, C.; Piedade Kiill, L. H.; Torres Silva, L. A. I. Estudo comparativo da polinização em variedades de aceroleiras (*Malpighia emarginata* DC, Malpighiaceae). **Revista Caatinga**, v. 24, n. 2, 2011.

Mesquita Júnior, D., Araújo, J. A. P., Catelan, T. T. T., Souza, A. W. S. D., Cruvinel, W. D. M., Andrade, L. E. C., & Silva, N. P. D. Sistema imunitário-parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Revista Brasileira de Reumatologia**, 2010.

Mezadri, T, Villano D, Fernandez-Pachon MS, Garcia-Parrilla MC, Troncoso AM. Antioxidant compounds and antioxidant activity in acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruits and derivatives. **Journal of Food Composition and Analysis**. 21, 282-290, 2008.

Mezquita PC, Vigoa YG. La acerola. Fruta marginada de América con alto contenido en Ácido ascorbico. **Alimentaria**, v. 1, p. 113–125, 2000.

Min K.; Park K.; Park D. H.; Yoo Y. J. Overview On the Biotechnological Production of L-DOPA. **Appl Microbiol Biotechnol.**, v. 99, n. 2, p. 575–584, 2015.

Mitsumoto, H.; Factor-Litvak, P.; Andrews, H.; Goetz, R. R.; Andrews, L.; Rabkin, J. G.; Hupf, J. ALS Multicenter Cohort Study of Oxidative Stress (ALS COSMOS): study methodology, recruitment, and baseline demographic and disease characteristics. **Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration**, v. 15, n. 3-4, p. 192-203, 2014.

Motohashi, N.; Wakabayashi, H.; Kurihara, T.; Fukushima, H.; Yamada, T.; Kawase, M.; Satoh, K. Biological Activity of Barbados Cherry (*Acerola* Fruits, Fruit of *Malpighia emarginata* DC) Extracts and Fractions. **Phytotherapy research**, v. 18, n. 3, p. 212-223, 2004.

Moreira AA, Martins LSS, Musser RS, Moraes Filho RM, Maranhão WA, Rossiter JG, Montarroyos AVV. Response of *Malpighia emarginata* active germplasm bank accessions to *Meloidogyne enterolobii* parasitism. **Genet. Mol. Res.**, v. 15, n. 4, 2016.

Morganti, P.; Fusco, A.; Paoletti, I.; Perfetto, B.; Del Ciotto, P.; Palombo, M.; Donnarumma, G. Anti-Inflammatory, Immunomodulatory, And Tissue Repair Activity On Human Keratinocytes by Green Innovative Nanocomposites. **Materials**, v. 10, n. 7, p. 843, 2017.

Montecucco A.; Zanetta F.; Biamonti G. Molecular Mechanisms of Etoposide. **Excli J**, v. 4, p. 95-108, 2015.

Moura, M. C., Napoleão, T. H., Coriolano, M. C., Paiva, P. M. G., Figueiredo, R. C. B. Q., & Coelho, L. C. B. B. Water-soluble Moringa oleifera lectin interferes with growth, survival and cell permeability of corrosive and pathogenic bacteria. **Journal of applied microbiology**, v. 119, n. 3, p. 666-676, 2015.

Murphy, K., & Weaver, C. (2016). **Imunobiologia De Janeway**. Garland Science.

Mzoughi, Z., Abdelhamid, A., Rihouey, C., Le Cerf, D., Bouraoui, A., & Majdoub, H. Optimized extraction of pectin-like polysaccharide from Suaeda fruticosa leaves: Characterization, antioxidant, anti-inflammatory and analgesic activities. **Carbohydrate polymers**, 2018.

Nascimento EMM, Rodrigues FG, Costa WD, Teixeira RNP, Boligon AA, Souza EO, Rodrigues FFG, Coutinho HDM, Costa JG. HPLC and *in vitro* evaluation of

antioxidant properties of fruit from *Malpighia glabra* (Malpighiaceae) at different stages of maturation. **Food and Chemical Toxicology**, p. 26, 2017.

Nakagawa, Y.; Yukishige, I. Arquitetura Molecular E Potencial Terapêutico De Mimetinas De Lectina. Avanços Na Química E Bioquímica De Carboidratos. **Academic press**, v. 68, p. 1-58, 2012.

