



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – ICB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA– PPGIBA

AÇÃO DA *Arrabidaea chica* VERLOT (BIGNONIACEAE) SOBRE O
ENVELHECIMENTO CELULAR

ADRIANE DÂMARES DE SOUSA JORGE BATALHA

MANAUS – AM

2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS-UFAM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

AÇÃO DA *Arrabidaea chica* VERLOT (BIGNONIACEAE) SOBRE O
ENVELHECIMENTO CELULAR

ADRIANE DÂMARES DE SOUSA JORGE BATALHA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: Professor Doutor Antônio Luiz Ribeiro Boechat Lopes

Coorientador: Professor Doutor Pritesh Lalwani

MANAUS – AM

2017

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

B328a Batalha, Adriane Dâmares de Sousa Jorge
Ação da Arrabidaea chica Verlot (Bignoniaceae) sobre o
envelhecimento celular / Adriane Dâmares de Sousa Jorge Batalha.
2017
84 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Antônio Luiz Ribeiro Boechat Lopes
Coorientador: Pritesh Jaychand Lalwani
Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. Arrabidaea chica. 2. Medicina tradicional. 3. Anti-inflamatório.
4. Antienvelhecimento. 5. Macrófago. I. Lopes, Antônio Luiz Ribeiro
Boechat II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

*Dedico este trabalho a Deus, minha
âncora.*

*Aos meus pais Aldo e Gerilza, meus irmãos
Adriano e Diêgo, meu esposo Minerval Jr.
e minhas amadas filhas Júlia, Luíza e
Maísa, que são minha base e fortaleza em
todos os momentos.*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, por estar na direção da minha vida, abençoando-me a cada passo, dando-me capacidade, entendimento, discernimento e fortalecendo-me a todo instante.

A minha amada família: meus pais Aldo e Gerilza pelos valores e ensinamentos passados e por terem sido incansáveis nessa batalha, meus irmãos Adriano e Diêgo por todo apoio e carinho, meu esposo Minerval Jr. pelo amor, força e parceria de todos os dias, e minhas heranças mais preciosas Júlia, Luíza e Maísa, por serem minhas maiores motivações para vencer.

Ao meu orientador, Professor Doutor Antônio Luiz Ribero Boechat Lopez, primeiramente pela oportunidade e confiança, por seus ensinamentos, entusiasmo, paciência, dedicação e conselhos. Ele sabe mais do que ninguém todos as dificuldades que passamos para concluir esta dissertação, sem seu apoio e orientação não teríamos concluído.

Ao meu coorientador Professor Doutor Pritesh Lalwani, por todo seu esforço, dedicação, conselhos e questionamentos que me fizeram amadurecer cientificamente.

As minhas irmãs de pesquisa, Aguyda, Camila e Rosmery por toda amizade, companheirismo, dedicação, pelos desabafos compartilhados e pela presença nos bons e maus momentos. Agradeço a Deus por ter colocado cada uma de vocês na minha vida.

A todos os colegas da minha turma de Mestrado, em especial as minhas irmãs em cristo Vanessa (Nessa), Marissa (Mari) e Anne pela união, dedicação, companheirismo e palavras de apoio durante os momentos de aflição. Sem vocês essa jornada teria sido muito mais difícil.

A toda equipe do IDI (Laboratório de Doenças Infecciosas e Imunologia), Fábio, Juliana (Ju), Rafaella (Rafa), Aguyda (Aguy), Bárbara, Rosmery (Ros), Nadielle (Nadi), Maria, Thiago, Nani, Cristiano e Andréia por todo apoio, companheirismo, pelos abraços nas horas certas e pelas palavras de conforto.

Aos professores Francisco Célio Maia Chaves e Emerson Silva Lima por cederem as folhas moídas da espécie *Arrabidaea chica*, utilizadas para o preparo dos extratos.

Aos professores Emerson Silva Lima, Marne Carvalho de Vasconcellos, Fernanda Guilhon Simplicio, por sempre disponibilizarem os seus laboratórios e equipamentos para a realização de alguns dos nossos experimentos. E aos alunos dos seus grupos de pesquisa, Leornad, Ângela, Edna, Caroline, Rayanne e Caio por sempre terem boa vontade em ajudar, e em especial a Tallita, Gabriel, Leilane, Patrícia e Nilton por auxiliarem no desenvolvimento de alguns experimentos realizados neste trabalho.

Aos professores Carlos Arterio Sorgi e Lucia Helena Faccioli por terem dado-me a oportunidade de fazer um estágio no Laboratório de Inflamação e Imunologia das Parasitoses – LIIP, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP) da Universidade de São Paulo (USP).

Aos membros da banca examinadora pela disponibilidade em participar da avaliação deste trabalho.

À Universidade Federal do Amazonas e ao Programa de Imunologia Básica e Aplicada (PPGIBA).

Aos excelentes profissionais que fazem parte da secretaria do PPGIBA, Ana Paula e Edson “Lorde”, por sempre fazerem o melhor para ajudar.

Enfim, a todos aqueles que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização desse sonho. Agradeço de coração!

.

**“Deus não escolhe os capacitados,
mas capacita os escolhidos!”**

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Ordem	Título da figura	Página
1	Distribuição geográfica da espécie <i>Arrabidaea chica</i> . Smithsonian Tropical Research Institute.	18
2	Foto das folhas de <i>Arrabidaea chica</i> Verlot.	19
3	Estrutura química das 3-desoxiantocianinas isoladas de <i>Arrabidaea chica</i> Verlot.	20

CAPÍTULO II

Ordem	Título da figura	Página
1	Efeito dos extratos aquosos de <i>Arrabidaea chica</i> tipo I, II e III na produção de Óxido Nítrico (NO) por macrófagos J774.	44
2	Perfil químico dos extratos de <i>Arrabidaea chica</i> Verlot.	46
3	Identificação dos íons 299 e 285 presentes em todos os extratos de <i>Arrabidaea chica</i> Verlot.	48
4	Ancoragem das moléculas carajurina e carajurona isoladas da espécie <i>Arrabidaea chica</i> em sítios ativos da proteína Ciclooxigenase-2.	51
5	Toxicidade dos diferentes extratos de <i>Arrabidaea chica</i> em células THP-1.	52
6	Efeito dos extratos aquosos de <i>Arrabidaea chica</i> sobre a produção de iROS em macrófagos THP1.	54
7	Efeito dos extratos acetato de etila, hexânico e etanólico de <i>Arrabidaea chica</i> sobre a produção de iROS em macrófagos THP1.	55
8	Efeito protetor dos extratos aquosos de <i>Arrabidaea chica</i> sobre o Potencial de Membrana Mitocondrial ($\Delta\Psi_m$).	57

9	Efeito protetor dos extratos acetato de etila, hexânico e etanólico de <i>Arrabidaea chica</i> sobre o Potencial de Membrana Mitochondrial ($\Delta\Psi_m$).	58
10	Avaliação do índice de dano em macrófagos THP-1.	60
11	Avaliação da frequência de dano em macrófagos THP-1.	61
12	Análise de fragmentação do DNA (Versão Neutra).	63
13	Controles negativo e positivo utilizados no experimento com Anexina V.	65
14	Marcação das células THP-1 tratadas com os extratos aquosos de <i>Arrabidaea chica</i> com Anexina V.	67
15	Marcação das células THP-1 tratadas com os extratos acetato de etila, hexânico e etanólico de <i>Arrabidaea chica</i> com Anexina V.	68
16	Percentual dos macrófagos THP1 positivos para Anexina V/FITC.	70
17	Efeito de <i>Arrabidaea chica</i> sobre a produção de TNF- α e IL-10 em células J.774 estimuladas com zymosan por 24h.	72

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Ordem	Título da tabela	Página
1	Rendimento percentual dos extratos de <i>Arrabidaea chica</i> Verlot.	45
2	Energias de ligação para a ancoragem molecular entre os ligantes e o sítio ativo da COX-2.	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
COX	Ciclooxigenase
DCF	Diclorofluoresceína
DCFDA	2' 7'- Acetato Diclorofluoresceína
DiOC ⁶ (3)	Iodeto de 3,3'-dihexyloxacarboxyanine iodide
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DOXO	Doxorrubicina
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IC50%	Concentração inibitória 50%
IL-10	Interleucina 10
iROS	“Reactive oxygen species intracellular” - Espécies Reativas de Oxigênio Intracelular.
LMP	Agarose baixo ponto de fusão
MS	Ministério da Saúde
MTT	{Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólico]}
NMP	Agarose ponto de fusão normal
NO	Óxido nítrico
NO ₂ ⁻	Nitrito
oxDCF	Diclorofluoresceína oxidada
PBS	Tampão Fosfato-Salino
PMA	Forbol 12-miristato-13-acetato
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute
RCX	Rofecoxibe
SFB	Soro Fetal Bovino
Stau	“Staurosporine” – Estaurosporina
SSC	Granulosidade ou Complexidade das células
THP-1	Células humanas de Leucemia Monócítica

SUMÁRIO

CAPÍTULO I - REVISÃO DA LITERATURA	15
1 REFERENCIAL TEÓRICO	15
1.1 Plantas medicinais	15
1.2 A importância dos produtos naturais encontrados na região Amazônica	16
1.3 <i>Arrabidaea chica</i> (Humb. & Bonpl.) Verlot.....	18
1.4 Atividades biológicas da <i>Arrabidaea chica</i>	21
2 REFERÊNCIAS.....	244
CAPÍTULO II – POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTIENVELHECIMENTO DOS EXTRATOS DE <i>ARRABIDAEA CHICA</i> VERLOT (BIGNONIACEAE). ..	28
RESUMO.....	29
ABSTRACT	30
1 INTRODUÇÃO	31
2 METODOLOGIA.....	33
2. 1 Avaliação Preliminar das Variedades Botânicas de <i>Arrabidaea chica</i> ..	33
2.1.1 Origem do Material Vegetal para Avaliação Preliminar	33
2.1.2 Obtenção dos Extratos Aquosos de <i>Arrabidaea chica</i> Verlot.....	33
2.1.3 Preparo dos Extratos Vegetais Para Adição em Cultura Celular	33
2.1.4 Quantificação de Óxido Nítrico (NO)	33
2.2 Modelo de Estudo e Delineamentos Experimentais	34
2.3 Origem do Material Vegetal.....	35
2.4 Preparo dos Extratos de <i>Arrabidaea chica</i> Verlot	35
2.5 Extrato Aquoso por Infusão e Decocção	35
2.6 Extrato Hexânico, Acetato de Etila e Etanólico	36
2.7 Prospecção Química dos Extratos de <i>Arrabidaea chica</i> Verlot.....	36
2.8 Ancoragem Molecular	37
2.9 Preparo dos Extratos Vegetais para Adição em Cultura Celular.....	37

2.10	Preparo das Células THP-1 em Cultura	38
2.11	Determinação da IC50% para Toxicidade dos Extratos <i>Arrabidaea chica</i> pelo Método de MTT	38
2.12	Detecção de Espécies Reativas de Oxigênio Intracelular (iROS)	39
2.13	Determinação do Potencial de Membrana Mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)	39
2.14	Efeito dos extratos de <i>Arrabidaea chica</i> na Inibição de Apoptose em Macrófagos	40
2.15	Ensaio para Detecção de Danos no DNA (Cometa)	40
2.15.1	Plaqueamento, Tratamento e Preparo das Células THP-1	41
2.15.2	Montagem das Lâminas	41
2.15.3	Eletroforese na Ausência de Luz	41
2.15.4	Análise das Lâminas	42
2.16	Quantificação de Citocinas.....	42
2.17	Análise Estatística	43
3	RESULTADOS	44
3.1	Quantificação de Óxido Nítrico (NO) em células J774	44
3.2	Rendimentos dos Extratos de <i>Arrabidaea chica</i> Verlot	45
3.3	Perfil Químico dos Extratos de <i>Arrabidaea chica</i> Verlot.....	45
3.4	Fragmentação dos íons com intensidades elevadas nos extratos de <i>Arrabidaea chica</i>	477
3.5	Ancoragem das Moléculas 3-desoxiantocianinas, pertencentes à espécie <i>Arrabidaea chica</i> , em Sítios Ativos da Proteína Ciclooxygenase-2 (COX-2)	49
3.6	Citotoxicidade dos Extratos de <i>Arrabidaea chica</i> Verlot.....	52
3.7	Atividade antioxidante dos extratos de <i>Arrabidaea chica</i> Verlot sobre a produção de Espécies Reativas de Oxigênio intracelular (iROS)	533
3.8	Efeito Protetor dos extratos de <i>Arrabidaea chica</i> Verlot sobre Potencial de Membrana Mitocondrial ($\Delta\Psi_m$).....	56

3.9 Atividade protetora dos extratos de <i>Arrabidaea chica</i> Verlot ao dano no DNA	59
3.10 Avaliação do Efeito Antiapoptotico de <i>Arrabidaea chica</i> Verlot.....	644
3.11 Quantificação de citocinas por Ensaio Imunoenzimático (ELISA)	711
4. DISCUSSÃO	733
5. CONCLUSÃO.....	788
7. REFERÊNCIAS.....	79

CAPÍTULO I - REVISÃO DA LITERATURA

1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 Plantas medicinais

Planta medicinal é toda planta, que administrada ao homem por qualquer via ou forma, exerce alguma ação terapêutica (LOPES, 2005). A utilização de plantas medicinais pela população, para o tratamento de várias doenças, tem sido uma prática comum há milhares de anos (DUTRA et al., 2016). Foi pela observação e da experimentação pelos povos primitivos que as propriedades terapêuticas de determinadas plantas foram sendo descobertas e propagadas de geração em geração, fazendo assim parte da cultura popular (DOS REIS TUROLLA; DE SOUZA NASCIMENTO, 2006).

O tratamento de diversas patologias pela da utilização de medicamentos cujos princípios ativos são exclusivamente de origem vegetal é denominado fitoterapia (ANVISA, 2010). As drogas derivadas de produtos naturais fizeram e podem continuar fazendo grandes contribuições para a saúde humana (KINGSTON, 2011). O conhecimento tradicional sobre o uso das plantas é amplo (DOS SANTOS; DE LIMA; FERREIRA, 2008), simbolizando muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades (MACIEL et al., 2002).

As plantas com potencial medicinal têm sido historicamente uma fonte rica para medicamentos de sucesso, levando ao um interesse científico para a descoberta de novos medicamentos a base de produtos naturais (ATANASOV et al., 2015). A conexão entre plantas e saúde é responsável pelo começo de uma nova geração de terapia, que integra fármacos derivados de plantas, o uso da própria planta ou de suas partes (CORRÊA; MELO; COSTA, 2008). Atualmente, a utilização dessas plantas está presente no combate a distúrbios, principalmente de caráter inflamatório (PIMENTA, 2012).

A presença de metabólitos secundários como polifenóis, flavonoides, terpenoides, alcaloides, antraquinonas, ligninas, polissacarídeos, saponinas e peptídeos estão relacionados à atividade anti-inflamatória de plantas medicinais (SPARG, LIGHT e VAN STADEN, 2004; WAN et al., 2004). Estudos indicam que

os flavonoides são os principais agentes anti-inflamatórios, podendo atuar no bloqueio da cascata do ácido araquidônico com inibição das vias de COX e de lipoxigenase (CHI et al., 2001; JANG et al., 2002). Plantas com potencial anti-inflamatório têm sido disponibilizadas pelo Sistema Único de Saúde (SUS), entre essas *Aloe vera*, *Schinus terebenthifolius* e *Uncaria tomentosa* (MARMITT et al., 2015).

O Brasil possui uma grande biodiversidade, incluindo plantas com grande interesse farmacológico (BREITBACH et al., 2013). Por isso, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o principal órgão responsável pela regulamentação de plantas medicinais e seus derivados no Brasil, realiza ações para garantir o registro de medicamentos, onde esses são avaliados quanto a sua segurança, eficácia e qualidade antes de serem expostos a venda para utilização pela população (CARVALHO et al., 2008). O sistema público de saúde do Brasil oferece fitoterápicos derivados de plantas, doze desses medicamentos são disponibilizados na rede pública de saúde (BRASIL, 2013).

1.2 A importância dos produtos naturais encontrados na região Amazônica

A utilização de plantas como medicamento se perpetua em muitas sociedades tradicionais (LOPES; PANTOJA, 2013), favorecendo a pesquisa e o desenvolvimento de fitoterápicos no país (SILVA et al., 2013). Nas florestas tropicais encontram-se um vasto reservatório de espécies que podem ser usadas como medicamentos, fornecendo compostos químicos de produtos naturais de valor inestimável para o desenvolvimento de novas drogas (GURIB-FAKIM, 2006). Por isso a importância de estimular a realização de estudos científicos, que comprovem o conhecimento popular existente sobre as plantas e a sua eficácia no tratamento das doenças (FEIJÓ et al., 2012).

A Amazônia, a maior floresta tropical do mundo, ocupa quase metade do continente sul-americano, e tem um grande potencial como fonte de novos produtos naturais (DE VARGAS et al., 2016) e de biomoléculas (REIS et al., 2004). Grande parte da população do Amazonas, que vive na região, encontra na floresta as fórmulas para a cura dos seus males, onde as receitas à base de plantas medicinais (muitas aprendidas com os indígenas) são passadas de pais para filhos há gerações (PIMENTA, 2012). Muitas pesquisas estão sendo

desenvolvidas com o objetivo de obter mais conhecimentos do uso de plantas tradicionais da Amazônia (DE VARGAS et al., 2016).

Atualmente, observa-se na sociedade um renovado interesse pela química verde e uma utilização sustentável de produtos naturais (BOHLIN et al., 2010). Nesse contexto, a Bacia Amazônica destaca-se como a região com maior potencial para aproveitamento econômico e sustentável dos produtos naturais voltados à produção de fitomedicamentos (PIMENTA, 2012). De acordo com estudos realizados por NEWMAN e CRAGG, entre os anos 1981 e 2011, grande número de moléculas que apresentaram potencial terapêutico era, direta ou indiretamente, de origem natural.

Várias espécies que ainda são essencialmente desconhecidas para a ciência têm sido utilizadas durante séculos pelas populações locais para tratar diversas doenças (DE VARGAS et al., 2016). Segundo BREITBACH et al., 2013, as utilizações tradicionais das plantas medicinais foram observadas em diferentes partes da Amazônia, principalmente em aldeias localizadas perto das margens dos rios Negro, Solimões, Japurá, Uaupés, Tocantins e Amazonas, bem como perto de cidades maiores, como Manaus, Belém e Santarém. Contudo, existe uma falta de investigação científica que pode contribuir para o conhecimento do potencial farmacológico da flora Amazônica (CARNEIRO et al., 2008).

A existência de produtos farmacêuticos desconhecidos para a medicina moderna é uma das razões mais importantes para a proteção das florestas tropicais, assim que a alta taxa de extinção anual é alarmante (GURIB-FAKIM, 2006). Na sua complexidade, ainda é mantido, uma razoável diversidade após cinco séculos de devastação, isso é observado na utilização de princípios bioativos das plantas medicinais existente na Amazônia (EVANGELISTA et al., 2013). Dessa maneira, existe uma grande necessidade de buscar medidas alternativas para o desenvolvimento de medicamentos para o combate de doenças (SILVA et al., 2013).

Dentre as espécies vegetais usadas na medicina popular encontra-se a *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verlot, pertencente à família Bignoniaceae e popularmente conhecida no Amazonas como crajiru (COSTA et al., 2010). No Brasil, plantas dessa família podem ser encontradas desde a Região Amazônica

até o Rio Grande do Sul (LORENZI; MATOS, 2002). As folhas do crajiru são tradicionalmente utilizadas na medicina popular para a cicatrização de feridas, tratamento de inflamação, cólicas intestinais, anemias, entre outras enfermidades (JORGE et al., 2008; ZORN et al., 2001).

