

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas

Artenizia Criste Lima

**AVALIAÇÃO *in vitro* DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTI-
INFLAMATÓRIA DE EXTRATOS DE DIFERENTES PARTES DA ESPÉCIE**

***Miconia ferruginata* DC.**

Diamantina

2021

Artenizia Criste Lima

**AVALIAÇÃO *in vitro* DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTI-
INFLAMATÓRIA DE EXTRATOS DE DIFERENTES PARTES DA ESPÉCIE
Miconia ferruginata DC.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia, nível mestrado, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Helen Rodrigues Martins

Coorientadores: Profa. Dra. Valéria Gomes de Almeida

Prof. Dr. Gustavo Eustáquio Brito Alvim de Melo

Diamantina

2021

Catálogo na fonte - Sisbi/UFVJM

L732 Lima, Artenizia Criste
2021 AVALIAÇÃO in vitro DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTI-
INFLAMATÓRIA DE EXTRATOS DE DIFERENTES PARTES DA ESPÉCIE
Miconia ferruginata DC [manuscrito] / Artenizia Criste Lima. -
- Diamantina, 2021.
112 p. : il.

Orientador: Prof. Helen Rodrigues Martins.

Coorientador: Prof. Valéria Gomes de Almeida.

Coorientador: Prof. Gustavo Eustáquio Brito Alvim de Melo.

Dissertação (Mestrado Multicêntrico em Ciências Fisiológicas) -- Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Programa de Pós-Graduação em Multicêntrico em Ciências Fisiológicas, Diamantina, 2021.

1. Plantas Medicinais. 2. Atividade Antioxidante. 3. Citotoxicidade. 4. Miconia ferruginata. 5. Atividade Anti-inflamatória. I. Martins, Helen Rodrigues . II. de Almeida, Valéria Gomes . III. de Melo, Gustavo Eustáquio Brito Alvim . IV. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. V. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

Artenizia Criste Lima

AVALIAÇÃO *in vitro* DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIA DE EXTRATOS DE DIFERENTES PARTES DA ESPÉCIE *Miconia ferruginata* DC.

Dissertação apresentada à Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas, da Sociedade Brasileira de Fisiologia, como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre, na área de Ciências Fisiológicas.**

Orientador: Profa. Helen Rodrigues
Martins

Coorientadores: Profa. Dra.

Valéria Gomes de Almeida

Prof. Dr.

Gustavo Eustáquio Brito Alvim de Melo

Data de aprovação 30/07/2021.

Prof. Eduardo de Jesus Oliveira (Departamento de Farmácia - FCBS - UFVJM)

Profa. Elizabete Adriana Esteves (Departamento de Nutrição - FCBS - UFVJM)

Profa. Helen Rodrigues Martins (Departamento de Farmácia - FCBS - UFVJM)



Documento assinado eletronicamente por **Eduardo de Jesus Oliveira, Servidor**, em 27/09/2021, às 21:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Elizabethe Adriana Esteves, Coordenador(a)**, em 28/09/2021, às 13:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Helen Rodrigues Martins, Membro**, em 15/12/2021, às 18:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufvjm.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0475904** e o código CRC **34405435**.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, a Deus, por me dar sabedoria e força durante essa caminhada.

Aos meus pais, Silvânia e Antônio que me incentivaram nos momentos difíceis, pela compreensão, dedicação e carinho.

Aos meus irmãos pela presença e carinho.

Aos meus familiares e amigos pelo carinho, atenção e auxílio.

À Guilherme por sempre estar presente, por todo amor, carinho e paciência.

À Edivânia, Cleyde, Sanny, Carina e Bianca pela amizade, presença, incentivo, auxílio e por todos momentos compartilhados.

À Poliana, minha colega de laboratório que me acolheu e foi meu braço esquerdo e direito durante toda a realização do trabalho, agradeço pela atenção, ensinamentos, paciência, dedicação e parceira.

A todos da equipe do LABMET, meu carinho por vocês é eterno.

A equipe do LADIP e LABIMUNO pela atenção, transmissão de conhecimentos e amizade.

À minha orientadora, Profa. Helen Rodrigues Martins e co-orientadores Profa. Valéria Gomes de Almeida e Prof. Dr. Gustavo Eustáquio Brito Alvim de Melo pelos ensinamentos, confiança e atenção.

A instituição de fomento Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNP-q) e Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) por tornarem possível a realização deste trabalho.

RESUMO

A importância das plantas medicinais e seus efeitos terapêuticos vêm sendo constatada ao longo do tempo, e muitas vezes, estas são usadas como único recurso para o tratamento de diversas doenças. A espécie *Miconia ferruginata* DC. (Melastomataceae) é conhecida popularmente como pixirica-do-campo ou babatenão, tem sido usada na medicina popular para tratar inflamações e infecções. Considerando o seu uso popular e os resultados promissores para o potencial anti-inflamatório, antitumoral e antioxidante, maiores esforços na investigação terapêutica da *M. ferruginata* tornam-se necessários, a fim de validar tal potencial. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar as atividades antioxidante e anti-inflamatória de extratos etanólicos brutos de folhas, do caule, de inflorescência e da casca da espécie *Miconia ferruginata* DC. A quantificação de compostos fenólicos e a avaliação da atividade antioxidante *in vitro* dos extratos foi realizada por meio da espectrofotometria. Todos os extratos brutos de *Miconia ferruginata* apresentaram teores de compostos fenólicos totais (CFT) com destaque para o extrato de inflorescência (120,137 mg EAG/g extrato). A atividade redutora dos extratos avaliada pela captura do radical DPPH• demonstrou maior captura para o extrato de caule (EC₅₀ de 483,58 µg/mL µg/mL). A citotoxicidade dos extratos foi avaliada sobre células mononucleares do sangue periférico (PBMC) humano, após 24 horas ou cinco dias de cultura, empregando o método de exclusão com azul de Tripán. Concentrações não tóxicas dos extratos *M. ferruginata* foram utilizadas para avaliar o efeito dos extratos sobre a proliferação de linfócitos e suas subpopulações TCD4 e TCD8, observando-se o decaimento da fluorescência de células marcadas com VPD450, em culturas estimuladas pela fitohemaglutinina (PHA). Os extratos apresentaram efeito inibitório sobre a resposta proliferativa de linfócitos e de suas subpopulações T CD4 e T CD8. A produção das citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , TNF- α e IL-2) por PBMC tratadas com os extratos e estimuladas com PMA e ionomicina também foi avaliada, utilizando a técnica de citometria de fluxo. Os extratos não tiveram efeito sobre a produção das citocinas IFN- γ e TNF- α pelos linfócitos totais. No entanto, houve diminuição de IL-2 em linfócitos totais tratados com extrato bruto de inflorescência. Assim, no presente estudo os extratos etanólicos brutos de *Miconia ferruginata* mostraram atividade antiproliferativa, a inibição da proliferação de linfócitos pelo extrato de inflorescência parece estar associada à inibição da citocina mitogênica IL-2. É provável que a atividade antioxidante observada possa estar relacionada a presença de compostos fenólicos nos extratos brutos de folhas,

de caule, de inflorescência e da casca, sendo necessário maiores investigações para comprovação da provável associação destas atividades.

Palavras-chave: Plantas Medicinais. Atividade Antioxidante. Citotoxicidade. *Miconia ferruginata*. Atividade Anti-inflamatória.

ABSTRACT

The importance of medicinal plants and their therapeutic effects have been observed over time, and they are often used as the only resource for the treatment of various diseases. The species *Miconia ferruginata* DC. (Melastomataceae) is popularly known as *pixirica-do-campo* or *babatenão*, it has been used in folk medicine to treat inflammation and infections. Considering its popular use and the promising results for its anti-inflammatory, antitumor and antioxidant potential, greater efforts in the therapeutic investigation of *M. ferruginata* become necessary in order to validate such potential. Thus, the aim of this study was to investigate the antioxidant and anti-inflammatory activities of crude ethanol extracts from leaves, stem, inflorescence and bark of the species *Miconia ferruginata* DC. The quantification of phenolic compounds and the evaluation of the in vitro antioxidant activity of the extracts was performed using spectrophotometry. All crude extracts of *Miconia ferruginata* showed levels of total phenolic compounds (CFT) with emphasis on the inflorescence extract (120,137 mg EAG/g extract). The reducing activity of the extracts evaluated by DPPH• radical capture showed greater capture for the stem extract (EC₅₀ of 483.58 µg/mL µg/mL). The cytotoxicity of the extracts was evaluated on human peripheral blood mononuclear cells (PBMC), after 24 hours or five days of culture, using the Trypan blue exclusion method. Non-toxic concentrations of *M. ferruginata* extracts were used to evaluate the effect of the extracts on the proliferation of lymphocytes and their TCD4 and TCD8 subpopulations, observing the decay of the fluorescence of cells labeled with VPD450, in cultures stimulated by phytohemagglutinin (PHA). The extracts showed an inhibitory effect on the proliferative response of lymphocytes and their T CD4 and T CD8 subpopulations. The production of proinflammatory cytokines (IFN-γ, TNF-α and IL-2) by PBMC treated with the extracts and stimulated with PMA and ionomycin was also evaluated using the flow cytometry technique. The extracts had no effect on the production of IFN-γ and TNF-α cytokines by total lymphocytes. However, there was a decrease in IL-2 in total lymphocytes treated with crude inflorescence extract. Thus, in the present study the crude ethanol extracts of *Miconia ferruginata* showed antiproliferative activity, the inhibition of lymphocyte proliferation by the inflorescence extract seems to be associated with the inhibition of the mitogenic cytokine IL-2. It is likely that the antioxidant activity observed may be related to the presence of phenolic compounds in the crude extracts of leaves, stem, inflorescence and bark, requiring further investigation to prove the probable association of these activities.

Keywords: Medicinal Plants. Antioxidant activity. Cytotoxicity. *Miconia ferruginata*. Anti-inflammatory activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- <i>Miconia ferruginata</i> DC.....	20
Figura 2- Imunidade inata e adaptativa	23
Figura 3 - Efeito do sistema glutaciona/peroxidase na manutenção do estado redox (-SH-) de proteínas intracelulares suscetíveis a oxidação de Espécies reativas de oxigênio (espécies reativas de oxigênio) e ERNs (espécies reativas de nitrogênio).....	33
Figura 4- Esquema de Reação do AG	39
Figura 5 - Reação de captura do radical livre DPPH.....	40
Figura 6 - Estratégia de análise por citometria de fluxo da emissão de fluorescência das PBMC tratadas com os extratos de <i>Miconia ferruginata</i>	44
Figura 7- Sequência de procedimentos utilizados para a análise do perfil de produção de citocinas por linfócitos.	46
Figura 8– Estratégia de análise utilizados para avaliação da proliferação celular pelo decaimento da fluorescência do VPD450.....	49
Figura 9 - Curva de calibração do padrão ácido gálico (AG) para determinação de compostos fenólicos totais.....	51
Figura 10 - Teor de compostos fenólicos totais (mgEAG/g) em diferentes concentrações dos extratos brutos de <i>Miconia ferruginata</i>	52
Figura 11- Teor de compostos fenólicos totais de extratos brutos de diferentes partes da espécie <i>Miconia ferruginata</i> na concentração de 750 ug/mL	53
Figura 12 - Porcentagem de inibição da captura do radical DPPH	54
Figura 13 - Concentração antioxidante efetiva média (EC50) dos extratos brutos de <i>Miconia ferruginata</i> frente ao ensaio DPPH.....	55
Figura 14 - Porcentagem de viabilidade das PBMC submetidas ao tratamento com os extratos de folhas, caule, inflorescência e casca de <i>Miconia ferruginata</i> após quatro horas	56
Figura 15 - Porcentagem de viabilidade das PBMC submetidas ao tratamento com os extratos de folhas, caule, inflorescência e casca de <i>Miconia ferruginata</i> após 120 horas.	57
Figura 16 - Análise da emissão de fluorescência de células tratadas com extrato etanólico bruto de folhas de <i>Miconia ferruginata</i> incubadas por quatro horas	58
Figura 17- Análise da emissão de fluorescência de células tratadas com extratos etanólicos brutos de folhas de <i>Miconia ferruginata</i> incubadas por 120 horas.....	60

Figura 18 - Efeito do solvente dimetilsulfóxido (DMSO) sobre o índice de proliferação de linfócitos humanos.....	64
Figura 19 - Índice de proliferação de linfócitos tratados com os extratos etanólicos brutos de <i>Miconia ferruginata</i>	66
Figura 20 - Porcentagem de viabilidade das PBMC submetidas ao tratamento com os extratos de <i>Miconia ferruginata</i> detectados no ensaio de linfoproliferação	67
Figura 21- Efeito dos extratos de <i>Miconia ferruginata</i> sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IFN- γ e IL-2) em linfócitos humanos.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AG	Ácido gálico
AUC	Área sobre a curva
APC	Aloficocianina
APC-Cy7	Aloficocianina combinada a cianina Cy7
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CAT	Catalase
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CsA	Ciclosporina A
COX-2-	Ciclooxigenase- 2
DAMPs	Padrões moleculares associados a dano
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
DPPH•	Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EAG	Equivalentes de ácido gálico
EC ₅₀	Concentração eficiente
ENOs	Espécies reativas de nitrogênio
ERK	Quinase controlada pela sinalização extracelular
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FC	Folin-Ciocalteu
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FOXP3	<i>Forkhead lineage-specific transcription factor</i>
FSC	Dispersão frontal
FSC-A	Área do pico de voltagem do parâmetro
FSC-H	Altura do pico de voltagem do parâmetro
FT	Fenólicos Totais
GPx	Glutathione Peroxidase
GSH	Glutathione

IC ₅₀	Concentração Inibitória de 50%
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-2	Interleucina 2
IL-17	Interleucina 17
IL-13	Interleucina 13
IL-5	Interleucina 5
IL-22	Interleucina 22
IL-26	Interleucina 26
IL1 β-	Interleucina 1 beta
INF-γ	Interferon gama
INOs	Óxido nítrico sintase induzível
IR	Infravermelho
JNK	Quinase c-Jun N-terminal
iNOs-	Síntese de óxido nítrico induzida
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LOX	Lipo-oxigenase
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK	Proteínas quinase ativadas por mitógenos
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MHC I	Complexo principal de histocompatibilidade de classe I
MHCII	Complexo principal de histocompatibilidade de classe II
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio
NF-kB	Fator nuclear kappa B
NK	Células natural Killer
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
O ₂	Oxigênio <i>singlete</i>
O ₂ ⁻	Radical superóxido
OH ⁻	Radical hidroxila
ONOO ⁻	Peroxinitrito
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos

PBMC	Células Mononucleares do Sangue Periférico
PBS	Tampão fosfato salino
PBS-W	Tampão Fosfato Salina para Lavagem (Wash)
PBS-P	Tampão Fosfato Salina de Permeabilização
PerCP	Peridinina-clorofila proteína
PE	Ficoeritrina
PMA	Acetato de forbol miristato
PMN	Células polimorfonucleares
PRMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
PPRs-	Receptores de reconhecimento de padrões
Q	Radical semiquinona
SOD	Superóxido Dismutase
SSC-A	Área do pico de voltagem do parâmetro
SSC-H	Altura do pico de voltagem do parâmetro
TGF- β	Fator de Crescimento Transformante beta
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UFVJM	Universidade Federal dos Vales Jequitinhonha e Mucuri
VPD450	Violet Proliferation Dye 450
v/v	Volume por volume

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1. As plantas medicinais	16
2.2. Família Melastomatacea e o gênero <i>Miconia</i>	18
2.1. Resposta imune inata e adaptativa.....	22
2.2. Inflamação	26
2.3. Os radicais livres e seus efeitos no organismo	29
2.4. Os Antioxidantes	31
3. OBJETIVOS.....	36
3.1. Objetivo geral	36
3.2. Objetivos específicos	36
4. MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1. Reagentes.....	37
4.1.1. Equipamentos	37
4.2. Protocolos Experimentais	38
4.2.1. Obtenção do material vegetal e preparo dos extratos vegetais.....	38
4.2.2. Determinação da concentração de compostos fenólicos totais dos extratos de <i>Miconia ferruginata</i>	39
4.2.3. Avaliação da atividade antioxidante in vitro dos extratos de <i>Miconia ferruginata</i>	40
4.2.4. Obtenção das Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMC) humano	41
4.2.5. Avaliação da viabilidade celular em culturas tratadas com extrato de <i>Miconia ferruginata</i>	42
4.2.6 Atividade sobre elementos da resposta imune dos extratos de <i>Miconia ferruginata</i>	42

4.2.6. Análise da emissão de fluorescência por células tratadas com extrato de <i>Miconia ferruginata</i>	43
4.2.7. Efeito dos extratos de <i>Miconia ferruginata</i> sobre a produção de citocinas por linfócitos humanos	44
4.2.8. Efeito dos extratos de <i>Miconia ferruginata</i> sobre proliferação de linfócitos humanos.....	46
4.2.9. Análise estatística	49
5. RESULTADOS.....	51
5.1. Avaliação do potencial antioxidante in vitro de <i>Miconia ferruginata</i>	51
5.1.1. Determinação da concentração de compostos fenólicos totais dos extratos de <i>Miconia ferruginata</i>	51
5.1.2. Avaliação da atividade antioxidante in vitro dos extratos de <i>Miconia ferruginata</i>	53
5.1.3. Avaliação da viabilidade celular em culturas tratadas com extrato de <i>Miconia ferruginata</i>	55
5.1.4. Viabilidade de células mononucleares do sangue periférico humano após tratamento com os extratos de <i>Miconia ferruginata</i>	55
5.2. Avaliação da emissão de fluorescência dos extratos etanólicos de <i>Miconia ferruginata</i>	57
5.3. Atividade sobre elementos da resposta imune dos extratos de <i>Miconia ferruginata</i>	62
5.3.1. Efeito dos extratos de <i>Miconia ferruginata</i> sobre a proliferação de linfócitos humanos.....	62
5.3.2. Avaliação do efeito dos extratos brutos de <i>Miconia ferruginata</i> sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias por linfócitos humanos.....	68
6. DISCUSSÃO.....	70
7. CONCLUSÃO.....	77
REFERÊNCIAS.....	78
APÊNDICE A	101

APÊNDICE B	102
APÊNDICE C	102
ANEXO A.....	104

1. INTRODUÇÃO

A utilização de plantas com fins medicinais para o tratamento, a cura e a prevenção de doenças é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade (MACEDO, 2016; WHO, 2014-2023). Apresenta-se como importante instrumento na assistência farmacêutica, principalmente, em países em desenvolvimento (OMS, 2002; CRAVOTTO *et al.*, 2010).

Os efeitos terapêuticos das plantas medicinais estão relacionados aos metabólitos secundários presentes em sua composição, que podem estar correlacionados a potenciais atividades biológicas, entre elas as atividade antioxidante e anti-inflamatória (LI *et al.*, 2020; PEREIRA *et al.*, 2021).

Os antioxidantes são classificados em enzimáticos e não enzimáticos, sendo frequentemente encontrados em fontes naturais (OLIVEIRA *et al.*, 2009; VELLOSA *et al.*, 2021). Entre os antioxidantes provenientes de vegetais encontram-se os compostos fenólicos, que têm sido associados à capacidade de combater os prejuízos celulares decorrentes do estresse oxidativo e processos inflamatórios crônicos (JÁUREGUI, 2007; HUSSAIN *et al.*, 2016).

Os polifenóis possuem quatro classes de metabólitos secundários, os ácidos fenólicos, os flavonoides, os estilbenos e as lignanas. (BOUAYED; BOHN, 2010). Em especial, os flavonoides possuem capacidade de reduzir a produção e eliminar as espécies reativas, além de exercer um papel eficaz como fatores anti-inflamatórios (ARULSELVAN *et al.*, 2016). Este efeito parece estar associado a quelação de traços de elementos envolvidos na produção de radicais livres, pela captura direta de espécies reativas de oxigênio (ROCHA; SOUZA, 2018), capacidade desses compostos em inibir enzimas importantes no processo inflamatório, tais como a fosfolipase A2 (PLA2) (KIM *et al.*, 2004; CHEN *et al.*, 2018), a lipo-oxigenase (LOX), a ciclooxigenase-2 (COX-2), além de promover a modulação da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (PIETTA, 2000; YOON; BAEK, 2005; SANTANGELO *et al.*, 2007; MARTINS, 2013).

Os polifenóis e outros metabólitos secundários são encontrados em diferentes espécies vegetais. A espécie *Miconia ferruginata*, uma planta do Cerrado, conhecida popularmente como pixirica-do-campo ou babatenão, assim como outras plantas da família Melastomataceae, se insere neste contexto e, é utilizada com fins medicinais (CAMPOS; AVELAR-FREITAS, 2018). Estudos químicos com espécies do gênero

Miconia apontam a presença de terpenoides, catequinas e flavonoides, sendo esses os possíveis responsáveis pelas atividades biológicas associadas a essas espécies. Na literatura já foram demonstrados por meio de estudos, *in vitro* e *in vivo*, atividades antimicrobiana, antitumoral, antinociceptiva, leishmanicida e antioxidante destas plantas (VASCONCELOS *et al.*, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2008; PEIXOTO *et al.*, 2011; SERPELONI *et al.*, 2011; LIMA, 2016; CRUZ, 2017; CUNHA *et al.*, 2019; BARROSO *et al.*, 2021).

Neste contexto, nosso grupo de pesquisa verificou, em estudos de triagem de atividades biológicas *in vitro*, que extratos brutos de *M. ferruginata* apresentaram efeitos antioxidante, antitumoral e anti-inflamatório, (BARROSO, 2015; LIMA, 2016; CORDOBA, 2017; CRUZ, 2017). De maneira geral, os extratos etanólicos apresentaram efeito citotóxico altamente seletivo frente a diferentes células tumorais (BARROSO 2015; CORDOBA, 2017). Os extratos aquosos das folhas (45µg/mL) e do caule (15, 20 e 30 µg/mL) apresentaram elevada inibição proliferativa de linfócitos estimulados por mitógenos em comparação à dexametasona, com eficácia de 39,9%, 57,3%, 137,4% e 251,8%, respectivamente. O extrato aquoso do caule se destacou uma vez que, quando avaliado na concentração de 30 µg/mL apresentou eficácia 2,5 vezes superior ao fármaco padrão (BARROSO, 2015). Também foi observada elevada capacidade antioxidante e redução do *burst* respiratório em neutrófilos (LIMA, 2016; CRUZ, 2017). Estes resultados sugerem possível atividade antioxidante e anti-inflamatória destes extratos. Contudo, ainda são necessárias investigações mais detalhadas sobre os efeitos dos extratos brutos de folhas, caule, inflorescência e casca de *M. ferruginata* a fim identificar e validar tais atividades. Ademais, torna-se necessário compreender os mecanismos celulares pelos quais a *M. ferruginata* atua no processo inflamatório, requerendo avaliações quanto a produção das citocinas, a proliferação de subpopulações de linfócitos (T CD4 e T CD8) e, também da quantificação do efeito antioxidante.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. As plantas medicinais

A importância das plantas medicinais e seus efeitos terapêuticos vêm sendo constatadas ao longo do tempo, e muitas vezes são utilizadas como único recurso para o tratamento de diversas doenças (KOPAEI, 2012; JAMSHIDI-KIA *et al.*, 2018). Para a Organização Mundial da Saúde (OMS), as plantas medicinais são instrumentos importantes da assistência farmacêutica, especialmente da população de países em vias de desenvolvimento, no que se refere à Atenção Primária à Saúde (OMS, 2011). Assim, o uso das plantas pode ser uma alternativa para manutenção, prevenção e tratamento de saúde para diferentes patologias (RODRIGUES *et al.*, 2007; DANTAS *et al.*, 2018; EBRAHIMI *et al.*, 2020).

No Brasil, as plantas medicinais são amplamente utilizadas para o tratamento de diversas doenças (RODRIGUES *et al.*, 2008) e, essa abordagem é favorecida pela diversidade da flora brasileira (SOUZA *et al.*, 2017). Dentre os seis biomas do Brasil, o Cerrado se destaca por ser o segundo maior bioma nacional e ser considerado um *hotspot* mundial (JOLY *et al.*, 2011). As plantas encontradas no Cerrado despertam o interesse da pesquisa, pois estas constituem fontes de promissores compostos bioativos (CARAMORI *et al.*, 2004). Atualmente, os estudos com produtos fitoterápicos vêm com expectativa de aumentar a regularização e distribuição destes produtos no Brasil, visando a disponibilidade de medicamentos para atendimento à população (OLIVEIRA, 2016). De acordo com a WHO, cerca de 80% da população mundial faz uso das plantas medicinais na atenção primária a saúde (WHO, 2014-2023). A utilização de plantas medicinais e fitoterápicos deve ser realizada por meio de prescrição adequada e informação sobre possíveis interações medicamentosas (MATTOS *et al.*, 2018). Assim, são necessários mais estudos com plantas medicinais, incluindo espécies vegetais provenientes do Cerrado, com o objetivo de averiguar seus reais potenciais farmacológicos e assegurar a segurança de seu uso (SOUZA, 2015).

De acordo com a diretriz da Política de Plantas Medicinais e Fitoterápicos de 2006, é garantido à população a obtenção e o uso das plantas medicinais e fitoterápicos com segurança, eficácia e qualidade (BRASIL, 2006). Estudo realizado no Vale do Jequitinhonha de Minas Gerais mostrou que 73% dos participantes faziam uso de plantas medicinais, e dessas 90% utilizavam plantas dos quintais de suas casas. Importante

ressaltar que 94,4% acreditavam que as plantas não poderiam fazer mal (CRUZ *et al.*, 2015). No estado de Santa Catarina, também foi observado um grande uso de plantas medicinais pela população do município de Blumenau, as plantas eram colhidas em suas residências e feitas em forma de chás. Ainda foi visto, que os principais usuários foram do sexo femininos e com idade avançada (ZENI, 2017).

Adicionalmente, também foi demonstrado por Piriz (2013) o elevado uso de plantas medicinais, sendo maior uso nas comunidades rurais e usuários do Sistema Único de Saúde (SUS) e da Estratégia Saúde da Família (ESF). O uso das plantas medicinais se deve a fatores econômicos, sociais e culturais, associado ao alto custo de consultas médicas, as dificuldades de acesso, ao custo de medicamentos e, ao conhecimento de comunidades tradicionais, que culturalmente usam plantas com fins preventivos e terapêuticos (SIMÕES *et al.*, 1999; NICOLETTI *et al.*, 2015; CAMPOS; AVELAR-FREITAS, 2018).

Contudo, o uso inadequado e desconhecimento de efeitos secundários de plantas pode ocasionar reações adversas, intoxicações, algumas até graves, levando a morte devido a presença de substâncias tóxicas (NAVARRO MOLL, 2000; FRANCA *et al.*, 2008; VASCONCELOS; VIEIRA; VIEIRA, 2009; FARZAEI *et al.*, 2020). Um exemplo é o uso da *Ruta graveolens*, conhecida como arruda, em mulheres grávidas seu uso pode provocar efeitos teratogênicos, hemorragias e até mesmo provocar aborto (GORRIL *et al.*, 2016). Foi observado que informações sobre intoxicações e outros efeitos advindos da utilização das plantas não atinge as pessoas que fazem uso do serviço público de saúde (SILVA, 2003; ALEXANDRE; BAGATINI; SIMÕES, 2008; SILVEIRA, BANDEIRA; ARRAIS 2008), tornando-se necessário a capacitação de profissionais de saúde relacionada a plantas medicinais para orientar sobre o seu uso de forma segura e eficaz (BRUNING; MOSEGUI; VIANNA, 2012; MACEDO, 2016; HARAGUCHI *et al.*, 2020). Portanto, estudos etnobotânicos, químicos e farmacológicos são importantes para identificar os fatores de riscos, os mecanismos de ação e a padronização do uso de plantas medicinais (VEIGA- JUNIOR *et al.*, 2005; SILVEIRA, BANDEIRA; ARRAIS 2008; JAMSHIDI-KIA, 2018; FARZAEI *et al.*, 2020).

A pesquisa com plantas medicinais interliga investigações da medicina tradicional e popular; isolamento, purificação e caracterização de princípios ativos; investigação farmacológica de extratos, frações e constituintes químicos isolados; modificações estruturais e a preparação de diferentes formulações para a produção de fitoterápicos.

Assim, a junção destas áreas multidisciplinares na pesquisa de plantas medicinais pode desencadear a descoberta de drogas promissoras e eficazes (MACIEL *et al.*, 2002).

2.2. Família Melastomatacea e o gênero *Miconia*

A família Melastomatacea apresenta aproximadamente 4.500 espécies, com quase dois terços dessas encontradas nas Américas. Esta família está representada por 100 gêneros, sendo o gênero *Miconia* Ruiz & Pav, o maior e mais representativo, com cerca de 1000 espécies (MEYER, 1998; MARTINS, 2009). As espécies são, em maior parte, arbustos e ervas de sub-bosque, e estão distribuídas em habitats secos a úmidos, desde o nível do mar a grandes altitudes, mas é possível encontrar outras formações como trepadeiras, epífitas, ervas anuais e perenes. Suas folhas são geralmente curvinérveas acródroma, estames falciformes, sem estípulas e anteras poricidas facilitam sua distinção entre outras espécies (MARTINS, 1996; RENNER 2004; ROMERO, 2002; ALBUQUERQUE *et al.*, 2013).

Estudos fitoquímicos de espécies do gênero *Miconia* detectaram compostos das classes dos triterpenos e, alquilbenzoquinonas (GUNATILAKA *et al.*, 2001; VASCONCELOS *et al.*, 2006; MARTINO *et al.*, 2008; FERREIRA, 2010; TARAWNEH *et al.*, 2014; LIMA *et al.*, 2020). Contudo, a maioria dos constituintes químicos relatados pertencem ao grupo dos compostos fenólicos, especialmente os flavonoides (CHAN *et al.*, 1992; KINGSTON *et al.*, 2000; DOS SANTOS *et al.*, 2012; NDJATEU *et al.*, 2014; LIMA *et al.*, 2020). Esses compostos têm sido apontados como os responsáveis pelas atividades anti-inflamatória, antioxidante e analgésica, e são indicadas para tratar artrite, artrose e dores musculares. Dentre esses, os flavonoides já foram apontados como responsáveis por forte efeito antioxidante e anti-inflamatório (RICE- EVANS *et al.*, 1996; MANCINI *et al.*, 2008; SERAFINI; PELUSO; RAGUZZINI, 2010; PIERONI *et al.*, 2011). Os compostos triterpenos pentacíclicos, especialmente, os ácidos ursólico e oleanólico, tem registros também de atividade anti-inflamatória (VASCONCELOS *et al.*, 2006; DALLA; GNOATTO; GOSMANN, 2009).

Muitas espécies do gênero *Miconia* têm sido utilizadas na medicina popular como agentes anti-inflamatórios e antibióticos. Estudos científicos preliminares com algumas espécies têm mostrado potenciais atividades biológicas, tais como ação antimicrobiana, antitumoral, antimutagênica, antimalárica, antinoceptiva, antiparasitária, antioxidante e anti-inflamatória (CELOTTO *et al.*, 2003; CRUZ; KAPLAN, 2004; CUNHA, 2003;

CUNHA *et al.*, 2006; VASCONCELOS *et al.*, 2006; CUNHA *et al.*, 2008; RODRIGUES *et al.*, 2008; PIERONI *et al.*, 2011; PEIXOTO *et al.*, 2011; SERPELONI *et al.*, 2011; BARROSO, 2015; LEITE, 2016; LIMA, 2016; CRUZ, 2017; GATIS-CARRAZZONI *et al.*, 2018; CUNHA *et al.*, 2019; GONTIJO *et al.* 2019; BARROSO *et al.*, 2021).

A *Miconia albicans* (SW.) conhecida popularmente como canela de velho é uma das espécies mais estudadas no gênero (SERPELONI *et al.*, 2008; PIZA, 2009; PIERONI *et al.*, 2011; SANTOS; COUTO, 2018; LIMA, 2020; QUINTANS- JUNIOR *et al.*, 2020; GOMES *et al.*, 2021). Tem sido aplicada comercialmente na forma de chás, cápsulas de extratos secos e pomadas de uso adjuvante e cosmético, que não necessitam de liberação da ANVISA, para tratar dores musculares e articulares.

Estudos vêm sendo realizados para correlacionar a composição química com as atividades biológicas atribuídas à espécie. Vasconcelos *et al.* (2003) investigaram efeitos analgésicos dos extratos brutos (hexano, cloreto de metileno e etanol) obtidos das partes aéreas de *Miconia albicans* SW pelo teste de contorção. Os autores verificaram que os extratos hexânico e cloreto de metileno, administrados por via oral, produziram antinoceção, e que os triterpenos isolados poderiam ser os responsáveis pela analgesia. Adicionalmente, os ácidos ursólico e oleanólico foram os principais metabólitos isolados em mistura de *Miconia albicans*, cujo extrato bruto apresentou atividades analgésica e anti-inflamatória. No entanto, a administração da mistura contendo 65% de ácido ursólico e 35% de ácido oleanólico não exibiu significativas ações analgésica e anti-inflamatória. Assim, considerando que a mistura de ácido ursólico e ácido oleanólico foi inativa, foi sugerido que outros compostos presentes podem estar relacionados por estes efeitos ou efeito sinérgico, uma vez que o extrato bruto apresentou boa atividade (VASCONCELOS *et al.*, 2006). Além disso, estudo realizado em portadores de osteoartrite mostraram resultado promissor quanto a atividade anti-inflamatória e analgésica de *Miconia albicans* comparado ao ibuprofeno (GOMES *et al.*, 2021).

A atividade antioxidante do extrato de *Miconia albicans* SW foi demonstrada por Pieroni *et al.* (2011), a qual foi relacionada ao alto teor de fenóis presentes.

Outras espécies do gênero *Miconia*, também tem demonstrado efeitos anticonceptivos e anti-inflamatórios (SPESSOTO *et al.*, 2003; CELLOTO *et al.*, 2003; GATIS-CARRAZZONI *et al.*, 2018). No modelo de pleurisia induzida por carragenina, o extrato de *Miconia fallax* inibiu a migração de leucócitos, reduziu a produção das citocinas pró-inflamatórias (TNF e IL-1 β) e reduziu cerca de 58,9% o número de contorções, mostrando um possível efeito analgésico e anti-inflamatório. Segundo os

autores, essas atividades parecem estar envolvidas com a presença de compostos fenólicos. Nesta espécie também foi observada capacidade de inibição do crescimento tumoral de adenocarcinoma uterina tanto o extrato etanólico, quanto a mistura de ácidos oleanólico e ursólico (CUNHA *et al.*, 2008).

A espécie *M. ferruginata* DC. (Figura 1) conhecida popularmente como pixirica-do-campo ou babatenã, tem sido usada na medicina popular para tratar inflamações e infecções (ALMEIDA; BANDEIRA, 2010). É encontrada na Bolívia e Brasil, está presente nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Bahia, Pernambuco, Rio de Janeiro, Tocantins e no Distrito Federal (GOLDENBERG, 2000; GOLDENBERG *et al.*, 2012). No estado de Minas Gerais pode ser encontrada em campos rupestre, cerrado rupestre e cerrado sentido restrito, especialmente em áreas de altitude elevada. Possui ramos bastante robustos, rugosos, com estrias bem evidentes, grandes inflorescências escorpioides (14-38,5 cm de comprimento) (REZENDE *et al.*, 2014).

Figura 1- *Miconia ferruginata* DC.



Fonte: Acervo próprio.

Através de estudos fitoquímicos com extratos etanólicos e aquosos de folhas e caules de *M. ferruginata* foi possível identificar 14 compostos equivalentes a diferentes classes de sesquiterpenos, hidrocarbonetos, monoterpênicos, fenil propanóides, e álcoois, sendo predominante os sesquiterpenos β -cariofileno e α -humuleno (BARROSO, 2015). Cunha *et al.* (2020) isolaram os compostos 5,6,7-trihidroxi 4'-metoxiflavona e uma mistura de ácidos ursólico e oleanólico de extrato etanólico das folhas de *M. ferruginata*.

O estudo de BARROSO *et al.* (2021) identificou compostos fenólicos utilizando cromatografia líquida de ultra eficiência com arranjo de fotodiodos (UFLC- DAD). No extrato etanólico de folhas/flores foi possível identificar a presença de flavona, flavonol e derivados de flavonóides da quercetina, e no extrato etanólico de caule foi identificado as classes de catequinas e flavonol.