Nelson, D. L.; Cox, M. M. **Princípios De Bioquímica De Lehninger**. Porto Alegre: Artmed, 2011. 6. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

Neto, A. F.; Reis, D. S.; Alves, E.; Gonçalves, E.; Dos Anjos, F. C.; Ferreira, M. Determinação De Vitamina C e Avaliação Físico-Química Em Três Variedades De Acerola Cultivadas Em Petrolina-PE. **Nucleus**, v. 11, n. 1, 2014.

Noble R. L.; Beer C. T.; Cutts J. H. Further Biological Activities of Vinca Leukoblastine - An Alkaloid Isolated from *Vinca rosea* (L.). **Biochem pharm.**, v. 1, p. 347-348, 1958.

Nowotarska SW, Nowotarski K, Grant IR, Elliott CT, Friedman M, Situ C. Mechanisms of Antimicrobial Action of Cinnamon and Oregano Oils, Cinnamaldehyde, Carvacrol, 2,5-Dihydroxybenzaldehyde, and 2-Hydroxy-5-Methoxybenzaldehyde against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map). **Foods**, v. 6, n. 9, p. 72, 2017.

Nunes RS, Kahl VFS, Sarmento MS, Richter MF, Abin-Carriquiry JA, Martinez MM, Ferraz ABF, Silva J. Genotoxic and Antigenotoxic Activity of Acerola (*Malpighia glabra* L.) Extract in Relation to the Geographic Origin. **Phytother. Res.**, v. 27, p. 1495–1501, 2013.

Nunes RS, Kahl VFS, Sarmento MS, Richter MF, Costa-Lotufo LV, Rodrigues FAR, Abin-Carriquiry JA, Martinez MM, Ferronatto S, Ferraz ABF, Silva J. Antigenotoxicity and Antioxidant Activity of Acerola Fruit (*Malpighia glabra* L.) at Two Stages of Ripeness. **Plant Foods Hum Nutr.**, v. 66, p. 129–135, 2011.

O'Connor, S. E. Engineering of secondary metabolism. **Annual review of genetics**, v. 49, p. 71-94, 2015.

Oliveira LS, Moura CFH, Brito ES, Mamede RVS, Miranda MRA. Antioxidant Metabolism during Fruit Development of Different Acerola (*Malpighia emarginata* D.C) Clones. **J. Agric. Food Chem**, 60(32), 7957–7964, 2012.

Ostrosky-Zeichner, L. et al. An insight into the antifungal pipeline: selected new molecules and beyond. **Nature Ver. Drug Disc.**, v. 9, pp. 719-727, 2010.

Pasa S, Aydin S, Kalayci S, Boga M, Atla M, Bingul M, Sahin F, Temel H. The synthesis of boronic-imine structured compounds and identification of their anticancer, antimicrobial and antioxidant activities. **J pharm anal.**, v. 6, p. 39–48, 2016.

Patra, A.; Singh, S. K. Evaluation of Phenolic Composition, Antioxidant, Anti-Inflammatory and Anticancer Activities of *Polygonatum Verticillatum* (L.). **Journal of integrative medicine**, 2018.

Perna, T. A.; Do Nascimento Lamano-Ferreira, A. P. Revisão Bibliométrica Sobre O Cultivo De Plantas Medicinais Em Quintais Urbanos Em Diferentes Regiões Do Brasil (2009-2012). **Journal of health sciences**, v. 16, n. 1, 2015.

Pilatti, F. K.; Aguiar, T.; Simões, T.; Benson, E. E.; Viana, A. M. In Vitro and Cryogenic Preservation of Plant Biodiversity in Brazil. **In vitro cellular & developmental biology-plant**, v. 47, n. 1, p. 82-98, 2011.

Pohanka, M., Pejchal, J., Snopkova, S., Havlickova, K., Z Karasova, J., Bostik, P., & Pikula, J. Ascorbic acid: an old player with a broad impact on body physiology including oxidative stress suppression and immunomodulation: a review. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 12, n. 1, p. 35-43, 2012.

Potmesil M. Research Camptothecins: From Bench Researctc to Hospital Wards. **Cancer res**, v. 54, n. 6, p. 1431-1439, 1994.

Ramsay, D. S.; Woods, S. C. Clarifying The Roles of Homeostasis and Allostasis in Physiological Regulation. **Psychological review**, v. 121, n. 2, p. 225, 2014.

