

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI
Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas

Edivania Cordeiro dos Santos

INVESTIGAÇÃO DE PROPRIEDADES ANTI-INFLAMATÓRIAS DO ÓLEO DE PEQUI (*Caryocar brasiliense*) EM CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO HUMANO.

Diamantina

2022

Edivania Cordeiro dos Santos

INVESTIGAÇÃO DE PROPRIEDADES ANTI-INFLAMATÓRIAS DO ÓLEO DE PEQUI (*Caryocar brasiliense*) EM CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO HUMANO.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Elizabethe Adriana Esteves

Coorientador: Prof. Dr. Gustavo Eustáquio Brito Alvim de Melo

Diamantina

2022

Catálogo na fonte - Sisbi/UFVJM

S237i Santos, Edivania Cordeiro dos

2022 Investigação de propriedades anti-inflamatórias do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*) em células mononucleares do sangue periférico humano [manuscrito]/ Edivania Cordeiro dos Santos. -- Diamantina, 2022.

90 p. : il.

Orientadora: Prof.^a Elizabethe Adriana Esteves.

Coorientador: Prof. Gustavo Eustáquio Brito Alvim de Melo.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas) -- Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2022.

1. óleo de pequi. 2. *Caryocar brasiliense*. 3. Inflamação.
4. Proliferação de linfócitos. 5. Citocinas. I. Esteves, Elizabethe Adriana . II. Melo, Gustavo Eustáquio Brito Alvim de . III. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. IV. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFVJM com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecário Rodrigo Martins Cruz / CRB6-2886 Técnico em T.I. Thales Francisco Mota Carvalho

EDIVANIA CORDEIRO DOS SANTOS


**INVESTIGAÇÃO DE PROPRIEDADES ANTI-INFLAMATÓRIAS DO
ÓLEO DE PEQUI (*Caryocar brasiliense*) EM CÉLULAS
MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO HUMANO**

Dissertação apresentada ao
PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO
EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS,
nível MESTRADO, como parte dos
requisitos para obtenção do título de
MESTRE EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS


Orientador (a): Prof.^a Dr.^a Elizabethe
Adriana Esteves

Co-orientador: Prof. Dr. Gustavo
Eustáquio Brito Alvim de Melo


Data da aprovação: 27/01/2022

Documento assinado digitalmente
 Elizabethe Adriana Esteves
Data: 02/02/2022 09:51:34-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>


Prof.Dr.^a ELIZABETHE ADRIANA ESTEVES - UFVJM

Documento assinado digitalmente
 GUSTAVO EUSTAQUIO BRITO ALVIM DE MELO
Data: 04/02/2022 19:33:57-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof.Dr. GUSTAVO EUSTAQUIO BRITO ALVIM DE MELO - UFVJM

Documento assinado digitalmente
 Etel Rocha Vieira
Data: 04/02/2022 09:41:29-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof.Dr.^a ETEL ROCHA VIEIRA - UFVJM

Documento assinado digitalmente
 LAUANE GOMES MORENO
Data: 02/02/2022 17:45:38-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof.Dr.^a LAUANE GOMES MORENO - UFVJM

DIAMANTINA

*Bethe e Gustavo (meus orientadores), cujo incentivo e paciência serviram como pilares de sustentação para a existência deste trabalho.
A vocês dedico.*

AGRADECIMENTOS

Ao Deus Triuno (Pai, Filho e Espírito Santo), criador de todas as coisas, autor de toda ciência: graças pelo cuidado diário, conforto e esperança em todos os momentos. Obrigada pela vida e por conceder-me condições físicas, mentais e intelectuais para realização deste trabalho. Conciliar fé e ciência aumenta ainda mais meu reconhecimento da sua soberania e poder. Ao Senhor toda glória!

À Professora Dr.^a Elizabete: agradeço pela disponibilidade em me orientar e por ter feito isso com tamanha excelência e amor. Obrigada pelo acolhimento desde os primeiros períodos de graduação, pelos incentivos que me fizeram apaixonar pela pesquisa, pelos elogios e por acreditar em meu potencial.

Ao Professor Dr. Gustavo: sou imensamente grata pela recepção em seu laboratório e pelos valiosos ensinamentos obtidos no campo da imunologia e da citometria de fluxo. Obrigada pela sua atenção, disponibilidade, paciência e por sempre me “socorrer” apontando uma solução quando os experimentos davam errado. Foi um privilégio contar com sua ajuda e orientação.

À equipe do LABMET (Laboratório de Estudos Metabólicos) e do LABIMUNO (Laboratório de Imunologia): gratidão por toda amizade, apoio, experiências e conhecimentos compartilhados. Especialmente agradeço à Lauane por ter sido minha inspiração no campo dos estudos envolvendo o óleo de pequi e sistema imunológico e pela maravilhosa ideia deste estudo. Agradeço ao Paulo por todo apoio e pela ajuda nas análises químicas do óleo de pequi. Sou grata ao professor Dr. Wagner por ser tão prestativo e pela ajuda na aquisição de reagentes. Também agradeço às professoras Dr.^a Bethania, Dr.^a Vália e ao Kaique com quem aprendi os primeiros passos da separação de PBMC. E ainda agradeço ao Marcelo pelo auxílio na coleta de sangue e nas análises em citometria de fluxo.

À Professora Dr.^a Etel, pela doação do kit CBA e ao Vinícius Ottone pelo auxílio no ensaio e nas análises de CBA.

À Artenizia, pela companhia durante todo o período experimental. Obrigada pela amizade e parceria tão crucial para realização deste trabalho.

Aos demais colegas de pós-graduação, por todos os momentos e saberes compartilhados.

À UFVJM, instituição que me permitiu ter acesso à educação gratuita e de qualidade. Agradeço pela concessão da bolsa de estudos, que me permitiu dedicar exclusivamente à pesquisa durante 24 meses.

À coordenação e professores do Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas, bem como às instituições nucleadoras onde realizei disciplinas (Instituto de Biociências e Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo e Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho - Universidade Federal do Rio de Janeiro) por contribuírem com ensinamentos cruciais para meu crescimento pessoal e profissional.

Às agências de fomento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro para a aquisição de insumos e reagentes necessários a realização do protocolo experimental.

Ao Centro Integrado de Pós-graduação e Pesquisas em Saúde (CIPq) pela estrutura física, equipamentos e suporte técnico para a realização dos experimentos, e aos servidores dessa instituição, especialmente ao Fidelis e à Magda por todo apoio e amizade.

Aos voluntários da pesquisa pela doação da amostra biológica sem a qual este trabalho não seria possível.

À minha família (meus pais, irmãos, irmãs, sobrinhos e sobrinhas). Especialmente agradeço à minha mãe Izaira por todo zelo, pelas constantes orações e por ter apoiado minhas escolhas. Agradeço também ao meu tio Gabriel e família pela recepção em sua casa, apesar da COVID-19 inviabilizar os planos da estadia em São Paulo.

Ao meu namorado, Ramon, que durante todo o tempo esteve do meu lado. Agradeço pela sua paciência e serenidade e por todo amor e carinho demonstrado. Obrigada por ser meu melhor amigo e por me incentivar a “lutar” pelos meus sonhos.

À Dona Fia e família pela estadia em sua casa durante boa parte do mestrado.

Ao coral Universitário pela oportunidade de conciliar a música à rotina da pós-graduação, especialmente ao Fred (maestro) pela existência desse coral.

À igreja Assembleia de Deus do Bairro Pedra Grande, onde ouvir o evangelho de Cristo me serviu de sustento durante toda essa etapa.

À cidade de Diamantina onde escrevi boa parte de minha história.

Finalmente, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho e para o privilégio de me tornar Mestre em Ciências Fisiológicas!

O Deus da Bíblia é também o Deus do genoma. Pode ser adorado na catedral ou no laboratório. Sua criação é majestosa, esplêndida, complexa e bela — e não pode guerrear consigo mesma. (COLLINS; 2006).

RESUMO

O óleo de pequi (OP) é rico em nutrientes e compostos bioativos, especialmente ácido oleico, carotenoides e compostos fenólicos que, isoladamente, apresentam efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios em sistemas biológicos, indicando um potencial funcional para esse alimento. Entretanto investigações com o OP em células do sistema imunológico humano, ainda são escassas. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar efeitos anti-inflamatórios do OP em culturas de células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC). Previamente, o perfil de ácidos graxos, o conteúdo de carotenoides e fenólicos totais foram determinados. Em seguida, a atividade antioxidante foi determinada pelos testes de captura do radical ABTS, capacidade antioxidante por varredura do radical DPPH e capacidade redutora do ferro. Por fim, utilizou-se culturas de PBMC obtidas a partir do sangue periférico de indivíduos adultos, hígidos e de ambos os sexos para os experimentos com células humanas. O OP foi testado em concentrações que variaram de 1 µg/mL a 1000 µg/mL. Previamente, avaliou-se a emissão de fluorescência interferente e a viabilidade celular. A proliferação de linfócitos e das subpopulações celulares CD4⁺ e CD8⁺ foi avaliada em culturas de 120 horas estimuladas pela fitohemaglutinina (PHA). As concentrações de interferon-γ (IFN-γ), interleucina (IL)-17, IL-2, IL-4, IL-10 e IL-6 foram determinadas em culturas de 4 horas. O OP apresentou alto conteúdo de ácido oleico, carotenoides e compostos fenólicos e demonstrou atividade antioxidante em todos os testes utilizados. O OP não induziu emissão de fluorescência interferente e não reduziu a viabilidade dos linfócitos. A concentração de 400 µg/mL de OP reduziu o índice de proliferação de linfócitos (p < 0,05). Na concentração de 200 µg/mL, o OP reduziu o índice de proliferação de linfócitos e a subpopulação CD8⁺ (p < 0,05), e reduziu as concentrações de IL-17, a IL-2 e de IL-4 (p < 0,05). Portanto, o OP apresentou atividade antioxidante *in vitro* e potencial anti-inflamatório em culturas de PBMC já que reduziu a proliferação de linfócitos e a produção de mediadores pró-inflamatórios. É provável que o ácido oleico, carotenoides e fenólicos, sejam determinantes, pelo menos em parte, desses efeitos.

Palavras-chave: *Caryocar brasiliense*, óleo de pequi, antioxidante, inflamação, linfócitos, citocinas.

ABSTRACT

Pequi oil (PO) is rich in nutrients and bioactive compounds, especially oleic acid, carotenoids and phenolics, with antioxidant and anti-inflammatory effects in biological systems, pointing out a functional potential for this food. However, studies with PO in immune system cells from humans are still scarce. Therefore, we aimed to investigate the anti-inflammatory effects of PO in human peripheral blood mononuclear cell (PBMC) cultures. Previously, the fatty acid profile of PO was determined by gas chromatography, the carotenoid content by spectrophotometry and the total phenolics were determined. Following, the *in vitro* antioxidant activity was determined by ABTS radical scavenging, DPPH radical scanning antioxidant capacity and iron reducing capacity tests. At last, PBMC cultures obtained from the peripheral blood of healthy adults of both sexes were used for human cell experiments. PO was tested at concentrations ranging from 1 µg/mL to 1000 µg/mL. Interfering fluorescence emission and cell viability were previously evaluated. The proliferation of lymphocytes, CD4⁺ and CD8⁺ cell subpopulations were evaluated in 120-hour cultures stimulated by phytohemagglutinin (PHA). Interferon-γ (IFN-γ), interleukin (IL)-17, IL-2, IL-4, IL-10 and IL-6 concentrations were determined in 4-hour cultures. PO showed had high amounts of oleic acid, total carotenoids and phenolic, and showed antioxidant activity in all *in vitro* tests. PO did not induce interfering fluorescence emission and did not reduce lymphocyte viability. At 400 µg/mL, PO reduced the lymphocyte proliferation index ($p < 0.05$). At 200 µg/mL, PO reduced the proliferation index of lymphocytes and CD8⁺ subpopulation ($p < 0.05$), and reduced IL-17, IL-2 and IL-4 concentrations ($p < 0.05$). Therefore, PO showed *in vitro* antioxidant effects and anti-inflammatory potential as it reduced the proliferation of lymphocytes and the production of pro-inflammatory mediators. Oleic acid, carotenoids, and phenolic compounds could be determinants, at least in part, of these effects.

Keywords: *Caryocar brasiliense*, pequi oil, antioxidant, inflammation, lymphocytes, cytokines.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA | 3 |
| 2 OBJETIVOS | 6 |
| 2.1 Geral | 6 |
| 2.2 Específicos | 6 |
| 3 REFERENCIAL TEÓRICO | 7 |
| 3.1 Características gerais da resposta imunológica..... | 7 |
| 3.2 <i>Crosstalk</i> entre estresse oxidativo e inflamação | 10 |
| 3.3 Nutrientes e compostos bioativos da dieta e suas interações com a inflamação e o estresse oxidativo | 12 |
| 3.3.1 <i>Ácidos graxos monoinsaturados (MUFA)</i> | 12 |
| 3.3.2. <i>Carotenoides</i> | 15 |
| 3.3.3 <i>Compostos fenólicos</i> | 17 |
| 3.4 Óleo de pequi (<i>Caryocar brasiliense</i>): valor nutricional e potencial funcional..... | 20 |
| 4 METODOLOGIA | 27 |
| 4.1 Obtenção e preparo do óleo de pequi | 27 |
| 4.2 Composição química e atividade antioxidante <i>in vitro</i> do óleo de pequi..... | 27 |
| 4.2.1 <i>Perfil de ácidos graxos</i> | 27 |
| 4.2.2 <i>Conteúdo de carotenoides,7 fenólicos totais e atividade antioxidante in vitro do óleo de pequi</i> | 27 |
| 4.3 Atividade anti-inflamatória do óleo de pequi em PBMC..... | 28 |
| 4.3.1 <i>Aspectos éticos</i> | 28 |
| 4.3.2 <i>Coleta de sangue</i> | 28 |
| 4.3.3 <i>Obtenção das PBMC</i> | 29 |
| 4.3.4 <i>Procedimentos preliminares</i> | 29 |
| 4.3.4.1 <i>Análise da emissão de fluorescência interferente por PBMC tratadas com óleo de pequi</i> | 29 |
| 4.3.4.2 <i>Análise da viabilidade de PBMC tratadas com óleo de pequi</i> | 31 |
| 4.3.5 <i>Efeitos do óleo de pequi sobre a proliferação de linfócitos em PBMC</i> | 32 |
| 4.3.6 <i>Efeitos do óleo de pequi sobre a produção de citocinas em culturas de PBMC</i> | 35 |
| 4.3.7 <i>Análises estatísticas</i> | 36 |
| 5 RESULTADOS | 37 |
| 5.1 Composição química e atividade antioxidantes <i>in vitro</i> do óleo de pequi | 37 |
| 5.2 Avaliação da atividade anti-inflamatória do óleo de pequi em culturas de PBMC .. | 38 |

| | |
|--|-----------|
| 5.2.1 Características dos sujeitos da pesquisa..... | 38 |
| 5.2.2 Procedimentos preliminares | 38 |
| 5.2.2.1Análise da emissão de fluorescência interferente em culturas de PBMC tratados com óleo de pequi | 38 |
| 5.2.2.2Análise da viabilidade celular em culturas de PBMC tratados com óleo de pequi ... | 382 |
| 5.2.3 Efeitos do óleo de pequi sobre a proliferação de linfócitos em culturas de PBMC..... | 42 |
| 5.2.4 Efeitos do óleo de pequi sobre a produção de citocinas em cultura de PBMC | 44 |
| 6 DISCUSSÃO..... | 46 |
| 7 RESUMO DOS PRINCIPAIS RESULTADOS E CONCLUSÃO | 52 |
| REFERÊNCIAS..... | 53 |
| ANEXO – A | 68 |
| ANEXO – B..... | 73 |

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Diversos alimentos, especialmente os de origem vegetal, têm sido alvo de inúmeras pesquisas científicas por apresentarem em sua composição química, nutrientes e compostos bioativos que podem afetar processos fisiológicos e patológicos relacionados à saúde e à doença, dentre os quais destacam aqueles com propriedades anti-inflamatórias. Dessa forma, já houve demonstração de propriedades anti-inflamatórias advindas de alimentos ricos em ácidos graxos monoinsaturados (do inglês, *monounsaturated fatty acid* – MUFA) como o azeite de oliva, o abacate, o açaí e o óleo de farelo de arroz (HORIGUCHI *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2019; LI *et al.*, 2013; DE PABLO *et al.*, 1998); de alimentos ricos em carotenoides como o tomate, a cenoura, o mamão e o caqui (ABDULLAH *et al.*, 2011; KIM *et al.*, 2017; WATZL *et al.*, 2003) e de alimentos ricos em compostos fenólicos como o cacau, o vinho tinto, o chá verde e a cebola (CHALONS *et al.*, 2018; CHO *et al.*, 2016; GOYA *et al.*, 2016; WU *et al.*, 2012).

Neste contexto, um alimento que vem despertando o interesse científico é o fruto do *Caryocar brasiliense*, popularmente conhecido como pequi, cuja polpa é rica em óleo comestível e de alto valor nutricional. O óleo de pequi é comumente utilizado na culinária regional como ingrediente no preparo de pratos típicos, na indústria farmacêutica e na medicina tradicional (ALMEIDA; SILVA, 1994; OLIVEIRA *et al.*, 2008). Estudos anteriores do nosso grupo (CÉSAR *et al.*, 2017; EVANGELISTA-SILVA *et al.*, 2021; OLIVEIRA *et al.*, 2017; TEIXEIRA *et al.*, 2013) e de outros autores (MIRANDA-VILELA *et al.*, 2014) têm demonstrado que esse óleo é rico em MUFA com predominância do ácido oleico, além de compostos antioxidantes com predominância de carotenoides (OLIVEIRA *et al.*, 2017), e diversos compostos fenólicos (CICERO *et al.*, 2018), os quais tem sido alvo de extensivas pesquisas que relacionam seus potenciais efeitos benéficos à saúde incluindo efeitos anti-inflamatórios.

Por exemplo, tem sido demonstrado que o ácido oleico pode modular o sistema imunológico, afetando tanto a imunidade inata quanto a adaptativa (YAQOOB, 2002). Parece que esse ácido graxo pode influenciar a proliferação de linfócitos (GORJÃO *et al.*, 2007; PASSOS *et al.*, 2016; VERLENGIA *et al.*, 2003) e a diferenciação de células imunes reguladoras (WU *et al.*, 2017), por meio de efeitos antioxidantes (CHEN *et al.*, 2018, DEBBABI *et al.*, 2017) e redução de mediadores inflamatórios (CHEN *et al.*, 2018; FINUCANE *et al.*, 2015). Tais efeitos são decorrentes da sua capacidade em inibir vias de sinalização reguladas por fatores de transcrição como o fator nuclear κ B (do inglês, *nuclear*

factor kappa B – NFκB) e o complexo NLRP3 inflamassoma (do inglês, *NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3* – NLRP3) (RAVAUT *et al.*; 2021).

Em relação aos carotenoides, as evidências apontam que eles possuem propriedades anti-inflamatórias por sua habilidade de também interagir com a via de sinalização do NFκB, impedindo sua translocação para o núcleo e dessa forma inibindo a expressão e produção de citocinas pró-inflamatórias. Eles também são capazes de bloquear o estresse oxidativo por interagir com a via de sinalização do fator nuclear eritroide-2 (do inglês, *Nuclear Factor, Erythroid 2* – Nrf2), aumentando sua translocação para o núcleo e ativando assim, enzimas antioxidantes como as glutatonas – S – transferases (revisado por KAULMANN; BOHN, 2014).

Os compostos fenólicos são conhecidos classicamente por suas atividades antioxidantes, entretanto tais compostos também podem interferir na regulação de células imunológicas, reduzir a síntese de citocinas pró-inflamatórias inibir vias de sinalização como a via regulada pelo NF-κB, e a via da proteína quinase ativada por mitógeno (do inglês, *Mitogen-activated protein Kinase* – MAPK), e ainda atuar no metabolismo do ácido araquidônico impedindo a produção de mediadores pró-inflamatórios (YAHFOUFI *et al.*, 2018).

Assim, nas últimas décadas, houve aumento considerável nas investigações relacionadas ao potencial funcional do fruto do *Caryocar brasiliense*, principalmente seu óleo, e especialmente por causa da sua composição em ácido oleico e carotenoides e compostos fenólicos. Desta forma, já foram demonstrados, em modelo animal, efeitos antioxidantes (COLOMBO *et al.*, 2015; MIRANDA-VILELA *et al.*, 2013; ROLL *et al.*, 2018; TORRES *et al.*, 2016; VALE *et al.*, 2019); anti-inflamatórios (DE SA-COUTINHO *et al.*, 2020; JUNIOR *et al.*, 2020; ROLL *et al.*, 2018; TORRES *et al.*, 2016); hipolipidêmicos (TORRES-SILVA *et al.*, 2020); antígenotóxicos e anticarcinogênicos (COLOMBO *et al.*, 2015; MIRANDA-VILELA *et al.*, 2011, 2014; PALMEIRA *et al.*, 2016); cicatrizantes (BEZERRA; BARROS; COELHO, 2015) e analgésicos (JUNIOR *et al.*, 2020). Em humanos, o óleo do pequi promoveu efeitos anti-inflamatórios e hipotensivos além de melhorar o perfil lipídico plasmático e a morfologia e função de hemácias de corredores (MIRANDA-VILELA *et al.*, 2009a, 2009b, 2010). Em pacientes portadores de Lúpus eritematoso sistêmico, esse óleo reduziu as concentrações de proteína C-reativa, o que também aponta para seu efeito anti-inflamatório (MONTALVÃO *et al.*, 2015).

Ainda, estudos prévios do nosso laboratório, em modelo animal, também apontaram benefícios da ingestão do óleo de pequi sobre o perfil de lipídeos séricos e hepáticos

(TEIXEIRA *et al.*, 2013), sobre a deposição hepática de gordura e morfologia intestinal (MORENO *et al.*, 2016), sobre a adiposidade visceral e função cardíaca de ratos saudáveis e alimentados com dieta ocidental (CÉSAR *et al.*, 2017; MENDES, 2019; MORENO *et al.*, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2017) e sobre o conteúdo de transportadores intestinais de nutrientes (EVANGELISTA-SILVA *et al.*, 2021). Recentemente, nosso grupo demonstrou ainda, pela primeira vez, efeitos advindos da ingestão do óleo de pequi sobre elementos da resposta imune intestinal de camundongos com colite ulcerativa induzida por dextran sulfato de sódio (DSS). Nós demonstramos, em nível intestinal, que a ingestão do óleo de pequi atenuou a resposta citotóxica, o que protegeu a mucosa dos camundongos de lesões imunológicas causadas pela colite. Esses efeitos contribuíram para melhorias de sinais clínicos da colite e para um melhor prognóstico da doença (MORENO *et al.*, 2021).

Entretanto, nesse estudo não foi possível avaliar, diretamente, efeitos do óleo de pequi sobre a proliferação e secreção de citocinas por células imunes. Assim, dada à escassez de informações científicas neste contexto, nosso próximo passo foi investigar, *in vitro*, os efeitos diretos do óleo de pequi na proliferação de células imunes isoladas do sangue periférico de humanos, bem como em suas secreções de citocinas. Nossa hipótese foi de que o óleo de pequi seria capaz de reduzir a proliferação de linfócitos e a secreção de citocinas pró-inflamatórias em células mononucleares do sangue periférico humano (do inglês, *peripheral blood mononuclear cell* – PBMC). Dada a importância das propriedades antioxidantes de compostos bioativos para atividade anti-inflamatória, nós também procedemos, previamente, a avaliação da atividade antioxidante *in vitro*, do óleo de pequi.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Investigar propriedades anti-inflamatórias do óleo de pequi em PBMC.

2.2 Específicos

- Determinar a composição em ácidos graxos, carotenoides totais e fenólicos totais do óleo de pequi.
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* do óleo de pequi.
- Avaliar a proliferação de linfócitos em culturas de PBMC tratadas com óleo de pequi.
- Determinar o perfil de secreção de citocinas em culturas de PBMC tratadas com óleo de pequi.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Características gerais da resposta imunológica

Constituído por uma rede de órgãos, células e moléculas, o sistema imunológico (ou imune) tem como principal finalidade a manutenção da homeostase do organismo, por meio do combate às agressões de modo geral (CRUVINEL *et al.*, 2010). As barreiras anatômicas e fisiológicas incluindo a pele intacta, os mecanismos muco-ciliares, o baixo pH estomacal, e as lisozimas bacteriolíticas presentes nas lágrimas e na saliva formam a primeira linha de defesa contra patógenos. Esses mecanismos são ainda reforçados por células como macrófagos, células dendríticas, mastócitos, neutrófilos, eosinófilos e células natural *killer* (NK), constituindo assim, a denominada resposta imunológica inata (TURVEY; BROIDE, 2010).

A resposta imunológica inata caracteriza-se pela rápida defesa às agressões, e tem como principais mecanismos a fagocitose, a ativação de proteínas do sistema complemento e a síntese de citocinas e quimiocinas de fase aguda. Entretanto, sozinho, essa resposta pode falhar em conter o processo infeccioso, portanto, trabalha em conjunto com a resposta imunológica adaptativa resultando no reconhecimento e na eliminação de patógenos de forma altamente eficiente. Por sua vez, a imunidade adaptativa consiste em uma resposta de alta especificidade e que fornece memória imunológica, cujos elementos celulares são os linfócitos B e T (CLARK; KUPPER, 2005; CRUVINEL *et al.*, 2010).

