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

AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DA ESPÉCIE *Fridericia chica* (Bonpl.) L. G. Lohmann (BIGNONIACEAE) EM MODELOS *IN VITRO*

ADRIANE DÂMARES DE SOUSA JORGE BATALHA

MANAUS - AM
2022

ADRIANE DÂMARES DE SOUSA JORGE BATALHA

AVALIAÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DA ESPÉCIE *Fridericia chica* (Bonpl.) L. G. Lohmann (BIGNONIACEAE) EM MODELOS *IN VITRO*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas como pré-requisito para defesa.

Orientador: Professor Doutor Antônio Luiz Ribeiro Boechat Lopes
Coorientador: Professor Doutor Marco Aurélio Sartim

MANAUS - AM
2022

Ficha Catalográfica

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

B328a

Batalha, Adriane Dâmares de Sousa Jorge
Avaliação da ação anti-inflamatória e antioxidante dos extratos da espécie Fridericia chica (Bonpl.) L. G. Lohmann (Bignoniaceae) em modelos in vitro / Adriane Dâmares de Sousa Jorge Batalha . 2022
99 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Antônio Luiz Ribeiro Boechat Lopes
Coorientador: Marco Aurélio Sartim
Tese (Doutorado em Imunologia Básica e Aplicada) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Fridericia chica. 2. Flavonóides. 3. Estresse oxidativo. 4. Inflamação. I. Lopes, Antônio Luiz Ribeiro Boechat. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

Dedico este trabalho a Deus, minha âncora.

Aos meus pais Aldo e Gerilza, meu irmão Adriano, meu esposo Minerval Jr. e minhas amadas filhas Júlia, Luíza e Maísa, que são minha base e fortaleza em todos os momentos. Essa vitória é nossa, família!

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço à Deus, por direcionar cada um dos meus projetos, abençoando-me a cada passo, dando-me capacidade, entendimento, discernimento e fortalecendo-me a todo instante. Continua na direção da minha vida, Senhor!

A minha amada família: meus pais Aldo e Gerilza pelos valores e ensinamentos passados e por terem sido incansáveis nessa batalha, meus irmãos Adriano e Diêgo por todo apoio e carinho, meu esposo Minerval Jr. pelo amor, força e parceria de todos os dias, minhas heranças mais preciosas Júlia, Luíza e Maísa por serem minhas maiores motivações para vencer, e minha amiga Elizângela pela dedicação com as minhas filhas como se fossem suas. Sem o apoio de cada um de vocês eu não teria conseguido!

Ao meu orientador Professor Doutor Antônio Luiz Ribeiro Boechat Lopez, pela oportunidade, confiança para desenvolver esse projeto, orientação e ensinamentos repassados, cada um deles contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional.

Ao meu coorientador Professor Doutor Marco Aurélio Sartim, pelo apoio, confiança depositada no meu trabalho, pelo tempo dedicado à minha orientação, por todos os ensinamentos e questionamentos que me fizeram amadurecer cientificamente e profissionalmente.

A toda a equipe (Damy, Rosmery, Professor Francisco Célio, Professor Wuelton, Felipe, Professor Hector, Professor Boechat e professor Marco) que contribuiu para a publicação do artigo de revisão intitulado “Therapeutic Potential of Leaves from *Fridericia chica* (Bonpl.) L. G. Lohmann: Botanical Aspects, Phytochemical and Biological, Anti-Inflammatory, Antioxidant and Healing Action". O nosso artigo poderá contribuir para estudos futuros relacionados a espécie *Fridericia chica*. Agradeço a parceria e empenho de todos!

À Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e a todos os membros que compõem o Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada (PPGIBA). Em especial ao coordenador Professor Doutor Allyson Guimarães da Costa e a vice-coordenadora Professora Doutora Jerusa Araújo Quintão Arantes Faria pela atenção, disponibilidade e esclarecimento das dúvidas sempre que necessário. Ao corpo discente do programa, que em cada disciplina ministrada, se esforçou para que as atividades realizadas contribuíssem para o conhecimento intelectual e científico dos seus alunos. Aos excelentes profissionais que cuidam da parte administrativa do programa, Edson, Ana Paula e Magda, por toda dedicação, comprometimento e por não medirem esforços para ajudar no que fosse preciso. Obrigada a todos, sinto-me honrada em fazer parte desse programa de excelência.

A todos os colegas da minha turma de doutorado pela parceira, companheirismo nas disciplinas e pelas palavras de positividade. As amigas/irmãs, que durante essa jornada, Deus me presenteou, entre elas Nadielle, Juliana, Rosmery e meu sobrinho Caleb, Nani, Aguyda, Camila, Marissa, Vanessa, Anne e Márcia pelas orações, cumplicidade, companheirismo e por todas as palavras de apoio durante os momentos de aflição. Sem vocês essa jornada teria sido muito mais difícil!

Ao professor Doutor Francisco Célio Maia Chaves pelas coletas das folhas da espécie *Fridericia chica*, localizadas no setor de plantas medicinais e hortaliças da Embrapa Amazônia Ocidental, para o preparo dos extratos utilizados neste projeto.

Ao Laboratório da Central Analítica no Centro de Apoio Multidisciplinar (CAM)/ UFAM em especial ao colega Felipe Moura pela disponibilidade e auxílio na análise química dos extratos. A equipe do Laboratório de Doenças Infecciosas e Imunologia (IDI), em especial ao Professor Doutor Pritesh Lalwani e aos amigos Aguyda, Bárbara, Thiago, Wlademir e Sophia por sempre se mostrarem dispostos a ajudar e pelas palavras de apoio.

Ao Laboratório de Inovação e Desenvolvimento em Tecnologia Farmacêutica (LIDETEF) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/ UFAM em especial a Professora Tatiane Sousa e aos colegas Newton Leiros e Serafim Florentino pela ajuda no preparo e secagem do extrato aquoso da espécie *Fridericia chica*.

Ao Laboratório de Atividades Biológicas (BIOPHAR) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/ UFAM em especial ao Professor Doutor Emerson Silva Lima e as colegas Márcia de Jesus e Patrícia Danielle pela parceria e auxílio em alguns experimentos *in vitro*.

Ao Laboratório Central de Análises, da Escola Superior de Ciências da Saúde (ESA), da Universidade do Estado do Amazonas (UEA) em especial ao Professor Doutor Héctor Koolen e aos colegas Rodrigo Cunha e Weider Paz pela disponibilidade em ajudar no preparo e no fracionamento do extrato acetato de etila da espécie *Fridericia chica*.

À Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) e toda a equipe do Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema (IPCCB) em especial aos Professores Marco Aurélio Sartim e Wuelton Monteiro, a psicóloga Sara Fernandes e aos colegas Flávia Regina, Larissa, Cecília, Ariane, Alê e Eduardo pela atenção e ajuda sempre que necessário.

Ao grupo de Pesquisa Clínica em Envenenamento por Animais (CEPCLAM)/ FMT-HVD em especial aos Professores Marco Aurélio Sartim e aos amigos queridos Távila, Karol, Endila, Kamilla, Jéssica Lobato, Jéssica Burlamaque, Bianca, Víctor, David, Kevin e Tarcizio por todo apoio, companheirismo, ajuda nos experimentos e amizade em todos os momentos. A união faz a força, meus amigos! Muito obrigada!

Ao Laboratório de Cultura Celular da Fiocruz, localizado na FMT-HVD, em especial a minha dupla Kamilla e aos amigos Jéssica Lobato, Ana Xavier, Carol, Ana Liz, Eliz, Rafa, Yuri, Rebeca, Emily, Thaíssy e Shuan pelo auxílio nos experimentos e por todas as palavras de apoio.

A Rede Plataformas Tecnológicas da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) – Instituto Leônidas e Maria Deane em especial as colegas Ivanildes, Carol e Ana Xavier pela parceria e boa vontade em ajudar com as leituras das placas de alguns experimentos *in vitro*.

Ao Laboratório de Virologia e Imunologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) em especial ao Professor Doutor Gemilson Soares pela parceria em alguns ensaios de citotoxicidade, *in vitro*.

Ao Centro de Pesquisa em Doenças Inflamatórias (CRID) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) em especial ao Professor Doutor José Carlos Alves de Faria e a amiga Rosmery Duran Ubiera pelo apoio e parceria em alguns experimentos *in vitro*.

Aos professores que fizeram parte da banca examinadora, Professora Doutora Roberta Lins, Professora Doutora Jerusa Araújo Quintão, Professora Doutora Ilia Gilmara Carvalho, Professor Doutor Carlos Arterio Sorgi e Professor Doutor Antônio Luiz Ribeiro Boechat Lopes pelo tempo disponibilizado e por todas as contribuições. Muito obrigada!

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pela oportunidade, financiamento e investimento com a bolsa de doutorado.

Enfim, a todos aqueles que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização desse sonho. Agradeço de coração! Que Deus abençoe cada um de vocês!

“Porque o Senhor dá a sabedoria, e da sua boca vem o conhecimento e o entendimento.”

Provérbios 2:6

RESUMO

Os extratos das folhas da espécie amazônica *Fridericia chica* (Bignoniaceae), conhecida na medicina popular como crajiru, são muito utilizadas no tratamento da inflamação, cicatrização de feridas, hemorragias, entre outras enfermidades. O potencial terapêutico dessa espécie tem sido evidenciado em diversas pesquisas. O objetivo deste estudo foi avaliar a ação anti-inflamatória e antioxidante dos extratos brutos (aquoso e em acetato de etila) da espécie *Fridericia chica* (*F. chica*) *in vitro*. Foram avaliados a interação com a enzima COX-2 *in silico*, a produção intracelular de espécies reativas de oxigênio (iROS), o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi m$), a produção de citocinas, a motilidade celular, a diferenciação de células Th17 e Treg, e a polarização de macrófagos. A molécula carajurona, uma das substância majoritárias presente na espécie de *F. chica*, apresentou uma energia de ligação próxima a do ligante Rofecoxib, inibidor específico da COX-2. Os extratos aquoso e acetato de etila diminuíram as espécies reativas de oxigênio intracelular, na presença de estaurosporina e aumentaram o potencial de membrana mitocondrial, nas mesmas condições. Reduziram ainda a produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1β, TNF-α e IL-6, na presença do veneno de *Bothrops atrox* e aumentaram a produção da citocina anti-inflamatória IL-10, nas mesmas condições. O extrato aquoso de *F. chica* proporcionou uma alta taxa de migração em células de fibroblastos humanos. O extrato aquoso também foi capaz de diminuir a diferenciação de células Th17 e aumentar a polarização da população de células Treg, induzindo assim um perfil mais regulatório. Além disso, o extrato aquoso de *F. chica* potencializou a produção de CCL-22, induzida por IL-4. A espécie *Fridericia chica* (crajiru) é de fácil acesso e os nossos dados sugerem que seja explorada como agente terapêutico contra o estresse oxidativo e processos inflamatórios. Este trabalho contou com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM).

Palavras-chave: *Fridericia chica*; Flavonóides; Estresse oxidativo; Inflamação.

ABSTRACT

Extracts from the leaves of the Amazonian species *Fridericia chica* (Bignoniaceae), known in popular medicine as crajiru, are widely used in the treatment of inflammation, wound healing, and bleeding, among other illnesses. The therapeutic potential of this species has been evidenced in several studies. The aim of this study was to evaluate the anti-inflammatory and antioxidant action of crude extracts (aqueous and in ethyl acetate) of *Fridericia chica* (*F. chica*) *in vitro*. Were evaluated the interaction with the COX-2 enzyme *in silico*, intracellular production of reactive oxygen species (iROS), mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi m$), production of cytokines, cell motility, Th17 and Treg cell differentiation and macrophage polarization. The molecule carajurone, one of the major substances present in the species of *F. chica*, showed a binding energy close to that of the Rofecoxib ligand, a specific inhibitor of COX-2. The Aqueous and ethyl acetate extracts decreased the intracellular reactive oxygen species production in the presence of staurosporine and increased mitochondrial membrane potential under the same conditions. They also reduced the production of the pro-inflammatory cytokines IL-1β, TNF-α and IL-6, in the presence of *Bothrops atrox* venom and increased the production of anti-inflammatory cytokine IL-10, under the same conditions. The aqueous extract of *F. chica* provided a high rate of migration in human fibroblast cells. And was able to decrease the Th17 cell´s differentiation and increase the polarization of Treg cell´s, thus inducing a more regulatory profile. Furthermore, the aqueous extract of *F. chica* potentiated the production of CCL-22, induced by IL-4. The species *Fridericia chica* (crajiru) is easily accessible and our data suggest that it is explored as an therapeutic agent against oxidative stress and inflammatory processes. This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM).

Key words: *Fridericia chica*; Flavonoids; Oxidative stress; Inflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Extratos brutos da espécie *Fridericia* chica.....53
Figura 2. Frações (F1-F10) obtidas a partir do extrato bruto em acetato de etila da espécie *Fridericia chica*.....55
Figura 3. Perfil químico dos extratos de Fridericia chica.....57
Figura 4. Perfil químico das Frações (F5-F10) obtidas a partir do extrato bruto em acetato de etila da espécie Fridericia chica.....60
Figura 5. Identificação dos íons 299 e 285 presentes nos extratos de *Fridericia chica* Verlot.....61
Figura 6. Ancoragem das moléculas carajurina e carajurona isoladas da espécie *Fridericia chica* em sítios ativos da proteína Ciclooxigenase-2.....63
Figura 7. Avaliação da toxicidade dos extratos brutos da espécie *Fridericia chica* sobre as células THP-1.....64
Figura 8. Determinação da IC50% para toxicidade dos extratos brutos da espécie *Fridericia chica* em células THP-1.....65
Figura 9. Avaliação da toxicidade do extrato aquoso da espécie *Fridericia chica* sobre as células J774-A1.....66
Figura 10. Avaliação da toxicidade do extrato aquoso da espécie *Fridericia chica* sobre as células HL60.....67
Figura 11. Determinação da IC50% para toxicidade dos extratos brutos da espécie *Fridericia chica* em células HL60.....67
Figura 12. Avaliação da toxicidade dos extratos brutos da espécie *Fridericia chica* sobre as PBMC.....68
Figura 13. Avaliação da toxicidade das frações da espécie *Fridericia chica* sobre as PBMC...69
Figura 14. Efeito dos extratos de *Fridericia chica* sobre a produção de espécies reativas de oxigênio intracelular (iROS) em PBMC.....70
Figura 15. Efeito das frações da espécie *Fridericia chica* sobre a produção de espécies reativas de oxigênio intracelular (iROS) em PBMC.....71
Figura 16. Efeito protetor dos extratos de *Fridericia chica* sobre o Potencial de Membrana Mitocondrial (ΔΨm) em PBMC.....72
Figura 17. Efeito protetor das frações de *Fridericia chica* sobre o Potencial de Membrana Mitocondrial (ΔΨm) em PBMC.....73

Figura 18. Efeito inibidor dos extratos brutos da espécie *Fridericia chica* sobre a produção de IL-1β e TNF-α, em PBMC.....75
Figura 19. Efeito inibidor das frações da espécie *Fridericia chica* sobre a produção de IL-1β e TNF-α, em PBMC.....76
Figura 20. Avaliação do potencial anti-inflamatório das frações da espécie *Fridericia chica* sobre a produção das citocinas IL-6 e IL-10, em PBMC.....78
Figura 21. Efeito do extrato aquoso de *Fridericia chica* sobre a motilidade celular.....79
Figura 22. Efeito do extrato aquoso de *Fridericia* chica sobre a migração das células MRC-5.....80
Figura 23. Diferenciação de linfócitos Th17 na presença do extrato aquoso de *Fridericia chica*.....82
Figura 24. Diferenciação de células T reguladoras na presença de extrato aquoso de *Fridericia chica*.....84
Figura 25. Efeito do extrato aquoso de *Fridericia chica* sobre a polarização de macrófagos para um perfil M2.....85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Rendimento percentual dos extratos de *Fridericia chica*.....53

Tabela 2. Rendimento das Frações obtidas a partir do extrato bruto em acetato de etila.....54

Tabela 3. Energias de ligação para a ancoragem molecular entre os ligantes e o sítio ativo da COX-2.....62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-LO	5-lipoxigenase
F. chica	*Fridericia chica*
Akt	Proteína Quinase
APCI	Ionização Química de Pressão Atmosférica
ATP	Adenosina 5′ trifosfato
BALB/C	Raça de camundongo
BMDMs	Macrófagos derivados da medula óssea
BV2	Linhagem celular imortalizada de microglia murina
Ca^{+2}	Cálcio
CCL22	Quimiocina 22
COX	Enzima ciclooxigenase
COX-2	Enzima ciclooxigenase 2
DA	Neurônios Dopaminérgicos
DAMPs	Padrões Moleculares Associados a Danos
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DP	Doença de Parkinson
EDTA	Ácido Etilenodiamino tetra-acético
ESI	Ionização por Eletrospray
ESI-MS	Espectrometria de Massa com Ionização por Eletrospray
ESI-MSn	Espectrometria de Massa em tandem com Ionização por Eletrospray
F	Fracionamento
FMLP	Formylmethionil-leucyl-phenylalanine
g	grama
HD	Doença de Huntington
HEK-293	Células Humanas de rim embrionário
HL60	Células de leucemia mieloide aguda humana
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
K^+	Potássio
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-10	Interleucina 10
IL-6	Interleucina 6
iNOS	Óxido nítrico sintase induzido
IRFs	Fatores Regulatórios de Interferons
Jurkat	Linhagem de linfócitos T derivada da leucemia
L	litro
LB	Meio Luria-Bertani
L-DOPA	Levodopa
LPS	Lipopolissacarídeo
J774-A1	Macrófagos de camundongos
MeOH	Metanol

mL	Mililitro
mM	milimolar
MPP	1-metil-4-fenilpiridínio
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,4-tetraidropiridina
MS	Ministério da Saúde
MS/MS	Espectros de Massa em tandem
iROS	Espécies reativas de Oxigênio intracelular
mtROS	Espécies reativas de Oxigênio Mitocondriais
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
NADP	Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida
NF-κB	Fator de Transcrição Nuclear kappa B
NLPR3	Domínio de pirina da família NLR contendo 3
NO	Óxido Nítrico
NADPH oxidase	Complexo enzimático
NOX	Subunidades constituintes da NADPH oxidase
OMS	Organização Mundial de Saúde
ppm	Partes por milhão
PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PBS	Tampão Fosfato-Salino
PBMC	Células Mononucleares do Sangue Periférico
PDB	Protein Data Bank
PGE2	Prostaglandina E2
pH	Potencial de Hidrogênio
PRRs	Receptor de Reconhecimento de Padrões
RIG-I	Receptores semelhantes a RIG-I
RNA	Ácido Ribonucleico
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SNC	Sistema Nervoso Central
SNpc	Substância negra *pars* compacta
STAT3	Transdutores de Sinal e Ativadores de Transcrição
THP-1	Monócitos humanos derivados de leucemia monocítica
TLR9	Receptor Toll-like 9
TLRs	Receptores semelhantes a *Toll*
Tregs	Células T reguladoras
TNF- α	Fatores de Necrose Tumoral Alfa
UEA	Universidade do Estado do Amazonas
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
VAMPs	Padrões Moleculares Associados a Venenos
VMAT2	Transportador Vesicular de Monoamina-2
ΔΨm	Potencial de membrana mitocondrial

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 19
2. REFERENCIAL TEÓRICO 21
2.1. Artigo de revisão publicado na Revista *biomolecules*. 21
1. Introduction 22
2. Revision Strategy 23
3. Ethnobotany 23
4. Chemical Composition 23
5. Pharmacological Properties 27
5.1. Healing Activity 29
5.2. Anti-inflammatory Activity 30
5.3. Antioxidant Activity 31
6. Conclusions 33
References 34
3. OBJETIVOS 41
3.1. Objetivo Geral 41
3.2. Objetivos Específicos 41
4. MATERIAL E MÉTODOS 42
4.1. Origem do Material Vegetal 42
4.2. Preparo dos Extratos de *Fridericia chica* 42
4.2.1. Extrato Aquoso por Infusão 42
4.2.2. Extrato Acetato de Etila 43
4.2.3. Fracionamento do Extrato Bruto Acetato de Etila de *Fridericia chica* 43
4.3. Prospecção Química dos Extratos de *Fridericia chica* 44
4.4. Análise do perfil químico das frações de *Fridericia chica* 44
4.5. Análise dos Espectros 45
4.6. Ancoragem Molecular 45

4.7. Experimentação Celular *in vitro* 46
4.7.1. Preparo dos Extratos Vegetais para Adição em Cultura Celular 46
4.7.1.1. Extrato Aquoso de *Fridericia chica* 46
4.7.1.2. Extrato Acetato de etila de *Fridericia chica* 46
4.7.2. Obtenção das peçonhas de *Bothrops atrox* 46
4.7.3. Sangue humano 47
4.7.4. Isolamento de Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMC) 47
4.7.5. Avaliação da citotoxicidade dos extratos de *Fridericia chica* pelo método de MTT 47
4.7.6. Detecção de Espécies Reativas de Oxigênio Intracelular (iROS) 49
4.7.7. Determinação do Potencial de Membrana Mitocondrial (ΔΨm) 50
4.7.8. Quantificação de Citocinas 50
4.7.9. Ensaio de Motilidade Celular 51
4.7.10. Animais 51
4.7.11. Isolamento e Diferenciação de Linfócitos 51
4.7.12. Marcação Extracelular e Intracelular por Citometria de Fluxo 52
4.7.13. Polarização de Macrófagos 53
4.7.14. Testes estatísticos 53
5. RESULTADOS 54
5.1. Obtenções e Rendimentos dos Extratos de *Fridericia chica* 54
5.2. Obtenções e Rendimentos das Frações do Extrato Bruto Acetato de Etila 55
5.3. Perfil Químico dos Extratos brutos e das Frações de *Fridericia chica* 57
5.4. Fragmentação dos íons com intensidades elevadas nos extratos de *Fridericia chica* ... 62
5.5. Ancoragem das Moléculas desoxiantocianidinas, pertencentes à espécie *Fridericia chica*, em Sítios Ativos da Proteína Ciclooxigenase-2 (COX-2) 63
5.6. Avaliação da Citotoxicidade dos Extratos de *Fridericia chica* 65
5.7. Atividade antioxidante dos extratos de *Fridericia chica* sobre a produção de Espécies Reativas de Oxigênio intracelular (iROS) 71

5.8. Efeito Protetor dos extratos de *Fridericia chica* sobre Potencial de Membrana Mitocondrial (ΔΨm) 73

5.9. Efeito inibidor dos extratos brutos e das frações de *Fridericia chica* sobre a produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1β e TNF-α. 75

5.10. Efeito das frações de *Fridericia chica* sobre a produção da citocina pró-inflamatória IL-16 e da citocina anti-inflamatória IL-10 em PBMC. 78

5.11. Efeito do extrato de *Fridericia chica* Verlot sobre a Motilidade Celular 80

5.12. Diferenciação de linfócitos Th17 na presença do extrato aquoso de *Fridericia chica* 82

5.13. Diferenciação de células T reguladoras na presença de extrato aquoso de *Fridericia chica* 84

5.14. Efeito do extrato aquoso de *Fridericia chica* sobre a polarização de macrófagos para um perfil M2 86

6. DISCUSSÃO 87

7. CONCLUSÃO 93

8. REFERÊNCIAS 94

9. ANEXO 99

1. INTRODUÇÃO

Grande parte da população mundial utiliza as plantas medicinais no tratamento de diversas enfermidades, conhecimento que é compartilhado de geração para geração (WHO, 2002). As populações indígenas, com as suas diversidades culturais, contribuem para que esse conhecimento tradicional seja mantido. O potencial terapêutico das plantas medicinais está associado aos compostos ativos frequentemente produzidos quando as plantas são expostas a algum tipo de estresse. Esses compostos ativos são chamados metabólitos secundários e são importantes para a defesa, adaptação e interação das plantas com o meio ambiente. Além disso, vários grupos de metabólitos secundários possuem inúmeras funções biológicas, como por exemplo os compostos fenólicos, que apresentam atividades antioxidantes, anti-inflamatórios e anticancerígenas (HUANG et al., 2009; STREET, 2012; MAZID et al., 2011; KUMAR, 2019).

Os flavonóides pertencem ao grupos dos compostos fenólicos e seu potencial terapêutico no estresse oxidativo, na inflamação, em modular a resposta imune e em outras atividades biológicas, vem tornando esse grupo alvo de pesquisas científicas, ao longo dos anos (KOZLOWSKA et al., 2014; MARTÍNEZ et al., 2019; TABRIZI et al.,2020). Na estrutura química dos flavonóides encontra-se dois anéis de benzeno (A e B) com hidroxila fenólica, e é partir do grupo hidroxila no anel B, anel mais rico em elétrons, que podem ocorrer as doações de um átomo de hidrogênio e um elétron para os radicais livres, reduzindo-os. A capacidade dos flavonóides em atuar como agentes redutores em diversas reações, como por exemplo a quercetina na eliminação das espécies reativas de oxigênio, confirmam o seu potencial antioxidante e seu papel essencial no estresse oxidativo (SEYOUM et al, 2006; RAVISHANKAR et al., 2013; PROCHAZKOVA et al., 2011).

Estudos indicam que os flavonóides podem atuar como agentes anti-inflamatórios por diferentes mecanismos, entre eles bloqueando a cascata do ácido araquidônico a partir da inibição da via da enzima Ciclooxigenase 2 (COX2), a qual é ativada por mediadores inflamatórios. Os flavonóides podem suprimir a expressão da COX-2 inibindo a atividade dos principais produtos gerados por essa via enzimática, como por exemplo inibindo a ligação do fator de transcrição NF-kB ao seu elemento de resposta nuclear (NF-kB RE), o qual é responsável pela expressão de COX-2. Além disso, alguns grupos funcionais dos flavonóides podem se apresentar como ligantes e ativadores do receptor delta ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR-γ), molécula que regula a inflamação e ao ser ativada inibe o elemento de resposta nuclear NF-kB (NF-kB RE), suprimindo assim a produção de citocinas pró-

inflamatórias (IADECOLA et al., 2004; O'LEARY et al., 2004; CHI et al., 2001; SLIKA et al., 2022).

Países em desenvolvimento como o Brasil, utilizam as plantas medicinais como tratamento alternativo. O sistema público de saúde brasileiro oferece doze fitoterápicos como opções de tratamento, entre eles com ação anti-inflamatória: *Aloe vera* (Babosa), *Schinus terebenthifolius* (Aroeira) e *Uncaria tomentosa* (Unha-de-gato) (PINTO; FLOR et al., 2011; BRASIL, 2015; MARMITT et al., 2015). Entre as plantas medicinais usadas na região Amazônica encontra-se a espécie *Fridericia chica* (Bonpl.) L. G. Lohmann, pertencente à família Bignoniaceae, popularmente conhecida como crajiru, sendo tradicionalmente utilizadas principalmente por apresentar uma forte atividade anti-inflamatória e antioxidante (PAULETTI; BOLZANI; YOUNG, 2003; JORGE et al., 2008; MARTINS et al., 2016; MICHEL et al., 2015; RIBEIRO et al., 2018). Os indígenas da região Amazônica utilizam o corante preparado a partir das folhas de *Fridericia chica* na pintura corporal, para tingir enfeites, utensílios e vestuários, além de usarem contra picada de mosquito (método profilático) (BARBOSA et al., 2008). A coloração vermelha adquirida pelas folhas após a coleta deve-se a formação de 3-desoxiantocianidinas, entre elas carajurina (pigmento principal) e carajurona (ZORN et al., 2001).

A espécie *Fridericia chica* faz parte da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), o que favorece os direcionamentos das pesquisas para essa espécie (BRASIL, 2009). Embora a espécie *Fridericia chica* seja utilizada amplamente pela população e muitos estudos estejam investigando suas aplicações terapêuticas, novas pesquisas esclarecendo os mecanismos anti-inflamatórios e antioxidantes dos extratos dessa espécie, devem ser realizadas. Por isso, o objetivo principal deste trabalho é avaliar a ação anti-inflamatória e antioxidante dos extratos brutos (aquoso e em acetato de etila) da espécie *Fridericia chica* em cultura celular *in vitro*.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Artigo de revisão publicado na Revista *biomolecules*.

Review

Therapeutic Potential of Leaves from *Fridericia Chica* (Bonpl.) L. G. Lohmann: Botanical Aspects, Phytochemical and Biological, Anti-inflammatory, Antioxidant and Healing Action

Adriane Dâmares de Sousa Jorge Batalha [1], Damy Caroline de Melo Souza [1], Rosmery Duran Ubiera [1], Francisco Celio Maia Chaves [2], Wuelton Marcelo Monteiro [3,4], Felipe Moura Araújo da Silva [5], Hector Henrique Ferreira Koolen [3,6], Antônio Luiz Boechat [1,7] and Marco Aurélio Sartim [1,3,8,*]

[1]Basic and Applied Graduate Program—PPGIBA, Biological Science Institute, Federal University of Amazonas, 69080-900 Manaus, Brazil; adrianejorge87@hotmail.com (A.D.d.S.J.B.); damycaroline.96@gmail.com (D.C.d.M.S.); rosmeryduran_u05@hotmail.com (R.D.U.); antonioluiz.boechat@gmail.com (A.L.R.B.L.) [2]Embrapa Western Amazonia, 69010-970 Manaus, Brazil; celio.chaves@embrapa.br (F.C.M.C.) [3]Tropical Medicine Graduate Program, Amazonas State University -UEA, 69040-000 Manaus, Brazil; wueltonmm@gmail.com (W.M.M.); hectorkoolen@gmail.com (H.H.F.K.) [4]Tropical Medicine Foundation Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), 69040-000 Manaus, Brazil [5]Multidisciplinary Support Center, Federal University of Amazonas - UEA, 69080-900 Manaus, Brazil; felipemas@ufam.edu.br (F.M.A.S.) [6] Research Group in Metabolomics and Mass Spectrometry, Amazonas State University, 690065-130 Manaus, Brazil [7] Laboratory of Innovative Therapies, Department of Parasitology, Amazonas State University - UEA, 69080-900 Manaus, Brazil [8] Research & Development Department, Nilton Lins Foundation, 69058-030 Manaus, Brazil
***** Correspondence: marcosartim@hotmail.com

Citation: de Sousa Jorge Batalha, A.; de Melo Souza, D.; Ubiera, R.D.; Chaves, F.C.M.; Monteiro, W.M.; da Silva, F.M.A.; Koolen, H.H.F.; Boechat, A.L.; Sartim, M.A. Therapeutic Potential of Leaves from *Fridericia Chica* (Bonpl.) L. G. Lohmann: Botanical Aspects, Phytochemical and Biological, Anti-inflammatory, Antioxidant and Healing Action. *Biomolecules* **2022**, *12*, x. https://doi.org/10.3390/xxxxx

Academic Editor(s): Heping Cao; Vladimir N. Uversky

Received: 15 July 2022
Accepted: 26 August 2022
Published: date

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2022 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Abstract: Plants of the species *Fridericia chica* (Bonpl.) L. G. Lohmann (Bignoniaceae), which are widely distributed in Brazil and named crajiru in the state of Amazonas, are known in folk medicine as a traditional medicine in the form of a tea for the treatment of intestinal colic, diarrhea, and anemia, among other diseases. The chemical analysis of extracts of the leaves has identified phenolic compounds, a class of secondary metabolites that provide defense for plants and benefits to the health of humans. Several studies have shown the therapeutic efficacy of *F. chica* extracts, with antitumor, antiviral, wound healing, anti-inflammatory, and antioxidant activities being among the therapeutic applications already proven. The healing action of *F. chica* leaf extract has been demonstrated in several experimental models, and shows the ability to favor the proliferation of fibroblasts, which is essential for tissue repair. The anti-inflammatory activity of F. chica has been clearly demonstrated by several authors, who suggest that it is related to the presence of 3-deoxyanthocyanidins, which is capable of inhibiting pro-inflammatory pathways such as the kappa B (NF-kB) nuclear transcription factor pathway. Another important effect attributed to this species is the antioxidant effect, attributed to phenolic compounds interrupting chain reactions caused by free radicals and donating hydrogen atoms or electrons. In conclusion, the species *Fridericia chica* has great therapeutic potential, which is detailed in this paper with the objective of encouraging new research and promoting the sum of efforts for the inclusion of herbal medicines in health systems around the world.

Keywords: *Fridericia chica*; phytochemistry; anti-inflammatory; antioxidant; wound healing

1. Introduction

Fridericia chica (Bonpl.) L. G. Lohmann (Figure 1) is a liana or creeper that belongs to the family Bignoniaceae, which comprises about 120 genera and 800 species [1]. The largest number of species of this family is found mainly in tropical and subtropical regions, with Brazil and the African continent as the two major centers of geographical distribution. In Brazil, the species of the family Bignoniaceae do not have a unique habitat and are widely distributed in the region of the legal Amazon, as well as throughout the southern region of the country as far down as Rio Grande do Sul. In addition, plants of this family can be found in the Cerrado and Atlantic Forest biomes [2–4]. *F. chica* was first described by Cronquist [5] as *Arrabidaea chica*, belonging to the division Magnoliophyta, class Magnoliopsida, subclass Asteridae, order Scrophulariales, family bignoniaceae, and genus *Arrabidaea*. However, its classification has been altered due to recent taxonomic changes, such as the inclusion of several species of the genus *Arrabidaea* in the genus *Fridericia*. This change has affected the classification of its varieties *A. chica var. acutifolia* (DC.) Bureau, *A. chica var. angustifolia* Bureau & K. Schum, *A. chica var. cuprea* Bureau & K. Schum, *A. chica var. thyrsoidea* (DC.) Bureau and *A. chica var. viscida* Donn.Sm [6].

Botanically, *Fridericia chica* are described as woody, shrub-like, or arboreal plants, as well as climbing plants, with that leaves measure between 18-20 cm in length when mature. They have opposite crossed leaves, compound bi- or trifoliate, however, with the terminal foliole modified in tendrils in the elevated part of the branches. The folioles have an oblong-lanceolate shape, cartaceous, with an obtuse base, acute apex and herbaceous consistency. The surface of the folioles is smooth, and the rib is of the peninerveal type, i.e., the secondary ribs branch from the main rib [3,7–9]. The flowers are campanulate, resemble the shape of a bell, and have pink or violet coloration [10,11].

F. chica occurs in Central American countries, the Caribbean, and mainly in South American countries, such as Guyana and French Guiana, and especially in Brazil. In the latter it has wide geographical distribution, with confirmed occurrence in all regions and phytogeographic domains, including the Amazon, the Caatinga, the Cerrado, the Atlantic Forest, and the Pantanal biomes. With regard to the type of vegetation, *F. chica* can be found in floodplains or forests of various types, such as riparian, flooded forests, and terra firma, among others [6].

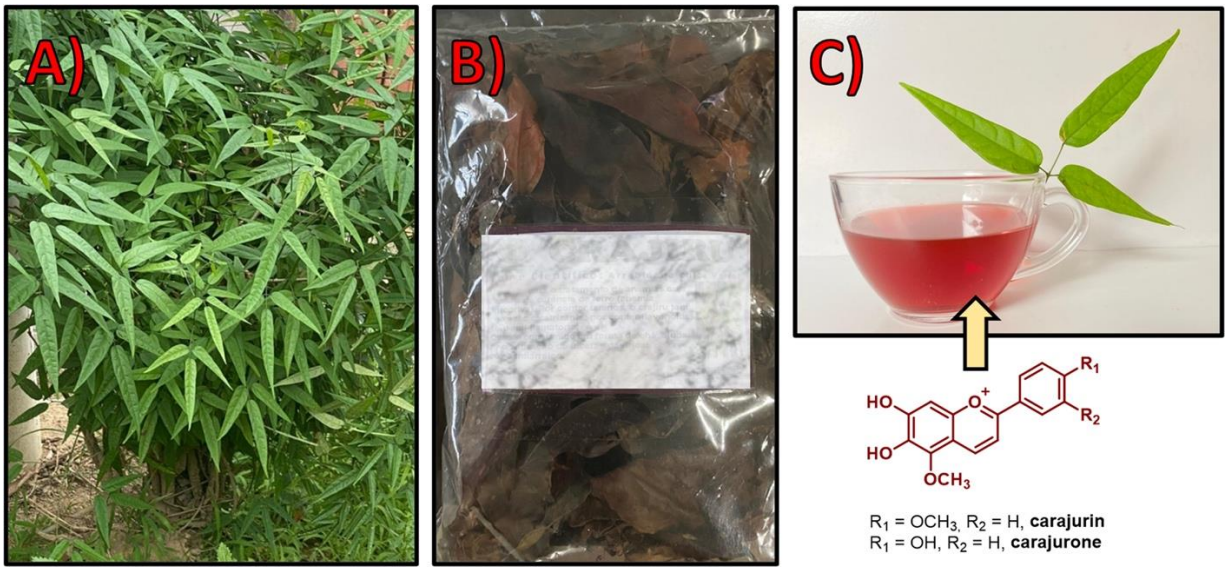


Figure 1. ***Fridericia chica*** **(Bonpl.) L. G. Lohmann: specimen and presentations forms A**) Arboreal specimen of adult *F.chica in situ* in the city of Manaus, Amazonas Brazil. **B**) Dried leaves of *F. chica* as marketed in the city of Manaus, Brazil. **C**) Tea obtained from the dried leaves of *F. chica* and its main compounds responsible for the characteristic color. Photos: Author.

2. Revision Strategy

An extensive literature review was carried out using different scientific electronic sources, including databases such as Scifinder, Pubmed, Scopus, Web of Science, and Google Scholar. The study databases included original papers published in peer reviewed journals, books, dissertations, and theses, and all data of scientific interest written or translated into English published prior to July 2022 was considered. The keywords "Arrabidae chica" and "Fridericia chica" alone and in combination with änflammation", inflammatory", änti-inflammatory", "oxidative stress", "antioxidant", "wound healing", and "healing". In addition, the names of all phytochemical compounds were used in the search.