Reesi, F.; Minaiyan, M.; Taheri, A. A novel Lignin-Based nanofibrous dressing containing arginine for Wound-Healing applications. **Drug delivery and translational research**, p. 1-12, 2017.

Regente, M., Taveira, G. B., Pinedo, M., Elizalde, M. M., Ticchi, A. J., Diz, M. S., ... & Gomes, V. M. A sunflower lectin with antifungal properties and putative medical mycology applications. **Current microbiology**, v. 69, n. 1, p. 88-95, 2014.

Reichling, J. Plant–Microbe Interactions and Secondary Metabolites with Antibacterial, Antifungal and Antiviral Properties. **Annual plant reviews**, p. 214-347, 2018.

Renslo A. R. Antimalarial Drug Discovery: From Quinine to The Dream of Eradication. **ACS Med Chem Lett**, v. 4, n. 12, p. 1126-1128, 2013.

Rezende, Y. R. R. S., Nogueira, J. P., & Narain, N. Microencapsulation of Extracts of Bioactive Compounds Obtained from Acerola (*Malpighia emarginata* DC) Pulp and Residue By Spray And Freeze Drying: Chemical, Morphological And Chemometric Characterization. **Food Chemistry**, v. 254, p. 281-291, 2018.

Ribeiro, R. V.; Bieski, I. G. C.; Balogun, S. O.; De Oliveira Martins, D. T. Ethnobotanical Study of Medicinal Plants Used by Ribeirinhos in The North Araguaia Microregion, Mato Grosso, Brazil. **Journal of ethnopharmacology**, v. 205, p. 69-102, 2017.

Ribeiro, T. J. S. **Análise Exergética Do Sistema Térmico Do Corpo Humano Para Avaliação De Conforto Térmico**. 2018. 150p. Dissertação (Mestrado). Faculdade De Engenharia Mecânica, Universidade Estadual De Campinas, Campinas.

Rocha, G. J. M. Deslignificação de Bagaço de Cana de Açúcar Assistida por Oxigênio. 2000. **Tese de Doutorado**. São Carlos, SP: Universidade Federal de São Carlos.

Rocha, G. J. M.; Martin, C.; Soares, I. B.; Souto-Maior, A. M.; Baudel, H. M.; Abreu, C. A. M. Dilute mixed-acid pretreatment of sugarcane bagasse for ethanol production. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, p. 663-670, 2011.

Rocha, G. J. M.; Martin, C.; Silva, V. F. N.; Olivarez, E. G.; Gonçalves, A. R. Mass balance of pilot-scale pretreatment of sugarcane bagasse by steam explosion followed by alkaline delignification. **Bioresource Technology**, v. 111, p. 447-452, 2012.

Rodrigues, V.E.G.; Carvalho, D.A. Levantamento Etnobotânico De Plantas Medicinais Do Domínio Cerrado Na Região Do Alto Rio Grande, Minas Gerais. **Ciência agrotécnica**, v. 25, p. 102-123, 2011.

Rosenblum A.; Marsch L. A.; Joseph Hportenoy, R. K. Opioids and The Treatment of Chronic Pain: Controversies, Current Status, And Future Directions. **Exp clin psychopharmacol**, v. 16, n. 5, p. 405–416, 2008.

Rosso VV, Hillebrandb S, Montillab EC, Bobbio FO, Winterhalter P, Mercadante AZ. Determination of anthocyanins from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) and açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) by HPLC–PDA–MS/MS. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, p. 291–299, 2008.

Russo M, Fanali C, Tripodo G, Dugo P, Muleo R, Dugo L, De Gara L, Mondello L. Analysis of phenolic compounds in different parts of pomegranate (*Punica granatum*) fruit by HPLC-PDA-ESI/MS and evaluation of their antioxidant activity: application to different Italian varieties. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, p. 1-14, 2018.

Sassa, A.; Kamoshita, N.; Matsuda, T.; Ishii, Y.; Kuraoka, I.; Nohmi, T.; Yasui, M. Miscoding Properties Of 8-Chloro-2'-Deoxyguanosine, A Hypochlorous Acid-Induced

DNA Adduct, Catalysed By Human DNA Polymerases. **Mutagenesis**, v. 28, n. 1, p. 81-88, 2013.

Saljoughian, S.; Roohinejad, S.; Bekhit, A. E. D. A.; Greiner, R.; Omidizadeh, A.; Nikmaram, N.; Mousavi, A. The Effects of Food Essential Oils On Cardiovascular Diseases: A Review. **Critical reviews in food science and nutrition**, p. 1-18, 2017.