Os linfócitos B são responsáveis pela imunidade humoral que se caracteriza pela produção e liberação de anticorpos ou imunoglobulinas (Ig) capazes de neutralizar os antígenos contra os quais foram gerados. Para tal, os linfócitos B devem ser ativados, o que acarreta um processo de proliferação e diferenciação, que culmina na geração de plasmócitos com produção de imunoglobulinas com alta afinidade para o epítopo antigênico que originou a resposta. Para que ocorra a ativação do linfócito B é preciso que seu receptor, denominado receptor de célula B (do inglês, *B-Cell receptor* – BCR), ligue-se a um epítopo antigênico, o que desencadeia uma sequência de eventos intracelulares (MESQUITA Jr *et al.* 2010).

Os anticorpos são classificados pelo isotipo de suas cadeias pesadas em IgM, IgG, IgE e IgA. Inicialmente os linfócitos B produzem IgM, mas sob a influência de alguns fatores como o estímulo de citocinas elas sofrem eventos de recombinação genética adicionais que levam à troca de isotipos e à produção de subtipos de IgG, IgE ou IgA. O ajuste fino da especificidade do antígeno também é realizado pela maturação da afinidade. Esse processo envolve a hipermutação de genes de anticorpos combinados com competição por antígeno

dentro dos folículos linfoides, levando à sobrevivência seletiva das células B com maior afinidade pelo antígeno (CLARK; KUPPER, 2005).

Além da produção de anticorpos, os linfócitos B podem funcionar também como células apresentadoras de antígeno (do inglês, *antigen presenting cells* – APC). Após interiorizar e processar o antígeno, fragmentos são expressos na membrana dessas células ligados às moléculas do Complexo maior de histocompatibilidade (do inglês, *major histocompatibility complex* – MHC) de classe II resultando na diferenciação e regulação dos linfócitos T (GRAY; GRAY; BARR, 2007, MESQUITA Jr *et al.* 2010).

Além disso, as células B, assim como outras APC, têm uma função de programação na diferenciação das células T por meio da secreção de citocinas. Essas células são conhecidas por produzir citocinas como IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-12. Essa produção pode ser desencadeada por estímulos primários como os ligantes de receptores *toll-like* (do inglês, *Toll-like receptor* – TLR) (produção primária) ou depender da interação de células B ativadas com células T auxiliares ativadas (produção secundária) (GRAY; GRAY; BARR, 2007).

Os linfócitos T são as principais células efetoras da imunidade celular. Eles também expressam em sua superfície, receptores de antígenos altamente específicos denominados receptores de células T (do inglês, *T-Cell receptor* – TCR), esses receptores encontram-se associados a um complexo de quatro outras cadeias de sinalização invariantes, chamadas coletivamente de CD3 (FARBER, 2011).

Existem diversos subtipos de linfócitos T efetores. Classicamente os dois principais subtipos são os auxiliares e os citotóxicos, que apresentam um receptor TCR $\alpha\beta$ e as moléculas correceptoras, CD4 ou CD8, respectivamente (MESQUITA Jr *et al.* 2010).

Os linfócitos T citotóxicos (CD8⁺) reconhecem antígenos citoplasmáticos apresentados por moléculas MHC de classe I, que são expressas por praticamente todas as células nucleadas. Dessa forma, células infectadas por vírus e células tumorais normalmente são reconhecidas pelos linfócitos T CD8⁺ que por sua vez, induzem a via de morte celular programada (apoptose) pela ação de perforinas e granzimas e podem levar a apoptose pela expressão do receptor FAS ligante (FASL) que interage com a molécula FAS nas células alvo (CLARK; KUPPER, 2005, MESQUITA Jr *et al.* 2010).

Os linfócitos T auxiliares (CD4⁺), também chamados T *helper* (Th), reconhecem fragmentos antigênicos ligados às moléculas MHC de classe II expressas nas membranas das APC. Esses linfócitos são responsáveis por orquestrar outras células da resposta imune na erradicação de patógenos. Sua resposta é baseada na produção de citocinas, que estimulam a proliferação e a diferenciação das próprias células T auxiliares e citotóxicas e a ativação de

outras células como linfócitos B, macrófagos e células dendríticas (CLARK; KUPPER, 2005, MESQUITA Jr *et al.* 2010).

De acordo com seus perfis de expressão de citocinas, os linfócitos Th são ainda classificados em quatro subconjuntos distintos de células efetoras já bem caracterizadas na literatura, a saber: Th1, Th2, Th17 e Linfócitos T auxiliares foliculares (do inglês, *Follicular helper T lymphocytes* – Tfh) (DONG, 2021).

As células Th1 e Th2 foram descritas pela primeira vez no final da década de 1980 por Mossman; Coffman (1989). A linhagem Th1 contribui com a secreção de interleucina 2 (IL-2), importante para a proliferação dos próprios linfócitos T CD4⁺ de maneira autócrina e também induz a proliferação e aumenta a capacidade citotóxica dos linfócitos T CD8⁺. Além disso, células Th1 secretam também outras citocinas como interferon γ (IFN- γ) para aumentar a apresentação do antígeno e facilitar a função bactericida dos macrófagos. A resposta Th1 é responsável pela imunidade celular que é essencial nas respostas às infecções virais e no controle de patógenos citoplasmáticos e de células tumorais (DONG, 2021, MESQUITA Jr *et al.*, 2010).

Por outro lado, as células Th2 secretam interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5) e interleucina 13 (IL-13) que promovem a proliferação de células B e produção de imunoglobulina E (Ig-E) e a ativação de eosinófilos. São mediadoras da imunidade humoral e importantes no controle de patógenos extracelulares. Tais respostas estão associadas com as doenças alérgicas e infecções por helmintos (DONG, 2021; MCCOY *et al.*, 2010).

Os linfócitos Th17 representam um outro subtipo de linfócitos T efetores que também são importantes na proteção contra microrganismos extracelulares. Linfócitos Th17 foram originalmente descritos em modelos experimentais de doenças autoimunes como encefalite autoimune e artrite induzida por colágeno, que antes se acreditava serem mediadas predominantemente por linfócitos Th1. Os linfócitos Th17 produzem citocinas como interleucina 22 (IL-22), interleucina 26 (IL-26) e citocinas da família da interleucina 17 (IL-17). As citocinas da família IL-17 são potentes indutoras da inflamação ao favorecer a infiltração celular e a produção de outras citocinas pró-inflamatórias, além de sua produção desregulada estar associada às condições autoimunes, como esclerose múltipla, doença intestinal inflamatória, psoríase e lúpus (CHEN *et al.*, 2011; MESQUITA Jr *et al.*, 2009).

Os linfócitos T auxiliares foliculares refere-se a uma subpopulação de linfócitos T CD4⁺ identificada inicialmente nos centros germinativos dos folículos dos órgãos linfoides secundários. Sua função primordial é auxiliar os linfócitos B nas respostas timo-dependentes,

maturação da afinidade e formação de plasmócitos de vida longa, por meio da produção de citocinas como interleucina 21 (IL-21) e IL-4 (ALONSO; FOMIN; RIZZO, 2021).

A inflamação consiste em uma resposta fisiológica frente a um agente infeccioso, um antígeno ou qualquer outro estímulo que promova lesão tecidual e pode ser entendido como uma ação coordenada entre o sistema imunológico e o tecido afetado, visando a proteção tecidual, eliminação do agente agressor e o reparo da área afetada, retornando em seguida ao estado de homeostasia (ASHLEY; WEIL; NELSON, 2012). Uma resposta inflamatória aguda geralmente é benéfica, porém, a inflamação crônica pode ser prejudicial e provocar efeitos deletérios; o que acontece, por exemplo, em doenças como obesidade, diabetes, aterosclerose, doenças hepáticas, câncer, *Parkinson* e *Alzheimer* que apresentam em comum, a presença de um processo inflamatório associado (NETEA *et al.*, 2017).

3.2 Crosstalk entre estresse oxidativo e inflamação

O estresse oxidativo é uma condição biológica caracterizada pelo desequilíbrio entre a geração de compostos oxidantes em favor da geração excessiva de radicais livres ou espécies reativas, em detrimento da velocidade de remoção destes. Tal desequilíbrio é predominante entre as espécies reativas de oxigênio (do inglês, *reactive oxygen species* – ROS) e, ou de nitrogênio (do inglês, *reactive nitrogen species* – RNS), incluindo o oxigênio singlete, peróxidos lipídicos e óxido nítrico, e uma função reduzida de compostos antioxidantes (quantidade e, ou atividade), tais como enzimas (superóxido dismutase, catalase e glutational peroxidase), antioxidantes endógenos não enzimáticos (ureia, glutational reduzida, albumina) e antioxidantes exógenos (vitamina C, E, polifenóis, carotenoides) (BOUAYED; BOHN, 2010).

A produção de espécies reativas (ER) é um processo contínuo e fisiológico, parte integrante do metabolismo e está presente em condições normais, notadamente nos processos como produção de energia, crescimento celular, transcrição gênica, sinalização intracelular, síntese de hormônios e enzimas e na resposta imune (VASCONCELOS *et al.*, 2014). No entanto, a sua produção excessiva desencadeia o estresse oxidativo; um processo deletério que causa danos oxidativos às principais macromoléculas celulares, como carboidratos, lipídios, proteínas e ao ácido desoxirribonucleico (do inglês, *deoxyribonucleic acid* – DNA); resultando em disfunção celular, alterações em receptores, fluidez e permeabilidade da membrana, ativação de vias pró-inflamatórias e apoptose. A cronicidade desse processo tem relevantes implicações sobre a etiologia de várias doenças crônicas não transmissíveis, tais como as doenças cardiovasculares, as doenças inflamatórias intestinais, diabetes, câncer e

obesidade (ASLANI; GHOBADI, 2016; FANG; YANG; WU, 2002; PHAM-HUY; PHAM-HUY, 2008; VICTOR; ROCHA; DE LA FUENTE, 2004).

Está bem documentado na literatura que a inflamação é fortemente modulada pela sinalização redox (LAURIDSEN, 2019). As ROS são reconhecidas como importantes sinalizadoras intracelulares e estão envolvidas na regulação redox no interior das células do sistema imune. Quando em baixas concentrações as ROS participem na regulação de diferentes funções celulares, tais como proliferação, biossíntese de hormônios, quimiotaxia, explosão oxidativa e apoptose. Por outro lado altas concentrações de ROS estão envolvidas na ativação do NF- κ B com a manutenção do processo inflamatório, atuando como agente causal de dano a macromoléculas (OKTYABRSKY; SMIRNOVA, 2007, HWANG; KIM, 2007). Em infecções, por exemplo, a alta produção de radicais livres por células imunes no sítio da infecção, especialmente macrófagos, podem desencadear o estresse oxidativo. Adicionalmente, excessivas quantidades de ROS/RNS extracelulares, podem tanto oxidar biomoléculas, incluindo DNA, ácido ribonucleico (do inglês, *ribonucleic acid* – RNA), lipídeos e proteínas como podem modificar, estruturalmente, proteínas e genes para desencadear cascatas de sinalização pró-inflamatória (LOPRESTI *et al.*, 2014).

As relações entre inflamação crônica e estresse oxidativo também tem sido alvo de pesquisas, já que eles podem influenciar um ao outro em um círculo vicioso recíproco. Estados de inflamação crônica de baixo grau presentes em muitas doenças crônicas não transmissíveis estão associados com processos inflamatórios que permanecem por um longo período, e por isso são considerados deletérios à saúde. Na obesidade, por exemplo, a capacidade deficiente dos adipócitos em armazenar o excesso de energia como triglicerídeos contribui para o acúmulo de lipídeos e seus metabólitos em outros tecidos que não são necessariamente adaptados ao armazenamento de lipídeos (ELLULU *et al.*, 2017). Inevitavelmente, o excesso de adiposidade eleva a infiltração de macrófagos no tecido adiposo, induzindo, por um lado respostas pró-inflamatórias e por outro, aumento da produção de ERO/ERN e por consequência, estresse oxidativo. Ambos os processos contribuem para desencadear a inflamação sistêmica crônica de baixo grau (SPEER *et al.*, 2020).

3.3 Nutrientes e compostos bioativos e suas interações com a inflamação e o estresse oxidativo

Como dito anteriormente, a inflamação é fortemente modulada pela sinalização redox (LAURIDSEN; 2019), e ambos esses processos podem ser influenciados pela dieta do indivíduo (MARCOS; NOVA; MONTERO, 2003, MOHAMMED *et al.*, 2020).

Desequilíbrios nutricionais, tais como a ingestão excessiva de gorduras saturadas e açúcar refinado, ativam vias de sinalização pró-inflamatórias como o TLR e as vias do ácido araquidônico e da prostaglandina E2 (PGE₂) (MYLES; 2014), e promovem o estresse oxidativo (CUI *et al.*, 2012). Por outro lado, muitos constituintes dietéticos, tais como os ácidos graxos ômega-3 e ômega-9 (ácido oleico) (ARTEMIS, 2002; SCHWINGSHACKL; HOFFMANN, 2014), as vitaminas C e E (MOHAMMED *et al.*, 2020), fitoquímicos como os polifenóis (KHAN *et al.*, 2014; KUMAR SINGH *et al.*, 2019; RODRIGO; MIRANDA; VERGARA, 2011; YAHFOUFI *et al.*, 2018) e os carotenoides (BOHN, 2019; KAULMANN; BOHN, 2014; RUBIN *et al.*, 2017) demonstram atividade anti-inflamatória e antioxidante. Vários deles podem interagir com fatores de transcrição, tais como o NF-κB e o Nrf2, resultando em efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes, respectivamente (MOHAMMED *et al.*, 2020).

3.3.1 Ácidos graxos monoinsaturados (MUFA)

Diversas evidências atribuem efeitos anti-inflamatórios aos MUFA (revisado por ROCHA; BRESSAN; HERMSDORFF, 2017) e nesse aspecto, os ácidos graxos ômega – 9 (ω - 9) especialmente o ácido oleico tem sido o mais estudado. O ácido oleico é um ácido graxo de cadeia longa (18 carbonos), encontrado principalmente no azeite de oliva, nozes, óleo de pequi, azeitona, amendoim, óleo de canola e abacate, sendo o MUFA mais abundante na dieta (EVANGELISTA-SILVA *et al.*, 2021; KONSTANTINIDI; KOUTELIDAKIS, 2019; OLIVEIR *et al.*, 2017; SCHWINGSHACKL; HOFFMANN, 2014). O seu valor funcional é fortemente apoiado pelo amplo uso na região do Mediterrâneo, onde grandes quantidades de ácido oleico proveniente do azeite de oliva são consumidas e concomitantemente, as populações dessa região apresentam menores indicadores de mortalidade e morbidade comparativamente a outros grupos populacionais, especialmente em relação às doenças cardiovasculares, alguns tipos de câncer e outras doenças degenerativas (CARBAJAL; ORTEGA, 2001; DI DANIELE *et al.*, 2016; MARTIN-PELAEZ *et al.*, 2017; SHIVELY *et al.*, 2019; WANG; ZHAO, 2018).

O padrão dietético mediterrâneo é caracterizado por um alto consumo de peixes, azeite de oliva, frutas, hortaliças e grãos integrais; os lipídeos representa 1/3 do total de calorias, sendo aproximadamente 60% de MUFA e 20% de ácidos graxos saturados (do inglês, *saturated fatty acids* – SFA) (TRICHOPOULOU; KATSOUYANNI; GNARDELLIS, 1993). As dietas ocidentais contêm quantidades similares de lipídeos, mas com uma proporção de MUFA muito menor (36% de MUFA e 33% de SFA) (SHIVELY *et al.*, 2019).

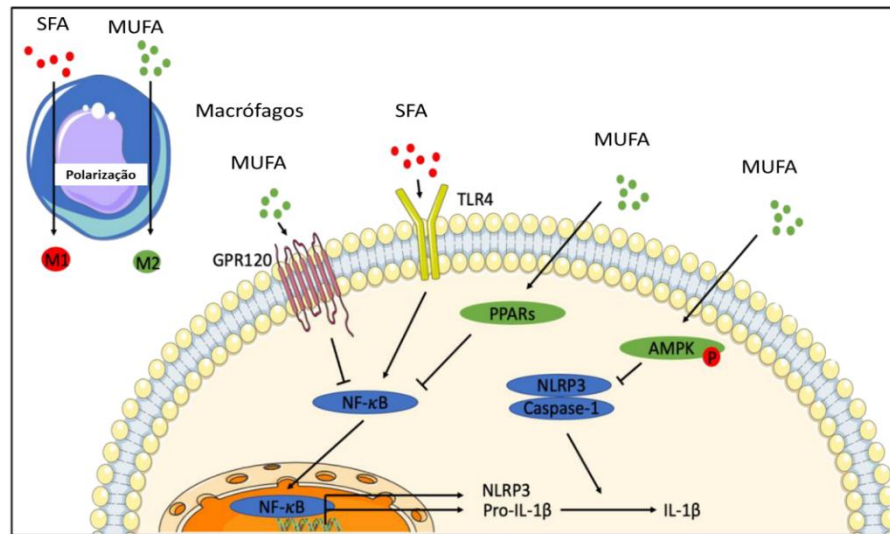
Quando comparada a outros padrões dietéticos, a dieta mediterrânea é associada à redução da pressão arterial, melhorias no metabolismo da glicose e de lipídeos e redução da inflamação crônica (CASAS; ESTRUCH; SACANELLA, 2018; DE PERGOLA; D’ALESSANDRO, 2018; ESPOSITO *et al.*, 2017). Além disso, impactos positivos da dieta mediterrânea, incluindo a diminuição da atividade da doença e melhor qualidade de vida, também têm sido apontados no contexto de algumas doenças autoimunes como a psoríase (BARREA *et al.*, 2015), a artrite reumatoide (FORSYTH *et al.*, 2018) e o lúpus eritematoso sistêmico (CONSTANTIN *et al.*, 2019).

Além disso, efeitos anti-inflamatórios dos MUFA também já foram demonstrados *in vitro* e em modelos de animais experimentais: em culturas de células, Lior *et al.* (2003) observaram que o azeite de oliva diminuiu a expressão da enzima ciclooxigenase 2 (COX-2) e da proteína anti-apoptótica Bcl-2 (do inglês, *B-cell lymphoma 2* – Bcl-2), fenômenos que foram associados ao aumento das taxas de diferenciação celular e de apoptose. No mesmo estudo, os autores observaram ainda que os ácidos graxos derivados do azeite de oliva reduziram também a proliferação celular. Já Finucane *et al.* (2015) demonstraram que camundongos alimentados com dieta hiperlipídica, rica em MUFA, apresentaram redução na secreção de IL-1 β pelo tecido adiposo, comparados com camundongos alimentados com dieta hiperlipídica, rica em SFA. No mesmo trabalho um experimento *in vitro* demonstrou que esses MUFA inibem a secreção da IL-1 β e sustenta a ativação da proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina (do inglês, *adenosine monophosphate-activated protein kinase* - AMPK), o que também está associado à redução da inflamação (FINUCANE *et al.*, 2015). Em humanos, Van Dijk *et al.* (2012) demonstraram que o consumo de dieta rica em MUFA por adultos com sobrepeso ou obesidade diminuiu as concentrações plasmáticas de diversas proteínas e citocinas pró-inflamatórias bem como a expressão de genes da fosforilação oxidativa em PBMC isoladas desses indivíduos. Já Sakhaei *et al.* (2018) demonstraram redução da concentração sérica de IL-17 em mulheres adultas com alto consumo de azeite de oliva. Tem sido também demonstrado que o maior consumo de MUFA melhora a resposta antioxidante em células imunes (Moreno *et al.*, 2001).

Em relação ao ácido oleico, especificamente, tem sido evidenciado sua capacidade de modular a resposta imunológica, afetando tanto a imunidade inata quanto adaptativa (YAQOOB, 2002). Ensaios *in vitro* já demonstraram sua influência sobre a inibição da proliferação de linfócitos T de maneira dose dependente (GORJÃO *et al.*, 2007; PASSOS *et al.*, 2016; VERLENGIA *et al.*, 2003); diferenciação de células imunes reguladoras (Wu *et al.*, 2017), proteção contra o estresse oxidativo e lipotoxicidade celular (CHEN *et al.*, 2018, DEBBABI *et al.*, 2017) e redução de marcadores da inflamação incluindo IFN- γ , TNF, IL-1, IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-10, IL-18, NLRP3 e proteína quimiotática de monócitos-1 (do inglês, *monocyte chemoattractant protein-1* – MCP-1) (CHEN *et al.*, 2018; FINUCANE *et al.*, 2015, KIEN *et al.*, 2016).

Assim, resumidamente, dentre os potenciais mecanismos envolvidos na ação dos MUFA, e em especial do ácido oleico, na inflamação, destacam-se seu efeito inibitório sobre a via de sinalização regulada pelo NF κ B e o complexo NLRP3 inflamassoma. Postula-se que os MUFA inibem a ativação do NF κ B porque se ligam a receptores acoplados à proteína G (GPR120, por exemplo) ou a receptores ativados por proliferadores de peroxissomo (do inglês, *peroxisome proliferator-activated receptors* - PPAR) e em ambos os casos impedem a translocação desse fator para o núcleo e por consequência a sua ativação. Ademais, esses compostos podem também promover a fosforilação da proteína AMPK e com isso inibir o complexo NLRP3 inflamassoma. Além disso, Os MUFA também inibem a polarização de macrófagos M1, potencializando a polarização de macrófagos M2 (RAVAUT *et al.*; 2021) (FIG.1).

Figura 1. Mecanismos de ação dos MUFA na inflamação*.



*Figura adaptada de Ravaut *et al.* (2021)

3.3.2. Carotenoides

Os carotenoides constituem um grupo de pigmentos vegetais, na sua maioria tetraterpenoides, tais como o β -caroteno, o α -caroteno, o licopeno, a luteína, a zeaxantina, a β -criptoxantina, dentre outros. Os principais alimentos relacionados como fontes de carotenoides são as frutas amarelo alaranjadas e as hortaliças verde-escuras (AMBRÓSIO *et al.*, 2006; RODRIGUEZ-AMAYA *et al.*, 2008).

Eles apresentam em sua estrutura química um sistema extenso de duplas ligações conjugadas que podem ser substituídas por grupos terminais, o que lhes confere atividade antioxidante (GULÇIN, 2012; MAIANI *et al.*, 2009; PRIOR *et al.*, 2005). Graças à sua natureza hidrofóbica, eles podem incorporar em membranas celulares aumentando sua firmeza e diminuindo a peroxidação lipídica, o que contribui para melhorias na funcionalidade das células (JOHNSON *et al.*, 2018; RESZCZYNSKA *et al.*, 2015).

Em seres humanos, tais compostos constituem o grupo fitoquímico solúvel em gorduras mais abundante no plasma e apresentam um clearance renal reduzido (KLOTZ, 2009), o que aumenta suas meias vidas, resultando em efeitos biológicos mais prolongados (OLMEDILLA *et al.*, 2001).

Os carotenoides têm sido estudados principalmente devido às suas propriedades antioxidantes (FIEDOR; BURDA, 2014; KAWATA *et al.*, 2018; LIN *et al.*, 2016; MILANI, *et al.*, 2017; SKIBSTED, 2012; STORNILOLO *et al.*, 2019; TERAOKA; MINAMI; BANDO, 2010). Eles agem, especialmente, no sequestro do oxigênio singlete e de peróxidos lipídicos na bicamada fosfolipídica das membranas celulares (BARREIROS; DAVID, 2006).

Evidências apontam seus efeitos sobre a diminuição do risco de doenças degenerativas como câncer, doenças cardiovasculares e diabetes; e ainda em melhorias da saúde ocular e função cognitiva (BERTRAM 1993; BERNSTEIN *et al.*, 2016; FEENEY *et al.*, 2013; PALOZZA *et al.*, 2009; ROOHBAKHSH; KARIMI; IRANSHAHI, 2017; VOUTILAINEN *et al.*, 2006). Além disso, alguns carotenoides podem também ser convertidos em vitamina A e exercer variadas funções biológicas (OLSON *et al.*, 1989).

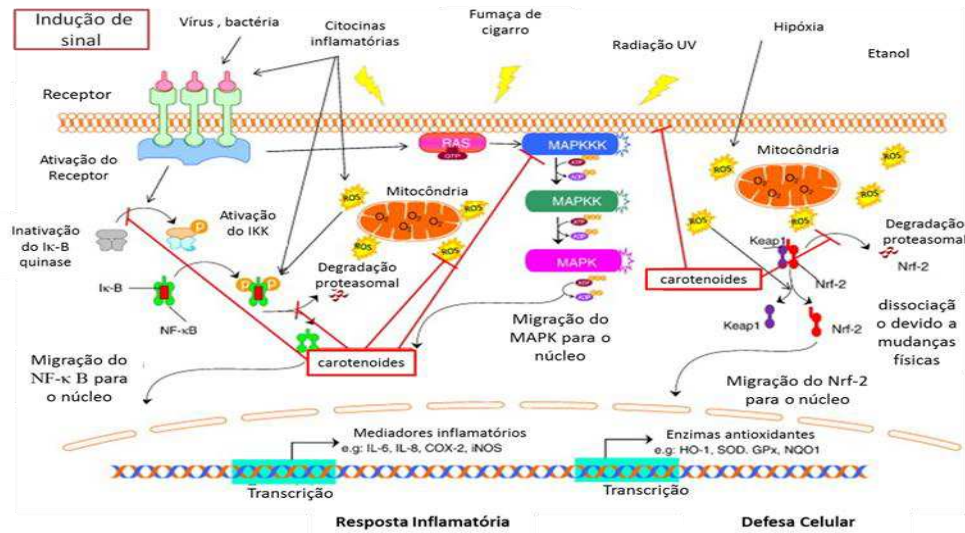
Conforme revisado por Bonh (2019), baixas concentrações de α - e β -caroteno, luteína/zexantina, bem como de carotenoides totais têm sido associadas ao aumento do estresse oxidativo (BONH; 2019) e da inflamação (WALSTON *et al.*; 2006). Já Watzl *et al.* (2003) demonstraram que a ingestão de uma dieta pobre em carotenoides acompanhada pelo consumo de 330 mL / dia de suco de tomate (fornecendo grandes quantidades de licopeno) ou de cenoura (fornecendo grandes quantidades de α e β -caroteno) resultou no aumento rápido das concentrações plasmáticas de carotenoides acompanhado por uma modulação tardia das funções imunes.

