



**UFRJ**  
UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO DE JANEIRO



**instituto de**  
**ciências farmacêuticas**  
Universidade Federal do Rio de Janeiro - Macaé

**ISABELLA SANTOS PASSALINE DE CAMPOS**

**ESTUDO QUÍMICO BIOMONITORADO PELO POTENCIAL ANTI-  
INFLAMATÓRIO *IN VITRO* DO EXTRATO DE *Kielmeyera membranacea***

**MACAÉ, 2022**

ISABELLA SANTOS PASSALINE DE CAMPOS

ESTUDO QUÍMICO BIOMONITORADO PELO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO *IN*  
*VITRO* DO EXTRATO DE *Kielmeyera membranacea*

Trabalho de conclusão de curso (TCC)  
apresentado ao Curso de Farmácia do Centro  
Multidisciplinar UFRJ Macaé, como  
requisito para obtenção do título de  
farmacêutico.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Michelle Frazão Muzitano  
Co-orientador: Dr Marlon Heggdorne de Araújo

**MACAÉ, 2022**

CIP - Catalogação na Publicação

C198

Campos, Isabella Santos Passaline de

Estudo químico biomonitorado pelo potencial anti inflamatório in vitro do extrato de *kielmeyra membranacea* / Isabella Santos Passaline de Campos - Macaé, 2022.  
71 f.

Orientador(a): Michelle Frazão Muzitano.

Coorientador(a): Marlon Heggdorne de Araújo.

Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Farmacêuticas, Bacharel em Farmácia, 2022.

1. Química de produtos naturais. 2. Mediadores da inflamação. 3. Atividade biológica. I. Muzitano, Michelle Frazão, orient. II. Araújo, Marlon Heggdorne de, coorient. III. Título.

CDD 540

Isabella Santos Passaline de Campos

Estudo químico biomonitorado pelo potencial anti-inflamatório *in vitro* do extrato de *Kielmeyera membranacea*

Trabalho de conclusão de curso (TCC) defendido e aprovado como requisito para obtenção do título de farmacêutico.

Macaé, 22 de julho de 2022.

Comissão avaliadora:

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Michelle Frazão Muzitano (Presidente da Banca)  
CM UFRJ-Macaé  
<http://lattes.cnpq.br/6637126351943749>

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Denise Oliveira Guimarães  
CM UFRJ-Macaé  
<http://lattes.cnpq.br/3655111598408217>

Dr. Sanderson Dias Calixto  
Universidade Estadual do Norte Fluminense - UENF  
<http://lattes.cnpq.br/4705348856252126>

*Dedico este trabalho a Deus, meu  
único e eterno amor, salvador e  
consolador.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram no decorrer desta jornada, em especial: a Deus, a quem devo minha vida e a trajetória que tenho percorrido.

Aos meus pais, Priscila Passaline e Eduardo Passaline, pelo amor, apoio e suporte incondicionais, por serem o alicerce de todas as minhas conquistas, por me oferecerem estímulo e forças para seguir perseguindo meus sonhos e por fornecerem toda a estrutura para que eu possa voar, além de serem meus maiores exemplos de fé. Nada que eu escreva conseguirá traduzir minha tamanha gratidão. A minha família que sempre me apoiou em cada escolha e decisão, por toda torcida e suporte mesmo com toda distância. Em especial aos meus avós, tias, tios, irmão, cunhada e meu companheiro, que forneceram os meios necessários para que eu não desistisse deste sonho.

Ao meu coorientador pós-doutorando Marlon Heggdorne que teve papel fundamental na elaboração deste trabalho, com paciência, carinho e muita diversão. Tive o prazer de desfrutar de sua companhia, aprendizado e ensinamentos. Obrigada por todos os conselhos, abraços, coreografias, cafés, conversas, ensinamentos e por ser essa alma de luz. Tenho certeza de que a vida tem coisas incríveis reservadas àqueles que fazem aquilo que amam.

A minha orientadora Prof. Dra. Michele Muzitano por acreditar em mim e me acolher enquanto aluna, por me incentivar em todos os momentos, e fazer eu me sentir em família. Aos meus orientadores em outros projetos, iniciações científicas, monitorias e estágios: Prof. Dr. Cid Pereira, Prof. Dr. Shaft Corrêa, Prof. Dra. Flávia Amorim e Prof. Dr. Vítor Todeschini, por suas contribuições incríveis em minha formação.

A minha assídua leitora, irmã de alma e futura médica, Isabela Ramos, por todo o auxílio e apoio imprescindíveis na realização deste e de outros trabalhos, e por sempre me apoiar e acreditar em tudo que ousou sonhar.

Aos amigos da Farmac Jr. por tudo que construímos e pela amizade que se desenvolveu em consequência da participação nesta empresa júnior, por todos os projetos desenvolvidos, parcerias construídas e pelo legado que esperamos criar. Em especial a minha Diretoria de Projetos e aos meus companheiros.

Aos meus companheiros de jornada, em especial Caroline Oliveira, Geovana Imad, Mayara Santos, Nayara Cecche, Júlia Nogueira, Luiza Ribeiro, Juliana Barros e Natália Marques, por todo o apoio, companheirismo, ombros, choros compartilhados, batalhas vencidas, força e tudo que compartilhamos nestes anos. Obrigada por embarcarem em todos os meus sonhos, como companheiras de residência e de universidade. Vocês se tornaram meu alicerce, minha família,

minha base, meu suporte emocional e físico. Daria a minha vida e o meu coração por cada um de vocês e carregarei um pouco de cada um em minha trajetória. Vocês marcaram minha vida de uma maneira singular e tenho certeza de que serão farmacêuticas incríveis e excepcionais. Winxs, superpoderosas ou rasen shuriken.

A PIBIC-UFRJ pelo fomento desta pesquisa, através da concessão de bolsa de iniciação científica. As minhas companheiras de laboratório, meus sinceros agradecimentos por tamanha cumplicidade e parceria em todos os dias de LPBio, final de semana, feriado e madrugadas, por me acompanharem e auxiliarem no que precisei, Julia Ximenes, Natalie Ximenes e Jessyca Oliveira.

Gostaria, através deste parágrafo, de expressar toda a minha gratidão e apreço a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para que esta tarefa se tornasse uma realidade. Porque pela graça e benevolência do Altíssimo, a Sua vontade prevalece, e todas as suas promessas se cumprem.

## RESUMO

O Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, possui diversas espécies, sendo fonte promissora na busca por substâncias bioativas. Dentre as espécies presentes, o gênero *Kielmeyera* possui bisflavonoides promissores, como a podocarpusflavona e a amentoflavona. Essas substâncias têm sido cada vez mais estudadas e suas evidências etnofarmacológicas confirmadas. As seguintes atividades farmacológicas já foram descritas: antifúngica, antibacteriana, antiviral e anti-hipertensiva. Atrelado a isto, apesar do número de fármacos atualmente utilizados na terapêutica no combate ao processo inflamatório ser considerável, a busca por novas alternativas de tratamento utilizando produtos naturais como fonte de estudo tem sido crescente. Isto se explica, pois, a terapêutica dos fármacos existentes é prejudicada pela presença de efeitos adversos e, portanto, tratamentos menos tóxicos tornam-se desejáveis. O presente estudo visa entender a interação dos bisflavonoides presentes na *K. membranacea* com mediadores inflamatórios, gerando resultados para o futuro do desenvolvimento de fármacos no Brasil. O material previamente coletado foi seco e submetido a maceração com etanol. O extrato etanólico seco redissolvido foi submetido à partição líquido-líquido com n-hexano (HEX) e diclorometano (DCM). As frações que já são identificadas como ativas foram fracionadas empregando cromatografia em coluna clássica utilizando como fase estacionária gel Sephadex LH-20, e como fase móvel um solvente orgânico, o Metanol. As amostras foram avaliadas na concentração de 4, 20 e 100 µg/mL, quanto ao seu potencial inibitório da produção de óxido nítrico (NO), fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e também, quanto ao seu potencial citotóxico pelo método de MTT. O rendimento total das partições obtidas foi de 84,94% e a fração em DCM foi selecionada para prosseguir o estudo por ter apresentado atividade promissora. Através de cromatografia em camada delgada (CCD), foi possível observar a presença de substâncias da classe dos flavonoides e esta foi direcionada ao processo de fracionamento em coluna com Sephadex LH-20. Este processo gerou 10 conjuntos e uma substância isolada, identificada como podocarpusflavona A (PCFA) presente no conjunto 7, que foi confirmada através de HPLC-DAD, sendo esse conjunto comparado ao padrão isolado anteriormente. A partir dos resultados obtidos em cultura de macrófagos, na maior concentração testada (100 µg/mL), foi possível observar significativa inibição de NO, no entanto, o efeito citotóxico pode ter contribuído para esta atividade. Por este motivo, selecionou-se a concentração de 20 µg/mL para continuar os estudos, pois nessa mesma concentração, foi observada a inibição da produção de NO sem causar um efeito citotóxico significativo. A fração em DCM apresentou inibição de 75,66 $\pm$ 1,76% e a PCFA 79,44 $\pm$ 1,14% em relação à produção de NO. Relacionada à inibição da produção de TNF- $\alpha$ , destacam-se a PCFA (33,29 $\pm$  1,20%), conjunto 1 (33,15 $\pm$  2,96%) e o conjunto 9 (30,24 $\pm$  6,51%), novamente na concentração de 20 µg/mL. Uma comparação foi realizada utilizando a apigenina, acacetina e amentoflavona. Os resultados obtidos são promissores e sugerem um possível potencial regulatório da produção de NO e modulação do TNF- $\alpha$  pelo bisflavonoide presente na *K. membranacea*, apresentando um efeito tóxico não significativo nas concentrações intermediárias ativas. Os ensaios realizados tornam factível a proposição da modulação de mediadores inflamatórios contendo Podocarpusflavona A.

Palavras-chave: Inflamação, Bisflavonoides, Mediadores inflamatórios, Produtos Naturais, Restinga de Jurubatiba.



## ABSTRACT

The Restinga de Jurubatiba National Park has several species, being a promising source in the search for bioactive substances. Among the species present, the genus *Kielmeyera* has promising bisflavonoids, such as podocarpus flavone a and amentoflavone. These substances have been increasingly studied and their ethnopharmacological evidence confirmed. The following pharmacological activities have already been described: antifungal, antibacterial, antiviral and antihypertensive. Linked to this, despite the number of drugs currently used in therapy to combat the inflammatory process is considerable, the search for new treatment alternatives using natural products as a source of study has been growing. This is explained because the therapy of existing drugs is impaired by the presence of adverse effects and, therefore, less toxic treatments become desirable. The present study aims to understand the interaction of bisflavonoids present in *K. membranacea* with inflammatory mediators, generating results for the future of drug development in Brazil. The material previously collected was dried and subjected to maceration with ethanol. The redissolved dry ethanol extract was subjected to liquid-liquid partition with n-hexane (HEX) and dichloromethane (DCM). The fractions that are already identified as active were fractionated using classical column chromatography using Sephadex LH-20 gel as stationary phase, and an organic solvent, Methanol, as mobile phase. The samples were evaluated at the concentration of 4, 20 and 100 µg/mL, regarding their inhibitory potential of NO, TNF-α production and also, regarding their cytotoxic potential by the MTT method. The total yield of the obtained partitions was 84.94% and the fraction in DCM was selected to continue the study because it showed promising activity. Through thin layer chromatography (TLC), it was possible to observe the presence of substances of the flavonoid class and this was directed to the fractionation process in a column with Sephadex LH-20. This process generated 10 sets and an isolated substance, identified as podocarpus flavone a (PCFA) present in set 7, which was confirmed by HPLC-DAD, this set being compared with a previously isolated standard. From the results obtained in macrophage culture, at the highest concentration tested (100 µg/mL), it was possible to observe significant NO inhibition, however, the cytotoxic effect may have contributed to this activity. For this reason, the concentration of 20 µg/ml was selected to continue the studies, because at this same concentration, inhibition of NO concentration was observed without causing a significant cytotoxic effect. The DCM fraction showed inhibition of 75.66±1.76% and PCFA 79.44±1.14% in relation to NO production. Related to the inhibition of TNF-α production, PCFA generated (33.29± 1.20%), conjunto 1 (33.15 ± 2.96%) and conjunto 9 (30.24 ± 6, 51%), again at a concentration of 20 µg/mL. A comparison was performed using apigenin, acacetin and amentoflavone. The results obtained are promising and suggest a possible regulatory potential of NO production and modulation of TNF-α by the bisflavonoid present in *K. membranacea*, presenting a non-significant toxic effect at the intermediate concentrations tested. The tests performed make it possible to propose the modulation of inflammatory mediators containing Podocarpusflavone A.

Keywords: Inflammation; Bioflavonoids; Inflammatory Mediators; Natural Products; Jurubatiba National Park;

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Gráfico da origem das pequenas substâncias que estão como medicamentos na atualidade
- Figura 2 Progressão da inflamação aguda para a inflamação crônica
- Figura 3 Interações macrófago-linfócito na inflamação crônica
- Figura 4 Vias de ativação de macrófago e mediadores envolvidos
- Figura 5 Fontes e efeitos do óxido nítrico no processo inflamatório
- Figura 6 Formação do óxido nítrico (NO) pela sintase de óxido nítrico (iNOS)
- Figura 7 Parna da Restinga de Jurubatiba
- Figura 8 Registros Georeferenciados da espécie *K. membranacea* Casar. (Calophyllaceae)
- Figura 9 Imagens da espécie *K. membranacea* Casar. (Calophyllaceae)
- Figura 10 Estrutura química dos bisflavonoides
- Figura 11 Exemplos de variações estruturais dos bisflavonoides
- Figura 12 Esquema da partição líquido/líquido para obtenção das diferentes frações
- Figura 13 Cromatografia em camada delgada (CCD) da fração em diclorometano e subfrações obtidas por Sephadex LH-20
- Figura 14 Perfil Cromatográfico dos conjuntos da fração em diclorometano de *K. membranacea*, evidenciando picos obtidos a 365 nm
- Figura 15 Espectros de UV dos picos majoritários obtidos a 365 nm
- Figura 16 Perfil Cromatográfico da co-injeção do conjunto 7 e da PCFA anteriormente obtido e caracterizado no LP Bio (ARAÚJO, 2019).
- Figura 17 Percentual de inibição da produção de óxido nítrico e efeito citotóxico em Macrófagos RAW 264.7
- Figura 18 Estruturas químicas da Acetina e Apigenina

Figura 19 Percentual de inibição da produção de óxido nítrico e efeito citotóxico em Macrófagos RAW 264.7 comparando a PCFA com a Acacetina, Apigenina e Amentoflavona

Figura 20 Percentual de inibição da produção de TNF- $\alpha$

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1	Porcentagem solúvel do extrato bruto
Tabela 2	Rendimentos das frações
Tabela 3	Rendimento das frações em diclorometano após cromatografia em coluna por Sephadex LH-20
Tabela 4	Efeito do extrato, fração e substâncias de Kilmeyera membranácea na inibição da produção de NO e TNF- $\alpha$ e avaliação da citotoxicidade em macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
ACT	Acetina
AINEs	Anti-inflamatórios não esteroidais
AMF	Amentoflavona
APG	Apigenina
B	Biológicos
CCC	Cromatografia Contra Corrente
CC <sub>50</sub>	Concentração tóxica para 50% das células (µg/mL)
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CLAE-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada um detector de Arranjo de Diodos
COX	Cicloxigenase
CRH	Hormônio Liberador de Corticotrofina
DAMPs	Padrões Moleculares Associado ao Perigo
DCM	Diclorometano
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DMEM	Meio Eagle Modificado por Dulbecco
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
ERO	Espécies reativas de oxigênio
eNOS	Óxido Nítrico Sintase tipo 3

FDA	Food and Drug Administration
H <sub>2</sub> O	Água
IC <sub>50</sub>	A concentração inibitória média é a medida da potência de uma substância de inibir uma substância em relação a uma função biológica
IL	Interleucina
INF- $\gamma$	Interferon gama
iNOS	Óxido Nítrico Sintase tipo 2
IRF	Fatores reguladores de interferon
L-NMMA	Acetato de NG-Metil-L-Arginina
LPS	Lipopolissacarídeos
MeOH	Metanol
MO	Macrófagos
MTT	Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]
N	Produtos Naturais inalterados
NAD	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
NB	Produtos Naturais Botânicos
ND	Derivados de Produtos Naturais
NF- $\kappa\beta$	Factor Nuclear Kappa B
NOS	Óxido Nítrico Sintase
nNOS	Óxido Nítrico Sintase Neuronal
OMS	Organização Mundial da Saúde
PARNA	Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba
PBS	Tampão fosfato-salino

PCFA	Podocarpusflavona A
PGE	Prostaglandina E
Rf	Fator de Retardamento
S	Fármacos Sintáticos
S*	Fármacos Sintéticos cujo Farmacóforo é derivado de Produtos Naturais
SAR	Relação Estrutura/Atividade
SFB	Soro Fetal Bovino
S*/NM	Sintéticos Mímicos com Farmacóforo derivado de Produtos Naturais
S/NM	Sintéticos Mímicos
STAT	Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição
TLR	Toll-like
TFA	Ácido Trifluoroacético
TFG $\beta$	Fator de crescimento transformante beta
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral
V	Vacina

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 PRODUTOS NATURAIS E ATIVIDADE ANTI- INFLAMATÓRIA.....	1
1.2 INFLAMAÇÃO.....	3
1.2.1 INFLAMAÇÃO AGUDA.....	5
1.2.2 INFLAMAÇÃO CRÔNICA .....	5
1.2.3 ÓXIDO NÍTRICO.....	8
1.2.4 FATOR NECROSE TUMORAL (TNF- $\alpha$ ).....	10
1.3 RESTINGA DE JURUBATIBA: ASPECTOS GERAIS .....	11
1.4 FAMÍLIA CALOPHYLLACEAE.....	12
1.5 GÊNERO <i>Kielmeyera</i> .....	13
1.6 ESPÉCIE <i>Kielmeyera membranacea</i> E SEUS METABÓLITOS .....	14
1.6.1 QUÍMICA E DISTRIBUIÇÃO DOS BISFLAVONOIDES.....	15
1.6.2 POTENCIAL BIOLÓGICO DA AMENTOFLAVONA E PODOCARPUSFLAVONA A .....	16
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>18</b>
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	18
<b>3. METODOLOGIA.....</b>	<b>19</b>
3.1 MATERIAL VEGETAL .....	19
3.2 PREPARO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES ORGÂNICAS .....	19
3.3 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS ATIVAS A PARTIR DA FRAÇÃO EM DICLOROMETANO.....	20
3.3.1 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD) .....	20
3.3.2 CROMATOGRAFIA EM FASE LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	20
3.4 ATIVIDADES BIOLÓGICAS .....	20
3.4.1 CULTURA E PREPARAÇÃO DOS ENSAIOS EM MACRÓFAGOS.....	20
3.4.2 ENSAIO DA CAPACIDADE DE INIBIÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) .....	21
3.4.3 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR EM MACRÓFAGOS .....	21
3.4.4 BIOENSAIO COM CÉLULAS L929 E ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE TNF- $\alpha$ POR MACRÓFAGOS .....	22
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	22
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>23</b>



4.1 RENDIMENTOS TOTAIS.....	23
4.2 CROMATOGRAFIA EM COLUNA POR SEPHADEX LH-20 DA FRAÇÃO EM DICLOROMETANO E ANÁLISE POR CCD .....	24
4.3. RENDIMENTOS DAS FRAÇÕES OBTIDAS DO PROCESSO DE CROMATOGRAFIA EM COLUNA SEPHADEX LH-20 DA FRAÇÃO EM DICLOROMETANO DE <i>K. membranacea</i> .....	25
4.4 ANÁLISES POR CLAE-DAD DOS CONJUNTOS 4 A 10.....	25
4.5 ATIVIDADES BIOLÓGICAS <i>IN VITRO</i> .....	29
4.5.1 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM MACRÓFAGOS E EFEITO CITOTÓXICO.....	29
4.5.2 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE TNF- $\alpha$ .....	35
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>38</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>39</b>

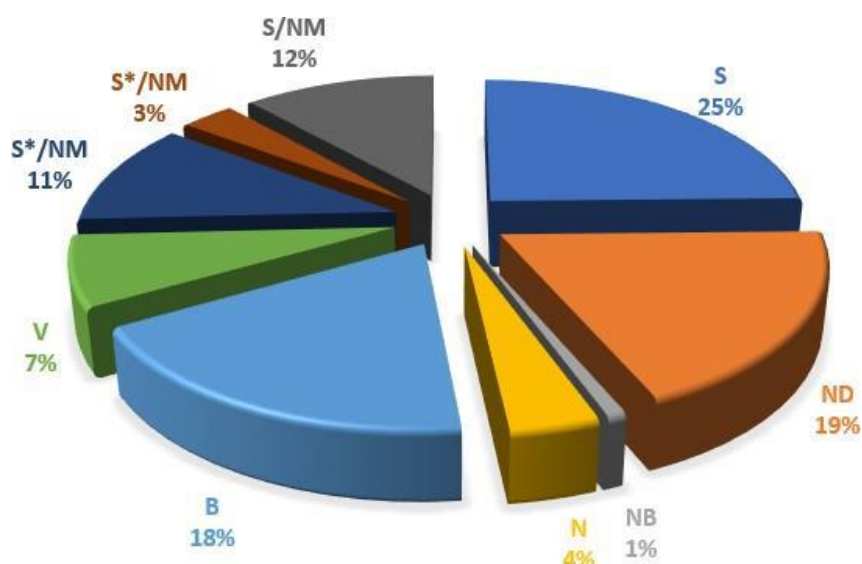
## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 PRODUTOS NATURAIS E ATIVIDADE ANTI- INFLAMATÓRIA

Os produtos naturais são usados ao longo da história, desde tempos imemoriais. A busca por cura e alívio de patologias com a ingestão de ervas e folhas é apontado como um primeiro formato de utilização destes produtos. A história da construção das civilizações Oriental e Ocidental é vasta em exemplificação da utilização de recursos medicinais naturais, seja controlando pragas, seja em mecanismos de defesa, como as civilizações Egípcia, Greco-romana e Chinesa (MACIEL, 2002).

