



Universidade de Brasília – UnB

Faculdade de Medicina

Pós-Graduação em Ciências Médicas

Laboratório Interdisciplinar de Biociências - LabIBC

LAISE ANANIAS DO ESPIRITO SANTO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA E ANTI-
INFLAMATÓRIA DA ESPÉCIE DO CERRADO *Jacaranda*
ulei (Bignoniaceae) EM CÉLULAS J774**

Brasília – DF,

2021

LAISE ANANIAS DO ESPIRITO SANTO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA E ANTI-
INFLAMATÓRIA DA ESPÉCIE DO CERRADO *Jacaranda*
ulei (Bignoniaceae) EM CÉLULAS J774**

Dissertação apresentada como requisito a
obtenção do grau Mestre em Ciências Médicas,
Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas,
Universidade de Brasília-UnB.

Orientador: Prof^a. Dr. Ricardo Pratesi

Coorientadora: Prof^a. Dr^a Lorena Albernaz

Brasília – DF,

2021

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

da do Espírito Santo, Laise Ananias
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA E ANTI-INFLAMATÓRIA DA
ESPÉCIE DO CERRADO Jacaranda ulei (Bignoneaceae) EM CÉLULAS
J774 / Laise Ananias do Espírito Santo; orientador Riccardo
Pratesi; co-orientador Lorena Albernaz Carneiro. --
Brasília, 2021.
66 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Ciências Médicas) --
Universidade de Brasília, 2021.

1. plantas medicinais. 2. Jacaranda ulei. 3.
citotoxicidade . 4. oxido nitrico. 5. cerrado. I. Pratesi,
Riccardo , orient. II. Carneiro, Lorena Albernaz, co
orient. III. Título.

BANCA EXAMINADORA



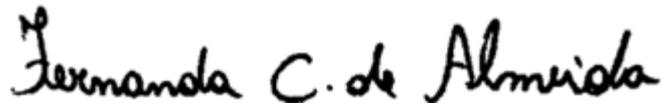
Prof. Dr. Riccardo Pratesi
Matricula 094641
... DF 408

Prof^ª. Dr. Riccardo Pratesi (Orientador/Presidente)

Universidade de Brasília- UnB



Prof.ª Dr.ª. Angélica Amorim Amato (Membro)
Universidade de Brasília- UnB



Prof.ª Dr.ª. Fernanda Coutinho de Almeida (Membro externo)
Universidade de Brasília- UnB

ÓRGÃOS FINANCIADORES

Este trabalho foi realizado no Laboratório Interdisciplinar de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília.

Financiamento: FAPDF / CNPq / CAPES

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus,
meus queridos pais Luis e Ananias,
meus queridos orientadores Riccardo e Lorena e
a meu amado esposo Glauber Lindemberg.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê”.

Arthur Schopenhauer

AGRADECIMENTOS

Á Deus, por derramar sua infinita graça sobre a minha vida todas as manhãs, bem como me manter firme em meio as adversidades, me conceder sabedoria, perseverança e força para conquistar os meus objetivos.

Aos meus queridos pais, Luis das Chagas Morais e Ananias Ana de Morais por estarem ao meu lado durante a caminhada, por todo o apoio e suporte, por nunca me deixar desanimar, por sempre me fazer sentir importante ao se alegrar com cada uma das minhas conquistas.

Ao meu marido Glauber e meu filho Noah, por sempre me incentivarem e apoiarem, mesmo nos momentos mais difíceis. Por toda paciência e compreensão.

Aos meus avós (*in memorian*), por me ensinarem em vida a ser um ser humano melhor, a amar a Deus sobre todas as coisas, a valorizar a família antes de qualquer coisa e principalmente por acreditarem em mim.

Á cada um dos meus familiares, por terem me auxiliado durante essa jornada.

Áo meu orientador e a minha co-orientadora, Riccardo Pratesi e Lorena Albernaz, pelos ensinamentos transmitidos, pela rica oportunidade de ser sua orientanda e por serem grandes exemplos de profissionais.

Aos professores, funcionários técnicos (Isabela Teotônio, Cássia e outros), colaboradores e estagiários da Universidade de Brasília, por todo aprendizado e auxílio recebidos durante o curso.

Às minhas amigas e companheiras de curso, Geysa Stéfanne e Jéssica, por um ciclo concluído de frustrações, desespero, risos e felicidades.

Às minhas amigas de graduação, Luma e Karla, por todo o apoio e ânimo.

Por fim sou grata a todos, que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho

RESUMO

Jacaranda ulei é uma espécie do Cerrado utilizada na medicina tradicional e tem sido indicada para o tratamento de doenças de pele, reumatismo, trato urinário, disenteria e processos inflamatórios. Estudos fitoquímicos demonstraram a presença metabólitos secundários com atividade anti-inflamatória em alvos biológicos de outras espécies desse gênero. Contudo, até o presente momento, não existem estudos sobre o potencial anti-inflamatório da referida espécie. Assim, o presente estudo investigou possíveis efeitos anti-inflamatórios e citotóxicos do extrato bruto e frações das partes aéreas de *Jacaranda ulei* em células da linhagem J774 e em peixe zebra. Em seguida, a viabilidade celular foi avaliada por meio do método de conversão do azul de tiazolil (MTT) e a produção de óxido nítrico (NO) foi quantificada nos sobrenadantes das culturas pelo método de Griess. Os ensaios com embriões de peixe zebra foi realizada em microplacas de 96 poços com 250 μ l de concentração, um total de 60 organismos por concentração e duração de 96h. Os dados obtidos mostraram que houve redução da viabilidade celular em concentrações superiores a 100 μ g/mL ($P < 0,05$). Portanto, o extrato de *Jacaranda ulei* apresentou um efeito sobre a citotoxicidade de modo dose-dependente estimulando a proliferação celular em concentrações menores. O extrato foi capaz de reduzir a produção de NO em todas as concentrações do extrato, sendo que nas concentrações 100 e 25 μ g/mL este efeito foi mais pronunciado. E em peixes zebra não foram observados efeitos subletais e letais em *Jacaranda ulei*. Assim, um agente que previna a liberação desses mediadores pode indicar atividade anti-inflamatória. Contudo, mais estudos são necessários para comprovar o potencial efeito anti-inflamatório da espécie *Jacaranda ulei*, além da caracterização química e identificação dos componentes biologicamente ativos.

Palavras-chaves: *Jacaranda ulei*, plantas medicinais, citotoxicidade, óxido nítrico, cerrado.

ABSTRACT

Jacaranda ulei is a Cerrado species used in traditional medicine and has been indicated for the treatment of skin diseases, rheumatism, urinary tract, dysentery and inflammatory processes. Phytochemical studies demonstrated the presence of secondary metabolites with anti-inflammatory activity in biological targets of other species of this genus. However, to date, there are no studies on the anti-inflammatory potential of this species. Thus, the present study investigated possible anti-inflammatory and cytotoxic effects of the crude extract and aerial parts fractions of *Jacaranda ulei* in J774 lineage cells and in zebrafish. Then, cell viability was evaluated using the thiazolyl blue (MTT) conversion method and the production of nitric oxide (NO) was quantified in the culture supernatants by the Griess method. Assays with zebrafish embryos were performed in 96-well microplates with 250 μ l concentration, a total of 60 organisms per concentration and duration of 96h. The data obtained showed that there was a reduction in cell viability at concentrations above 100 μ g/mL ($P < 0.05$). Therefore, *Jacaranda ulei* extract showed a dose-dependent effect on cytotoxicity, stimulating cell proliferation at lower concentrations. The extract was able to reduce the production of NO at all concentrations of the extract, and at concentrations 100 and 25 μ g/mL this effect was more pronounced. And in zebra fish, sublethal and lethal effects were not observed in *Jacaranda ulei*. Thus, an agent that prevents the release of these mediators may indicate anti-inflammatory activity. However, more studies are needed to prove the potential anti-inflammatory effect of the *Jacaranda ulei* species, in addition to the chemical characterization and identification of biologically active components.

Keywords: *Jacaranda ulei*, medicinal plants, cytotoxicity, nitric oxide, shut.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de Localização do Bioma Cerrado	15
Figura 2. Bioma Cerrado: vegetação do cerrado	16
Figura 3. <i>Jacaranda ulei</i> Bureau & K. Schum. (Bignoniaceae)	18
Figura 4. Distribuição Geográfica do <i>Jacaranda ulei</i> Bureau & K. Schum	19
Figura 5. Características da planta <i>Jacaranda ulei</i>	20
Figura 6. <i>Jacaranda ulei</i> : presença de xilópodio	21
Figura 7. Distribuição da família Bignoniaceae no mundo	22
Figura 8. Resposta inflamatória: calor, rubor, edema e dor	26
Figura 9. Redução do MTT, coloração do amarelo (MTT) ao arroxeadado (Formazan)	36
Figura 10. Design experimental do teste de embriotoxicidade utilizando o peixe-zebra como organismo modelo	39
Figura 11. Ensaio da viabilidade celular utilizando células J774	42
Figura 12. Produção de óxido nítrico (NO) em células J774	44
Figura 13. Ensaio da viabilidade celular – Frações do extrato	46
Figura 14. Produção de óxido nítrico (NO) nas frações de <i>Jacaranda ulei</i>	48
Figura 15. Ensaio de Citotoxicidade – MTT: extrato bruto de <i>Jacaranda ulei</i>	50
Figura 16. Produção de NO em células J774 tratadas com extrato bruto de <i>Jacaranda ulei</i>	51
Figura 17. 74 frações obtidas do extrato acetato de etila das partes aéreas de <i>J. ulei</i>	53
Figura 18. Gráfico “visão global” do teste de embriotoxicidade do composto Arbo191	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados sobre a prevalência da família Bignoniaceae no Brasil	23
Tabela 2. Lista com os 82 extratos brutos vegetais	30-32
Tabela 3. Coluna Cromatográfica Aberta	38
Tabela 4: Identificação das espécies viáveis pelo método MTT	41-42
Tabela 5: Rendimentos para os solventes Hexano, Acetato e Metanol	45

LISTA DE ABREVIATURAS

ONGs: Organizações não governamentais

UV: Ultra violeta

TNF α : Fator de necrose tumoral α

ILs: Interleucinas

NO: Óxido nítrico

ROS: Espécies reativas de oxigênio

AVC: Acidente vascular cerebral

AINES: Anti-inflamatórios não esteroidais

DMEM: Eagle modificado por Dulbecco

DMSO: Dimetilsulfóxido

SFB: Soro Fetal Bovino

NEED: Naftiletilenodiamino Dihidroclorídrico

LabIBC: Laboratório Interdisciplinar de Biociências

MTT: Tetrazólio de metiltiazol

SDS: Dodecilsulfato de sódio

SPE-Diol: Fracionamento em Fase Sólida

CCD: Cromatografia em Camada Delgada

CC: Cromatografia em Coluna

RMN: Ressonância magnética nuclear

UHPLC: Cromatógrafo líquido

CLAE: Cromatografia de alta eficiência

GNPS: The Global Natural Product Social Molecular Networking

NADH: Dinucleótido de nicotinamida e adenina

NADHP: Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

iNOS: Enzima óxido nítrico sintetase induzível

LPS: Lipopolissacarídeo

IC50: Concentração inibitória capaz de matar 50%

NF- κ B: Factor nuclear kappa B

INF- γ : Interferon gama

SUMÁRIO

I. Introdução	15
1. Cerrado	15
2. <i>Jacaranda ulei</i> Bureau & K. Schum	17
3. A família: Bignoniaceae	22
4. O gênero: <i>Jacaranda juss</i>	23
5. Inflamação	25
II. Justificativa	28
III. Objetivo.....	29
IV. Materiais e Métodos.....	30
1. Triagem dos extratos brutos vegetais.....	30
2. Coleta do material vegetal	32
3. Obtenção do extrato bruto	33
4. Cultura de células <i>in vitro</i>	33
5. Teste de Citotoxicidade (MTT) utilizando células J774.....	34
6. Teste do Óxido Nítrico (NO)	35
7. Fracionamento do extrato Bruto	35
7.1 Fracionamento em Fase Sólida (SPE-Diol).....	35
7.1.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	36
7.1.2 Cromatografia em Coluna Aberta de Sílica.....	36
8. Sistema de cultivo e obtenção dos embriões de peixe-zebra	37
8.1 Testes de toxicidade com embriões de peixe zebra (FET).....	37
9. Análise Estatística.....	39
V. Resultados e Discussão	40
1. Resultado do screening inicial com diferentes extratos	40
1.1 Teste de Citotoxicidade (MTT) - Todos os extratos	40
1.2 Óxido Nítrico – extratos selecionados pelo MTT	42

2. Resultado das frações obtidas por SPE-Diol	43
2.1 Rendimento das Frações	44
2.2 Teste de Citotoxicidade (MTT) – Frações dos extratos.....	45
2.3 Teste de Óxido Nítrico (NO) – Frações dos extratos	47
3. Resultados com o extrato bruto de <i>Jacaranda ulei</i>	48
3.1 Teste de Citotoxicidade – MTT.....	48
3.2 Ensaio do Óxido Nítrico em células J774 tratadas com o extrato de <i>Jacaranda ulei</i>	50
3.3 Cromatografia em Coluna Aberta (CC) no extrato de <i>Jacaranda ulei</i>	52
3.4 Resultado do testes de toxicidade com embriões de peixe zebra	53
VI. Conclusão.....	54
VII. Referências Bibliográficas	56

I. INTRODUÇÃO

1. O Cerrado

O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro, sendo superado em área apenas pela Amazônia. Ele cobre aproximadamente 25% de todo o território do país. Esta área abrange o sul do Mato Grosso, o norte do Piauí, o oeste da Bahia, o sul do Maranhão, os Estados de Goiás, Tocantins, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Rondônia e São Paulo, e o Distrito Federal (Figura 1) (SOARES et al., 2017).



Figura 1. Mapa de Localização do Bioma Cerrado (Adaptado de CORTELO et al, 2021). Imagem do Laboratório de Farmacognosia.

O Cerrado possui formações campestres, savânicas e florestais, sendo muito diversificado e peculiar. Apresenta um mosaico de vegetação que abrange desde plantas herbáceas até espécies lenhosas (Figura 2) (MIRANDA, 2014). A vegetação do bioma é caracterizada como aberta ou floresta semidecidual, possui habitats xerofíticos, mésicos e enclaves com regiões úmidas, caracterizada por árvores de médio porte, galhos e troncos

retorcidos, raízes densas e acomodadas a uma menor pluviosidade (REIS et al, 2019). Os principais fatores responsáveis pelas diferentes fisionomias da vegetação e padrões de composições florísticas são as duas estações bem definidas: seca e chuvosa, disponibilidade hídrica, textura e disponibilidade de nutrientes no solo, fogo, herbívora entre outros fatores (SILVA JUNIOR et al, 2012).



Figura 2. Bioma Cerrado: vegetação do cerrado (Foto tirada no condomínio residencial Santos Dumont, Santa Maria-DF).

Essa variedade nos tipos de vegetação do Cerrado explica a sua vasta biodiversidade. O Cerrado é o lar de aproximadamente 12.700 espécies de plantas vasculares conhecidas, das quais 35% são endêmicas e possui a maior diversidade de plantas de qualquer região de savana do mundo (FORZZA et al. 2012; BFG 2018). Porém, o Cerrado tem sido historicamente desvalorizado, apesar de sua biodiversidade. Tanto pelo governo brasileiro, como por ONGs internacionais que vêem as florestas tropicais da Amazônia e do Atlântico como mais valiosas (ANTAR, 2019).

O Cerrado é predominantemente dominado pelo clima tropical, com estações chuvosas e secas claramente diferenciadas e temperaturas médias anuais que variam de 18 a 22°C e 23 a 27°C no centro-sul e norte da região, respectivamente. A umidade relativa do ar alcança taxas entre 38 e 40% no inverno seco, enquanto no período chuvoso, a umidade é elevada, atingindo 97%. A maioria dos solos são latossolos ácidos (mais de 45%), areias quartzosas, podzólicos, plintossolo, litossolos entre outros, com alta saturação de alumínio e

capacidade de fixação de fósforo, mas baixa disponibilidade de nutrientes e capacidade de retenção de água (PEREIRA et al., 2019).

