

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Citotoxicidade e produção de óxido nítrico em células RAW 264.7 tratadas com o extrato
aquoso da *Campomanesia xanthocarpa*

Luana do Nascimento Pinto

Monografia apresentada à Coordenação
do Curso de Biotecnologia, da
Universidade Federal de Uberlândia,
para obtenção do grau de Bacharel em
Biotecnologia.

Uberlândia - MG

Julho – 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Citotoxicidade e produção de óxido nítrico em células RAW 264.7 tratadas com o extrato
aquoso da *Campomanesia xanthocarpa*

Luana do Nascimento Pinto

Celene Maria de Oliveira Simões Alves

Monografia apresentada à Coordenação
do Curso de Biotecnologia, da
Universidade Federal de Uberlândia,
para obtenção do grau de Bacharel em
Biotecnologia.

Uberlândia - MG

Julho – 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Citotoxicidade e produção de óxido nítrico em células RAW 264.7 tratadas com o extrato
aquoso da *Campomanesia xanthocarpa*

Luana do Nascimento Pinto

Celene Maria de Oliveira Simões Alves

Instituto de Ciências Biomédicas

Homologado pela coordenação do Curso
de Biotecnologia em ___/___/___

Edgar Silveira Campos

Uberlândia – MG

Julho – 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Citotoxicidade e produção de óxido nítrico em células RAW 264.7 tratadas com o extrato
aquoso da *Campomanesia xanthocarpa*

Luana do Nascimento Pinto

Aprovado pela Banca Examinadora em: 13 / 07 / 2018 Nota: 98

Celene Maria de Oliveira Simões Alves

Presidente da Banca Examinadora

Uberlândia, 13 de Julho de 2018

RESUMO

A família *Myrtaceae* compreende várias espécies encontradas principalmente em regiões tropicais e subtropicais, como a *Campomanesia xanthocarpa*. Taninos e flavonoides, metabólitos secundários detentores de atividades anti-inflamatórias, já foram identificados no extrato aquoso das folhas da referida espécie. Assim, no presente estudo investigamos os possíveis efeitos anti-inflamatórios e citotóxicos do extrato aquoso das folhas da *Campomanesia xanthocarpa* em células *macrophage-like* RAW 264.7. O extrato aquoso foi obtido a partir das folhas secas, trituradas, colocadas em água destilada (20%, m/v) e mantidas à temperatura ambiente por 48 horas. O extrato obtido foi congelado, liofilizado e acondicionado em freezer a -20°C até a utilização. A citotoxicidade do extrato da *Campomanesia xanthocarpa* foi avaliada empregando-se o ensaio de MTT (tetrazólio de metiltiazol) e a produção de óxido nítrico (NO) foi quantificada pelo método de Griess. Células RAW 264.7 (2×10^4 células/100 μ L) foram tratadas com concentrações crescentes de extrato (1,95 a 500 μ g/mL) por 24 horas e, posteriormente, pulsadas com MTT (0,5 mg/mL). Para a determinação de NO, as células (1×10^6 células/200 μ L) foram tratadas com diferentes concentrações do extrato de *Campomanesia xanthocarpa* (1,95 a 500 μ g/mL) ou com LPS (0,5 μ g/mL). O extrato aquoso da *Campomanesia xanthocarpa* apresentou citotoxicidade em concentrações superiores a 125 μ g/mL ($p < 0,05$), como evidenciado pela baixa viabilidade celular quando comparada àquela de células não-tratadas (controles). Em concentrações iguais ou inferiores a 62,5 μ g/mL, o extrato não foi capaz de induzir a produção de NO em células RAW 264.7 ($p > 0,05$). Portanto, o extrato da *Campomanesia xanthocarpa* parece interferir com o ciclo celular em células RAW 264.7 e, em concentrações não citotóxicas, não constitui estímulo suficiente para induzir a produção de NO.