1.3 *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) Verlot

A espécie *Arrabidaea chica* pertence à família Bignoniaceae, a qual encerra 120 gêneros e 800 espécies (TAKEMURA et al., 1995). A classificação taxonômica da espécie foi realizada por CRONQUIST (1981) como pertencente à divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, subclasse Asteridae, ordem Scrophulariales, família Bignoniaceae, gênero *Arrabidaea* e espécie *Arrabidaea chica*. Os centros de distribuição geográfica da espécie *Arrabidaea chica* são as Américas Central e do Sul, onde provavelmente o Brasil é a região onde a família apresenta-se com o maior número de espécies, principalmente na região Amazônica (Figura 1) (LORENZI; MATOS, 2002; PAULETTI; BOLZANI; YOUNG, 2003; CHAPMAN, et al 1927).



FIGURA 1: Distribuição geográfica da espécie *Arrabidaea chica*. Fonte: Smithsonian Tropical Research Institute:
http://biogeodb.stri.si.edu/herbarium/species/15406/?search_key=Arrabidaea+chica

A espécie *Arrabidaea chica* pode ter diversas denominações em várias regiões brasileiras, entre elas crajiru (Amazonas), carajiru, carajuru, capiranga, cajuru, crejeru, carajunu, chica, cipó-pau, cipó-cruz, pariri (Pará), paripari, crejer,

entre outras (CORRÊA, 1984; PAULETTI; BOLZANI; YOUNG, 2003). São descritas botanicamente como plantas lenhosas, arbustivas ou arbóreas e também trepadeiras. Possuem folhas compostas bi ou trifoliadas, folíolos oblongo-lanceolados, cartáceos, medindo entre 8-13 cm de comprimento (JOLY, 1993; LORENZI; MATOS, 2002).



FIGURA 2: Foto das folhas de *Arrabidaea chica* Verlot.

Na medicina popular as folhas de cajuru (Figura 2) são utilizadas como decocto na forma de chá com função adstringente, contra diarreias, anemia, leucemia, icterícia, albuminúria, para lavagens vaginais através de “banho de assento” ou na forma de tintura para uso tópico diretamente sobre lesões de pele ou ainda pomadas, cremes (BORRÁS, 2003) e na forma de sabonete tendo um efeito antiacne (TAKEMURA, 1995). Também é utilizada como anti-inflamatório, antioxidante, antidiabética e desinfetante (CORRÊA, 1984; LORENZI; MATOS, 2002; JORGE et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2009a). Os indígenas da região Amazônica utilizam o corante preparado a partir das folhas de *Arrabidaea chica*, na pintura corporal, para tingir enfeites, utensílios e vestuários, e até como método profilático contra picada de mosquito (BARBOSA et al., 2008).

A espécie *Arrabidaea chica* era comercializada, no início do século XX, pelo seu corante vermelho-escuro ou vermelho-tijolo (CHAPMAN et al., 1927) produzidos à partir da fermentação e manipulação de suas folhas como anileiras (*Indigofera* spp.) (TAKEMURA, 1995). De acordo com ZORN et al., (2001) as

folhas de *Arrabidaea chica* foram estudadas pela primeira vez por CHAPMAN e cols. (1927), onde isolaram dois pigmentos nomeados carajurina (pigmento principal) e carajurona como sendo os principais responsáveis por proporcionar coloração avermelhada como característica dos extratos desse vegetal. Mais tarde, SCOGIN (1980) e HARBORNE & WILLIAMS (2001) propuseram que a coloração vermelha adquirida pelas folhas após a coleta, se deve a formação de 3-desoxiantocianidinas, e que ocorrência destes pigmentos na família Bignoniaceae poderia ser provavelmente restrita a *Arrabidaea chica*.

A estrutura dos pigmentos presentes em *Arrabidaea chica* foi elucidada por ZORN et al., (2001) e Devia et al., (2002) a partir de suas folhas, onde foi feito o isolamento e caracterização espectrometricamente das 3-desoxiantocianidinas (Figura 3). As antocianinas possuem suas estruturas básicas formadas por agliconas que são antociadininas. As antociadininas são instáveis conforme o pH, solventes, temperatura, luminosidade e outros fatores, no entanto, 3-desoxiantocianidinas, devido a sua estrutura química, apresentam maior estabilidade (WILLIAMS e GRAYER, 2004).

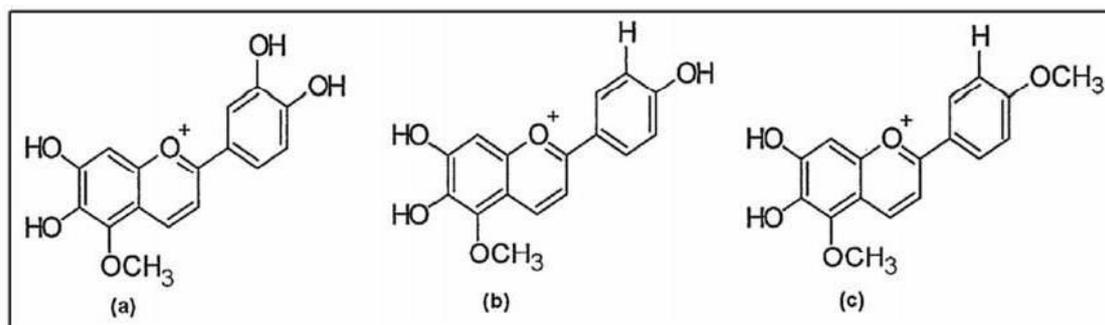


FIGURA 3. Estrutura química das 3-desoxiantocianinas isoladas de *Arrabidaea chica* Verlot. a) 6,7,3',4'-tetra-hidroxi-5-metoxi-flavílio; b) 6,7,4'-tri-hidroxi-5-metoxi-flavílio (carajurona); c) 6,7-di-hidroxi-5,4'-dimetoxi-flavílio (carajurina). (ZORN et al., 2001; PAULA et al., 2013).

As antocianinas são flavonóides e estão distribuídos na natureza, pertencem ao grupo dos compostos fenólicos e são responsáveis pela coloração vermelho-escuro das folhas de *A. chica* (WANG; STONER, 2008). A partir de uma abordagem fitoquímica sobre *Arrabidaea chica*, foi possível detectar diversas classes metabólicas no extrato etanólico, tais como antociadininas, antocianinas,

antraquinona, catequinas, ácidos orgânicos, açúcares redutores, esteróides, xantonas e taninos, flavanonóis e flavanona (BARBOSA et al., 2008). Já no extrato metanólico das folhas foi também identificado a luteolina, um corante vegetal amarelo, derivado dos flavonoides (TAKEMURA et al., 1995).

1.4 Atividades biológicas da *Arrabidaea chica*

Pesquisas realizadas *in vitro* e *in vivo* demonstraram uma forte atividade anti-inflamatória do extrato de *Arrabidaea chica* e de seus constituintes (TAKEMURA et al., 1995; ZORN et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2009b). A atividade anti-inflamatória da carajuflavona e da luteolina isoladas do extrato da *A. chica* foi utilizada para testes *in vitro* em neutrófilo de coelho, onde observou-se que a luteolina mostrou uma alta capacidade de inibir a liberação de enzimas e produção de superóxido por neutrófilos estimulados por peptídeo FMLP (formylmethionil-leucyl-phenylalanine) (TAKEMURA et al., 1995). Esse peptídeo ativa a NADP oxidase que está localizada na membrana plasmática e leva a produção de ânion superóxido que é fonte de todas as outras espécies reativas de oxigênio geradas na explosão respiratória do neutrófilo (FILHO, 2006).

O experimento desenvolvido por ZORN et al., 2001 utilizando o extrato lipofílico (200 µg/mL) das folhas de *Arrabidaea chica* mostrou ação anti-inflamatória *in vitro* pela inibição do Fator de Transcrição Nuclear kappa B (NF-κB, do inglês, nuclear fator-κB). O NF-κB regula a transcrição de genes que codificam diversas citocinas pró-inflamatórias, enzimas inflamatórias, entre essas iNOS, COX-2 e 5-LOX, além de ser considerado um mediador central da resposta imune em seres humanos, portanto, sua inibição pode modular o processo inflamatório. Observou-se que tanto a carajurina isolada (500 µM) quanto o extrato lipofílico inibiram completamente o NF-κB, o que indica que além das 3-desoxiantocianidinas, outras substâncias presentes no extrato que ainda não foram identificadas são responsáveis pela atividade anti-inflamatória (ZORN et al., 2001).

Foram realizados estudos para avaliar o efeito do extrato aquoso de *Arrabidaea chica* sobre o edema induzido por serpentes *Bothrops atrox* e *Crotalus durissus ruruima* em camundongos albinos por três vias diferentes: oral, intraperitoneal e subcutânea. Os resultados mostraram que o extrato possui

substâncias com ação anti-inflamatória ao serem administrados pelas vias subcutânea (10,6g/kg peso) e intraperitoneal (2,5g/kg peso), não tendo efeito por via oral. Pela análise histopatológica foi demonstrado que houve a inibição do infiltrado de granulócitos e da miocitólise induzidos pelas toxinas das serpentes (OLIVEIRA et al., 2009b).

A avaliação das propriedades de cicatrização do extrato metanólico das folhas de *Arrabidaea chica* foram realizados *in vitro* e *in vivo* por JORGE e cols. (2008), onde os experimentos *in vitro* demonstraram que *Arrabidaea chica* estimulou o crescimento de fibroblastos de uma forma dependente da concentração ($EC_{50} = 30 \mu\text{g/mL}$), além do aumento da produção de colágeno que indicaram a capacidade antioxidante moderada do extrato. Os resultados dos experimentos *in vivo*, indicaram que o extrato metanólico administrados por via oral é capaz de reduzir em 96% o efeito ulcerativo do etanol em modelo murínico (JORGE et al., 2008). A ação antioxidante do extrato corrobora o uso popular do crajiru, podendo está possivelmente relacionada à presença de antocianidinas (JORGE et al., 2008) e à presença de luteolina (AMARAL et al., 2002).

O desenvolvimento de testes *in vitro* com o extrato etanólico 70% (v/v) das folhas de *Arrabidaea chica* (10-500 $\mu\text{g/mL}$) demonstraram o efeito anti-hipertensivo e vaso-relaxante em modelos de artérias mesentéricas de ratos Wistar (CATARGENES, 2009). A partir dos resultados pode ser sugerido que esse efeito venha ser mediado por uma via independente de endotélio que parece envolver o bloqueio de influxo de cálcio (Ca^{+2}) com ação sobre os receptores de rianodina na membrana citoplasmática. Foram realizados também testes *in vivo* em ratos Wistar espontaneamente hipertensos, comprovando assim sua atividade anti-hipertensiva, onde observou-se que houve a diminuição da resistência vascular periférica com possível envolvimento do influxo de Ca^{+2} através dos canais tipo L operadores por voltagem (CATARGENES, 2009).

Pesquisas realizadas por BARBOSA e colaboradores (2008) utilizando o extrato etanólico das folhas de *Arrabidaea chica* demonstraram seu potencial na inibição total de crescimento do fungo *Trichophyton mentagrophytes*, em uma concentração de 3,1 mg/ml. O efeito visto foi associado a presença de quinonas e flavonoides no extrato da planta. O extrato etanólico não apresentou toxicidade

relevante aguda, mesmo quando avaliado a uma dose de 1000 mg/kg. Outra pesquisa *in vitro* realizada por MEDEREIROS e cols. (2011) avaliando a atividade anti-hepatotóxica do extrato etanólico a 70%(v/v) das folhas de cajuru em ratos Wistar, mostraram que a administração oral do extrato (doses de 300, 500 ou 600 mg/kg) por 7 dias foi capaz de inibir os danos no fígado causados por tetracloreto de carbono.

Foram realizados trabalhos demonstrando a utilização das folhas frescas de cajuru como corante natural, obtido pela fervura e fermentação. O resultado indicou, que o corante de cajuru devido a sua natureza ácida (técnica de fervura: pH 5,5; método por fermentação: pH 6,4) apresentou maior afinidade por componentes acidófilos dos tecidos, corando em rosa o citoplasma das células e fibras colágenas. Portanto, o cajuru pode ser utilizado como corante ácido em técnicas de coloração em histologia (SOUZA; FREITAS HIDALGO; CHAVES, [s.d.]).

2 REFERÊNCIAS

AMARAL, R.R.; MANEZES, F.S.; ROCHA, L.M.; SOARES, T.E.; RANNA, F. Estudo Fitoquímico e Atividade Antioxidante em extratos de folhas de *Arrabidaea chica*, **Resumos da 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ)**, 2002.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. BRASIL. RDC nº 14/2010 de 31/03/2010 – Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Revogada pela RDC 14/2010. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 13 março de 2016.

ARNOUS, A. H.; SANTOS, A. S.; BEINNER, R. P. C. Plantas medicinais de uso caseiro-conhecimento popular e interesse por cultivo comunitário. **Revista espaço para a saúde**, v. 6, n. 2, p. 1–6, 2005.

ATANASOV, A. G. et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 8, p. 1582–1614, dez. 2015.

BARBOSA, W. L. R. et al. *Arrabidaea chica* (HBK) Verlot: phytochemical approach, antifungal and trypanocidal activities. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 544–548, 2008a.

BARBOSA, W. L. R. et al. *Arrabidaea chica* (HBK) Verlot: phytochemical approach, antifungal and trypanocidal activities. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 544–548, 2008b.

BOHLIN, L. et al. Natural products in modern life science. **Phytochemistry Reviews**, v. 9, n. 2, p. 279–301, jun. 2010.

BREITBACH, U. B. et al. Amazonian Brazilian medicinal plants described by C.F.P. von Martius in the 19th century. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 147, n. 1, p. 180–189, maio 2013.

CARNEIRO, A. L. B. et al. Screening of Amazonian plants from the Adolpho Ducke forest reserve, Manaus, state of Amazonas, Brazil, for antimicrobial activity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 1, p. 31–38, 2008.

CARVALHO, A. C. et al. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Rev Bras Farmacogn**, v. 18, n. 2, p. 314–319, 2008.

CORRÊA, M. F. P.; MELO, G. O. DE; COSTA, S. S. Substâncias de origem vegetal potencialmente úteis na terapia da asma. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 785–797, dez. 2008.

DE VARGAS, F. S. et al. Antioxidant activity and peroxidase inhibition of Amazonian plants extracts traditionally used as anti-inflammatory. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, n. 1, dez. 2016.

DOS REIS TUROLLA, M. S.; DE SOUZA NASCIMENTO, E. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 2, 2006.

DOS SANTOS, M. R. A.; DE LIMA, M. R.; FERREIRA, M. Uso de plantas medicinais pela população de Ariquemes, em Rondônia. **Horticultura Brasileira**, v. 26, n. 2, p. 244–250, 2008.

DUTRA, R. C. et al. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, jan. 2016.

EVANGELISTA, S. S. et al. Fitoterápicos na odontologia: estudo etnobotânico na cidade de Manaus. **Rev. bras. plantas med**, v. 15, n. 4, p. 513–519, 2013.

FEIJÓ, A. M. et al. Medicinal plants used by elderly people with Diabetes mellitus in the treatment of the disease symptoms. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 1, p. 50–56, 2012.

FIGUEIREDO FILHO, D. A. et al. Mulateiro (*Calycophyllum spruceanum*) Stem Cell Extract: An Evaluation of Its Anti-Aging Effect on Human Adult Fibroblasts. [s.d.].

GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. **Analytical biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131–138, 1982.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 1, p. 1–93, fev. 2006.

HE, W.; GOODKIND, D.; KOWAL, P. R. **An aging world: 2015**. [s.l.] United States Census Bureau, 2016.

IP, W. E. et al. Anti-inflammatory effect of IL-10 mediated by metabolic reprogramming of macrophages. **Science**, v. 356, n. 6337, p. 513–519, 2017.

JORGE, M. P. et al. Evaluation of wound healing properties of *Arrabidaea chica* Verlot extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 118, n. 3, p. 361–366, ago. 2008.

KINGSTON, D. G. I. Modern Natural Products Drug Discovery and Its Relevance to Biodiversity Conservation. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 3, p. 496–511, 25 mar. 2011.

LOPES, G. F. G.; PANTOJA, S. C. DE S. Levantamento das espécies de plantas medicinais utilizadas pela população de Santa Cruz–Rio de Janeiro–RJ. **Rev Eletronica Nov Enf**, v. 16, n. 16, p. 62–80, 2013.

MACIEL, M. A. M. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química nova**, v. 25, n. 3, p. 429–438, 2002.

MARMITT, D. J. et al. Plantas Mediciniais da RENISUS Com Potencial Anti-inflamatório: Revisão Sistemática Em Três Bases de Dados Científicas. **Revista Fitos**, v. 9, n. 2, 2015.

MEDICINALES, P. Y. C. D. P. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. 2011.

MICHAUD, M. et al. Proinflammatory Cytokines, Aging, and Age-Related Diseases. **Journal of the American Medical Directors Association**, v. 14, n. 12, p. 877–882, dez. 2013.

MICHEL, A. F. R. M. et al. Evaluation of anti-inflammatory, antiangiogenic and antiproliferative activities of *Arrabidaea chica* crude extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 165, p. 29–38, maio 2015.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 311–335, 23 mar. 2012.

OLIVEIRA, D. P. C. DE et al. Anti-inflammatory activity of the aqueous extract of *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verl. on the self-induced inflammatory process from venoms amazonians snakes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2B, p. 643–649, 2009.

PAULA, J. T. et al. Extraction of anthocyanins from *Arrabidaea chica* in fixed bed using CO₂ and CO₂/ethanol/water mixtures as solvents. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 81, p. 33–41, set. 2013.

PAULETTI, P. M.; BOLZANI, V. DA S.; YOUNG, M. C. M. Chemical constituents of *Arrabidaea samydoides* (Bignoniaceae). **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 641–643, 2003a.

PAULETTI, P. M.; BOLZANI, V. DA S.; YOUNG, M. C. M. Chemical constituents of *Arrabidaea samydoides* (Bignoniaceae). **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 641–643, 2003b.

PIMENTA, A. C. Instituições paraenses se unem para produção de fitoterápicos. **Revista Ver-a-Ciência**, v. 1, p. 29–35, 2012.

SILVA, J. C. et al. Modelos experimentais para avaliação da atividade antinociceptiva de produtos naturais: uma revisão. **Brazilian Journal of Pharmacy**, v. 94, p. 18–23, 2013.

SILVA, W. J. M. DA; FERRARI, C. K. B. Metabolismo mitocondrial, radicais livres e envelhecimento. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, p. 441–451, 2011.

SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, n. 1, p. 184–191, 1 mar. 1988.

SOUZA, H. Q.; FREITAS HIDALGO, A.; CHAVES, F. C. M. Preparo do corante de crajirú (*Arrabidaea chica* (Bonpl.) B. Verl.) e sua aplicação em Histologia. [s.d.].

TAFFARELLO, D. et al. Activity of *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) Verlot extracts obtained by biotechnological processes on fibroblast and human tumor cells. **Química Nova**, v. 36, n. 3, p. 431–436, 2013.

TSENG, T.-S. et al. Discovery of a potent cyclooxygenase-2 inhibitor, S4, through docking-based pharmacophore screening, in vivo and in vitro estimations. **Mol. BioSyst.**, v. 12, n. 8, p. 2541–2551, 2016.

VAFAI, S. B.; MOOTHA, V. K. Mitochondrial disorders as windows into an ancient organelle. **Nature**, v. 491, n. 7424, p. 374–383, 14 nov. 2012.

WANG, L.-S.; STONER, G. D. Anthocyanins and their role in cancer prevention. **Cancer Letters**, v. 269, n. 2, p. 281–290, out. 2008.

ZORN, B. et al. 3-Desoxyanthocyanidins from *Arrabidaea chica*. **Phytochemistry**, v. 56, n. 8, p. 831–835, 2001.

CAPÍTULO II – POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTIENVELHECIMENTO DOS EXTRATOS DE *ARRABIDAEA CHICA* VERLOT (BIGNONIACEAE).

Adriane Dâmares de Sousa Jorge Batalha^{1,*}, Aguyda Rayanny Cavalcante Barbosa¹, Tallita Marques Machado¹, Leilane Bentes de Sousa¹, Marne Carvalho de Vasconcellos², Emerson Silva Lima², Pritesh J. Lalwani¹, Antonio Luiz Boechat¹.