Cerca de metade dos 2 milhões de km² originais do Cerrado foram transformados em pastagens, culturas anuais e outros tipos de uso. Desde a década de 1970, esse bioma sofreu grandes perdas de sua vegetação natural devido à expansão agrícola. A taxa de desmatamento é de cerca de 1,6% ao ano (ARANTES et al. 2016), levando à conversão da vegetação nativa em terras agrícolas, que já afetaram mais de 40% da área original desse bioma (SILVEIRA et al, 2019). O Cerrado é um dos hotspots (definido como áreas com grande biodiversidade, ricas principalmente em espécies endêmicas, e que apresentam alto grau de ameaça) mundiais de biodiversidade. E pelo menos 137 espécies de animais que ocorrem no Cerrado estão ameaçadas de extinção. A degradação do solo e dos ecossistemas nativos e a dispersão de espécies exóticas são as maiores e mais amplas ameaças à biodiversidade em função da grande expansão da agricultura e intensa exploração local de produtos nativos (KLINK et al, 2005).

As plantas do Cerrado são adaptadas às condições ambientais distintas: extensos períodos de seca (abril a setembro), ao mesmo tempo períodos de alta precipitação (outubro a março), solos pobres em nutrientes, grande ocorrência de incêndios e alta incidência de radiação UV. Diante disto, as plantas utilizam mecanismos de defesa para se protegerem de agentes físicos, químicos e biológicos. O que pode ser associado à produção e armazenamento de compostos bioativos nos indivíduos (REIS et al, 2019).

2. *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum

Jacaranda ulei Bureau & K. Schum. é uma espécie endêmica do Cerrado pertencente a família Bignoniaceae. Conhecida popularmente como caroba, carobinha-do-campo, carobinha-mirim, carobinha e carabo-de-goiás (MIRANDA, 2014) (Figura 3). Outras sinonímias aceitáveis para a planta são *Jacaranda crystallana*, *Jacaranda bahiensis*, *Jacaranda morii* (CNCFlora, 2012).



Figura 3. *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum. (Bignoniaceae). A. Aspecto geral da planta. **B.** Exsicata de *Jacaranda ulei* coletado em 23/03/1971, Chapada dos Veadeiros, Go. (Adaptado de MMA/SBF, 2011; Re flora, Herbário Virtual, disponível em: <<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/herbarioVirtual/ConsultaPublicoHVUC/ConsultaPublicoHVUC.do?idTestemunho=3552285>> Acesso em 29/4/2020)

A planta está amplamente distribuída pelos estados da Bahia (BA), Mato Grosso (MT), Goiás (GO), Distrito Federal (DF) e Minas Gerais (MG), como mostra a figura 4. Além disso, o *Jacaranda ulei* é encontrado no habitat da borda de mata de galeria, Cerrado (stricto sensu) e campo limpo (MEDEIROS, 2011).



Figura 4. Distribuição Geográfica do *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum (Disponível em: <https://ferramentas.sibbr.gov.br/ficha/bin/view/especie/jacaranda_ulei>. Acesso em: 30/04/2020).

Estudos e colaborações pioneiras, como de Italo de Vattimo em 1984, utilizou-se de espécimes do herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro para o estabelecimento de características anatômicas da espécie. No estudo em questão, a planta foi nomeada por sua sinonímia, *Jacaranda bahiensis*. Além disso, em 1897 está o primeiro registro histórico de *Jacaranda ulei* lançado na literatura pelos autores que a identificaram e acrescentaram seu nome à espécie, Édouard Bureau e Karl Moritz Schumann pela revista Flora do Brasiliensis (BUREAU & SCHUMANN, 1897).

Jacaranda ulei é um sub-arbusto do Cerrado, com altura de 0,38 a 2,60 m (SILVEIRA, 2018). A planta possui folhas bipinadas (Figura 5b), foliólulos simétricos, inteiros e bulados. E suas inflorescências são terminais ou apicais. As flores são hermafroditas, zigomorfas, gamossépalas, diclamídeas, com cálice hirsuto e corola tubulosa-campanulada, de cor vinácea. Como mostra a figura 5, os frutos são cápsulas secas de formato arredondado a elíptico, rígidos e de cor verde-claro quando jovens, e castanhos quando maduros. As sementes são grandes, aladas, de coloração castanha e formato

arredondado a elíptico (MIRANDA, 2014). O período de longo florescimento da espécie é de agosto a novembro, florescendo anualmente. E entre os períodos de abril a agosto, os frutos iniciam sua fase de deiscência (RIBEIRO, 2003).

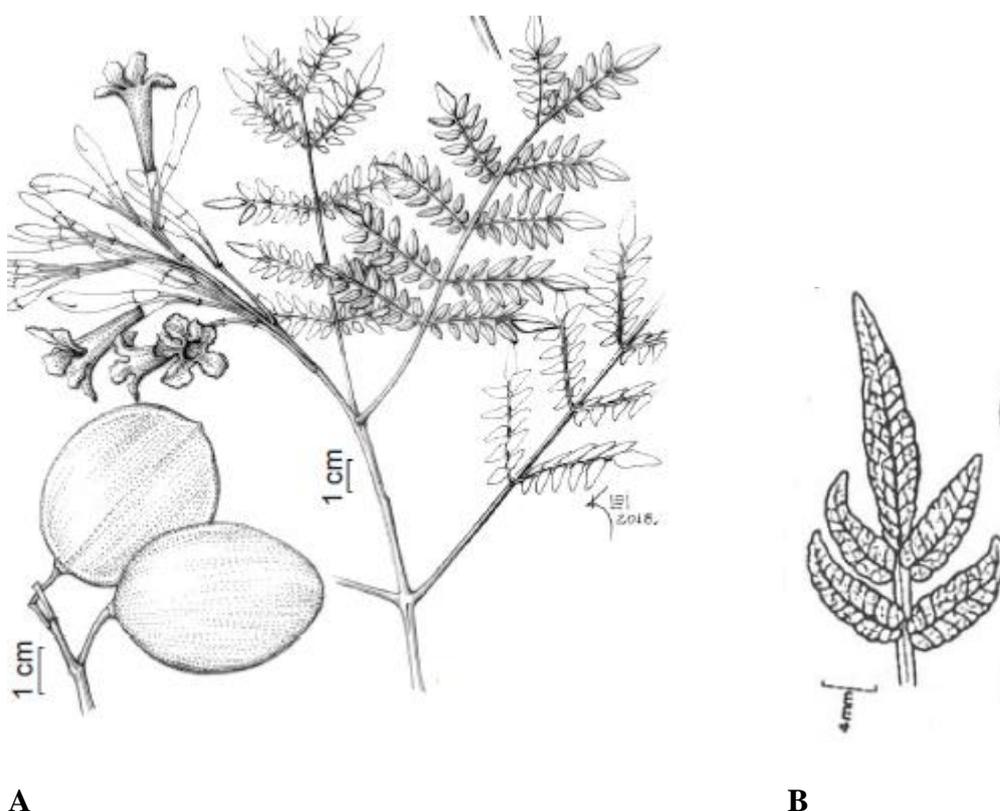


Figura 5. Características da planta *Jacaranda ulei*. A. Ramo florido e Fruto Deiscente. **B.** Folíolos em detalhe. (Adaptado de LOHMANN *et al.*, 2018; LOHMANN & PIRANI, 1996).

Outra característica interessante desta planta é a presença de um xilopódio nos indivíduos adultos. Um xilopódio (Figura 6) é uma estrutura subterrânea espessa que acumula substâncias como amido, água, taninos, fenóis e diversos outros metabólitos secundários (PALHARES *et al.*, 2007; SILVEIRA *et al.*, 2018). Em geral, o xilopódio é originário da região da raiz da planta e tem a capacidade de brotar. Essa característica é particularmente importante nas espécies de Cerrado, devido à frequência de incêndios ou uma longa estação de seca (SILVEIRA *et al.*, 2018).



Figura 6. *Jacaranda ulei*: presença de xilópodio (seta). (Adaptado de MIRANDA, 2014).

Conhecida pelas suas propriedades medicinais, a espécie é amplamente utilizada para o tratamento de reumatismo, dores na coluna, inflamação vaginal, feridas, coceiras e como depurativo do sangue (MIRANDA, 2014). O *Jacaranda ulei* apresenta ainda atividade antifúngica e ação antioxidante (FARIAS, 2013).

Estudos mostram que a presença de compostos fenólicos está nas folhas e no sistema subterrâneo. As folhas de *J. ulei* são comercializadas em farmácias, que as indicam para disenteria amebiana, doenças da pele e vias urinárias (FUKUDA, 2011). Além da ação terapêutica, a espécie apresenta grande potencial ornamental devido à beleza e abundância de suas flores (SILVEIRA et al, 2016).

Apesar de já existir trabalhos descrevendo a atividade em alvos biológicos e fitoquímica com outras espécies desse gênero, a espécie *Jacaranda ulei* pode nos surpreender com substâncias ainda não descritas na literatura e novas propriedades medicinais, pois podem ser únicos nessa espécie além de fatores bióticos e abióticos que podem estar estimulando a biossíntese de novas moléculas (RODRIGUES & CARVALHO, 2001). O que justifica o nosso trabalho de busca do (s) compostos que apresentam atividade anti-inflamatória. Uma vez que ainda não existem relatos na literatura nesse sentido.

3. A família: Bignoniaceae

A família Bignoniaceae (Dicotyledonae) pertence à ordem Lamiales e subclasse Euasteridae, reúne cerca de 120 gêneros, com aproximadamente 800 espécies, distribuídas principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do planeta como Américas, África, Ásia e Oceania (Figura 7) (LOHMANN et al, 2018; CHASE et al, 2016). A maior parte dos representantes da família são árvores, arbustos ou lianas, com folhas compostas e opostas, flores vistosas com corola gamopétala e zigomorfa, androceu composto por quatro estames e um estaminódio, gineceu bicarpelar e bilocular, com muitos óvulos por lóculo, e fruto cápsula (MIRANDA, 2014). Atualmente, Bignoniaceae possui seis tribos monofiléticas (Bignonieae, Catalpeae, Jacarandae, Oroxyleae, Tecomeae e Tourrettieae) e dois clados denominados informalmente de aliança Tabebuia e clado Paleotropical (OLMSTEAD et al. 2009). Tendo o Brasil como centro da sua diversidade. No país ocorrem 34 gêneros e 420 espécies, das quais 212 são endêmicas (LOHMANN, 2015).



Figura 7. Distribuição da família Bignoniaceae no mundo. (Adaptado de LEÇA et al, 2015).

Abaixo segue alguns quantitavos relativos ao gênero Bignoniaceae, tabela 1:

Tabela 1. Dados sobre a prevalência da família Bignoniaceae no Brasil. (Adaptado de LOHMANN, 2015). Site: Reflora.

FAMÍLIA BIGNONIACEAE			
	Aceitos	Endêmicos	Sinônimos
Gênero	34	1	82
Espécie	420	212	1394
Subespécie	1	0	5
Variedades	0	0	215

Apesar dos representantes arbóreos serem os mais conhecidos, esta família botânica inclui espécies com flores muito vistosas e madeira altamente resistente, sendo muito utilizada na arborização urbana e paisagismo. A família também inclui um grande número de cipós e trepadeiras como o “cipó-de-São-João” (MATTOS et al, 2019). Os gêneros mais importantes da família, com ampla distribuição nas regiões tropicais, são *Tabebuia* e *Jacaranda* (ZAPPI et al, 2015).

Estudos pertencentes a diferentes espécies do gênero *Bignoniaceae* demonstraram baixa toxicidade no modelo experimental de toxicidade aguda e nas doses avaliadas, como é o caso da planta *Memora nodosa* (Silva Manso) Miers (TRESVENZOL et al, 2013). ANTUNES (2013) observou que o extrato etanólico de folhas de *Jacaranda decurrens* subsp. *symmetrifoliolata* (ExJds) reduziu o tecido adiposo branco em ratos Wistar sem causar efeitos tóxicos. Além do mais, entre os constituintes químicos reconhecidos na família *Bignoniaceae* têm-se naftoquinonas do tipo lapachol, monoterpenos (principalmente iridoides), triterpenos, alcaloides monoterpênicos, flavonoides, taninos e lignanas (GACHET et al, 2009).

Considerada uma família com alto potencial econômico, diversos usos são relatados principalmente na horticultura, culinária, artesanato, corantes em rituais religiosos, com recurso madeireiro e medicinal (LEÇA et al, 2015). Muitos representantes desta família são usadas mundialmente como plantas ornamentais, devido a beleza de suas flores. Diversas espécies de *Bignoniaceae* possuem flavonóides, taninos e alcalóides. E já demonstraram atividade antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória, antiviral, antioxidante, adstringente e diurética (MIRANDA, 2014).

4. O gênero: *Jacaranda* Juss.

O gênero *Jacaranda* pertence a tribo Tecomeae assim como o gênero *Tabebuia*. Essa tribo da família Bignoniaceae é reconhecida como única que ocorre no Velho e no Novo Mundo (GACHET & SCHÜHLY, 2009). A tribo Jacarandae foi circunscrita pela primeira vez por Fenzl em 1841 (RAGSAC et al, 2019).

O gênero contém ao todo 47 espécies em todo o mundo. Nativas da América Central, do Sul e Caribe. A maioria dos jacarandás são árvores de 1 a 45 metros de altura, entretanto podem ser encontradas como arbustos e sub-arbustos. Das 47 espécies do gênero, 35 espécies são encontradas no Brasil e 31 são endêmicas (GACHET & SCHÜHLY, 2009; MIRANDA, 2014).

As espécies do gênero *Jacaranda* têm sido usadas para o tratamento de doenças venéreas e da pele, o estômago e os intestinos (GENTRY, 1992). Como por exemplo, o infuso das folhas e das cascas do caule e da raiz de *Jacaranda caroba* indicado como adstringente, antirreumático, diurético, possui ação sudorífica e cura afecções cutâneas. Do mesmo modo, as folhas de *Jacaranda brasiliiana* são usadas na forma de chás para combater as afecções cutâneas, o reumatismo, a sífilis, a desinteria amebiana, além de serem utilizadas na forma de pó para o combate a úlceras, aplicando-o por cima da mesma. E ainda com a casca da raiz prepara-se um chá de ação sudorífica. Além do mais, as plantas do gênero possuem uso no setor madeireiro e ornamental, como o *Jacaranda cuspidifolia* (MIRANDA, 2014).

Uma revisão sobre a composição química e atividades bioativas do gênero *Jacaranda* podem ser vistas em Gachet e Schühly (2009) onde foi observado que as espécies do gênero possuem grupos químicos em comum, mas nem sempre a mesma composição química, e que espécies diferentes promovem atividades biológicas também diferentes. O gênero *Jacaranda* é bem conhecido devido às propriedades biológicas e composição química. Diferentes classes de substâncias foram identificadas em espécies de *Jacaranda* e os principais metabólitos descritos são esteróis, triterpenos, flavonoides, fenilpropanoides, feniletanoides e quinonas (AVANCINI, 2018).

Em um estudo recente com extratos de folhas de *J. caroba* identificaram-se treze compostos fenólicos (FERRERES et al., 2013), enquanto quatro triterpenos foram isolados de folhas de *J. puberula* (ALMEIDA et al., 2014). A triagem fitoquímica de extratos de *J. caroba* e *J. decurrens* mostraram a presença de saponinas, flavonoides, taninos e

antraquinonas (somente para *J. decurrens*) e negativos para alcaloides e óleos voláteis (HERNANDES et al., 2014).

5. Inflamação

A inflamação pode ser definida como a reação do tecido vivo vascularizado à injúria local. É um processo desenvolvido em resposta a condições nocivas, como lesões nos tecidos e infecções microbianas. Como uma resposta imune essencial, a inflamação permite a remoção de estímulos prejudiciais do corpo hospedeiro e a cicatrização dos tecidos danificados (KAZEMIL et al, 2018). O termo anti-inflamatório é definido, portanto, como a capacidade de uma substância ou tratamento (natural ou sintético) em minimizar a inflamação (CHEUNG et al, 2015).

O processo inflamatório, sob determinado ponto de vista, pode ser encarado como um mecanismo de defesa do organismo e, como tal, atua destruindo (fagocitose e anticorpos), diluindo (plasma extravasado) e isolando ou sequestrando (malha de fibrina) o agente agressor, além de abrir caminho para os processos para reparar o tecido afetado (BECHARA & SZABÓ, 2006). Manter o dano sob controle é uma consequência benéfica da inflamação, mas a inflamação se torna uma complicação quando o corpo sofre de inflamação grave ou os estímulos inflamatórios são persistentes (CHEUNG et al, 2015). As lesões inflamatórias induzem a liberação de diversos mediadores sistêmicos, de citocinas e quimiocinas, que por sua vez orquestram a infiltração celular e conseqüentemente causa a resolução da resposta inflamatória e a restauração da integridade do tecido (MAIONE et al, 2016). Esses mediadores inflamatórios incluem citocinas, histamina, óxido nítrico, leucotrienos e prostaglandinas que são fatores reconhecidos pelas células imunes (macrófagos, leucócitos, neutrófilos e mastócitos) e atraídas para o local da lesão, como mostra a figura 8 (DVORAKOVA & LANDA, 2017).