CRUZ (2017) determinou quantidade significativa de compostos fenólicos totais (561, 89 mg EAG/g) no extrato das folhas de *M. ferruginata*. Além disso, foi observado potencial atividade antioxidante em relação aos radicais DPPH• e ABTS•⁺. A capacidade antioxidante foi associada a quantidade de compostos fenólicos presentes no extrato bruto. Vale ressaltar que o extrato não apresentou efeito citotóxico em neutrófilos isolados de sangue total tratados com o extrato nas concentrações de 25 e 50 µg/mL. Adicionalmente, no estudo de LIMA (2016) atividade antioxidante dos extratos do caule também foi observada, que promoveram elevada inibição do *burst* oxidativo dos neutrófilos, associada a moderada quantidade de compostos fenólicos presentes.

Estudo realizado por CORDOBA (2017), mostrou potencial seletivo e citotóxico dos extratos etanólicos e aquosos do caule de *M. ferruginata* sobre as células de leucemia linfocítica (Jukart), com provável mecanismo antitumoral por apoptose, com indução e retenção das células tumorais na fase G0-G1. Além disso, foi demonstrado que extratos etanólicos apresentaram elevada citotoxicidade sobre diferentes células de linhagem tumoral, tais como adenocarcinoma de mama (MDA- MB-231), adenocarcinoma de câncer murino (4T1) e adenocarcinoma de pulmão humano (A549), mostrando provável atividade antitumoral dos extratos testados (BARROSO *et al.*, 2021). Adicionalmente, efeito citotóxico de triterpenos na forma metilada isolados das folhas de *M. ferruginata* foi observado, apresentando inibição de 90 % sobre linhagens tumorais do melanoma (MDA- MB- 435) e câncer de cólon (HCT-8). Além da inibição da catepsina-B pela mistura dos triterpenos ácido ursólico e ácido oleanólico também foi observado neste estudo (OLIVEIRA, 2010).

A atividade anti-inflamatória de *M. ferruginata* tem sido estudada por nosso grupo, os extratos aquosos das folhas (45µg/mL) e do caule (15, 20 e 30 µg/mL) apresentaram elevada inibição proliferativa de linfócitos estimulados por mitógenos, com eficácia de 39,94%, 57,3%, 137,4% e 251,8%, respectivamente, em comparação à dexametasona. Com destaque para o extrato aquoso do caule, com eficácia 2,5 vezes superior ao fármaco padrão dexametasona (BARROSO, 2015). Recentemente, estudo *in vivo* com camundongos (C57BL/10 Sc Sn- Dmdmdx/J) mostrou promissor potencial da

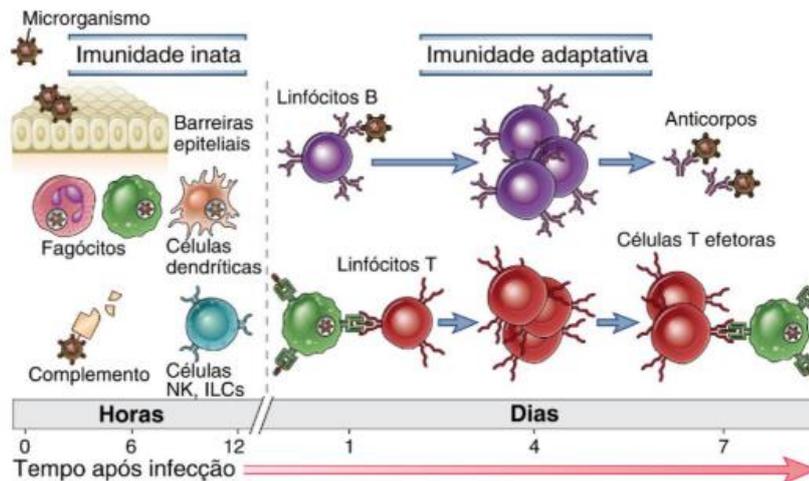
função regenerativa tecidual, anti-inflamatória e anti-fibrótica do extrato aquoso das folhas de *M. ferruginata* (CORRÊA, 2020).

Considerando o uso popular da espécie e os resultados altamente promissores para o potencial anti-inflamatório, antitumoral e antioxidante, maiores esforços na investigação terapêutica da *M. ferruginata*, tornam-se necessários. Assim, é importante a investigação das atividades anti-inflamatória e antioxidante a fim de validar tais atividades de extratos etanólicos brutos da espécie *Miconia ferruginata* DC.

2.1. Resposta imune inata e adaptativa

As respostas imunes contra agentes patogênicos são compostas das reações primárias da imunidade inata, seguida pela resposta da imunidade adaptativa (figura 2). A imunidade inata e adaptativa funciona cooperativamente em um sistema de defesa firmemente ligado e integrado (revisado por SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004; CRUVINEL *et al.*, 2010; KAUR; SECORD, 2019). Macrófagos, células dendríticas, mastócitos, neutrófilos, eosinófilos e células natural Killer (NK), também chamadas de células polimorfonucleares (PMN) participam da resposta inata. Os mecanismos de defesa envolvem fagocitose, ativação do sistema complemento, liberação de mediadores inflamatórios, citocinas e quimiocinas (CRUVINEL *et al.*, 2010; PAHWA *et al.*, 2020). As células dendríticas e monócitos/macrófagos possuem a capacidade de reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (PAMP's) ou a danos (DAMP's) por meio de receptores de reconhecimento de padrões (PPRs) (AKIRA *et al.*, 2009; MEDZHITOV, 2010; KEARNEY; MARTIN, 2017), que atuam na ativação de linfócitos T (SANTANA; ESQUIVEL-GUADARRAMA 2006; GUERRIERO *et al.*, 2019). Assim, a imunidade inata fornece uma resposta rápida e não específica, mas também estimula e direciona o curso e a especificidade da imunidade adaptativa, aumentando e potencializando a resposta contra o agente agressor de maneira eficaz, por dias, meses ou até anos, após a primeira estimulação imunológica (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

Figura 2- Imunidade inata e adaptativa



Fonte: COSTA (2018)

Já a resposta adaptativa possui um conjunto de mecanismos mediado por linfócitos B ou T, incluindo os subconjuntos de CD4+, CD8+, desempenhando importante ação na inflamação por vários mecanismos, que incluem a secreção de citocinas, a co-estimulação de linfócitos e a produção de anticorpos e complexos imunes (SUN *et al.*, 2012; PAHWA *et al.*, 2020). Dessa forma, a resposta adaptativa se divide em duas: a resposta humoral e a resposta celular. A resposta humoral é mediada por anticorpos produzidos e liberados pelos linfócitos B, que neutralizam ou até mesmo eliminam antígenos. Essa resposta frente a antígenos protéicos necessita do reconhecimento do antígeno pelos linfócitos T auxiliares e sua contribuição com os linfócitos B antígenos específicos, induzindo expansão clonal dos linfócitos B, a mudança de classe, a maturação de afinidade e a diferenciação em linfócitos B de memória (revisado por BONILLA; OETTGEN, 2010; JUNIOR *et al.*, 2010).

A imunidade celular é mediada por linfócitos T que promovem a destruição de microrganismos intracelulares alojados em fagócitos ou induzem a morte de células infectadas para eliminar reservatórios de infecção. Além disso, os linfócitos T auxiliam no recrutamento de outras células fagocíticas e auxiliam as células B na produção de anticorpos (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004; CRUVINEL *et al.*, 2010).

Os linfócitos T são divididos em duas subpopulações, os linfócitos T CD4+, também chamados de linfócitos T auxiliares ou T *helper* (Th) e linfócitos T CD8+, conhecidos como linfócitos T citotóxicos. Os linfócitos T reconhecem antígenos apresentados através de moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) presentes na superfície de uma célula apresentadora de antígenos (JUNIOR *et al.*, 2010). Os linfócitos T CD8+ reconhecem os antígenos ligados às moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade de classe I (MHCI), realizando dessa forma a eliminação de células infectadas por patógenos intracelulares. Já os linfócitos T CD4+ reconhecem os antígenos que se encontram na superfície celular ligados as moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade de classe II (MHC II) e, sua ativação induz a produção de citocinas, o que amplifica tanto a resposta inata quanto a adquirida (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004; CLARK; KUPPER, 2005; MACIEL, 2014). Os linfócitos TCD4+ possuem subconjuntos denominados Th1, Th2, Th17, Th9, Linfócitos T reguladores (Treg, Tr1 e Th3) e Th folicular, sendo determinados de acordo com as citocinas que produzem.

A indução da resposta de linfócitos Th1 é realizada, principalmente, pela produção de IL-2, que induz a proliferação de linfócitos T, a proliferação e o aumento da capacidade citotóxica dos linfócitos TCD8+ (JUNIOR *et al.*, 2010). O IFN- γ também produzido em grandes quantidades, gerando a ativação de macrófagos e promovendo a ação citotóxica de linfócitos TCD8+ (JUNIOR *et al.*, 2010; OCHOA- AZZE, 2014).

A população de Th2 apresenta papel importante nas repostas humorais, favorecendo a produção de anticorpos por meio das citocinas produzidas. As citocinas que representam a resposta Th2 são IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 e IL-10. Sua principal função está relacionada a defesa contra helmintos. Entretanto, possui contribuição em casos patológicos como asma e reações alérgicas provocado pela troca de classe de imunoglobulinas nos linfócitos B para IgE através da IL-4, e produção e ativação de eosinófilos pela IL-5 (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004; BONILLA; OETTGEN, 2010; JUNIOR *et al.*, 2010).

O grupo Th17 apresenta um subtipo de linfócitos T efetores, com papel importante na proteção contra microrganismos extracelulares. As citocinas produzidas por esse subtipo são IL-22, IL-26 e citocinas da família IL-17 (JUNIOR *et al.*, 2010). A IL17 induz a inflamação por meio da produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF- α) e da infiltração celular (KIMURA; KISHIMOTO, 2010; JUNIOR *et al.*, 2010). A hipersecreção dessa citocina vem sendo associada a doenças autoimunes, uma vez que,

foi detectado altos níveis de IL-17 no soro e tecidos alvos de pacientes com esclerose múltipla, lúpus e artrite reumatoide (KIMURA; KISHIMOTO, 2010).

As células T regulatórias (Treg) apresentam papel na manutenção da homeostase imunológica e na prevenção de doenças autoimunes. Atuam na supressão da resposta imunológica, suprimindo a ativação, a proliferação e as funções efetoras como a produção de citocinas e a ativação de linfócitos TCD4+ e TCD8+, de células NK, de linfócitos B, de células dendríticas e de mastócitos (SAKAGUCHI S. *et al.*, 2010; RINCON, 2017). As células Treg encontradas no sangue têm origem no timo e são conhecidas como Treg naturais (HERNANDEZ, 2009; JUNIOR *et al.*, 2010). Essas células apresentam níveis elevados de CD25 e expressam fator de transcrição Foxp3, que possui papel importante no desenvolvimento e função das células T regulatórias (JUNIOR *et al.*, 2010; SAKAGUCHI *et al.*, 2010). Além de expressar a molécula de superfície CD25+, os linfócitos como Treg naturais expressam CTLA-4, GITR, TNFR-2 e HLA- DR (BATISTA *et al.*, 2012).

Os linfócitos T reguladores (Tr1) originam-se em tecidos periféricos, apresentando função supressora através da produção de citocinas, como IL10. Já os linfócitos reguladores Th3 atuam na supressão da resposta imunológica por meio da produção de TGF- β , sendo capaz de impedir o desenvolvimento de doenças autoimunes (HERNANDEZ, 2009; JUNIOR *et al.*, 2010; BATISTA *et al.*, 2012). Dessa forma, os linfócitos T reguladores apresentam papel importante na manutenção da homeostase imunológica e controle das respostas autoimunes.

Os linfócitos T auxiliares foliculares são identificadas nos centros germinativos dos folículos dos órgãos linfoides secundários, quando presentes no sangue essas células são denominadas linfócitos T auxiliares circulantes. Apresentam importante função em auxiliar os linfócitos B na produção de anticorpos, uma vez que, a alteração de classe e de afinidade dos anticorpos, a diferenciação das células B e a geração de memória dependem da cooperação entre os linfócitos T auxiliares foliculares e as células B. Nos folículos, essas células sintetizam a IL-21 que atua estimulando a proliferação de linfócitos B e sua diferenciação em plasmócitos. Contudo, quando presentes no sangue, a subpopulação de linfócitos T auxiliares foliculares circulantes podem ser reconhecidas com diversos marcadores clássicos de linfócitos T auxiliares (ALONSO; FOMIN; RIZZO, 2021).

A subpopulação de linfócitos T auxiliares, Th9 está relacionada a produção de IL-9 que está associada a maior hiper-reatividade brônquica e possui papel patogênico em

doenças alérgicas, como a asma (SOUZA *et al.*, 2010; DEGASPERI *et al.*, 2018). A IL-9 atua como fator de crescimento para mastócitos e potencializa a produção de citocinas. Além disso, induz a produção dos anticorpos IgG e IgE nos linfócitos B (DEGASPERI *et al.*, 2018).

Assim, a defesa imunológica contra patógenos é realizada de forma integrada, envolvendo componentes da resposta inata e da adaptativa, com a participação de diversas células do sistema imunológico e de mediadores inflamatórios.

2.2. Inflamação

A inflamação é caracterizada como uma cascata complexa de eventos fisiológicos, os quais são responsáveis pela eliminação de patógenos ou agentes lesivos associados a dano celulares com o intuito de reparo e do restabelecimento da homeostasia e da função tecidual (MEDZHITOV, 2008; VODOVOTZ *et al.*, 2009; CHEN *et al.*, 2017; KEARNEY; MARTIN, 2017; PAHWA *et al.*, 2020). Assim, a inflamação é uma estratégia defensiva do organismo, em que o sistema imunológico identifica células danificadas e realiza sua função protetora, diminuindo ou neutralizando os agentes nocivos.

A inflamação pode ser classificada em aguda ou crônica, sendo que a fase aguda se inicia rapidamente e, tem uma duração relativamente curta, de duas a seis semanas. O estímulo para resposta aguda ocorre através de danos nos tecidos devido a trauma, a invasão microbiana ou a compostos nocivos (revisado por CHEN *et al.*, 2017; PAHWA *et al.*, 2020). Apresenta como principais características a permeabilidade capilar com a exsudação de fluidos ricos em proteínas plasmáticas, a vasodilatação e a migração de leucócitos, como neutrófilos para o sítio inflamatório através da parede capilar (MEDZHITOV, 2008; CHEN *et al.*, 2017; PAHWA *et al.*, 2020).

A inflamação crônica é lenta e de longo prazo, podendo durar por meses e anos, a fim de eliminar o agente lesivo e restaurar as funções do tecido. Os efeitos ocasionados pela inflamação crônica diferenciam-se de acordo com a causa da lesão provocada e a capacidade de reparar o dano tecidual (PAHWA *et al.*, 2020). Assim, em casos de persistência inflamatória, pode ocorrer lesão tecidual persistente e prejudicial, induzida pelo acúmulo de células mononucleares, como linfócitos, macrófagos e sinais de angiogênese, fibrose e necrose tissular (NATHAN, 2002; NATHAN; DING, 2010;

CRUVINEL *et al.*, 2010). Desse modo, para evitar estes danos o ponto chave é a resolução da inflamação rapidamente, por meio da eliminação tanto dos agentes patogênicos, quanto dos neutrófilos estimulados por apoptose (KUNDU; SURH, 2005).

Durante a inflamação, os macrófagos ativados produzem grande quantidade de moléculas pró-inflamatórias, incluindo o óxido nítrico (NO), as prostaglandinas da série E2 (PGE2), o TNF- α e a IL-1 (CRUVINEL *et al.*, 2010; ARULSELVAN *et al.*, 2016; CHEN *et al.*, 2017). O NO também é produzido por muitos tipos celulares, sobretudo as células endoteliais do tecido lesionado, atuando como mediador inflamatório no desempenho de várias funções, tais como: vasodilatação, regulação da liberação de neurotransmissores, ação antagonista nos estágios de ativação plaquetária (adesão, agregação e degranulação). Ele também é utilizado pelos macrófagos, como metabólito citotóxico na destruição de micro-organismos e células tumorais (FERNANDES, 2004; COUTINHO *et al.*, 2009; CHAMUSCA *et al.*, 2012).

A resolução do dano tecidual ocorre através da mudança de um perfil pró-inflamatório para anti-inflamatório. Desse modo, mediadores anti-inflamatórios inibem seletivamente certos aspectos da resposta imune (MEDZHITOV, 2010; NATHAN; DING, 2010). A citocina IL-4 secretada por mastócitos, basófilos e linfócitos Th2 induzem os macrófagos a mudarem para um perfil de supressão da inflamação, favorecendo a cicatrização do tecido lesado, através da produção de IL-10 e TGF- β (NATHAN; DING, 2010). Além disso, redução da infiltração de neutrófilos no tecido e sua apoptose, a contra regulação de quimiocinas e outras citocinas auxiliam na resolução da inflamação (CHEN *et al.*, 2017).

As citocinas são polipeptídeos ou glicoproteínas extracelulares, hidrossolúveis (revisado por LIN *et al.*, 2000), apresentando papel importante na modulação da resposta inflamatória. As citocinas são liberadas por meio de células imunitárias, incluindo monócitos, macrófagos e linfócitos (revisado por TURNER *et al.*, 2014), agem influenciando a atividade, a diferenciação, a proliferação e a sobrevivência das células do sistema imunológico. Elas também regulam a produção e a atividade de outras citocinas, que podem aumentar (pró-inflamatórias) ou atenuar (anti-inflamatórias) a resposta inflamatória (WOOLF; SALTER, 2000; PENNA; COSTA, 2018). Dessa forma, as citocinas modulam a resposta imune à infecção ou inflamação e regulam a própria inflamação por meio de uma complexa rede de interações. Contudo, a produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias pode acarretar a danos nos tecidos, alterações

hemodinâmicas, falência de órgãos e, ainda, a morte celular (CZAJA, 2014; LIU *et al.*, 2016).

As citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , INF- γ , IL-2, IL-1, IL-6 e outras) são produzidas por muitos tipos de células, principalmente, por macrófagos, mastócitos e linfócitos. Elas apresentam vários papéis na resposta inflamatória, incluindo a ativação do endotélio, expressão de moléculas de superfície em leucócitos e outros aspectos da resposta da fase aguda (MEDZHITOV, 2008). Entre as principais citocinas pró-inflamatórias, está o TNF- α , citocina produzida, principalmente, por monócitos, macrófagos e linfócitos T CD4+ (LIN; CALVANO; LOWRY, 2000). Essa citocina desempenha um papel fundamental para iniciar o processo inflamatório, bem como na regulação da cascata de sinalização de outras citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias e no recrutamento de neutrófilos e monócitos para o sítio de infecção e na sua ativação (RUBIO-PEREZ, 2012; MAYER *et al.*, 2015; KEARNEY; MARTIN, 2017). Após procedimentos cirúrgicos, trauma ou durante as infecções, o TNF- α é um importante mediador envolvido na resposta inflamatória. Ele tem importante papel também em doenças inflamatórias como a artrite reumatoide, a doença de Cronh, e outras doenças inflamatórias intestinais (KEARNEY; MARTIN, 2017). Além disso, exerce papel fundamental na ativação da cascata de coagulação, na estimulação da expressão ou na liberação de moléculas de adesão (PGE2), fator ativador de plaquetas, glicocorticoides e eicosanoides e, ainda influência a apoptose celular (CURFS *et al.*, 1997; ZHANG, 2007).

O INF- γ é outra citocina com significativa participação na inflamação, produzida por linfócitos T CD4+, além de ter sua produção estimulada por células NK e, por isso, possui funções tanto na resposta imune inata quanto na adaptativa. Essa citocina apresenta diversas funções, tais como, a ativação de células endoteliais, a estimulação na atividade das células NK, a indução de MHC I e MHCII, a diferenciação de linfócitos B, a ativação de linfócitos T e macrófagos, entre outros (revisado por VARELLA; FORTE, 2001, CRUVINEL *et al.*, 2010; MEDZHITOV, 2010).

A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória secretada por várias células, como osteoblastos, miócitos, queratinócitos, células β pancreáticas, células endoteliais, monócitos, macrófagos, adipócitos, dentre outras (CAREY *et al.*, 2004). Sua concentração circulante é, regularmente, baixa, porém se eleva em várias condições inflamatórias (TORRES-LEAL, 2012). Já a IL-2 é produzida principalmente por células TCD4+ e em menor quantidade por células TCD8+, que atua estimulando o crescimento e a proliferação de linfócitos T e B. Além disso, ela induz a produção de outras citocinas,

como o IFN- γ e Fator de necrose tumoral beta (TNF- β), o que resulta na ativação de monócitos, neutrófilos e células NK. Assim, a IL-2 contribui para a formação e a propagação da resposta inflamatória crônica e estimulação da apresentação de antígenos (CURFS *et al.*, 1997; RAEBURN *et al.*, 2002; JUNIOR *et al.*, 2010).

Vale destacar que, no processo inflamatório ocorre uma maior produção de EROs e outras ERs, liberados de várias células do sistema imune mediadas/ativadas por citocinas pró-inflamatórias (LATSCHA *et al.* 2001; CRUVINEL *et al.*, 2010; HUSSAIN *et al.*, 2016). Neste sentido, a descoberta do efeito deletério dos ERs sobre as células e a ocorrência com certas doenças, agindo como causador ou agravante (LOBO *et al.*, 2010; GUAN; LAN, 2018; VELLOSA *et al.*, 2021), impulsionou a busca por novas substâncias capazes de prevenir ou minimizar os danos celulares causados pelos ERs e pela inflamação. Neste contexto, a avaliação da produção de diferentes citocinas pró-inflamatórias e ação sobre a proliferação de linfócitos são parâmetros importantes na avaliação de potenciais candidatos a fármacos anti-inflamatórios.

2.3. Os radicais livres e seus efeitos no organismo

Os radicais livres referem-se a espécies químicas constituídas de um átomo ou associação de átomos com existência independente, contendo um ou mais elétrons não emparelhados ou ímpares na orbita externa (HALLIWELL,1994; DREHER; JUNOD, 1996; COTINGUIBA *et al.*, 2013) e, são, portanto, altamente instáveis. Para alcançar sua estabilidade, esses compostos tendem a se ligar a outros componentes celulares, tais como proteínas, lipídios e o ácido desoxirribonucleico (DNA), levando a diversas alterações (SOUZA; FERREIRA, 2007; LUSHCHAK, 2014). Os radicais livres são gerados em sistemas biológicos como resultado do metabolismo aeróbico celular normal ou de reações anormais estimuladas por alguma doença e/ou xenobióticos (SIES, 1986), ocorrendo tanto no citoplasma como nas membranas celulares, mas principalmente, nas mitocôndrias (BARJA, 2007; BARBOSA *et al.*, 2010). A formação de radicais livres pode ocorrer ainda pela via ação catalítica de enzimas, no decorrer de processos de transferência de elétrons que ocorrem no metabolismo celular e pela exposição à fatores exógenos, tais como radiação UV, infecções, estresse e poluição (CERUTTI 1991, 1994; VELLOSA *et al.*, 2021).

Existe várias formas de radicais livres, a maior parte relacionada ao oxigênio, entretanto, há outras origens diversas. Entre as espécies de radicais livres presentes

naturalmente no organismo, podem ser citadas as espécies reativas de oxigênio (ERO), espécies reativas de nitrogênio (ERN) o oxigênio *singlete* ou molecular (O₂), o radical superóxido (O₂⁻), o radical hidroxila (OH⁻), o óxido nítrico (NO), o peroxinitrito (ONOO) e o radical semiquinona (Q) (BIANCHI; ANTUNES, 1999; OLIVEIRA *et al.*, 2009; GUAN; LAN, 2018).

A presença de radicais livres no nosso corpo é essencial para a manutenção das funções vitais, porém, quando em excesso, devido ao desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes, pode levar ao processo denominado estresse oxidativo (SIES, 1993; KRISHNAIAH *et al.*, 2011; GUAN; LAN, 2018). Esta condição de estresse oxidativo pode gerar danos a todos os componentes celulares vitais, como DNA, proteínas e lipídios de membrana, sendo capaz de levar à morte celular (COTINGUIBA *et al.*, 2013; ARULSELVAN *et al.*, 2016). Assim, em concentrações fisiológicas os ERs possuem funções essenciais para o nosso corpo, atuando como mensageiros de sinalização. Em baixas concentrações estão envolvidos na regulação de processos que compreendem a manutenção da homeostase celular e funções como transdução de sinal, expressão gênica e ativação de receptores (RIBEIRO *et al.*, 2005; HUSSAIN *et al.*, 2016).

As principais patologias associadas ao estresse oxidativo são as doenças degenerativas e problemas cardiovasculares, tais como distúrbios do envelhecimento, câncer, aterosclerose, doenças neurodegenerativas, catarata, diabetes, esclerose múltipla, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC); artrite reumatoide, obesidade, doença de Cronh e outras (THANAN *et al.*, 2014; GOUVEIA; LIMA, 2017; GUAN; LAN, 2018; VELLOSA *et al.*, 2021). Ainda, as EROs e ENOs estão relacionadas aos processos de envelhecimento e desenvolvimento de doenças crônico-degenerativas (VALKO *et al.*, 2006; GONÇALVES, 2008; ALVES *et al.*, 2010; SIMAS; GRANZOTI; PORSHC, 2019).

Ademais, os danos oxidativos nas células e tecidos causados pelo excesso dos radicais têm sido associados com problemas pulmonares (JAUREGUI *et al.*, 2007; VELLOSA *et al.*, 2021). De acordo com Andrade Junior *et al.* (2005) o pulmão é um alvo frequente dos EROs, visto que os tecidos entram em contato com o oxigênio por duas vias diferentes, perfusão e ventilação. Segundo esse autor, em casos de tabagismo crônico, DPOC, asma, apneia obstrutiva do sono e síndrome do desconforto respiratório agudo há atuação dos EROs nos danos teciduais. Outra doença associada ao estresse oxidativo é a aterosclerose, onde a produção de EROs e ENOs está associada a liberação de enzimas degradativas, citocinas e fatores de crescimento, além da citotoxicidade direta

do LDL oxidado, que causa mudanças estruturais nas células endoteliais e fibroblastos. Em condições crônicas, esses agentes podem danificar essas células levando ao desenvolvimento de uma lesão aterosclerótica (HESSLER *et al.*, 1983; CATHCART *et al.*, 1985; SILVA; CERCHIARO; HONÓRIO, 2011; VELLOSA *et al.*, 2021).

No sistema imunológico, as ERs exercem um papel fundamental nas ações bactericida, fungicida, virótica, atuando como defesa do organismo na presença destes microrganismos (RAHMAN, 2007). Porém, a exposição a altos níveis de ERs tem um impacto negativo no sistema imunológico (FERREIRA *et al.*, 2018). As bases moleculares para esses efeitos não permanecem claros, mas provavelmente, está relacionado a um desequilíbrio entre papéis dos radicais como tóxicos imunes e seus papéis na comunicação celular.

O processo inflamatório envolve uma rede complexa de eventos de sinalização intracelular, em que participam muitos mediadores químicos e que o dano tecidual associado à inflamação crônica é mediado em parte, pela produção endógena de espécies reativas (KEHRER; KLOTZ, 2015). Assim, no processo inflamatório mediadores inflamatórios são gerados, como citocinas, ácido araquidônico e quimiocinas, que atuam por meio de células inflamatórias ativas na área de infecção e liberam espécies mais reativas (ARULSELVAN *et al.*, 2016).

Acredita-se que a produção de ERs e outros mediadores inflamatórios por células ativadas contribui para os danos que ocorrem, por exemplo, na artrite reumatoide (VELLOSA *et al.*, 2021). O recrutamento subsequente de mais neutrófilos ativados levam à inflamação crônica, degeneração gradual das articulações característica desta doença (DATTA *et al.*, 2014). Dessa forma, as doenças crônicas associadas à maior produção de ERs, resultam do estresse oxidativo e variedade de oxidações de proteínas (HUSSAIN *et al.*, 2016). Além disso, os efeitos de outros mediadores inflamatórios e proteases liberadas são importantes, contribuindo no processo e manutenção das doenças crônico inflamatórias (BOGDAN, 2001; KEHRER; KLOTZ, 2015; FURMAN *et al.*, 2019).

Em decorrência desta relação entre o dano tecidual e a presença de espécies reativas, a utilização de substâncias antioxidantes no intuito de minimizar os efeitos deletérios das EROS, tem sido cada vez mais estudada e recomendada (SKROVANKOVA *et al.*, 2016; GUO *et al.*, 2019).

2.4. Os Antioxidantes

Antioxidante pode ser definido como qualquer substância que, quando presente em concentrações menores comparadas àquela do substrato oxidável, retarda ou previne, significativamente, a oxidação do substrato (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; HALLIWELL, 2006). Deste modo, essas moléculas apresentam uma função importante na regeneração e no reparo dos danos oxidativos (ALVES *et al.*, 2010).

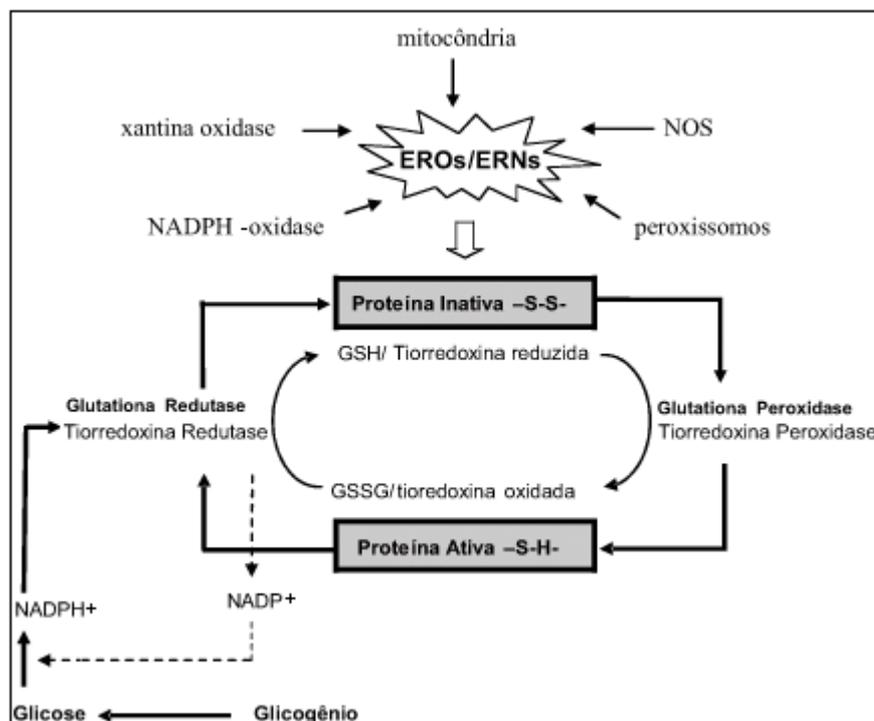
Os antioxidantes podem ter origem endógena ou dietética, em que o sistema antioxidante de origem endógena consiste em um arsenal que pode ser enzimático ou não enzimático (ALVES *et al.*, 2010; VELLOSA *et al.*, 2021). O sistema de defesa enzimático inclui as enzimas superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a Glutathione Peroxidase (GPS) e a glutathione redutase (GR) (MATES *et al.*, 1999; ANDRADE JUNIOR, 2005; VELLOSA *et al.*, 2021). Já o não enzimático inclui os compostos antioxidantes de origem dietética como o alfa-tocoferol (vitamina E), o beta-caroteno (pró-vitamina A), o ácido ascórbico (vitamina C), os antioxidantes tiol (glutathione, tioredoxina e ácido lipóico), a melatonina, os carotenoides e os compostos fenólicos (HALLIWELL *et al.*, 1995; MCCALL; FREI, 1999; PIETTA, 2000; RODRIGO *et al.*, 2007).

A catalase é uma enzima de defesa primária encontrada, principalmente, no peroxissomo das células aeróbicas, mas pode ser encontrada livre no citoplasma e fagolisossomos, sendo eficaz na indução da conversão do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água (H_2O) e oxigênio molecular (O_2) (MATES *et al.*, 1999; ANDRADE-JUNIOR *et al.*, 2015). Essa enzima está relacionada com papel protetor importante contra alguns tumores, como o câncer de pulmão. No estudo realizado com 24 pacientes portadores de câncer de pulmão, a atividade da catalase encontrava-se significativamente diminuída no tecido tumoral em comparação com o pulmão normal (CHUNG-MAN, 2001). Além disso, sua deficiência ou disfunção está relacionada ao aparecimento de doenças, como hipertensão arterial, anemia, câncer, vitiligo, diabetes, doença de Parkinson, doença de Alzheimer (NANDI *et al.*, 2019)

A enzima glutathione peroxidase atua semelhante a catalase, fazendo com que o peróxido de hidrogênio se encontre em baixas concentrações (BARBOSA *et al.*, 2010). O mecanismo de ação da glutathione peroxidase (Figura 3) ocorre por meio da redução do peróxido de hidrogênio e de peróxidos orgânicos em água (H_2O) e oxigênio (O_2) com utilização da glutathione reduzida (GSH), que atua como co-substrato da glutathione peroxidase, tendo propriedade de doador de elétrons, convertendo-se em glutathione oxidada (GSSG) a qual poderá ser regenerada por meio da glutathione redutase – (GR), sendo responsável dessa forma pela recuperação da glutathione reduzida na presença de

nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) (ROVER- JUNIOR; HOEHR; VELASCO, 2001; BARREIROS *et al.*, 2006; BARBOSA *et al.*, 2010; OESTREICHER; MORGAN, 2019). A glutathiona peroxidase pode ser encontrada em duas formas: uma dependente de selênio e a independente de selênio (MATES *et al.*, 1999). Já a enzima superóxido dismutase age catalisando a conversão de ânions superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em oxigênio (O_2) e peróxido de hidrogênio H_2O_2 . Pode ser encontrada no organismo de duas formas: a primeira é encontrada no citoplasma, superóxido dismutase dependente de cobre e zinco, contendo o Cu^{2+} e Zn^{2+} como cofatores, cuja ação não é afetada pelo estresse oxidativo. Já a segunda forma é encontrada na mitocôndria, dependente de manganês (Mn), contendo o Mn^{2+} como centro redox, sua atividade diferente da primeira forma, estando aumentada com o estresse oxidativo (BARREIROS *et al.*, 2006; VELLOSA *et al.*, 2021).

Figura 3 - Efeito do sistema glutathiona/peroxidase na manutenção do estado redox (-SH-) de proteínas intracelulares suscetíveis a oxidação de Espécies reativas de oxigênio (espécies reativas de oxigênio) e ERNs (espécies reativas de nitrogênio).



Legenda: NOS, óxido nítrico sintase; GSH, glutathiona reduzida; GSSG, glutathiona oxidada; $NADPH^+$, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida; $NADP^+$, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidada. Fonte: SILVEIRA *et al.*, (2008)

Dentre os antioxidantes não enzimáticos, a vitamina E, representa uma importante molécula, em que o hidroxil fenólico é a base para a atividade antioxidante desta molécula que pode doar um elétron formando o radical tocoferoxil, sendo esse radical minimamente reativo. O β -caroteno é um precursor da vitamina A e pode eliminar O_2 *in vitro* com eficiência muito alta (BOSIO *et al.*, 2013). Estes particularmente quando consumidos na dieta, representam uma parte importante do sistema antioxidante não-enzimático (STAHL; SIES, 2005). A vitamina C (ácido ascórbico), além de ser o antioxidante solúvel em água mais importante, apresenta papel essencial como cofator enzimático, como para a prolil hidroxilase. Esta atividade de cofator é baseada em sua capacidade de sofrer reações redox, associado com sua capacidade de reagir quimicamente com ERs. Entretanto, a vitamina C também pode funcionar como um pró-oxidante, especialmente na presença de íons de metais de transição, promovendo um efeito contrário das defesas antioxidantes celulares, tendo os níveis fisiológicos ideais ainda incerto (KEHRER; KLOTZ, 2015). Segundo Rodrigo *et al.* (2007), a vitamina C age contra a oxidação e lipídios, proteínas, e DNA com subsequente proteção de sua estrutura e função biológica.

