

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
CURSO DE FARMÁCIA

LENIVALDO JORGE ALVES MARTINS

**ANÁLISE *in vitro* DO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO DO EXTRATO
HIDROETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Fridericia platyphylla* Lohmann E SUA
CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA**

São Luís

2019

LENIVALDO JORGE ALVES MARTINS

**ANÁLISE *in vitro* DO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO DO EXTRATO
HIDROETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Fridericia platyphylla* Lohmann E SUA
CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Curso de Graduação em Farmácia da Universidade
Federal do Maranhão (UFMA) – Campus
Bacanga, como requisito para obtenção do grau de
Bacharel em Farmácia Generalista.

ORIENTAÇÃO: Profa. Dra. Cláudia Quintino
da Rocha

São Luís

2019

Martins, Lenivaldo Jorge Alves.

**ANÁLISE *in vitro* DO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO DO
EXTRATO HIDROETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Fridericia
platyphylla* Lohmann E SUA CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA /**

Lenivaldo Jorge Alves Martins. - 2019.

46 p.

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Cláudia Quintino da Rocha.

Monografia (Graduação) - Curso de Farmácia, Universidade
Federal do Maranhão, São Luís, 2019.

1. Anti-inflamatório. 2. Flavanoides. 3. *Fridericia platyphylla*.
I. da Rocha, Cláudia Quintino. II. Título.

LENIVALDO JORGE ALVES MARTINS

**ANÁLISE *in vitro* DO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO DO EXTRATO
HIDROETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Fridericia platyphylla* Lohmann E SUA
CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Curso de Graduação em Farmácia da
Universidade Federal do Maranhão (UFMA) –
Campus Bacanga, como requisito para obtenção
do grau de Bacharel em Farmácia Generalista.

Data de Aprovação: São Luís – MA, _____ de _____ de _____

BANCA EXAMINADORA

DrWellyson da Cunha Araújo Firmo
(Membro 1 – Universidade-CEUMA)

DraPatricia de Maria Silva Figueiredo.
(Membro 2 – Universidade Federal do Maranhão-UFMA)

Dra Cláudia Quintino da Rocha
(Orientadora – Universidade Federal do Maranhão-UFMA)

“Creio que uma das maiores dádivas que o Criador nos deu é a da expectativa e suspense. Como a vida seria tediosa se soubéssemos de antemão tudo o que vai acontecer! A verdade é que nunca sabemos o que vai acontecer em seguida na vida! Nos próximos momentos, pode acontecer alguma coisa capaz de mudar todo o rumo e qualidade de sua vida num instante. Devemos aprender a amar a mudança, pois é a única coisa certa.”

(Anthony Robbins do livro “Desperte o gigante interior”).” (Paulo Beleki).

AGRADECIMENTOS

Primeiro quero agradecer a Deus pela saúde, pela força, pela perseverança, por todo conhecimento adquirido e por ter estado comigo em toda minha jornada acadêmica.

Segundo as duas pessoas que foram e sempre serão o alicerce da minha vida, meu pai Leodoro Martins e minha mãe Aricéa Alves Martins, que me orientaram por toda vida e fizeram parte da construção do meu caráter.

À minha esposa Lilia Marcia Lopes Martins, pelo carinho, compreensão, paciência, colaboração e ajuda nestes anos de caminhada, a quem serei eternamente grato.

Aos amores da minha vida, minhas paixões, meus filhos Daniel e Samuel, pelos momentos de paciência e colaboração nos meus momentos de impaciência e ausência.

Aos meus amáveis irmãos Lâmede, Liênio, Lilian e Lisiane por torcerem e acreditarem no meu potencial, me ajudando a concretizar este sonho.

A minha orientadora Claudia Quintino da Rocha, pela sabedoria, colaboração e dedicação durante todo esse período.

Agradeço do fundo do meu coração, com muito carinho aos meus colegas e em especial a família LEAF pelo companheirismo, dando-me todo apoio nesta caminhada.

Agradeço, enfim, a todos que de alguma maneira proporcionaram este momento maravilhoso em minha vida.

MEU ETERNO MUITO OBRIGADO!

RESUMO

Fridericia platyphylla (Cham.) L. G., popularmente conhecida como “cipó-una”, “tintureiro” ou “cervejinha do campo”, suas raízes são tradicionalmente usadas para o tratamento de cálculo renal e osteoartrite, ela é uma espécie do cerrado rica em metabólitos secundários, conhecida por sua ação anti-inflamatória. Nessa perspectiva o presente estudo teve por objetivo identificar os metabólitos secundários e avaliar o potencial anti-inflamatório presente no extrato hidroetanólico das folhas de *F. platyphylla* e caracterizar os constituintes químicos do extrato. Para análise fitoquímica a caracterização ocorreu pelas técnicas hifenadas. A caracterização dos metabólitos secundários foi realizada por LC-UV/MS, comparando os tempos de retenção com padrões autênticos e seus espectros no UV e fragmentos de massa. Para avaliação do efeito anti-inflamatório foi realizado o teste com o extrato bruto nos modelos de quantificação de NO (óxido nítrico) e citocinas. Os resultados demonstram que foi detectada a presença de apigenina, cirsilol e derivado, isoquercitrina e rutina e que o extrato obtido das folhas apresentou uma atividade anti-inflamatória, confirmada pela capacidade de inibir o NO e pela produção de IL-4, nas concentrações de 0,063 e 0,125 mg/mL, respectivamente. Esses resultados demonstraram que as folhas de *F. platyphylla* apresenta potencial anti-inflamatório e os flavonoides podem ser os responsáveis por essa ação.

Palavras-chave: Inflamação; citocinas, óxido nítrico, flavonoides.

ABSTRACT

Fridericia platyphylla (Cham.) L. G., popularly known as "cipó-uma", "dyer" or "beer of the field", its roots are traditionally used for kidney stone treatment and osteoarthritis, it is a species of the cerrado rich in secondary metabolites. The objective of the present study was to identify these secondary metabolites and to evaluate the anti-inflammatory potential present in the hydroethanolic extract of the leaves of *F. platyphylla* and to characterize the chemical constituents of the extract. For phytochemical analysis, the characterization was performed by hyphenated techniques. The characterization of these secondary metabolites was performed by LC-UV / MS, comparing retention times with authentic standards and their UV spectra and mass fragments. To evaluate the anti-inflammatory effect, the crude extract test was performed in the quantification model of NO (nitric oxide) and cytokines. The results demonstrate that the presence of apigenin, cirsiol and derivative, isoquercitrin and rutin was detected and that the extract obtained from the leaves showed an anti-inflammatory activity, confirmed by the ability to inhibit NO and IL-4 production, in concentrations of 0.063 and 0.125 mg / mL, respectively. These results demonstrated that the leaves of *F. platyphylla* present anti-inflammatory potential and the flavonoids may be responsible for this action.

Keywords: Inflammation; cytokines, nitric oxide, flavonoids

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Espécie <i>Fridericia platyphylla</i>	17
Figura 2-	Exsicata <i>Fridericia platyphylla</i>	18
Figura 3	Requisitos estruturais observados para atividade anti-inflamatória de flavonoides.....	19
Figura 4-	Cromatograma de separação por HPLC-UV-Vis dos constituintes químicos presentes no extrato EtOH 70% das folhas de <i>F. platyphylla</i> e seus espectros representativos no ultravioleta.....	27
Figura 5-	Espectro de primeira ordem para o ion molecular m/z 610,88 (rutina).....	28
Figura 6-	Espectro de primeira ordem para o ion molecular m/z 331,15 (cirsiolol)	29
Figura 7-	Espectro de primeira ordem para o ion molecular m/z 331,15 (derivado cirsiolol).....	30
Figura 8-	Espectro de primeira ordem para o ion molecular m/z 271 (apigenina)	30
Figura 9-	Espectro de primeira ordem para o ion molecular m/z 271 (isoquercitrina).....	31
Figura10-	Viabilidade de macrófagos peritoneais, após aderência, de camundongos Balb/c estimulados com tioglicolato de sódio 3% (**** p<0,0001).....	33
Figura11-	Produção de NO (óxido nitro), em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c (****p< 0,0001).....	34
Figura12 -	Inibição da produção de NO utilizando extrato das folhas <i>Fridericia platyphylla</i> em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c (**p<0,001, ****p< 0,0001).....	35
Figura13 -	Concentração de fator de necrose tumoral- α liberado no sobrenadante da cultura de macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c. Os macrófagos peritoneais foram colocados em contato com o extrato de folhas de <i>Fridericia pratyphylla</i> ; como controle positivo foi utilizado o LPS e como controle negativo apenas o meio RPMI (****p<0,0001).....	36
Figura 14 –	Concentração de interleucina-1 liberada no sobrenadante da cultura de macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c. Os macrófagos peritoneais foram colocados em contato com o extrato das folhas de <i>Fridericia platyphylla</i> ; como controle positivo foi utilizado o LPS (lipopolissacarídeo), e como controle negativo.....	37
Figura 15 -	Concentração de interleucina-4 liberada no sobrenadante da cultura de esplenócitos de camundongos Balb/c. Os esplenócitos foram colocados em contato com o extrato de folhas da <i>Fridericia platyphylla</i> ; como controle positivo foi utilizado o Con-A e como controle negativo apenas o meio RPMI.....	38
Figura 16	Concentração de interleucina-10 liberada no sobrenadante da cultura de esplenócitos de camundongos Balb/c. Os esplenócitos foram colocados em contato com o extrato de folhas de <i>Fridericia pratyphylla</i> ; como controle positivo foi utilizado o Con-A e como controle negativo apenas o meio RPMI.....	39

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Taxonomia da planta.....	18
---	----

CEU	Comissão de Ética no Uso de Animais
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CO ₂	Gás Carbônico
ESI	Fonte de Ionização do Tipo Eletrospray
EtOH	Etanol
DCM	Diclorometânica
FAB	Extrato bruto das Folhas de <i>Fridericia platyphylla</i>
FIA	Análise por Injeção em Fluxo
He	Hélio
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
H ₂ SO ₄	Ácido Sufúrico
IL	Interleucina
IT	"IonTrap" ou Armadilha de Elétrons
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Performance
LEAF	Laboratório de Estudos Avançados em Fitomedicamentos
LC	Cromatografia Líquida
MeOH	Metanol
MS	Espectrometria de Massa
NO	Óxido Nitro
PEC	Célula do Exsudato Peritoneal
RNI	Reativos Intermediários de Nitrogênio
ROI	Reativos Intermediários de Oxigênio
SPE	Extração em Fase Sólida
TNF	Fator de Necrose Tumoral
UNESP	Universidade Estadual de São Paulo
UV-VIS	Ultravioleta – Visível
TNF α	Fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 AÇÃO DO SISTEMA IMUNOLÓGICO NA INFLAMAÇÃO	15
2.2 CERRADO BRASILEIRO COMO FONTE DE PRODUTOS NATURAIS BIOATIVOS	17
2.3 <i>Fridericia platyphylla</i> L. (Família <i>Bignoniaceae</i>)	17
2.4 AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIO DOS FLAVONÓIDES	19
3 OBJETIVOS	21
3.1 OBJETIVO GERAL	21
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
4 MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1 MATERIAL VEGETAL	22
4.1.1 Perfil por HPLC-UV-Vis do extrato das folhas de <i>F. platyphylla</i> L.....	222
4.1.2 Caracterização do extrato por Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massa.....	22
4.1.3 Avaliação do potencial anti-inflamatório do extrato das folhas de <i>Fridericia platyphylla</i>	23
3	
4.2 OBTENÇÃO E CULTURA DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS PARA DETERMINAÇÃO DE MTT, NO	233
4.2.1 Teste de viabilidade celular	233
4.2.2 Determinação de Óxido Nítrico (NO)	244
4.2.3 Determinação da inibição de Óxido Nítrico.....	24
4.3 OBTENÇÃO E CULTURA DE ESPLÊNOCITOS TOTAIS PARA DETERMINAÇÃO DE TNFα, IL-1, IL-4 E IL-10	244
4.3.1 Quantificação de citocinas no sobrenadante das culturas através de ensaio imunoenzimático (ELISA).....	24
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	25
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	27

5.1 Perfil COMATOGRÁFICO DAS FOLHAS DE <i>F. platyphylla</i> L.	27
5.2 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DAS FOLHAS DE <i>Fridericia platyphylla</i>.	28
5.3 RESULTADOS DOS TESTES EM <i>VITRO</i> COM O EXTRATO DAS FOLHAS DE <i>Fridericia platyphylla</i> L.	32
5.3.1 Teste de viabilidade celular.....	32
5.3.2 Determinação da produção de NO.....	33
5.3.3 Determinação da inibição de NO.....	34
5.3.4 Determinação do TNF- α	35
5.3.5 Determinação da interleucina - 1.....	36
5.3.6 Determinação da interleucina - 4.....	37
5.3.7 Determinação da interleucina - 10.....	388
6 SÍNTESE DE TODO A PESQUISA	40
7 CONCLUSÃO	41
REFERÊNCIAS	42

INTRODUÇÃO

O processo inflamatório, envolvido em diversas patologias, é uma resposta do organismo frente a uma infecção ou a uma injúria tecidual. Compreende basicamente dois mecanismos de defesa: uma resposta inespecífica (resposta inata), responsável pelas características da região inflamada (vermelhidão, edema, calor, dor e perda de função) e uma resposta imunológica, na qual há produção de anticorpos específicos contra um determinado agente agressor (MARCELA et al., 2009). Para combater o processo inflamatório utilizam-se anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) ou esteroidais (SANTON, 2017).