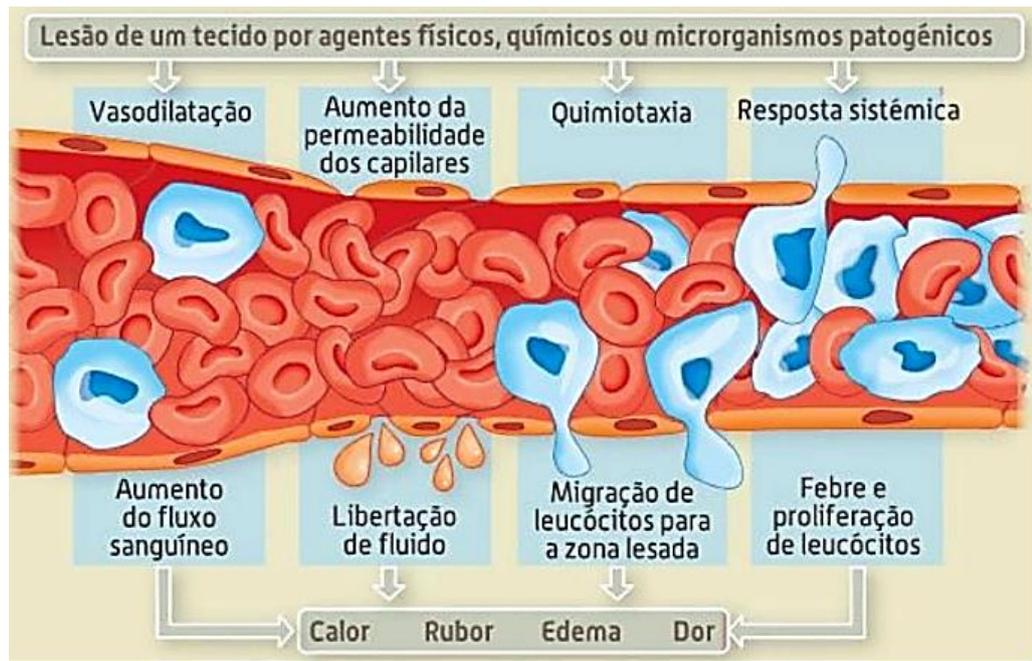


Figura 8. Resposta inflamatória: calor, rubor, edema e dor. (Disponível em: <<https://i.ytimg.com/vi/gqCIipHifqw/maxresdefault.jpg>> acesso em: 20/04/2020).

Os mediadores pré e pró-inflamatórios que são originários do exsudato e do infiltrado celular durante a inflamação, possuem grande importância terapêutica. Isto porque podem ser inibidos ou estimulados, o que permite o controle de sinais e sintomas do processo infeccioso (CHAMUSCA et al., 2012).

Citocinas como o fator de necrose tumoral α (TNF α) e interleucinas (ILs) são liberadas pelos macrófagos e reparam os danos locais. A histamina é liberada pelos mastócitos e causa vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. O óxido nítrico (NO), liberado pelas células endoteliais, difunde-se entre as células musculares lisas promovendo a vasodilatação. Prostaglandinas e leucotrienos também são sintetizados por células endoteliais a partir de fosfolipídios de membranas danificadas e promovem o aumento da dilatação e da permeabilidade dos vasos. Com o recrutamento adicional de células imunes, esses mediadores inflamatórios provocam febre, vermelhidão, edema e dor (NEWTON & DIXIT, 2012).

O óxido nítrico é um radical livre gasoso sintetizado por um grande número de células que participam de vias de resposta inflamatória variadas e pode levar à destruição proeminente do tecido quando produzido em concentrações mais altas. NOS tem três isoformas diferentes: NOS neuronal, NOS endotelial e NOS induzível. As duas primeiras formas são predominantemente sintetizadas no corpo, enquanto a última, sendo uma enzima

induzível, é abundantemente sintetizada durante uma resposta inflamatória. NOS induzível é expresso após estimulação por mediadores inflamatórios (por exemplo, TNF- α , IL-1 β) e lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) (MOLLACE et al, 2005). Níveis elevados de NO sintetizado por macrófagos durante a resposta inflamatória causam um dano oxidativo predominante. Nessas condições, os macrófagos ativados não só aumentam a produção de NO, mas também de ânions superóxidos. Além disso, o óxido nítrico (NO) também pode reagir com outros radicais livres, formando peroxinitrito altamente perigoso, que tem o potencial de oxidar diretamente lipídios de baixa densidade, causando danos irreparáveis às membranas celulares dos tecidos afetados (DAR et al, 2016).

Além disso, durante a inflamação, uma enorme quantidade de espécies reativas de oxigênio (ROS) é gerada. As ROS produzidas intracelularmente são supressores-chave da inflamação, pois iniciam a apoptose de neutrófilos. No entanto, reações inflamatórias e oxidativas prolongadas levam à inflamação crônica caracterizada por acúmulo anormal de células inflamatórias e liberação de mediadores inflamatórios juntamente com reações oxidativas tóxicas mediadas por ROS, danificando lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (DVORAKOVA & LANDA, 2017).

A inflamação está ligada ao envelhecimento, a obesidade, ao acidente vascular cerebral (AVC), a fadiga, a depressão e até mesmo as reações alérgicas. Também causa danos aos tecidos do corpo através da esclerose múltipla, artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico e outras doenças autoimunes. Nosso corpo deve sempre manter um equilíbrio entre inflamação e anti-inflamatório. A inflamação excessiva causa todas essas doenças acima citadas, contudo uma completa falta de inflamação atenua nosso sistema imunológico, o que resulta em propensão à infecção. O que será por fim fatal em ambos os casos (CHEUNG et al, 2015).

Os medicamentos anti-inflamatórios mais comuns são os anti-inflamatórios esteróides e não esteroidais (AINES), usados para tratar febre, dor e inchaço. No entanto, eles não estão livres de efeitos colaterais. Portanto, existe uma necessidade urgente de introduzir novos compostos anti-inflamatórios potentes, que sejam não tóxicos ou menos tóxicos (CHEUNG et al, 2015). Sabe-se que a eficácia e tolerabilidade dos medicamentos anti-inflamatórios e analgésicos convencionais podem ser ofuscadas, de certo modo, por seus efeitos colaterais indesejados, apesar do rápido progresso no desenvolvimento de vários tratamentos para a inflamação. Pesquisas sobre compostos naturais baseados em suas informações etnofarmacológicas forneceram contribuições significativas para o

aprimoramento de medicamentos e abriam o caminho para novas ferramentas farmacológicas (MAIONE et al, 2016).

II. JUSTIFICATIVA

Várias classes de medicamentos são usadas para tratar distúrbios inflamatórios. São drogas anti-inflamatórias biológicas, esteróides e não esteróides. No entanto, provocam efeitos adversos e, no caso de produtos biológicos, o tratamento é caro. Produtos naturais são alternativas a esses medicamentos. Eles oferecem esperança na descoberta de compostos de bioativos que podem ser desenvolvidos em agentes terapêuticos para combater distúrbios inflamatórios (CHEUNG et al, 2015). Sabe-se que o *Jacaranda ulei* é uma planta extensivamente usada na medicina popular e produz vários compostos de interesse farmacêutico. Contudo, não existem trabalhos que tenham avaliado o potencial anti-inflamatório dessa importante espécie do Cerrado brasileiro.

Assim, no presente estudo investigamos o possível efeito anti-inflamatório do extrato aquoso das folhas de *Jacaranda ulei* em células macrófago J774 para possivelmente determinar as moléculas biologicamente ativas.

Esse trabalho realizou uma triagem com 82 plantas e após um levantamento de espécies que eram utilizadas popularmente como anti-inflamatórias e que tinham poucos estudos na literatura, a espécie *Jacaranda ulei* foi selecionada para o trabalho. A triagem foi realizada por meio de uma cultura de células *in vitro*, em que buscou-se avaliar os extratos vegetais na citotoxicidade e produção de óxido nítrico. Foi também realizado um fracionamento químico para se avaliar qual o composto responsável por essa atividade, porém devido a problemas alheios essa parte ficará como perspectivas futuras do trabalho.

III. OBJETIVO

1. Objetivo Geral

O objetivo geral do presente trabalho foi avaliar os extratos vegetais do bioma Cerrado em células de macrófago J774 quanto à presença de atividade anti-inflamatória.

2. Objetivos Específicos

- Obter o extrato de *Jacaranda ulei* em quantidade suficiente para os experimentos, por meio da coleta, secagem e produção do extrato.
- Avaliar a citotoxicidade dos extratos brutos vegetais em diferentes concentrações pela determinação da viabilidade das células pelo teste do MTT.
- Avaliar a produção de óxido nítrico pelo macrófago em resposta ao tratamento com diferentes concentrações do extrato pelo método de Griess.
- Adicionalmente, avaliar a toxicidade do extrato em peixes-zebra

IV. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Coleta do material vegetal

A espécie selecionada para o estudo foi coletada e identificada pelo aluno de pós-doutorado Thiago de Roure Bandeira de Mello do Laboratório de Farmacognosia da UnB. Foram coletadas partes aéreas (folhas e o caule, o fruto foi separado para outros projetos). A planta foi coletada em 19 de fevereiro de 2020, crescendo em condições naturais, na Reserva Ecológica do IBGE, Brasília-DF, em área de cerrado típico.

Logo após a coleta, o material foi limpo, cortado em pedaços menores e seco em estufa à 40 °C.

2. Obtenção do extrato bruto

O extrato bruto obtido foi obtido do Laboratório de Farmacognosia. Após a completa secagem do material vegetal, as folhas foram separadas do caule para melhor passagem no Moinho de Facas (SL 32 da Solab).

Para realizar a produção do extrato foi usado o método de maceração em ultrassom, o solvente acetato de etila foi vertido em todo o conteúdo seco da planta triturada. O extrato foi submetido a 6 ciclos de 30 minutos, um total de 3 horas, utilizando-se o equipamento Ultrassom (Digital Ultrasonic Cleaner). A temperatura foi ajustada para 40 °C. O ultrassom por sua vez atua aumentando a penetração do solvente à matriz do soluto, através da fragmentação das membranas celulares.

Durante a maceração, a cada 1 hora, ou seja, a cada 2 ciclos de 30 minutos no Ultrassom, o extrato era filtrado com papel filtro e concentrado no Rotaevaporador. Após a completa evaporação de seus solventes, o extrato concentrado foi deixado na estufa para secagem.

3. Triagem dos extratos brutos vegetais

Foi feita uma triagem com 82 extratos brutos fornecidos pelo Laboratório de Farmacognosia da UnB (Tabela 2) em células J744 utilizando placas de 96 poços pelo método MTT.

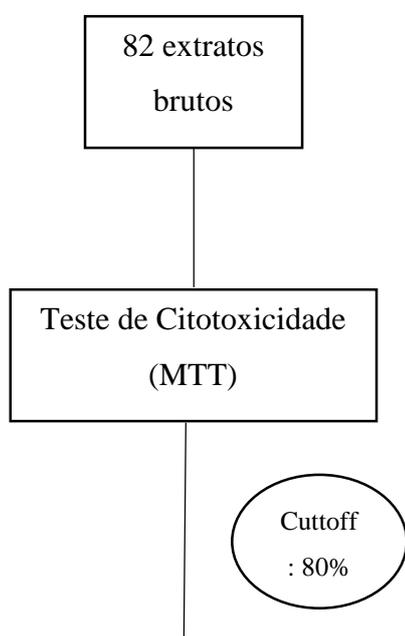
Tabela 2. Lista com os 82 extratos brutos vegetais fornecidos pelo Laboratório de Farmacognosia, com respectivas famílias, partes da planta e solventes utilizados.

Código Arbo	Familia	Espécie	Parte da planta	Solvente		
Arbo091	Apocynaceae	<i>Aspidosperma macrocarpa</i>	casca do caule	hexano		
Arbo092			casca da raiz	hexano		
Arbo093			casca da raiz	etanol		
Arbo094			madeira do caule	etanol		
Arbo095			madeira do caule	hexano		
Arbo096			casca do caule	hexano		
Arbo097			casca do caule	diclorometano		
Arbo098			casca do caule	hidroalcoolico		
Arbo099			madeira do caule	hidroalcoolico		
Arbo100			madeira do caule	diclorometano		
Arbo102			raiz (c+m)	hidroalcoolico		
Arbo103			raiz (c+m)	diclorometano		
Arbo105			folha	hidroalcoolico		
Arbo106			folha	acetato de etila		
Arbo107			folha	hexano		
Arbo191			Bignoniaceae	<i>Jacaranda ulei</i>	partes aéreas	acetato de Etila
Arbo192	partes aéreas	acetato de Etila				
Arbo193	rizoma	etanol				
Arbo194	rizoma	acetato de Etila				
Arbo195	rizoma	ciclohexano				
Arbo198	<i>Tabebuia caraiba</i>	casca da raiz		etanol		
Arbo199		madeira do caule		etanol		
Arbo200		madeira do caule		hidroalcoolico		
Arbo201		madeira do caule		etanol		
Arbo202		madeira do caule		hexano		
Arbo203		madeira do caule		hexano		
Arbo204		casca do caule		etanol		
Arbo205		casca do caule		hexano		
Arbo206		folha		etanol		
Arbo207		folha		etanol		
Arbo208		folha		hexano		
Arbo215		Burseraceae		<i>Protium heptaphyllum</i>	madeira da raiz	etanol
Arbo218					casca da raiz	etanol
Arbo219					casca do caule	etanol

Arbo221			madeira do caule	etanol		
Arbo222			folha	hexano		
Arbo223			folha	etanol		
Arbo353	Dilleniaceae	<i>Davilla elliptica</i>	folha	acetato de Etila		
Arbo354			folha	hexano		
Arbo355			madeira do caule	etanol		
Arbo357			casca do caule	hexano		
Arbo371	Euphorbiaceae	<i>Croton goyazensis (90)</i>	raiz (c+m)	etanol		
Arbo373			partes aéreas	etanol		
Arbo374			partes aéreas	acetato de Etila		
Arbo434	Flacourtiaceae	<i>Casearia sylvestris var. lingua</i>	madeira da raiz	hexano		
Arbo535	Mimosaceae	<i>Plathymenia reticulata</i>	casca do caule	hexano		
Arbo536			casca do caule	etanol		
Arbo537			madeira do caule	acetato de Etila		
Arbo538			madeira da raiz	hexano		
Arbo540		<i>Stryphnodendron adstringens</i>	folha	acetato de Etila		
Arbo541			folha	hexano		
Arbo542			folha	diclorometano		
Arbo544			casca do caule	hidroalcoólico		
Arbo545			casca do caule	hexano		
Arbo546			casca do caule	diclorometano		
Arbo549			casca da raiz	hexano		
Arbo618			Rubiaceae	<i>Palicourea rigida</i>	raiz (c+m)	diclorometano
Arbo619					raiz (c+m)	hidroalcoólico
Arbo621	partes aéreas	hexano				
Arbo622	partes aéreas	etanol				
Arbo631	Rutaceae	<i>Spiranthera odoratissima</i>	folha	hexano		
Arbo632			folha	acetato de Etila		
Arbo633			folha	etanol		
Arbo634			raiz (c+m)	hexano		
Arbo635			raiz (c+m)	etanol		
Arbo636			raiz (c+m)	acetato de Etila		
Arbo637			raiz (c+m)	acetato de Etila		
Arbo638			fruto	hexano		
Arbo659	Sapindaceae	<i>Cupania vernalis</i>	casca do caule	hexano		
Arbo660			casca do caule	etanol		
Arbo661			madeiro do caule	hexano		
Arbo662			madeira do caule	etanol		
Arbo663			madeira da raiz	hexano		
Arbo664			madeira da raiz	etanol		
Arbo665			casca da raiz	etanol		
Arbo667			raiz (c+m)	etanol		
Arbo668			folha	etanol		

Arbo693	Sapindaceae	<i>Serjania lethalis</i>	Casca do caule	etanol
Arbo694			folha	hexano
Arbo695			folha	etanol
Arbo696			Madeira do caule	etanol
Arbo699			casca da raiz	etanol

Fluxograma da seleção do extrato para o projeto:



O Teste de citotoxicidade selecionou os extratos vegetais mais promissores, considerando um cutoff de viabilidade de 80% de inibição. Os extratos escolhidos foram submetidos posteriormente ao Teste do Óxido Nítrico.