Palavras-chave: *Campomanesia xanthocarpa*; células RAW 264.7; citotoxicidade; óxido nítrico.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Plantas medicinais	1
1.2	<i>Campomanesia xanthocarpa</i>	2
1.3	Metabólitos secundários	4
1.4	Inflamação e óxido nítrico.....	6
1.5	Linhagem celular <i>macrophage-like</i> RAW 264.7	7
1.6	Justificativas	8
2	OBJETIVOS	
1.1.	Objetivos gerais.....	9
1.2.	Objetivos específicos.....	9
3	MATERIAL E MÉTODOS	9
3.1.	Condição ambiental	9
3.2.	Material vegetal	9
3.3.	Obtenção do extrato aquoso	10
3.4.	Cultura de células da linhagem <i>macrophage-like</i> RAW 264.7.....	10

3.5. Avaliação da citotoxicidade do extrato aquoso de <i>C. xanthocarpa</i> em células <i>macrophage-like</i> RAW 264.7.....	11
3.6. Dosagem de óxido nítrico (NO) em sobrenadante de cultura de células <i>macrophage-like</i> RAW 264.7.....	12
3.7. Análises estatísticas.....	12
4 RESULTADOS	13
5 DISCUSSÃO.....	16
6 CONCLUSÃO	18
7 REFERÊNCIAS.....	19

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Viabilidade de células RAW 264.7 tratadas com o extrato aquoso da *Campomanesia xanthocarpa*.....13
- Figura 2** – Curva padrão para determinação da concentração de NO em sobrenadantes de cultura de células RAW 264.7.....14
- Figura 3** – Produção de óxido nítrico (NO) em células RAW 264.7 tratadas com o extrato aquoso da *Campomanesia xanthocarpa*.....15

1 INTRODUÇÃO

1.1 Plantas medicinais

O uso de produtos naturais pelo homem com finalidade terapêutica é tão antigo quanto a sua história, o que faz com que as plantas medicinais tenham grande importância para as condições de saúde das populações.

A medicina tradicional compreende diversas práticas, enfoque, conhecimentos e crenças sanitárias que incluem plantas, animais e/ou medicamentos baseados em minerais, terapias espirituais, técnicas manuais e exercícios, aplicados individualmente ou em combinação para manter o bem-estar, além de tratar, diagnosticar e prevenir as enfermidades (OMS, 2014).

Neste contexto, atualmente, é possível observar um crescimento significativo do uso de plantas medicinais para a síntese de fitoterápicos. Plantas medicinais são espécies vegetais, cultivadas ou não, e utilizadas com propósitos terapêuticos e fitoterápicos são produtos obtidos de plantas medicinais, ou de seus derivados, exceto substâncias isoladas, com finalidade profilática, curativa ou paliativa, podendo ser simples, quando o ativo é proveniente de uma única espécie vegetal medicinal, ou composto, quando o ativo é proveniente de mais de uma espécie vegetal (POLÍTICA NACIONAL DE PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS, 2016).

O crescimento na utilização de plantas medicinais deve-se não apenas ao seu poder curativo, mas também por serem economicamente mais acessíveis. Devido à desigualdade social em algumas regiões do país, muitas comunidades, principalmente as famílias mais carentes, buscam alternativas e soluções para a promoção da qualidade de vida (MENEGUELLI *et al*, 2018).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 60 a 80% da população mundial dependem da medicina popular nos seus cuidados básicos de saúde, e deste total, aproximadamente 85% utilizam-se de plantas e seus derivados como forma terapêutica (VERRI, A. M.; MOURA, A de A.; DE MOURA, V. M., 2018). Neste contexto, o estudo de plantas nativas do Brasil com potencial ação farmacológica é uma ferramenta relevante para a bioprospecção de novos agentes terapêuticos ou como complemento/alternativa aos fármacos já existentes.

1.2 *Campomanesia xanthocarpa*

Na América do Sul, a flora representa uma das fontes mais ricas do mundo de material com atividade farmacológica, e o Brasil possui a maior diversidade vegetal. Classificado como o segundo maior bioma brasileiro, o Cerrado ocupa uma área de, aproximadamente, 204,7 milhões de hectares na porção central do país, de forma que abriga mais de 11 mil espécies vegetais, as quais têm sido muito utilizadas na medicina popular e estudadas em relação aos seus potenciais farmacológicos (BERNARDES *et al*, 2017; MOREIRA, G. A. M., SPERANDIO, E. M., DO VALE, H. M. M. 2016).

Dentre essas espécies, encontra-se a *Campomanesia xanthocarpa*, popularmente conhecida como guabirobeira. Pertencente à família Myrtaceae, é uma árvore frutífera e lenhosa, a qual se apresenta como arbusto, arvoreta ou árvore de 10 a 20 m de altura e até 60 cm de diâmetro; as folhas são verdes e membranáceas e medem de 4 a 10 cm de comprimento por 3 a 4,5 cm de largura; seus frutos, denominados guabiroba, quando maduros, possuem grande potencial econômico, tanto como alimento *in natura* quanto na preparação de sorvetes e doces (VALLILO *et al*, 2008). No Brasil, a *C. xanthocarpa* está presente em vários estados das regiões central e sul, incluindo os estados de Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Rio Grande do Sul, e outros.