3. Ethnobotany

In Brazil, *F. chica* is popularly known as cajuru, carajiru, carajunu, carajuru, chica, china, cipó-cruz, cipó-pau, coá-piranga, crajiru, crajuru, cuica, guajuru, guajuru-piranga, guarajuru, oajuru, oajuru-piranga, paripari, pariri, and piranga, among others [2,6,10]. Its mature leaves, collected from plants ranging from 50 cm to 2 m, are used in the form of tea (dried form), which has an astringent function and can be used against intestinal colic, diarrhea, anemia, uterine inflammation, hemorrhages, leukemia, jaundice, albuminuria, for vaginal hygiene via bathing, or in the form of tincture for topical use directly on skin lesions or even in ointments, creams [10,12], and in the form of soap with an antiacne effect [13]. It is used as an anti-inflammatory, antioxidant, antidiabetic medicine, and a disinfectant [3,10,14,15].

4. Chemical Composition

Chemically, *F. chica* is rich in polyphenols, especially flavonoids. Among the flavonoids, derivatives of the class of anthocyanins stand out, which in this plant are abundant in the form of 3-deoxyanthocyanins. These are involved in plant growth and development, including UV protection, stimulation of pollination and seed dispersal, and as a defense mechanism [16]. The 3-deoxyanthocyanins are the substances that give the tea its red color, especially the main compounds carajurin (**1**) and carajurone (**2**) [17], and to a lesser extent four other substances, 3′- hydroxy-carajurone (**3**), 3′-hydroxy-carajurin (**4**), 6,7,3′,4′-tetrahydroxy-5-methoxyflavylium (**5**), and 6,7,4′-trihydroxy-5-methoxyflavylium (**6**) [18]. Substances **1** and **2** were the first to be described in this species.

In addition to anthocyanidins, other flavonoids (aglycones and glycosides) have been isolated and/or characterized using high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (HPLC-MS) analysis, among them the flavones carajuflavone (**7**), luteolin (**8**) [13], chrysoeriol (**9**) [19], 4′-hydroxy-3,7-dimethoxyflavone (**10**) [20], 5,7-dimethoxy-4′-hydroxyflavone (**11**) [19], acacetin (**12**) [17], isoscutellarein (**13**), scutellarein (**14**), 6-hydroxyluteolin (**15**), hispidulin (**16**), apigenin (**17**) [21], thevetiaflavone (**18**) [13], cirsimarin (**19**) [19], apigenin 7-glucuronide (**20**), scutellarin (**21**) [22], chrysoeriol-*O*-glucoside (**22**) [19]. Flavonols are a more restricted group, being so far characterized as quercetin-*O*-gallate (**23**), kaempferol (**24**), isorhamnetin (**25**) hyperin 6″-gallate (**26**), quercetin-*O*-glucoside (**27**), and isorhamnetin-3-*O*-glucoside (**28**) [19]. The biflavonoid amentoflavone (**29**) and the flavans-3-ols catechin (**30**) and epicatechin (**31**) [19] are other flavonoid derivatives identified in *F. chica* (Figure 2).

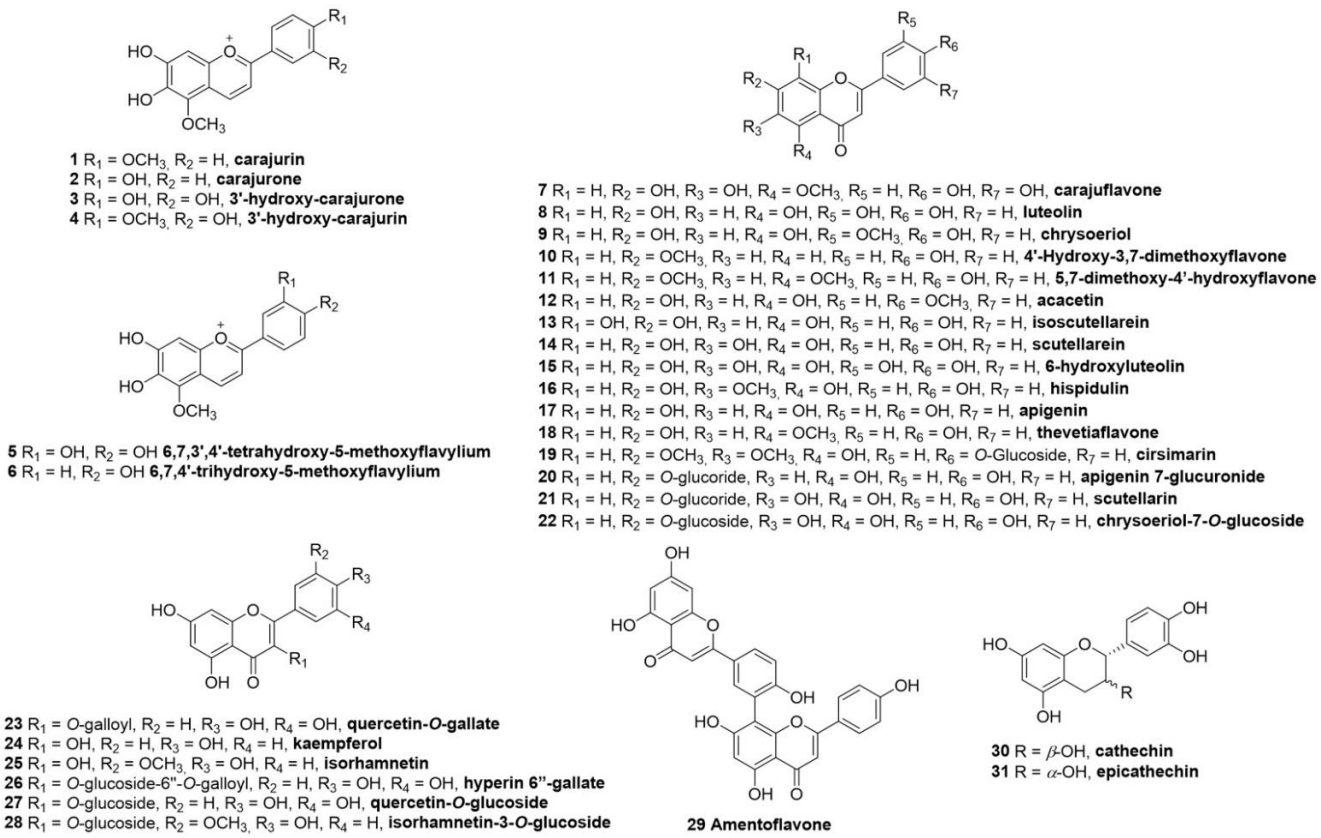


Figure 2. Polyphenols (**1**–**31**) of *F. chica*.

With respect to other classes of natural products, the characterization of terpenes, including carotenoids, and other classes such as fatty acids and their derivatives, tocochromanols and alkaloids, stands out. The diterpene phytol (**32**), the triterpene squalene (**33**), and the steroidal β-sitosterol (**34**) [23] are described as structures of a terpenic nature of up to 30 carbons described in *F. chica*. On the other hand, a number of tetraterpenes have been identified using HPLC-MS, among them the main compounds β-carotene (**35**), (all-*E*)-zeaxanthin (**36**), (all-*E*)-lutein (**37**), (all-*E*)-violaxathin (**38**), (13*Z*)-violaxathin (**39**), and (all-*E*)-luteoxanthin (**40**) [22]. In addition to antioxidant carotenoids, tocochromanol α-tocopherol (**41**) has been described as well [23]. Additionally, the identification of the fatty acid ethyl ester ethyl palmitate (**42**) has been reported [23], as has the alkaloid pheophorbide α (**43**) [24]. In Table 1, the 43 compounds already identified in *F. chica* and their biological activities already studied from these molecules alone (isolated from *F. chica* extract or other sources) are shown. It is worth noting that despite the tea being the most popular use of *F. chica*, phytochemical studies were focused on hydroalcoholic and/or organic extracts, possibly aiming for the enhancement of extraction yields. Moreover, tea preparations may contain the most polar compounds, specifically the positively charged 3-deaoxyanthocyanins, information that is corroborated by the bright red color of the dried leaf infusions. Thus, the composition of the extract is of great importance, as these compounds can exert pharmacological effects with summative, potentiating, or deleterious characteristics (Figure 3).

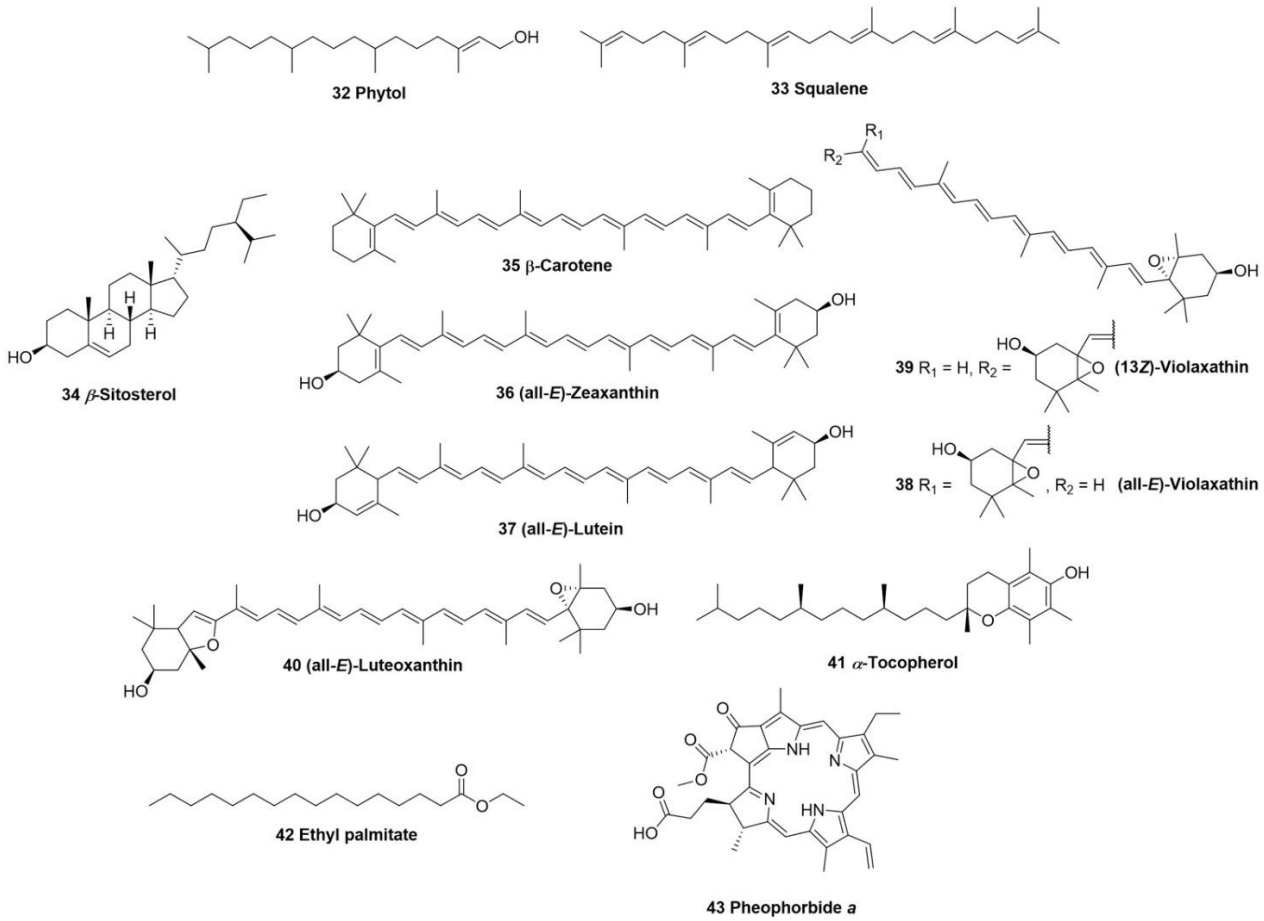


Figure 3. Terpenes (**32**–**40**), tocochromanol (**41**), fatty acid (**42**), and alkaloid (**43**) of *F. chica.*

Table 1. Phytochemical components of *F. chica* extracts and their biological activities.

Compound No.	Name	Source	Isolation/Detection	Biological Activity*
			Anthocyanins	
1	Carajurin	leaves, MeOH	Isolation [17]	Anti-inflammatory [17]
2	Carajurone	leaves, MeOH	Isolation [17]	N.A.
3	3′-Hydroxy-carajurone	leaves, MeOH	Isolation [17]	N.A.
4	3′-Hydroxy-carajurin	leaves, MeOH	Isolation [17]	N.A.
5	6,7,3′,4′-Tetrahydroxy-5-methoxyflavylium	leaves, DCM fraction	Isolation [18]	N.A.
6	6,7,4′-Trihydroxy-5-methoxyflavylium	leaves, DCM fraction	Isolation [18]	N.A.
			Flavones	
7	Carajuflavone	leaves, AcOEt fraction	Isolation [1]	N.A.
8	Luteolin	leaves, AcOEt fraction	Isolation [1]	Anti-inflammatory [25] Antioxidant [26]
9	Chrysoeriol	leaves, 70% EtOH	HPLC-MS detection [19]	Anti-inflammatory [27] Antioxidant [28]
10	4′-Hydroxy-3,7-dimethoxyflavone	leaves, EtOH	Isolation [20]	N.A.
11	5,7-dimethoxy-4′-hydroxyflavone	leaves, 70% EtOH	HPLC-MS detection [19]	N.A.
12	Acacetin	leaves, MeOH	Isolation [17]	Anti-inflammatory [29] Antioxidant [30]

13	Isoscutellarein	leaves, 90% EtOH	HPLC-MS detection [21]	Antioxidant [31]
14	Scutellarein	leaves, 90% EtOH	HPLC-MS detection, isolation [21]	Anti-inflammatory [32,33] Antioxidant [34]
15	6-Hydroxyluteolin	leaves, 90% EtOH	HPLC-MS detection [21]	N.A.
16	Hispidulin	leaves, 90% EtOH	HPLC-MS detection [21]	Anti-inflammatory [35,36] Antioxidant [37]
17	Apigenin	leaves, 90% EtOH	HPLC-MS detection, isolation [21]	Anti-inflammatory [38,39] Antioxidant [40] Healing [41]
18	Thevetiaflavone	leaves, AcOEt fraction	Isolation [1]	Antioxidant [42]
19	Cirsimarin	leaves, 70% EtOH	HPLC-MS detection [19]	Anti-inflammatory [43] Antioxidant [44] Healing [45]
20	Apigenin 7-glucuronide	leaves, 80% MeOH	HPLC-MS detection [22]	Anti-inflammatory [46] Antioxidant [47]
21	Scutellarin	leaves, 80% MeOH	HPLC-MS detection [22]	Anti-inflammatory [48] Antioxidant [34] Healing [49]
22	Chrysoeriol-*O*-glucoside	leaves, 70% EtOH	HPLC-MS detection [19]	N.A.
			Flavonols	
23	Quercetin-*O*-gallate	leaves, 70% EtOH	HPLC-MS detection [19]	N.A.
24	Kaempferol	leaves, 70% EtOH	HPLC-MS detection [19]	Anti-inflammatory [50,51] Antioxidant [31] Healing [52]
25	Isorhamnetin	leaves, 70% EtOH	HPLC-MS detection [19]	Anti-inflammatory [53] Antioxidant [54]
26	Hyperin 6”-gallate	leaves, 70% EtOH	HPLC-MS detection [19]	Antioxidant [55]
27	Quercetin-*O*-glucoside	leaves, 70% EtOH	HPLC-MS detection [19]	Antioxidant [56]
28	Isorhamnetin-3-*O*-glucoside	leaves, 70% EtOH	HPLC-MS detection [19]	Antioxidant [57]
			Flavone dimer	
29	Amentoflavone	leaves, 70% EtOH	HPLC-MS detection [19]	Anti-inflammatory [58] Antioxidant [59]
			Flavan-3-ols	
30	Catechin	leaves, 70% EtOH	HPLC-MS detection [19]	Anti-inflammatory [60] Anti-oxidant [61]
31	Epicatechin	leaves, 70% EtOH	HPLC-MS detection [19]	Anti-inflammatory [62] Antioxidant [63]
			Terpenes	
32	Phytol	leaves, 70% EtOH, hexane fraction	GC-MS detection [23]	Anti-inflammatory [64] Antioxidant [65]
33	Squalene	leaves, 70% EtOH, hexane fraction	GC-MS detection [23]	Antioxidant [66] Anti-inflammatory [67]
34	β-Sitosterol	leaves, 70% EtOH, hexane fraction	GC-MS detection [23]	Anti-inflammatory [68]

35	β-Carotene	leaves, acetone	HPLC-MS detection [22]	Anti-inflammatory [69] Antioxidant [69] Healing [70]
36	(all-*E*)-Zeaxanthin	leaves, acetone	HPLC-MS detection [22]	Anti-inflammatory [71] Antioxidant [72]
37	(all-*E*)-Lutein	leaves, acetone	HPLC-MS detection [22]	Anti-inflammatory [73] Antioxidant [74]
38	(all-*E*)-Violaxanthin	leaves, acetone	HPLC-MS detection [22]	Anti-inflammatory [75] Antioxidant [75]
39	(13*Z*)-Violaxanthin	leaves, acetone	HPLC-MS detection [22]	Antioxidant [76]
40	(all-*E*)-Luteoxanthin	leaves, acetone	HPLC-MS detection [22]	N.A.
		Tocochromanol		
41	*α*-Tocopherol	leaves, 70% EtOH, hexane fraction	GC-MS detection [23]	Antioxidant [77] Healing [78]
		Fatty acid		
42	Ethyl palmitate	leaves, 70% EtOH, hexane fraction	GC-MS detection [23]	Anti-inflammatory [79]
		Alkaloid		
43	Pheophorbide *a*	leaves, 90% EtOH	Isolation [24]	Anti-inflammatory [80] Antioxidant [81] Healing [82]

* Biological activities concern anti-inflammatory, antioxidant, and healing activity described in previous articles using the isolated components obtained from *F.chica* or other plants. N.A., not available.

5. Pharmacological Properties

Historically, plants have been an important source of active ingredients for drug development, and scientific research has been directed towards the prospect of new drugs based on natural products [83]. Thus, the connection between plants and health is responsible for the beginning of a new generation of therapy that integrates drugs derived from plants or the use of plants themselves or their parts [84]. The public health system in Brazil offers twelve herbal medicines as treatment options, among them several with anti-inflammatory potential, such as *Aloe vera*, *Schinus terebenthifolius*, and *Uncaria tomentosa* [85,86]. The use of plants as a medicine occurs in many traditional societies [87]; therefore, it is important to stimulate scientific studies that prove existing popular knowledge about plants and their effectiveness in the treatment of diseases [88]. In this sense, several studies have been carried out with different extracts of *F. chica* leaves in order to prove the effectiveness of the plant for the therapeutic purposes for which it is popularly used (Table 2).

Table 2. Pharmacological properties of extracts of *Fridericia chica*.

Authors	Type of study	Action	Etiological agent	Plant material/part	Treatment
[20]	In vitro study	Antifungal and antiprotozoal	Trichophyton mentagrophytes (fungus) and *Trypanosoma cruzi*	Ethanolic extract of leaves	4 mg/mL (trypanocide); 3.125 mg/mL (fungicide)
[89]	In vitro study	Antiprotozoal	*Leishmania amazonensis* and *Leishmania infantum*	Hexanic leaf extract	37.2 µg/mL (*L. amazonensis*); 18.6 µg/mL (*L. infantum*)
[90]	In vitro and in vivo study	Antiprotozoal and healing	*Leishmania amazonensi*; Swiss Webster mouse	Ethanolic extract of leaves and fractions	Leishmanicidal effect: 60–155.9 µg/mL; healing effect: 10 mg/g
[24]	In vitro study	Antiprotozoal	*Trypanosoma cruzi*	Hydroethanolic extract of leaves and fractions	24.8 µg/mL–213 µg/mL (hydroethanolic extract); 2.3 µg/mL–10 µg/mL (feoforbide-a)
[91]	In vivo Study	Antimicrobial	*Helicobacter pylori* 43,504 and *Enterococcus faecalis* 29,212	Hydroethanolic extract of leaves	12.5 µg/mL (*H. pylori*); 100 µg/mL (*E. faecalis*)

[92]	In vitro study	Antimicrobial	*Staphylococcus* sp.	Hydroalcoholic extract	250 µg gallic acid equivalent (GAE)/mL–MIC; 1000 µg GAE/mL–MBC
[93]	In vitro study	Antimicrobial	*Candida* sp.	Dichloromethane extract of leaves	0.007–0.03 mg/mL
[94]	In vitro study	Antiviral	aMPV cepa SHS/669/03	Ethanolic extract of leaves	2.5 µg/mL
[95]	In vitro study	Antiviral	Human Herpes Virus type 1 (HHV-1); murine Encephalomyocarditis virus (EMCV); Vaccinia Virus strain Western Reserve (VACV-WR)	Ethanolic extract of leaves	EC_{50}: 245.7 µg/mL (HHV-1); 86.3 µg/mL (VACV-WR)
[96]	In vivo study	Antitumor	Solid Ehrlich tumor	Ethanolic extract and aqueous extract of leaves	30 mg/kg body weight (10 days of oral treatment)
[97]	In vivo study	Antitumor	7,12-dimethyl injection-induced breast cancer-1,2-benzanthracene (DMBA)	Hydroalcoholic extract of leaves	Oral administration for 16 weeks: extract at a dose of 300 mg/kg; 7,12-dimethyl-1,2-benzanthracene (DMBA) associated with vincristine 250 µg /mL
[98]	In vitro study	Antitumor and fibroblast proliferation	Human tumor cell lines: MCF-7 (breast), NCI-ADR/RES (ovary with multiple drug resistance phenotype), UACC-62 (melanoma), NCI–h460 (lung), PC-3 (prostate), HT29 (colon), OVCAR-03 (ovary), 786-0 (kidney) and K562 (leukemia). Fibroblasts: obtained from 3T3 mice	Crude leaf extracts (without and with enzyme treatment)	0.25; 2.5 and 25 µg/mL without enzymatic treatment (fibroblast proliferation); 7.4 and 8.7 µg/mL with enzymatic treatment (cytostatic effect for UACC-62–melanoma lineage)
[99]	Survey of use by health professionals	Anti-inflammatory	Oral diseases	Leaves	Tea (no dose determined)
[19]	In vivo study	Analgesic and anti-inflammatory	Osteoarthritis induced by sodium monoiodoacetate	Hydroalcoholic extract of leaves	Oral administration s. i.d. for 25 days: 50 mg/kg, 150 mg/kg, 450 mg/kg
[100]	Survey of studies with herbal medicines	Anti-acne	Does not apply	Not mentioned	Not informed
[101]	Survey of traditional use	Treatment of skin irritation and healing	Measles and smallpox	Leaves	Infusion and bath (measles and smallpox); leaves macerated and applied to the affected area (lesions)
[102]	Review	Treatment of tuberculosis-related symptoms	Mycobacterium tuberculosis	Not specified	Not specified
[103]	Survey of traditional use	Anemia and weakness	Does not apply	Leaves	Not specified
[104]	In vivo study	Antihypertensive	Does not apply	Hydroalcoholic extract of leaves	Oral administration of the extract at doses of 100 mg/kg; 250 mg/ kg and 500 mg/kg
[105]	Survey of traditional use	(1) Anemia, weakness, restoration facial color in malaria patients; (2) ovarian cysts, cystitis, hepatitis, liver, diarrhea; (3) flu, cough, anemia; (4) aids getting pregnant, ulcers, (5) vaginal itching	Does not apply	Leaves	(1) maceration or tea; (2) tea or infusion; (3) syrup; (4) bottled; (5) bath. No dose determined
[21]	Ex vivo study	Photoprotection	Does not apply	Various parts	Topical application of nonionic cream with 2.5% ethylacetate fraction and 2.5% hexane fraction
[106]	In vitro study	Photosensitization	MCF-7 cells of human breast adenocarcinoma	Extract nanoemulsion produced from aerial parts	CC_{50}: 1.3 µg ACE/mL
[107]	In vitro study	Anti-hepatoxic	Does not apply	Leaves	0.25–1.25 mg/mL
[108]	In vivo study	Anti-hepatoxic	Carbon tetrachloride	Ethanolic extract of leaves	300, 500 and 600 mg/kg
[109]	In vitro study	Antioxidant	Free Radical DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylidazyl	Ethanolic extract of leaves and fractions	5, 10, 25, 50, 125 and 250 µg/mLin ethanol
[14]	In vitro study	Antioxidant	Free Radical DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylidazyl	Methanolic extract of leaves	0.25; 2.5; 25 and 250 µg/mL

Among biological effects from *F. chica* leaf extracts, anti-inflammatory, antioxidant, and healing properties are well evidenced from previous studies (Table 2), and result from the leaves' phytochemical composition. Studies have shown that the compounds identified in *F.chica* leaf extracts, as well as in

several other plants, are responsible for the above-mentioned pharmacological activities (Table 1) when evaluated in isolation (Table 1).

5.1. Healing Activity

The tissue repair process is divided into three successive and overlapping phases that present specific characteristics: (1) the inflammatory phase, (2) the proliferative phase, and (3) the remodeling phase. In the inflammatory phase, there is an increase in vascular permeability, which promotes chemotaxis and the consequent intense migration of leukocytes, mainly neutrophils and macrophages, to the site of tissue damage in response to the release of pro-inflammatory chemical mediators. The proliferative phase is characterized by the reconstitution of epithelial tissue, angiogenesis and migration of endothelial cells, granulation tissue formation, and extracellular matrix deposition, mainly collagen produced by activated fibroblasts. In the remodeling phase, the initial deposited collagen (type III) is degraded by collagenases and reabsorbed, and the gradual replacement of type III collagen by type I collagen occurs until the proportion found in healthy tissue is reached, providing reorganization of the extracellular matrix and marking the success of tissue repair [110,111].

Several herbal medicines have been explored in order to evaluate their action on tissue healing, mainly due to their lower cost and fewer observed adverse effects [112]. Tissue regeneration studies with *F. chica* leaves have addressed the action of different extracts and formulations in both in vitro and in vivo experiments using experimental animals in order to investigate different phases of the healing process. Among the main experimental procedures in the bioprospecting of new components with healing potential, cell proliferation assays using fibroblasts and the production of extracellular matrix components such as collagen are considered highly reliable models. Fibroblasts are connective tissue cells that are essential for the formation of the dermis and are responsible for structural firmness. After injury, fibroblasts proliferate and migrate to the injured site, where they produce a large amount of extracellular matrix material, such as type I and III collagen, which helps to isolate and repair the injured tissue. The use of a methanolic extract of *F. chica* leaves stimulates the growth of fibroblasts in vitro in a concentration-dependent manner and increases collagen production [14].

From this tissue regeneration property, several in vivo studies with experimental animals have been developed to evaluate the healing potential of *F. chica* in different tissue types. In treatment of gastric ulcers induced by ethanol and indomethacin in Wistar/Uni rats, administration of the hydroalcoholic extract of *F. chica* leaves reduced about 60% of lesions [113]. The methanolic extract administered orally was able to reduce up to 96% of the ulcerative effect of ethanol in a murine model [14]. The ethanol-induced model is associated with gastric mucosal injury induced by oxidative stress (via alcohol); thus, the gastroprotective effect of *F. chica* may occur via antioxidant action. In skin lesions of Swiss mice, treatment with ethanolic extract of *F. chica* leaves has not yet shown promising results. During 21 days of observation, it was found that the extract did not accelerate total tissue regeneration and presented a profile that was similar to the control group [90]. Other studies have investigated the effect of *F. chica* leaves on the healing process of tendon injuries in rats. Observed results included an increase in the total collagen content on the seventh and twenty-first day of the healing process, an increase in the synthesis of collagenase type IV (matrix metalloproteinase-2, an enzyme that participates in the extracellular matrix remodeling process), and better organization of collagen fibers. The treated groups presented a lower inflammatory reaction, which promoted the recovery of the injured animals' ability to walk [114,115].

In addition to the studies developed in different tissues, investigations of the healing properties of *Fridericia chica* have used different types of formulations for administration of the plant extract and for carrying out these studies. The choice of formulation is extremely important, as it influences the stability, distribution, solubility, bioavailability, and protection of the active compound. Topical formulations such as cream and gel containing *F. chica* leaf extract are being developed for the treatment of skin lesions [90,116]. For the treatment of gastric ulcers, a nanoformulation of *F. chica* extract has been elaborated in chitosan triphosphate-based nanoparticles for oral administration. Nanoformulation was responsible for a greater fibroblast proliferation effect, and the anti-ulcerogenic effect of *F. chica* leaf extract in a nanoformulation was more efficient compared to hydroalcoholic extract [113].

From the 43 compounds identified from *F.chica* leaves, seven molecules (comprising the classes of flavones, flavonols, terpenes, tochromanols, and alkaloids) have been described to present healing

properties when evaluated alone. Among them, kaempferol (compound 24—Table 1) is a flavonol which has been described as improving repair of diabetic excisional and nondiabetic incisional wounds in rats, working as an effective topical wound healing agent [52]. Another component present in F.chica leaf extract in considering amount is α-tocopherol (compound 41, Table 1), belonging to the tocochromanol class. Shuid and colleagues [78] evaluated the effects of α-tocopherol supplementation on osteoporotic fracture healing in a rat model, showing an improvement in fracture healing associated with the antioxidatant property. Other compounds have been shown to induce healing activity, such as apigenin (compound 17, Table 1), with anti-hyaluronidase and anti-collagenase activities [41], scutellarin (compound 21, Table 1) with angiogenic properties [49], and pheophorbide *a* (compound 43, Table 1), which decreased the length of the inflammation stage [82].

5.2. Anti-inflammatory Activity

Inflammation is defined as a protective response of the host to various interactions with the external environment. The assembly of this response requires the participation of cells and molecules, including macrophages and neutrophils, along with cytokines, such as interleukin (IL)-1β and IL-6 [117–121]. These cells recognize and discriminate stimuli as damage-associated molecular patterns (DAMPs) and pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) through pattern recognition receptors (PRR) [122]. The inflammatory response, despite being an effective defense mechanism, can occur in an exacerbated or perpetuated manner for a longer period of time than is necessary, causing important tissue damage and contributing to the development of diseases such as rheumatoid arthritis. [123,124].

The participation of inflammation in the pathophysiology of multiple diseases stimulates the constant development of anti-inflammatory drugs, and nature represents an important source of plants with therapeutic potential that needs to be explored [125,126]. Plants such as *Aloe vera* have demonstrated efficacy in controlling the inflammatory response and are considered by the Brazilian public health system as a treatment option [127]. Flavonoids, a class of secondary metabolites belonging to the group of phenolic compounds, are anti-inflammatory agents and can act to block arachidonic acid cascade through inhibition of the COX and lipoxygenase pathways [128,129]. The species *Fridericia chica* is used in traditional medicine as an anti-inflammatory agent, which has been confirmed in several studies using different extracts prepared from the leaves of this plant [15,17,130].

The chemical characterization of extracts of *F. chica* leaves has allowed the identification of 3-deoxyanthocyanidins, to which are attributed the greater part of the anti-inflammatory effect of this plant [4,17,18]. In 2001, Zorn et al. [17] demonstrated that both the lipophilic extract of *Fridericia chica* leaves (200 mg/mL) and one of its isolated components (carajurine) at a concentration of 500 μM had the ability to completely inhibit nuclear factor kappa B (NF-κB), which is responsible for the transcription of genes that encode several pro-inflammatory mediators and which participates in the pathogenesis of diseases such as multiple sclerosis [131–133]. Several authors have suggested that other unidentified substances present in the extract of *F. chica* leaves may contribute to the anti-inflammatory activity of this species [17].

Several models of inflammation have been used for the study of anti-inflammatory drugs, one of which is the experimental model of inflammation induced by snake venom. Its pathogenesis may involve the participation of the enzyme phospholipase A_2, which stimulates the release of arachidonic acid [134,135]. In 2009, Oliveira et al. [15] evaluated the anti-inflammatory effect of an aqueous extract of the leaves of *Fridericia chica* in mice inoculated with the venom of the snakes *Bothrops atrox* and *Crotalus durissus ruruima*, administered via the subcutaneous and intraperitoneal routes at different times. After treatment with the extract, it was possible to observe that it showed inhibitory activity, especially in the processes of myocytolysis and granulocyte migration, thus resulting in a decrease in inflammation. This effect is attributed to substances present in the extract, flavonoids among them.

The effectiveness of *Fridericia chica* leaves as an anti-inflammatory agent has been demonstrated in other models, such as inflammatory angiogenesis, which was induced in a murine model by a sponge implant (polyether-polyurethane) and in the proliferative process of human tumor cell lines in vitro, in which Michel et al. (2015) [130] observed a reduction in the amount of neutrophils at the site of the sponge implants and a great decrease in angiogenesis after treatment with aqueous and ethanolic extracts. Flavone escutelarin derivatives, found in the hydroethanolic extract of *Fridericia chica* leaves, have been

associated with a reduction of parameters linked to inflammatory response in the model of intestinal mucositis induced by 5-fluorouracil in a study by [136].

Among phytochemical compounds present in *F.chica* leaf extracts, 25 have been described as presenting anti-inflammatory behavior (Table 1). The anthocyanins comprise the class of most abundant compounds in *F.chica* leaves, with carajurin composing one of the major molecules found in extract of the leaves [17]. Carajurin (compound 1, Table 1) is capable of inhibiting transcription factor NF-κB, an important signaling pathway associated with pro-inflammatory response [17]. *F.chica* leaf extracts consist of a high range of flavonoid compounds, such as flavones and flavonols (Table 1). Regarding this class, the literature on their biological potentials is extensive, with a total of 14 flavonoids from *F.chica* leaf extracts having been shown to suppress inflammation through different cell signaling pathways. An example is luteolin (compound **8**, Table 1), a flavone which has been shown to interact with several inflammatory targets such as matrix metalloprotease 9 (MMP9) and mitogen-activated protein kinase 1 (MAPK1) [25]. Chrysoeriol (compound 9, Table 1), another flavone, ameliorates TPA-induced ear edema in mice, and its inhibition of JAK2/STAT3 and IκB/p65 NF-κB pathways is involved in the anti-inflammatory effects [27]. Hispidulin, a flavone found in a number of plants, among them in *F. chica*, was evaluated by Yu et al. (2020) [36] in relation to protection against neuroinflammation using the immortalized cell line of murine microglial BV2 (BV2 cells). Hispidulin has been shown to inhibit NO and ROS production, which suppressed the expression of the inflammation-related enzymes iNOS and COX-2 [137] in a dose-dependent manner. Corroborating these data, Torres et al. (2018) [138] showed a decrease in the enzymatic activity of lipoxygenase in the presence of ethanolic extract of *F. chica* leaves. They observed that treatment with hispidulin in the presence of LPS inhibited the production of TNF- α, IL-6, IL-1 β, and PGE2 in a dose-dependent manner. In addition, hispidulin showed activity in reducing NF-κB, and decreased the levels of phosphorylation of IκB kinase in BV2 cells. Based on the above examples, there is other evidence of the effect of the species *F. chica* leaves in the modulation of the cytokine profile, among them that demonstrated by Lima (2020) [139], which suggests an increase in the production of IL-10 and a decrease in the production of IL-1β in RAW 264.7 cells activated with LPS in the presence of a hydroethanolic extract of *F. chica*. The authors attributed this effect to 5 *O*-methylescutelarin, a derivative of the flavone escutelarin. The aforementioned studies corroborate the therapeutic potential described in traditional medicine for *F. chica*.

Despite being encountered in minor proportions in *F. chica*, terpenes may play roles in its biological activities, including in anti-inflammatory response. β-carotene (compound 35, Table 1) was capable of inhibiting LPS-stimulated Cox2, Nos2, and Tnfalpha gene expression from macrophages in vitro [69]. Another terpene, phytol (compound 32, Table 1), has been described as inducing anti-inflammatory activity in vitro and in vivo, with higher potency in the presence of others non-steroidal anti-inflammatories [64]. Among fatty acids, ethyl palmitate (compound 42, Table 1) reduced plasma levels of tumor necrosis factor-α (TNF-α) and IL-6, decreased NF-κB expression in liver and lung tissues, and ameliorated histopathological changes in an LPS-induced endotoxemia rat model [79]. The alkaloid pheophorbide *a* (compound 43, Table 1), was found to inhibit nitric oxide production and suppress the expression of iNOS proteins in LPS-stimulated macrophages [80].

5.3. Antioxidant Activity

The term oxidative stress, first proposed in 1985, refers to the imbalance between the production of oxidizing and antioxidant molecules; it favors oxidation reactions and compromises cell signaling and redox control [140–142]. The aforementioned changes result in excessive production of free radicals, which can contribute to the generation of reactive oxygen species, thus resulting in structural damage to biological systems [143–145]. Reactive species are defined as atoms, molecules, or ions resulting from oxygen, usually with a high reactivity capacity, which can cause damage to cellular constituents, such as lipid peroxidation and oxidation of DNA bases [146–149]. Free radicals and other reactive species are essential for cellular homeostasis, but when generated excessively they contribute to cellular aging and the development of diseases, as is observed in the development of hemolytic anemia due to deficiency of the enzyme glucose-6-phosphate dehydrogenase. In addition, oxidative stress is part of the pathophysiology of several chronic degenerative diseases, including cancer, diabetes, and hypertension [150–156].

Antioxidants are compounds that are capable of slowing, preventing, or removing damage caused by redox imbalance, and thereby regulating the development of oxidative stress [157]. The large number of adverse effects observed with the use of synthetic antioxidants have driven the search for other alternatives, among them substances isolated from natural products [158–160]. The main antioxidants present in plants are phenolic compounds, which represent a family of secondary metabolites with the property of interrupting chain reactions caused by free radicals by donating hydrogen atoms or electrons [161–163]. To this large group of compounds belong several of the flavonoids, which are present in medicinal plants such as the species *F. chica* [20,21,91,164–166].