4. Cultura de células *in vitro*

Para os experimentos deste trabalho, foi utilizada a linhagem celular J774. A escolha das células de linhagem J774 nos ensaios foi baseada na premissa que tais células é parte de um dos modelos *in vitro* mais aceitos para a seleção de drogas anti-inflamatórias. Células de linhagem J774 oriundas de tumor em camundongos fêmeas BALB/C foram cultivadas em meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado com 10% de

soro bovino fetal inativado (GIBCO), 50 UI/ml de penicilina, 50µg/ml de estreptomicina estando prontas para serem utilizadas nos ensaios (Almeida, 2014).

As células foram mantidas em nitrogênio líquido (criopreservação) em solução de congelamento contendo 5% de dimetilsulfóxido (DMSO) e 22% de Soro Fetal Bovino (SFB). Para os ensaios de estimulação *in vitro*, as células foram descongeladas em banho maria a 37°C e transferidas para frasco de 75 cm² contendo meio DMEM suplementado com SFB.

As culturas foram mantidas em estufa a 37 °C, numa atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. O crescimento celular foi avaliado a cada 24 horas, utilizando-se microscópio invertido de fase. Repiques semanais para o estabelecimento da cultura celular foram realizados.

A linhagem celular utilizada neste estudo foi adquirida do banco de células do Instituto Adolfo Lutz (São Paulo - SP). As características dessas linhagens e orientações de cultivo estão descritas pela *American Type Culture Collection* ATCC® específicas para cada linhagem celular, e foram seguidas neste estudo.

5. Teste de Citotoxicidade (MTT) utilizando células J774

Os estudos de citotoxicidade foram realizados no Laboratório Interdisciplinar de Biociências (LabIBC) da Universidade de Brasília. Os extratos foram cultivados em células J774 em meio DMEM suplementado com 10% de SFB. As culturas foram mantidas em incubadora a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂ até atingirem confluência de 80-100%. A contagem de células foi feita utilizando um contador de células automatizado e a porcentagem de células viáveis foi calculada para a diluição.

A avaliação da citotoxicidade dos extratos foi feita pela redução do MTT (tetrazólio de metiltiazol), um sal de coloração amarela e solúvel em água a formazan, sal de coloração arroxeadada e insolúvel em água. (MOSMANN, 1983). A viabilidade é portanto, quantificada pela redução do MTT, pela atividade metabólica celular ligada ao NADH e NADHP, a formazan. O formazan é impermeável para as membranas celulares, desta forma, ele se acumula nas células saudáveis, e pode ser quantificado por espectrofotometria (BOCHNIE et al, 2016).

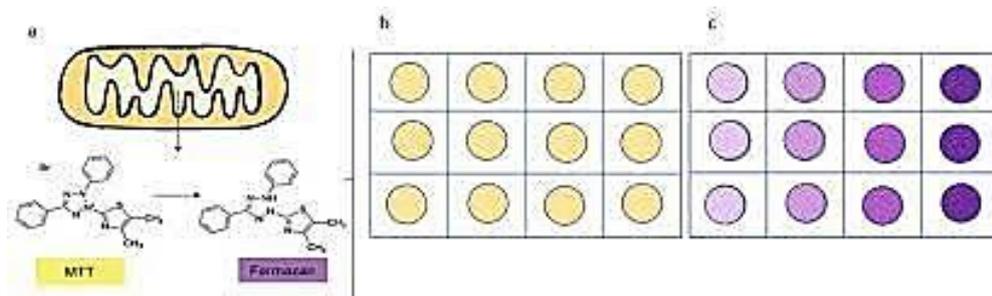


Figura 9. Redução do MTT, coloração do amarelo (MTT) ao arroxeadado (Formazan). Adaptado de SANTOS, 2019.

O teste foi realizado em placa de 96 poços, com 150.000 células viáveis por poço. Os extratos foram diluídos em DMSO e foram testados em triplicata, nas concentrações: 6,25 $\mu\text{g/mL}$, 12,5 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$ e 200 $\mu\text{g/mL}$ de *J. ulei*; os extratos brutos iniciais estavam na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$, concentração determinada conforme experimentos anteriores de NO em extratos brutos de plantas do cerrado (MESQUITA, 2009). As placas foram incubadas por 24h. Após esse período, foi retirado o sobrenadante dos poços e aplicou-se a solução de MTT a uma concentração de 5 mg/mL , previamente preparada, a placa foi novamente incubada por 3h30min. Após o período de incubação, retirou-se a solução de MTT e foi adicionado SDS 10%, , por fim, as placas foram novamente incubadas durante 30 min. Após o término do período de incubação, as placas foram lidas em espectrofotômetro a 570 nm. Os resultados da triagem citotóxica são expressos pela porcentagem (%) de inibição da proliferação celular ocasionada por cada extrato nas culturas celulares.

6. Teste do Óxido Nítrico (NO)

Para avaliar o efeito anti-inflamatório, as amostras foram analisadas quanto a produção de óxido nítrico, 10^5 células da linhagem J774 foram incubadas em placa de 96 poços por 24h. O experimento foi realizado em triplicata. Como controle positivo foi utilizado o LPS 1 $\mu\text{g/mL}$. A produção de óxido nítrico foi quantificada no sobrenadante das células pela reação de Griess (100 μL do reagente de Griess – [NEED 0,1% e sulfanilamida a 1% em H₃PO₄ a 5%] com 100 μL do sobrenadante da amostra).

A leitura foi feita em espectrofotômetro em 540 nm. A curva padrão de óxido nítrico foi feita pela a diluição seriada de nitrito de sódio (NaNO₂). A diluição iniciou com 200 μM , seguido das diluições com 50 μM , 25 μM , 12,5 μM , 6,25 μM , 3,125 μM e 1,56 μM em água

destilada. Para o valor zero, foi utilizado apenas água destilada. As leituras da curva padrão e dos testes foram feitas ao mesmo tempo.

7. Fracionamento do extrato Bruto

7.1 Fracionamento em Fase Sólida (SPE-Diol)

O pré-fracionamento do extrato bruto selecionado foi conforme POP0013 – Pré-fracionamento das amostras em SPE. Para tanto, foram pesados, aproximadamente, 100 mg de cada extrato. Cada extrato foi fracionado em 6 pré-frações, conforme o seguinte gradiente: Fração A – hexano; Fração B – Acetato de etila; Fração C – Metanol.

Para o cálculo do rendimento das frações, considerou-se 100% o peso inicial da coluna de sílica 104,3mg e do diol 105,2mg para o extrato de acetato de etila das partes aéreas de *Jacaranda ulei*. E do extrato etanólico das folhas de *Tabebuia caraiba*, o peso correspondente a 100% foi de 106mg de sílica e 104,4mg de diol. O cálculo do rendimento foi realizado pela porcentagem de cada fração pesada.

7.1.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A técnica de cromatografia em camada delgada (CCD) foi utilizada para acompanhar o fracionamento e permitir a reunião de frações segundo o perfil observado na cromatografia. Foram utilizadas placas de CCD sílica gel 60 de 0,20 mm de espessura com indicador de fluorescência UV 254 (Macherey-Nagel®). As placas foram acompanhadas pela fluorescência quando expostas a luz ultravioleta e reveladas com vanilina sulfúrica.

7.1.2 Cromatografia em Coluna Aberta de Sílica

O extrato bruto selecionado foi fracionado em coluna aberta de sílica gel 60 (Vetec®, 70-230 mesh), utilizando a proporção de 1 g de extrato bruto para cada 20 g de sílica. Como fase móvel foram utilizados gradientes dos solventes hexano, acetato de etila e metanol. As frações obtidas foram reunidas segundo o perfil em cromatografia em camada delgada (CCD).

A cromatografia em coluna (CC) foi realizada em sílica-gel de fase normal, e a fase móvel foi hexano: acetato de etila: metanol nas proporções mostradas na tabela abaixo (Tabela 3).

Tabela 3: Coluna Cromatográfica Aberta: Frações e proporção dos solventes em mL.

Solventes	Proporção	Numeração das Frações
Hexano: Acetato	1%	1 a 14
	3%	15 a 22
	5%	23 a 39
	10%	40 a 50
	15%	51 a 56
	30%	57 a 59
Acetato de etila	100%	60 a 63
Acetato de etila: Metanol	1%	64 a 69
	5%	70 a 72
	20%	73 e 74

8. Sistema de cultivo e obtenção dos embriões de peixe-zebra

Os embriões do peixe-zebra utilizados nos presentes testes de embriotoxicidade foram fornecidos pelo sistema de cultivo do laboratório de Genética Toxicológica (G-Tox) da Universidade de Brasília - UnB, onde os peixes adultos são mantidos em um sistema recirculante de água automatizado, abastecido com água filtrada por carvão ativado e aerada para eliminação de cloro (ZebTec, Tecniplast, Itália). As características físicas e químicas do sistema são mantidas em: pH 7,2 - 7,6; dureza 6.7° dH; temperatura de 26 ± 1 °C; condutividade 728 µS. A sala de aquários dispõe de um fotoperíodo de 12 h de luz e 12 h de escuro. Os peixes são alimentados de duas a três vezes ao dia com a ração comercial (SERAVipan©; Tetramin©) e alimentação viva (nauplii de *Artemia salina*).

Para a obtenção de embriões, grupos de peixes machos e fêmeas, na proporção de 2:1, respectivamente, foram colocados em um aquário de reprodução (iSpawn-Tecniplast, Itália), no dia anterior ao teste, separados por uma barreira. O fundo do aquário de desova é equipado com uma rede para evitar a predação dos embriões pelos adultos. No dia posterior à preparação do aquário de reprodução a barreira foi retirada pela manhã cinco minutos antes das luzes da sala de cultivo acenderem, permitindo, assim, o contato entre os peixes machos e fêmeas e, conseqüentemente, a desova. Foi respeitado o intervalo de desova entre 30 - 120 min e posteriormente os peixes adultos foram recolhidos e devolvidos para o sistema de

cultivo. A água dos aquários foi filtrada por uma peneira para a separação dos ovos, os quais foram lavados para remoção de restos de fezes e alimento. Posteriormente foi feita uma primeira triagem dos ovos viáveis a olho nu, seguida de uma seleção criteriosa dos ovos fertilizados ao estereomicroscópio (Sterioscopic STEMI 2000 - Zeiss). Por fim, esses foram distribuídos, um ovo por poço, em microplacas de 96 poços, contendo as diferentes soluções teste.

8.1 Testes de toxicidade com embriões de peixe zebra (FET)

Os ensaios com embriões foram baseados no protocolo para avaliação de toxicidade da OCDE: *Fish Embryo Toxicity – FET test* – (OECD nº 236, 2013). Após o recolhimento dos ovos dos aquários de coleta de embriões, os mesmos foram lavados e distribuídos imediatamente em microplacas com “soluções teste” para garantir o início da exposição nos estágios iniciais. A exposição foi realizada em microplacas de 96 poços com 250 ul de cada concentração. Os testes foram condicionados em uma câmara climática com condições idênticas a sala de cultivo. As soluções testes foram preparadas com a água de cultivo de peixe-zebra (características físicas e químicas previamente descritas). Todos os testes foram feitos em triplicata com um total de 60 organismos por poço. A duração dos testes foi de 96 h (design do teste – Figura 9).

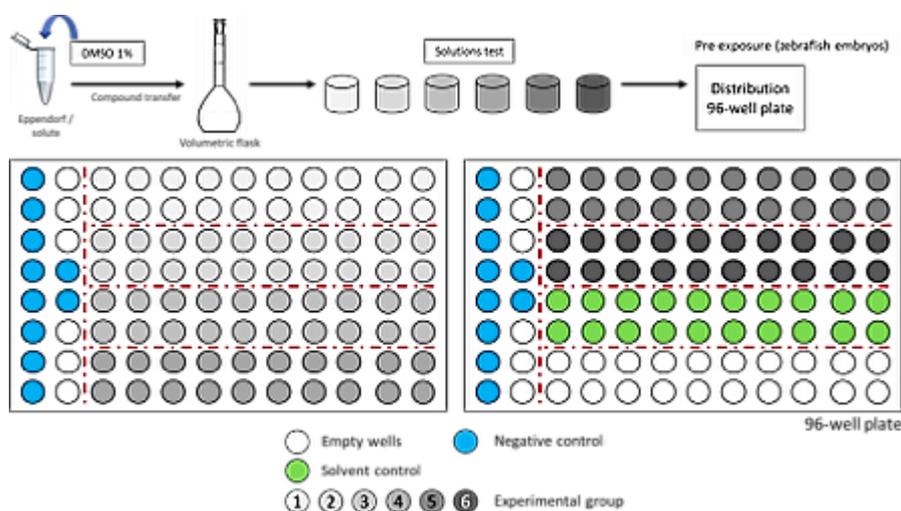


Figura 10. Design experimental do teste de embriotoxicidade utilizando o peixe-zebra como organismo modelo. Soluções testadas: ArboS187; Arbo21A085C; ArboBR3212; ArboBR191; Arbo20A29PR; Arbo21A018G; Formulação F1C. O experimento foi realizado em placas de 96 poços, um embrião por poço em 250uL das diferentes concentrações. O experimento foi realizado em triplicata e o tempo total de exposição foi de 96 h. 1-6 grupo experimental, verde: controle solvente (DMSO 1%); azul: controle negativo. Vale destacar

que foram realizados bioensaios para avaliar a influência da volatilização das seguintes substâncias: F1C e ArboS187. A mesma metodologia foi empregada para a realização dos referidos testes, entretanto, houve a substituição das microplacas de 96 poços pelos *vials* com tampas.

Na fase de embrião foi avaliada a mortalidade antes e após a eclosão (coagulação dos ovos e morte de embriões). Ademais, foram avaliadas alterações em parâmetros de desenvolvimento embrionário como: formação do otólito, pigmentação do corpo e olhos, formação dos somitos, presença de batimento cardíaco, separação da cauda do saco vitelino, edema, acúmulo de hemácias, líquido amniótico, absorção do saco vitelino, formação do telencéfalo e eclosão. Após a eclosão foram avaliados: pigmentação do corpo e olhos, batimento cardíaco, edema, acúmulo de hemácias, absorção do saco vitelino, inflação da bexiga natatória, malformações da cauda, resposta ao estímulo mecânico (equilíbrio, definido como o embrião deitado lateralmente no fundo do poço da microplaca).

9. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada através da Análise de Variância (ANOVA) de acordo com o programa *GraphPad Prism* versão 7.0 (*GraphPad Software*, San Diego, Califórnia, USA). Sendo consideradas diferenças estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

O pacote estatístico Sigma Plot 12.5 foi utilizado para análises estatísticas em peixes-zebra. As concentrações efetivas (CE_{50}) foram calculadas usando uma função de decaimento alostérico não linear em uma planilha construída sobre o Microsoft Excel. A ANOVA unidirecional foi utilizada para detectar as diferenças entre os grupos para os conjuntos de dados normalmente distribuídos. Quando os dados não passam no teste de normalidade de *Kolmogorov-Smirnov* e o teste de homogeneidade de variância de *Levene*, o teste de *Kruskal-Wallis* foi utilizado. O teste de *Dunnett* ou *Dunn* (para testes paramétricos ou não paramétricos, respectivamente) foi utilizado para detectar diferenças significativas entre as concentrações testadas e o controle ($p < 0,05$).

V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Resultado do screening inicial com diferentes extratos

1.1 Teste de Citotoxicidade (MTT) - Todos os extratos

Foi avaliada a viabilidade celular em todos os extratos de plantas do projeto (Figura 10). Dentre os 82 extratos apenas 21 (25,60%) apresentaram o efeito desejado. Houve similaridade destes extratos quanto à família vegetal, muitos deles eram da mesma espécie. Os extratos foram selecionados por apresentarem baixa citotoxicidade, ou seja, viabilidade celular acima de 80% ($p < 0,05$), conforme tabela a seguir:

Tabela 4. Identificação das espécies viáveis pelo método MTT.