Aplicado a isto, sabe-se que os produtos naturais detêm uma ampla variabilidade química estrutural e funcional, devido à flexibilidade metabólica proveniente à adaptação das espécies a diversas situações de estresse ambiental, que podem ser causadas por fatores químicos, físicos e biológicos. E, conseqüentemente, eles são uma fonte renovável de metabólitos especializados, isto é, verifica-se uma acumulação de metabólitos secundários por parte deles. Assim, possuem um papel determinante na adaptação às condições ambientais, uma vez que os organismos são obrigados a ativar determinados mecanismos bioquímicos e genéticos para sobreviver (RODRIGUES, 2018).

Atualmente, observa-se muitas plantas ou suas partes sendo empregadas clinicamente como fitoterápicos. Além disso, a descoberta de novos fármacos através de plantas viabilizou o isolamento de muitas substâncias que até hoje são utilizadas clinicamente, ou então, serviram como protótipos para a síntese de novos fármacos (FAGOTTI, 2021). Por este motivo, hodiernamente, muitas substâncias naturais são sintetizadas e comercializadas já em escalas maiores. No entanto, de maneira geral, os medicamentos que têm origem natural foram, com o passar dos anos, sendo substituídos progressivamente por análogos ou derivados sintéticos (WALTON, 2019). Segundo Newman e Cragg, em uma revisão de 1981 a 2019, pode-se observar que de todos os medicamentos aprovados pelo Food and Drug Administration (FDA), 24,6% são substâncias totalmente sintéticas, que frequentemente foram encontradas por triagem ou modificação aleatória de um agente existente. Ademais, 75,4% são produtos naturais, produto natural botânico, derivados de um produto natural (por modificação semissintética) ou biológico, sendo geralmente um peptídeo ou proteína grande isolados (**Figura 1**).



**Figura 1. Gráfico da origem das pequenas substâncias que estão como medicamentos na atualidade.** B corresponde ao produto biológico, geralmente um peptídeo ou proteína grande; N corresponde ao produto natural; NB corresponde ao produto natural “botânico” que foi recentemente aprovado; ND representa o derivado de um produto natural; S representa a droga totalmente sintética; S\* representa a droga feita por síntese total, porém seu farmacóforo é/era de um produto natural; V representa a vacina; Modificado de NEWMAN & CRAGG, 2020.

Portanto, citando algumas substâncias isoladas de plantas, tem-se a morfina da *Papaver somniferum* (analgésico) em seguida a aconitina da *Aconitum napellus* e emetina da *Cephaelis ipecacuanha* (amebicida/emético), atropina da *Atropa belladonna* (anticolinérgico), digitoxina da *Digitalis lanata* (cardiotônico), vincristina da *Catharanthus roseus* (antitumoral), reserpina da *Rauwolfia serpentina* (anti-hipertensivo), quinina da *Cinchona officinalis* e artemisinina da *Artemisia annua* (antimaláricos), sendo estes apenas alguns exemplos mais clássicos (FARNSWORTH; MORRIS, 1976). Outro exemplo de medicamento é o ácido acetilsalicílico, conhecido popularmente como “aspirina”, substituto do ácido salicílico, que foi isolado das cascas do “salgueiro-branco” (*Salix alba*). Também torna-se relevante destacar o anti-inflamatório fitoterápico Acheflan®, indicado para o tratamento local da inflamação. Produto composto por 5,0 mg do óleo essencial de erva-baleeira (*Cordia verbenacea*, Boraginaceae), padronizado em 2,3-2,9% do terpeno  $\alpha$ -humuleno. Além desses, ressalta-se o Daflon® 500 mg, medicamento que desempenha ação venotônica e vasoprotetora. Produto composto por fração flavonoídica purificada, sob forma micronizada contendo 450 mg de diosmina e 50 mg de flavonoides titulados em hesperidina (COUTINHO et al., 2009).

Salienta-se que diversos estudos demonstram a importante contribuição das plantas para a descoberta de substâncias com propriedades anti-inflamatórias. Dessa maneira, é possível verificar a descoberta de substâncias com propriedades anti-inflamatórias pertencentes a classes químicas distintas, dentre estas destacam-se terpenos (TOLSTIKOVA et al., 2006; SIMÕES et

al., 2004), taninos (ZHAO et al., 2008), alcaloides (RAMSEWAK et al., 1999; SIMÕES et al., 2004), lignanas (BAN et al., 2002), saponinas (SIMÕES et al., 2004); cumarinas (SÍLVAN et al., 1996), flavonoides (GUERRA et al., 2006), como também bisflavonoides (FAROMBI et al., 2009).

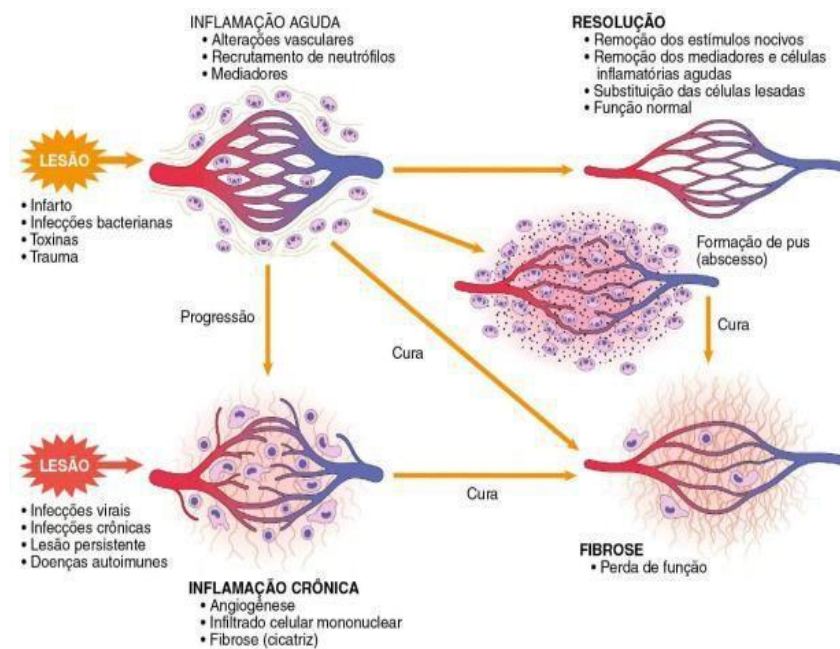
Ademais, a ação antioxidante e anti-inflamatória de folhas de plantas é atribuída principalmente à sua composição rica em compostos fenólicos, inclusive flavonoides. Quimicamente, os compostos fenólicos são substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais. Dentre os tipos de compostos fenólicos existentes, destacam-se os flavonoides, ácidos fenólicos, fenóis simples, cumarinas, taninos, ligninas e tocoferóis (ANGELO; JORGE, 2007; CROFT, 1998). Estes compostos possuem importante potencial antioxidante, principalmente devido a sua estrutura, ideal para o sequestro de radicais livres, no qual os polifenóis podem evitar reações em cadeia (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; DAI; MUMPER, 2010; HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002). A atividade antioxidante dos compostos fenólicos, inclusive dos flavonoides, depende do número de hidroxilas em sua estrutura e de sua interação com biomembranas (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

## 1.2 INFLAMAÇÃO

A inflamação, processo envolvido em diversas doenças, é uma resposta protetora que envolve células, vasos sanguíneos, proteínas e outros mediadores. Esta resposta está destinada a eliminar a causa inicial da lesão celular, bem como as células e tecidos necróticos resultantes da lesão original e iniciar o processo de reparo. As manifestações externas da inflamação, chamadas de sinais cardinais são: calor, rubor, inchaço, dor e perda de função (KUMAR et al., 2013). Os quatro primeiros sinais foram descritos há mais de 2.000 anos por Celsus, um enciclopedista romano. No século XIX, o quinto sinal foi adicionado por Virchow, conhecido como o pai da patologia moderna (KUMAR et al., 2013). A resposta inflamatória pode ser chamada como um evento orquestrado onde as células e mediadores trabalham em conjunto para neutralizar e eliminar os estímulos nocivos, a fim de possibilitar a manutenção da homeostase. Cada estímulo específico provoca um padrão característico de resposta que, mesmo com toda diversidade e complexidade dos mediadores químicos, apresentam variação relativamente pequena (CARVALHO, 2004).

Diversos tipos de substâncias e células exercem papéis importantes na inflamação. Entre estas, encontram-se as proteínas plasmáticas, os leucócitos, as células das paredes vasculares,

as células da matriz extracelular do tecido conjuntivo circundante (KUMAR et al. 2008). A interação de mediadores inflamatórios, juntos ou em sequência, com componentes celulares e vasculares influencia a duração e evolução da resposta inflamatória (ROBBINS et al., 2001). Durante o processo inflamatório podem ocorrer reações de rápida instalação e curta duração que caracterizam a inflamação aguda, ou reações de início lento e que duram por mais tempo que caracterizam a inflamação crônica (KUMAR et al., 2013). Dessa forma, a inflamação aguda pode progredir para inflamação crônica, e essa transição ocorre quando a resposta aguda não pode ser resolvida, devido à persistência do agente lesivo ou por causa da interferência com o processo normal de cura (**Figura 2**) (ROBBIN, 2013).



**Figura 2 – Progressão da inflamação aguda para a inflamação crônica.** Adaptado de ROBBIN, 2013.

O tratamento da inflamação com analgésicos, anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) e corticosteroides nos faz enfrentar uma nova era de pessoas apresentando sintomas ocasionados pelo abuso de analgésicos e seus efeitos hostis, como desconforto gástrico, erosão gástrica e reações de hipersensibilidade (SANTANGELO et al., 2007). O progresso crescente de descobertas de fármacos sintéticos que possuem efeitos adversos possibilita o momento necessário para considerar as plantas como fontes de medicamentos. Este esforço acelerou a corrida global para coletar as plantas medicinais que têm efeitos benéficos, e avaliá-las farmacologicamente a nível de substâncias potencialmente ativas.

### **1.2.1 INFLAMAÇÃO AGUDA**

A inflamação aguda é de início rápido e de curta duração, podendo perdurar de poucos minutos a poucos dias, e caracteriza-se pela exsudação de líquido e proteínas plasmáticas, e acúmulo de leucócitos, predominantemente neutrófilos (KUMARI et al., 2011). A primeira etapa do processo inflamatório agudo é uma resposta vascular com a hiperemia e aumento da permeabilidade da parede dos vasos. Nesta etapa, inicialmente ocorre o reconhecimento pelos macrófagos teciduais de padrões moleculares associados à patógenos. A interação descrita leva a ativação de vias de sinais intracelulares que resultam na produção de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e interleucina 1 (IL-1), bem como diversas quimiocinas e também na ativação do factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) envolvido na cascata de produção de óxido nítrico (NO). Estas citocinas atuam nas células endoteliais, levando ao aumento de permeabilidade e à expressão de moléculas de adesão (SZABÓ, 2000; RANG et al., 2003). O aumento do calibre vascular resulta na elevação do fluxo sanguíneo e as alterações nas paredes vasculares permitem que as proteínas plasmáticas deixem a circulação. Além disso, as células endoteliais levam ao aumento de adesão dos leucócitos e sua migração através das paredes dos vasos (KUMARI et al., 2011; ALESSANDRI et al., 2013).

Para além do supracitado, a inflamação aguda é normalmente controlada e autolimitada. As células e mediadores são ativados somente em resposta à lesão e como têm vida curta, são degradados ou se tornam inativos quando acontece a eliminação do agente agressor. A resolução da inflamação aguda envolve então a neutralização, decomposição ou degradação enzimática dos mediadores químicos, normalização vascular, eliminação da emigração de leucócitos, com a eliminação por apoptose dos neutrófilos extravasados. Então, os leucócitos começam a produzir mediadores que inibem a inflamação. Em seguida, a drenagem linfática e ingestão das sobras necróticas pelos macrófagos geram depuração do edema, das células inflamatórias e dos detritos do local. Nesse tipo de inflamação, além de ocorrer a restauração da normalidade completa do tecido, quando não há nenhum dano mais profundo, também pode ocorrer a cicatrização e reconstituição tecidual ou cura por fibrose. Todavia, quando a destruição tecidual é significativa, ela pode evoluir para a inflamação crônica (KUMAR et al., 2013).

### **1.2.2 INFLAMAÇÃO CRÔNICA**

A inflamação crônica é de duração prolongada, na qual a inflamação ativa, a destruição tecidual e reparação ocorrem ao mesmo tempo. As inflamações crônicas podem ser resultantes

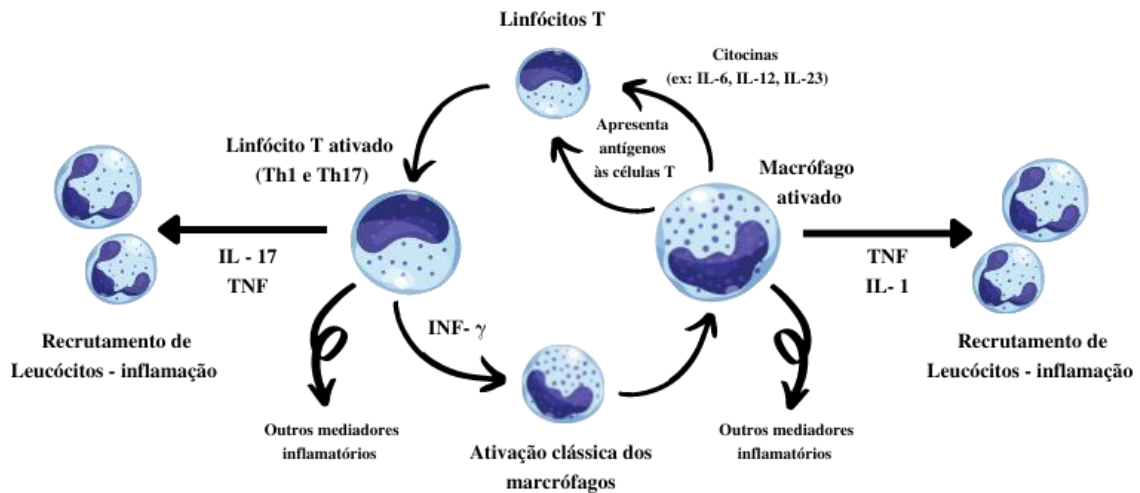
de infecções decorrentes de micro-organismos difíceis de eliminar, mas também de doenças inflamatórias imunomediadas e de exposição prolongada a agentes tóxicos. Com relação aos processos celulares crônicos, pode-se verificar a infiltração tecidual por células mononucleares, incluindo macrófagos, linfócitos e plasmócitos (KUMAR et al., 2008).

Os macrófagos possuem papel central na inflamação crônica, estas células teciduais são derivadas de monócitos do sangue após sua emigração da corrente sanguínea. Estes, podem ser ativados, levando ao aumento do tamanho celular, aumento do conteúdo de enzimas lisossômicas, metabolismo mais ativo, e maior capacidade de destruição dos organismos fagocitados. Estas células podem também ser ativadas pela interação de endotoxinas bacterianas (por exemplo, os lipopolissacarídeos, chamados de LPS) e outros compostos microbianos com receptores encontrados na superfície do macrófago, como os receptores TLR (Toll-like) (LUSTER et al., 2005).

Essas interações levam a ativação de cascatas de sinalização que geram a ativação de fatores de transcrição como o NF- $\kappa$ B e membros da família dos fatores reguladores de interferon (IRF), acarretando a produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL12, IL1 $\beta$ , IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$  (KOPP e MEDZHITOV, 1999). As TLRs também identificam moléculas endógenas denominadas padrões moleculares associado ao perigo (DAMPs), que são liberadas durante o momento de estresse e lesão celular. Este reconhecimento é essencial nas respostas inflamatórias do tipo estéril não infecciosa, característica de processos como trauma e isquemia (KONO e ROCK, 2008; MARTINON et al., 2009). Quando ativados, os macrófagos produzem vários produtos ativos na inflamação que resultam em lesão tecidual e fibrose. Entre estes produtos, encontram-se também as proteases, as espécies reativas de oxigênio, o óxido nítrico, e os eicosanoides (VILLAGRAN et al., 2021).

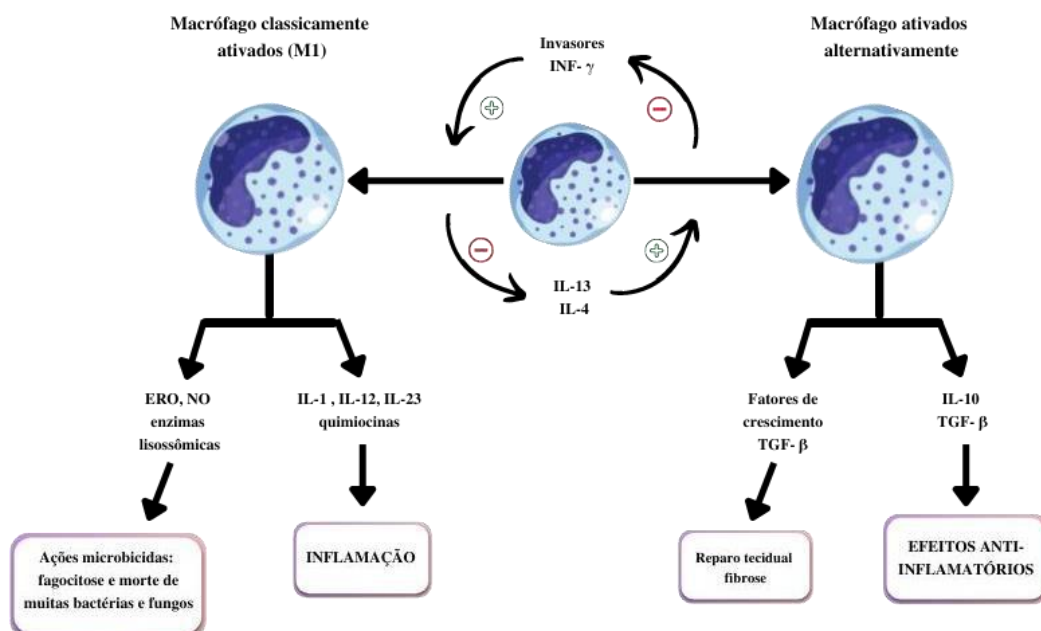
Os linfócitos T são mobilizados nas reações imunológicas mediadas por anticorpos e células, mas também, na inflamação sem mediação imune (DA SILVA et al., 2003). Linfócitos e macrófagos interagem de modo bidirecional. Os macrófagos apresentam antígenos aos linfócitos T, e pela liberação de citocinas (IL-12, IL-6 e IL-23) promovem a ativação deste linfócito, bem como liberação de TNF e IL-1, que também contribuem no recrutamento de leucócitos. O linfócito ativado produz citocinas, entre elas o INF- $\gamma$  sendo um importante ativador de macrófagos que promove mais apresentação de antígeno e secreção de mais citocinas. Ademais, as células produtoras de IL-17, as T helper 17 (Th17), são uma linhagem de células T CD4+ diferentes, conhecidas T helper 1 (Th1) e T helper 2 (Th2), com uma contribuição maior na patogenia de várias doenças. Além da produção de citocinas (IL-17A,

IL-22, fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), IL-6), estão, também, envolvidas no recrutamento de outros linfócitos (PACHECO, 2011) (**Figura 3**).



**Figura 3 – Interações macrófago-linfócito na inflamação crônica.**

Sabe-se então, que os plasmócitos se desenvolvem a partir de células B ativadas, passando a produzir anticorpos direcionados a antígenos persistentes no local da inflamação (ROBBINS et al., 2001; LUSTER et al., 2005). Os macrófagos classicamente ativados produzem enzimas lisossômicas, NO e espécies reativas de oxigênio (ERO), todas aumentando sua habilidade em destruir organismos fagocitados e secretando citocinas que estimulam a inflamação. Ao contrário, o papel dos macrófagos ativados alternativamente é exercido no reparo tecidual (**Figura 4**) (KUMAR, 2008).



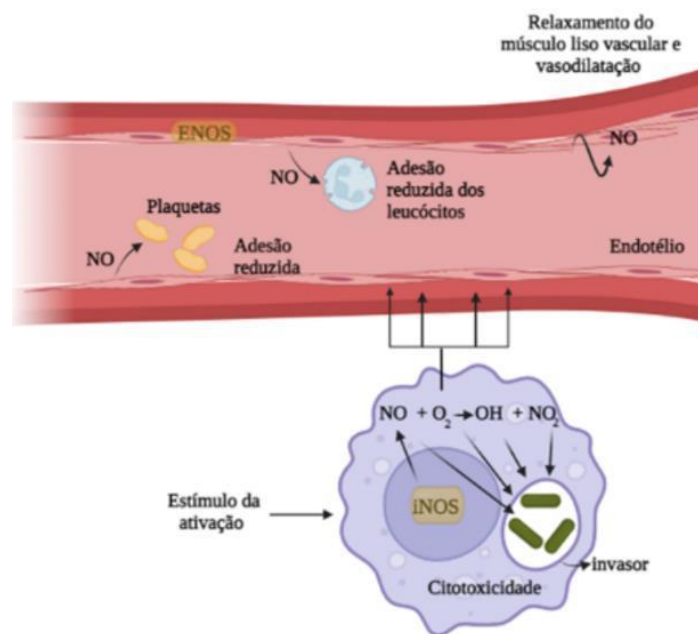
**Figura 4 - Vias de ativação de macrófago e mediadores envolvidos na inflamação crônica.**



Considerando que a resposta inflamatória está envolvida na patogênese de uma ampla gama de doenças que afligem a sociedade, o mecanismo de ação destas substâncias tem sido alvo de muitas pesquisas com a finalidade de estabelecer alternativas farmacológicas mais eficazes para a terapia anti-inflamatória. Logo, os principais mediadores químicos da inflamação são as aminas vasoativas (histamina e serotonina), proteínas plasmáticas (do sistema complemento, cinina e de coagulação), metabólitos do ácido araquidônico (prostaglandinas, leucotrienos e lipoxinas), citocinas (fator de necrose tumoral e interleucina 1), quimiocinas e o óxido nítrico (DIAS et al., 2021).