The antioxidant potential of *F. chica* has already been evaluated in several studies. In 2012, Do Amaral et al. [109] identified the presence of phenolic compounds in an ethanolic extract of the leaves of this plant. In addition, Gemelli et al. (2015) [166] and Campos de Siqueira et al. (2019) [22] examined the antioxidant potential in the aqueous and hydroethanolic leaf extract, respectively. The anti-inflammatory property of 3-deoxyanthocyanidins, which are phenolic pigments with the ability to stabilize free radicals by donating hydrogen radicals, was proposed by Zorn et al. in 2001 [17]. However, the antioxidant capacity of these flavonoids was identified much later, by Do Amaral et al. in 2012 [109], and later confirmed by Dos Santos et al. in 2013 [166]. Another important finding was that reported by Olivero-Verbel et al. in 2021 [167], which suggests the ability of aqueous extract of *F. chica* leaves to induce nuclear translocation of DAF-16 in a prominent manner, thus suggesting the potential of this extract in the regulation of oxidative stress [17,22,109,166–168].

As already mentioned, flavonoids are phenolic compounds which have a great antioxidant potential. Among them are flavones, the antioxidant capacity of which is related to the presence of free hydroxyl groups in their A and B rings [161,162]. Luteolin (compound **8**—Table 1), one of the most abundant flavones, was identified by Do Amaral et al. (2012) [116], who evaluated the antioxidant activity of the ethanolic extract of *F. chica* leaves in the presence of the free radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil) using *Gingkgo bibola* as a positive control and demonstrated that the antioxidant capacity of *F. chica* extract is superior. This antioxidant effect was attributed mainly to the flavones luteolin and apigenin. In 2015, Gemelli et al. [168] confirmed the presence of luteolin in the aqueous extract of *F. chica* leaves and demonstrated its antioxidant potential by DNA damage assay in CHO cells (hamster ovary cells) [109,168].

The leaves of *Fridericia chica* have a high flavones content along with the presence of apigenin (compound 17, Table 1), with high antioxidant activity [40], as evidenced by Siraichi et al. in 2013 [21], confirming what had already been proposed by Do Amaral et al. in 2012 [109]. Other important flavone identified in the extract of *F. chica* leaves are scutellarin (compound 21, Table 1) and scutellarein (compound 14, Table 1), which are present in other medicinal plants such as *Scutellaria barbata* and *S. lateriflora*. Scutellarin is a glucoronid form of scutellarein, which means that although both molecules present antioxidant activity, the aglycone form (scutellarein) has a stronger activity [34]. The research of Campos de Siqueira et al. (2019) [22], who identified carotenoids such as β-carotene and α-carotene in a hydrometanolic extract of *F. chica*, was not the first time that escutelarin was identified in the species *F.a chica*, as in 2013 Siraichi et al. [21] attributed the antioxidant effect of the species to the presence of this flavone [21,22,109].

Terpenes are well known antioxidant agents, and have been shown to provide relevant protection under oxidative stress conditions. The terpene zeaxanthin (compound 36, Table 1) protects against chronic eye and cardiovascular diseases due its antioxidant property by directly quenching reactive oxygen species (ROS) and by facilitating glutathione synthesis [72]. Violaxanthin (compound 38, Table 1) possesses potent lipid peroxidation inhibitory activity [76]. Other compounds from different classes, such as α-Tocopherol and Pheophorbide *a* (compounds 41 and 43, respectively, in Table 1) have shown antioxidant activity as well, and are present in others plant species [77; 81].

Martins et al., in 2016 [169] and Ribeiro et al., working in 2018 [170], demonstrated the antioxidant capacity of a hydroethanolic extract of *Fridericia chica* in the presence of both the free radical DPPH and the oxidative damage induced by ultraviolet radiation. The use of several methodologies to evaluate the effects of *F. chica* extracts for the control of oxidative stress allowed for a more complete view of this mechanism. Other authors, such as Torres et al. in 2018 [138] and Teixeira et al. in 2017 [171], have included other free radical neutralization assays, such as ABTS (2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) and FRAP (ferric reducing antioxidant power), thus reaffirming the biological effects of *F. chica* [138,169–171].

In 2009, the Brazilian Ministry of Health published a list of 71 species that are part of the Report on Medicinal Plants of Interest to the SUS (RENISUS); *F. chica* is among them due to the large amount of scientific evidence pointing to its different biological effects [172,173]. One of the most important biological effects of this species is the antioxidant effect, which can contribute to the control and prevention of degenerative diseases, as already mentioned. Encouraging the development of research related to *F. chica* is be essential for its inclusion in the list of herbal medicines prescribed within the Brazilian health services, through which twelve herbal medicines are already available that are part of the National List of Essential Medicines (RENAME) [127].

6. Conclusions

The World Health Organization (WHO) has encouraged the inclusion of medicinal plants in primary health care networks, and in Brazil their use is regulated by the National Health Surveillance Agency (ANVISA). The public health system of Brazil has offered herbal medicines since 2007, and 12 herbal medicines have been made available in the public network by the Ministry of Health (MS). The species *Fridericia chica* (Bonpl.) L. G. Lohmann is traditionally used in folk medicine, especially in the Amazon region, and is part of the 71 species of interest to the SUS (Brazilian public health system). Among these species, *Aloe vera*, *Schinus terebenthifolius*, and *Uncaria tomentosa* are used as commercial herbal pharmaceutical formulations in the Brazilian Health System. *Schinus terebenthifolius* has healing and anti-inflammatory action and is used as an antiseptic topical for gynecological applications, available in the forms of cream and ovules. *Uncaria tomentosa* is indicated as an assistant in cases of arthritis and osteoarthritis thanks its anti-inflammatory and immunomodulatory activity, and is available in capsule, pill, and gel forms. *Aloe vera* is indicated for the topical treatment of first and second degree burns and as an adjunct in cases of psoriasis vulgaris, and is available in cream form [85]. Therefore, the present review indicates the potential inclusion of *F.chica* on the list of herbal medicines prescribed within the scope of Brazilian Health System services, as the extract can be used in different pharmacological formulations such as topical or oral administrations in order to treat diseases associated with inflammatory response and wounded tissue.

Scientific evidence indicates the different biological effects of *F. chica*, which proves the therapeutic effect of this species in folk medicine, which is explained especially by the presence of a wide range of biologically active compounds that are known from other plant species. The present review has shown that from all compounds identified in *F.chica* leaf extract, over 70% are known to exert anti-inflammatory, antioxidant, and/or healing properties based on previous studies. Therefore, the pharmacological properties of *F.chica* leaf extract are directly associated with the phytochemical composition, with different molecules working in association in order to observe the conclusive therapeutical potential. Although carajurin is found as the major component of the extract with anti-inflammatory activity, its synergism with other less abundant components is important to the overall pharmacological properties of the extract. Therefore, the proportion of every molecule within the extract and its biological potency should be more closely investigated. It is of great importance to encourage more studies related to the chemical profile, standardization of extracts, and proof of pharmacological activities of *F. chica*. Concerning the traditional use of *F.chica* leaf extract as tea, more studies should be performed in order to evaluate the phytochemical composition of aqueous infusions, considering that almost all studies on leaves have used extract compositions with other types of solvents. New research needs to be developed in order to add scientific evidence that favors the use of this and other medicinal species, both in Brazil and in other regions of the world.

The scientific investigations cited in this study contribute to the construction of arguments, providing a solid basis to attribute anti-inflammatory, antioxidant, and healing properties to *Fridericia chica*, thus demonstrating the scientific bases that justify its use in traditional medicine.

Author Contributions: M.A.S., A.D.d.S.J.B. and D.C.d.M.S. conceived the main idea and designed the topics. A.D.d.S.J.B., D.C.d.M.S. and R.D.U. conducted the bibliography search. A.D.d.S.J.B., D.C.d.M.S., R.D.U., F.C.M.C., W.M.M., F.M.A.d.S., H.H.F.K., A.L.R.B.L. and M.A.S. wrote the review. A.D.d.S.J.B., D.C.d.M.S., H.H.F.K. and M.A.S. designed the figures and tables of this review. FCMC, WMM, FMAS, HHFK, ALRBL and MAS revised and edited the manuscript. All authors listed have made a substantial intellectual contribution to the work and approved it for publication.

Funding: The following agencies founded the present work: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) for the funding, CT&I Priority Areas Call FAPEAM 010/2021 for MAS and HHFK, and HHFK's research under the Universal Call FAPEAM-006/2019. HHFK and WMM acknowledge FAPEAM for funding via the calls PAPAC 005/2019, PRO-ESTADO- 002/2008; 007/2018; 005/2019 and POSGRAD 2020-2021.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors would also like to thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the payment of scholarships to MAS (No. 163843/2020-1), WM (No. 309207/2020-7) and HK (No. 305942/2020-4).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Takemura, O.S.; Iinuma, M.; Tosa, H.; Miguel, O.G.; Moreira, E.A.; Nozawa, Y. A flavone from leaves of Arrabidaea chica f. cuprea. *Phytochemistry* **1995**, *38*, 1299–1300.
2. Pauletti, P.M.; Bolzani, V.S.; Young, M.C.M. Chemical constituents of Arrabidaea samydoides (Bignonia-ceae). *Química Nova* **2003**, *26*, 641–643.
3. Lorenzi, H.; Matos, F.J. *Plantas Medicinais No Brasil: Nativas e Exóticas*; Instituto Plantarum de Estudos da Flora: São Paulo, Brazil, 2002; p. 512.
4. Chapman, E.; Perkin, A.G.; Robinson, R. The colouring matters of carajura. *J. Chem. Soc.* **1927**, *49*, 3015.
5. Cronquist, A. *An Integrated System of Classification of Flowering Plants*; Columbia University Press: New York, NY, USA, 1981; pp. 248–250.
6. Lohmann, L.G. *Bignoniaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil*; Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de janeiro, Brazil: 2015.
7. Behrens, M.D.; Tellis, C.J.M. Arrabidaea chica (Humb. & Bonpl.) B. Verlot (Bignoniaceae). *Revista Fitos* **2012**, *7*, 236–244.
8. Joly, A.B. *Botânica: Introdução à Taxonomia Vegetal*; Editora Nacional: São Paulo, Brazil, 1993; p. 776.
9. Puhl, M.C.M.N.; Milaneze-Gutierre, M.A.; Nakamura, C.V.; Cortez, D.A.G. Morpho-anatomy of leaves and young stems of Arrabidaea chica (Humb. & Bonpl.) B. Verl. (Bignoniaceae). *Lat. Am. J. Pharm.* **2007**, *26*, 224–229.
10. Corrêa, M.P.; Pena, L.A. *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas*; Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal: Rio de Janeiro, Brazil, 1984; pp. 1974–1934.
11. Ferreira, F.A.G.; Carvalho, C.M.; Costa, J.C.; Ferreira, J.M.R.; Silva, F. Comprovação do potencial medici-nal de Arrabidaea chica (Bignoniaceae). *Sci. Prima* **2013**, *1*, 1–6.
12. Borrás, M.R.L. *Plantas da Amazônia: Medicinais ou Mágicas—Plantas Comercializadas no Mercado Municipal Adolpho Lisboa*; Editora Valer, Governo do Estado do Amazonas, Manaus; Manaus, Brazil, 2003; p. 322.
13. Moreira, L.S.; Silva, S.A. Ação Inibitória do Crajiru Arrabdaea chica (Humb&Bonpl.) B.Verlt Sobre Staphylococcus sp como Microoganismo Oportunista no Tratamento da Acne Vulgar. *Revista Olhar Científico* **2016**, 2, 210.
14. Jorge, M.P.; Madjarof, C.; Gois Ruiz, A.L.; Fernandes, A.T.; Ferreira Rodrigues, R.A.; de Oliveira Sousa, I.M.; Foglio, M.A.; de Carvalho, J.E. Evaluation of wound healing properties of Arrabidaea chica Verlot extract. *J. Ethnopharmacol.* **2008**, *118*, 361–366.
15. Oliveira, D.P.C.; Borrás, M.R.L.; Ferreira, L.C.L.; López-Lozano, J.L. Anti-inflammatory activity of the aqueous extract of Arrabidaea chica (Humb. & Bonpl.) B. Verl. on the self-induced inflammatory process from venoms amazonians snakes. *Rev. Bras. de Farmacogn.* **2009**, *19*, 643–649.
16. Buer, C.S.; Imin, N.; Djordjevic, M.A. Flavonoids: New roles for old molecules. *J. Integr. Plant Biol.* **2010**, *52*, 98–111.
17. Zorn, B.; García-Piñeres, A.J.; Castro, V.; Murillo, R.; Mora, G.; Merfort, I. 3-Desoxyanthocyanidins from Ar-rabidaea chica. *Phytochemistry* **2001**, *56*, 831–835.
18. Devia, B.; Llabres, G.; Wouters, J.; Dupont, L.; Escribano-Bailon, M.T.; de Pascual-Teresa, S.; Angenot, L.; Tits, M. New 3-deoxyanthocyanidins from leaves of Arrabidaea chica. *Phytochem. Anal. PCA* **2002**, *13*, 114–120.
19. Vasconcelos, C.C.; Lopes, A.; Sousa, E.; Camelo, D.S.; Lima, F.; Rocha, C.; Silva, G.; Garcia, J.; Cartágenes, M. Effects of Extract of Arrabidaea chica Verlot on an Experimental Model of Osteoarthritis. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 4717.
20. Barbosa, W.L.R.; Pinto, L.N.; Quignard, E.; Vieira, J.M.S.; Silva-Júnior, O.C.; Albuquerque, S. Arrabidaea chica (HBK) Verlot: Phytochemical approach, antifungal and trypanocidal activities. *Braz. J. Pharmacogn.* **2008**, *18*, 544–548.
21. Siraichi, J.T.; Felipe, D.F.; Brambilla, L.Z.; Gatto, M.J.; Terra, V.A.; Cecchini, A.L.; Cortez, L.E.; Ro-drigues-Filho, E.; Cortez, D.A. Antioxidant capacity of the leaf extract obtained from Arrabidaea chica cultivat-ed in Southern Brazil. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e72733.
22. de Siqueira, F.C.; Leitão, D.D.S.T.C.; Mercadante, A.Z.; Chiste, R.C.; Lopes, A.S. Profile of phenolic compounds and carotenoids of Arrabidaea chica leaves and the in vitro singlet oxygen quenching capacity of their hydrophilic extract. *Food Res. Int.* **2019**, *126*, 108597.

23. Vasconcelos, C.C.; Lopes, A.; de Jesus Garcia Ataide, E.; Carvalho, K.; de Brito, M.; Rodrigues, M.S.; de Mo-rais, S.V.; Silva, G.; da Rocha, C.Q.; Garcia, J.; et al. Arrabidaea chica Verlot fractions re-duce MIA-induced osteoarthritis progression in rat knees. *Inflammopharmacology* **2021**, *29*, 735–752.
24. Miranda, N.; Gerola, A.P.; Novello, C.R.; Ueda-Nakamura, T.; de Oliveira Silva, S.; Dias-Filho, B.P.; Hioka, N.; de Mello, J.; Nakamura, C.V. Pheophorbide a, a compound isolated from the leaves of Arrabidaea chica, induces photodynamic inactivation of Trypanosoma cruzi. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2017**, *19*, 256–265.
25. Huang, X.F.; Zhang, J.L.; Huang, D.P.; Huang, A.S.; Huang, H.T.; Liu, Q.; Liu, X.H.; Liao, H.L. A net-work pharmacology strategy to investigate the anti-inflammatory mechanism of luteolin combined with in vitro transcriptomics and proteomics. *Int. Immunopharmacol.* **2020**, *86*, 106727.
26. Zhang, Y.C.; Gan, F.F.; Shelar, S.B.; Ng, K.Y.; Chew, E.H. Antioxidant and Nrf2 inducing activities of luteolin, a flavonoid constituent in Ixeris sonchifolia Hance, provide neuroprotective effects against ischemia-induced cellular injury. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* **2013**, *59*, 272–280.
27. Wu, J.Y.; Chen, Y.J.; Bai, L.; Liu, Y.X.; Fu, X.Q.; Zhu, P.L.; Li, J.K.; Chou, J.Y.; Yin, C.L.; Wang, Y.P.; et al. Chrysoeriol ameliorates TPA-induced acute skin inflammation in mice and inhibits NF-κB and STAT3 pathways. *Phytomedicine Int. J. Phytother. Phytopharm.* **2020**, *68*, 153173.
28. Nickavar, B.; Rezaee, J.; Nickavar, A. Effect-Directed Analysis for the Antioxidant Compound in Salvia verticil-lata. *Iran. J. Pharm. Res. IJPR* **2016**, *15*, 241–246.
29. Huang, W.C.; Liou, C.J. Dietary acacetin reduces airway hyperresponsiveness and eosinophil infiltration by modulating eotaxin-1 and th2 cytokines in a mouse model of asthma. *Evid. Based Complementary Alterna-Tive Med. eCAM.* **2012**, *2012*, 910520.
30. More, G.; Lall, N.; Hussein, A.; Tshikalange, T.E. Antimicrobial Constituents of Artemisia afra Jacq. ex Willd. against Periodontal Pathogens. *Evid. -Based Complementary Altern. Med. eCAM* **2012**, *2012*, 252758.
31. Sarian, M.N.; Ahmed, Q.U.; Mat So'ad, S.Z.; Alhassan, A.M.; Murugesu, S.; Perumal, V.; Syed Mohamad, S.; Khatib, A.; Latip, J. Antioxidant and Antidiabetic Effects of Flavonoids: A Structure-Activity Relationship Based Study. *BioMed Res. Int.* **2017**, *2017*, 8386065.
32. Pandith, H.; Zhang, X.; Thongpraditchote, S.; Wongkrajang, Y.; Gritsanapan, W.; Baek, S.J. Effect of Siam weed extract and its bioactive component scutellarein tetramethyl ether on anti-inflammatory activity through NF-κB pathway. *J. Ethnopharmacol.* **2013**, *147*, 434–441.
33. Lin, Y.; Ren, N.; Li, S.; Chen, M.; Pu, P. Novel anti-obesity effect of scutellarein and potential underlying mechanism of actions. *Biomed. Pharmacother.* **2019**, *117*, 109042.
34. Liu, Q.; Li, X.; Ouyang, X.; Chen, D. Dual Effect of Glucuronidation of a Pyrogallol-Type Phytophenol Antiox-idant: A Comparison between Scutellarein and Scutellarin. *Molecules* **2018**, *23*, 3225.
35. Ana Silvia, G.R.; Gabriela, T.T.; Maribel, H.R.; Nayeli, M.B.; José Luis, T.E.; Alejandro, Z.; Manasés, G.C. Effect of Terpenoids and Flavonoids Isolated from Baccharis conferta Kunth on TPA-Induced Ear Edema in Mice. *Molecules* **2020**, *25*, 1379.
36. Yu, C.I.; Cheng, C.I.; Kang, Y.F.; Chang, P.C.; Lin, I.P.; Kuo, Y.H.; Jhou, A.J.; Lin, M.Y.; Chen, C.Y.; Lee, C.H. Hispidulin Inhibits Neuroinflammation in Lipopolysaccharide-Activated BV2 Microglia and Attenu-ates the Activation of Akt, NF-κB, and STAT3 Pathway. *Neurotox. Res.* **2020**, *38*, 163–174.
37. Dabaghi-Barbosa, P.; Mariante Rocha, A.; Franco da Cruz Lima, A.; Heleno de Oliveira, B.; Benigna Martinelli de Oliveira, M.; Gunilla Skare Carnieri, E.; Cadena, S.M.; Eliane Merlin Rocha, M. Hispidulin: Antioxidant properties and effect on mitochondrial energy metabolism. *Free. Radic. Res.* **2005**, *39*, 1305–1315.
38. Lee, J.H.; Zhou, H.Y.; Cho, S.Y.; Kim, Y.S.; Lee, Y.S.; Jeong, C.S. Anti-inflammatory mechanisms of apig-enin: Inhibition of cyclooxygenase-2 expression, adhesion of monocytes to human umbilical vein endothelial cells, and expression of cellular adhesion molecules. *Arch. Pharmacal Res.* **2007**, *30*, 1318–1327.
39. Funakoshi-Tago, M.; Nakamura, K.; Tago, K.; Mashino, T.; Kasahara, T. Anti-inflammatory activity of structur-ally related flavonoids, Apigenin, Luteolin and Fisetin. *Int. Immunopharmacol.* **2011**, *11*, 1150–1159.
40. Fidelis, Q.C.; Faraone, I.; Russo, D.; Aragão Catunda-Jr, F.E.; Vignola, L.; de Carvalho, M.G.; de Tommasi, N.; Milella, L. Chemical and Biological insights of Ouratea hexasperma (A. St.-Hil.) Baill.: A source of bioactive compounds with multifunctional properties. *Nat. Prod. Res.* **2019**, *33*, 1500–1503.
41. Süntar, I.; Küpeli Akkol, E.; Keles, H.; Yesilada, E.; Sarker, S.D. Exploration of the wound healing potential of Helichrysum graveolens (Bieb.) Sweet: Isolation of apigenin as an active component. *J. Ethnopharmacol.* **2013**, *149*, 103–110.
42. Yao, H.; Yuan, Z.; Wei, G.; Chen, C.; Duan, J.; Li, Y.; Wang, Y.; Zhang, C.; Liu, Y. Thevetiaflavone from Wikstroemia indica ameliorates PC12 cells injury induced by OGD/R via improving ROS mediated mitochondrial dysfunction. *Mol. Med. Rep.* **2017**, *16*, 9197–9202.
43. Han, H.S.; Shin, J.S.; Lee, S.B.; Park, J.C.; Lee, K.T. Cirsimarin, a flavone glucoside from the aerial part of Cirsium japonicum var. ussuriense (Regel) Kitam. ex Ohwi, suppresses the JAK/STAT and IRF-3 signaling pathway in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Chem. Interact.* **2018**, *293*, 38–47.
44. Zhang, E.; Wang, Y.; Xie, F.; Zhuang, X.; Wang, X.; Yu, X. Development and Validation of a UPLC-MS/MS Method for the Quantitative Determination and Pharmacokinetic Analysis of Cirsimarin in Rat Plasma. *BioMed Res. Int.* **2021**, *2021*, 9953664.
45. Serpeloni, J.M.; Oliveira, L.; Fujiike, A.; Tuttis, K.; Ribeiro, D.L.; Camara, M.; Rocha, C.; Cólus, I. Flavone cirsimarin impairs cell proliferation, migration, and invasion in MCF-7 cells grown in 2D and 3D models. *Toxicology* **2022**, *83*, 105416.
46. Hu, W.; Wang, X.; Wu, L.; Shen, T.; Ji, L.; Zhao, X.; Si, C.L.; Jiang, Y.; Wang, G. Apigenin-7-O-β-D-glucuronide inhibits LPS-induced inflammation through the inactivation of AP-1 and MAPK signaling path-ways in RAW 264.7 macrophages and protects mice against endotoxin shock. *Food Funct.* **2016**, *7*, 1002–1013.

47. Li, S.; Xu, T.; Liu, S.; Liu, Z.; Pi, Z.; Song, F.; Jin, Y. Exploring the potential pharmacodynamic material basis and pharmacologic mechanism of the Fufang-Xialian-Capsule in chronic atrophic gastritis by network pharma-cology approach based on the components absorbed into the blood. *R. Soc. Open Sci.* **2018**, *5*, 171806.
48. Luo, Z.; Hu, Z.; Bian, Y.; Su, W.; Li, X.; Li, S.; Wu, J.; Shi, L.; Song, Y.; Zheng, G. et al. Scutellarin Attenuates the IL-1β-Induced Inflammation in Mouse Chondrocytes and Prevents Osteoarthritic Progression. *Front. Pharmacol.* **2020**, *11*, 107.
49. Gao, Z.X.; Huang, D.Y.; Li, H.X.; Zhang, L.N.; Lv, Y.H.; Cui, H.D.; Zheng, J.H. Scutellarin promotes in vitro angiogenesis in human umbilical vein endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, *400*, 151–156.
50. Kadioglu, O.; Nass, J.; Saeed, M.E.; Schuler, B.; Efferth, T. Kaempferol Is an Anti-Inflammatory Compound with Activity towards NF-κB Pathway Proteins. *Anticancer. Res.* **2015**, *35*, 2645–2650.
51. Park, M.Y.; Ji, G.E.; Sung, M.K. Dietary kaempferol suppresses inflammation of dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Dig. Dis. Sci.* **2012**, *57*, 355–363.
52. Özay, Y.; Güzel, S.; Yumrutaş; Ö; Pehlivanoğlu, B.; Erdoğdu, İ.H.; Yildirim, Z.; Türk, B.A.; Darcan, S. Wound Healing Effect of Kaempferol in Diabetic and Nondiabetic Rats. *J. Surg. Res.* **2019**, *233*, 284–296.
53. Chirumbolo, S. Anti-inflammatory action of isorhamnetin. *Inflammation* **2014**, *37*, 1200–1201.
54. Bakır, T.; Sönmezoğlu, I.; Imer, F.; Apak, R. Antioxidant/prooxidant effects of α-tocopherol, quercetin and iso-rhamnetin on linoleic acid peroxidation induced by Cu(II) and H2O2. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2014**, *65*, 226–234.
55. Marzouk, M.S.; Moharram, F.A.; Haggag, E.G.; Ibrahim, M.T.; Badary, O.A. Antioxidant flavonol glycosides from Schinus molle. *Phytother. Res.* **2006**, *20*, 200–205.
56. Lesjak, M.; Beara, I.; Simin, N.; Pintać; D; Majkić; T; Bekvalac, K.; Orčić; D; Mimica-Dukić; N Antioxidant and anti-inflammatory activities of quercetin and its derivatives. *J. Funct. Foods* **2018**, *40*, 68–75.
57. Kim, J.S.; Kwon, Y.S.; Sa, Y.J.; Kim, M.J. Isolation and identification of sea buckthorn (Hippophae rhamnoides) phenolics with antioxidant activity and α-glucosidase inhibitory effect. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 138–144.
58. Zhang, Z.; Sun, T.; Niu, J.G.; He, Z.Q.; Liu, Y.; Wang, F. Amentoflavone protects hippocampal neurons: Anti-inflammatory, antioxidative, and antiapoptotic effects. *Neural Regen. Res.* **2015**, *10*, 1125–1133.
59. Bajpai, V.K.; Park, I.; Lee, J.; Shukla, S.; Nile, S.H.; Chun, H.S.; Khan, I.; Oh, S.Y.; Lee, H.; Huh, Y.S; et al. Anti-oxidant and antimicrobial efficacy of a biflavonoid, amentoflavone from Nandina domestica in vitro and in minced chicken meat and apple juice food models. *Food Chem.* **2019**, *271*, 239–247.
60. Sánchez-Fidalgo, S.; da Silva, M.S.; Cárdeno, A.; Aparicio-Soto, M.; Salvador, M.J.; Frankland Sawaya, A.C.; Souza-Brito, A.R.; de la Lastra, C.A. Abarema cochliacarpos reduces LPS-induced inflammatory response in murine peritoneal macrophages regulating ROS-MAPK signal pathway. *J. Ethnopharmacol.* **2013**, *149*, 140–147.
61. Pereira, R.B.; Sousa, C.; Costa, A.; Andrade, P.B.; Valentão, P. Glutathione and the antioxidant potential of binary mixtures with flavonoids: Synergisms and antagonisms. *Molecules* **2013**, *18*, 8858–8872. https://doi.org/10.3390/molecules18088858.
62. Vasconcelos, P.C.D.P.; Seito, L.N.; Di Stasi, L.C.; Akiko Hiruma-Lima, C.; Pellizzon, C.H. Epicatechin used in the treatment of intestinal inflammatory disease: An analysis by experimental models. *Evid. -Based Complementary Altern. Med.* **2012**, *2012*, 508902.
63. Yadav, R.; Kumar, D.; Kumari, A.; Yadav, S.K. Encapsulation of catechin and epicatechin on BSA NPS im-proved their stability and antioxidant potential. *EXCLI J.* **2014**, *13*, 331–346.
64. Islam, M.T.; Ayatollahi, S.A.; Zihad, S.; Sifat, N.; Khan, M.R.; Paul, A.; Salehi, B.; Islam, T.; Mubarak, M.S.; Martins, N.; et al. Phytol anti-inflammatory activity: Pre-clinical assessment and possible mechanism of action elucidation. *Cell. Mol. Biol.* **2020**, *66*, 264–269.
65. Santos, C.C.; Salvadori, M.S.; Mota, V.G.; Costa, L.M.; de Almeida, A.A.; de Oliveira, G.A.; Costa, J.P.; de Sousa, D.P.; de Freitas, R.M.; de Almeida, R.N. Antinociceptive and Antioxidant Activities of Phytol In Vivo and In Vitro Models. *Neurosci. J.* **2013**, *2013*, 949452.
66. Amarowicz, R. Squalene: A natural antioxidant? *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2009**, *111*, 411–412.
67. Cárdeno, A.; Aparicio-Soto, M.; Montserrat-de la Paz, S.; Bermudez, B.; Muriana, F.J.G.; Alarcón-de-la-Lastra, C. Squalene targets pro- and anti-inflammatory mediators and pathways to modulate over-activation of neutrophils, monocytes and macrophages. *J. Funct. Foods* **2015**, *14*, 779–790.
68. Loizou, S.; Lekakis, I.; Chrousos, G.P.; Moutsatsou, P. Beta-sitosterol exhibits anti-inflammatory activity in human aortic endothelial cells. *Mol. Nutr. Food Res.* **2010**, *54*, 551–558.
69. Kawata, A.; Murakami, Y.; Suzuki, S.; Fujisawa, S. Anti-inflammatory Activity of β-Carotene, Lycopene and Tri-n-butylborane, a Scavenger of Reactive Oxygen Species. *In Vivo* **2018**, *32*, 255–264.
70. Fiedor, J.; Burda, K. Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. *Nutrients* **2014**, *6*, 466–488.
71. Tuzcu, M.; Orhan, C.; Muz, O.E.; Sahin, N.; Juturu, V.; Sahin, K. Lutein and zeaxanthin isomers modulates lipid metabolism and the inflammatory state of retina in obesity-induced high-fat diet rodent model. *BMC Ophthalmol.* **2017**, *17*, 129.
72. Murillo, A.G.; Hu, S.; Fernandez, M.L. Zeaxanthin: Metabolism, Properties, and Antioxidant Protection of Eyes, Heart, Liver, and Skin. *Antioxidants* **2019**, *8*, 390.
73. Chung, R.; Leanderson, P.; Lundberg, A.K.; Jonasson, L. Lutein exerts anti-inflammatory effects in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis* **2017**, *262*, 87–93.
74. Wisniewska-Becker, A.; Nawrocki, G.; Duda, M.; Subczynski, W.K. Structural aspects of the antioxidant activi-ty of lutein in a model of photoreceptor membranes. *Acta Biochim. Pol.* **2012**, *59*, 119–124.
75. Freitas de Lima, F.; Lescano, C.H.; Arrigo, J.; Cardoso, C.; Coutinho, J.P.; Moslaves, I.; Ximenes, T.; Kadri, M.; Weber, S.S.; Perdomo, R.T.; et al. Anti-inflammatory, anti-proliferative and cytoprotective potential of the Attalea phalerata Mart. ex Spreng. pulp oil. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0195678.

76. Araki, M.; Kaku, N.; Harada, M.; Ando, Y.; Yamaguchi, R.; Shindo, K. Production of Auroxanthins from Violaxanthin and 9-cis-Violaxanthin by Acidic Treatment and the Antioxidant Activities of Violaxanthin, 9-cis-Violaxanthin, and Auroxanthins. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64*, 9352–9355.
77. Serbinova, E.A.; Packer, L. Antioxidant properties of alpha-tocopherol and alpha-tocotrienol. *Methods Enzymol.* **1994**, *234*, 354–366.
78. Shuid, A.N.; Mohamad, S.; Muhammad, N.; Fadzilah, F.M.; Mokhtar, S.A.; Mohamed, N.; Soelaiman, I.N. Effects of α-tocopherol on the early phase of osteoporotic fracture healing. *J. Orthop.Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* **2011**, *29*, 1732–1738.
79. Saeed, N.M.; El-Demerdash, E.; Abdel-Rahman, H.M.; Algandaby, M.M.; Al-Abbasi, F.A.; Abdel-Naim, A.B. Anti-inflammatory activity of methyl palmitate and ethyl palmitate in different experimental rat models. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2012**, *264*, 84–93.
80. Islam, M.N.; Ishita, I.J.; Jin, S.E.; Choi, R.J.; Lee, C.M.; Kim, Y.S.; Jung, H.A.; Choi, J.S. Anti-inflammatory activity of edible brown alga Saccharina japonica and its constituents pheophorbide a and pheophytin a in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophage cells. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* **2013**, *55*, 541–548.
81. Lanfer-Marquez, U.M.; Barros, R.M.C.; Sinnecker, P. Antioxidant activity of chlorophylls and their derivatives. *Food Res. Int.* **2005**, *38*, 885–891.
82. Liapina, E.A.; Machneva, T.V.; Larkina, E.A.; Tkachevskaia, E.P.; Osipov, A.N.; Mironov, A.F. Effect of the photosensitizers pheophorbid a and protoporphyrin IX on skin wound healing by the action of low-intensity laser irradiation. *Biofizika* **2010**, *55*, 350–355.
83. Atanasov, A.G.; Waltenberger, B.; Pferschy-Wenzig, E.M.; Linder, T.; Wawrosch, C.; Uhrin, P.; Temml, V.; Wang, L.; Schwaiger, S.; Heiss, E.H.; et al.Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnol. Adv.* **2015**, *33*, 1582–1614.
84. Corrêa, M.F.P.; Melo, G.O.; Costa, S.S. Natural products from plant origin potentially usefull in the asthma therapy. *Braz. J. Pharmacogn.* **2008**, *18*, 785–797.
85. Brasil. Relação Nacional de Medicamentos Essenciais: Rename 2013. Brasília, DF: Ministério da Saúde, Secreta-ria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estra-tégicos, 8ª ed, 2013; p. 200. Available online: https://www.prefeitura.sp.gov.br/cidade/secretarias/upload/rename/livro-rename-2013-atualizado.pdf (accessed on May 15th).
86. Marmitt, D.J.; Rempel, C.; Goettert, M.I.; Silva, A.C. Medicinal Plants RENISUS with Potential Anti-inflammatory: Systematic Review in Three Scientific Databases. *Rev. Fitos* **2015**, *9*, 73–159.
87. Lopes, G.F.G.; Pantoja, S.C.S. Levantamento das espécies de plantas medicinais utilizadas pela população de Santa Cruz–Rio de Janeiro–RJ. *Rev. Eletrônica Novo Enfoque* **2013**, *16*, 62–80.
88. Feijó, AM; Heiden, G. Medicinal plants used by elderly people with Diabetes mellitus in the treatment of the disease symptoms. *Rev. Bras. De Plantas Med.* **2012**, *14*, 50–56.
89. Rodrigues, I.A.; Azevedo, M.M.; Chaves, F.C.; Alviano, C.S.; Alviano, D.S.; Vermelho, A.B. Arrabidaea chica hexanic extract induces mitochondrion damage and peptidase inhibition on Leishmania spp. *BioMed. Res. Int.* 2014, 985171.
90. Cortez de, S.á.; J; Almeida-Souza, F.; Mondêgo-Oliveira, R.; Oliveira, I.; Lamarck, L.; Magalhães, I.; Ataídes-Lima, A.F.; Ferreira, H.; Abreu-Silva, A.L. Leishmanicidal, cytotoxicity and wound healing potential of Arra-bidaea chica Verlot. *BMC Complementary Altern. Med.* **2016**, *16*, 1–11.
91. Mafioleti, L.; da Silva Junior, I.F.; Colodel, E.M.; Flach, A.; Martins, D.T. Evaluation of the toxicity and anti-microbial activity of hydroethanolic extract of Arrabidaea chica (Humb. & Bonpl.) B. Verl. *J. Ethnopharmacol.* **2013**, *150*, 576–582.
92. Torres, C.A.; Zampini, I.C.; Nuñez, M.B.; Isla, M.I.; Castro, M.P.; Gonzalez, A.M. In vitro antimicrobial activity of 20 selected climber species from the Bignoniaceae family. *Nat. Prod. Res.* **2013**, *27*, 2144–2148.
93. Hofling, J.F.; Anibal, P.C.; Obando-Pereda, G.A.; Peixoto, I.A.T.; Furletti, V.F.; Foglio, M.A.; Gonçalves, R.B. Antimicrobial potential of some plant extracts against Candida species. *Braz. J. Biol.* **2010**, *70*, 1065–1068.
94. Kohn, L.K.; Foglio, M.A.; Rodrigues, R.A.; Sousa, I.M.O.; Martini, M.C.; Padilla, M.A.; Lima-Neto, D.F.; Arns, C.W. In-Vitro Antiviral Activities of Extracts of Plants of The Brazilian Cerrado against the Avian Metap-neumovirus (aMPV). *Rev. Bras. De Ciência Avícola* **2015**, *17*, 275–280.
95. Brandão, G.C.; Kroon, E.G.; Santos, J.R.; Stehmann, J.R.; Lombardi, J.A.; Oliveira, A.B. Antiviral activities of plants occurring in the state of Minas Gerais, Brazil: Part 2. Screening Bignoniaceae species. *Rev. Bras. de Farmacogn.* **2010**, *20*, 742–750.
96. Ribeiro, A.F.C.; Telles, T.C.; Ferraz, V.P.; Souza-Fagundes, E.M.; Cassali, G.D.; Carvalho, A.T.; Melo, M.M. Effect of Arrabidaea chica extracts on the Ehrlich solid tumor development. *Rev. Bras. de Farmacogn.* **2012**, *22*, 364–373.
97. Rocha, K.B.F.; Oliveira, C.N.; Azevedo, I.M.; Macedo, R.; Medeiros, A.C. Effect of Arrabidaea chica extract against chemically induced breast cancer in animal model. *Acta Cirúrgica Bras.* **2019**, *34*, e201901001.
98. Taffarello, D.; Jorge, M.P.; Sousa, I.M.O.; Duarte, M.C.T.; Figueira, G.M.; Queiroz, N.C.A.; Rodrigues, R.A.F.; Carvalho, J.E.; Goes, A.L.T.R.; Foglio, M.A. Activity of Arrabidaea chica (Humb. & Bonpl.) Verlot ex-tracts obtained by biotechnological processes on fibroblast and human tumor cells. *Química Nova* **2013**, *36*, 431–436.
99. Evangelista, S.S.; Sampaio, F.C.; Parente, R.C.; Bandeira, M.F.C.L. Phytotherapics in Odontology: Ethnobo-tanical study in Manaus. *Rev. Bras. de Plantas Med.* **2013**, *15*, 513–519.
100. Elisabetsky, E.; Wannmacher, L. The status of ethnopharmacology in Brazil. *J. Ethnopharmacol.* **1993**, *38*, 137–143.
101. Odonne, G.; Valadeau, C.; Alban-Castillo, J.; Stien, D.; Sauvain, M.; Bourdy, G. Medical ethnobotany of the Chayahuita of the Paranapura basin (Peruvian Amazon). *J. Ethnopharmacol.* **2013**, *146*, 127–153.
102. Sharifi-Rad, J.; Salehi, B.; Stojanović-Radić; ZZ; Fokou, P.V.T.; Sharifi-Rad, M.; Mahady, G.B.; Iriti, M. Me-dicinal plants used in the treatment of tuberculosis-Ethnobotanical and ethnopharmacological approaches. *Biotechnol. Adv.* **2020**, *44*, 107629. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107629.