Os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) encontram-se entre os medicamentos mais prescritos em todo o mundo. Essa classe heterogênea de fármacos inclui a aspirina e vários outros agentes inibidores da ciclo-oxigenase (COX), seletivos ou não. Os AINEs não seletivos são os mais antigos, e designados como tradicionais ou convencionais. Os AINEs seletivos para a COX-2 são designados COXIBEs. Nos últimos anos, tem sido questionada a segurança do uso dos AINEs na prática clínica, particularmente dos inibidores seletivos da COX-2 (BATLOUNI, 2010).

Resultados de estudos clínicos prospectivos e de meta-análises indicam que os inibidores seletivos da COX-2 exercem importantes efeitos cardiovasculares adversos, que incluem aumento do risco de infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, insuficiência cardíaca, insuficiência renal e hipertensão arterial (BATLOUNI, 2010). Com todos os efeitos adversos que estes medicamentos trazem ao ser humano, tem-se a necessidade de se buscar alternativas naturais para o combate a inflamação.

Dentre as alternativas naturais encontram-se as plantas que são uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais derivam diversos fármacos comercializados no mundo inteiro. O estudo químico e farmacológico das plantas medicinais possibilitou a obtenção de novos compostos com propriedades relevantes, como o taxol (anticancerígeno), a artemisinina (antimalárico), a morfina (analgésico), a emetina (antiprotozoário), a galangina (antibacteriano), a colchicina e o acheflan (anti-inflamatórios) (NEWMAN; CRAGG, 2016).

Nessa perspectiva este estudo tem como finalidade a busca em *F. platyphylla*, por novas alternativas para o tratamento da inflamação.

2REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 AÇÃO DO SISTEMA IMUNOLÓGICO NA INFLAMAÇÃO

A inflamação é um processo fisiológico que ocorre em consequência da ativação de alguns mecanismos que provocam adulterações nos componentes humorais e celulares após agravo tecidual de distintas origens tais como: toxinas, substâncias cáusticas, tecido necrótico, traumas mecânicos diretos ou indiretos, radiações, entre outros (CRUVINEL et al., 2010).

De maneira geral, a inflamação é classificada em aguda e crônica levando-se em conta o período de duração e características patológicas. É caracterizada como inflamação aguda, aquela em que há uma progressão de horas a dias, sendo caracterizada por vasodilatação, exsudação plasmática e migração de células para o sítio lesado. As desordens crônicas são caracterizadas por longa duração semanas, meses até anos com inflamação ativa, destruição tecidual e tentativa de reparo ocorrendo simultaneamente (NORLING, 2010).

O sistema imunológico é constituído de uma complexa rede de células e mediadores altamente efetivos e dinâmicos que protegem o hospedeiro contra agentes agressores. Embora a inflamação atue como uma defesa do hospedeiro contra infecções ou lesões, e é primariamente um processo autolimitado, a resolução inadequada de respostas inflamatórias frequentemente conduz a doenças crônicas incluindo câncer (MEDZHITOV, 2008; KUNDU; SHUR, 2008; MANTOVANI, 2009).

Durante o processo inflamatório, os macrófagos exercem três funções principais: fagocitose, apresentação de antígenos e imunomodulação através da produção de várias citocinas e fatores de crescimento. Os macrófagos inflamatórios diferem dos macrófagos residentes especialmente pelo aumento da capacidade fagocítica e pela capacidade aumentada de gerar reativos intermediários de oxigênio (ROIs) e nitrogênio (RNIs), ainda evidências indicam, que macrófagos ativados são capazes de destruir células tumorais (EBERHARDET, 2001, SULLIVAN; CHANDEL, 2014).

Tal estimulação resulta na síntese de enzimas como a óxido nítrico síntese induzível (iNOS), responsável pela produção de óxido nítrico (NO). Estudos anteriores descrevem o envolvimento de níveis elevados de iNOS na carcinogênese, incluindo iniciação, promoção, progressão, metástase e angiogênese tumoral (CHEN; STONER, 2004). Em alguns

tipos de tumores, incluindo o de mama, inibidores da iNOS vem sendo utilizados na prevenção da angiogênese e além disto, a terapia para prevenção de metástases no câncer pode ser acompanhada pela inativação da iNOS (RAO et al., 2002; KOHNO et al., 2007).

Quanto à imunidade celular, processo eficaz na destruição dos tumores, é composto por células imunológicas que são capazes de liberar muitas substâncias que tem como objetivo amplificar o processo inflamatório (MILLS et al., 2004; OSTUNI et al., 2015).

Porém pode haver um desequilíbrio nessa imunovigilância na eliminação do tumor, e isso é um processo complexo que abrange várias vias de sinalização que podem ser influenciadas pela expressão de citocinas de células tumorais, células do sistema imunológico e outros tipos de células não cancerosas, tais como células epiteliais ou fibroblastos associados ao câncer, em tecido circundante. Assim, as citocinas de vários tipos celulares presentes no microambiente tumoral podem promover ou suprimir o crescimento do tumor (BURKHOLDER, 2014).

Algumas citocinas apresentam características moduladoras da progressão do tumor, principalmente através da indução do processo metastático das células tumorais, afetando diversas etapas da disseminação celular e de sua implantação em sítios secundários (MANTOVANI et al., 2008; BURKHOLDER, 2014).

A reação inflamatória constitui um dos componentes mais importantes da execução da resposta imunitária, e embora faça parte dos mecanismos defensivos contra grande número de agressões, em muitos casos ela própria pode causar danos ao organismo, (FILHO, 2013). Entre todas as citocinas anti-inflamatórias, a IL-10 é uma citocina com potente ação anti-inflamatória, reprimindo a expressão de citocinas inflamatórias, como TNF- α , IL-6 e IL-1 por macrófagos ativados, (ZHANG; NA, 2007). A IL-4 é uma glicoproteína com propriedades anti-inflamatórias produzidas por linfócitos T-CD4, mastócitos, eosinófilos e basófilos, (GEROLA et al., 2011).

Para Carvalho (2003) o NO é o principal mediador citotóxico de células imunes efetoras ativadas, constitui a mais importante molécula reguladora do sistema imune. No entanto o NO é potencialmente tóxico. A toxicidade se faz presente, particularmente, em situações de estresse oxidativo, geração de intermediários do oxigênio e deficiência do sistema antioxidante.

2.2 CERRADO BRASILEIRO COMO FONTE DE PRODUTOS NATURAIS BIOATIVOS

O Brasil possui a maior diversidade vegetal do planeta, contando com aproximadamente 55 mil espécies de plantas, distribuídas nos diferentes tipos de biomas: Floresta Amazônica, Cerrado, Mata Atlântica, Pantanal, Caatinga e Manguezal (ALBERNAZ, 2010; VIEIRA et al., 2010).

Dentre as várias plantas brasileiras com potencial farmacológico, encontra-se *F. platyphylla* cuja sinonímia *Arrabidaea brachypoda*, uma importante representante da família *Bignoniaceae*, com 56 gêneros e cerca de 340 espécies. Esta família apresenta diversas atividades como adstringentes, antitérmicos, antivirais, citotóxicos, anti-inflamatórios, antibacterianos, antifúngicos, antiparasitários, antimaláricos, antirreumáticos e anticarcinogênico (BRANDÃO et al., 2010).

O Cerrado brasileiro é reconhecido como a savana mais rica do mundo, abrigando 11.627 espécies de plantas nativas já catalogadas. Existe uma grande diversidade de habitats, que determinam uma notável alternância de espécies entre diferentes fitofisionomias. O cerrado é o segundo maior bioma da América do Sul, ocupando uma área de 2.036.448 km², cerca de 22% do território nacional. A sua área contínua incide sobre os estados de Goiás, Tocantins, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Bahia, Maranhão, Piauí, Rondônia, Paraná, São Paulo e Distrito Federal, além dos encaves no Amapá, Roraima e Amazonas (BRASIL, 2018).

2.3 *Fridericia platyphylla* L. (Família Bignoniaceae)

A família Bignoniaceae é originalmente subdividida em oito tribos, ocorrendo três delas no Brasil (Bignoniaceae, Crescentieae e Tecomeae), as quais se diferenciam pelo hábito da planta e pela morfologia do fruto (BUREAU; SCHUMANN, 1897; GENTRY, 1980, apud DELGADO, 2015). O centro de dispersão da família como um todo é o Brasil (GENTRY, 1979 apud BARROSO, 1991, Apud DELGADO, 2015), embora existam cinco regiões principais de dispersão: a América Central e parte oeste da América do Sul; região da Guiana; terras baixas da Amazônia; cerrados e caatingas do Brasil; litoral do Brasil. O centro de diversidade da família também está no Brasil, onde ocorrem 56 gêneros e cerca de 340 espécies, incluindo muitos táxons endêmicos. As espécies de Bignoniaceae são encontradas em diferentes tipos de ambientes, desde os cerrados abertos até as florestas úmidas e

perenifólias, representando a principal família de lianas das matas brasileiras (GENTRY, 1980, apud DELGADO, 2015). Na tabela 1 encontra-se descrito a taxonomia da planta.

Tabela 1. Taxonomia da planta

Reino	Plantae
Subdivisão	Spermatophyta
Divisão	Magnoliopsida
Subclasse	Asteridae
Ordem	Scrophulariales
Família	Bignoniaceae
Gênero	<i>Fridericia</i>
Espécie	<i>Platyphylla</i>

Fonte: Rocha (2013)

Fridericia platyphylla (Cham.) L. G. Lohmann é uma espécie pertencente a família Bignoniaceae, é um arbusto nativo do cerrado brasileiro, possui entre 1,0 e 2,0 m de altura, abundantemente ramificado, com folhas simples e flores róseo-roxas em inflorescências terminais (Figura 1), já na (Figura 1) é demonstrado a exsicata das folhas. É popularmente conhecida como “cipó-una”, “tintureiro” ou “cervejinha do campo”, suas raízes são tradicionalmente usadas para o tratamento de pedras nos rins e dor nas articulações (artrite) (ALCERITO et al., 2002; RODRIGUES et al., 2006; ROCHA et al., 2014).

Figura 1- *Fridericiaplatyphylla* (Cham.) L. G. Lohmann



Fonte: Salles (2007)

Figura 2 – Exsicata de *Fridericia platyphylla*



Fonte: Gentry, A. (1991)

Alguns estudos realizados com folhas de *F. platyphylla* identificaram flavonoides como apigenina e luteolina (BLATT et al., 1998). Alcerito et al., (2002) isolaram quatro flavonoides a partir da cera epicuticular das folhas: cirsimaritina, hispidulina, cirsilinol e 3,4-dihidroxi-5,6,7-trimetoxiflavona. Há também relatos da presença de saponinas, glicosídeos cardiotônicos, compostos fenólicos, taninos, esteroides, triterpenos pentacíclicos, ácido betulínico, ácido ursólico, ácido oleanólico e flavonoides diméricos incomuns glicosilados e suas agliconas (ALCERITO et al., 2002; ROCHA et al., 2011; ROCHA, 2014; ROCHA, 2015; ROCHA, 2016).

Estudos realizados por Rocha et al. (2011) demonstraram que os extratos das raízes da *Fridericia platyphylla* L. possuem atividade analgésica efetiva e uma pronunciada atividade anti-inflamatória em modelos animais *in vivo*. Em 2015, Rocha confirmou a ação anti-inflamatória de um triterpeno pentacíclico isolado da espécie. No ano seguinte, Rocha e colaboradores apresentaram os efeitos gastroprotetores do extrato da raiz da *F. platyphylla* através de evidências da citoproteção ao mostrar uma série de compostos flavonoides diméricos incomuns responsáveis pelo efeito.