Salazar, F., Sewell, H. F., Shakib, F.; Ghaemmaghani, A. M. The Role of Lectins In Allergic Sensitization And Allergic Disease. **Journal of allergy and clinical immunology**, v. 132, n. 1, p. 27-36, 2013.

Santos A. P.; Moreno R. H. *Pilocarpus* Spp.: A Survey of Its Chemical Constituents and Biological Activities. **Braz j pharm sci**, v. 40, n. 2, p. 116-137, 2004.

Saleh-e-In M, Staden JV. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Arctotis arctotoides* (L.f.) O. Hoffm.: A review. *Journal of Ethnopharmacology*. 11, 2018.

Schelenz, S., Barnes, R. A., Barton, R. C., Cleverley, J. R., Lucas, S. B., Kibbler, C. C., & Denning, D. W. British Society for Medical Mycology best practice recommendations for the diagnosis of serious fungal diseases. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 15, n. 4, p. 461-474, 2015.

Sen, S.; Patil, S.; Argyropoulos, D. S. Thermal Properties of Lignin in Copolymers, Blends, And Composites: A Review. **Green chemistry**, v. 17, n. 11, p. 4862-4887, 2013.

Singh, P.; Zimmerli, L. Z. Lectin Receptor Kinases in Plant Innate Immunity. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, p. 124, 2013.

Sluiter, A.; Hames, B.; Ruiz, R.; Scarlata, C.; Sluiter, J.; Templeton, D.; Crocker, D. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. **Laboratory Analytical Procedure (LAP)**. Issue Date: 4/25/2008. Technical Report NREL/TP – 510-42618.

Sluiter, A.; Hames, B.; Ruiz, R.; Scarlata, C.; Sluiter, J.; Templeton, D.; Crocker, D. Determination of Sugars, Byproducts, and Degradation Products in Liquid Fraction Process Samples. **Laboratory Analytical Procedure (LAP)**. Issue Date: 12/08/2006. Technical Report NREL/TP – 510-42623.

Sluiter, A.; Ruiz, R.; Scarlata, C.; Sluiter, J.; Templeton, D. Determination of Extractives in Biomass. **Laboratory Analytical Procedure (LAP)**. Issue Date: 7/17/2005. Technical Report NREL/TP – 510-42619.

Shinohara, N. K. S. *Et Al.* Maria Celene De Almeida: A Mãe da Acerola (*Malpighia Glabra* L.) No Brasil. **Revista eletrônica “diálogos acadêmicos”**. v. 09, nº 2, p. 49-63, 2015.

Shirzad H, Taji F, Rafieian-Kopaei M. Correlation between antioxidant activity of garlic extracts and WEHI-164 fibrosarcoma tumor growth in BALB/c mice. **J. Med. Food**, v. 14, p. 969-974, 2011.

Smiljkovic M, Stanisavljevic D, Stojkovic D, Petrovic I, Vicentic JM, Grdadolnik SG, Markovic D, Sankovic-Babice, S, Glamoclija J, Stevanovic M, Sokovic M. Apigenin-7-O-glucoside versus apigenin: Insight into the modes of anticandidal and cytotoxic actions. **Excli journal.**, v, 16, p. 795-807, 2017.

Streffer, F. **Method for Digesting a Biomass Comprising Lignin Together With Cellulose And/Or Hemicellulose**. U.S. Patent N. 8,895,290, 2014.

Son J. K.; Lee S. H.; Nagarapu L; Jahng Y. A Simple Synthesis of Nordihydroguaiaretic Acid and Its Analogues. Bull. **Korean chem soc**, v. 26, p. 1117-1120, 2005.

Sultana, S.; Muhamma, A. H. Medicinal Plants Combating Against Hypertension: A Green Antihypertensive Approach. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 30, n. 6, 2017.

Souza, M. A.; Carvalho, F. C.; Ruas, L. P.; Ricci-Azevedo, R.; Roque-Barreira, M. C. The Immunomodulatory Effect of Plant Lectins: A Review with Emphasis On Artinm Properties. **Glycoconjugate journal**, v. 30, n. 7, p. 641-657, 2013.

Souza, V. C.; Lorenzi, H. **Botânica Sistemática: Guia Ilustrado Para Identificação Das Famílias De Fanerógamas Nativas E Exóticas No Brasil, Baseado Na APG II**. Nova Odessa, Instituto Plantarum, São Paulo, Brasil, 2008.