Código	Espécie	Viabilidade Celular
Arbo619	Extrato hidroalcoólico da <i>Palicourea rigida</i>	81,76%
Arbo665	Extrato etanólico da casca da raiz de <i>Cupania vernalis</i>	95,99%
Arbo541	Extrato hexânico das folhas de <i>Stryphnodendron adstringens</i>	81,94%
Arbo538	Extrato hexânico da madeira da raiz de <i>Plathymenia reticulata</i>	81,41%
Arbo374	Extrato em acetato de etila das partes aéreas do <i>Croton goyazensis</i>	81,94%
Arbo373	Extrato etanólico das partes aéreas do <i>Croton goyazensis</i>	86,88%
Arbo222	Extrato hexânico das folhas de <i>Protium heptaphyllum</i>	89,80%
Arbo218	Extrato etanólico da casca da raiz de <i>Protium heptaphyllum</i>	104,66%
Arbo207	Extrato etanólico das folhas de <i>Tabebuia caraiba</i>	96,79%
Arbo206	Extrato etanólico das folhas de <i>Tabebuia caraiba</i>	104,00%
Arbo204	Extrato etanólico da casca do caule de <i>Tabebuia caraiba</i>	92,55%
Arbo202	Extrato hexânico da madeira do caule de <i>Tabebuia caraiba</i>	88,41%
Arbo205	Extrato hexânico da casca do caule de <i>Tabebuia caraiba</i>	87,33%
Arbo203	Extrato hexânico da madeira do caule de <i>Tabebuia caraiba</i>	83,02%
Arbo199	Extrato etanólico da madeira do caule de <i>Tabebuia caraiba</i>	89,80%
Arbo191	Extrato em acetato de etila de partes aéreas de <i>Jacaranda ulei</i>	93,35%
Arbo107	Extrato hexânico da folha de <i>Aspidosperma macrocarpa</i>	121,88%
Arbo105	Extrato hidroalcoólico da folha de <i>Aspidosperma macrocarpa</i>	97,87%
Arbo106	Extrato em acetato de etila da folha de <i>Aspidosperma macrocarpa</i>	113,18%
Arbo97	Extrato em diclorometano da casca do caule de <i>A. macrocarpa</i>	83,54%

Arbo96	Extrato hexânico da casca do caule de <i>Aspidosperma macrocarpa</i>	102,01%
--------	--	---------

Citotoxicidade em células J774 após 24h

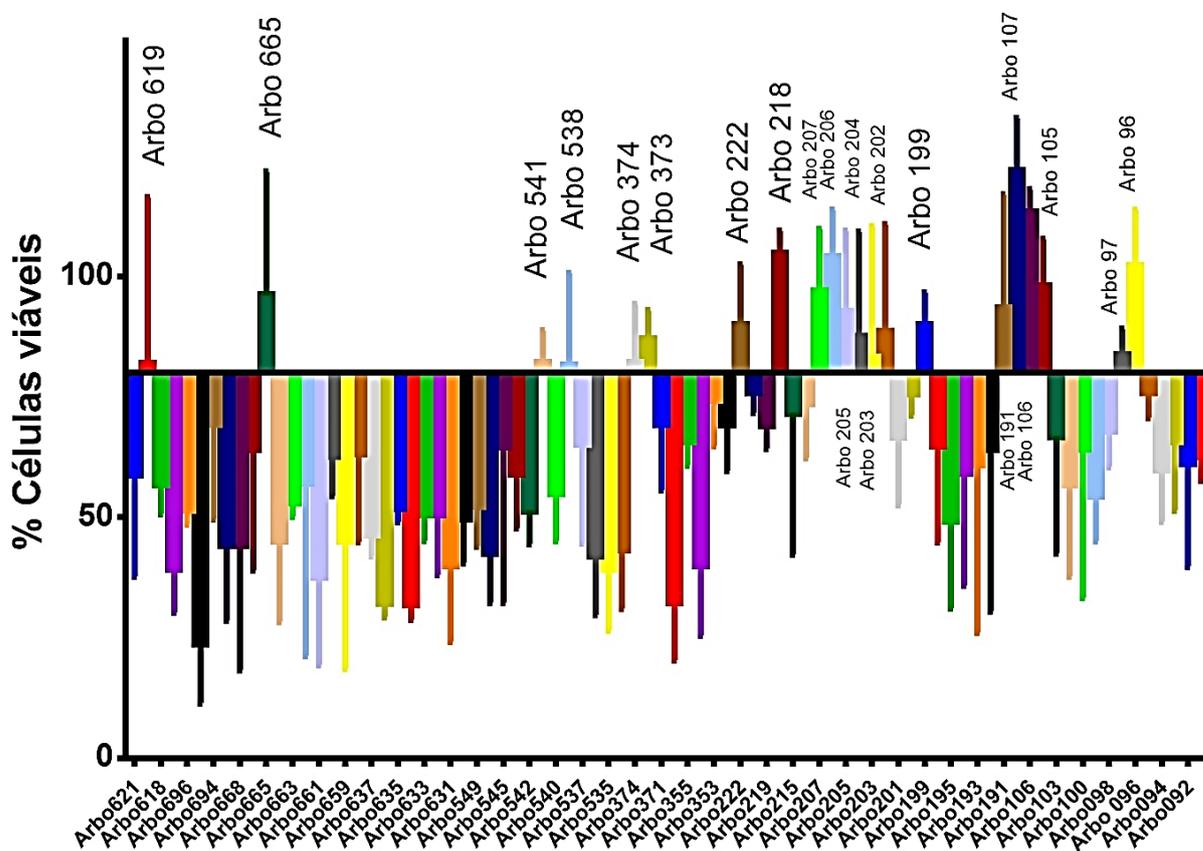


Figura 11. Ensaio da viabilidade celular utilizando células J774. (1×10^5 células / 200 μL /poço) foram cultivadas em placas de 96 poços a 37 °C e 5% de CO_2 durante 24 horas e tratadas com 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ do extrato aquoso de *Jacaranda ulei* por 24 horas. (Teste ANOVA, $p < 0,05$).

Nota-se na Figura 10 que a maioria dos extratos reduziram a viabilidade celular na linhagem de células J774. Dados de citotoxicidade são importantes em experimentos *in vitro* para triagem de compostos com atividade biológica. Nestes estudos de compostos, têm-se encontrado uma razoável correlação entre citotoxicidade celular e toxicidade aguda em animais e humanos (CELMER, 2010).

Foi avaliado por SANTOS (2014) a citotoxicidade de cinquenta e cinco extratos de plantas do cerrado e foram selecionados os extratos que induziram a inibição da viabilidade celular ($\leq 50\%$). Com esse critério, 14 dentre os 55 extratos analisados (26%) apresentaram o

efeito de citotoxicidade desejado. O estudo em questão verificou a atividade antitumoral em linhagem celular de Feocromocitoma.

Os demais extratos avaliados que apresentaram citotoxicidade maior que 80%, não atendendo aos nossos critérios estabelecidos nesta pesquisa, não devem ter sua atividade anti-inflamatória descartada, podendo ser objeto de pesquisa futura. Pois podem apresentar esta atividade em outras linhagens celulares, como a linhagem celular *macrophage-like* RAW 264.7 frequentemente usada para avaliar atividade biológica de extratos naturais (MERLY, 2017).

1.2 Óxido Nítrico – extratos selecionados pelo MTT

A produção de NO foi quantificada em sobrenadantes de culturas de células J774 por meio do método de Griess. Os extratos selecionados do teste de viabilidade celular foram avaliados e os que apresentaram efeito inflamatório $\geq 70\%$ comparado ao LPS (controle positivo) foram excluídos da pesquisa. Dentre os 21 extratos brutos selecionados no teste de citotoxicidade (tabela 5), 2 deles foram excluídos após os testes de óxido nítrico, o extrato etanólico da casca da raiz de *Protium heptaphyllum* (Arbo218) e o extrato etanólico da casca da raiz de *Cupania vernalis* (Arbo665) (Figura 11).

O estímulo com LPS induz a produção de óxido nítrico, pela enzima óxido nítrico sintetase induzível (*iNOS*). O óxido nítrico é reconhecido como um mediador de respostas inflamatórias. Portanto, os extratos que apresentam atividade capaz de reduzir esta produção podem possuir atividade anti-inflamatória (HONG *et al.*, 2014). O que foi compatível com a grande maioria dos extratos analisados, que diminuíram significativamente a produção de óxido nítrico. Esses extratos podem indicar atividade anti-inflamatória e ser alvo para formulação de fármacos. Nem todos os estudos com extratos de plantas apresentam resultados satisfatórios quanto ao Óxido Nítrico, como é o caso de SILVA (2019), que estudou o extrato aquoso das folhas da *Eugenia dysenterica*, porém não houve indução da produção de NO em células RAW 264.7 tratadas com o extrato.

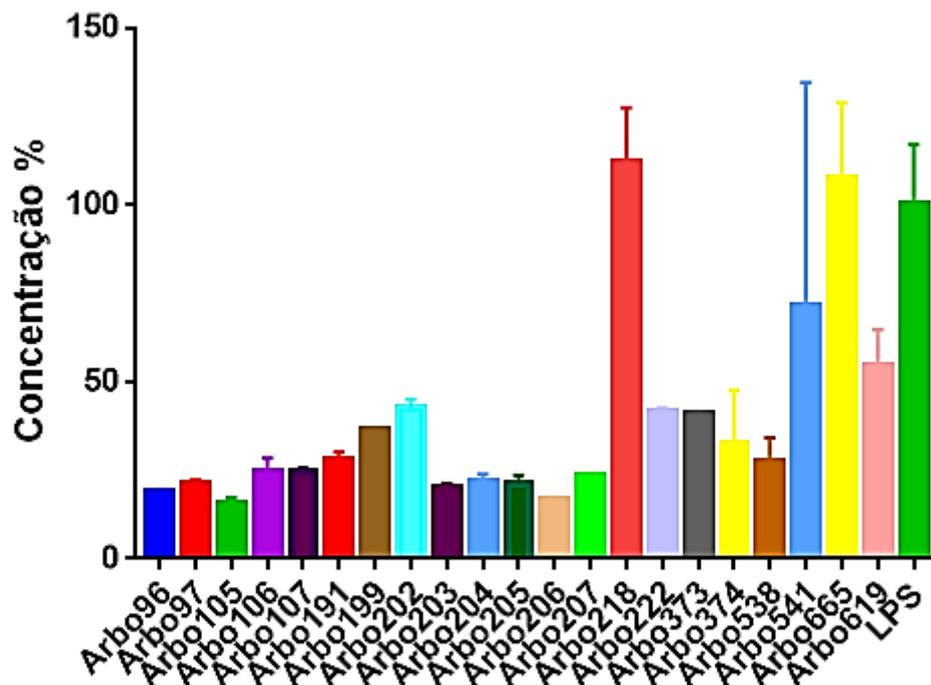


Figura 12. Produção de óxido nítrico (NO) em células J774 tratadas com extrato aquoso de *Jacaranda ulei*. (1×10^5 células/200 μ L/poço) foram cultivadas em placas de 96 poços durante 24 horas e tratadas com 50 μ g/mL do extrato *Jacaranda ulei*, ou com LPS (1 μ g/mL). (Teste ANOVA, $p < 0,05$).

2. Resultado das frações obtidas por SPE-Diol

Após pesquisas na literatura em bases de dados como PUBMED, Scielo, Science Direct e CAPES, os extratos foram selecionados utilizando-se como critério aqueles que apresentaram pouco ou nenhum estudo envolvendo extratos anti-inflamatórios. As espécies selecionadas para o fracionamento foram: extrato de acetato de etila das partes aéreas de *Jacaranda ulei*, extrato etanólico das folhas de *Tabebuia caraiba* e extrato etanólico/acetato de etila das partes aéreas do *Croton goyazensis*.

2.1 Rendimento das Frações

Ao realizar a extração em fase sólida dos extratos foi calculado o rendimento de cada fração obtida (Tabela 5): O cálculo dos rendimentos foi realizado considerando 100% os

pesos medidos para o Arbo191 na coluna de sílica 104,3mg e de diol 105,2mg. E para o Arbo206 na sílica 106mg e no diol 104,4mg.

Tabela 5. Rendimentos para os solventes Hexano, Acetato e Metanol.

Tabela Rendimentos - Frações				
Fração	Peso (mg)		Rendimento (%)	
	Diol	Sílica	Diol	Sílica
	HEXANO			
Arbo191	3,900	2,200	3,700	2,100
Arbo206	3,700	2,100	3,540	1,980
	ACETATO			
Arbo191	62,400	49,600	59,310	47,550
Arbo206	41,100	29,300	39,360	27,640
	METANOL			
Arbo191	29,800	40,700	28,320	39,020
Arbo206	60,400	114,500	57,850	108,100

Os rendimentos do extrato em acetato de etila de partes aéreas de *Jacaranda ulei* que apresentaram melhores resultados foram com o solvente acetato, com porcentagens de 59,31 % e 47,55 %. Os resultados apresentaram valores superiores aos demais solventes analisados. Na literatura foram encontrados relatos de teores variáveis, dependendo da espécie e da parte da planta testada. Um dos fatores que pode influenciar significativamente nos rendimentos dos extratos obtidos são os solventes utilizados, como: água, metanol, etanol, acetona, soluções aquosas e acetato de etila. (FRANZEN et al, 2018). O solvente utilizado e a polaridade podem afetar a transferência de elétrons e de átomos de hidrogênio, que é aspecto-chave na extração de polifenóis, por exemplo (OLIVEIRA et al, 2016). HAYOUNI (2007) relatou em diversos extratos de frutos de *J. phoenicea L.* e *Q. coccifera L.* que os solventes mais eficientes para extração de polifenóis foram os solventes polares, como: acetona / eau / ácido acético (95 / 4,5 / 0,5), acetato de etila / metanol / água (60/30/10) e água. Além disso, GRÜNER et al., (2012) ao realizar extratos aquoso e metanólico das folhas de erva-de-passarinho (*Tripodanthus acutifolius*) obtidos através da técnica de maceração, por um período de 24 horas, foram obtidos rendimentos dos extratos de 30 g de extrato aquoso bruto (rendimento de 30%), e 20 g de extrato metanólico bruto (rendimento de 20%).

2.2. Teste de Citotoxicidade (MTT) – Frações dos extratos

Todas as frações obtidas do extrato acetato de etila das partes aéreas de *Jacaranda ulei* foram consideradas viáveis, as frações com o solvente metanol na coluna de sílica - ARBO191 M (S) - e hexano em diol - Arbo191 H (D) apresentaram ligeira diminuição na viabilidade celular, mas não foi estaticamente significativo (Figura 12).

Os demais extratos de *Tabebuia caraiba* e *Croton goyazensis*, algumas frações tiveram ótimos desempenho de viabilidade celular, como da *Tabebuia caraiba* dissolvido em acetato de etila na coluna de sílica - ARBO206 A (S) - e do *Croton goyazensis* dissolvido em acetato na coluna de diol - ARBO374 A (D). Algumas frações foram consideradas mais citotóxicas, como ARBO206 H (S) da *Tabebuia caraiba* e o ARBO373 A (D), ARBO373 M (D) e ARBO374 do *Croton goyazensis*, mas não houve diferença estatística.