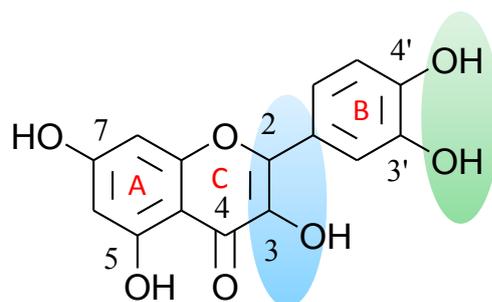
2.4 AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA DOS FLAVONÓIDES

As ações anti-inflamatórias dos flavonoides em modelos celulares envolvem a inibição da síntese e atividades de diferentes mediadores pró-inflamatórios, como eicosanoides, citocinas, moléculas de adesão e proteína C-reativa. As atividades moleculares dos flavonoides incluem a inibição de fatores de transcrição, como o NF-kappa B e a ativação da proteína-1 (AP-1), bem como a ativação do fator nuclear relacionado ao fator eritróide 2 (Nrf2) (SERAFINI, 2010).

Entretanto, subclasses de flavonoides que não possuem um destes padrões em sua estrutura, como por exemplo, a aglicona kaempferol, também se destacam por apresentar atividade sobre enzimas da cascata de inflamação. Os requisitos estruturais atualmente aceitos

para atividade anti-inflamatória de flavonoides são mostrados na Figura 2, (MARCELA, et al, 2009). Dentre os fatores estruturais importantes para atividade anti-inflamatória de flavonoides destacam-se a insaturação no anel C (posições 2-3), o número e a posição de grupamentos hidroxilas (por exemplo: padrão catecol no anel B do flavonoide, ou seja, anel 3',4'-di-hidroxiado), a carbonila em C-4 (Anel B) e a não glicosilação da molécula.

Fig. 3. Requisitos estruturais observados para atividade anti-inflamatória de flavonoides



Fonte: Coutinho (2009).

A maior variedade estrutural existente nos flavonoides são originadas em função de modificações químicas ocorridas em sua estrutura básica, que podem ser por meio de hidroxilação, metilação, acilação, glicosilação, hidrogenação, (BANTIM, 2015).

Os estudos de Kasahara et al (2011), demonstraram que os flavonoides apigenina e luteolina inibiram efetivamente a inflamação induzida por carragenina em modelo murino.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar os metabólitos secundários e o potencial anti-inflamatório presente no extrato hidroetanólico das folhas de *F. platyphylla* L.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Obter o extrato hidroetanólico 70% das folhas de *F. platyphylla* L.;

Caracterizar os constituintes químicos do extrato pela técnica de HPLC-UV-Vis e LC-ESI-IT-MS;

Avaliar o potencial anti-inflamatório em modelo *in vitro* do extrato hidroetanólico de *F. platyphylla*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAL VEGETAL

As folhas da *Fridericia platyphylla* L. foram coletadas em regiões de cerrado do município de João Pinheiro, Minas Gerais – Brasil, em abril de 2017. A planta foi identificada no Herbário José Badine da Universidade Federal de Ouro Preto pela botânica Dra. Maria Cristina Teixeira Braga Messias. Sob o número 17.935, a autorização para coleta e estudos científicos foi cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob o número A451DE4.

As folhas foram secas em estufa. O pó obtido foi macerado com etanol 70% v/v de acordo com a Farmacopeia Brasileira, após macerado foi concentrada em rotaevaporador e, posteriormente liofilizado. O extrato obtido foi submetido à *clean-up* em cartuchos Sep-Pak de fase reversa e a caracterização foi realizada comparando os tempos de retenção com padrões autênticos e seus espectros no UV e Massas.

4.1.1 Perfil por HPLC-UV-VIS do extrato das folhas de *F. platyphylla* L.

Após *clean up*, o extrato foi submetido à análise em HPLC-UV-Vis (SHIMADZU) em coluna C18 (Phenomenex, 250 x 4.6 mm, 5 μ m, 100 °A); usando com o fase móvel água (eluente A) e metanol (eluente B), acidificados em ácido fórmico 0,01%, a um fluxo de 1 mL/min em um gradiente de 10% a 100% de B em 60 min. A temperatura da coluna foi mantida à temperatura ambiente e o volume de injeção da amostra foi de 10 μ L. Os dados foram coletados e processados utilizando o software Shimadzu LC Solution 1.25.

4.1.2 Caracterização do extrato por Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas

Os experimentos de espectrometria de massa foram realizados em LCQ Equipamento de frota (ThermoScientific) equipado com um dispositivo de inserção direta da amostra via análise por injeção em fluxo (FIA). A matriz estudada foi analisada por ionização por eletrospray (ESI), a fragmentação em múltiplos estágios (Ms^n), realizada em uma interface de prisão de íon (IT). O modo positivo foi selecionado para a geração e análise dos espectros de massa para primeira ordem (MS) e para os demais experimentos em múltiplos estágios nas seguintes condições: tensão capilar, 25 V; voltagem spray, 5 kV; e temperatura capilar, 275 °C. Um gás de arraste (N_2) com um fluxo de 8 unidades arbitrárias (A.U.), e o gás de

colisão será o hélio (He). A aquisição da faixa será m/z 100-2000. O software Xcalibur versão 1.3 (ThermoFinnigan, Waltham, MA) foi usado para adquirir e processar os dados.

4.1.3 Avaliação do potencial anti-inflamatório do extrato das folhas de *Fridericia platyphylla*

Na triagem da ação anti-inflamatória foram utilizados modelos *in vitro*, em cultura de células.

4.2 OBTENÇÃO E CULTURA DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS PARA DETERMINAÇÃO DE MTT, NO.

Os animais (camundongos Balb/c, machos) foram inoculados (por via intraperitoneal) com 3 mL de tioglicolato de sódio a 3% (Difco Lab. LTDA) três dias antes de serem eutanasiados em câmara de CO₂. As células do exsudato peritoneal (PEC) foram obtidas pela inoculação de 5 mL de PBS gelado. As células foram contadas e ajustadas a uma concentração de 5×10^6 células/mL em meio de cultura. Todos os testes foram realizados de acordo com as normas do comitê de ética do biotério central da UNESP, sob o número de protocolo 738 (CEUA).

4.2.1 Teste de viabilidade celular

O método escolhido foi o MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólico]. Esse método avalia a atividade das desidrogenases mitocondriais, capazes de reduzir o MTT a sais de formazan, um composto de coloração azul escuro (MOSMANN, 1983). Foram utilizados macrófagos RAW 264.7, em placas de microdiluição de 96 poços a uma concentração 2×10^5 , e células em 200 μ L de meio RPMI + SFB 2% por poço e incubadas por 24h para aderência. As células foram cultivadas a 37°C. Depois da incubação, o sobrenadante foi pipetado e descartado e acrescido 200 μ L das concentrações 50 μ g/mL, 100 μ g/mL, 150 μ g/mL e 250 μ g/mL do EHLd e do EHSt, em triplicata, diluídas no mesmo meio de cultura e incubadas por 48 h. O próximo passo foi descartar o sobrenadante e colocar 100 μ L do mesmo meio com MTT – [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólico] (0,5%) (Sigma-Aldrich, EUA), para melhor visualização dos cristais de formazan nas células viáveis. As placas foram incubadas por mais de 24h e após esse período fez-se leitura no leitor ELISA com absorbância a 570 nm. Os cálculos das porcentagens de crescimento e viabilidade celular foram obtidos a partir da seguinte fórmula: % Viabilidade = TA / T1 x 100, tendo: TA =

media da absorbância da célula tratada – absorbância do branco da amostra; e T1 = absorbância da suspensão celular de controle (sem tratamento).

4.2.2 Determinação de Óxido Nítrico (NO)

O NO foi quantificado espectrofotometricamente pelo acúmulo de nitrito no sobrenadante da cultura de macrófagos peritoneais através da reação de diazotação com o reagente de Griess, conforme descrito por Green et al. (1982). Os sobrenadantes de cultura foram obtidos e expostos ao reagente de Griess. Após 10 min de incubação a temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm.

4.2.3 Determinação da inibição do Óxido Nítrico (NO)

No teste de Inibição desse mediador, se procedeu à realização da mesma reação anterior, com a diferença de que foram adicionados ao mesmo tempo o controle positivo LPS e os extratos da planta sobre a cultura de macrófagos.

4.3 OBTENÇÃO E CULTURA DE ESPLÊNOCITOS TOTAIS PARA DETERMINAÇÃO DE TNF- α , IL-1, IL-4 e IL-10

Após eutanásia, o peritônio foi exposto e aberto para a extração do baço no qual fora assepticamente removido e macerado. A suspensão celular foi ajustada para 5×10^6 células/mL, plaqueada e estimulada e, então, incubadas em estufa de CO₂, por 24 horas. O sobrenadante foi colhido e armazenado a -20°C em geladeira, para posterior quantificação de citocinas.

4.3.1 Quantificação de citocinas no sobrenadante das culturas através de ensaio imunoenzimático (ELISA)

As citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-4 e IL-10 foram quantificadas nos sobrenadantes da cultura de células do exsudato peritoneal após aderência e esplenócitos totais, obtidos conforme descrito anteriormente, ajustados à concentração de 5×10^6 células/mL e 1×10^7 células/mL, respectivamente, em RPMI-C após 24 h de cultura em presença dos estímulos já citados. Para quantificar a produção de cada citocina, foram utilizados testes

imunoenzimáticos ELISA sandwich (eBioscience®, OptEIA™), de acordo com as instruções do fabricante. As placas de 96 orifícios (Corning Inc.) foram adsorvidas com 100 µL/cavidade de anticorpo de captura, monoclonal, obtidos de rato, anti-citocina de camundongo, na concentração adequada para cada citocina, diluído em tampão fosfato de sódio (pH 6,5) ou carbonato de sódio (pH 9,6), conforme indicado pelo fabricante, e incubadas overnight à 4 °C. No dia seguinte, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS contendo 0,05% de Tween-20 (tampão de lavagem) e bloqueadas com 200 µL/cavidade com diluente de ensaio (tampão PBS acrescido de 10% de soro fetal bovino inativado, Sigma-Aldrich, pH 7,2 a 7,4) à temperatura ambiente por 60 min. Após a incubação, as placas foram lavadas 3 vezes com tampão de lavagem e em seguida foram adicionados 100 µL/cavidade do padrão de citocinas ou dos sobrenadantes das culturas celulares a serem testados. As placas foram então incubadas à temperatura ambiente por 120 min e então foram lavadas 5 vezes com tampão de lavagem. Em seguida, foram adicionados 100 µL por cavidade de anticorpo monoclonal de cabra (anticorpo anti-citocina de camundongo) marcado com biotina e diluído à concentração adequada de cada citocina em diluente de ensaio. As placas foram incubadas por mais 60 min à temperatura ambiente e posteriormente foi lavada mais 5 vezes com tampão de lavagem, então foram adicionados 100 µL/cavidade do conjugado peroxidase-estreptavidina e incubadas novamente à temperatura ambiente por 60 min. Após este período de incubação, as placas foram lavadas 5 vezes com tampão de lavagem e em seguida foram adicionados 100 µL por cavidade do substrato [10 mM de tampão citrato-fosfato, contendo 0,4 mM de tetrametilbenzidina (Sigma) e 1,2 mM de H₂O₂ (MallinckrodtChemical)] e incubados por 30 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A reação foi interrompida para se adicionar 50 µL de H₂SO₄ 2N por cavidade. Nestas reações há formação de cromóforos, que teve sua absorbância lida em espectrofotômetro UV/visível para microplacas (MultiskanAscent, Labsystems) em 450 nm. As concentrações de cada citocina foram quantificadas com base em uma curva padrão previamente estabelecida e os resultados foram expressos em pg/mL.