¹*Laboratório de Doenças Infecciosas e Imunologia, Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brasil.*

²*Laboratório de Atividade Biológica – Biophar, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas, AM, Brasil.*

*Autor correspondente. Tel.: +5541991382737. E-mail address: adrianejorge87@hotmail.com. Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas - Av. General Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 3000, Japiim, Manaus, Amazonas, Brasil, CEP 69057-000.

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

RESUMO

A espécie amazônica *Arrabidaea chica* Verlot (Bignoniaceae), conhecida como cajuru, é muito utilizada na medicina tradicional, devido ao seu potencial antioxidante e anti-inflamatório. O objetivo deste estudo foi investigar o potencial antienvelhecimento e anti-inflamatório de cinco extratos da espécie *Arrabidaea chica*: extratos aquosos brutos por infusão e decocção, acetato de etila, hexânico e etanólico. Foi realizada a quantificação de citocinas para avaliar o efeito na inflamação, e foi avaliada a ação contra o envelhecimento por meio da produção de espécies reativas de oxigênio intracelular (iROS), potencial de membrana mitocondrial, teste do cometa e citometria. Os extratos aquosos reduziram o TNF- α (IC 50% = 35 μ g / mL) e aumentaram a IL-10 (EC 50% = 31 μ g / mL) com Zymosan dose-dependente em macrófagos J774, demonstrando a atividade anti-inflamatória. A capacidade antienvelhecimento foi demonstrada em todos os extratos pela redução da produção de iROS ($p < 0.0001$) e aumento do potencial de membrana mitocondrial ($p < 0.0001$) quando comparado com o controle de estaurosporina em macrófagos THP-1. Além disso, os extratos de *Arrabidaea chica* protegeram a fita dupla de DNA contra a ação da doxorubicina ($p < 0,0001$) em células THP-1 e protegeram as células da apoptose ($p < 0,0001$), destacando o efeito principal promovido pelo acetato de etila (95% CI 83,60 – 123,1; $p < 0.0001$) e extratos aquosos (95% CI 6,278 – 7,655; $p < 0.0001$), respectivamente. A espécie *Arrabidaea chica* (cajuru) é de fácil acesso e sugere-se que seja explorada como agente terapêutico contra o envelhecimento celular e processos inflamatórios. Este trabalho foi apoiado pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM).

Palavras-chave: *Arrabidaea chica*, medicina tradicional, anti-inflamatório, antienvelhecimento, macrófago.

ABSTRACT

The amazonian species *Arrabidaea chica* Verlot (Bignoniaceae), known as *crajiru*, are useful in traditional medicine, because of antioxidant and anti-inflammatory potential. The aim of this study was to investigate the anti-aging and anti-inflammatory potential of five extracts from *Arrabidaea chica* species: crude aqueous extracts by infusion and decoction, ethylic acetate, hexanic and ethanolic. It was performed the cytokines quantification to evaluate the effect on inflammation, and was assessed the action against aging by intracellular reactive oxygen species (iROS) production, mitochondrial membrane potential, comet test and cytometry. The aqueous extracts reduced TNF- α (IC 50% = 35 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and increased IL-10 (EC 50% = 31 $\mu\text{g}/\text{mL}$) with dose-dependent Zymosan in J774 macrophages, demonstrating the anti-inflammatory activity. The anti-aging ability was demonstrated in all the extracts by reduction of iROS production ($p < 0.0001$) and enhancement of the mitochondrial membrane potential ($p < 0.0001$) when compared to the staurosporine control in THP-1 macrophages. Furthermore, the extracts from *Arrabidaea chica* protected the double-stranded of DNA against doxorubicin action ($p < 0.0001$) in THP-1 cells and protected the cells from apoptosis ($p < 0.0001$), highlighting the major effect promoted by ethylic acetate extract (95% CI 83,60 – 123,1; $p < 0.0001$) and aqueous extracts (95% CI 6,278 – 7,655; $p < 0.0001$), respectively. The species *Arrabidaea chica* (*crajiru*) is easily accessible and we suggest that it should be explored as a therapeutic agent against cellular aging and inflammatory processes. This work was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM).

KeyWords: *Arrabidea Chica, Tradditional Medicine, anti-inflammatory, anti-aging, macrophages.*

1 INTRODUÇÃO

A população idosa mundial continua crescendo em um ritmo acelerado (HE; GOODKIND; KOWAL, 2016) e segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), atualmente 841 milhões de pessoas em todo o mundo tem mais de 65 anos e esses números deverão aumentar para dois bilhões até 2050. A disfunção mitocondrial está relacionada à morte celular e ao surgimento de várias doenças, entre elas, distúrbios relacionados à idade, diabetes e neurodegeneração (VAFAI; MOOTHA, 2012). Inúmeros trabalhos evidenciam que o envelhecimento celular está relacionado à diminuição do metabolismo mitocondrial (SILVA; FERRARI, 2011), resultante da produção excessiva de espécies reativas de oxigênio, do acúmulo de mutações no DNA mitocondrial, da fosforilação oxidativa, assim como da desigualdade de expressão de enzimas antioxidantes (WANG et al., 2013). Estão sendo desenvolvidas alternativas que possam proteger as células do envelhecimento, por exemplo, os antioxidantes naturais encontrados em plantas da região Amazônica (ZONG et al., 2015).

A sabedoria popular, muitas vezes, é a fonte em que a ciência vai buscar inspiração para algumas de suas maiores descobertas (COSTA; NUNES; PERES, 2010). O uso de plantas medicinais no tratamento de diversas doenças ocorre a milhares de anos, onde as antigas civilizações já conheciam o poder medicinal de algumas plantas e as cultivavam, repassando os saberes a cada geração (FEIJÓ et al., 2012). Na fitoterapia, que é a área do conhecimento que busca a cura das doenças pelas plantas medicinais (DANTAS; GUIMARÃES, 2007), destaca-se a importância do conhecimento popular e a necessidade de um envolvimento científico para melhor aplicabilidade e uso dessas espécies vegetais (MEDICINALES, 2011).

O avanço da medicina convencional não inibiu o progresso das práticas curativas populares, que utilizam as plantas produzidas localmente para tratar suas enfermidades (ARNOUS; SANTOS; BEINNER, 2005; LOPES; PANTOJA, 2013). A Amazônia é a maior floresta tropical do mundo e ocupa quase metade do continente sul-americano, sendo considerada uma fonte rica de biomoléculas com aplicações medicinais (CARNEIRO et al., 2008; REIS et al., 2004). Por essa razão, é fundamental realizar estudos científicos que comprovem o conhecimento popular existente sobre as plantas e a eficácia no tratamento das

doenças, proporcionando aumento dos benefícios na utilização das plantas medicinais (FEIJÓ et al., 2012).

Dentre as espécies de plantas medicinais utilizadas na Amazônia por apresentar atividade anti-inflamatória, encontra-se a *Arrabidaea chica*, pertencente à família Bignoniaceae (PAULETTI; BOLZANI; YOUNG, 2003b), sendo popularmente conhecida no Amazonas como crajiru. No Amazonas as folhas dessa planta são tradicionalmente utilizadas na medicina popular para a cicatrização de feridas, tratamento de inflamação, cicatrização, cólicas intestinais, hemorragia, leucorreia e anemia (JORGE et al., 2008; ZORN et al., 2001). Os indígenas da região Amazônica além de utilizarem o corante preparado a partir das folhas de *A. chica* na pintura corporal, para tingir enfeites, utensílios e vestuários, também usam como método profilático contra picada de mosquito (BARBOSA et al., 2008).

Uma melhor investigação científica pode proporcionar um conhecimento mais realista do potencial das espécies que fazem parte da biodiversidade Amazônica (CARNEIRO et al., 2008). Dentro do contexto exposto, o objetivo principal do nosso trabalho foi avaliar a atividade antienvelhecimento dos diferentes extratos obtidos a partir da espécie Amazônica *Arrabidaea chica* Verlot (Bignoniaceae), popularmente conhecida como crajiru (AM), sendo amplamente utilizada na medicina tradicional, por seu potencial antioxidante, anti-inflamatório, antimicrobiano, além da sua atividade eficaz como agentes anticancerígenos (JORGE et al., 2008; ZORN et al., 2001; MICHEL et al., 2015; TAFFARELLO et al., 2013).

2 METODOLOGIA

2.1 Avaliação Preliminar das Variedades Botânicas de *Arrabidaea chica*

2.1.1 Origem do Material Vegetal para Avaliação Preliminar

Com o objetivo de verificar a variedade de *Arrabidaea chica* com melhor resultado para os experimentos, foram coletadas amostras de três tipos da espécie. As coletas das folhas de *Arrabidaea chica* Verlot tipos I, II e III, foram realizadas no mês de agosto/2015, no setor de plantas medicinais e hortaliças da Embrapa Amazônia Ocidental, na Rodovia AM 010, Km 29, com o auxílio do Prof. Dr. Francisco Célio M. Chaves. As mostras botânicas de cajuru (*Arrabidaea chica*) tipo I, foram depositadas em forma de exsicatas no Herbário EAFM do Instituto Federal do Amazonas – Zona Leste, com numeração de acesso de acesso EAFM 6791 (morfotipo I), EAFM 6792 (morfotipo II) e EAFM 6793 (morfotipo III).

2.1.2 Obtenção dos Extratos Aquosos de *Arrabidaea chica* Verlot

O preparo dos extratos a partir das folhas de *Arrabidaea chica* tipos I, II e III foi baseado no preparo do uso popular. As folhas foram coletadas e secas a temperatura ambiente, na sombra, diminuídas por moinho de facas, resultando em 300g do pó das folhas de cada um dos tipos de cajuru. Adicionaram-se 3L de água a 100°C em 300g do pó das folhas dos respectivos tipos de cajuru, seguidamente as mesmas foram deixadas por infusão durante 15 minutos. Logo após a infusão, os líquidos foram filtrados e secos por nebulização em um equipamento de mini spray drier, sem qualquer uso de adjuvante de secagem. O rendimento final obtido dos extratos de *Arrabidaea chica* tipo I, II e III foi 0,3%.

2.1.3 Preparo dos Extratos Vegetais Para Adição em Cultura Celular

Foram pesados 10mg dos extratos aquosos de *Arrabidaea chica* tipos I, II e III, incorporados em 1mL do meio de cultura RPMI 1640, suplementado com 10% SFB e 0,01% de Dimetilsulfóxido (DMSO). Em seguida, os extratos foram homogeneizados e devidamente identificados.

2.1.4 Quantificação de Óxido Nítrico (NO)

Para testar a atividade antioxidante dos extratos aquosos de *Arrabidaea chica* tipos I, II e III, avaliou-se a produção de óxido nítrico (NO) pela dosagem de nitrito (NO_2^-) pelo método colorimétrico de Griess. Os extratos de *Arrabidaea chica* foram utilizados na concentração de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em experimentos com macrófagos de camundongos da linhagem J774A.1 sobre a produção de NO. O plaqueamento da linhagem J774A.1 foi realizada em placas de 96 poços a uma densidade de $0,55 \times 10^6$ células/poço, cultivada em atmosfera úmida, a 37°C, contendo 5% de CO_2 , durante 24h. Posteriormente realizou-se a troca do meio dos poços, adicionando-se 100 μL de meio RPMI, suplementado com 1% de Soro Fetal Bovino. Logo após, foram adicionados 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de lipopolissacarídeo (LPS) (Sigma-Aldrich, Alemanha), os extratos aquosos de cajuru tipos I, II e III na concentração de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, meio RPMI 1640 com LPS (controle positivo) e meio RPMI 1640 sem LPS (controle negativo). Após 24h de incubação em atmosfera úmida, a 37°C, contendo 5% de CO_2 o sobrenadante foi recolhido para a análise de NO. Para a dosagem de nitrito (NO_2^-) transferiu-se 50 μL dos sobrenadantes para uma nova placa e adicionou-se 50 μL de Sulfanilamida (Sigma-Aldrich, Alemanha) a 1% em meio ácido, em seguida a placa foi incubada por 10 minutos para que ocorresse à reação do nitrito com a Sulfanilamida. Posteriormente foi adicionado o Naftil-1-etilenodiamina (Merck, Alemanha) a 0,1%, que possui uma coloração púrpura, para a quantificação de nitrito em espectrofotômetro a 550nm (GREEN et al., 1982).

2.2 Modelo de Estudo e Delineamentos Experimentais

Foi conduzido um estudo experimental *in vitro* com macrófagos THP1 tratados com diferentes extratos (hexânico, acetato de etila, etanólico, aquoso por infusão e aquoso por decocção) em delineamento fatorial, considerando-se as concentrações 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dos extratos de *Arrabidaea chica*. Para os experimentos deste projeto foram realizados os seguintes delineamentos: *terapêutico*, *profilático* e *ambos*. Conforme o experimento, no delineamento *terapêutico* as células THP1 foram inicialmente tratadas com estaurosporina (2,5 μM) por 12h, logo após as mesmas foram tratadas com as diferentes concentrações dos extratos *Arrabidaea chica* por 36h. No delineamento *profilático*, as células THP1 foram tratadas inicialmente com as

diferentes concentrações dos extratos de *Arrabidaea chica* por 36h, e posteriormente foram tratadas com estaurosporina (2,5 μ M) por 12h. No delineamento com ambos, as células foram tratadas ao mesmo tempo com as diferentes concentrações dos extratos de *Arrabidaea chica* e estaurosporina (2,5 μ M) ou por 48h.

2.3 Origem do Material Vegetal

As coletas das folhas de *Arrabidaea chica* Verlot Tipo I foram realizadas no mês de maio, do ano de 2016, no setor de plantas medicinais e hortaliças da Embrapa Amazônia Ocidental, localizada na Rodovia AM 010, Km 29, com o auxílio do Prof. Dr. Francisco Célio M. Chaves. As mostras botânicas de cajuru (*Arrabidaea chica*) tipo I, foram depositadas em forma de exsicatas no Herbário EAFM do Instituto Federal do Amazonas – Zona Leste, com numeração de acesso EAFM 6791.

2.4 Preparo dos Extratos de *Arrabidaea chica* Verlot

Para este projeto foram preparados cinco tipos de extratos de *Arrabidaea chica*: extrato hexânico, extrato acetato de etila, extrato etanólico, extrato aquoso por infusão e extrato aquoso por decocção. As folhas de *Arrabidaea chica* coletadas e secas a temperatura ambiente e na sombra, foram cominuídas por moinho de facas, obtendo-se 500g do pó das folhas.

2.5 Extrato Aquoso por Infusão e Decocção

Para a obtenção do extrato aquoso pelo método de infusão pesou-se 150g do pó das folhas e adicionou-se 150g do material vegetal e 1L de água destilada fervida em um Becker tampado por 30 minutos. Após a infusão, o extrato obtido foi filtrado e seco por nebulização através do equipamento de mini spray dryer (LABMAQ DO BRASIL LTDA) a temperatura de 90°C, sem qualquer uso de adjuvante de secagem. O rendimento final obtido do extrato aquoso por infusão foi 8.61%. Para a obtenção do extrato aquoso pelo método de decocção pesou-se 150g do material vegetal seco e triturado e adicionou-se 150g do material vegetal e 1L de água destilada em um balão volumétrico de fundo redondo. O mesmo foi adicionado em uma manta aquecedora (EVEN) para atingir o ponto

de ebulição da água. O material vegetal foi deixado fervendo por 15 minutos. Após o processo de decocção, o extrato obtido foi filtrado e seco por nebulização no mini spray dryer a 90°C, sem qualquer uso de adjuvante de secagem. O rendimento final obtido do extrato aquoso por decocção foi 9.04%.

2.6 Extrato Hexânico, Acetato de Etila e Etanólico

Para a preparação dos extratos com os solventes hexano, acetato de etila (BIOTEC Reagentes Analíticos) e etanol (Nuclear), a partir da extração sólido-líquido, utilizou-se 150g do pó das folhas em 500mL dos respectivos solventes separadamente em um balão de fundo redondo (1000mL). Em seguida, montaram-se as secções do aparelho Soxhlet (VIDROLEX®) e acoplou-se a manta aquecedora (Fisatom) dando início a extração. O processo de extração ocorreu à aproximadamente 40°C por 4h. Os extratos obtidos foram filtrados em papel de filtro e concentrados em evaporador rotativo (IKA® HB 10 basic) a temperatura de 40°C e vácuo (BUCHI V-850) de aproximadamente 425mbar, recuperando-se todos os solventes dos seus respectivos extratos. Posteriormente, os extratos puros obtidos foram adicionados em recipientes de vidro (pesado anteriormente) e levados para uma capela de exaustão (OXICAMP). Após a secagem, os recipientes de vidro com os extratos foram retirados da capela de exaustão e pesados, em seguida, calculou-se o rendimento de cada extrato. Os rendimentos dos extratos obtidos foram 3.99% do extrato hexânico, 2.01% do extrato acetato de etila e 4.51% do extrato etanólico.

2.7 Prospecção Química dos Extratos de *Arrabidaea chica* Verlot

Soluções estoque (1mg.mL⁻¹) dos extratos foram preparadas em metanol. Alíquotas (5µL) das soluções estoque foram posteriormente diluídas a 5µg.mL⁻¹, sendo as soluções resultantes analisadas por infusão direta no espectrômetro de massas. Todos os espectros de massas foram registrados em modo de monitoramento contínuo (Thermo LCQ Fleet Tune application) utilizando-se um equipamento LCQ Fleet, equipado com fonte de ESI e operando no modo positivo de aquisição para as análises de ESI-MS e ESI-MSn Os espectros foram obtidos a partir da média de pelo menos 10 espectros adquiridos. As amostras

foram infundidas na fonte de ESI através da bomba seringa do equipamento ($10\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$). As condições analíticas da análise foram as seguintes: spray voltage, 5 kV; sheath gas, 10arb; auxiliary gas, 5 arb; sweep gas, 0 arb; capillary temp, 200 °C; capillary voltage, 40 V; tube lens, 115 V; mass range, m/z 200 a 400; colision gas, He. Os espectros de ESI-MSn foram obtidos a partir da aplicação de energia de 20 a 30%.

2.8 Ancoragem Molecular

O método de ancoragem molecular foi realizado com a estrutura cristalográfica da proteína Ciclooxygenase-2 (COX-2), complexada com o ligante Rofecoxib (RCX) inibidor específico da COX-2. A proteína COX-2, de origem humana (*Homo sapiens*), está disponível no banco de dados *Protein Data Bank* (PDB) (código: 5KIR), com resolução de 2,7Å. (Orlando & Malkowski, 2016). As estruturas tridimensionais (3D) dos ligantes da carajurona, 6,7,4'-tri-hidroxi-5-metoxi-flavílio, carajurina e Rofecoxib (RCX) foram geradas a partir do software *Marvin Sketch* (ChemAxon, 2017). A otimização geométrica de todos os ligantes foi feita pelo método semi-empírico PM7 (Stewart, 2013) disponível no software *MOPAC2016* (Stewart, 2016). A preparação do receptor e dos ligantes foi alcançada através do software *Autodock tools* (Morris et al., 2009), sendo o *grid box* definido em relação ao sítio ativo ocupado pelo ligante RCX. O procedimento de ancoragem foi então realizado pelo software *Autodock Vina* (Trott & Olson, 2010). Os resultados foram processados com o auxílio do software *Discovery Studio* (Discovery Studio Visualizer, 2016).

2.9 Preparo dos Extratos Vegetais para Adição em Cultura Celular

Foram pesados 5mg/mL dos extratos secos de *Arrabidaea chica* incorporados em 50 μL de Dimetilsufóxido (DMSO). Logo após, adicionou-se 950 μL do meio de cultura RPMI 1640 (Gibco®, Life Technologies, EUA) suplementados com 10% de SFB (Gibco®, Life Technologies, EUA), (1%) 2mM de L-glutamina, penicilina/estreptomicina a 1% (Gibco®, Life Technologies, EUA), em seguida a solução foi homogeneizada. Logo após, o material foi filtrado (filtro de seringa com poro 0.22 μm) e utilizado nas concentrações 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ nos diferentes experimentos.