Contudo, dentre todos os compostos antioxidantes não-enzimáticos presentes em plantas e vegetais, os compostos fenólicos, com destaque aos flavonoides são os mais importantes (BIANCHI; ANTUNES, 1999). Os flavonoides possuem capacidade de reduzir a formação e eliminação de ERs (PIETTA, 2000), por meio da capacidade de doação de átomos de hidrogênio aos ERs, inibindo assim, as reações e danos desses radicais (BIANCHI, 1999).

Ademais, os flavonoides podem apresentar efeitos anti-inflamatórios, visto que, são capazes de atenuar o processo inflamatório por meio de diferentes vias de sinalização (CHEN *et al.*, 2018). De acordo com Hussain *et al.* (2016) os polifenóis atuam através da eliminação de radicais livres, regulação das atividades de células inflamatórias, modulação das atividades das enzimas fosfolipase A2 e COX e metabolismo da arginina (iNOS) e modulação da produção de moléculas pró-inflamatórias. Dessa forma, os flavonoides exercem papel importante, uma vez que, o estresse oxidativo promove a ativação de mediadores inflamatórios envolvidos em doenças crônicas associadas a inflamação.

Ebegboni *et al.* (2019) demonstraram a eficácia dos flavonoides contra a presença de EROs, ao protegerem células trofoblásticas contra o estresse oxidativo induzido por fumaça de cigarro. Neste contexto, vários estudos têm demonstrado a ação de extratos

provenientes de plantas medicinais no combate ao estresse oxidativo e no processo inflamatório. Esses estudos sugerem que os efeitos terapêuticos envolvem ações antioxidantes e imunomoduladoras tais como, a redução de citocinas pró-inflamatórias (IL-2, TNF- α e IFN- γ) e a expressão e/ou atividade de enzimas (COX-2, iNOS e outras) (AVELAR *et al.*, 2011; ALMEIDA, 2012; LEE *et al.* 2012; AVELAR-FREITAS *et al.*, 2013; HELLINGER *et al.*, 2013).

Desta forma, a investigação de atividades biológicas a partir de extratos de plantas medicinais consiste em uma importante estratégia para a identificação de substâncias que podem fornecer novos fármacos antioxidantes e anti-inflamatórios.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Investigar as atividades antioxidante e anti-inflamatória de extratos etanólicos brutos de diferentes partes da espécie *Miconia ferruginata* DC.

3.2. Objetivos específicos

- Obter extratos etanólicos das folhas, inflorescência, casca e caule da espécie *M. ferruginata*.
- Determinar a concentração de compostos fenólicos dos extratos.
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* dos extratos.
- Determinar a toxicidade dos extratos em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) humano.
- Avaliar o efeito dos extratos sobre a proliferação de linfócitos e de suas subpopulações T CD4+ e T CD8+ em PBMC.
- Avaliar o efeito dos extratos sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias em PBMC.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Reagentes

Ácido clorídrico – ISO FAR®; Ácido Gálico – IMPEX; Álcool etílico (Etanol) P.A – PROQUIMIOS®; Álcool metílico P.A (Metanol) – VETEC®; Azul de Tripán (Sigma®); Brefeldina a obtida de *Penicillium Brefeldianum* (Sigma®); ®; Anticorpo IL-2 HU APC 250 UG (BD Pharmingem); Anticorpo INF -G HU/PNH APC 4S.B3 50T(BD Pharmingem); HU Anti- TNF Alexa 700 MAB 11; Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) – SIGMA®; Carbonato de Sódio P.A – DINÂMICA®; Ciclosporina Sandimmun®, 50mg/mL, injetável, Novartis Biociências S. A., Indústria Brasileira); Cloreto de amônio – DINÂMICA®; Cloreto de cádmio (Proquimios®); Cloreto de Sódio (Vetec®); coquetel de antibióticos (penicilina G 100 UI/mL e Estreptomicina 100 µg/mL) – (Sigma®); Dimetilsulfóxido P.A (DMSO) – VETEC®; 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) – SIGMA-ALDRICH®; Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM); Fosfato de Potássio dibásico – VETEC®; Fosfato de Potássio monobásico P.A– VETEC®; Fosfato de Sódio bibásico– DINÂMICA®; Fosfato de Sódio monobásico– CINÉTICA®; Hipoclorito de Sódio 2,0 a 2,5% p/v – SANTA CLARA®; Ionomicina Cálcica (Sigma®); SFB inativado (Gibco®); Ficoll-Histopaque 1077 (Sigma®); L-glutamina - Sigma, St. Louis, EUA; 1-2 Miristrato 13- acetato de forbol (Sigma- Aldrich); Soro fetal bovino (SFB) - Gibco, Invitrogen Corporation; Paclitaxel (Quiral Química®); Persulfato de Potássio – VETEC – RPMI-1640 (Sigma®)

4.1.1. Equipamentos

Balança analítica (Bioprecisa®, modelo JA3003N); Banho-maria (Fanen LTDA®, modelo 102); Capela de fluxo laminar (Veco®, modelo BIO SEG 12) e (Airstream®, Esco, Class II BSC); Centrifuga (Thermo®, modelo Heraeus Megafuge 16 R); Citômetro de fluxo (FACScan® - Becton-Dickinson); Estufa Incubadora com demanda bioquímica de Oxigênio (B. O. D.) (Solab® Científica, SL 200/364); Espectrofotômetro leitor de microplacas modelo molecular Devices/ Spectra Max 190 (Spectramax®); Espectrofotromêtro Multiskan GO; Microscópio óptico (Olympus®, modelo CX 41); Microscópio Invertido (Medilux®, modelo MDL 150 TAI); Microscópio confocal

modelo zeiss; PHmetro (Hanna® Instrumentos, modelo HI 3221 pH/ORP/ISE Meter); Vortex (Phoenix Lufarco® , modelo AP-56).

4.2. Protocolos Experimentais

4.2.1. Obtenção do material vegetal e preparo dos extratos vegetais

Os extratos utilizados fazem parte da extratoteca do Laboratório de Doenças Parasitárias/UFVJM e foram preparados pela Ms. Poliana Ribeiro Barroso. O material coletado foi georeferenciado e o voucher foi depositado no Herbário Dendrológico Jeanine Felfili (HDJF) da UFVJM, sob o número de registro HDJF2405. A identificação foi realizada por Dr. Evandro Luiz Mendonça Machado, curador do HDJF. A autorização para coleta de plantas foi emitida pelo Ministério do Meio Ambiente (número de registro 64300-13) e o acesso ao patrimônio genético pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN AACD7CF/2018).

Os procedimentos de obtenção do material vegetal e preparo dos extratos foi realizado no Laboratório de Química Orgânica e Produtos Naturais do departamento de Farmácia da UFVJM. O material vegetal foi estabilizado e seco em estufa de ar circulante (Biopar® S480AT) a aproximadamente 40 °C, por 14 dias, segregado em folhas, caule, inflorescências e casca, posteriormente, pulverizado com auxílio de moinho de facas (Marconi® MA580) e, armazenados em sacos plásticos, em local fresco, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Os materiais pulverizados de cada parte foram submetidos à extração por maceração, utilizando-se como solvente extrator o etanol 96%, na razão 1:10 p/v (planta: solvente). Os extratos etanólicos foram concentrados em evaporador rotativo (Fisaton® 801) e, transferidos para frascos previamente tarados, para secagem final em temperatura ambiente ($20 \pm 4^\circ\text{C}$), em dessecador com vácuo onde ficaram armazenados durante todo o procedimento experimental. Os novos extratos foram submetidos a ensaios de triagem prévia para confirmação das atividades anti-inflamatória e antioxidante, uma vez que alterações nos constituintes químicos decorrentes de alterações sazonais são possíveis.

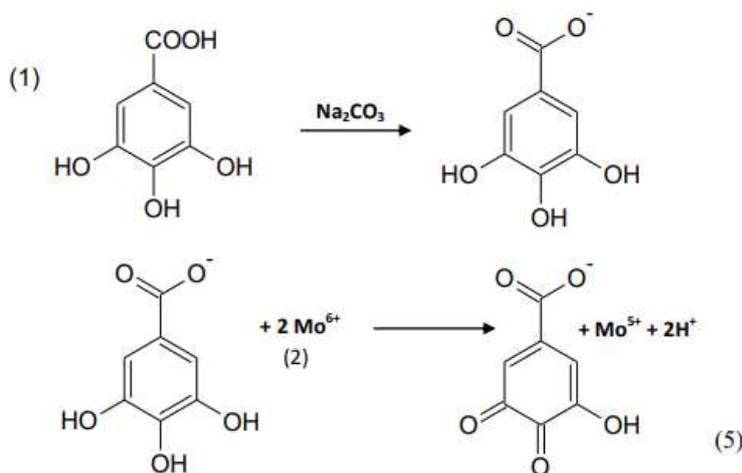
Para a utilização nos ensaios biológicos, os extratos da *Miconia ferruginata* foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO), na concentração de 10 mg/mL para o extrato de Folha e 3,33 mg/mL para os extratos de Caule, Inflorescência e Casca. As alíquotas dos extratos foram mantidas a -20°C e descongeladas a temperatura ambiente no

momento do uso. As concentrações foram definidas de acordo com estudos prévios de toxicidade dos extratos em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) humano.

4.2.2. Determinação da concentração de compostos fenólicos totais dos extratos de *Miconia ferruginata*

Nesta avaliação foi usada o método de Folin-Ciocalteu, segundo Singleton e colaboradores em 1965. A composição química deste reagente inclui o ácido fosfotúngstico ($H_3PW_{12}O_{40}$) e ácido fosfomolibdídico ($H_3PMo_{12}O_{40}$), que na presença de certos agentes redutores como os compostos fenólicos, como o ácido gálico (AG) formam os chamados complexos molibdênio-tungstênio azuis $[(PMoW_{11}O_4)^4]$, nos quais a média do estado de oxidação dos metais está entre 5 e 6 (reação 5) (Figura 4) a qual intensidade de coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras (SINGLETON *et al.*, 1999; HUANG *et al.*, 2005).

Figura 4- Esquema de Reação do AG



Legenda: Esquema de Reação do AG (1) com o Molibidênio (2), componente do reagente de Folin-Ciocalteu. Fonte: LIMA, (2016)

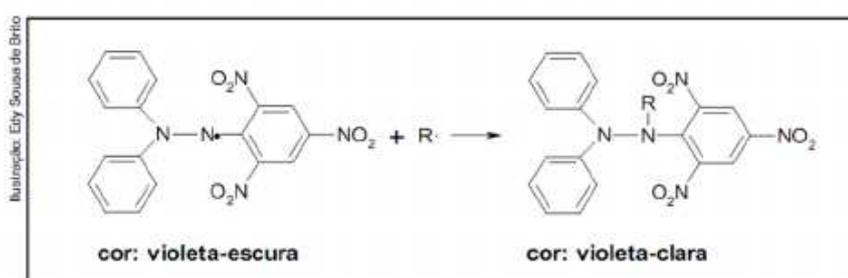
Foram pipetados 12,5 μ L de cada concentração dos extratos de folha, caule, inflorescência e casca, nas concentrações de 50 a 750 μ g/mL, 12,5 μ L do reagente Folin-Ciocalteu e 100 μ L de água Milli-Q (pH= 7,0) em cada poço da microplaca de 96 poços. A placa foi submetida à agitação de 60 segundos e depois a um repouso de 5 minutos. Em seguida, acrescentou-se 125 μ L de carbonato de sódio 1M obtendo um volume final de

250 μL por poço e a microplaca foi mantida em incubação por 90 minutos em temperatura ambiente, ao abrigo da luz. A leitura da absorbância foi realizada em 750 nm em leitor de microplacas (Spectramax®, marca), utilizando o metanol como branco (SINGLETON e ROSSI, 1965). No mesmo ensaio, foi confeccionada uma curva de calibração com o padrão AG nas concentrações de 50 a 750 $\mu\text{g/mL}$. As absorbâncias obtidas para os extratos foram convertidas em concentrações de AG, calculadas a partir da equação da reta obtida na curva de calibração. Os resultados foram expressos em equivalentes de AG por grama de extrato (EAG/ g de extrato).

4.2.3. Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* dos extratos de *Miconia ferruginata*

Vários métodos são utilizados para determinar a atividade antioxidante em extratos e substâncias isoladas; um dos mais usados consiste em avaliar a capacidade sequestradora do radical livre 2,2- difenil-1picril-hidrazila (DPPH•) (SUCUPIRA *et al.*, 2012). O radical DPPH•, de coloração púrpura apresenta absorção máxima a 515 nm, que por ação de um antioxidante ou uma espécie radicalar (R•), reduz o DPPH• formando o 2,2-difenilpicril-hidrazina (DPPH-H), de coloração amarela, com consequente decréscimo da absorbância em 515 nm em meio alcoólico (Figura 5).

Figura 5 - Reação de captura do radical livre DPPH



Legenda: Reação de captura do DPPH*. Fonte: SANTOS *et al.*, (2011)

Para a preparação da solução DPPH foram dissolvidos 0,0024g do reagente DPPH em metanol (concentração final de DPPH: 60 μM) e aferiu-se o volume em um balão volumétrico de 100 mL. O preparo da solução foi realizado apenas no dia do experimento sendo armazenada ao abrigo da luz até o momento de sua utilização. As soluções dos extratos foram diluídas em metanol nas concentrações de 50, 100, 250, 500 e 750 $\mu\text{g/mL}$.

Em uma microplaca de 96 poços foram adicionados 244 μL de DPPH• 60 μM , em ambiente escuro e em seguida foi adicionado uma alíquota de 6 μL de cada diluição dos extratos e do padrão AG, obtendo um volume final de 250 μL . Foi realizado um controle contendo somente o reagente DPPH• e um branco com metanol. A placa foi mantida à temperatura ambiente e ao abrigo da luz por um período de 30 minutos, em seguida foi realizada leitura das absorvâncias a 515 nm em leitor de microplacas (Multileitura Spectramax® Paradigma). Os resultados das absorvâncias foram convertidos em porcentagem de inibição através da equação 1 e foi calculada a Concentração Eficiente para captura de 50% do radical (CE_{50}).

$$\text{Inibição (\%)} = (\text{Ac} - \text{Aam}) / \text{Ac} \times 100 \text{ (Eq. 1)}$$

Onde Ac é a Absorvância de Controle com DPPH;

Aam é a Absorvância dos extratos.

4.2.4. Obtenção das Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMC) humano

A avaliação da atividade anti-inflamatória e toxicidade dos extratos de *M. ferruginata*, foi realizada por meio da utilização das células mononucleares do sangue periférico (PBMC) obtidas de sangue humano. Foram recrutados voluntários, de ambos os sexos, com idades entre 20 a 39 anos e que declararam não apresentar doença infecciosa ou crônica não transmissíveis, auto-imune, crônica não transmissível ou de hipersensibilidade. Além disso, foi também critério de inclusão não ter usado medicamentos com ação anti-inflamatória em até cinco dias antes da coleta. Os participantes foram informados sobre os objetivos e benefícios da pesquisa e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo A). A coleta de sangue seguiu todas as recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS) e após o procedimento experimental, o material foi devidamente descartado. O projeto foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), número do parecer nº 2.931.933 (Anexo B).

No ensaio, 20 mL de sangue periférico venoso coletados em tubos a vácuo contendo heparina (Vacutainer, Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA) foram diluídos na proporção 1:1 em Tampão Fosfato de Salina (PBS) (NaCl 1,50 M; Na_2HPO_4 0,08M; NaH_2PO_4 0,02M, pH 7,20-7,40). As PBMC foram obtidas por meio de gradiente de

densidade durante centrifugação (400 g, 21°C, 30 min) com Ficoll-Histopaque 1077, conforme descrito por Bicalho *et al.* (1981) e, lavadas duas vezes em PBS (250 g, 4°C, 15 min). Em seguida, as PBMC foram ressuspensas em 1 mL de RPMI suplementado (10% SFB, 1% L-glutamina 2mM; 1% coquetel de antibióticos - penicilina G 100 ug/mL e estreptomicina 100 µg/mL). As PBMC foram contadas em câmara de Neubauer e ajustadas em PBS ou RPMI completo na concentração de 1×10^7 PBMC/mL.

4.2.5. Avaliação da viabilidade celular em culturas tratadas com extrato de *Miconia ferruginata*

A avaliação da toxicidade dos extratos de *M. ferruginata* e determinação das concentrações a serem utilizadas no ensaio de atividade anti-inflamatória foi realizada pela determinação de viabilidade em PBMC por meio da técnica de exclusão com Azul de Tripán, nos tempos de quatro e 120 horas. Uma suspensão de 5×10^5 PBMC (n=6), obtidas de voluntários saudáveis, foram tratadas com diferentes concentrações dos extratos brutos e incubadas a 37 °C com 5% de CO₂. No tempo de quatro horas e 120 horas, as concentrações testadas foram de 120 µg/mL, 60 µg/mL e 30 µg/mL para os extratos de folhas e 40 µg/mL, 20 µg/mL e 10 µg/mL para os extratos de caule, inflorescência e casca. As concentrações utilizadas foram definidas de acordo com estudos prévios do laboratório e resultados preliminares. Os controles do experimento incluíram: controle negativo contendo somente meio RPMI; um controle positivo com cloreto de Cádmio (CdCl₂) 2mg/mL; e um controle do solvente com DMSO a 0,6% e 1,2%.

Ao fim dos períodos de incubação as células foram lavadas com PBS, transferidas para tubos de poliestireno (Falcon 2059, Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA) seguido de centrifugação (240g, 7 min, 18°C). O sobrenadante foi descartado e 10 µL suspensão celular foram incubados com 190 µL da solução de Azul de Tripán (0,4%) e o percentual de células viáveis dentre as células totais foi determinado utilizando câmara de Neubauer em microscópio óptico (Olympus®, modelo CX 41).

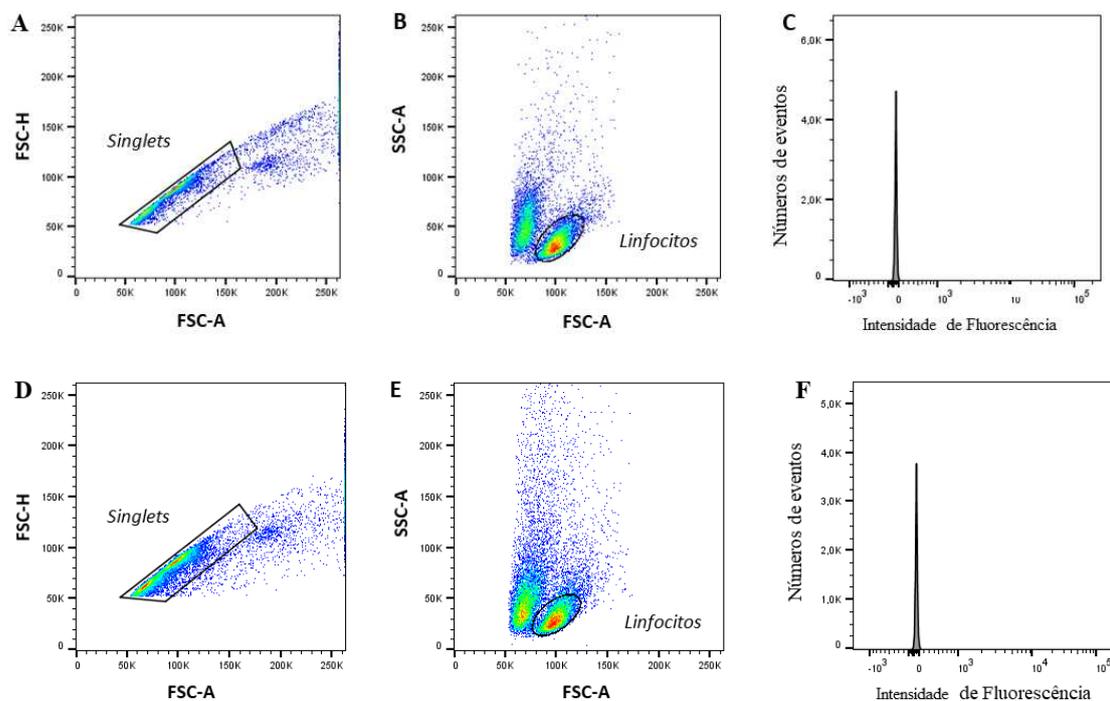
4.2.6 Atividade sobre elementos da resposta imune dos extratos de *Miconia ferruginata*

4.2.6. Análise da emissão de fluorescência por células tratadas com extrato de *Miconia ferruginata*

A citometria de fluxo foi escolhida para avaliar a atividade anti-inflamatória dos extratos brutos de folha, caule, inflorescência e casca de *M. ferruginata* sobre PBMC humanas. Assim, torna-se necessário avaliar se esses extratos, bem como o solvente DMSO, seriam capazes de emitirem fluorescência nos canais de detecção usados do citômetro de fluxo (BD FACSCanto II®, - Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA), e assim determinar quais marcadores fluorescentes poderão ser usados nas análises de proliferação de linfócitos e produção de citocinas. Assim, uma suspensão de 5×10^5 PBMC, obtidas de voluntários saudáveis (n=5) foram tratadas com os extratos brutos de folhas nas concentrações de 120 µg/mL, 60 µg/mL e 30 µg/mL, e de caule, inflorescência e casca nas concentrações de 40 µg/mL, 20 µg/mL e 10 µg/mL no tempo de quatro horas e 120 horas. Os controles experimentais incluíram: um controle negativo contendo somente meio RPMI; um controle positivo com cloreto de Cádmio (CdCl_2) 2mg/mL; e um controle solvente com DMSO 0,6% e 1,2%. As culturas foram incubadas por 4 e 120 horas, a 37 °C em estufa com 5% de CO_2 .

Após incubação, as PBMC foram transferidas para tubos poliestireno e lavadas duas vezes com PBS gelado (240g, 18°C, 7 min). Os dados foram adquiridos em citômetro de fluxo (BD FACSCanto II® - Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA) com aquisição de 10000 eventos por cultura (BRITO-MELO et al., 2006), utilizando o software BD FACSDiva versão 6.0, e a análise dos dados foi realizada no software FlowJo 10.0.7. A estratégia de análise consistiu em um gráfico de distribuição pontual de FSC-A versus FSC-H, para exclusão dos “doublets” celulares, localizados fora da região P1 (Figura 6A e 6D). Posteriormente, foi realizada a seleção da população de linfócitos em gráficos de distribuição pontual de FSC-A versus SSC-A (Figura 6B e 6E.). A emissão de fluorescência pelas células tratadas foi analisada em histogramas de intensidade de fluorescência para cada um dos oito canais disponíveis no citômetro em função do número de eventos (Figura 6C e 6F). A presença de fluorescência contaminante induzida pelos extratos (Figura 6F) foi avaliada pelo deslocamento do pico de fluorescência para a direita, em relação ao pico de fluorescência da cultura não tratada (Figura 6C).

Figura 6 - Estratégia de análise por citometria de fluxo da emissão de fluorescência das PBMC tratadas com os extratos de *Miconia ferruginata*



A e D – Seleção dos *singlets* celulares das culturas controle; B e E – Seleção da população linfocitária; C e F – Histogramas da emissão de fluorescência verde (485 – 535 nm) após excitação do laser violeta.

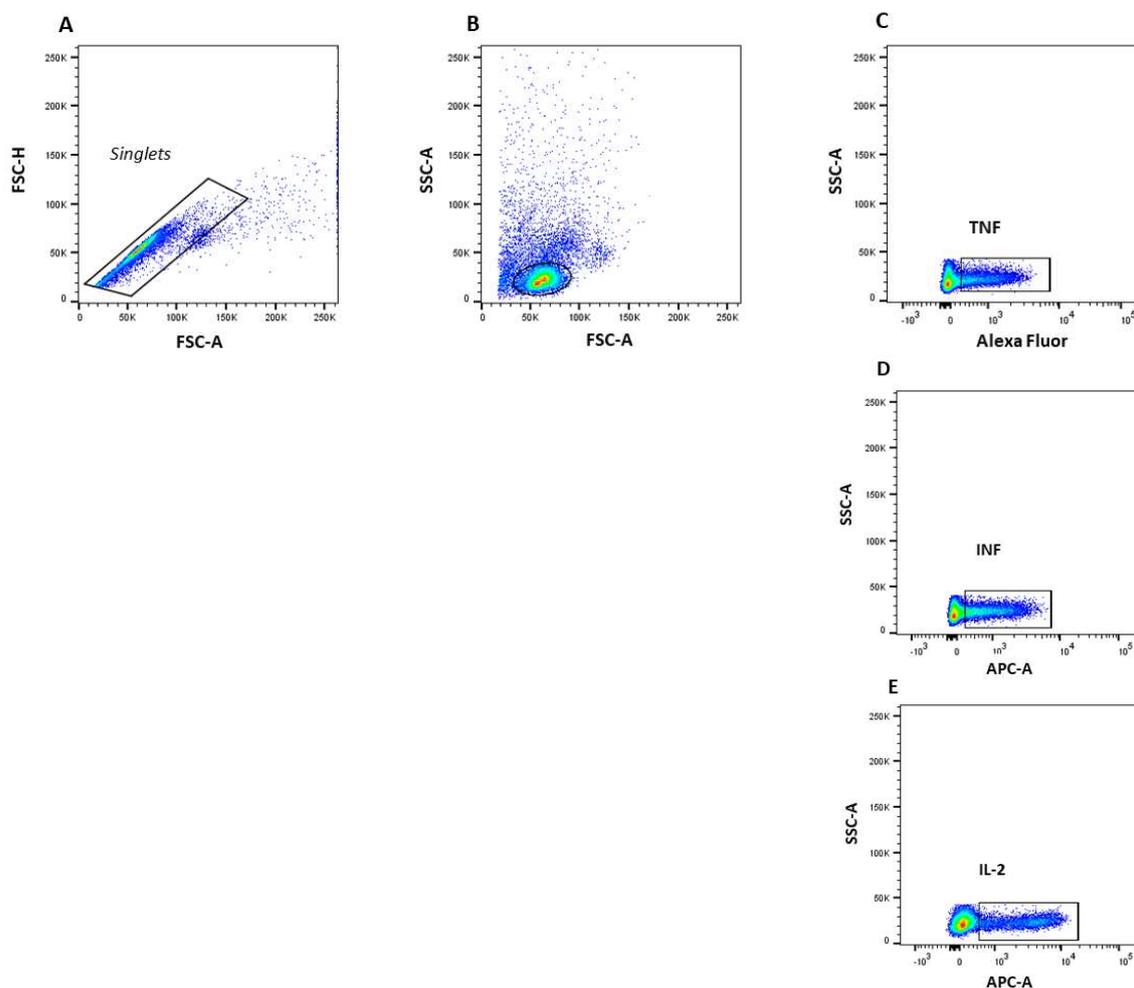
4.2.7. Efeito dos extratos de *Miconia ferruginata* sobre a produção de citocinas por linfócitos humanos

As concentrações de Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), Interleucina 2 (IL-2), e Interferon gama (INF- γ) foi realizada utilizando citometria de fluxo, com marcação por anticorpos específicos, segundo protocolo do fabricante. Para isso, uma suspensão de 5×10^5 PBMC/mL, obtidas de voluntários saudáveis (n= 4) foram tratadas com os extratos brutos de folhas nas concentrações 120 μ g/mL e de caule, inflorescência e casca nas concentrações 40 μ g/mL de *M. ferruginata*. As culturas foram estimuladas ou não com Miristato Acetato de Forbol (PMA) 25 ng/mL e Ionomicina a 1 ng/mL, além da adição de brefeldina a 1mg/mL, e incubadas a 37 °C com 5% de CO₂, por quatro horas. Os controles do experimento incluíram: um controle negativo para produção de citocinas

estimulado ou não estimulado; um controle positivo com o fármaco padrão ciclosporina 5µg/mL; e um controle do solvente com DMSO 1,2 %. Após o período de incubação as células foram lavadas duas vezes com PBW (PBS contendo 0,5% de BSA, 0,1% de azida sódica, pH 7,2-7,4) (240 g, 7 min, 18°C), o sobrenadante foi descartado e as suspensões celulares foram homogeneizadas. Em seguida, foram adicionados aos tubos, PBS- W e paraformaldeído a 4% (paraformaldeído 4%, NaOH 2,65mM, pH 7,2-7,4). A suspensão foi incubada à 4° C por 15 min, posteriormente as células foram permeabilizadas com PBS-P (Tampão Fosfato Salina Permeabilization) (PBS-P contendo 0,5% de BSA, 0,1% de azida sódica e 0,5% de saponina, pH 7,2-7,4) e centrifugadas (250 g, 7 min, 18°C), o sobrenadante foi descartado e as suspensões celulares foram homogeneizadas e distribuídas em tubos contendo anticorpos monoclonais, para IL-2 conjugada com o fluorocromo APC (aloficocianina; clone MQ1-17H12, BD Pharmingen), TNF- α conjugado com o fluorocromo Alexa Fluor e, INF- γ conjugado com o fluorocromo APC (aloficocianina; clone MQ1-17H12, BD Pharmingen). Foram confeccionadas as mesmas culturas para controles sem estímulo e tratamento. Após incubação por 30 minutos, à 4°C e ao abrigo da luz, as PBMC foram lavadas com PBS-W (250 g, 7 min, 18°C) e, em seguida foi avaliada a produção de citocinas por citometria de fluxo (FACSCANTO II - Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA), com aquisição de 30000 eventos (BRITOMELO et al., 2006). Para análise dos dados foi utilizado o programa FACSDIVA (Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA).

A análise de dados foi realizada utilizando o software Flow Jo versão 10.0.6. Inicialmente, foram gerados gráficos bidimensionais de distribuição pontual FSC-H versus FSC-A, nos quais foi delimitada uma região correspondente aos *singlets* celulares (Figura 7A). A partir dos eventos dessa região, foram gerados novos gráficos de complexidade interna (SSC-A) em função do tamanho celular (FSC-A), em que foram delimitados os eventos referentes aos linfócitos (Figura 7B). Para determinar o perfil de produção de citocinas de linfócitos totais para cada uma das citocinas avaliadas, foram obtidos gráficos de distribuição pontual de fluorescência para Alexa Fluor (conjugado anti-TNF- α), APC (conjugado ao anti-IFN- γ), ou APC (conjugado ao anti-IL-2) versus SSC-A (Figura 7C; 7D e 7E).

Figura 7- Sequência de procedimentos utilizados para a análise do perfil de produção de citocinas por linfócitos.



A – Seleção dos *singlets* celulares das culturas; B – Seleção da população linfocitária; C, D e E– gráficos de fluorescência para Alexa Fluor ou APC x SSA-A, foram gerados para avaliar a produção de citocinas em linfócitos.

4.2.8. Efeito dos extratos de *Miconia ferruginata* sobre proliferação de linfócitos humanos

Foi utilizada a técnica de incorporação e decaimento da fluorescência do BD Horizon Violet Proliferation Dye 450 (VPD450) para avaliação do efeito dos extratos da planta sobre a proliferação de linfócitos humanos. Uma suspensão de 1×10^7 PBMC/mL, obtidas de voluntários saudáveis (n=8) foram suspensas em PBS (NaCl 1,50 M; Na_2HPO_4 0,08M; NaH_2PO_4 0,02M, pH 7,20-7,40) e incubadas por 15 minutos no banho-maria a

37° C. Em seguida, lavou-se as suspensões celulares por centrifugação (500g, 10 min, 18°C), e o sobrenadante descartado. Foi adicionado 10mL de RPMI suplementado, seguida de nova centrifugação (500g, 10 min, 18°C), o sobrenadante foi descartado e as PBMC marcadas com VPD450 foram suspendidas em RPMI suplementado.

Para avaliar o efeito dos extratos brutos de *M. ferruginata* sobre a resposta proliferativa de linfócitos, 5×10^5 PBMC/mL foram incubadas em RPMI suplementado com ou sem estímulo de mitógeno fitohemaglutinina (PHA) (Sigma Aldrich) 5 mg/mL. As concentrações avaliadas foram de 120 µg/mL para o extrato de folha e de 39,9 µg/mL para o extrato de caule, inflorescência e casca. Os controles experimentais incluíram: um controle negativo contendo somente meio RPMI com ou sem estímulo; um controle positivo com o fármaco Ciclosporina A (CSA) 5µg/mL; e um controle solvente com DMSO (0,6% v/v), essa porcentagem corresponde a quantidade de DMSO presente na maior concentração do extrato. As células foram incubadas por 120 h, a 37 °C em estufa com 5% de CO₂. Em todos os experimentos foram realizados teste de marcação do VPD450 antes da montagem das culturas. Após incubação, as PBMC foram transferidas para tubos poliestireno e lavadas duas vezes com PBS gelado, por centrifugação (240g, 18°C, 7 min). As suspensões celulares foram divididas em duas alíquotas: uma utilizada para avaliação da viabilidade celular pela técnica de exclusão com azul de Tripán 0,4%, por meio da contagem em câmara de Neubauer e a outra usada para avaliação do efeito dos extratos na proliferação de linfócitos.

Com a finalidade de identificar as subpopulações linfocitárias foi adicionada às PBMC os anticorpos: CD4 conjugado com o fluorocromo APC-Cy7(aloficocianina combinada a cianina Cy7; Clone SK3, BD Biosciences) e anti CD8- conjugado com o fluorocromo FITC (isotiocianato de fluorescência; clone UCHT1, Biolegend). Após a incubação de 20 min a temperatura ambiente e ao abrigo da Luz, as PBMC foram lavadas com PBS e realizou-se a análise de proliferação celular pela medida do decaimento da fluorescência do VPD450 através de citometria de fluxo (FACSCANTO II – BectonDickinson, San Jose, CA, EUA), com aquisição de 50.000 eventos por tubo., respectivamente usando o *software* FACSDIVA versão 6.1.3.

A análise dos dados foi realizada utilizando o *software* FlowJo versão 10.0.6. Em gráficos de distribuição pontual de tamanho celular em altura (FSC-H) versus o tamanho celular em área (FSC-A), selecionou-se a região dos *singlets* celulares para culturas estimuladas e não estimuladas (Figura 8A-D). Em outro gráfico correspondente aos *singlets*, por meio dos parâmetros complexidade interna celular em área (SSC-A) versus

tamanho celular em área (FSC-A), a população de linfócitos para culturas estimuladas e não estimuladas (Figura 8B e 8E, respectivamente). O marcador M1 foi definido como o pico de células que não proliferaram na análise de linfócitos em função da fluorescência para VPD450 em culturas sem estímulo (Figura 8C).

As subpopulações linfocitárias foram analisadas em gráficos de distribuição pontual de fluorescência para APC-Cy7 (anti-CD4) ou para FITC (antiCD8) (Figura 8H e 8I). Em seguida, os linfócitos e suas subpopulações T CD4+ e T CD8+ foram analisados para intensidade de fluorescência do VPD450 utilizando-se histogramas do número de eventos em função da fluorescência para VPD450 (Figura 8J e 8H).