Specian AFL, Serpeloni JM, Tullis K, Ribeiro DL, Colião HL, Varanda EA, Sannomiya M, Martinez-Lopes W, Vilegas W, Cólus IMS. LDH, proliferation curves and cell cycle analysis are the most suitable assays to identify and characterize new phytotherapeutic compounds. **Cytotechnology**, v. 68, p. 2729-2744, 2016.

Su X. Z.; Miller L. H. The Discovery of Artemisinin and Nobel Prize in Physiology or Medicine. **Sci china life sci**, v. 58, n. 11, p. 1175-1179, 2015.

Tormohelen LM, Tekulve KJ, Nañagas KA. Hydrocarbon toxicity: A review. **Journal clinical toxicology**, v. 52, p. 479-489, 2014.

Tsuji, R.; Ikado, K.; Fujiwara D. Modulation of Innate Immunity by Lignin-Carbohydrate, A Novel TLR4 Ligand, Results in Augmentation of Mucosal Iga and Systemic Igg Production. **Int J Mol Sci**, v. 19, n. 1, p. E64, 2017.

Tyagi A. K.; Prasad S. Drug Discovery Inspired by Mother Nature for Cancer Therapy. **Biochem Physiol**, v. 4, n. 1, p. E128, 2015.

Vasconcelos, C. N. E. D.; Silva, N. N. P.; Batista, P. N.; Souza, J. H. K. D. Estudo Comparativo Entre Terapia Oral E Local No Tratamento De Corrimentos Vaginais: Candidíase, Tricomoníase E Vaginose Bacteriana. 2016.

Vásquez, S. P. F. Conhecimento, Uso E Conservação Da Diversidade Vegetal Em Quatro Comunidades Ribeirinhas No Município Manacapuru, Amazonas. 2014.

Vásquez, S. P. F., Mendonça, M. D., & Noda, S. D. N. Etnobotânica De Plantas Medicinais Em Comunidades Ribeirinhas Do Município De Manacapuru, Amazonas, Brasil. **Acta amazônica**, v. 44, n. 4, p. 457-472, 2014.

Verdam MCS, Guilhon-Simplicio F, Paula CS, Oliveira VB, Miguel MD, Campelo, PMS, Miguel OG. Cytotoxicity of *Byrsonima duckeana* W.R. Anderson (Malpighiaceae) on colon cancer cells. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 11, 2014.

Venditti, P., Di Stefano, L., & Di Meo, S. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. **Mitochondrion**, v. 13, n. 2, p. 71-82, 2013.

Vizzotto, M., Krolow, A., & Weber, G. E. B. Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância. Embrapa Clima Temperado-Documents (INFOTECA-E), 2010.

Vieira, E. J., Martins, H. C., & Gonçalves, C. A. Aplicabilidade Da Teoria Do Caos A Organizações. **Gestão e Sociedade**, v. 8, n. 19, p. 517-540, 2014.

Xiong, H.; Keith, J. W.; Samilo, D. W.; Carter, R. A.; Leiner, I. M.; Pamer, E. G. Innate Lymphocyte/Ly6Chi Monocyte Crosstalk Promotes Klebsiella Pneumoniae Clearance. **Cell**, v. 165, n. 3, p. 679-689, 2016.

Wang W, Jiang S, Pu T, Fan L, Su F, Ye M. Antifungal activity of phenolic monoterpenes and structure-related compounds against plant pathogenic fungi. **Natural product research.**, p. 1-8, 2018.

Wong SY, Grant IR, Friedman M, Elliott CT, Situ C. Antibacterial Activities of Naturally Occurring Compounds against *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 19, p. 5986-5990, 2008.

World Health Statistics 2018: Monitoring Health for The Sdgs, Sustainable Development Goals. Geneva: World Health Organization; 2018. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO

Wright, A. P.; Richardson, L.; Mahon, B. E.; Rothenberg, R.; Cole, D. J. The Rise and Decline In *Salmonella enterica*, *Serovar enteritidis* Outbreaks Attributed To Egg-Containing Foods In The United States, 1973–2009. **Epidemiology & infection**, v. 144, n. 4, p. 810-819, 2016.

Wikiera, A.; Irla, M.; Mika, M. Health-Promoting Properties of Pectin. **Postepy Hig Med Dosw**, v. 2, n. 68, p. 590-6, 2018.