2.10 Preparo das Células THP-1 em Cultura

A linhagem celular de monócitos humanos derivados de leucemia monocítica THP-1 foram cultivadas em atmosfera úmida, a 37°C, contendo 5% de CO₂, em meio RPMI 1640 (Gibco[®], Life Technologies, EUA) suplementados com 10% de SFB (Gibco[®], Life Technologies, EUA), (1%) 2mM de L-glutamina, penicilina/estreptomicina a 1% (Gibco[®], Life Technologies, EUA). Para induzir a diferenciação dos monócitos em macrófagos (células aderentes), as células foram ressuspensas em meio novo contendo forbol 12-miristato-13-acetato (PMA) a 200ng/mL. De acordo com o experimento, as células foram plaqueadas em placas de 24 ou 96 poços, a uma densidade de 600.000 ou 100.000 células/poço respectivamente e incubadas por 48h. Após 48h, os macrófagos foram lavados com meio RPMI e deixados em repouso por mais 48h, realizando-se a troca do meio diariamente.

2.11 Determinação da IC50% para Toxicidade dos Extratos *Arrabidaea chica* pelo Método de MTT

Para determinar a toxicidade dos diferentes extratos de *Arrabidaea chica* sobre os macrófagos THP-1 foi utilizado o método de avaliação colorimétrica de brometo de 3(4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT), descrito por Mosmann (1983). A solução de MTT em células viáveis interage com as desidrogenases mitocondriais, resultando na redução da solução de MTT a um composto chamado formazan (coloração púrpura), cuja absorbância pode ser determinada por medição espectrofotométrica. A viabilidade celular é apontada pela quantificação da produção de cristais de formazan conforme a presença de desidrogenases ativas. A determinação da Concentração Inibitória 50% (IC50%) do extrato foi realizada após o plaqueamento das células THP1 (veja no item 5.6.2), utilizando-se concentrações crescentes do extrato de *Arrabidaea chica* (1µg/mL, 10µg/mL, 100µg/mL e 1000 µg/mL) por 48h. Após 48h os sobrenadantes foram desprezados e as células foram expostas a solução de MTT (10µL) na concentração de 5mg/mL em meio RPMI 1640 (90µL) durante 3h. Posteriormente removeu-se a solução de MTT da placa, adicionou-se 100µL de DMSO aos poços. A placa foi mantida sob agitação por 20 minutos para total

dissolução dos cristais de formazan. As análises foram realizadas em leitor de ELISA, com absorvância de 560nm. Sendo linearmente proporcional ao número de células viáveis. A viabilidade celular foi calculada usando a equação: Viabilidade celular em % = $(Abs_{amostra} \times 100 / Abs_{controle})$, onde a $Abs_{amostra}$ é a absorvância de células tratadas com os extratos e o $Abs_{controle}$ é a absorvância das células só com o meio de cultura. Os resultados obtidos foram calculados em escala logarítmica e analisados no software GraphPad Prisma 7.0 para obtenção das curvas de IC50%, potência máxima e dose IC50%.

2.12 Detecção de Espécies Reativas de Oxigênio Intracelular (iROS)

Os níveis de iROS foram analisados pela sonda fluorescente 2'7'-Acetato Diclorofluoresceína (DCFDA). O DCFDA difunde-se pela membrana celular e é hidrolisado por esterases intracelulares, formando a diclorofluoresceína (DCF não fluorescente), que reage com H_2O_2 intracelular, formando a diclorofluoresceína oxidada (oxDCF, fluorescente), medindo-se os níveis de fluorescência. As células THP-1 foram plaqueadas (veja no item 2.2) e tratadas com as concentrações dos diferentes extratos de *Arrabidaea chica* (1 μ g/mL, 10 μ g/mL e 100 μ g/mL) e estaurosporina (2,5 μ M) durante 48h de acordo com o delineamento experimental (veja no item 5.6.2). Após os tratamentos desprezou-se o sobrenadante e adicionou-se DCFDA (25 μ M) às culturas por 45 minutos, a 37°C em 5% de CO_2 , ao abrigo da luz. As placas foram raspadas e os níveis de fluorescência foram medidos em leitor de placas (Chameleon™ V Multitecnológico) com emissão de 450nm e excitação 535nm.

2.13 Determinação do Potencial de Membrana Mitocondrial ($\Delta\psi_m$)

O iodeto de 3,3'-dihexyloxacarboyanine iodide (DiOC6(3)) (Sigma, Brasil) é um corante lipofílico que permite avaliar o potencial das membranas citoplasmática e mitocondrial gerada pela diferença de concentração de íons no interior e exterior das membranas. As células THP-1 foram plaqueadas (veja no item 2.10) e tratadas com as concentrações dos diferentes extratos de *Arrabidaea chica*. (1 μ g/mL, 10 μ g/mL e 100 μ g/mL) e estaurosporina (2,5 μ M) durante 48 horas de acordo com os delineamentos experimentais (veja no item 2.2). Após os tratamentos, os sobrenadantes foram desprezados e as células

foram incubadas com DiOC6 (2 μ M) por 12 minutos a 37°C em 5% de CO₂. Posteriormente as células foram retiradas da placa (raspagem) e lavadas três vezes com 100 μ L de PBS 1X. Logo após os níveis de fluorescências foram medidos em leitor de placas (Chameleao™ V Multitecnológico) com emissão de 450nm e excitação 500nm.

2.14 Efeito dos extratos de *Arrabidaea chica* na Inibição de Apoptose em Macrófagos

A detecção de apoptose em células tratadas com os extratos de *Arrabidaea chica* foi realizada por marcação celular de Anexina V/APC (DB Pharmingen™), sendo muito utilizada na marcação de células apoptóticas. A Anexina V possui afinidade pelo fosfolípido de membrana fosfatidilserina, que se encontra na parte interna da membrana celular, sendo exposto apenas durante o estágio inicial da apoptose. As células THP-1 foram plaqueadas (item 2.10) e cultivadas em uma densidade de 1x10⁶ células/poço, utilizando-se os seguintes estímulos: estaurosporina a 2,5 μ M (controle positivo), meio RPMI 1640 (controle negativo) e a concentração de 50 μ g/mL dos extratos de *Arrabidaea chica* por 48h, realizando-se o tratamento ambos, conforme descrito no item 2.2. Após o tratamento as células foram retiradas da placa e transferidas para tubos de citometria, lavadas duas vezes com PBS 1X gelado e fixadas com paraformaldeído 2% (20 minutos a 4°C). O processo de lavagem das amostras foi repetido por mais duas vezes, posteriormente foram marcadas com Anexina V/APC (4 μ L) e incubadas por 45 minutos em estufa a 37°C em 5% de CO₂, ao abrigo da luz. Posteriormente as amostras foram lavadas e analisadas em citômetro de fluxo FACSCanto™ II (BD Bioscience) e em software Flowing 2.5.1.

2.15 Ensaio para Detecção de Danos no DNA (Cometa)

O ensaio do teste do cometa ou ensaio de eletroforese em gel de célula única é uma técnica capaz de detectar de forma rápida e quantitativa danos no DNA. Trata-se de um ensaio de grande sensibilidade que permiti avaliar danos, por exemplo, quebras de fitas duplas ou simples, danos oxidativos e ligações cruzadas. O presente experimento foi realizado em pH neutro que avalia

diretamente as quebras de fitas duplas do DNA , conforme metodologia descrita por SINGH et al., (1988) com modificações.

2.15.1 Plaqueamento, Tratamento e Preparo das Células THP-1

As células THP-1 foram plaqueadas a uma densidade de 3×10^5 células/poço em placas de 24 poços, tratadas com PMA (200ng/mL) e incubadas a 37°C em 5% de CO₂ por 48 horas. Posteriormente as células descansaram por 72h, realizando-se a troca do meio diariamente. Em seguida foram adicionados os diferentes extratos de *Arrabidaea chica* na concentração de 50µg/mL, DMSO 0,1% e meio RPMI (controle negativo) por 48 horas. Após 48 horas as células foram tratadas com DOXO a 63µM por 3 horas. Ao término do tratamento as células foram centrifugadas a 25°C, 1500 rpm durante 5 minutos.

2.15.2 Montagem das Lâminas

Após a centrifugação as células foram ressuspensas em agarose baixo ponto de fusão (LMP) e transferidas para lâminas previamente cobertas com agarose ponto de fusão normal (NMP), sobrepondo sobre as mesmas lamínulas para espalhar o conteúdo celular. A solidificação ocorreu a 4°C durante 3 minutos. Posteriormente retiraram-se as lamínulas delicadamente e as lâminas foram adicionadas em uma cuba contendo solução de lise por 1 hora. A solução de lise leva a desnaturação da parede celular e nuclear da célula, resultando apenas o DNA que ocupou o espaço que antes seria do núcleo celular. Após a adição da solução de lise, as lâminas foram mantidas no escuro para impedir qualquer dano no DNA causado pela iluminação fluorescente.

2.15.3 Eletroforese na Ausência de Luz

Desprezou-se a solução de lise contida na cuba com as lâminas e adicionou-se solução de neutralização por 15 minutos a temperatura de 4°C. Logo após, as lâminas foram dispostas horizontalmente na cuba de eletroforese preenchida com solução alcalina (cometa alcalino) e posteriormente preenchida com solução neutra (cometa neutro), ambas por 20 minutos para o processo de ambientação. A eletroforese foi conduzida na ausência de luz a 25V e corrente

de 300mA por 20 minutos. Ao término da corrida de eletroforese as lâminas foram lavadas com solução de neutralização por 15 minutos e em seguida fixadas com etanol a 100%.

2.15.4 Análise das Lâminas

Após a eletroforese, as lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência em filtro GFP-L, objetiva de 20x, utilizando 40µL de Syber Green diluído 1:1000 em TBE. Foram realizadas contagens de 150 células (três contagens de 50) por lâmina no total. Utilizou-se para análise o padrão de escore de 0-4 de acordo com tamanho e intensidade da cauda do cometa, que representa o nível de fragmentação de DNA, indicando o grau de lesão sofrido pelas células.

2.16 Quantificação de Citocinas

As células J774 (macrófagos de camundongo) foram plaqueadas em meio de cultura DMEM-I (Gibco-Aldrich, EUA) a uma densidade de 0.5×10^6 células/poço, em placa de 96 poços, incubada a 37°C em 5% de CO₂ por 2h. Logo após, retirou-se o sobrenadante dos poços e adicionaram-se 100µl das concentrações de 25µg/mL, 50µg/mL e 100µg/mL do extrato aquoso de *Arrabidaea chica* tipo I, nos seus respectivos poços, além dos controles positivo (DMEM-I com Zymosan) e negativo (DMEM-I sem Zymosan). A placa foi incubada a 37°C em 5% de CO₂ por 2 horas. Em seguida, adicionou-se nos poços 100µl de Zymosan (100ng/mL) por 24h, totalizando em um volume final de 200µL/poço. Posteriormente, o sobrenadante foi coletado e armazenado a -20°C até o momento do experimento de quantificação de citocinas. Os sobrenadantes de cultura obtidos anteriormente foram utilizados para as dosagens das citocinas: TNF-α e IL-10 (R&D, EUA). Primeiramente, foram adicionados em placa de 96 poços os anticorpos monoclonais de alta afinidade (Kasvi, EUA) (primários) de captura (100µL/poço), por 18h à temperatura ambiente. Logo após, a placa foi lavada 3 vezes com PBS 1x + Tween 0,05% (200uL/poço); e adicionado 200µL de Tampão Bloqueio (PBS + BSA 1%) por 1 h. Em seguida, a placa foi lavada novamente, e 50µL das amostras foram adicionadas aos poços

em duplicata e incubados por 2h em temperatura ambiente. Após uma nova lavagem, os anticorpos de detecção (secundário) conjugados com biotina (R&D, EUA) foram adicionados (100µL/poço), e a placa foi incubada novamente por 2h. Em seguida a uma nova lavagem, foi adicionado aos poços a enzima peroxidase (100µL/poço) (R&D, EUA) e as placas foram incubadas por mais 20min. Posteriormente a esta etapa, as placas foram lavadas novamente e o substrato (OPD – Dicloridrato de o- fenilenodiamina) (Thermo Scientific Pierce, EUA) diluído em água Milli-Q (100µL/poço) foi adicionado aos poços para a revelação colorimétrica. A reação da enzima com o substrato foi parada com a adição de 50 µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄ - 1M). A leitura de absorbância foi feita em 450nm em espectrofotômetro de microplacas (SpectraMax- Molecular Devices, EUA).

2.17 Análise Estatística

Utilizou-se Análise de Variância com um fator ou dois fatores (ANOVA One-Way ou Two-Way), de acordo com o delineamento experimental, utilizando-se o teste de Tukey para comparação pós-teste. A correção de Bonferroni foi aplicada para correção de comparações múltiplas. As curvas de IC₅₀% foram obtidas por regressão não-linear. Os dados foram expressos como média e desvio padrão, nível de significância adotado de 5%.

3 RESULTADOS

3.1 Quantificação de Óxido Nítrico (NO) em células J774

A atividade antioxidante de *Arrabidaea chica* é a atividade biológica mais bem documentada desta espécie vegetal. No entanto, não encontramos na literatura a descrição da variedade utilizada para avaliar diferentes atividades biológicas de *Arrabidaea chica*. Neste experimento, foi avaliada a atividade antioxidante das três variedades de *Arrabidaea chica*. Observou-se (Figura 1) a quantidade de NO detectada foi maior para o Tipo I quando comparado ao controle negativo e LPS. Além disso, na concentração utilizada, Tipo I apresentou maior atividade redutora sobre NO quando comparado ao Tipo II e Tipo III. Em razão destes resultados selecionou-se a variedade I para o restante dos experimentos.

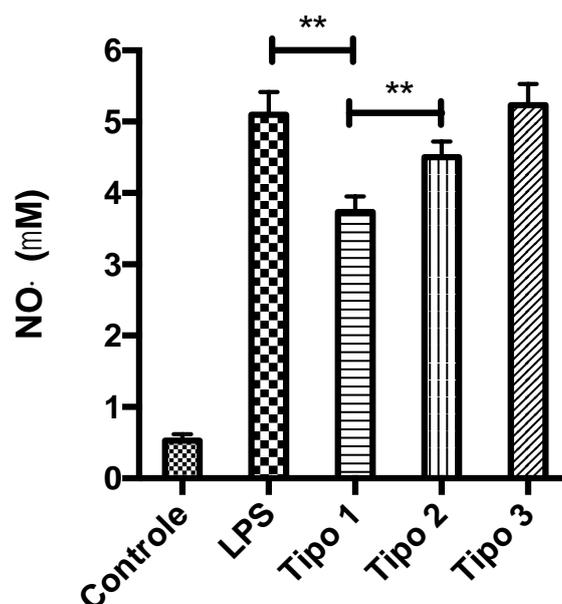


Figura 1. Efeito dos extratos aquosos de *Arrabidaea chica* tipo I, II e III na produção de Óxido Nítrico (NO) por macrófagos J774. As células J774A.1 foram tratadas com 20µg/mL dos extratos de *Arrabidaea chica* e 1µg/mL LPS por 24h. A produção de óxido nítrico (NO) pela dosagem de nitrito (NO₂⁻) foi realizada pelo método colorimétrico de Griess em espectrofotômetro a 550nm. O extrato Tipo I apresentou maior atividade redutora sobre NO quando comparado ao Tipo II e Tipo III. Os dados são representados como média e desvio padrão. As médias foram comparadas por ANOVA.

3.2 Rendimentos dos Extratos de *Arrabidaea chica* Verlot

Os rendimentos dos extratos de *Arrabidaea chica* estão expressos na Tabela 1 de acordo com o método de secagem. A secagem dos extratos acetato de etila, hexânico e etanólico foi realizada por evaporação na capela de exaustão, enquanto a secagem dos extratos aquosos por infusão e aquoso por decocção ocorreu por nebulização, através do equipamento de mini spray dryer.

Tabela 1. Rendimento percentual dos extratos de *Arrabidaea chica* Verlot.

Extrato	Método de secagem	Rendimento (%)
Acetato de etila	Evaporação	2.01%
Hexânico	Evaporação	3.99%
Etanólico	Evaporação	4.51%
Aquoso (infusão)	Nebulização	8.61%
Aquoso (decocção)	Nebulização	9.04%

Os rendimentos percentuais dos extratos foram calculados através de regra de três simples, onde os extratos aquosos por infusão e por decocção apresentaram um maior rendimento em comparação aos demais extratos.

3.3 Perfil Químico dos Extratos de *Arrabidaea chica* Verlot

Na Figura 2 são apresentados quatro espectros relacionados ao perfil químico dos extratos aquoso (infusão), aquoso (decocção), etanólico e acetato de etila. Os espectros mostram os íons (substâncias, interferentes ou contaminantes) presentes em cada extrato. De acordo com os espectros A e B os extratos aquosos são complexos e muito similares, já os extratos etanólico e acetato de etila, expressos nos espectros C e D, são extratos menos complexos e mais limpos (menor quantidade de íons com intensidades elevadas). O extrato acetato de etila é considerado o extrato mais puro, quando comparado aos outros extratos, sendo formado principalmente pelos íons 299 e 285. Os íons 299 e 285 possuem intensidades elevadas em todos os extratos, por isso, foram selecionados para a realização do processo de fragmentação e determinação das substâncias.

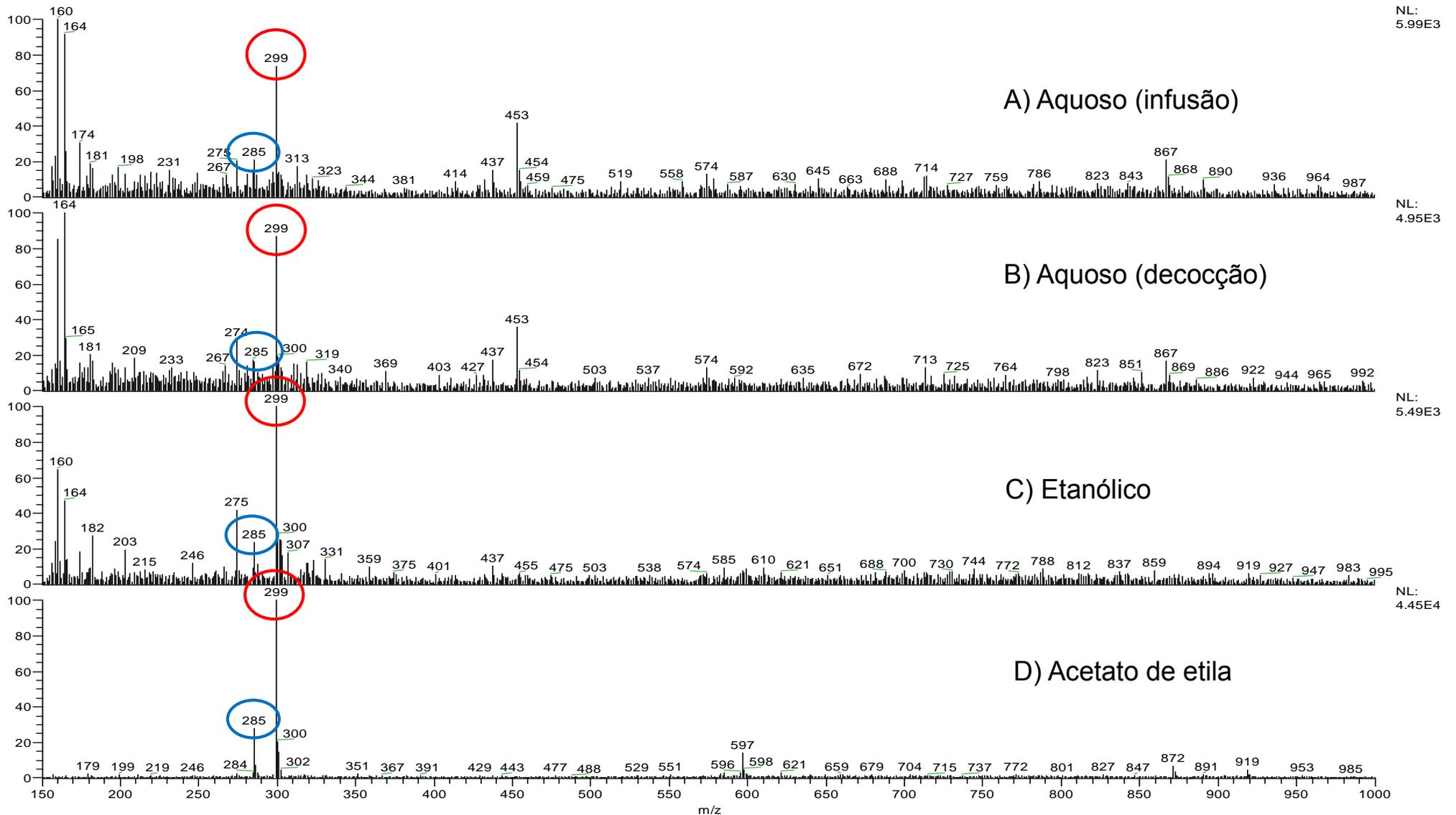


Figura 2. Perfil químico dos extratos de *Arrabidaea chica* Verlot. As análises do perfil químico dos extratos de *Arrabidaea chica* ocorreram pela da solubilização dos extratos aquosos (infusão /decoção), etanólico e acetato de etila em metanol e análise por infusão direta no espectrômetro de massa. Os íons 299 e 285 foram identificados com intensidades elevadas em todos os extratos. Os espectros A e B mostraram uma complexidade e grande similaridade entre os extratos aquosos por infusão e por decoção. De acordo com a diminuição da intensidade elevada dos íons, observados nos espectros C e D, os extratos etanólico e acetato de etila são extratos mais limpos e menos complexos. O extrato acetato de etila (D) é considerado o mais puro quando comparado com os extratos aquosos (infusão/decoção) e etanólico.