Nestes gráficos, a região M1 foi definida como células marcadas com VPD450 derivadas do grupo controle negativo e os picos de M2 a M8 foram definidos de acordo com picos de diferentes intensidades de VPD450 em culturas estimuladas com PHA na presença dos extratos testados. O índice de proliferação foi calculado por meio do percentual de células viáveis nas regiões M1 a M8 das culturas celulares através da seguinte equação (1):

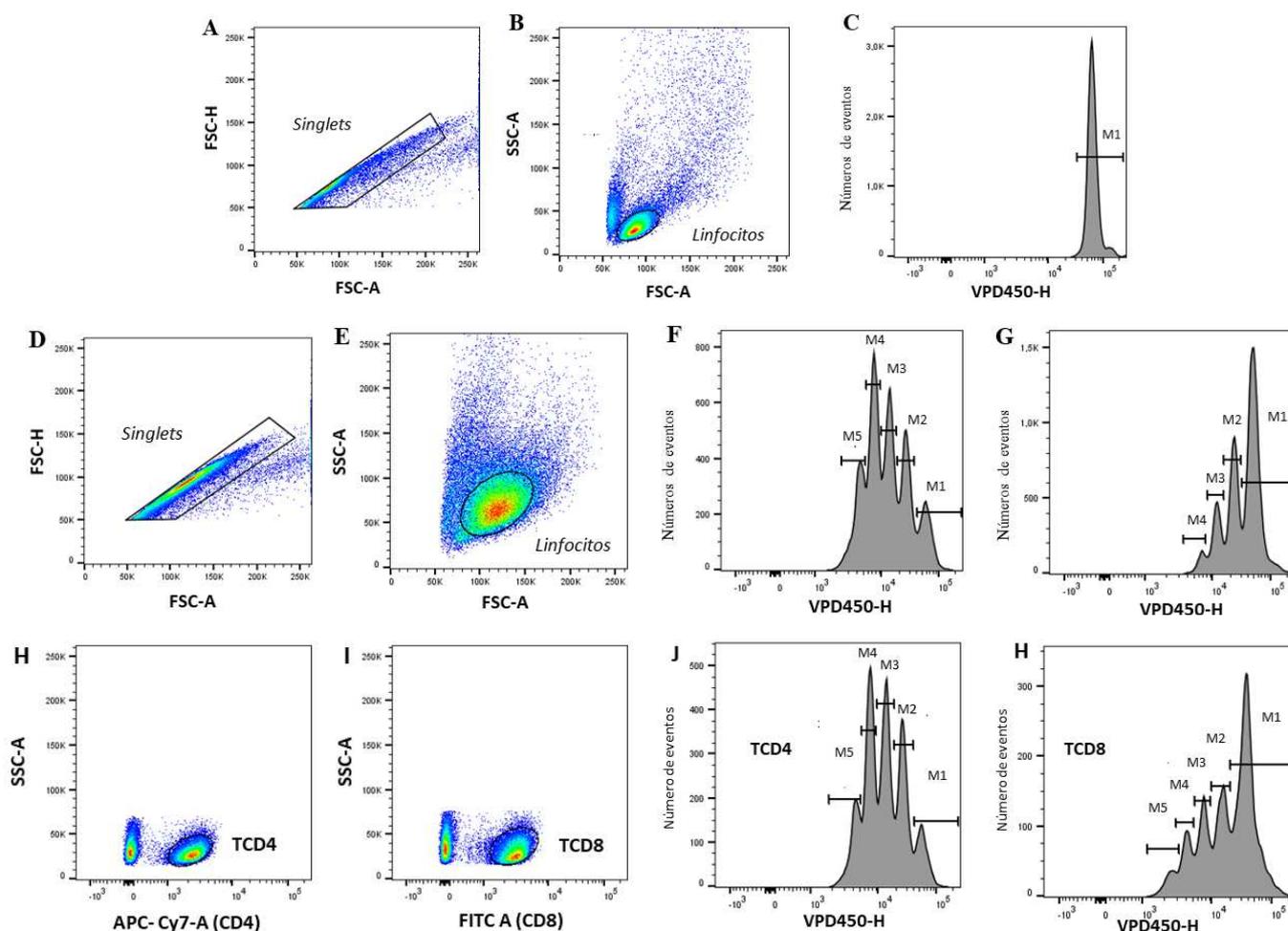
Em que,

$$IP = \frac{100 - Y}{Y}$$

$$Y(x) = X_0 + \frac{X_1}{2} + \frac{X_2}{4} + \frac{X_3}{8} + \frac{X_4}{16} + \frac{X_5}{32}$$

Sendo X0 a porcentagem de células que não se dividiram (localizadas em M1), e X1 a X8 os picos de divisão gradual (localizados de M2 a M8) (ÂNGULO; FULCHER, 1998).

Figura 8– Estratégia de análise utilizados para avaliação da proliferação celular pelo decaimento da fluorescência do VPD450



A e D - Gráfico de distribuição pontual (FSC-H x FSC-A) para seleção dos *singlets* celulares para culturas não estimuladas e estimuladas, respectivamente; B e E - Gráficos de distribuição pontual (SSC-A x FSC-A) para a seleção da população de linfócitos das culturas não estimuladas e estimuladas respectivamente; H e J - Gráficos de distribuição pontual (SSA-H x APC-Cy7) para selecionar as células TCD4+ e (SSA-H x FITC) para selecionar as células TCD8+; C e F - Histogramas de eventos x VPD450, para definir os marcadores M1 em culturas controle, ou M2 a M5 em culturas estimuladas com PHA. G - Histograma com cultura estimulada com PHA e tratada com extrato etanólico de *Miconia ferruginata*.

4.2.9. Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão e as análises foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego,

CA, EUA). As diferenças entre as variáveis com distribuição normal foram testadas utilizando ANOVA one-way com Post Hoc de Tukey. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

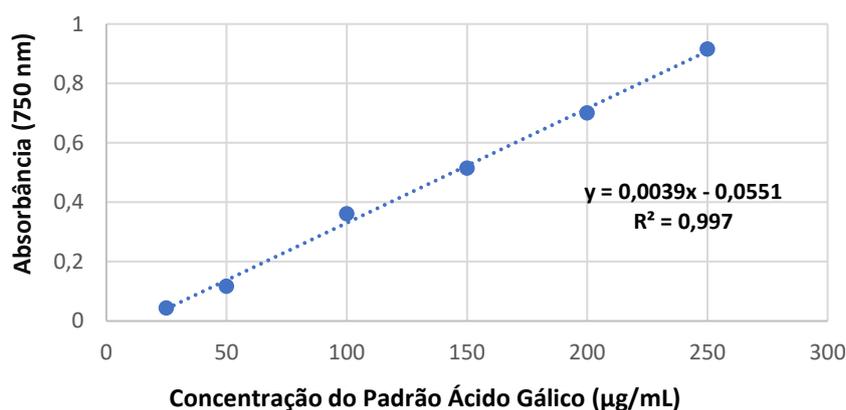
5. RESULTADOS

5.1. Avaliação do potencial antioxidante in vitro de *Miconia ferruginata*

5.1.1. Determinação da concentração de compostos fenólicos totais dos extratos de *Miconia ferruginata*

A primeira etapa na determinação da concentração dos compostos fenólicos nos extratos de partes da *M. ferruginata* foi a obtenção da curva de calibração a partir de diferentes concentrações do padrão Ácido Gálico representada na figura 9.

Figura 9 - Curva de calibração do padrão ácido gálico (AG) para determinação de compostos fenólicos totais



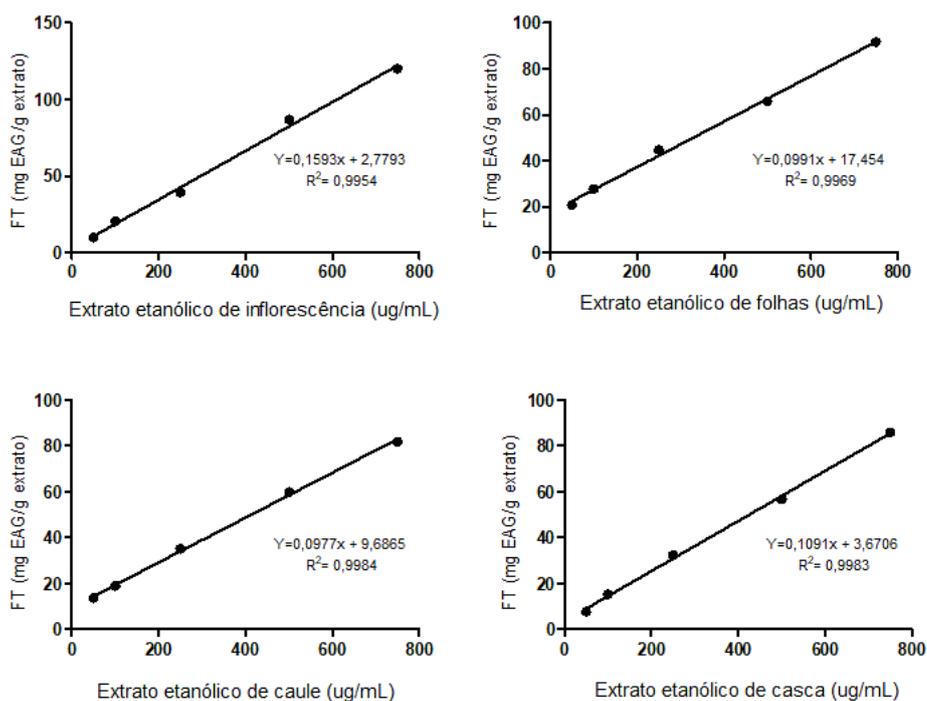
Curva analítica do padrão ácido gálico (n=3)

A partir da obtenção da equação de regressão linear da curva, os teores de compostos fenólicos totais dos extratos brutos de *M. ferruginata*, foram calculados a partir da substituição dos valores das absorbâncias das amostras na variável Y. Os resultados foram apresentados em miligramas de fenólicos totais equivalentes de AG por grama do extrato (EAG/g) e são mostrados na figura 10 e 11.

Os dados obtidos para avaliação da concentração de teor de compostos fenólicos totais em diferentes concentrações dos extratos estão contidos no gráfico 10 e mostram uma adequada capacidade de detecção dos compostos fenólicos nestas amostras, contudo

para comparação isolada de diferentes amostras o ideal é realizar a dosagem em amostras com concentrações superiores a 500ug/mL (Apêndice A).

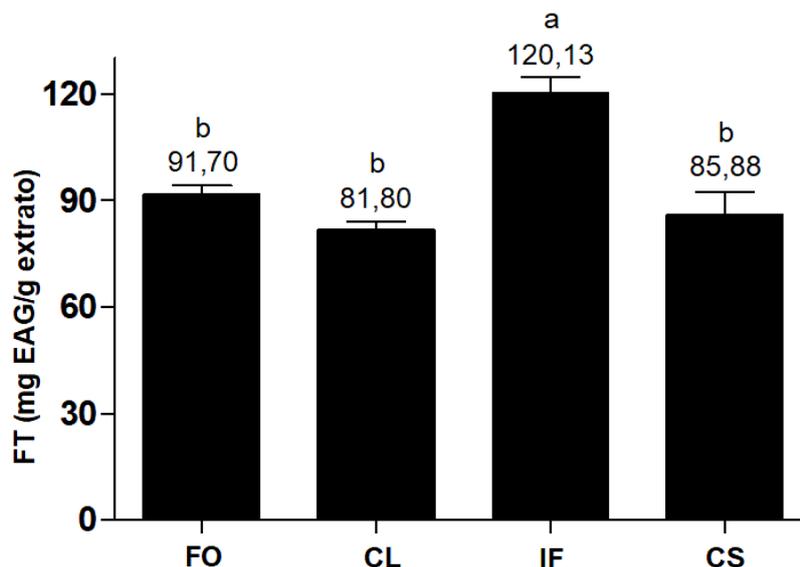
Figura 10 - Teor de compostos fenólicos totais (mgEAG/g) em diferentes concentrações dos extratos brutos de *Miconia ferruginata*



Quantificação de Teor de compostos fenólicos totais em diferentes concentrações (50, 100, 250, 500 e 750 ug/mL) dos extratos brutos de *Miconia ferruginata*. Valores expressos em média \pm erro padrão, (n=4). FT: fenólicos totais.

Na concentração de 750 ug/mL, o extrato etanólico de inflorescência (120,13 mg EAG/g) apresentou maior teor de compostos fenólicos totais ($p<0,05$), seguido pelos extratos etanólicos de folhas (91,70 mg EAG/g), de casca (85,88 mg EAG/g) e de caule (81,80 mg EAG/g), os quais não foram diferentes entre si (Figura 11).

Figura 11- Teor de compostos fenólicos totais de extratos brutos de diferentes partes da espécie *Miconia ferruginata* na concentração de 750 $\mu\text{g/mL}$

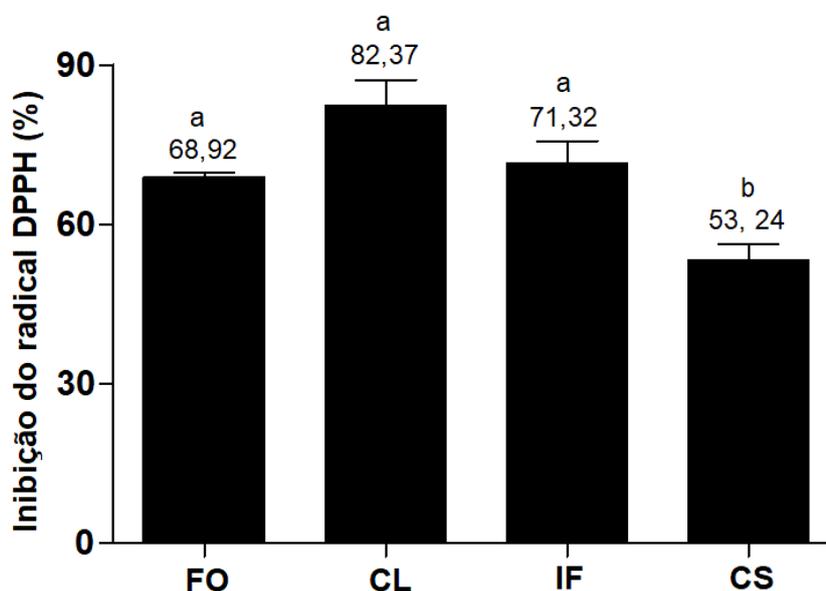


Teor de compostos fenólicos totais de extratos brutos de diferentes partes da espécie *Miconia ferruginata* na concentração de 750 $\mu\text{g/mL}$. Valores expressos em média \pm erro padrão, experimento realizado em triplicata (n=4). Barras acompanhadas por letras diferentes diferem entre si ($p < 0,05$) Nível de significância $p < 0,05$. Teste estatístico utilizado, ANOVA one way seguida de Tukey. FT: fenólicos totais; FO: Extrato bruto de folhas; CL Extrato bruto de caule; IF: Extrato bruto de inflorescência; CS: Extrato bruto de casca.

5.1.2. Avaliação da atividade antioxidante in vitro dos extratos de *Miconia ferruginata*

Os valores das absorvâncias foram medidos em 515nm e convertidos em porcentagem de inibição de acordo com a equação 1 (figura 12). O extrato etanólico do caule apresentou maior porcentagem de inibição do radical DPPH (82,37%), seguido do extrato etanólico de inflorescência (71,32%), extrato etanólico de folhas (68,92%) e extrato etanólico de casca (53,24%), quando presentes na concentração de 750 $\mu\text{g/mL}$.

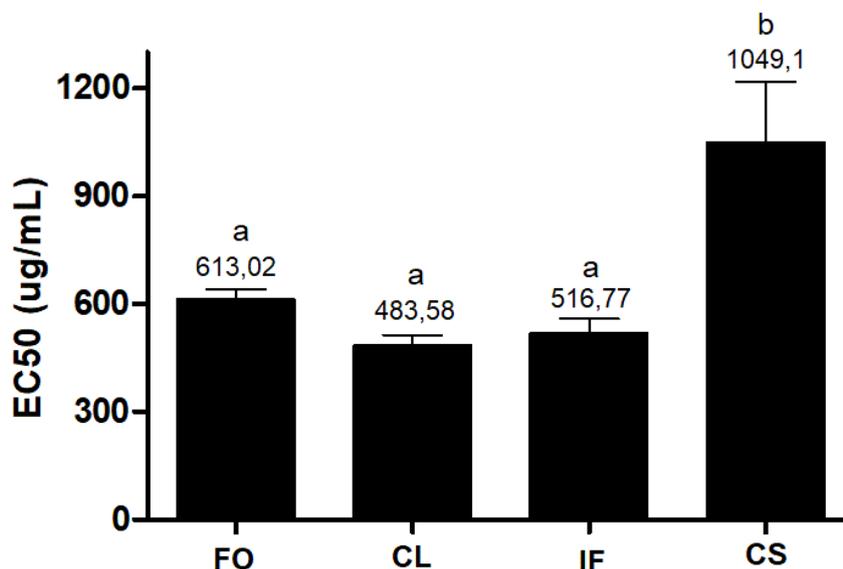
Figura 12 - Porcentagem de inibição da captura do radical DPPH



Porcentagem de inibição da captura do radical DPPH pelos extratos brutos de diferentes partes da espécie *Miconia ferruginata* na concentração de 750 $\mu\text{g/mL}$. Valores expressos em média \pm erro padrão, experimento realizado em triplicata ($n=4$). a: representa diferença estatística em relação a b. Nível de significância $p<0,05$. Teste estatístico utilizado, ANOVA one way seguida de Tukey. FO: Extrato bruto de folhas; CL Extrato bruto de caule; IF: Extrato bruto de inflorescência; CS: Extrato bruto de casca.

A Concentração Eficiente para captura de 50% do radical livre DPPH• (EC50) dos extratos foi calculada por meio de gráficos de porcentagem de inibição versus concentração (Apêndice B) e os dados obtidos estão apresentados na Figura 13. O EC50 é a concentração da amostra ou padrão que causa 50 % da inibição da concentração inicial do DPPH, ou seja, quanto maior o valor do EC50 menor a capacidade de captura do radical, dessa forma, indicando menor ação antioxidante. O extrato etanólico do caule apresentou melhor atividade antioxidante (483,58 $\mu\text{g/mL}$), seguido do extrato etanólico de inflorescência (516,77 $\mu\text{g/mL}$), extrato etanólico de folhas (613,02 $\mu\text{g/mL}$) e extrato etanólico de casca (1049,1 $\mu\text{g/mL}$).

Figura 13 - Concentração antioxidante efetiva média (EC50) dos extratos brutos de *Miconia ferruginata* frente ao ensaio DPPH



Concentração antioxidante efetiva média (EC50) dos extratos brutos de *Miconia ferruginata* frente ao ensaio DPPH. Valores expressos em média \pm erro padrão, experimento realizado em triplicata (n=4). a: representa diferença estatística em relação a b. Nível de significância $p < 0,05$. Teste estatístico utilizado, ANOVA one way seguida de Tukey. FO: Extrato bruto de folhas; CL Extrato bruto de caule; IF: Extrato bruto de inflorescência; CS: Extrato bruto de casca

A análise da correlação (Apêndice C) para a comparação dos dados de teor de compostos fenólicos totais e captura do radical DPPH• foi realizada para verificar se existe uma correlação positiva entre os testes.

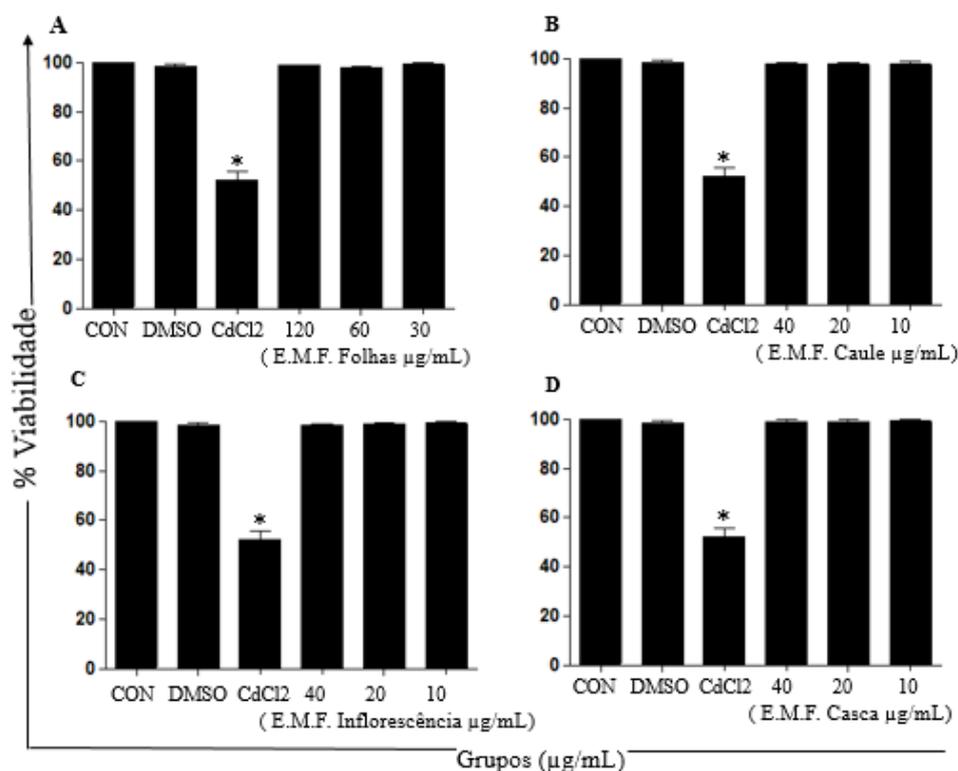
5.1.3. Avaliação da viabilidade celular em culturas tratadas com extrato de *Miconia ferruginata*

5.1.4. Viabilidade de células mononucleares do sangue periférico humano após tratamento com os extratos de *Miconia ferruginata*.

A figura 14 e 15 representam a análise de viabilidade de PBMC após quatro e 120 horas de exposição aos extratos de folha, caule, inflorescência e casca de *M. ferruginata*. Os resultados mostram que não houve diferença significativa no percentual de células

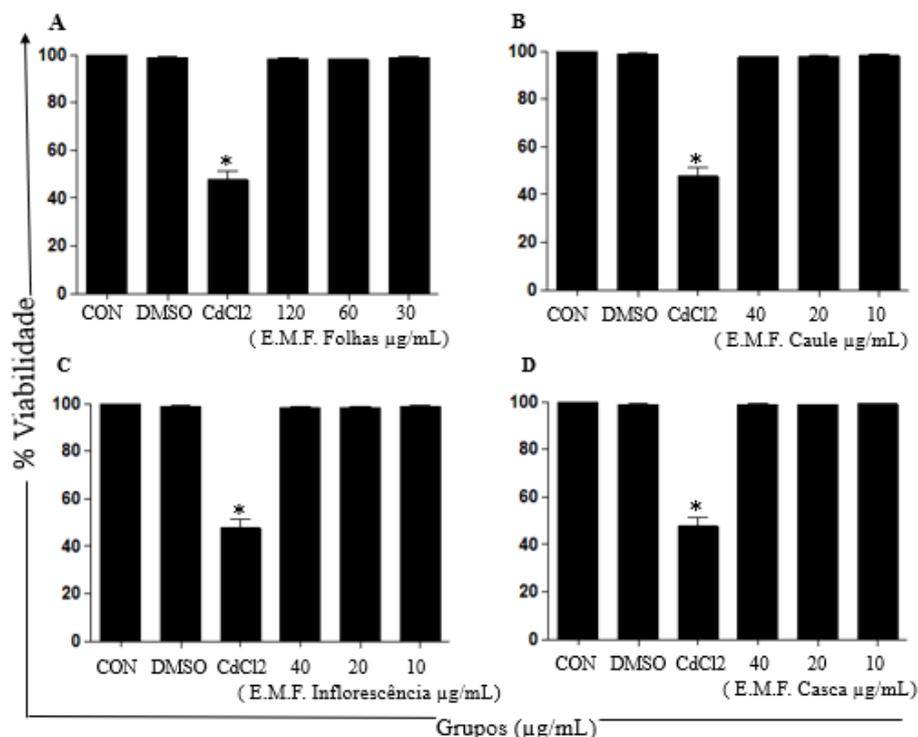
viáveis após tratamento com as diferentes concentrações do extrato de folhas (120, 60 30 ug/mL) e extratos de caule, inflorescência e casca (40, 20 e 10 ug/mL), mantendo a viabilidade celular acima de 90%. Vale destacar que o extrato de folhas foi testado em concentrações superiores aos demais extratos, pois em testes preliminares (dados não apresentados) apresentou menor citotoxicidade. Em relação ao grupo solvente (DMSO) não houve diferença significativa no percentual de células viáveis comparado ao grupo controle, mostrando que este solvente não influenciou nos resultados apresentados para os extratos. Dessa forma, as concentrações testadas dos extratos não apresentaram qualquer toxicidade sob as PBMC e foram utilizadas nas culturas de células em outros ensaios de avaliação da atividade anti-inflamatória.

Figura 14 - Percentagem de viabilidade das PBMC submetidas ao tratamento com os extratos de folhas, caule, inflorescência e casca de *Miconia ferruginata* após quatro horas



Percentual de PBMC viáveis nas culturas controle, DMSO; CdCl2 e nas culturas tratadas com os extratos de *Miconia ferrugianata* em diferentes concentrações, avaliado por exclusão com azul de Tripán utilizando câmara de Neubauer (n = 6). Os dados foram representados como média e o desvio padrão. *: diferença estatística significativa, para $p \leq 0,05$ em relação à cultura controle e DMSO; Teste estatístico utilizado, ANOVA one way seguida de Tukey. CON: grupo controle de viabilidade; DMSO: grupo controle do solvente; CdCl2 grupo controle de morte; (A) Extrato bruto de folha (B) Extrato bruto de caule (C) Extrato bruto de Inflorescência (D) Extrato bruto de Casca.

Figura 15 - Porcentagem de viabilidade das PBMC submetidas ao tratamento com os extratos de folhas, caule, inflorescência e casca de *Miconia ferruginata* após 120 horas.



Percentual de PBMC viáveis nas culturas controle, DMSO; CdCl₂ e nas culturas tratadas com os extratos de *Miconia ferrugianata* em diferentes concentrações, avaliado por exclusão com azul de Tripán utilizando câmara de Neubauer (n = 6). Os dados foram representados como média e o desvio padrão. *: diferença estatística significativa, para $p \leq 0,05$ em relação à cultura controle e DMSO; Teste estatístico utilizado, ANOVA one way seguida de Tukey. CON: grupo controle de viabilidade; DMSO: grupo controle do solvente; CdCl₂ grupo controle de morte; (A) Extrato bruto de folha (B) Extrato bruto de caule (C) Extrato bruto de Inflorescência (D) Extrato bruto de Casca.

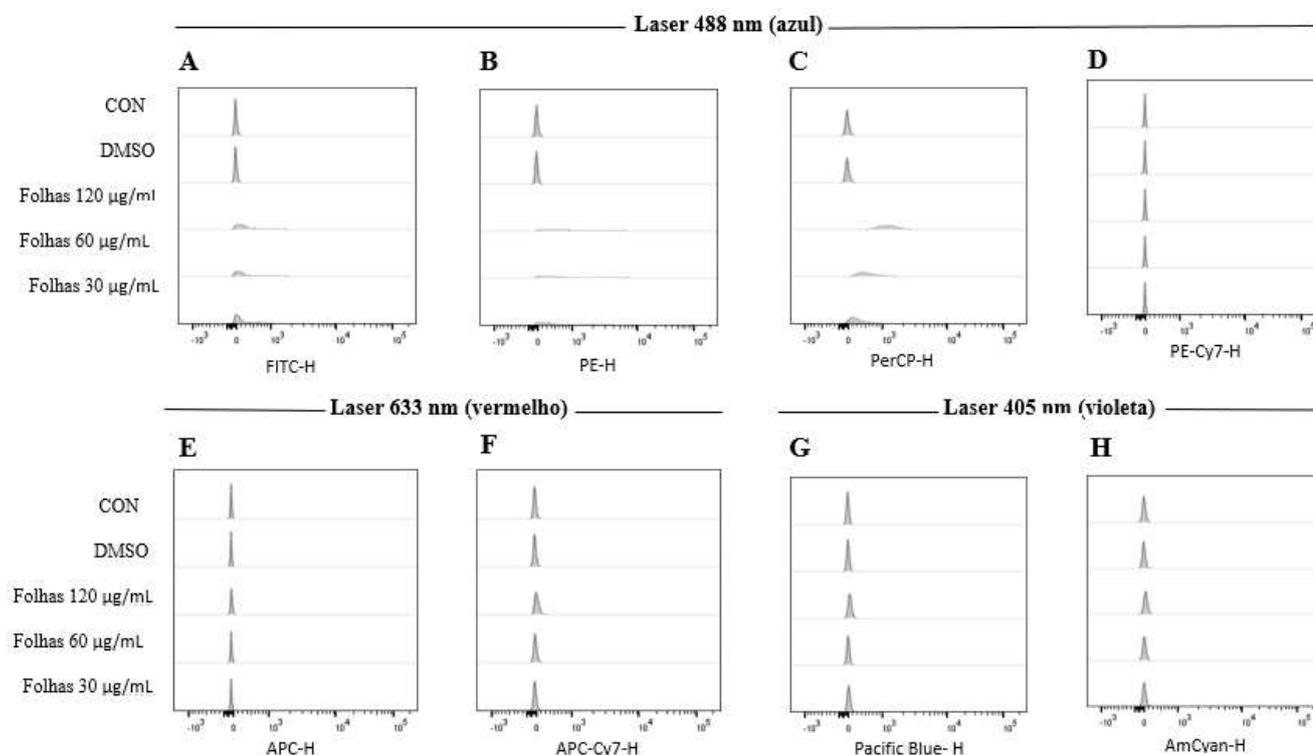
5.2. Avaliação da emissão de fluorescência dos extratos etanólicos de *Miconia ferruginata*

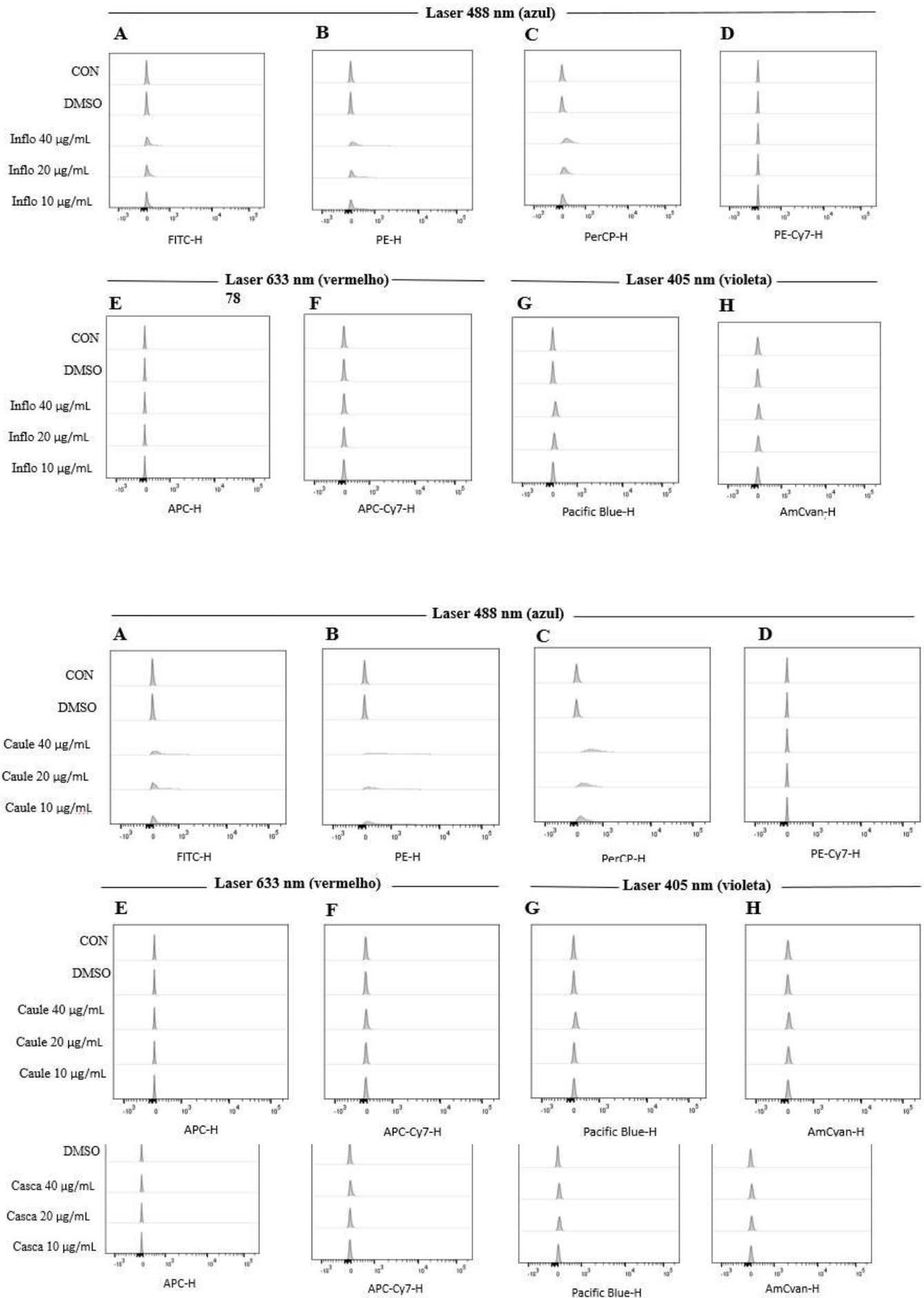
Segundo Ottoni (2017) é importante avaliar a presença de fluorescência das amostras a serem estudadas, uma vez que, a fluorescência presente na amostra pode ser confundida com a fluorescência da sonda utilizada para a identificação de uma molécula específica, influenciando nos resultados obtidos. Dessa forma, tal análise evita a obtenção de resultados incorretos, possibilitando a escolha correta de anticorpos e marcadores a serem utilizados nas análises realizadas por citometria de fluxo. Os dados obtidos estão

apresentados nas figuras 16 e 17, respectivamente. Os histogramas representam as intensidades de fluorescência de PBMC captada nos oito canais do citômetro de fluxo BD FACSCanto II, após quatro e 120 horas de exposição.

Após quatro horas de tratamento das PBMC ocorreram deslocamentos dos picos de fluorescência para a direita nos canais dos fluorocromos FITC, PE e PerCP, laser 488 azul (figura 16A; 16B; 16C) nas culturas tratadas com o extrato etanólico de folhas e de caule. O tratamento com extrato bruto de inflorescência levou a um leve deslocamento nos canais dos fluorocromos FITC e PerCP na cultura tratada com a concentração de 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e emissão de fluorescência nos canais de PE nas concentrações de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A avaliação do extrato bruto de casca mostrou emissão de fluorescência somente no canal do fluorocromo PerCP. A partir dos dados obtidos foi determinado que os fluorocromos FITC, PE e PerCP do laser 488 azul não poderiam ser utilizados para a análise de produção de citocinas por PBMC.