103. Moraes, L.L.C.; Fritas, J.L.; Matos-Filho, J.R.; Silva, R.B.L.; Borges, C.H.A.; Santos, A.C. A Ethno-knowledge of medicinal plants in a community in the eastern Amazon. *Rev. de Ciências Agrárias* **2019**, *42*, 565–573.
104. Cartagenes M do, S.S.; Lima, N.F.M.C.; França, L.G.; Pessoa, D.L.R.; Amaral, F.M.M.; Abreu, I.C.; Silva, S.N.; Borges, M.O.R.; Medeiros, I.A. Avaliação da atividade anti-hipertensiva do extrato de Arrabi-daea chica Verlot em ratos espontaneamente hipertensos. *Rev. de Ciências da Saúde* 2015, 16.
105. Coelho-Ferreira, M. Medicinal knowledge and plant utilization in an Amazonian coastal community of Marudá, Pará State (Brazil). *J. Ethnopharmacol.* **2009**, *126*, 159–175.
106. Rodrigues, M.C.; Muehlmann, L.A.; Longo, J.P.F.; Silva, R.C.; Graebner, I.B.; Degterev, I.A.; Lucci, C.M.; Azevedo, R.B.; Garcia, M.P. Photodynamic Therapy Based on Arrabidaea chica (Crajiru) Extract Nanoemulsion: In vitro Activity against Monolayers and Spheroids of Human Mammary Adenocarcinoma MCF-7 Cells. *J. Nanomed. Nanotechnol.* **2015**, *6*, 286.
107. Souza, H.Q.; Hidalgo, A.F.; Chaves, F.C.M. Preparo do corante de crajirú (Arrabidaea chica (Bonpl.) B. Verl.) e sua aplicação em Histologia. *J. Braz. Assoc. Hortic. Sci.* **2007**, *25,* S36.
108. Lima de Medeiros, B.J.; Dos Santos Costa, K.; Alves Ribeiro, J.F.; Carrera Silva, J.O.; Ramos Barbosa, W.L.; Tavares Carvalho, J.C. Liver protective activity of a hydroethanolic extract of Arrabidaea chica (Humb. and Bonpl.) B. Verl. (pariri). *Pharmacogn. Res.* **2011**, *3*, 79–84.
109. do Amaral, R.R.; Santos, A.A.; Saravia, A.; Botas, G.; Cruz, R.A.; Fernandes, C.P.; Boylan, F. Biological activities of Arrabidaea chica (Bonpl.) B. Verl. leaves. *Lat. Am. J. Pharm.* **2012**, *31*, 451–455.
110. Gonzalez, A.C.O.; Costa, T.F.; Andrade, Z.A.; Medrado, A.R.A.P. Wound healing—A literature review. *An. Bras. de Dermatol.* **2016**, *91*, 614–620.
111. Pristo, I. Cicatrização de feridas: Fases e fatores de influência. *Acta Vet. Bras.* **2012**, *6*, 267–271.
112. Martelli, A.; Andrade, T.A.M.; dos Santos, G.M.T. Perspectivas na utilização de fitoterápicos na cicatriza-ção tecidual: Revisão sistemática. *Arch. Health Investig.* **2018**, *7*, 344–350.
113. Servat-Medina, L.; González-Gómez, A.; Reyes-Ortega, F.; Sousa, I.M.; Queiroz, N.; Zago, P.M.; Jorge, M.P.; Monteiro, K.M.; de Carvalho, J.E.; San Román, J.; et al. Chitosan-tripolyphosphate nanoparticles as Arrabidaea chica standardized extract carrier: Synthesis, characterization, biocompatibility, and antiulcerogenic activity. *Int. J. Nanomed.* **2015**, *10*, 3897–3909.
114. Aro, A.A.; Freitas, K.M.; Foglio, M.A.; Carvalho, J.E.; Dolder, H.; Gomes, L.; Vidal, B.C.; Pimentel, E.R. Effect of the Arrabidaea chica extract on collagen fiber organization during healing of partially transected ten-don. *Life Sci.* **2013**, *92*, 799–807.
115. Aro, A.A.; Simões, G.F.; Esquisatto, M.A.; Foglio, M.A.; Carvalho, J.E.; Oliveira, A.L.; Gomes, L.; Pimen-tel, E.R. Arrabidaea chica extract improves gait recovery and changes collagen content during healing of the Achilles tendon. *Injury* **2013**, *44*, 884–892.
116. Pires, A.; Westin, C.B.; Hernandez-Montelongo, J.; Sousa, I.; Foglio, M.A.; Moraes, A.M. Flexible, dense and porous chitosan and alginate membranes containing the standardized extract of Arrabidaea chica Verlot for the treatment of skin lesions. *Mater. Sci. Engineering. C Mater. Biol. Appl.* **2020**, *112*, 110869.
117. Zhang, H.; Sun, S.C. NF-κB in inflammation and renal diseases. *Cell Biosci.* **2015**, *5*, 63.
118. Medzhitov, R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* **2008**, *454*, 428–435.
119. Kuprash, D.V.; Nedospasov, S.A. Molecular and Cellular Mechanisms of Inflammation. *Biochemistry* **2016**, *81*, 1237–1239.
120. Groh, L.; Keating, S.T.; Joosten, L.; Netea, M.G.; Riksen, N.P. Monocyte and macrophage immunometabo-lism in atherosclerosis. *Semin. Immunopathol.* **2018**, *40*, 203–214.
121. Kiripolsky, J.; McCabe, L.G.; Kramer, J.M. Innate immunity in Sjögren's syndrome. *Clin. Immunol.* **2017**, *182*, 4–13.
122. Scrivo, R.; Vasile, M.; Bartosiewicz, I.; Valesini, G. Inflammation as "common soil" of the multifactorial diseases. *Autoimmun. Rev.* **2011**, *10*, 369–374.
123. Liu, T.; Zhang, L.; Joo, D.; Sun, S.C. NF-κB signaling in inflammation. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2017**, *2*, 17023.
124. Brubaker, S.W.; Bonham, K.S.; Zanoni, I.; Kagan, J.C. Innate immune pattern recognition: A cell biological perspective. *Annu. Rev. Immunol.* **2015**, *33*, 257–290.
125. Placha, D.; Jampilek, J. Chronic Inflammatory Diseases, Anti-Inflammatory Agents and Their Delivery Nanosystems. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 64.
126. Tasneem, S.; Liu, B.; Li, B.; Choudhary, M.I.; Wang, W. Molecular pharmacology of inflammation: Medicinal plants as anti-inflammatory agents. *Pharmacol. Res.* **2019**, *139*, 126–140.
127. Brasil. Relação Nacional de Medicamentos Essenciais: RENAME 2014. Brasília: Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégi-cos. 9ª edição, 2015; p. 228. Available online: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/relacao_nacional_medicamentos_essenciais_rename_2014.pdf (accessed on July 1st 2022).
128. Chi, Y.S.; Jong, H.G.; Son, K.H.; Chang, H.W.; Kang, S.S.; Kim, H.P. Effects of naturally occurring prenyl-ated flavonoids on enzymes metabolizing arachidonic acid: Cyclooxygenases and lipoxygenases. *Biochem. Pharmacol.* **2001**, *62*, 1185–1191.
129. Jang, D.S.; Cuendet, M.; Hawthorne, M.E.; Kardono, L.B.; Kawanishi, K.; Fong, H.H.; Mehta, R.G.; Pez-zuto, J.M.; Kinghorn, A.D. Prenylated flavonoids of the leaves of Macaranga conifera with inhibitory activi-ty against cyclooxygenase-2. *Phytochemistry* **2002**, *61*, 867–872.
130. Michel, A.F.; Melo, M.M.; Campos, P.P.; Oliveira, M.S.; Oliveira, F.A.; Cassali, G.D.; Ferraz, V.P.; Cota, B.B.; Andrade, S.P.; Souza-Fagundes, E.M. Evaluation of anti-inflammatory, antiangiogenic and antiprolifera-tive activities of Arrabidaea chica crude extracts. *J. Ethnopharmacol.* **2015**, *165*, 29–38.
131. Lawrence, T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2009**, *1*, a001651.
132. Tak, P.P.; Firestein, G.S. NF-kappaB: A key role in inflammatory diseases. *J. Clin. Investig.* **2001**, *107*, 7–11.

133. Libby, P.; Ridker, P.M.; Maseri, A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* **2002**, *105*, 1135–1143.
134. Furtado, M.F.D.; Silva, W.D.; Colleto, G.M.D.D. Controle de qualidade dos venenos animais e dos corres-pondentes antivenenos. I Padronização dos métodos de ensaio das atividades bioquímicas e farmacológicas dos venenos de algumas espécies do gênero Bothrops e Crotalus usando amostras secas a temperaturas ambiente ou lioflizadas. *Memórias Do Inst. Butantan* **1991**, *53*, 149–159.
135. Koutoulogenis, G.S.; Kokotou, M.G.; Hayashi, D.; Mouchlis, V.D.; Dennis, E.A.; Kokotos, G. 2-Oxoester Phospholipase A2 Inhibitors with Enhanced Metabolic Stability. *Biomolecules* **2020**, *10*, 491.
136. Takenaka, I.K.T.M.; Amorim, J.M.; de Barros, P.A.V.; Brandao, G.C.; Contarini, S.M.L.; de Sales Souza e Melo, É.; Fernandes, S.O.A. Chemical characterization and anti-inflammatory assessment of the hydroethanol-ic extract of Fridericia chica. *Rev. Bras. de Farmacogn.* **2020**, *30*, 559–567.
137. Murakami, A.; Ohigashi, H. Targeting NOX, INOS and COX-2 in inflammatory cells: Chemoprevention using food phytochemicals. *Int. J. Cancer* **2007**, *121*, 2357–2363.
138. Torres, C.A.; Pérez Zamora, C.M.; Nuñez, M.B.; Gonzalez, A.M. In vitro antioxidant, antilipoxygenase and antimicrobial activities of extracts from seven climbing plants belonging to the Bignoniaceae. *J. Integr. Med.* **2018**, *16*, 255–262.
139. Lima, J.; de Oliveira, R.G.; Silva, V.C.; de Sousa, P.T., Jr.; Violante, I.; Macho, A.; Martins, D. Anti-inflammatory activity of 4',6,7-trihydroxy-5-methoxyflavone from Fridericia chica (Bonpl.) L.G.Lohmann. *Nat. Prod. Res.* **2020**, *34*, 726–730.
140. Sies, H. Oxidative Stress: Introductory Remarks. In: *Oxidative stress* Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 1985, pp. 1–8.
141. Sies, H. Biological redox systems and oxidative stress. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **2007**, *64*, 2181–2188.
142. Sies, H.; Berndt, C.; Jones, D.P. Oxidative Stress. *Annu. Rev. Biochem.* **2017**, *86*, 715–748.
143. Miguel, M.G. Anthocyanins: Antioxidant and/or anti-inflammatory activities. *J. Appl. Pharm. Sci.* **2011**, *1*, 7–15.
144. Carvalho, A.V.; Cavalcante, M.A.; Santana, C.L.; Alves, R.M. Physical and chemical characteristics of ma-trices of yellow mobin fruits in the state of Pará. *Aliment. E Nutr. Araraquara* **2011**, *22*, 45–53.
145. Aprioku, J.S. Pharmacology of free radicals and the impact of reactive oxygen species on the testis. *J. Reprod. Infertil.* **2013**, *14*, 158–172.
146. Lü, J.M.; Lin, P.H.; Yao, Q.; Chen, C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: Experimental approaches and model systems. *J. Cell. Mol. Med.* **2010**, *14*, 840–860.
147. Halliwell, B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem. Soc. Trans.* **2007**, *35 Pt 5*, 1147–1150.
148. El-Beltagi, H.S.; Mohamed, H.I. Reactive oxygen species, lipid peroxidation and antioxidative defense mechanism. *Not. Bot. Horti Agrobot. Cluj-Napoca* **2013**, *41*, 44–57.
149. Salisbury, D.; Bronas, U. Reactive oxygen and nitrogen species: Impact on endothelial dysfunction. *Nurs. Res.* **2015**, *64*, 53–66.
150. Halliwell, B. Free radicals and antioxidants: Updating a personal view. *Nutr. Rev.* **2012**, *70*, 257–265.
151. Venkataraman, K.; Khurana, S.; Tai, T.C. Oxidative stress in aging--matters of the heart and mind. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 17897–17925.
152. Katoch, N.; Kaur, P.; Kashyap, P.; Gupta, S.; Dahiya, R.S. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci.* **2013**, *4*, 870–881.
153. Fibach, E.; Rachmilewitz, E. The role of oxidative stress in hemolytic anemia. *Curr. Mol. Med.* **2008**, *8*, 609–619.
154. Federico, A.; Morgillo, F.; Tuccillo, C.; Ciardiello, F.; Loguercio, C. Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis. *Int. J. Cancer* **2007**, *121*, 2381–2386.
155. Afanas'ev, I. New nucleophilic mechanisms of ros-dependent epigenetic modifications: Comparison of aging and cancer. *Aging Dis.* **2013**, *5*, 52–62.
156. Oguntibeju, O.O. Type 2 diabetes mellitus, oxidative stress and inflammation: Examining the links. *Int. J.Physiol. Pathophysiol. Pharmacol.* **2019**, *11*, 45–63.
157. Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*; Oxford Scholarship Online, Oxford, UK: 2015.
158. Augustyniak, A.; Bartosz, G.; Cipak, A.; Duburs, G.; Horáková; L; Luczaj, W.; Majekova, M.; Odysseos, A.D.; Rackova, L.; Skrzydlewska, E.; et al. Natural and synthetic antioxidants: An updated overview. *Free. Radic. Res.* **2010**, *44*, 1216–1262.
159. Arulselvan, P., Fard, M.T., Tan, W.S., Gothai, S., Fakurazi, S., Norhaizan, M.E., Kumar, S.S. Role of Antioxidants and Natural Products in Inflammation. *Oxidative Med. Cell. Longev.* **2016**, *2016*, 5276130.
160. Krishnaiah, D.; Sarbatly, R.; Nithyanandam, R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food Bioprod. Processing* **2011**, *89*, 217–233. https://doi.org/10.1016/j.fbp.2010.04.008.
161. Durazzo, A.; Lucarini, M.; Souto, E.B.; Cicala, C.; Caiazzo, E.; Izzo, A.A.; Novellino, E.; Santini, A. Polyphe-nols: A concise overview on the chemistry, occurrence, and human health. *Phytother. Res. PTR* **2019**, *33*, 2221–2243.
162. Mark, R.; Lyu, X.; Lee, J.J.; Parra-Saldívar, R.; Chen, W.N. Sustainable production of natural phenolics for functional food applications. *J. Funct. Foods* **2019**, *57*, 233–254.
163. Caleja, C.; Ribeiro, A.; Barreiro, M.F.; Ferreira, I. Phenolic Compounds as Nutraceuticals or Functional Food Ingredients. *Curr. Pharm. Des.* **2017**, *23*, 2787–2806.
164. Silva, E.M.; Souza, J.N.S.; Rogez, H.; Rees, J.F.; Larondelle, Y. Antioxidant activities and polyphenolic con-tents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. *Food Chem.* **2007**, *101*, 1012–1018.
165. Paula, J.T.; Paviani, L.C.; Foglio, M.A.; Sousa, I.M.O.; Duarte, G.H.B.; Jorge, M.P.; Eberlin, M.N.; Ca-bral, F.A. Extraction of anthocyanins and luteolin from Arrabidaea chica by sequential extraction in fixed bed using supercritical CO2, ethanol and water as solvents. *J. Supercrit. Fluids* **2014**, *86*, 100–107.
166. dos Santos, V.C.; Longo, T.B.; Garcia, A.L.; Richter, M.F.; Guecheva, T.N.; Henriques, J.A.; Ferraz, A.; Picada, J.N. Evaluation of the mutagenicity and genotoxicity of Arrabidaea chica Verlot (Bignoneaceae), an Amazon plant with medicinal properties. *J. Toxicol. Environ. Health Part A* **2013**, *76*, 381–390.

167. Gemelli, T.F.; Prado, L.; Santos, F.S.; de Souza, A.P.; Guecheva, T.N.; Henriques, J.A.; Ferraz, A.; Corrêa, D.S.; Dihl, R.R.; Picada, J.N. Evaluation of Safety of Arrabidaea chica Verlot (Bignoniaceae), a Plant with Healing Properties. *J. Toxicol. Environ. Health Part A* **2015**, *78*, 1170–1180.
168. Olivero-Verbel, J.; De la Parra-Guerra, A.; Caballero-Gallardo, K.; Sierra-Marquez, L.; Fuentes-Lopez, K.; Franco-Marmolejo, J.; Jannasch, A.S.; Sepulveda, M.S.; Stashenko, E. The aqueous extract of Fridericia chica grown in northern Colombia ameliorates toxicity induced by Tergitol on Caenorhabditis elegans. Comparative biochemistry and physiology. *Toxicol. Pharmacol. CBP* **2021**, *244*, 109026.
169. Martins, F.J.; Caneschi, C.A.; Vieira, J.L.; Barbosa, W.; Raposo, N.R. Antioxidant activity and potential pho-toprotective from amazon native flora extracts. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2016**, *161*, 34–39.
170. Ribeiro, F.M.; Volpato, H.; Lazarin-Bidóia, D.; Desoti, V.C.; de Souza, R.O.; Fonseca, M.; Ueda-Nakamura, T.; Nakamura, C.V.; Silva, S.O. The extended production of UV-induced reactive oxygen species in L929 fi-broblasts is attenuated by posttreatment with Arrabidaea chica through scavenging mechanisms. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2018**, *178*, 175–181.
171. Teixeira, T.S.; Vale, R.C.; Almeida, R.R.; Ferreira, T.P.S.; Guimarães, L.G.L. Antioxidant Potential and its Correlation with the Contents of Phenolic Compounds and Flavonoids of Methanolic Extracts from Different Medicinal Plants. *Rev. Virtual de Química* **2017**, *9*, 1546–1559.
172. Brasil. Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília: Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos, 2009; p. 136. Available online: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/programa_nacional_plantas_medicinais_fitoterapicos.pdf (accessed on June 3rd 2022).
173. Panizza, S.T. *Como Prescrever ou Recomendar Plantas Medicinais*; Conbrafito: São Luís, Brazil, 2010; p. 15.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a ação anti-inflamatória e antioxidante dos extratos brutos (aquoso e em acetato de etila) da espécie *Fridericia chica* em cultura celular *in vitro*.

3.2. Objetivos Específicos

a) Obter os extratos brutos (aquoso e em acetato de etila) e o perfil químico dos extratos da espécie *Fridericia chica*;
b) Fracionar o extrato bruto em acetato de etila da espécie *Fridericia chica*;
c) Avaliar a modulação da atividade da enzima Ciclooxigenase 2 pela molécula carajurona, uma das substâncias majoritárias presente na espécie *Fridericia chica*: modelo *in silico*.
d) Avaliar as atividades anti-inflamatória, antioxidante e cicatrizante dos extratos brutos da espécie *Fridericia chica* (aquoso e em acetato de etila) e das frações (acetato de etila) em cultura celular.
e) Avaliar o potencial do extrato aquoso da espécie *Fridericia chica* na diferenciação de linfócitos (Th17 e Treg) e na produção da quimiocina CCL-22 induzida por IL-4.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Origem do Material Vegetal

A primeira coleta das folhas de *Fridericia chica* foi realizada no mês de novembro, do ano de 2019. A segunda coleta foi realizada no mês de agosto, do ano de 2022. As coletas foram realizadas no setor de plantas medicinais e hortaliças da Embrapa Amazônia Ocidental, localizada na Rodovia AM 010, Km 29, com o auxílio do Prof. Dr. Francisco Célio M. Chaves. As amostras botânicas de crajiru (*Fridericia chica*) do tipo I, foram depositadas em forma de exsicatas no Herbário EAFM do Instituto Federal do Amazonas – Zona Leste, com numeração de acesso EAFM 6791.

4.2. Preparo dos Extratos de *Fridericia chica*

Para este projeto foram preparados dois tipos de extratos da espécie *Fridericia chica*: extrato aquoso por infusão e extrato acetato de etila. As folhas foram coletadas, secas a temperatura ambiente e na sombra, posteriormente cominuídas por moinho de facas, obtendo-se um pó avermelhado.

4.2.1. Extrato Aquoso por Infusão

Para a obtenção do extrato aquoso por infusão foram pesados 150 g do pó das folhas e adicionados em 1 L de água destilada fervida em um Becker tampado por 30 minutos. Após a infusão, o extrato obtido foi filtrado e seco por nebulização através do equipamento de mini spray dryer (LABMAQ DO BRASIL LTDA) a temperatura de 90 °C, sem qualquer uso de adjuvante de secagem. O rendimento final foi calculado por regra de três simples, obtendo-se 9,028% do extrato seco. O procedimento foi realizado no Laboratório de Inovação e Desenvolvimento em Tecnologia Farmacêutica (LIDETEF) na Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

4.2.2. Extrato Acetato de Etila

Para a preparação do extrato acetato de etila, a partir da extração por maceração, utilizou-se 1.270 g do pó das folhas em 3 L do solvente acetato de etila (Synth) incialmente. O material vegetal e o solvente foram divididos igualmente, adicionados em duas garrafas de 4 L (vidro âmbar) e deixados na capela de exaustão (INCONEX CIENTÍFICA), em maceração com o solvente, por 48 h. O processo de maceração foi repetido até exaurir completamente o material botânico. Após a maceração do material vegetal, de acordo com o intervalo de tempo estabelecido, o extrato bruto obtido foi filtrado em papel de filtro, concentrado em evaporador rotativo (Fisatom 803) a 45 ºC e vácuo (Prismatec 131) de aproximadamente 425 mbar, recuperando-se o solvente contido no extrato. Em seguida, o extrato foi filtrado com algodão e adicionado em um recipiente de vidro, previamente pesado e levado ao dessecador (VIDROLABOR®), contendo sílica gel, para a absorção total da umidade da amostra. Em seguida, o recipiente de vidro contendo o extrato foi pesado e calculou-se o rendimento. O procedimento foi realizado no Laboratório Central de Análises, na Escola Superior de Ciências da Saúde (ESA) da Universidade do Estado do Amazonas (UEA).

4.2.3. Fracionamento do Extrato Bruto Acetato de Etila de *Fridericia chica*

O fracionamento cromatográfico do extrato bruto de *Fridericia chica* (38,781 g) foi realizado em coluna de vidro, utilizando como fase estacionária, sílica gel 60 (230-400 mesh) da Neon® e como fase móvel, mistura de solventes grau P.A (gradientes) em ordem crescente de polaridade (hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, respectivamente) (COSTA *et al*., 2006).

A quantidade de sílica utilizada no fracionamento cromatográfico consistiu em cerca de 20 vezes a massa do analito (735,62 g) a ser purificado, e duas vezes a quantidade da amostra para o preparo da pastilha (77.562 g) (MATOS, 2009). Foram utilizados a combinação de eluentes (solventes grau P.A) para a separação cromatográfica em ordem crescente de polaridade (hexano > diclorometano > acetato de etila > metanol). Para a solubilização da pastilha, utilizou-se os solventes diclorometano e metanol, ambos foram evaporados, e a pastilha foi adicionada a coluna cromatográfica.

Foram obtidas dez frações provenientes do fracionamento (F1 – F10). Todas as frações foram rotaevaporadas separadamente, utilizando-se um evaporador rotativo (Fisatom 803) a 45 ºC e vácuo (Prismatec 131) de aproximadamente 425 mbar, sendo realizado a recuperação do

solvente contido nas frações. As frações foram adicionadas em recipientes de vidro, devidamente identificados, previamente pesado e levado ao dessecador (VIDROLABOR®, contendo sílica gel, para a absorção total da umidade da amostra. Em seguida, o recipiente de vidro contendo a fração foi pesado e calculou-se a quantidade da amostra. O procedimento cromatográfico foi realizado no Laboratório Central de Análises, na Escola Superior de Ciências da Saúde (ESA) da Universidade do Estado do Amazonas (UEA).

4.3. Prospecção Química dos Extratos de *Fridericia chica*

Soluções estoque (1 mg. mL^{-1}) dos extratos foram preparadas em metanol. Alíquotas (5 µL) das soluções estoque foram posteriormente diluídas a 5 µg. mL^{-1}, sendo as soluções resultantes analisadas por infusão direta no espectrômetro de massas. Todos os espectros de massas foram registrados em modo de monitoramento contínuo (Thermo LCQ Fleet Tune application) utilizando-se um equipamento LCQ Fleet, equipado com fonte de Ionização por Eletrospray (ESI) e operando no modo positivo de aquisição para as análises de Espectrometria de Massa com Ionização por Eletrospray (ESI-MS) e Espectrometria de Massa em tandem com Ionização por Eletrospray (ESI-MSn). Os espectros foram obtidos a partir da média de pelo menos 10 espectros adquiridos. As amostras foram infusionadas na fonte de ESI através da bomba seringa do equipamento (10 µL.min-1). As condições analíticas da análise foram as seguintes: voltagem spray, 5 kV; gás de bainha, 10 arb; gás auxiliar, 5 arb; gás de varredura, 0 arb; temperatura capilar, 200 ºC; tensão capilar, 40 V; lente de tubo, 115 V; faixa de massa, m/z 200 a 400; gás de colisão, He. Os espectros de ESI-MSn foram obtidos a partir da aplicação de energia de 20 a 30%. O procedimento foi realizado no Laboratório da Central Analítica no Centro de Apoio Multidisciplinar (CAM) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

4.4. Análise do perfil químico das frações de *Fridericia chica*

As frações (F5 a F10), obtidas a partir do extrato acetato de etila, foram solubilizados em metanol HPLC, gerando soluções estoque de 1000 Partes por milhão (ppm). Alíquotas (10 µL) dessas soluções foram transferidas para vials contendo 1 mL de Metanol (MeOH). Em seguida, 5 µL das soluções diluídas foram analisadas por inserção direta no espectrômetro de

massas do tipo íon trap, modelo LCQ Fleet, equipado com fonte de Ionização Química de Pressão Atmosférica (APCI) operando nos modos positivo e negativo. Os parâmetros analíticos utilizados foram os seguintes: corrente de descarga: 5 µA; temperatura do vaporizador: 320 ºC; temperatura capilar: 220 ºC; gás de revestimento: 30 psi; gás auxiliar: 10 arb, faixa de massa, m/z 100-1000. Os espectros de massa em tandem (MS/MS) foram adquiridos utilizando hélio como gás de colisão e energia variando entre 20-30 %. O procedimento foi realizado no Laboratório da Central Analítica no Centro de Apoio Multidisciplinar (CAM) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

4.5. Análise dos Espectros

Os espectros UV visível do pigmento isolado foram registrados em um espectrofotômetro em 0,1% de ácido clorídrico em metanol, seguido da adição de duas ou três gotas de cloreto de alumínio a 5%. A elucidação estrutural da molécula foi baseada em análise dos espectros de RMN 400.13 MHz (1H) e 100.62 MHz (13C). As mudanças químicas foram determinadas em relação ao tetrametilsilano a 0 ppm. Os espectros foram estabelecidos a partir dos sinais dos experimentos bidimensionais COZY, HMQC e HMBC. Uma amostra de cristal de carajurina foi dissolvida em clorofórmio deuterado (CDCl3) e analisada, enquanto outra amostra foi dissolvida em metanol deuterado (CD3OD), analisada após 1 h. Os espectros positivos para carajurina foram identificados por espectrometria de massa com ionização por eletrospray (ESI-MS).

4.6. Ancoragem Molecular

O método de ancoragem molecular foi realizado com a estrutura cristalográfica da proteína Ciclooxigenase-2 (COX-2), complexada com o ligante Rofecoxib (RCX) inibidor específico da COX-2. A proteína COX-2, de origem humana (*Homo sapiens*), está disponível no banco de dados *Protein Data Bank* (PDB) (código: 5KIR), com resolução de 2,7Å. (Orlando & Malkowski, 2016). As estruturas tridimensionais (3D) dos ligantes da carajurona, 6,7,4'-tri-hidroxi-5-metoxi-flavílio, carajurina e Rofecoxib (RCX) foram geradas a partir do software *Marvin Sketch* (ChemAxon, 2017). A otimização geométrica de todos os ligantes foi feita pelo método semi-empírico PM7 (Stewart, 2013) disponível no software *MOPAC2016* (Stewart,

2016). A preparação do receptor e dos ligantes foi alcançada através do software *Autodock tools* (Morris et al., 2009), sendo o *grid box* definido em relação ao sítio ativo ocupado pelo ligante RCX. O procedimento de ancoragem foi então realizado pelo software *Autodock Vina* (Trott & Olson, 2010). Os resultados foram processados com o auxílio do software *Discovery Studio* (Discovery Studio Visualizer, 2016).

4.7. Experimentação Celular *in vitro*

4.7.1. Preparo dos Extratos Vegetais para Adição em Cultura Celular

4.7.1.1. Extrato Aquoso de *Fridericia chica*

Foram pesados 5mg do extrato aquoso de *Fridericia chica* e adicionou-se 1 mL do meio de cultura RPMI 1640 (Gibco®, Life Technologies, EUA) suplementado com 10% de SFB (Gibco®, Life Technologies, EUA), (1%) 2mM de L-glutamina, penicilina/estreptomicina a 1% (Gibco®, Life Technologies, EUA). Em seguida a solução foi homogeneizada e filtrada (filtro de seringa com poro 0.22 µm).

4.7.1.2. Extrato Acetato de etila de *Fridericia chica*

Foram pesados 5mg do extrato acetato de etila de *Fridericia chica* e incorporados em 50µL de Dimetilsufóxido (DMSO). Logo após, adicionou-se 950µL do meio de cultura RPMI 1640 (Gibco®, Life Technologies, EUA) suplementados com 10% de SFB (Gibco®, Life Technologies, EUA), (1%) 2mM de L-glutamina, penicilina/estreptomicina a 1% (Gibco®, Life Technologies, EUA). Em seguida a solução foi homogeneizada e filtrada (filtro de seringa com poro 0.22 µm).

4.7.2. Obtenção das peçonhas de *Bothrops atrox*

A peçonha de serpentes adultas (n=7) da espécie *Bothrops atrox* foi fornecida pelo Serpentário do Museu da Amazônia (MUSA) em parceria com a Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), sob Comitê de Ética Animal

(001552/2017.011) e registrado no SISGEN sob o processo A3A5599, para fins científicos. Os venenos foram imediatamente transportados em gelo seco até o laboratório do Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema. Posteriormente, as amostras foram submetidas à centrifugação a 4500 RPM por 20 minutos, para separação de células e outros materiais. Foi feito um *pool* com os venenos obtidos, e então armazenado -80°C até a realização dos experimentos.

4.7.3. Sangue humano

As amostras do sangue periférico, utilizadas para a obtenção dos leucócitos, foram coletadas de doadores saudáveis (CAAE: 44561521.4.0000.0005). O sangue foi coletado assepticamente em tubos contendo Citrato de Sódio.

4.7.4. Isolamento de Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMC)

As Células Mononucleares Periféricas (PBMC) foram isoladas por gradiente de densidade, utilizando o meio de separação Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich), seguindo as recomendações do fabricante. As células foram centrifugadas a 500 RCF, por 20 minutos à 22˚C. Em seguida, a camada de células brancas (PBMC) foi coletada, utilizando-se uma pipeta pasteur, e foram realizadas duas lavagens com solução salina tamponada com fosfato (PBS 1X - pH 7,2) a 500 RCF, por 10 minutos à 22˚C. Posteriormente, as células foram ressuspensas em meio de cultura RPMI 1640 (suplementado com 10% de SFB, (1%) 2mM de L-glutamina e 1% de penicilina/estreptomicina) e avaliadas pelo método de contagem em Câmara de Neubauer, utilizando-se o corante Azul de Trypan.

4.7.5. Avaliação da citotoxicidade dos extratos de *Fridericia chica* pelo método de MTT

Para avaliar a toxicidade dos extratos de *Fridericia chica*, sobre as linhagens celulares de Monócitos Humanos Derivados de Leucemia Monocítica (THP-1), Macrófagos de Camundongos (J774-A1), células de Leucemia Mieloide Aguda Humana (HL60) e Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMC), foi utilizado o método de avaliação colorimétrica de brometo de 3(4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT), descrito por MOSMANN (1983). Em células viáveis, a solução de MTT (coloração amarela) é reduzida em

um composto chamado formazan (coloração púrpura) por ação das desidrogenases mitocondriais. A viabilidade celular é apontada pela quantificação da produção de cristais de formazan conforme a presença de desidrogenases ativas e a absorbância pode ser determinada por medição espectrofotométrica.

A linhagem celular de monócitos humanos derivados de leucemia monocítica (THP-1) foi cultivada em meio RPMI 1640, suplementados com 10% de SFB, (1%) 2mM de L-glutamina e 1% de penicilina/estreptomicina. As células THP-1 foram plaqueadas em placas de 96 poços a uma densidade de 1 x 10^5 células/poço em meio RPMI contendo forbol 12-miristato-13-acetato (PMA) a 200ng/mL para induzir a diferenciação dos monócitos em macrófagos. Posteriormente, os macrófagos foram lavados com meio RPMI e deixados em repouso por mais 48h, realizando-se a troca do meio diariamente. Após 48 horas, as células THP-1 foram tratadas com os extratos de *Fridericia chica* (aquoso e acetato de etila) nas concentrações de 1µg/mL, 10µg/mL, 100µg/mL e 1000 µg/mL. A estaurosporina, na concentração de 2,5µM, foi utilizada como controle positivo. As células foram incubadas em atmosfera úmida a 37ºC, contendo 5% de CO_2, durante 48 horas.

Os macrófagos de camundongo da linhagem J774-A1 foram cultivados em meio Dulbeco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco®, Life Technologies, EUA), suplementados com 10% de SFB, (1%) 2mM de L-glutamina e 1% de penicilina/estreptomicina, plaqueados a uma densidade de 2 x 10^5 células/mL em placas de 96 poços, incubadas "overnight" a 37ºC em 5% de CO_2. No dia seguinte, as células foram tratadas com o extrato aquoso de *Fridericia chica* nas concentrações de 10 µg/mL, 30 µg/mL, 100 µg/mL e 300 µg/mL. O veneno de *Bothrops atrox* na concentração de 6,25 µg/mL, foi utilizado como controle positivo. As células J774-A1 foram incubadas por 24 horas em atmosfera úmida, a 37ºC, contendo 5% de CO_2.

A linhagem celular de leucemia mieloide aguda humana (HL60) foi cultivada em meio RPMI 1640, suplementados com 10% de SFB, (1%) 2mM de L-glutamina e 1% de penicilina/estreptomicina. As células foram plaqueadas em placas de 96 poços a uma densidade de 1 x 10^5 células/poço em meio RPMI, incubadas em atmosfera úmida a 37ºC, contendo 5% de CO_2, por 24h. Após a formação da monocamada, as células HL60 foram tratadas com o extrato aquoso de *Fridericia chica* nas concentrações de 12 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL. Como controle positivo foi usado DMSO 100%. Os tratamentos foram avaliados nos tempos de 24 horas, 48 horas e 72 horas.

As Células Mononucleares Periféricas (PBMC) foram plaqueadas em meio de cultura RPMI 1640, suplementados com 10% de SFB, (1%) 2mM de L-glutamina e 1% de

penicilina/estreptomicina, a uma densidade de 1 x 10^5 células/poço em placas de 96 poços. Em seguida, foram incubadas "overnight" em atmosfera úmida a 37ºC, contendo 5% de CO_2. Posteriormente as células foram pré-tratadas com os extratos aquoso e acetato de etila (1 µg/mL, 3 µg/mL, 10 µg/mL, 30 µg/mL e 50 µg/mL) e com as frações F5, F6, F7, F8, F9 e F10 (30 µg/mL) de *Fridericia chica*, durante 4h. Após o pré-tratamentos, as células foram tratadas com o veneno de *Bothrops atrox*, na concentração de 5 µg/mL, em atmosfera úmida a 37ºC, contendo 5% de CO_2, durante 24 horas.

Ao completar o tempo de tratamento, os sobrenadantes foram retirados e as células foram expostas a solução de MTT (10µL) na concentração de 5mg/mL em meio RPMI 1640 (90µL) durante 3 horas. Posteriormente removeu-se a solução de MTT da placa, adicionou-se 100µL de DMSO aos poços. A placa foi mantida sob agitação por 20 minutos para total dissolução dos cristais de formazan. As leituras foram realizadas em leitor de microplacas AccuSkan FC Fisher Scientific do Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema/ FMT-HVD, com absorbância de 620 nm. Sendo linearmente proporcional ao número de células viáveis. A viabilidade celular foi calculada usando a equação: Viabilidade celular em % = ($Abs_{amostra}$ x 100 / $Abs_{controle}$), onde a $Abs_{amostra}$ é a absorbância de células tratadas com os extratos e o $Abs_{controle}$ é a absorbância das células só com o meio de cultura. Os resultados obtidos foram calculados em escala logarítmica e analisados no software GraphPad Prisma 8.0.