3.4 Fragmentação dos íons com intensidades elevadas nos extratos de *Arrabidaea chica*

Na análise de identificação dos íons que apresentaram intensidades elevadas presentes em todos os extratos de *Arrabidaea chica* foram identificadas substâncias principais existentes na espécie *Arrabidaea chica* Verlot. O íon 299 (A) é o pigmento conhecido como carajurina (componente principal da espécie *Arrabidaea chica*) e o íon 285 (B) que é chamado de carajurona, ambos são pigmentos pertencentes à espécie *Arrabidaea chica*, responsáveis por proporcionar a cor avermelhada após a coleta das folhas (Figura 3).

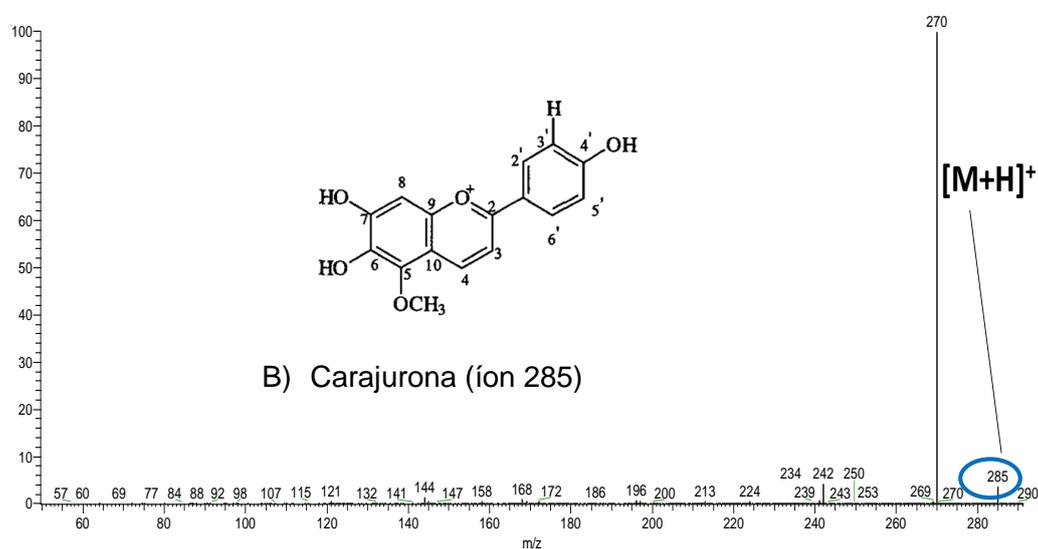
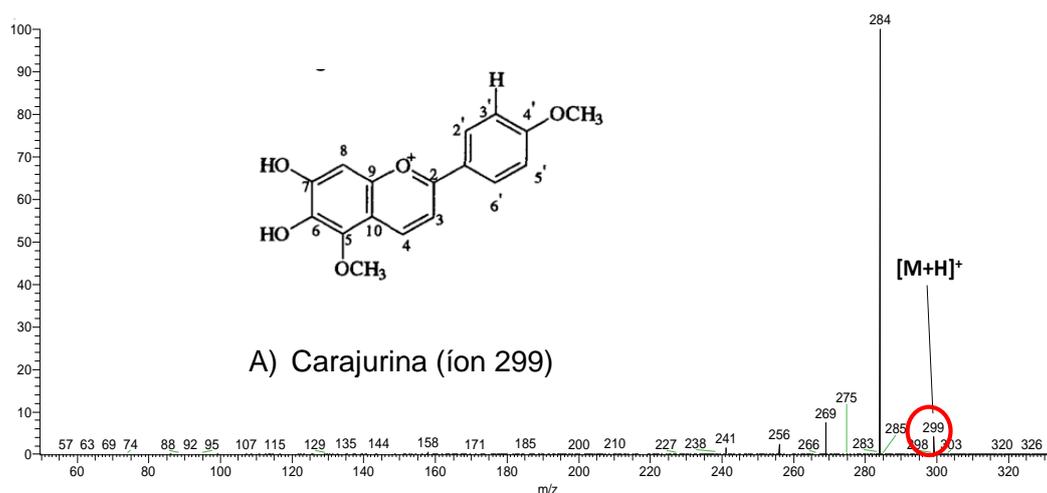


Figura 3. Identificação dos íons 299 e 285 presentes em todos os extratos de *Arrabidaea chica* Verlot. A fragmentação dos íons 299 e 285 presentes nos espectros de todos os extratos foram realizadas por meio da espectrometria de massa. Os íons 299 (a) e 285 (b) apresentaram-se com intensidades elevadas em todos os extratos, o íon identificado no espectro A é a carajurina, (pigmento principal encontrado na espécie *Arrabidaea chica*), no espectro B encontra-se o pigmento carajurona, ambos os pigmentos são os principais responsáveis pela presença da coloração avermelhada da espécie.

3.5 Ancoragem das Moléculas 3-desoxiantocianinas, pertencentes à espécie *Arrabidaea chica*, em Sítios Ativos da Proteína Ciclooxygenase-2 (COX-2)

O procedimento da ancoragem molecular foi realizado pela energia de ligação das moléculas 3-desoxiantocianinas isoladas da espécie *Arrabidaea chica* em sítios ativos da proteína ciclooxygenase-2 (COX-2) com a estrutura cristalográfica. A COX-2 (proteína de origem humana) foi complexada com o ligante Rofecoxib (RCX), inibidor específico da COX-2, possuindo uma energia de -10,3 (kcal/mol), conforme ilustrado na Tabela 2. A molécula B, chamada carajurona (6,7,4'-tri-hidroxi-5-metoxi-flavílio), apresentou uma energia de ligação -8,0 (kcal/mol), possuindo a energia de ligação mais próxima do Rofecoxib (RCX) -10,3 kcal/mol, apresentando assim uma eficiência de ligação maior com a proteína ciclooxygenase-2 (COX-2) em comparação com as moléculas A T5MF (6,7,3', 4'-tetra-hidroxi-5-metoxi-flavílio) -7,6 kcal/mol e molécula C carajurina (6,7-di-hidroxi-5,4'-dimetoxi-flavílio) -7,8 kcal/mol.

Tabela 2. Energias de ligação para a ancoragem molecular entre os ligantes e o sítio ativo da COX-2.

Ligante	Energia de ligação (kcal/mol)
Rofecoxib	-10,3
Molécula B (Carajurona)	-8,0
Molécula C (Carajurina)	-7,8

As energias de ligação foram calculadas pelo software AutoDock Vina para a ancoragem molecular entre os ligantes e o sítio ativo da COX-2. O ligante Rofecoxib (RCX) apresentou uma energia de ligação de -10,3 kcal/mol em sítios ativos da COX-2. A molécula B (6,7,4'-tri-hidroxi-5-metoxi-flavílio) apresentou uma energia de ligação de -8,0 kcal/mol, a qual mais se aproximou da energia de ligação apresentada pelo Rofecoxib (RCX), quando comparada com a energia de ligação da molécula C (6,7-di-hidroxi-5,4'-dimetoxi-flavílio) -7,8 kcal/mol.

A molécula de rofecoxib apresentou ligações hidrofóbicas LEU-352, ALA-527, VAL-349, SER-353, VAL-523, PHE-518, além de duas interações de hidrogênio. A molécula de carajurona apresentou uma interação com hidrogênio, além de algumas ligações semelhantes à de rofecoxib, entre elas, VAL-523, ALA-527 e VAL-349. A molécula de carajurina apresentou duas ligações com hidrogênio, uma ligação com ARG-513 e algumas ligações hidrofóbicas semelhantes à de rofecoxib, como LEU-352, ALA-527, VAL-349 e VAL-523 (Figura 4).

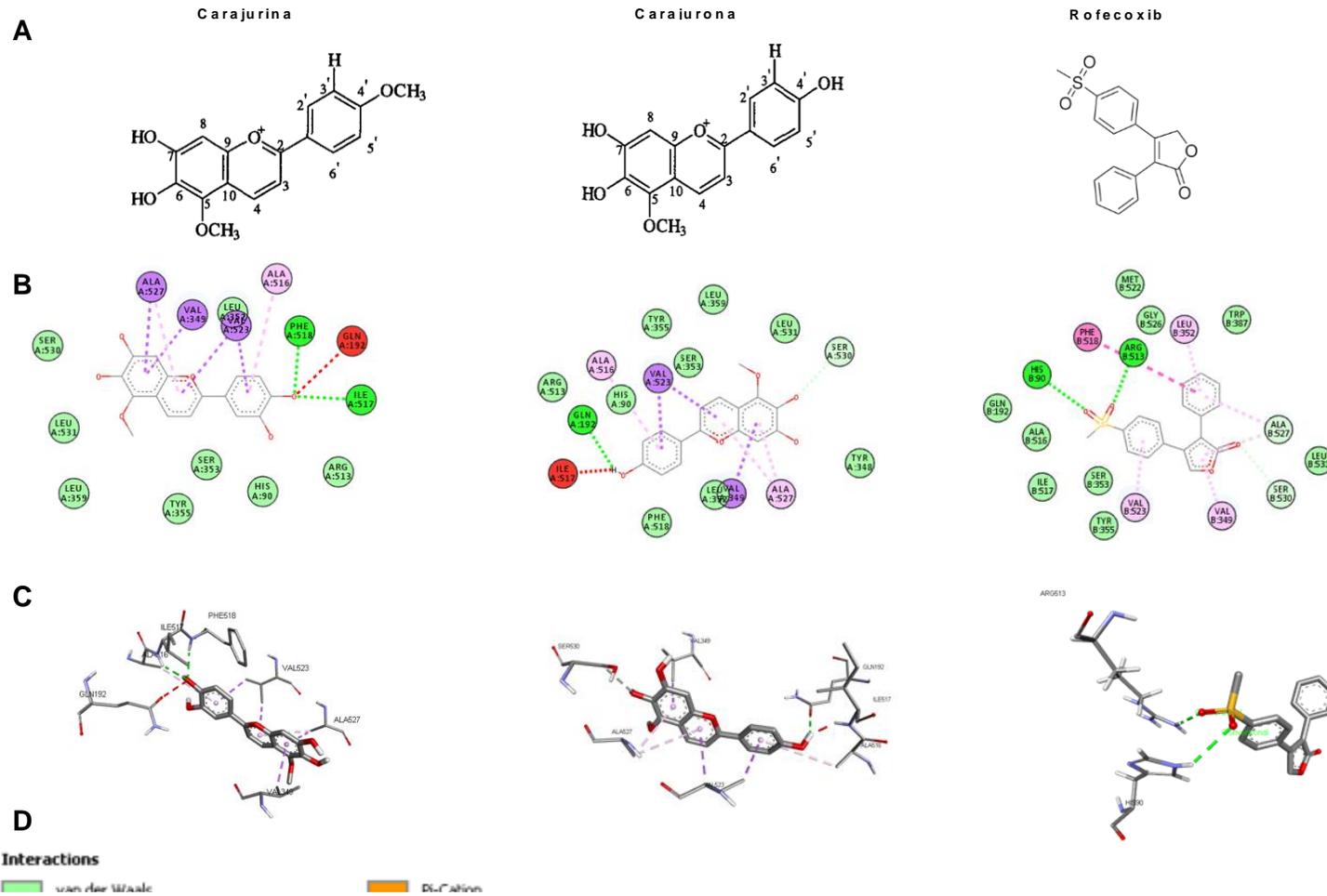


Figura 4. Ancoragem das moléculas carajurina e carajurona isoladas da espécie *Arrabidaea chica* em sítios ativos da proteína Ciclooxygenase-2. O procedimento de ancoragem molecular foi realizado com a estrutura cristalográfica da proteína ciclooxygenase-2 (COX-2), complexada com o ligante rofecoxib (RCX).

3.6 Citotoxicidade dos Extratos de *Arrabidaea chica* Verlot

A avaliação da citotoxicidade dos extratos *Arrabidaea chica* sobre os macrófagos THP-1 (Figura 5), foi realizada após 48h de tratamentos com os extratos nas concentrações de 1µg/mL, 10µg/mL, 100µg/mL e 1000µg/mL. O extrato acetato de etila apresentou maior toxicidade aos macrófagos THP-1 na concentração de 1000µg/mL ($IC_{50}\%=264,5\mu\text{g}$). Os demais extratos não atingiram 50% de efeitos nas concentrações testadas, desta forma, a $IC_{50}\%$ não pôde ser estimada para esses extratos. Os extratos aquosos por infusão e por decocção, obtidos a base do conhecimento popular, apresentaram menor toxicidade e suas curvas ficaram sobrepostas.

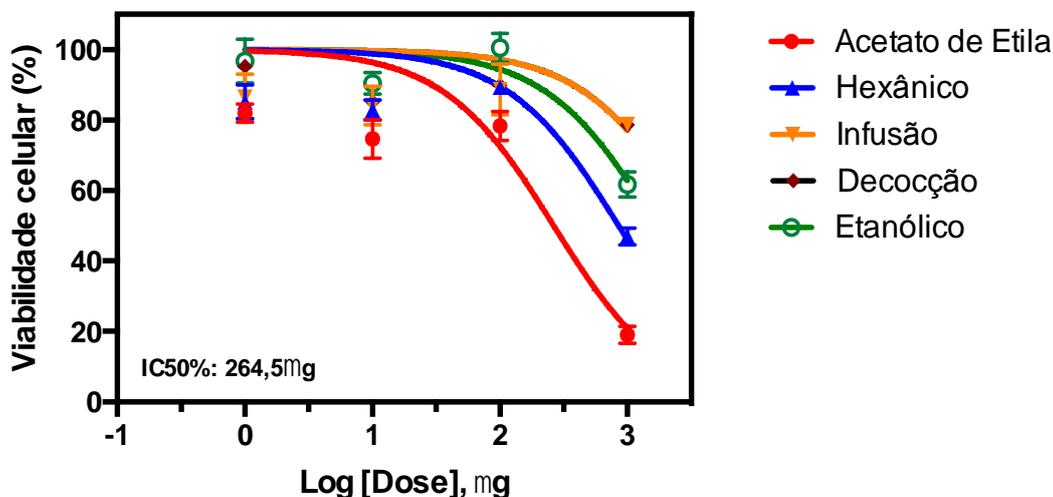


Figura 5. Toxicidade dos diferentes extratos de *Arrabidaea chica* em células THP-1. Os diferentes extratos de *Arrabidaea chica* foram utilizados nas concentrações de 1µg/mL, 10µg/mL, 100µg/mL e 1000µg/mL por 48h. A toxicidade dos extratos aos macrófagos THP-1 foi avaliada através do ensaio colorimétrico de MTT. O extrato acetato de etila foi o único que apresentou 50% de toxicidade aos macrófagos THP-1. Os extratos hexânico, aquosos (infusão/decocção) e etanólico não apresentam 50% dos efeitos citotóxicos. Os extratos aquosos por infusão e por decocção causaram a menor toxicidade aos macrófagos THP-1.

3.7 Atividade antioxidante dos extratos de *Arrabidaea chica* Verlot sobre a produção de Espécies Reativas de Oxigênio intracelular (iROS)

A avaliação da atividade antioxidante dos extratos de *Arrabidaea chica* sobre a produção de iROS em macrófagos THP1 foi realizada de acordo com seus respectivos delineamentos pela sonda fluorescente 2'7'-Acetato Diclorofluoresceína (DCFDA) (Figura 6). As células THP1 foram tratadas com diferentes concentrações dos extratos de *Arrabidaea chica* e estimuladas com estaurosporina. Na Figura 6, observa-se que os extratos aquosos por infusão e por decocção apresentaram eficaz atividade antioxidante nos delineamentos terapêutico, profilático e ambos, quando comparados a produção de iROS do controle positivo (estaurosporina a 2,5 μ M).

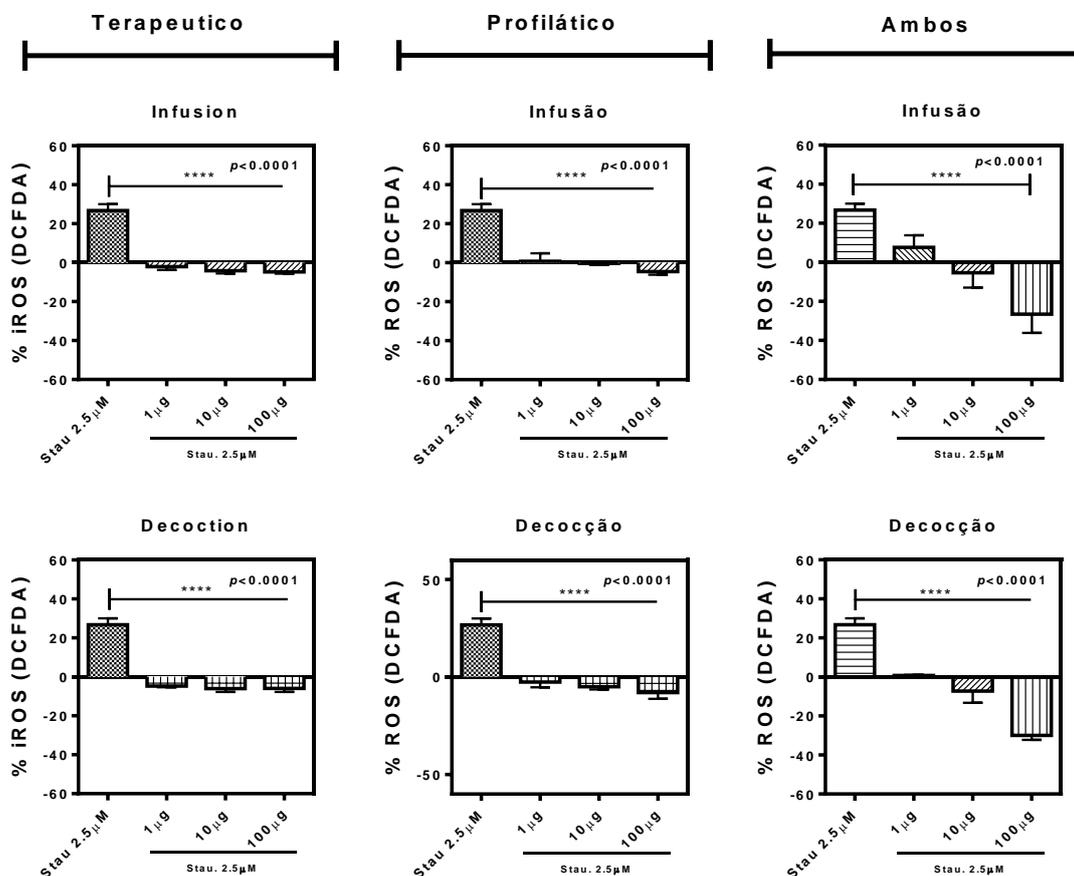


Figura 6. Efeito dos extratos aquosos de *Arrabidaea chica* sobre a produção de iROS em macrófagos THP1. As células THP-1 foram tratadas com os extratos aquosos por infusão e decocção de *Arrabidaea chica* nas concentrações de 1 μg/mL, 10 μg/mL e 100 μg/mL, e estaurosporina a 2,5 μM nos delineamentos terapêutico ($p < 0.0001$), profilático ($p < 0.0001$) e ambos ($p < 0.0001$) por 48h. Para medir os níveis de iROS adicionou-se a sonda fluorescente DCFDA a 25 μM. A leitura foi realizada em leitor de placas (Chameleon™ V Multitecnológico) com emissão de 450nm e excitação 535nm.