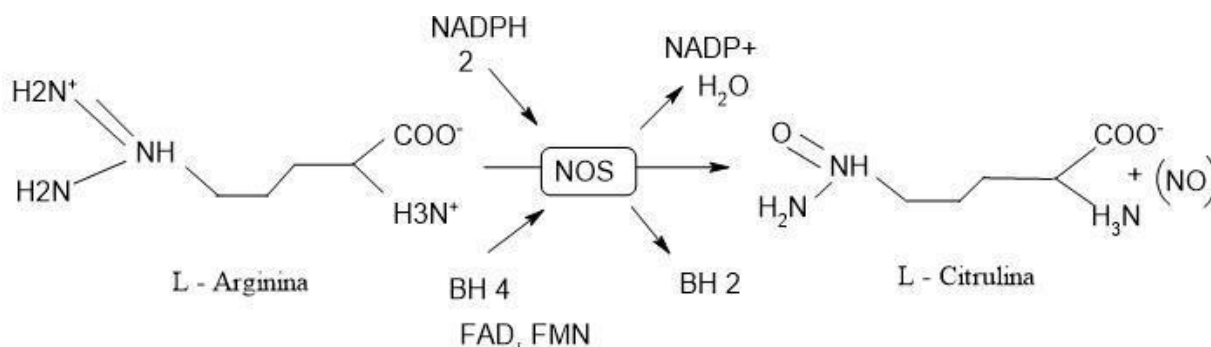
### 1.2.3 ÓXIDO NÍTRICO

O óxido nítrico (NO) é um dos principais mediadores químicos da inflamação e existem três formas deste, com diferentes atribuições nos tecidos. Além disso, ele é um gás radical livre, solúvel e de curta duração, produzido por vários tipos celulares, sendo capaz de mediar diferentes funções (PINTO, 2021), como observado na **Figura 5**.



**Figura 5 - Fontes e efeitos do óxido nítrico no processo inflamatório.** Criado com BioRender.com.

Em macrófagos ativados por citocinas e/ou compostos microbianos, o NO é um derivado do aminoácido L-arginina produzido pela atividade enzimática do óxido nítrico sintase induzida (iNOS ou NOS2) (MACMICKING et al., 1997), como explicitada na **Figura 6**.



**Figura 6 – Formação do óxido nítrico (NO) pela sintase de óxido nítrico (iNOS).** Adaptado de (COSTA, 1999).

Como acima citado, existem três isoformas de NOS com diferentes atribuições nos tecidos. O tipo I (nNOS) é uma NOS neuronal constitutivamente expressa, não apresentando papel significativo na inflamação. O tipo II (iNOS), é uma enzima induzível, expressa na maioria das células inflamatórias, entre estas o macrófago, quando expostos a produtos microbianos (ex: LPS) ou à citocinas pró-inflamatórias IL-1, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . O tipo III (eNOS) é uma NOS vascular sintetizada constitutivamente, encontrada principalmente no endotélio.

Sob análise específica essas isoformas, é relevante explicitar que tanto a nNOS quanto a eNOS são constitutivamente expressas e cálcio-dependente, enquanto a iNOS é cálcio independente e tem sua expressão induzida por mediadores químicos. Sobre o método de ação, é essencial destacar que a NOS ativa é responsável pela conversão de L-arginina em NO e L-citrulina na presença de NADPH e  $\text{O}_2$  como co-substrato (RANG et al., 2003; KORHONEN et al., 2005; KUMAR et al., 2008). Sobre efeitos na inflamação, o NO exerce muitas funções, como no desempenho, principalmente, de uma ação pró-inflamatória. Este efeito é possibilitado pela promoção do relaxamento vascular (vasodilatação) e pela ação citotóxica (CERQUEIRA, et al. 2002).

Além disso, ele também desempenha algumas ações anti-inflamatórias. Essa característica é explicada mediante a liberação dessa substância pelas células endoteliais, o que bloqueia a adesão dos neutrófilos e plaquetas, assim como a agregação plaquetária (RANG et al., 2003; KUMAR et al., 2008). Dessa maneira, o NO pode reagir com moléculas orgânicas (oxigênio, superóxido e metais de transição), com estruturas do ácido desoxirribonucleico (DNA) ou, ainda, com proteínas (BOGDAN, 2001). Entretanto, a produção excessiva de NO durante a inflamação aguda ou crônica pode gerar problemas, como mudanças fisiopatológicas no tecido, resultando em dano ao organismo (LASKIN et al., 1994). Sendo assim, é crucial dissertar que um limite estreito de concentração existe entre a não-toxidez às células do hospedeiro e a toxidez para exercer ação antimicrobiana (GUZIK et al., 2003).

### 1.2.4 FATOR NECROSE TUMORAL (TNF- $\alpha$ )

O fator de necrose tumoral, conhecido como TNF- $\alpha$ , foi identificado em 1975 (CARSWELL et al., 1975) como uma molécula induzida por citotoxina que causava necrose de tumores *in vitro*. Logo depois, ele foi purificado e demonstrou ser significativamente tóxico para linhagem de fibroblastos L929 (SENGER e MCDERMOTT, 2014). Tipo celular que é predominantemente encontrado em tecidos conectivos perdidos ou danificados, e também desempenham importante papel nos mecanismos de reparação tecidual e na fase de remodelamento dos tecidos (PAN et al., 2006).

O TNF é produzida predominantemente em macrófagos ativados e linfócitos T como pró-TNF que é expresso na membrana plasmática onde pode sofrer clivagem pela ação da metaloproteinase (TACE), uma enzima conversora de TNF- $\alpha$ , resultando na liberação da sua forma solúvel no meio extracelular (BRADLEY, 2008; SENGER e MCDERMOTT, 2014). Tanto a TNF transmembrana quanto o solúvel ligam-se a dois receptores transmembranas, TNFR1 e TNFR2. A interação resultante pode desencadear vias de sinalização apoptóticas, mas também vias relacionadas ao estabelecimento do processo inflamatório com a ativação lipoxigenase-5 e fosfolipase A2 que resultam na produção de ácido araquidônico o que levará a formação de leucotrienos pró-inflamatórios pela ação da lipoxigenase e também de prostaglandinas, tromboxano e prostaciclina pela oxidação desta molécula pela ciclooxigenase (COX-1 e COX-2) (SENGER e MCDERMOTT, 2014).

Sobre o método de ação, podemos salientar que o TNF-  $\alpha$  age nas células endoteliais promovendo vasodilatação e estimulando também a secreção de um grupo de citocinas (quimioquinas) que têm ação quimiotática - isto é - promove um processo inflamatório local sobre os leucócitos, capacitando o combate a quadros infecciosos. Já no âmbito do sistema nervoso central, age no hipotálamo como pirógeno endógeno induzindo febre. Já na ordem de órgãos viscerais, tem ação estimulante no fígado que gera a produção das proteínas da fase aguda do processo inflamatório e, também, de fibrinogênio. Além disso, o TNF- $\alpha$  também promove erosão óssea. Dessa maneira, ocorre que sua ação consiste, diretamente, na diferenciação e maturação dos osteoclastos. Caso haja de maneira indireta, ele expõe a matriz óssea (VITALE e RIBEIRO, 2007).

Logo, de perspectiva fisiológica, o TNF é relevante para a execução da resposta à infecção. Sob esse viés, é necessário destacar que sua produção inadequada ou excessiva pode ser prejudicial ao organismo (BRADLEY, 2008). A título de ilustração, altas concentrações de TNF podem ser encontradas em condições inflamatórias agudas e crônicas (como trauma,

septicemia, infecção, artrite reumatoide). Logo, destaca-se que a inibição da produção ou da ação do TNF-  $\alpha$  pode piorar o prognóstico em pacientes em situações delicadas, como com abscessos e infecções granulomatosas. No entanto, esta estratégia é altamente benéfica no caso de doenças inflamatórias crônicas (POPA et al, 2007).

Portanto, considerando a relevância de plantas como fontes alternativas para a obtenção de novos constituintes anti-inflamatórios bioativos, envolvidos com os mediadores acima citados, esse trabalho propõe a investigação de uma espécie vegetal ocorrente na Restinga de Jurubatiba. A diversidade das condições físicas desta região dá origem a uma grande variedade de habitats, os quais são colonizadas por comunidades vegetais também bastante diversificadas (KELECOM et al., 2002), com uma riqueza e complexidade estrutural promissora, o que justifica a escolha de espécie vegetal pertencente a esta região para a realização destes estudos.

### 1.3 RESTINGA DE JURUBATIBA: ASPECTOS GERAIS

Dentre as muitas regiões de grande riqueza natural no Brasil, a região norte do estado do Rio de Janeiro apresenta características climáticas e ambientais que favorecem o estabelecimento de biotas variadas, integrando diversos ecossistemas como restingas, lagoas costeiras, manguezais, baías, florestas, entre outros (PALMA-SILVA et al., 2006), como o Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba (PARNA Jurubatiba), o qual tem tido seu conhecimento sobre a flora e fauna acumulados ao longo das últimas décadas. Ele abrange as planícies fluviais e marinhas do litoral dos municípios de Quissamã, Carapebus e Macaé. Compreende uma faixa de orla marítima com 14.860 Hectares de área e 44 km de extensão ao longo da praia, com cerca de 2 km de largura na extremidade oeste, ao lado da lagoa Cabiúnas e 4,8 km de largura na extremidade leste (canal de Ubatuba), com um perímetro de 123 km (Figura 7).



**Figura 7. PARNA da Restinga de Jurubatiba.** (A) Demonstrando as planícies fluviais. (B) Demonstrando a extensão da praia. Retirado do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - Ministério do Meio Ambiente.

As restingas possuem uma grande biodiversidade, e no Brasil elas recobrem em torno de 79% da zona costeira. Essa biodiversidade está ligada a uma combinação de fatores físicos e químicos destas regiões, tais como: elevada temperatura, salinidade, grande deposição de sal e alta exposição à luminosidade (COGLIATTI-CARVALHO et al., 2001). Essas condições originam uma grande diversidade de habitats que são colonizados por uma grande variedade de animais, micro-organismos e comunidades vegetais (AMARAL et al., 2013). E dentro da comunidade vegetal, diferentes espécies têm sido alvo de estudos, por grupos de pesquisadores da UFRJ e outras universidades, nas mais diversas áreas de conhecimento.

Alguns exemplos se fazem relevantes no grupo de pesquisa do qual faço parte, como o estudo do extrato diclorometano da *Kielmeyera membranacea* e *Eremanthus crotonoides* no tratamento de *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium tuberculosis*, através da inibição de óxido nítrico e fator de necrose tumoral (HEGGDORNE et al., 2021), como também a pesquisa focada na *Ocotea notata*, utilizando sua fração hexânica para testar sua atuação na imunomodulação e atividade antimicobacteriana (COSTA et al., 2021). Ademais, a *Humiria balsamifera*, *Tapirira guianensis*, entre outras diversas espécies, têm sido pesquisadas com suas atuações vasodilatadoras e inibidoras da mieloperoxidase (CALASSARA et al., 2020), como também sua inibição de óxido nítrico e fator de necrose tumoral, aplicadas a imunomodulação correlacionadas aos resultados de macrófagos estimulados com LPS (OLIVEIRA et al., 2021). No Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba já foram registradas 618 espécies vasculares, que estão distribuídas em 381 gêneros e 120 famílias. Dentre algumas das famílias de espécies vegetais que compõem a restinga de Jurubatiba encontram-se Asteraceae, Myrtaceae, Rubiaceae, Bromeliaceae e Calophyllaceae, da qual pertence a espécie *Kielmeyera*. (KELECOM, et al., 2002).

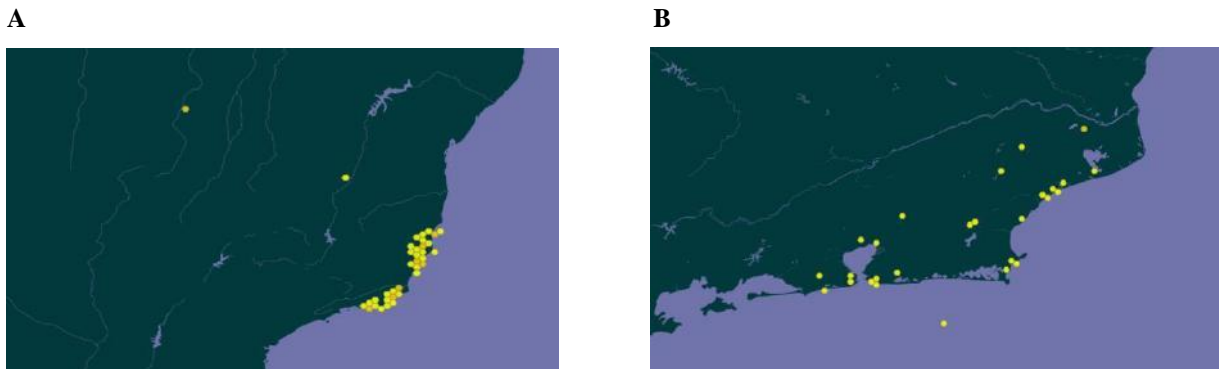
#### **1.4 FAMÍLIA CALOPHYLLACEAE**

A família Calophyllaceae é composta por 14 gêneros e cerca de 460 espécies, organizadas em duas tribos: Calophylleae, com distribuição pantropical, e Endodesmieae, restrita à África (STEVENS, 2001). No Brasil, a família é representada por sete gêneros e 87 espécies (~19% das spp. da família) (BFG 2015; BFG 2018; Trad & Cabral 2020), distribuída em todas as regiões, domínios fitogeográficos e estados, com exceção dos estados do Ceará, Paraíba, Rio Grande do Norte e Rio Grande do Sul. Essa família apresenta uma distribuição mundial, predominando-se nos paleotrópicos.

Essas plantas têm hábito arbóreo-arbustivo e possuem grande importância do ponto de vista etnobotânico e econômico devido ao fornecimento de madeira de boa qualidade, e também ecológico. Alguns gêneros são utilizados como plantas medicinais e têm crescido ao longo dos anos as descobertas nas suas propriedades. Essas plantas estão inseridas no clado das Rosídeas que compreende cerca de 70.000 das espécies de angiospermas, é pertencente à Malpighiales, uma das maiores e mais diversas ordens deste clado, dentro do grupo dos clusioides (HERBÁRIO VIRTUAL, 2021).

### 1.5 GÊNERO *Kielmeyera*

O gênero *Kielmeyera* pertence à família Calophyllaceae e possuem cerca de 47 espécies diferentes, as quais são encontradas na América do Sul, sendo 45 delas nativas da flora brasileira, como por exemplo a *K. membranacea*, comum em vários estados, porém mais presente nos estados do Rio de Janeiro, sendo encontrada por exemplo no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba (**Figura 8**).

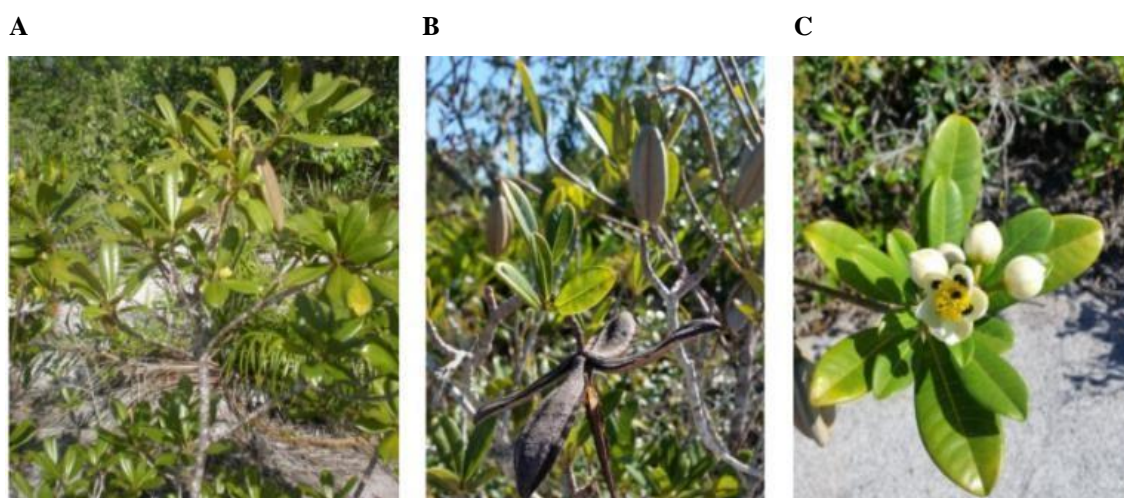


**Figura 8.** Registros Georeferenciados da espécie *K. membranacea* Casar (Calophyllaceae). (A) Imagem ampliada do Brasil. (B) Imagem aplicada ao estado do Rio de Janeiro. Retirado de GBIF Secretariat, 2021.

Espécies do gênero *Kielmeyera* têm sido descritas com o uso popular para diversas infecções, por exemplo: extrato etanólico das folhas da espécie *Kielmeyera neglecta* apresentou atividade contra as cepas resistentes de *Enterococcus faecalis* (ATCC 51299) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 43300) (SOUSA et al., 2012); extrato em diclorometano a partir das folhas de *Kielmeyera coriacea* apresentou atividade antifúngica contra *Cladosporium cucumerinum* e *Candida albicans* (CORTEZ et al., 1998). Para a espécie *Kielmeyera membranacea*, estudos sobre elas avançam e informações são respaldadas por evidências etnofarmacológicas, sendo alguns destes de aspectos botânicos (CORREIA; LIMA; SILVA; 2013), prosseguindo também para os estudos voltados para a atividade antimicobacteriana (HEGGDORNE, 2021).

## 1.6 ESPÉCIE *Kielmeyera membranacea* E SEUS METABÓLITOS

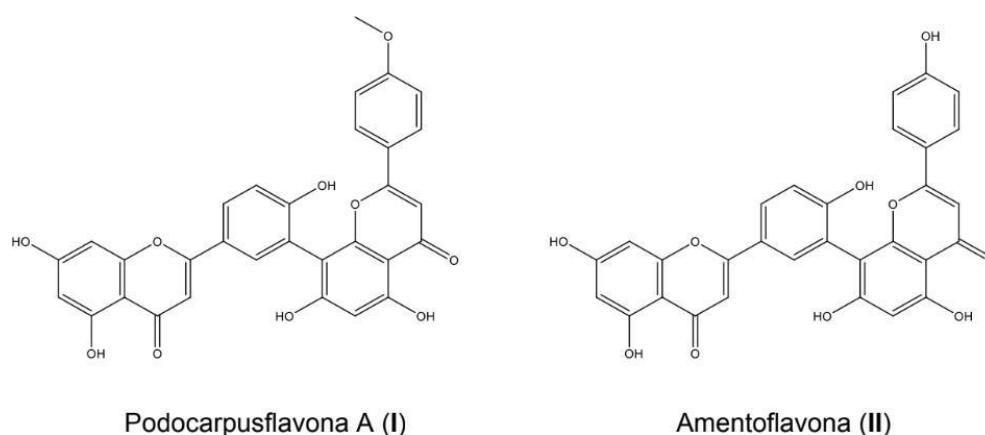
A espécie vegetal *Kielmeyera membranacea* (Calophyllaceae) (**Figura 9**) faz parte da rica biodiversidade presente no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba. Tem como nome popular “pau-mandioca” ou “pequiá-branco” (GBIF, 2021) e apresenta porte arbustivo e flores hermafroditas. Suas folhas apresentam coloração verde-escuro, forma elíptica, bordos lisos e consistência coriácea (CORREIA; LIMA; SILVA; 2013). Sua utilização tradicional é reconhecida pela madeira, que é culturalmente utilizada para a fabricação de cabos de ferramentas (SANTOS, 2009).



**Figura 9 -** Imagens da espécie *K. membranacea* Casar. (Calophyllaceae). (A) Indivíduo completo. (B) fotografia evidenciando os frutos e (C) Flores. Retirado de arquivos do nosso grupo de pesquisa do LP Bio.

Dentre as substâncias presentes na *K. membranacea*, estão os flavonoides, os quais são importantes na estabilização de radicais livres. Os flavonoides se subdividem em classes, como os bisflavonoides que são dímeros de flavonoides. Essa classe de metabólitos são encontradas em diversas espécies possuindo algumas atividades farmacológicas elucidadas ao longo dos anos, como: estimulante cardíaco, antifúngico, antiviral e anti-inflamatório. Neste viés, dois bisflavonoides se destacam na *K. membranacea*: a amentoflavona (AMF) e Podocarpusflavona A (PCFA) (**Figura 10**). A amentoflavona é um dímero de apigenina ligado por uma ligação covalente C3'-C8'' que possui inúmeras atividades biológicas já descritas, *in vitro* e *in vivo* (KIM, 2016). Enquanto a PCFA, possui composição química estrutural composta por duas flavonas ligadas por uma ligação C-C, com poucas propriedades elucidadas e grande potencial descrito (TRANG, 2016), inclusive na temática de inibição de mediadores inflamatórios, citados nos tópicos 1.2.3 e 1.2.4.