4.7.6. Detecção de Espécies Reativas de Oxigênio Intracelular (iROS)

Os níveis de iROS foram analisados pela sonda fluorescente 2'7'-Acetato Diclorofluoresceína (DCFDA). O DCFDA difunde-se pela membrana celular e é hidrolisado por esterases intracelulares, formando a diclorofluoresceína (DCF não fluorescente), que reage com H_2O_2 intracelular, formando a diclorofluoresceína oxidada (oxDCF, fluorescente), medindo-se os níveis de fluorescência. As Células Mononucleares Periféricas (PBMC) foram plaqueadas em meio de cultura RPMI 1640, suplementados com 10% de SFB, (1%) 2mM de L-glutamina e 1% de penicilina/estreptomicina, a uma densidade de 1 x 10^5 células/poço em placas de 96 poços e incubadas "overnight" em atmosfera úmida a 37ºC, contendo 5% de CO_2. Posteriormente as células foram pré-tratadas com os extratos aquoso e acetato de etila (1 µg/mL, 3 µg/mL, 10 µg/mL, 30 µg/mL e 50 µg/mL) e com as frações F5, F6, F7, F8, F9 e F10 (30 µg/mL) de *Fridericia chica*, durante 4h. Em seguida, as células foram tratadas por 4 horas com estaurosporina na concentração de 2,5 µM, em atmosfera úmida a 37ºC, contendo 5% de CO_2. Após o tratamento, retirou-se o sobrenadante e adicionou-se 200 µl/ poço de DCFDA (25µM) às culturas por 45 minutos, a 37ºC em 5% de CO_2, ao abrigo da luz. Os níveis de fluorescência

foram medidos em leitora de microplacas multimodo GloMax® Explorer do Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema/ FMT-HVD, com excitação de 475 nM e emissão de 500-550 nM.

4.7.7. Determinação do Potencial de Membrana Mitocondrial (ΔΨm)

O Iodeto de 3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide (DiOC6(3)) (Sigma, Brasil) é um corante lipofílico que permite avaliar o potencial das membranas citoplasmática e mitocondrial gerada pela diferença de concentração de íons no interior e exterior das membranas. As Células Mononucleares Periféricas (PBMC) foram plaqueadas em meio de cultura RPMI 1640, suplementados com 10% de SFB, (1%) 2mM de L-glutamina e 1% de penicilina/estreptomicina, a uma densidade de 1 x 10^5 células/poço em placas de 96 poços e incubadas "overnight" em atmosfera úmida a 37ºC, contendo 5% de CO_2. Posteriormente as células foram pré-tratadas com os extratos aquoso e acetato de etila (1 µg/mL, 3 µg/mL, 10 µg/mL, 30 µg/mL e 50 µg/mL) e com as frações F5, F6, F7, F8, F9 e F10 (30 µg/mL) de *Fridericia chica*, durante 4h. Em seguida, as células foram tratadas por 4 horas com estaurosporina na concentração de 2,5 µM, em atmosfera úmida a 37ºC, contendo 5% de CO_2. Após o tratamento, retirou-se o sobrenadante e as células foram incubadas com 100 µl/ poço de DiOC6 (2µM) por 12 minutos, a 37ºC em 5% de CO_2. Logo após, as células foram lavadas três vezes com 100µL de PBS 1X. Os níveis de fluorescência foram medidos em leitora de microplacas multimodo GloMax® Explorer do Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema/ FMT-HVD, com excitação de 475 nM e emissão de 500-550 nM.

4.7.8. Quantificação de Citocinas

Foram coletados os sobrenadantes da cultura celular das Células Mononucleares Periféricas (PBMC), pré-tratadas com os extratos (1 µg/mL, 3 µg/mL, 10 µg/mL, 30 µg/mL e 50 µg/mL) e com as frações F5, F6, F7, F8, F9 e F10 (30 µg/mL) de *Fridericia chica*, por 4h e posteriormente tratadas com o veneno de *Bothrops atrox* (5 µg/mL), por 24 horas. As concentrações das citocinas IL-10, IL-6, IL-1β e TNF-α foram determinadas usando o kit de imunoensaio BD OptEIA ™ (BD Biosciences, San Diego, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

4.7.9. Ensaio de Motilidade Celular

Para avaliar a capacidade de migração celular *in vitro* das células MRC-5, tratadas com o extrato aquoso de *Fridericia chica*, foi utilizado o método descrito por Liang e colaboradores (2007). O ensaio baseia-se na criação de um espaço artificial ("arranhão"), em uma monocamada de célula confluente, onde as células da borda irão mover-se para fechar completamente o novo espaço criado (Liang; Park; Guan *et al*., 2007). Os fibroblastos isolados a partir do pulmão humano (MRC-5) foram cultivados em meio de cultura DMEM, contendo (1%) 2mM de L-glutamina e 1% de penicilina/estreptomicina. As células foram plaqueadas a uma densidade de 5 x 10^4 células/poço em atmosfera úmida, a 37ºC, contendo 5% de CO2, durante 24h. Posteriormente, utilizando uma ponteira de 1- 200 µL foi feito um risco no meio da monocamada de células contidas em todos os poços. Logo após, as células foram tratadas com as diferentes concentrações do extrato aquoso de *Fridericia chica* (0,5 µg/mL, 1 µg/mL e 5 µg/mL) e Vitamina C (25µM), por 24h. O comportamento das células foi observado e fotografado no tempo inicial, após o risco e após o período de 24 horas.

4.7.10. Animais

Camundongos machos C57BL/6 livre de patógenos específicos (WT), com 5 semanas de idade (20-23 gramas), foram obtidos no biotério do Departamento de Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP/USP). Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Farmacologia da FMRP/USP, em temperatura ambiente de 21 ± 1 ˚C, com ciclos claro e escuro de 12 horas e acesso a comida e água *ad libitum*. Os experimentos foram conduzidos com a aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa animal da FMRP/USP (número do protocolo 117/2020).

4.7.11. Isolamento e Diferenciação de Linfócitos

Células T $CD4^+$ foram isoladas dos Linfonodos (cervical, braquial, axilar e inguinal) e do baço, coletados em meio RPMI 1640, suplementados com 10% de SFB, 1 mL de antibiótico antimicótico e 55 µM β-mercaptoetanol. As amostras foram processadas usando um filtro de 100 µm e centrifugadas a 4˚C, 450 g, por 6 minutos. Em seguida o sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspensas em tampão de Lise (2 mL/ camundongo) e deixadas em repouso por 2 minutos em temperatura ambiente. Após os 2 minutos foram adicionados 20 mL de meio

RPMI. Logo após as células foram centrifugadas novamente, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 20 mL de meio RPMI. As células foram reprocessadas utilizando um filtro de 100 µm e após a centrifugação foi realizado o descarte do sobrenadante, as células foram ressuspensas em 500 µl de RPMI completo e incubadas na estufa por 30 minutos. Posteriormente as células foram incubadas com anticorpo anti-CD4L3T4 (Miltendy Biotec 1130049201) por 15 minutos. Logo após, as células passaram por um processo de seleção positiva utilizando colunas (130-042-401 Miltendy Biotec) para separação manual. As células obtidas foram lavadas e incubadas com anti CD25 (556642 BD Biosciences) por 10 minutos. Seguidamente foi realizada a triagem de células $CD4^+ CD25^-$ utilizando o classificador FACSria III (BD Biosciences). As células obtidas foram lavadas, ressuspensas e plaqueadas a uma densidade de 1.000.000 células/poço, em placas de 96 poços, pré-revestidas com anti CD3 e anti CD28, durante 5h. Na primeira placa, para induzir a diferenciação de linfócitos T reguladores, foram adicionadas diferentes concentrações de TGF β (3 ng/mL, 1 ng/mL e 0,3 ng/mL). Na segunda placa, para induzir a diferenciação e a proliferação de Th17, foram adicionados TGF β (2,5 ng/mL) e IL6 (20 ng/mL). Logo em seguida, foram adicionadas diferentes concentrações do extrato aquoso de *Fridericia chica* (10 µg/mL, 30 µg/mL e 100 µg/mL), em ambas as placas, durante 72h. As placas foram incubadas em atmosfera úmida, a 37ºC, contendo 5% de CO_2.

4.7.12. Marcação Extracelular e Intracelular por Citometria de Fluxo

Após 72h a incubação com o extrato aquoso de *Fridericia chica*, as células foram centrifugadas e o sobrenadante foi descartado. As células foram transferidas para outra placa de 96 poços de fundo U. Em seguida, foi adicionado em cada poço da placa, meio RPMI completo, PMA (50 ng/mL), Ionomicina (1 µM) e Brefeldina A (10 µg/mL). As células foram incubadas por 4 horas, a 37˚C e 5% de CO_2. Posteriormente foram realizadas as etapas de coloração, fixação e permeabilização, seguindo as instruções do fabricante (eBioscience). As células foram coradas com os marcadores extracelulares, os anticorpos anti CD4 (1:300) e DYE (1:3000), por 20 minutos à temperatura ambiente. Logo após as células foram permeabilizadas e fixadas com kit de solução Perm/Fix (eBioscience) e corados com os marcadores intracelulares, os anticorpos FOXP3 (1:200) e IL17 (1:200), por 20 minutos. Após 20 minutos, as células foram centrifugadas (4˚C, 450 g, por 6 minutos), ressuspensas em tampão FACS e analisadas no citômetro FACS Verse (BD Bioscience), e pelo Software FlowJo 10 (Treestar).

4.7.13. Polarização de Macrófagos

Os macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs) foram obtidos usando o meio condicionado L929 como fonte de fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF). As células da medula óssea foram obtidas de camundongos machos C57BL/6, com 6 semanas, por lavagem dos fêmures. Após a centrifugação, as células foram ressuspensas em meio RPMI 1640 suplementado com 20% de meio celular condicionado L929, 10% de SFB (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA), L-glutamina (2 mM), penicilina (100 U/mL) e fungizona (2,5 µg/mL). Células da medula óssea foram cultivadas em quatro placas de Petri não tratadas (Corning, 430591) e incubadas a 37ºC, contendo 5% de CO_2, durante quatro dias. Após quatro dias de cultivo, foi adicionado meio RPMI 1640 suplementado, e as células foram incubadas por mais três dias. Posteriormente, os BMDMs foram coletados, plaqueados e estimulados com IL-4 (20 ng/mL) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) para a diferenciação de M2, na presença das diferentes concentrações do extrato aquoso de *Fridericia chica* (1 µg/mL, 3 µg/mL, 10 µg/mL e 30 µg/mL).

4.7.14. Testes estatísticos

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

5. RESULTADOS

5.1. Obtenções e Rendimentos dos Extratos de *Fridericia chica*

Para a realização deste projeto foram obtidos dois tipos de extratos brutos, aquoso e acetato de etila. O extrato aquoso foi obtido pelo método de infusão e o extrato acetato de etila a partir do método de maceração. A secagem do extrato aquoso ocorreu por nebulização, através do equipamento de mini spray dryer, enquanto a secagem do extrato acetato de etila foi através do dessecador contendo sílica gel. Observa-se na figura 1 o extrato aquoso (A) e o extrato de acetato de etila (B), após passarem pelo método de secagem. Os rendimentos dos extratos de *Fridericia chica* estão expressos na tabela 1 de acordo com o método de secagem.

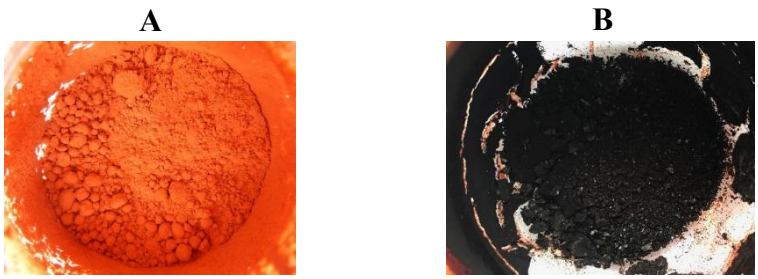


Figura 1. Extratos brutos da espécie *Fridericia chica*. A. Extrato aquoso (Nebulização). B. Extrato acetato de etila (Dessecador/ sílica gel).

Tabela 1. Rendimento percentual dos extratos de *Fridericia chica*.

Extrato	Método de secagem	Rendimento (%)
Aquoso (Infusão)	Nebulização	9,028
Acetato de etila	Evaporação	3,053

Os rendimentos percentuais dos extratos foram calculados através de regra de três simples, no qual o extrato aquoso apresentou um maior rendimento em comparação ao rendimento extrato acetato de etila.

5.2. Obtenções e Rendimentos das Frações do Extrato Bruto Acetato de Etila

No fracionamento a partir do extrato bruto acetato de etila, realizado por cromatografia em coluna, foram utilizados diferentes solventes, de acordo com a ordem crescente de polaridade. Na figura 2 é possível observar as dez frações (F1-F10) obtidas. O rendimento de cada fração foi calculado, conforme descrito na tabela 2.

Tabela 2. Rendimento das Frações obtidas a partir do extrato bruto em acetato de etila.

Fração	Gradiente	Proporção	Volume (mL)	Quantidade (g)
-	Hexano	100%	1700	Descartada
F1	Hexano: Diclorometano	7: 3	1250	1,632
F2	Hexano: Diclorometano	3: 7	500	4,188
F3	Diclorometano: Acetato	8: 2	1500	0,560
F4	Diclorometano: Acetato	8: 2	2000	11,783
F5	Diclorometano: Acetato	1: 1	3000	3,938
F6	Acetato	100%	2000	1,787
F7	Acetato: Metanol	9,5: 0,5	2000	2,558
F8	Acetato: Metanol	8: 2	500	0,442
F9	Acetato: Metanol	1: 1	1000	3,139
F10	Metanol	100%	4000	1,034

As quantidades das frações em gramas, foram calculadas pela subtração do peso do frasco com a amostra (P.F.A) pelo peso do fraco vazio (P.F).

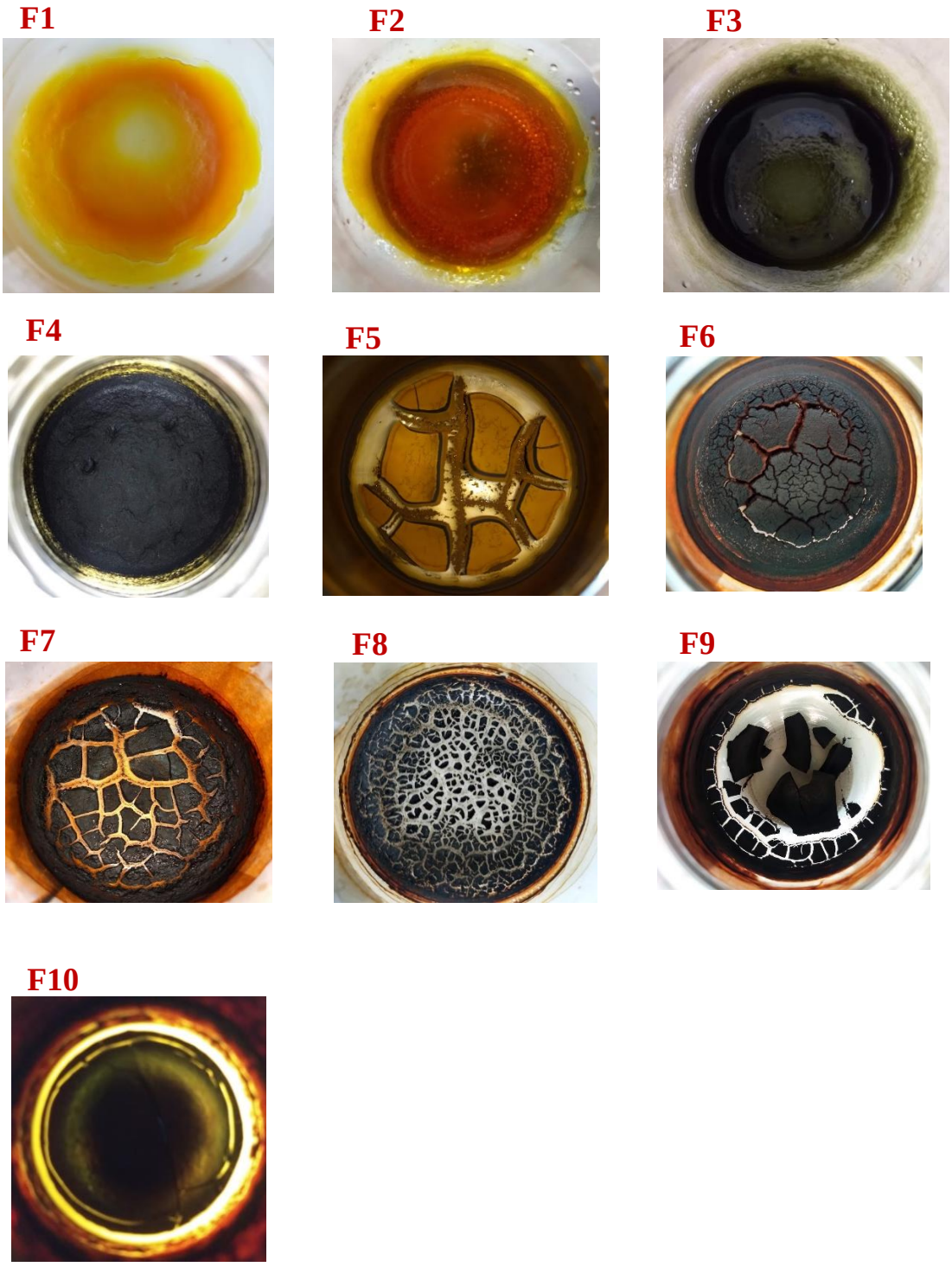
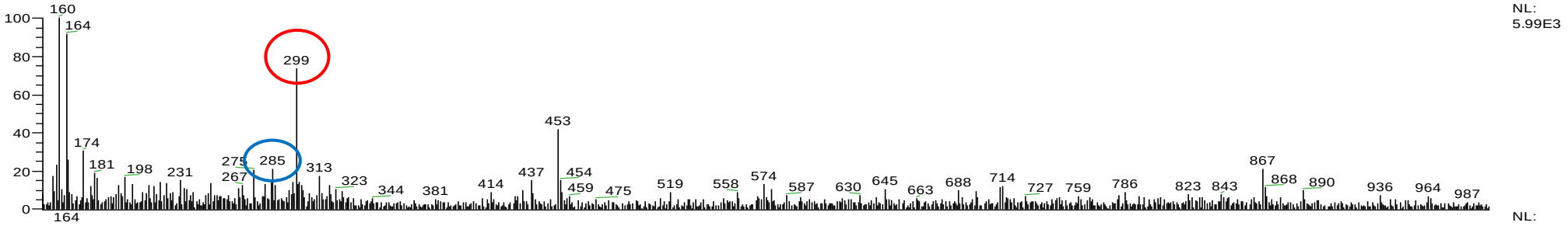


Figura 2. Frações (F1-F10) obtidas a partir do extrato bruto em acetato de etila da espécie *Fridericia* chica. As frações foram obtidas por cromatografia em coluna, de acordo com a ordem crescente de polaridade dos diferentes solventes.

5.3. Perfil Químico dos Extratos brutos e das Frações de *Fridericia chica*

Nas Figuras 3 e 4 são apresentados os espectros relacionados ao perfil químico dos extratos brutos (aquoso e acetato de etila) e das Frações (F5 a F10) da espécie *Fridericia chica*. Os espectros mostram os íons (substâncias, interferentes ou contaminantes) presentes nos extratos brutos e nas frações. De acordo com os espectros encontrados no extrato aquoso, observa-se que ele é um extrato mais é complexo (maior quantidade de íons com intensidades elevadas). O extrato acetato de etila é considerado um extrato mais limpo (puro), quando comparado ao extrato aquoso, sendo formado principalmente pelos íons 299 e 285. Os íons 299 e 285 foram identificados, juntos ou individualmente, nos extratos brutos e nas Frações (F6, F7, F8, F9 e F10), por isso foram selecionados para a realização do processo de fragmentação e determinação das substâncias.

A) Extrato Aquoso



B) Extrato Acetato de Etila

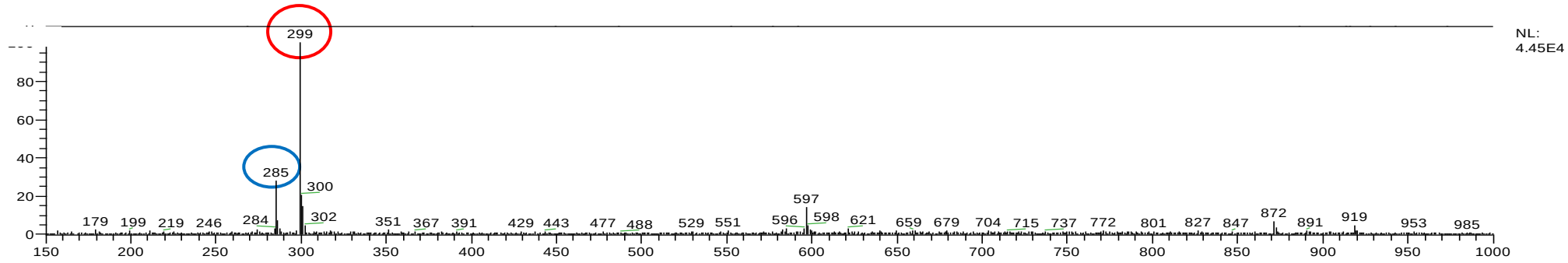
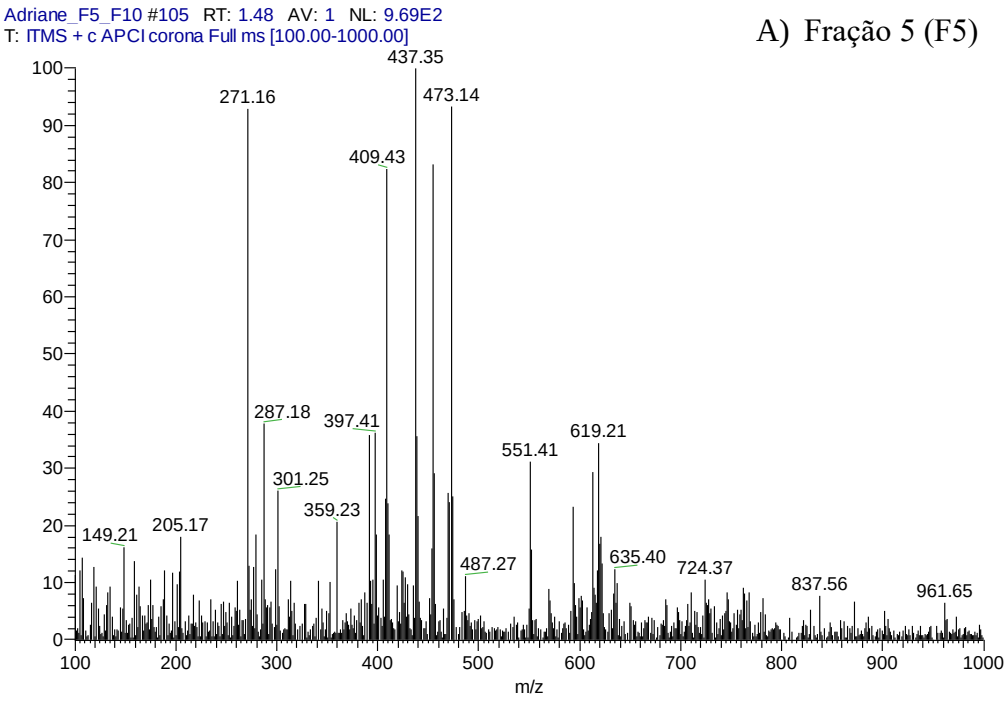


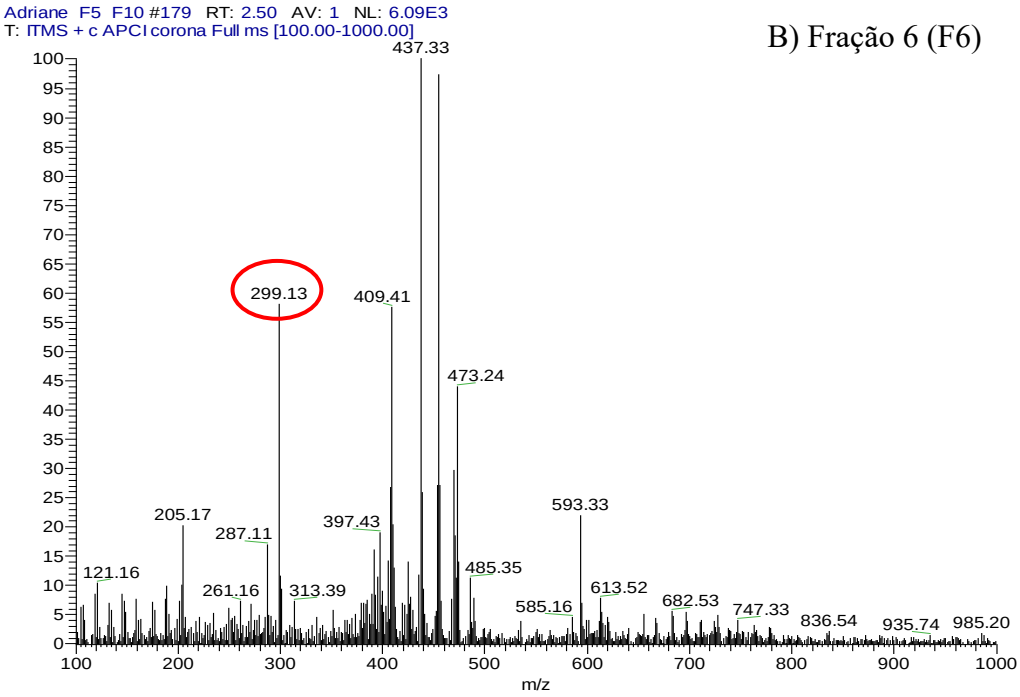
Figura 3. Perfil químico dos extratos de *Fridericia chica*.

As análises do perfil químico dos extratos de *Fridericia chica* ocorreram pela solubilização do extrato aquoso (infusão) e do extrato acetato de etila em metanol e a análise por infusão direta no espectrômetro de massa. Os íons 299 e 285 foram identificados com intensidades elevadas nos dois extratos. De acordo com a diminuição da intensidade elevada dos íons, observado no espectro B, o extrato acetato de etila é mais limpo e menos complexo, sendo considerado o mais puro.

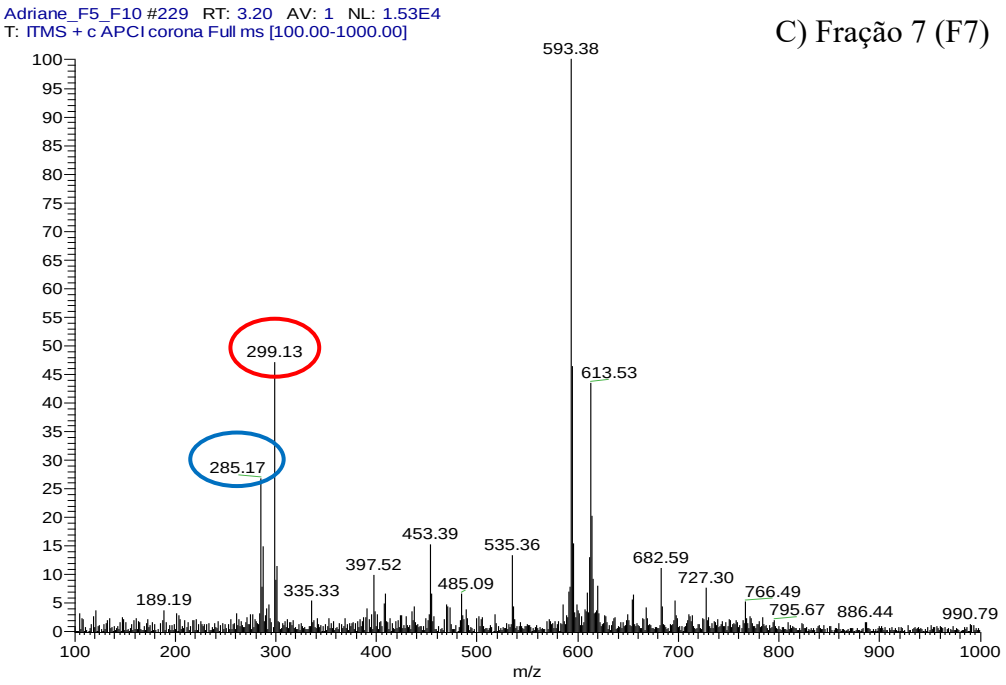
A) Fração 5 (F5)



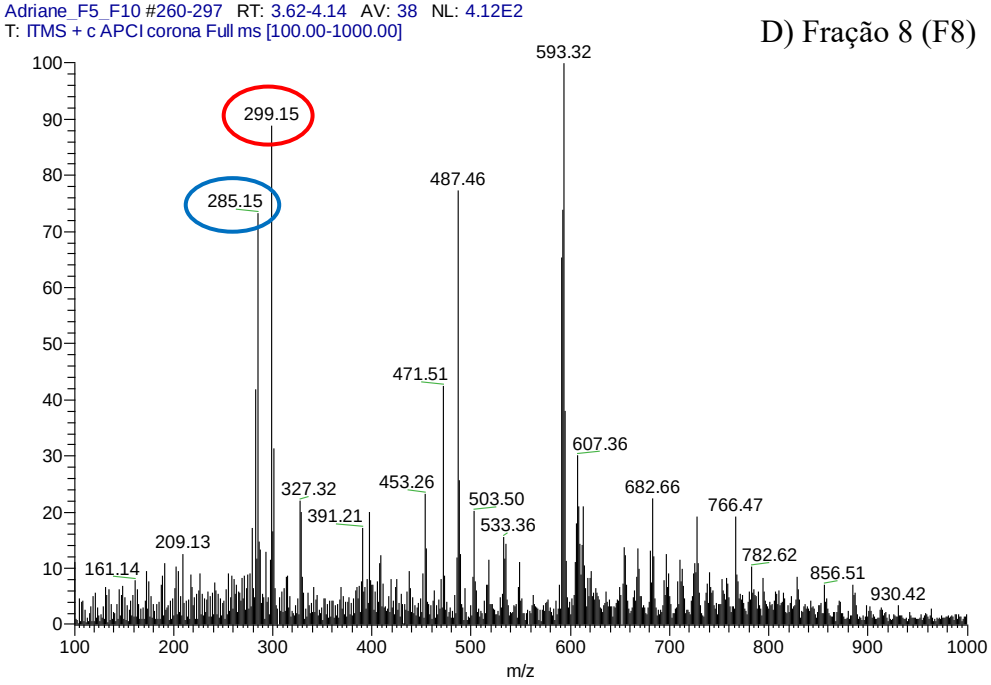
B) Fração 6 (F6)



C) Fração 7 (F7)



D) Fração 8 (F8)



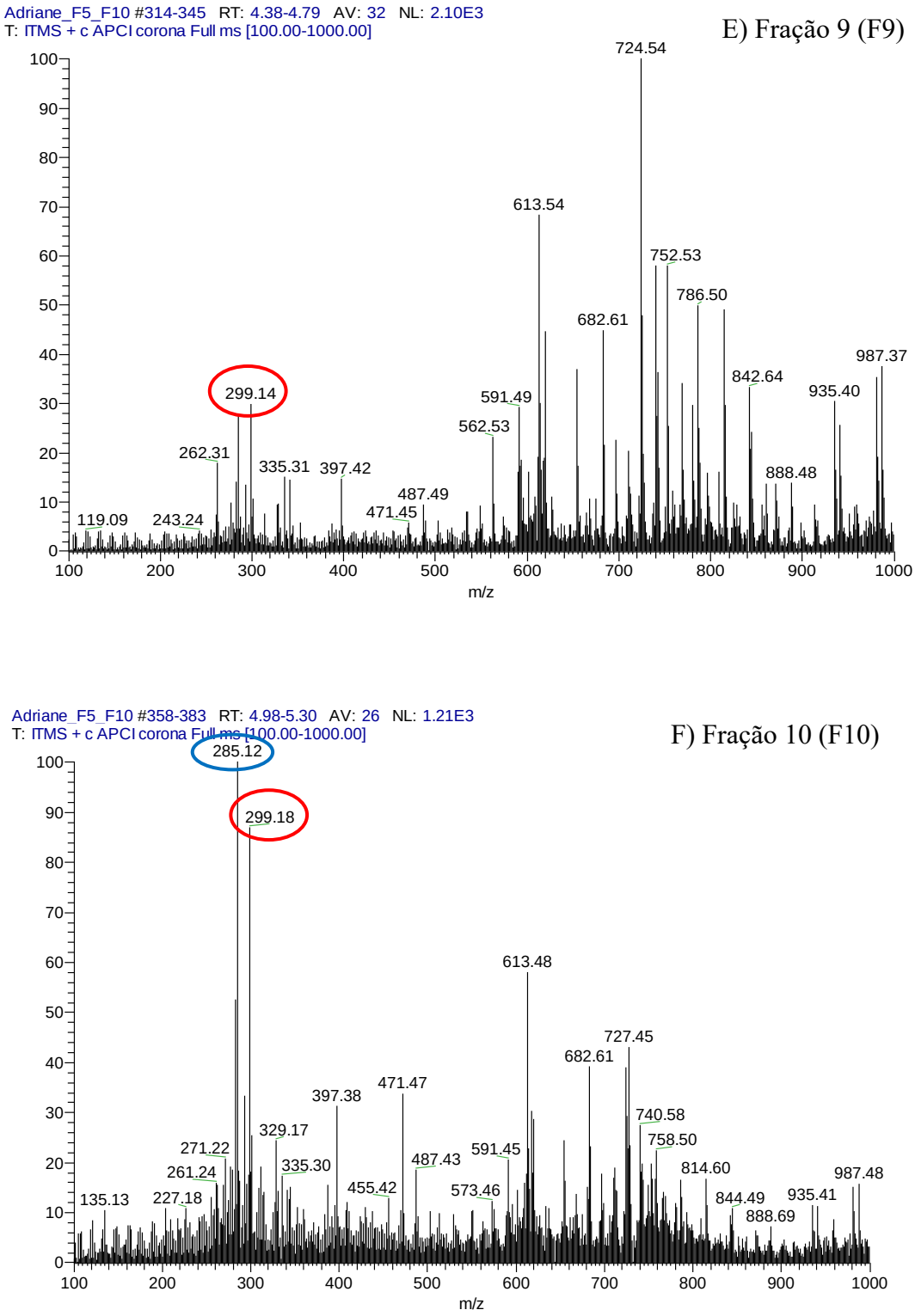


Figura 4. Perfil químico das Frações (F5-F10) obtidas a partir do extrato bruto em acetato de etila da espécie *Fridericia chica*. As Frações foram solubilizadas com metanol e analisadas por infusão direta no espectrômetro de massa. Os íons (299 e 285) foram identificados nas frações, juntos (F7, F8 e F10) ou individualmente (F6 e F9).

5.4. Fragmentação dos íons com intensidades elevadas nos extratos de *Fridericia chica*.

A partir da análise dos íons (299 e 285), que apresentaram intensidades elevadas nos extratos brutos (aquoso e acetato de etila) e foram identificados nas frações, foi possível identificar substâncias principais existentes na espécie *Fridericia chica*. O íon 299 (A) é o pigmento conhecido como carajurina (componente principal da espécie) e o íon 285 (B) que é chamado de carajurona, ambos são pigmentos majoritários pertencentes à espécie *Fridericia chica* (figura 5).