Figura 16 - Análise da emissão de fluorescência de células tratadas com extrato etanólico bruto de folhas de *Miconia ferruginata* incubadas por quatro horas

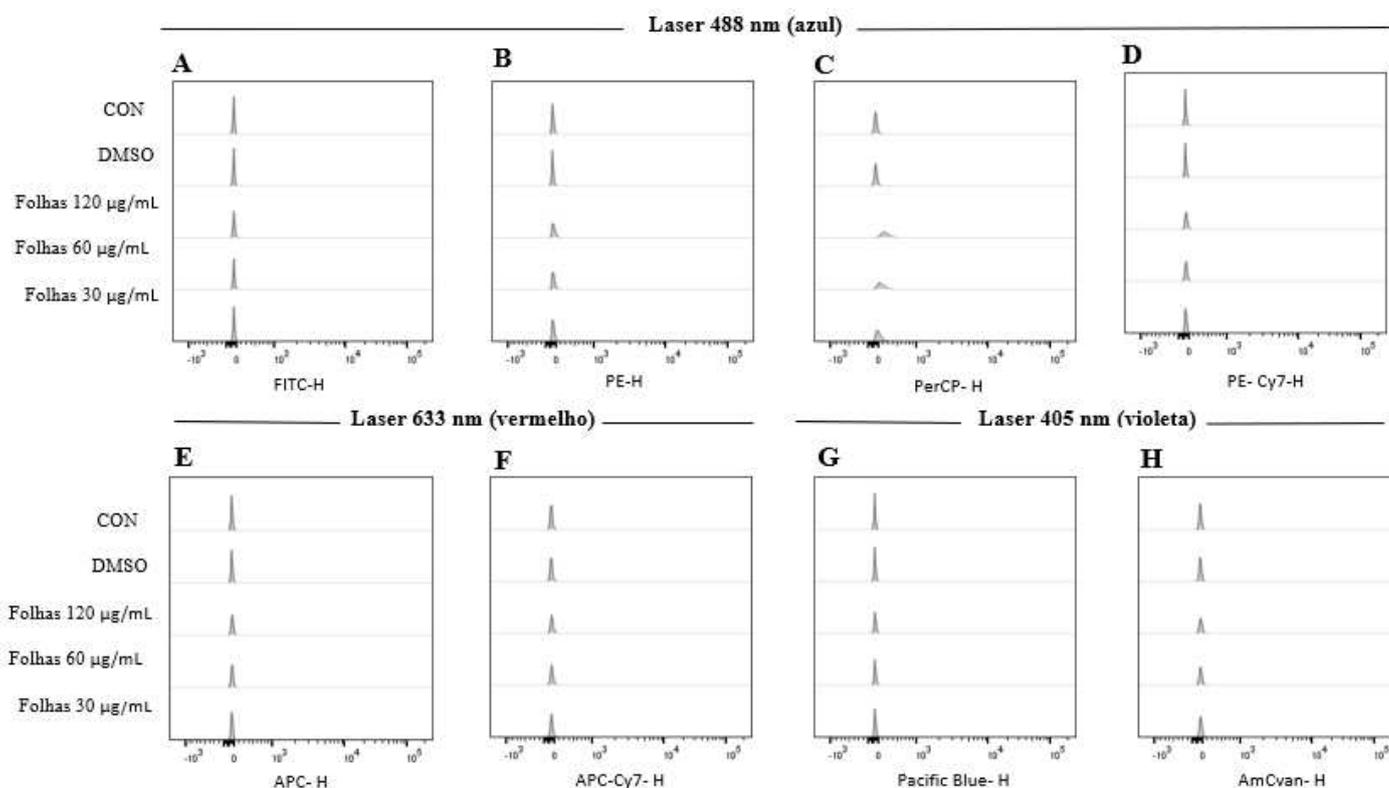




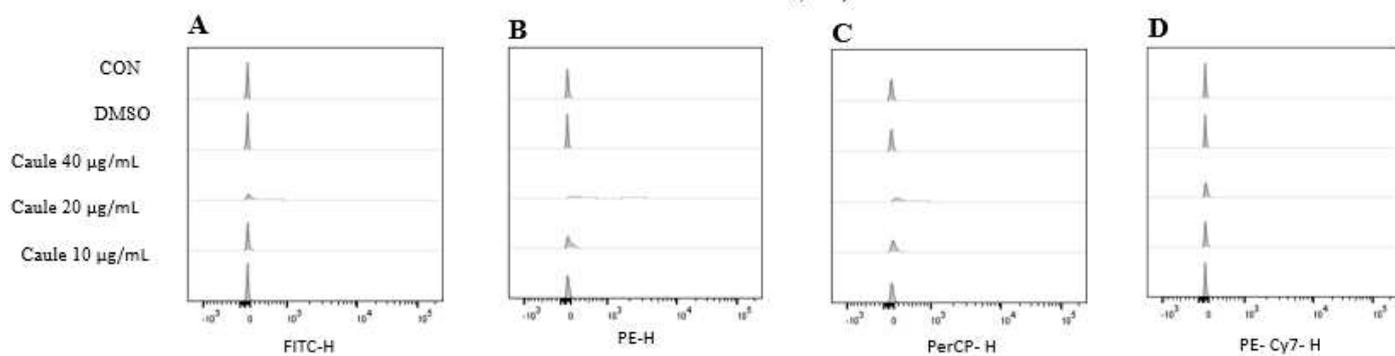
Os histogramas acima representam as intensidades de fluorescência de PBMC captada nos oito canais do citômetro de fluxo BD FACSCanto II. (A) Canal FITC-H; (B) Canal PE-H; (C) Canal PerCP-H; (D) Canal PE- Cy7-H; (E) Canal APC-H; (F) APC-Cy7-H; (G) Pacific Blue-H; (H) Canal AmCyan-H. CON: grupo controle; DMSO: grupo solvente; grupo tratado com extrato bruto de Folhas de *Miconia ferruginata* nas concentrações de 120 $\mu\text{g/mL}$, 60 $\mu\text{g/mL}$ e 30 $\mu\text{g/mL}$ grupo tratado com extrato bruto de caule, inflorescência e casca nas concentrações de 40 $\mu\text{g/mL}$, 20 $\mu\text{g/mL}$ e 10 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente permaneceram incubadas por quatro horas em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂.

Ao contrário do observado após quatro horas de exposição aos extratos, nas culturas tratadas por 120 horas, não ocorreu emissão de fluorescência, sendo possível utilizar todos os canais dos fluorocromos para a análise de proliferação de linfócitos. Somente para a maior concentração do extrato bruto de caule (40 $\mu\text{g/mL}$), houve emissão de fluorescência nos canais de FITC, PE e PerCP, laser 488 azul, sendo estes excluídos da análise neste extrato.

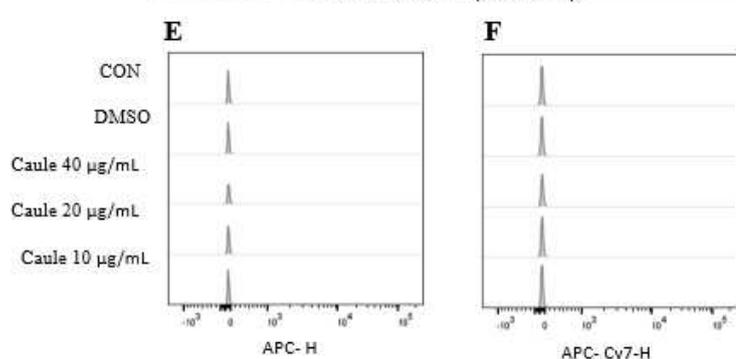
Figura 17- Análise da emissão de fluorescência de células tratadas com extratos etanólicos brutos de folhas de *Miconia ferruginata* incubadas por 120 horas



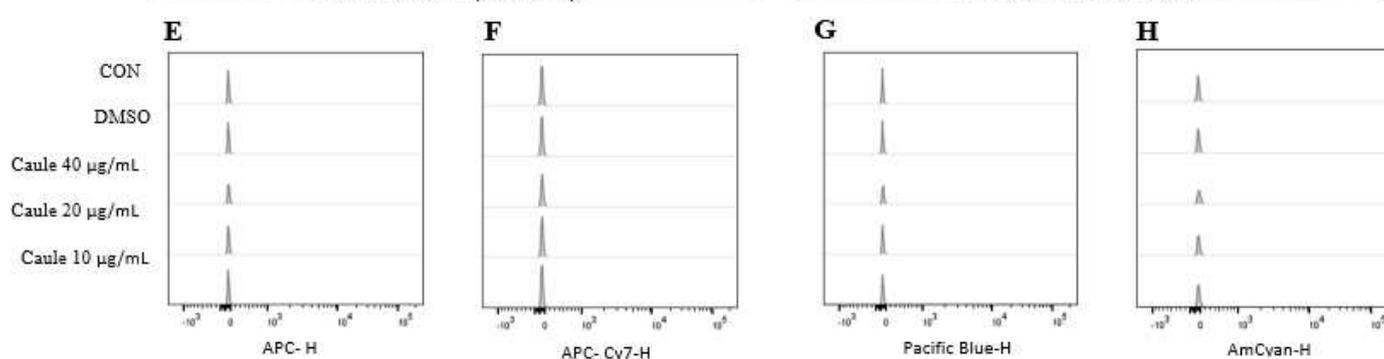
Laser 488 nm (azul)



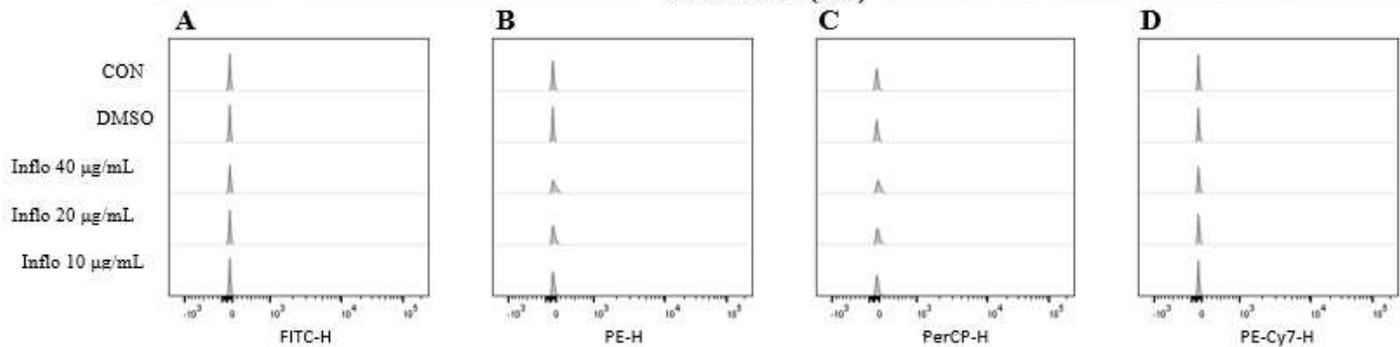
Laser 633 nm (vermelho)



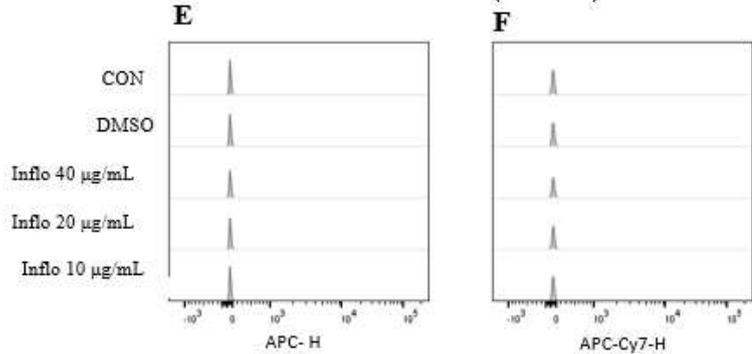
Laser 405 nm (violeta)



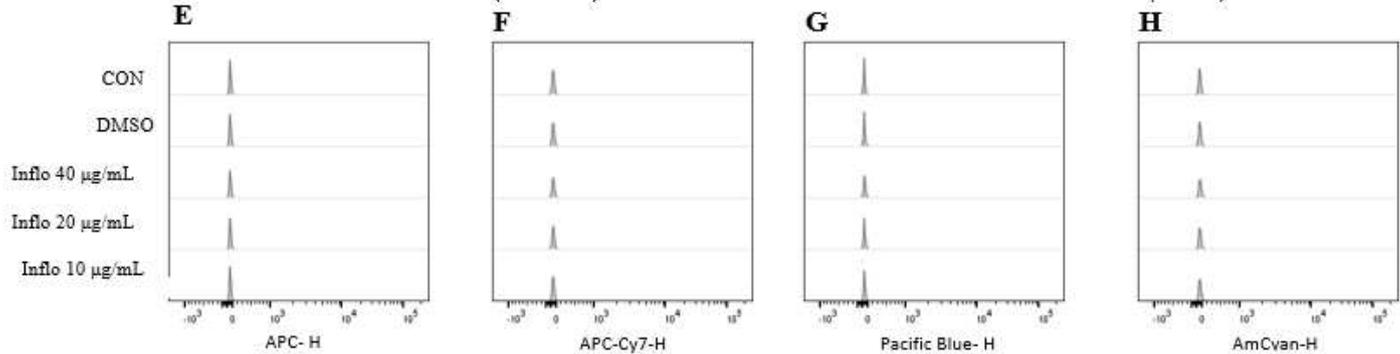
Laser 488 nm (azul)

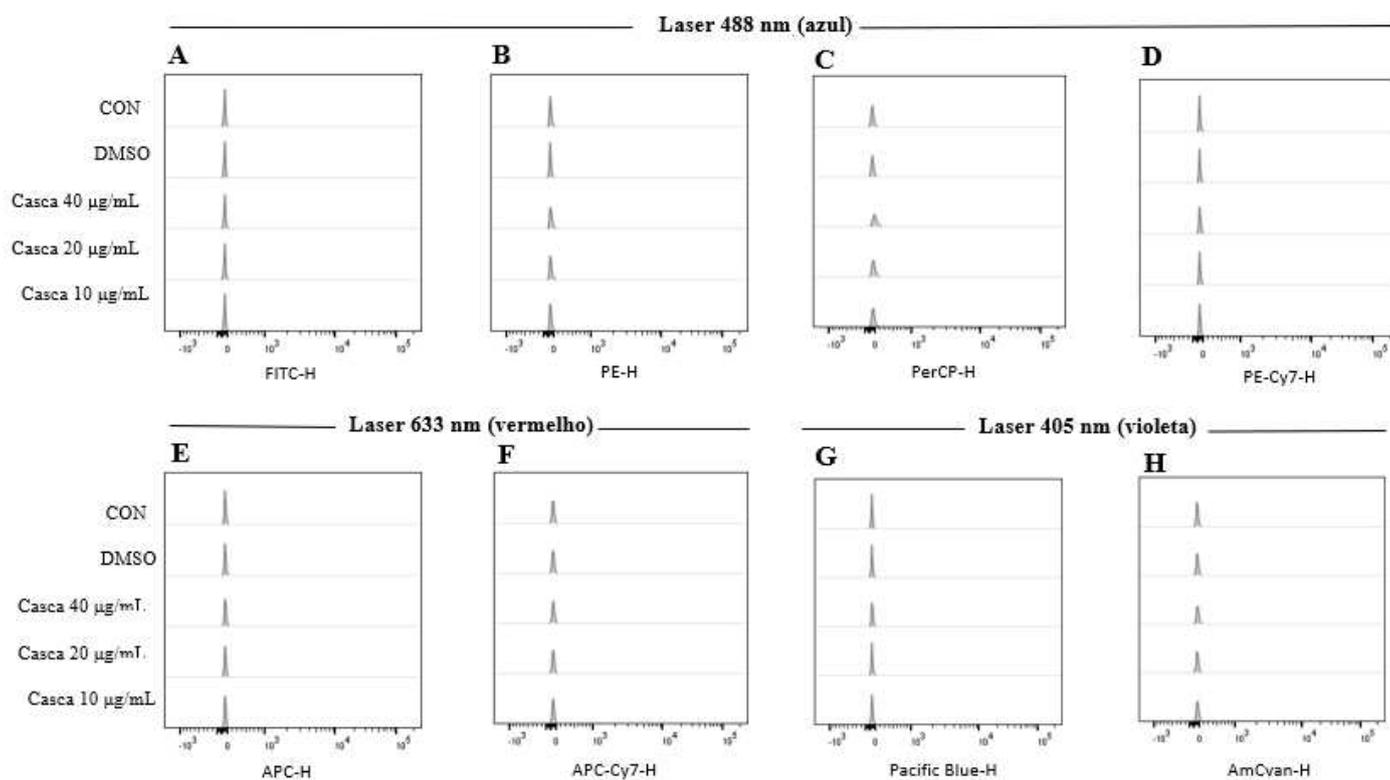


Laser 633 nm (vermelho)



Laser 405 nm (violeta)





Os histogramas acima representam as intensidades de fluorescência de PBMC captada nos oito canais do citômetro de fluxo BD FACSCanto II. (A) Canal FITC-H; (B) Canal PE-H; (C) Canal PerCP-H; (D) Canal PE-Cy7-H; (E) Canal APC-H; (F) APC-Cy7-H; (G) Pacific Blue-H; (H) Canal AmCyan-H. CON: grupo controle; DMSO: grupo solvente; grupo tratado com extrato bruto de Folhas de *Miconia ferruginata* nas concentrações de 120 µg/mL, 60 µg/mL e 30 µg/mL, grupo tratado com extrato bruto de caule, inflorescência e casca nas concentrações de 40 µg/mL, 20 µg/mL e 10 µg/mL, respectivamente permaneceram incubadas por 120 horas em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂.

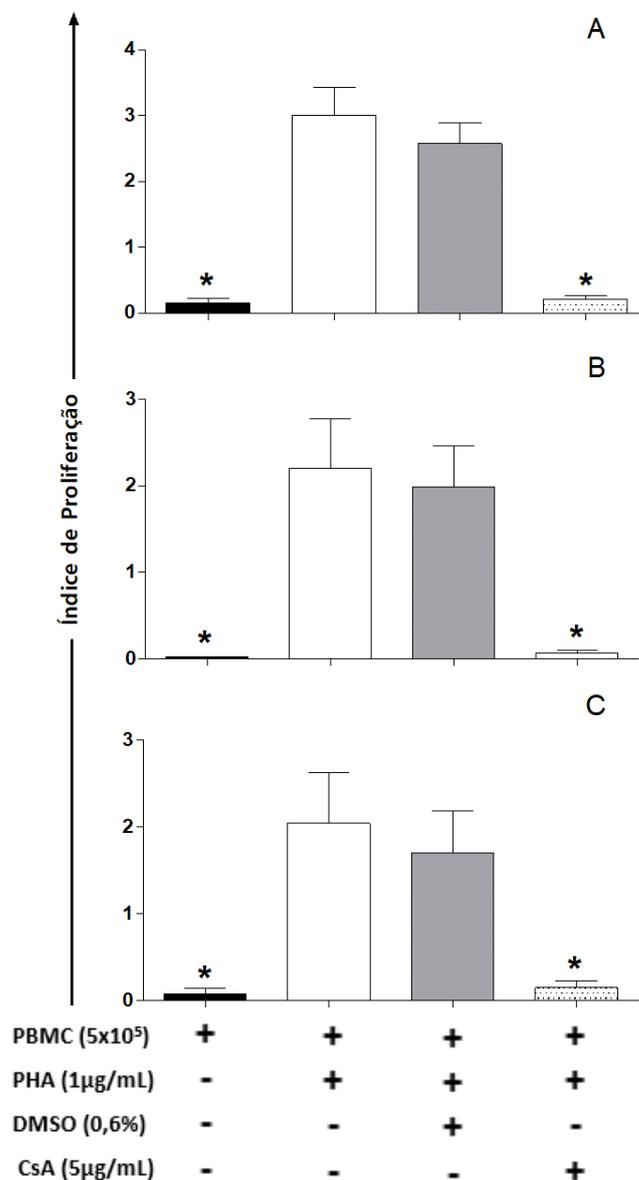
5.3. Atividade sobre elementos da resposta imune dos extratos de *Miconia ferruginata*

5.3.1. Efeito dos extratos de *Miconia ferruginata* sobre a proliferação de linfócitos humanos

Na avaliação do efeito dos extratos etanólicos da *M. ferruginata* sobre PBMC foi realizado um experimento piloto, a fim de verificar se o solvente DMSO interferiria em sua atividade. Na figura 18 está apresentado os resultados obtidos nas culturas tratadas com DMSO a 0,6% v/v, juntamente com o controle negativo de estímulo (PBMC),

controle positivo de estímulo (PHA) e controle positivo de inibição (CSA). Os dados mostraram que o solvente DMSO não reduziu significativamente o índice de proliferação celular dos linfócitos e suas subpopulações (LT: $2,25 \pm 0,88$; T CD 4 $1,47 \pm 0,92$; T CD8 $1,21 \pm 0,88$) quando comparado com às culturas controle estimuladas com PHA (LT: $2,25 \pm 0,92$; T CD4 $2,07 \pm 0,10$; T CD8 $2,29 \pm 0,92$). Dessa forma, o solvente, na concentração de 0,6% v/v poderia ser utilizado nas culturas celulares tratadas com os extratos, visto que não interferiu na resposta proliferativa dessas células, e a resposta observada seria referente ao efeito exclusivamente do extrato.

Figura 18 - Efeito do solvente dimetilsulfóxido (DMSO) sobre o índice de proliferação de linfócitos humanos



Análise da porcentagem relativa de linfócitos totais (A), CD4+ (B) e CD8+ (C). Os dados foram representados como média e o desvio padrão ($n=6$ por grupo). Teste estatístico utilizado, ANOVA one way seguida de Tukey, *: diferença estatística significativa, para $p \leq 0,05$ em relação à cultura estimulada com PHA isoladamente (100% do índice de proliferação). PHA grupo controle de estímulo; DMSO: grupo controle do solvente; CSA grupo controle de inibição.

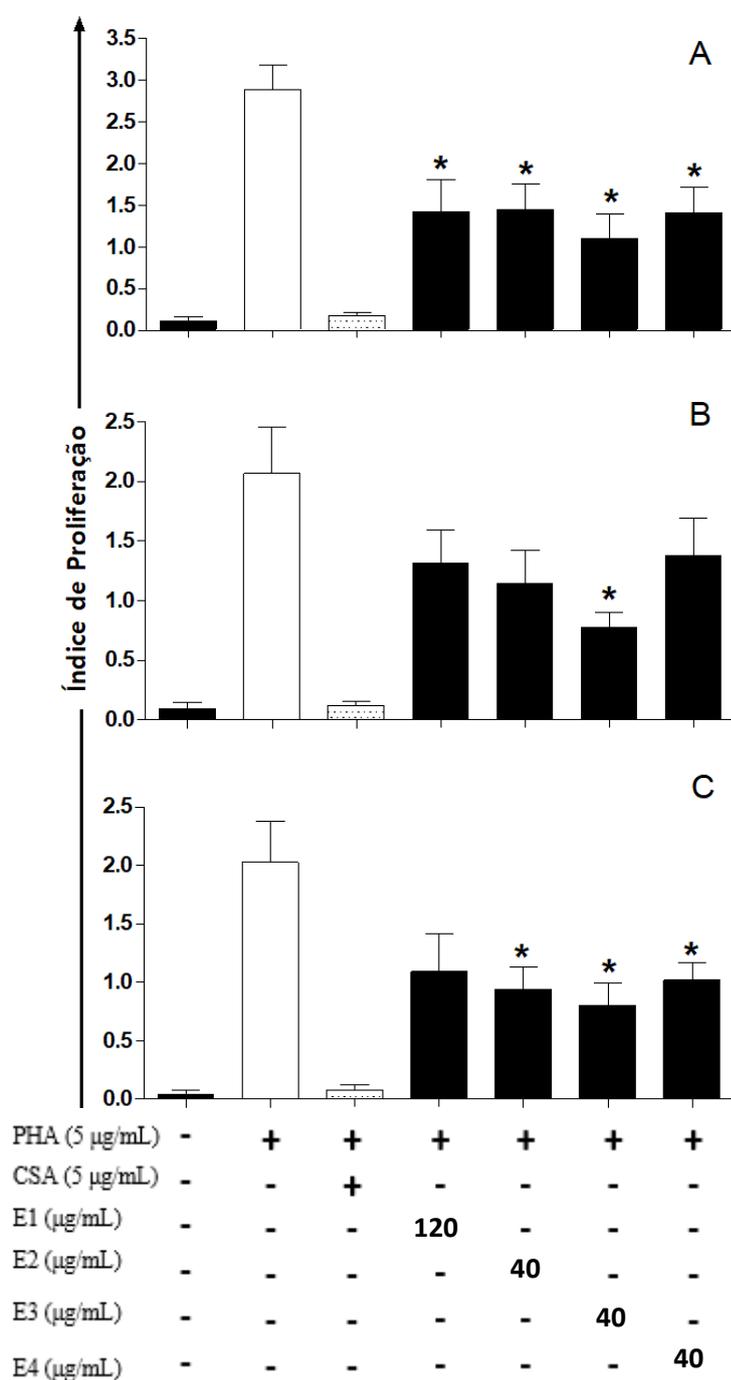
Na figura 19 está representando o efeito dos extratos etanólicos brutos de folha, de caule, de inflorescência e de casca de *M. ferruginata* na resposta proliferativa de linfócitos totais e subpopulações de TCD4+ e TCD8+. O extrato de inflorescência apresentou maior redução do índice de proliferação tanto dos linfócitos totais quanto nas

subpopulações de TCD4+ e TCD8+ na concentração de 40 µg/mL, em comparação ao controle estimulado PHA (PHA: $2,86 \pm 0,92$; LT: $1,26 \pm 0,96$; TCD4: $0,76 \pm 0,77$; TCD8 $0,68 \pm 0,54$).

Para os extratos do caule e da casca houve uma redução da resposta proliferativa de linfócitos totais e subpopulação de TCD8 +, na concentração de 40 µg/mL, respectivamente. Entretanto, não foi observado redução na subpopulação de TCD4+ nas culturas tratadas com estes extratos. Já o extrato de folhas diminuiu a resposta proliferativa de linfócitos totais somente na concentração de 120 µg/mL Como esperado, a ciclosporina reduziu de forma significativa a proliferação de linfócitos totais, das subpopulações de linfócitos TCD4+ e TCD8+ (LT: $0,19 \pm 0,13$; TCD4: $0,12 \pm 0,11$; TCD8: $0,12 \pm 0,009$), quando comparado as culturas controle de estímulo com PHA (linfócitos totais: $2,25 \pm 0,92$; T CD4 $2,07 \pm 0,10$; T CD8 $2,29 \pm 0,92$).

A partir dos dados do índice de proliferação de linfócitos foi calculado os valores de eficácia do efeito antiproliferativo de cada extrato em relação ao efeito da CSA. Para o extrato de inflorescência na concentração de 40 µg/mL foi observado uma eficácia de 16,12% para linfócitos totais, 15,75% para células T CD4 e 9,63% para células T CD8. Já a eficácia do extrato de folhas para linfócitos totais foi de 12,5%, o extrato de caule apresentou eficácia de 12,3 % para linfócitos totais e 8,21% para células TCD8. E o extrato de casca apresentou eficácia de 12,67% para linfócitos totais e 7,56% para linfócitos TCD8.

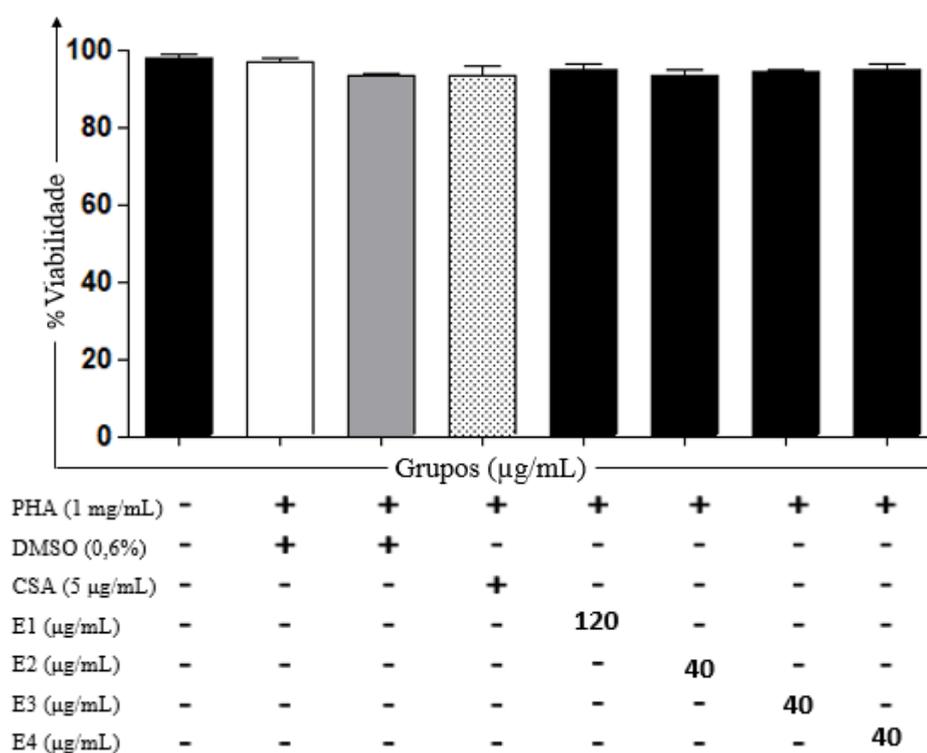
Figura 19 - Índice de proliferação de linfócitos tratados com os extratos etanólicos brutos de *Miconia ferruginata*



Análise da porcentagem relativa de linfócitos totais (A), CD4+ (B) e CD8+ (C) (n=8) estimulados com PHA e tratados com DMSO nas concentrações de 0,6% v/v ou ciclosporina (CsA) na concentração de 5 µg/mL. *: diferença estatística significativa, para $p \leq 0,05$ em relação à cultura estimulada com PHA isoladamente (100% do índice de proliferação). Teste estatístico utilizado, ANOVA seguida de Tukey. E1: extrato de folhas; E2: extrato de caule; E3: extrato de inflorescência e E4: extrato de casca.

Para verificar se a queda nos valores de proliferação não estaria relacionada à eventos de morte celular, tais como apoptose, morte por ativação ou outra causa não relacionada ao tratamento com o extrato, foi realizada a contagem de células viáveis pela técnica de exclusão do azul de Tripán a 0,4% em microscópio ótico (Figura 20). Foi observado que os extratos de *M. ferruginata* não diminuíram a viabilidade das células comparado com o grupo controle negativo, como esperado. Além disso, não foi observada citotoxicidade celular nos grupos controle solvente (DMSO), grupo controle de estímulo (PHA) e grupo controle de inibição (CSA).

Figura 20 - Porcentagem de viabilidade das PBMC submetidas ao tratamento com os extratos de *Miconia ferruginata* detectados no ensaio de linfoproliferação



Análise de viabilidade das PBMC no ensaio de linfoproliferação. Os dados foram representados como média e desvio padrão (n=6 por grupo). *: diferença estatística significativa, para $p \leq 0,05$ em relação à cultura estimulada com PHA isoladamente (100% do índice de proliferação). Teste estatístico utilizado, ANOVA seguida de Tukey CON: grupo controle de viabilidade; DMSO: grupo controle do solvente; PHA grupo controle de estímulo; CSA grupo controle de inibição; E1: extrato de folhas; E2: extrato de caule; E3: extrato de inflorescência e E4: extrato de casca.

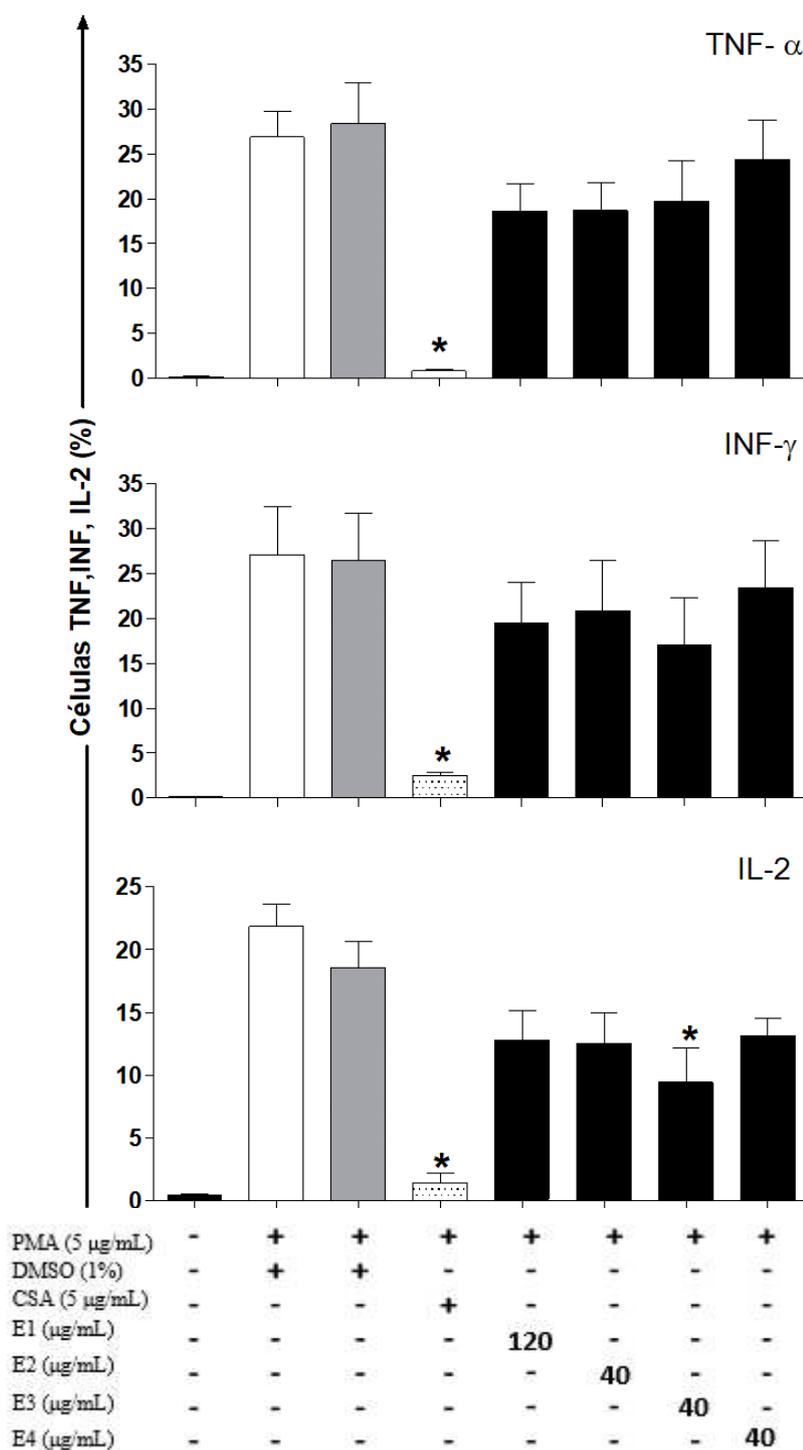
5.3.2. Avaliação do efeito dos extratos brutos de *Miconia ferruginata* sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias por linfócitos humanos

A figura 21 apresenta o percentual das citocinas TNF- α , IFN- γ e IL-2 detectados em culturas de linfócitos humanos e o efeito do tratamento com os extratos etanólicos brutos de folhas, de caule, de inflorescência e de casca de *M. ferruginata*. Os dados mostram que não houve redução significativa no percentual de linfócitos totais positivos para TNF- α nos extratos testados em comparação ao controle estimulado (PMA) (PMA: $26,9 \pm 5,74$; E1: $18,62 \pm 6,13$; E2: $18,67 \pm 6,19$; E3: $19,72 \pm 9,12$; E4: $24,37 \pm 8,81$). Somente o controle de inibição (CSA) promoveu, como esperado, uma redução no percentual de células positivas para TNF- α (CSA: $0,81 \pm 0,26$), em comparação ao controle estimulado (PMA). Para todas análises, o solvente DMSO não promoveu efeito significativo na diminuição do percentual das citocinas pró-inflamatórias (TNF- α : $28,4 \pm 9,19$; IFN- γ : $21,8 \pm 10,45$) bem como de IL2 (IL-2: $18,57 \pm 4,14$), mostrando que os efeitos observados foram decorrentes da ação dos extratos de *M. ferruginata*. Importante ressaltar que o DMSO à 1% não interferiu na redução das citocinas avaliadas, estando de acordo com os resultados encontrados também por Almeida (2015).

Similarmente ao observado para a citocina TNF- α não houve diminuição significativa da citocina IFN- γ nos linfócitos tratados com os diferentes extratos de *M. ferruginata*, em comparação ao controle estimulado (PMA) (PMA: $27,07 \pm 10,72$; E1: $12,88 \pm 9,13$; E2: $14,28 \pm 11,30$; E3: $9,15 \pm 20,44$; E4: $18,6 \pm 10,49$). Para as culturas tratadas com a ciclosporina houve redução significativa no percentual de IFN- γ (CSA: $2,21 \pm 0,55$).

Contudo, houve diminuição significativa de IL-2 em linfócitos totais tratados com extrato bruto de inflorescência ($9,40 \pm 5,44$), em comparação ao controle estimulado (PMA: $21,87 \pm 3,60$; E3: $9,40 \pm 5,44$). Porém, para os outros extratos de *M. ferruginata* não houve este mesmo efeito de redução desta citocina (E1: $12,76 \pm 4,75$; E2: $12,54 \pm 4,74$; E4: $13,17 \pm 2,80$). Como esperado e observado para as outras citocinas, houve redução no IL-2 nas culturas tratadas com a ciclosporina (CSA: $1,42 \pm 1,46$). Em relação as culturas tratadas com o solvente DMSO ($18,57 \pm 4,14$), não foi observado efeito significativo na diminuição do percentual de linfócitos totais.

Figura 21- Efeito dos extratos de *Miconia ferruginata* sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IFN- γ e IL-2) em linfócitos humanos



Análise da porcentagem relativa de linfócitos totais sobre a produção de citocinas. Os dados foram representados como média e desvio padrão, (n = 4). p < 0,05. Teste estatístico utilizado, ANOVA one way seguida de Tukey A – Linfócitos marcados com TNF- α ; B – IFN- γ ; C – IL-2. E1: extrato de folhas; E2: extrato de caule; E3: extrato de inflorescência; E4: extrato de casca; CSA: Ciclosporina; PMA: Miristato Acetato de Forbol.

6. DISCUSSÃO

Neste trabalho foi realizado a determinação da concentração de compostos fenólicos totais presentes nos extratos brutos de folhas, de caule, inflorescência e de caule de espécie *M. ferruginata* e, foi verificadas concentrações expressivas de compostos fenólicos totais em todos os extratos de *M. ferruginata* estudados, sendo o extrato de inflorescência o mais rico nesses compostos. Em geral, o potencial antioxidante das espécies vegetais pode ser atribuído, ao menos em parte, à presença de substâncias fenólicas em sua composição química. Assim, os resultados observados, corroboram com estudos prévios de plantas deste gênero, em que tem sido detectado promissor efeito antioxidante.