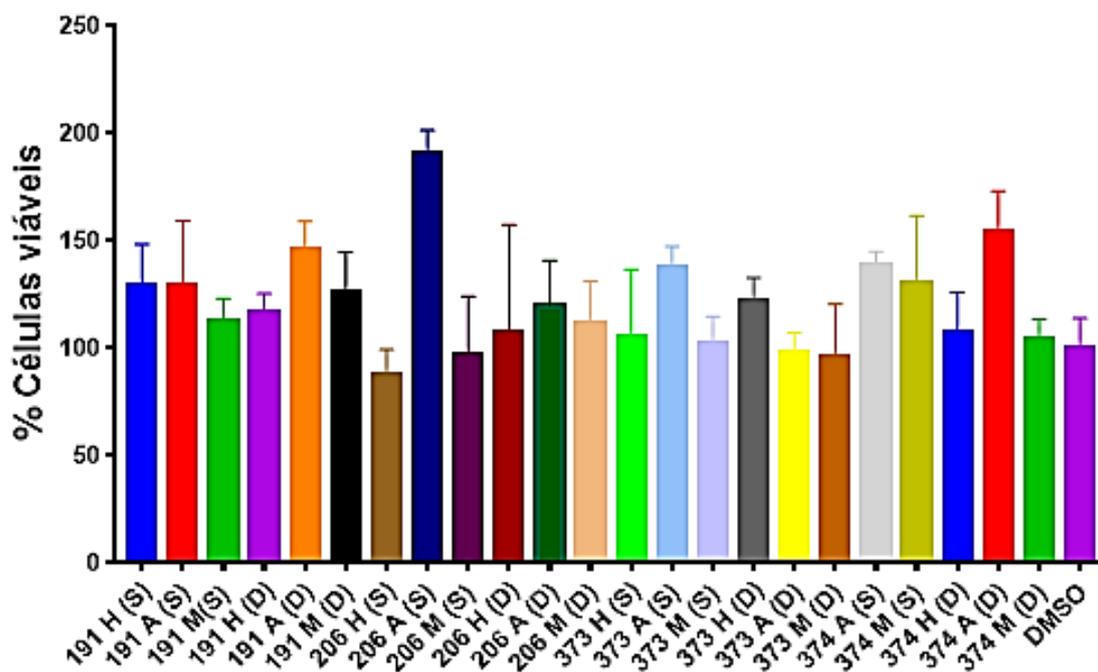


Figura 13. Ensaio da viabilidade celular – Frações do extrato. (1×10^5 células / 200 μL /poço) foram cultivadas em placas de 96 poços durante 24 horas e tratadas com 50 $\mu\text{g/mL}$ das frações dos extratos de *Jacaranda ulei*, *Tabebuia caraiba* e *Croton goyazensis* por 24 horas. H = Hexano; M = Metanol; A = Acetato de etila; S = Sílica; D = Diol; Código ARBO numeração padronizada dos extratos advindos do Laboratório de Farmacognosia da UnB. A

viabilidade celular foi analisada usando o método de conversão de MTT. (Teste ANOVA, $p < 0,05$).

Outros estudos na literatura, observa-se o mesmo aumento da viabilidade celular que as frações obtidas dos extratos do cerrado. SILVA (2019) avaliou a viabilidade celular usando o método de conversão de MTT no extrato aquoso de *E. Dysenterica* que não apresentou efeitos citotóxicos sobre as células RAW 264.7. Ao contrário, os resultados obtidos sugerem efeito proliferativo dose-dependente como demonstrado pela maior viabilidade nas células tratadas com as concentrações 31,25 e 62,5 µg/ml do extrato. Embora os resultados dos testes que avaliam a citotoxicidade *in vitro* possam não ter uma correlação direta com os *in vivo*, é seguro afirmar que, se um material induz, comprovadamente, uma reação citotóxica em testes envolvendo cultura de células, é muito provável que desenvolva toxicidade quando aplicado em tecido vivo (MARTINS et al, 2009).

Quanto a *Tabebuia caraiba*, Segundo CÂMARA (2019) observa-se uma tendência prévia de que há uma concentração maior de compostos polares do que de compostos apolares nesta planta. De acordo com a diferença dos solventes utilizados, a extração da *Tabebuia caraíba* em água foi a mais efetiva, aparecendo inclusive com o maior rendimento (extrato aquoso de folhas): 15,80%. Extratos etanólicos se mostraram com rendimentos intermediários, enquanto os hexânicos apresentaram os tres piores rendimentos no geral – sendo eles folhas: 0,37%, galhos: 0,15% e cascas: 0,12%. O que explica os melhores resultados de viabilidade celular do nosso estudo nas frações do extrato etanólico das folhas de *Tabebuia caraiba* com o solvente polar acetato de etila principalmente quando comparado ao solvente hexânico.

Quanto ao *Croton goyasensis*, a fitoquímica do gênero *Croton* tem sido explorada e os estudos efetuados têm conduzido ao isolamento de compostos das classes dos alcalóides, flavonóides, triterpenóides e uma grande variedade estrutural de diterpenóides (ARRAIS, 2012). *Croton goyazensis* é uma planta pouco explorada, tanto do ponto de vista químico quanto biológico. Portanto, os estudos seja de citotoxicidade ou óxido nítrico desta espécie são importantes e contribuem para o conhecimento de uma espécie ainda inexplorada. Um artigo recente sobre a espécie do mesmo gênero, o extrato hidroetanólico da raiz de *Croton floribundus*, caracterizou cinco diterpenóides de clerodano e a estereoquímica absoluta de 1 foi estabelecida como 3R, 4R, 5R, 8R, 9R, 10S, 12S. Além do mais, foram avaliados efeitos inibitórios na produção de nitrito induzida por lipopolissacarídeo (LPS) em células de macrófago RAW 264. Porém, nas concentrações testadas, as amostras apresentaram baixa

toxicidade em macrófagos (QUEIROZ et al., 2019). Segundo ARRAIS (2012), no *Croton pulegioides* foi observada ausência de toxicidade nas doses de 2000, 3000 e 4000 mg/Kg para os três extratos testados, raiz, caule e folhas, oferecendo uma grande margem de segurança para ensaios posteriores e a atividade anti-inflamatória, testada apenas com o extrato da raiz, mostrou significativa inibição da migração celular. O *Croton goyazensis* possui portanto, interessante na busca por compostos líderes para o tratamento de doenças inflamatórias.

2.3 Teste de Óxido Nítrico (NO) – Frações dos extratos

Com as frações do extrato em acetato de etila das partes aéreas de *Jacaranda ulei* anteriormente obtidas foi também realizado o teste do Óxido Nítrico, os resultados mostraram que todas as frações do extrato, exceto a hexânica obtiveram redução maiores que 50% no nível de NO ($p < 0,05$). A fração hexânica do extrato de *J. ulei* apresentou inflamação e foi excluída do estudo.

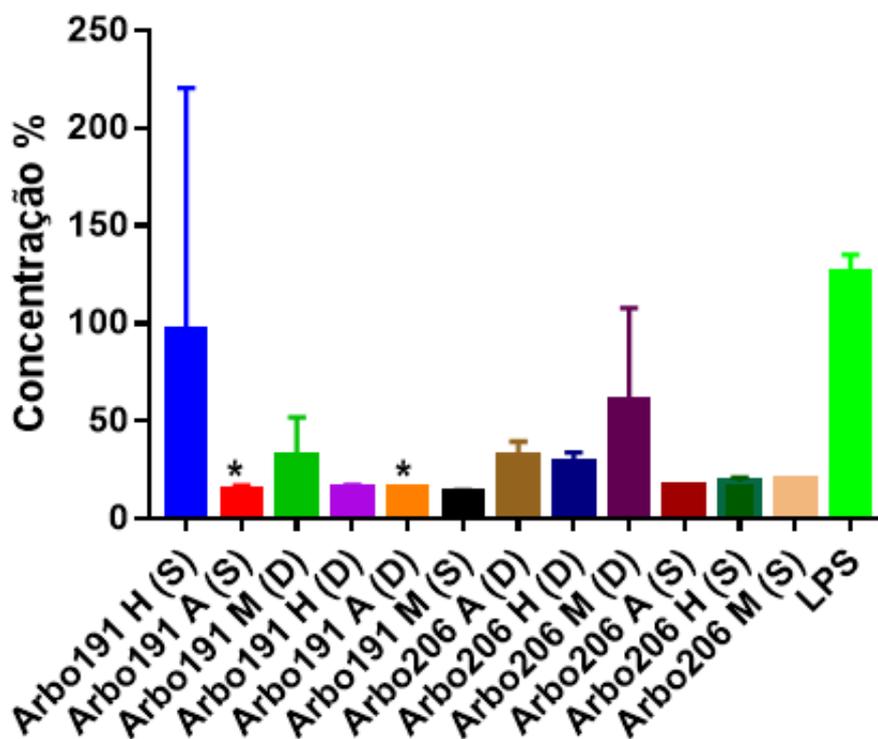


Figura 14. Produção de óxido nítrico (NO) nas frações de *Jacaranda ulei* em células J774. (1×10^5 células/200 μ L/poço) foram cultivadas em placas de 96 poços durante

24 horas e tratadas com 50 µg/mL do extrato aquoso do *Jacaranda ulei*, ou com LPS (1µg/mL). Os dados estão expressos como média ± S.E.M. de valores da concentração de NO (µM) e são representativos de experimentos realizados em triplicata. (Testes ANOVA, $p < 0,05$).

3. Resultados com o extrato bruto de *Jacaranda ulei*

3.1 Teste de Citotoxicidade – MTT

Após os testes iniciais com o extrato bruto de *Jacaranda ulei*, que apresentou sugestiva atividade contra a inflamação, foi então coletado uma maior quantidade da planta para realizar as demais análises.

O extrato em acetato de etila das partes aéreas de *Jacaranda ulei* apresentou baixa citotoxicidade, apenas em concentrações superiores a 100 µg/mL ($p < 0,05$), quando comparada àquela de células não-tratadas (controles). A maior dose do extrato utilizada (200 µg/mL) não foi suficiente para a determinação do valor da IC₅₀ (concentração do extrato citotóxica em 50% das células), já que nesta dose não obteve citotoxicidade máxima. Das seis concentrações utilizadas duas apresentaram alguma citotoxicidade para as células: 100 e 200 µg /mL (figura 14), principalmente 200 µg /mL, que diminuiu a viabilidade em 30% a partir de 100 µg/mL. Os dados obtidos sugerem que o extrato da planta *Jacaranda ulei* apresenta efeito citotóxico de modo dose-dependente.

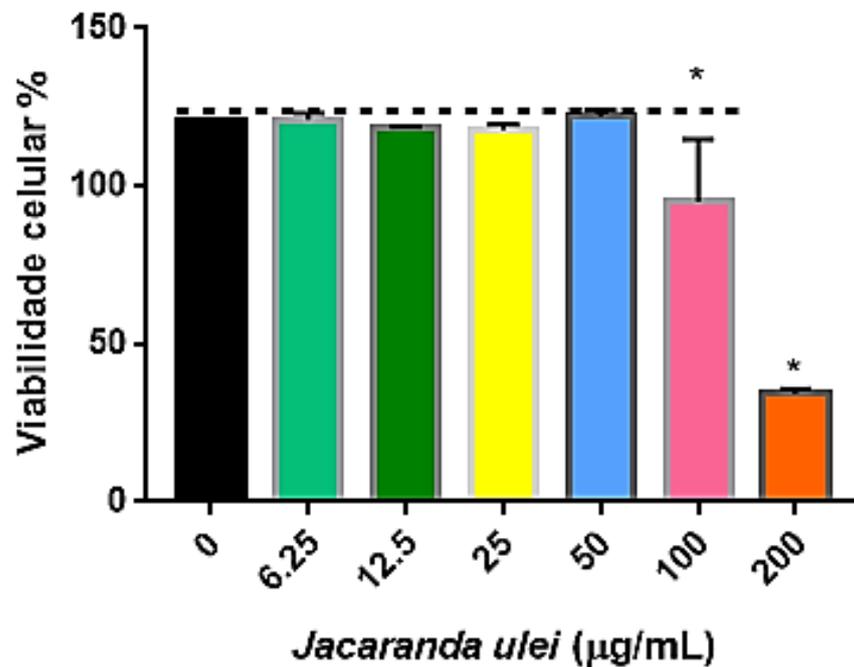


Figura 15. Ensaio de Citotoxicidade – MTT: extrato bruto de *Jacaranda ulei*. (1×10^5 células / 200 µL/poço) foram cultivadas em placas de 96 poços durante 24 horas e tratadas com diferentes concentrações: 6,25 µg/mL, 12,5 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL e 200 µg/mL do extrato aquoso de *Jacaranda ulei* por 24 horas. Células tratadas apenas com meio DMEM 10% de SFB foram utilizadas como controle positivo (100% de viabilidade). (Testes ANOVA, $p < 0,05$).

Outras pesquisas corroboram para avaliação de baixa citotoxicidade em outras espécies da família. RIBEIRO E COLABORADORES (2014) avaliaram a citotoxicidade do extrato etanólico de folhas de *J. caroba* e *J. cuspidifolia* contra macrófagos murinos não apresentando citotoxicidade. A fração derivada das folhas de *J. copaia* também foi citotóxica apenas em concentrações muito altas do extrato, o extrato apresentou citotoxicidade a partir de 100 µg/mL em células RAW 264.7 (RAMOS et al, 2011). As linhagens J774.A1 que foram testadas nos nossos experimentos, é uma linhagem de macrófagos de camundongos BALB/c (ATCC, TIB-67) de origem murina e derivada do sarcoma reticular (CELMER, 2010).

Amâncio (2019) avaliou o efeito citotóxico dos extratos etanólicos de espécies do gênero *Jacaranda* frente a linhagens de células tumorais utilizando o método colorimétrico MTT. Todas as células foram expostas a oito concentrações, variando de 400, 200, 100, 50, 25, 12,5, 6.250 e 3.125 µg/mL dos extratos etanólicos. Entre os 15 extratos testados, sete

deles apresentaram pouco efeito citotóxico contra as células utilizadas. Por outro lado, oito extratos etanólicos (folhas de *J. caroba*, folhas de *J. cuspidifolia*, caule/folhas de *J. macrantha*, folhas e frutos de *J. micrantha*, caule e folhas de *J. mimosifolia* e folhas de *J. puberula*) revelaram uma diminuição da viabilidade celular nas linhagens celulares tumorais testadas abaixo de 100 µg/mL.

3.2 Ensaio do Óxido Nítrico em células J774 tratadas com o extrato de *Jacaranda ulei*

Os resultados apresentados na figura 15, evidenciam que o extrato reduziu significativamente a produção de óxido nítrico em todas as concentrações do extrato analisadas quando comparadas à produção de NO induzida pelo estímulo com LPS. Nas concentrações de 100 e 25 µg/mL ($p < 0,05$), observou-se uma redução de NO maior que 80% em relação ao controle positivo (LPS). Portanto, em concentrações não citotóxicas, o extrato constituiu estímulo suficiente para inibir a produção de NO, das quais algumas concentrações foram mais acentuadas.

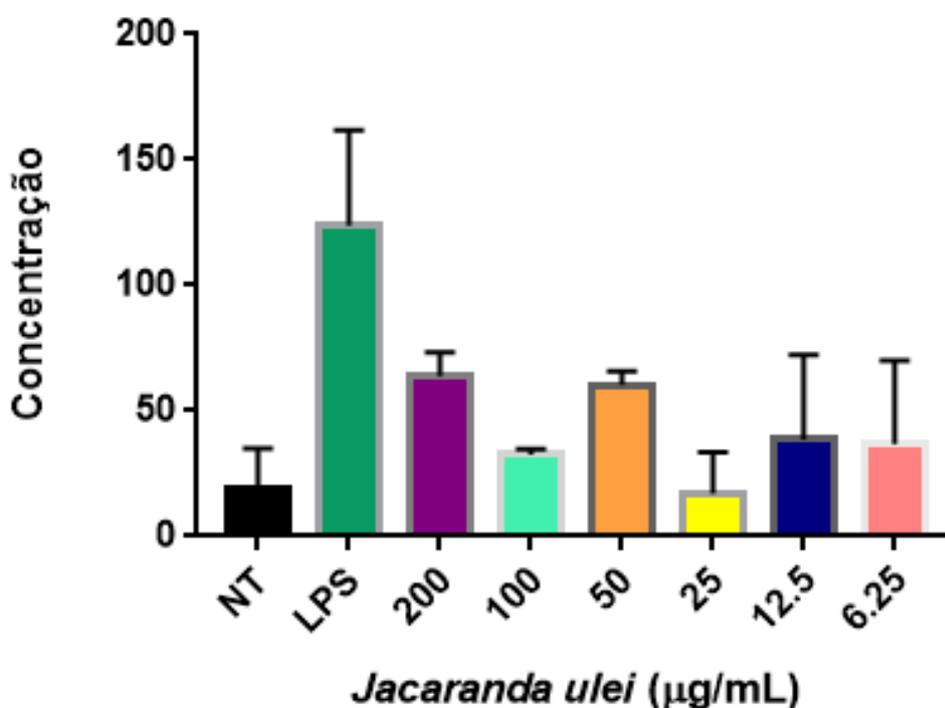


Figura 16. Produção de óxido nítrico (NO) em células J774 tratadas com extrato bruto de *Jacaranda ulei*. Células de macrófago J774 (1×10^5 células/200 µL/poço) foram

cultivadas em placas de 96 poços durante 24 horas e tratadas com diferentes concentrações do extrato de *Jacaranda ulei*, ou com LPS (1 µg/mL). O experimento foi realizado em triplicata. (Teste ANOVA, $p < 0,05$).