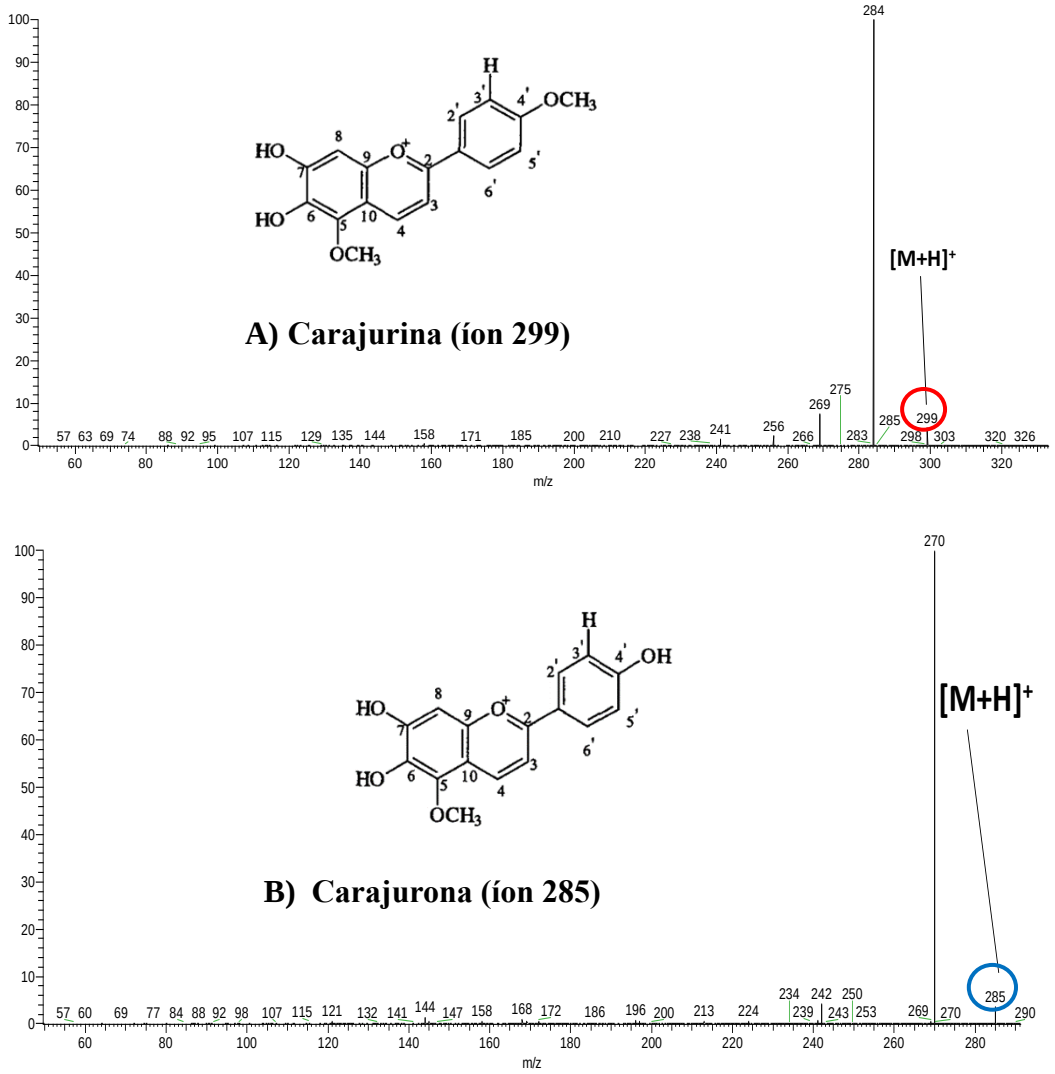


Figura 5. Identificação dos íons 299 e 285 presentes nos extratos de *Fridericia chica*. A fragmentação dos íons 299 e 285 presentes nos espectros dos extratos e frações analisadas, foram realizadas por meio da espectrometria de massa. Os íons 299 (A) e 285 (B) apresentaram-se com intensidades elevadas nos extratos brutos e foram identificadas nas frações. O íon identificado no espectro A é a carajurina, (pigmento principal encontrado na espécie *Fridericia chica*), no espectro B encontra-se o pigmento carajurona, íons identificados como pigmentos principais responsáveis pela presença da coloração avermelhada da espécie.

5.5. Ancoragem das Moléculas desoxiantocianidinas, pertencentes à espécie *Fridericia chica*, em Sítios Ativos da Proteína Ciclooxigenase-2 (COX-2)

O ensaio de ancoragem molecular foi avaliado a partir da ligação de Rofecoxib (RCX), inibidor específico de COX-2, e das moléculas desoxiantocianidinas, isoladas da espécie *Fridericia chica*, em sítios ativos da proteína Ciclooxigenase-2 (COX-2). A estrutura cristalográfica de COX-2 (proteína de origem humana) foi complexada com o ligante rofecoxib, resultando em uma energia de ligação de -10,3 (kcal/mol). A molécula B, carajurona (6,7,4'-tri-hidroxi-5-metoxi-flavílio), apresentou uma energia de ligação de -8,0 (kcal/mol), a qual mais se aproximou da energia de ligação apresentada por rofecoxib, em relação a energia de -7,8 (kcal/mol) apresentada pela molécula C, carajurina (6,7-di-hidroxi-5,4'-dimetoxi-flavílio) (tabela 3).

Tabela 3. Energias de ligação para a ancoragem molecular entre os ligantes e o sítio ativo da COX-2.

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

A molécula B, carajurona (6,7,4'-tri-hidroxi-5-metoxi-flavílio), apresentou uma energia de ligação (-8,0 kcal/mol) mais próxima do Rofecoxib (-10,3 kcal/mol), inibidor específico da COX-2, em relação a molécula C, carajurina (-7,8 kcal/mol). As energias de ligação foram calculadas pelo software *AutoDock Vina* para a ancoragem molecular entre os ligantes e o sítio ativo da COX-2.

De acordo com a figura 7, a molécula de rofecoxib apresentou ligações hidrofóbicas LEU-352, ALA-527, VAL-349, SER-353, VAL-523, PHE-518, além de duas interações de hidrogênio. A molécula B (carajurona) apresentou uma interação com hidrogênio, além de algumas ligações semelhantes à de rofecoxib, entre elas, VAL-523, ALA-527 e VAL-349. A molécula C (carajurina) apresentou duas ligações com hidrogênio, uma ligação com ARG-513 e algumas ligações hidrofóbicas semelhantes à de rofecoxib, como LEU-352, ALA-527, VAL-349 e VAL-523.

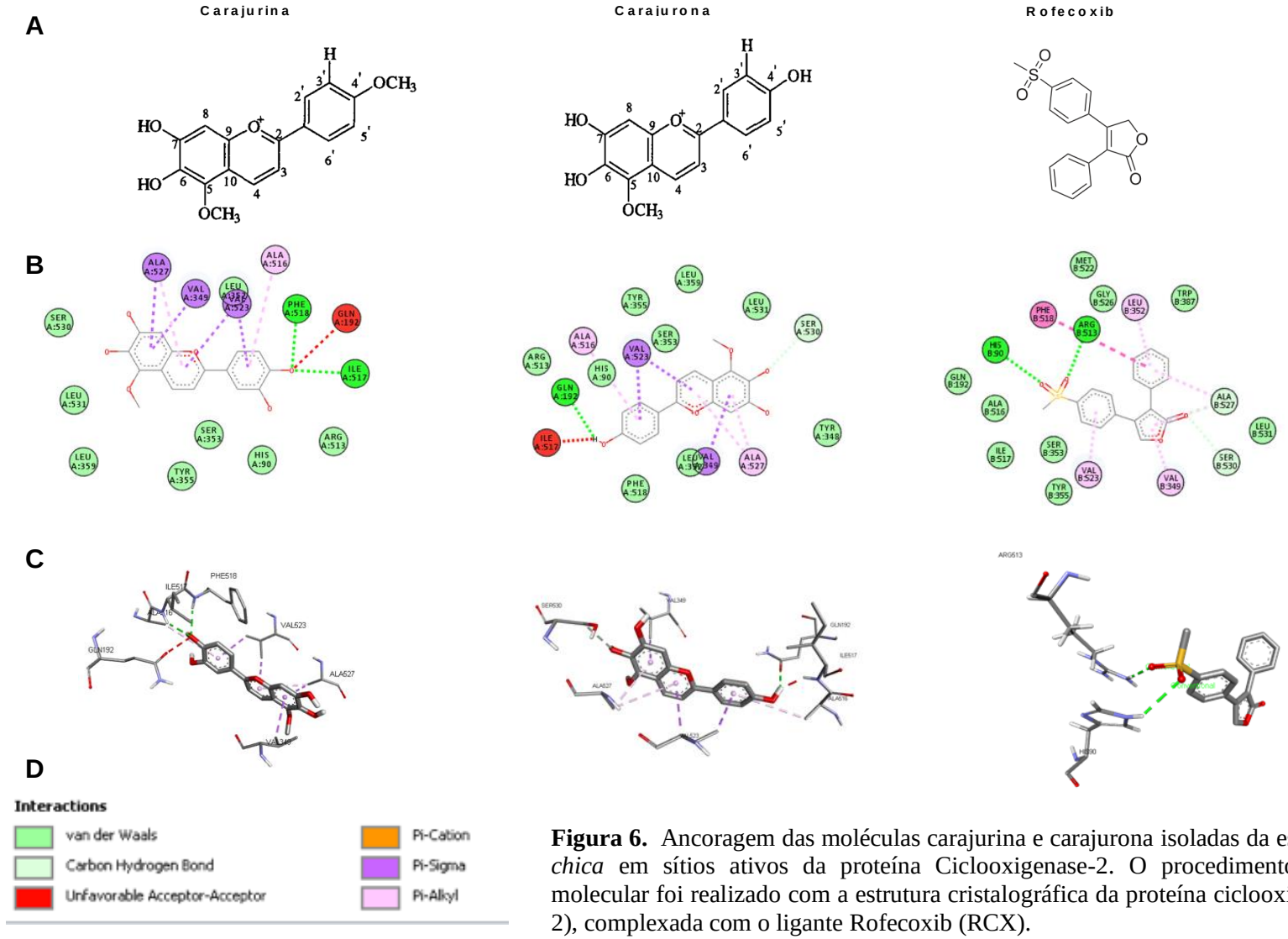


Figura 6. Ancoragem das moléculas carajurina e carajurona isoladas da espécie *Fridericia chica* em sítios ativos da proteína Ciclooxigenase-2. O procedimento de ancoragem molecular foi realizado com a estrutura cristalográfica da proteína ciclooxigenase-2 (COX-2), complexada com o ligante Rofecoxib (RCX).

5.6. Avaliação da Citotoxicidade dos Extratos de *Fridericia chica*

De acordo com o tratamento estabelecido para cada linhagem, a avaliação da citotoxicidade dos extratos brutos e das frações da espécie *Fridericia chica* sobre as células THP-1, J774-A1 (figura 9), HL60 (figura 10) e PBMC (figura 11) foi realizada utilizando-se diferentes concentrações, entre 1 µg/mL a 1000 µg/mL, e diferentes tempos de tratamento (24h, 48h e 72h), conforme o delineamento experimental.

As células THP-1 (monócitos humanos derivados de leucemia monocítica), diferenciadas, foram tratadas por 48 horas com os extratos aquoso e acetato de etila (1µg/mL, 10µg/mL, 100µg/mL e 1000µg/mL). A estaurosporina (2,5 µM/mL) foi utilizada como controle positivo. O extrato acetato de etila apresentou maior toxicidade as células THP-1 na concentração de 1000µg/mL (IC50%=264,5µg). O extrato aquoso não apresentou toxidade em nenhuma das concentrações testadas (figuras 8 e 9).

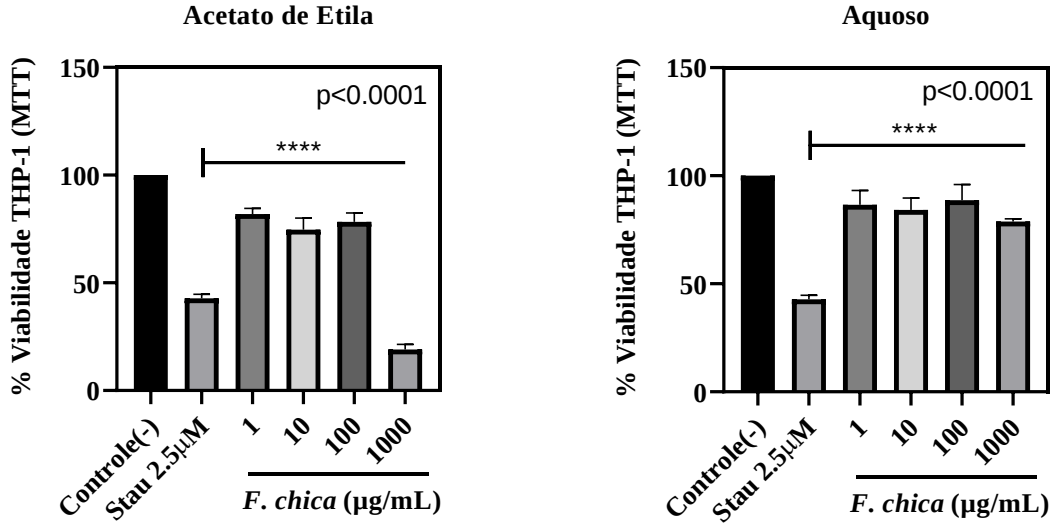


Figura 7. Avaliação da toxicidade dos extratos brutos da espécie *Fridericia chica* sobre as células THP-1. As células THP-1 foram tratadas com os extratos brutos aquoso e acetato de etila (1 µg/mL, 10 µg/mL, 100 µg/mL e 1000 µg/mL) por 48 horas. A estaurosporina (2,5 µM/mL) foi utilizada como controle positivo. O extrato acetato de etila apresentou maior toxicidade aos macrófagos THP-1 na concentração de 1000 µg/mL. O extrato aquoso não atingiu 50% de efeitos nas concentrações testadas, desta forma, a IC50% não pôde ser estimada para esse extrato. Os resultados obtidos foram analisados no software GraphPad Prisma 8.0. As análises foram realizadas em comparação ao controle positivo. Os dados são representados como média e desvio padrão. As médias foram comparadas por one-way ANOVA. *p<0,05 indica os valores significativamente diferentes entre os grupos.

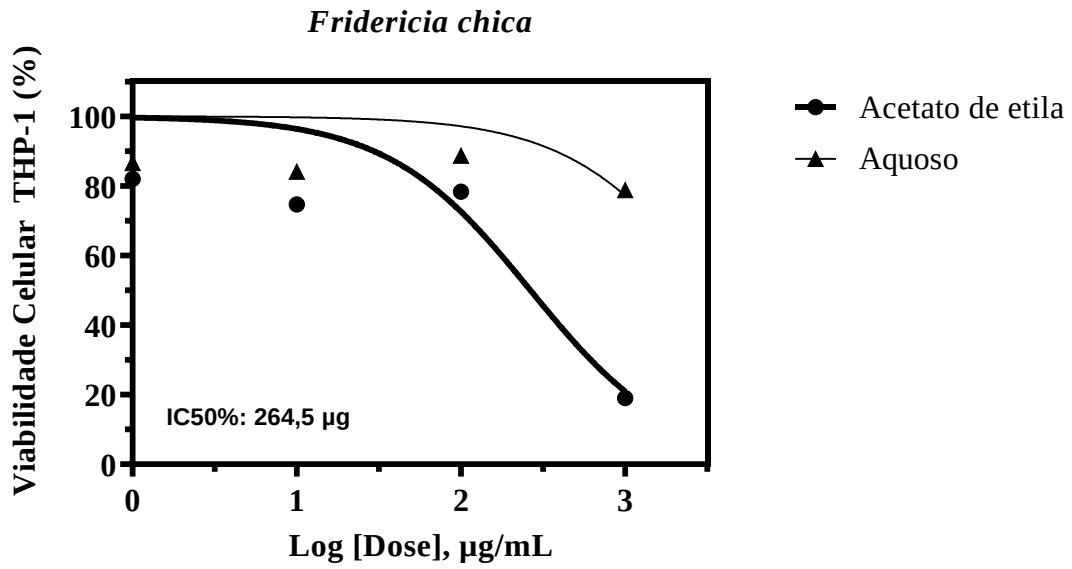


Figura 8. Determinação da IC50% para toxicidade dos extratos brutos da espécie *Fridericia chica* em células THP-1. O extrato acetato de etila apresentou maior toxicidade aos macrófagos THP-1 na concentração de 1000 µg/mL (IC50%=264,5µg). O extrato aquoso não atingiu 50% de efeitos nas concentrações testadas, desta forma, a IC50% não pôde ser estimada para esse extrato. Os resultados obtidos foram calculados em escala logarítmica e analisados no software GraphPad Prisma 8.0 para obtenção das curvas de IC50%, por meio de regressão não linear.

As células J774-A1 (macrófagos de camundongo) foram tratadas com as diferentes concentrações do extrato aquoso de *Fridericia chica* (10 µg/mL, 30 µg/mL, 100 µg/mL e 300 µg/mL), durante 24 horas. O veneno de *Bothrops atrox* (BaV), na concentração de 6,25 µg/mL, foi utilizado como controle positivo. O extrato aquoso, nas concentrações utilizadas, não apresentou toxidade para a linhagem J774-A, conforme ilustrado na figura 10.

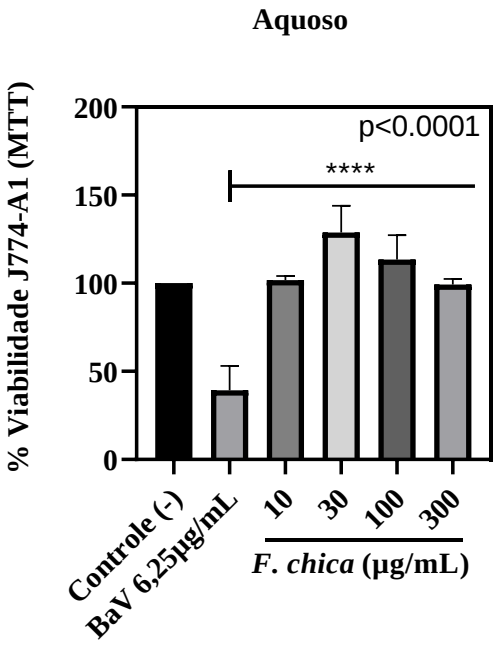


Figura 9. Avaliação da toxicidade do extrato aquoso da espécie *Fridericia chica* sobre as células J774-A1. O extrato aquoso foi testado nas concentrações de 10 µg/mL, 30 µg/mL, 100 µg/mL e 300 µg/mL, por 24h. O veneno de *Bothrops atrox* (BaV) (6,25 µg/mL) foi utilizado como controle positivo. O extrato aquoso não apresentou toxidade as células J774-A1, em nenhuma das concentrações testadas. Os resultados obtidos foram analisados no software GraphPad Prisma 8.0. As análises foram realizadas em comparação ao controle positivo. Os dados são representados como média e desvio padrão. As médias foram comparadas por one-way ANOVA. *p<0,05 indica os valores significativamente diferentes entre os grupos.

As células da linhagem HL60 (Leucemia mieloide aguda humana) foram tratadas com o extrato aquoso da espécie *Fridericia chica* nas concentrações de 12 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL, nos tempos de 24 horas, 48 horas e 72 horas. DMSO a 100% foi utilizado como controle positivo. O extrato aquoso na concentração de 12 µg/mL, no tempo de 24h, não apresentou toxidade celular. O aumento da toxicidade do extrato aquoso sobre as células HL60 foi dependente das concentrações e dos tempos de tratamento. A IC50% foi igual a 6.77 µM (figuras 11 e 12).

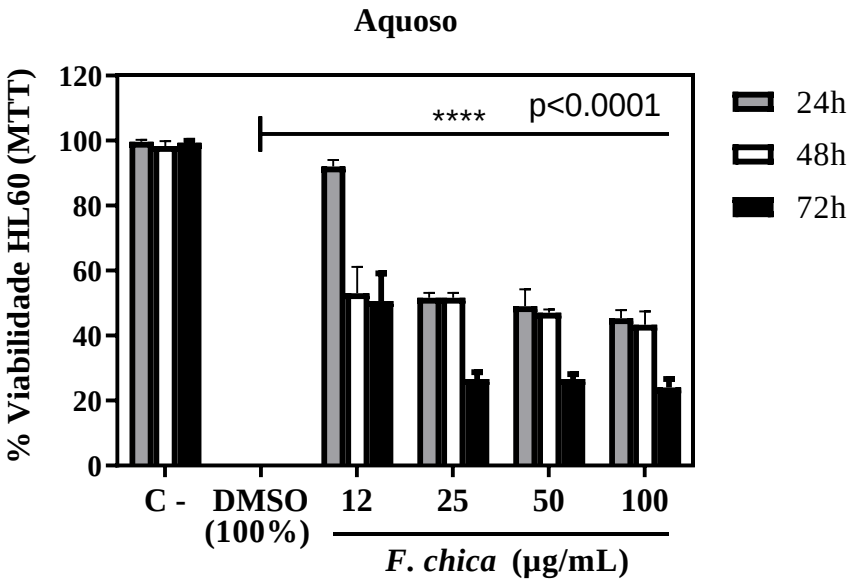


Figura 10. Avaliação da toxicidade do extrato aquoso da espécie *Fridericia chica* sobre as células HL60. O extrato aquoso foi testado nas concentrações de 12 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL, durante 24h, 48h e 72h. DMSO a 100% foi utilizado como controle positivo. O tratamento com a concentração de 12 µg/mL, no tempo de 24h, não apresentou toxidade as células HL60. O aumento da toxidade foi dependente das concentrações e dos tempos testados. Os resultados obtidos foram analisados no software GraphPad Prisma 8.0. As análises foram realizadas em comparação ao controle positivo. Os dados são representados como média e desvio padrão. As médias foram comparadas por one-way ANOVA. *p<0,05 indica os valores significativamente diferentes entre os grupos.

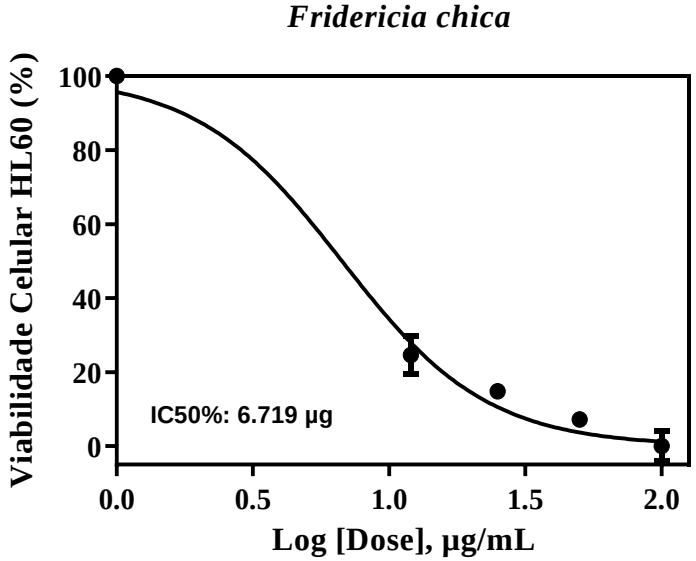


Figura 11. Determinação da IC50% para toxicidade dos extratos brutos da espécie *Fridericia chica* em células HL60. O efeito citotóxico do extrato aquoso sobre as células HL60 resultou em uma IC50% de 6.719 µg. Os resultados obtidos foram calculados em escala logarítmica e analisados no software GraphPad Prisma 8.0 para obtenção das curvas de IC50%, por meio de regressão não linear.

As células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMC) foram tratadas com diferentes concentrações dos extratos brutos (1 µg/mL, 3 µg/mL, 10 µg/mL, 30 µg/mL e 50 µg/mL) e com as frações F5 a F10 na concentração de 30 µg/mL, por 24 horas. O veneno de *Bothrops atrox* (BaV) (5 µg/mL) foi utilizado como controle positivo. Os extratos brutos da espécie *Fridericia chica*, em nenhuma das concentrações testadas, não apresentaram toxidade sobre PBMC, conforme observado nas figuras 13. O tratamento com as frações (F5 a F10) não apresentaram toxicidade. Na presença do veneno, as frações não reverteram a citotoxicidade causadas por BaV (figuras 14).

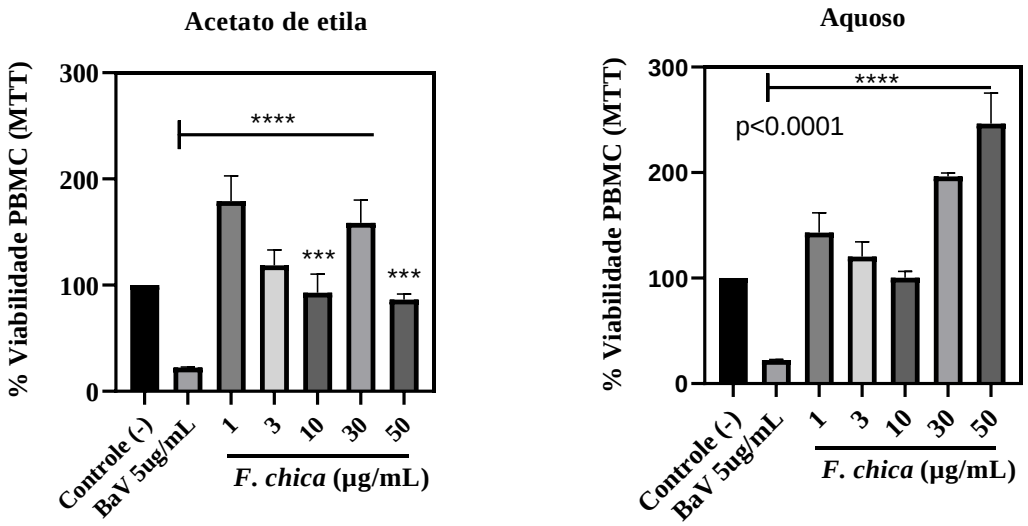


Figura 12. Avaliação da toxicidade dos extratos brutos da espécie *Fridericia chica* sobre as PBMC. O extratos aquosos e acetato de etila foram testados nas concentrações de 1 µg/mL, 3 µg/mL, 10 µg/mL, 30 µg/mL e 50 µg/mL, por 24h. O veneno de *Bothrops atrox* (5 µg/mL) foi utilizado como controle positivo. Os extratos não apresentaram toxidade sobre as PBMC, em nenhuma das concentrações testadas. Os resultados obtidos foram analisados no software GraphPad Prisma 8.0. As análises foram realizadas em comparação ao controle positivo. Os dados são representados como média e desvio padrão. As médias foram comparadas por one-way ANOVA. *p<0,05 indica os valores significativamente diferentes entre os grupos

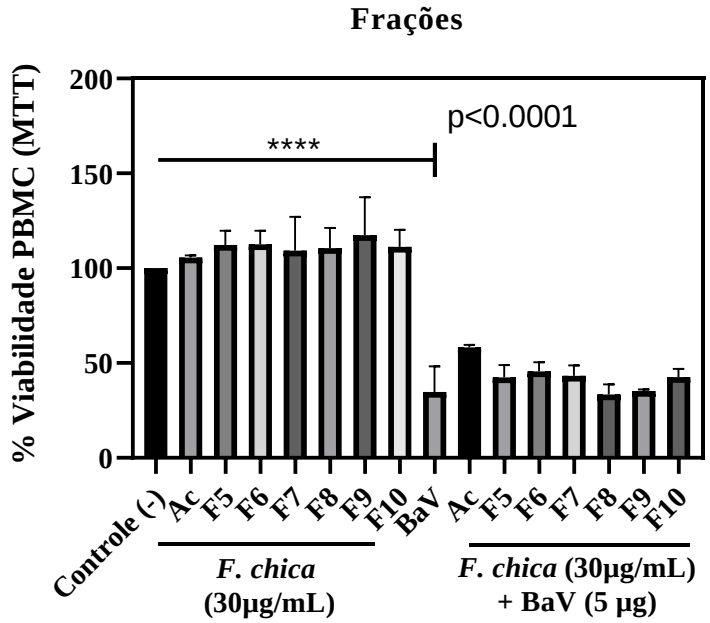


Figura 13. Avaliação da toxicidade das frações da espécie *Fridericia chica* sobre as PBMC. As frações (F5 a F10) e o extrato bruto acetato de etila foram avaliadas na concentração de 30 µg/mL, na ausência e na presença do veneno de *Bothrops atrox* (BaV) (5 µg/mL), utilizado como controle positivo. O extrato bruto acetato de etila e as frações não apresentaram toxidade sobre as PBMC, na concentração testada. As frações e o extrato bruto não conseguiram reverter a citotoxicidade causadas por BaV sobre PBMC, na concentração testada. Os resultados obtidos foram analisados no software GraphPad Prisma 8.0. As análises foram realizadas em comparação ao controle positivo. Os dados são representados como média e desvio padrão. As médias foram comparadas por one-way ANOVA. *p<0,05 indica os valores significativamente diferentes entre os grupos.

5.7. Atividade antioxidante dos extratos de *Fridericia chica* sobre a produção de Espécies Reativas de Oxigênio intracelular (iROS)

Para avaliar a atividade antioxidante dos extratos e frações da espécie *Fridericia chica*, Células Mononucleares Periféricas (PBMC) foram tratadas com diferentes concentrações dos extratos brutos (1 µg/mL, 3 µg/mL, 10 µg/mL, 30 µg/mL e 50 µg/mL), com as frações F5 a F10 (30 µg/mL) e estaurosporina (2,5µM), por 4 horas. Conforme observado nas figuras 15 e 16, o extrato acetato de etila e as frações (F5, F6, F9 e F10), na presença de estaurosporina, diminuíram as espécies reativas de oxigênio intracelular (iROS) em todas as concentrações testadas. O tratamento com o extrato aquoso e com as frações (F7 e F9), nas mesmas condições, diminuíram iROS nas concentrações de 10 µg/mL, 30 µg/mL e 50 µg/mL. Os níveis de iROS foram medidos utilizando a sonda fluorescente DCFDA a 25µM.

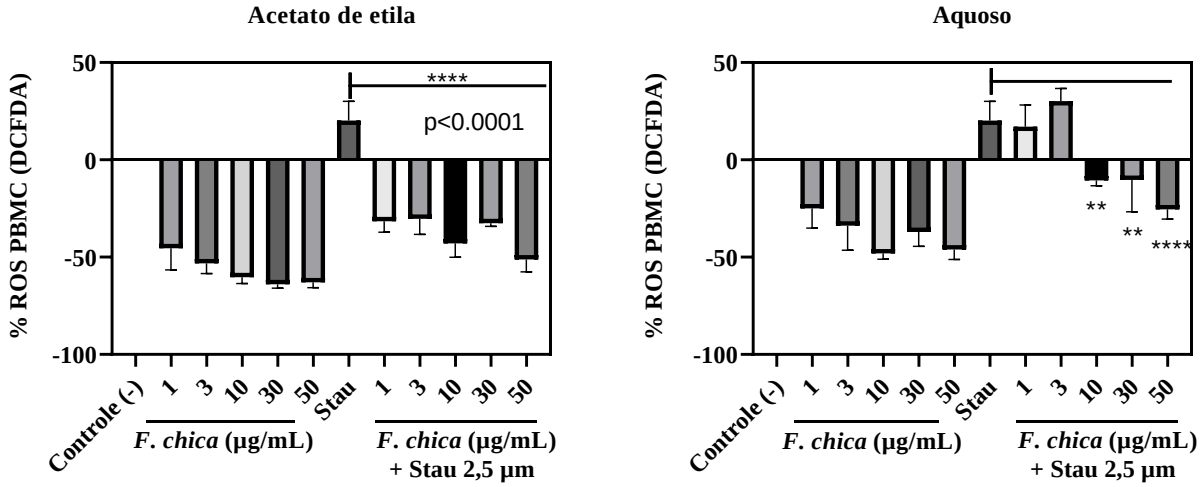


Figura 14. Efeito dos extratos de *Fridericia chica* sobre a produção de espécies reativas de oxigênio intracelular (iROS) em PBMC. O extratos aquoso e acetato de etila foram testados nas concentrações de 1 µg/mL, 3 µg/mL, 10 µg/mL, 30 µg/mL e 50 µg/mL, por 4h. Estaurosporina (2,5µM) foi utilizado como controle positivo. O extrato acetato de etila, na presença de estaurosporina, diminuiu iROS em todas as concentrações testadas. O extrato aquoso, nas mesmas condições, diminui iROS nas concentrações de 10 µg/mL, 30 µg/mL e 50 µg/mL. Os resultados obtidos foram analisados no software GraphPad Prisma 8.0. Os dados são representados como média e desvio padrão. As médias foram comparadas por one-way ANOVA. *p<0,05 indica os valores significativamente diferentes entre os grupos.

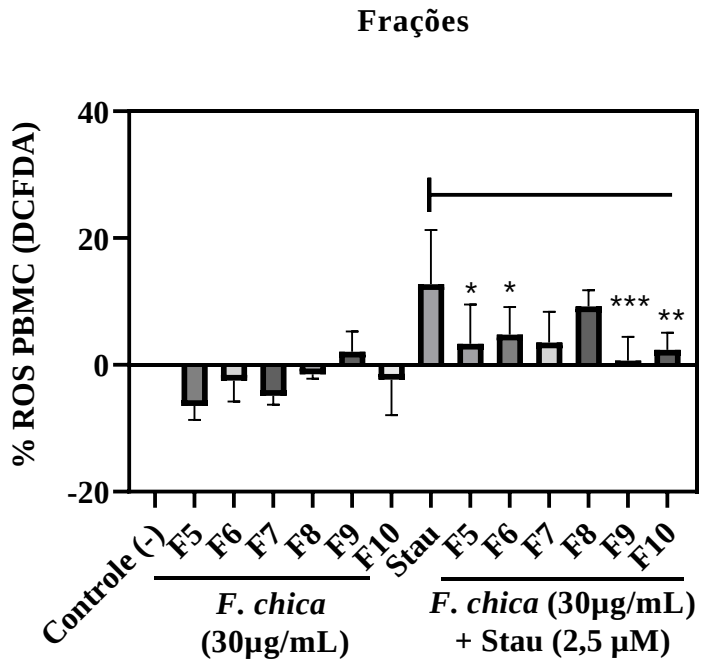


Figura 15. Efeito das frações da espécie *Fridericia chica* sobre a produção de espécies reativas de oxigênio intracelular (iROS) em PBMC. As frações foram testadas nas concentrações de 30 µg/mL por um tempo de 4h. Estaurosporina (2,5µM) foi utilizado como controle positivo. As frações F5, F6, F9 e F10 diminuíram as espécies reativas de oxigênio intracelular (iROS), na presença de estaurosporina. As frações F7 e F8, nas mesmas condições, não apresentaram diferença estatística quando comparadas ao controle positivo. Os resultados obtidos foram analisados no software GraphPad Prisma 8.0. Os dados são representados como média e desvio padrão. *p<0,05 indica os valores significativamente diferentes entre os grupos. As médias foram comparadas por one-way ANOVA. *p<0,05 indica os valores significativamente diferentes entre os grupos.

5.8. Efeito Protetor dos extratos de *Fridericia chica* sobre Potencial de Membrana Mitocondrial (ΔΨm)

Para avaliar o efeito protetor sobre a membrana mitocondrial dos extratos e frações da espécie *Fridericia chica*, Células Mononucleares Periféricas (PBMC) foram tratadas com diferentes concentrações dos extratos brutos (1 µg/mL, 3 µg/mL, 10 µg/mL, 30 µg/mL e 50 µg/mL), das frações F5 a F10 (30 µg/mL) e estaurosporina (2,5µM), durante 4h. O extrato acetato de etila e as frações F5 a F10, na presença de estaurosporina, aumentaram o potencial de membrana mitocondrial. O extrato aquoso, nas mesmas condições de tratamento, aumentou o potencial de membrana nas concentrações 3 µg/mL, 10 µg/mL, 30 µg/mL e 50 µg/mL. O potencial de membrana intracelular foi avaliado utilizando-se o corante lipofílico DiOC6 a 2µM (figuras 17 e 18).

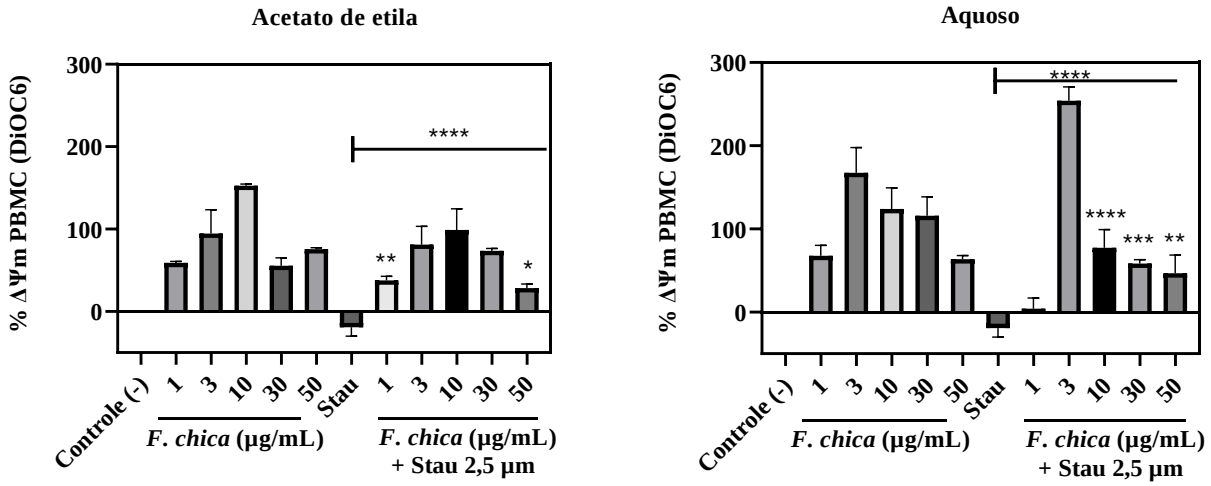


Figura 16. Efeito protetor dos extratos de *Fridericia chica* sobre o Potencial de Membrana Mitocondrial (ΔΨm) em PBMC. O extratos aquoso e acetato de etila foram testados nas concentrações de 1 µg/mL, 3 µg/mL, 10 µg/mL, 30 µg/mL e 50 µg/mL, por 4h. Estaurosporina (2,5µM) foi utilizado como controle positivo. O extrato acetato de etila, na presença de estaurosporina, aumentou o potencial de membrana mitocondrial em todas as concentrações testadas. O extrato aquoso, nas mesmas condições, aumentou o potencial de membrana nas concentrações 3 µg/mL, 10 µg/mL, 30 µg/mL e 50 µg/mL, sem apresentar diferença estatística na concentração de 1 µg/mL. Os resultados obtidos foram analisados no software GraphPad Prisma 8.0. Os dados são representados como média e desvio padrão. As médias foram comparadas por one-way ANOVA. *p<0,05 indica os valores significativamente diferentes entre os grupos.

