

**ANÁLISE DAS ATIVIDADES ANTIVIRAL E IMUNOMODULADORA DE
EXTRATOS DA RESINA DE *PROTIUM* SP. POR INFEÇÃO *IN VITRO* DE
HEPATÓCITOS HUMANOS (Huh-7) PELO VÍRUS DENGUE**

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS – UEA
ESCOLA NORMAL SUPERIOR – ENS
LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

CRISTIANE NAZARÉ FIDELIS APARÍCIO

ANÁLISE DAS ATIVIDADES ANTIVIRAL E IMUNOMODULADORA DE EXTRATOS
DA RESINA DE *PROTIUM* SP. POR INFECÇÃO *IN VITRO* DE HEPATÓCITOS
HUMANOS (Huh-7) PELO VÍRUS DENGUE

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso Superior de
Licenciatura em Ciências Biológicas da
Universidade do Estado do Amazonas,
para obtenção do título de Licenciatura em
Ciências Biológicas

Orientador: Prof. Dr. Raimundo Sousa
Lima Junior

Coorientadora: Prof (a). Dra. Rosilene
Gomes da Silva Ferreira

Manaus – AM
2021

CRISTIANE NAZARÉ FIDELIS APARÍCIO

ANÁLISE DAS ATIVIDADES ANTIVIRAL E IMUNOMODULADORA DE EXTRATOS
DA RESINA DE *PROTIUM* SP. POR INFECÇÃO *IN VITRO* DE HEPATÓCITOS
HUMANOS (Huh-7) PELO VÍRUS DENGUE

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso Superior de
Licenciatura em Ciências Biológicas da
Universidade do Estado do Amazonas,
para obtenção do título de Licenciatura em
Ciências Biológicas

Data da aprovação: Manaus, _____ de _____ de 2021

BANCA EXAMINADORA

Prof^o Dr. Raimundo Sousa Lima Junior
Universidade do Estado do Amazonas

Prof^a Dra. Gladys Corrêa
Universidade do Estado do Amazonas

Msc. Andréia Costa Paz
Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a). **Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.**

A639a	<p>Aparício, Cristiane Nazaré Fidelis</p> <p>Análise das atividades antiviral e imunomoduladora de extratos da resina de <i>Protium</i> sp. por infecção <i>in vitro</i> de hepatócitos humanos (Huh-7) pelo vírus Dengue / Cristiane Nazaré Fidelis Aparício. Manaus : [s.n], 2021.</p> <p>29 f.: color.; 31 cm.</p> <p>TCC - Graduação em Ciências Biológicas - Licenciatura - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2021.</p> <p>Inclui bibliografia Orientador: Lima-Júnior, Raimundo Sousa Coorientador: Ferreira, Rosilene Gomes da Silva</p> <p>1. Produtos naturais. 2. Citotoxicidade. 3. Ensaio MTT. I. Lima-Júnior, Raimundo Sousa (Orient.). II. Ferreira, Rosilene Gomes da Silva (Coorient.). III. Universidade do Estado do Amazonas. IV. Análise das atividades antiviral e imunomoduladora de extratos da resina de <i>Protium</i> sp. por infecção <i>in vitro</i> de hepatócitos humanos (huh-7) pelo vírus Dengue</p>
-------	---

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer primeiramente a Deus pelo dom da vida e a oportunidade de vir seguindo no caminho do conhecimento.

Agradeço aos meus pais, Vanderly e Cristovão, educadores de formação que desde pequena me incentivaram a estudar, como também custearam grande parte dos meus estudos, e me apoiam a seguir esta profissão. Ao meu companheiro Jaime que vem me apoiando e seguindo ao meu lado nessa jornada dentro da Universidade e na vida. Agradeço aos meus avôs, Altamir Aparício, Nazaré e Álvaro Ribeiro (*in memoriam*) que são estrelas no céu que tenho certeza que torceram por este momento, e minha avó Florinda Lopes por todo o amor e serenidade nas suas palavras de conforto e sabedoria de vida. Ao meu irmão Vinicius Fidelis pelas ajudas recebidas durante a graduação e também na vida. E a todas as pessoas da minha família que sempre me apoiaram a seguir nos estudos.

Agradeço imensamente aos meus orientadores, prof. Dr. Raimundo Júnior e a prof^a Dra. Rosilene Gomes, que embarcaram junto a mim neste projeto, com dedicação e paciência, sou muito grata a tudo que pude aprender com eles, e por cederem o espaço no laboratório de Imunofarmacologia Celular da Escola Normal Superior para realização deste trabalho. Ao laboratório de fungos comestíveis e a Escola Superior de Ciências da Saúde pelo espaço para realização dos testes. E também às colegas de laboratório Débora Raposo e Aldiane Oliveira por contribuírem significativamente no decorrer dos experimentos e também pela amizade.

Aos meus amigos que conheci através da Universidade, Sandra Duque, Fabrício Pontes, Luana Cordeiro, e Jamile Araújo, e em especial, Bruna Kathlen que desde o primeiro dia de aula vem me acompanhando, muitas alegrias vividas, mas também frustrações, e superação que temos vivenciado até hoje.

E a todos que me ajudaram direto ou indiretamente ao longo de toda minha trajetória na vida acadêmica.

“Podemos escolher recuar em direção à segurança ou avançar em direção ao crescimento. A opção pelo crescimento tem que ser feita repetidas vezes. E o medo tem que ser superado.”
(Abraham Maslow)

RESUMO

A dengue é uma doença alarmante, que atinge principalmente países subdesenvolvidos, acometendo a população de baixa renda os quais se situam em lugares com saneamento básico precário. No Brasil a cada ano vem apresentando aumento no número de casos de dengue. Diante de todas as ações biológicas descritas e reconhecidas do *Protium* sp. e a busca por fármacos para a redução dos principais fatores envolvidos com a gravidade da dengue, propõe-se a investigação *in vitro* de extratos da resina de *Protium* sp. quanto a atividade antiviral e, principalmente, imunomoduladora em linhagem de hepatócitos Huh-7 pelo vírus DENV-2. Foram utilizados 3 extratos da resina de *Protium* sp., com métodos de maceração usando os seguintes solventes: hexano, acetato de etila e etanol. Diferentes concentrações desses extratos de *Protium* sp. foram avaliadas quanto à sua citotoxicidade na linhagem de hepatócitos humanos Huh-7 através de ensaios colorimétricos quantitativos MTT. Os resultados revelaram que apenas as concentrações de 50 µg/ml e 10 µg/ml dos extratos de *Protium* sp. obtidos por maceração não foram citotóxicas nos comprimentos de onda observados, já os extratos obtidos pelos solventes acetato de etila e etanol de *Protium* sp. foram consideradas tóxicas para os hepatócitos. As atividades antiviral e imunomoduladora não foram realizadas devido a pandemia de COVID-19 que paralisou parte das atividades acadêmicas. Somente os extratos hexanólicos obtidos por maceração mostram-se promissores para futuras análises de atividade antiviral e imunomoduladora contra DENV-2 através do teste de citotoxicidade, todavia, recomenda-se mais testes para indicar seus efeitos nas culturas celulares.