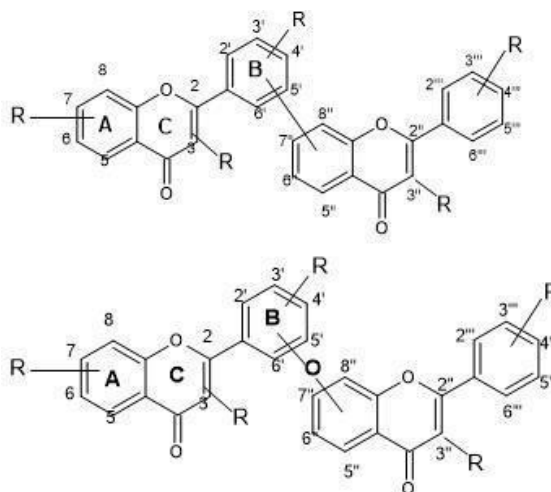
**Figura 10 - Estrutura química dos bisflavonoides.** (I) Podocarpusflavona A ; (II) Amentoflavona.

Todo esse conjunto de informações demonstra o quão importante são as pesquisas para potencial anti-inflamatório e o quão promissora pode ser a natureza como recurso para candidatos a novos fármacos, principalmente tendo a flora do Brasil como referência. Estudar modelos que beneficiem tanto o ponto de vista do desenvolvimento de novos fármacos, quanto à geração de práticas que viabilizem o uso sustentável destes recursos, é relevante e torna-se cada vez mais necessário.

### 1.6.1 QUÍMICA E DISTRIBUIÇÃO DOS BISFLAVONOIDES

No aspecto químico e biológico, os flavonoides são metabólitos secundários presentes nos vegetais e que protegem o organismo contra a ação dos agentes oxidantes, desempenhando diversos efeitos terapêuticos que resultam na diminuição da incidência de doenças relacionadas com o estresse oxidativo, por exemplo (MARTÍNEZ - FLÓREZ et al, 2002; ASOLINI et al, 2006). Os bisflavonoides constituem um grupo relativamente grande de substâncias naturais, que são flavonoides diméricos. A maioria dos bisflavonoides de ocorrência natural são dímeros de flavonas e flavanonas, raramente chalconas, podendo apresentar substituintes nas posições dos carbonos 5, 7, 4' e, mais raramente tendo substituintes nas posições 5, 7, 3', 4'. Os monômeros podem ser iguais ou de diferentes tipos: flavona – flavona, flavanona – flavanona ou flavona – flavanona. Algumas hidroxilas podem apresentar-se metoxiladas e os heterosídeos são encontrados em menor frequência. Além disso, existem dois tipos gerais de conexões de ligação entreos flavonoides: Ligação C-C ou ligação C-O-C (BOSSO, 2004) (**Figura 11**).





**Figura 11 – Exemplos de variações estruturais dos bisflavonoides.** (A) Ligação C-C; (B) Ligação C-O-C.

Segundo o The plant List, publicado em 2013, atualmente um total de 592 bisflavonoides são amplamente distribuídos em angiospermas, samambaias, gimnospermas, e briófitas, mas a maioria é encontrada em angiospermas, incluindo: *Anacardiaceae*, *Apiaceae*, *Aristolochiaceae*, *Asteraceae*, *Balsaminaceae*, *Berberidaceae*, *Caprifoliaceae*, *Chloranthaceae*, *Clusiaceae* (especialmente *Garcinia*), *Daphniphyllaceae*, *Ephedraceae*, *Ericaceae*, *Euphorbiaceae*, *Gentianaceae*, *Juglandaceae*, *Lanariaceae*, *Leguminosae*, *Liliaceae*, *Lythraceae*, *Menispermaceae*, *Moraceae*, *Myrtaceae*, *Ochnaceae*, *Polygonaceae*, *Rosaceae*, *Rubiaceae*, *Theaceae*, *Thymelaeaceae*, *Velloziaceae* e *Vitaceae*. A grande maioria dos bisflavonoides são provenientes de *Clusiaceae*, *Thymelaeaceae*, *Ochnaceae* e *Selaginellaceae*, que representam aproximadamente 50% dos bisflavonoides em todas as famílias (HE, 2021).

### 1.6.2 POTENCIAL BIOLÓGICO DA AMENTOFLAVONA E PODOCARPUSFLAVONA A

Neste contexto, a amentoflavona (AMF) é um dos bisflavonoides mais estudados, e pode ser encontrado nos extratos de muitas espécies, como: erva de São João (*Hypericum perforatum*), *Ginkgo biloba*, *Selaginella tamariscina*, *Torreya nucifera*, entre outras. Suas ações farmacológicas foram listadas como antiviral (GOSH. et al.; 2020), antibacteriana (SHEN, 2018), antioxidante (RIZK, 2021), anti-inflamatória (LI, 2021), anticancerígeno (CHEN, 2021), antidiabética (SU, 2019), antidepressiva (NIELSEN, 1988), neuroprotetora (CHEN et. al.; 2018), entre outras diversas ações já confirmadas. Estudos recentes de docagem molecular descobriram que este bisflavonoide se liga fortemente ao sítio ativo da principal protease (Mpro) inibindo a ligação do coronavírus-2 (SARS-CoV-2) responsável pela síndrome respiratória aguda grave (SINGH, 2021).

A Podocarpusflavona A (PCFA) é um dos bisflavonoides que possui menos atividades biológicas descritas ainda, tendo aparecimento em publicações somente a partir de 2004, onde Abe et al. (2004) demonstrou a melhoria da dermatite atópica, através dos bisflavonoides encontrados em *Calophyllum brasiliense*. Comparando este bisflavonoides aos outros de sua classe, ele possui ainda seus mecanismos de ação pouco conhecidos (HE, 2021). Trazendo um compilado de resultados comprovados, o artigo de Coulerie de 2013, cita que este bisflavonóide inibe uma RNA polimerase dependente do RNA NS5 do vírus da dengue (DENV-NS5 RdRp; IC<sub>50</sub> = 0,75 µM). A PCFA também demonstrou inibir a catepsina B com um valor de IC<sub>50</sub> de 1,68 µM e inibir a STAT3 de maneira dependente da concentração (ZHANG, 2005), sendo a STAT3 uma molécula de sinalização citoplasmática e fator de transcrição nuclear da família STAT, que envolve a regulação da proliferação celular, diferenciação, progressão do ciclo celular, angiogênese, apoptose, inflamação e evasão imune.

Este bisflavonoide também reduz a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e ânions superóxido induzidos por forbol 12-miristato 13-acetato em neutrófilos humanos isolados quando em concentração de 0,8 µM (ARWA, 2015). Ademais, a PCFA também inibe a agregação do peptídeo amiloide-β (1-40) (Aβ40) em um ensaio livre de células com um valor de IC<sub>50</sub> de 4,9 µM (SIRIMANGKALAKITTI, 2019). Mais recentemente, em 2020, Meng descreveu ainda que este bisflavonoide, na concentração de 20 µM, diminui a viabilidade de células de melanoma A375, MALME-3M, SK-MEL-1 e SK-MEL-5 e reduz o crescimento tumoral em um modelo de xenoinxerto de camundongo A375 em doses de 20 e 40 mg/kg. A PCFA segundo Yeh et al, de 2012, propôs ainda que este bisflavonoide é um inibidor da DNA topoisomerase I, tendo atividade antiproliferativa moderada, capaz de induzir a apoptose celular em MCF-7 (linhagem celular de câncer de mama).

Desta maneira, justifica-se este trabalho atrelando a vasta necessidade por novas alternativas de medicamentos anti-inflamatórios com o crescente investimento governamental na pesquisa por produtos naturais como fontes de potenciais substâncias bioativas. É sabido ainda que a biodiversidade brasileira é uma das mais diversificadas do planeta (ALHO, 2012) e, diante dos fatores expostos, a busca por alternativas terapêuticas para o tratamento da inflamação, que é um processo envolvido em diferentes patologias, e se faz extremamente necessária. Nesse contexto, os produtos naturais se apresentam como uma excelente fonte de estudo, obtenção e desenvolvimento de novos fármacos para a regulação da resposta inflamatória.

A restinga de jurubatiba, localizada no estado do Rio de Janeiro, é uma área bastante preservada, e possui uma vasta biodiversidade (FARJALLA; BOZELLI, & LOUREIRO, 2012). As condições edafoclimáticas específicas da restinga geram particularidades na sua

produção de metabólitos secundários, o que pode acarretar em uma maior especificidade de propriedades biológicas nas espécies ali recorrentes. Posto isso, vê-se a utilidade de se realizarem estudos a fim de se determinar as propriedades medicinais das espécies vegetais vigentes na restinga.

Em estudos prévios realizados por este grupo de pesquisa (ARAÚJO et al., 2021), detectou-se proeminente atividade antimicobacteriana e de regulação de NO através da fração em DCM da espécie *Kielmeyera membranacea*, advinda da restinga. O presente estudo tem como cerne a realização de um estudo químico não só dos extratos hexânico e diclorometano, mas também dos conjuntos fracionados e substâncias isoladas dessa espécie, objetivando a identificação e elucidação de seus constituintes químicos majoritários, para o estabelecimento de seu perfil químico, e comparação de suas estruturas com suas atividades.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVOS GERAIS

Promover um estudo fitoquímico biomonitorado do extrato das folhas da espécie vegetal *K. membranacea*, avaliando a atividade reguladora da produção de mediadores pró-inflamatórios em macrófagos bem como a identificação química dos constituintes relacionados a esta atividade.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

⇒ Obtenção das frações em hexano e diclorometano, a partir do extrato bruto das folhas da *K. membranacea*;

⇒ Investigação dos extratos, frações e substâncias isoladas quanto ao seu potencial regulatório da produção de óxido nítrico (NO) e do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) em cultura de macrófagos murinos RAW 264.7 e fibroblastos da linhagem celular L929.

⇒ Avaliação da viabilidade celular utilizando os extratos, frações e substâncias isoladas através dos ensaios de MTT em macrófagos RAW 264.7.

⇒ Comparar o bisflavonoide de desejo com os monômeros (acacetina e amentoflavona), afim de observar a relação estrutura com a atividade biológica.

⇒ Identificação dos constituintes químicos isolados por técnicas espectroscópicas utilizando co-injeção com padrões elucidados.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 MATERIAL VEGETAL

A espécie vegetal *Kielmeyera membranacea* Casar. (Calophyllaceae), coletada no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, em dezembro de 2014 (Licença SISBIO: 39673-2 e SISGEN: AAA989F), foi selecionada previamente por estudos do nosso grupo. A identificação botânica foi realizada pela Dra. Tatiana Ungaretti Paleo Konno e a exsicata foi depositada no Herbário da Universidade Federal do Rio de Janeiro (RFA38752). Esta pesquisa cumpriu todas as diretrizes federais relevantes e políticas institucionais relacionadas ao material botânico para fins de pesquisa.

#### 3.2 PREPARO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES ORGÂNICAS

O extrato etanólico seco preparado pelo grupo de pesquisa foi pesado, em aproximadamente 5,0478 g, redissolvido em 140 mL de metanol/água (9:1) e filtrado devido as porções insolúveis presentes, após isso foi submetido à partição líquido/líquido com 100 mL de solventes orgânicos de diferentes polaridades (n-hexano e diclorometano), por três vezes, sendo também obtido o resíduo aquoso (**Figura 12**). As frações com solventes orgânicos foram concentradas em evaporador rotatório (IKA®) sob pressão reduzida até a total remoção do solvente.

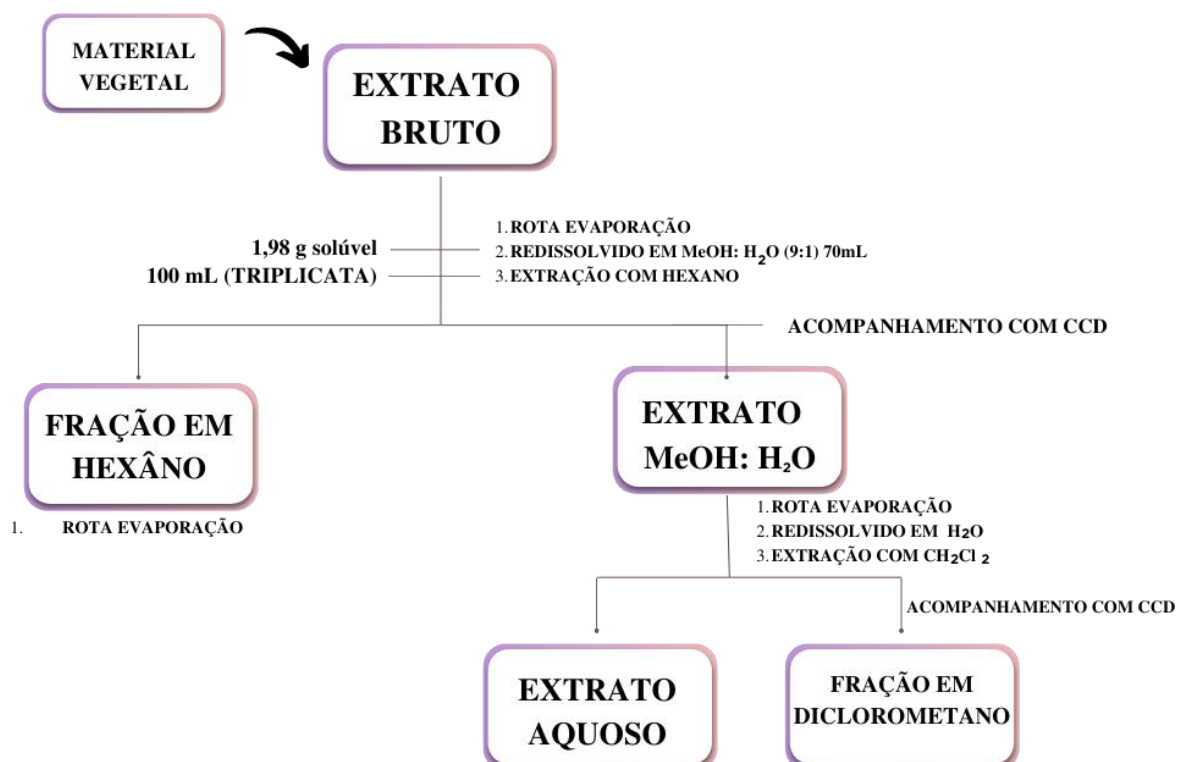


Figura 12. Esquema da partição líquido/líquido para obtenção das diferentes frações. Feito no Canva.com

## **3.2 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS ATIVAS A PARTIR DA FRAÇÃO EM DICLOROMETANO**

A fração ativa foi fracionada empregando cromatografia em coluna clássica utilizando como fase estacionária gel Sephadex LH-20, aplicando 0,1105 g de massa da fração em diclorometano, e como fase móvel um solvente orgânico, o Metanol. As frações obtidas foram avaliadas e as mais ativas selecionadas para nova purificação, quando necessário, adequando o método às características da amostra. As frações foram unidas em conjuntos considerando suas similaridades e as substâncias isoladas foram caracterizadas.

### **3.1.1 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)**

A cromatografia em camada delgada (CCD) em cromatoplaça de gel de sílica F254 foi utilizada preliminarmente com o objetivo de promover uma prospecção quanto ao perfil químico do extrato, frações e subfrações obtidas nas diferentes etapas. Para esta investigação, foi adotado o sistema de fase móvel com hexano:acetato de etila 7:3 para o CCD da fração hexânica e  $\text{CHCl}_3$ :MeOH 6:1 para o CCD da fração em diclorometano. As placas foram reveladas com difenilboriloxietilamina/polietilenoglicol (NP-PEG).

### **3.1.2 CROMATOGRAFIA EM FASE LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA**

A análise do perfil cromatográfico dos conjuntos da fração em diclorometano, foram realizadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD) da marca Shimadzu® LC-20AT e coluna analítica Luna C18 - Phenomenex de dimensões (250 mm x 4,6 mm x 5  $\mu\text{m}$ ). O volume injetado corresponde a 10  $\mu\text{L}$  e vazão de 1  $\text{mL}/\text{min}^{-1}$ , temperatura da coluna 30 °C. Para injeção da amostra preparou-se uma solução de 1  $\text{mg}/\text{mL}$  em metanol de elevado grau de pureza. O sistema de eluente utilizado foi  $\text{H}_2\text{O}$  (0,05% de ácido trifluoroacético - TFA): acetonitrila (ACN). O detector UV- visível com arranjo de fotodiodos (DAD) foi utilizado, possibilitando a visualização da absorção das amostras em diferentes comprimentos de onda.

## **3.2 ATIVIDADES BIOLÓGICAS**

### **3.2.1 CULTURA E PREPARAÇÃO DOS ENSAIOS EM MACRÓFAGOS**

Macrófagos murinos RAW 264.7 (*American Type Culture Collection - ATCC*) foram cultivados em garrafas com meio Dulbecco's Eagle modificado F-12 (DMEM- F12), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e mantidas em estufa à 37°C e 5% de  $\text{CO}_2$ ,

durante o período necessário para formação de uma monocamada celular. Para o ensaio, as células foram delicadamente soltas da garrafa com o auxílio de um raspador de células contadas na câmara de Neubauer. Após contagem,  $5 \times 10^4$  células/poço foram plaqueadas em microplaca de 96 poços, mantida em estufa por 24 horas para aderência dos macrófagos e estabilidade da cultura. Após este período, o sobrenadante da cultura foi removido cuidadosamente para retirada de células não aderentes e substituído por DMEM-F12 suplementado com 2% de SFB contendo ou não lipopolissacarídeo, [ $1 \mu\text{g/mL}$ ] (LPS, *Escherichia coli* 0111:B4; Sigma-Aldrich, USA). Simultaneamente as células foram tratadas com as amostras nas concentrações de 4; 20 e  $100 \mu\text{g/mL}$  e em outra análise as células foram tratadas com as amostras e monômeros dos bisflavonoides nas concentrações de 10, 20, 40 e  $80 \mu\text{g/mL}$ . Após 24h em estufa o sobrenadante da cultura foi coletado para avaliação da capacidade de inibição da produção de NO e TNF- $\alpha$ .

### **3.2.2 ENSAIO DA CAPACIDADE DE INIBIÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)**

A produção de NO foi estimada indiretamente, medindo-se a concentração de nitrito no sobrenadante através de uma curva padrão com nitrito de sódio diluído nas concentrações de 200 M a 1,56 M. Uma alíquota de  $50 \mu\text{L}$  dos sobrenadantes (obtido conforme item 3.4.1) foi transferido para uma nova microplaca e recebeu  $50 \mu\text{L}$  do reagente de Griess (p-aminobenzenosulfonamida 1% + diidrocloreto de naftiletenodiamino 0,1% em 5% de ácido fosfórico, Sigma Chemical Co.), recém-preparado (GRIESS, 1939; CHI, et al., 2001). Após 10 minutos, a absorbância foi medida no comprimento de onda de 540 nm no espectrofotômetro de placa. Controle positivo da produção de NO, macrófagos estimulados com LPS à  $1 \mu\text{g/mL}$  e não tratados. Controle negativo, macrófagos não estimulados e não tratados. Acetato de NG-Metil-L-Arginina (L-NMMA à  $20 \mu\text{g/mL}$ ) (Sigma-Aldrich), inibidor não específico de óxido nítrico sintase induzida (iNOS), foi utilizado como padrão para comparação da capacidade de inibição da produção de NO.

### **3.2.3 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR EM MACRÓFAGOS**

A viabilidade celular foi avaliada através do método com brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio (MTT). Onde, após 24 h de incubação da cultura de macrófagos RAW264.7, como citada anteriormente, foram adicionados  $10 \mu\text{L/poço}$  de uma solução com MTT em PBS ( $5 \text{ mg/mL}$ , Sigma Aldrich) e novamente incubada por 2 h a  $37^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$ . Posteriormente, o sobrenadante da cultura foi removido e os cristais de formazan foram solubilizados em DMSO. O sobrenadante foi analisado por absorbância em espectrofotômetro de placa (Dynatech MR5000) a 570 nm (RASO et al., 2001).

### **3.2.4 BIOENSAIO COM CÉLULAS L929 E ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE TNF- $\alpha$ POR MACRÓFAGOS**

As células L929 (linhagem de fibroblasto murinho, ATCC) foram cultivadas em meio DMEM-F12 suplementado com 10% de SFB durante o período necessário para formação de uma monocamada celular. Para o bioensaio, o sobrenadante celular foi removido e a monocamada celular foi lavada com PBS 1X para remoção completa de SFB e em seguida tratadas com solução de tripsina 0,025%+ EDTA 0,2%. As células foram centrifugadas (1200 rpm, 3', 22 °C) (Fanem®) e ressuspendidas em meio DMEM-F12 contendo 10% de SFB e 20 $\mu$ g/mL de gentamicina (Invitrogen) sendo plaqueadas na concentração 2 X 10<sup>5</sup> células/mL, em placa de 96 poços. Após a incubação a 37 °C por 24 h, o meio da cultura foi removido e 50  $\mu$ l de DMEM-F12 suplementado com 10% de SFB e 2  $\mu$ g/mL de actinomicina D (Sigma, USA) foram adicionados em cada poço, seguidos de 50  $\mu$ l do sobrenadante proveniente da cultura celular de RAW 264.7 (obtido de acordo com o item 3.4.1). Após nova incubação por 24 h a 37 °C e 5 % CO<sub>2</sub>, a viabilidade celular da L929 foi determinada através da técnica do MTT, descrita no item 3.4.3 (MOSMANN, 1983; SHIAU et al., 2001). Para mensurar a concentração de TNF- $\alpha$  encontrada nas amostras utilizou-se uma curva-padrão com TNF- $\alpha$  recombinante murinho (Biosource, USA). A leitura foi realizada em espectrofotômetro de placa a 570 nm. Também foi calculado o percentual de morte celular das células L929 utilizando como controles, o sobrenadante da cultura de macrófagos não estimulados (controle negativo da produção de TNF- $\alpha$ ) e o sobrenadante da cultura de macrófagos estimulados (controle positiva da produção de TNF- $\alpha$ ), obtido conforme item 3.4.1.