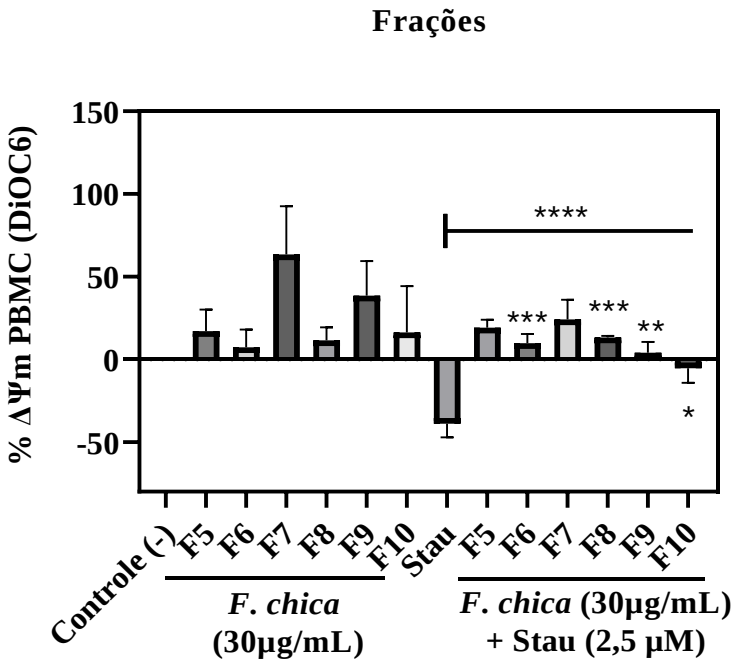


Figura 17. Efeito protetor das frações de *Fridericia chica* sobre o Potencial de Membrana Mitocondrial (ΔΨm) em PBMC. As frações F5 a F10 foram testadas nas concentrações de 30 µg/mL por de 4h. Estaurosporina (2,5µM) foi utilizado como controle positivo. Todas as frações, na presença de estaurosporina, aumentaram o potencial de membrana mitocondrial. Os resultados obtidos foram analisados no software GraphPad Prisma 8.0. Os dados são representados como média e desvio padrão. As médias foram comparadas por one-way ANOVA. *p<0,05 indica os valores significativamente diferentes entre os grupos.

5.9. Efeito inibidor dos extratos brutos e das frações de *Fridericia chica* sobre a produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1β e TNF-α.

Para avaliar a atividade anti-inflamatória dos extratos e frações da espécie *Fridericia chica*, sobrenadantes das Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMC) foram tratadas com diferentes concentrações dos extratos brutos (1 µg/mL, 3 µg/mL, 10 µg/mL, 30 µg/mL e 50 µg/mL), com as frações F5 a F10 (30 µg/mL), e o veneno de *Bothrops atrox* (BaV) (5 µg/mL), por 24 horas. O extrato bruto acetato de etila, em todas as concentrações testadas, diminuiu a produção de IL-1β induzida por BaV. O extrato aquoso, nas concentrações de 10 µg/mL, 30 µg/mL e 50 µg/mL, também diminuíram a produção de IL-1β. O tratamento com as frações F5, F7, F8, F9 e F10, na presença de BaV, diminuíram a produção da citocina IL-1β.
O extrato aquoso em todas as concentrações testadas, diminuiu a produção de TNF-α induzida por BaV. O extrato acetato de etila, diminuiu a produção de TNF-α nas concentrações de 30 µg/mL e 50 µg/mL. Apenas a fração F9 diminuiu a produção de TNF-α induzida pelo veneno (BaV) (figuras 19 e 20).

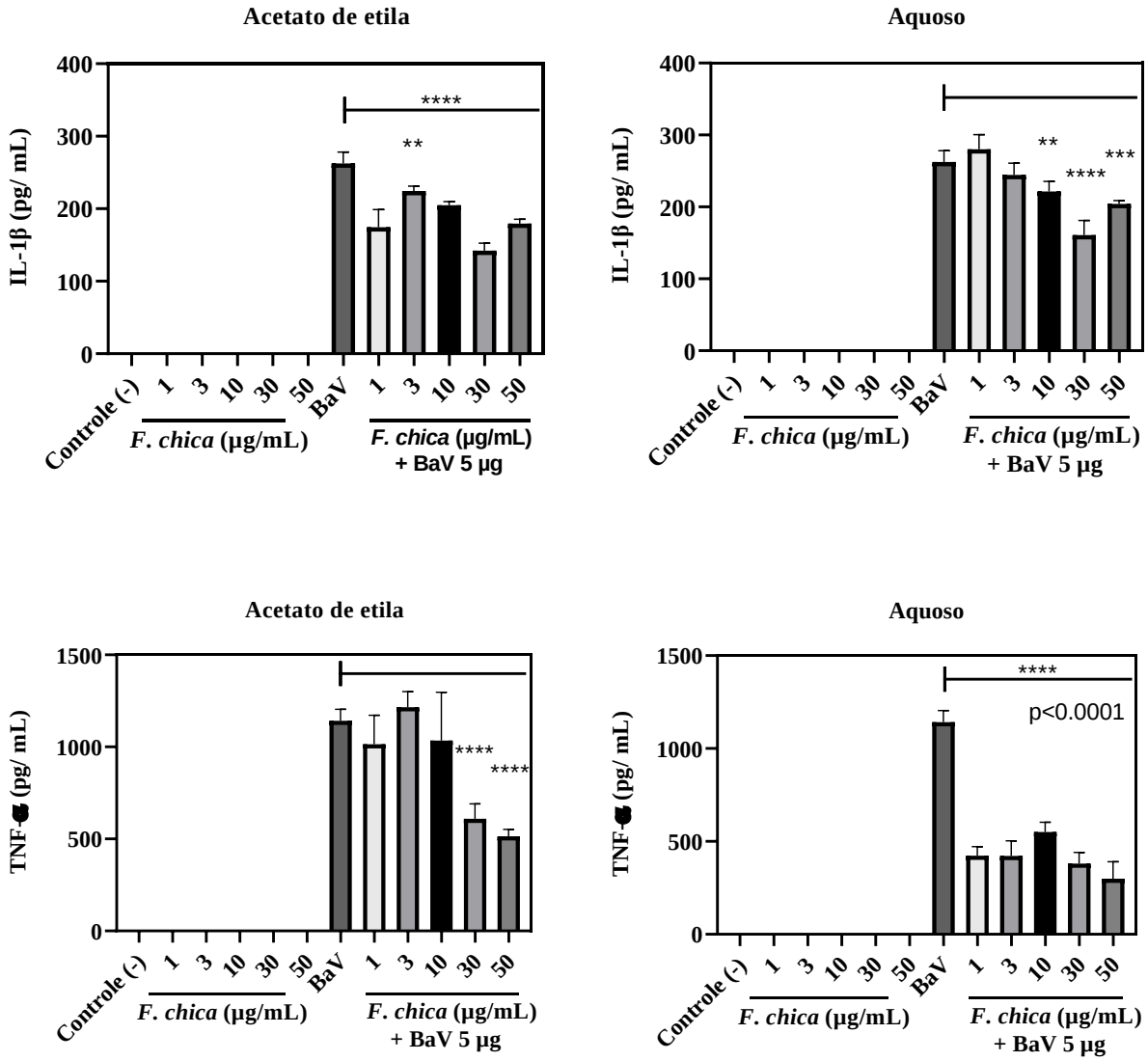


Figura 18. Efeito inibidor dos extratos brutos da espécie *Fridericia chica* sobre a produção de IL-1β e TNF-α, em PBMC. Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMC) foram tratadas com diferentes concentrações dos extratos brutos (1 µg/mL, 3 µg/mL, 10 µg/mL, 30 µg/mL e 50 µg/mL, e com o veneno de *Bothrops atrox* (BaV) (5 µg/mL), por 24 horas. O extrato bruto acetato de etila, em todas as concentrações testadas, diminuiu a produção de IL-1β. O extrato aquoso, nas concentrações de 10 µg/mL, 30 µg/mL e 50 µg/mL, também diminuíram a produção da citocina pró-inflamatória. O extrato aquoso em todas as concentrações testadas, diminuiu a produção de TNF-α induzida por BaV. O extrato acetato de etila, diminuiu a produção de TNF-α, apenas nas concentrações de 30 µg/mL e 50 µg/mL. Os resultados obtidos foram analisados no software GraphPad Prisma 8.0. Os dados são representados como média e desvio padrão. As médias foram comparadas por one-way ANOVA. *p<0,05 indica os valores significativamente diferentes entre os grupos.

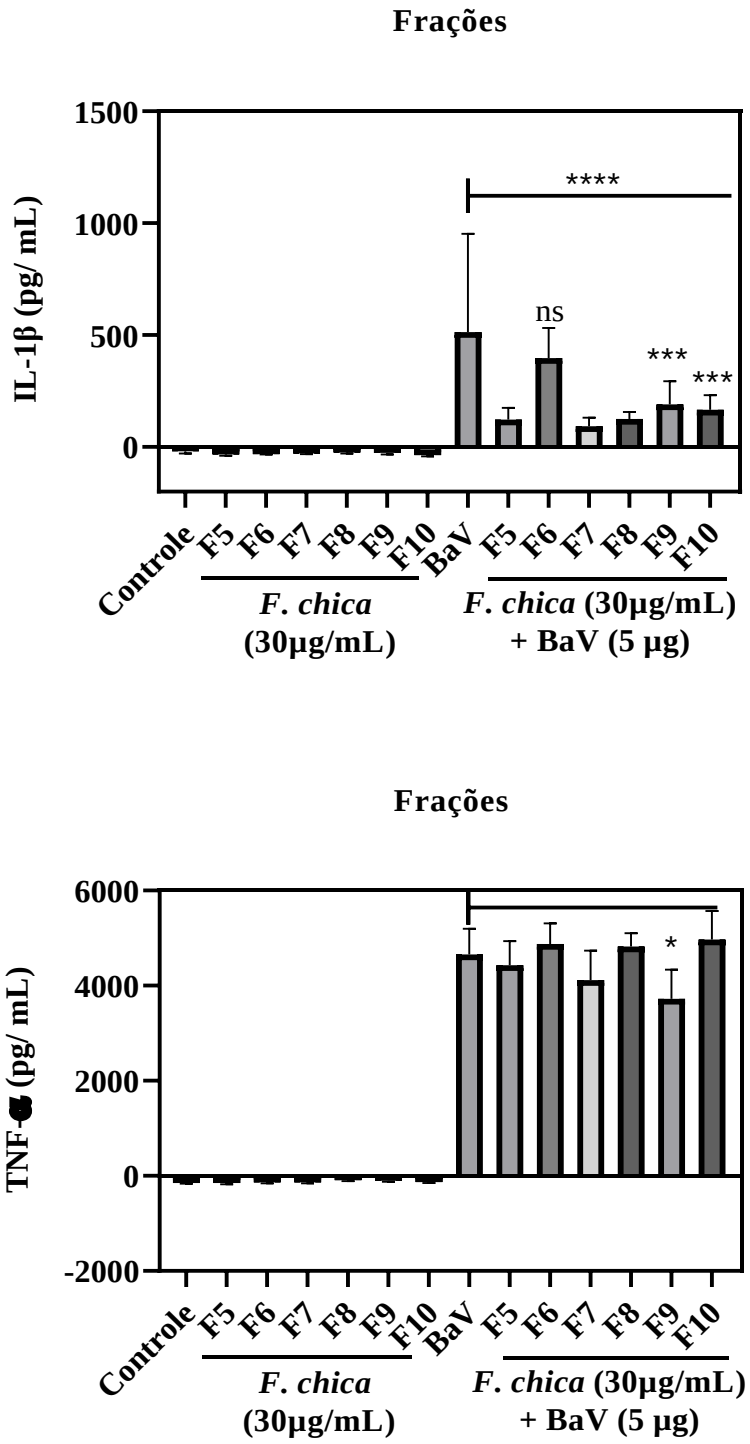
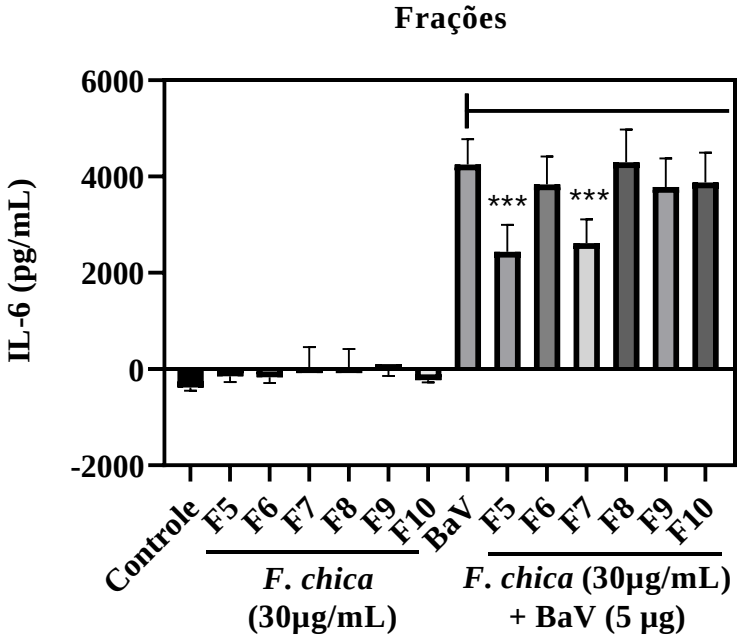


Figura 19. Efeito inibidor das frações da espécie *Fridericia chica* sobre a produção de IL-1β e TNF-α, em PBMC. Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMC) foram tratadas com as frações F5 a F10, na concentração de 30 µg/mL, e com o veneno de *Bothrops atrox* (BaV) (5 µg/mL), por 24 horas. O tratamento com as frações F5, F7, F8, F9 e F10, na presença de BaV, diminuíram a produção da citocina IL-1β. Apenas a fração F9 diminuiu a produção de TNF-α induzida pelo veneno (BaV). Os resultados obtidos foram analisados no software GraphPad Prisma 8.0. Os dados são representados como média e desvio padrão. As médias foram comparadas por one-way ANOVA. *p<0,05 indica os valores significativamente diferentes entre os grupos.

5.10. Efeito das frações de *Fridericia chica* sobre a produção da citocina pró-inflamatória IL-6 e da citocina anti-inflamatória IL-10 em PBMC.

Para avaliar o potencial anti-inflamatório das frações, obtidas a partir do extrato bruto de acetato de etila, sobrenadantes das Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMC) foram tratadas com as frações F5 a F10 na concentração de 30 µg/mL, e com o veneno de *Bothrops atrox* (BaV) (5 µg/mL), por 24 horas. Conforme observado na figura 21, as frações F5 e F7 diminuíram a produção da citocina pró-inflamatória IL-6 induzida por BaV. As frações F6 aumentou a produção de IL-10, na presença do veneno de *Bothrops atrox.*



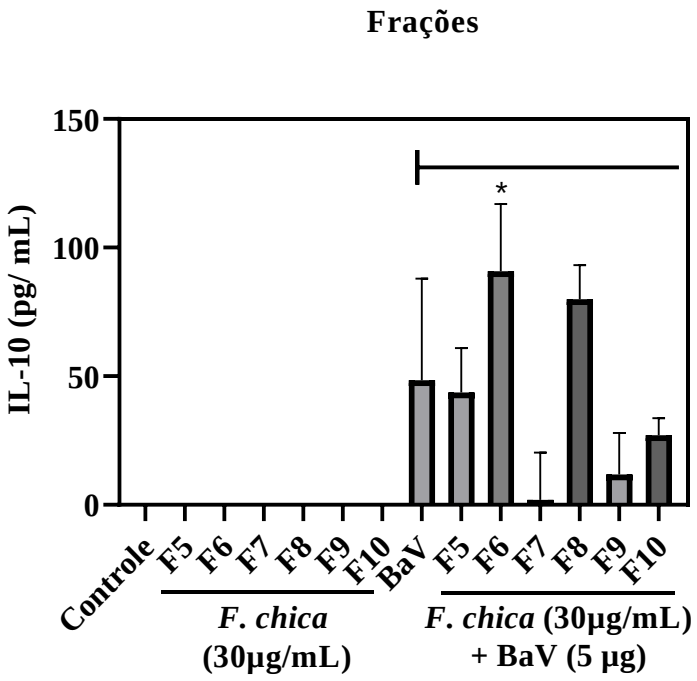


Figura 20. Avaliação do potencial anti-inflamatório das frações da espécie *Fridericia chica* sobre a produção das citocinas IL-6 e IL-10, em PBMC. Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMC) foram tratadas com as frações F5 a F10, na concentração de 30 µg/mL, e com o veneno de *Bothrops atrox* (BaV) (5 µg/mL), por 24 horas. As frações F5 e F7 diminuíram a produção da citocina IL-6 induzida por BaV. As frações F6 aumentou a produção de IL-10, na presença do veneno de *Bothrops atrox.* Os resultados obtidos foram analisados no software GraphPad Prisma 8.0. Os dados são representados como média e desvio padrão. As médias foram comparadas por one-way ANOVA. *$p<0,05$ indica os valores significativamente diferentes entre os grupos.

5.11. Efeito do extrato de *Fridericia chica* Verlot sobre a Motilidade Celular

A avaliação da Motilidade Celular ocorreu após o tratamento das Células MRC-5 com as diferentes concentrações do extrato aquoso de *Fridericia chica* (0,5 µg/ mL, 1 µg/ mL e 5 µg/ mL). Vitamina C a 25 µM foi utilizada como controle positivo. Observou-se que o tratamento com as concentrações do extrato proporcionou uma alta taxa de migração em todas as concentrações testadas no tempo de 24 h.

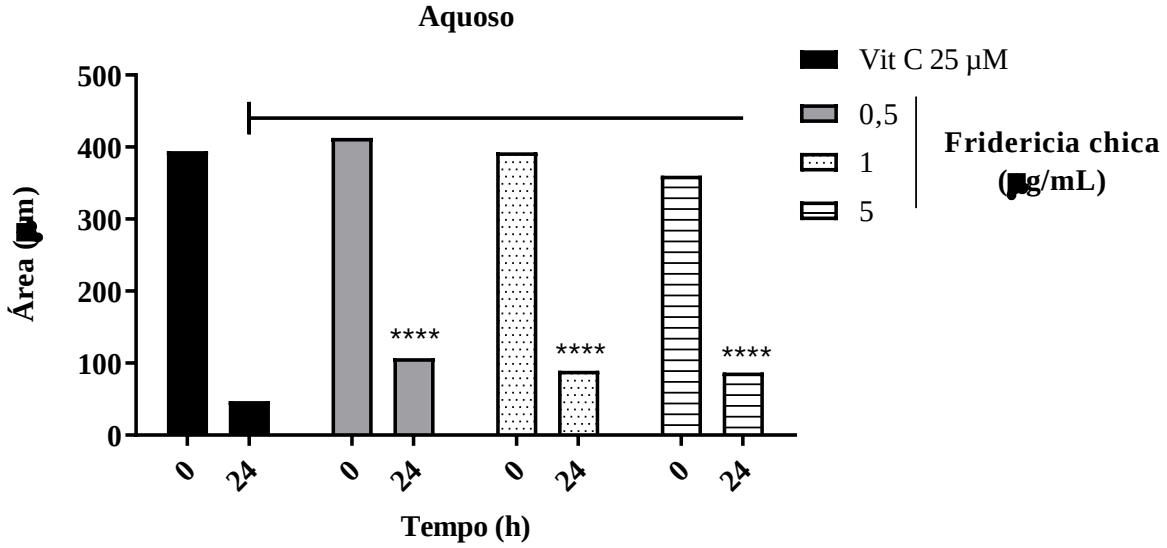


Figura 21. Efeito do extrato aquoso de *Fridericia chica* sobre a motilidade celular. As células MRC-5 foram tratadas com as diferentes concentrações de do extrato 0,5 µg/mL, 1 µg/mL e 5 µg/mL por 24 h. **** p <0.0001 foi considerado estatisticamente significativo.

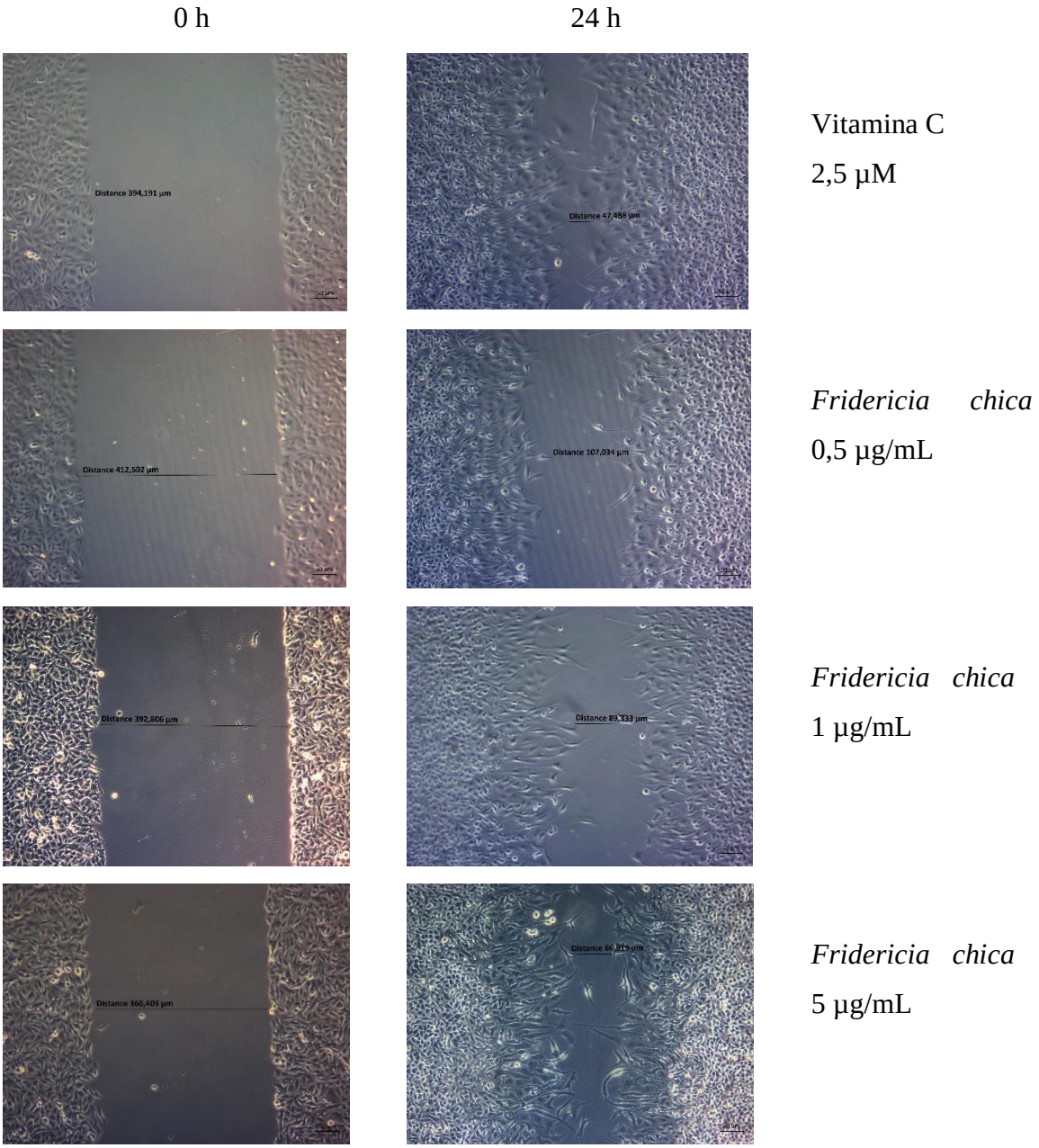


Figura 22. Efeito do extrato aquoso de *Fridericia chica* sobre a migração das células MRC-5. As células MRC-5 foram tratadas com as concentrações de 0,5 µg/mL, 1 µg/mL e 5 µg/mL do extrato aquoso das folhas de *A. chica* no tempo de 24 h.

5.12. Diferenciação de linfócitos Th17 na presença do extrato aquoso de *Fridericia chica*

Foi avaliada a diferenciação de linfócitos Th17 na presença de TGFβ, IL-6 e do extrato aquoso de *Fridericia chica* em diferentes concentrações (10 µg/mL, 30 µg/mL e 100 µg/mL). Nas condições descritas foi observado uma diminuição na diferenciação de linfócitos Th17 na presença de *Fridericia chica* em todas as concentrações avaliadas (10 µg/mL, 30 µg/mL e 100 µg/mL) quando comparado com as células estimuladas unicamente com TGFβ e IL-6, evidenciando assim que o extrato aquoso de *Fridericia chica* tem a capacidade de diminuir a diferenciação de células Th17, e que esse efeito vai se tornando mais forte com o aumento da concentração, o que poderia favorecer um microambiente de citocinas com um perfil mais anti-inflamatório (Figura 22).

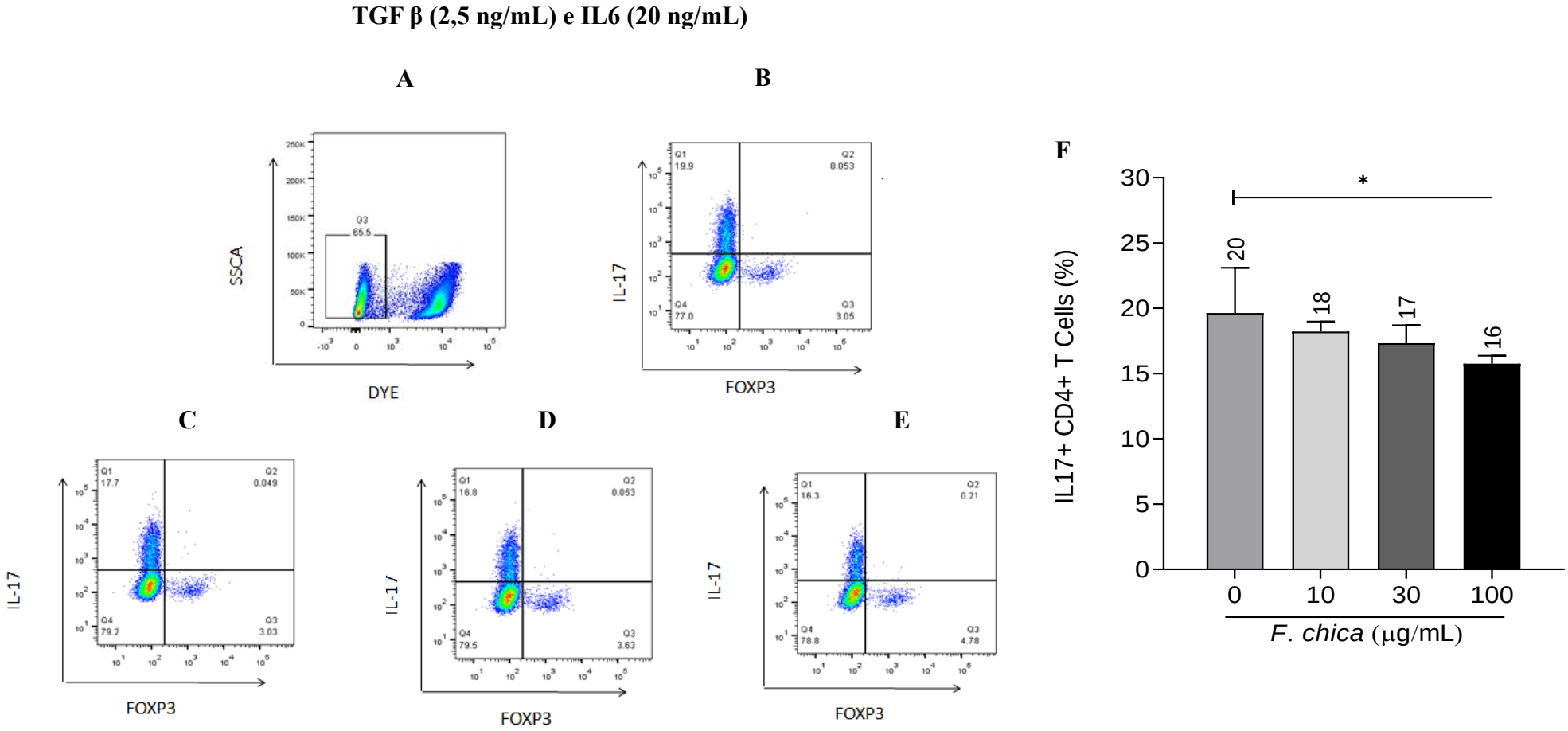


Figura 23. Diferenciação de linfócitos Th17 na presença do extrato aquoso de *Fridericia chica*. Foi avaliada a diferenciação de linfócitos Th17 na presença de TGFβ, IL-6 e do extrato aquoso de *Fridericia chica* em diferentes concentrações (10 µg/mL, 30 µg/mL e 100 µg/mL). A) Viabilidade celular; B) Sem estímulo; C) Tratamento com o extrato aquoso de *F. chica* (10 µg/mL); D) Tratamento com o extrato aquoso de *F. chica* (30 µg/mL); E) Tratamento com o extrato aquoso de *F. chica* (100 µg/mL); F) Gráfico de barras. Foi observado uma diminuição na diferenciação de linfócitos Th17 na presença de *Fridericia chica* em todas as concentrações avaliadas (10 µg/mL, 30 µg/mL e 100 µg/mL) quando comparado com as células estimuladas unicamente com TGFβ e IL-6.

5.13. Diferenciação de células T reguladoras na presença de extrato aquoso de *Fridericia chica*

Foi avaliada a capacidade do extrato de *Fridericia chica* para induzir a diferenciação de Linfócitos T reguladores (Treg) na presença de diferentes concentrações de TGF-β (0,3 ng/mL, 1 ng/mL e 3 ng/mL). Conforme ilustrado na Figura 23, e em seguida avaliados pela expressão de FoxP3, os linfócitos foram tratados com o extrato aquoso de *Fridericia chica* nas concentrações de 10 µg/mL, 30 µg/mL e 100 µg/mL, por 72 horas. O extrato aquoso de *Fridericia chica* não promoveu nenhuma alteração estatisticamente significativa na diferenciação das células T reguladoras na presença de TGF-β na concentração de 3 ng/mL. Na presença de 0,3 ng/mL e 1 ng/mL de TGF-β o extrato aquoso de *Fridericia chica* aumentou significativamente a diferenciação de células T reguladoras, principalmente quando tratadas com as concentrações de 30 µg/m e 100 µg/mL, sendo maior efeito observado quando usamos a concentração de 100 µg/mL. O anteriormente descrito mostra claramente como o extrato aquoso de *Fridericia chica* tem a capacidade de regular a diferenciação de linfócitos T favorecendo o perfil Treg nas condições adequadas, sendo maior o efeito quando as células são expostas as maiores concentrações do extrato (Figura 23).

Figura 24. Diferenciação de Células T reguladoras na presença do extrato aquoso de *Fridericia chica*. Foi avaliada a capacidade do extrato de *Fridericia chica* para induzir a diferenciação de Linfócitos T reguladores (Treg) na presença de diferentes concentrações de TGF-β (0,3 ng/mL, 1 ng/mL e 3 ng/mL). Em seguida avaliados pela expressão de FoxP3, os linfócitos foram tratados com o extrato aquoso de *Fridericia chica* (10 µg/mL, 30 µg/mL e 100 µg/mL). A) Viabilidade celular; B) Sem estímulo; C) Tratamento com o extrato aquoso de *F. chica* (10 µg/mL); D) Tratamento com o extrato aquoso de *F. chica* (30 µg/mL); E) Tratamento com o extrato aquoso de *F. chica* (100 µg/mL); F) Gráfico de barras. O extrato aquoso de *Fridericia chica* não promoveu nenhuma alteração estatisticamente significativa na diferenciação das células T reguladoras na presença de TGF-β na concentração de 3 ng/mL. Na presença de 0,3 ng/mL e 1 ng/mL de TGF-β o extrato aquoso de *Fridericia chica* aumentou significativamente a diferenciação de células T reguladoras, principalmente quando tratadas com as concentrações de 30 µg/m e 100 µg/mL.

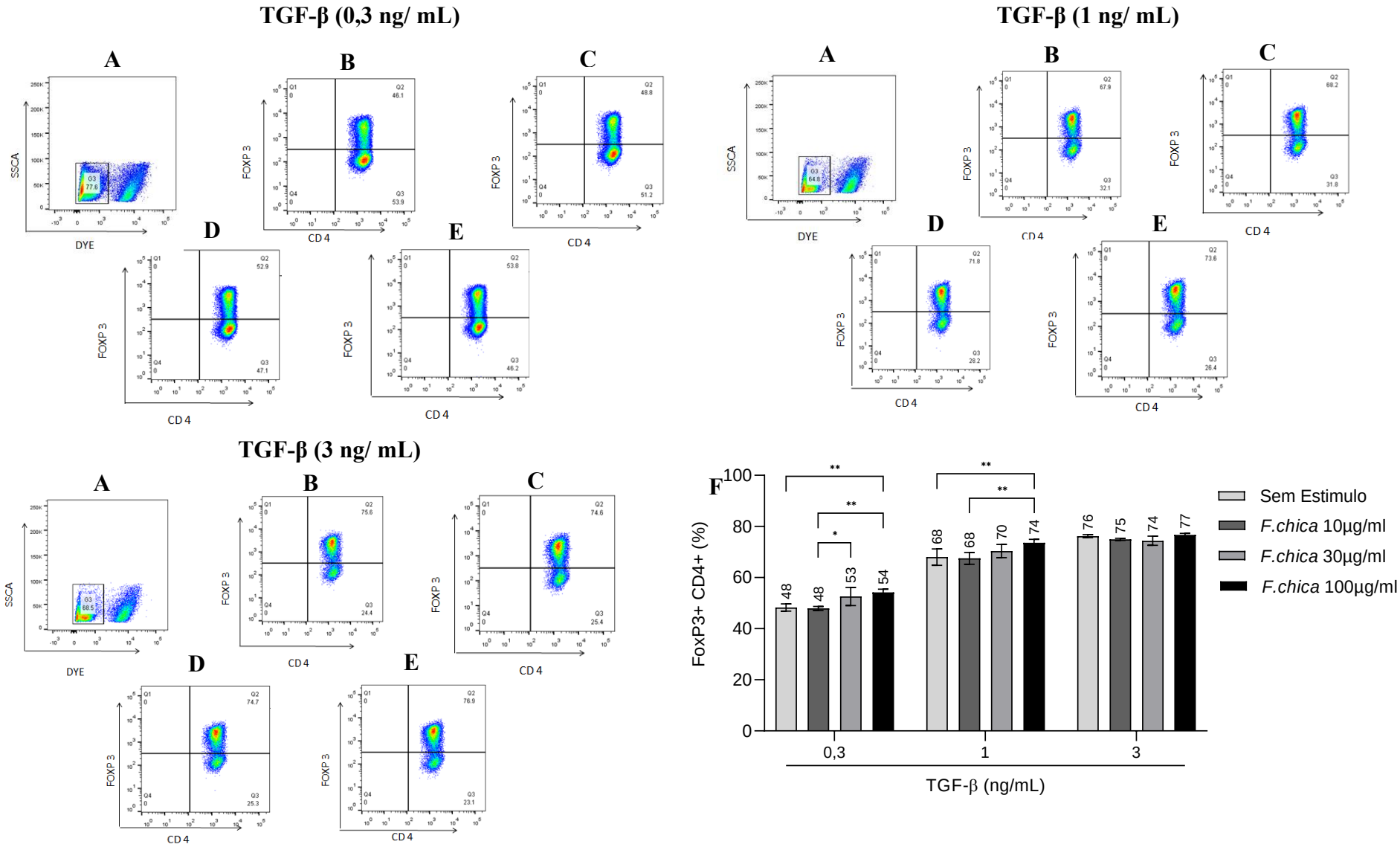


Figura 24. Diferenciação de células T reguladoras na presença de extrato aquoso de *Fridericia chica*.

5.14. Efeito do extrato aquoso de *Fridericia chica* sobre a polarização de macrófagos para um perfil M2

Macrófagos derivados da medula óssea de camundongos foram estimulados com a citocina imunoreguladora IL-4 com a intenção de induzir a polarização destas células para um perfil M2, conjuntamente os macrófagos foram ou não expostos a diferentes concentrações de *Fridericia chica* (1 µg/mL, 3 µg/mL,10 µg/mL e 30 µg/mL) por 24h e 48h. Como mostra a figura 25, nas condições descritas anteriormente, foi observado que na presença do extrato aquoso de *Fridericia chica*, na concentração de 10 µg/mL, houve um aumento da produção da citocina imunoreguladora CCL22, nos dois tempos testados, quando comparado com o controle exposto unicamente a IL4.

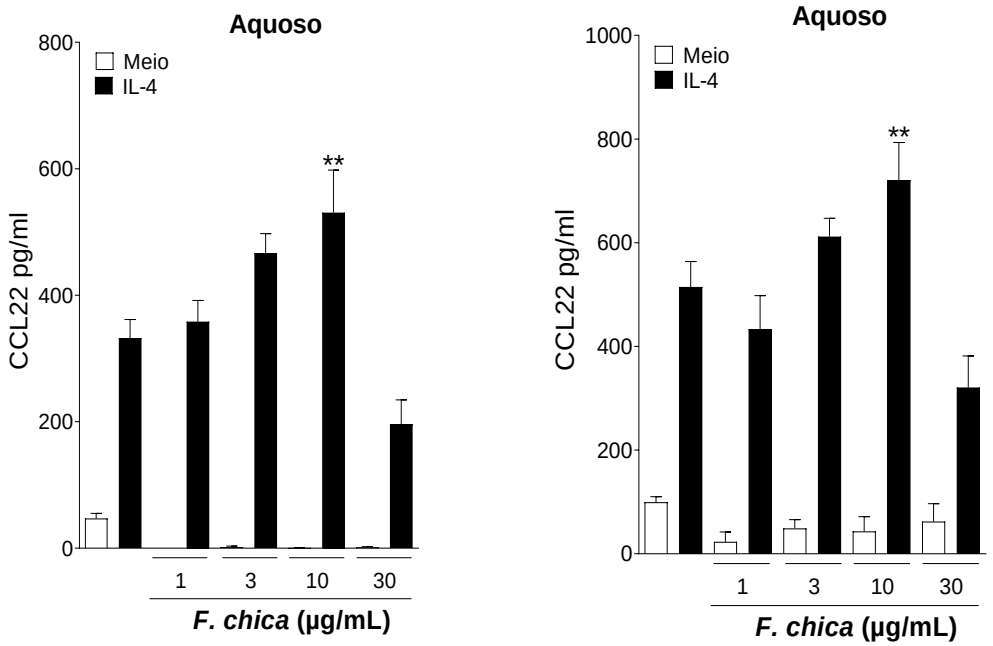


Figura 25. Efeito do extrato aquoso de *Fridericia chica* sobre a polarização de macrófagos para um perfil M2. Os macrófagos foram estimulados com a citocina imunoreguladora IL-4 com o intuito de induzir a polarização destas células para um perfil M2, e foram tratados com as diferentes concentrações do extrato aquoso de *Fridericia chica* (1 µg/mL, 3 µg/mL, 10 µg/mL e 30 µg/mL), nos tempos de 24h (A) e 48h (B). Foi observado que na presença do extrato aquoso de *Fridericia chica*, na concentração de 10 µg/mL, houve um aumento na secreção de CCL22 quando comparado com o controle exposto unicamente a IL4.