4.4ANÁLISE ESTATÍSTICA

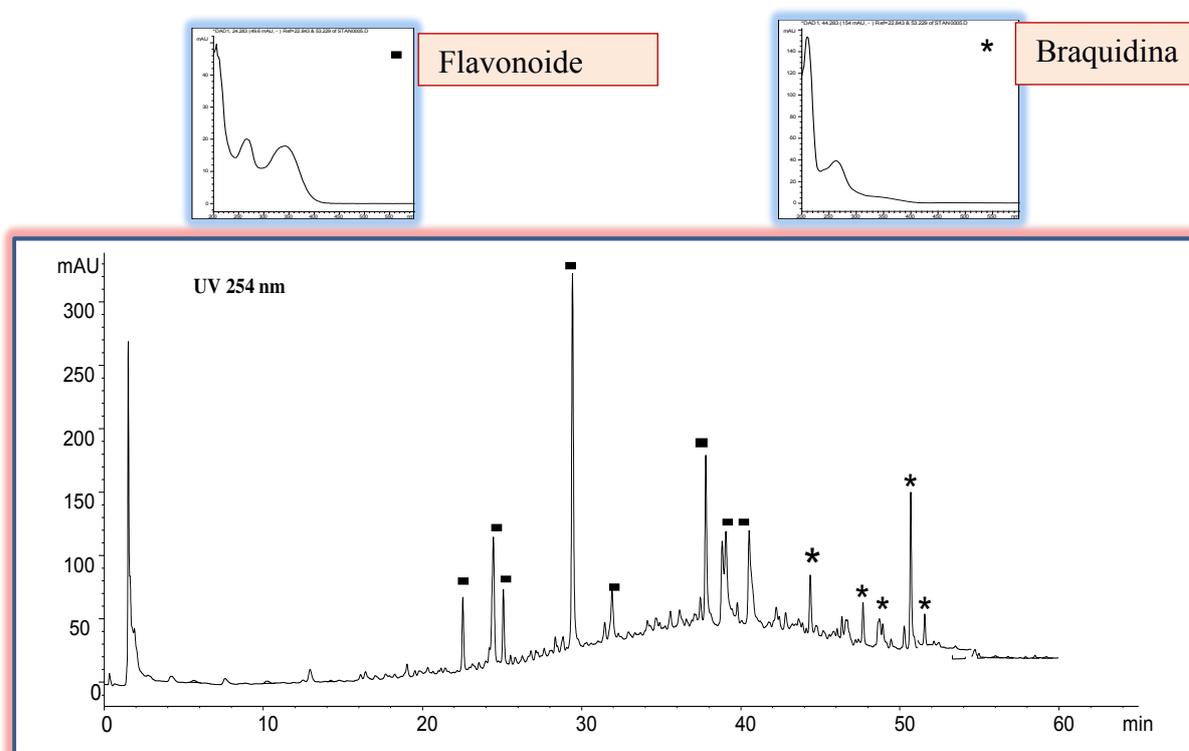
A significância estatística foi determinada por ANOVA de 2 vias usando o teste de comparações múltiplas de Sidak e intervalo de confiança em 95%. ($p < 0,05$) quando comparado com o grupo controle em cada ponto respectivo ou conforme indicado. Os resultados são apresentados como a média \pm desvio padrão de 5 animais.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PERFIL CROMATOGRÁFICO DAS FOLHAS DE *F. platyphylla* L.

Os perfis cromatográficos são bastante utilizados no estudo de plantas, permitindo comparar e sugerir classes de compostos presentes em extratos utilizando detectores de arranjo de diodos, ultravioleta ou espectrometria de massas. Nesta análise cromatográfica buscou-se a obtenção das informações sobre a composição química do extrato bruto hidroetanólico e a melhor identificação dos constituintes da *F. platyphylla*. Conforme (Fig. 4).

Figura 4 - Cromatograma de separação por HPLC-UV-Vis dos constituintes químicos presentes no extrato EtOH 70% das folhas de *F. platyphylla* e seus espectros representativos no ultravioleta.



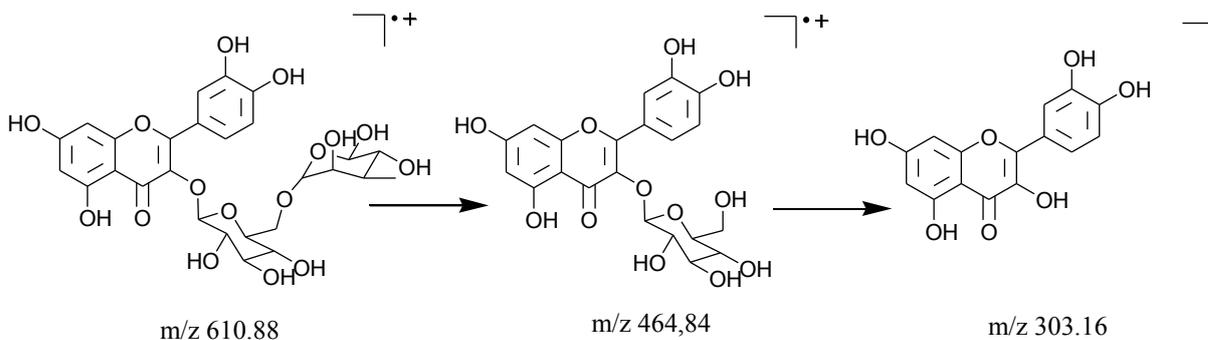
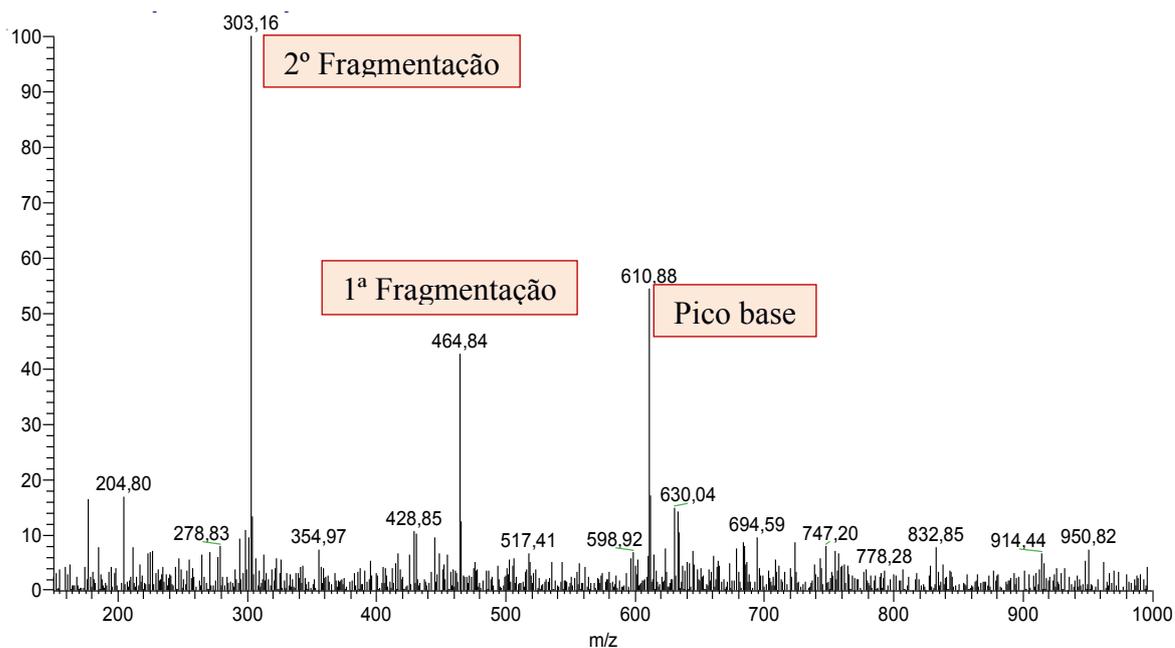
Fonte: Autor (2019)

O perfil cromatográfico do extrato apresentou vários picos em diferentes tempos de retenção caracterizados em sua maioria por flavonoides.

5.2 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Fridericia platyphylla*

Segundo Braga et al (2006, p. 17) entre os métodos modernos de análise, a cromatografia hifenada ocupa um lugar de destaque devido à facilidade com que efetua separação, identificação e quantificação das espécies químicas,

Figura 5–Espectro de primeira ordem para o ion molecular m/z 610,88 (rutina).



Fonte: Autor (2019)

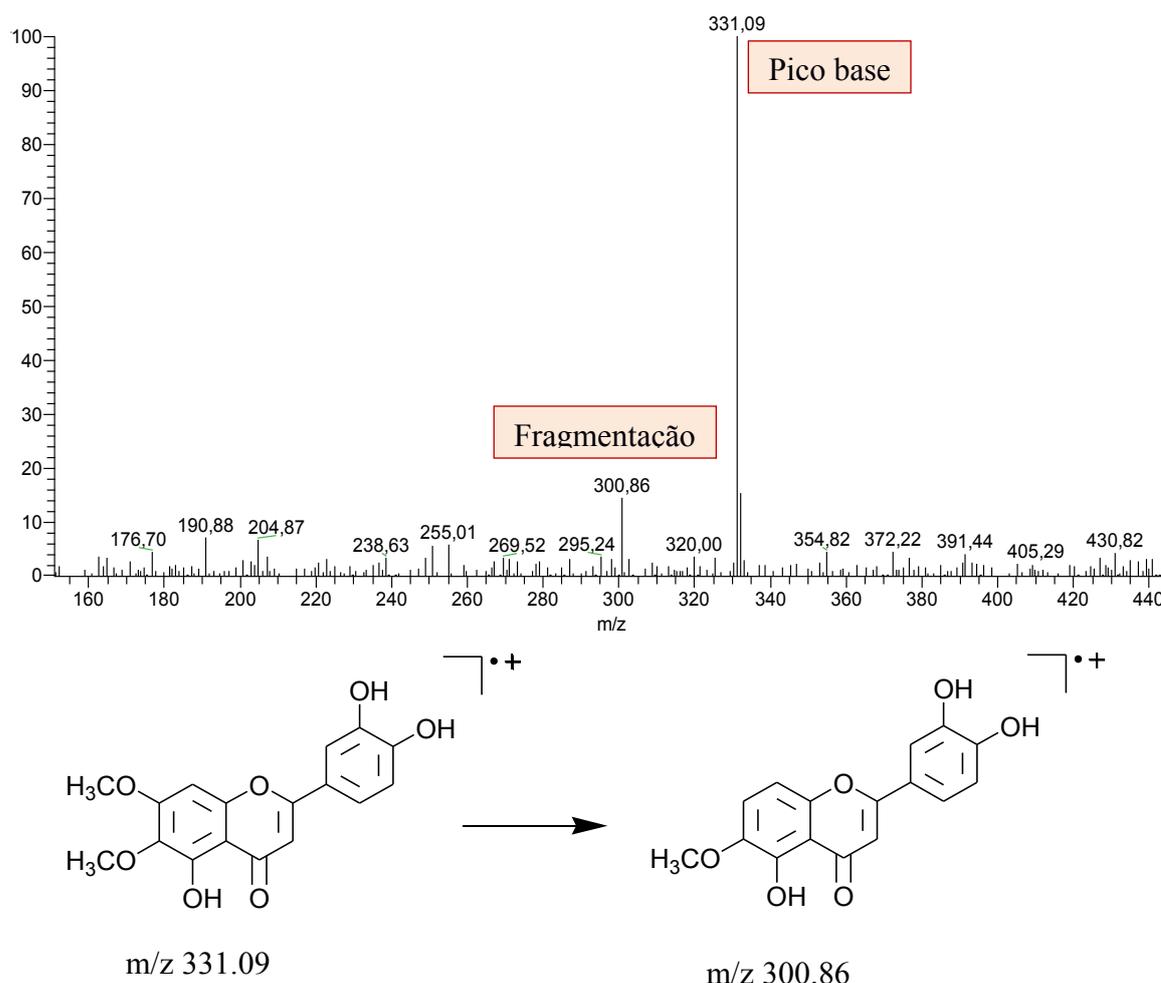
A rutina é um tipo de flavonoide encontrado nas plantas e de grande interesse farmacológico, incluindo atividade antialérgica, anti-inflamatória, antitumoral e principalmente antioxidante (JANBAZ, et al., 2002; CALABRÒ, et al., 2005; YANG, et al., 2008).

A rutina ou vitamina P, como antigamente era denominada, é um flavonol glicosídico pertencente a uma importante classe de flavonoides, sendo encontrada na natureza,

em frutas, vegetais, semente, ervas, especiarias, caules, folhas e bebidas como chá e vinho, (ROZATTO, 2012).