### **3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os programas Microsoft Office Excel e GraphPadPrism 4 foram utilizados. Os dados foram apresentados pela média  $\pm$  erro padrão e avaliados por análise de variância One-Way ANOVA seguido por Teste de Tukey, sendo considerado significativo  $p < 0.05$ . O IC<sub>50</sub> das amostras testadas foi calculado baseado nos resultados das curvas de dose-resposta da inibição da produção de NO e TNF- $\alpha$  e o valor do IC<sub>50</sub> calculado por regressão não-linear. Todos os experimentos foram realizados em triplicata (n=3). Sendo os resultados representativos de três experimentos independentes.



#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo fitoquímico foi iniciado com a partição líquido-líquido, a partir de uma massa de 5,0478 g do extrato etanólico ressuspendido em 70 mL de MeOH:H<sub>2</sub>O (9:1), onde foi agitado e colocado em banho de ultrassom por aproximadamente 20 minutos para facilitar solubilização. Após isso, devido a presença de partes insolúveis, se fez necessário filtrar para que a massa insolúvel não interferisse no rendimento final, ela foi seca e pesada, gerando o resultado demonstrado na **Tabela 1**.

**Tabela 1- Porcentagem solúvel do extrato bruto.** Demonstra o real quantitativo utilizado.

PESADO	SOLÚVEL	
5,0478 g	1,986 g	39,34% solúvel

Para o fracionamento, foi adicionado um volume de 100 mL com cada um dos solventes por três vezes, sendo acompanhada por CCD. A partição foi iniciada com *n*-hexano e por questões de miscibilidade de solventes, antes do início da partição com diclorometano foi necessário retirar o metanol da fração e redissolver o material em água. Na mistura CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O não houve no funil de partição, a formação de uma terceira fase (emulsão), conforme explicitado em Araújo, 2019, pois adicionou-se diclorometano lentamente.

##### 4.1 RENDIMENTOS TOTAIS

Os rendimentos das frações foram calculados a partir da relação percentual da massa de extrato recuperada no processo de partição líquido-líquido em relação à massa de material vegetal seco utilizada (1,98 g), e está descrita na **Tabela 2**.

**Tabela 2- Rendimentos das frações**

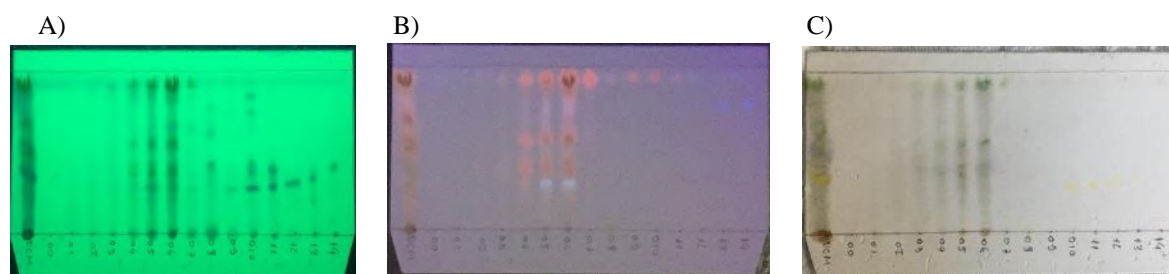
FRAÇÕES	MASSA (g)	RENDIMENTO (% p/p)
Fração em hexano	0,7907	40 %
Fração em diclorometano	0,1409	7,11 %
Fração aquosa	0,7503	37,8%
<b>Rendimento total (% p/p)</b>		<b>84,94 %</b>

Portanto, a fração em hexano foi a que obteve melhor rendimento dentre as frações passíveis de solubilização e estudo. Porém, no estudo de Araújo (2021) sobre a atividade antimicrobiana de extratos e frações das folhas de dez espécies diferentes da Restinga de

Jurubatiba, a fração em diclorometano de *K. membranacea* foi descrita como a mais promissora quanto a sua atividade antimicobacteriana e de regulação de mediadores pro-inflamatórios. Complementar a este fato, normalmente flavonoides são extraídos preferencialmente em acetato de etila e n-butanol, porém algumas agliconas pouco hidroxiladas e/ou metoxiladas podem ser extraídas melhor por diclorometano ou clorofórmio (RICE-EVAN, 1996). Desta forma, a fração diclorometano foi a fração selecionada para prosseguir os estudos fitoquímicos e de atividade biológicas, mesmo tendo apresentado o menor rendimento (7,11%).

#### 4.2 CROMATOGRAFIA EM COLUNA POR SEPHADEX LH-20 DA FRAÇÃO EM DICLOROMETANO E ANÁLISE POR CCD

As frações obtidas do processo de fracionamento da fração em diclorometano por cromatografia em coluna por Sephadex LH-20 foram analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD, sílica F254) e reunidas de acordo com a semelhança nos fatores de retenção ( $R_F$ ) dos constituintes majoritários presentes, o que gerou 16 subfrações. A partir da análise por CCD, observou-se para a fração 12 uma possível substância isolada ( $R_f$  0,7), sendo esta, sugestivo para a classe dos flavonoides, devido ao aparecimento de uma mancha de coloração amarelada após revelação com difenilboriloxietilamina/polietilenoglicol (NP-PEG), e mancha roxa sob luz UV a 254 nm, demonstrado na **Figura 13**. A mesma coloração foi observada para as frações 10, 11, 12 e 13, que apresentaram uma banda amarelada com  $R_f$  0,7. As demais frações apresentaram uma mistura complexa de constituintes. Segundo Araújo, 2019, em estudos anteriores do grupo de pesquisa, foi possível isolar e caracterizar a PCFA na fração em diclorometano de *K. membranacea*, porém em quantidade suficiente para finalizar apenas o estudo da atividade antimicobacteriana, não sendo possível investigar outros aspectos relativos a atividade biológica.



**Figura 13.** Cromatografia em camada delgada (CCD) da fração em diclorometano e subfrações obtidas por Sephadex LH-20. Fase móvel:  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$  6:1. A) CCD sob luz UV à 254 nm. B) CCD sob luz UV à 365 nm. C) CCD revelada com NP-PEG.

### 4.3. RENDIMENTOS DAS FRAÇÕES OBTIDAS DO PROCESSO DE CROMATOGRAFIA EM COLUNA SEPHADEX LH-20 DA FRAÇÃO EM DICLOROMETANO DE *K. membranacea*

O processo de separação por cromatografia em coluna Sephadex LH-20 foi realizado com a fração em diclorometano como forma de determinar os possíveis constituintes presentes na fração mais ativa e sugerir quais seriam os responsáveis pela atividade biológica proposta. Considerando a aplicação de uma alíquota de 110,5 mg da fração em diclorometano na coluna e a obtenção de 106,1 mg da amostra o rendimento obtido foi de 96% (**Tabela 3**). Para obtenção do perfil cromatográfico, os conjuntos 4 a 10 foram submetidos a análise por CLAE-DAD.

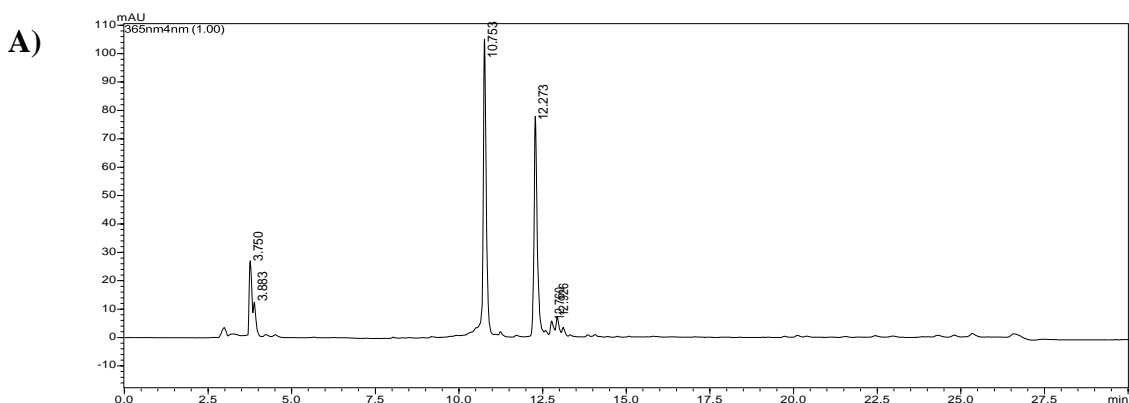
**Tabela 3. Rendimento das frações em diclorometano após cromatografia em coluna por Sephadex LH-20.**

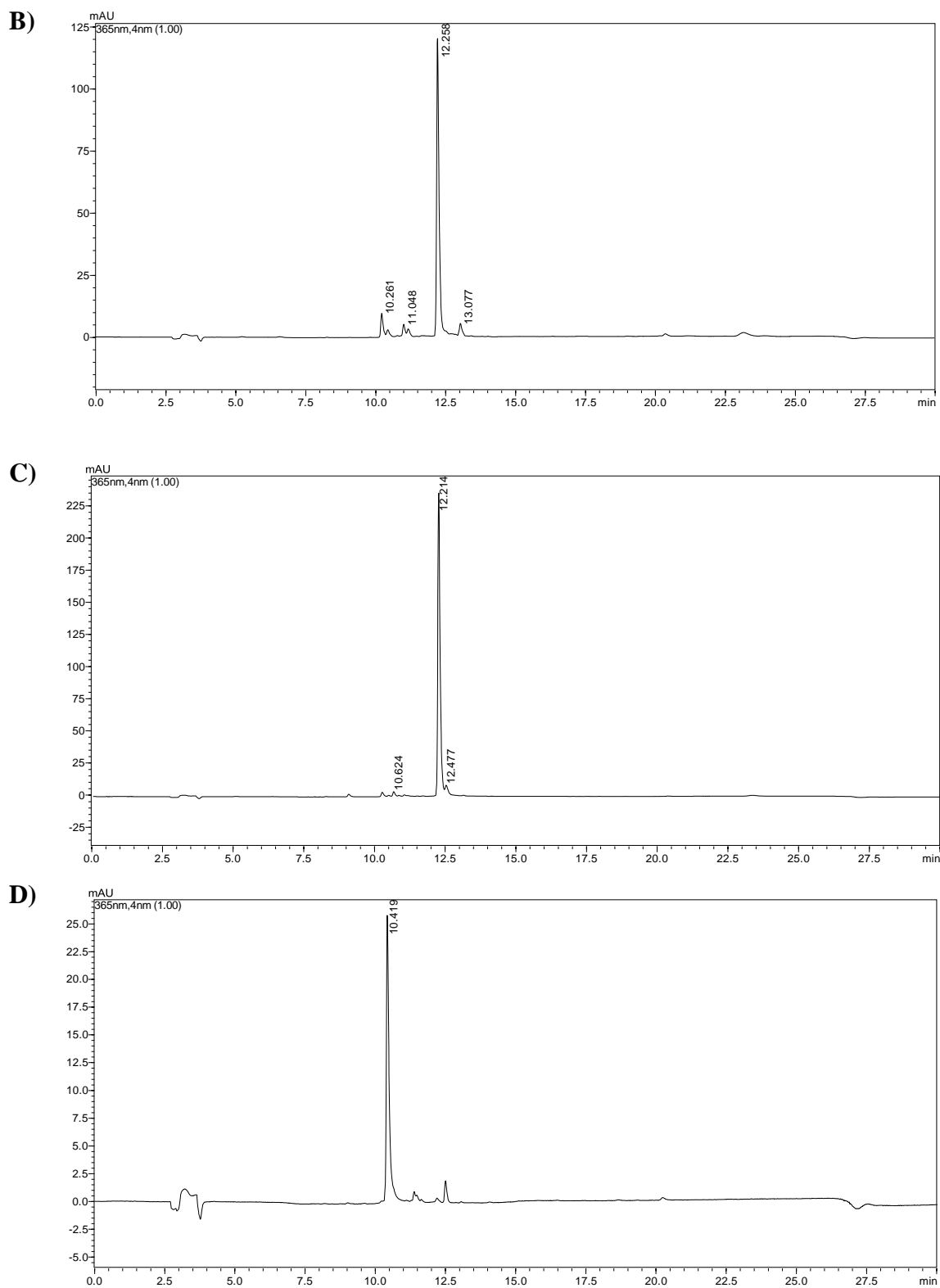
Frações	Conjuntos	Massa (g)	Teor na Fração (%)
0 - 3	1	0,0348	31,49
4 - 6	2	0,0352	31,85
7 - 8	3	0,0138	12,48
9	4	0,0064	5,79
10	5	0,0049	4,43
11	6	0,0011	0,99
12*	7*	0,0022	1,99
13	8	0,0048	4,34
14	9	0,0001	0,09
15	10	0,0028	2,53
<b>TOTAL</b>		<b>0,1061</b>	<b>96</b>

\*Possível bisflavonoide de interesse isolado

### 4.4 ANÁLISES POR CLAE-DAD DOS CONJUNTOS 4 A 10.

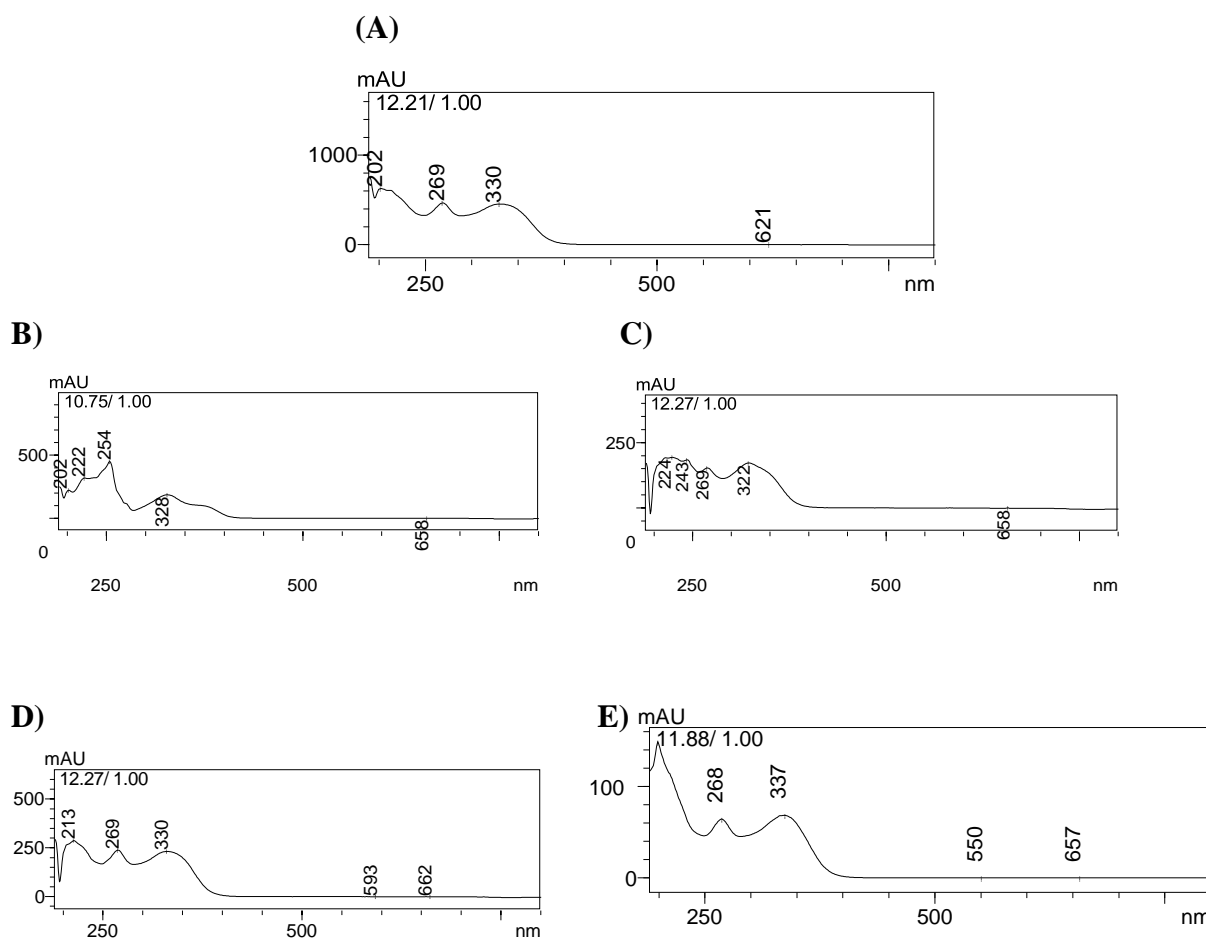
Os conjuntos de 4 a 10 foram selecionados para serem analisados após confirmação por CCD, devido ao aparecimento de banda amarelada representativo de flavonoides. Com intuito de comparar os perfis pelo mesmo método de análise, observou-se que em todos os conjuntos havia a presença de dois picos majoritários com  $T_r$  10,753 min e 12,214 min, os quais apresentaram cromóforo a 365 nm, tendo como destaque os conjuntos 4, 6, 7 e 9. (**Figura 14**).





**Figura 14. Perfil Cromatográfico dos conjuntos da fração em diclorometano de *K. membranacea*, evidenciando picos obtidos a 365 nm; (A) Cromatograma do conjunto 4 demonstrando dois picos majoritários com  $T_R$  10,753 min e 12,273 min; (B) Cromatograma do conjunto 6 demonstrando o pico majoritário com  $T_R$  12,214 min; (C) Cromatograma do conjunto 7 demonstrando o pico majoritário com  $T_R$  12,214 min; (D) Cromatograma do conjunto 9 demonstrando o pico majoritário com  $T_R$  10,419 min;**

O cromatograma do conjunto 7 se destaca dos demais, podendo-se observar apenas um pico majoritário de maior grau de pureza da amostra, sendo 89 %, enquanto no cromatograma do conjunto 4 observa-se dois picos majoritários, um deles com o tempo de retenção semelhante ao do conjunto 7. Reforçando a hipótese de ser a mesma substância ou com características muito semelhantes, podendo ser bisflavonoides muito parecidos, apenas com grupamentos metoxilas ou hidroxilas em posições distintas (provavelmente AMF e PCFA). Nestes conjuntos foi possível observar espectros com UV característico para bisflavonoides, com a presença de cromóforos que apresentam bandas em afeito “w” com máximos de absorção em 202, 269 e 330 nm (**Figura 15**). Ademais, outro cromatograma que demonstrou 79,96% de pureza da substância com  $T_R$  10,491 min foi o conjunto 9, explanando a presença de duas possíveis substâncias isoladas, com perfis cromatográficos de UV característicos de bisflavonoides, o conjunto 7 indicando PCFA e o conjunto 9 a AMF.