Em linfócitos e neutrófilos, o β -caroteno reduziu a atividade de citocinas pró-inflamatórias e exerceu efeitos contra danos oxidativos (FABIANI *et al.*, 2001; LIU *et al.*, 2000; MORIGUCHI *et al.*, 1996). Já a β -criptoxantina, a luteína e o licopeno reduziram as concentrações das quimiocinas MCP-1, M-CSF (do inglês, *macrophage colony-stimulating factor* – M-CSF) e CXCL-10 (do inglês, *C-X-C motif chemokine ligand 10* – CXCL-10) e das citocinas TNF e IL-1 β em células endoteliais estimulados por frutose (LIN *et al.*, 2020). Além disso, pacientes com aterosclerose que receberam 20 mg/dia de luteína tiveram uma significativa redução de IL-6 e MCP-1 (XU *et al.*, 2013).

Em relação às vias pelas quais os carotenoides exercem seus efeitos anti-inflamatórios e antioxidante destaca-se a modulação do NF κ B e do Nrf2 (FIG.2). A inativação da via NF- κ B se dá pela interação desses compostos com os resíduos de cisteína do IKK (Proteína quinase de do inibidor do complexo fator nuclear- κ B – I κ B) e / ou da subunidade B do NF- κ B (KAULMANN; BOHN, 2014). Por exemplo, no estudo de Ucci *et al.*, (2019), utilizando células endoteliais isoladas do cordão umbilical de mulheres com diabetes gestacional foi visto que o tratamento com os carotenoides β - caroteno e licopeno reduziu a translocação do NF- κ B para o núcleo. Da mesma forma, Linnewiel *et al.* (2014) em seu estudo com células mamárias cancerígenas T47D e osteoblastos, observaram que, derivados de carotenoides atenuaram a fosforilação da I κ B induzida pelo TNF, reduzindo o efeito pró-inflamatório do NF- κ B. Os mesmos autores mediram os efeitos dos derivados de carotenoides na expressão de proteínas endógenas e observaram redução do mRNA de dois genes dependentes do NF κ B: o

gene do TNF e do ligante de quimiocina-1 (CCL-1). Adicionalmente, os carotenoides também podem influenciar a via do Nrf2, estimulando sua translocação para o núcleo, o que induz a transcrição de genes relacionados às defesas antioxidantes enzimáticas, como a glutatona S-transferase resultando no bloqueio do estresse oxidativo (KAULMANN; BOHN, 2014).

Figura 2. Mecanismos de ação dos carotenoides na inflamação*



*Figura adaptada de Kaulmann; Bohn (2014)

3.3.3 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos, ou polifenóis, constituem um extenso grupo de fitoquímicos originados do metabolismo secundário das plantas sendo importantes para a defesa destas contra agressões externas atuando como agente antipatogênico, além de influenciar sua pigmentação, estabilidade oxidativa e sabor (BOUDET; 2007). Como principais fontes de polifenóis dietéticos destacam-se as frutas e bebidas como chá verde, vinho tinto e café, além dos vegetais, leguminosas e cereais (MANACH *et al.*, 2004).

Quimicamente, os polifenóis são definidos como substâncias que possuem um ou mais anéis aromáticos ligados a um ou mais radical hidroxila e/ou outros substitutos (TSAO; 2010). De acordo com sua diversidade estrutural (número de anéis aromáticos), esses compostos são classificados como flavonoides (flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavonois, e antocianinas) e não flavonoides (ácidos fenólicos, ácidos hidroxicinâmicos, lignanos, estilbenos e taninos) (DI LORENZO *et al.*, 2021; MANACH *et al.*, 2004).

Cientificamente, tais compostos têm sido amplamente estudados por seu envolvimento na prevenção de doenças das quais o componente inflamatório faz parte de sua etiologia e/ou

patologia, como as doenças cardiovasculares, síndrome metabólica, câncer entre outras (DEL BO *et al.*, 2019; TUFARELLI *et al.*, 2017).

Neste sentido, mais uma vez a dieta mediterrânea é destaque por ser baseada em alimentos vegetais além da presença do vinho tinto e do azeite de oliva, em conjunto importantes para o fornecimento de grandes quantidades de polifenóis. Por exemplo, os efeitos cardioprotetores do resveratrol (um estilbeno presente no vinho tinto) são atribuídos principalmente às suas propriedades anti-inflamatórias. Diversos estudos *in vivo* e *in vitro* já demonstram que esse composto pode inibir a enzima COX, reduzir a expressão de IL-1 β e NLRP3 e induzi eNOS (óxido nítrico sintase endotelial) (BIASUTTO; MATTAREI, ZORATTI, 2012, CHALONS *et al.*, 2018, MOHAR; MALIK, 2012 SPECIALE *et al.*, 2011).

Da mesma forma, importância tem sido atribuída à fração polifenólica do azeite de oliva extravirgem como responsável por seus efeitos cardioprotetores (GEORGE *et al.*, 2018). Nesse contexto, Fitó *et al.* (2008) demonstraram que uma dose diária de 50 ml de azeite de oliva extravirgem foi eficaz em reduzir marcadores pro-inflamatórios (IL-6 e proteína C reativa) em pacientes com doença cardíaca coronária estável. Além disso, a oleuropeína, o hidroxitirosol e seus derivados (polifenóis abundantes no azeite de oliva) são reconhecidos como poderosos antioxidantes com propriedades anticâncer, antiangiogênicas e anti-inflamatórias (GORZYNIK-DEBICKA *et al.*, 2018).

Ademais, efeitos anti-inflamatórios também têm sido atribuídos a outros compostos fenólicos. Em modelos experimentais, já foi demonstrado que o chá verde e seu ingrediente ativo, a epigallocatequina-3-galato (o polifenol mais abundante no chá) modulam as funções das células imunes podendo prevenir ou melhorar os sintomas de algumas doenças autoimunes como artrite reumatoide (AHMED *et al.*, 2008), esclerose múltipla (WANG *et al.*, 2012) e colite ulcerativa (ABBOUD *et al.*, 2008). Esses resultados associam aos achados onde o extrato de chá verde e a epigallocatequina-3-galato inibem a produção de citocinas pro-inflamatórias e a proliferação de linfócitos T e de células estimuladoras alogênicas (KIM *et al.*, 2007; WATSON *et al.*, 2005; WILASRUSMEE *et al.*, 2002; WU *et al.*, 2009). Além disso, já foi demonstrado também que a epigallocatequina-3-galato inibe a diferenciação de linfócitos Th1 e Th17 e aumenta a diferenciação de células T reguladoras induzidas (WANG *et al.*, 2013; WU *et al.*, 2012).

Conforme revisado por Goya *et al.* (2016) vários estudos envolvendo culturas celulares e modelos animais já demonstraram também efeitos anti-inflamatórios dos flavanois presentes no cacau sendo relatados redução de citocinas pró-inflamatórias e inibição de

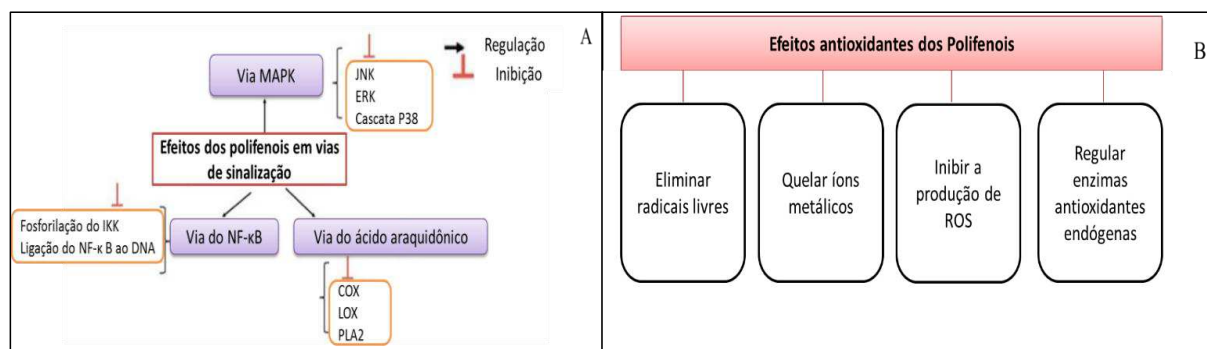
mediadores inflamatórios como NF- κ B, COX-2 e iNOS (óxido nítrico-sintase induzida). Além disso, estudos em animais e humanos mostraram adicionalmente que a ingestão de cacau ou a administração de flavanois diminuem biomarcadores críticos de inflamação endotelial apoiando ainda mais o seu efeito anti-inflamatório (GOYA *et al.*, 2016).

Dessa forma, a atuação dos polifenois no processo inflamatório ocorre de diversas maneiras, como pela alteração de processos enzimáticos envolvidos na proliferação, ativação e diferenciação de linfócitos (HUSSAIN *et al.*, 2016; MARGINA *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2013); inibição de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias como TNF, IL-1 β , IL-6, IL-8 e MCP-1 e regulação positiva da produção de IL-10 (citocina anti-inflamatória) (CROUVEZIER *et al.*, 2001; GONZÁLEZ *et al.*, 2011; SATO *et al.*, 1997) e ainda pela modulação de diferentes vias de sinalização (YAHFOUFI *et al.*, 2018).

Em relação às vias de sinalização sobre as quais os polifenois podem atuar destacam-se as vias reguladas pelo NF- κ B, pela MAPK e a via do ácido araquidônico. Eles podem modular a cascata de ativação do NF- κ B agindo em diferentes etapas, tais como inibindo a fosforilação do IKK ou impedindo a ligação do NF- κ B ao DNA. Em relação à via MAPK os polifenois podem atuar por meio da inibição das proteínas JNK (do inglês, *c-Jun amino-terminal kinases* – JNK), ERK (do inglês, *extracellular signal-regulated protein kinases* – ERK) e p38 resultando no bloqueio dessa via. Por fim, os polifenois reduzem a atividade de enzimas envolvidas na síntese do ácido araquidônico como as PLA2 (fosfolipase A2), as COX e as LOX (lipoxigenases) reduzindo assim a síntese de prostaglandinas e leucotrienos de caráter pro-inflamatórios (YAHFOUFI *et al.*, 2018) (FIG. 3 A).

Além disso, os polifenois são também classicamente reconhecidos por seus efeitos antioxidantes. Eles podem eliminar os radicais livres, quelar íons metálicos, inibir certas enzimas envolvidas na produção de ROS, como a xantina oxidase e a NADPH oxidase (NOX) e regular positivamente as enzimas antioxidantes endógenas, como a superóxido dismutase (SOD), a catalase e a glutathiona peroxidase (GSH) (MISHRA *et al.*, 2013), contribuindo assim com a redução do estresse oxidativo e proteção de compostos endógenos de lesões oxidativas (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002, YAHFOUFI *et al.*, 2018) (FIG. 3B).

Figura 3. Mecanismos de ação dos polifenóis na inflamação*



*Figura adaptada de Yahfoufi *et al.* (2018)

3. 4 Óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*): valor nutricional e potencial funcional

Dentre as diversas espécies típicas do cerrado brasileiro destaca-se o *Caryocar brasiliense* (Camb.), uma planta arbórea de oito a doze metros de altura, conhecida popularmente como pequizeiro (FIG. 4A), cuja distribuição territorial se dá nos estados do Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Goiás, Minas Gerais e na parte alta de São Paulo até o Norte do Paraná. Pertence à família *Caryocaraceae* e ao gênero *Caryocar*, que no Brasil engloba ainda duas outras espécies: *Caryocar coriaceum* (Wittm.) comum na Bahia, Piauí, Ceará, Pernambuco e Goiás e *Caryocar villosum* (Aubl.) encontrada na região da Amazônia. As três espécies produzem frutos com características físicas e químicas semelhantes, sendo todas utilizadas na alimentação (ALMEIDA *et al.*, 1988; LORENZI, 1992).

O pequizeiro é muito versátil quanto a sua utilização, pois dele se aproveita praticamente tudo. Graças à beleza de suas copas e flores (FIG. 4B) a árvore é apreciada como planta ornamental. Sua madeira é de ótima qualidade e alta resistência o que contribui para o seu importante valor econômico (ALMEIDA; SILVA, 1994). Devido a altos teores de taninos nas folhas e na casca, essas vêm sendo utilizadas como matéria-prima na fabricação de tinturas, que são úteis no tingimento de vários produtos, como couro, lã e algodão (SILVA FILHO, 1992). As folhas são ainda utilizadas pela população para fins terapêuticos, como no tratamento de resfriados, bronquite e gripe (VIEIRA; MARTINS, 2000). Além disso, o seu fruto (pequi) é um produto indispensável na alimentação das populações que vivem ao redor das áreas de sua ocorrência fornecendo parte do aporte energético e de nutrientes no período da safra, principalmente para famílias de baixa renda (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

O pequi (FIG. 4C) é coberto pela casca de coloração verde, e em seu interior há de um a quatro caroços cheios de espinhos envolvidos por uma polpa amarela que constitui a parte

mais utilizada para fins comestíveis. Sua polpa pode ser consumida *in natura*, em pratos como o arroz com pequi ou em diversas outras preparações alimentícias, como doces, conservas, sucos, sorvetes, geleias e licores (ALMEIDA; SILVA, 1994).

Dentre os compostos de interesse nutricional e funcional presentes na polpa do pequi destaca-se a presença de lipídeos, proteínas, carboidratos, vitaminas C, E e folatos, fibras, compostos fenólicos e carotenoides (CARDOSO *et al.*, 2013, LIMA *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Os lipídeos (66,76 %) (MORENO *et al.*, 2016) representa o componente nutricional mais abundante da polpa do pequi possibilitando a extração do seu óleo (FIG 4D), que é útil como ingrediente em preparações culinárias, na indústria cosmética para a fabricação de cremes e sabonetes e também na medicina tradicional contra gripe, bronquite e resfriado (ALMEIDA; SILVA, 1994; OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Do ponto de vista nutricional o óleo de pequi é composto majoritariamente por triglicerídeos, sendo o ácido graxo oleico e o palmítico os mais abundantes (57,42% e 37,05%, respectivamente). O óleo de pequi é também abundante em carotenoides, presentes na quantidade total de 32,18 mg.100g⁻¹, o que justifica a sua coloração amarelo-alaranjada (OLIVEIRA *et al.*, 2017). Contém diversos compostos fenólicos com destaque pra ácido p-cumárico (0,59 µg.g⁻¹), luteolina (0,08 µg.g⁻¹), vanilina (0,69 µg.g⁻¹), ácido cafeico (0,18 µg.g⁻¹) e ácido hidroxibenzoico (0,61 µg.g⁻¹) (CICERO *et al.*, 2018).

Figura 4 – *Caryocar brasiliense*: árvore, flor, fruto e óleo.



A – Pequi (*Caryocar brasiliense*), B – Flores, C – Fruto (pequi), D – Óleo de pequi. Fonte: A – Arquivo pessoal; B, C, D – <https://br.pinterest.com>.

Considerando a composição química peculiar, com destaque para o ácido oleico, carotenoides e compostos fenólicos, o óleo de pequi apresenta-se como um alimento de grande potencial funcional, o que vem despertando o interesse de muitos pesquisadores. Assim, nas últimas décadas, houve um crescimento substancial nas investigações a respeito de propriedades funcionais e biológicas desse alimento.

Inicialmente, ensaios *in vitro* realizados por Roesler *et al.* (2008) demonstraram que extratos etanólicos da polpa de pequi, inibiram a peroxidação de lipídeos de membrana de forma dose dependente, o que foi atribuído ao seu alto conteúdo de antioxidantes. Resultado semelhante foi descrito por Ferreira *et al.*, (2011) que relataram atividade antioxidante, antibacteriana e citotóxica do óleo de pequi.

Estudando o potencial antioxidante do óleo do pequi no câncer, Miranda-Vilela *et al.* (2011a) demonstraram que a administração do óleo de pequi (30 mg/animal), antes ou ao longo da indução de tumor sólido de *Ehrlich* em camundongos *Swiss* fêmeas, inibiu efetivamente seu crescimento e ainda foi mais eficaz do que outros tratamentos antioxidantes (vitaminas C e E) na contenção do crescimento tumoral. Esse mesmo grupo observou ainda que o óleo de pequi potencializou o tratamento tumoral, aumentou a imunidade dependente de linfócitos e reduziu efeitos adversos associados a danos oxidativo provocados pela quimioterapia (MIRANDA-VILELA *et al.*, 2013, 2014).

Em 2012, Aguilar *et al.* (2012) demonstraram efeitos paradoxais do óleo de pequi na aterogênese em ratos. A ingestão de uma dieta rica em óleo de pequi contribuiu para a redução da velocidade da aterogênese em estágios iniciais (atribuído principalmente à sua capacidade antioxidante). Entretanto, em estágios mais avançados o consumo dessa mesma dieta resultou em aumento das concentrações séricas de LDL-colesterol (do inglês, *low density lipoprotein* – LDL); favorecendo o aumento das placas ateroscleróticas, sendo este efeito atribuído ao alto conteúdo de ácido palmítico do óleo.

Colombo *et al.* (2015) demonstraram que a suplementação com 15µL/dia de óleo de pequi, em camundongos BALB/c, por 60 dias reduziu o estresse oxidativo induzido por uretano, com redução do dano ao DNA e redução da peroxidação de lipídeos.

Em um estudo realizado por Bezerra, Barros e Coelho (2015) foi visto o papel cicatrizante do óleo de pequi decorrente da aplicação de uma dose tópica de 1 mL de óleo sobre uma ferida produzida cirurgicamente em ratos *Wistar*. Os autores afirmaram que o óleo induziu o reparo das lesões cutâneas ao promover maior velocidade de reparo tecidual, redução de células inflamatórias e aumento de fibroblastos.

Em 2016, Traesel *et al.* (2016) demonstraram a baixa toxicidade do óleo de pequi em ratos. Foi realizado o teste de toxicidade aguda, em ratas *Wistar* que receberam, por via oral, uma dose única de 2000 mg de óleo de pequi / kg e foram observadas por 14 dias. E o teste de toxicidade subcrônica, em ratos *Wistar* machos e fêmeas que receberam por via oral, doses repetidas de 125, 250, 500 ou 1000 mg de óleo / kg, sendo tratadas e observadas por 28 dias. No teste de toxicidade aguda, não foram observadas alterações nem mortalidade. No teste de toxicidade subcrônica, as doses testadas não produziram alterações significativas nos parâmetros comportamentais, fisiológicos, bioquímicos ou histopatológicos em animais.

No estudo de Torres *et al.* (2016), foram observados efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios do óleo de pequi nos fígados de ratos tratados com óleo de pequi (3 ou 6 mL.kg⁻¹), por 21 dias anteriormente à utilização de tetracloreto de carbono (uma potente hepatoxina capaz de gerar radicais livres que levam ao estresse oxidativo e ao processo inflamatório). Os animais apresentaram significativa redução na lesão hepática, bem como nas concentrações de leptina e mediadores inflamatórios, tais como a IL-6, leucotrienos 4 e 5, e receptor de TNF. Além disso, o tratamento com óleo de pequi aumentou a capacidade antioxidante ao aumentar a atividade das enzimas glutathione peroxidase e glutathione reductase hepática. Ainda, Palmeira *et al.* (2016) mostraram que camundongos tratados com doses diárias de 100 mg.kg⁻¹ ou 400 mg.kg⁻¹ durante 160 dias, também obtiveram uma proteção hepática contra lesões pré-neoplásicas e de adenoma induzidos por dietilnitrosamina.

Traesel *et al.* (2017) avaliaram possíveis efeitos embriotóxicos e teratogênicos do óleo de pequi em camundongos fêmeas durante a gestação. Para tal, as fêmeas foram alimentadas durante a gestação com dietas-padrão suplementadas com 250, 500 e 1000 mg de óleo de pequi por kg de dieta. Não foram encontrados efeitos negativos decorrente da ingestão de nenhuma das dietas indicando que o consumo do óleo de pequi durante a gestação foi seguro.

Roll *et al.* (2018) investigaram efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios do óleo de pequi sobre o hemograma e danos no DNA de camundongos *swiss* adultos jovens e de meia idade de ambos os sexos tratados com 30 mg/dia de óleo de pequi durante 15 dias. Os autores demonstraram que o óleo de pequi melhorou as concentrações de hematócrito e hemoglobina em fêmeas de meia idade e não apresentou efeitos genotóxico ou clastogênico, além de resultar no aumento de linfócitos e diminuição de neutrófilos e monócitos, sugerindo que a suplementação dietética com óleo de pequi pode proteger contra anemia, inflamação e estresse oxidativo relacionados ao envelhecimento, auxiliando na prevenção de doenças crônicas degenerativas dessa fase, principalmente no sexo feminino.

Vale *et al.* (2019) demonstraram efeitos da ingestão do óleo de pequi contra lesões resultantes do estresse oxidativo associado ao exercício físico em ratos adultos. Foi visto que, após cinco semanas de treinamento e ingestão de 400mg de óleo de pequi por dia, os animais apresentaram redução considerável em lesões hepáticas em relação aos animais que não receberam o óleo. Ainda, Junior *et al.* (2020) demonstraram pela primeira vez que, além de efeitos anti-inflamatórios, o óleo de pequi também exerceu efeitos analgésicos, em camundongos *Swiss* machos submetidos a um modelo de inflamação de pata induzida por carragenina, e que receberam doses de 300, 700 e 1000 mg / kg de óleo de pequi por via oral.

Torres-Silva *et al.* (2020) relataram que o óleo de pequi apresenta excelente estabilidade oxidativa e demonstraram seus efeitos sobre o perfil lipídico de camundongos. A suplementação com óleo de pequi reduziu os níveis de colesterol total, LDL-colesterol e não HDL-colesterol (do inglês, *high density lipoprotein* – HDL). Além disso, os autores demonstraram também que o tratamento sinérgico com azeite de oliva e óleo de pequi proporcionou melhores resultados para as gorduras viscerais e índice de adiposidade.

De Sá Coutinho *et al.* (2020) desenvolveram e avaliaram efeitos de nanoemulsões contendo óleo de pequi (pequi-NE) na concentração de 20 mg/kg em um modelo de lesão pulmonar induzida por lipopolissacarídeo (LPS) em camundongos. As nanoemulsões foram administradas por via oral, 4 horas antes da exposição intranasal ao LPS. Os resultados demonstraram que o pré-tratamento com o pequi-NE aboliu completamente o acúmulo de leucócitos, reduziu os níveis de mieloperoxidase, quimiocina derivada de queratinócitos, TNF, IL-1 β , IL-6 e MCP-1. Dessa forma, os autores apontaram que o uso de nanoemulsões como carreadores aumenta as propriedades anti-inflamatórias do óleo de pequi. Pires *et al.* (2020) também desenvolveram e testaram nanocápsulas contendo óleo de pequi em feridas dérmicas de ratos *Wistar* machos por 14 dias e demonstraram que óleo nanoestruturado induziu a um aumento da produção de colágeno tipo 1 e à cicatrização das feridas.

Dentro dessa perspectiva é importante ressaltar que estudos envolvendo humanos ainda são escassos, existindo na literatura até o momento apenas dois estudos envolvendo tal temática. Em um dos estudos, foram investigados os efeitos da ingestão do óleo de pequi em corredores, sendo 76 homens e 49 mulheres, com idade entre 15 e 67 anos. Os voluntários receberam suplementação diária de cápsulas contendo 400mg de óleo de pequi por 14 dias, previamente a uma competição. Após a competição, foi observado redução da pressão arterial e de danos ao DNA em ambos os sexos, efeitos anti-inflamatórios, e redução nas concentrações plasmáticas de colesterol total e LDL- colesterol principalmente para homens acima de 45 anos, redução de lesões teciduais principalmente em mulheres (MIRANDA-

VILELA *et al.*, 2009a, 2009b), além de melhorias da anisocitose induzida pelo exercício e da capacidade de transporte de oxigênio no sangue (MIRANDA-VILELA *et al.*, 2010). Posteriormente, os autores apontaram a influência de alguns polimorfismos genéticos nas diferentes respostas dos corredores ao tratamento com o óleo de pequi (MIRANDA-VILELA *et al.* 2011b, 2011c, 2016; RIBEIRO *et al.* 2013).