No delineamento terapêutico, conforme apresentado na Figura 7, os extratos acetato de etila, hexânico e etanólico nas concentrações de 1 μg/mL, 10 μg/mL e 100 μg/mL diminuíram a formação de iROS (atividade antioxidante) nos macrófagos THP1 após o estímulo com de estaurosporina a 2,5 μM.

3.8 Efeito Protetor dos extratos de *Arrabidaea chica* Verlot sobre Potencial de Membrana Mitocondrial ($\Delta\psi_m$)

A avaliação do Potencial de Membrana mitocondrial após os tratamentos com as diferentes concentrações dos extratos de *Arrabidaea chica* e estaurosporina, ocorrerem através do corante lipofílico Iodeto de 3,3'-dihexyloxacarboxyanine iodide (DiOC6(3)) por três delineamentos diferentes (terapêutico, profilático e ambos) (Figura 8 e 9). Após os tratamentos com os extratos aquosos (infusão e decocção) foi observado a eficácia dos mesmos, na proteção da membrana mitocondrial em todas as concentrações e delineamentos utilizados, conforme ilustrado na Figura 8.

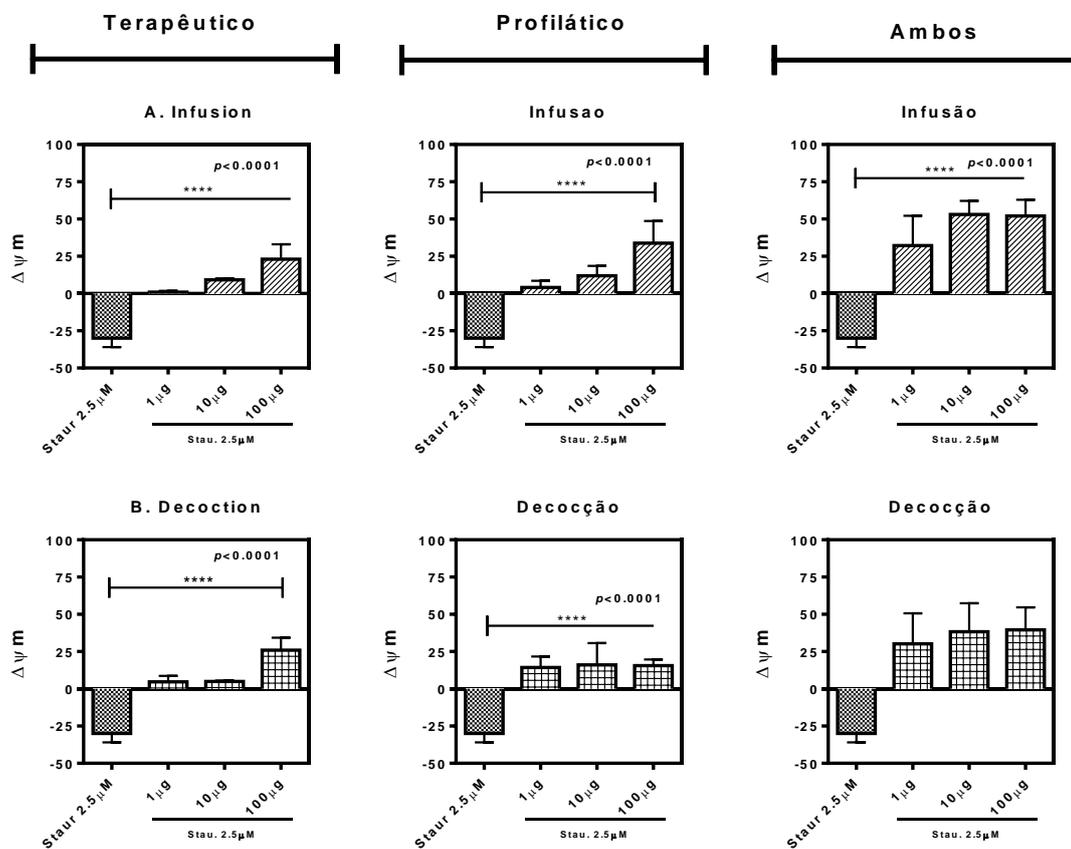


Figura 8. Efeito protetor dos extratos aquosos de *Arrabidaea chica* sobre o Potencial de Membrana Mitocondrial ($\Delta\psi_m$). As células THP-1 foram tratadas com os extratos aquosos por infusão e decoção nas concentrações de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, e estaurosporina a 2,5 μM nos delineamentos terapêutico ($p < 0.0001$), profilático ($p < 0.0001$) e ambos ($p < 0.0001$) por 48h. Posteriormente as células foram incubadas com o corante lipofílico DiOC6 (2 μM) por 12 min. Os níveis de fluorescências foram medidos em leitor de placas (Chameleon™ V Multitecnológico) com emissão de 450nm e excitação 500nm.

De acordo com os delineamentos experimentais terapêutico, profilático e ambos, apresentados na Figura 9, os extratos acetato de etila, hexânico e etanólico apresentam atividade protetora aos macrófagos THP1 estimulados com estaurosporina. A proteção pelos extratos foi observada em todas as concentrações utilizadas, apresentando uma proteção mais eficaz por todos os extratos no delineamento ambos.

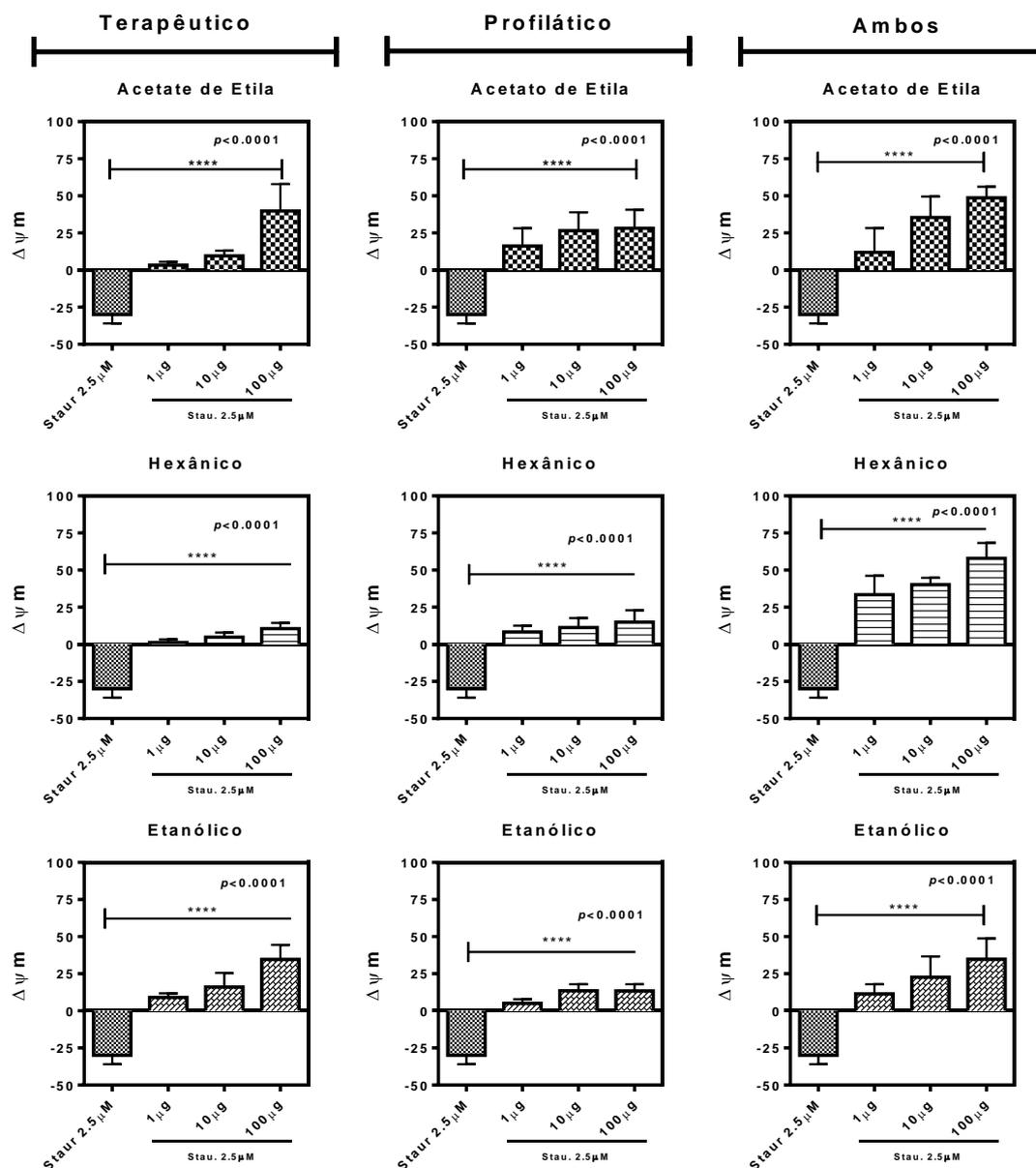


Figura 9. Efeito protetor dos extratos acetato de etila, hexânico e etanólico de *Arrabidaea chica* sobre o Potencial de Membrana Mitocondrial ($\Delta\psi_m$). As células THP-1 foram tratadas com os extratos acetato de etila, hexânico e etanólico nas concentrações de 1 μ g/mL, 10 μ g/mL e 100 μ g/mL, e estaurosporina a 2,5 μ M nos delineamentos terapêutico ($p < 0.0001$), profilático ($p < 0.0001$) e ambos ($p < 0.0001$) por 48h. Posteriormente as células foram incubadas com o corante lipofílico DiOC6 (2 μ M) por 12 min. Os níveis de fluorescências foram medidos em leitor de placas (Chameleon™ V Multitecnológico) com emissão de 450nm e excitação 500nm.

3.9 Atividade protetora dos extratos de *Arrabidaea chica* Verlot ao dano no DNA

Para avaliar o efeito protetor dos extratos de *Arrabidaea chica* sobre o dano no DNA, utilizou-se a Doxorubicina (DOXO) pelo teste do cometa em pH Neutro. De acordo com o delineamento ambos os macrófagos THP-1 foram tratados com os extratos aquosos (infusão e decocção), acetato de etila, hexânico e etanólico, além da Doxorubicina, por 48h. Na figura 10, estão apresentados os índices de danos totais por grupo. Todos os de extratos de *Arrabidaea chica* em pH neutro apresentaram atividade protetora da quebra de fita dupla do DNA, quando comparados ao controle com a Doxorubicina (DOXO).

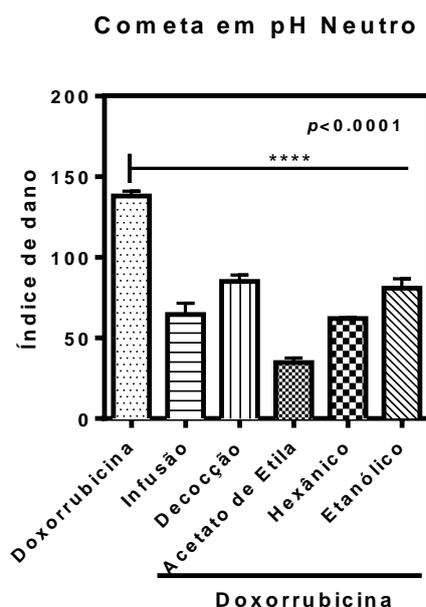


Figura 10. Avaliação do índice de dano em macrófagos THP-1. Apresentação percentual de danos totais em macrófagos THP-1 após os tratamentos com os extratos aquosos (infusão e decocção), acetato de etila, hexânico e etanólico utilizados na concentração de 50 μ M e Doxorubicina a 3,4 μ M por 48h. Os dados foram expressos como média e desvio padrão, nível de significância adotado de 5%.

Na frequência de dano, a eficiência de proteção ao DNA pelos extratos de *Arrabidaea chica* é observada pelo percentual dos níveis de dano causado pela doxorubicina de acordo com o padrão de escore de 0-4, conforme ilustrados na Figura 11.

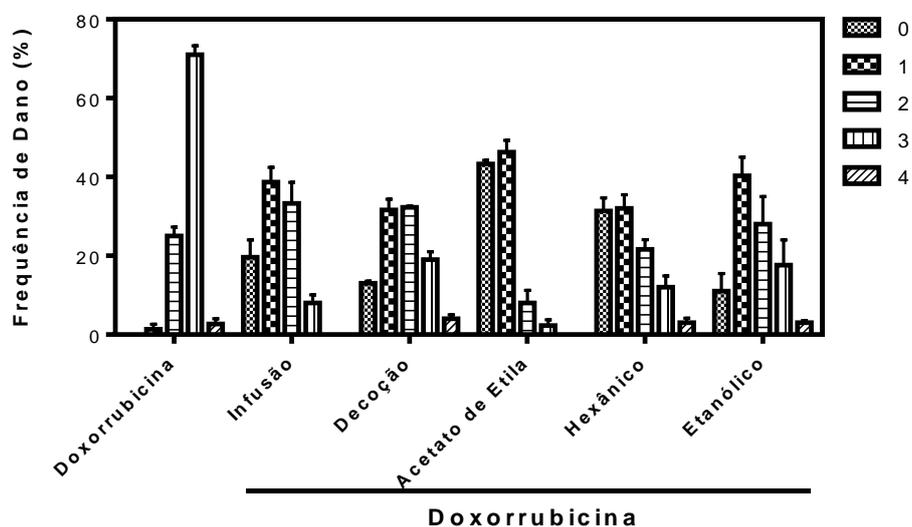


Figura 11: Avaliação da frequência de dano em macrófagos THP-1. Apresentação percentual de danos totais em macrófagos THP-1 após os tratamentos com os extratos aquosos (infusão e decocção), acetato de etila, hexânico e etanólico utilizados na concentração de 50 μ M e Doxorrubicina a 3,4 μ M por 48h. A análise do padrão de escore de 0-4 foi de acordo com tamanho e intensidade da cauda do cometa, representando o nível de fragmentação de DNA, indicando o grau de lesão sofrido pelas células. Os dados foram expressos como média e desvio padrão, nível de significância adotado de 5%.

As análises de fragmentação do DNA aos macrófagos THP-1, na versão neutra, ocorreu após o tratamento das células com os diferentes extratos de *Arrabidaea chica* e Doxorubicina (Figura 12). As leituras das lâminas foram realizadas pelas contagens de 150 células (três contagens de 50) por lâmina no total e o DNA foi marcado em Syber Green 1:10000 em Tampão Borato de EDTA. Os controles com DMSO 0,1% apresentaram predominância de cometa de níveis 0 e 1, enquanto os controles com Doxorubicina 3,4 μ M apresentaram em alta predominância cometas de níveis 3 e 4. O extrato acetato de etila conferiu maior proteção contra o dano específico da quebra de fita dupla do DNA, apresentando maior predominância de cometa de níveis 0 e 1.

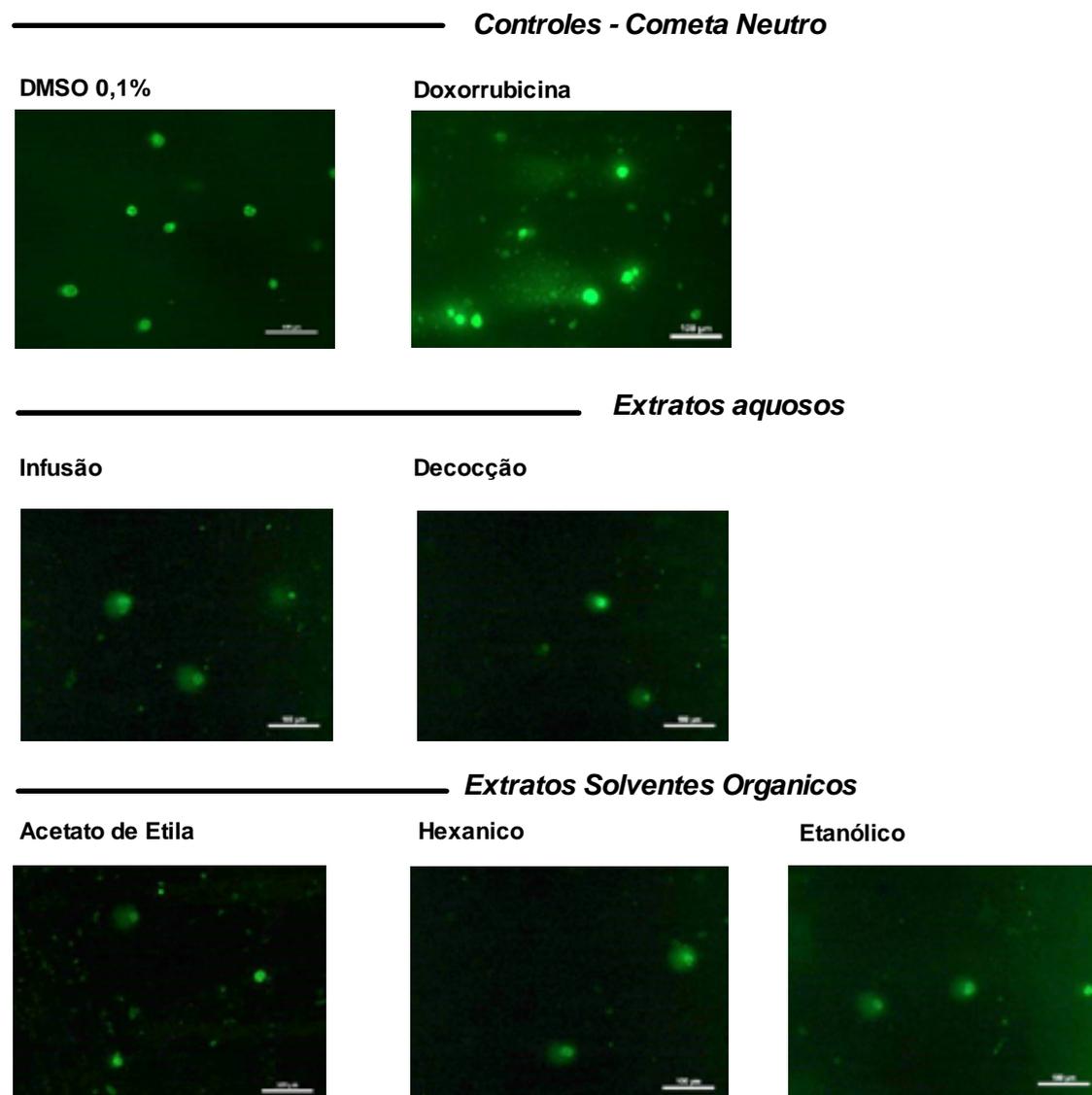


Figura 12. Análise de fragmentação do DNA (Versão Neutra). Os macrófagos THP-1 foram tratados 48h com os extratos aquosos (infusão e decocção), acetato de etila, hexânico e etanólico na concentração de 50µM, Doxorrubicina a 3,4 µM e DMSO a 0,1% de acordo com o delineamento ambos (48h com os extratos mais doxorrubicina ao mesmo tempo). Baseado na leitura das lâminas, realizaram-se contagens de 150 células (três contagens de 50 células) no total por lâmina e o DNA foi marcado em Syber Green 1:10000, em Tampão Borato de EDTA e em uma Escala de 100µm.