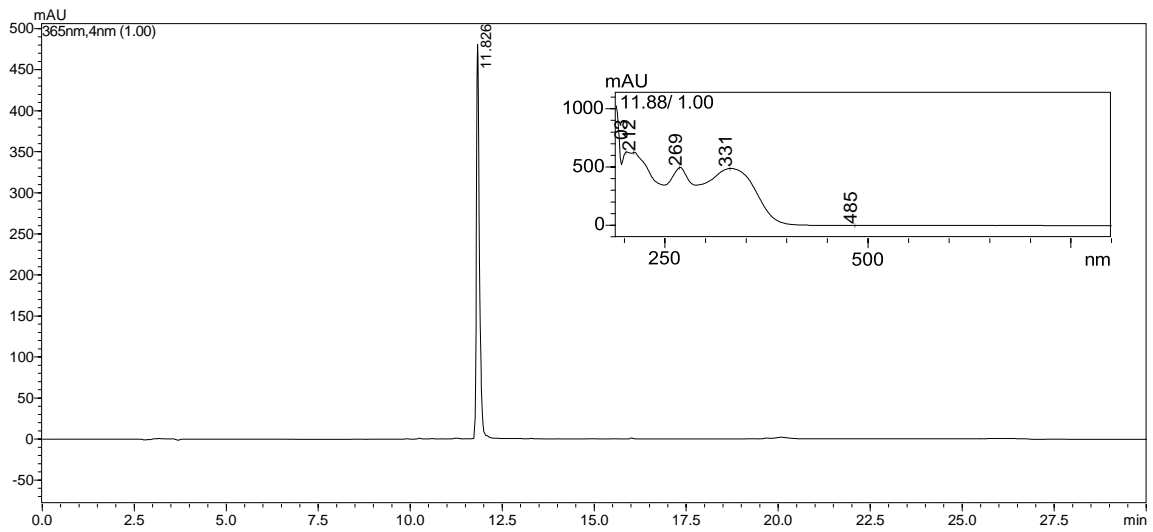
**Figura 15. Espectros de UV dos picos majoritários obtidos a 365 nm.** (A) UV do pico com  $T_R$  12,214 min do conjunto 7; (B) UV do pico com  $T_R$  10,753 min do conjunto 4; (C) UV do pico com  $T_R$  12,267 min do conjunto 4; (D) UV do pico com  $T_R$  12,256 min do conjunto 6; (E) UV do pico com  $T_R$  10,419 min do conjunto 9;

Após investigação inicial utilizando CLAE-DAD, o conjunto 7 foi submetido à outra análise para identificação por comparação da substância isolada, utilizando uma co-injeção do

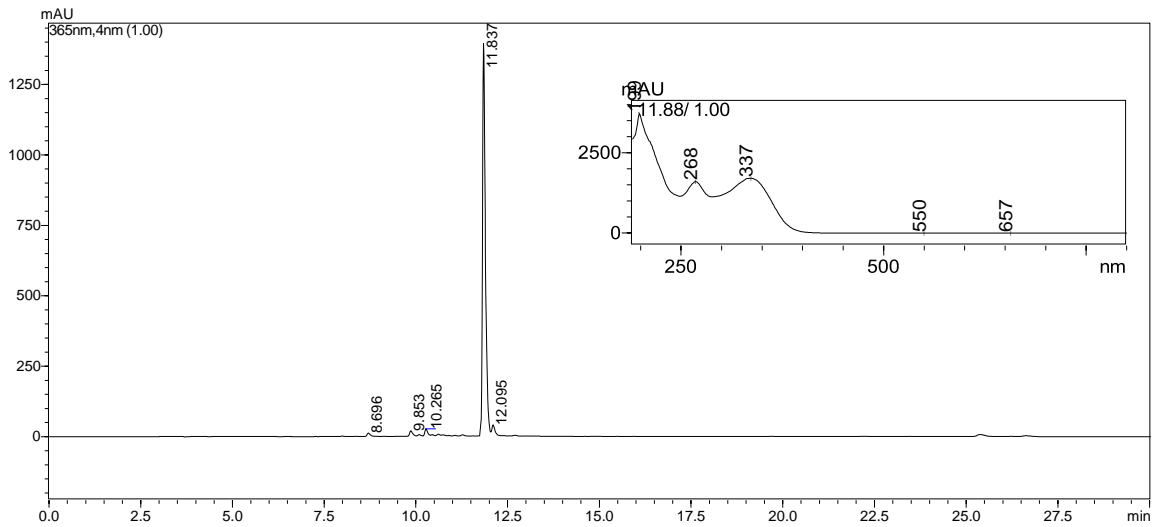
conjunto 7 com a PCFA padrão do laboratório, de pureza 97%, caracterizado por espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear (ARAÚJO, 2019).

Foi observado apenas um pico majoritário em com  $T_R$  11,837 min, confirmando a identidade do bisflavonoide, como sendo a PCFA (**Figura 16**). Da mesma maneira, foi possível observar o espectro UV com picos máximos de absorção em 212 nm, 269 nm e 331 nm, analisados a 365 nm.

A)



B)



**Figura 16.** Perfil Cromatográfico da co-injeção do conjunto 7 e da PCFA anteriormente obtida e caracterizada no LP Bio (ARAÚJO, 2019). A) PCFA isolada. B) Co-injeção do conjunto 7 com a PCFA, evidenciando pico majoritário obtido a 365 nm.

O CLAE é uma das técnicas cromatográficas mais utilizadas, seja para fins qualitativos ou quantitativos. Dentre as vantagens que esta técnica apresenta, podem-se citar a sua boa sensibilidade, sua capacidade de separar substâncias com uma maior instabilidade térmica e incapazes de se volatilizar, além de sua extensa aplicabilidade em diversas áreas (TONHI et al, 2002). Através deste método, portanto, pode-se observar através de co-injeção, de maneira qualitativa, a presença da PCFA, um bisflavonoide com uma forte capacidade de absorção no UV, com absorbâncias que versam de acordo com a variação das posições das hidroxilas nos anéis presentes em sua classe. Seus anéis aromáticos e a presença de um ou mais grupos hidroxila, fazem com que este grupo de flavonoides sejam bem característicos em análise por UV (ALEXANDRE-TUDO & DU TOIT, 2018).

#### **4.5 ATIVIDADES BIOLÓGICAS *IN VITRO***

Com o controle cada vez mais rigoroso em relação ao uso de animais e testes *in vivo*, há a necessidade e priorização dos testes *in vitro* que possam elucidar e apresentar resultados. Estes métodos apresentam vantagens em relação aos *in vivo*, como poder limitar o número de variáveis experimentais, obter dados significativos mais facilmente além do período de teste ser, em muitos casos, mais curto (ROGERO et al., 2003). Existe ainda um compromisso da comunidade científica mundial em seguir os Princípios de Russell-Burch (1959) de “redução, substituição e refinamento” no uso de animais, conhecido como Princípio dos 3R’s. Datada do final da década de 50, os princípios de William Russell e Rex Burch ainda mantêm-se ativos nos meios científicos e acadêmicos, trazendo sempre tal reflexão na tentativa de redução do número de animais por procedimento experimental (TRÉZ, 2018). Desta maneira, aplicado ao viés de pesquisa e observação da variação e modulação de mediadores inflamatórios, técnicas *in vitro* são amplamente aplicadas.

##### **4.5.1 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM MACRÓFAGOS E EFEITO CITOTÓXICO**

Sabe-se que em alta concentração, o NO é responsável pela angiogênese, hiperpermeabilidade vascular e severo dano oxidativo na vasculatura local (GUZIK et al., 2003; ORME, 2013). Além disso, muitos estudos podem ser observados na literatura descrevendo a atividade inibitória da produção de NO e TNF- $\alpha$  por espécies vegetais e seus constituintes (CHIOU et al., 2000; MANDRIKA et al., 2001; CHOI et al., 2014).

Visando confirmar o potencial regulatório da inflamação através das folhas de *K. membranacea* foi realizado um ensaio inicial baseado na inibição da produção de NO em macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS na concentração de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e tratados com os

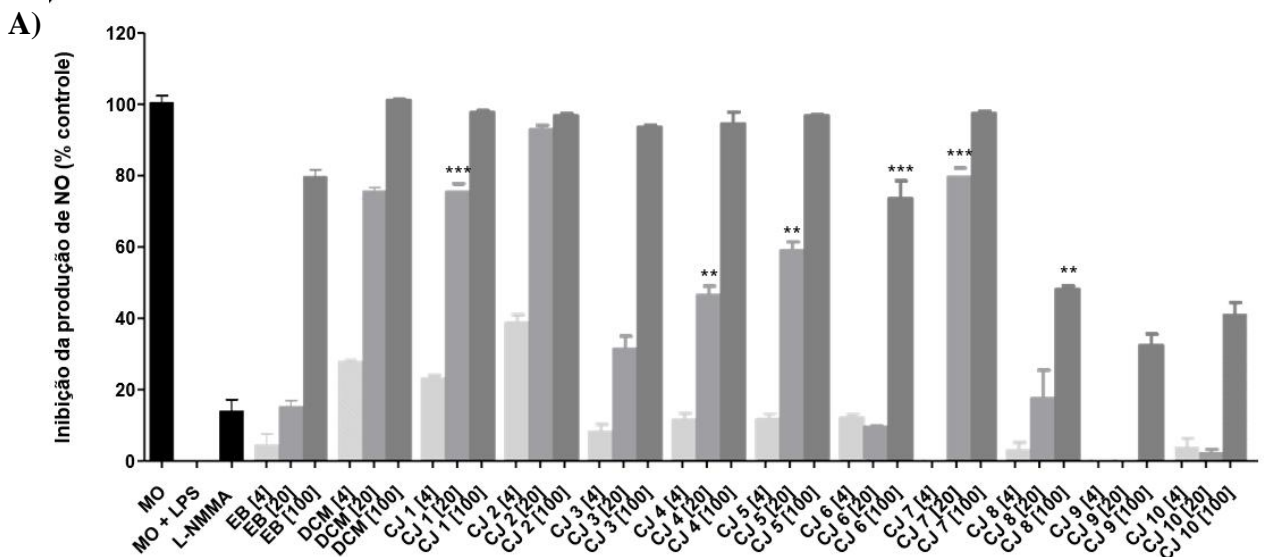
conjuntos, fração DCM, EB e parte insolúvel, nas concentrações de 4; 20 e 100 µg/mL, utilizando o método de Griess. Após isso foi realizada uma comparação da PCFA, com a AMF e os seus dois monômeros, a apigenina e acacetina, nas concentrações de 10, 20, 40 e 100 µg/mL. Além disso, o efeito citotóxico foi avaliado para permitir a seleção das amostras que não apresentaram efeito citotóxicos utilizando o método com MTT.

Na avaliação da inibição da produção de NO pelas amostras de *K. membranacea* foi possível observar para a PCFA (conjunto 7), na concentração de 20 µg/mL, apresentou inibição de  $79,61 \pm 4,37\%$  e na concentração de 100 µg/mL apresentou inibição de  $97,44 \pm 1,14\%$ , tendo ainda valor calculado de concentração inibitória média (IC<sub>50</sub>) de 24,49. Em relação a fração diclorometano, foi observado inibição de  $75,66 \pm 1,76\%$  da produção de NO na concentração de 20 µg/mL, e IC<sub>50</sub> de  $8,31 \pm 1,02$ . O extrato bruto não obteve resultado significativo de inibição de NO na concentração 4 µg/mL, com inibição de  $4,59 \pm 5,17\%$  e IC<sub>50</sub> de  $48,59 \pm 1,06$ . (**Figura 17A e Tabela 4**).

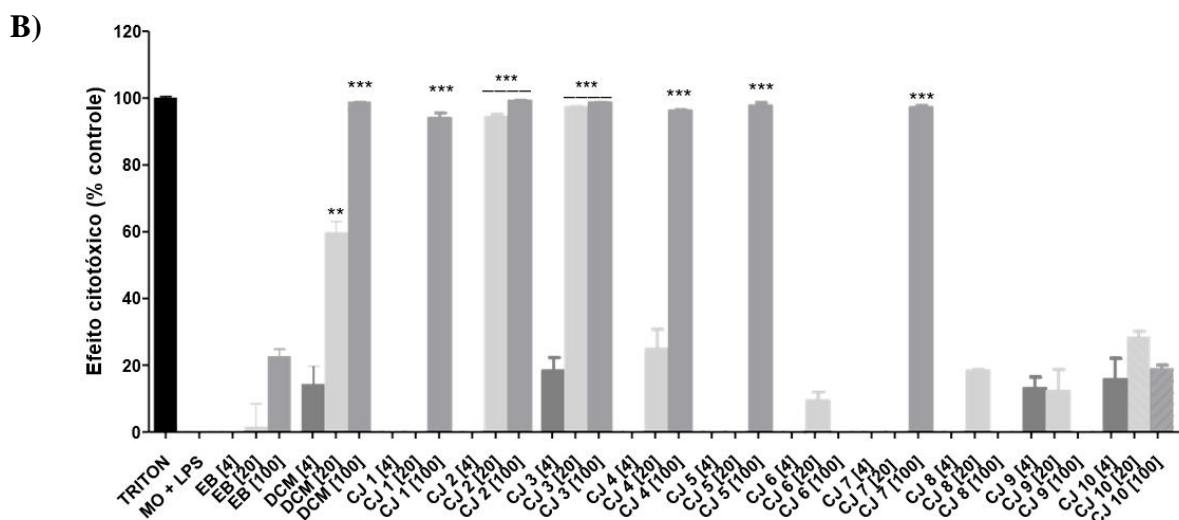
Embora a concentração de 100 µg/mL do conjunto 7 tenha apresentado uma inibição considerável, um efeito citotóxico significativo também foi observado, tornando a concentração de 20 µg/mL com melhor efeito inibitório de NO e não citotóxico (**Figura 17B**). Da mesma maneira, as duas maiores concentrações da fração em diclorometano, apresentaram efeito citotóxico e, portanto, pode-se propor que a concentração de 4 µg/mL desta fração a única que proporciona resultados influentes de inibição de NO sem apresentar toxicidade.

Outro conjunto que também apresenta destaque importante na concentração intermediária testada é o conjunto 1, com inibição de  $76,62 \pm 3,37\%$ , que terá sua identidade ainda elucidada através de métodos cromatográficos específicos.

A substância padrão NG-acetato de monometil-L-arginina (L-NMMA), inibidor conhecido da produção de NO, foi utilizado nesse ensaio possibilitando a comparação do potencial de inibição obtido pelas amostras de *K. membranacea* em relação ao L-NMMA que apresentou inibição de NO de  $18,35 \pm 2,35\%$ .





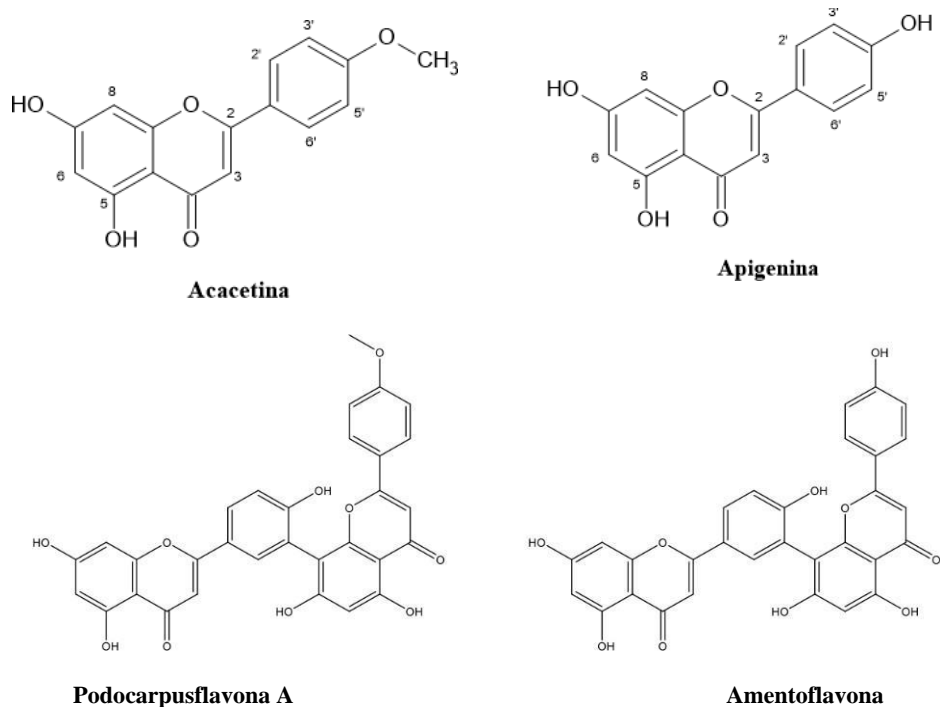


**Figura 17. Percentual de inibição da produção de óxido nítrico e efeito citotóxico em Macrófagos RAW 264.7.**

A) Percentual de inibição da produção de NO para extrato, fração e conjunto. Controles: Meio ( $100,46 \pm 3,34\%$ ) e Meio com LPS ( $0,00\%$ ). (B) Percentual de efeito citotóxico para extrato, fração e conjunto. Controles Triton ( $100,04 \pm 0,32\%$ ) e Meio com LPS ( $0,01\%$ ). Os resultados foram apresentados em média  $\pm$  desvio padrão.  $p < 0,001$  (\*\*\*),  $p < 0,01$  (\*\*) e  $p < 0,05$  (\*), comparando cada amostra com o Meio + LPS não tratado. Podocarpusflavona A (CJ 7); Extrato Bruto (EB); Meio (MO); Meio com LPS (MO + LPS);

Pode-se destacar ainda inibições relevantes da produção de NO além da PCFA, apresentadas nos conjuntos 4, 5, 6 e 8, que continham bisflavonoides. Os conjuntos 4 e 5 apresentaram melhores resultados na concentração de  $20 \mu\text{g/mL}$ , com inibições respectivas de  $44,26 \pm 4,66\%$  e  $58,98 \pm 4,21\%$ , desconsiderando a maior concentração destes conjuntos, visto que apresentaram citotoxicidade celular. Estes conjuntos obtiveram valor calculado de  $\text{IC}_{50}$  de  $26,43 \pm 1,31$  e  $22,57$  (**Tabela 4**). Já os conjuntos 6 e 8, no entanto, obtiveram resultados mais expressivos em maior concentração ( $100 \mu\text{g/mL}$ ), apresentando inibições respectivas de  $73,62 \pm 8,51\%$  e  $48,19 \pm 1,51\%$ , não alterando ainda a viabilidade celular, com  $\text{CC}_{50}$  de  $>100$ .

O resultado mais expressivo de inibição de NO considerando a viabilidade celular foi apresentado pela PCFA, desta maneira, visando um melhor entendimento de quais possíveis características e concentrações mais adequadas para obtenção de tais modulações, testou-se com as concentrações 10, 20, 40 e  $80 \mu\text{g/mL}$ , comparando-a também com a Apigenina (APG), Acetina (Flavona 4'-O- metilada), além da AMF (**Figura 18**). Estes padrões foram utilizados para que se pudesse analisar o efeito gerado pela presença do grupamento metila ( $\text{CH}_3$ ) adicionada ao carbono 4''' da PCFA, em comparação com a AMF não metoxilada, como também para avaliar se algum dos monômeros era capaz de exercer isoladamente efeito observado para a PCFA.



**Figura 18 - Estruturas químicas da Acacetina e Apigenina.** As estruturas da PCFA e AMF foram adicionadas novamente para facilitar rápida comparação.

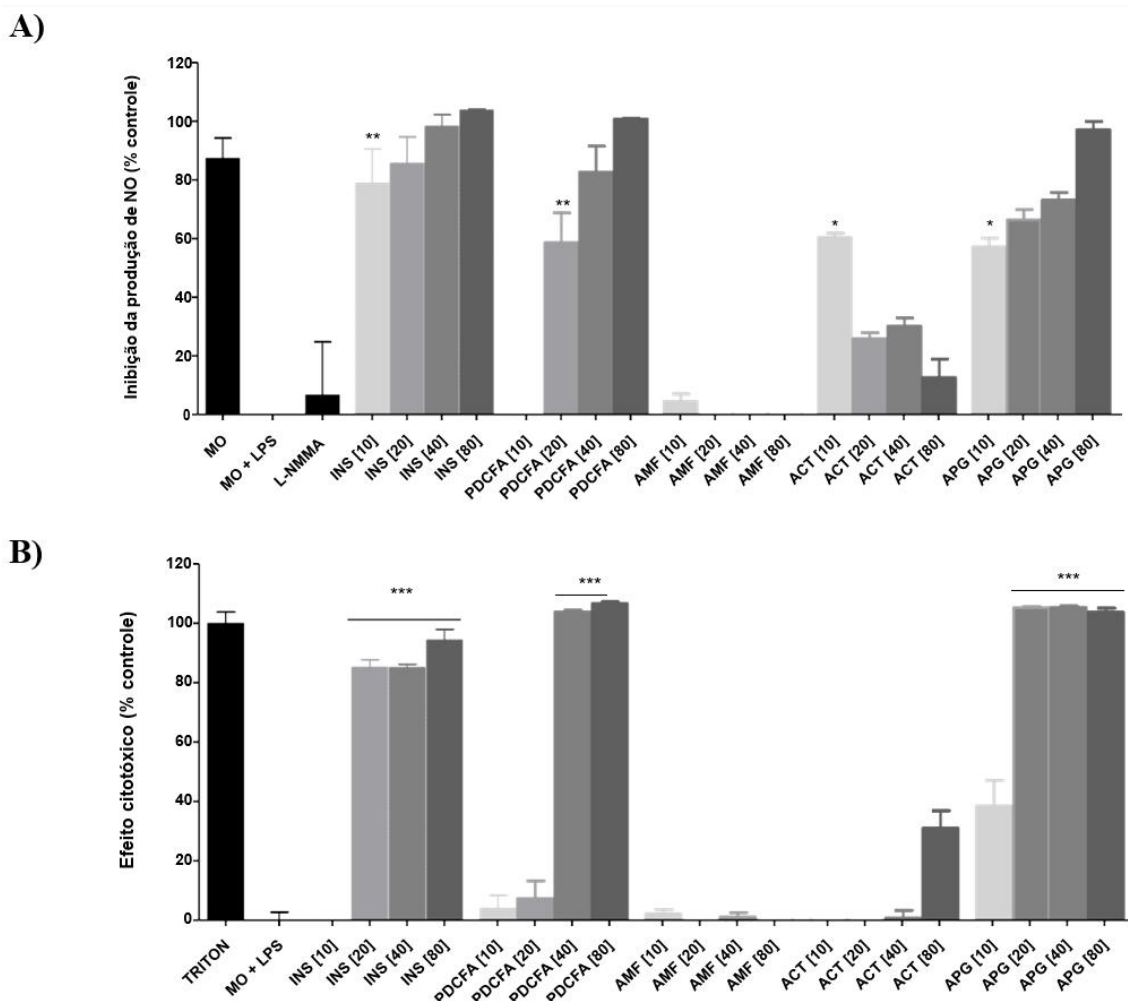
No contexto químico farmacêutico, a presença de um grupamento metila no lugar de uma hidroxila em uma molécula representa o aumento da lipofilicidade (Log P), fator importante a ser considerado na físico-química de fármacos. Esta influência pode atuar de maneira direta na regulação da liberação ou síntese de NO, devido ao aumento da lipofilicidade que está correlacionada com a maior facilidade em permear as membranas celulares (TAVARES, 2004).

Estudos de relação estrutura/atividade (SAR) revelaram que um metoxil em C-4 de piridina aumenta a atividade anti-iNOS em quatro vezes, mas a homologação para etoxil resulta diminuição da atividade em cinquenta vezes em um ensaio enzimático isolado (BONEFFOUS, 2009). Sabe-se que as três isoformas de NOS que é, nNOS, iNOS e eNOS têm 50% a 60% de semelhanças estruturais, desta forma, um dos maiores desafios em obter substâncias e potenciais inibidores de iNOS é a seletividade para iNOS (MINHAS, 2019). Segundo triagem realizada por Jackson et al, 2005, estudos levaram a identificação de uma tiocumarina como um inibidor fraco de iNOS. Esta atividade estava correlacionada com algumas modificações noanel aromático com vários substituintes, como halogênios, metil ou metoxil, no grupo amino ligado a propil.