O outro ensaio foi um estudo duplo-cego com o uso de placebo realizado com 73 pacientes portadores de Lúpus eritematoso sistêmico, que fizeram uso de cápsulas contendo 400 mg de óleo de pequi por 90 dias. Os autores verificaram que os valores de proteína C-reativa dos pacientes decaíram após o uso das cápsulas, demonstrando o efeito anti-inflamatório do óleo de pequi (MONTALVÃO *et al.*, 2015).

Neste contexto, nosso grupo de pesquisa, também vem investigando efeitos biológicos da polpa e do óleo do fruto do *Caryocar brasiliense*. Inicialmente, em um estudo preliminar, realizado por Morais *et al.* (2013) foi demonstrado a atividade antioxidante *in vitro* do extrato metanólico da polpa do pequi, com destaque para atividade antioxidante por captura de radicais livres e poder de redução do ferro. Já em estudos experimentais utilizando modelo animal observamos que a ingestão da polpa de pequi, de modo a ofertar 600 mg/dia de óleo elevou as concentrações séricas de HDL-colesterol e reduziu a deposição hepática de lipídeos em ratos *Wistar* alimentados com dieta hiperlipídica (TEIXEIRA *et al.*, 2013). A redução na deposição hepática de lipídeos em ratos foi ainda observada em três outros trabalhos do nosso grupo (CÉSAR *et al.*, 2017; MORENO *et al.*, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2017). Além disso, Moreno *et al.* (2016) demonstraram que a suplementação com a polpa de pequi em ratos *Wistar* saudáveis por 15 semanas promoveu melhorias na estrutura da mucosa do intestino delgado por aumentar a altura das vilosidades e profundidades das criptas. Concomitantemente, OLIVEIRA *et al.* (2017) também demonstraram em ratos *Wistar* saudáveis que a suplementação dietética com óleo de pequi na proporção 2,25 g.100⁻¹ g de dieta melhorou a função cardíaca *ex vivo* dos animais.

Em modelo de obesidade induzida por dieta de padrão ocidental (rica em banha de porco e açúcar), foi visto que a substituição parcial de 27% da banha de porco por óleo de pequi melhorou a homeostase da leptina e da adiponectina, o estado redox hepático e a função cardíaca e reduziu a adiposidade visceral e a deposição de triglicerídeos hepáticos em ratos *Wistar* (CÉSAR *et al.*, 2017). Em camundongos *Swiss* alimentados com dieta hiperlipídica, a substituição parcial da banha de porco por óleo de pequi promoveu menor acúmulo de gordura visceral e melhorou o perfil pró-inflamatório (MENDES, 2019).

Evangelista-Silva *et al.*, (2021) forneceram para camundongos C57BL/6 alimentados com dieta hiperlipídica, 150 mg de óleo de pequi via gavagem diariamente durante oito semanas. A ingestão do óleo de pequi contribuiu para o aumento da ingestão calórica dos animais sem aumentar sua massa corporal e adiposa e reduziu o conteúdo dos transportadores GLUT5 (do inglês, *Glucose transporter 5* – GLUT5) e FAT/CD36 (do inglês, *Fatty acids transporter/cluster of differentiation 36* –FAT/CD36) na mucosa do intestino delgado desses animais e a glicemia de jejum.

No estudo de Moreno *et al.*, (2021), camundongos C57BL/6 receberam suplementação de óleo de pequi diariamente (280 mg) por 28 dias e em seguida desenvolveram colite ulcerativa por meio da ingestão de dextran sulfato de sódio. Ao final de oito dias, observou-se que o consumo de óleo de pequi contribuiu para a menor perda de massa corporal e para a melhoria dos sinais histopatológicos da colite (atenuou a diarreia, preservou a camada epitelial e reduziu a infiltração de células imunológicas); além disso, aumentou a concentração de linfócitos T $\gamma\delta$ e a de imunoglobulina A (IgA) e reduziu os linfócitos T CD8⁺ no cólon e nos órgãos linfoides, e reduziu as concentrações de IL-17 e de proteína C reativa (PCR) no plasma.

Assim, em resumo, os relatos científicos até o momento, indicam que o óleo de pequi apresenta importante potencial protetor em diversos processos biológicos, em especial efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes. As evidências foram obtidas principalmente através do uso de modelos animais de estudo. Entretanto, à luz do conhecimento atual, não encontramos estudos que tenham avaliado diretamente, efeitos anti-inflamatoriod do óleo de pequi na proliferação e secreção de citocinas por células imunes. Neste sentido, estudos *in vitro* são úteis porque permitem avaliar respostas celulares específicas, bem como entender mecanismos moleculares associados a tais efeitos.

4 METODOLOGIA

4.1 Obtenção e preparo do óleo de pequi

O óleo de pequi foi adquirido do comércio local de Capelinha MG em frasco de 250 mL, do mesmo fabricante e lote. O frasco foi envolvido com papel alumínio e armazenado sob refrigeração (8 ± 2 °C) até o momento do uso.

4.2 Composição química e atividade antioxidante *in vitro* do óleo de pequi

4.2.1 Perfil de ácidos graxos

Para a determinação do perfil de ácidos graxos, os lipídeos foram extraídos previamente com éter de petróleo, e os ácidos graxos foram determinados por cromatografia gasosa de acordo com a metodologia AOCS Ce 1-62 (AOCS, 2009) modificada por Hartman; Lago (1979).

4.2.2 Conteúdo de carotenoides, fenólicos e atividade antioxidante *in vitro* do óleo de pequi

Os conteúdos de carotenoides e fenólicos totais, bem como a atividade antioxidante *in vitro* foram avaliados em extratos hidroalcolóico (etanol 60%) e metanol/acetona (50%/50%). Os extratos foram obtidos conforme descrito por Morais *et al.* (2013).

O teor de carotenoides totais foi determinado de acordo com a metodologia descrita pela AOAC (1990) usando um espectrofotômetro (Specord 210, modelo Analytikjena), a 450 nm.

Os fenólicos totais foram determinados conforme método descrito por Zielinski; Kozłowska (2000), utilizando o reagente Folin Ciocalteu e os resultados expressos em equivalentes de ácido gálico (mg GAE.g^{-1}).

O teste de captura do radical ABTS (2,2 AZINO BIS 3-ethylbenzo thiazoline 6 sulfonic acid) foi realizado de acordo com Rufino *et al.* (2007) e Le; Chiu, Ng (2007) com modificações. A capacidade redutora do ferro foi avaliada pelo método *Ferric Reducing Ability Power* (FRAP), com adaptações. O teste de determinação da capacidade antioxidante por varredura do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) foi realizado de acordo com Rufino *et al.* (2007) com algumas adaptações. A curva padrão de trolox foi feita nas mesmas

concentrações para todos os ensaios. Os resultados foram expressos como equivalentes em μmol de Trolox/g de amostra.

4.3 Atividade anti-inflamatória do óleo de pequi em PBMC

Em todos os experimentos amostras de óleo de pequi foram previamente aquecidas em banho-maria (37°C), até a completa liquefação e dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma, St. Louis, MO, EUA) de modo a obter soluções estoques a uma concentração de 100 mg/mL . As soluções foram armazenadas em $-20 \pm 2^{\circ}\text{C}$. As concentrações utilizadas nos ensaios de proliferação celular e análises da produção de citocinas foram determinadas a partir dos ensaios de emissão de fluorescência e viabilidade celular.

4.3.1 Aspectos éticos

O protocolo de estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP) da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), parecer número 2.931.933, e Certificado de Apresentação de Apreciação Ética (CAAE) número 94096218.1.0000.5108 (ANEXO – A).

Participaram do estudo indivíduos adultos que não apresentavam no momento da coleta doenças inflamatórias, autoimunes, infecciosas ou crônicas e que não estavam fazendo o uso de corticosteroides e/ou drogas imunossupressoras. As mulheres, além de preencherem os critérios citados anteriormente, não eram gestantes ou lactantes.

O recrutamento dos voluntários foi realizado por meio da abordagem de estudantes e servidores da UFVJM nas dependências da universidade. Após serem esclarecidos sobre os objetivos da pesquisa, aqueles que concordaram e que estavam aptos a participar do estudo, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (ANEXO – B).

Todos os procedimentos experimentais foram realizados no Laboratório de Imunologia do Centro integrado de Pós-Graduação e Pesquisa em Saúde (CIPq-Saúde) da UFVJM.

4.3.2 Coleta de sangue

De cada voluntário, foram coletados 10 mL de sangue venoso, de forma asséptica e por punção venosa, na fossa antecubital, utilizando tubos a vácuo contendo heparina (Vacutainer; Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA). Os procedimentos de coleta foram conduzidos por pessoal treinado e capacitado, seguindo as recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial para coleta de sangue venoso (2010). Após a

utilização das amostras nas análises descritas a seguir, todo o material remanescente foi descartado adequadamente.

4.3.3 Obtenção das PBMC

Para isolar as PBMC, o sangue coletado foi diluído na proporção 1:1 em Tampão Fosfato de Salina (PBS) (NaCl 1,50M; Na₂HPO₄ 0,08M; NaH₂PO₄ 0,02M, pH 7,20-7,40). Depois de homogeneizada, a mistura sangue/PBS foi adicionada sobre a solução de Ficoll-histopaque®-1077 (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e submetida à centrifugação (400 g, 18°C, 30 minutos) para separação das PBMC por meio do gradiente de densidade conforme descrito por Bicalho *et al.*, (1981). O anel de PBMC formado foi coletado com o auxílio de uma pipeta e lavado por duas vezes em PBS (240 g, 4°C, 15 minutos). Em seguida, as células foram ressuspensas em 1 mL de PBS ou 1 mL de meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI-1640) (Sigma, St. Louis, MO, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco, Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, EUA), 1% de L-glutamina (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e 1% de uma solução de antibiótico/antimicótico (penicilina G 100 UI/mL, estreptomicina 100 µg/mL e anfotericina B 250 ng/mL) (Gibco, Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, EUA), sendo, portanto, denominado meio RPMI completo. A concentração de células em suspensão foi ajustada para 1×10^7 células/mL por meio de contagem de células viáveis pelo método de exclusão em azul de Tripán em câmara de Neubauer.

4.3.4 Procedimentos preliminares

4.3.4.1 Análise da emissão de fluorescência interferente por PBMC tratadas com óleo de pequi

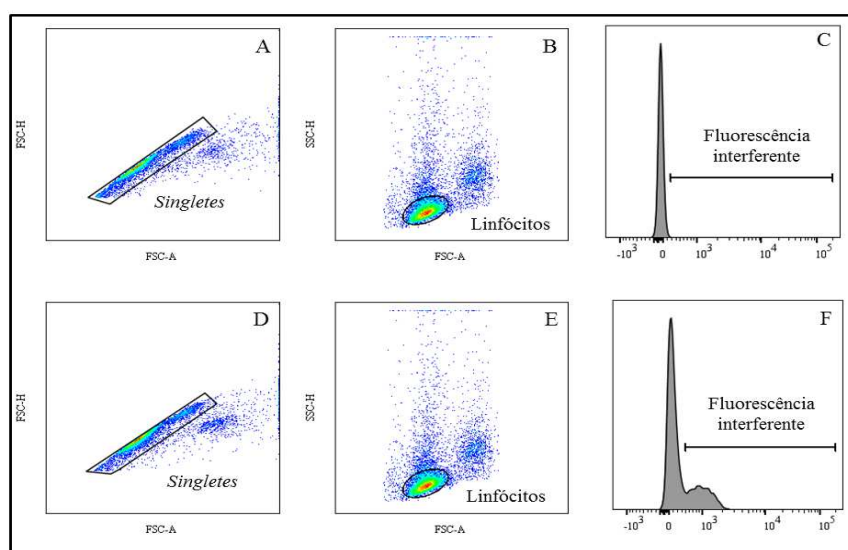
Considerando que alguns tratamentos podem induzir a emissão de fluorescência interferente em culturas de células, comprometendo assim, a utilização de determinados fluorocromos nas análises em citômetro de fluxo, investigamos se as PBMC tratadas com óleo de pequi emitiriam autofluorescência em algum dos detectores de fluorescência do citômetro utilizado. Para isso, 50 µL da suspensão celular (5×10^5 células/mL) foram incubadas em tubos de polipropileno (Falcon 2059, Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA) contendo RPMI completo e tratadas com óleo de pequi nas concentrações de 1µg/mL, 10µg/mL, 50µg/mL, 100µg/mL, 200µg/mL e 1000 µg/mL. As culturas não tratadas e tratadas com DMSO (1% v/v) constituíram as culturas controle e controle do solvente, respectivamente. As culturas

foram incubadas em estufa úmida a 37°C, contendo 5% de CO₂ por 24 horas e por 120 horas. Após esse período, as células foram lavadas em PBS (240 g, 18°C, 7 minutos) e em seguida, foram suspensas em 200 µL de PBS para análise no citômetro de fluxo com aquisição de 10.000 eventos na região correspondente aos linfócitos.

Foi utilizado o citômetro BD (FACSCANTO II® - Becton-Dickinson, San Jose, CA, EUA). O aparelho apresenta 3 *lasers* (azul 488 nm, vermelho 633 nm e violeta 405 nm), um octógono (488/10 *Band pass*-BP, 530/30 BP, 585/42 BP, 670 *Long Pass*- LP e 780/60 BP) e dois triângulos (triângulo I – 660/20 BP, 685 LP e 780/60 BP; triângulo II – 450/50 BP e 510/50 BP), possibilitando a análise dos parâmetros de tamanho (do inglês, *forward scatter* – FSC) e complexidade ou granulosidade celular (do inglês, *side light scatter* – SSC) e 8 fluorescências. Para aquisição dos dados foi utilizado o BD FACS Diva *Software* versão 6.1.3 e a análise foi realizada utilizando-se o *software* Flow Jo 10.7.1.

Na estratégia de análise dos dados (FIG. 5), primeiramente, foram selecionados os *singlets* celulares em gráficos de distribuição pontual de tamanho celular em altura (do inglês, *Forward Side Scatter Height* – FSC-H) *versus* o tamanho celular em área (*Forward Side Scatter Area* – FSC-A) (FIG. 5A e 5D). A partir dos eventos dessa região, selecionou-se a população linfocitária em gráficos de distribuição pontual de tamanho (FSC) *versus* granulosidade (SSC) celulares (FIG. 5B e 5E). Em seguida, foram construídos histogramas de intensidade de fluorescência para cada um dos oito canais do citômetro em função do número de células. A indução de emissão de fluorescência nas células foi avaliada pelo deslocamento do pico de fluorescência para a direita (FIG. 5F) comparando as culturas tratadas com óleo de peixe com o solvente DMSO à cultura não tratada (cultura controle).

Figura 5- Estratégia de análise, por citometria de fluxo, da emissão de fluorescência por células tratadas com diferentes concentrações do óleo de pequi.



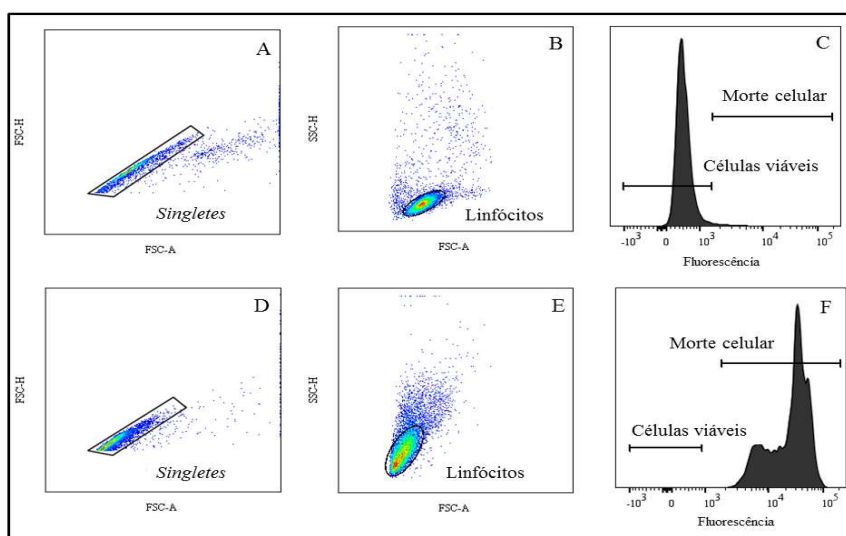
Após a seleção dos *singlets* celulares em gráficos FSC-H versus FSC-A (A e D), foi feita a seleção da população linfocitária utilizando os parâmetros de FSC e SSC (B e E). Em C e F os histogramas representam respectivamente a ausência e a presença de emissão de fluorescência interferente.

4.3.4.2 Análise da viabilidade de PBMC tratadas com óleo de pequi

Para identificar concentrações não tóxicas de óleo de pequi para utilização nos demais ensaios foi realizado o teste de viabilidade celular, por meio do método de exclusão com azul de Tripán, conforme protocolo proposto por Avelar-Freitas *et al.* (2014). Resumidamente, 50 μL da suspensão celular de PBMC foram incubadas em meio RPMI completo e tratadas com óleo de pequi nas concentrações de 1 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 200 $\mu\text{g/mL}$ e 1000 $\mu\text{g/mL}$. As culturas celulares não tratadas e tratadas com DMSO (1% v/v) constituíram a cultura controle e controle do solvente respectivamente. Para controle de morte foi utilizado 10 μL de uma solução de cloreto de cádmio (CdCl_2 -20 Mm). As culturas foram realizadas em tubos de polipropileno (Falcon 2059, Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA) e permaneceram por 24 horas e 120 horas em estufa úmida a 37°C e 5% CO_2 . Após esse tempo, as células foram lavadas com 2 mL de PBS (240 g, 18° C, 7 minutos) e o percentual de células viáveis foi determinado por citometria de fluxo (BD FACS Canto II) após adição de 10 μL das suspensões celulares a 190 μL de solução de Azul de Tripán 0,002 % (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Foram adquiridos 10.000 eventos na região correspondente aos linfócitos utilizando o *software* BD FACS Diva versão 6.1.3 e a análise dos dados realizada utilizando *software* Flow Jo versão 10.7.1.

Na estratégia de análise dos dados (FIG. 6), primeiramente, foram selecionados os *singlets* celulares em gráficos FSC-H versus FSC-A (FIG. 6A e 6D). A partir dos eventos dessa região, selecionou-se a população linfocitária em gráficos de distribuição pontual FSC versus SSC (FIG. 6B e 6E). A redução da viabilidade celular foi avaliada pelo deslocamento do pico de fluorescência para a direita (FIG. 6F) comparando as culturas controle, tratadas com DMSO e com diferentes concentrações de óleo à cultura tratada com CdCl₂.

Figura 6– Estratégia de análise, por citometria de fluxo, da viabilidade celular de células tratadas com diferentes concentrações do óleo de pequi.



Os gráficos ilustram a estratégia de análise para culturas controle (A, B e C) e tratadas com CdCl₂ (D, E e F). Após seleção dos *singlets* celulares (A e D) em gráficos FSC-H versus FSC-A, foi feita a seleção da população linfocitária utilizando os parâmetros de FSC e SSC (B e E). Em C e F os histogramas representam respectivamente a ausência e a presença de morte celular.

4.3.5 Efeitos do óleo de pequi sobre a proliferação de linfócitos em PBMC

O solvente DMSO foi escolhido para a solubilização do óleo de pequi. Assim, inicialmente investigamos qual concentração máxima (% v/v) desse solvente poderia ser utilizada nas culturas celulares sem causar redução na resposta proliferativa dessas células e, posteriormente, determinamos quais concentrações do óleo de pequi poderiam ser utilizadas nos ensaios.

Para a análise de proliferação foi utilizada a técnica de incorporação e decaimento da fluorescência do BD *Horizon Violet Proliferation Dye 450* (VPD450), um corante excitável no laser violeta do citômetro de fluxo. Para isso, aproximadamente, 1×10^7 PBMC/mL foram suspensas em PBS e incubadas com 1 μ M de VPD450 (Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA)

por 15 minutos em banho-maria a 37°C. Em seguida, as suspensões celulares foram lavadas com 10 mL de PBS (500 x g, 18°C, 10 minutos). A reação foi interrompida pela adição de 10 mL de RPMI completo, seguida de centrifugação (500 g, 18°C, 10 minutos). O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em RPMI-1640 completo.

Para determinar a concentração do DMSO a ser utilizada e, posteriormente, o efeito do óleo de pequi sobre a resposta proliferativa de linfócitos, aproximadamente 5×10^5 células marcadas com VPD450 foram incubadas em RPMI completo com ou sem estímulo mitogênico de fitohemaglutinina (PHA) (Sigma, St. Louis, MO, EUA) a uma concentração final de 5 µg/mL. O DMSO e o óleo de pequi foram adicionados às culturas simultaneamente ao estímulo. Como controle de inibição, utilizou-se Ciclosporina A (CsA) (Solução a 2mg/mL de ciclosporina obtida da diluição em PBS de Sandimmun®, 50mg/mL, injetável, Novartis Biociências S. A., Indústria Brasileira) na concentração de 5 µg/mL (GRUNDEMANN *et al.*, 2014). O DMSO foi testado nas concentrações finais de 0,4% e 0,9% (v/v). Já para as análises com o óleo de pequi, foram utilizadas as concentrações finais de 20 µg/mL, 200 µg/mL e 400 µg/mL.

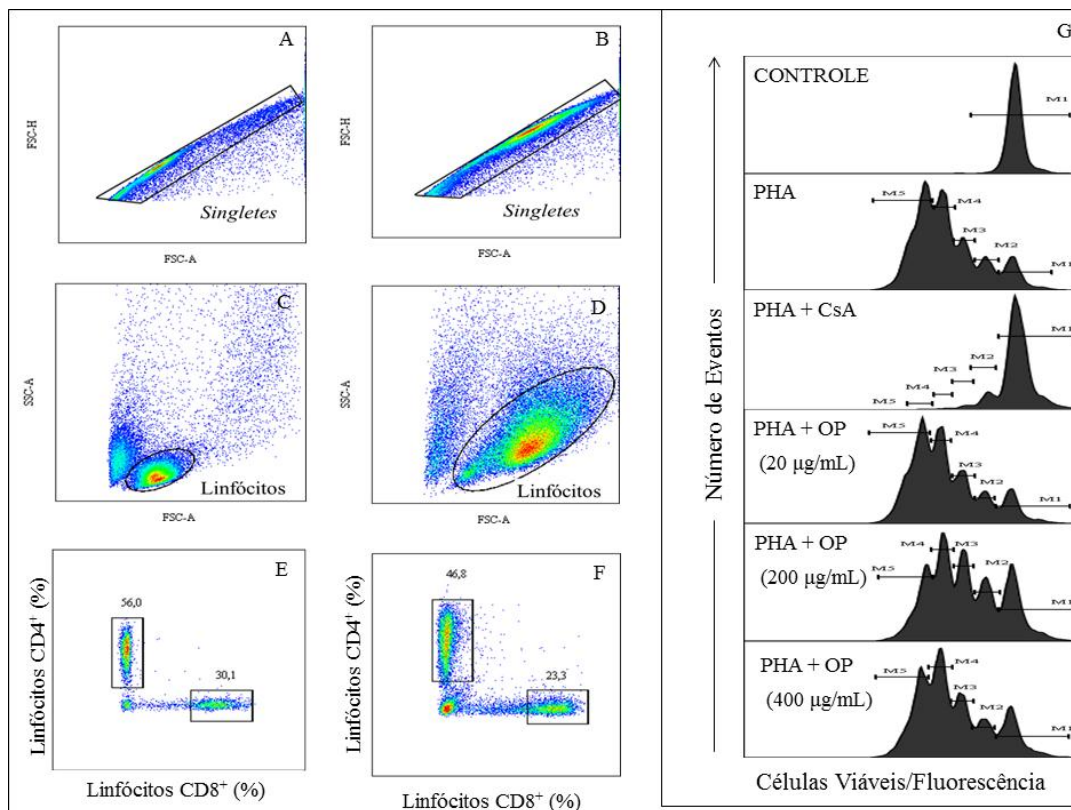
As culturas foram mantidas em tubos de polipropileno (Falcon 2059, Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA) e permaneceram por 120 horas em estufa úmida, a 37°C e 5% de CO₂. Após esse período, as células foram lavadas duas vezes com PBS gelado (240 x g, 18°C, 7 minutos). Em seguida, 10 µL das suspensões celulares de cada cultura foram utilizados para avaliação da viabilidade celular pela técnica de exclusão com azul de Tripán, por citometria de fluxo. O restante das células de cada cultura foi adicionado a tubos de poliestireno (5 mL) contendo os anticorpos anti-CD4 conjugado com fluorocromo APC-Cy7 (aloficocianina combinada a cianina Cy7; BD Biosciences) e anti-CD8 conjugado com o fluorocromo FITC (Isotiocianato de fluoresceína; BDBiosciences) para a identificação das células CD4⁺ e CD8⁺ respectivamente. Após incubação por 20 minutos a 25 °C e ao abrigo da luz, as células foram lavadas com PBS e realizou-se a análise da proliferação celular pela medida do decaimento da fluorescência do VPD450 utilizando a citometria de fluxo (FACS CANTO II –Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA), com aquisição de 50.000 eventos por tubo, utilizando o *Software* BD FACS Diva versão 6.1.3.