No estudo de Lima (2016), o extrato do caule de *M. ferruginata* apresentou 197,31 mg EAG/g, enquanto para o extrato das folhas foi observado um teor de 561,89 mg EAG/g por Cruz (2017). Comparando os resultados de fenólicos totais encontrados no presente estudo (caule: 81,80 mg EAG/g; folhas: 91,70 mg EAG/g), com os estudos citados anteriormente, a qual utilizaram a mesma metodologia, observa-se clara diferença com menor concentração observada naquele. A análise de compostos fenólicos pode ser influenciada pelo método de extração empregado, tamanho da amostra, tempo e condições de estocagem (ANGELO; JORGE, 2007; SILVA, 2015), que poderia explicar variações na concentração observada nos extratos desta planta. Um outro aspecto, ainda mais relevante a ser considerado é o fato, de que, variações na composição química das plantas podem ocorrer devido às condições sazonais (luminosidade, temperatura e clima) bem como características do solo, que podem alterar a produção de seus metabólitos secundários (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; LI *et al.*, 2020).

Em relação ao potencial antioxidante, o extrato bruto de caule de *M. ferruginata* apresentou melhor atividade. De acordo com Campos *et al.* (2003) são consideradas substâncias antioxidantes ativas as que apresentam $EC_{50} < 500 \mu\text{g/mL}$. Assim, o extrato que obteve esse resultado foi o extrato de caule, com EC_{50} de 483,58 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. O extrato com menor atividade foi o extrato de casca com um EC_{50} 1049,1 $\mu\text{g/mL}$. No estudo de Lima (2016) o extrato de caule mostrou baixa atividade para captura do radical DPPH, com EC_{50} de 518,51. No estudo Cruz (2017) foi observado um EC_{50} mínimo de até 500 $\mu\text{g/mL}$ para o extrato das folhas. Comparado com os dados obtidos no presente estudo observamos uma diferença na concentração de EC_{50} para o extrato de folhas (613,02 $\mu\text{g/mL}$). Essa diferença pode estar relacionada a composição

química desta planta, visto que foi encontrado um menor teor de compostos fenólicos nos extratos quando comparado aos estudos citados anteriormente. (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Não foram encontrados estudos com os extratos de inflorescência e casca da planta *M. ferruginata* envolvendo ensaio com DPPH, sendo uma contribuição para o conhecimento em relação a essa planta, que também mostrou moderado potencial antioxidante das inflorescências (516, 77µg/mL) desta espécie.

Apesar de maiores concentrações de fenólicos estarem associadas positivamente com maior atividade antioxidante (PIERONI *et al.*, 2011; LIMA, 2016; CRUZ, 2017; GONTIJO *et al.*, 2019), foi observado que o extrato de caule apresentou maior valor de EC 50 (474,31 µg/mL), apesar de apresentar menor concentração de fenólicos totais que o extrato de inflorescência e não diferir dos demais. Neste sentido, é possível que outros componentes antioxidantes não quantificados e mais presentes no caule tenham impactado neste achado. Além disso, a atividade antioxidante dos compostos fenólicos depende da sua estrutura química (LIMA; BEZERRA, 2012). Assim, estudos mais detalhados sobre a composição química desta planta são necessários para entendimento de sua composição e associação com as atividades observadas.

No estudo fitoquímico realizado por Barroso (2015) com extratos etanólicos e aquosos de folhas e caule de *M. ferruginata* foram identificados 14 compostos de diferentes classes, entre eles de sesquiterpenos, hidrocarbonetos, monoterpenos, fenil propanóides, e álcoois, sendo predominante os sesquiterpenos β-cariofileno e α-humuleno. Além disso, foram isolados e identificados o esteroide β-sitosterol (E1), estigmasterol (E2), os triterpenos ácidos ursólico e oleanóico. Os flavonoides (5,7,4'-trihidroxi-6,8-dimetilflavona, 5,6,7-trihidroxi-4'-metoxiflavona, 5-hidroxi-7,4'-dimetoxi-8-metilflavona também foram identificados (OLIVEIRA, 2010).

Em outras espécies deste gênero, essa correlação entre alto teor de compostos fenólicos e significativa atividade antioxidante pela inibição do radical DPPH tem sido demonstrada. Por exemplo, no estudo do extrato metanólico de *Miconia albicans* e de *Miconia latecrenata* (PIERONI *et al.*, 2011; GONTIJO *et al.*, 2019). A análise de correlação entre a maior quantidade compostos fenólicos e sua capacidade de capturar radicais de DPPH, foi também observada no presente estudo para os extratos de folhas, inflorescência e casca.

Os extratos de *M. ferruginata* mostraram inibição superior a 50% de atividade antioxidante na maior concentração (750 µg/mL), apresentando inibição de 82,37 % para o extrato de caule. Embora não haja estudos semelhantes na literatura para *M.*

ferruginata, plantas deste gênero também apresentaram atividade antioxidante. Mosquera *et al.* (2009) mostrou elevado poder antioxidante de *Miconia lehmannii* com 45,3% de atividade antioxidante frente ao radical DPPH. A atividade antioxidante de *Miconia alypifolia* também foi demonstrada e relacionada a composição e concentração de compostos presentes, uma vez que o flavonoide kaempferol-3-Odiglucosídeo (32%) apresentou maior porcentagem de inibição comparado a quercetina -3-O-galactosídeo (21%), apigenina-7-O-glicosídeo (19%) e kaempferol-3-O-galactosídeo (19%) a 30 μ M. A porcentagem de inibição do radical aumentou quando presentes na concentração de 100 μ M, kaempferol-3-Odiglucosídeo (96%), quercetina -3-O-galactosídeo (70%), apigenina-7-O-glicosídeo (41%) e kaempferol-3-O-galactosídeo (43%). Assim, a atividade antioxidante dos flavonoides depende dos arranjos de grupos funcionais e grupos de hidroxilas, quanto maior o número de hidroxilas, maior será a atividade como doador de hidrogênio e de elétrons (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002; LIMA; BEZERRA, 2012).

Na avaliação do efeito dos extratos sobre os elementos da resposta imune, foi realizado um estudo biológico para de avaliar a citotoxicidade dos mesmos sobre as células PBMC após quatro e 120 horas de tratamento. Os resultados mostraram que não houve redução significativa no percentual de células viáveis das PBMC tratadas com as diferentes concentrações dos extratos da *M. ferruginata*, (10 μ g/mL- 120 μ g/mL). Semelhante ao observado em outros estudos, os resultados mostram que não houve efeito citotóxico de extratos brutos de *M. ferruginata* frente a cultura de células. Comparativamente ao presente estudo, Barroso (2015) também encontrou baixa toxicidade associada aos extratos desta planta, não detectando redução significativa da viabilidade celular de PBMC em concentrações inferiores a 62,5 μ g/mL após 120 horas de exposição aos extratos aquosos (BARROSO, 2015). Contudo, a natureza do extrato empregado por essa autora, foi diferente do empregado aqui (aquosos vs. etanólicos). Neste sentido, cabe destacar que semelhante ao presente estudo Cordoba, (2017) e Cruz (2017) também avaliaram extratos etanólicos de folhas desta planta e não observaram citotoxicidade nas concentrações inferiores a 50 μ g/mL sob PBMC e neutrófilos humanos isolados do sangue periférico.

Adicionalmente, estudos avaliando a citotoxicidade dos extratos de *M. ferruginata* frente a diferentes tipos de células tumorais tem mostrado um efeito altamente citotóxico e seletivo (OLIVEIRA, 2010; BARROSO, 2015; CORDOBA, 2017). Nesses estudos, tanto os extratos etanólicos e aquosos brutos das folhas/flores e do caule, quanto

substâncias isoladas desta espécie tem mostrado efeito antitumoral sob células MDA-MB-231, MDA-MB-435, Jurkat e HCT-8. Estudo *in vivo* utilizando extrato aquoso de folhas de *M. ferruginata* mostrou elevada toxicidade quando administrada por via intraperitoneal na dose de 2000 mg/kg, com determinação de uma DL50 de 1000 mg/kg e sendo classificado como extrato moderadamente tóxico. Entretanto, nas doses de 200, 100 e 50 mg/kg não houve toxicidade e foi observado uma correlação dose-dependente do efeito terapêutico na distrofia muscular em camundongos *mdx*, com redução da necrose, degeneração celular e processo inflamatório (CORRÊA, 2020). Esses resultados mostram possíveis efeitos biológicos e elevada seletividade dos extratos de *M. ferruginata*, que o tornam uma planta promissora com atividade antioxidantes e/ou anti-inflamatória.

Após determinar as concentrações não tóxicas dos extratos de *M. ferruginata* a serem utilizadas nos demais ensaios biológicos e análise de emissão de fluorescência desses extratos nos detectores do citômetro, foi realizada a investigação do efeito dos extratos sobre a resposta proliferativa de linfócitos totais e suas subpopulações TCD4 e TCD8. Os resultados demonstram um efeito antiproliferativo dos extratos de *M. ferruginata* sob linfócitos totais. Importante ressaltar que apenas o extrato de inflorescência (40 µg/mL) reduziu de forma significativa o índice de proliferação da subpopulação de TCD4. Para certificar os resultados encontrados neste ensaio, o teste de viabilidade pelo método de exclusão de azul de Tripán (0,4%) foi realizado, mostrando que os efeitos inibitórios dos extratos frente a proliferação de linfócitos não estavam relacionados a eventos de morte.

Estudo realizado por Barroso (2015) mostrou potencial efeito antiproliferativo do extrato das folhas/flores na concentração de 45 µg/mL e do extrato do caule de *M. ferruginata* nas concentrações de 15, 20 e 30 µg/mL. O percentual de eficácia foi de 39,94%, 57,3%, 137,4% e 251,8%, respectivamente. Este estudo revelou um alto potencial antiproliferativo do extrato do caule com uma inibição 2.5 vezes maior em comparação a dexametasona (8 µg/mL).

O presente estudo corrobora a atividade antiproliferativa dos extratos de *Miconia ferruginata*, especialmente para os extratos etanólicos brutos de *M. ferruginata* os quais não haviam sido estudados até o momento. Foi ainda verificado que o extrato etanólico bruto de inflorescência obteve melhor redução do percentual de linfócitos e da sua subpopulação TCD4. As células T caracterizam a atividade efetora auxiliar na ativação de outros subtipos celulares, principalmente, através da secreção de citocinas e ação

efetora frente as células alvos. Os linfócitos TCD4 produzem citocina IL-2, que induz a proliferação de linfócitos, além de aumentar a capacidade citotóxica dos linfócitos TCD8 (JUNIOR *et al.*, 2010). A citocina IL-2 é considerada principal fator estimulador de células T, promovendo a proliferação de linfócitos e ativação de sua subpopulação, sendo produzida principalmente por linfócitos TCD4 (JUNIOR *et al.*, 2010). Assim, o efeito antiproliferativo dos extratos de *M. ferruginata* sobre os linfócitos pode ser compreendido em parte com a avaliação dos efeitos dos extratos sobre a produção da citocina IL-2.

A avaliação do efeito dos extratos sobre a produção de citocinas, revelou uma possível correlação do efeito antiproliferativo com a inibição da produção da citocina IL-2 para o extrato de inflorescência, apresentando eficácia de 15,13% quando comparado a CSA. Importante destacar que apenas o extrato de inflorescência reduziu a proliferação da subpopulação de linfócitos TCD4. Contudo, não foi observada redução significativa para TNF- α , IFN- γ e IL-2 nas culturas tratadas com os outros extratos de *M. ferruginata*, podendo estar o efeito antiproliferativo associado a outro mecanismo de ação.

Dessa forma, o efeito do extrato de inflorescência de *M. ferruginata* na redução da produção de IL-2 pode estar relacionado ao seu efeito sobre proliferação de linfócitos totais e subpopulações TCD4 e TCD8. A diferença no efeito dos extratos de *M. ferruginata* frente a produção de citocina observada, especificamente para IL-2 a qual apenas o extrato de inflorescência apresentou inibição significativa, pode estar associada a composição química desses extratos, que precisa ser melhor investigada. Contudo, vale ressaltar que, apesar da ausência de significância para a redução das citocinas pró-inflamatórias, houve uma redução relativa desses dados quando comparado a cultura controle estimulada. Esse menor efeito pode ter ocorrido devido as baixas concentrações usadas dos extratos ou ao baixo tempo de exposição ao tratamento.

Resultado similar foi observado por Santos (2018), quando avaliou extratos etanólicos de partes aéreas e de raízes de *Eriosema campestre*. Eles inibiram a proliferação de linfócitos totais e de suas subpopulações, reduziram a produção e expressão gênica de IL-2, mas não tiveram efeito sobre a produção das citocinas IFN- γ , TNF- α e IL-10. As atividades apresentadas foram correlacionadas as substâncias da classe dos flavonoides presentes na planta.

Conseqüentemente, o efeito antiproliferativo dos extratos etanólicos de *M. ferruginata* pode também estar correlacionado às substâncias identificadas na planta, como compostos fenólicos e triterpenos, visto que tem apresentado efeitos anti-inflamatórios descritos na literatura (OLIVEIRA, 2010; BARROSO, 2015; BARROSO;

OTONI; GREGÓRIO, 2017; CHEN *et al.*, 2017; CRUZ, 2017; YAHFOUF *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2020). Corroborando essa hipótese, tratamento com os triterpenos ácido ursólico e ácido oleanoico em animais infectados com formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* foi capaz de diminuir as de INF- γ e aumentar dos níveis séricos de IL-10 (FERREIRA, 2010). Ainda, tratamento oral com ácido ursólico em camundongos Balb/c artríticos apresentou efeito inibitório na produção de citocinas pró-inflamatórias, IL-2, INF- γ e TNF- α (AHMAD *et al.*, 2006). Pré-tratamento com ácidos ursólico ou oleanólico em linhagem celular de feocromocitoma (PC12) aumentou atividade de SOD catalase e reduziu a liberação de IL-6 e TNF- α induzida por iodeto de 1-metil-4-fenilpiridínio (MPP+) ou peróxido de hidrogênio (H₂O₂), compostos tóxicos capazes de causar estresse oxidativo e apoptose da célula. Devido a ação antioxidante e anti-inflamatória observadas pelos ácidos ursólico e oleanólico, esses compostos foram agentes potentes contra distúrbios degenerativos (TSAI; YIN, 2008).

A atividade anti-inflamatória dos triterpenoides ácidos oleanólico e ursólico têm sido relacionados a interação com as isoformas da ciclooxigenase, com inibição da COX-2, atuando na supressão da resposta inflamatória (RINGBOM *et al.*, 1998; MAGALHAES, 2010; SILVA, 2016).

O potencial anti-inflamatório observado em nosso estudo pode estar relacionado também aos conteúdos de flavonoides totais, uma vez que foi identificado compostos fenólicos totais nos extratos brutos de *M. ferruginata* (OLIVEIRA, 2010; BARROSO, 2015; CRUZ, 2017), esses compostos estão envolvidos na modulação da expressão de fatores nos processos inflamatórios, como as citocinas (GANDHI *et al.*, 2018; YAHFOUF *et al.*, 2018). Importante destacar que o extrato de inflorescência de *M. ferruginata* apresentou melhor atividade antiproliferativa e inibição da produção da citocina IL-2, e obteve maior teor de compostos fenólicos. Kim *et al.* (2004) propuseram que a atividade anti-inflamatória dos flavonoides se dá através da inibição de eicosanoides em gerar enzimas incluindo fosfolipase A2, ciclooxigenases reduzindo então a concentração de prostaglandinas e leucotrienos. Estudo realizado por Lima *et al.* (2020) mostrou efeito anti-inflamatório no edema de pata em camundongos induzido por carragenina com tratamento oral de extrato de *M. albicans nas* concentrações de 25, 50 e 100 mg/kg, com redução nos níveis de TNF- α e IL-1 β . A atividade analgésica e anti-inflamatória foi relacionada a presença de flavonoides, como a quercetina. Estudos com extrato de *M. ferruginata* mostraram eficácia na inibição dose-dependente das espécies reativas produzidas pelo *burst* oxidativo em neutrófilos, a qual foi relacionado a presença de

compostos fenólicos e outros metabólitos presentes nos extratos (LIMA, 2016; CRUZ, 2017).

Outras espécies do gênero *Miconia* tem demonstrado efeito anti-inflamatório e antioxidante (VASCOLCELOS *et al.*, 2006; GATIS CARRAZZONI *et al.*, 2018), e estudos fitoquímicos mostram os flavonoides e triterpenos como principais constituintes do gênero (CUNHA, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2007; CUNHA, 2010; OLIVEIRA, 2010; BARROSO; OTONI; GREGÓRIO, 2017; CUNHA; CRUZ; MENEZES 2019; LIMA, 2020), que apontam para uma importante participação destes compostos nas atividades registradas também para a *Miconia ferruginata*.

Em resumo, os resultados obtidos mostram um potencial dos extratos de *M. ferruginata* em relação a atividade anti-proliferativa e antioxidante, que pode estar correlacionada a presença de compostos fenólicos e/ou triterpenos, sendo necessário maiores investigações e avanços no conhecimento fitoquímico desta planta para comprovação da provável associação destas atividades. Ainda, no presente trabalho não foi avaliado o efeito dos extratos sobre outras citocinas como IL- 6, IL- 12 e IL-17 que são citocinas essenciais na resposta imunológica. Além disso, efeitos dos extratos brutos de *M. ferruginata* sobre outros mediadores inflamatórios devem ser investigados, tais como óxido nítrico e produtos das cicloogenases (COX). Devido a restrição de estudos em relação a atividade anti-inflamatória, especificamente na resposta inflamatória de *M. ferruginata*, torna-se necessário outros ensaios tanto com os extratos quanto com frações e/ou substâncias isoladas a fim de realizar maior investigação do efeito biológico.

7. CONCLUSÃO

No presente estudo os extratos etanólicos brutos de *M. ferruginata* mostraram atividade antiproliferativa, a inibição da proliferação de linfócitos pelo extrato de inflorescência parece estar associada à inibição da citocina mitogênica IL-2. É provável que a atividade antioxidante observada possa estar relacionada a presença de compostos fenólicos e outras substâncias antioxidantes nos extratos brutos de folhas, caule, inflorescência e casca. Contudo, não foi possível elucidar ainda os prováveis mecanismos de ação anti-proliferativa e/ou anti-inflamatória destes extratos e futuras avaliações do potencial biológico de *M. ferruginata* ainda deverão ser realizadas com o emprego de outros ensaios *in vitro* e modelos animais podem contribuir para verificação desse potencial e, inclusive, avaliar as frações e possíveis substâncias purificadas.

REFERÊNCIAS

AHMAD, S.F. *et al.* Amelioration of adjuvant-induced arthritis by ursolic acid through altered Th1/Th2 cytokine production. **Pharmacol Res.** n. 53, v. 3, p. 233-40, 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16406805/>. Acesso em: 20 abr. 2021

ALBUQUERQUE, L. B. *et al.* Espécies de Melastomataceae Juss. com potencial para restauração ecológica de mata ripária no cerrado. **Polibotânica.** n. 35, p. 1–19. 2013. Disponível em: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-27682013000100001. Acesso em: 10 abr. 2021

ALEXANDRE, R. F.; BAGATINI, F.; SIMÕES, C. M. O. Potenciais interações entre fármacos e produtos à base de valeriana ou alho. **Revista Brasileira Farmacognesia.** v. 18, p. 455-463, 2008. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2008000300021 Acesso em: 20 maio. 2021

ALMEIDA, V. S.; BANDEIRA, F. F. The cultural significance of use of caatinga plants by Quilombolas of the Raso Catarina, Jeremoabo district, Bahia, Brazil. **Rodriguésia.** v. 61, n. 2, p. 195-209, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rod/v61n2/2175-7860-rod-61-02-0195.pdf>. Acesso em: 08 abr. 2021

ALMEIDA, V.G. **Efeito citotóxico e potencial anti-inflamatório de Pseudobrickellia brasiliensis (Spreng) R, M. King & H. Rob (arnica-do-campo) em células mononucleares do sangue periférico humano, in vitro.** 2012. 72fl. Mestrado Multicêntrico em Ciências Fisiológicas – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2012. Disponível em: <http://acervo.ufvjm.edu.br/jspui/handle/1/716?mode=full> Acesso em: 21 jun. 2020

ALONSO, G. T.; FOMIN, D. S.; RIZZO, L. V. Linfócitos T auxiliares foliculares humanos: células essenciais para a resposta de anticorpos. **einstein (São Paulo).** v. 19, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.31744/einstein_journal/2021RB6077. Acesso em: 09 jun.2021

ALVES, C. Q. *et al.* Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova.** v. 33, n. 10, pag. 2202-2210, 2010. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422010001000033 Acesso em: 22 abr. 2021

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. **Rev Inst Adolfo Lutz.** v. 66, n. 1, p. 232-240, 2007. Disponível em: <http://periodicos.ses.sp.bvs.br/pdf/rial/v66n1/v66n1a01.pdf> Acesso em: 18 jun. 2020.

ARULSELVAN, P. *et al.* Role of Antioxidants and Natural Products in Inflammation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity.** p. 1-15, 2016. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2016/5276130/> Acesso em: 21 jun. 2021.

AVELAR, B. A. *et al.* The crude latex of *Euphorbia tirucalli* modulates the cytokine response of leukocytes, especially CD4⁺ T lymphocytes. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v. 21, p.662-667, 2011. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2011000400015 Acesso em: 22 abr. 2021

AVELAR-FREITAS, B. A. *et al.* The effect of ethanolic and ethyl acetate extracts of *Ageratum fastigiatum* (Asteraceae) on cytokine production in lymphocytes stimulated in vitro with PMA (Phorbol Myristate Acetate). **Academia Journal of Medicinal Plants**, v. 1, p. 111-15, 2013. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/260480850> Acesso em: 08 abr. 2021

BARBOSA, K. B. F. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev. Nutr.** v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/rn/v23n4/v23n4a13.pdf> Acesso em: 20 abr. 2021

BARJA G. Mitochondrial oxygen consumption and reactive oxygen species production are independently modulated: implications for aging studies. **Rejuvenation Res.** v.10, n. 2, p. 215-224, 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17523876/> Acesso em: 4 jun. 2020

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quím. Nova.** v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422006000100021&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 04 mai. 2021.

BARROSO, P. R. **Fitoquímica e atividades biológicas de *miconia ferruginata* dc. (melastomataceae)**. 2015. 255 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2015. Disponível em: <http://acervo.ufvjm.edu.br/jspui/handle/1/759> Acesso em: 17 mai. 2019

BARROSO, P. R.; *et al.* Biological activity and chemical composition of the ethanolic extracts Of *Miconia ferruginata* DC. **Brazilian Journal of Development.** v.7, n.4, p.37798-37819, 2021. Disponível em: <https://www.brazilianjournals.com/index.php/BRJD/article/view/28109/22255>. Acesso em: 17 mai. 2021

BARROSO, P. R.; OTONI, T. J. O.; GREGÓRIO, L. E. Analysis of Volatiles from Aerial Parts of *Miconia ferruginata* by HS-SPME and GC-MS. **Chem. Natl Comp.**, v.1, n.53, p.167-168, 2017. Disponível em: <https://www.semanticscholar.org/paper/Analysis-of-Volatiles-from-Aerial-Parts-of-Miconia-Barroso-Otoni/2d2691db55653ead238b85187b8ba1718f36bf41> Acesso em: 08 abr. 2021

BATISTA- SIQUEIRA, R. *et al.* Linfócitos T CD4⁺CD25⁺ e a regulação do sistema imunológico: perspectivas para o entendimento fisiopatológico da sepse. **Rev Bras Ter Intensiva.** v. 24, n. 3, p. 294-30, 2012. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/rbti/a/vYrsx9hFM4nxjYdgBXnRmNt/?lang=pt&format=pdf>
Acesso em: 29. jun. 2021

BIANCHI, M. D. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev. Nutr.**, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rn/a/bzHBTqBfJr8jmJn3ZXx9nMs/?lang=pt&format=pdf>
Acesso em: 10. jun. 2021.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nat Immunol.** v. 2, n. 10, p. 907-16, 2001 Disponível em: <https://www.nature.com/articles/ni1001-907> Acesso em: 20 abr. 2021.

BONILLA, F. A.; OETTGEN, H. C. Adaptive immunity. **J Allergy Clin Immunol.** v. 125, (2 Suppl 2):S33-40, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20061006/> Acesso em: 21 jun. 2021

BOSIO, G. N. *et al.* Antioxidant b-carotene does not quench singlet oxygen in mammalian cells. **J Am Chem Soc.** v. 135, n.1, p. 272–279, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23231017/> Acesso em: 20 jun.2020

BOUAYED, J.; BOHN, T. Exogenous antioxidants Double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity.** v.3, n. 4, p. 228–237, 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20972369> Acesso em: 07 mai. 2021

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política Nacional de plantas medicinais e fitoterápicos. Brasília: Ministério da Saúde**, 2006. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_fitoterapicos.pdf Acesso em: 17 maio. 2021

BRUNING, M. C. R.; MOSEGUI, G.B.G. Vianna, C. M. M. A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu – Paraná: a visão dos profissionais de saúde. **Ciência & Saúde Coletiva.** v. 17, n. 10, p. 2675-2685, 2012. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/csc/a/z6RsN7j4bRKfM8Lq8tQNX4N/?lang=pt&format=pdf>. Acesso em: 27 mai. 2021

CAMPOS, M. G. *et al.* Age-induced diminution of free radical scavenging capacity in bee pollens and the contribution of constituent flavonoids. **J Agric Food Chem.** v. 51, n. 3, p. 742-5, 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12537451/>. Acesso em: 27 mai. 2021

CAMPOS, P. C. L.; AVELAR-FREITAS, B. A. Plantas Medicinais Utilizadas na Região de Diamantina (MG), Cerrado e Campo Rupestre da Serra do Espinhaço (MG). **Ensaio Cienc.** v.22, n.1, p.63-67, 2018. Disponível em: <https://revista.pgskroton.com/index.php/ensaioeciencia/article/view/5861> Acesso em: 20 abr. 2021

CARAMORI, S.S.; LIMA, S. C.; FERNANDES, K. F. Biochemical characterization of selected plant species from Brazilian Savannas. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 47, n. 2, p. 253–259, 2004. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516-89132004000200013&script=sci_abstract Acesso em 20 maio. 2021

CAREY, A. L.; FEBBRAIO M. A. Interleukin-6 and insulin sensitivity: friend or foe. **Diabetologia**: v. 47, n. 7, p.1135-42, 2004. Disponível em; <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15241593/> Acesso em: 27 jul. 2021

CATHCART, M. K.; MOREL, D.W.; CHISOLM, G. M. Monocytes and neutrophils oxidize low density lipoprotein making it cytotoxic. **J Leukoc Biol** v. 38, n. 2, p. 341–350. 1985. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3861749/> Acesso em: 13 jun. 2021

CELOTTO, A. C. *et al.* Avaliação da atividade antimicrobiana in vitro de extratos brutos de três espécies de Miconia. **Braz. J. Microbiol.**v.34, n.4, p.339-340, 2003. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjm/a/HZ7Pm34YDWkxdkwcvRBxN/abstract/?lang=pt> Acesso em: 13 set. 2020

CERUTTI, P.A. Oxidant stress and carcinogenesis. **European Journal of Clinical Investigation, Oxford**. v.21, n.1, p.1-5, 1991. Disponível em; <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1907547/> Acesso em: 4 jun. 2020

CERUTTI, P.A. Oxy-radicals and cancer. **Lancet, London**. v.344, n. 8926, p.862-863, 1994. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7916406/> Acesso em: 4 jun. 2020

CHAMUSCA, FV; REIS, SRA; LEMAIRE, D; MEDRADO, AP. Mediadores do efeito sistêmico do processo inflamatório e terapias fotobiomoduladoras: uma revisão de literatura. **R. Ci. med. biol.** Salvador, v.11, n.1, p.70-78, jan./abr. 2012. Disponível em: <http://www.portalseer.ufba.br/index.php/cmbio/artic le/view/5705/4456>. Acesso em: 25 mai. 2021

CHAN, WR; SHEPPARD, V.; MEDFORD, K.; TINTO, WF; REYNOLDS, WF; MCLEAN, S. Triterpenes de *Miconia stenotachya*. **J. Nat. Prod.** v. 55, p. 963–966, 1992. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np50085a020> Acesso em: 20 maio. 2020

CHEN, L. *et al.* Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. **Oncotarget**. v. 9, n. 6, p.7204-7218, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5805548/> Acesso em: 21 jun. 2021

CHEN, L. Intracellular signaling pathways of inflammation modulated by dietary flavonoids: The most recent evidence. **Crit Rev Food Sci Nutr**. v. 58, n. 17, p. 2908-2924, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28682647/> . Acesso em: 21 jun. 2021

CHUNG-MAN, H. J. *et al.* Differential expression of manganese superoxide dismutase and catalase in lung cancer. **Cancer Res.** v. 61, n. 23, p. 8578-8585, 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11731445/> Acesso em: 19 jun.2021

CLARK, R.; KUPPER, T. Old meets new: the interaction between innate and adaptive immunity. **J Invest Dermatol.** v. 125, n. 4, p. 629-37, 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16185260/> Acesso em: 20 abr. 2021

CÓRDOBA, M. A. M. **Avaliação da atividade citotóxica in vitro dos extratos vegetais de *Pseudobrickellia brasiliensis* (Spreng) R. M. King & H. Rob, *Miconia ferruginata* DC e *Ageratum fastigiatum* (Gardn.) R. M. King sobre células tumorais Jurkat.** 2017. 123 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2017. Disponível em: <http://acervo.ufvjm.edu.br/jspui/handle/1/1564> Acesso em: 16 mai. 2021

CORRÊA, P. M. M. G. **Toxicidade aguda e efeito anti-inflamatório do extrato das folhas de *Miconia ferruginata* dc. em modelo experimental da distrofia muscular de duchenne.** 102p. Dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas, UFVJM, Diamantina, MG, 2020. Disponível em: http://acervo.ufvjm.edu.br/jspui/bitstream/1/2501/1/paula_mariana_munno_guimaraes_correa.pdf Acesso em: abr. 2021

COTINGUIBA, G. G. *et al.* Método de Avaliação da Defesa Antioxidante: Uma Revisão de Literatura. **UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde.** v. 15, n.3, p.231-237, 2013. Disponível em: <https://revista.pgskroton.com/index.php/JHealthSci/article/view/684> Acesso em: 4 junho 2020

COUTINHO, M. A. S; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Rev. Virtual Quim.** v.1, n. 3, p. 241-256, 2009. Disponível em: <http://www.uff.br/RVQ/index.php/rvq/article/view/51/98>. Acesso em: 04 mai. 2013

CRUVINEL, W. M. *et al.* Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Rev. Bras. Reumatol.** v. 50, n. 4, p. 434-447, 2010. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0482-50042010000400008&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 05 mai. 2021

CRUZ, A. M.; KAPLAN, M. C. Uso Medicinal de Espécies das Famílias Myrtaceae e Melastomataceae no Brasil. **Revista de Floresta e Ambiente,** v. 11, n. 1, p. 47-52, 2004. Disponível em: <http://s3.amazonaws.com/host-article-assets/floram/588e2208e710ab87018b460c/fulltext.pdf> Acesso em: 8 abr. 2021

CRUZ, D. B. **Atividade Antioxidante e Citotoxicidade de Plantas do Campo Rupestre Brasileiro: *Gomphrena arborescens* L.f., *Gomphrena virgata* Mart., *Miconia ferruginata* DC. e *Vochysia elliptica* Mart.** 106p. Dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFVJM, Diamantina, MG,

2017. Disponível em: <http://acervo.ufvjm.edu.br/jspui/handle/1/1619> Acesso em: 17 maio. 2021

CRUZ, M. *et al.* Uso de Plantas Medicinais por Famílias do Vale do Jequitinhonha, Minas Gerais, Brasil. **Infarma - Ciências Farmacêuticas**. v. 27, p. 38-48, 2015.

Disponível em:

https://www.researchgate.net/publication/277655879_Uso_de_Plantas_Medicinais_por_Familias_do_Vale_do_Jequitinhonha_Minis_Gerais_Brasil. Acesso em: 28 abr. 2021

CUNHA, *et al.* In vitro trypanocidal activity of triterpenes from Miconia species.

Planta Med. v. 69, n. 5, p. 468–470, 2003. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12802734>. Acesso em: 8 abr. 2021

CUNHA, W. R. *et al.* In vitro inhibition of tumor cell growth by Miconia fallax. **Pharm Biol.** v.46, p. 292–294, 2008. Disponível em:

<https://doi.org/10.1080/13880200701741245> Acesso em: 8 abr. 2019

CUNHA, G. O. S. *et al.* Isolated Compounds and Semi-Synthetic Derivatives from Miconia ferruginata as Inhibitors of Cathepsins K and B and their Cytotoxic Evaluation.

Rev. Virtual Quim. v. 12, n. 5, p. 1-9, 2020. Disponível em:

<http://static.sites.sbq.org.br/rvq.sbq.org.br/pdf/RVq110820-a1.pdf> Acesso em: 19 dez. 2020

CUNHA, G. O. S.; CRUZ, D. C.; MENEZES, A. C. S. An Overview of Miconia genus: Chemical Constituents and Biological Activities. **Pharmacog Rev.** 2019; v. 13, n. 26, p.77-88, 2019. Disponível em:

<https://www.phcogrev.com/sites/default/files/PharmacogRev-13-26-77.pdf> Acesso em: 19 dez. 2020

CUNHA, W. R. *et al.* A study of the trypanocidal activity of triterpene acids isolated from Miconia species. **Phytotherapy Research**. v. 20, n. 6, p. 474-8, 2006. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ptr.1881>. Acesso em: 02 jun. 2020

CURFS, J. H.; MEIS, J. F.; HOOGKAMP-KORSTANJE, J.A. A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. **Clin Microbiol Rev.** 1997;10, n. 4, :742-780. Disponível em: Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC172943/> Acesso em: 23 jul. 2020

CRAVOTTO, G.; BOFFA, L.; GENZINI, L.; GARELLA, D. Phytotherapeutics: an evaluation of the potential of 1000 plants. **J Clin Pharm Ther.** v. 35, n. 1, p. 11-48, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20175810/> Acesso em: 04 ag. 2021.

CZAJA AJ. Inflamação hepática e fibrose hepática progressiva na doença hepática crônica. **Mundo J Gastroenter.** v. 20, n. 10, p.2515–2532, 2014. Disponível Em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3949261/#:~:text=Chronic%20liver%20inflammation%20drives%20hepatic,by%20their%20anti%20inflammatory%20actions> Acesso em: 23 abr. 2021

DALLA V. L.; GNOATTO, S. C. B.; GOSMANN, G. Derivados oleananos e ursanos e sua importância na descoberta de novos fármacos com atividade antitumoral, anti-inflamatória e antioxidante. **Quím. Nova**. v. 32, n. 5, p. 1245-1252, 2009. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422009000500031&lng=en&nrm=isso. Acesso em: 20 abr. 2021

DANTAS, *et al.* *Miconia Albicans* (SW.): Tratamento de doenças inflamatórias ARTICULARES. **Mostra Científica da Farmácia**. v. 4, n. 2, 2018. Disponível em: <<http://publicacoesacademicas.unicatolicaquixada.edu.br/index.php/mostracientificafarmacia/article/view/2316/1888>>. Acesso em: 08 abr. 2021

DATTA, S. *et al.* Correlation of oxidant status with oxidative tissue damage in patients with rheumatoid arthritis. **Clin Rheumatol**. v. 33, n. 11, p. 1557–1564, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24718487/#:~:text=Taken%20together%2C%20in%20patients%20with,monitoring%20disease%20severity%20in%20RA>. Acesso em: 14 jun. 2020

DE OLIVEIRA, A.C. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Quim. Nova**. v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/D7W5ZmntbhMyt5G9FNwvpLr/?lang=pt&format=pdf>. Acesso em: 15 jun. 2021

DEGASPERI, G. R. Polarização de linfócitos: Relevância fisiopatológica de Th9 e Th17. **Saúde (Santa Maria)**. v. 44, n. 2, p. 1-9, 2018. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/327924835_Polarizacao_de_linfocitos_Relevancia_fisiopatologica_de_Th9_e_Th17 Acesso em: 10 jun. 2021

DOS SANTOS, F. M. *et al.* Avaliação da actividade antimicrobiana de extractos de *Tibouchina candolleana* (Melastomataceae), compostos isolados e os derivados semi-sintéticos contra bactérias endodontia. **Braz. J. Microbiol**. v. 43, p. 793-799, 2012. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822012000200045 Acesso em: 20 maio. 2020

DREHER, D.; JUNOD, A. F. Role of oxygen free radicals in cancer development. **Eur J Cancer**. v. 32, n. 1, p. 30-38, 1996 Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8695238/> Acesso em 4 junho. 2020

EBEGBONI, V. J. *et al.* The effects of flavonoids on human first trimester trophoblast spheroidal stem cell self-renewal, invasion and JNK/p38 MAPK activation: Understanding the cytoprotective effects of these phytonutrients against oxidative stress. **Biochemical Pharmacology**. v. 164, p. 289-298, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31022396> Acesso em: 29 abr. 2019

EBRAHIMI, F.; TORBATI, M.; MAHMOUDI, J.; VALIZADEH, H. Medicinal Plants as Potential Hemostatic Agents. **J Pharm Pharm Sci**. v. 23, n. 1, p. 10-23, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32027817/> Acesso em: 08 ag. 2021.