A PCFA novamente confirmou inibição de NO na concentração de 20 µg/mL de  $58,61 \pm 7,54\%$ , apresentando toxicidade celular nas maiores concentrações (40 e 80 µg/mL) (**Figura 19A**). Já a amentoflavona não apresentou inibição da produção de NO em nenhuma concentração mesmo apresentando viabilidade celular nas mesmas, com  $IC_{50}$  calculado  $>100$ . Esses resultados poderiam ser explicados pelos substituintes presentes em cada uma das substâncias, de modo que hidroxilas podem favorecer menos a atividade reguladora de NO de bisflavonoides do que grupos menos polares como metoxila e nitro, que podem contribuir para a permeabilidade na parede celular (LIN, 2001).

A apigenina apresentou inibição de NO de  $57,17 \pm 5,18\%$  na concentração de 10 µg/mL, sendo a única que demonstrou citotoxicidade celular moderada ( $38,51 \pm 4,87\%$ ), com  $IC_{50}$  calculado de  $10,25 \pm 1,20$ . Comparado com a acacetina, esta também apresentou inibição de NO mais expressiva na menor concentração de 10 µg/mL ( $60,43 \pm 2,39\%$ ), apresentando efeito citotóxico somente na maior concentração ( $31,09 \pm 5,41\%$ ) e  $IC_{50}$  calculado de  $74,54 \pm 1,16$  (**Figura 19B**). A maior potência apresentada pela apigenina, partindo da comparação do  $IC_{50}$  da acacetina, propõe que a presença do grupamento hidroxila ao invés de uma metoxila pode estar interligada com tal elevação. Porém, o baixo  $CC_{50}$  da apigenina (10,21) prova que sua potencia demonstrada tem interrelação não com sua hidroxila, mas sim com a citotoxicidade celular calculada (**Tabela 4**).

Diversos estudos recentes têm apontado novos potenciais farmacológicos à acacetina, destacando-se a regulação da ROS induzida, vinculando esta substância à responsabilidade da indução da parada do ciclo celular e ativação das vias caspase-cascata em células U87 (células de glioblastoma) (SHENDGE, et al.; 2021). Tal estudo confirma o potencial anti-inflamatório da acacetina, atuando na regulação de mediadores inflamatório e de compostos químicos resultantes da ativação ou redução do oxigênio molecular. Segundo os relatos de Lehane & Saliba (2008), ela possui atividade antiplasmódica. Pinzon et al. (2011) relata ainda que ela é um agente antifúngico com potência comparável à anfotericina B contra *C. glabrata* e *C. tropicalis*. É, portanto, um promissor agente para o tratamento de fibrilação atrial (WU et al., 2011), apresentando atividade leishmanicida moderada (SILVA Filho et al., 2009) e inibição moderada da atividade da aromatase ( $IC_{50}$  18,7 µM) (ZHAO et al., 2008).



**Figura 19. Percentual de inibição da produção de óxido nítrico e efeito citotóxico em Macrófagos RAW 264.7.**

A) Percentual de inibição da produção de NO para insolúvel, PCFA, AMF, ACT e APG. Controles: Meio ( $92,66 \pm 3,34\%$ ) e Meio com LPS ( $0,00\%$ ). (B) Percentual de efeito citotóxico para insolúvel, PCFA, AMF, ACT e APG. Controles Triton ( $100,04 \pm 0,32\%$ ) e Meio com LPS ( $0,01\%$ ). Os resultados foram apresentados em média  $\pm$  desvio padrão.  $p < 0,001$  (\*\*\*),  $p < 0,01$  (\*\*) e  $p < 0,05$  (\*), comparando cada amostra com o Meio + LPS não tratado. Meio (MO); Meio com LPS (MO + LPS); Insolúvel (INS); PDCFA (Podocarpusflavona A); Amentoflavona (AMF); Acacetina (ACT); Apigenina (APG).

Segundo Ma et al, 2015, a adição de diferentes grupos funcionais nas posições 1, 2 e 5 do núcleo pirrol, da pirrazolina, pirrol e tiadiazolina, revelaram que um grupo metil ou ciclopentil exibe boa inibição de iNOS ( $IC_{50}$   $5,78$  ou  $6,53 \mu\text{M}$ , respectivamente). Quando comparado com a adição de um átomo de cloro no anel fenil, provou-se potencial prejudicial para a atividade, mas um grupo metoxil é preferido para a atividade reguladora de NO (CARA, 2009). Por fim, foi possível observar que nenhuma das unidades flavônicas presentes na PCFA (apigenina e acacetina) exercem isoladamente o efeito observado para este bisflavonoide.

O insolúvel testado nas quatro concentrações aplicadas foi utilizado visando a observação da presença ou não de bisflavonoides, flavonoides, ou outras classes que pudessem gerar modulação dos mediadores inflamatórios ou citotoxicidade. Os resultados apresentados

mostraram viabilidade celular apenas na concentração mais baixa, de 10 µg/mL, que também apresentou significativa inibição de NO, de  $78,87 \pm 10,18\%$ . Este resultado evidencia a necessidade de se elucidar, caracterizar e identificar as substâncias ainda presentes, que apresentam tal potencial regulatório.

Tem-se como um mecanismo bem descrito para inibição do NO e do TNF- $\alpha$ , o bloqueio da ação do NF- $\kappa$ B (KIM et al., 2007; CHEUNG et al., 2013; CHOI et al., 2014). O NF- $\kappa$ B é um heterodímero que funciona predominantemente como um ativador de transcrição gênica. Tal heterodímero se encontra inativado no citoplasma através da regulação por inibidores  $\kappa$ B, que previnem sua translocação para o núcleo (CHEUNG et al., 2013; CHOI et al., 2014). O NF- $\kappa$ B ativado será translocado para o núcleo onde se ligará a sequências específicas de regiões promotoras de genes que codificam a expressão de iNOS e vários mediadores inflamatórios, como NO e TNF- $\alpha$  (GWON et al., 2013; CHEUNG et al., 2013).

Desta forma, a inibição da produção de NO e TNF- $\alpha$  resultará na redução de eventos inflamatórios, como por exemplo a liberação de citocinas e quimicinas pró-inflamatórias e a vasodilatação, que em determinadas situações podem ser considerados danosos ao organismo (RANG et al., 2003; KUMAR et al., 2008).

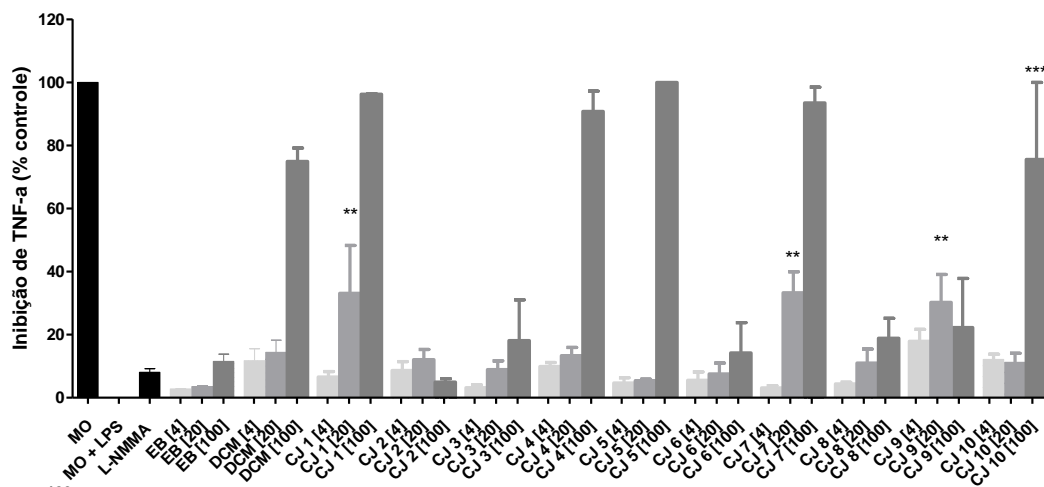
#### **4.5.2 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE TNF- $\alpha$**

O TNF- $\alpha$  desempenha um papel importante na resposta ao dano tecidual ou infecção promovendo inflamação, recrutamento de linfócitos e monócitos para locais de infecção, estimulando as células endoteliais a expressar moléculas de adesão, induzindo quimicinas e ativação dos neutrófilos (PFEFFER, 2003). Através do TNF- $\alpha$ , ocorre a dilatação e aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos, provocando o extravasamento de leucócitos do sangue para a área infectada (STASHENKO et al., 1987).

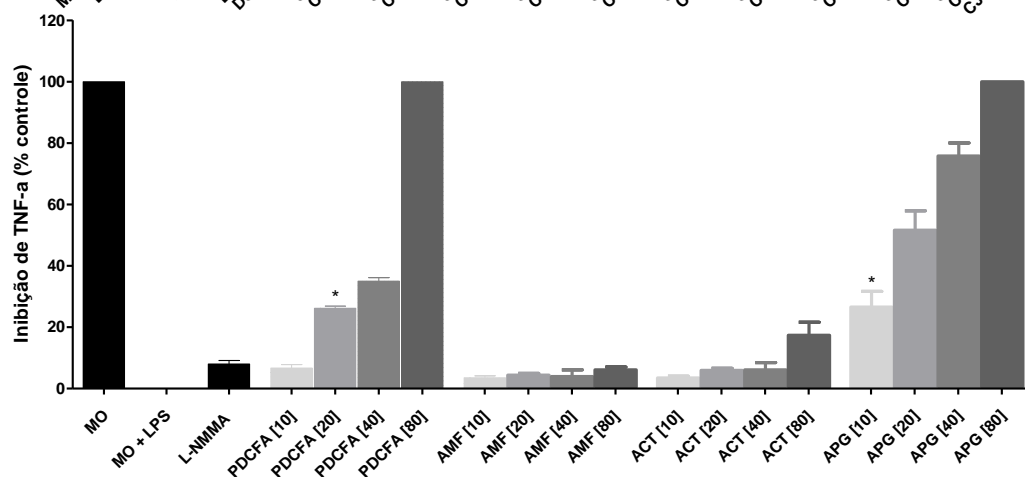
Desta maneira, sabe-se que no bioensaio utilizando fibroblastos murinos da linhagem L929, os mesmos são sensíveis ao TNF- $\alpha$  e, por isso, o sobrenadante obtido do ensaio com os macrófagos RAW 264.7 contendo esta citocina, é aplicada na cultura. Visando, então, obter através do ensaio de citotoxicidade celular (MTT), a variação que as amostras geraram na cultura de macrófagos. Para o ensaio de inibição do TNF- $\alpha$ , dentre as amostras que foram capazes de inibir sem ter apresentado influência pelo seu efeito citotóxico, destaca-se o conjunto 10 ( $80,76 \pm 20,34\%$ ) na concentração de 100 µg/mL. Comparando-as com as substâncias isoladas, a APG, na concentração de 10 µg/mL, inibiu a produção do TNF- $\alpha$  em  $12,44 \pm 3,17\%$ . A PCFA, na concentração de 20 µg/mL, inibiu  $6,07 \pm 0,40\%$ . A ACT, na concentração de 80

$\mu\text{g/mL}$ , inibiu em  $6,79 \pm 2,62\%$ . (Figura 20A).

A)



B)



**Figura 20. Percentual de inibição da produção de TNF- $\alpha$ .** A) extrato, fração e conjuntos. B) Substâncias controles: Meio com LPS ( $93,69 \pm 2,03\%$ ) e Meio ( $0,00\%$ ). Os resultados foram apresentados em média  $\pm$  desvio padrão.  $p < 0,001$  (\*\*\*) ,  $p < 0,01$  (\*\*) e  $p < 0,05$  (\*), comparando cada amostra com Meio + LPS não tratado. Podocarpusflavona A (PCFA); Insolúvel (INS); Meio (MO); Meio com LPS (MO + LPS); Apigenina (APG); Acetina (ACT); Amentoflavona (AMF).

O conjunto de destaque na avaliação da inibição de TNF- $\alpha$  foi o conjunto 10, com inibição de  $76,55 \pm 7,30\%$ , de estrutura química ainda não identificada, apresentando necessidade de elucidação estrutural com a utilização de métodos espectrométricos como HPLC-DAD, RMN e EM.

Na investigação comparativa a fim de compreender a parte química estrutural ligada a atividade apresentada, a apigenina (flavona não metoxilada) apresentou também modulação de TNF- $\alpha$ , na concentração de  $10 \mu\text{g/mL}$  ( $26,55 \pm 7,30\%$ ) e valor calculado de  $\text{IC}_{50}$  de  $34,62 \pm 1,09$  (Figura 20B e Tabela 4). Tais dados confirmam o apresentado nos estudos de Seo et al. de 2014, onde é citado que a apigenina afeta a produção induzida pelo TNF- $\alpha$  e a expressão gênica da mucina MUC5AC em células epiteliais das vias aéreas.

Tais resultados confirmam o explicitado no estudo de imunomodulação de Araújo, 2021, onde houve a avaliação da inibição da produção de NO e TNF- $\alpha$ , tendo a fração em diclorometano de *K. membranacea* apresentado resultados interessantes, obtendo IC<sub>50</sub><0,8  $\mu\text{g/mL}$  para inibição de NO e  $4,70\pm 1,84 \mu\text{g/mL}$  para inibição de TNF- $\alpha$ . Como também na avaliação do efeito citotóxico em macrófagos esta fração apresentou CC<sub>50</sub>>100  $\mu\text{g/mL}$  (HEGGDORNE-ARAUJO, 2014). Mesmo que não sejam ainda resultados significativos, há um indicativo de regulação apresentados e confirmados, que traz a luz do exposto, a necessidade de elucidação de possíveis mecanismos envolvidos.

**Tabela 4. Efeito do extrato, fração e substâncias de *Kielmeyera membranacea* na inibição da produção de NO e TNF- $\alpha$  e avaliação da citotoxicidade em macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS.**

Amostras	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ )		CC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ )
	NO	TNF- $\alpha$	
<b>EB</b>	48,59 $\pm$ 1,06	>100	>100
<b>INS</b>	4,50 $\pm$ 1,98	-	18,63
<b>DCM</b>	8,31 $\pm$ 1,02	>100	14,72
<b>CJ 1</b>	8,90 $\pm$ 1,12	65,02 $\pm$ 1,17	81,97
<b>CJ 2</b>	4,87 $\pm$ 1,05	>100	15,75
<b>CJ 3</b>	14,73 $\pm$ 1,07	>100	6,45 $\pm$ 1,08
<b>CJ 4</b>	26,43 $\pm$ 1,31	76,38 $\pm$ 1,11	28,84 $\pm$ 1,31
<b>CJ 5</b>	22,57	67,37 $\pm$ 2,09	74,23
<b>CJ 6</b>	>100	>100	>100
<b>CJ 7*</b>	24,49	76,21 $\pm$ 1,15	77,56
<b>CJ 8</b>	>100	>100	>100
<b>CJ 9</b>	>100	>100	>100
<b>CJ 10</b>	>100	75,31	>100
<b>AMF</b>	>100	>100	>100
<b>APG</b>	10,25 $\pm$ 1,20	34,62 $\pm$ 1,09	10,21
<b>ACT</b>	74,54 $\pm$ 1,16	>100	89,46 $\pm$ 5,18

\*PCFA isolada

Ademais, durante uma inflamação a resposta imunológica desempenha um papel importante permitindo, principalmente aos macrófagos, a capacidade de eliminar conteúdos fagocitados. Essa eliminação ou não está relacionada a resposta do organismo e produção de mediadores inflamatórios que podem ser direcionadas para um perfil mais pró- ou anti-inflamatório. Assim, um equilíbrio adequado entre esses perfis é essencial para o controle da inflamação e manutenção da função do tecido.

## 5. CONCLUSÕES

Através desse trabalho de conclusão de curso foi possível isolar a PCFA para realização dos ensaios biológicos utilizando técnicas cromatográficas. Ademais, foi possível também comprovar seu efeito de inibição da produção de NO e TNF- $\alpha$  por macrófagos estimulados por LPS.

Desta forma, através da comparação do efeito da PCFA com a amentoflavona foi possível ainda verificar que a presença da metoxila em 4<sup>o</sup> é essencial para que esse efeito ocorra.

Por fim, avaliando a atividade das unidades flavônicas que compõem a PCFA, apigenina e acetina, foi possível concluir que nenhuma das duas foi capaz de exercer o efeito observado pela bisflavona, PCFA, mostrando a relevância desse bisflavonoide como requisito estrutural para a atividade em estudo.

As perspectivas do presente estudo são diversas. Além da continuação dos testes com outros mediadores inflamatórios como IL-1 $\beta$ , pleiteia-se realizar a determinação de suas propriedades químicas ligados aos possíveis mecanismos de ação e sítios de ligação envolvidos. Além disso, objetiva-se otimizar o processo de extração e purificação, aumentando a quantidade de bisflavonoide isolado, potencialmente através de Cromatografia Contracorrente (CCC), e diminuindo também quantidade dos solventes envolvidos, possibilitando a avaliação do mesmo em outros ensaios biológicos *in vitro* e posteriormente *in vivo*.



## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, F.; NAGAFUJI, S.; OKABE, H.; AKAHANE, H.; ESTRADA -MUNIZ, E.; HUERTA-REYES, M.; REYES-CHILPA, R. Trypanocidal constituents in plants 3. Leaves of *Garcinia intermedia* and heartwood of *Calophyllum brasiliense*. **Biol Pharm Bull**, 2004.

ALEIXANDRE-TUDO, J. L.; DU TOIT, W. The role of UV-visible spectroscopy for flavonoids compounds quantification in winemaking. **Frontiers and new trends in the science of fermented food and beverages**, p. 1-21, 2018.

ALESSANDRI, K.; SARANGI, BR.; GURCHENKOV, V.V.; SINHA, B.; KIEßLING, T.R.; FETLER, L.; RICO, F.; SCHEURING, S.; LAMAZE, C.; SIMON, A.; GERALDO, S.; VIGNJEVIC, D.; DOMÉJEAN, H.; ROLLAND, L.; FUNFAK, A.; BIBETTE, J.; BREMOND, N.; NASSOY, P. Cellular capsules as a tool for multicellular spheroid production and for investigating the mechanics of tumor progression in vitro. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2013

AMARAL, R.R.; FERNANDES, C.P.; CAMEL, O.P.; TIETBOHL, L.A.; SANTOS, M.G.; CARVALHO, J.C.; ROCHA, L. Essential oils from fruits with different colors and leaves of *Neomitranthes obscura* (DC.) N. Silveira: an endemic species from Brazilian Atlantic forest. **Biomed Research International**, 2013.

ANGELO, P.M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.66, n.1, p.1-9, 2007.

ARAUJO, M.H., SIMÃO, T.L.B.V., KONNO, T.U.P., GUIMARÃES, D.O., LEAL, I.C.R., LASUNSKAIA, E., MUZITANO, F.M. Anti-mycobacterial and anti-inflammatory activity of restinga plants: a dual approach in searching for new drugs to treat severe tuberculosis. **Rodriguesia**. 72: e 01152019, 2021.

AREND, W.P. GUTHRIDGE, C.J. Biological role of interleukin 1 receptor antagonist isoforms. **Annals of the Rheumatic Diseases**. 59: 60-64, 2000.

ARWA, P.S., ZERAIK, M.L., XIMENES, V.F., et al. Redox-active biflavonoids from *Garcinia brasiliensis* inhibitors of neutrophil oxidative burst and human erythrocyte membrane damage. **J. Ethnopharmacol.** 174, 410-418, 2015.

BAN, H. S.; LEE, S.; KIM, Y. P.; YAMAKI, K.; SHIN, K. H. AND OHUCHI, K. Inhibition of PGE2 production by taiwanin C isolated from the root of *Acanthopanax chiisanensis* and the mechanism of action. **Biochemical Pharmacology**, v. 64, n.9, p. 1345-1354, 2002.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v.29, n.1, p.113:123, 2006.

BFG - The Brazil Flora Group - Brazilian Flora 2020: innovation and collaboration to meet Target 1 of the Global Strategy for Plant Conservation (GSPC). **Rodriguésia**, 69: 1513-1527, 2018.

BFG - The Brazil Flora Group - Growing knowledge: an overview of seed plant diversity in Brazil. **Rodriguésia** 66: 1085-1113, 2015.

BRADLEY, J.R. TNF-mediated inflammatory disease. **Journal of pathology**, v. 214, n.2, p. 149–160, 2008.

BOSSO, A. A.; IDENTIFICAÇÃO DE BISFLAVONOIDES DE *Luxemburgia nobilis* e *Ouratea semiserrata* (Ochnaceae) POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA. **Tese de Mestrado**, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2004.

BONNEFOUS, C.; PAYNE, J. E.; ROPPE, J.; Discovery of inducible nitric oxide synthase (iNOS) inhibitor development candidate KD7332, part 1: identification of a novel, potent, and selective series of quinolinone iNOS dimerization inhibitors that are orally active in rodent pain models. **J Med Chem.**52(9):3047-3062, 2009.

CALASSARA, L. ; PINTO, S. C. ; CECÍLIA PENA MACÁRIO CONDAK ; LEITE, B. ; NERY, L. ; TINOCO, L. W. ; AGUIAR, F. A. ; LEAL, I. C. R. ; MARTINS, S. M. ; LOUBACK, L. ; Raimundo J.M. ; MUZITANO, M. F. . Isolation and characterization of flavonoids from *Tapirira guianensis* leaves with vasodilatory and myeloperoxidase-inhibitory activities. **Natural Product Research**, p. 1-4, 2020.