Palavras-chave: Produtos naturais; Citotoxicidade; ensaio MTT

ABSTRACT

Dengue is an alarming disease that affects mainly underdeveloped countries, affecting the low-income population who are located in places with poor basic sanitation. In Brazil every year has been showing an increase in the number of dengue cases. Given all the described and recognized biological actions of *Protium* sp. and the search for drugs to reduce the main factors involved with the severity of dengue, it is proposed the in vitro investigation of resin extracts of *Protium* sp. for antiviral and, mainly, immunomodulatory activity in Huh-7 hepatocytes by DENV-2 virus. Three extracts of *Protium* sp. resin were used, with maceration methods using the following solvents: hexane, ethyl acetate, and ethanol. Different concentrations of these extracts of *Protium* sp. were evaluated for their cytotoxicity in the Huh-7 human hepatocyte lineage by quantitative MTT colorimetric assays. The results revealed that only the concentrations of 50 µg/ml and 10 µg/ml of the extracts of *Protium* sp. obtained by maceration were not cytotoxic at the observed wavelengths, whereas the extracts obtained by the solvents of ethyl acetate and ethanol from *Protium* sp. were considered toxic to hepatocytes. Antiviral and immunomodulatory activities were not performed due to the COVID-19 pandemic that paralyzed part of academic activities. Only the hexane extracts obtained by maceration show promise for future analysis of antiviral and immunomodulatory activity against DENV-2 through the cytotoxicity test, however, further tests are recommended to indicate its effects in cell cultures.

Keywords: Natural products; Cytotoxicity; MTT test

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Resina de <i>Protium</i> sp. em pó.....	17
Figura 2: Extratos obtidos (copo) após a maceração com os solventes, respectivamente, Etanol, Acetato de etila e Hexano.....	17
Figura 3: Células Huh -7 em meio DMEM suplementado com SFB, antibiótico e antifúngico.....	18
Figura 4: Avaliação da atividade citotóxica de extratos da resina de <i>Protium</i> sp. em diferentes concentrações.....	21

LISTA DE ABREVIATURAS

AFUT = Fração alcalóide de *Uncaria tomentosa*

DENV = Vírus da Dengue

DENV-1 = Vírus da Dengue sorotipo 1

DENV-2 = Vírus da Dengue sorotipo 2

DENV-3 = Vírus da Dengue sorotipo 3

DENV-4 = Vírus da Dengue sorotipo 4

DMSO = Dimetilsulfóxido (do inglês Dimethyl sulfoxide)

DMEM = (do inglês Dulbecco`s modified Eagle`s médium)

ELISA = Ensaio de imunoabsorção enzimática ou Ensaio Imunoenzimático (do inglês: Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

IL-6 = Interleucina-6

IL-8 = Interleucina-8

IL-10 = Interleucina-10

IL-18 = Interleucina-18

INF- γ = Interferon-gama

Huh-7 = Linhagem celular de hepatocarcinoma humano (do inglês: hepatocarcinoma cell line)

MTT = (do inglês: 3-(4,5-dimethylthiazol- 2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)

MIF = Fator inibidor da migração de macrófagos (do inglês Factor Macrophage Migration Inhibitor)

NF- κ B= Factor nuclear kappa B (inglês Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)

RNA = Ácido ribonucleico (do inglês ribonucleic acid).

SFB = Soro fetal bovino

TNF- α = Fator de Necrose tumoral- T (do inglês tumor necrosis factor- α)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 Dengue	12
1.2 Resposta imunológica	13
1.3 Vacina da Dengue	13
1.4 Produtos naturais	14
1.5 <i>Protium</i> sp.	14
2 . OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo geral	16
2.2 Objetivos específicos	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 <i>Extratos</i> da resina de <i>Protium</i> sp.	17
3.2 Linhagem celular e DENV-2	17
3.3 Avaliação da atividade citotóxica	18
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4.1 Avaliação da atividade citotóxica	20
4.2 Atividade antiviral e imunomoduladora	23
5. CONCLUSÃO	24
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25

1. INTRODUÇÃO

1.1 Dengue

Atualmente a dengue é uma doença alarmante, que ocorre em vários países, principalmente países subdesenvolvidos, acometendo a população de baixa renda os quais se situam em lugares com saneamento básico precário. Segundo a Organização Mundial de Saúde (2021), estima-se que ocorra 100-400 milhões de infecções a cada ano em mais de 100 países endêmicos, logo essa doença é preocupante em todo o cenário mundial.

De acordo com Moreira (2017), o Brasil é um país que a cada ano vem apresentando aumento no número de casos de dengue. Dados dos primeiros meses (janeiro a abril) do ano de 2021 do Ministério da Saúde mostram que a região Centro-Oeste apresentou a maior incidência de dengue, com 249,4 casos/100 mil hab., seguida das regiões: Sul (123,3 casos/100 mil hab.), Sudeste (117,6 casos/100 mil hab.), Norte (115,2 casos/100 mil hab.) e Nordeste (41,7 casos/100 mil hab.) (BRASIL, 2021b).

O principal vetor da dengue é o mosquito da espécie *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1792), mas a doença pode ser transmitida pela espécie *Ae. albopictus* (Skuse, 1894) (KORSMAN et al., 2014). Os vírus são transmitidos aos seres humanos através das picadas de fêmeas de *Aedes* infectivo, que adquiriu principalmente enquanto se alimentava do sangue de uma pessoa infectada, porém, foram registrados casos de transmissão vertical (gestante - bebê) e por transfusão sanguínea (BRASIL, 2021a). Após o repasto sanguíneo, o vírus infecta o intestino médio do mosquito e, em seguida, se espalha para suas glândulas salivares durante um período de 8 a 12 dias, depois deste período de incubação, o vírus pode ser transmitido pela saliva do mosquito para outros seres humanos durante novos repastos sanguíneos (OMS, 2021).