Embora o extrato não tenha obtido uma redução da produção de NO de forma dose-dependente, no nosso estudo mostramos que a produção de óxido nítrico aumentou consideravelmente em células tratadas com LPS (controle positivo) quando comparado com as células não estimuladas (controle negativo), esse resultado corrobora com os dados de outros estudos (KACEM et al., 2015; ZHOU R. et al., 2015; SONG et al., 2014; KIM et al., 2013). Muitos metabólitos secundários dos extratos de plantas tem a capacidade de inibir a produção de mediadores inflamatórios, como também a atividade de mensageiros secundários, fatores de transcrição e expressão das principais moléculas pró-inflamatórias (GUEDES, 2016). O que se determinou neste caso é que o extrato em acetato de etila das partes aéreas de *Jacaranda ulei* produziu uma atividade anti-inflamatória, no entanto este efeito não foi dose-dependente.

Apesar de não haver dados disponíveis na literatura que avaliem os efeitos anti-inflamatórios da espécie *Jacaranda ulei*, alguns estudos realizados com outras espécies do mesmo gênero *Jacaranda*, corroboram com os resultados encontrados. Como relatado por Ramos (2011) que avaliou o extrato bruto e as frações de *J. copaia* sobre a produção de óxido nítrico em células de macrófagos. Uma diminuição significativa na produção de NO foi observada na presença do extrato bruto de 1 µg/mL para 30 µg/mL, nesta última concentração apenas 2,3 µM de NO foi produzido, correspondendo a 66% de inibição em relação ao controle sem tratamento. A fração E1 diminuiu a produção de NO de 1 µg/mL, o efeito nas seguintes concentrações foi altamente variável, no entanto, nenhuma das concentrações testadas foi citotóxica para células RAW. A fração E2 foi a que apresentou maior inibição da produção de NO (a partir de 0,3 µg/mL), a 30 µg/mL foi produzido 0,9 µM de NO, correspondendo a 87% de inibição. Na presença de altas concentrações (100 µg/mL e 300 µg/mL) do extrato bruto e da fração E2, observou-se citotoxicidade.

Além do mais, TEOTÔNIO (2015) avaliou a atividade anti-inflamatória de extratos de *Pouteria torta* e *Pouteria ramiflora* em macrófagos RAW 264.7 inflamados com 1µg/mL de LPS. Os resultados demonstraram que nas concentrações 0,078, 0,039, 0,020 mg/mL todos os extratos testados não apresentam toxicidade e apresentaram atividade anti-inflamatória e antioxidante em células RAW 264.7 estimuladas com LPS, reduzindo em todas as concentrações os níveis de NO.

Para elucidar e investigar as possíveis vias de sinalização pelas quais os componentes ativos de *J. ulei* poderiam estar atuando, seria de grande interesse avaliar o efeito sobre outros fatores, como TNF- α , NF- κ B INF- γ e dosagem de citocinas inflamatórias e assim determinar se na presença dos compostos derivados das folhas de *J. ulei*, é realizada a supressão da cadeia inflamatória.

É necessário considerar as possíveis limitações dos ensaios aqui realizados, que dizem respeito principalmente à variabilidade intrínseca dos resultados observados com células em cultura. Entretanto, a identificação do extrato com atividade citotóxica dose-dependente e sustentada, e de seus componentes químicos principais, a partir de uma triagem inicial de 82 extratos do Cerrado, torna esse estudo útil para o seguimento de experimentos biomonitorados com os mesmos.

3.3 Cromatografia em Coluna Aberta (CC) no extrato de *Jacaranda ulei*

Foram obtidas 74 frações do extrato em acetato de etila das partes aéreas de *Jacaranda ulei* (Figura 16). Essas frações serão avaliadas em UHPLC MS/MS futuramente para anotação de prováveis compostos presentes.



Figura 17. 74 frações obtidas do extrato acetato de etila das partes aéreas de *J. ulei* da Coluna Cromatográfica Aberta.

Nunes e colaboradores (2020) realizaram um estudo recente sobre *Jacaranda ulei* que analisa a composição química e a variabilidade sazonal nos óleos voláteis das folhas durante 11 meses. Entre os compostos identificados, 2,6% eram monoterpenos oxigenados, 2,0-33,6% eram hidrocarbonetos sesquiterpênicos, 0,5-22,7% eram sesquiterpenos oxigenados e 54,7-79,7% eram outros compostos. Foi observada grande variabilidade nos compostos

químicos dos óleos voláteis. Essa variabilidade pode ser resultado de diversos fatores, como variações fisiológicas e genéticas ou das condições ambientais a que as plantas foram submetidas. Neste estudo, que foi o primeiro sobre os óleos voláteis de *Jacaranda ulei*, os principais componentes químicos dos óleos voláteis das folhas foram γ -amorfenol (1,3–27,1%), n - heneicosano (0,4–59,5%), etil hexadecanoato (0,4-8,1%), eicosano-3-fenil (0,9-18,5%), esqualeno (março - 66,4%, maio - 8,3%, agosto - 17,6%, setembro - 0,64% e novembro - 6,47%) e 9-octadecenamida (50,9% na amostra de junho). Ainda assim, se faz necessário o estudo e identificação química do extrato de *Jacaranda ulei*, já que o óleo essencial tem composição química diferente da planta. Sabendo-se, entretanto, que como no óleo essencial, pode haver também variação dos seus componentes químicos conforme a época que for coletado e as condições fisiológicas e genéticas inerentes a planta.

Na literatura têm-se pesquisas de diferentes sistemas de eluentes e reveladores seletivos para cada classe de produto natural e os resultados da prospecção fitoquímica por CCD no gênero *Jacaranda* atestam a presença de flavonóides (FERRERES et al, 2013), antraquinonas, saponinas (ARRUDA et al, 2011) e terpenos (ALMEIDA, 2014). Heterosídeos cardiotônicos também não são encontrados em Bignoniaceae (MORSY, 2017). Há relatos também de alcaloides do tipo monoterpênicos em *Jacaranda* (ARRUDA et al, 2011).

3.4 Resultado do testes de toxicidade com embriões de peixes-zebra

No ensaio em peixe zebra, foi observado que as diferentes concentrações do extrato em acetato de etila das partes aéreas de *Jacaranda ulei* se apresentaram homogêneas no momento de sua dissolução e permaneceram dessa forma até o término do teste. A Figura 17 mostra a visão geral do teste de embriotoxicidade. As concentrações testadas foram: DMSO 0.1% (controle solvente); 0 (controle negativo – água do sistema de cultivo); 6.25; 12.5; 25; 50 e 100 mg/L e o tempo total de exposição foi de 96h.

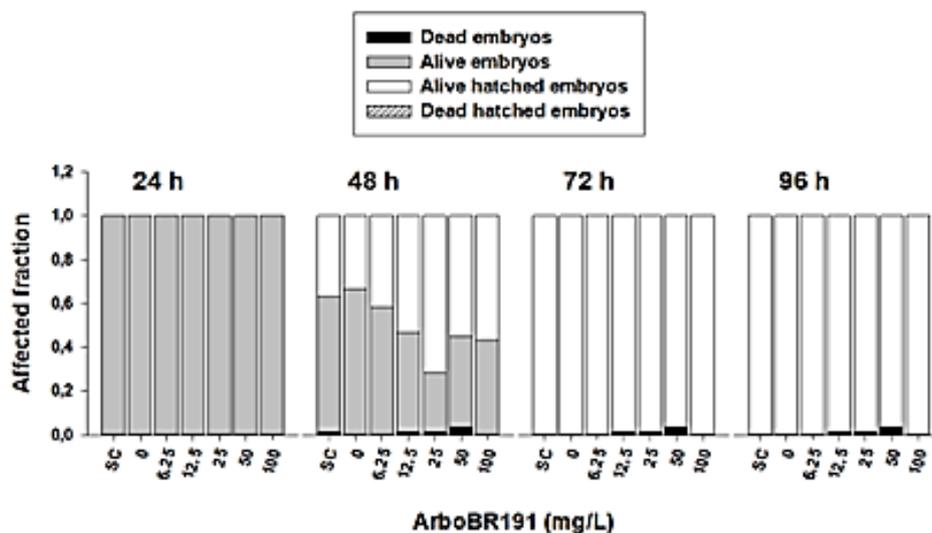


Figura 17. Gráfico “visão global” do teste de embriotoxicidade do composto Arbo191. SC: *Solvent control*.

Durante às 96 h de exposição não foram observados efeitos subletais e letais significativos para a fração do extrato bruto de *Jacaranda ulei*, Arbo191. O peixe-zebra (*Danio rerio*) é um vertebrado modelo grandemente utilizado em investigação científica em todo o mundo. Nas últimas décadas, foram desenvolvidos protocolos e técnicas que permitem o uso deste organismo na avaliação de ecotoxicidade. O peixe é um grupo taxonômico importante e tradicionalmente usado em testes de toxicidade de substâncias e efluentes individuais. Devido à crescente importância do peixe-zebra como um sistema modelo de pesquisa, é imperativo que padrões para seu manejo (nutrição, criação, bem-estar) sejam desenvolvidos para melhorar a reprodutibilidade dos experimentos e a eficiência do uso deste modelo em ambiente de pesquisa (OLVEIRA, 2009).

Técnicas *in vitro*, como cultura de células, permitem o monitoramento de respostas biológicas de forma rápida e com baixo custo (GOSH et al, 1994). Assim, o peixe-zebra é um modelo emergente para triagem de toxicidade de drogas e biomedicina. E está bem estabelecido como modelo para estudar a ecotoxicidade de solventes, metais pesados, produtos farmacêuticos e pesticidas (OLVEIRA, 2009).

Portanto, a citotoxicidade do extrato de *Jacaranda ulei* foi avaliada *in vitro* pelos métodos de MTT e em embriões de peixes-zebras, dos quais em ambos apresentou resultados de baixa citotoxicidade.

VI. CONCLUSÃO

A investigação da existência de atividade anti-inflamatória de extratos de plantas do Cerrado em linhagem de células J774 é importante para a busca de moléculas para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da Inflamação.

Os resultados obtidos pela análise da citotoxicidade dos extratos nos permitiram concluir:

1. 61 extratos de plantas nativas do Cerrado apresentaram atividade citotóxica em linhagem celular J774. Apenas 21 extratos foram considerados viáveis e selecionados para o estudo.
2. Seis frações do extrato de *Jacaranda ulei* nos solventes hexano, metanol e acetato de etila não apresentaram atividade citotóxica significativa, porém observa-se melhor desempenho nos solventes mais polares.
3. O extrato bruto de *Jacaranda ulei* apresenta citotoxicidade em concentrações superiores a 100 µg/mL de modo dose-dependente.

Da mesma forma, pode-se concluir pela análise do óxido nítrico:

1. Os extratos de *Protium heptaphyllum* e *Cupania vernalis* não apresentaram diminuição na produção do óxido nítrico e foram excluídos do estudo.
2. As frações do extrato da *Tabebuia caraíba* e do *Croton goyasensis* apresentaram efeito anti-inflamatório considerável, sendo promissoras para pesquisas futuras.
3. A fração do extrato hexânico utilizando as partes aéreas de *J. ulei* não apresentou diminuição na produção do óxido nítrico e foram excluídos do estudo.
4. O extrato bruto de *J. ulei* apresentou redução da produção de óxido nítrico em todas as concentrações analisadas. Nas concentrações 100 e 25 µg/mL, este efeito foi mais pronunciado.
5. O extrato acetato de etila das partes aéreas de *J. ulei* não apresentou efeito tóxico em peixe zebra.

Mais estudos são necessários para comprovar o potencial efeito anti-inflamatório da espécie *J. ulei*. Como perspectiva futura, mais testes com diferentes mediadores da inflamação são necessários para confirmar os resultados aqui apresentados, além da caracterização química e identificação dos componentes biologicamente ativos.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALMEIDA, MRA et al. **Identification of triterpenes from the leaves of *Jacaranda puberula***. *Chemistry of Natural Compounds*, v. 50, n. 6, p. 1143–1145, 2014.
2. ALMEIDA, NJ. **Avaliação do Papel do Receptor Marco na Infecção de Macrófagos Murinos por *Leishmania Major***. Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz. Dissertação de mestrado, 2014.
3. AMÂNCIO, EAM. **Estudo fitoquímico de extratos etanólicos de espécies do Gênero *Jacaranda* (bignoniaceae) ocorrentes no estado de Minas Gerais e avaliação da atividade citotóxica**. *Universidade Federal de Ouro Preto*, dissertação de mestrado, 2019.
4. ANTAR, GM; SANO, PT. **Angiosperms of dry grasslands and savannahs of Jalapão, the largest conserved Cerrado area in Brazil**. Universidade de São Paulo, Inst. Biociências, Depto. Botânica, 2019.
5. ANTUNES, K.A. **Efeito antiobesidade e toxicidade aguda de *Jacaranda decurrens* subsp. *symmetrifoliolata* Farias & Proença (Bignoniaceae)**. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral/Bioprospecção) – Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, 2013.
6. ARANTES, AE; FERREIRA, LG; COE, MT. **The seasonal carbon and water balances of the Cerrado environment of Brazil: Past, present, and future influences of land cover and land use**. *ISPRS J Photogramm* 117: 66-78, 2016.
7. ARRAIS, LG. **Estudo fitoquímico e avaliação da atividade antimicrobiana e farmacológica de *Croton pulegioides* Baill (EUPHORBIACEAE)**. *Universidade Federal de Pernambuco*, dissertação de mestrado, 2012.
8. ASSIS, PA. **Atividade antifúngica de extratos depositados no banco de extratos de plantas do bioma Cerrado e de substâncias isoladas de *Matayba guianensis***. Brasília. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade de Brasília, p. 168, 2013.
9. BAILÃO, EFLC; DEVILLA, IA; CONCEIÇÃO, EC. **Bioactive Compounds Found in Brazilian Cerrado Fruits**. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 23760-23783; doi:10.3390/ijms161023760, 2015.
10. BECHARA, GH; SZABÓ, MPJ. **Processo Inflamatório: Alterações Vasculares e Mediação Química**. 2006 Disponível em: <

- https://www.fcav.unesp.br/Home/departamentos/patologia/GERVASIOHENRIQUEBECHARA/inflam_aspectosvasculares2006.pdf> Acesso em: 10/06/2020.
11. BFG - THE BRAZIL FLORA GROUP. **Brazilian Flora 2020: innovation and collaboration to meet Target 1 of the Global Strategy for Plant Conservation (GSPC)**. *Rodriguésia* 69: 1513-1527, 2018.
 12. BOCHNIE, KA; GREGÓRIO, PC; MACIEL, RAP. **Análise da viabilidade celular por MTT em células tratadas com toxinas urêmicas – Revisão**. *Cad. da Esc. de Saúde, Curitiba*, V.1 N.15: 42-51, 2016.
 13. BUREAU, E; SCHUMANN, K. **Bignoniaceae in Martius Fl. Bras. (B)2**. 1897.
 14. CÂMARA, LMA. **Avaliação das características fitoquímicas qualitativa e quantitativa da Carabeira (Tabebuia Caraíba (Mart.) Bur.) cultivada na fazenda escola do IFRN – Campus Apodi**. *Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio*, monografia, 2019.
 15. CELMER, AJ. **Padronização da técnica de RT-PCR para triagem *in vitro* de compostos com potencial atividade imunomodulatória em macrófagos**. *Universidade Federal de Santa Catarina*, dissertação de mestrado, 2010.
 16. CHAMUSCA, FV; REIS, SRA; LEMAIRE, D; MEDRADO, AP. **Mediadores do efeito sistêmico do processo inflamatório e terapias fotobiomoduladoras: uma revisão de literatura**. *R. Ci. med. biol., Salvador*, v.11, n.1, p.70-78, jan./abr. 2012. Disponível em: <<http://www.portalseer.ufba.br/index.php/cmbio/article/view/5705/4456>> Acesso em: 10/06/2020.
 17. CHASE, MW et al. **An update of the Angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV**. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 181, n. 1, p. 1–20, 2016.
 18. CHEUNG, RCF; NG, TB; WONG, JH; CHEN, Y; CHAN, WY. **Marine natural products with anti-inflammatory activity**. *Appl Microbiol Biotechnol*. Doi: 10.1007/s00253-015-7244-3, 2015.
 19. CNCFlora. **Jacaranda ulei in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012**. Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em <http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Jacaranda_ulei>. Acesso em 29 abril 2020.
 20. CORTELO, PC; DEMARQUE, DP; DUSI, RG; ALBERNAZ, LC; BRAZ-FILHO, R; GONCHAROVA, EI; BOKESCH, HR; GUSTAFSON, KR; BEUTLER, JA;