CARA, L. C. L.; CAMACHO, M. E.; CARRIÓN, M. D. et al. Phenylpyrrole derivatives as neural and inducible nitric oxide synthase (nNOS and iNOS) inhibitors. **Eur J Med Chem.** 44(6):2655-2666, 2009.

CARVALHO, J. C. T. Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. **Ed. Tecmedd**, Ribeirão Preto, SP, 2004.

CARSWELL, E. A.; OLD, L.J.; KASSEL, R.L.; GREEN, S.; FIORE, N.; WILLIAMSON, B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 72, p.3666-70, 1975.

CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. B.; Óxido nítrico: revisão. **Acta Cir Bras [serial online]**, Nov-Dez;17(6), 2002.

CHEN, C.; LI, B.; CHENG, G.; YANG, X.; ZHAO, N.; SHI, R. Amentoflavone Ameliorates A $\beta$ 1-42-Induced Memory Deficits and Oxidative Stress in Cellular and Rat Model. **Neurochem Res**, 2018.

CHEN, W. T.; CHEN, C. H.; SU, H. T.; YUEH, P. F.; HSU, F. T.; CHIANG, I. T. Amentoflavone Induces Cell-cycle Arrest, Apoptosis, and Invasion Inhibition in Non-small Cell Lung Cancer Cells. **Anticancer Res**, 2021.

CHEUNG, D.W.; KOON, C.; WAT, E.; KO, C.; CHAN, J.Y.; YEW, D.T.; LEUNG, P.; CHAN, W.; LAU, C.B.; FUNG, K. A herbal formula containing roots of *Salvia miltiorrhiza* (Danshen) and *Pueraria lobata* (Gegen) inhibits inflammatory mediators in LPS-stimulated RAW 264.7

macrophages through inhibition of nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) pathway. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 145, n. 3, p. 776–783, 2013.

CHIOU, W.; CHEN, C.; LIN, J. Mechanisms of suppression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in RAW 264.7 cells by andrographolide. **British Journal of Pharmacology**, v.129, n. 8, p.1553 – 1560, 2000.

CHOI, R. J. ; CHUN, J.; KHAN, S.; KIM, Y.S. Desoxyrhapontigenin, a potent anti-inflammatory phytochemical, inhibits LPS-induced inflammatory responses via suppressing NF- $\kappa$ B and MAPK pathways in RAW 264.7 cells. **International Immunopharmacology**, v. 18, n.1, p.182–190, 2014.

CHUNG, B. Y.; WON, L. S.; LEE, B. R.; LEE, C. H.; A New Chemical Constituent of Green Leaves of *Ginkgo biloba* L. **Journal of the Korean Chemical Society**, v. 16, n° 2, 1982.

COGLIATTI-CARVALHO, L., FREITAS, A.F.N. de, ROCHA, C.F.D. da, VAN SLUYS, M. Variation in structure and composition of Bromeliaceae at five zones of "restinga" in Jurubatiba National Park, Macaé, RJ. **Revista Brasileira de Botânica**. 24: 1-9, 2001.

CORREIA, M. C. R., LIMA, H. A. de, e DE SILVA, R. C. P. Characterization of fruits, of Rio de Janeiro State. **Rodriguésia**. 64, 2013.

CORTEZ, D.A.G., YOUNG, M.C.M., MARSTON, A., WOLFENDER, J.L. e HOSTETTMANN, K. Xanthonenes, triterpenes and a biphenyl from *Kielmeyera coriacea*. **Phytochemistry**. 47: 1367-74, 1998.

COSTA, E.; FRANÇA, A. T.; SILVA, J. R. L.; Nitric oxide and bronchial asthma – review. **Rev. bras. alerg. imunopatol.** 22(3):83-93, 1999.

COSTA, I. J. B. ; SIMAO, T. ; CALIXTO, S. ; PEREIRA, R. V. ; Konno, Tatiana U. P. ; PINTO, S. C. ; TINOCO, LUZINEIDE WANDERLEY ; LASUNSKAIA, ELENA B. ; LEAL, I. C. R. ; MUZITANO, M. F. . Anti-mycobacterial and immunomodulatory activity of n-hexane fraction and spathulenol from *Ocotea notata* leaves. **Rodriguesia**, v. 72, p. 1, 2021.

COULERIE, P., NOUR, M., MACIUK, A., et al. Structure-activity relationship study of biflavonoids on the Dengue virus polymerase DENV-NS5 RdRp. **Planta Med.** 79(14), 1313-1318, 2013.

COUTINHO, M.A.S.; MUZITANO, M.F.; COSTA, S.S. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**. 1: 241-56, 2009.

COUTINHO, A.E. e CHAPMAN, K.E. The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 335, n.1 , p. 2– 13, 2011.

CROFT, K.D. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.854, p.435,442, 1998.

CUNHA, M.G.S. Episódios reacionais e relação com recidiva em doentes com hanseníase multibacilar tratados com diferentes esquemas terapêuticos. **Tese de Doutorado em Medicina**, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - USP, Ribeirão Preto, 163 f, 2001.

DAI, J.; MUMPER, R.J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules**, v.15, p.7313-7352, 2010.

DIAS, TM da S. .; CARDOSO, BEP.; SILVA, AF da S. e .; SILVA, RRS da .; FREITAS, TEC de .; SEVERO, JS.; CARDOSO, GGS.; MILANEZ, L. de S.; MOURA, AR da S. .; MORAIS, JBS. Relação citocina inflamatória e PCR e risco cardiovascular em pacientes com doença de

Crohn. **Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento**, v. 10, n. 4, pág. e17810414088, 2021.

FAGOTTI, R. L. V.; RIBEIRO, J. C. Uso de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos em insônia: uma revisão bibliográfica. **Brazilian Journal of Health and Pharmacy**, 3(2), 35–48, 2021.

FARNSWORTH, N.R.; MORRIS, R.W. Higher plants – the sleeping giant of drug development. **American Journal of Pharmacy**, v.148, n.2, p.46-52, 1976.

FAROMBI, E. O.; SHROTRIYA, S.; SURH, Y. J.; Kolaviron inhibits dimethyl nitrosamine-induced liver injury by suppressing COX-2 and iNOS expression via NF- $\kappa$ B and AP-1, **Life Sciences**, v.84, n° 5–6, p. 149-155, 2009.

GRIESS, J. P. (1864) *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* 154: 679. / A.C. Bratton, E.K. Marshall Jr., **Journal of Biology and Chemical**, v. 128, p. 537, 1939.

GUERRA, J. A.; MOLINA, M. F.; ABAD, M. J.; VILLAR, A. M. AND BERMEJO, P. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids isolated from *Tanacetum microphyllum*. **International Immunopharmacology**, v.6, n.11, p. 1723–1728, 2006.

GUZIK, T.J.; KORBUT, R.; ADAMEK-GUZIK, T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. **J. Phys. Pharm.** 54: 469-487, 2003.

HEGGDORNE-ARAUJO, M.; SIMAO, T.; Konno, Tatiana U. P.; Guimarães, Denise de O. ; LEAL, I. C. R.; LASSOUNSKAIA, E.; MUZITANO, M. F. Anti-mycobacterial and anti-inflammatory activity of restinga plants: a dual approach in searching for new drugs to treat severe tuberculosis. **Rodriguesia**, v. 72, p. 1, 2021.

HEGGDORNE-ARAUJO, M. Estudo da atividade antimicrobacteriana de produtos naturais obtidos de espécies vegetais ocorrentes na Restinga de Jurubatiba. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Bioativos e Biociências como defesa de Mestrado,

2014.

HEIM, K.E.; TAGLIAFERRO, A.R.; BOBILYA, D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.13, p.572-584, 2002.

HERBÁRIO VIRTUAL. Re flora, 2021. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 05 de dezembro de 2021.

JACKSON, S. A.; SAHNI, S.; LEE, L. et al. Design, synthesis and characterization of a novel class of coumarin-based inhibitors of inducible nitric oxide synthase. **Bioorg Med Chem**. 13(8):2723-2739, 2005.

KELECOM, A.; REIS, G. L.; FEVEREIRO, P. C.A.; SILVA, J. G.; SANTOS, M. G.; MELO NETO, C. B.; GONZALES, M. S.; GOUVEA, R. C.S.; ALMEIDA, G. S.S. A multidisciplinary approach to the study of the fluminense vegetation. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 74, n°.1, p.171–181, 2002.

*KIELMEYERA MEMBRANACEA* CASAR. in GBIF Secretariat (2021). GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset <https://doi.org/10.15468/39omei> accessed via GBIF.org on 2021-12-06.

KIM, H.; YOON, D.; KIM, C.; SHERESTHA, B.; SUNG, J.; HWANG, K.; KIM, T. Ethanol extract of inonotus obliquus inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation in raw 264.7 macrophage cells. **Journal of medicinal food**, v. 10, n.1, p. 80-89, 2007.

KOPP, EB.; MEDZHITOV, R. The Toll-receptor family and control of innate immunity. *Curr Opin Immunol*. Feb;11(1):13-8. 1999.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; ASTER, J.C. Robbins Patologia Básica, **Ed. Elsevier**, 8a edição, Rio de Janeiro, RJ. 2008.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; ASTER, J.C. Robbins Patologia Básica (2013). **Ed. Elsevier**, 9a edição, Rio de Janeiro, RJ.

KUMARI, R.; MEYYAPPAN, A.; SELVAMANI, P.; MUKHERJEEB, J.; JAINSANKAR, P. Lipoxygenase inhibitory activity of crude bark extracts and isolated compounds from *Commiphora berryi*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 138, n.1, p. 256–259, 2011.

LI, W. W.; LI, D.; QUIN, Y.; SUN, C. X.; WANG, Y. L.; GAO, L.; LING, H. L.; ZHANG, F.; CAI, W. ZHU, L.; WANG, G. Cardioprotective effects of Amentoflavone by suppression of apoptosis and inflammation on an in vitro and vivo model of myocardial ischemia-reperfusion injury. **Int Immunopharmacol**, 2021.

LIN, Y.M.; FLAVIN, M.T.; CASSIDY, C.S.; MARA, A.; CHEN, F.C. Biflavonoids as novel antituberculosis agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. 11: 2101-04, 2001.

MA, L.; PEI, H.; LEI, L. et al. Structural exploration, synthesis and pharmacological evaluation of novel 5-benzylidenethiazolidine-2,4-dione derivatives as iNOS inhibitors against inflammatory diseases. **Eur J Med Chem**. 92:178-190, 2015.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA JR., V.F.; ECHEVARRIA, A.; GRYNBERG, N.F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v.25, n.3, p.429-438, 2002.

MACMICKING, J.; XIE, Q.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage Function. **Annual Review of Immunology**, v.15, p. 323–50, 1997.

MARTINON, F.; PREFEITO, A.; TSCHOPP, J. Os inflamassomas: guardiões do corpo. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:229-65.

MANDRIKA, I.; MUCENIECE, R.; WIKBERG, J.E.S. Effects of melanocortin peptides on lipopolysaccharide/interferon-gamma-induced NF-kappaB DNA binding and nitric oxide production in macrophage-like RAW 264.7 cells: evidence for dual mechanisms of action.



**Biochemical Pharmacology**, v. 61, n. 5, p. 613– 621, 2001.

MENG, H., PANG, Y., LIU, G. et al. Podocarpusflavone A inhibits cell growth of skin cutaneous melanoma by supressing STAT3 signaling. **J. Dermatol. Sci.** 100(3), 201-208, 2020.

MINHAS, R.; BANSAL, Y.; BANSAL, G.; Inducible nitric oxide synthase inhibitors: A comprehensive update. **Med Res Rev.** 1–33, 2019.

MOSMMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods.** 16;65(1-2):55-63,1983.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G. M. **J. Nat. Prod.** 83, 3, 770–803, 2020.

NEWMAN, D. J. **Mar. Drugs**, 17, 324, 2019.

NIELSEN, M.; FRØKAIER, S.; BRAESTRUO, C. High affinity of the naturally-occurring biflavonoid, amentoflavon, to brain benzodiazepine receptors in vitro. **Biochem Pharmacol**, 1988.

OLIVEIRA, J. F. ; ARAUJO, M. H. ; MUZITANO, M. F. ; LEAL, I. C. R. . Humiria balsamifera extract inhibits nitric oxide and tumor necrosis factor production in LPS-stimulated macrophages. **Rodriguesia**, v. 72, p. e00292020, 2021.

PACHECO, A. R. S. Células Th17 e Interleucina 17 em Doentes com Artrite Reumatóide: Um novo alvo de tratamento? **Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina.** Porto, 2011.

PALMA-SILVA, C.E.; ALBERTONI, E.F.; ESTEVES, F.A. Efeito de perturbações antrópicas sobre as comunidades de macrófitas e de macroinvertebrados associados (Lagoa Imboassica, RJ). **Brazilian Journal of Ecology.** 7: 26-32, 2006.

PAN, H.; JIANG, H. L.; CHEN, W. L. Interaction of dermal fibroblasts with electrospun composite polymer scaffolds prepared from dextran and poly lactide- coglycolide. **Biomaterials**, v.27, n.17, p.3209-3220, 2006.

PARNA DA RESTINGA DE JURUBATIBA. Governo brasileiro, **Ministério do Meio Ambiente**, 2021.

PINTO, M. R. Papel de óxido nítrico sintase induzida na nocicepção e desconforto orofacial em ratas submetidas a clareamento dental com peróxido de hidrogênio. **Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciências Odontológicas)** – Centro Universitário Christus, Fortaleza, 2021.

PFEFFER, K. Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 14, p. 185-91, 2003.

POPA, C.; NETEA, M.G.; RIEL, P.L.C.M.; MEER, J.W.M.; STALENHOEF, A.F.H. The role of TNF-a in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk. **Journal of Lipid Research**, v. 48, n.4, p. 751-762, 2007.

RAMSEWAK, R. S.; NAIR, M. G.; STRASBURG, G. M.; DEWITT, D. L. AND NITISS, J. L. Biologically active carbazole alkaloids from *Murraya koenigii*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n.2, p. 444-447, 1999.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. AND FLOWER, R. J. (2003) **Farmacologia**. Ed. **Elsevier**, 5ª edição, Rio de Janeiro, RJ.

RIZK, Y. S.; SANTOS-PEREIRA, S.; GERVAZONI, L.; HARDOIM, D. J.; CARDOSO, F. O.; DE SOUZA, C. D. S. F.; PELAJO-MACHADO, M.; CAROLLO, C. A.; DE ARRUDA, C. C. P.; ALMEIDA- AMARAL, E. E.; ZAVERUCHA-DO-VALLE, T.; CALABRESE, K. D. S. Amentoflavone as an Ally in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis: Analysis of Its Antioxidant/Prooxidant Mechanisms. **Front Cell Infect Microbiol**, 2021.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radic Biol Med.** 20, pp. 933-56, 1996.

ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Fundamentos de Robbins – **Patologia Estrutural e Funcional.** Ed. Guanabara Koogan, 6a edição. Rio de Janeiro, RJ, 2001.

RODRIGUES, A. R. M.,; Produtos Naturais na Descoberta de Fármacos. **Tese de mestrado,** Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2018.

ROGERO, S. O.; LUGÃO, A. B.; IKEDA, T. I.; CRUZ, Á. S.; Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Mat. Res.** Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN/CNEN-SP Av. Prof. Lineu Prestes, 2242, 05508-900, São Paulo – SP, 2003.

SANTANGELO, C.; VARI. C.; SCAZZOCCHIO. B.; BENEDETTO. C.; FILES. C.; MASELLA. R.; Polifenóis, sinalização intracelular e inflamação. **Anais dell'Istituto Superiore di Sanità** , 43, pp. 394 - 405, 2007.

SEDDER, L.M. e MCDERMOTT, M.F. TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants – past, present and future. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 25, n. 4, p. 453–472, 2014.

SHENDGE, A. K.,; CHAUDHURI, D.; MANDAL, N. The natural flavones, acacetin and apigenin, induce Cdk-Cyclin mediated G2/M phase arrest and trigger ROS-mediated apoptosis in glioblastoma cells. **Mol Biol Rep.** Jan;48(1):539-549, 2021.

SHEN, X.; NIU, X.; LI, G.; DENG, X.; WANG, J. Amentoflavone Ameliorates Streptococcus suis-Induced Infection In Vitro and In Vivo. **Appl Environ Microbiol**, 2018.

SEO, H. S.; SIKDER, M. A.; LEE, H. J.; RYU, J.; LEE, C. J. Apigenin Inhibits Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ -Induced Production and Gene Expression of Mucin through Regulating Nuclear Factor-Kappa B Signaling Pathway in Airway Epithelial Cells. **Biomol Ther (Seoul)**. Nov;22(6):525-3, 2014.

SÍLVAN, A.M.; ABAD, M.J.; BERMEJO, P.; SOLLHUBER, M.; VILLAR, A. Antiinflammatory activity of coumarins from Santolina oblongifolia. **Journal of Natural Products**, v.59, n.12, p.1183-1185, 1996.

SINGH, A. V. "Potencial da Amentoflavona com propriedades antivirais no tratamento da COVID-19" **Asian Biomedicine**, v.15, n 4, p.153-159, 2021.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN,G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L.A. AND PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Editora da UFSC, 5a edição, 2004.

SIRIMANGKALAKITTI, N., JULIAWATY, L.D., HAKIM, E.H., et al. Naturally occurring biflavonoids with amyloid aggregation inhibitory activity for development of anti-Alzheimer agent. **Bioorg, Med. Chem. Lett.** 29(15), 1994-1997, 2009.

SOUSA, Z.L., DE OLIVEIRA, F.F., DA CONCEIÇÃO, A.O., SILVA, L.A., ROSSI, M.H., SANTOS, J.D.A.S e ANDRIOLI, J.L. Biological activities of extracts from *Chenopodium ambrosioides* Lineu and *Kielmeyera neglecta* Saddi. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**.11: 1-7, 2012.

STEVENS, P. F. Angiosperm Phylogeny Website. Version 14, 2017.

SU, C.; YANG, C.; GONG, M.; KE, Y.; YUAN, P.; WANG, X.; LI, M.; ZHENG, X.; FENG, W. Antidiabetic Activity and Potential Mechanism of Amentoflavone in Diabetic Mice.

**Molecules**, 2019.

STASHENKO, P. et al. Synergistic interactions between interleukin 1, tumor necrosis factor, and lymphotoxin in bone resorption. **J Immunol**, v. 138, p. 1464-1468, 1987.

SZABÓ, Csaba. Pathophysiological Roles of Nitric Oxide in Inflammation. **Biology and Pathobiology Academic Press**, p. 841-872. 2000.

TAVARES, L. C. QSAR: the Hansch's approach. **Quím. Nova**, 27 (4), 2004 .

TOLSTIKOVA, T. G.; SOROKINA, I. V.; TOLSTIKOV, G. A. AND FLEKHTER, O. B. Biological activity and pharmacological prospects of Lupane terpenoids: I. Natural Lupane Derivatives. **Russian Journal of bioorganic Chemistry**, v.32, n.1, p.37-49, 2006.

TONHI, E. et al. Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 616-623, 2002.

TRÉZ, T. A. Considerações sobre o conceito dos 3Rs e o potencial conflito com novas compreensões do animal experimental. **Revista Brasileira de Zootecias**, 19(2): 97-113. 2018.

VILLAGRAN, C.; FERNÁNDEZ-BOTRÁN, R.. HERNANDEZ, E.; NAVE, F.; WELLMANN, I. A.; & MUNÓZ-VALLE, J. F. Perfil de citocinas Th1, Th2, Th17 y otras citocinas pro inflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF $\alpha$ ) en el plasma de pacientes con cáncer gástrico. **Ciencia, Tecnología Y Salud**, 8(2), 166–183, 2021.

VITALE, R. F. e RIBEIRO, F.A.Q. O papel do Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- alfa) no processo de erosão óssea presente no colesteatoma adquirido da orelha média. **Revista**

**Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 73, n. 1, p. 123-127, 2007.

WALTON, N.J.; MAYER, M.J.; NARBAD, A. Vanillin. **Phytochemistry**, v.63, n.5, p.505-515, 2019.

YEH, P. H.; SHIEH, Y. D.; HSU, L. C.; KUO, L. M.; LIN, J. H.; LIAW, C. C.; KUO, Y. H. Naturally Occurring Cytotoxic [3'→8'']-Biflavonoids from *Podocarpus nakaii*. **J Tradit Complement Med**. Jul;2(3):220-6, 2012.

ZHANG, Y., TAN, N.S., HUANG, H., et al. Three bioactive biflavones isolated from *Taxodium mucronatum*. **Yunnan Zhiwu Yaniju** 27(1), 107-110, 2005.

ZHAO, L.; ZHANG, S-L.; TAO, J-Y.; PANG, R.; JIN, F.; GUO, Y-J.; DONG, J-H.; YE, P.; ZHAO, H-Y. AND ZHENG, G-H. Preliminary exploration on antiinflammatory mechanism of Corilagin (beta-1-O-galloyl-3,6-(R)-hexahydroxydiphenoyl-D -glucose) in vitro. **International Immunopharmacology**, v. 8, n.7, p. 1059-1064, 2008.

ZHOU, Y.; TU, Y.; ZHOU, Q.; HUA, A.; GENG, P.; CHEN, F.; HAN, A.; LIU, J.; DAI, D.; WANG, S.; WANG, J.; WEN, C. Evaluation of acacetin inhibition potential against cytochrome P450 in vitro and in vivo. **Chem Biol Interact**. Sep 25;329:109147, 2