Uma vez infectados, os humanos se tornam os principais portadores e multiplicadores do vírus Dengue, servindo como uma fonte do vírus para mosquitos não infectados (OMS, 2021). O vírus circula no sangue de uma pessoa infectada por 2-7 dias, aproximadamente ao mesmo tempo em que a pessoa desenvolve febre (OMS, 2021). Pacientes que já estão infectados com o vírus da dengue podem transmitir a infecção através do mosquito *Aedes* após o aparecimento dos primeiros sintomas (OMS, 2021).

Segundo o Ministério da Saúde (2021a) a dengue é uma doença febril aguda, que pode apresentar um amplo espectro clínico: enquanto a maioria dos pacientes se recupera após evolução clínica leve e autolimitada, uma pequena parte progride para doença grave. A infecção por Dengue pode ser assintomática ou causar doença cujo espectro inclui desde formas

oligossintomáticas até quadros graves com choque com ou sem hemorragia, podendo evoluir para o óbito (BRASIL, 2021a)

A dengue é uma arbovirose humana, febril e aguda, causada pela infecção por um dos quatro sorotipos intimamente relacionados de vírus Dengue: DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4; esse vírus pertence à família Flaviviridae, gênero *Flavivirus* (KORSMAN et al., 2014). São dotados de um RNA de fita simples que é revestido por um capsídeo proteico de forma icosaédrica, possuem no seu genoma viral três proteínas estruturais: capsídeo (C); proteína da membrana (M), glicoproteína do envelope (E) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4 e NS5) (SINGHI et al., 2007). As partículas entram na célula hospedeira por endocitose mediada por receptor com o RNA do vírus (VANDERLEI, 2012; KORSMAN et al., 2014). A replicação viral ocorre com ajuda de cada uma de suas proteínas e acontece nas células retículo-endoteliais, células de Langerhans, ou em fibroblastos (KORSMAN et al., 2014). Após se replicarem nestas células, os vírus provavelmente atingem os linfonodos através das células dendríticas e se difundem pelo sangue, podendo infectar os leucócitos do sangue periférico, fígado, baço, linfonodos, medula óssea, coração, rins, estômago, pulmões, podendo ser detectados juntamente com o início dos sintomas (SINGHI et al., 2007).

1.2 Resposta imunológica

A interação antígeno e anticorpos faz produzir diversas citocinas e outros fatores. As citocinas são proteínas solúveis e funcionam como mensageiro químico para regular a resposta inata (DELVES; ROITT, 2000) e podem exercer efeitos sinérgicos (GREEN; ROTHMAN, 2006). E os fatores tais como TNF- α , IL6, INF- γ , IL18, IL-10, IL-8 (SRIKIATKHACHORN; GREEN, 2010). As citocinas e os fatores podem promover ativação plaquetária e endotelial, resultando em trombocitopenia, permeabilidade vascular, hipotensão e choque, relacionados aos casos graves (FINK; GU; VASUDEVAN, 2006). As citocinas da superfamília do TNF usam seus efeitos através da ativação de fatores de transcrição, incluindo NF- κ B, que termina em processos apoptóticos e/ou proliferação celular (KARIN; LIN, 2002).

1.3 Vacina da Dengue

Até o momento a Dengvaxia® (CYD-TDV) consiste na primeira vacina licenciada em alguns países endêmicos, no qual teve seu registro concedido pela Anvisa no Brasil em dezembro de 2015 (GODÓI, 2018), para seu uso é necessário algumas recomendações, e se mostra pouco eficaz contra os quatro sorotipos, nem tampouco uma específica para o controle

da dengue no uso clínico ou uma terapia antiviral efetiva no controle da dengue, a única terapia é a reposição de fluidos e o uso de antipiréticos (HASAN et al., 2016)

1.4 Produtos naturais

Os produtos naturais oferecem vantagens na busca por moduladores de funções biológicas específicas e potentes, assim como novas drogas (HONG, 2011; KOISHI, 2014). Produtos esses que têm sido uma alternativa eficiente, são economicamente viáveis e biodegradáveis (ESTEVAM, 2017); os quais podem causar menos efeitos colaterais do que medicamentos sintéticos. Matérias-primas derivadas das plantas apresentam várias propriedades terapêuticas, além de ser de baixo custo e maior benefício para a população (CARTAXO-FURTADO et al., 2015). Desse modo o gênero *Protium* sp. pode ser uma alternativa para o combate ao vírus Dengue.

1.5 *Protium* sp.

Protium Burm. f. é um gênero pantropical com cerca de 146 espécies, muitas dessas espécies estão na floresta amazônica, considerada a maior floresta do mundo com 7 milhões de km² (SALATI et al.; 1998), onde ocorrem 73 espécies de *Protium* das quais 72 são endêmicas na região (DALY, 1992). Conhecida como “breu branco”, denominação utilizada para várias outras espécies de *Protium* na região, a resina exsudada das árvores após exposição, é coletada para uso próprio ou para comercialização em centros urbanos. (LIMA et al., 2016). São pertencentes à família Burseraceae, cujas árvores, raramente arbustos, possuem óleos essenciais aromáticos e resina na casca (FERNANDEZ, 2008).

Protium sp. possui taxonomia confusa, marcada por sinonímias e o uso de caracteres taxonômicos pouco relevantes, e sua determinação no campo complexa, pois suas flores são pequenas e pouco visíveis, tornando apenas os caracteres vegetativos diagnósticos (FERNANDEZ, 2008). A primeira descrição de *Protium* foi uma espécie denominada *Amyris protium* em 1767 por Linnaeus, e que no ano seguinte foi descrita por Burmann como *Protium javanicum*, logo o gênero apresenta diversas denominações (DALY, 1987).

Muitas espécies desse gênero são usadas no âmbito econômico, um dos seus usos é a madeira para diversos fins. Segundo Loureiro et al. (1997) a espécie *Protium tenuifolium* é uma madeira de fácil processamento, utilizada na produção de móveis, acabamentos internos, brinquedos e chapas de compensado. Outro uso, relacionado às culturas locais é o uso da resina *in natura* ou manufaturada vendida na forma de incenso no mercado de produtos espirituais e místicos, muito usada na defumação de ambientes em rituais e cerimônias de diversas religiões

(FERNANDEZ, 2008). A resina também é utilizada para iluminação e para calafetar canoas, além do uso no preparo da tinta ou verniz preto (FERNANDEZ, 2008).