Após aquisição dos eventos, foi feita a análise dos dados utilizando-se o *software* FlowJo versão 10.7.1. Em gráficos de distribuição pontual FSC-H *versus* FSC-A, selecionou-se a região onde continha somente *singlets* celulares para culturas não estimuladas e estimuladas, (FIG. 6A e 6B, respectivamente). Em outro gráfico, por meio dos parâmetros

SSC *versus* FSC, foi selecionado a população de linfócitos para culturas não estimuladas e estimuladas (FIG. 6C e 6D, respectivamente). As populações celulares CD4⁺ e CD8⁺ foram analisadas em gráficos de distribuição pontual de fluorescência com base na expressão dos marcadores FITC (anti-CD8 *high*) e APC-Cy7 (anti-CD4) para culturas não estimuladas e estimuladas (FIG. 6E e 6F respectivamente).

Em seguida, os linfócitos e as populações celulares CD4⁺ e CD8⁺ foram analisados em histogramas do número de eventos em função da intensidade de fluorescência do corante VPD450 (FIG. 6G). O marcador M1 foi definido na análise de linfócitos corados com VPD450 em culturas sem estímulo (controle) como o pico de células que não proliferaram. Os marcadores M2 a M5 foram definidos de acordo com o perfil proliferativo das culturas estimuladas com PHA e representaram o número de ciclos de proliferações celulares obtidos ao longo de 120 horas de cultura. Em seguida, esses marcadores foram utilizados para a análise do perfil proliferativo de linfócitos estimulados com PHA e tratados com diferentes concentrações do óleo de pequi.

Figura 6 - Sequência de procedimentos utilizados para as análises dos efeitos do óleo de pequi sobre a proliferação de linfócitos em culturas de PBMC.



Foram utilizados gráficos de distribuição pontual FSC-H x FSC-A para selecionar os singlets celulares em culturas não estimuladas e estimuladas (A e B, respectivamente), seguido da geração de gráficos de distribuição

pontual SSC-A x FSC-A para a seleção da população linfocitária em culturas não estimuladas e estimuladas (B e C, respectivamente). Em seguida as populações CD4⁺ e CD8⁺ foram selecionadas em gráficos de distribuição com base no percentual de expressão dos marcadores utilizados (E, F). Histogramas de número de eventos *versus* fluorescência do VPD450, foram utilizados para definir os marcadores M1 em culturas controle e M2 a M5 em culturas estimuladas com PHA (G).

A proliferação foi determinada pelo índice de proliferação (IP), calculado conforme equação a seguir (ÂNGULO e FULCHER, 1998):

$$IP = (100-Y)/Y$$

Sendo,

$$Y (\%) = X0 + X1/2 + X2/4 + X3/8 + X4/16 + X5/32$$

X0 = porcentagem de células que não se dividiram

X1 a X5 = sequências de divisão

4.3.6 Efeitos do óleo de pequi sobre a produção de citocinas em culturas de PBMC

Inicialmente 100 µL da suspensão celular (aproximadamente 1 x 10⁶ PBMC/mL) foi adicionada à tubos de polipropileno contendo meio RPMI completo e tratadas com óleo de pequi na concentração final de 200 µg/mL. Como estímulos para a produção de citocinas foram utilizados 25 µL de Miristato Acetato de Forbol – PMA (Sigma, St. Louis, MO, EUA) (25 ng/mL), um éster de forbol que atua ativando a proteína kinase C (PKC) e induzindo leucócitos a sintetizarem citocinas (PALA *et al.*, 2000); e 1µL de Ionomicina (Sigma, St. Louis, MO, EUA) (1ng/mL), um ionóforo que atua em sinergismo com o PMA por induzir influxo de íons cálcio (PALA *et al.*, 2000).

Culturas não estimuladas e estimuladas com PMA e Ionomicina constituíram as culturas controle negativo e controle positivo. Como controle de inibição foi utilizada a Ciclosporina A na concentração de 5µg/mL (GRUNDEMANN *et al.*, 2014) e, nas culturas controle do solvente, adicionou-se 2 µL de DMSO (0,2%v/v). Além disso, todas as culturas receberam 10 µL de brefeldina A (Sigma, St. Louis, MO, EUA) (1mg/mL), um metabólito fúngico que inibe a secreção proteica por impedir o transporte de proteínas do retículo endoplasmático para o complexo de Golgi (MISUMI *et al.*, 1986; ZELNICKOVA *et al.*, 2007). As culturas foram incubadas por 4 horas em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂. Após esse período, foram centrifugadas (300 g, 18°C, 7 minutos), o sobrenadante descartado e em seguida as células foram ressuspensas em 200 µL de PBS e armazenadas a -80°C para análises posteriores.

Para análise da concentração de citocinas, as células foram inicialmente lizadas pelo processo de descongelamento à temperatura de 25 °C seguido de congelamento a - 80°C durante 15 minutos por 3 vezes; em seguida foram confeccionados pools utilizando 10 µL de cada cultura e a análise de citocinas foi realizada em triplicata.

Foram avaliadas as concentrações das citocinas das respostas IFN γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-17, por meio do ensaio de citometria de *beads*, usando kit CBA (BD *Biosciences*) para humanos, conforme recomendações do fabricante com algumas adaptações.

Após aquisição de dados em citômetro de fluxo (FACSCANTO II, BD *Biosciences*), a concentração de cada citocina foi baseada na curva padrão obtida com a citocina recombinante, e posteriormente corrigida pelo conteúdo de proteína total, sendo então expressa em pg/mL de proteína total.

4.3.7 Análises estatísticas

Para análise da atividade antioxidante e do conteúdo de carotenoides e fenólicos totais nos extratos do óleo de pequi foi realizado o teste T de Student.

Para a análise estatística dos testes de viabilidade celular, proliferação de linfócitos e produção de citocinas foi utilizada a ANOVA de um fator, seguida pelo teste Tukey, considerando-se diferenças significativas quando $p < 0,05$.

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).

5 RESULTADOS

5.1 Composição química e atividade antioxidantes *in vitro* do óleo de pequi

Em consonância com resultados prévios do nosso grupo (EVANGELISTA-SILVA *et al.*, 2021; OLIVEIRA *et al.*, 2017) e de outros autores (DE MORAIS CARDOSO *et al.*, 2013; MIRANDA-VILELA *et al.*, 2014), o óleo de pequi apresentou predominância de ácidos graxos insaturados, com destaque para o ácido oleico, um monoinsaturado, seguido pelo linoléico, um ácido graxo essencial e poliinsaturado da família dos ômega-6. Dentre os saturados, o destaque foi para o ácido palmítico, seguido pelo esteárico (TAB. 1).

Tabela 1. Perfil de ácidos graxos do óleo de pequi (g.100g⁻¹)

| Ácido graxo | Nº de Carbonos | Média ± DP |
|-------------------------------------|----------------|----------------|
| Láurico | C12:0 | 0,025 ± 0,007 |
| Mirístico | C14:0 | 0,105 ± 0,007 |
| Palmítico | C16:0 | 36,040 ± 0,042 |
| Margárico | C17:0 | 0,060 ± 0,140 |
| Esteárico | C18:0 | 2,105 ± 0,007 |
| Araquidônico | C20:0 | 0,175 ± 0,007 |
| Behênico | C22:0 | 0,045 ± 0,035 |
| Lignocérico | C24:0 | 0,075 ± 0,021 |
| Total de saturados: 38,630 | | |
| Palmitoléico | C16:1 | 0,810 ± 0,014 |
| Cis-10-heptadecenóico | C17:1 | 0,075 ± 0,007 |
| Oléico | C18:1 | 58,555 ± 0,205 |
| Linoléico | C18:2 | 1,400 ± 0,014 |
| Linolênico | C18:3 | 0,335 ± 0,007 |
| Eicosenóico | C20:1 | 0,195 ± 0,077 |
| Total de insaturados: 61,370 | | |

Ambos os extratos apresentaram atividade antioxidante *in vitro*, o que indica que a capacidade antioxidante do óleo de pequi é influenciada pelo conteúdo de carotenoides e compostos fenólicos, ambos compostos solúveis em solventes orgânicos como o metanol e a acetona. O extrato metanol/acetona apresentou melhores resultados para os ensaios FRAP e DPPH e o extrato etanólico para o ensaio de captura do radical ABTS. Assim como o conteúdo de fenólicos totais foi maior para esse extrato. E ambos os extratos apresentaram quantidades estatisticamente semelhantes de carotenoides.

Tabela 2. Atividade antioxidante *in vitro*, conteúdo de fenólicos totais e carotenoides totais do óleo de pequi.

| Atividade antioxidante | Extratos | |
|---|-------------------|-------------------|
| | Etanol 60% | Metanol/Acetona |
| ABTS (uMolTE/g) | 2773,23* ± 641,60 | 1161,57 ± 316,93 |
| FRAP (uMolTE/g) | 455,01 ± 63,29 | 1256,13* ± 128,17 |
| DPPH (uMolTE/g) | 89,03 ± 22,25 | 499,01* ± 135,72 |
| Sequestro DPPH (%) | 1,42 ± 0,17 | 5,89* ± 1,32 |
| Fenólicos totais (mgGAE.g ⁻¹) | 0,33*±0,03 | 0,26±0,02 |
| Carotenoides totais (mg.g ⁻¹) | 22,97±0,05 | 23,00±0,07 |

*Teste T de Student

5.2 Avaliação da atividade imunomoduladora do óleo de pequi em culturas de PBMC

5.2.1 Características dos sujeitos da pesquisa

Participaram deste estudo 18 voluntários, sendo 10 do sexo feminino e 8 do sexo masculino, com idade média de 29 ± 6 anos. Os participantes apresentaram valor médio de leucócitos igual a $6,6 \pm 3,4 \times 10^3$ células/mm, o que caracteriza normalidade para indivíduos adultos (XAVIER *et al.*, 2010).

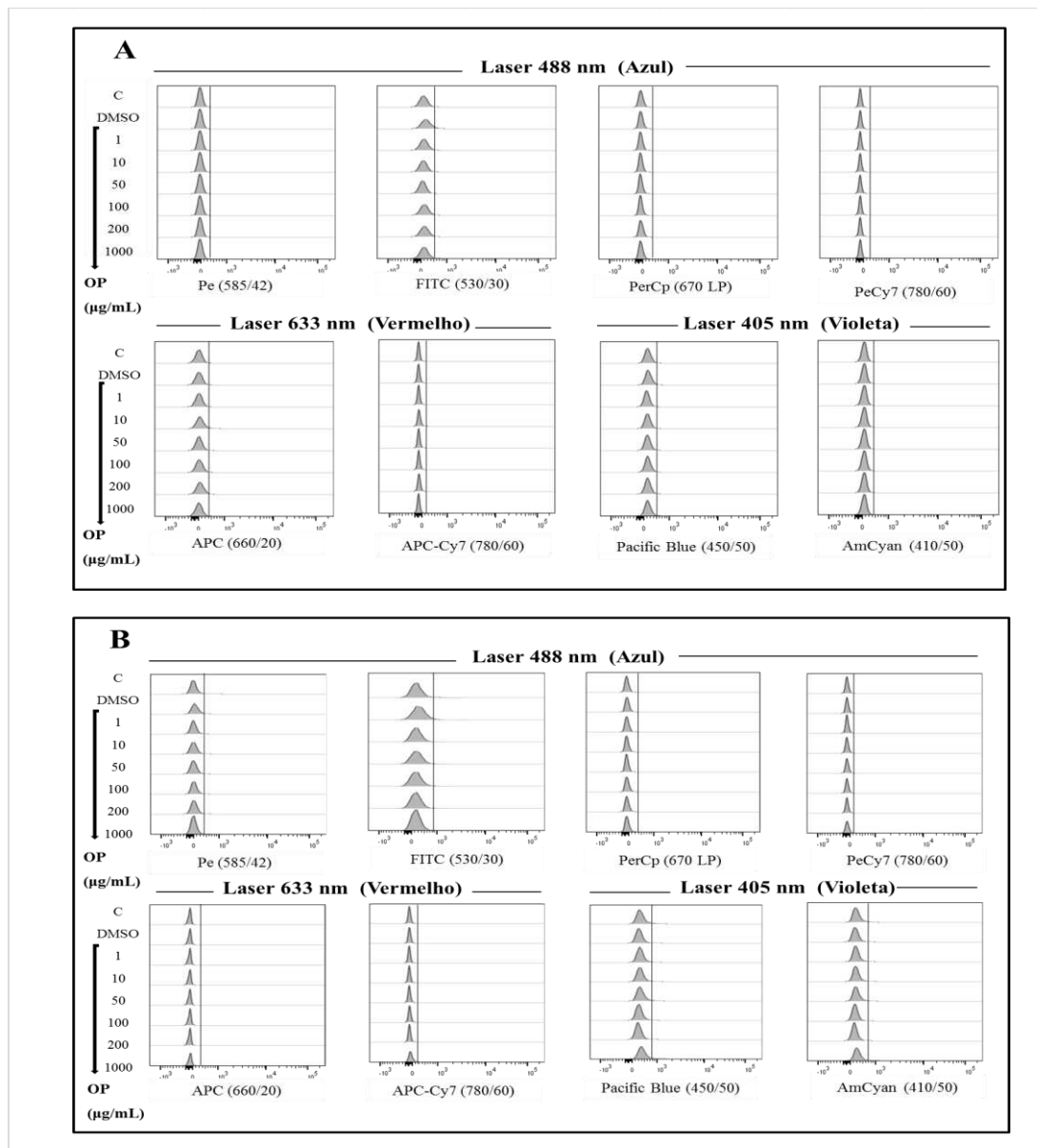
5.2.2 Procedimentos preliminares

5.2.2.1 Análise da emissão de fluorescência interferente em culturas de PBMC tratados com óleo de pequi

A Figura 7 ilustra os resultados obtidos a partir da análise da emissão de fluorescência em células não tratadas (controle), tratadas com DMSO à 1% v/v (controle

do solvente) e tratadas com óleo de pequi nas concentrações finais de 1 µg/mL, 10 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL e 1000 µg/mL, após 24 horas (A) e 120 horas (B) respectivamente. Os histogramas demonstram que o tratamento com óleo de pequi bem como o solvente utilizado não induziu o deslocamento do pico de fluorescência para a direita em relação à cultura controle, em nenhum dos oito canais do citômetro BD FACS Canto II, viabilizando, portanto, a utilização de qualquer marcador fluorescente nessas condições, sem o comprometimento nas análises posteriores.

Figura 7 - Histogramas de emissão de fluorescência de PBMC humanas tratadas com diferentes concentrações de óleo de pequi após 24 horas (A) e 120 horas (B) de cultura.



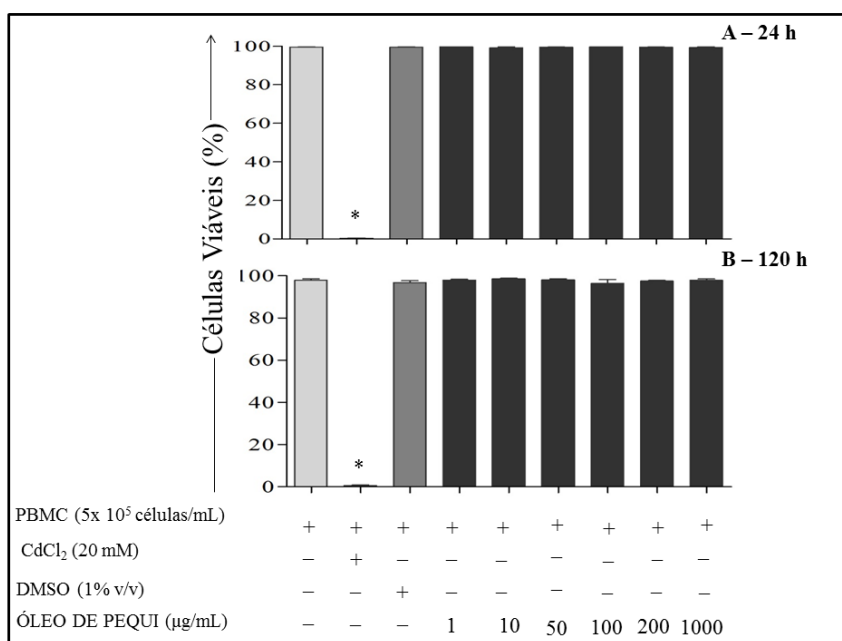
Cerca de 5×10^5 PBMC/mL (N= 6) foram incubadas por 24 horas e por 120 horas em estufa úmida a 37°C contendo 5% de CO₂. As culturas foram tratadas com óleo de pequi nas concentrações de 1 µg/mL, 10µg/mL, 50µg/mL, 100µg/mL, 200µg/mL e 1000µg/mL. Culturas não tratadas e tratadas com DMSO constituíram as culturas controle negativo e controle do solvente. Os histogramas representam a intensidade de fluorescência em comprimentos de onda referentes aos oito canais do citômetro BD FACS Canto II.

5.2.2.2 Análise da viabilidade celular em culturas de PBMC tratadas com óleo de pequi

Após verificar que o óleo de pequi não emitiu fluorescência interferente em nenhum canal do citômetro BD FACS Canto II, realizamos o teste de viabilidade celular por citometria de fluxo, a fim de verificar possíveis efeitos citotóxicos do óleo de pequi em culturas de PBMC. A Figura 8 apresenta os resultados obtidos a partir da análise de viabilidade celular

em culturas não tratadas, tratadas com CdCl₂- 20 Mm (controle de morte), tratadas com DMSO 1% v/v (controle do solvente) e tratadas com óleo de pequi nas concentrações finais de 1 µg/mL, 10 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL e 1000 µg/mL, após 24 horas (A) e após 120 horas (B) respectivamente. Os resultados demonstram que em nenhuma das concentrações utilizadas o óleo de pequi, bem como o solvente utilizado reduziu a viabilidade celular, possibilitando assim, que qualquer concentração do óleo de pequi (entre 1µg/mL e 1000µg/mL) fosse utilizada nos ensaios posteriores. Como esperado o CdCl₂ reduziu expressivamente a viabilidade celular. Os resultados foram semelhantes considerando as culturas de 24 horas e as culturas de 120 horas.

Figura 8 – Efeitos do tratamento com óleo de pequi sobre a viabilidade celular em cultura de PBMC

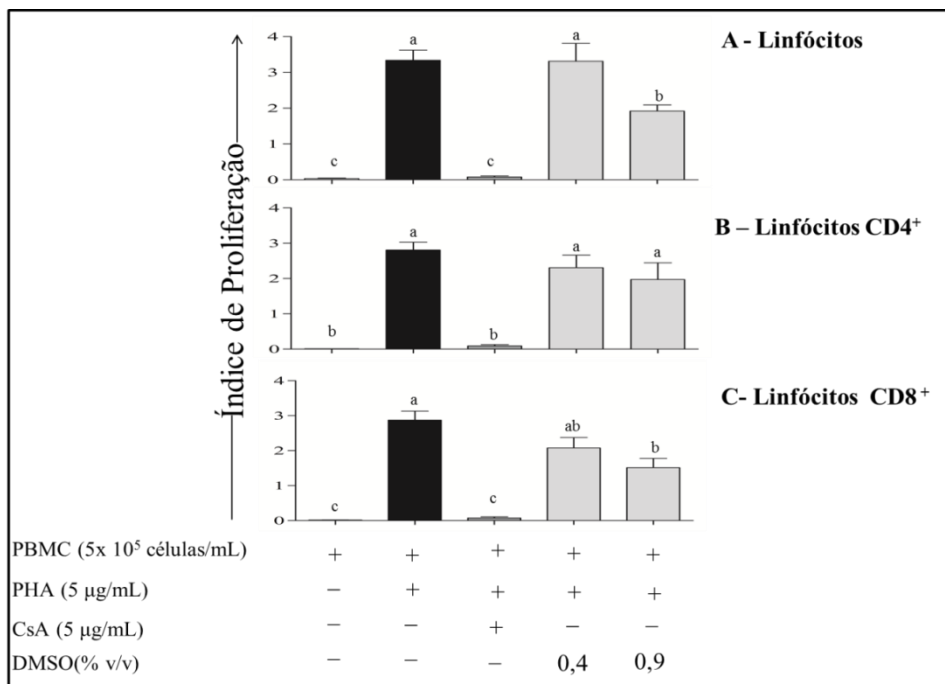


Cerca de 5×10^5 PBMC/mL (N= 6) foram incubadas por 24 horas e por 120 horas em estufa úmida a 37°C contendo 5% de CO₂. As culturas foram tratadas com óleo de pequi nas concentrações de 1µg/mL, 10 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL e 1000 µg/mL. Culturas não tratadas, tratadas com CdCl₂, e tratadas com DMSO constituíram respectivamente as culturas controle negativo, controle de morte e controle do solvente. O percentual de células viáveis foi avaliado pelo método de exclusão com azul de Tripán utilizando o citômetro de fluxo. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão. * indica diferença estatisticamente significativa (p< 0,05) em relação à cultura controle. Método estatístico utilizado: ANOVA com *post hoc* de Tukey.

5.2.3 Efeitos do óleo de pequi sobre a proliferação de linfócitos em culturas de PBMC

Inicialmente verificamos que, na concentração de 0,4%, o solvente DMSO não reduziu o índice de proliferação de linfócitos ou das subpopulações CD4⁺ e CD8⁺; já na concentração de 0,9% houve redução do índice de proliferação dos linfócitos e da subpopulação CD8⁺ comparado às culturas tratadas somente com PHA (FIG.9).

Figura 9- Efeitos do solvente DMSO sobre a proliferação de linfócitos em cultura de PBMC

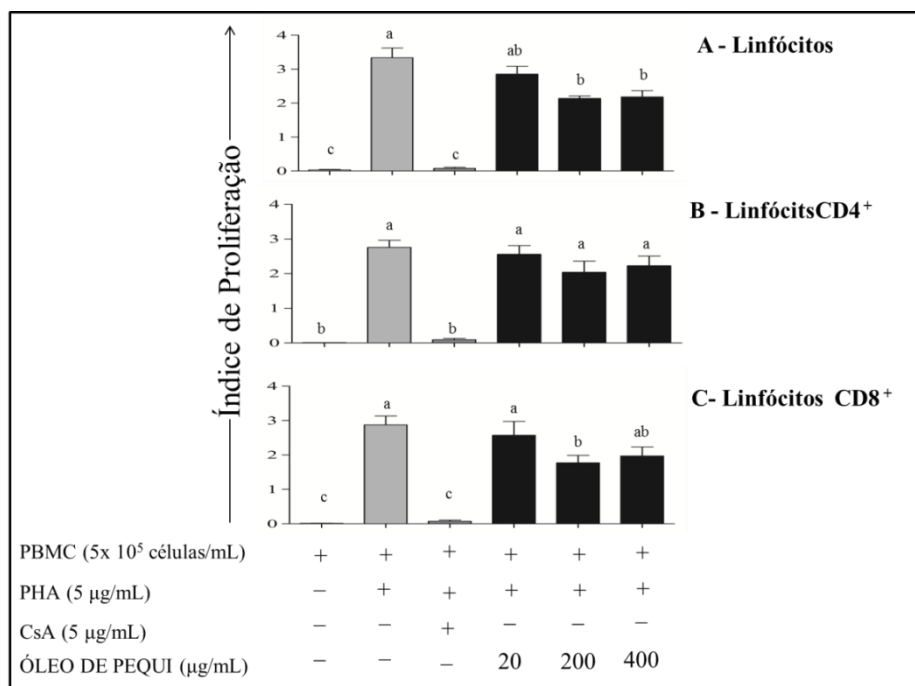


Cerca de 5x10⁵ PBMC/ mL marcadas com VPD450 (N=4) foram incubadas durante 120 horas a 37°C e 5% de CO₂. As culturas foram estimuladas com PHA e tratadas com DMSO nas concentrações finais de 0,4% e 0,9%. Culturas não estimuladas e não tratadas, culturas somente estimuladas, e culturas estimuladas e tratadas com CsA constituíram respectivamente as culturas controle negativo, controle positivo e controle de inibição. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão do índice de proliferação de linfócitos (A) e das subpopulações linfocitárias CD4⁺ (B) e CD8⁺ (C). Barras acompanhadas de letras diferentes indicam diferença estatística (p < 0,05). Método estatístico utilizado – ANOVA seguida de *post hoc* de Tukey.

A figura 10 demonstra resultados do efeito do óleo de pequi sobre a proliferação dos linfócitos (FIG. 10A) e das subpopulações linfocitárias CD4⁺ (FIG. 10B) e CD8⁺ (FIG. 10C). Em comparação à cultura tratada apenas com PHA, o óleo de pequi na concentração de 200µg/mL reduziu o índice de proliferação de linfócitos e da subpopulação CD8⁺. Na concentração de 400µg/mL houve redução do índice de proliferação de linfócitos. Já na concentração de 20µg/mL não foram observadas diferenças significativas. Observamos ainda

que a CsA, utilizada como controle de inibição, reduziu o índice de proliferação dos linfócitos e das subpopulações CD4⁺ e CD8⁺ assemelhando-se à cultura controle.