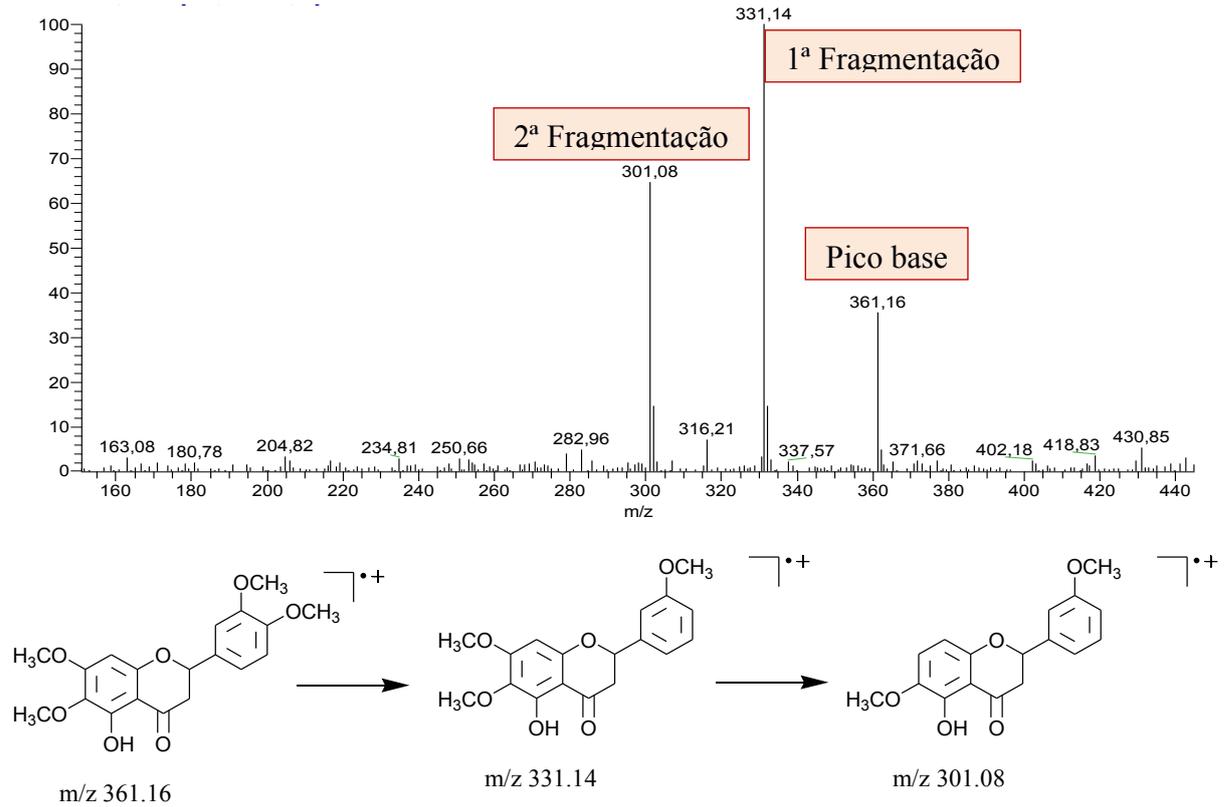
Conforme Nagem, (2002), foi demonstrado que a molécula de rutina tem uma capacidade inibitória sobre o metabolismo do ácido araquidônico, envolvido na síntese de prostaglandinas sensibilizadoras de células do sistema imune, demonstrando sua ação anti-inflamatória.

Figura 6—Espectro de primeira ordem para o ion molecular m/z 331,09 (cirsiolol)



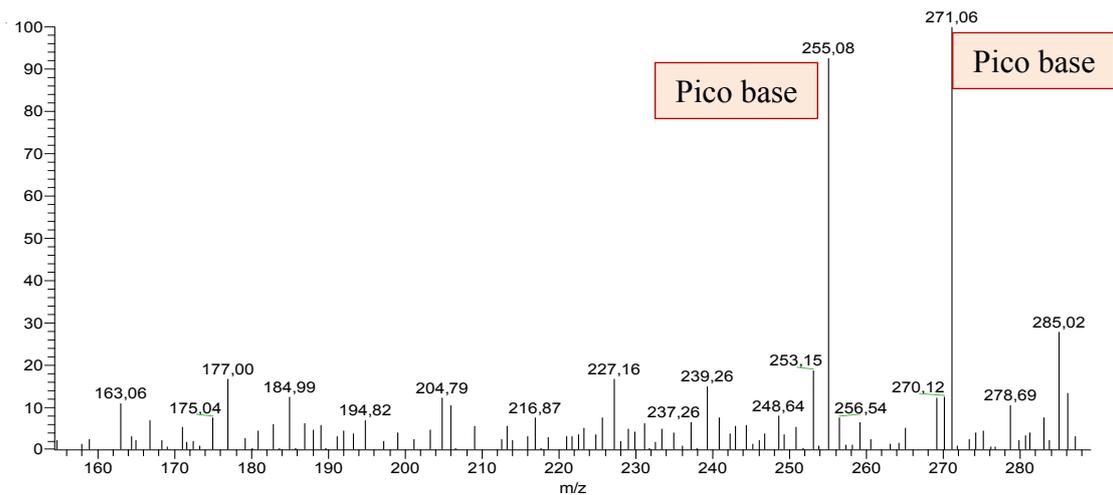
Em estudos com efeitos inibitórios da sakuranetina (estrutura semelhante ao cirsiolol), usando os compostos 7-O-metil-aromadendrina e araquidonato de 3-acetil-7-O-metil-aromadendrinona sobre leucócitos peritoneais de ratos, foi observado que os dois compostos reduziram a produção de LTB₄ (Leucotrieno B₄). Comportamento semelhante aos flavonoides agliconas, que também suprimem a formação do produto 5-LOX (Leucotrieno) em células intactas, demonstrando IC₅₀ menor que 1 μM (GINER, 2007).

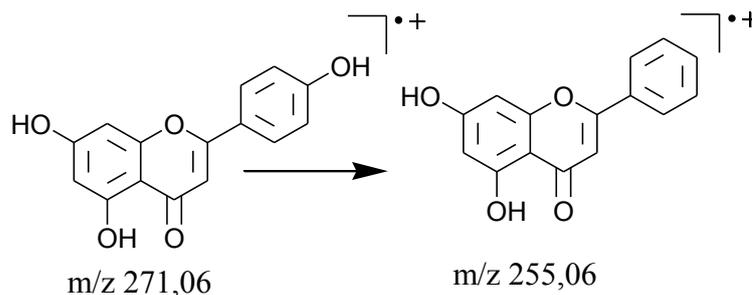
Figura 7—Espectro de primeira ordem para o ion molecular m/z 361,16 (derivado do cirsiolol)



Fonte: Autor (2019)

Figura 8–Espectro de primeira ordem para o ion molecular m/z 271,06 (apigenina)

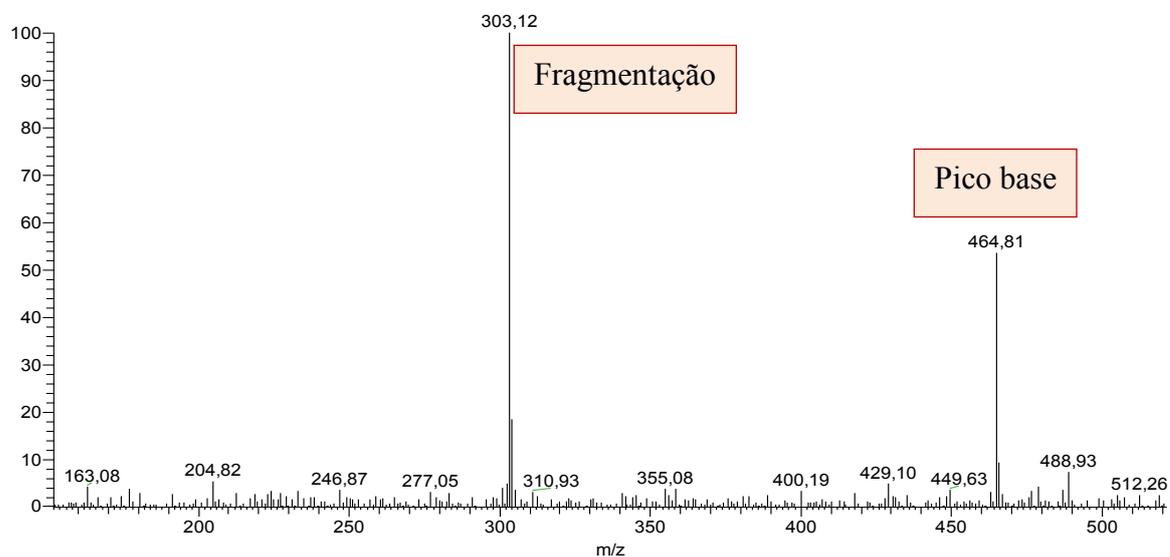


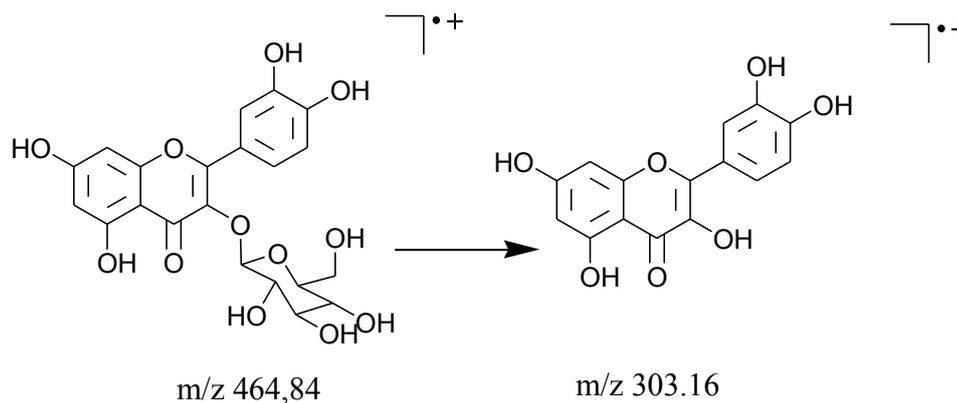


Fonte: Autor (2019)

Muitos flavonoides como as agliconas tem atividade anti-inflamatória, como as flavonas (apigenina, luteolina e crisina), na quais possuem como mecanismo de ação a inibição das vias ciclooxigenase e lipoxigenase no metabolismo do ácido araquidônico, (COUTINHO et al, 2009). Os estudos de Kasahara et al (2011), demonstraram que os flavonoides apigenina e luteolina inibiram efetivamente a inflamação induzida por carragenina em modelo murinho.

Figura 9–Espectro de primeira ordem para o ion molecular m/z 464,81 (isoquercitrina)





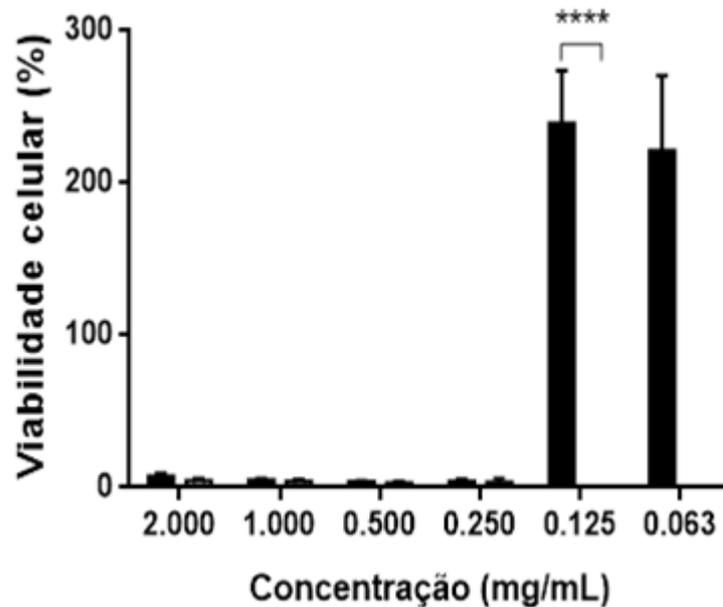
Nos testes de vias respiratórias, observou-se que o flavonoide isoquercitrina, apresentou atividade anti-inflamatória, após administração por via parenteral (15mg/Kg), promovendo a redução no recrutamento de eosinófilos e a formação de leucotrienos indutores de broncoconstrição, portanto este flavonoide tem evidências científicas que tem um potencial efeito para o tratamento contra crises asmáticas, (COUTINHO et al., 2009).

5.3 RESULTADOS DOS TESTES *in vitro* COM OS EXTRATOS DAS FOLHAS DE *Fridericia platyphylla* L.

5.3.1 Teste de viabilidade celular

No ensaio para a determinação da citotoxicidade em macrófagos peritoneais é possível observar na (Figura 10), que o extrato obtido das folhas da *F. platyphylla* foicitotóxico para as concentrações maiores 0,125 e 0,063 mg/mL já nestas concentrações o extrato das folhas não apresentou citotoxicidade e sua viabilidade foi igual ou superior a 100%. Portanto essas concentrações foram às escolhidas para estimular os macrófagos e esplenócitos para dosar as citocinas.