A resina é secretada naturalmente, ou através de injúrias, pelo tronco da árvore e em alguns casos é possível encontrar alguns quilos de resina aderida ao tronco (FERNANDEZ, 2008). Assim que a resina entra em contato com o ar começa a endurecer, formando pelotas que se desprendem com facilidade (PLOWDEN, 2001). De acordo com Fernandez (2008) essa resina e os óleos essenciais obtidos da casca, madeira e folhas são utilizadas na medicina popular, podendo ser empregado em distúrbios gástricos, do sistema nervoso e respiratório (CORRÊA, 1984; LORENZI, 1998; LORENZI; MATOS, 2002).

Muitas espécies desse gênero têm atividades farmacológicas descritas, como antimalarial e antiinflamatória provindas de óleos essenciais obtidas da resina e folhas de várias espécies (DEHARO et al., 2001; SIANI et al., 1999). Algumas pesquisas indicam seu uso para tratamento de doenças esplênicas e sífilis (FERNANDEZ, 2008), outras reconhecem alguns de seus constituintes com atividade antiinflamatória (MORAES et al., 2013, SIANI et al., 2004; LIMA et al., 2005) antinociceptiva, (OTUKI et al., 2005, SIANI et al., 2011), cercaricida (FRISCHKORN et al., 1978), atividade antiparasitária frente ao *T. cruzi* (ESTEVAM, 2017), e acaricida (MORAES et al., 2013). A resina da espécie *Protium ovatum* possui propriedades imunoestimulantes e anticancerígenas relatadas em vários estudos (SIANI et al., 2011).

Um estudo realizado com a mistura de α , β -amirerona de *Protium* sp. demonstrou ser eficaz no tratamento das alterações metabólicas induzidas pelo aumento da adiposidade, com possível potencial hipoglicemiante e hipolipemiante, ou mesmo como agente nutracêutico para o tratamento de alterações metabólicas associadas à obesidade (FERREIRA, 2017).

Diante de todas as ações biológicas descritas e reconhecidas do *Protium* sp. e a busca por fármacos para a redução dos principais fatores envolvidos com a gravidade da Dengue, propõe-se a investigação *in vitro* de extratos da resina de *Protium* sp. quanto a atividade antiviral e, principalmente, imunomoduladora em linhagem de hepatócitos Huh-7 pelo DENV-2.

2 . OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar as possíveis atividade antiviral e imunomoduladora de extratos da resina de *Protium* sp. em linhagem de hepatócitos infectados pelo vírus DENV-2.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade dos extratos da resina de *Protium* sp. na cultura de hepatócitos (Huh-7);
- Avaliar a atividade imunomoduladora dos extratos da resina de *Protium* sp, por meio de Ensaio Imunoenzimático (ELISA), com a finalidade de dosar as citocinas MIF e IL-8 nos sobrenadantes de Huh-7 infectadas pelo DENV-2;
- Avaliar a atividade antiviral de *Protium* sp. através da dosagem por ELISA do antígeno viral NS1 nos sobrenadantes de Huh-7 infectadas pelo DENV-2.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Extratos da resina de *Protium* sp.

Os extratos foram obtidos pelo método de maceração no Laboratório de Imunofarmacologia Celular - LIFCEL da Escola Normal Superior - ENS da UEA. O procedimento consistiu em pesar 10 gramas da resina de *Protium* sp. em pó (Figura 1) e ficaram no frasco de vidro âmbar juntamente com 30 ml de solvente hexano, acetato de etila e etanol, e ficou reservado por 7 dias (FERREIRA, 2017). Após este período o material foi filtrado, obtendo-se o extrato (Figura 2).

Figura 1: Resina de *Protium* sp. em pó



Fonte: Arquivo pessoal

Figura 2: Extratos obtidos (copo) após a maceração com os solventes, respectivamente, Etanol, Acetato de etila e Hexano



Fonte: Arquivo pessoal

Para a diluição dos extratos, foi usado 900 μ l meio de cultura RPMI 1640 (Gibco) e 100 μ l de DMSO em um microtubo de 1,5 ml mais 10 mg do extrato obtido por maceração para cada solvente utilizado. A partir das diluições, foram preparadas soluções estoques nas concentrações de 10 mg, 1 mg e 100 μ g com um volume final de 50 μ L, armazenados em microtubos (600 μ L) e guardadas a -20°C.

3.2 Linhagem celular e DENV-2

Os ensaios celulares também foram realizados no Laboratório de Imunofarmacologia Celular da Escola Normal Superior – ENS da UEA. A linhagem celular de hepatócitos (Huh-7) e as alíquotas do DENV-2 foram gentilmente cedidas pela Dra. Claire Fernandes Kubelka, do

Laboratório de Imunologia Viral da FIOCRUZ-RJ. As células Huh-7 foram cultivadas em frascos de cultura (25 cm²) com 10 ml de meio de cultura DMEM (Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 2 mM de L-glutamina, 100 µg/ml de estreptomicina e 100U/ml de Penicilina e 0,5 µg/ml de anfotericina B (fungizona), em estufa com 37 °C e 5% de CO₂ (Figura 3). A multiplicação celular foi acompanhada diariamente com auxílio de microscópio invertido de contraste de fase (Motic AE31). Uma vez observada a formação de uma monocamada confluyente, os hepatócitos eram passados para novas garrafas (expansão celular) com auxílio de Tripsina-EDTA, seguido de centrifugação a 250 g por 5 minutos. Após a centrifugação, o *pellet* formado era ressuspensão em meio fresco suplementado e depois transferido para novos frascos de 25 cm². Quando necessário, a partir do procedimento anterior foi separado 200 µl de células mais 700 µl de meio de cultura DMEM acrescido de 900 µl de solução de congelamento (20% de dimetilsulfóxido e 80% de SFB), os criotubos contendo as células, foram armazenados numa temperatura inicial de -80 °C para manter um estoque das células Huh-7.

Figura 3: Células Huh -7 em meio DMEM suplementado com SFB, antibiótico e antifúngico



Fonte: Arquivo pessoal

3.3 Avaliação da atividade citotóxica

Os extratos da resina de *Protium* sp. foram avaliados quanto à sua citotoxicidade nas Huh-7 através de ensaios colorimétricos quantitativo de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)diphenyl tetrazolium bromide) (MOSMANN, 1983).