6. DISCUSSÃO

Conforme discutido anteriormente na revisão desta tese, os extratos de *Fridericia chica* são ricos em flavonóides, sobretudo a carajurina (6,7-di-hidroxi-5,4'-dimetoxi-flavílio) e a carajurona (6,7,4'-tri-hidroxi-5-metoxi-flavílio), pigmentos responsáveis pela coloração vermelha do chá preparado a partir das folhas secas dessa espécie. Os flavonóides são um grupo de compostos naturais que possuem na sua estrutura química 15 carbonos, dependendo do nível de oxidação do seu anel C podem ser classificados em oito grupos, entre eles as antocianinas, as quais apresentam atividade anti-inflamatória e antioxidante, e estão presentes majoritariamente na forma 3-desoxiantocianinas, principalmente carajurina e carajurona, nas plantas da espécie *Fridericia chica* (ZORN et al., 2001; MARTÍNEZ; MIJARES; DE SANCTIS, 2019; FALLAH et al. , 2020).

A partir da caracterização química realizada neste trabalho demostrou-se claramente que o extrato aquoso de *Fridericia chica*, produzido com secagem em spray dryer, é rico em carajurina (6,7-di-hidroxi-5,4'-dimetoxi-flavílio) e carajurona (6,7,4'-tri-hidroxi-5-metoxi-flavílio). No extrato bruto acetato de etila e nas frações obtidas a partir dele as substâncias carajurina e carajurona também foram identificadas. No estudo desenvolvido por CABRAL et al., (2010) utilizando o extrato etanólico de *Fridericia chica* também foram identificados os íons 285 (carajurona) e 299 (carajurina). Anteriormente foi demonstrado que o extrato de *Fridericia chica* seco com spray dryer tem quantidade menor de carajurina em 37,5%, porém o processo de secagem preserva as atividades farmacológicas do extrato. O extrato demonstrou atividade cicatrizante e antimicrobiana (SOUSA et al., 2022).

Os flavonóides também podem atuar no bloqueio da cascata do ácido araquidônico pelas vias de inibição da enzima Ciclooxigenase 2 (COX-2) e 5-Lipoxigenase (5-LO) (CHI et al., 2001; JANG et al., 2002). Estudos demonstram que os flavonóides e seus derivados também atuam nas respostas das células imunes, influenciando na expressão de mediadores inflamatórios (MARTÍNEZ; MIJARES; DE SANCTIS, 2019). O Fator de Transcrição Nuclear kappa B (NF-κB, do inglês, nuclear fator-kB) regula a transcrição de genes que codificam diversas enzimas inflamatórias, entre elas Óxido Nítrico sintase induzível (iNOS), Ciclooxigenase 2 (COX-2) e 5-LO (ZORN et al., 2001). Em um trabalho desenvolvido por ZORN e colaboradores, em 2001, mostrou que a molécula carajurona foi capaz de inibir totalmente o NF-κB. Neste trabalho avaliamos *in silico* a interação da molécula carajurona a partir da energia de ligação com a enzima Ciclooxigenase 2 (COX-2) e observamos uma energia de ligação próxima a do ligante Rofecoxib, inibidor específico da COX-2.

Os extratos (aquoso e acetato de etila) de *Fridericia chica*, nas concentrações utilizadas neste trabalho, não apresentaram toxicidade para células humanas (PBMC) e de camundongos (J774.A1). Entretanto apresentaram atividade citotóxica para as linhagens tumorais HL60 e THP-1, apresentando um perfil antitumoral. Em contrapartida dados publicados por DE CARVALHO RIBEIRO (2012) demonstraram que o extrato aquoso não apresentou atividade citotóxica significativa sobre as células leucêmicas humanas da linhagem Jurkat (leucemia linfoide).

De uma forma geral, está bem estabelecido que os flavonóides apresentam propriedades antioxidantes *in vitro* e *in vivo*, o grupo hidroxila presente na estrutura desses compostos naturais impede as reações em cadeias produzidas pelos radicais livres, a partir da doação de átomos de hidrogênio ou elétrons (RAVISHANKAR et al., 2013; KOZLOWSKA et al., 2014; SLIKA et al., 2022). Estudos anteriores identificaram que a flavona luteolina, identificada no extrato etanólico de *Fridericia chica*, apresentou atividade antioxidante pelo método de DPPH (2,2-difenil-1-picrylhydrazil) (AMARAL et al., 2012). O excesso de radicais livres pode contribuir para o aumento das espécies reativas de oxigênio e levar ao estresse oxidativo, o qual está envolvido no desenvolvimento de doenças como as doenças neurodegenerativas, obesidade, no processo de envelhecimento e condições inflamatórias (ICHIISHI et al., 2016; MATSUDA et al., 2013). O estresse oxidativo pode levar a disfunção mitocondrial, que está frequentemente associada ao desenvolvimento de doenças, entre elas as doenças neurodegenerativas (GOLPICH et al., 2017; ZONG et al., 2015; LEE et al., 2015).

Os flavonóides também tem uma ação sobre as mitocôndrias, em aumentar o potencial de membrana mitocondrial levando a redução da apoptose (KICINSKA et al., 2020). A biogênese das mitocôndrias torna as células saudáveis, ou seja, quanto maior a quantidade de mitocôndrias maior o número de células saudáveis. O crescimento do número de mitocôndrias causa um efeito geral no corpo de imunomodulação, e o aumento da massa mitocondrial está associado a um perfil anti-inflamatório (FERREE e SHIRIHAI., 2012; WENZEL et al., 2017). Quando as mitocôndrias encontram-se danificadas tornam-se pró-inflamatórias (MILLS; KELLY; O'NEILL, 2017). A disfunção mitocondrial está diretamente envolvida na morte celular e ao surgimento de doenças como o câncer, diabetes e doenças neurodegenerativas (LIN; BEAL, 2006; REDDY, 2008; DIMAURO; SCHON, 2008; VAFAI; MOOTHA, 2012).

O papel terapêutico dos flavonóides no tratamento da inflamação tem sido evidenciado em diversas pesquisas *in vitro* e *in vivo*. A flavona hispidulina inibiu a produção de TNF- α, IL-6, IL-1 β, e PGE2 e reduziu NF-κB (LIMA et al., 2020). Além disso, a carajurona, umas das 3-desoxiantocianinas, que estão presentes na espécie *Fridericia chica*, foi capaz de inibir

totalmente o Fator de Transcrição Nuclear kappa B (NF-κB), o qual está envolvido na transcrição de genes pró inflamatórios, e que podem levar ao desenvolvimento de doenças como a Esclerose Múltipla (ZORN et al., 2001; LAWRENCE, 2009; TAK et al., 2001; LIBBY et al., 2002). Um modo pelo qual os flavonóides podem estar atuando na redução de citocinas pró-inflamatórias é inibindo a ativação de NF-κB. Foi demonstrando anteriormente que o tratamento com o extrato da espécie *Fridericia chica*, diminuiu a inflamação induzida pelos venenos das serpentes *Bothrops atrox* e *Crotalus durissus ruruima*, cuja patogênese pode envolver a participação da enzima fosfolipase A_2, que estimula a liberação do ácido araquidônico (FURTADO et al., 1991; KOUTOULOGENIS et al., 2020).

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que os extratos aquoso e acetato de etila de *Fridericia chica* mostraram-se capazes de reduzir o estresse oxidativo, aumentar o potencial de membrana mitocondrial e reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1β e TNF-α) em células de PBMC, estimuladas com o veneno de *Bothrops atrox*. Além disso, a fração F6 obtida a partir do extrato bruto acetato de etila, aumentou a produção da citocina anti-inflamatória IL-10, nas mesmas células e condições de tratamento citados acima. Experimentos realizados por BATALHA (2017) em células THP-1, estimuladas com estaurosporina, mostraram que após os tratamentos com extratos de *Fridericia chica* (aquoso, acetato de etila, etanólico e hexânico) houve uma diminuição na produção de espécies reativas de oxigênio intracelular e um aumento no potencial de membrana mitocondrial. Estudos publicados por LIMA (2020) em células RAW 267.4 (macrófagos de camundongo), estimuladas com LPS, mostram um aumento na produção da citocina IL-10 e diminuição na produção da citocina IL-1β a partir do tratamento com o extrato hidroetanólico de *Fridericia chica*.

Pesquisas comprovam que os flavonóides podem interferir na ativação do inflamassoma NLRP3 (LIM et al., 2018). A apigenina, também identificada nos extratos de *Fridericia chica*, e uma chalcona inibiram a oligomerização do inflamassoma NLRP3 em células THP-1 estimuladas com LPS (HONDA et al., 2014; ZHANG et al., 2014). Os extratos brutos e as frações da espécie *Fridericia chica* reduziram a produção de IL-1β induzida pelo veneno de *Bothrops atrox* em células de PBMC. A IL-1β é resultado da ativação de um complexo chamado inflamassoma, no citoplasma da célula. O inflamassoma é um complexo macromolecular citoplasmático que quando acionado induz a produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1β e IL-18. Para o acionamento da via canônica do inflamassoma é necessário um sinal de iniciação (priming) e o acionamento de NLRP3 (Família de receptores semelhantes a NOD contendo domínio de pirina 3) (TAKEUCHI et al., 2010; SHARMA, et al., 2016). A iniciação do

inflamassoma por sua via canônica acontece após o acionamento dos receptores TLR e ativação de NF-κB. Esta etapa promove a liberação citoplasmática de Pró- IL-1β e Pró-IL-18.

O NLPR3 é um receptor de reconhecimento de padrão (PRRs) molecular derivados de patógenos (PAMPs), de danos celulares (DAMPs) e toxinas (VAMPs). Entre os PRRs destacam-se Espécies Reativas de Oxigênio (iROS), Adenosina Trifosfato (ATP), Potássio (K^+) extracelular, flagelina, o asbesto, entre outros. O acionamento do NLPR3 ativa a caspase-1 que quebra Pró- IL-1β e Pró- IL-18 em IL-1β e IL-18 (MANJI et al., 2002; FRANCHI et al., 2009; MARTINON et al., 2002). A desregulação do inflamassoma NLRP3 está na gênese de várias doenças como a doença de Alzheimer, diabetes, gota e aterosclerose (MENU et al., 2011; GUO et al., 2015). Os extratos de *Fridericia chica* mostraram-se eficientes em reduzir a produção de IL-1β em macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs), estimulados com LPS e ácido úrico (UBIERA 2021). A carajurona isolado do extrato hidroalcoólico de *Fridericia chica* também se mostrou eficaz em reduzir a produção de IL-1β em modelo murínico de peritonite (LIMA, 2020).

A BthTX-1 é uma Fosfolipase A2 (Lys49-PLA_2) presente no veneno *B. jararacussu* é capaz de induzir a produção de IL-1β via ativação de NLP3 quando injetada no músculo gastrocnêmio (BOENO et al., 2019). A produção de IL-1β induzida por BthTX-1 é dependente de caspase-1/11, proteína ASC e NLPR3, e adicionalmente pela liberação de ATP através dos canais de panexina P2X7 (RANÉIA E SILVA et al., 2021). É interessante notar que o extrato aquoso de *Fridericia chica* foi capaz de reduzir o edema de pata induzido pelo veneno de *Bothrops atrox* e *Crotalus durissus* (OLIVEIRA et al., 2009). No entanto, não está demonstrado se este efeito redutor de edema produzido por *Fridericia chica* se deve majoritariamente a ação inibitória do extrato sobre o inflamassoma.

Estudos realizados anteriormente mostraram que os extratos de *Fridericia chica* induziram fortemente a produção de IL-10 em células J774A.1 estimuladas com zymosan, células RAW 264.7 e em macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs), tratados com LPS. (BATALHA, 2017; LIMA et al., 2020; UBIERA, 2021). A produção de IL-10 induzida pelo extrato aquoso de *Fridericia chica* está associada a ativação dependente da via adenosinérgica. GURUNG et al., 2015 demonstraram que a IL-10 reduz a expressão de NLRP3 em BMDMs, modulando dessa forma a ativação do inflamassoma e a produção de IL-1β.

Diversos trabalhos apontam a importância da citocina IL-10 sobre as mitocôndrias. Por meio do processo de mitofagia (eliminação das mitocôndrias disfuncionais) a IL-10 remove as mitocôndrias que apresentam disfunção (baixo potencial de membrana e altos níveis de espécies reativas de oxigênio). Quando ocorre a ausência de IL-10, os macrófagos acumulam

mitocôndrias danificadas, o que leva a produção de IL1β e ativação do inflamassoma via NLPR3 (GURUNG; LUKENS; KANNEGANTI, 2015; MILLS; KELLY; O'NEILL, 2017; IP et al., 2017).

O reparo de lesões teciduais, isto é a cicatrização, é um processo interativo que envolve mediadores, componentes da matriz extracelular, células residentes e subtipos de leucócitos infiltrantes, que participam de diferentes maneiras nas três fases classicamente definidas da cicatrização de feridas: inflamação, formação e remodelação dos tecidos. Dentre as células, fibroblastos, macrófagos e linfócitos apresentam um importante papel nesse evento (BIELECKI et al., 2012). A avaliação da motilidade celular após o tratamento com o extrato aquoso de *Fridericia chica*, realizado neste trabalho, proporcionou uma alta taxa de migração em células de fibroblastos humanos (MRC-5).

Os macrófagos teciduais compartilham uma série de funções comuns que abrangem a eliminação de detritos celulares, vigilância imunológica, cicatrização de feridas, defesa contra patógenos e iniciação e resolução da inflamação. Macrófagos são funcionalmente diversos e compreendem vários subtipos, incluindo populações M1 pró-inflamatórias ativadas classicamente e populações M2 anti-inflamatórias alternativamente ativadas. Em contraste, os macrófagos M2 liberam baixas quantidades de moléculas pró-inflamatórias, mas níveis mais altos de mediadores anti-inflamatórios (CELIK et al., 2020).

A ativação alternativa de macrófagos *in vitro* induzida por IL-4 é capaz de gerar a expressão de genes, que promovem a expressão de várias citocinas e quimiocinas anti-inflamatórias, como TGF-β, IL-10 e CCL18, induzindo um efeito pró-fibrótico (ROSZER, 2015; ORECCHIONI et al., 2020). A quimiocina CCL-22 (quimiocina derivada de macrófago – MDC) é responsável por induzir quimiotaxia de células dendríticas e células Th2, desempenhando um papel importante no recrutamento de células Th2 para os locais inflamatórios e na regulação das respostas imunes relacionadas a Th2 (YAMASHITA & KURODA, 2002). Estudos demonstraram que CCL-22 é capaz de promover a reepitelização de lesões cutâneas e deposição de matriz extracelular em um modelo de cicatrização de feridas *ex vivo* humano (WILKINSON et al., 2019).

Os macrófagos, obtidos pela estimulação com IL-4, são considerados agentes anti-inflamatórios com papéis importantes na homeostase e na restituição/recuperação tecidual após lesão (HAMIDZADEH et al., 2017 ; MINUTTI et al., 2017). No presente estudo, observamos que o extrato aquoso de *Fridericia chica* foi capaz de aumentar a secreção de CCL-22 em macrófagos já com fenótipo M2 (induzidos pelo tratamento com IL-4). Assim, baseado na função de macrófagos no processo de reparação tecidual e com os resultados obtidos, podemos

sugerir que o extrato aquosos de *Fridericia chica* seria capaz de potencializar o reparo tecidual por macrófagos que já apresentam um perfil M2. Este resultado ajuda a entender o papel anti-inflamatório da espécie *Fridericia chica* de um modo mais amplo, apresentando a proposta de um mecanismo complexo que envolve distintos grupos celulares.

Linfócitos apresentam uma função importante no início da cicatrização de feridas, porém sua preservação resulta em uma resposta imune essencial para um resultado normal do reparo tecidual. A lesão pode reduzir o número de linfócitos, bem com o fenótipo e suas funções, que podem levar à imunossupressão generalizada que aumenta a suscetibilidade a infecções (SHORT et al., 2022). Os linfócitos T $CD4^+$ podem representar a população de linfócitos chave que regula as respostas à lesão e reparação de feridas. O equilíbrio entre a angiogênese da inflamação dirigida pelos linfócitos T pode fazer parte dos mecanismos responsáveis pelo reparo tecidual e a cicatrização (WANG et al., 2019).

As células T reguladoras (Tregs), definidas pela expressão do fator de transcrição determinante da linhagem, Foxp3, compõem aproximadamente 20% das células $CD4^+$ que residem no tecido cutâneo humana adulto e desempenham um papel crucial na atenuação da inflamação durante a cicatrização normal de feridas. Enquanto as Tregs secretam a citocina reguladora e antifibrótica, IL-10, elas também secretam TGF-β1, que duplamente atua como um fator anti-inflamatório e um fator de crescimento intensamente pró-fibrótico (SANCHEZ et al., 2014). Em nossos resultados, observamos que o extrato aquoso de *Fridericia chica* apresentou uma capacidade de aumentar significativamente a diferenciação de células T reguladoras, induzidas por TGF-β. Tregs moderam uma resposta Th1/Th2 que é fundamental na prevenção da ativação e fibrose de fibroblastos dérmicos. Assim, as Tregs atuam na prevenção da fibrose excessiva, mas também indicam que as ações das Tregs sozinhas não são suficientes para promover a cicatrização regenerativa (SHORT et al., 2022).

Linfócitos Th17 são definidos por sua produção de IL-17, a qual demonstrou diminuir o fator de crescimento do tecido conjuntivo em fibroblastos humanos, um promotor de fibrose a montante do TGF-β1, sugerindo um possível papel na redução da cicatrização (SHORT et al., 2022). No presente trabalho, observamos que na presença do extrato aquoso de *Fridericia chica* foi observada uma diminuição na diferenciação de linfócitos Th17, favorecendo assim um microambiente de citocinas com um perfil mais anti-inflamatório.

7. CONCLUSÃO

1. A molécula carajurona, uma das substância majoritárias presente nos extratos da espécie de *Fridericia chica*, apresentou uma energia de ligação próxima a do ligante Rofecoxib, inibidor específico da COX-2.
2. Os extratos aquoso, acetato de etila e as frações da espécie *Fridericia chica* diminuíram as espécies reativas de oxigênio intracelular, na presença de estaurosporina e aumentaram o potencial de membrana mitocondrial, nas mesmas condições.
3. Os extratos aquoso, acetato de etila e as frações de *Fridericia chica* reduziram a produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1β e TNF-α, na presença do veneno de *Bothrops atrox*. As frações aumentaram a produção da citocina anti-inflamatória IL-10 e diminuíram IL-6, nas mesmas condições.
4. O extrato aquoso de *Fridericia chica* proporcionou uma alta taxa de migração em células de fibroblastos humanos.
5. O extrato aquoso de *Fridericia chica* foi capaz de diminuir a diferenciação de células Th17 e aumentar a polarização da população de células Treg, induzindo assim um perfil mais regulatório.
6. O extrato aquoso de *Fridericia chica* potencializou a produção de CCL-22 induzida por IL-4.

8. REFERÊNCIAS

AMARAL, R. R. et al. Biological activities of Fridericia chica (Bonpl.) B. Verl. leaves. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 31, n. 3, p. 451–455, 2012.

CABRAL, E. C. Utilização da técnica de Fingerprinting por espectrometria de massas para a análise de extratos de produtos naturais. Tese, **Universidade de São Paulo**, 2010.

CHI, Y.; JONG, H.; SON, K.; CHANG, H.; KANG, S.; KIM, H. Effects of naturally occurring prenylated flavonoids on enzymes metabolizing arachidonic acid: cyclooxygenases and lipooxygenases. **Biochemical Pharmacology**, v.62, p.1185-1191, 2001.

BARBOSA, W. L. R.; PINTO, L. N.; QUIGNARD, E.; VIEIRA, J. M. S.; SILVA-JÚNIOR, O. C.; ALBUQUERQUE, S. ARRABIDAEA CHICA (HBK) Verlot: Phytochemical approach, antifungal and trypanocidal activities. **Braz. J. Pharmacogn**, v.18, p.544–548, 2008.

BATALHA, A. D. S. J. Ação da Arrabidaea chica Verlot (Bignoniaceae) sobre o envelhecimento celular. 2017. 84 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada), **Universidade Federal do Amazonas, Manaus**, 2017.

BIELECKI T. M.; GAZDZIK T. S.; ARENDT J.; SZCZEPANSKI T.; KRÓL W.; WIELKOSZYNSKI T. Antibacterial effect of autologous platelet gel enriched with growth factors and other active substances: an in vitro study. **J Bone Joint Surg Br**., 89(3), 417-420, 2007.

BOENO, C.N. et al. Inflammasome activation induced by a snake venom Lys49-phospholipase A2 homologue. **Toxins** 12.1: 22, 2019.

BRASIL. Relação Nacional de Medicamentos Essenciais: RENAME 2014. Brasília: Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, **Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos**. 9ª edição. 2015.

BRASIL. Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília: Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, **Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos**. 2009.

CELIK M. Ö.; LABUZ D.; KEYE J.; GLAUBEN R.; MACHELSKA H. IL-4 induces M2 macrophages to produce sustained analgesia via opioids. **JCI Insight**, 27;5(4), 2020.

CHI, Y.; JONG, H.; SON, K.; CHANG, H.; KANG, S.; KIM, H. Effects of naturally occurring prenylated flavonoids on enzymes metabolizing arachidonic acid: cyclooxygenases and lipooxygenases**. Biochemical Pharmacology**, v.62, p.1185-1191, 2001.

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

VAFAI, S.; SCHON, E. A. Mitochondrial Disorders in the Nervous System. **Annual Review of Neuroscience**, v. 31, n. 1, p. 91–123, jul. 2008.

FALLAH, A. A. et al. Impact of dietary anthocyanins on systemic and vascular inflammation: Systematic review and meta-analysis on randomised clinical trials. **Food and Chemical Toxicology**, v. 135, p. 110922, 2020.

FERREE, A. E.; SHIRIHAI, O. Mitocondrial dynamics: the intersection of form and function. **Mitocondrial Oxidative Phosphorylation**, ed. B. Kadenbach (New York, NY: Springer), 13-40, 2012.

FRANCHI, L.; EIGENBROD, T.; MUÑOZ-PLANILLO, R.; NUÑEZ, G. The Inflammasome: A Caspase-1 Activation Platform Regulating Immune Responses and Disease Pathogenesis**. Nat. Immunol**, 10, 241, 2009.

FURTADO, M. F. D.; DIAS DA SILVA W, COLLETO G. M. D. D. Controle de qualidade dos venenos animais e dos correspondentes antivenenos. I Padronização dos métodos de ensaio das atividades bioquímicas e farmacológicas dos venenos de algumas espécies do gênero Bothrops e Crotalus usando amostras secas a temperaturas ambiente ou liofilizadas. **Mem Inst Butantan**, 53: 149-59, 1991.

GOLPICH M, AMINI E.; MOHAMED Z.; AZMAN ALI R.; MOHAMED IBRAHIM N.; AHMADIANI A. Mitochondrial Dysfunction and Biogenesis in Neurodegenerative diseases: Pathogenesis and Treatment. **CNS Neurosci Ther**, 23(1):5-22, 2017.

GUO, H.; CALLAWAY, J. B.; TING, J. P. Y. Inflammasomes: Mechanism of action, role in disease, and therapeutics. **Nat. Med**, 21, 677–687, 2015.

GURUNG, P.; LI, B.; SUBBARAO MALIREDDI, R. et al. Chronic TLR Stimulation Controls NLRP3 Inflammasome Activation through IL-10 Mediated Regulation of NLRP3 Expression and Caspase-8 Activation. **Sci Rep,** 5, 14488, 2015.

GURUNG P.; LUKENS J. R.; KANNEGANTI T. D.; Mitochondria: diversity in the regulation of the NLRP3 inflammasome. **Trends Mol Med**, 21(3):193-201, 2015.

HAMIDZADEH K.; CHRISTENSEN S. M.; DALBY E.; CHANDRASEKARAN P.; MOSSER D. M. Macrophages and the recovery from acute and chronic inflammation. **Annu. Rev. Physiol**. 79, 567–592, 2017.

HONDA H.; NAGAI Y.; MATSUNAGA T, et al. Isoliquiritigenin is a potent inhibitor of NLRP3 inflammasome activation and diet-induced adipose tissue inflammation**. J Leukoc Biol**, 96(6):1087-1100, 2014.

HUANG, W.Y.; CAI, Y.Z.; ZHANG, Y. Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: Potential use for cancer prevention. **Nutr. Cancer**, 62, 1–20, 2009.

IADECOLA, C.; ALEXANDER, Mihaela. Cerebral ischemia and inflammation. **Current opinion in neurology**, v. 14, n. 1, p. 89-94, 2001.

ICHIISHI, E.; LI, X.; IORIO, L. Oxidative stress and diseases: clinical trials and approaches**. Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2016, 2016.

IP, W. K. E. et al. Anti-inflammatory effect of IL-10 mediated by metabolic reprogramming of macrophages. **Science**, v. 356, n. 6337, p. 513–519, 5, 2017.

JANG, D.; CUENDET, M.; HAWTHORNE, M.; KARDONO, L.; KAWANISHI, K.; FONG, H. Prenylated flavonoids of the leaves of Macaranga conifer with inhibitory activity against cyclooxygenase-2. **Phytomedicine**, v.61, p.867-872, 2002.

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

KICINSKA A, JARMUSZKIEWICZ W. Flavonoids and Mitochondria: Activation of Cytoprotective Pathways?. **Molecules,** 4;25(13):3060, 2020.

KOUTOULOGENIS G. S.; KOKOTOU M. G.; HAYASHI D.; MOUCHLIS V.D.; DENNIS E.A.; KOKOTOS G. 2-Oxoester phospholipase A2 inhibitors with enhanced metabolic stability. **Biomolecules**, 10:491, 2020;

KOZLOWSKA, A.; SZOSTAK-WEGIEREK, D. Flavonoids–food sources and health benefits. **Rocz. Panstw. Zakl. Hig.**, 65 (2), 79–85, 2014.

KUMAR, N.; GOEL, N. Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. **Biotechnology Reports**, v. 24, p. e00370, 2019.

LAWRENCE, T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation**. Cold Spring Harb Perspect Biol**, 1: a001651, 2009.

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

LEI C.; HUI C.; QUN H.; JIANBO X. & HUI T. Absorption, metabolism and bioavailability of flavonoids: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 2021.

LIBBY, P.; RIDKER, P. M.; MASERI, A. Inflammation and atherosclerosis. **Circulation**, 105, 1135–1143, 2002.

LIMA J. C. S.; DE OLIVEIRA R. G.; SILVA V. C.; DE SOUSA P. T. JR.; VIOLANTE I. M. P.; MACHO A.; MARTINS D. T. O. Anti-inflammatory activity of 4',6,7-trihydroxy-5-methoxyflavone from Fridericia chica (Bonpl.) L.G.Lohmann. **Nat Prod Res.,** 34(5):726-730, 2020;

LIM, HYUN et al. Flavonoids interfere with NLRP3 inflammasome activation. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 355, p. 93-102, 2018.

LIN, M. T.; BEAL, M. F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Nature,** 443, 787–795, 2006.
MANJI, G. A.; WANG, L.; GEDDES, B. J.; BROWN, M.; MERRIAM, S.; AL-GARAWI, A.; MAK, S.; LORA, J. M.; BRISKIN, M.; JURMAN, M.; et al. PYPAF1, a PYRIN-containing Apaf1-like protein that assembles with ASC and regulates activation of NF-kappa B. J. **Biol. Chem.,** 277, 11570–11575, 2002.

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

MARTÍNEZ, G.; MIJARES, M. R.; DE SANCTIS, J. B. Efeitos dos flavonoides e seus derivados nas respostas das células imunes. **Patentes recentes sobre inflamação e descoberta de medicamentos para alergia**, v. 13, n. 2, p. 84-104, 2019.

MARTINON, F.; BURNS, K.; TSCHOPP, J. The Inflammasome: A Molecular Platform Triggering Activation of Inflammatory Caspases and Processing of proIL-β. **Mol. Cell,** 10, 417–426, 2002.

MARTINS, F.J.; CANESCHI, C.A.; VIEIRA, J.L.; BARBOSA, W.; RAPOSO, N.R. Antioxidant activity and potential pho-toprotective from amazon native flora extracts. J. Photochem. **Photobiol. B Biol**., 161, 34–39, 2016.

MATOS, A. P. et al. Constituintes químicos e atividade inseticida dos extratos de frutos de Trichilia elegans e T. catigua (Meliaceae). **Química Nova**, v. 32, p. 1553-1556, 2009.

MATSUDA H.; NAKAMURA S.; YOSHIKAWA M.; Degranulation inhibitors from medicinal plants in antigen-stimulated rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells. **Chem Pharm Bull**, 64(2): 96-103, 2016.

MAZID, M., KHAN, T. A., & MOHAMMAD, F. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. **Biology and Medicine**, 3, 232-249, 2011.

MENU, P.; VINCE, J.E. The NLRP3 inflammasome in health and disease: The good, the bad and the ugly. **Clin. Exp. Immunol**, 166, 1–15, 2011.

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

MILLS, E. L.; KELLY, B.; O'NEILL, L. A. J. Mitochondria are the powerhouses of immunity. **Nature Immunology**, v. 18, n. 5, p. 488–498, 2017.

MINUTTI C. M.; JACKSON-JONES L. H.; GARCÍA-FOJEDA B.; KNIPPER J. A.; SUTHERLAND T. E.; LOGAN N.; RINGQVIST E.; GUILLAMAT-PRATS R.; FERENBACH D. A. et al., Local amplifiers of IL-4Rα–mediated macrophage activation promote repair in lung and liver. **Science**, 356, 1076–1080, 2017.

O'LEARY, K. A.; DE PASCUAL-TERESA, S.; NEEDS, P. W.; BAO, Y. P.; O'BRIEN, N.M.; WILLIAMSON, G. Effect of flavonoids and vitamin E on cyclooxygenase-2 (COX-2) transcription. **Mutat. Res.** 551 (1–2), 245–254, 2004.

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

ORECCHIONI M.; GHOSHEH Y.; PRAMOD A. B.; LEY K. Macrophage Polarization: Different Gene Signatures in M1(LPS+) vs. Classically and M2(LPS-) vs. Alternatively Activated Macrophages. **Front Immunol**., 24, 10:1084, 2020.

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

PINTO, N.; FLOR, A. S. O. AND BARBOSA W. L. R. “Fitoterapia popular na Amazônia Paraense: uma abordagem no município de Igarapé-Mirím, estado do Pará nos anos de 2000 e 2008”. **Revista Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**, vol. 35, no. 2, pp. 305–311, 2011.

PROCHAZKOVA, D.; I. BOUSOVA, N. WILHELMOVA, Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. **Fitoterapia**, 82 (4), 513–523, 2011.

RANÉIA E SILVA, PRISCILA A., et al. "Inflammatory effect of Bothropstoxin-I from Bothrops jararacussu venom mediated by NLRP3 inflammasome involves ATP and P2X7 receptor." **Clinical Science** 135.5, 687-701, 2021.

RAVISHANKAR, D.; A.K. RAJORA, F. GRECO, H. M. Osborn, Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy. **Int. J. Biochem. Cell Biol**., 45 (12), 2821–2831, 2013.

REDDY, P. H. Mitochondrial medicine for aging and neurodegenerative diseases. **Neuromolecular Med**, 10:291–315, 2008.

RIBEIRO, F.M.; VOLPATO, H.; LAZARIN-BIDÓIA, D.; DESOTI, V.C.; DE SOUZA, R.O.; FONSECA, M.; UEDA-NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C.V.; SILVA, S.O. The extended production of UV-induced reactive oxygen species in L929 fi-broblasts is attenuated by posttreatment with Arrabidaea chica through scavenging mechanisms. **J. Photochem. Photobiol. B Biol**., 178, 175–181, 2018.

ROSZER T. Understanding the mysterious M2 macrophage through activation markers and effector mechanisms. **Mediators Inflamm**., 2015:816460, 2015.

SANCHEZ RODRIGUEZ R.; PAULI M. L.; NEUHAUS I. M.; YU S. S.; ARRON S.T.; HARRIS H. W. et al. Memory regulatory T cells reside in human skin. **J Clin Invest**., 124(3):1027-36, 2014.

SERVAT-MEDINA, L. et al. Chitosan–tripolyphosphate nanoparticles as Arrabidaea chica standardized extract carrier: Synthesis, characterization, biocompatibility, and antiulcerogenic activity. **International journal of nanomedicine**, v. 10, p. 3897, 2015.

SEYOUM, A.; ASRES, K.; EL-FIKY, F. K. Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. **Phytochemistry**. 67 (18), 2058–2070, 2006.
SHARMA, D.; KANNEGANTI, T.-D. The cell biology of inflammasomes: Mechanisms of inflammasome activation and regulation. **J. Cell Biol.**, 213, 617–629, 2016.

SHORT W. D.; WANG X.; KESWANI S. G. The Role of T Lymphocytes in Cutaneous Scarring. **Adv Wound Care (New Rochelle)**, 11(3):121-131, 2022.

SLIKA, HASAN et al. Therapeutic potential of flavonoids in cancer: ROS-mediated mechanisms. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 146, p. 112442, 2022.

SOUSA, ILZA MARIA DE OLIVEIRA et al. “The role of spray-drying atmosphere on fridericia chica (bonpl.) L.G. Lohmann standardized extract production for wound healing activity.” **Natural product research**, vol. 36,18: 4799-4803, 2022.

STREET, R. A. Heavy metals in medicinal plant products - An African perspective. **South African Journal of Botany**, 82, 67 – 74, 2012.

TABRIZI, R. et al. Os efeitos da suplementação de quercetina sobre perfis lipídicos e marcadores inflamatórios entre pacientes com síndrome metabólica e distúrbios relacionados: Uma revisão sistemática e meta-análise de ensaios clínicos randomizados. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, n. 11, p. 1855–1868, 2020.

TAK, P. P.; FIRESTEIN, G. S. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. **J Clin Invest**, 2001.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell**, 140, 805–820, 2010.

UBIERA, ROSMERY DURAN. Adenosine Dependent Anti-Inflammatory Effects of Arrabidaea Chica VERLOT. 2021. 80 f. Tese (Doutorado em Imunologia Básica e Aplicada) - **Universidade Federal do Amazonas**, Manaus, 2021.

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

WANG X.; BALAJI S.; STEEN E. H.; LI H.; RAE M. M.; BLUM A. J.; MIAO Q.; BUTTE M. J.; BOLLYKY P. L.; KESWANI S. G. T Lymphocytes Attenuate Dermal Scarring by Regulating Inflammation, Neovascularization, and Extracellular Matrix Remodeling. **Adv Wound Care (New Rochelle)**, 1;8(11):527-537, 2019.

WENZEL, PHILIP et al. Redox regulation of cardiovascular inflammation–Immunomodulatory function of mitochondrial and Nox-derived reactive oxygen and nitrogen species. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 109, p. 48-60, 2017.

WILKINSON, H. N.; ROBERTS E. R.; STAFFORD A. R.; BANYARD K. L.; MATTEUCCI P.; MACE KA, M. J. Tissue Iron Promotes Wound Repair via M2 Macrophage Polarization and the Chemokine (C-C Motif) Ligands 17 and 22. **Am J Pathol**., 189(11):2196-2208, 2019.

WHO. The world health report 2002: reducing risks, promoting healthy life. **World Health Organization**, 2002.

YAMASHITA U.; KURODA E. Regulation of macrophage-derived chemokine (MDC, CCL22) production**. Crit Rev Immunol.**, 22(2):105-14, 2002.

ZHANG X.; WANG G.; GURLEY E. C.; ZHOU H. Flavonoid apigenin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response through multiple mechanisms in macrophages. **PLoS One**, 9(9):e107072, 2014.

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

ZORN, B. et al. 3-Desoxiantocianidinas de Arrabidaea chica. **Fitoquímica**, v. 56, n. 8, p. 831–835, 2001.

9. ANEXO

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A U T O R I Z A Ç Ã O

A CEUA-FMRP autoriza a execução do projeto intitulado: ***"Efeito anti-inflamatório da Arrabidaea chica VERLOT dependente da adenosina."***, registrado com o número do protocolo **117/2020**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. José Carlos Farias Alves Filho,** envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata, subfilo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O Protocolo foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, em reunião de 31 de agosto de 2020.

Colaboradores: Rosmery Duran Ubiera
Antonio Luiz Boechat
Paula Ramos Viacava
Adriane Dâmares de Sousa Jorge Batalha

Lembramos da obrigatoriedade do Relatório Final, em modelo da CEUA, para emissão do Certificado, como disposto nas Resoluções Normativas do CONCEA.

Finalidade			() Ensino (X) Pesquisa Científica	
Vigência da autorização			31/08/2020 a 12/10/2022	
Espécie/Linhagem	Nº de Animais	Peso/Idade	Sexo	Origem
Camundongo / C57Bl 6	105	22g / 42 dias	Macho	Serviço de Biotério
Camundongo / Balb c	06	22g / 42 dias	Macho	Serviço de Biotério
Camundongo / A2A KO	06	22g / 42 dias	Macho	Centro de Criação de Camundongos Especiais
Camundongo / CD39 KO	06	22g / 42 dias	Macho	Centro de Criação de Camundongos Especiais

Ribeirão Preto, 31 de agosto de 2020

Profa. Dra. Katiuchia Uzzun Sales
Coordenadora da CEUA–FMRP–USP