- ESPINDOLA, LS. **A Molecular Networking Strategy: High-Throughput Screening and Chemical Analysis of Brazilian Cerrado Plant Extracts against Cancer Cells.** *Cells* 10, 691, 2021. <https://doi.org/10.3390/cells10030691>.
21. DA COSTA, RC; et al. **Discovery of the rapanone and suberonone mixture as a motif for leishmanicidal and antifungal applications.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, Vol. 22, nº 1, p. 135-140. England, 2014.
22. DAR, KB; BHAT, AH; AMIN, S; MASOOD, A; ZARGAR, MA; GANIE, SA. **Inflammation: A Multidimensional Insight on Natural Anti-Inflammatory Therapeutic Compounds.** *Current Medicinal Chemistry*, 23, 1-22, 2016.
23. Disponível em:
<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/herbarioVirtual/ConsultaPublicoHVUC/ConsultaPublicoHVUC.do?idTestemunho=3552285>> Acesso em 29/4/2020.
24. DREBES, T; ETHUR, EM.; AVANCINI, CAM. **Triagem Fitoquímica e atividade antibacteriana dos extratos aquosos e hidroalcoólicos brutos de Jacaranda micrantha Staphylococcus coagulase positiva e Salmonella spp. padrões e isoladas em produtos de.** *Archives of Veterinary Science*, v. 23, n. 2, p. 27–39, 2018.
25. DVORAKOVA, M; LANDA, P. **Anti-inflammatory activity of natural stilbenoids: A review.** *Pharmacological Research*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2017.08.002>, 2017.
26. FARIAS, KS; SANTOS, TSN; PAIVA, MRAB; ALMEIDA, SML; GUEDES, PT; VIANNA, ACA; FAVARO, SP; BUENO, NR; CASTILHO, R. O. **Antioxidant properties of species from the Brazilian cerrado by different assays.** *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s 15(4): 520–528, 2013.
27. FERRERES, F et al. **Food and chemical toxicology phenolic compounds from Jacaranda caroba (Vell .) A . DC .: Approaches to neurodegenerative disorders.** *Food and Chemical Toxicology*, v. 57, p. 91–98, 2013.
28. FORZZA, RC et al. **New Brazilian floristic list highlights conservation challenges.** *Bioscience* 62: 39-45, 2012.
29. FRANZEN, FL; FRIES, LLM; OLIVEIRA, MSR; LIDÓRIO, HF; MENEGAES, JF; LOPES, SJ. **Teor e rendimento de extratos de flores obtidos por diferentes métodos e períodos de extração.** *Acta Iguazu, Cascavel*, v.7, n.1, p. 9-21, 2018.
30. GACHET, MS.; SCHÜHLY, W. **Jacaranda - An ethnopharmacological and phytochemical review.** *Journal of Ethnopharmacology*, v. 121, n. 1, p. 14–27, 2009.

31. GENTRY, AH. **Bignoniaceae: part I, tribes crescentieae and tourentieae.** Flora Neotropica, v. **25**, n. 1, p. 1-130, 1980.
32. GRÜNER, JM; SOUZA, TK; BENITEZ, LB; SILVA, CM. **Análise do perfil fitoquímico de *Tripodanthus acutifolius* (Ruiz & Pavón) Tieghem, Loranthaceae.** *Revista Jovens Pesquisadores*, Santa Cruz do Sul, n. 1, p. 9-17, 2012.
33. GUEDES, EJRC. **Avaliação da atividade anti-inflamatória e ensaios toxicológicos pré-clínicos do extrato etanólico bruto das folhas de *Wissadula Periplocifolia* (L.) C. Presl.** Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Tese de doutorado, 2016.
34. HAYOUNI, EA; MANAF ABEDRABBA, M; BOUIX, M; HAMDI, M. **The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts.** *Food Chemistry* 105, 1126–1134, 2007.
35. HERNANDES, LS et al. **Acute oral toxicity and total flavonoid content of *Jacaranda caroba* (Vell.) A. DC.** *Planta Medica*, v. 80, n. 10, p. 851, 2014.
36. HONG, YH; WENG, LW; CHANG, CC; HSU, HF; WANG, CP; WANG, SW; HOUNG, JY. **Anti-Inflammatory Effects of *Siegesbeckia orientalis* Ethanol Extract in In Vitro and In Vivo Models.** *BioMed Research International*, v. 2014, p. 1–10, 2014.
37. ***Jacaranda ulei* in Ficha de Espécies do Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira (SiBBr).** Disponível em: <https://ferramentas.sibbr.gov.br/ficha/bin/view/especie/jacaranda_ulei>. Acesso em 30/04/2020.
38. KACEM, M. et al. **Antioxidant and anti-inflammatory effects of *Ruta chalepensis* L. extracts on LPS-stimulated RAW 264.7 cells.** *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, v. 51, n. 2, p. 128–141, 2015.
39. KAZEMIL, S; SHIRZAD, H; RAFIEIAN-KOPAEI, M. **Recent Findings in Molecular Basis of Inflammation and Anti-inflammatory Plants.** *Current Pharmaceutical Design*, 24, 1551-1562, 2018.
40. KIM, H. J.; PARK, G. M.; KIM, J.-K. **Anti-inflammatory effect of pristimerin on lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in murine macrophages.** *Archives of pharmacal research*, v. 36, n. 4, p. 495–500, 2013.
41. KLINK, CA; MACHADO, RB. **A conservação do Cerrado brasileiro.** *Megadiversidade*, Volume 1, nº 1, 2005.

42. LEÇA, MS et al. **Levantamento de espécies da Família Bignoniaceae ocorrentes na Universidade Castelo Branco, Campus Realengo – RJ.** Link: <<http://www.revistaea.org/artigo.php?idartigo=2238>> Relatos de Experiências, no. 54, 2015.
43. LOHMANN, LG; FIRETTI, F; GOMES, BM. **Flora das cangas da Serra dos Carajás, Pará, Brasil: Bignoniaceae.** Rodriguésia 69(3): 1063-1079, 2018.
44. MAIONE, F; RUSSO, R; KHAN, H; MASCOLO, N. **Medicinal plants with anti-inflammatory activities.** Natural Product Research, 30:12, 1343-1352. Doi: 10.1080/14786419.2015.1062761, 2016.
45. MARTINELLI, G; MESSINA, T; FILHO, LS. **Livro Vermelho da Flora do Brasil. Plantas Raras do Cerrado.** Centro Nacional de Concentração da Flora (CNCFlora), 2014.
46. MARTINS, MD; MARQUES, MM; BUSSADORI, SK; et al. **Citotoxicidade in vitro de extratos de arnica brasileira (*Solidago microglossa*) e arnica paulista (*Porophyllum ruderale*).** Con Scientiae Saúde, 8(1):99-104, 2009.
47. MATTOS, JR; LOHMANN, LG; COELHO, MAN. **Bignoniaceae a família do Ipê. Cultivada no Arboreto do Jardim Botânico do Rio de Janeiro.** 1. ed., 2019.
48. MEDEIROS, JD. Ministério do Meio Ambiente. **Guia de campo: vegetação do Cerrado 500 espécies.** 532 p. (Série Biodiversidade, 43), Brasília: MMA/SBF, 2011.
49. MERLY, L; SMITH, S. L. **Murine RAW 264.7 cell line as an immune target: are we missing something? Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 39, n. 2, p. 55–58, 2017.
50. MESQUITA, ML. **Potencial anti-tumoral de substâncias isoladas de plantas do Cerrado brasileiro: estudos preliminares do mecanismo de ação da atividade citotóxica.** Universidade de Brasília, programa de pós-graduação em Ciências Médicas. Tese de Doutorado, 2009.
51. MIRANDA, TD. **Morfoanatomia de órgãos vegetativos e regeneração in vitro a partir de segmentos radiculares de *jacaranda ulei* Bureau & K. Schum.** (Bignoniaceae). Dissertação de mestrado. Universidade de Brasília. 2014.
52. MOLLACE, V.; MUSCOLI, C.; MASINI, E.; CUZZOCREA, S.; SALVEMINI, D. **Modulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide and nitric oxide donors.** *Pharmacol. Rev.* 57, 217-252, 2005.
53. MORSY, N. **Cardiac Glycosides in Medicinal Plants.** In: *Aromatic and Medicinal Plants - Back to Nature.* InTech, p. 29–45, 2017.

54. NEWTON, K; DIXIT, VM. **Signaling in innate immunity and inflammation**. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 4 a006049, 2012.
55. NUNES, PH; FERREIRA, HD; BORGES, LL; SÁ, S; CUNHA, LC; NETO, JRO; PAULA, JR; FIUZA, TS. **Morphoanatomic Study of Jacaranda ulei and Variability of Its Volatile Oils**. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 30:718–722, 2020.
56. OLIVEIRA, VB; ZUCHETTO, M; OLIVEIRA, CF; PAULA, CS; DUARTE, AFS; MIGUEL, MD; MIGUEL, OG. **Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por clae-dad de dicksonia sellowiana (presl.). Hook, dicksoniaceae**. *Rev. bras. plantas med.* 18 (1 suppl 1), 2016. https://doi.org/10.1590/1983-084X/15_106
57. OLIVEIRA, R. **O peixe-zebra como uma ferramenta para avaliação de ecotoxicidade**. Universidade de Aveiro, dissertação de mestrado, 2009.
58. OLMSTEAD, RG; ZJHRA, ML; LOHMANN, LG; GROSE, SO; ECKERT, AJ. **A molecular phylogeny and classification of Bignoniaceae**. *American Journal of Botany* 96(9): 1731–1743, 2009.
59. PALHARES, D., et al. **Comparative anatomomy of bark of stems, roots and xylopodia of Brosimum gaudichaudii (Moraceae)**. – *IAWA Journal* 28: 315–324, 2007.
60. PANDEY, A.; TRIPATHI, S. **Conceptof stadardization, extraction and pre phytochemical screening strategies for herbal drug**. *Journal of pharmacy phytochemitry*. v. 2, n. 5, p. 115-9, 2014.
61. PEREIRA, JF; CUNHA, GR; MORESCO, ER. **Improved drought tolerance in wheat is required to unlock the production potential of the Brazilian Cerrado**. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 19: 217-225, 2019.
62. QUEIROZ, SAS; PINTO, MEF; BOBEY, AF; RUSSO, HM; BATISTA, ANL; BATISTA JR JM; CODO, AC; MEDEIROS, AI; BOLZANI, VS. **Diterpenoids with inhibitory activity of nitrite production from Croton floribundus**. *Journal of Ethnopharmacology*, 2019 doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112320>.
63. RAGSAC, AC; FARIAS-SINGER, R; FREITAS, LB; LOHMANN, LG; OLMSTEAD, RG. **Phylogeny of the Neotropical tribe Jacarandae (Bignoniaceae)**. *American Journal of Botany* 106(12): 1–13, 2019.
64. RAMOS, GA. **Estudio *in vitro* de la actividad antiinflamatoria y citotóxica de fracciones derivadas de hojas de Jacaranda copaia**. *Universidad Central de*

- Venezuela, monografia, 2011. Disponível em: <http://saber.ucv.ve/jspui/bitstream/123456789/8019/1/Tesis%20Giselle%20A.%20Ramos.pdf> Acesso em: 21/06/2021.
65. REIS, AF; SCHMIELE, M. **Características e potencialidades dos frutos do Cerrado na indústria de alimentos.** Braz. J. Food Technol., Campinas, v. 22, e2017150, 2019.
66. RIBEIRO, MF. **Biologia reprodutiva e polinização de *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum. (Bignoniaceae).** Dissertação (Mestrado em Botânica), Brasília - Universidade de Brasília, 196 p, 2003.
67. RIBEIRO, TG et al. **Antileishmanial activity and cytotoxicity of Brazilian plants.** *Experimental Parasitology*, v. 143, n. 1, p. 60–68, 2014.
68. RODRIGUES, FA.; PIMENTA, VSC.; BRAGA, KMS.; ARAÚJO, EG. **Obtenção de Extratos de Plantas do Cerrado.** Enciclopédia biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.13 n.23; p. 870, 2016.
69. RODRIGUES, VEG; CARVALHO, DA. **Plantas medicinais no domínio dos cerrados.** Lavras: UFLA, p 180, 2001.
70. SANTOS, BTA. **Estudo da atividade dos extratos de plantas e fungos endofíticos isolados do cerrado brasileiro em linhagem celular de Feocromocitoma.** *Universidade de Brasília*, dissertação de mestrado, 2014.
71. SANTOS, NCI. **Avaliação citotóxica e genotóxica da infusão de Equisetum sp. L (equisetaceae).** Universidade do Vale do Paraíba, trabalho de conclusão de curso, 2019.
72. SILVA JÚNIOR, JH; DANTAS, LM; ARAÚJO, LFS. **Pesquisa Bibliográfica: Uma Abordagem Sobre o Bioma Cerrado.** Congresso Norte nordeste de pesquisa e inovação, Palmas Tocantins, 2012.
73. SILVA, R. M. F.; GOMES, T. C. B. L.; ALBUQUERQUE, M. M.; SILVA JÚNIOR, J. O. C.; BARBOSA, W. L. R.; ROLIM NETO, P. J. **Abordagem sobre os diferentes processos de secagem empregados na obtenção de extratos secos de plantas medicinais.** Revista Brasileira Plantas Mediciniais. v. 14, n. 1, p. 103-09, 2012.
74. SILVA, VHS. **Avaliação da viabilidade celular e produção de óxido nítrico em células RAW 264.7 tratadas com extrato aquoso das folhas da *Eugenia dysenterica*.** *Universidade Federal de Uberlândia, Monografia de Conclusão de Curso*, 2019.

75. SILVEIRA, CES; MIRANDA, TD; PALHARES D; PEREIRA LAR. *Jacaranda ulei* – **Carobinha-do-campo. Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: Plantas para o Futuro: Região Centro-Oeste / Ministério do Meio Ambiente.** Secretaria de Biodiversidade e Florestas. Roberto Fontes Vieira (Ed.). Julcéia Camillo (Ed.). Lídio Coradin (Ed.), p. 983–988. – MMA; Brasília, 2016.
76. SILVEIRA, CESS., et al. **A micropropagation protocol for the domestication of *Jacaranda ulei* (Bignoniaceae).** – *Phyton* (Horn, Austria) 58 (2): 165–174, 2018.
77. SILVEIRA, EMO et al. **Spatial distribution of wood volume in Brazilian savannas.** *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 91(4): e20180666, 2019.
78. SOARES, LV; MELO, R; OLIVEIRA, WS; SOUZA, PM; & SCHMIELE, M. **Brazilian Cerrado fruits and their potential use in bakery products.** In H. Lewis (Ed.), *Bread: Consumption, cultural significance and health effects* (Chap. 5, pp. 125-160). New York: Nova Publisher, 2017.
79. SONG, M; PARK, HJ. **Anti-inflammatory effect of *Phellinus linteus* grown on germinated brown rice on dextran sodium sulfate-induced acute colitis in mice and LPS-activated macrophages.** *Journal of ethnopharmacology*, v. 154, n. 2, p. 311–8, 2014.
80. TEOTÔNIO, IMSN. **Efeitos anti-inflamatórios de espécies de *Pouteria* spp. sobre macrófagos murinos raw 264.7 estimulados com LPS.** Universidade de Brasília, dissertação de mestrado, 2015.
81. TRESVENZOL, LMF; PARENTE, LML; LINO JÚNIOR, RS; FIUZA, TS; BARA, MTF; CUNHA, LC; LAXOR, LP; MIGUEL, MP; PAULA, J.R. **Avaliação da toxicidade aguda e da atividade cicatrizante dos extratos etanólicos das folhas e raízes da *Memora nodosa* (Silva Manso) Miers (Bignoniaceae).** *Rev. bras. plantas med.* v.15 n.3, 2013.
82. VATTIMO, I. **Quatro novas espécies do *Jacaranda jussieu* (Bignoniaceae).** *Rodriguésia*. Rio de Janeiro 36(59): 79-83.1984.
83. ZAPPI, DC et al. **Growing knowledge: an overview of seed plant diversity in Brazil.** *Rodriguésia*, v. 66, n. 4, p. 1085–1113, 2015.
84. ZHOU, R. et al. **Anti-inflammatory activity of guluronate oligosaccharides obtained by oxidative degradation from alginate in lipopolysaccharide-activated murine macrophage RAW 264.7 cells.** *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 63, n.1, p. 160-8, 2015.

IV. ANEXO