O MTT é um sal hidrossolúvel que tem sua estrutura molecular em forma de anel, e é clivado por uma enzima mitocondrial, a desidrogenase succínica, dando origem aos cristais de Formazan de coloração violeta (LIMA-JUNIOR, 2013). Este sal é armazenado no citoplasma

celular e solubilizado após adição de dimetilsulfóxido (DMSO) ocorrendo formação de um produto de coloração roxa, cuja intensidade de cor é lida em espectrofotômetro a 540 nm, de modo que, a absorbância obtida é diretamente proporcional à viabilidade celular (MOSMANN, 1983). Para cálculo da taxa foi usada a média normalizada das porcentagens dos poços controle (REIS et al., 2007; LIMA-JUNIOR et al., 2013; MELLO et al., 2017), sendo assim, a linha vermelha horizontal indica 90% da produção de sal de formazam, quando está abaixo de 90% (Figura 4) o extrato é considerado tóxico, e acima de 90% não é tóxico.

Para tal, foi realizada a contagem das células em Câmara de Neubauer e a suspensão celular foi distribuída em 1 placa de 96 poços junto ao meio de cultura (DMEM, mais 10% SFB, 1% de antibiótico e antifúngico), numa concentração de 10^5 células por poço. A placa foi armazenada em estufa (37 °C e 5% de CO₂) por 48h, período necessário para formação da monocamada. Após esse período, o sobrenadante foi retirado, em seguida, foi adicionado 200 µl de meio de cultura fresco com 3% de SFB em cada poço, sendo que em alguns poços as células Huh-7 foram tratadas com diferentes concentrações dos extratos da resina de *Protium* sp. (100 µg/ml, 50 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml e 0,1 µg/ml) para cada solvente usado. Para o controle positivo foi utilizado apenas as células Huh-7, e controle negativo, apenas a adição de MTT, como também, o controle DMSO nas mesmas concentrações que foram utilizados os extratos.

Após 48h, com os extratos, o possível efeito citotóxico das diferentes concentrações dos extratos de *Protium* sp. sobre a linhagem Huh-7 foi determinado utilizando método o MTT (Molecular Probes cat. # M-6494), de acordo com as recomendações do fabricante. A leitura das densidades ópticas de cada placa foi realizada no espectrofotômetro de placas, nos comprimentos de onda de 540-620 nm. Este procedimento foi feito no Laboratório de Virologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA e na Escola Superior de Ciências da Saúde (ESA/UEA). Os dados foram analisados no programa GraphPad Prism 4.0.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação da atividade citotóxica

Dos extratos de *Protium* sp. obtidos por maceração, com o solvente hexano, apenas as concentrações de 50 µg/ml e 10 µg/ml não foram citotóxicas (Figura 4A) nos comprimentos de onda observados. Nos estudos de Mello (2015) utilizando extratos brutos das cascas do caule de *Uncaria* sp. os tratamentos de 50 µg/ml e 10 µg/ml também não foram tóxicos para as células Huh-7. O ensaio de citotoxicidade *in vitro* é o primeiro teste que avalia a toxicidade de qualquer material, e somente depois de comprovada sua não toxicidade a pesquisa deve ter seguimento (ROGERO et al., 2003), portanto, usar culturas celulares são eficazes para determinar a citotoxicidade dos extratos vegetais e para o estudo das relações parasita-hospedeiro (FLINT et al. 2004). Esses extratos devem apresentar-se o mínimo citotóxico possível e se possível interferir apenas nos processos moleculares dos vírus, sem afetar os processos metabólicos celulares (GUTIÉRREZ, 2002).

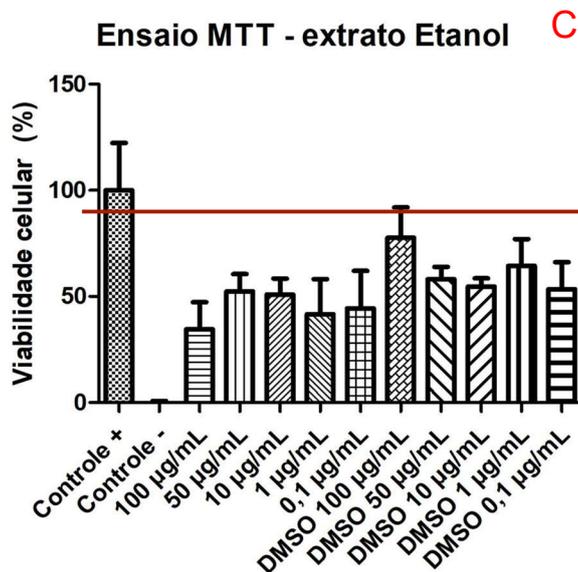
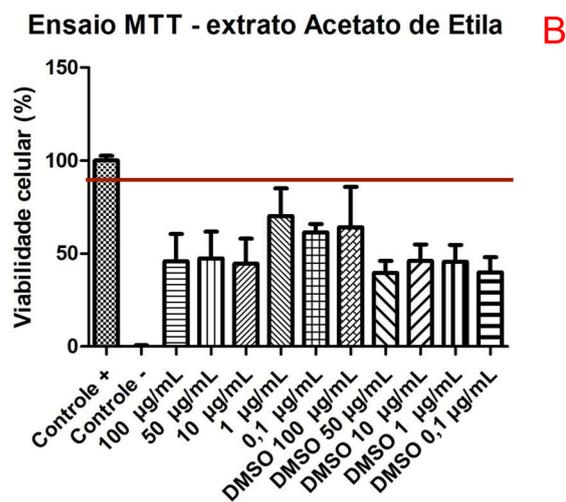
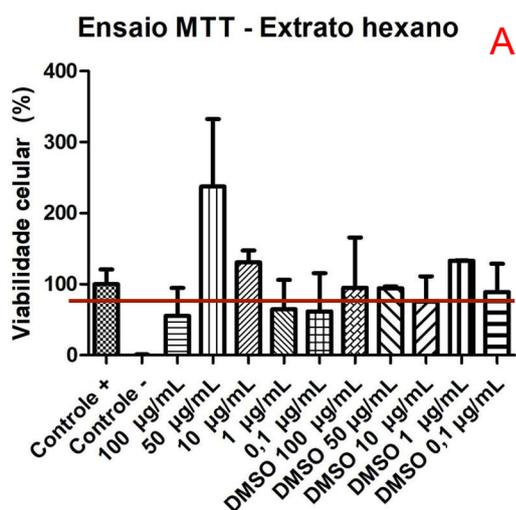
O fígado é composto principalmente por hepatócitos (80%), incluindo outros tipos celulares como as células de Kupffer, endoteliais, estreladas e biliares (MELLO, 2015). A linhagem Huh-7, Células de Hepatocarcinoma Humano, foi determinada a partir do tumor hepático de um paciente masculino japonês de 57 anos (NAKABAYASHI, 1982), a utilização desta linhagem objetiva não só mimetizar o ambiente hepático de pacientes quando infectados, mas também investigar as interações que ocorram entre o vírus e a célula do hospedeiro (MELLO, 2015).