Yan, M.; Zhu, Y.; Zhang, H. J.; Jiao, W. H.; Han, B. N.; Liu, Z. X.; Qiu, F.; Chen, W.S.; Lin, H. W. Anti-Inflammatory Secondary Metabolites from The Leaves of *Rosa Laevigata*. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 21, n. 11, p. 3290-3297, 2013.

Yang, B., & Liu, P. Composition and biological activities of hydrolyzable tannins of fruits of *Phyllanthus emblica*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 62, n. 3, p. 529-541, 2014.

Yen GC, Chen CS, Chang WT, Wu MF, Cheng FT, Shiau DK, Hsu CL. Antioxidant activity and anticancer effect of ethanolic and aqueous extracts of the roots of *Ficus beecheyana* and their phenolic components. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 26, p. 182-192, 2018.

Yung PY, Grasso LL, Mohidin AF, Acerbi E, Hinks J, Seviour T, Marsili E, Lauro FM. Global transcriptomic responses of *Escherichia coli* K-12 to volatile organic compounds. **Scientific reports**, v. 6, 2016.

Zaitseva, O. O.; Polezhaeva, T. V.; Khudvakov, A. N.; Solomina, O. N.; Golovchenko, V. V. Application of Pectin from *Rauvolfia Serpentina* (L.) Benth to The Cryopreservation of Human Leucocyte Cell Suspensions. **Cryo letters**, v. 39, n. 1, p. 72-78, 2018.

Zangueu, C. B., Olounlade, A. P., Ossokomack, M., Djouatsa, Y. N. N., Alowanou, G. G., Azebaze, A. G. B.; Hounzangbe-Adote, M. S. In Vitro Effects of Aqueous Extract from *Maytenus Senegalensis* (Lam.) Exell Stem Bark On Egg Hatching, Larval Migration and Adult Worms of *Haemonchus contortus*. **BMC Veterinary Research**, v. 14, n. 1, p. 147, 2018.

Zengin G, Aumeeruddy-Elalfi Z, Mollica A, Yilmaz MA, Mahomoodally MF. *In vitro* and *in silico* perspectives on iological and phytochemical profile of three halophyte species - A source of innovative phytopharmaceuticals from nature. **Phytomedicine**, v. 38, p. 35-44, 2018.

Zhao H, Liu Q, Wang S, Dai F, Cheng X, Chen W, Zhang M, Chen D. In vitro additive antitumor effects of Dimethoxycurcumin and 5-fluorouracil in colon cancer cells. **Cancer medicine**, v. 6, n. 7, p. 1698-1706, 2017.

Zuo, L.; Otenbaker, N.P.; Rose, B.A.; Salisbury, K.S. Molecular Mechanisms of Reactive Oxygen Species-Related Pulmonary Inflammation and Asthma. **Mol. Immunol**, v. 56, p. 57–63, 2013.

Zuo, L.; Rose, B.A.; Roberts, W.J.; He, F.; Banes-Berceli, A.K. Molecular Characterization of Reactive Oxygen Species in Systemic and Pulmonary Hypertension. **Am j Hypertens**, v. 27, p; 643–650, 2014.

Zuo, L.; Zhou, T.; Pannell, B. K.; Ziegler, A. C.; Best, T. M. Biological and Physiological Role of Reactive Oxygen Species–The Good, The Bad and The Ugly. **Acta Physiologica**, v. 214, n. 3, p. 329-348, 2015.

Anexo A: Parecer do Comitê de Ética em Animais



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
Fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
Fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br

Recife, 27 de dezembro de 2016.

Ofício nº 134/16

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof.^a Cristiane Moutinho Lagos de Melo**

Departamento de Antibióticos

Centro de Biociências

Universidade Federal de Pernambuco

Processo nº **0048/2016**

Certificamos que a proposta intitulada “**Investigação imunológica e antitumoral de compostos naturais extraídos de plantas**”, registrada com o nº **0048/2016**, sob a responsabilidade de Prof.^a **Cristiane Moutinho Lagos de Melo** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 07/12/2016.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Até 01/2019
Espécie/linhagem/raça	Camundongos Swiss e BALB/c
Nº de animais	32
Peso/Idade	25-40g/ 60 dias
Sexo	Fêmeas

Origem	Biotério do Departamento de Antibióticos – CB/UFPE
--------	---

Atenciosamente,