Figura 10 - Viabilidade de macrófagos peritoneais, após aderência, de camundongos Balb/c estimulados com tioglicolato de sódio 3% (**** p<0,0001).



Fonte: Autor (2019)

No trabalho de Lima (2015)

Acitotoxicidade foi observada após 48 e 72 horas de incubação de células

3T3 em concentrações que variaram entre 0,25-

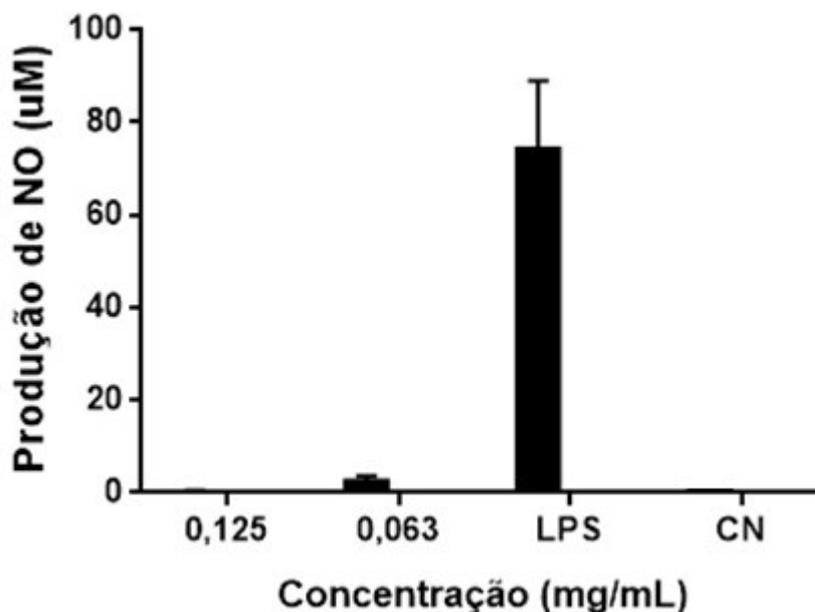
1,75 mg/mL de extrato aquoso de *Aspidosperma pyrifolium* apresentou o grau de citotoxicidade baixa e a percentagem máxima de inibição da proliferação celular foi observada na concentração de 1,75 mg/mL, em 72 horas.

5.3.2 Determinação da produção de óxido nítrico (NO)

A determinação da produção de NO foi realizada em sobrenadantes de culturas de macrófagos peritoneais, após aderência. As células foram mantidas 24 horas em contato com diferentes concentrações dos extratos, LPS como controle positivo e apenas o meio RPMI como controle negativo. (Na Figura 11) observa-se que não houve produção de NO pelos extratos das folhas, indicando que provavelmente possa ter ocorrido inibição da produção de NO.

O óxido nítrico é conhecido por ser um mediador pró-inflamatório em diversas doenças inflamatórias agudas e crônicas, portanto a diminuição na sua concentração favorece a diminuição da inflamação (LEE et al., 2006).

Figura 11 -Produção de NO (óxido nítrico), em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c (****p< 0,0001).



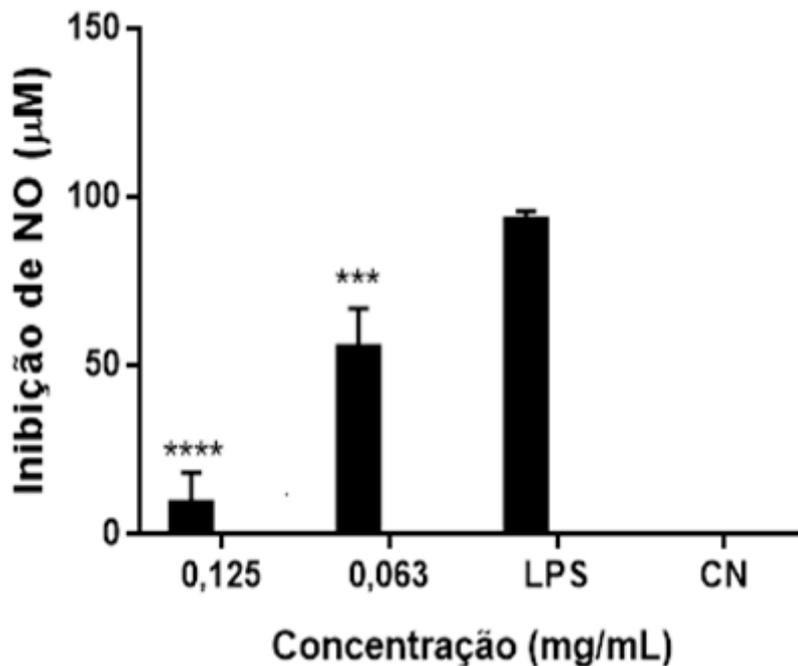
Fonte: Autor (2019)

Para Alves (2007), uma subfração orgânica do extratobruato da *Cynarascalymus*(1mg/mL) foi eficiente, para a produção de NO. Os ácidos cafeoilquínicos e os flavonóides representam os dois principais grupos de constituintes do extrato da alcachofra. Os flavonóides luteolina e cinarosídeo aumentaram a produção da enzima. Comparado com o extrato bruto da *Fridericia platyphylla* as concentrações foram menores e apresentaram inibição na produção de NO.

5.3.3 Determinação da inibição de NO

Por meio de outro experimento, foi determinada a inibição de NO observada na (Figura 12), em que os extratos das folhas *Fridericia platyphylla* foram capazes de inibir a produção de NO na concentração de 0,125mg/mL, sendo que este extrato também inibiu na concentração menor de 0,063mg/mL (p<0,001), sem diferença estatística significativa. A inibição de NO pode estar relacionada com a presença de atividade anti-inflamatória e pode indicar nova abordagem farmacológica para prevenir doenças crônicas como hipertensão, neurodegeneração, doença de Crohn e câncer (NAIK, DIXIT, 2011; NAZAREWICK, DIKALOV, 2013).

Figura 12 -Inibição da produção de NO utilizando extrato das folhas *Fridericia platyphylla* em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c (**p<0,001, ***p<0,0001).



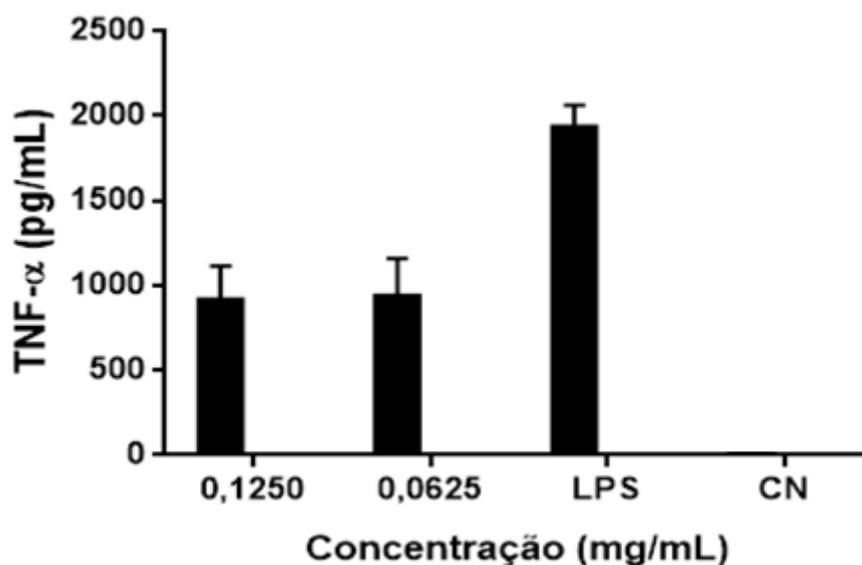
Fonte: Autor (2019)

O extrato lipofílico (200 µg/mL) das folhas de *Arrabidaea chica* mostrou ação anti-inflamatória *in vitro* pelo método que avalia a capacidade de inibição do fator de transcrição nuclear kappa B (NF-κB, do inglês, nuclear factor-κB), um mediador central da resposta imune em seres humanos, que regula a transcrição de genes que codificam várias citocinas pró-inflamatórias, entre outros, e enzimas inflamatórias, como iNOS (CHAGAS, 2016).

5.3.4 Determinação do TNF-α

O mediador TNF-α, atua como um importante alvo terapêutico em uma gama de doenças inflamatórias crônicas e fornecendo um elo importante entre a inflamação e o câncer. O TNF-α pode regular numerosos processos celulares e biológicos, tais como a função imunitária, a diferenciação celular, proliferação, apoptose e metabolismo energético. Está também envolvido na patogênese de várias doenças auto-imunes ou inflamatórias crônicas (VERMA et. al, 2012).

Figura 13: Concentração de fator de necrose tumoral- α liberado no sobrenadante da cultura de macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c. Os macrófagos peritoneais foram colocados em contato com o extrato de folhas de *Fridericia pratyphylla*; como controle positivo foi utilizado o LPS e como controle negativo apenas o meio RPMI (**** $p < 0,0001$).



Fonte: Autor (2019)

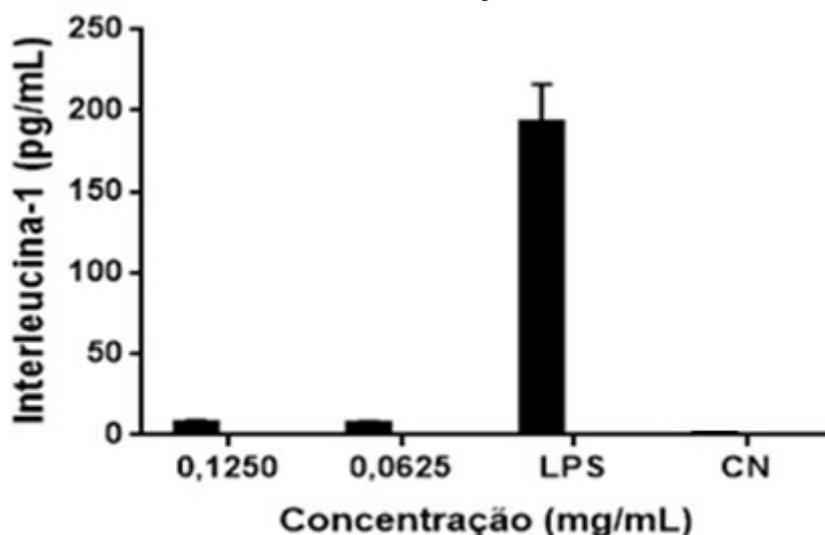
Moraes (2011) avaliou o mecanismo de ação anti-inflamatório do flavonoide isolado da planta *Brosimumacutifolium* na concentração de 100 μ M, promoveram considerável redução nos níveis de TNF- α e PGE 2, quando comparado ao grupo não tratado. Essa redução é importante visto que o TNF- α é um mediador crucial no desencadeamento da resposta pró-inflamatória, levando à transcrição gênica de várias moléculas inflamatórias.

5.3.5 Determinação da interleucina – 1

Nos macrófagos peritoneais murinos, os extratos obtidos das folhas de *Fridericia platyphylla* não foram capazes de inibir a produção interleucina-1 (Figura 14).

IL-1 é uma citocina pró-inflamatória que inicia e propaga a inflamação, principalmente através da indução de uma rede de citocinas e melhorando a infiltração de células inflamatórias locais e aumentando a expressão de moléculas de adesão como leucócitos e células endoteliais. A IL-1 apresenta um papel no desenvolvimento do tumor, especialmente como um fator pró-angiogênese (VORONOV et. al, 2014).

Figura 14 - Concentração de interleucina-1 liberada no sobrenadante da cultura de macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c. Os macrófagos peritoneais foram colocados em contato com o extrato das folhas de *Fridericia platyphylla*; como controle positivo foi utilizado o LPS (lipopolissacarídeo), e como controle negativo apenas o meio RPMI.