Oliveira (2020) aplicando extratos de *Aspergillus giganteus* nas concentrações de 100 µg/ml, 50 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml e 0,1 µg/ml nas células Huh-7 com ensaio colorimétrico MTT, verificou que nenhuma das concentrações foram tóxicas na linhagem Huh-7. Lima-Junior (2013) observou a fração alcalóide de *Uncaria tomentosa* (AFUT) na linhagem Huh-7 nas concentrações: 1, 10, 50 e 100 µg/ml, quanto à citotoxicidade através do ensaio de MTT. Somente a concentração de 100 µg/ml de AFUT foi considerada citotóxica.

Os extratos obtidos com os solventes acetato de etila e etanol foram tóxicos em todas as concentrações de extratos usados nos hepatócitos (Figura 4 B e C). Esses dados estão de acordo com o estudo realizado com extrato etanólico macerado a frio de boldo do Chile (*Pneumus boldus*), o qual se mostrou mais citotóxico em linhagem celular MDBK, em relação ao extrato aquoso (KAZIYAMA, 2012), o que pode estar relacionado a extração de substâncias menos polares, diferentes das encontradas nos extratos aquosos, e talvez mais tóxicas ou ainda pela presença residual de etanol utilizado durante a obtenção do extrato (KAZIYAMA, 2012), nesse

sentido, pode ser considerado nesta pesquisa sobre a atividade citotóxica frente às Huh-7 dos extratos etanólicos.

Figura 4 A, B e C: Avaliação da viabilidade celular de extratos da resina de *Protium* sp. em diferentes concentrações pelo método MTT. Os dados foram normalizados utilizando-se como referência o controle positivo de células sem o tratamento e o controle negativo apenas com o MTT. Cada gráfico representa a média de 3 experimentos independentes em quadruplicata.



Os solventes utilizados possuem polaridade crescente: hexano, acetato de etila e etanol, logo, os extratos hexanólicos possuem baixa polaridade em relação aos extratos etanólicos e

acetato de etila, sendo que foi o único a apresentar não atividade citotóxica na linhagem Huh-7. A técnica da maceração seguida da filtração permite a separação dos componentes estruturais da planta e a extração dos compostos orgânicos que conferem diversas funções no vegetal (INOUE, 2014). O extrato de etanol por apresentar alta polaridade permite a extração dos glicosídeos presentes nas flores, enquanto os solventes extratores de menor polaridade realizam a extração das geninas, resultando em um maior rendimento para o extrato etanólico quando comparado aos demais (INOUE, 2014).

Estevam (2017) avaliando a atividade citotóxica do óleo essencial de frutos verdes de *Protium ovatum* encontrado no cerrado brasileiro, localizado na região Centro-Oeste do país, possui moderada citotoxicidade em relação às células de fibroblastos de mamífero LLCMK2, cujo método usado foi colorimétrico MTT, essas culturas de células foram tratadas com óleo essencial nas concentrações de 6,25; 12,5; 25,0; 50,0; 100; 200 e 400 $\mu\text{g ml}^{-1}$ durante 24 h (ESTEVAM, 2017).

Divergindo com a citotoxicidade dos extratos etanólicos e do acetato de etila, Almeida (2013) observou que compostos triterpênicos testados de *Protium paniculatum* não apresentaram redução significativa na viabilidade de macrófagos murino J774, com exceção do triterpeno breína/maniladiol que apresentou potencial citotóxico moderado.

Os testes de citotoxicidade por MTT são utilizados em pesquisas para avaliar a atividade antitumoral *in vitro*. Uma das aplicações de substâncias obtidas de produtos naturais e de seus derivados é sua utilização no tratamento de câncer (RUDIGER, 2012), uma vez que, os extratos, inibem a atividade metabólica dessas células. Rudiger (2012) avaliou a atividade antitumoral de algumas espécies de *Protium* contra as linhagens de células cancerígenas HCT-8 (côlon humano), MDA/MB-435 (melanoma de mama humano) e SF-295 (glioblastoma humano) pelo método do MTT. Os solventes usados para obtenção dos extratos, foram o hexano e acetato de etila da oleorresina de *Protium* sp. numa concentração única de 50 $\mu\text{g/ml}$ (RUDIGER, 2012). Os ensaios demonstraram que os extratos em hexano de *Protium nitidifolium* e *Protium cf. rubrum* apresentaram alta atividade contra a linhagem HCT-8; *Protium cf. rubrum*, contra a linhagem SF-295 (RUDIGER, 2012). Estes resultados contrapõem com os resultados das linhagens Huh-7, pois a concentração de 50 $\mu\text{g/ml}$ não apresentou atividade citotóxica. Para amostras obtidas em acetato de etila (maior polaridade), a alta atividade antitumoral se deu em *Protium apiculatum* e *Protium giganteum var giganteum* para linhagem HCT-8 e *Protium giganteum var giganteum*, também foi tóxico para MDA/MB-435 (RUDIGER, 2012), coincidindo com os resultados da citotoxicidade nas células Huh-7 por solvente acetato de etila.

4.2 Atividade antiviral e imunomoduladora

Os testes da atividade antiviral e atividade imunomoduladora com os extratos obtidos por maceração de *Protium* sp. não foram realizados devido à pandemia do COVID-19, que paralisou as atividades acadêmicas e contratempos nas culturas celulares disponíveis.

5. CONCLUSÃO

Somente os extratos hexanólicos obtidos por maceração nas concentrações de 50 µg/ml e 10 µg/ml não foram citotóxicas nas culturas de hepatócitos (Huh-7), portanto, mostra-se promissor para futuras análises de atividade antiviral e imunomoduladora contra o DENV -2, todavia, recomenda-se mais testes biológicos para indicar seus efeitos nas culturas celulares, como também, outras possíveis atividades farmacológicas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, P. D. O. **Avaliação da atividade anti-inflamatória de triterpenos isolados de óleo-resinas de *Protium paniculatum* Engler (Burseraceae)**. 2013. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Dengue: causas, sintomas, tratamento e prevenção**. 2021a. Disponível em <https://antigo.saude.gov.br/saude-de-a-z/dengue> . Acesso em: 01 junho 2021.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas causados por vírus transmitidos pelo mosquito *Aedes* (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 16, 2021 . **Boletim Epidemiológico**, v. 52, nº 16. 2021b.