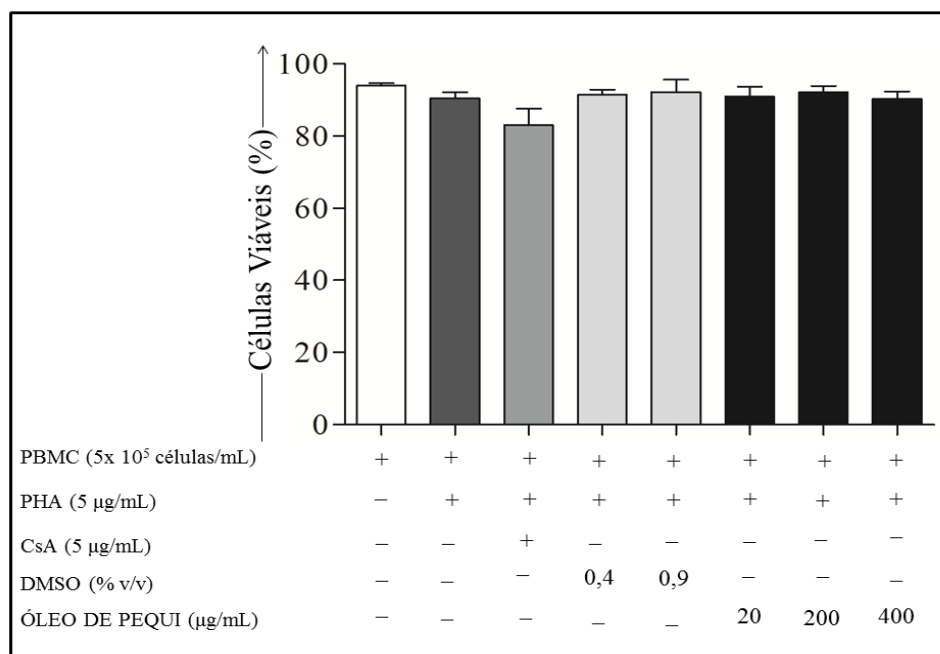
Figura 10- Efeitos do óleo de pequi sobre a proliferação de linfócitos em cultura de PBMC



Cerca de 5×10^5 PBMC/mL marcadas com VPD450 (N=7) foram incubadas durante 120 horas a 37°C e 5% de CO₂. As culturas foram estimuladas com PHA e tratadas com óleo de pequi nas concentrações finais de 20 µg/mL, 200 µg/mL e 400 µg/mL. Culturas não estimuladas e não tratadas, culturas somente estimuladas, e culturas estimuladas e tratadas com CsA constituíram respectivamente as culturas controle negativo, controle positivo e controle de inibição. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão do índice de proliferação de linfócitos (A) e das subpopulações linfocitárias CD4⁺ (B) e CD8⁺ (C). Barras acompanhadas de letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$). Método estatístico utilizado – ANOVA seguida de *post hoc* de Tukey.

Para demonstrar que a atividade inibitória do óleo de pequi sobre a proliferação de linfócitos não estava relacionada à morte celular, a viabilidade das células em cultura para investigação da proliferação foi avaliada após 120 horas. Observamos que em nenhuma das concentrações testadas, o óleo de pequi, reduziu significativamente a viabilidade dos linfócitos. O mesmo foi visto também para o solvente DMSO e para o fármaco CsA, conforme ilustra a figura 11.

Figura 11 – Avaliação da viabilidade celular de culturas de PBMC sob efeito do solvente DMSO e do óleo de pequi.



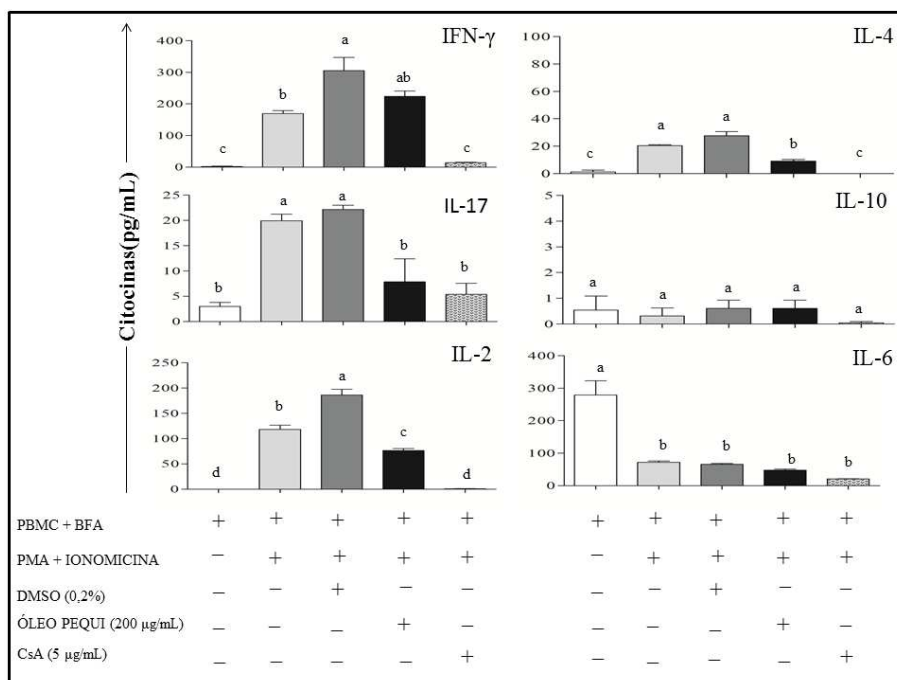
Cerca de 5×10^5 PBMC/mL marcadas com VPD450 (N=7) foram incubadas durante 120 horas a 37°C e 5% de CO₂. As culturas foram estimuladas com PHA e tratadas com DMSO nas concentrações finais de 0,4% e 0,9% e com óleo de pequi nas concentrações finais de 20 µg/mL, 200 µg/mL e 400 µg/mL. Como controle de inibição foi utilizado Ciclosporina (CsA). Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão do percentual de células viáveis analisadas pelo método de exclusão com azul de tripan por citometria de fluxo. Método estatístico utilizado – ANOVA seguida de *post hoc* de Tukey, $p < 0,05$.

5.2.4 Efeitos do óleo de pequi sobre a produção de citocinas em cultura de PBMC

A figura 12 demonstra o efeito do óleo de pequi sobre a produção de IFN- γ , IL-17, IL-2, IL4, IL-10 e IL-6 por PBMC estimuladas com PMA e ionomicina, durante 4 horas. Os resultados mostram concentrações significativamente reduzidas de IL-17, IL-2 e IL-4 para a cultura estimulada e tratada com óleo de pequi em comparação à cultura estimulada. Não houve diferenças significativas nas concentrações de IFN- γ , IL-10 e IL-6. Observamos também que o solvente DMSO não reduziu as concentrações de nenhuma das citocinas analisadas o que nos permitiu associar o resultado encontrado ao efeito do óleo de pequi sobre as células. Ainda em relação ao DMSO, houve aumento nas concentrações de IFN- γ e IL-2 comparando a cultura estimulada e tratada com DMSO com a cultura somente estimulada. Observamos ainda que o fármaco CsA reduziu a produção das citocinas IFN- γ , IL-17, IL-2 e

IL-4 tornando sua síntese semelhante à cultura controle. Para a citocina IL-10 não houve diferença significativa.

Figura 12- Efeitos do óleo de pequi sobre a produção de citocinas em cultura de PBMC



Cerca de 5×10^6 PBMC/mL (N=5) foram incubadas durante 4 horas a 37°C e 5% de CO_2 . As culturas foram estimuladas com PMA e ionomicina e tratadas com óleo de pequi na concentração final de $200 \mu\text{g/mL}$. Culturas não estimuladas e não tratadas, culturas somente estimuladas, culturas estimuladas e tratadas com DMSO 0,2% e culturas estimuladas e tratadas com CsA constituíram respectivamente as culturas controle negativo, controle positivo, controle do solvente e controle de inibição. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da concentração de citocinas (n = 5). Barras acompanhadas de letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$). Método estatístico utilizado – ANOVA seguida de *post hoc* de Tukey.

6 DISCUSSÃO

O pequi é um fruto comumente utilizado em diversas regiões brasileiras, especialmente em sua época de colheita, que acontece entre os meses de novembro e janeiro. A extração do seu óleo, além de concentrar nutrientes e compostos bioativos, é uma forma de garantir seu acesso, mesmo fora do período de safra (ALMEIDA; SILVA, 1994). Esse óleo apresenta um alto conteúdo de ácidos graxos monoinsaturados, especialmente o ácido oleico (EVANGELISTA-SILVA *et al.*, 2021; OLIVEIRA *et al.*, 2017), além de compostos antioxidantes como os carotenoides (OLIVEIRA *et al.*, 2017) e os polifenóis (CICERO *et al.*, 2018). De fato, as análises químicas realizadas em nossas amostras de óleo de pequi mostraram um alto conteúdo de ácido oleico, carotenoides e fenólicos totais corroborando a maioria dos resultados previamente publicados.

Diante da abundância de compostos reconhecidamente anti-inflamatórios e antioxidantes presentes no óleo de pequi e as associações entre atividade antioxidante e anti-inflamatória, inicialmente testamos a atividade antioxidante, *in vitro*, dos extratos etanólico e metanólico do óleo de pequi. De maneira geral, ambos os extratos apresentaram atividade antioxidante em todos os testes. Esses achados também estão em consonância com alguns estudos que já mostraram atividade antioxidante de extratos da polpa (LIMA, *et al.*, 2007; MORAIS *et al.*, 2013; NASCIMENTO *et al.*, 2017 ROESLER *et al.*, 2008) e do óleo de pequi (FERREIRA *et al.*, 2011). É importante ressaltar que nesses estudos, quase sempre, a atividade antioxidante foi associada ao conteúdo de compostos fenólicos e carotenoides das amostras (LIMA, *et al.*, 2007; MORAIS *et al.*, 2013; NASCIMENTO *et al.*, 2017 ROESLER *et al.*, 2008).

Quando analisados de forma isolada, alguns compostos presentes em abundância no óleo de pequi também já apresentaram diversos efeitos anti-inflamatórios principalmente *in vitro* e em modelos animais (KAULMANN; BOHN, 2014; RAVAUT *et al.*, 2021; YAHFOUFI *et al.*, 2018), o que nos instigou investigar suas propriedades anti-inflamatórias, *in vitro* e *in vivo*. Assim, recentemente, nosso grupo de pesquisa mostrou, pela primeira vez, que o óleo de pequi contribuiu para a regulação da resposta imune e melhorou os sinais clínicos e histopatológicos da colite ulcerativa induzida por DSS em camundongos. Nesse estudo, o óleo de pequi reduziu células citotóxicas e marcadores inflamatórios e estimulou células reguladoras com preservação de células produtoras de muco da mucosa intestinal (MORENO *et al.*, 2021). Entretanto, não pudemos mostrar a influência da ingestão desse óleo diretamente na proliferação de células imunes nem tampouco sobre sua secreção de citocinas.

Assim, nossa proposta passou a ser investigar, inicialmente *in vitro*, os efeitos do óleo de pequi sobre a proliferação de linfócitos e secreção de citocinas em culturas de PBMC. Verificamos que, nas culturas testadas, o óleo de pequi reduziu a capacidade proliferativa de linfócitos e a secreção de citocinas, o que reforçou o potencial anti-inflamatório desse alimento.

Inicialmente foi necessário solubilizar do óleo de pequi, afim de, viabilizar o seu uso nas culturas celulares. O DMSO foi o solvente escolhido por ser amplamente utilizado para esse fim (TIMM *et al.*, 2013). Sua molécula é constituída por um grupo polar e dois grupos apolares, o que o torna capaz de dissolver diversas substâncias hidrofóbicas, como é o caso do óleo de pequi (AHN *et al.*, 2014; COLUCCI *et al.*, 2008). Verificamos também qual concentração máxima de DMSO poderíamos utilizar nas culturas sem influenciar as variáveis analisadas (emissão de fluorescência, viabilidade celular, proliferação e síntese de citocinas). Para tal, observamos o que foi descrito por De Abreu Costa *et al.* (2017). Inicialmente padronizamos a concentração estoque do óleo de pequi dissolvido em DMSO para 100 mg/mL e a partir dela foi definida a quantidade a ser utilizada nos experimentos, a fim de, obter as concentrações finais desejadas nas culturas.

Para as análises de emissão de fluorescência e de viabilidade celular as concentrações finais do óleo de pequi utilizadas nas culturas foram determinadas conforme o estudo de Figueiredo *et al.* (2016). Nesse estudo, o óleo de *Caryocar coriaceum* (um fruto da mesma família do *Caryocar brasiliense* e cuja composição química é similar) foi testado *in vitro* em células polimorfonucleares humanas nas concentrações finais de 1 µg/mL, 10 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL e 200 µg/mL veiculadas em DMSO a 1%. Dessa forma, em nosso estudo optamos por iniciar os ensaios com as mesmas concentrações utilizadas por esses autores e acrescentamos mais uma como concentração máxima. Portanto, utilizamos as seguintes concentrações: 1 µg/mL, 10 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL e 1000 µg/mL.

Nós avaliamos a emissão de fluorescência pelo óleo de pequi porque alguns compostos podem induzir a emissão de fluorescência interferente em culturas de células e assim comprometer a utilização de determinados fluorocromos nas análises por citometria de fluxo. Assim, o cuidado de avaliar a presença de fluorescência interferente permite evitar a obtenção de resultados errôneos ao utilizar marcadores que emitam fluorescência na mesma faixa de comprimento de onda que aquela induzida pela ação de um composto vegetal sobre células sanguíneas. Verificamos que o tratamento com óleo de pequi e o solvente utilizado, não induziram emissão de fluorescência interferente após 24 horas ou 120 horas de cultura.

Portanto, não houve limitação quanto ao uso da técnica de citometria de fluxo ou de marcadores fluorescentes nas análises posteriores.

Nós também avaliamos a viabilidade celular previamente aos testes finais, já que alguns compostos bioativos vegetais podem induzir a morte celular (VEIGA JÚNIOR; PINTO, 2005), o que faz com que essa análise sempre preceda a avaliação da atividade biológica. Assim, observamos que a viabilidade celular não foi alterada após 24 horas ou após 120 horas de cultura em nenhuma das concentrações de óleo de pequi testadas. Portanto, elas poderiam ser utilizadas seguramente para as demais análises. Vale ressaltar que o solvente a 1% também não alterou os percentuais de células viáveis em relação às culturas controle, estando nossos resultados de acordo com o que foi demonstrado por De Abreu Costa *et al.* (2017). Como esperado, o CdCl₂ apresentou efeito citotóxico. O CdCl₂ é um agente citotóxico (FOTAKIS; TIMBELL, 2006) e por esse motivo foi escolhido como controle positivo para a indução de morte celular.

Nosso próximo passo foi o ensaio de proliferação celular. Para isso, inicialmente realizamos um teste prévio afim de, determinar em qual concentração máxima o solvente DMSO poderia ser utilizado nas culturas celulares sem causar interferência nos resultados de proliferação e com base nesse teste escolhemos as concentrações do óleo de pequi utilizadas no ensaio de proliferação. Verificamos a 0,9% o DMSO reduziu a proliferação de linfócitos e da subpopulação CD8⁺. Já na concentração de 0,4%, o mesmo não exerceu impacto. Sendo assim, nós investigamos o efeito do óleo de pequi sobre a proliferação celular nas concentrações finais de 400 µg/mL, 200 µg/mL, e 20 µg/mL sendo que nessas concentrações o DMSO na cultura representava respectivamente 0,4%, 0,2% e 0,02 %.

Verificamos que, nas duas maiores concentrações testadas o óleo de pequi reduziu a proliferação dos linfócitos, sendo que na de 200 µg/mL, houve redução também da subpopulação de células CD8⁺. É importante ressaltar que não foi possível a seleção exclusiva de linfócitos T no ensaio de proliferação; nós apenas utilizamos anticorpos monoclonais específicos para a marcação dos coreceptores CD4 e CD8. Sabemos que outras células do sistema imune, incluindo monócitos, células dendríticas, células NK e NKT também expressam em suas membranas o coreceptor CD8 (TERRY *et al.*, 1990, GIBBINGS *et al.*, 2007, SHORTMAN; HEATH, 2010). Em nosso experimento, isolamos células mononucleares, e na análise dos dados, selecionamos por meio de um *gate*, somente os linfócitos, considerando que dentro dessa população a expressão de CD4 ou CD8 é dependente do processo de maturação dos linfócitos T no timo (TANIUCHI; 2018), provavelmente a maioria das células CD8⁺ eram linfócitos T, apontando para a possibilidade

de que o óleo de pequi tenha reduzido, principalmente, a proliferação de linfócitos T citotóxicos. Além disso, em nosso estudo selecionamos células CD8⁺ *high* o que contribui para a exclusão de outras células do *gate* de linfócitos.

Tendo em vista que a produção de citocinas é fundamental tanto para a indução da ativação celular quando para o direcionamento e manutenção da resposta imunológica, analisamos os efeitos do óleo de pequi sobre a produção de citocinas por PBMC estimuladas com PMA e ionomicina. Para esta análise, a concentração do óleo de pequi testada foi a de 200 µg/mL, já que essa reduziu significativamente a proliferação celular. Sendo assim, a concentração final de solvente na cultura foi de 0,2%. Verificamos que nesse ensaio, o óleo de pequi reduziu as concentrações de IL-2, IL-17 e IL-4 nas culturas.

IL-2 e IL-4 estão entre as citocinas cruciais para a homeostase de linfócitos, sendo importantes estímulos para sua resposta proliferativa (BOYMAN *et al.*, 2007). Assim, podemos inferir que as concentrações reduzidas dessas citocinas na cultura, justifique a redução da proliferação observada neste estudo. Nesse contexto é importante destacar que existem diferenças no perfil de resposta proliferativa entre diferentes subpopulações linfocitárias, o que pode explicar o efeito seletivo do óleo de pequi sobre as células CD8⁺. Hoffman *et al.*, (2002) descreveram que na estimulação antigênica, as células T CD4⁺ geralmente proliferam mais rapidamente do que as células T CD8⁺ e além disso, a proliferação de células T CD8⁺ pode ser inibida por quantidades menores de agentes inibidores do que o necessário para inibir a proliferação de células T CD8⁺. Postula-se ainda que tais padrões proliferativos distintos não sejam devidos a sinais externos, mas controlados por mecanismos reguladores intrínsecos a essas células (FOULDS *et al.*, 2002).

Embora a resposta imune mediada por linfócitos T seja principalmente benéfica, em algumas situações tais respostas têm o potencial de causar imunopatologias, sendo fundamental um equilíbrio entre os efeitos pró-inflamatórios e anti-inflamatórios (SEDER; AHMED, 2003). Especialmente em relação aos linfócitos T citotóxicos, há evidências do seu envolvimento na fisiopatologia de algumas doenças autoimunes (RUSSELL; LEY, 2002). Sendo assim, a redução da resposta proliferativa de linfócitos pelo tratamento com óleo de pequi, é um indício do seu papel na manutenção da homeostasia da resposta imune frente a condições inflamatórias incluindo as doenças autoimunes. Esta hipótese é ainda apoiada pela redução na concentração de IL-17 na cultura, visto que, a produção desregulada das citocinas da família IL-17 está associada às condições autoimunes, como esclerose múltipla, doença inflamatória intestinal, psoríase e lúpus (CHEN *et al.*, 2011; MESQUITA Jr *et al.*, 2009).

Nesse sentido, o efeito anti-inflamatório do óleo de pequi já foi demonstrado no contexto do lúpus eritematoso sistêmico (MONTALVÃO *et al.*, 2015). Além disso, Oliveira (2013) observou o efeito antinociceptivo e anti-inflamatório do óleo de *Caryocar coriaceum* (cuja composição química é similar ao óleo de *Caryocar brasiliense*) na artrite induzida por zymosan em ratos e relatou que esse efeito pode estar relacionado à inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias. E ainda recentemente Moreno *et al.*, (2021) apontaram o efeito regulador do óleo de *Caryocar brasiliense* na colite ulcerativa induzida por DSS em camundongos. Condizente aos nossos resultados, esses autores também demonstraram que o óleo de pequi reduziu células citotóxicas e marcadores inflamatórios dentre os quais a citocina IL-17 o que reforça ainda mais a hipótese apontada por este estudo.

Dentre os compostos bioativos do óleo de pequi que podem estar envolvidos nos principais resultados encontrados, destacamos o ácido graxo oleico, os carotenoides e os compostos fenólicos. Conforme já descrito, os MUFA, em especial o ácido oleico, têm sido associados à inibição de vias de sinalização pró-inflamatórias (FINUCANE *et al.*, 2015; KIRWAN *et al.*, 2017) e redução da proliferação de linfócitos (GORJÃO *et al.*, 2007; PASSOS *et al.*, 2016; VERLENGIA *et al.*, 2003). Isso se explica porque, eles podem se ligar a receptores acoplados à proteína G ou se difundir passivamente através da membrana das células e se ligar a uma proteína citoplasmática chamada proteína de ligação aos ácidos graxos (do inglês, *fatty acid binding proteins* – FABP). As FABP por sua vez, deslocam-se para o núcleo e ativam os receptores nucleares PPAR (TAN *et al.*, 2002). Dentre outras funções, esses receptores estão associados com a inibição de vias de sinalização pró-inflamatórias como o NFκB e o complexo NLRP3 inflamassoma (RAVAUT *et al.*; 2021) e ainda com a inibição da proliferação de linfócitos (HARRIS; PHIPP, 2001). Assim, apontamos que o tratamento das culturas com óleo de pequi forneceu um aporte de MUFA capaz de se ligar as FABP, o que culminou com a maior ativação de receptores PPAR contribuindo para a redução de vias de sinalização pro-inflamatorias e para a redução resposta proliferativa de linfócitos.

Adicionalmente, carotenoides e compostos fenólicos possuem significativo potencial antioxidante e anti-inflamatório, e por isso, estão associados com redução do estresse oxidativo o que contribui para o controle da inflamação. Os carotenoides possuem um extenso sistema de ligações duplas conjugadas que podem ser substituídas por grupos terminais, o que lhes confere atividade antioxidante. Tem sido demonstrado que o beta caroteno e a luteína (KIM *et al.*, 2011), o licopeno (SIMONE *et al.*, 2011) e a zeaxantina (BIAN *et al.*, 2012) interagem com a via regulada pelo NFκB de modo a suprimir a produção

de produtos pró-inflamatórios. Dessa forma, é possível que o tratamento com óleo de pequi tenha contribuído para o aporte de carotenoides, o que culminou com os efeitos anti-inflamatórios observados.

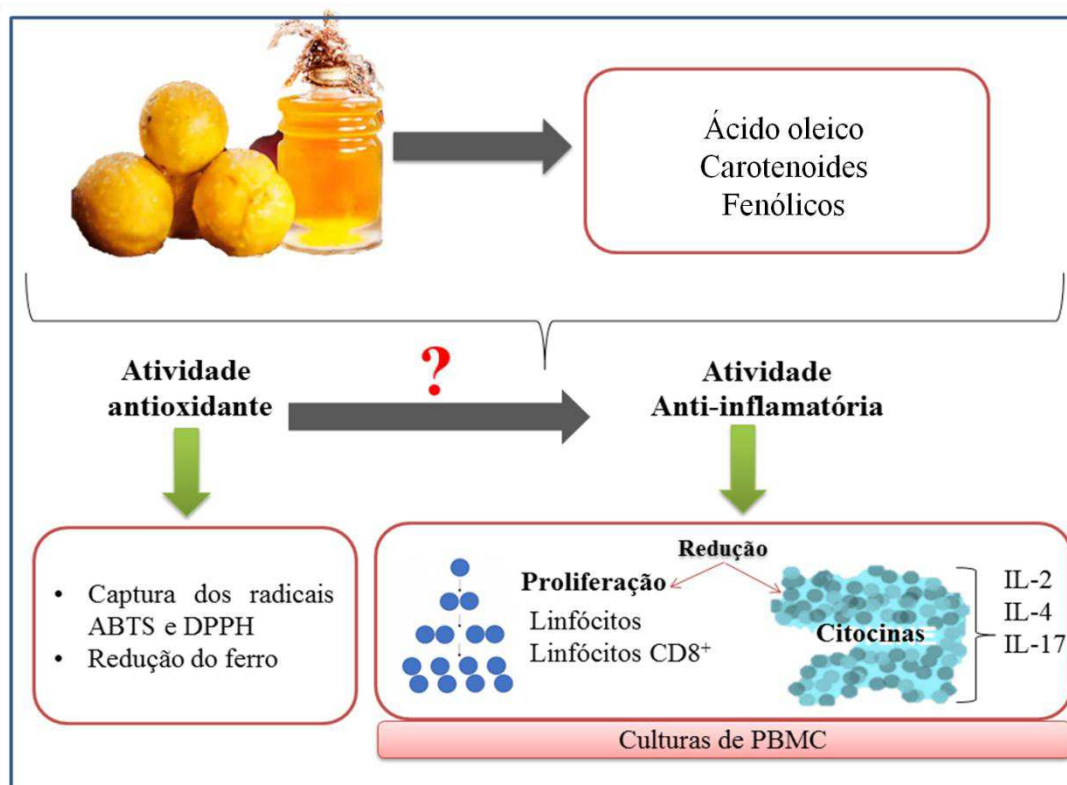
Da mesma forma, os compostos fenólicos também possuem propriedades antioxidantes e atividade anti-inflamatória (Revisado por YAHFOUFI *et al.*, 2018). Quando presentes na membrana plasmática, os polifenóis podem reagir com compostos não polares presentes na camada hidrofóbica da membrana interna afetando a taxa de oxidação de lipídios ou de proteínas, além de, impedir o acesso de compostos oxidantes e proteger a estrutura e função da membrana (HUSSAIN *et al.*, 2016). Os polifenóis podem ainda afetar diversos sistemas enzimáticos e de sinalização envolvidos nos processos inflamatórios, incluindo a tirosina e as proteínas quinases serina-treonina, enzimas diretamente envolvidas em processos celulares como a proliferação de linfócitos e a produção de citocinas por células estimuladas (HUSSAIN *et al.*, 2016), além das vias NF κ B e MAPK, e das enzimas envolvidas no metabolismo do ácido araquidônico (YAHFOUFI *et al.*, 2018).