3.10 Avaliação do Efeito Antiapoptótico de *Arrabidaea chica* Verlot

As populações das células THP1 de interesse foram delimitadas na área R1, de acordo com seu tamanho (FSC), tanto no controle negativo (A) quanto no controle positivo (B), ilustrados na Figura 13. A efetividade dos controles pode ser observada na permanência das células do controle negativo (A) do lado inferior esquerdo e no deslocamento das células tratadas com estaurosporina a 2,5 μM para o lado inferior direito no controle positivo (B), resultando na marcação de células positivas para Anexina V.

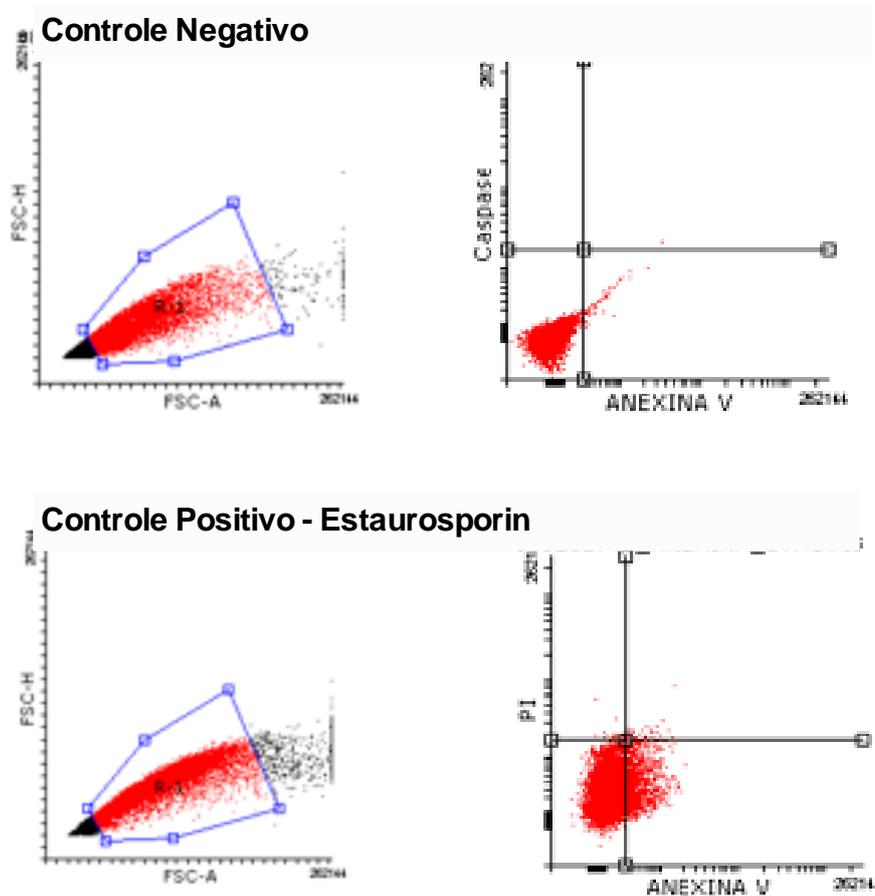


Figura 13. Controles negativo e positivo utilizados no experimento com Anexina V. As células THP1 foram analisadas em citômetro de fluxo FACSCanto™ II (BD Bioscience) e em software Flowing 2.5.1. As células foram avaliadas em um gráfico de ponto (*dot plot*) e delimitadas na área R1. As células do controle negativo (A) não apresentaram deslocamentos permanecendo no lado inferior direito e as células do controle positivo (B) com estaurosporina a 2,5 μM apresentaram deslocamento para o lado inferior esquerdo (células positivas para Anexina V), demonstrando a efetividade dos controles.

A marcação das células THP1 com Anexina V ocorreu após o tratamento ao mesmo tempo com os diferentes tipos de extratos de *Arrabidaea chica* e

estaurosporina, durante 48h. Nas Figuras 14 e 15, observa-se que as células THP1 de interesse foram delimitadas na área R1 de acordo com as análises individuais de cada um dos extratos de *Arrabidaea chica*. Foi observado que o tratamento com os diferentes extratos de *Arrabidaea chica* reduziu as marcações das células THP1 com Anexina V. Os extratos aquosos (infusão e decocção) conferiram uma maior proteção às células THP-1 contra a apoptose. Os resultados podem ser visualizados a partir das reduções dos deslocamentos das células THP1 para o lado inferior esquerdo, resultando na diminuição das células marcadas com Anexina V em relação às células do controle positivo onde houve um aumento das células marcadas com Anexina V. Sendo assim, ficou evidente que todos os extratos de cajuru utilizados protegeram as células da apoptose induzida por estaurosporina.

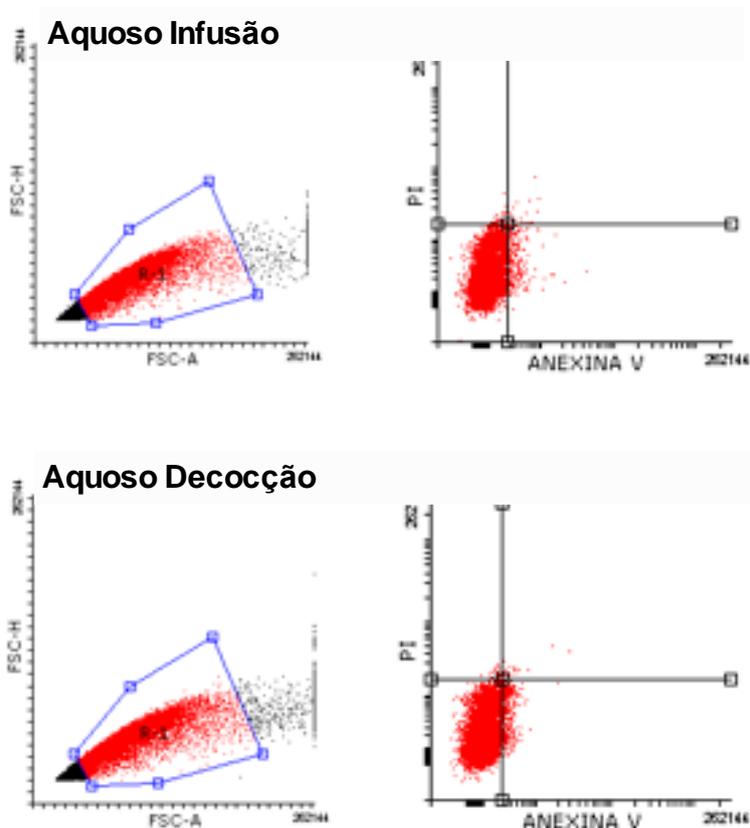


Figura 14. Marcação das células THP-1 tratadas com os extratos aquosos de *Arrabidaea chica* com Anexina V. Para marcação das células THP1 com Anexina V. foi realizado o delineamento ambos, onde as mesmas foram tratadas com os diferentes extratos de *Arrabidaea chica* na concentração de 50 µg/mL e estaurosporina a 2,5 µM, por 48 h. A partir dos resultados do tratamento com os extratos (A) Acetato de etila, (B) Hexânico, (C) Aquoso por infusão, (D) Aquoso por decocção, (E) Etanólico e estaurosporina a 2,5 µM foi observado que os extratos protegeram as células THP1 da apoptose por estresse oxidativo induzida por estaurosporina.

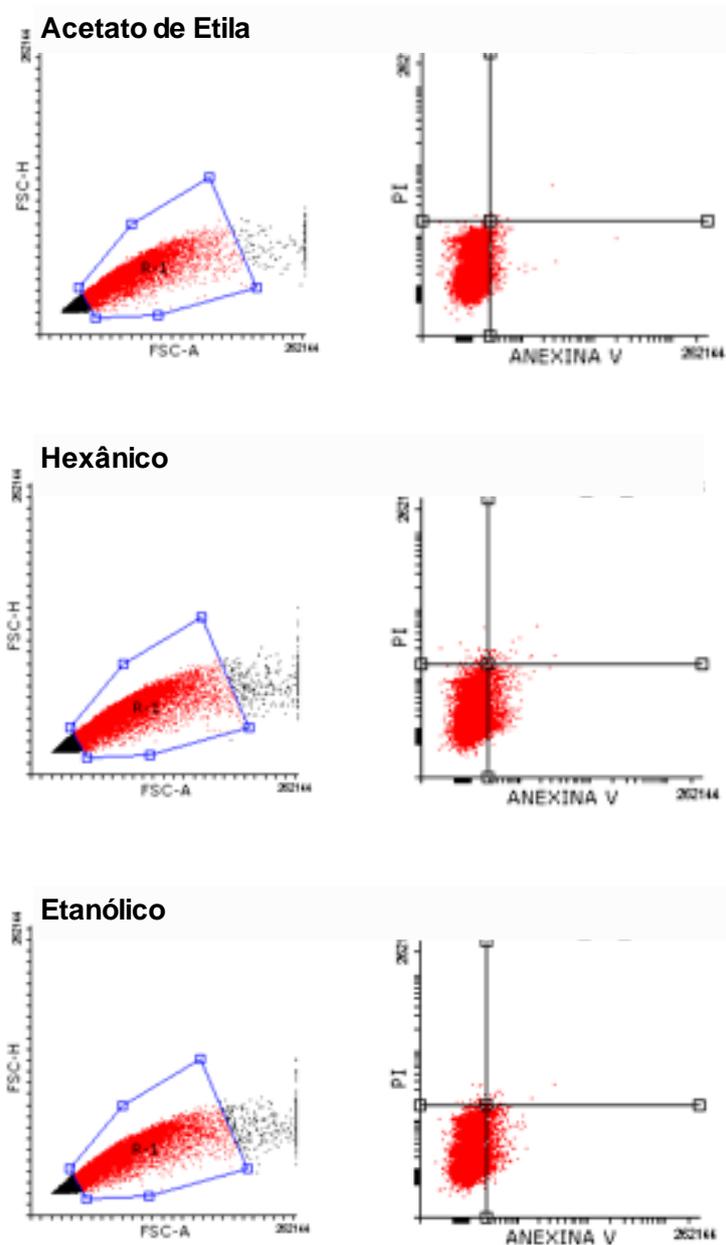


Figura 15. Marcação das células THP1 tratadas com os extratos acetato de etila, hexânico e etanólico de *Arrabidaea chica* com Anexina V. Para marcação das células THP1 com Anexina V foi realizado o delineamento ambos, onde as mesmas foram tratadas com os diferentes extratos de *Arrabidaea chica* na concentração de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e estaurosporina a 2,5 μM , por 48 h. A partir dos resultados do tratamento com os extratos (A) Acetato de etila, (B) Hexânico, (E) Etanólico e estaurosporina a 2,5 μM foi observado que os extratos protegeram as células THP1 da apoptose por estresse oxidativo induzida por estaurosporina.

Os percentuais dos macrófagos THP1 positivos para Anexina V apresentam-se na Figura 16, conforme os tratamentos com os diferentes tipos de extratos de *Arrabidaea chica*. Todos os extratos na concentração de 50 µg/mL apresentaram proteção dos macrófagos THP1 da apoptose induzida por estaurosporina (2,5 µM). Todos os extratos avaliados reduziram o percentual de células positivas para Anexina V quando comparados ao controle com estaurosporina ($p < 0,0001$). Os extratos acetato de etila, infusão e decocção foram os mais eficientes em reduzir o percentual de células em apoptose quando comparadas ao controle, respectivamente ($2,87 \pm 0,38$, $2,47 \pm 0,29$, $2,64 \pm 0,25$; $p < 0,0001$). Não há diferença na eficiência desses extratos quando comparados entre si. O extrato acetato de etila apresentou efeito semelhante quando comparado ao extrato de infusão ($2,87 \pm 0,38$, $2,47 \pm 0,29$; $p = 0,501$) e decocção ($2,87 \pm 0,38$, $2,64 \pm 0,25$; $p = 0,914$). O extrato hexânico foi o de menor eficiência em proteger as células da apoptose quando comparado ao estaurosporina ($6,49 \pm 0,44$ e $9,44 \pm 0,65$; $p < 0,0001$) e ao extrato etanólico ($5,50 \pm 0,10$ e $9,44 \pm 0,65$; $p = 0,002$).

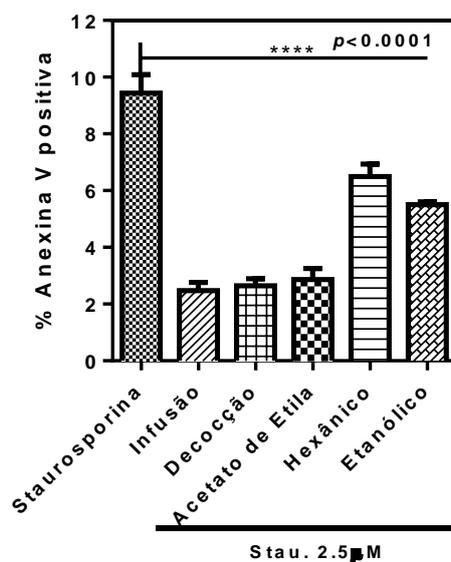


Figura 16. Percentual dos macrófagos THP1 positivos para Annexina V/FITC. Os macrófagos THP-1 foram tratados com os extratos aquosos (infusão e decocção), acetato de etila, hexânico e etanólico utilizados na concentração de 50 μ g/mL, em conjunto com estaurosporina a 2,5 μ M por 48h. Todos os extratos de *Arrabidaea chica* protegeram os macrófagos THP1 da apoptose induzida por estaurosporina. As análises foram realizadas por citometria de fluxo. Os dados estão expressos com média e desvio padrão.

3.11 Quantificação de citocinas por Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

Para a quantificação das citocinas TNF- α e IL-10 no sobrenadante das células J.774, realizou-se os tratamentos com o extrato aquoso de *Arrabidaea chica* tipo I nas concentrações de 25 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 75 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$, com e sem estímulos de Zymosan a 100ng/mL, por 24h. Conforme as ilustrações apresentadas na Figura 16, o extrato de cajuru tipo I foi eficaz na diminuição da produção de TNF- α (citocina inflamatória) e no aumento da produção de IL-10 (citocina reguladora). A eficácia pode ser observada à medida que as concentrações dos extratos aumentam.

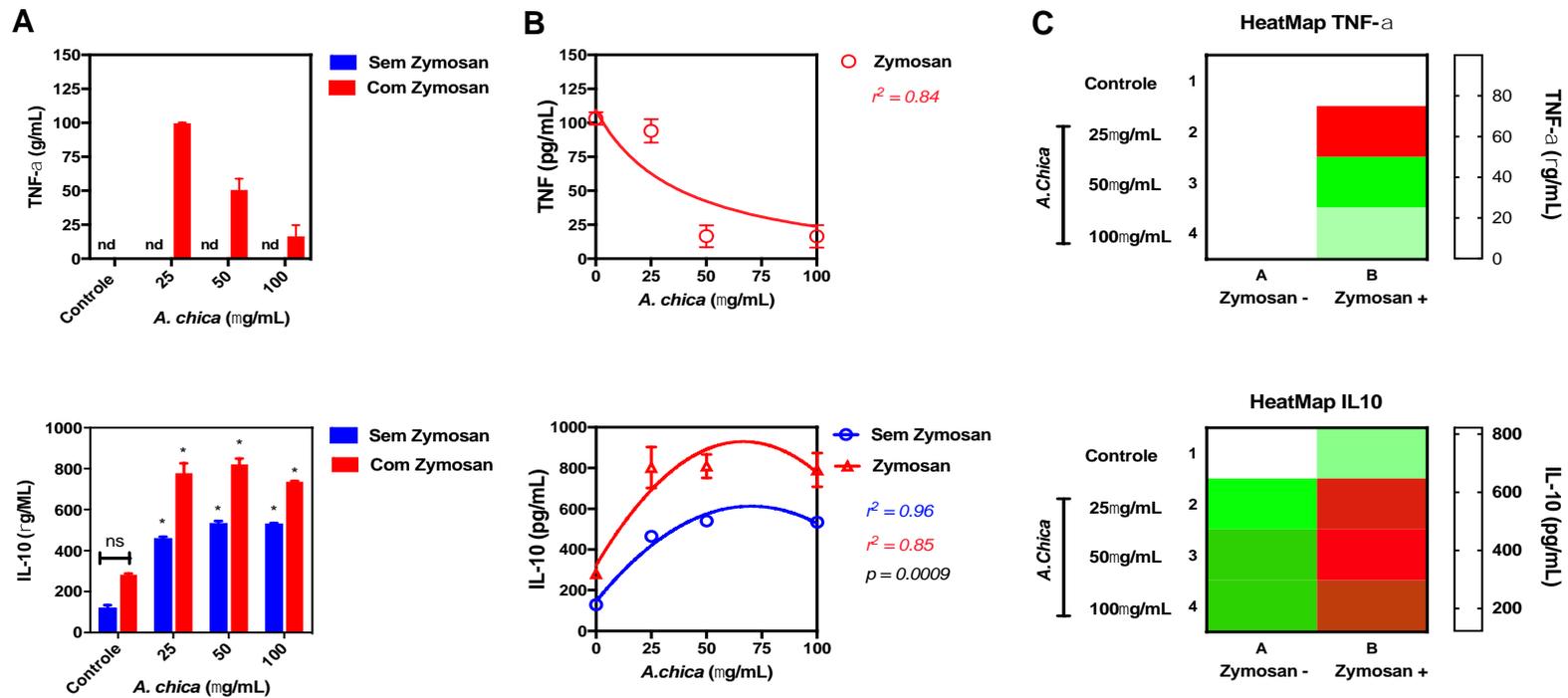


Figura 17. A. Efeito de *Arrabidaea chica* sobre a produção de TNF- α e IL-10 em células J.774 estimuladas com zymosan por 24h, através do ensaio Imunoenzimático (ELISA). **B.** Cálculos para IC50% e EC50% para TNF- α e IL-10 em células J.774, respectivamente. **C.** HeatMap das citocinas TNF- α e IL-10. O extrato de *Arrabidaea chica* tipo I foi eficaz na diminuição da produção de TNF- α (IC50%= 35 μ g/mL) e no aumento da produção de IL-10 (EC50%= 31 μ g/mL).

4. DISCUSSÃO

Devido ao aumento da população mais envelhecida, as doenças relacionadas à idade são as principais causas de morte em todo o mundo, entre essas, doenças cardiovasculares, câncer e doenças neurodegenerativas (KENNEDY et al., 2014; FERNANDES et al., 2016). O aumento do estresse oxidativo e a disfunção mitocondrial estão frequentemente associados ao envelhecimento e as doenças relacionadas à idade (Zong et al., 2015; LEE et al., 2015). Já existem estudos na literatura que relatam o uso de antioxidantes naturais encontrados em plantas da região Amazônica que podem prevenir o envelhecimento celular (FUNASAKI et al. , 2016).

A diminuição do metabolismo mitocondrial e a crescente produção de radicais livres e espécies reativas de oxigênio leva a indução do envelhecimento celular por estresse oxidativo (SILVA; FERRARI, 2011). É importante ressaltar que a defesa das células em relação ao estresse oxidativo está associada com os antioxidantes celulares (FERRARI et al., 2009). Para a sobrevivência ou adaptação das células no momento do processo de envelhecimento algumas ações ocorrem em repostas ao estresse oxidativo oriundo da disfunção mitocondrial, como a regulação de enzimas antioxidantes e o controle do nível de espécies reativas de oxigênio intracelular (WANG et al., 2013). Diante do exposto, avaliamos os efeitos dos extratos de *Arrabidaea chica* tipo I sobre o produção de espécies reativas de oxigênio intracelular e a proteção do potencial de membrana mitocondrial em macrófagos THP1 tratados com estaurosporina nesses experimentos, observamos que tanto os extratos aquosos utilizados tradicionalmente pela população (infusão e decocção), quanto os extratos obtidos a partir dos solventes orgânicos apresentaram eficaz atividade antioxidante e de proteção da membrana mitocondrial em todas as concentrações utilizadas, quando comparados a produção de iROS do controle positivo, porém, não foi observada uma diferença significativa entre os delineamentos utilizados. Além de todos os extratos protegeram a mitocôndria deixaram as células metabolicamente mais ativas. Estes resultados são relevantes, uma vez que os

extratos brutos de *Arrabidaea chica* reduziram significativamente a produção de ROS intracelular e aumentaram do potencial de membrana mitocondrial dos macrófagos THP-1 tratados com estaurosporina. Nossos resultados corroboram o estudo realizado por FIGUEIREDO FILHO et al., [s.d.], onde foi observado que o extrato lipofílico da espécie *Calycophyllum spruceanum* (mulateiro), pode proteger as células humanas da senescência induzida pelo estresse (peróxido de hidrogênio).