CARTAXO-FURTADO, N.A.D.E.O.; SAMPAIO, T.O.; XAVIER, M.A.; MEDEIROS, A.D.D.E.; PEREIRA, J.V. Perfil fitoquímico e determinação da atividade antimicrobiana de *Syzygium cumini* (L.) Skeels (Myrtaceae) frente a microrganismos bucais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v.17, n.4, supl. III, p.1091-1096, 2015. https://doi.org/10.1590/1983-084X/14_153.

CEBALLOS-OLVERA, I.; CHAVEZ-SALINAS, S.; MEDINA, F.; LUDERT, J. E.; DEL ANGEL, R. M. JNK phosphorylation, induced during dengue virus infection, is important for viral infection and requires the presence of cholesterol. **Virology**. 396(1):30-6, 2010.

CHEN, L.C; LEI, H.Y.; LIU, C.C.; SHIESH, S.C.; CHEN, S.H.; LIU, H.S.; LIN, Y.S.; WANG, S.T.; SHYU, H.W.; YEH, T.M. Correlation of serum levels of macrophage migration inhibitory fator with disease severity and clinical outcome in dengue patients. **The American jornal of tropical medicine and hygiene**, 74, 142-147. 2006.

CHUANG, Y. C.; CHEN, H. R.; YEH, T. M. Pathogenic Roles of Macrophage Migration Inhibitory Factor during Dengue Virus Infection. **Mediators of Inflammation**, vol. 2015, Article ID 547094, 7 pages, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/547094>

CORRÊA, P. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**. Rio de Janeiro, Brasil: Ministério da Agricultura, v.1. 1984.

DALY, D.C. New taxa and combinations in *Protium* Burm. F. Studies in neotropical Burseraceae VI. **Brittonia**, v. 44, 280-299, 1992.

DALY, D. C. **A Taxonomic Revision of *Protium* (Burseraceae) in Eastern Amazonia and the Guianas**. City University of New York New York, 1987.

DEHARO, E.; BOURDY, G.; QUENEVO, C.; MUÑOZ, V.; RUIZ G. ; SAUVAIN, M. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part V: Evolution of antimalarial activity of plants used by Tacana Indians. **Jornal of Ethnopharmacology**, v. 77, p. 91-98, 2001.

DELVES, P. J.; ROITT, I. M. The immune system. First of two parts. **The New England Journal of Medicine**. 2000;343(1):37-49. Epub 07.07.2000.

ESTEVAM, E. B. B. **Composição química e atividades biológicas do óleo essencial das folhas de *Citrus limonia* e *Citrus latifolia* e dos frutos verdes e folhas de *Protium ovatum*.** 2017. 90 f. Dissertação (Mestrado em agroquímica) - Instituto Federal Goiano, Rio Verde, 2017

FERNANDEZ, M.H. **Anatomia, morfologia e identificação de espécies de *Protium burm. f.* (Burseraceae) na reserva de desenvolvimento sustentável Tupé, Manaus, AM.** 2008. 90f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2008.

FERREIRA, R. G. S. **Obtenção da mistura triterpênica de α,β - amirenona e avaliação de seus efeitos hipolipemiante, hipoglicemiante e antiobesidade.** 2017. 111 f. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal - BIONORTE) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2017.

FINK, J.; GU, F.; VASUDEVAN, S.G. Role of T cells, cytokines and antibody in dengue fever and dengue haemorrhagic fever. **Reviews in Medical Virology.** 2006;16(4):263-75. Epub 2006/06/23

FLINT, S.J. et al. Prevention and control of viral diseases. In: FLINT, S.J. et al. (Eds.). **Principles of Virology.** 2.ed. Washington: ASM Press, 2004.

FRISCHKORN, C. G.; FRISCHKORN, H. E.; CARRAZZONI, E. Cercaricidal activity of some essential oils of plants from Brazil. **The Science of Nature - Naturwissenschaften,** v.65, p.480-883. 1978

GODÓI, I.P. **Avaliação econômica de uma vacina da dengue no Brasil baseado em seu valor terapêutico no sistema único de saúde.** 2018, 190f. Tese (Doutorado em Medicamentos e Assistência Farmacêutica) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2018.

GREEN, S.; ROTHMAN, A. Immunopathological mechanisms in dengue and dengue hemorrhagic fever. **Current Opinion in infectious diseases.** 2006;19(5):429-36. Epub 2006/08/31.

GUTIÉRREZ, R.M.P. Compuestos com actividad antiviral. In: GUTIÉRREZ, R.M.P. (Ed.). **Compuestos aislados de plantas con actividad antiinflamatoria, antiviral e hipogluceante.** México: Instituto Politécnico Nacional, 2002. p.79-119.

HASAN, S.; JAMDAR, S.F.; ALALOWI, M.; AL AGEEL AL BEAJI, S.M. 2016. Dengue virus: A global human threat: Review of literature. **Journal of International Society of Preventive and Community Dentistry.** 2016 Jan-Feb;6(1):1-6. doi: 10.4103/2231-0762.175416

HONG, J. Role of natural product diversity in chemical biology. **Current Opinion in Chemical Biology,** v. 15, n. 3, p. 350–4, 2011.

INOUE, F. A. **Avaliação de atividade biológicas e estudo fitoquímico de extrato de flores de *Senna macranthera*.** 2014, 70f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014.

KAZIYAMA, V.M.; FERNANDES, M.J.B.; SIMONI, I.C. **Atividade antiviral de extratos de plantas medicinais disponíveis comercialmente frente aos herpesvírus suíno e bovino.** Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, v.14, n.3, p.522-528, 2012.

KARIN, M.; LIN, A. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nature immunology*. 2002;3(3):221-7. Epub 05.03.2002.

KOISHI, A. C.. **Caracterização do efeito de substâncias naturais extraídas de macroalgas marinhas e de um painel de substâncias sintéticas na inibição da infecção pelo vírus da dengue em modelo in vitro.** 2014. 129f. Tese (doutorado em biologia Celular e Molecular) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

KORSMAN, S. N.J.; ZYL, G. U.V.; NUTT, L.; ANDERSSON, M. I.; PREISER, W. **Virologia.** Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

LIMA, F. V.; MALHEIROS, A.; OTUKI, M. F.; CALIXTO, J. B.; YUNES, R. A.; FILHO, V. C.; MONACHE, F. D. Three new triterpenes from the resinous bark of *Protium kleinii* and their antinociceptive activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.16, n.3b, p.578-572. 2005.