FARZAEI, M. H. Poisoning by Medical Plants. **Arch Iran Med.** v. 23, n. 2, p. 117-127, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32061075/> Acesso em: 04 ag. 2021.

FERNANDES, K. P. S. Infecções odontogênicas: abordagem imunológica. **ConScientiae Saúde**, v. 3, p. 85-94. São Paulo: UNINOVE, 2004. Disponível em: http://www.uninove.br/PDFs/Publicacoes/conscientiae_saude/csauade_v3/cnsv3_kristiannefernandes.pdf. Acesso em: 27 ago. 2013

FERREIRA, D. S. **Propriedades terapêuticas de triterpenos ácidos na doença de Chagas experimental – avaliação em fase aguda da infecção.** 2010. 131 f. Tese (Doutorado em Biociências aplicadas à Farmácia) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60135/tde-01072010-134659/pt-br.php> Acesso em 20 mai. 2021

FERREIRA, J.; DE MESQUITA, H.; ARAGÃO, D. M.; BASTOS, C. O sistema imunológico e a autoimunidade. **Revista Científica do UBM**, v. 20, n. 39, p. 40-58, 2018. Disponível em: <http://revista.ubm.br/index.php/revistacientifica/article/view/950> Acesso em: 08 jun. 2021.

FRANCA, I. S. X. *et al.* Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. **Rev. bras. enferm.** v. 61, n. 2, p. 201-208, 2008. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-71672008000200009&lng=en&nrm=iso Acesso em: 28 abr. 2021

FURMAN, D. *et al.* Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. **Nat Med.** v. 25, n. 12, p.1822-1832, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7147972/> Acesso em: 20 jun. 2021.

GANDHI, G. R. *et al.* Flavonoids as Th1/Th2 cytokines immunomodulators: A systematic review of studies on animal models. **Phytomedicine.** n. 44, p. 74-84, 2018 Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29895495/> Acesso em: 15 abr. 2021

GATIS-CARRAZZON, A. S. G. *et al.* Anti-inflammatory and antinociceptive activities of the leaf methanol extract of *Miconia minutiflora* (Bonpl.) DC. and characterization of compounds by UPLC-DAD-QTOF-MS/MS. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology** v. 392, p. 55–68, 2019. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00210-018-1561-x> Acesso em: 21 jun. 2021

GLOBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quim. Nova.** v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/gn5mhqcFHSbXXgTKNLJTS9t/?lang=pt> Acesso em: 03 jul. 2021

GOLDENBERG, R. **O gênero Miconia RUIZ & PAV. (Melastomataceae).** 2000. 249 p. Tese de Doutorado em Biologia Vegetal, Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, 2000. Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/314842>. Acesso em: 02 jun. 2021

GOLDENBERG, R.; BAUMGRATZ, J. F. A.; SOUZA, M. L. R. Taxonomy of Melastomataceae in Brazil: retrospective and perspective views, and an identification key for the genera. **Rodriguésia**, v. 63, n. 1, p.145-61, 2012. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rod/a/xSffQNJtSPGc49JP4bcBcKP/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 02 jun. 2021

GOMES, T. P.O. *et al.* *Miconia albicans* and *Curcuma longa* herbal medicines positively modulate joint pain, function and inflammation in patients with osteoarthritis: a clinical study. **Inflammopharmacology**. v. 29, n. 2, p.377-391, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33452967/> Acesso em: 12 abr. 2021

GONÇALVES, ANY D. E. S. S., **Avaliação da capacidade antioxidante de frutas e polpas de frutas nativas e determinação dos teores de flavonoides e vitamina C.** 88p Dissertação (Mestrado em Bromatologia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008. Disponível em: <file:///C:/Users/Artenizia%20Lima/Downloads/dissertacao.pdf> Acesso em: 22 abr. 2019

GONTIJO, D. C. *et al.* Antioxidant study indicative of antibacterial and antimutagenic activities of an ellagitannin-rich aqueous extract from the leaves of *Miconia latecrenata*. **J Ethnopharmacol**. v. 236, p. 114-123, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30853643/> Acesso em: 20 abr. 2020

GORRIL, L. E. *et al.* Risco das plantas medicinais na gestação: uma revisão dos dados de acesso livre em língua portuguesa. **Arquivos de Ciência da Saúde UNIPAR**, Umarama, v. 20, n. 1, 2016. Disponível em: < <http://revistas.unipar.br/index.php/saude/article/view/5515/3282>>. Acesso em: 22 jun. 2021

GOUVEIA, S. S.; LIMA, A. A. Relação entre espécies reativas de oxigênio e a promoção carcinogênica. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**. v.20, n.3, p.174-179, 2017. Disponível em: https://www.mastereditora.com.br/periodico/20171001_161829.pdf Acesso em: 22 jun. 2021

GUAN, G.; LAN, S. Implications of Antioxidant Systems in Inflammatory Bowel Disease. **BioMed Research International**, 2018 Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2018/1290179> Acesso em: 09 jun. 2021

GUERRIERO, J. L. Macrophages: Their Untold Story in T Cell Activation and Function. **Int Rev Cell Mol Biol**. v. 342, p. 73-93, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30635094/> Acesso em: 21 jun. 2021

GUO, Q. *et al.* Oxidative stress, nutritional antioxidants and beyond. **Sci China Life Sci**. v. 63, n. 6, p. 866-874, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31705360/>. Acesso em: 21 jun. 2021

HALLIWELL B. Antioxidants in human health and disease. **Ann Rev Nutr**. v. 16, p. 33–50, 1996. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8839918/> Acesso em: 15 abr. 2021.

- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in biology and medicine. **3.ed. New York: Oxford**, 1999. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/journal/free-radical-biology-and-medicine> Acesso em: 18 jun. 2020.
- HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiol.** v. 141, n. 2, p. 312-322, 2006. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1475431/> Acesso em: 29 jun. 2021.
- HALLIWELL B.; GUTTERIDGE J.M. A definição e medição de antioxidantes em sistemas biológicos. **Free Radic Biol Med.** v. 18, n.1, p. 125-126, 1995. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7896166> Acesso: 27 abr. 2019.
- HARAGUCHI, L.; M.M. Impacto da Capacitação de Profissionais da Rede Pública de Saúde de São Paulo na Prática da Fitoterapia. **Revista brasileira de educação médica.** v. 44, n. 1, p. 1-11, 2020. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbem/a/LhQmyY5gvq6rPct9bdfqzMP/?lang=pt>. Acesso em: 30 jun. 2021
- HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **J Nutr Biochem.** v. 13, n. 10, p. 572-584, 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12550068/> Acesso em: 20 mai. 2020
- HELLINGER, R. *et al.* Immunosuppressive activity of a aqueous *Viola tricolor* herbal extract. **Journal of Ethnopharmacology.**2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2013.10.044>. Acesso em: 20 mai. 2020
- HERNÁNDEZ, A. S. Células colaboradoras (TH1, TH2, TH17) y reguladoras (Treg, TH3, NKT) en la artritis reumatoide. **Reumatol Clin.** v. 5, n. (S1) p. 1–5, 2009. Disponível em: <https://pdf.sciencedirectassets.com/277684/1-s2.0-S1699258X09X00033/1-s2.0-S1699258X09000345/main.pdf> Acesso em: 10 jun. 2021
- HESSLER, J. R.; MOREL, D. W.; LEWIS, L. J.; CHISOL, M. G.M. Lipoprotein oxidation and lipoprotein-induced cytotoxicity. **Arteriosclerosis** v. 3, n. 3, p. 215–222, 1983. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6847521/> Acesso em: 13 jun. 2020
- HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** v. 53, n. 6, p. 1841-1856, 2005. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf030723c> Acesso em: 02 jun. 2019
- HUSSAIN, T. *et al.* Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? **Oxid Med Cell Longev.** 2016:7432797, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27738491/> Acesso em: 21 jun. 2021
- JAMSHIDI-KIA, F.; LORIGOOINI, Z.; AMINI-KHOEI, H. Medicinal plants: Past history and future perspective. **J Herbmed Pharmacol.** v. 7, n. 1, p. 1-7, 2018. Disponível em: <http://herbmedpharmacol.com/Article/jhp-1198> Acesso em: 09 jun. 2021.

JÁUREGUI, A. M. M. *et al.* Evaluación de la capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en recursos vegetales promissórios. **Revista da Sociedade Química do Perú**. v. 73, n. 3, p. 142-149, 2007. Disponível em: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2007000300003. Acesso em: jun. 2021

JOLY, C.A. *et al.* Diagnóstico da Pesquisa em Biodiversidade no Brasil. **Revista USP**. n.89, p. 114-133, 2011. Disponível em: http://rusp.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-99892011000200009&lng=pt Acesso em: 20 mai. 2020

JUNIOR, D.M. *et al.* Sistema imunitário - parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Rev. Bras. Reumatol.** v. 50, n. 5, p. 552-580, 2010. Disponível em: Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbr/a/kPW8JNvSRfRy7RkdZVjW3tw/?lang=pt> Acesso em: 02 jun. 2021

KAUR, B. P.; SECORD, E. Innate Immunity. **Pediatr Clin North Am.** v. 66, n. 5, p. 905-911, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31466680/>. Acesso em: 21 jun. 2021

KEARNEY, C. MARTIN, S. J. An Inflammatory Perspective on Necroptosis. **Molecular Cell**65. p. 965- 973, 2017 Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1097276517301612#bbib28> Acesso em: 8 jun. 2021

KEHRER, J.P.; KLOTZ, L.O. Free radicals and related reactive species as mediators of tissue injury and disease: implications for Health. **Crit Rev Toxicol.** v.45, n. 9, p.765-98, 2015 Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26610815/> Acesso em: 20 abr. 2021

KIM, H. P., *et al.* Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. **J. Pharmacol. Sci.** v. 96, n. 3, p. 229-245, 2004. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15539763?dopt=Abstract> Acesso em: 02 mai. 2021

KIMURA, A.; KISHIMOTO, T. IL-6: Regulator of Treg/Th17 balance, **Eur. J. Immunol.** v. 40, p. 1830–1835, 2010. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/eji.201040391> Acesso em: 09 jun.2021

KINGSTON, D. G; *et al.* Conservação da biodiversidade, desenvolvimento econômico e descoberta de drogas no suriname. **biol. aja. nat. prod. pharm.** p. 39-49, 2000. Disponível em: <https://www.researchgate.net/deref/http%3A%2F%2Fdx.doi.org%2F10.1351%2Fpac200173030595> Acesso em: 20 maio. 2020

KOPAEI, R M. Medicinal plants and the human needs. **J HerbMed Pharmacol.** v. 1, n. 1, p. 1-2, 2021. Disponível em:

https://www.researchgate.net/publication/284850619_Medicinal_plants_and_the_huma_n_needs Acesso em: 09 jun. 2021

KRISHNAIAH, D. SARBATLY. R, NITHYANANDAM, R. A review of the antioxidante potential of medicinal plant species. **Food and Bioproducts Processing**. v. 89, p. 217-233, 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S09603085100005204> Acesso em: 18 mai. 2020

KUNDU J.K.; SURH Y.J. Breaking the relay in deregulated cellular signal transduction as a rationale for chemoprevention with anti-inflammatory phytochemicals. **Mutat. Res**. v. 591, p. 123–146, 2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16102784> Acesso em: 30 abr. 2019

LATSCHA, D. B.; DRUEKE T, SARSAT V.W. Estresse oxidativo induzido por diálise: aspectos biológicos, consequências clínicas e terapia. **ytgk in Dialysis**. v. 14, n. 3, p. 193–199, 2001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1525-139X.2001.00052.x> Acesso em: 27 abr. 2019

LEE, S.H.; LEE, E.; KO, Y.T. Anti-inflammatory effects of a methanol extract from *Pulsatilla koreana* in lipopolysaccharide-exposed rats. **BMB Reposts**. v. 45, n. 6, p. 371-376, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22732224/> Acesso em: 21 jun. 2020

LEITE, T.C.C. **Chemical and pharmacological activity of species of Miconia (Melastomataceae)**. 2016. Thesis (Ph.D.) Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/18558/1/TESE%20TONNY%202016.pdf> Acesso em: 8 abr. 2021

LI, Y. et al. The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. **Plant Physiol Biochem**. v. 148, p.80-89, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31951944/> Acesso em: 4 ag. 2021.

LIMA, F. O., BEZERRA, A. S. Flavonoides e radicais livres. **Disciplinarum Scientia. Série: Ciências Naturais e Tecnológicas**. v. 13, n. 1, p. 111-124, 2012. Disponível em: <https://periodicos.ufn.edu.br/index.php/disciplinarumNT/article/view/1298> Acesso em: 20 mai. 2020

LIMA, P. D. A. **Avaliação da capacidade antioxidante dos extratos etanólicos de plantas do cerrado: *Ageratum fastigiatum* (GARDN.) R. M. KING et H. ROB., *Croton antisiphiliticus* MART., *Kielmeyera rubriflora* CAMB., *Miconia ferruginata* DC., e *Norantea adamantium* CAMB.** 114f. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal dos Vales Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, MG, 2016 Disponível em: <http://acervo.ufvjm.edu.br/jspui/handle/1/1185> Acesso em: 20 mai. 2020

LIMA, T. C. *et al.* Evidence for the involvement of IL--1 β and TNF- α in anti-inflammatory effect and antioxidative stress profile of the standardized dried extract from *Miconia albicans* Sw. (Triana) Leaves (Melastomataceae). **J Ethnopharmacol**. v. 259, p.1-14, 2020, Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378874119348433> Acesso em: 18 abr. 2021

LIN E, CALVANO SE, LOWRY SF - Inflammatory cytokines and cell response in surgery. **Surgery**. v.127, n. 2, p. 117-126, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10686974/> Acesso em: 21 jul. 2020

LIU, Z. *et al.* A dexmedetomidina atenua a reação inflamatória nos tecidos pulmonares de camundongos sépticos, ativando a via anti-inflamatória colinérgica. **Int Immunopharmacol**. v. 35, p. 210-216, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27074053/> Acesso em: 23 jul. 2020

LOBO, V. *et al.* Free radicals, antioxidants and functional foods: impacts on human health. **Pharmacognosy Review**. v. 4, n. 8, p. 118-126, julho/dezembro 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3249911/> Acesso em: 22 abr. 2019

LUSHCHAK, V. I. classification of oxidative stress based on its intensity. **excli journal**. v. 13, p. 922- 937, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26417312/> Acesso em 4 junho. 2020

MACEDO, J. A. B. **Plantas medicinais e fitoterápicos na atenção primária à saúde: contribuição para profissionais prescritores**. 58 p. Monografia de Especialização. Instituto de Tecnologia em Fármacos, FIOCRUZ. RJ, 2016. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/17719/2/12.pdf>. Acesso em: 01 abr. 2021

MACIEL, M. A. M. *et al.* Plantas medicinais: a necessidade de estudo multidisciplinares. **Química Nova**. v.25, p. 429-438, 2002 Disponível em: scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422002000300016. Acesso em: 20 maio 2020

MACIEL, T.A.O. **Estudo da influência de linfócitos T CD8 e das células NK em caso de carcinoma epidermoide de lábio inferior e sua relação com a progressão da lesão**. 2014. 93.f. Dissertação (Mestrado) do Programa de pós-graduação em Patologia Oral do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal (RN), 2014. Disponível em: https://bdtd.ibict.br/vufind/Record/UFRN_68a2792128f8baf27269c53c0ba47426 Acesso em: 20 abr. 2021

MAGALHÃES, W. S. **Modo de interação dos ácidos oleanólico e ursólico com as isoformas da ciclooxigenase através de docking e dinâmica molecular**. 71p. Dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas UFOP, Ouro Preto, MG 2010. Disponível em: <http://livros01.livrosgratis.com.br/cp153480.pdf> Acesso em: 20 abr. 2021

MANCINI, E.; DEMARTINO, L.; BELISARIO, M. A.; DEFEO, V. Flavonoids of *Miconia alypifolia* and their antioxidant activity. **Pharmacology online**. v.2, p. 452-60, 2008. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/285699104_Flavonoids_of_Miconia_alypifolia_and_their_antioxidant_activity. Acesso em: 20 abr. 2021

MARTINS, A. B. Em Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo; Marins, S. E., Wanderley, M. G. L., Shepherd, G. J., Giulietti, A. M., Melhem, T. S., eds.; **Instituto de Botânica**: v. 6, n. 2, 2009. Disponível em: https://www.infraestruturameioambiente.sp.gov.br/institutodebotanica/wp-content/uploads/sites/235/2016/06/FFESP-Volume-I_06_24.pdf. Acesso em: 07mai. 2021

MARTINS, A. B.; SEMIR, J.; GOLDENBERG, R.; MARTINS, E. O gênero *Miconia Ruiz & Pav.* (Melastomataceae) no estado de São Paulo. **Acta Botânica Brasileira**. v. 10, n. 2, p. 267-316, 1996. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abb/a/8nvXjNgf4VDdCPywTx7NzXF/abstract/?lang=pt> Acesso em: 07mai. 2021

MARTINS, Z. C. **Atividade anti-inflamatória dos flavonoides**. 2012. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) - Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10400.26/14109> Acesso em: 07mai. 2021

MATES J. M.; PEREZ-GOMEZ C.; DE CASTRO, I. N. Antioxidant enzymes and human diseases. **Clin Biochem**. v. 32, n. 8, p. 595–603, 1999. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10638941/> Acesso em: 18 jun. 2020

MATTOS, G. *et al.* Plantas medicinais e fitoterápicos na Atenção Primária em Saúde: percepção dos profissionais. **Ciência & Saúde Coletiva**. v. 23, n. 11, p. 3735-3744, 2018. Disponível em: <https://www.scielo.org/pdf/csc/2018.v23n11/3735-3744/pt> Acesso em 08 jun. 2021

MAYER, L. E. Perspectivas laboratoriais na avaliação da resposta inflamatória. **Rev. Bras. Farm.** v. 91, n. 4, p.149-61, 2010. Disponível em: <https://dokumen.tips/documents/perspectivas-laboratoriais-na-avaliacao-da-resposta-inflamatoria.html> Acesso em: 20 abr. 2021

MCCALL, M. R.; FREI, B. Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? **Free Rad Biol Med**. v. 26, n. 7-8 p. 1034–1053, 1999. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10232849/#:~:text=With%20the%20only%20exception%20of,reduces%20oxidative%20damage%20in%20humans.> Acesso em: 18 jun.2020

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**. v. 454, p. 428–435, 2008. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature07201>. Acesso em: 06, mai. 2020

MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. **Cell**. v. 140, n. 6, p. 771–776. 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20303867/> Acesso em: 20 abr. 2021

MEYER J. Y. Observations on the reproductive biology of *Miconia calvescens* DC (Melastomataceae), an alien invasive tree on the island of Tahiti (South Pacific Ocean).

- Biotropica**. v. 30, n. 4, p. 609-624, 1998 Disponível em:
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1744-7429.1998.tb00101.x> Acesso em: 20 mai. 2020
- MOSQUERA, O. M.; CORRERA, Y. M.; NINO, J. Antioxidant activity of plant extracts from Colombian flora. **Rev. bras. farmacogn.** v. 19, n. 2a, p. 382-387, 2009. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/rbfar/v19n2a/a08v192a.pdf> Acesso em: 17 mai. 2021
- NANDI, A. *et al.* Role of Catalase in Oxidative Stress- and Age-Associated Degenerative Diseases. **Oxid Med Cell Longev.** 22019:9613090, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31827713/> Acesso em: 08 jun. 2021
- NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature**. v. 420, p. 846-852, 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12490957/> Acesso em: 20 maio 2021
- NATHAN, C.; DING, A. **Nonresolving Inflammation**. p. 871-882, 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867410001820> Acesso em: 8 jun. 2021
- NAVARRO MOLL, M. C. Uso racional de las plantas medicinales. **Pharmaceutical Care Espana**. v.2, p.9-19, 2000.
- NDJATEU, F. S. T. *et al.* Antimicrobiana e actividades antioxidantes dos extractos e compostos dez de três plantas medicinais camaroneses: *dissotis perkinsiae* (Melastomaceae), *Adenocarpus mannii* (Fabaceae) e *Barteria fistulosa* (Passifloraceae). *S. Afr. J. Bot.* v. 91, p. 37-42, 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0254629913004626> Acesso em: 20 maio. 2020
- NICOLETTI, M.A.; ITO, R.K.; FUKUSHIMA, A.R.; LEANDRO, A.C. Farmacovigilância de drogas vegetais e seus derivados: uma ação necessária e já iniciada para a segurança do paciente, no contexto do uso racional de medicamentos. **Vigilância Sanitária Debate**. v. 3, n. 2, p. 136-143, 2015. Disponível em: <https://visaemdebate.incqs.fiocruz.br/index.php/visaemdebate/article/view/254> Acesso em: 19 maio. 2021
- OCHOA, A.; ROLANDO, F. Lymphocytes Th1 are not exclusive of cellular immunity. **Vaccinmonitor**. v. 23, n. 2, p. 37-40, 2014. Disponível em: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-028X2014000200001&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 09 jun.2021
- OESTREICHER J.; MORGAN, B. Glutathione: subcellular distribution and membrane transport. **Biochemin. Cell Biol.** v. 97, n. 3, :270-289, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1139/bcb-2018-0189>. Acesso em: 08 jun. 2021
- OLIVEIRA, A. P. C. O conhecimento tradicional sobre plantas medicinais no âmbito da saúde da mulher: uma perspectiva no contexto do produto tradicional fitoterápico. **Revista Fitos**, v. 1, n. 62, p. 28- 31, 2016. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/19281/2/5.pdf> Acesso em: 02 mai. 2020

OMS. Organização Mundial de Saúde. **Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005**. 2002. Genebra. 67 p.

OMS - **Organização Mundial de Saúde. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional** - 2014-2023. Disponível em: https://www.who.int/topics/traditional_medicine/WHO-strategy/es/ Acesso em: 02 mai. 2021

OTTONI, M. H. F. **Indução de fluorescência interferente em culturas de linfócitos humanos pelo tratamento com três extratos vegetais**. 95 p. Dissertação de mestrado Programa do Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFVJM, Diamantina, MG. 2017. Disponível em: http://acervo.ufvjm.edu.br/jspui/bitstream/1/1594/1/marcelo_henrique_fernandes_ottoni.pdf. Acesso em: abr. 2021

PAHWA, R. Chronic Inflammation. 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK493173/> Acesso em: 08 jun. 2020.

PEIXOTO, J. A.; *et al.* Antileishmanial Activity of the Hydroalcoholic Extract of *Miconia langsdorffii*, Isolated Compounds, and Semi-Synthetic Derivatives. **Molecules**. v. 16, n. 2, p. 1825-1833, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21343887> Acesso em: 8 abr. 2021

PENNA; COSTA, A. A. B. **Estudo do perfil de citocinas inflamatórias das doenças desmielinizantes adquiridas na faixa etária pediátrica em ambulatório especializado no estado do Rio de Janeiro**. Tese apresentada à Pós-Graduação em Pesquisa Aplicada à Saúde da Criança e da Mulher do Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira, da Fundação Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências. Rio de Janeiro, 2018. Disponível em: https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/34713/2/alessandra_costa_iff_dout_2018.pdf Acesso em: 09 jun. 2021

PIERONI, L. G. *et al.* Antioxidant Activity and Total Phenols from the Methanolic Extract of *Miconia albicans* (Sw.) Triana Leaves. **Molecules. Basel: Mdpi Ag**, v. 16, n. 11, p. 9439-9450, 2011. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/8196> Acesso em: 16 mai. 2019

PIETTA, P. G. **Flavonoids as Antioxidants**. **J. Nat. Prod.** v. 63, n. 7, p. 1035–1042, 2000. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10924197> Acesso em: 27 abr. 2019

PIRIZ, M. A. *et al.* Uso de plantas medicinais: impactos e perspectivas no cuidado de enfermagem em uma comunidade rural. **Rev. Eletr. Enf.** v. 15, n. 4, p.992-999, 2013. Disponível em: <https://revistas.ufg.br/fen/article/view/19773/15729> Acesso em: 17 maio. 2019

PIZA, A.C.M.T. **"Isolamento, identificação fenogenotípica e potencial bioativo de microrganismos endofíticos intrinsecamente associados à *Miconia albicans* no Cerrado de São Carlos-SP."** (2009) Dissertação de mestrado apresentada ao Programa

de Pós-Graduação em Biotecnologia. p. 1 – 70. Disponível em: <https://text-br.123dok.com/document/zlgm3roy-isolamento-identificacao-fenogenotipica-potencial-bioativo-de-microrganismos-endofiticos-intrinsecamente-associados-a-miconia-albicans-no-cerrado-de-sao-carlos-sp.html> Acesso em: 16 mai. 2021.

QUINTANS-JÚNIOR, L. J. *et al.* Dereplication and quantification of the ethanol extract of *Miconia albicans* (Melastomaceae) by HPLC-DAD-ESI/MS/MS, and assessment of its anti-hyperalgesic and anti-inflammatory profiles in a mice arthritis-like model: Evidence for involvement of TNF- α , IL-1 β and IL-6. **J Ethnopharmacol.** v. 10, 258:112938, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32387232/> Acesso em: 21 jun. 2021

RAEBURN, C. D. *et al.* - Cytokines for surgeons. **Am J Surg.** 2002; v. 183, n. 3, p.268-273. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11943124/#:~:text=Surgical%20patients%20are%20a%20stew,stories%20and%20some%20crushing%20disappointments>. Acesso em: 24 jul.2020

RAHMAN K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. **Clin Interv Aging.** v. 2, n. 2, p.219-236, 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2684512/> Acesso em: 20 jun. 2021

RENNER, S.S. **Melastomataceae (Black Mouth Family), Flowering plants of the neotropics.** In The New York Botanical Garden (N. Smith, S.A. Mori, A. Henderson, D.W.M. Stevenson & S.V. Heald, eds). **Princeton University Press, Princeton**, p.240-243, 2004

REZENDE, A. R.; ROMERO, R.; GOLDENBERG, R. Sinopse de *Miconia* seção *Miconia* DC. (Melastomataceae) no estado de Minas Gerais, **Brasil.Biosci. J.** Uberlândia, v. 30, n. 1, p. 273-287, 2014. Disponível em: <http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/18141/13710>. Acesso em: 20 jun. 2021

RIBEIRO, S. M. R. *et al.* A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Biosci. J.** Uberlândia, v. 21, n.3, p.133-149, 2005. Disponível em: <http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/6617/4350> Acesso em: 02 jun. 2021

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure–antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine.** v. 20, v. 7, p. 933– 956, 1996 Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0891584995022279> Acesso em: 20 abr. 2021

RINCON, A. J. M. **Estratégias para a inativação de células t regulatórias por silenciamento gênico transcricional de foxp3 para potencializar a imunidade antitumoral.** Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Ciências na área de concentração da clínica medica. P. 172. CAMPINAS,

2017. Disponível Em: <http://repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/334021> Acesso em: 10. jun. 2021

RINGBOM, T.; SEGURA, L.; NOREEN, Y.; PERERA, P.; BOHLIN, L. Ursolic Acid from *Plantago major*, a Selective Inhibitor of Cyclooxygenase-2 Catalyzed Prostaglandin Biosynthesis. **J. Nat. Prod.** v. 61, p. 1212-1215, 1998. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9784154/> Acesso em: 20 abr. 2021

RODRIGO, R.; GUICHARD, C.; CHARLES, R. Clinical pharmacology and therapeutic use of antioxidant vitamins. **Fundam Clin Pharmacol.** v. 21, n. 2, p. 111-27, 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17391284/> Acesso em: 20 abr. 2021

RODRIGUES, J. *et al.* Antimicrobial activity of *Miconia* species (Melastomataceae). **J Med Food.** 2008 v.11, n. 1, p. 120-26. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18361747> Acesso em: 25 mai. 2019

RODRIGUES, J. **Uso sustentável da biodiversidade brasileira: prospecção químico-farmacológica em plantas superiores: *Miconia* spp.** 2007. 154 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, 2007. Disponível em: https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/97996/rodrigues_j_me_araiq.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Acesso em: 10 abr. 2019

ROMERO, R.; MARTINS, A. B. Melastomataceae do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. **Rev. bras. Robô.** v. 25, n. 1, p. 19-24, 2002. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-84042002000100004&script=sci_abstract&tlng=pt Acesso em: 10 abr. 2019

ROVER, J. R. L.; HOEHR, N.F.; VELLASCO, A.P. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutathiona associado à métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Quím Nova.** v. 24, n.1 p. 112-9, 2001. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422001000100019&script=sci_abstract&tlng=pt Acesso em: 20 abr. 2021

RUBIO-PEREZ, MIGUEL J. e MORILLAS-RUIZ J. M. **A Review: Inflammatory Process in Alzheimer's Disease, Role of Cytokines.** The Scientific World Journal, v. 15, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3330269/> Acesso em: 22 jul. 2020

SAKAGUCHI, S. *et al.* FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. **Nat Rev Immunol.** v. 10, n.7, p. 490-500, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20559327/> Acesso em: 09 jun.2021

SANTANA, M. A.; ESQUIVEL-GUADARRAMA F. Cell biology of T cell activation and differentiation. **Int Rev Cytol.** v. 250, p. 217-74, 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16861067/> . Acesso em: 21 jun. 2021

SANTANGELO, C. *et al.* Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanità**, v. 43, n. 4, p. 394-405, 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18209273/> Acesso em: 20 abr. 2021

SANTOS, I. V.; COUTO, L. P. S. M. **Caracterização química e avaliação da atividade antioxidante do extrato seco de *Miconia albicans* (Sw.) Triana (Melastomataceae)**. São Cristóvão, SE, 2018. Monografia (graduação em Farmácia) – Departamento de Farmácia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2018. Disponível em: <https://www.teses.ufs.br/handle/riufs/10721> Acesso em: 17 mai.2021

SANTOS, M. G. **Efeito dos extratos etanólicos de partes aéreas e de raízes de *Eriosema campestre* var. *macrophyllum* (Grear) Fortunato sobre ativação e proliferação de linfócitos, in vitro**. 141p. Tese apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, MG. 2018. Disponível em: <http://acervo.ufvjm.edu.br/jspui/handle/1/1918> Acesso em: 01 jul. 2021

SANTOS, S. N. Determinação quantitativa da atividade antioxidante de extratos brutos de microrganismos pelo método de captura de radical livre DPPH. (Embrapa Meio Ambiente. Comunicado Técnico, 50). **Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente**. 5 p., 2011. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/898412>. Acesso em: 02 jun. 2021.

SERAFINI, M PELUSO I.; RAGUZZINI, A. Flavonoids as anti-inflammatory agents. **Proc Nutr Soc**. v. 69, n. 3, p.273-8, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20569521> Acesso em: 20 abr. 2021

SERPELONI, J. M. *et al.* In vivo assessment of DNA damage and protective effects of extracts from *Miconia* species using the comet assay and micronucleus test. **Mutagenesis**. v. 23, n. 6, p. 501-507, 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18765422/> Acesso em: 20 abr. 2020

SERPELONI, J. M. *et al.* Cytotoxic and mutagenic evaluation of extracts from plant species of the *Miconia* genus and their influence on doxorubicin-induced mutagenicity: an in vitro analysis. **Experimental and Toxicologic Pathology**. v. 63, n. 5, p. 499-504, 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0940299310000461> Acesso em: 8 abr. 2019

SHERWOOD, E.R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Pract Res Clin Anaesthesiol**. v. 18, n. 3, p. 385-405, 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15212335/> Acesso em: 20 abr. 2021

SIES, H. Biochemistry of oxidative stress. **Angew Chem Int Ed Engl**. v. 25, p. 1058–1071, 1986. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/anie.198610581> Acesso em: 04 jun. 2020

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **Eur. J. Biochem.** v. 215, p. 213-219, 1993. Disponível em: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1432-1033.1993.tb18025.x> Acesso em: 4 jun. 2020

SILVA, D. C.; CERCHIARO, G.; HONÓRIO, K. M. Relações patofisiológicas entre estresse oxidativo e arteriosclerose. **Quim. Nova.** v. 34, n. 2, p.300-305, 2011. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/dWb4TmJfqGrckNx5NgmpSnb/?format=pdf&lang=pt> Acesso em: 4 jun. 2021

SILVA, F.C.O. *et al.* Bioatividades de Triterpenos isolados de plantas: Uma breve revisão. **Rev. Virtual Quim.** v. 12, n. 1 p. 1-14, 2020. Disponível em: <http://static.sites.sbq.org.br/rvq.sbq.org.br/pdf/rvq-270220a1.pdf> Acesso em: 20 set. 2021.

SILVA, M. I. G. **Utilização de Fitoterápicos nas Unidades Básicas de Saúde da Família (UBSF) no Município de Maracanaú-CE.** Fortaleza.2003. p. 144 Dissertação de Mestrado Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2006000400003 Acesso em: 21 abr. 2021

SILVA, M. O. **Atividade antioxidante e composição de oligossacarídeos em subproduto obtido do processamento industrial da goiaba (psidium guajava).** Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas. Mestrado em Ciências de Alimentos. Campinas, SP. p. 154. 2015 Disponível em: http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/256721/1/Silva_MairaOliveira_M.pdf Acesso em: 03 jun. 2021

SILVA, R. H. M. **Atividade antinoceptiva de *Borreira verticillata* (L) G. meY. E modo de interação com a cicloxigenase-2 (COX-2) e receptor N-metil- D- aspartato (NMDA).** Universidade federal do maranhão. Programa de Pós- graduação em ciências da saúde, mestrado em ciências da saúde. São luis, 2016 p. 1-78. Disponível em: <https://tedebc.ufma.br/jspui/handle/tede/1630> Acesso em: 21 abr. 2021

SILVEIRA, L. R. *et al.* Regulação metabólica e produção de espécies reativas de oxigênio durante a contração muscular: efeito do glicogênio na manutenção do estado redox intracelular. **Rev Bras Med Esporte.** v. 14, n. 1, p. 57-63, 2008. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbme/a/nHsbnZ9SqRXjKgsSqGDDpnP/?lang=pt> Acesso em: 20 maio. 2021

SILVEIRA, P. F.; BANDEIRA, M. A. M.; ARRAIS, P. S. D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia.** v. 18, p. 618-626, 2008. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2008000400021 Acesso em: 20 maio. 2020

SIMAS, L. A. W.; GRANZOTI, R. O.; PORSCH. Estresse oxidativo e o seu impacto no envelhecimento: uma revisão bibliográfica. **Brazilian Journal of Natural Sciences.** v.