Tendo em vista a complexidade da resposta inflamatória, com envolvimento de vários mediadores e componentes celulares, novos ensaios devem ser conduzidos para avaliar o efeito do óleo de pequi sobre a expressão de outros mediadores inflamatórios tais como quimiocinas e enzimas, bem como as potenciais vias de sinalização envolvidas com inflamação (NF- κ B, NLRP3 e MAPK) e estresse oxidativo (Nrf2) e ainda sobre o fenótipo e funcionalidade de células da imunidade inata e adaptativa, por meio de marcadores específicos e uso de anticorpos para marcação de citocinas intracitoplasmáticas, a fim de, possibilitar uma melhor compreensão dos efeitos do óleo de pequi sobre cada fenótipo específico e das vias intracelulares envolvidas na sua atividade biológica bem como estabelecer uma melhor compreensão da possível relação entre atividade antioxidante e anti-inflamatória do óleo de pequi.

7 RESUMO DOS PRINCIPAIS RESULTADOS E CONCLUSÃO

A Figura 13 ilustra os principais resultados encontrados em nosso estudo. Analisados em conjunto, nossos resultados sugerem que o óleo de pequi exerce atividade antioxidante e anti-inflamatória *in vitro*, já que foi capaz de sequestrar radicais orgânicos e reduzir o ferro, além de reduzir a proliferação de linfócitos e a síntese de citocinas pró-inflamatórias em culturas de PBMC. É possível que sua atividade antioxidante esteja relacionada à sua atividade anti-inflamatória e que MUFA, carotenoides e compostos fenólicos presentes nesse óleo sejam determinantes, pelo menos em parte, desses resultados. Contudo, são necessários estudos adicionais para o aprofundamento e a elucidação desses efeitos.

Figura 13 – Atividade antioxidante e anti-inflamatória do óleo de pequi *in vitro*.



O óleo de pequi é rico em ácido oleico, carotenoides e fenólicos. *In vitro* esse óleo apresentou atividade antioxidante por sequestrar os radicais orgânicos ABTS e DPPH e reduzir o ferro. Também apresentou efeito anti-inflamatório em culturas de PBMC porque reduziu a proliferação de linfócitos e a síntese de citocinas pró-inflamatórias. É possível que sua atividade antioxidante contribua para sua atividade anti-inflamatória, mas são necessários estudos adicionais para elucidar esta hipótese.

REFERÊNCIAS

- ABBOUD, P. A. *et al.* Therapeutic effect of epigallocatechin-3-gallate in a mouse model of colitis. **Eur J Pharmacol**, v.579, p. 411–17, 2008.
- ABDULLAH, M. *et al.*, Carica papaya increases regulatory T cells and reduces IFN- γ +CD4+ T cells in healthy human subjects. **Mol. Nutr. Food Res**, n. 55, p.803–806, 2011.
- AGUILAR, E. C. *et al.* Paradoxical effect of a pequi oil-rich diet on the development of atherosclerosis: balance between antioxidant and hyperlipidemic properties. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, n. 7, p. 601–609, 2012.
- AHMED, S. *et al.* Epigallocatechin-3-gallate inhibits IL-6 synthesis and suppresses transsignaling by enhancing soluble gp130 production. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.105, p.14692–7, 2008.
- AHN, H.; KIM, J.; JEUNG, E. B.; LEE G. S. Dimethylsulfoxideinhibits NLRP3 inflammasomeactivation. **Immunobiology**, v. 219, n. 4, p. 315-322. 2014.
- ALMEIDA, S. P.; SILVA, J. A. Piqui e buriti: importância alimentar para a população dos cerrados. **Planaltina: Embrapa-CPAC**, p. 38, 1994.
- ALMEIDA, S. P. *et al.* Cerrado: espécies vegetais úteis. **Planaltina: Embrapa-CPAC**, p.464, 1998.
- AMBRÓSIO, C. L. B. *et al.* Carotenoides como alternativa contra a hipovitaminose A. **Revista de Nutrição**, v. 19, n. 2, p. 233-243, 2006.
- ÂNGULO, R.; FULCHER, D. A. Measurement of Candida-specific blastogenesis: comparison of carboxyfluorescein succinimidyl ester labelling of T cells, thymidine incorporation, and CD69 expression. **Cytometry**, v. 34, n.3, p. 143-151, 1998.
- AOAC, Official methods of analysis of the AOAC,15 ed., Methods 932.06, 925.09, 985.29, 923.03. **Association of official analytical chemists. Arlington, VA, USA**, 1990.
- AOAC, Official methods and recommended practices American Oil Chemists' Society. Champaign: **American Oil Society**, 2009.
- ARTEMIS, P. S. Omega-3 Fatty Acids in Inflammation and Autoimmune Diseases, **Journal of the American College of Nutrition**, v. 21, n.6, p. 495-505, 2002.
- ASHLEY, N.T.; WEIL, Z.M.; NELSON, R.J. Inflammation: Mechanisms, Costs, and Natural Variation. **Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.** v.43, p.385–406, 2012.
- ASLANI, B. A.; GHOBADI, G. Studies on oxidants and antioxidants with a brief glance at their relevance to the immune system. **Life Sciences**, v. 146, p.163-173, 2016.
- AVELAR-FREITAS, B.A. *et al.* Trypan blue exclusion assay by flow cytometry. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 47, p. 307-315, 2014.
- AZUMA, T. *et al.* Human CD4+ CD25+ regulatory T cells suppress NKT cell functions. **Cancer Res.**, v. 63, n.15, p. 4516-20, 2003.

BARREA, L. *et al.* Nutrição e psoríase: Existe alguma associação entre a gravidade da doença e a adesão à dieta mediterrânea? **J. Transl. Med**, v. 13, 2015.

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

BERNSTEIN, P. S. *et al.* Lutein, zeaxanthin, and meso-zeaxanthin: The basic and clinical science underlying carotenoid-based nutritional interventions against ocular disease. **Prog. Retin. Eye Res.**, v. 50, p. 34–66, 2016.

BERTRAM, J.S. Cancer prevention by carotenoids: Mechanistic studies in cultured cells. **Ann. N. Y. Acad. Sci. USA**, v. 691, p.177–191, 1993.

BEZERRA, N. K. M. S.; BARROS, T. L.; COELHO, N. P. M. F. A ação do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*) no processo cicatricial de lesões cutâneas em ratos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. A00101s1, p. 875-880, 2015.

BIASUTTO, L.; MATTAREI, A.; ZORATTI, M. Resveratrol and Health: The Starting Point. **ChemBioChem**, v.13, p.1256–1259, 2012.

BICALHO, H.M.S.; GONTIJO, C.M.; NOGUEIRA-MACHADO, J.A. A simple technique for simultaneous human leukocytes separation. **Journal of Immunological Methods**, v. 40, p. 115-116, 1981.

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. **Oxid. Med. Cell Longev**, v. 3, p.228–237, 2010.

BOHN, T. Carotenoids and Markers of Oxidative Stress in Human Observational Studies and Intervention Trials: Implications for Chronic Diseases. **Antioxidants (Basel)**, v. 8, n.179, 2019.

BOUDET, A. M. Evolution and current status of research of in phenolic compounds. **Phytochemistry**, v.68, p.2722-2735, 2007.

BOYMAN, J.F.; PURTON, C.D.; SURH, J., SPRENT. Cytokines and T-cell homeostasis. **Curr. Opin. Immunol.**, v.19, p. 320–326, 2007.

CARBAJAL, A.; ORTEGA, R. M. La dieta mediterránea como modelo de dieta prudente y saludable. **Revista chilena de nutrición.**, v. 28, n.2, p. 224-236, 2001.

CARDOSO, L. M. *et al.* Chemical characteristics and bioactive compounds of cooked pequi fruits (*Caryocar brasiliense* Camb.) from the Brazilian Savannah. **Fruits**, v. 68, n. 1, p. 3-14,2013.

CASAS, R.; ESTRUCH, R.; SACANELLA, E. The Protective Effects of Extra Virgin Olive Oil on Immune-mediated Inflammatory Responses. **Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets**, v.18, n. 23–35, 2018.

CÉSAR, N. R. *et al.* The Partial Replacement of Lard by *Caryocar brasiliense* Oil in a Western Diet improves Cardiovascular Risk Factors in Rats. **Food and Nutrition Report**, v. 1, n. 4, p. 1-08, 2017.

CHALONS, P. *et al.* Study of Potential Anti-Inflammatory Effects of Red Wine Extract and Resveratrol through a Modulation of Interleukin-1-Beta in Macrophages. **Nutrients**, v.10, n.12, 2018.

- CHEN, X. *et al.* Oleic acid protects saturated fatty acid mediated lipotoxicity in hepatocytes and rat of non-alcoholic steatohepatitis. **Life sciences**, v. 203, p. 291-304, 2018.
- CHEN, Y. *et al.* The Effects of Th17 Cytokines on the Inflammatory Mediator Production and Barrier Function of ARPE-19 Cells. **Plos One**, v.6, n.3, 2011.
- CHEW, B. P.; PARK, J. S. Carotenoid action on the immune response. **The Journal of Nutrition**, v. 134, n. 1, p. 257S-261S, 2004.
- CHO, Y. H. *et al.*, Protective Effect of Onion Extract on Bleomycin-Induced Cytotoxicity and Genotoxicity in Human Lymphocytes. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, v. 13, n. 227, p. 1-11, 2016.
- CICERO, N. *et al.* Chemical Characterization of a Variety of Cold-Pressed Gourmet Oils Available on the Brazilian Market. **Food Research International**, v. 109, p. 517–525, 2018.
- CLARK, R.; KUPPER, T. Old Meets New: The Interaction Between Innate and Adaptive Immunity. **Journal of Investigative Dermatology**, v.125, p. 629–637, 2005.
- COLLINS, F.S. A linguagem de Deus, New York: **Imprensa Livre**, 2006.
- COLOMBO, N. B. R. *et al.* Caryocar brasiliense camb protects against genomic and oxidative damage in urethane-induced lung carcinogenesis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 9, p. 852-862, 2015.
- COLUCCI, M. *et al.* New insights of dimethyl sulphoxide effects (DMSO) on experimental *in vivo* models of nociception and inflammation. **Pharmacological Research**, v. 57, n. 6, p. 419–425, 2008.
- CONSTANTIN, M. *et al.* Significance and impact of dietary factors on systemic lupus erythematosus pathogenesis. **Exp. Ther. Med**, v.17, p.1085–1090, 2019.
- CROUVEZIER, S. *et al.* The Effects of Phenolic Components of Tea on the Production of Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines by Human Leukocytes in Vitro. **Citocina.**; v.13, p.280–286, 2001.
- CRUVINEL, W. M. *et al.* Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Rev Bras Reumatol**, v. 50, n.4, p. 434-61, 2010.
- CUI, J. *et al.* Lipoic acid attenuates high-fat-diet-induced oxidative stress and B-cell-related immune depression. **Nutrition**. v. 28, n.3, p.275-80. 2012.
- DE ABREU COSTA, L. *et al.* Dimethyl Sulfoxide (DMSO) Decreases Cell Proliferation and TNF- α , IFN- γ , and IL-2 Cytokines Production in cultures of Peripheral Blood Lymphocytes. **Molecules**. v.22, n.11, 2017.
- DEBBABI, M. *et al.* Comparison of the effects of major fatty acids present in the Mediterranean diet (oleic acid, docosahexaenoic acid) and in hydrogenated oils (elaidic acid) on 7-ketocholesterol-induced oxiaoptophagy in microglial BV-2 cells. **Chemistry and physics of lipids**, v. 207, p. 151-170, 2017.
- DEL BO, C. *et al.* Systematic Review on Polyphenol Intake and Health Outcomes: Is there Sufficient Evidence to Define a Health-Promoting Polyphenol-Rich Dietary Pattern? **Nutrients**, v.11, n.6, 2019.

- DE MORAIS CARDOSO, L. *et al.* Chemical characteristics and bioactive compounds of cooked pequi fruits (*Caryocar brasiliense* Camb.) from the Brazilian Savannah. **Fruits**, v. 68, n. 1, p. 3–14, 2013.
- DE PABLO, M. A. *et al.* Influence of diets containing olive oil, sunflower oil or hydrogenated coconut oil on the immune response of mice. **Journal of clinical biochemistry and nutrition**, v. 25, n. 1, p. 11-23, 1998.
- DE PERGOLA, G.; D’ALESSANDRO, A. Influence of Mediterranean Diet on Blood Pressure. **Nutrients**, v. 10, 2018.
- DE SA COUTINHO, D. P. J. *et al.* Pequi (*Caryocar brasiliense* Cambess)-Loaded Nanoemulsion, Orally Delivered, Modulates Inflammation in LPS-Induced Acute Lung Injury in Mice. **Pharmaceutics**. v. 12, 17p. 2020.
- DI DANIELE, N. *et al.* Impact of Mediterranean diet on metabolic syndrome, cancer and longevity. **Oncotarget**, v. 8, n. 5, p. 8947-8979, 2016.
- DI LORENZO, C. *et al.* Polyphenols and Human Health: The Role of Bioavailability. **Nutrients**.v.19, n.13, 2021.
- DONG, C. Cytokine Regulation and Function in T Cells. **Annual Review of Immunology**, v. 39, p. 51-76, 2021.
- ELLULU, M.S. *et al.* Obesity and inflammation: The linking mechanism and the complications. **Arch. Med. Sci.**v.13, p. 851–863, 2017.
- ESPOSITO, K. *et al.* Mediterranean diet for type 2 diabetes: Cardiometabolic benefits. **Endocrine**, v. 56, p. 27–32, 2017.
- EVANGELISTA-SILVA, P.H. *et al.* Intestinal GLUT5 and FAT/CD36 transporters and blood glucose are reduced by a carotenoid/MUFA-rich oil in high-fat fed mice. **Life Sci**, v. 279, 8p. 2021.
- FABIANI, R. *et al.* Antioxidants prevent the lymphocyte DNA damage induced by PMA-stimulated monocytes. **Nutr. Cancer**, v.39, p. 284-291, 2001.
- FARBER, D.L. T lymphocytes and cell-mediated immunity. In: Bellanti JA (ed) Immunology IV, clinical applications in health and disease. **I Care Press, Bethesda**, p. 209–254. 2011.
- FANG, Y. Z.; YANG, S.; WU, G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. **Nutrition**, v.18, p. 872-879, 2002.
- FEENEY, J. *et al.* Low macular pigment optical density is associated with lower cognitive performance in a large, population-based sample of older adults. **Neurobiol. Aging**. v.34, p.2449–2456, 2013.
- FERREIRA, B. S. *et al.* Comparative Properties of Amazonian Oils Obtained by Different Extraction Methods. **Molecules**, v. 16, n. 7, p. 5875–5885, 2011.
- FIEDOR, J.; BURDA, K. Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. **Nutrients**. 2014; v.6, p.466–488, 2014.

- FIGUEIREDO, P. R. L. *et al.* Caryocar coriaceum Wittm.(Pequi) fixed oil presentes hypolipemic and anti-inflammatory effects in vivo and in vitro. *Journal of ethnopharmacology*, v. 191, p. 87-94, 2016.
- FINUCANE, O. M. *et al.* Monounsaturated fatty acid–enriched high-fat diets impede adipose NLRP3 inflammasome–mediated IL-1 β secretion and insulin resistance despite obesity. *Diabetes*, v. 64, n. 6, p. 2116-2128, 2015.
- FORSYTH, C. *et al.* The effects of the Mediterranean diet on rheumatoid arthritis prevention and treatment: A systematic review of human prospective studies. *Rheumatol. Int.* v.38, p.737–747, 2018.
- FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A *In vitro* cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters.*, v.160, n. 2, p. 171–177, 2006.
- FOULDS, K. E. *et al.* Cutting Edge: CD4 and CD8 T Cells Are Intrinsically Different in Their Proliferative Responses. *The Journal of immunology.* v.168, n.4, p.1528-1532, 2002.
- GEA-BANACLOCHE, J. C. Immunomodulation. In: Runge M.S., Patterson C., editors. **Principles of Molecular Medicine.** Humana Press; Totowa, NJ, USA, p. 893–904, 2006.
- GEOCZE, K.C. *et al.* Caryocar brasiliense Camb. fruits from the Brazilian Cerrado as a rich source of carotenoids with pro-vitamin A activity. *Journal of Food Composition and Analysis.* v. 101, 8 p. 2021.
- GEORGE, E. S. *et al.* The effect of high-polyphenol extra virgin olive oil on cardiovascular risk factors: A systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Food Sci Nutr.* v.59, n.17, p. 2772-2795, 2019.
- GIBBINGS, D. J. *et al.* CD8 alpha is expressed by human monocytes and increases Fc gamma R dependent responses. *BMC Immunol.*v. 8, n.12,2007.
- GONZÁLEZ, R. *et al.* Effects of Flavonoids and Other Polyphenols on Inflammation. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* v. 51, p.331–362, 2011.
- GORJÃO, R. *et al.* Regulation of human lymphocyte proliferation by fatty acids. *Cell Biochemistry and Function: Cellular biochemistry and its modulation by active agents or disease*, v. 25, n. 3, p. 305-315, 2007.
- GORZYNIK-DEBICKA, M. *et al.*, Potential Health Benefits of Olive Oil and Plant Polyphenols. *Int J Mol Sci.* v.28, n.19, 2018.
- GOYA, L. *et al.* Effect of Cocoa and Its Flavonoids on Biomarkers of Inflammation: Studies of Cell Culture, Animals and Humans. *Nutrients*, v. 8, n.4, 2016.
- GRAY, D.; GRAY, M.; BARR, T. Innate responses of B cells. *Eur J Immunol.* v.37, n.12, p.3304-10. 2007.
- GULÇİN, I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives Toxicological*, v. 86, p. 345–391, 2012.

- HARTMAN, L. LAGO, R. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Laboratory Practice*. v. 22, p.475-476, 1973.
- HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid Antioxidants: Chemistry, Metabolism and Structure-Activity Relationships. *J. Nutr. Biochem*. v.13, p.572–584, 2002.
- HOFFMAN, A. R. *et al.* Differential modulation of CD4 and CD8 T-cell proliferation by induction of nitric oxide synthesis in antigen presenting cells. **Transplantation**. v.74, n.6, p.836-45. 2002.
- HORIGUCHI, T. *et al.* Inhibitory Effect of Ac-a1' (Euterpe oleracea Mart.) Pulp on IgE-Mediated Mast Cell Activation. **J. Agric. Food Chem.**, v. 59, p. 5595–5601, 2011.
- HWANG, E.S.; KIM, G.H. Biomarkers for oxidative stress status of DNA, lipids, and proteins in vitro and in vivo cancer research. **Toxicology**, v. 229, p. 1-10, 2007.
- IDDIR, M. *et al.* Strengthening the Immune System and Reducing Inflammation and Oxidative Stress through Diet and Nutrition: Considerations during the COVID-19 Crisis. **Nutrients**, v.12, n.6, 39p, 2020.
- JOHNSON, Q. R. *et al.* Effects of carotenoids on lipid bilayers. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 20, p. 3795-3804, 2018.
- JUNIOR, A. J. *et al.* Analgesic and Anti-inflammatory Effects of Caryocar brasiliense. **Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem**.v. 19, n.3, p. 313-322, 2020.
- KAULMANN, A.; BOHN, T. Carotenoids, inflammation, and oxidative stress—implications of cellular signaling pathways and relation to chronic disease prevention. **Nutr. Res**, v. 34, p. 907–929, 2014.
- KAWATA, A. *et al.* Anti-inflammatory activity of β -carotene, lycopene and tri-n-butylborane, a scavenger of reactive oxygen species. **In Vivo**, v.32, p.255–264, 2018.
- KHAN, N. Cocoa polyphenols and inflammatory markers of cardiovascular disease. **Nutrients**. v.6, p.844–880. 2014.
- KIM, D. H. *et al.* Oleate protects macrophages from palmitate-induced apoptosis through the downregulation of CD36 expression. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 488, n. 3, p. 477-482, 2017.
- KIM, J. W. *et al.* Tea polyphenol inhibits allostimulation in mixed lymphocyte culture. **Cell Transplant.**, v.16, n.1, p. 75-83, 2007.
- KIRWAN, A. M. *et al.* Nutritional modulation of metabolic inflammation. **Biochem Soc Trans**,v.45, n.4, p. 979–985, 2017.
- KLOTZ, U. Pharmacokinetics and drug metabolism in the elderly. **Drug Metabolism Reviews**, v. 41, n. 2, p. 67–76, 2009.
- KONSTANTINIDI, M.; KOUTELIDAKIS, A. E. Functional Foods and Bioactive Compounds: A Review of Its Possible Role on Weight Management and Obesity's Metabolic Consequences. **Medicines (Basel)**. v.6, n.3, 2019.

- KRINSKY, N.I.; JOHNSON, E.J. Carotenoid actions and their relation to health and disease. **Mol. Aspects Med.** v.26, p.459–516, 2005
- KUMAR SINGH, A. Beneficial Effects of Dietary Polyphenols on Gut Microbiota and Strategies to Improve Delivery Efficiency. **Nutrients**, v.11, n.2216, 2019.
- LAURIDSEN, C. From oxidative stress to inflammation: Redox balance and immune system. **Poult. Sci.** v. 98, n.10, p. 4240–4246, 2019.
- LE, K.; CHIU, F.; NG, K. Identification and quantification of antioxidants in Fructus lycii. **Food Chemistry**. V.10, p.353-363, 2007.
- LEE, S. *et al.* Rice bran oil ameliorates inflammatory responses by enhancing mitochondrial respiration in murine macrophages Sojung. **PLoS ONE**,v.14, n. 10,14p, 2019.
- LI, Z. *et al.* Hass avocado modulates postprandial vascular reactivity and postprandial inflammatory responses to a hamburger meal in healthy volunteers. **Food & function**, v. 4, n.3, p. 384-391, 2013.
- LIMA, A. *et al.* Composição química e compostos bioativos presentes na polpa e na amêndoa do pequi (Caryocar brasiliense, Camb.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 29, n. 3, p. 695–698, 2007.
- LIN, K. H. *et al.* Astaxanthin, a carotenoid, stimulates immune responses by enhancing IFN- γ and IL-2 secretion in primary cultured lymphocytes in vitro and ex vivo. **Int. J. Mol. Sci.** v.17, 2016.
- LIN, P. *et al.*, Carotenoids Inhibit Fructose-Induced Inflammatory Response in Human Endothelial Cells and Monocytes. **Mediators of inflammation**, 2020.
- LINNEWIEL-HERMONI, K. *et al.* Carotenoid derivatives inhibit nuclear factor kappa B activity in bone and cancer cells by targeting key thiol groups. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 75, p. 105-120, 2014.
- LIOR, X., *et al.* The effects of fish oil, olive oil, oleic acid and linoleic acid on colorectal neoplastic processes. **Clin Nutr.**, v.22, p. 71-9, 2003.
- LIU, K. *et al.* Antioxidant activities of natural 9-cis and synthetic all-trans β -carotene assessed by human neutrophil chemiluminescence. **Nutr. Res.**, v.20,p. 5-14, 2000.
- LOPRESTI, A.L. *et al.* A review of peripheral biomarkers in major depression: The potential of inflammatory and oxidative stress biomarkers. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**. v.48, p. 102–111, 2014.
- LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil.4.ed. **Nova Odessa: Plantarum**, v.1, 368p,1992.
- MAIANI, G. *et al.* Carotenoids: Actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 53, p. 194 –218, 2009.
- MANACH, C. *et al.* Polyphenols: food sources and bioavailability. **Am J Clin Nutr.** v.79, n.5, p.727-47, 2004.

MARCELINO, G. *et al.* Effects of Olive Oil and Its Minor Components on Cardiovascular Diseases, Inflammation, and Gut Microbiota. **Nutrients**. v.11, n.8, 2019.

MARCOS, A.; NOVA, E.; MONTERO, A. Changes in the immune system are conditioned by nutrition. **Eur. J. Clin. Nutr.** v. 57, p. S66–S69. 2003.

MARGINA, D. *et al.* Analysis of the intricate effects of polyunsaturated fatty acids and polyphenols on inflammatory pathways in health and disease. **Food and Chemical Toxicology**. v. 143, 2020.

MARTIN-PELAEZ, S. *et al.* Effect of virgin olive oil and thyme phenolic compounds on blood lipid profile: Implications of human gut microbiota. **Eur. J. Nutr.** v.56, p.119–131, 2017.

MCCOY, M.E. *et al.* Th2-Specific Immunity and Function of Peripheral T Cells Is Regulated by the p56Lck Src Homology 3 Domain. **J Immuno**, v. 185, n.6, p.3285-94, 2010.

MCHEYZER-WILLIAMS, M.G. B cells as effectors. **Curr Opin Immunol**; v.15, n.3, p. 354-61, 2003.

MENDES, M. F. **Efeitos do óleo de pequi (Caryocar brasiliense) no balanço energético em biomarcadores imunometabólicos de camundongos alimentados com dietas balanceada e hiperlipídica.** 78 p. Dissertação de mestrado. UFVJM, Diamantina -MG, 2019.

MESQUITA Jr. D. *et al.* Autoimmune diseases in the TH17 era. **Braz J Med Biol Res**. v.42, n.6, p.476-486, 2009.