LIMA, T. A. A. C.; RIBEIRO, J. E. L.S.; MARQUES, M. O.M.; FACANALI, R.; LIMA, M. P. Estímulo para produção de resina em *Protium hebetatum* Daly e avaliação dos constituintes químicos voláteis. **Scientia Amazonia**, v. 5, n.3, 21-24, 2016. ISSN:2238.1910

LIMA-JÚNIOR, R.S. **Efeito antiviral, imunomodulador e atenuante da permeabilidade endotelial de uma fração alcaloide de *Uncaria tomentosa* em células infectadas pelo DENV-2.** 2013. 117f. Tese (Doutorado em Biologia Parasitária) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, 2013.

LIMA-JÚNIOR, R.S; MELLO, C.S.; SIANI, A.C.; VALENTE, L.M.M.; KUBELKA, C.F. *Uncaria tomentosa* alkaloidal fraction reduces paracellular permeability, IL-8 and NS1 production on human microvascular endothelial cells infected with dengue vírus. **Natural Product Communications**, 8, 1547-1550. 2013.

LORENZI, H. E F. J. A. Matos. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas.** Nova Odessa, São Paulo: Plantarum, v.1. 2002

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil.** Nova Odessa, São Paulo: Plantarum, v.1. 1998

LOUREIRO, A. A.; FREITAS, J. A. D.; FREITAS, C. A. A. D. **Essências Madeireiras da Amazônia.** Manaus: MCT/INPA-CPPF, v.3. 1997

MELLO, C. da S. **Atividade antiviral e imunomoduladora de extratos originados de *Uncaria sp.* em infecção in vitro de linhagem contínua de hepatócitos humanos pelo vírus Dengue.** 2015. 119f. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, 2015

MELLO, C. S. et al. Decrease in Dengue virus-2 infection and reduction of cytokine/chemokine production by *Uncaria guianensis* in human hepatocyte cell line Huh-7. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 6, p. 458-468, 2017

MORAES, M.M.; CAMARA, C. A. G.; RAMOS, C. S. Seasonal variation in the essential oil of *Protium bahianum* Daly (Burseraceae). **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, Abingdon U.A.E, v.16, p. 300-307, 2013.

MOREIRA, P. S. **Avaliação da atividade antiviral de extratos obtidos da folha e fruto de *Morinda citrifolia* contra vírus dengue**. 2017. 63f. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária) - Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2017. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Programa de Pós Graduação em Biologia Parasitária Natal, 2017.

MOSMANN, T. Rapid calorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological**, 65, 55-63. 1983.

NAKABAYASHI, H.; TAKETA, K.; MIYANO, K.; YAMANE, T.; SATO, J. Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. **Cancer research**. 1982;42(9):3858-63. Epub 1982/09/01.

OLIVEIRA, A.P. **Avaliação da atividade antimicrobiana e antiviral de *Aspergillus* spp**. 2020. 91f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia) - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2020

OMS. Organização Mundial de Saúde. Dengue e dengue grave. 2021. Disponível em https://www.who.int/health-topics/dengue-and-severe-dengue#tab=tab_1. Acesso em 20 jun 2021.

OTUKI, M. F.; VIEIRA-LIMA, F.; MALHEIROS, A.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Topical anti-inflammatory effects of the ether extract from *Protium kleinii* and [alpha]-amyirin pentacyclic triterpene. **European Journal of Pharmacology**, v.507, n.1-3, p.253-259.2005.

PLOWDEN, J. C. **The Ecology, Management and Marketing of Non-Timber Forest Products in the Alto Rio Guamá Indigenous Reserve (Eastern Brazilian Amazon)**. Ecology, The Pennsylvania State University, 2001.

REIS, S.R.; SAMPAIO, A.L.; HENRIQUES, M.; GANDINI, M.; AZEREDO, E.L.; KUBELKA, C.F. An in vitro model for dengue virus infection that exhibits human monocyte infection, multiple cytokine production and dexamethasone immunomodulation. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, Vol. 102(8): 983-990, December, 2007.

ROGERO, S.O.; LUGÃO, A.B.; IKEDA, T.I.; CRUZ, A.S. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**. Vol. 6, No. 3, 317-320, 2003.

RUDIGER, A. L. **Estudo fitoquímico e citotóxico de oleorresinas de Burseraceae**. 2012. 244 f. Tese (Doutorado em Química) — Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2012

SALATI, E.; SANTOS, A. A.; LOVEJOY, T. E.; KLABIN, E. I. **Porque salvar a floresta amazônica**. Manaus: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. 1998.

SIANI, A. C.; GARRIDO, I. S.; MONTEIRO S. S.; CARVALHO E. S.; RAMOS M. F. S. *Protium icicariba* as a source of volatile essences. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.32, n.5, p.477-489. 2004.

SIANI, A. C.; RAMOS, M. F. S. LIMA JR., O.M.; SANTOS, R.R.; FERREIRA, E. F.; SOARES, R. O. A.; ROSAS, E. C.; SUSUNAGA, G.S; GUIMARÃES, A. C.; ZOGHBI, M. G. B.; HENRIQUES, M. G. M. O. Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of *Protium*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, p. 57-69, 1999

SIANI, A. C.; RAMOS, M. F.; MONTEIRO, S. S.; DOS SANTOS, R. R.; SOARES, R. O. A. Essential oils of the oleoresins from *Protium heptaphyllum* growing in the Brazilian southeastern and their cytotoxicity to neoplastic cell lines. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, Abingdon U.A.E, v.14, p. 373 378, 2011.

SRIKIATKHACHORN, A.; GREEN, S. Markers of dengue disease severity. **Current Topics in Microbiology and Immunology**. 2010;338:67-82. Epub 2009/10/06.

SINGHI, S.; KISSOON, N.; BANSAL, A. Dengue e dengue hemorrágico: aspectos do manejo na unidade de terapia intensiva - ARTIGO DE REVISÃO - **Jornal de Pediatria**, volume 83, maio, Porto Alegre. 2007.

VANDERLEI, E. D. S. O. **Atividades antiviral e anti-inflamatória de uma fração Polissacarídica sulfatada da alga marinha vermelha *Gracilaria birdiae* (plastino e oliveira)**. 2012. 141f. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Centro de ciências, Departamento de bioquímica e biologia molecular, Universidade federal do ceará, Fortaleza, 2012.