Fonte: Autor (2019)

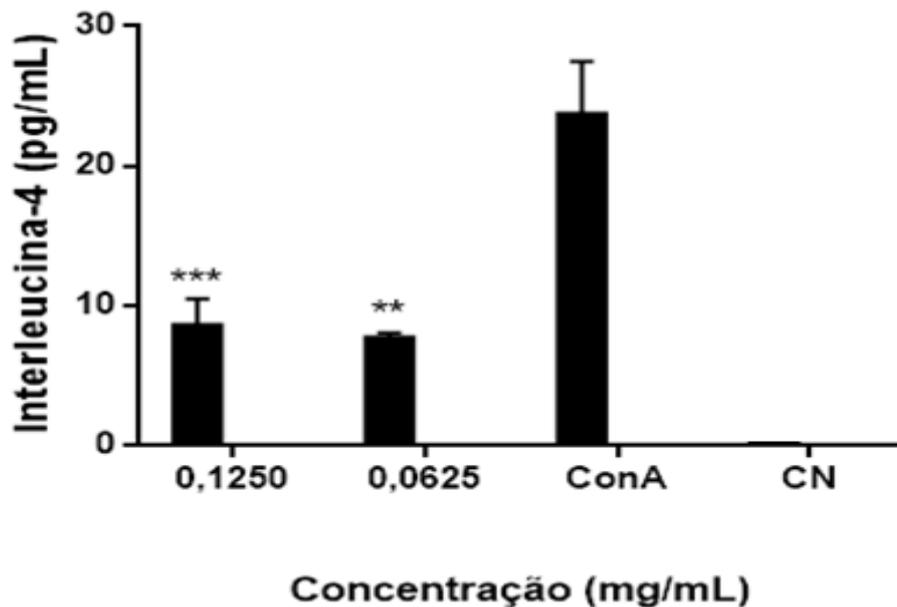
No trabalho de Maia (2015) a interleucina – 1 (IL-1 β) os testes realizados com 4 mg do extrato de *Solanum lycopersicum* apresentou diminuição de 52%. Porém os extratos obtidos das folhas de *Fridericia platyphylla* não foram capazes de inibir a produção interleucina-1.

5.3.6 Determinação da interleucina – 4

Na (figura 15), pode-se observar que houve produção de IL-4 pelo extrato testado, confirmando a sua atividade anti-inflamatória.

A IL-4 é uma citocina anti-inflamatória produzida pelas células T CD4+ ativadas e promove respostas com fenótipo Th2. Isto conduz à produção de outras citocinas anti-inflamatórias e inibe as condições pró-inflamatórias, servindo como um regulador da resposta imune (VAZQUEZ et al., 2015).

Figura 15 - Concentração de interleucina-4 liberada no sobrenadante da cultura de esplenócitos de camundongos Balb/c. Os esplenócitos foram colocados em contato com o extrato de folhas da *Fridericia platyphylla*; como controle positivo foi utilizado o Con-A e como controle negativo apenas o meio RPMI.



Fonte: Autor (2019)

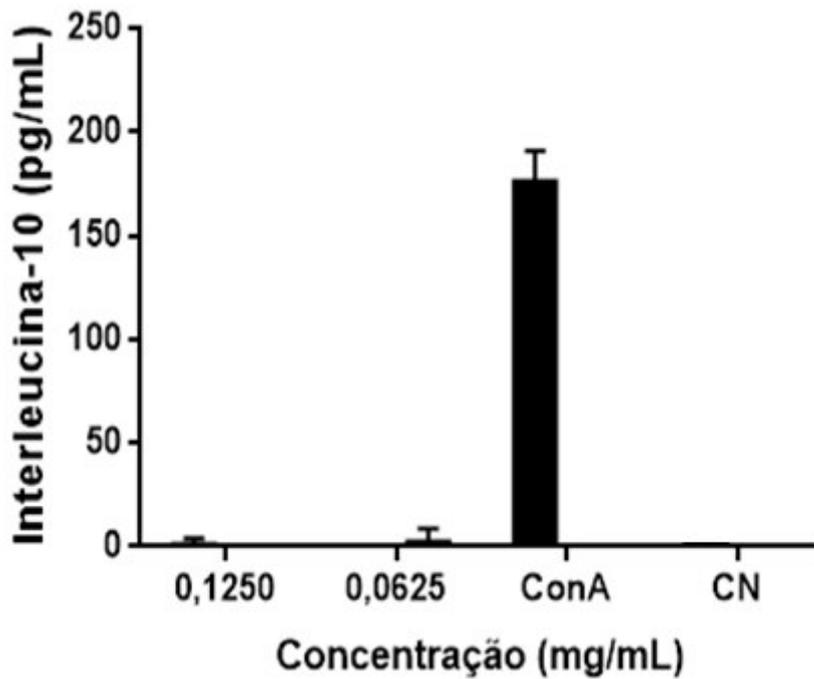
O efeito das citocinas com ação anti-inflamatória, como por exemplo, IL-4, IL-10 (interleucina 10) e IL-13, inibem as respostas inflamatórias e, dessa forma, contribuem para a prevenção da obesidade e diabetes do tipo 2. Dessa forma, elevadas concentrações dessas citocinas são benéficas para a modulação dos mediadores do metabolismo energético (GOMES, 2016). Nos teste realizado com extrato de *Eugenia involucrata* e *Vitisvinifera* foram promissores para a produção o que confirma os testes realizados com a *Fridericia Platyphylla*.

5.3.7 Determinação da interleucina – 10

A IL-10 apresenta características anti-inflamatórias e inibe a resposta imune no local do tumor, e sua relação com a presença de apoptose pode sugerir um aumento da agressividade do tumor, mesmo em estágios iniciais de seu desenvolvimento (FERNANDEZ et al., 2006; BURKHOLDER et al., 2014).

Entretanto, observando a (Figura 16) os extratos da *Fridericiapratyphylla* não foram capazes de produzir IL-10.

Figura 16 - Concentração de interleucina-10 liberada no sobrenadante da cultura de esplenócitos de camundongos Balb/c. Os esplenócitos foram colocados em contato com o extrato de folhas de *Fridericia pratyphylla*; como controle positivo foi utilizado o Con-A e como controle negativo apenas o meio RPMI.

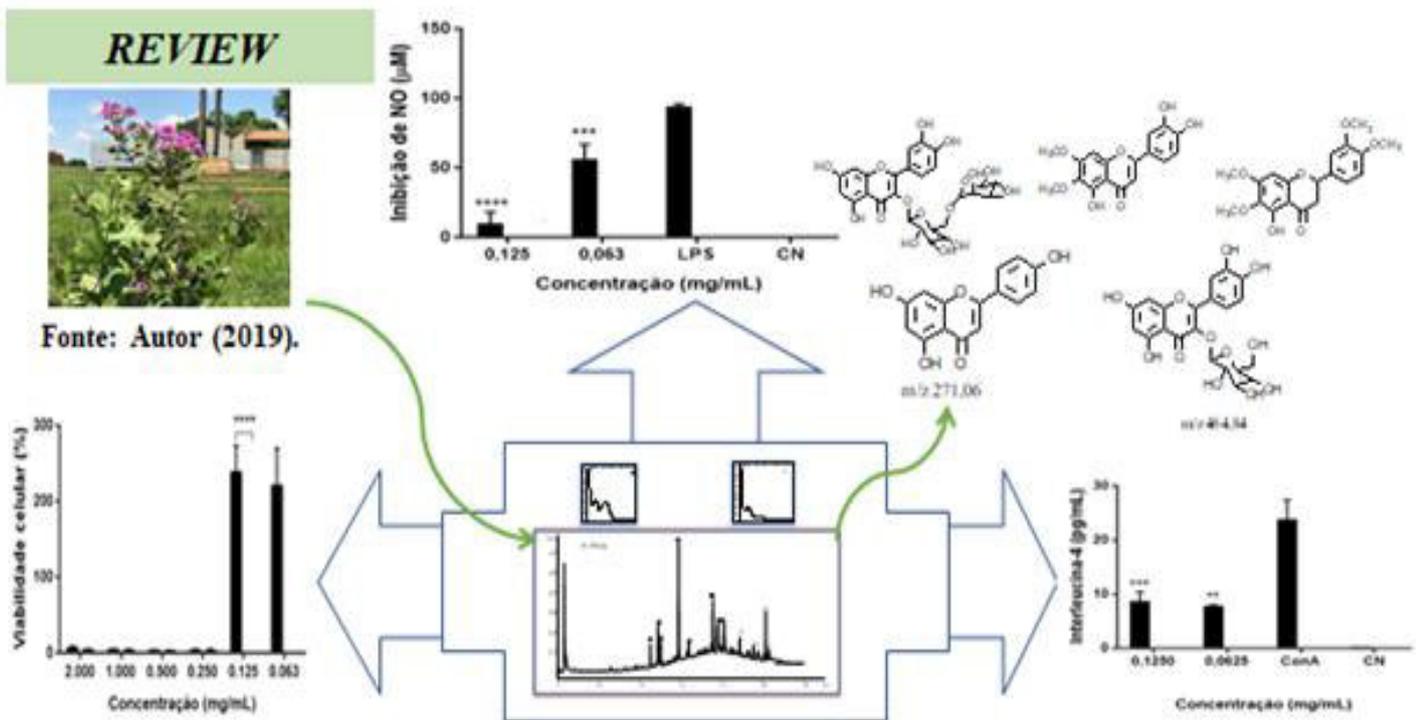


Fonte: Autor (2019)

Nos testes de Burian (2016), os resultados obtidos na determinação da citocina IL-10, na concentrações 100pg/mL de *Alliumsativum* foram capaz de produzir a citocina. Porém o extrato bruto das folhas de *Fridericiapratyphylla* não foram capazes de produzir IL-10.

6 SÍNTESE DE TODO A PESQUISA

O presente trabalho demonstrou que a planta selecionada foi a *F. platyphylla*, o perfil cromatográfico demonstrou diferentes picos com diferentes concentrações e diferente classe, cuja classe majoritária foi a dos flavonoides. Na análise do HPLC-MS, pode se observar que os flavonoides encontrados eram glicosilados e agliconas. Nos testes em vitro as concentrações viáveis para os demais testes foi de 0,063 e 0,125 mg/mL análise realizada pelo teste de MTT, e nos demais teste o extrato demonstrou ação anti-inflamatória pela inibição do óxido nítrico e produção da interleucina – 4. Portanto os resultados são promissores no tratamento da inflamação.



Fonte: Autor (2019)

7 CONCLUSÃO

O extrato de *Fridericia platyphylla* demonstrou efeito anti-inflamatório confirmado pela capacidade de inibir NO e a produção de IL-4. Neste contexto os flavonoides encontrados nesta planta constituem uma alternativa promissora como agentes terapêuticos frente aos processos inflamatórios. Diante desses resultados, estudos bio guiados poderão levar ao isolamento de compostos das folhas que poderão apresentar resultados ainda mais efetivos que o extrato bruto.

REFERÊNCIAS

- ALBERNAZ, L.C.; de PAULA, J.E.; ROMERO, G. A. S; SILVA, M. R. R.; GRELLIER, P.; MAMBU, L.; ESPINDOLA, L.S. Investigation of plant extracts in traditional medicine of the Brazilian Cerrado against protozoans and yeasts. **Journal of Ethnopharmacology**. 131: 116–121. 2010.
- ALCERITO, T.; BARBO, F. E.; NEGRI, G.; SANTOS, D. Y. A. C.; MEDA, C. I.; YOUNG, M. C. M.; CHÁVEZ, D.; BLATT, C. T. T. **Foliar epicuticular wax of *Arrabidaea brachypoda* : flavonoids and antifungal activity**. **Biochemical Systematics and Ecology**, 30: 7, 677-683, 2002.
- ALVES, L.F.; BOTSARIS, A.S. *Cynarascolymus* L. (Alcachofra). **Revista Fitos**, v.3, n.2, p.51-63, 2007.
- BATLOUNI, M. **Anti-inflamatórios não esteroides: Efeitos cardiovasculares, cerebrovasculares e renais**. Arquivo Brasileiro de Cardiologia, 2010.
- BANTIM, F. C. I.; MARIA, S. F.; MARTINS, L. V.; MEIRELES, D.; RODRIGUES, S. L.; PAULO, M. P.; PERON, A. P. Flavonóides: constituição química, ações medicinais e potencial tóxico. **Acta Toxicológica Argentina**(2015) 23 (1): 36-43.
- BRANDÃO, G. C.; KROON, E. G.; DOS SANTOS, J. R.; STEHMANN, J. R.; LOMBARDI, J. A.; OLIVEIRA, A. B. Antiviral activity of *Bignoniaceae* species occurring in the State of Minas Gerais (Brazil). **Letters in Applied Microbiology**, v. 51, n. 4, p. 469-476, 2010.
- BLATT, C. T. T.; DOS SANTOS, M.MD.; SALATINO, A. Flavonoids of *Bignoniaceae* from the “cerrado” and their possible taxonomic significance. **Pl. Syst. Evol.** 210:289-297, 1998.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **O Bioma Cerrado**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>>. Acesso em: 11 maio 2018.
- BRAGA, L. G; BONATO, S. P; COLLINS, H. C. **Fundamentos de cromatografia, Campinas** – SP, Editora da Unicamp, 2006.
- BURKHOLDER, B; HUANG, R.; BURGESS, R.; LUO, S.; JONES, V.S.; ZHANG, W.; LV, Z.; GAO, C.; WANG, B.; WANG, R. Tumor-induced perturbations of cytokines and immune cell networks. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1845, p.182–201, 2014.
- BURIAN, J. P. Efeito imunomodulatório e controle da infecção fúngica do extrato de alho (*Allium sativum* L.) em modelo murino de esporotricose. Dissertação (**Mestrado**) apresentada a Universidade Estadual Paulista. Araraquara-SP, 2016. Disponível em: https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/138189/burian_jp_me_arafcf.pdf?sequence=5&isAllowed=y, Acesso 05 de Maio de 2019.
- CALABRÒ ML, TOMMASINI S, DONATO P, STANCANELLI R, RANERI D, CATANIA S, et al. The rutin/ β -cyclodextrin interactions in fully aqueous solution: spectroscopic studies and biological assays. **J Pharm Biomed Anal**. 2005;36(5):1019-27.