MESQUITA Jr. D. *et al.* Sistema Imunitário – Parte II: Fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Rev Bras Reumatol** v.50, n.5, p.552-80. 2010.

MILANI, A. *et al.* Carotenoids: biochemistry, pharmacology and treatment. **Br J Pharmacol**. V.174, n.11, p. 1290-1324. 2017.

MIRANDA-VILELA A.L. *et al.* Pequi fruit (Caryocar brasiliense Camb.) pulp oil reduces exercise-induced inflammatory markers and blood pressure of male and female runners. **Nutrition Research**. v. 29, n. 12, p. 850-858, 2009a.

MIRANDA-VILELA, A. L. *et al.* Dietary carotenoid-rich pequi oil reduces plasma lipid peroxidation and DNA damage in runners and evidence for an association with MnSOD genetic variant-Val9Ala. **Genet Mol Res**, v. 8, n. 4, p. 1481–95, 2009b.

MIRANDA-VILELA, A. L. *et al.* Dietary carotenoid-rich oil supplementation improves exercise-induced anisocytosis in runners: influences of haptoglobin, MnSOD (Val9Ala), CAT (21A/T) and GPX1 (Pro198Leu) gene polymorphisms in dilutional pseudoanemia ("sports anemia"). **Genetics and molecular biology**, v. 33, n. 2, p. 359-367, 2010.

MIRANDA-VILELA, A. L. *et al.* The protective effects of nutritional antioxidant therapy on Ehrlich solid tumor-bearing mice depend on the type of antioxidant therapy chosen: histology, genotoxicity and hematology evaluations. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 22, n. 11, p. 1091–1098, 2011a.

MIRANDA-VILELA A. L. *et al.* Under increased hydrogen peroxide conditions, the antioxidant effects of pequi oil (Caryocar brasiliense Camb.) to decrease DNA damage in runners are influenced by sex, age and oxidative stress-related genetic polymorphisms. **Free Rad Antiox** . p.27–39, 2011b.

- MIRANDA-VILELA, A. L. *et al.* Genetic polymorphisms influence runners' responses to the dietary ingestion of antioxidant supplementation based on pequi oil (*Caryocar brasiliense* Camb.): a before-after study. **Genes Nutrition**, v. 6, p. 369–395, 2011c.
- MIRANDA-VILELA, A. L. *et al.* Dextran-functionalized magnetic fluid mediating magnetohyperthermia combined with preventive antioxidant pequi-oil supplementation: potential use against cancer. **Journal of biomedical nanotechnology**, v. 9, n. 7, p. 1261–1271, 2013.
- MIRANDA-VILELA, A. L. *et al.* Oil rich in carotenoids instead of vitamins C and E as a better option to reduce doxorubicin-induced damage to normal cells of Ehrlich tumor-bearing mice: hematological, toxicological and histopathological evaluations. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 25, n. 11, p. 1161–1176, 2014.
- MIRANDA-VILELA, A.L. *et al.* Association between interleukin 6–174 G/C promoter gene polymorphism and runners' responses to the dietary ingestion of antioxidant supplementation based on pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) oil: A before-after study. **Genet Mol Biol**. v.39, p.554–566, 2016.
- MISHRA, A. *et al.* Bauhinia Variegata Leaf Extracts Exhibit Considerable Antibacterial, Antioxidant, and Anticancer Activities. **Biomed. Res.Int.** 2013.
- MOHAMMED, I. *et al.* Strengthening the Immune System and Reducing Inflammation and Oxidative Stress through Diet and Nutrition: Considerations during the COVID-19 Crisis. **Nutrients**, v. 12, n. 6, 2020.
- MOHAR, D.; MALIK, S. The Sirtuin System: The Holy Grail of Resveratrol? **J. Clin. Exp. Cardiol.** v.3, n. 216, 2012.
- MONTALVÃO, T.M. *et al.* Anti-inflammatory effect of antioxidant pequi (*Caryocar brasiliense*) oil capsules and antioxidant effect of vitamin D and physical activity on systemic lupus erythematosus patients. **J Rheum Dis Treat.** v. 2, 2015.
- MORAIS, M. L.; *et al.* Determination of antioxidant potential in vitro of brazilian Cerrado fruits. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 2, p. 355-360, 2013.
- MORENO, L. G. *et al.* *Caryocar brasiliense* fruit intake ameliorates hepatic fat deposition and improves intestinal structure of rats. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 10, n. 37, p. 640-648, 2016.
- MORENO, L. G. *et al.* Pequi Oil, a MUFA/Carotenoid-Rich Oil, Exhibited Protective Effects against DSS-Induced Ulcerative Colitis in Mice. **Eur. J. Lipid Sci. Technol.** p. 1-7, 2021.
- MORIGUCHI, S. *et al.*, β -carotene supplementation enhances lymphocyte proliferation with mitogens in human peripheral blood lymphocytes. **Nutr Res**; n.16, p. 211–218,1996.
- MOSMANN, T. R.; COFFMAN, R. L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annu. Rev. Immunol.** v. 7, p. 145–73, 1989.
- MYLES, I. A. Fast food fever: reviewing the impacts of the Western diet on immunity. **Nutrition Journal** . v. 13, n. 61, p. 1-17. 2014.
- NETEA, M.G. *et al.* A guiding map for inflammation. **Nat. Immunol.** v.18, p. 826–831, 2017.

- OKTYABRSKY, O. N.; SMIRNOVA, G.V. Redox regulation of cellular functions. **Biochemistry (Mosc)**, v. 72, n. 2, p. 132-45, 2007.
- OLIVEIRA, M. N. S. *et al.* Estádio de maturação dos frutos e fatores relacionados aos aspectos nutritivos e de textura da polpa de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 3, p. 380–386, 2006.
- OLIVEIRA, M. E. B. *et al.* Aspectos agrônômicos e de qualidade do pequi. Fortaleza: **Embrapa Agroindústria Tropical**, 32 p. 2008.
- OLIVEIRA F.F.B. **Efeito antinociceptivo e anti-inflamatório do óleo da polpa de pequi *Caryocar coriaceum* Wittm na artrite induzida por zymosan em ratos**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2013.
- OLIVEIRA, L. G. *et al.* *Caryocar brasiliense* oil improves cardiac function by increasing Serca2a/PLB ratio despite no significant changes in cardiovascular risk factors in rats. **Lipids in Health and disease**, v. 16, n.37, p.1-8. 2017.
- OLMEDILLA, B. A. Serum concentrations of carotenoids and vitamins A, E, and C in control subjects from five European countries. **British Journal of Nutrition**, v. 85, p. 227- 238, 2001.
- OLSON, J. A. *et al.* Provitamin A function of carotenoids: The conversion of β -carotene into vitamin A. **J. Nutr.** v.119, p.105–108, 1998.
- PALA, P., HUSSELL, T., OPENSHAW, P. J.M. Flow cytometric measurement of intracellular cytokines. **Journal of Immunological Methods**, v. 243, p.107–124, 2000.
- PALMEIRA, S. M. *et al.* Chemopreventive effects of pequi oil (*Caryocar brasiliense* Camb.) on preneoplastic lesions in a mouse model of hepatocarcinogenesis. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 25, n. 4, p. 299-305, 2016.
- PALOZZA, P. *et al.* Modulation of Intracellular Signaling Pathways by Carotenoids. In: Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H., editors. **Carotenoids: Nutrition and Health** v.5. 2009.
- PASSOS, M. E. P. *et al.* Differential effects of palmitoleic acid on human lymphocyte proliferation and function. **Lipids in health and disease**, v. 15, n. 1, p. 217, 2016.
- PHAM-HUY, L. A.; PHAM-HUY, H. He. C. Free radicals, antioxidants in disease and health **Int. J. Biomed. Sci.** v.4, p. 89-96, 2008.
- PIRES, J. *et al.* Healing of dermal wounds property of *Caryocar brasiliense* oil loaded polymeric lipid-core nanocapsules: formulation and in vivo evaluation. **Eur J Pharm Sci.** v.1; n.150, 2020.
- POKROVSKII, M. *et al.* Characterization of transcriptional regulatory networks that promote and restrict identities and functions of intestinal innate lymphoid cells. **Immunity**, v.51, p.185-97, 2019.
- PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4290–4302, 2005.
- RAVAUT, G. *et al.* Monounsaturated Fatty Acids in Obesity-Related Inflammation. **Int. J. Mol. Sci**, v. 22, n.330. 2021.

RESZCZYNSKA, E. *et al.* Carotenoid binding to proteins: Modeling pigment transport to lipid membranes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 584, p. 125-133, 2015.

RIBEIRO I. F. *et al.* The influence of erythropoietin (EPO T/G) and α -Actinin-3 (ACTN3 R577X) polymorphisms on runners' responses to the dietary ingestion of antioxidant supplementation based on pequi oil (*Caryocar brasiliense* Camb.): A before-after study. **J Nu-trigenet Nutrigenom**, v.6, p.283–304, 2013.

ROCHA, D. M.; BRESSAN, J. HERMSDORFF, H. H. The role of dietary fatty acid intake in inflammatory gene expression: **A critical review. Sao Paulo Med. J.** v.135, p.157–168. 2017.

RODRIGO, R.; MIRANDA, A.; VERGARA, L. Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease. **Clin. Chim. Acta**, v. 412, p. 410–424, 2011.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M.; AMAYA-FARFAN, J. Fontes brasileiras de carotenoides: **Tabela brasileira de composição de carotenoides em alimentos. Ministério do Meio Ambiente**, Brasília, 2008.

ROESLER, R. *et al.* Antioxidant activity of *Caryocar brasiliense* (pequi) and characterization of components by electrospray ionization mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 110, n. 3, p. 711–717, 2008.

ROOHBAKHSH, A.; KARIMI, G.; IRANSHAHI, M. Carotenoids in the treatment of diabetes mellitus and its complications: a mechanistic review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 91, p.31–42, 2017.

ROLL, M. M. *et al.* The pequi pulp oil (*Caryocar brasiliense* Camb.) provides protection against aging-related anemia, inflammation and oxidative stress in Swiss mice, especially in females. **Genetics and Molecular Biology**, v. 41, n. 4, p. 858–869, 2018.

RUBIN, L.P *et al.* Metabolic effects of inflammation on vitamin A and carotenoids in humans and animal models. **Adv. Nutr.** v. 8, p.197–212, 2017.

RUFINO, M. S. M. *et al.* Free radical-scavenging behaviour of some north-east Brazilian fruits in a DPPH system., **Food Chemistry**. v. 114, n. 2, p. 693-695, 2009.

RUSSELL, J. H.; LEY, T. J. Lymphocyte-Mediated Cytotoxicity. *Annual Review of Immunology*, v.20, p. 323-370,2002.

SALES-CAMPOS, H. *et al.* An overview of the modulatory effects of oleic acid in health and disease. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 13, n. 2, p. 201-210, 2013.

SAKAGUCHI, S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. **Nat Immunol**; v. 6, p.345-52, 2005

SAKHAEI, R. *et al.* The dietary approaches to stop hypertension (DASH)-style diet and an alternative Mediterranean diet are differently associated with serum inflammatory markers in female adults. **Food Nutr. Bull**, v.39, p.361–376, 2018.

SATO, M. *et al.* Quercetin, a Bioflavonoid, Inhibits the Induction of Interleukin 8 and Monocyte Chemoattractant Protein-1 Expression by Tumor Necrose Factor-Alpha in Cultured Human Synovial Cells . **J. Rheumatol.** v.24, p.1680–1684, 1997.

SCHMETTERER, K. G.; NEUNKIRCHNER, A.; PICKL, W. F. Naturally occurring regulatory T cells: markers, mechanisms, and manipulation. **FASEB J.** v. 26, n.6, p.2253-76, 2012.

SCHWINGSHACKL, L. HOFFMANN, G. Monounsaturated fatty acids, olive oil and health status: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. **Lipids Health Dis.** v.13, n.154, 2014.

SCHWINGSHACKL, L.; CHRISTOPH, M.; HOFFMANN, G. Effects of Olive Oil on Markers of Inflammation and Endothelial Function-A Systematic Review and Meta-Analysis. **Nutrients**, v.7, p.7651–7675, 2015.

SEDER, R. A.; AHMED, R. Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell generation. **Nature Immunology.** v. 4, p. 835–842, 2003.

SHEVACH, E. M. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. **Immunity.** v. 30, n.5, p.636-45, 2009.

SHIVELY, C. A. *et al.* Mediterranean versus Western Diet Effects on Caloric Intake, Obesity, Metabolism, and Hepatosteatosis in Nonhuman Primates. **Obesity**, v. 27, p. 777–784, 2019.

SHORTMAN, K.; HEATH, W.R. The subset of CD8+ dendritic cells. **Immunol Rev.** v.234, p.18-31, 2010.

SILVA FILHO, P. V. da. Plantas do cerrado produtoras de matéria tintorial. **Informe Agropecuário, Belo Horizonte**, v.16, n.173, p.27-32, 1992.

SKIBSTED, L. H. Carotenoids in antioxidant networks. Colorants or radical scavengers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.60, n.10, p.2409–2417, 2012.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PATOLOGIA CLÍNICA/MEDICINA LABORATORIAL.
Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial para coleta de sangue venoso. 2. ed. Barueri, SP: Minha Editora, 2010.

SPECIALE, A. *et al.* Nutritional Antioxidants and Adaptive Cell Responses: An Update. **Curr. Mol. Med.** v. 11, p.770–789, 2011.

SPEER H. *et al.* Anthocyanins and Human Health-A Focus on Oxidative Stress, Inflammation and Disease. **Antioxidants (Basel).** v. 9, n.5 .2020.

STORNILOLO, C. E. *et al.* Bioactive Compounds of Cooked Tomato Sauce Modulate Oxidative Stress and Arachidonic Acid Cascade Induced by Oxidized LDL in Macrophage Cultures. **Nutrients**, v. 11, n. 8, p. 1880, 2019.

TAN, N.S. *et al.* Selective cooperation between fatty acid binding proteins and peroxisome proliferator-activated receptors in regulating transcription. **Mol Cell Biol.** v.22, n.14, p.5114-27, 2002.

TANG, Q.; BLUESTONE, J.A. The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. **Nat Immunol.**, v. 9, n3, p. 239-44, 2008.

- TANIUCHI, I. CD4 Helper and CD8 Cytotoxic T Cell Differentiation. **Annu. Rev. Immunol.** v. 36, p. 579–601, 2018.
- TEIXEIRA, T. N, *et al.* Caryocar brasiliense pulp increases serum HDL and reduces hepatic lipid accumulation in rats fed a high fat diet. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 7, n. 15, p. 963-969, 2013.
- TERAO, J.; MINAMI, Y.; BANDO, N. Singlet molecular oxygen-quenching activity of carotenoids: Relevance to protection of the skin from photoaging. **J. Clin. Biochem. Nutr.**, v. 48, p.57–62, 2010.
- TERRY, L. A. *et al.* Differential expression and regulation of human CD8 alpha and CD8 beta chains. **Tissue Antigens.** v.35, n.2, p.82-91, 1990.
- TIMM, M. *et al.* Considerations regarding use of solvents in in vitro cell based assays. **Cytotechnology.** v.65, n. 5, p. 887-94. 2013.
- TORRES, L.R.O. *et al.* Pequi (Caryocar brasiliense Camb.) almond oil attenuates carbon tetrachloride-induced acute hepatic injury in rats: Antioxidant and anti-inflammatory effects. **Food and Chemical Toxicology**, v. 97, p. 205-216, 2016.
- TORRES SILVA, G. *et al.* Caryocar brasiliense Cambess. Pulp Oil Supplementation Reduces Total Cholesterol, LDL-c, and Non-HDL-c in Animals. **Molecules.** 2020 v.25, n.19, 17p. 2020.
- TOTI, E. *et al.* Non-provitamin A and provitamin A carotenoids as immunomodulators: Recommended dietary allowance, therapeutic index, or personalized nutrition? **Oxidative Med. Cell. Longev.** 2018.
- TRAESEL, G. K. *et al.* Oral acute and subchronic toxicity studies of the oil extracted from pequi (Caryocar brasiliense, Camb.) pulp in rats. **Food Chem Toxicol.** V.97, p.224-231, 2016.
- TRAESEL, G. K. *et al.* Safety assessment of oil from pequi (Caryocar brasiliense Camb.): evaluation of the potential genotoxic and clastogenic effects. **Journal of medicinal food**, v. 20, n. 8, p. 804–811, 2017.
- TRICHOPOULOU, A.; KATSOUYANNI, K.; GNARDELLIS, C. The traditional Greek diet. **Eur. J. Clin. Nutr.** v. 47, p. S76–S81, 1993.
- TSAO, R. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. **Nutrientes.** v. 2, p.1231–1246, 2010.
- TUFARELLI, V. *et al.*, Dietary Phenolic Compounds: Biochemistry, Metabolism and Significance in Animal and Human Health. **Curr. Drug Metab.**v.18, n. 905–913, 2017.
- TURVEY, S. E.; BROIDE, D. H. Innate immunity. **J Allergy Clin Immunol**, v.125, n.2, p.24-32, 2010.
- UCCI, M. *et al.* Anti-inflammatory role of carotenoids in endothelial cells derived from umbilical cord of women affected by gestational diabetes mellitus. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity.**v.11, 2019.
- VALE, A. F. *et al.* Antioxidant effect of the pequi oil (Caryocar brasiliense) on the hepatic tissue of rats trained by exhaustive swimming exercises. **Brazilian Journal of Biology**, v. 79, n. 2, p. 257–262, abr. 2019.

- VAN HELDEN, Y. G. J. *et al.* Organ specificity of beta-carotene induced lung gene-expression changes in Bcmo1^{-/-} mice. **Molecular nutrition & food research**, v. 57, n.2, p. 307-319, 2013.
- VASCONCELOS, T. B. *et al.* Antioxidants and Free Radicals: Peril or Protection? UNOPAR **Cient Ciênc Biol Saúde**, v.16, n.3, p.213-9, 2014.
- VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO A. C. Plantas medicinais: cura segura? **Quim. Nova**, v.28, n.3, p.519-528, 2005.
- VERLENGIA, R. *et al.* Effect of arachidonic acid on proliferation, cytokines production and pleiotropic genes expression in Jurkat cells—A comparison with oleic acid. **Life Sciences**, v.73, n. 23, p.2939-2951, 2003.
- VICTOR, V. M.; ROCHA, M.; DE LA FUENTE, M. Immune cells: free radicals and antioxidants in sepsis. **Int. Immunopharmacol.**, v.4, p. 327-347, 2004.
- VIEIRA, R. F., MARTINS, M. V. M. Recursos genéticos de plantas medicinais do cerrado: uma compilação de dados. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai. Botucatu**, v. 3, n.1, p.13-36, 2000.
- VOUTILAINEN, S. *et al.* Carotenoids and cardiovascular health. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.83, n.6, p.1265–1271, 2006.
- WALSTON, J. *et al.* Serum antioxidants, inflammation, and total mortality in older women. **Am. J. Epidemiol.** v., 163, p.18–26, 2006.
- WANG, J. *et al.*, Green Tea Epigallocatechin-3-Gallate Modulates Differentiation of Naive CD4⁺ T Cells into Specific Lineage Effector Cells. **J. Mol. Med.** v. 91, p.485–495, 2013.
- WANG, J. *et al.* Epigallocatechin-3-gallate ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis by altering balance among CD4⁺ T-cell subsets. **Am J Pathol**, v.180, p.221–34, 2012.
- WANG, Z.; ZHAO, Y. Gut microbiota derived metabolites in cardiovascular health and disease. **Protein Cell**, v.9, p.416–431, 2018.
- WATSON, M. *et al.* Immune cell activation and subsequent epithelial dysfunction by Staphylococcus enterotoxin B is attenuated by the green tea polyphenol epigallocatechin gallate. **Cell Immunol.**, v.237, p. 7-16, 2005.
- WATZL, B. *et al.*, Supplementation of a Low-Carotenoid Diet with Tomato or Carrot Juice Modulates Immune Functions in Healthy Men. **Ann Nutr Metab.** v.47, n.6, p. 255–261, 2003.
- WILASRUSMEE, C. *et al.*, In vitro immunomodulatory effects of ten commonly used herbs on murine lymphocytes. **J. Altern. Complem. Med.** v.8, n.4, p. 467-475, 2002.
- WU, D. *et al.* Green tea EGCG suppresses T cell proliferation through impairment of IL-2/IL-2 receptor signaling. **Free Radic. Biol. Med.**, v.47, n.5, p. 636-643, 2009.
- WU, D. *et al.* Green tea EGCG, T cells, and T cell-mediated autoimmune diseases. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 33, p. 107-118, 2012.
- WU, H, *et al.* Oleate but not stearate induces the regulatory phenotype of myeloid suppressor cells. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 74-98, 2017.

XAVIER, R. M.; DORA, J. M.; DE SOUZA, C. F. M.; BARROS, E. Laboratórios na prática clínica – consulta rápida. 2.ed. Porto Alegre: **Artmed**, 928p, 2010.

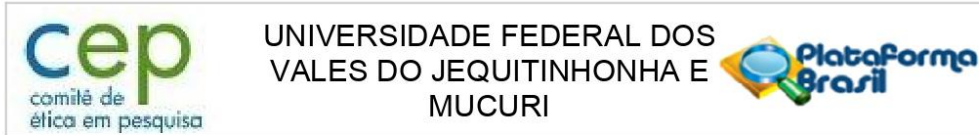
XU, X. R. *et al.* Effects of lutein supplement on serum inflammatory cytokines ApoE and lipids profiles in early atherosclerosis population. **Journal of Atherosclerosis and thrombosis**, v. 20, n. 2, p. 170-177, 2013.

YAHFOUFI, N. *et al.* The Immunomodulatory and Anti-Inflammatory Role of Polyphenols. **Nutrientes**, v. 10, 2018

YAQOOB, P. Monounsaturated fatty acids and immune function. **European journal of clinical nutrition**, v. 56, n. 3, p. 9, 2002.

ZIELINSKI, H; KOZLOWSKA, H. Antioxidant activity and total phenolics in selected cereal grains and their different morphological fractions. **J. Agric. Food Chem.**, v. 48, p. 2008-2016, 2000.

ANEXO – A



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:

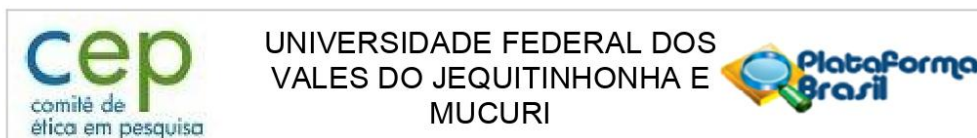
Objetivo Primário:

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 exsiccatas 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



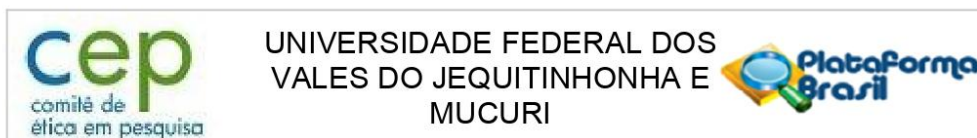
UNIVERSIDADE FEDERAL DOS
VALES DO JEQUITINHONHA E
MUCURI



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 porcentagem 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 apor 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



UNIVERSIDADE FEDERAL DOS
VALES DO JEQUITINHONHA E
MUCURI



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

ANEXO – B



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 in blue ink, possibly reading 'Gustavo' and 'Barroso'.

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 DE 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 VOLUNTÁRIO SERÁ DIRECIONADO A UM LOCAL RESERVADO E TRANQUILO PARA FICAR SENTADO OU DEITADO ATÉ MELHORAR, E TERÁ SUA PRESSÃO MONITORADA NESSA PERÍODO.

Os benefícios relacionados com a sua participação SERÃO DE FORMA INDIRETA, A CITAR: você estará contribuindo com um levantamento da eficácia e segurança de plantas medicinais utilizadas na região do Jequitinhonha-MG que você possa fazer uso, além de que será realizado uma triagem de parâmetros hematológicos de sua amostra sanguínea (semelhante quando você faz algum exame de sangue) empregando contador automático de células (CELM CC-550®) e realização de contagem global e diferencial de leucócitos, assim quaisquer alterações nestes parâmetros você será informado imediatamente para providencias adequadas. Estão previstos como forma de acompanhamento e assistência laboratorial (se for o caso).

Os resultados desta pesquisa poderão ser apresentados em seminários, congressos e similares, entretanto, os dados/informações pessoais obtidos por meio da sua participação serão confidenciais e sigilosos, não possibilitando sua identificação. Não há remuneração com sua participação, bem como a de todas as partes envolvidas. Não está previsto indenização por sua participação, mas em qualquer momento se você sofrer algum dano, comprovadamente decorrente desta pesquisa, terá direito à indenização.

Os pesquisadores responsáveis por este projeto podem decidir sobre a sua exclusão do estudo por razões científicas, a respeito das quais você deverá ser devidamente informado. Quaisquer dúvidas que possam surgir durante o andamento deste estudo por parte do voluntário poderão ser esclarecidas junto aos membros da equipe responsáveis pelo projeto, pessoalmente ou por telefone (0(38) 35321200 ramal 8422).

Observação: Quaisquer gastos quanto a locomoção e alimentação não estão incluídos no financiamento deste projeto, assim o participante não será ressarcido.

Assinatura
Assinatura

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: _____

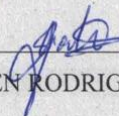
Testemunha: _____

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