A guabirobeira é indicada para recomposição de áreas degradadas e matas ciliares, pois detém grande interesse econômico e ecológico. Além disso, pode ser utilizada para arborização urbana, devido ao efeito ornamental e por proporcionar boa sombra. As flores possuem importância melífera, sendo um atrativo para abelhas, enquanto a casca, as folhas e os frutos têm propriedades medicinais (DALANHOL *et al*, 2017).

Além disso, o país possui uma abundância de frutas nativas, as quais são ricas em aromas e sabores, apresentando grande potencial para serem exploradas economicamente. Dentre várias plantas nativas da flora brasileira, a família Myrtaceae destaca-se como uma das mais estudadas, cujas frutas apresentam um aroma agradável e intenso, como goiabas (*Psidium guajava L.*), pitanga (*Eugenia uniflora L.*) e jabuticaba (*Myrciaria jabuticaba*), mas há frutos de Myrtaceae a serem mais explorados, como a guabiroba (*Campomanesia xanthocarpa* O. Berg) (FERREIRA *et al*, 2016).

Conforme MENDES *et al* (2018), o fruto da guabirobeira caracteriza-se por ser arredondado, de coloração amarelo-esverdeada e polpa esbranquiçada. A guabiroba apresenta alto potencial para ser utilizada na indústria de alimentos, como bebidas (sucos, vitaminas e chás) e sobremesas, e como flavorizante, na indústria de bebidas, devido ao elevado teor de acidez, ácido ascórbico (vitamina C), minerais, fibras alimentares e hidrocarbonetos monoterpênicos, que lhe conferem o aroma cítrico.

Segundo KLAFKE *et al* (2010) e PASTORI *et al* (2013), *C. xanthocarpa* apresenta potencial uso para a perda de peso e no controle de certas condições associadas à obesidade, uma vez que estudos realizados anteriormente mostraram que o tratamento com guabiroba encapsulada reduziu o colesterol total do sangue e os níveis de LDL (lipoproteína de baixa densidade) em pacientes hipercolesterolêmicos. Estudos realizados por AUHAREK *et al* (2013) mostraram que o tratamento com o extrato dessa espécie, em estudos reprodutivos *in*

vivo, reduz os locais de reabsorção (indicativos de desenvolvimento anormal pós implantação do blastocisto no endométrio), aumenta o peso da placenta e o número de fetos vivos e pode, portanto, ter aplicações terapêuticas. Ademais, na medicina popular, a guabirobeira é utilizada para o tratamento de diversas patologias como diarreia, reumatismo, úlcera gástrica e uretrites (ABE, S. Y.; POSSAMAI, J. C.; NAKASHIMA, T. 2014).

Nativa do Brasil, a espécie *C. xanthocarpa* apresentou elevada atividade antioxidante, quando comparada entre seis frutas do Rio Grande do Sul (RS), devido ao seu teor de compostos fenólicos, vitamina C e carotenoides. Assim, nanopartículas de poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA) carregadas com extrato hidrofóbico de *C. xanthocarpa* foram sintetizadas e os perfis de liberação do extrato mostraram ter um efeito significativo sobre as propriedades biológicas das nanopartículas. No geral, PLGA carregada com extrato apresentou bons resultados para nanoencapsulação em termos de perfil de liberação, atividades antimicrobiana e antioxidante, e inibição das espécies reativas de oxigênio. Os resultados mostram que a nanoencapsulação com PLGA pode ser útil para outros extratos, contendo carotenóides e outros lipídios funcionais, como sistemas de liberação para atividade biológica aumentada (PEREIRA *et al*, 2015).

1.3 Metabólitos secundários

Conforme SANT'ANNA *et al* (2017), compostos biológicos naturais nas plantas têm um papel significativo no mecanismo de defesa dos vegetais, além de serem importantes pelas suas ações biológicas no organismo humano. Devido às propriedades terapêuticas, os metabólitos secundários estão se tornando parte do sistema de saúde integrativa como medicamentos alternativos.

Assim, conhecer a composição química de plantas medicinais é muito relevante. No extrato das folhas da *Campomanesia xanthocarpa*, foi indicada a presença de taninos,

saponinas e flavonoides, como quercetina, miricitrina e rutina (ABE, S. Y., POSSAMAI, J. C., NAKASHIMA, T., 2014; KATAOKA, V. M. F., CARDOSO, C. A. L., 2013).