Ao avaliarmos o efeito do extrato aquoso da espécie *Arrabidaea chica* morfotipo I, sobre a produção de citocinas (TNF- α e IL-10) em macrófagos J774 com e sem estímulo de zymosan, observamos que o extrato diminuiu a produção da citocina pró-inflamatória TNF- α e aumentou a produção da citocina reguladora IL-10 tanto na presença quanto na ausência de zymosan, com concentração dependente. É importante ressaltar que o aumento da IL-10 é maior na presença de zymosan, isso quer dizer, que o papel do extrato aquoso de *Arrabidaea chica* nas mitocôndrias pode ser maior na inflamação devido esse diferencial da IL-10. A produção de TNF- α promove efeitos prejudiciais sobre o envelhecimento, influenciando na diminuição cognitiva e em eventos cardiovasculares e neurológicos (MICHAUD et al., 2013). De acordo com IP et al., (2017) a IL-10 promove a eliminação das mitocôndrias apresentando baixo potencial de membrana e um elevado nível de espécies reativas de oxigênio, por meio do processo de mitofagia. Além disso, afirmam que ao utilizarem um modelo de doença inflamatória intestinal em ratos, observaram que na falta da sinalização realizada pela IL-10, os macrófagos acumulam mitocôndrias danificadas, resultando em ativação desregulada do inflamassoma NLRP3 e produção de IL-1 β . A partir dos nossos resultados, sugerimos que o extrato aquoso de *Arrabidaea chica* pode ser potencialmente utilizado na proteção mitocondrial, além de prevenir danos relacionados ao envelhecimento, gerados com a produção de TNF- α .

No perfil químico dos extratos brutos de *Arrabidaea chica* Verlot, utilizando a técnica de *fingerprinting*, por espectrometria de massas com infusão direta,

observou-se a presença dos íons 299 e 285 em todos os extratos analisados (aquoso por infusão, aquoso por decocção, etanólico e acetato de etila). Após análise de fragmentação, o íon 299 foi identificado como o pigmento carajurina e apresentou-se em maior intensidade, enquanto o íon 285 apresentou-se de maneira menos intensa e foi identificado como o pigmento carajurona. É importante ressaltar que a presença dos pigmentos carajurina e carajurona nos extratos aquosos, resulta em uma confiabilidade na forma de preparo do chá, por infusão e por decocção, tradicionalmente utilizada pela população. Estudos desenvolvidos por CABRAL et al., (2010), identificaram no extrato etanólico de *Arrabidaea chica*, o íon 285 (carajurona) com um sinal mais intenso em comparação ao íon 299 (carajurina). O fato pode ser explicado, pois as concentrações de carajurina e carajurona presentes na espécie de *Arrabidaea chica* podem variar de acordo com a região onde foi realizada a coleta das folhas. Foi visto ainda, que o pó obtido das folhas de *Arrabidaea chica* de coloração vermelha intenso possuíam maior intensidade do íon 299 (carajurina) e os outros com a coloração menos intensa apresentavam maior intensidade do íon 285 (carajurona). Nossos resultados corroboram os experimentos realizados por CHAPMAN et al., (1927), ZORN et al., (2001) e DEVIA et al., (2002), que identificaram 3-desoxiantocianidinas isoladas das folhas de *Arrabidaea chica* Verlot, entre elas, a carajurina (componente principal) e a carajurona, responsáveis por proporcionar uma coloração avermelhada após a coleta das folhas, característica provavelmente restrita na família Bignoniaceae a espécie *Arrabidaea chica* (SCOGIN 1980; HARBORNE & WILLIANS, 2001).

Ao verificarmos os efeitos citotóxicos dos extratos brutos de *Arrabidaea chica* Verlot, sobre as células THP-1 (leucemia monocítica) por 48h, foi observado que os extratos aquosos (infusão e decocção) apresentaram a menor toxicidade, o extrato acetato de etila apresentou toxicidade na maior concentração utilizada e os extratos hexânico e etanólico não apresentaram toxicidade significativa. Os nossos resultados corroboram os dados publicados por DE CARVALHO RIBEIRO (2012), onde foi demonstrado que os extratos

aquosos não apresentaram atividade citotóxica significativa sobre as células leucêmicas humanas das linhagens Jurkat (leucemia linfóide) e HL60 (leucemia mielóide), no período de 48h.

É de grande importância a realização de estudos científicos que comprovem o conhecimento tradicional sobre as plantas medicinais que são comumente utilizadas pela população (FEIJÓ et al., 2012). A atividade antioxidante de *Arrabidaea chica* é a atividade biológica mais bem documentada desta espécie, porém não é comum na literatura a informação de qual morfotipo da espécie está sendo utilizado (morfotipo I, II ou III). Ao compararmos o efeito dos três morfotipos da espécie *Arrabidaea chica* sobre a produção de Óxido Nítrico (NO) em macrófagos murinos J774 tratados com LPS, observamos que morfotipo I reduziu significativamente a produção de NO em comparação aos morfotipos II, III e ao controle com LPS. Os nossos resultados corroboram os dados evidenciados na literatura, além disso, comprovam a utilização do chá das folhas da espécie *Arrabidaea chica*, amplamente usado como antioxidantes na população tradicional.

O experimento desenvolvido por ZORN et al., (2001) utilizando o extrato lipofílico das folhas de *Arrabidaea chica* mostrou a ação anti-inflamatória *in vitro* pela inibição do fator de transcrição NF- κ B, o mesmo regula a transcrição de genes que codificam diversas enzimas inflamatórias, entre essas, a enzima Ciclooxigenase-2 (COX-2). De acordo com dados da literatura, alguns inibidores da COX-2 foram citados no tratamento de doenças neurodegenerativas, como na doença de Alzheimer (KALGUTKAR et al., 2001; PASINETTI et al., 1998). Ao investigarmos, por meio da análise *in silico*, a possível ancoragem das moléculas carajurina e carajurona isoladas da espécie *Arrabidaea chica* em sítios ativos da proteína Ciclooxigenase-2 (COX-2) complexada com o Rofecoxib (RCX), observamos que a molécula carajurina apresentou interações com os resíduos VAL-523 e ARG-513, que são apresentados na literatura como essências para a interação de inibidores seletivos para COX-2 (TSENG et al., 2016).

Ao observarmos os efeitos protetores dos extratos de *Arrabidaea chica* sobre o dano na fita dupla do DNA, pelo teste do cometa em pH neutro, verificamos no índice de dano que o extrato acetato de etila apresentou-se mais eficiente em bloquear os efeitos danosos da Doxorubicina, quando comparados aos extratos aquosos (infusão e decocção), hexânico e etanólico, embora todos os extratos tenham apresentado proteção ao DNA, quando comparadas ao controle com DOXO. Segundo BERTHIAUME et al., (2007) uma das causas que levam a toxicidade da doxorubicina é a formação de espécies reativas de oxigênio, por isso, o grande interesse em estudos de moléculas que sequestram as espécies reativas de oxigênio (BOHM; EDGE; TRUSCOTT, 2012). Além do mais, verificamos o efeito anti-apoptótico dos extratos *Arrabidaea chica*, realizada por meio da marcação das células THP-1 com Anexina V, onde foi observado que todos os extratos, aquosos (infusão e decocção), acetato de etila, hexânico e etanólico, apresentaram proteção aos macrófagos THP1 da apoptose induzida por estaurosporina. Nossos resultados sugerem que além dos extratos de *Arrabidaea chica* apresentarem proteção ao DNA do dano causado pela doxorubicina, protegeram também as células THP-1 contra a apoptose induzida por estaurosporina.

5. CONCLUSÃO

1. Todos os extratos de *Arrabidaea chica* morfotipo I reduziram significativamente a produção de ROS intracelular e aumentaram do potencial de membrana mitocondrial em macrófagos THP-1 tratados com estaurosporina.
2. O extrato aquoso bruto de *Arrabidaea chica* morfotipo I diminuiu a produção da citocinas pró-inflamatórias TNF- α e aumentou a produção da citocina reguladora IL-10 tanto na presença quanto na ausência de zymosan, com concentração dependente, em macrófagos J774.
3. Todos os extratos de *Arrabidaea chica* morfotipo I protegeram as células THP-1 do dano ao DNA causado pela doxorrubicina.
4. Todos os extratos de *Arrabidaea chica* morfotipo I protegeram os macrófagos THP1 da apoptose induzida por estaurosporina.

7. REFERÊNCIAS

ARNOUS, A. H.; SANTOS, A. S.; BEINNER, R. P. C. Plantas medicinais de uso caseiro-conhecimento popular e interesse por cultivo comunitário. **Revista espaço para a saúde**, v. 6, n. 2, p. 1–6, 2005.

ATANASOV, A. G. et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 8, p. 1582–1614, dez. 2015.

BARBOSA, W. L. R. et al. Arrabidaea chica (HBK) Verlot: phytochemical approach, antifungal and trypanocidal activities. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 544–548, 2008.

BERTHIAUME, J. M.; WALLACE K. B. Adriamycin-induced oxidative mitochondrial cardiotoxicity. **Cell Biology and Toxicology**, Princeton, v. 23, n. 1, p. 15-25, 2007

BOHLIN, L. et al. Natural products in modern life science. **Phytochemistry Reviews**, v. 9, n. 2, p. 279–301, jun. 2010.

BOHM, F.; EDGE, R.; TRUSCOTT, G. Interactions of dietary carotenoids with activated (singlet) oxygen and free radicals: Potential effects for human health. **Molecular Nutrition & Food Research**, Weinheim, v. 56, n. 2, p. 205-216, 2012.

BREITBACH, U. B. et al. Amazonian Brazilian medicinal plants described by C.F.P. von Martius in the 19th century. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 147, n. 1, p. 180–189, maio 2013.

CABRAL, E.C. Utilização da técnica de Fingerprinting por Espectrometria de Massas para a Análise de Extratos de Produtos Naturais. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2010.

CHAPMAN, E.; PERKIN, A. G.; ROBINSON, R.; **J. Chem. Soc.** 1927.

CARNEIRO, A. L. B. et al. Screening of Amazonian plants from the Adolpho Ducke forest reserve, Manaus, state of Amazonas, Brazil, for antimicrobial activity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 1, p. 31–38, 2008.

CARVALHO, A. C. et al. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Rev Bras Farmacogn**, v. 18, n. 2, p. 314–319, 2008.

CORRÊA, M. F. P.; MELO, G. O. DE; COSTA, S. S. Substâncias de origem vegetal potencialmente úteis na terapia da asma. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 785–797, dez. 2008.

COSTA, F. G. C.; NUNES, F. C. P.; PERES, V. Mapeamento etnofarmacológico e etnobotânico de espécies de cerrado, na microrregião de Patos de Minas. **Perquirere**, v. 2, p. 93-111, 2010.

CHEMAXON; *MarvinSketch* 17.1.2.0; ChemAxon, Budapest, 2017.

DANTAS, I. C.; GUIMARÃES, F. R. Plantas medicinais comercializadas no município de Campina Grande, PB. **Revista de Biologia e Farmácia**, v. 1, n. 1, p. 1-13, 2007.

DE CARVALHO RIBEIRO, A.F. Avaliação das atividades antiinflamatória, antiangiogênica e antitumoral de extratos da *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verlot. 2012.

DE VARGAS, F. S. et al. Antioxidant activity and peroxidase inhibition of Amazonian plants extracts traditionally used as anti-inflammatory. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, n. 1, dez. 2016.

DEVIA B, LLABRES G, WOUTERS J, DUPONT L, ESCRIBANO-BAILON MT, PASCUAL-TERESA S, et al. New 3-deoxyanthocyanidins from leaves of *Arrabidaea chica*. **hytochem Anal**;13:114–20, 2002.

Discovery Studio Visualizer, V 16.1.0, **Accelrys Inc**, San Diego, CA, 2016.

DOS REIS TUROLLA, M. S.; DE SOUZA NASCIMENTO, E. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 2, 2006.

DOS SANTOS, M. R. A.; DE LIMA, M. R.; FERREIRA, M. Uso de plantas medicinais pela população de Ariquemes, em Rondônia. **Horticultura Brasileira**, v. 26, n. 2, p. 244–250, 2008.

DUTRA, R. C. et al. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, jan. 2016.

EVANGELISTA, S. S. et al. Fitoterápicos na odontologia: estudo etnobotânico na cidade de Manaus. **Rev. bras. plantas med**, v. 15, n. 4, p. 513–519, 2013.

FEIJÓ, A. M. et al. Medicinal plants used by elderly people with Diabetes mellitus in the treatment of the disease symptoms. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 1, p. 50–56, 2012.

FERRARI CKB, FRANÇA EL, HONORIO-FRANÇA AC. Nitric oxide, health and disease. **J Appl Biomed**, 7:163-73, 2009.

FERNANDES, M. et al. Systematic analysis of the gerontome reveals links between aging and age-related diseases. **Hum. Mol. Genet.** 25, 4804–4818, 2016.

FIGUEIREDO FILHO, D. A. et al. Mulateiro (*Calycophyllum spruceanum*) Stem Cell Extract: An Evaluation of Its Anti-Aging Effect on Human Adult Fibroblasts. [s.d.].

FUNASAKI, M.; BARROSO, H.S.; FERNANDES, V.L.A.; MENEZES, I.S. Amazon Rainforest Cosmetics: Chemical Approach for Quality Control. **Quimica Nova**, 39:194-209, 2016.

GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. **Analytical biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131–138, 1982.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 1, p. 1–93, fev. 2006.

HE, W.; GOODKIND, D.; KOWAL, P. R. An aging world: 2015. [s.l.] United States Census Bureau, 2016.

IP, W. E. et al. Anti-inflammatory effect of IL-10 mediated by metabolic reprogramming of macrophages. *Science*, v. 356, n. 6337, p. 513–519, 2017.

KALGUTKAR A. S. AND CURR Z. ZHAO. *Drug Targets*, 2, 79–106, 2001.

KENNEDY, B.K. et al. Geroscience: linking aging to chronic disease. **Cell** 159, 709–713, 2014.

STEWART, J. J. P. Stewart Computational Chemistry, **Colorado Springs**, CO, USA, 2016. [HTTP://OpenMOPAC.net](http://OpenMOPAC.net)

STEWART, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods VI: more modifications to the NDDO approximations and re-optimization of parameters. **J Mol Model.** 19, 1-32, 2013.

JORGE, M. P. et al. Evaluation of wound healing properties of *Arrabidaea chica* Verlot extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 118, n. 3, p. 361–366, ago. 2008.

KINGSTON, D. G. I. Modern Natural Products Drug Discovery and Its Relevance to Biodiversity Conservation. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 3, p. 496–511, 25 mar. 2011.

LEE, C. et al. The Mitochondrial-Derived Peptide MOTS-c Promotes Metabolic Homeostasis and Reduces Obesity and Insulin Resistance. **Cell Metabolism**, v. 21, n. 3, p. 443–454, mar. 2015.

LOPES, G. F. G.; PANTOJA, S. C. DE S. Levantamento das espécies de plantas medicinais utilizadas pela população de Santa Cruz–Rio de Janeiro–RJ. **Rev Eletronica Nov Enf**, v. 16, n. 16, p. 62–80, 2013.

MACIEL, M. A. M. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química nova**, v. 25, n. 3, p. 429–438, 2002.

MARMITT, D. J. et al. Plantas Mediciniais da RENISUS Com Potencial Anti-inflamatório: Revisão Sistemática Em Três Bases de Dados Científicas. **Revista Fitos**, v. 9, n. 2, 2015.

MEDICINALES, P. Y. C. D. P. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. 2011.

MICHAUD, M. et al. Proinflammatory Cytokines, Aging, and Age-Related Diseases. **Journal of the American Medical Directors Association**, v. 14, n. 12, p. 877–882, dez. 2013.

MICHEL, A. F. R. M. et al. Evaluation of anti-inflammatory, antiangiogenic and antiproliferative activities of *Arrabidaea chica* crude extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 165, p. 29–38, maio 2015.

MORRIS, G. M.; LINDSTROM, R. HUEY; SANNER, W. M. F.; BELEW, R. K.; GOODSSELL, D. S.; OLSON A. J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **J Comput Chem**. 2009, 30, 2785–2791.

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

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 311–335, 23 mar. 2012.

OLIVEIRA, D. P. C. DE et al. Anti-inflammatory activity of the aqueous extract of *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verl. on the self-induced inflammatory process from venoms amazonians snakes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2B, p. 643–649, 2009.

Orlando, B. J.; Malkowski, M. G. Crystal structure of rofecoxib bound to human cyclooxygenase-2. **Acta Crystallogr.**, Sect.F 72: 772-776, 2016.

PASINETTI, G. M.; **Neurosci J.Res**, 54, 1–6, 1998.

PAULA, J. T. et al. Extraction of anthocyanins from *Arrabidaea chica* in fixed bed using CO₂ and CO₂/ethanol/water mixtures as solvents. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 81, p. 33–41, set. 2013.

PAULETTI, P. M.; BOLZANI, V. DA S.; YOUNG, M. C. M. Chemical constituents of *Arrabidaea samydoidea* (Bignoniaceae). **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 641–643, 2003.

PIMENTA, A. C. Instituições paraenses se unem para produção de fitoterápicos. **Revista Ver-a-Ciência**, v. 1, p. 29–35, 2012.

SCOGIN R. Anthocyanins of the Bignoniaceae biochemical and systematics ecology.; 8:273-6, 1980.

SILVA, J. C. et al. Modelos experimentais para avaliação da atividade antinociceptiva de produtos naturais: uma revisão. **Brazilian Journal of Pharmacy**, v. 94, p. 18–23, 2013.

SILVA, W. J. M. DA; FERRARI, C. K. B. Metabolismo mitocondrial, radicais livres e envelhecimento. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, p. 441–451, 2011.

SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, n. 1, p. 184–191, 1 mar. 1988.

SOUZA, H. Q.; FREITAS HIDALGO, A.; CHAVES, F. C. M. Preparo do corante de crajirú (*Arrabidaea chica* (Bonpl.) B. Verl.) e sua aplicação em Histologia. [s.d.].

TAFFARELLO, D. et al. Activity of *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) Verlot extracts obtained by biotechnological processes on fibroblast and human tumor cells. **Química Nova**, v. 36, n. 3, p. 431–436, 2013.

TROTT, O; OLSON. A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. **J Comput Chem**. 2010, 30, 455–461.

TSENG, T.-S. et al. Discovery of a potent cyclooxygenase-2 inhibitor, S4, through docking-based pharmacophore screening, in vivo and in vitro estimations. **Mol. BioSyst.**, v. 12, n. 8, p. 2541–2551, 2016.

VAFAI, S. B.; MOOTHA, V. K. Mitochondrial disorders as windows into an ancient organelle. **Nature**, v. 491, n. 7424, p. 374–383, 14 nov. 2012.

WANG, C.-H. et al. Oxidative stress response elicited by mitochondrial dysfunction: Implication in the pathophysiology of aging. **Experimental Biology and Medicine**, v. 238, n. 5, p. 450–460, maio 2013.

WANG, L.-S.; STONER, G. D. Anthocyanins and their role in cancer prevention. **Cancer Letters**, v. 269, n. 2, p. 281–290, out. 2008.

ZORN, B. et al. 3-Desoxyanthocyanidins from *Arrabidaea chica*. **Phytochemistry**, v. 56, n. 8, p. 831–835, 2001.

ZONG, Q.O.; Rades, T.; McDowell, A. Anti-Ageing Effects of *Sonchus oleraceus* L. (pūhā) Leaf Extracts on H₂O₂-Induced Cell Senescence. **Molecules**, 20: 4548-4564, 2015.