2 n. 2, 2019. Disponível em: <http://bjns.com.br/index.php/BJNS/article/view/53> Acesso em: 08 jun.2018

SIMÕES, C. M. *et al.* O. (Orgs.) **Farmacognosia da planta ao medicamento. 6 ed. Porto Alegre, RS: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.** Florianópolis, SC: Editora da Universidade Federal de Santa Catarina, 1999. Cap. 3, p. 46-49. Disponível em: <https://www.worldcat.org/title/farmacognosia-da-planta-ao-medicamento/oclc/55589049/editions?referer=di> Acesso em: 19 jun. 2021

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Jr.; Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic - Phosphotungstic Acid Reagents. **American Journal of Enology and Viticulture.** v. 16, p. 144-58, 1965. Disponível em: <https://www.ajevonline.org/content/16/3/144>. Acesso em: 19 jun.2021

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. S. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology.** v.299, p. 152-178, 1999. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687999990171>. Acesso em: 02 jun. 2019

SKROVANKOVA, S. *et al.* Bioactive Compounds and Antioxidant Activity in Different Types of Berries. **International Journal of Molecular Sciences.** v. 16, n. 10, p. 24673-24706, 2015. <https://doi.org/10.3390/ijms161024673>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/16/10/24673>. Acesso em: 21 jun. 2021

SOUSA, I. A.N. *et al.* A diversidade da flora brasileira no desenvolvimento de recursos de saúde. **Revista uningá review.** v. 31, n. 1, p. 1-5, 2017. Disponível em: <http://revista.uninga.br/index.php/uningareviews/article/view/2048>>. Acesso em: 28 abr. 2021

SOUZA, A. W. S. *et al.* Sistema Imunitário – Parte III O delicado equilíbrio do sistema imunológico entre os pólos de tolerância e autoimunidade. **Rev Bras Reumatol.** v. 50, n. 6, p.665-94, 2010. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbr/a/Wq3MQVB7chf7SmdZGLj9pGR/?lang=pt&format=pdf> . Acesso em: 20 mai. 2021

SOUZA, C. R. F.; FERNANDES, L. P.; BOTT, R. F.; OLIVEIRA, W.P. Influência do processo de secagem e condição de armazenamento de extratos secos de Bauhinia forficata e Passiflora alata sobre seu perfil de dissolução. **Rev Bras Plantas Mediciniais.** v.17, n. 1, p. 67-75, 2015. Disponível em: https://doi.org/10.1590/1983-084X/11_137 Acesso em 17 mai. 2019

SOUZA, J.D.S.; FERREIRA, W. M. O papel da vitamina e na nutrição e reprodução animal - meios de defesa contra os radicais livres. **Rev Eletr Nutr.** v.4, p.456-461, 2007. Disponível em: <https://www.nutritime.com.br/site/artigo-045-o-papel-da-vitamina-e-na-nutricao-e-reproducao-animal-meios-de-defesa-contra-os-radicais-livres/> Acesso em: 20 mai. 2021

SPESSOTO, M. A. *et al.* Evaluation of the analgesic activity of extracts of Miconia rubiginosa (Melastomataceae). **Phytomedicine.** v. 10, p. 606-9, 2003. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0944711304702718> Acesso em: 20 abr.2021

STAHL W, SIES H. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. **Biochim Biophys Acta** v. 1740, n. 2, p. 101–107, 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15949675/> Acesso em: 20 jun. 2020

SUCUPIRA, N. R. *et al.* Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos. **Científica Ciências Biológicas e da Saúde**. vol. 14, n. 4, p. 263-269, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.17921/2447-8938.2012v14n4p%25p> Acesso em: 8 abr. 2019

SUN S, J.; KERSTEN S.; QI, L. Mechanisms of inflammatory responses in obese adipose tissue. **Annu Rev Nutr**. v. p. 32, p. 261-286, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22404118> Acesso em: 30 abr.2019
TARAWNEH, A. H. e t al. Flavanones from *Miconia prasina*. **Phytochem Lett**. p.130-132, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24976876/>. Acesso em: 20 mai. 2021

THANAN, R. *et al.* Oxidative stress and its significant roles in neurodegenerative diseases and cancer. **Int J Mol Sci**. v. 16, n. 1, p. 193-217, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25547488/> Acesso em: 21 jun. 2021

TORRES-LEAL, F. L. *et al.* Chapter 6: Adipose Tissue Inflammation and Insulin Resistance. **Insulin Resistance**.2012. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/insulin-resistance/adipose-tissue-inflammation-and-insulin-resistance> Acesso em: 01 jul. 2021

TSAI, S. J.; YIN, M. C. Antioxidative and anti-inflammatory protection of oleanolic acid and ursolic acid in PC12 cells. **J Food Sci**. v. 73, n. 7. 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18803714> Acesso em: 21 mai. 2021

TURNER, M. D.; NEDJAI, B.; HURST, T.; PENNINGTON, D. J. Citocinas e quimiocinas: Na encruzilhada de sinalização celular e doenças inflamatórias. **BBA-Mol Cell Res**. v. 1843, n. 11, p. 2563-2582, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24892271/> Acesso em: 22 jul.2020

VALKO, M. *et al.* Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced câncer. **Chemico-Biological Interactions**. v. 160, n. 1, p. 1-40, 2006. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0009279705004333>. Acesso em: 21 jun. 2021

VARELLA, P.; FORTE, W. C. N. Citocinas: revisão. *ev. bras. alerg. imunopatol.* 2001; v. 24, n. 4, p. 146-154. Disponível em: <http://www.sbai.org.br/revistas/Vol244/citocinas.htm> Acesso em: 29 jun. 2021

VASCONCELOS, *et al.* Analgesic effects of crude extracts of *Miconia albicans* (*Melastomataceae*). **Boll Chim Farm**. v. 142, n.8, p.333-335, 2003. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15040462> Acesso em: 16 mai. 2019

VASCONCELOS, J., VIEIRA, J. G. P.; VIEIRA, E. P. P. Plantas Tóxicas: Conhecer para Prevenir. **Revista Científica da UFPA**. v. 7, n.1, p. 1-10, 2009. Disponível em: <http://www.gege.agrarias.ufpr.br/plantastoxicass/textos/euphorbia%20mili.pdf>. Acesso em: 28 abr. 2021

VASCONCELOS, M. A.; *et al.* In vivo analgesic and antiinflammatory activities of ursolic acid and oleanolic acid from *Miconia albicans* (Melastomataceae). **Journal of Bioscience**. v. 61, n. 7-8, p. 477-482, 2006. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16989305> Acesso em: 8 abr. 2019

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Quím. Nova**. v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422005000300026&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 30 abr. 2021

VELLOSA, J. C. R. Estresse oxidativo: uma introdução ao estado da arte Brazilian Journal of Development ISSN: 2525 – 8761 10163 **Brazilian Journal of Development, Curitiba**. v. 7, n. 1, p. 10152 – 10168, 2021. Disponível em: <https://www.brazilianjournals.com/index.php/BRJD/article/view/23823/19133> Acesso em: 09 jun. 2021

WHO (World Health Organization). **The world medicines situation 2011: traditional medicines: global situation issues and challenges**. Geneva: WHO, 2011. 12p. Disponível em: who.int/medicines/areas/policy/world_medicines_situation/WMS_ch6_wPricing_v6.pdf. Acesso em: 03 jul. 2020

WOOLF, C. J.; SALTER, M. W. Neuronal plasticity: Increasing the gain in pain. **Science** v. 288, n. 5472, p. 1765-9, 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10846153/> Acesso em: 23 jul. 2020

YAHFOUF, N. *et al.* The Immunomodulatory and Anti-Inflammatory Role of Polyphenols. **Nutrients**. v.10, n.11, p.1-23, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/nu10111618>. Acesso em: 02 jun. 2021

YOON, J. H.; BAEK, S. J. Molecular targets of dietary polyphenols with antiinflammatory properties. **Yonsei Medical Journal**. v. 46, n. 5, p. 585-96, 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16259055/> Acesso em: 13 mai. 2019

ZENI, A. L. B. Utilização de plantas medicinais como remédio caseiro na Atenção Primária em Blumenau, Santa Catarina, Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, n. 8, p. 2703-2712, 2017. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/csc/v22n8/1413-8123-csc-22-08-2703.pdf>. Acesso em: 22 jul. 2020

ZHANG, J. M.; NA, J. Cytokines, inflammation, and pain. **Int Anesthesiol Clin** v. 45, n. 2, p. 27-37, 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17426506/> Acesso em: 22 jul. 2020

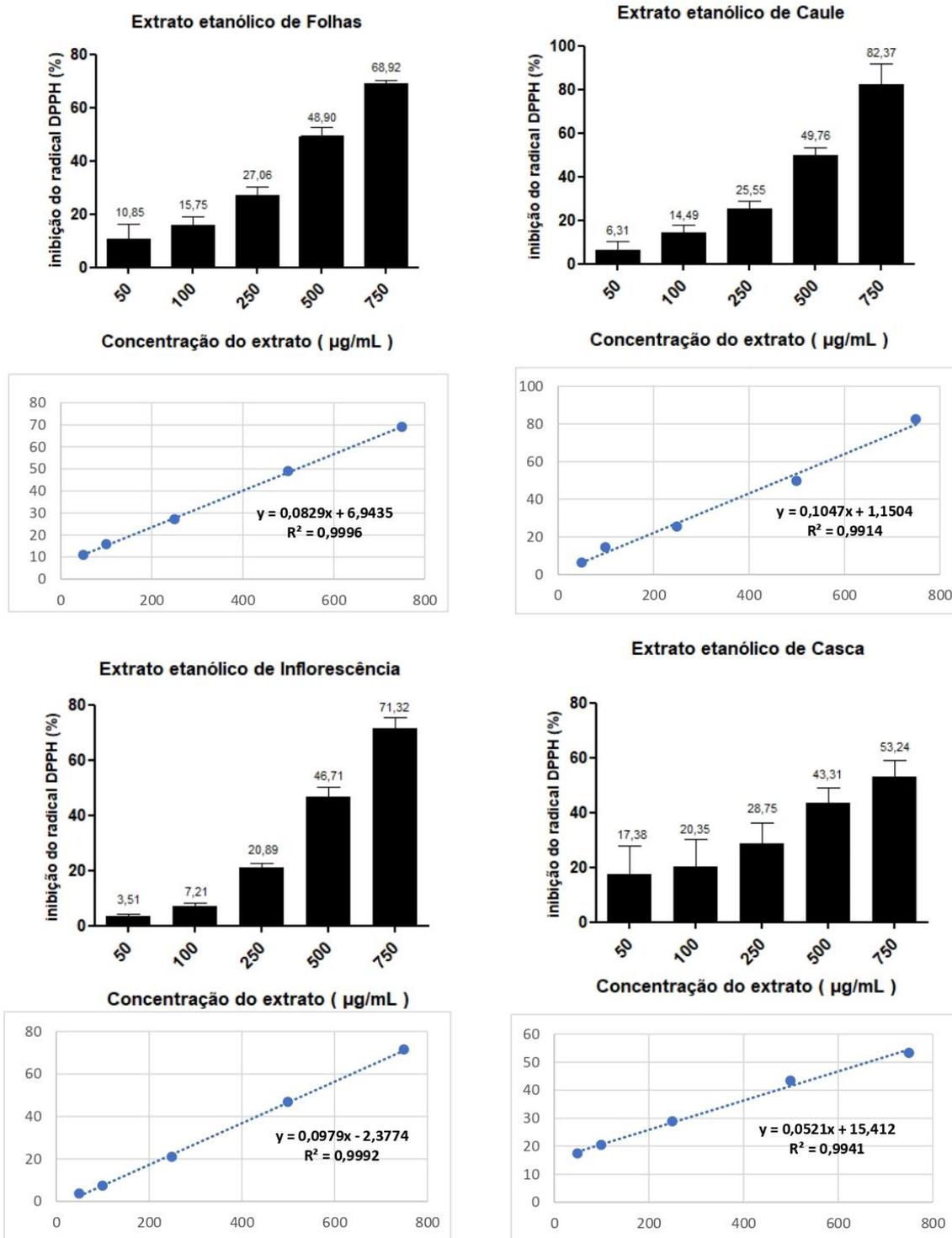
APÊNDICE A

Teor de compostos fenólicos totais (mgEAG/g) dos extratos brutos de *Miconia ferruginata*.

CONCENTRAÇÃO	Ext. etan. Folhas	Ext. etan. Caule	Ext. etan. Inflorescência	Ext. etan. Casca
750 µg/mL	91,703 ± 4,75 ^b	81,803 ± 4,54 ^b	120,137 ± 8,72 ^a	85,885 ± 12,65 ^b
500 µg/mL	65,974 ± 3,80 ^b	59,886 ± 5,89 ^b	87,028 ± 3,77 ^a	56,774 ± 7,40 ^b
250 µg/mL	44,701 ± 5,43 ^a	35,239 ± 4,28 ^b	39,296 ± 2,31 ^{ab}	32,459 ± 3,41 ^b
100 µg/mL	27,730 ± 4,88 ^a	19,001 ± 8,0 ^{ab}	20,448 ± 3,60 ^{ab}	15,358 ± 4,82 ^b
50 µg/mL	20,668 ± 4,09 ^a	13,706 ± 6,68 ^{ab}	9,856 ± 4,91 ^{ab}	7,816 ± 7,64 ^b

Valores expressos em média ± erro padrão, (n=4). Comparação entre os extratos em relação a cada concentração. a: representa diferença estatística em relação a b; ab não apresenta diferença estatística. Nível de significância $p < 0,05$ (ANOVA, *Tukey*).

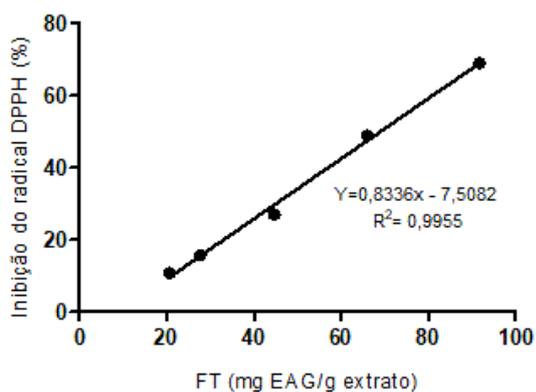
APÊNDICE B



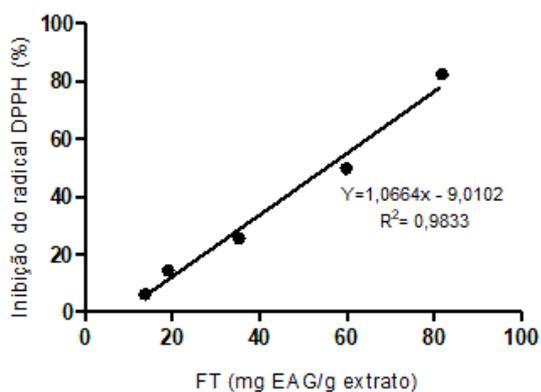
APÊNDICE C

Teste de correlação entre FT (mg EAG/g extrato) e a capacidade de captura do radical DPPH• (%)

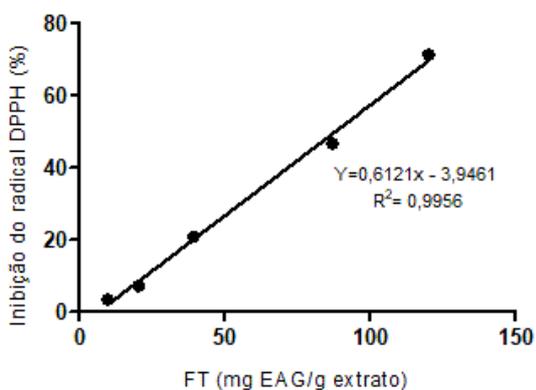
Extrato etanólico de folhas



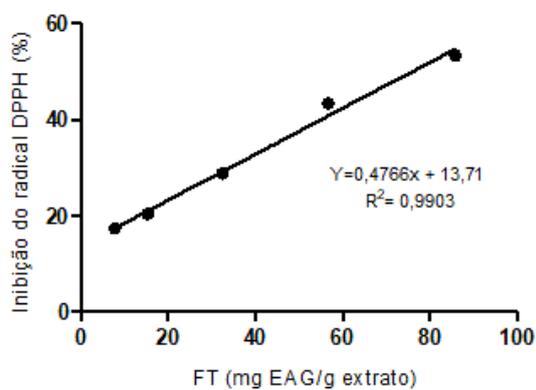
Extrato etanólico de caule



Extrato etanólico de inflorescência



Extrato etanólico de casca



ANEXO A



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
Comitê de Ética em Pesquisa



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Você está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa intitulada: “**Estudo biomonitorado e avaliação das atividades antitumoral, antiinflamatórias e imunomodulatórias de plantas medicinais nativas do Cerrado**”, em virtude de realizar uma coleta de amostra sanguínea a fim de viabilizar ensaios biológicos para compor banco de dados e potencial biológico de plantas medicinais coletadas na região dos Vales Jequitinhonha-MG, coordenada pelo(a) PROFA. HELEN RODRIGUES MARTINS E O Aluno(a) de Pós-Graduação, nível de doutorado POLIANA RIBEIRO BARROSO e contará ainda com os professor(as) KELLY CRISTINA KATO; GUSTAVO EUSTÁQUIO BRITO ALVIM DE MELO; WAGNER DE FÁTIMA PEREIRA E ELAINE AMARAL LEITE.

A sua participação não é obrigatória sendo que, a qualquer momento da pesquisa, você poderá desistir e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo para sua relação com o pesquisador, ou com a UFVJM.

Os objetivos desta pesquisa são: realizar um estudo biomonitorado das atividades antitumoral, antiinflamatória e imunomodulatória de extratos, frações, subfrações e/ou compostos isolados de espécies medicinais nativas do Cerrado pertencentes a extratoteca da Universidade Federal dos Vales Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM). Caso você decida aceitar o convite, será submetido(a) ao(s) seguinte(s) procedimentos: doar 10 mL de sangue, que será coletado por punção venosa com tubos a vácuo (da mesma maneira que é coletado quando você faz algum exame de sangue), em data e horário a combinar, A SER REALIZADO NO LABORATÓRIO DE IMUNOLOGIA (LABIMUNO) DO CENTRO INTEGRADO DE PESQUISA EM SAÚDE (CIPQ-SAÚDE) DA UFVJM. O tempo previsto para a sua participação é de aproximadamente 10 minutos uma única vez.

Os riscos relacionados com sua participação são hematoma (roxo no local da coleta de sangue), dor, tontura, enjoo, DE IDENTIFICAÇÃO DO VOLUNTÁRIO E DE CONSTRANGIMENTO. ESSES RISCOS SERÃO MINIMIZADOS POR SE TRATAR

Comitê de Ética em Pesquisa da UFVJM
Rodovia MGT 367 - Km 583 - nº 5000 - Alto da Jacuba

Diamantina/MG CEP39100000. Tel.: (38)3532-1240

Handwritten signature: Gustavo Barroso



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
Comitê de Ética em Pesquisa



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Você está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa intitulada: “**Estudo biomonitorado e avaliação das atividades antitumoral, antiinflamatórias e imunomodulatórias de plantas medicinais nativas do Cerrado**”, em virtude de realizar uma coleta de amostra sanguínea a fim de viabilizar ensaios biológicos para compor banco de dados e potencial biológico de plantas medicinais coletadas na região dos Vales Jequitinhonha-MG, coordenada pelo(a) PROFA. HELEN RODRIGUES MARTINS E O Aluno(a) de Pós-Graduação, nível de doutorado POLIANA RIBEIRO BARROSO e contará ainda com os professor(as) KELLY CRISTINA KATO; GUSTAVO EUSTÁQUIO BRITO ALVIM DE MELO; WAGNER DE FÁTIMA PEREIRA E ELAINE AMARAL LEITE.

A sua participação não é obrigatória sendo que, a qualquer momento da pesquisa, você poderá desistir e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo para sua relação com o pesquisador, ou com a UFVJM.

Os objetivos desta pesquisa são: realizar um estudo biomonitorado das atividades antitumoral, antiinflamatória e imunomodulatória de extratos, frações, subfrações e/ou compostos isolados de espécies medicinais nativas do Cerrado pertencentes a extratoteca da Universidade Federal dos Vales Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM). Caso você decida aceitar o convite, será submetido(a) ao(s) seguinte(s) procedimentos: doar 10 mL de sangue, que será coletado por punção venosa com tubos a vácuo (da mesma maneira que é coletado quando você faz algum exame de sangue), em data e horário a combinar, A SER REALIZADO NO LABORATÓRIO DE IMUNOLOGIA (LABIMUNO) DO CENTRO INTEGRADO DE PESQUISA EM SAÚDE (CIPQ-SAÚDE) DA UFVJM. O tempo previsto para a sua participação é de aproximadamente 10 minutos uma única vez.

Os riscos relacionados com sua participação são hematoma (roxo no local da coleta de sangue), dor, tontura, enjoo, DE IDENTIFICAÇÃO DO VOLUNTÁRIO E DE CONSTRANGIMENTO. ESSES RISCOS SERÃO MINIMIZADOS POR SE TRATAR

Comitê de Ética em Pesquisa da UFVJM
Rodovia MGT 367 - Km 583 - nº 5000 - Alto da Jacuba

Diamantina/MG CEP39100000. Tel.: (38)3532-1240

Handwritten signature: Gustavo Barroso

Você receberá uma via deste termo onde constam o telefone e o endereço do pesquisador principal, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sobre sua participação agora ou em qualquer momento.

Coordenador(a) do Projeto: HELEN RODRIGUES MARTINS E POLIANA RIBEIRO BARROSO

Endereço: Laboratório de Doenças Infecciosas e Parasitárias (LADIP – CIPq-Saúde) Campus JK, Diamantina-MG.

Telefone: 0(38) 35321200 ramal 8422

Declaro que entendi os objetivos, a forma de minha participação, riscos e benefícios da mesma e aceito o convite para participar. Autorizo a publicação dos resultados da pesquisa, a qual garante o anonimato e o sigilo referente à minha participação.

Nome do participante da pesquisa: _____

Assinatura do participante da pesquisa: _____

Informações – Comitê de Ética em Pesquisa da UFVJM

Rodovia MGT 367 - Km 583 - nº 5000 - Alto da Jacuba

Diamantina/MG CEP39100-000

Tel.: (38)3532-1240

Coordenador: Prof. Disney Oliver Sivieri Junior

Secretária: Ana Flávia de Abreu

Email: cep.secretaria@ufvjm.edu.br e/ou cep@ufvjm.edu.br.

TERMO DE LIVRE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

Eu discuti os riscos e benefícios da minha participação no estudo intitulado “**Estudo biomonitorado e avaliação das atividades antitumoral, antiinflamatórias e imunomodulatórias de plantas medicinais nativas do Cerrado**” com os pesquisadores envolvidos. Eu li e compreendi todos os procedimentos que envolvem esta pesquisa e tive tempo suficiente para considerar a minha participação no estudo. Eu perguntei e obtive as respostas para todas as minhas dúvidas. Eu sei que posso me recusar a participar deste estudo ou que posso abandoná-lo a qualquer momento sem qualquer constrangimento ou prejuízo. Eu também compreendo que os pesquisadores podem decidir a minha exclusão do estudo por razões científicas, sobre as quais eu serei devidamente informado. Não terei nenhuma remuneração e nenhum gasto por participar do projeto. Tenho uma cópia deste formulário, o qual foi assinado em duas vias idênticas e rubricadas. Portanto, aqui forneço o meu consentimento para participar do estudo intitulado: “**Estudo biomonitorado e avaliação das atividades antitumoral, antiinflamatórias e imunomodulatórias de plantas medicinais nativas do Cerrado**” durante todos os testes realizados.

Diamantina,

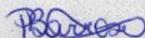
Assinatura do voluntário: _____

Testemunha: _____

Testemunha: _____

Declaro que expliquei todos os objetivos, benefícios e riscos deste estudo ao voluntário, dentro dos limites de meus conhecimentos científicos.

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS:



Poliana Ribeiro Barroso

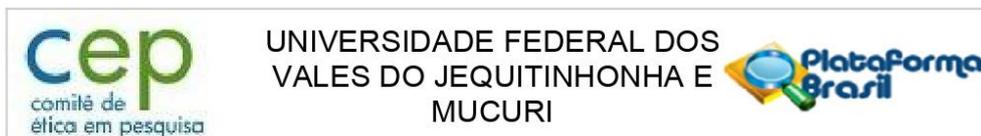


HELEN RODRIGUES MARTINS

Comitê de Ética em Pesquisa da UFVJM
Rodovia MGT 367 - Km 583 - nº 5000 - Alto da Jacuba

Diamantina/MG CEP39100000. Tel.: (38)3532-1240

ANEXO B



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO BIOMONITORADO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTITUMORAL, ANTIINFLAMATÓRIAS E IMUNOMODULATÓRIAS DE PLANTAS MEDICINAIS NATIVAS DO CERRADO

Pesquisador: POLIANA RIBEIRO BARROSO

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 94096218.1.0000.5108

Instituição Proponente: Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.931.933

Apresentação do Projeto:

A região dos Vales Jequitinhonha, em especial Diamantina está localizada na região central do estado de Minas Gerais, dentro do bioma Cerrado, com diferentes fitofisionomias, sendo a mais marcante e com maior extensão os campos rupestres. A região, apresenta importância biológica especial, por apresentar grande e diversificada riqueza botânica com elevado grau de endemismo além do extenso conhecimento popular repassado ainda por gerações. É possível que muitas dessas plantas medicinais apresentem atividades biológicas cientificamente comprovadas. Assim, o presente estudo tem por objetivo avaliar a composição química e atividades biológicas de plantas medicinais da região dos Vales Jequitinhonha, a fim de complementar a construção de uma extratoteca da UFVJM com informações químicas e biológicas/terapêuticas de diferentes extratos vegetais

Objetivo da Pesquisa:

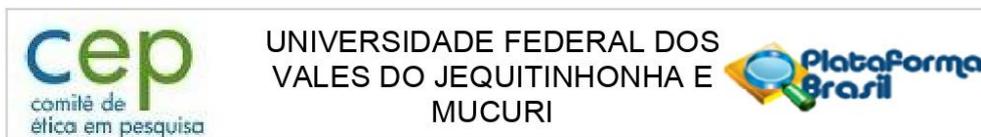
Objetivo Primário:

O objetivo do presente projeto é realizar um estudo continuado e biomonitorado das atividades antitumoral, antiinflamatória e imunomodulatória de extratos, frações, subfrações e/ou compostos isolados de espécies medicinais nativas do Cerrado pertencentes a extratoteca da UFVJM.

Objetivo Secundário:

- Coletar e obter extratos etanólicos e aquosos de espécies medicinais nativas do Cerrado com

Endereço: Rodovia MGT 367 - Km 583, nº 5000
Bairro: Alto da Jacuba **CEP:** 39.100-000
UF: MG **Município:** DIAMANTINA
Telefone: (38)3532-1240 **Fax:** (38)3532-1200 **E-mail:** cep@ufvjm.edu.br



Continuação do Parecer: 2.931.933

aplicação na medicina popular pertencentes a extratoteca da UFVJM. - Fracionamento e análise preliminar dos extratos por triagem fitoquímica clássica, com vistas a evidenciar as principais classes de metabólitos secundários presentes.- Realizar uma triagem dos extratos, frações, subfrações e/ou substâncias para a atividade antitumoral, antiinflamatória e imunomodulatória por meio de testes in vitro. - Avaliar a toxicidade in vitro dos extratos, frações, subfrações e/ou substâncias que apresentarem atividade nos testes de triagem. - Análise química dos extratos e suas respectivas frações ativos por diferentes técnicas espectroscópicas e espectrométricas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

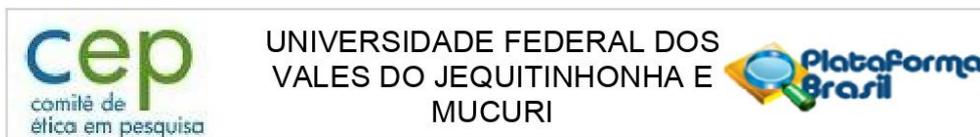
Riscos:

Os riscos relacionados com sua participação são hematoma (roxo no local da coleta de sangue), dor, tontura, enjoo, DE IDENTIFICAÇÃO DO VOLUNTÁRIO E DE CONSTRANGIMENTO. ESSES RISCOS SERÃO MINIMIZADOS POR SE TRATAR DE UMA COLETA POR PESSOA TREINADA, CEGO PARA OS DIFERENTES TESTES, EM LOCAL LIMPO E RESERVADO PARA EVITAR IDENTIFICAÇÃO E CONSTRANGIMENTOS DO VOLUNTÁRIO, EQUIPADO COM CADEIRA PARA COLETA, UTILIZANDO MATERIAL ESTÉRIL E DESCARTÁVEL. EM CASO DE DOR E HEMATONAS SERÁ RECOMENDADO O USO DE COMPRESSA GELADA NO LOCAL DA COLETA. EM CASO DE TONTURA E ENJOO O VOLUNTARIO SERÁ DIRECIONADO A UM LOCAL RESERVADO E TRANQUILO PARA FICAR SENTADO OU DEITADO ATÉ MELHORAR, E TERÁ SUA PRESSÃO MONITORADA DURANTE ESTE PERÍODO.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

As espécies não constam da Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção e serão usados os dados de exsicatas dos herbários da UFVJM. A composição química dos extratos vegetais será realizada por fitoquímica clássica e técnicas hifenadas para os extratos ativos quanto as atividades biológicas, segundo projeto em anexo. A avaliação biomonitorada das atividades biológicas dos extratos serão realizados testes para as atividades: antitumoral usando testes de citotoxicidade frente linhagens tumorais e avaliação das vias de indução de morte; anti-inflamatória e imunomoduladora usando testes de avaliação do efeito sobre a produção citocinas, sobre a expressão de ciclooxigenase 2 (COX2) e sobre a proliferação de linfócitos humanos; toxicidade usando os testes de atividade hemolítica, viabilidade sobre leucócitos humanos e fibroblastos normais da linhagem L929. Para as atividades anti-inflamatória e imunomoduladora será utilizado células provenientes do sangue periférico de indivíduos saudáveis, da seguinte forma: Obtenção de leucócitos - As amostras de sangue serão colhidas em média de 45 voluntários por punção da veia ante cubital mediana, utilizando tubos a vácuo heparinizados. Os voluntários serão estudantes da UFVJM com idade entre 29 e 30 anos, abordados no campus e

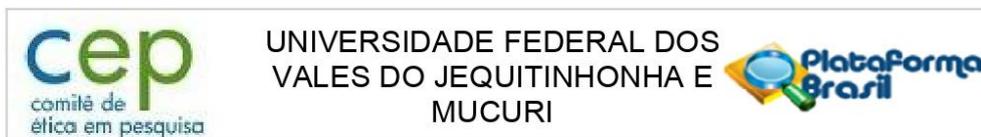
Endereço: Rodovia MGT 367 - Km 583, nº 5000
Bairro: Alto da Jacuba **CEP:** 39.100-000
UF: MG **Município:** DIAMANTINA
Telefone: (38)3532-1240 **Fax:** (38)3532-1200 **E-mail:** cep@ufvjm.edu.br



Continuação do Parecer: 2.931.933

convidados a participarem do estudo. Os procedimentos de coleta obedecerão as Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial para coleta de sangue venoso (2010). As células mononucleares do sangue periférico de indivíduos saudáveis (CMSP) serão obtidas a partir de 10 mL de sangue periférico venoso após centrifugação em Histopaque 1077 conforme Bicalho et al., (1981). Avaliação da ativação de leucócitos para produção de citocinas - Aliquotas de sangue total serão tratadas com DMSO ou extratos, na ausência e presença do PMA (25 ng/mL), por 24 e 36 horas, em estufa úmida. Após o período de incubação as células serão permeabilizadas e marcadas com anticorpos anti-citocinas (IL-2, IL-10, IFN- e TNF-) conjugados com o fluorocromo PE. As amostras serão avaliadas por citometria de fluxo, procedendo-se a aquisição de pelo menos 30.000 eventos. Análise do efeito dos extratos sobre a proliferação de linfócitos humanos - Será utilizada a técnica de incorporação e decaimento da fluorescência de CFSE (5- (and-6)-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester)(Lyons et al., 2000). Para isso, serão confeccionadas culturas marcadas com CFSE estimuladas com o mitógeno Fitohemaglutinina (PHA). As células serão estimuladas ou não com 10µL de PHA (1 ug/mL) e tratadas com extratos mantidas por 5 dias em estufa úmida. A proliferação celular será determinada por citometria de fluxo (ÂNGULO e FULCHER, 1998). Avaliação sobre a expressão de COX-2 - Aliquota de 1mL sangue periférico de voluntários sadios, estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS), serão tratadas com os extratos, incubadas em estufa úmida por 4 h. Após incubação, 100 L de cada cultura serão expostas ao anticorpo anti-CD14 conjugado com PerCP-Cy5, seguida de lise eritrocitária. Incubados com anticorpos anti-COX-1 conjugado com FITC e anti-COX-2 conjugado com PE. Paralelamente será confeccionado controles isotípicos. Após a incubação, as células serão analisadas em citometria de fluxo com aquisição de 50000 eventos. Para os testes de toxicidade serão utilizando CMSP e sangue total da seguinte forma: Efeito dos extratos sobre a viabilidade de CMSP humanas- Serão incubadas culturas com os extratos por 24 horas e 120 dias, em estufa úmida. Será usado a técnica de exclusão de azul de tripam (ALLISON et al. 1980; AVELAR-FREITAS et al. 2014). Atividade hemolítica - Suspensão de hemácias a 0,05%, coletado de voluntários sadios, serão tratadas com os extratos conforme Kang et al. 2009 incubadas por 4 h, o sobrenadante será transferido para placas para leitura de absorbancia a 540 nm e dados como percentagem de hemólise. Os demais ensaios não envolvem seres humanos conforme projeto. Numero amostral: 45

Endereço: Rodovia MGT 367 - Km 583, nº 5000
Bairro: Alto da Jacuba **CEP:** 39.100-000
UF: MG **Município:** DIAMANTINA
Telefone: (38)3532-1240 **Fax:** (38)3532-1200 **E-mail:** cep@ufvjm.edu.br



Continuação do Parecer: 2.931.933

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foi apresentado o Projeto de Pesquisa, Folha de Rosto, Cronograma, TCLE.

A carta da Instituição Co-partícipe foi apresentada conforme Resolução 466/12.

Recomendações:

- Segundo a Carta Circular nº. 003/2011/CONEP/CNS, de 21/03/11, há obrigatoriedade de rubrica em todas as páginas do TCLE pelo sujeito de pesquisa ou seu responsável e pelo pesquisador, que deverá também por sua assinatura na última página do referido termo.

- Relatórios final e parciais deverão ser apresentado ao CEP. Os relatórios parciais deverão ser apresentados nas datas: 30/04/2019; 30/10/2019; 30/04/2020; 30/10/2020;30/04/2021; 30/10/2021. O relatório final deverá ser apresentado em 30/04/2022. Considerase como antiética a pesquisa descontinuada sem justificativa aceita pelo CEP que a aprovou.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

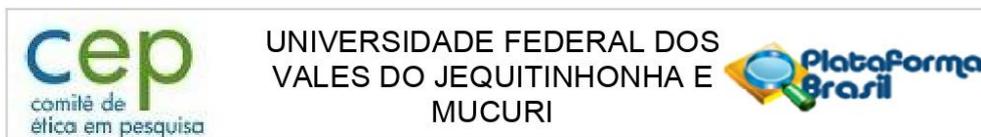
O projeto atende aos preceitos éticos para pesquisas envolvendo seres humanos preconizados na Resolução 466/12 CNS.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1179558.pdf	04/09/2018 09:39:51		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CARTA_COPARTICIPANTE.pdf	04/09/2018 09:39:11	POLIANA RIBEIRO BARROSO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_ATUALIZADA.pdf	04/09/2018 09:38:19	POLIANA RIBEIRO BARROSO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	proposta_do_projeto_Cep_ATUALIZADA.pdf	04/09/2018 09:37:41	POLIANA RIBEIRO BARROSO	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	18/07/2018 11:11:47	POLIANA RIBEIRO BARROSO	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO.pdf	16/07/2018 17:00:37	POLIANA RIBEIRO BARROSO	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.pdf	16/07/2018 15:20:41	POLIANA RIBEIRO BARROSO	Aceito

Endereço: Rodovia MGT 367 - Km 583, nº 5000
Bairro: Alto da Jacuba **CEP:** 39.100-000
UF: MG **Município:** DIAMANTINA
Telefone: (38)3532-1240 **Fax:** (38)3532-1200 **E-mail:** cep@ufvjm.edu.br



Continuação do Parecer: 2.931.933

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

DIAMANTINA, 02 de Outubro de 2018

Assinado por:

Simone Gomes Dias de Oliveira
(Coordenador(a))

Endereço: Rodovia MGT 367 - Km 583, nº 5000
Bairro: Alto da Jacuba **CEP:** 39.100-000
UF: MG **Município:** DIAMANTINA
Telefone: (38)3532-1240 **Fax:** (38)3532-1200 **E-mail:** cep@ufvjm.edu.br