CARVALHO, M. G; DUSSE, L. M. S. A; VIEIRA, L. M. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro-RJ, v. 39, n. 4, p. 343-350, 2003.

CHAGAS, M. S. S. **Potencial Terapêutico da espécie vegetal *Arrabidaea chica* Verlot**. Trabalho de Conclusão de Curso. Fiocruz, Instituto de Tecnologia em Fármacos. Coordenação de Ensino e Capacitação. Rio de Janeiro, 2016

CHEN, T.; STONER, G.D. Inducible nitric oxide synthase expression in N-nitrosomethylbenzylamine (NMBA)-induced rat esophageal tumorigenesis. **Mol. Carcinog.**, v.40, p.232–240, 2004.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, MICHELE, F.; COSTA, SÔNIA S. Flavonoides: Potenciais Agentes Terapêuticos para o Processo Inflamatório. (**Revista**) *Virtual Química*, Rio de Janeiro-RJ, Vol. 1 No. 3, 241-256, 2009.

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

DELGADO, D. D. R; SOUZA, C. S; REIS, L, A; PANTOJA, S. C. S. Levantamento de espécies da família *bignoniaceae* ocorrentes na universidade castelo branco, campus realengo – RJ, REB Volume 8 (3): 299-307, ISSN 1983-7682, Rio de Janeiro – RJ, 2015. Disponível em: <file:///C:/Users/lenivaldo/Downloads/22296-65143-1-PB.pdf>

EBERHARDET, M.K. Reactive oxygen metabolites: chemistry and medical consequences. **Boca Raton: CRC Press**, p.590, 2001.

FERNÁNDEZ, L.L.; ÁLVAREZ-GOYANES I.L.; ARANGO-PRADOA, C.L.; ALCOCER-GONZÁLEZB, J.M.; MOJARRIETA, J.C.; PÉREZ, X.E.; LÓPEZ, O.M.; ODIO, S.F.; RODRÍGUEZ, R.C.; YI, M.E.G.; MARINA, M.V.; GUERRA, R.T.; PADILLA, C.R. Relationship between IL-10 and tumor markers in breast cancer patients. **The Breast**. v. 15, p. 482-489, 2006.

FILHO, G. B. **Patologia geral**. 5ª edição, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro-RJ. 2013

GADELHA, J. A; VASCONCELOS, A. S; SANTIAGO, V. R; JUNIOR, W. P. H; MOREIRA, B. A. A; SOARES, J. E. S; CARVALHO, T. M. J. P. Desenvolvimento de métodos cromatográficos qualitativos para identificação de benzodiazepínicos. **RevInter(Revista) Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 7, n. 3, p. 25-49, ISSN 1984-3577, Outubro de 2014.

GEROLA, L. R.; ISSY, A. M.; OLIVEIRA, C. M. B.; SAKATA, R. K; SALOMÃO, R. Citocinas e Dor, **Revista Brasileira Anestesiologia** , 2011; 61: 2: 255-265

GINER, R. M.; HERNÁNDEZ, V.; RECIO, M.C.; MÁÑEZ, S.; RÍOS, J. L. Effects of naturally occurring dihydroflavonols from *Inulaviscosa* on inflammation and enzymes

involved in the arachidonic acid metabolism. (**Revista**) Elsevier Volume 81, Issue 6, 19 July 2007, Pages 480-488

GOMES, S. F.; SILVA, F. C.; PINHEIRO, V. A. C. Efeito do consumo de frutas ricas em flavonoides sobre mediadores inflamatórios, bioquímicos e antropométricos relacionados ao metabolismo energético. **Nutr. clín. diet. hosp**; 36(3):170-180 DOI: 10.12873/363. 2016.

KAEHLER, M. *Fridericia* in **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB113396>>. Acesso em: 28 Abr. 2019

KASAHARA, T.; TAGO, M. F.; NAKAMURA, K.; TAGO, K.; MASHINO, T. Anti-inflammatory activity of structurally related flavonoids, Apigenin, Luteolin and Fisetin, **International Immunopharmacology** 11 (2011) 1150–1159

KUNDU, J.K.; SURH, Y. Inflammation: Gearing the journey to cancer. **Mutation Res.**, v. 659, p.15-30, 2008.

KOHNO, H.; TAKAHASHI, M.; YASUI, Y.; SUZUKI, R.; MIYAMOTO, S.; KAMANAKA, Y.; NAKA, M.; MARUYAMA, T.; WAKABAYASHI, K.; TANAKA, T. A specific inducible nitric oxide synthase inhibitor, ONO-1714 attenuates inflammation-related large bowel carcinogenesis in male ApcMin/+ mice. **Int. J. Cancer**, v.121, p.506–513, 2007.

JANBAZ KH, SAEED SA, GILANI AH. **Protective effect of rutin on paracetamol- and CCl4-induced hepatotoxicity in rodents**. *Fitoterapia*. 2002;73(7–8):557-63.

LEE, H. J. et al. *In vitro* anti-inflammatory and anti-oxidative effects of Cinnamomum camphora extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v.103, p.208-216, 2006.

LIMA, Maira Conceição Jerônimo de Souza. Análise fitoquímica e avaliação das atividades anti-inflamatória, anti-peçonhenta e citotóxica de extratos aquosos de *Aspidosperma pyrifolium* e *Ipomoea asarifolia*. 2015. 150f. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2015.

MAIA, A. P. S. Atividade anti-inflamatória de extrato fenólico de tomate roxo (*Solanum lycopersicum* L.) em camundongo em modelo de peritonite induzido pelo LPS. Dissertação de (**Mestrado**) apresentado a Faculdade Farmacêutica da Universidade de São Paulo. São Paulo-SP, 2015.

MANTOVANI, A. Inflammation and metastasis. **Nature**. v.457, p.36-37, 2009.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v.454, 436-444, 2008.

MEGUMI, F. T; KEI, N; KENJI, T; TADAHIKO, M; TADASHI, K. Anti-inflammatory activity of structurally related flavonoids, Apigenin, Luteolin and Fisetin, (**Revista**) Esvier - International Immunopharmacology Volume 11, Issue 9, September 2011, Pages 1150-1159
Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567576911001512> acesso: 04 de Maio de 2019.

MILLS, K.H.; MCGUIRK P. Antigen-specific regulatory T cells-their induction and role in infection. **Semin Immunol.**, v.16, p.107-117, 2004.

MORAES, Waldiney Pires. Caracterização do mecanismo de ação antiinflamatória do flavonóide BAS1 isolado da planta *Brosimumacutifolium*. 2011. 90 f. Tese (**Doutorado**) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Belém, 2011. Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular.

NAGEM, T. J. EFEITO DE FLAVONÓIDES NO METABOLISMO.pdf. p. 127–133, 2002.

NAZAREWICK, R.R.; DIKALOV, S.I. Mitochondrial ROS in the prohypertensive immune response. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v.305, 2013.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2016.

NOGUEIRA, Catarine Haidê. **Avaliação da mutagenicidade e da estrogenicidade dos extratos etanólicos padronizados, frações e substâncias isoladas de *Arrabidaea brachypoda* (DC.) Bureau.** 2015.

NORLING, L. V., SERHAN, C. N. **Profiling in resolving inflammatory exudates identifies novel anti-inflammatory and pro-resolving mediators and signals for termination.** J. Intern. Med. 268, 15–24.(2010)

OLIVEIRA, D. P. C. et al . Atividade anti-inflamatória do extrato aquoso de *Arrabidaea chica* sobre o edema induzido por venenos de serpentes amazônicas. **Revista brasileira farmacognosia**, João Pessoa , v. 19, n. 2b, p. 643-649, Junho 2009 . disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2009000400024&lng=en&nrm=iso>. Acesso 04 Maio 2019.

OSTUNI, R.; KRATOCHVILL, F.; MURRAY, P.J.; NATOLI, G. Macrophages and cancer: from mechanisms to therapeutic implications. **Trends in Immunology**, 2015.

PAULETTI, Patrícia Mendonça et al. **Constituintes químicos de *Arrabidaea samyoides* (*Bignoniaceae*): uma contribuição para a pesquisa de bioprospeção da flora paulista.** 2004. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista (UNESP). Campus de Araraquara. Instituto de Química.

RAO, C.V.; INDRANIE, C.; SIMI, B.; MANNING, P.T.; CONNOR, J.R.; REDDY, B.S. Chemopreventive properties of a selective inducible nitric oxide synthase inhibitor in colon carcinogenesis, administered alone or in combination with celecoxib, a selective cyclooxygenase-2 Inhibitor. **Cancer Res.**, v.62, p.165-170, 2002.

ROCHA, Cláudia Q. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Arrabidaea brachypoda* (DC.) Bureau roots. **Journal of ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 396-401, 2011.

ROCHA, C. Q.; QUEIROZ, E. F.; MEIRA, C. S.; MOREIRA, D. R. M.; SOARES, M. B. P.; MARCOURT, L.; VILEGAS, W.; WOLFENDER, J. Dimeric Flavonoids from *Arrabidaea brachypoda* and Assessment of Their Anti- *Trypanosoma cruzi* Activity. **Journal of Natural Products (Print)**, v. 77, p. 1345-1350, 2014.

ROCHA C. Q., et al., Gastroprotective effects of hydroethanolic root extract of *Arrabidaea brachypoda*: Evidences of cytoprotection and isolation of unusual glycosylated polyphenols, **Phytochemistry**, 2016.

ROCHA C. Q. **Extratos padronizados para tratamento de doenças crônicas**, *Arrabidaea spp.* Universidade Estadual Paulista. Araraquara – SP, p. 103. 2013.

RODRIGUES, E.; MENDES, F.R.; NEGRI, G. **Plants indicated by Brazilian Indian to central nervous system disturbances: a bibliographical approach** Current Medicinal Chemistry-Central Nervous System Agents, 6, 211-244, 2006.

ROZATTO, M. R. Determinação da atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos, frações e compostos isolados de *Arrabidaea brachypoda*. Dissertação (**Mestrado**), apresentada a Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara-SP, 2012

SALOMÉ, R. J. **Análise fitoquímica dos princípios ativos, filantina, hipofilantina, e niranina da espécie quebra-pedra (*Phyllanthus amarus* Schumach & Thonn), sob condições de déficit hídrico.** Dissertação (**Mestrado**). Apresentado a USP, Piracicaba – SP, 2007.

SERAFINI M, PELUSO I, RAGUZZINI A. Flavonoids as anti-inflammatory agents. **Proc Nutr Soc** 2010;69:273–8.

VAZQUEZ, M.I.; CATALAN-DIBENE, J.; ZLOTNIK, A. B cells responses and cytokine production are regulated by their immune microenvironment. **Cytokine**, in press, 2015.

VORONOV, E.; CARMI, Y.; APTE, R.N. The role IL-1 in tumor-mediated angiogenesis. **Frontiers in Physiology**, v.5, n.114, p.1-10, 2014.

YANG J, GUO J, YUAN J. In vitro antioxidant properties of rutin. **LWT - Food Sci Technol**. 2008;41(6):1060-6.

ZHANG, J.M, AN J. – Cytokines, inflammation, and pain. **Intitute Anesthesiology Clinic**, University Yuquan Hospital, Beijing - China, 2007, 45(2): 27–37. doi:10.1097/AIA.0b013e318034194e.