Dentre esses metabólitos, os flavonoides apresentam atividade anti-inflamatória. Análises *in vitro* sugerem que esta atividade ocorre por meio de alguns mecanismos, tais como: (i) inibição de enzimas pró-inflamatórias, como a ciclooxigenase-2, lipooxigenase e óxido nítrico (NO) sintase, responsáveis pela síntese de prostanoídes, leucotrienos e NO, respectivamente; (ii) inibição dos fatores de transcrição NF- κ B, AP-1 e da via MAPK; (iii) ativação do fator nuclear eritróide 2, responsável pela ativação de genes que codificam proteínas antioxidantes; (iv) redução na expressão de citocinas pró-inflamatórias (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8) e da quimiocina MCP-1 em diferentes tipos celulares e supressão da molécula de adesão celular vascular-1, reduzindo a adesão endotelial e a transmigração de leucócitos (FUNK, 2001; SERAFINI, M., PELUSO, I., RAGUZZINI, A., 2010; SOARES *et al*, 2015).

Algumas plantas são capazes de produzir substâncias antimicrobianas, utilizadas como mecanismo de defesa contra microrganismos. Dessa forma, os principais grupos de compostos com propriedades antimicrobianas, extraídas de plantas incluem: terpenoides e óleos essenciais; lectinas, polipeptídios, substâncias fenólicas e polifenóis, que são: fenóis simples, ácidos fenólicos, quinonas, flavonas, flavonóis e flavonoides, taninos e cumarinas. Além disso, atividades antibacterianas de plantas medicinais são atribuídas também à presença de alcaloides esteroidais (KAUR, S., MONDAL, P., 2014).

Estes agentes antimicrobianos isolados de plantas superiores podem agir como reguladores do metabolismo intermediário, ativando ou bloqueando reações enzimáticas, afetando diretamente sua síntese enzimática, ou mesmo alterando estruturas de membranas (DE SOUZA *et al*, 2017).

Segundo VALLILO *et al* (2008), o extrato hidroalcoólico liofilizado das folhas de *C.*

xanthocarpa apresentou potencial antimicrobiano com Concentração Mínima Inibitória (CMI) < 1000 e $> 500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em relação à *Staphylococcus aureus*; CMI < 500 e $> 100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para *Salmonella cholerasuis*; e CMI < 1000 e $> 500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para *Candida albicans*. Estudos de BRANDELLI *et al* (2013) demonstraram que o extrato aquoso de folhas da guabiroba apresentou alta atividade anti-*Trichomonas vaginalis*, reduzindo a viabilidade do parasita em até 96%. Além disso, também foi observada atividade antiviral para extrato aquoso de *C. xanthocarpa* contra o herpesvírus suíno tipo 1 (SuHV-1), responsável por causar doenças graves em suínos (PADILLA *et al*, 2018).

Diante do exposto, a espécie *C. xanthocarpa* possui propriedades biológicas importantes, com potencial anti-inflamatório e antimicrobiano, com a descrição de atividades contra bactérias, fungo, protozoário e vírus.

1.4 Inflamação e óxido nítrico

A inflamação é uma reação biológica que ocorre em resposta a danos teciduais devido à presença de estímulos biológico, químico ou físico. As principais funções do processo inflamatório são eliminar ou isolar a fonte de perturbação, e, assim, restaurar a homeostase do tecido (LEYVA-LÓPEZ *et al*, 2016).

A inflamação pode ser dividida principalmente em inflamação aguda e crônica. De acordo com HWANG *et al* (2014), a forma aguda é a resposta protetora normal do corpo a uma lesão, irritação ou cirurgia. No entanto, a crônica induz várias doenças, incluindo câncer, Alzheimer, diabetes tipo II, artrite, e doenças de caráter autoimune, neurológico, pulmonar e cardiovascular.

Durante o processo inflamatório, vários mediadores inflamatórios, incluindo óxido nítrico (NO), prostaglandina E2 (PGE2), citocinas pró-inflamatórias e moléculas de adesão,

estão intimamente associados aos sintomas clássicos de inflamação, como dor, calor, vermelhidão, inchaço e perda de função. O NO é gerado a partir do aminoácido L-arginina pela expressão da isoforma induzível da enzima NO sintase (iNOS) que é estimulada durante a inflamação por endotoxinas bacterianas (por exemplo, lipopolissacarídeos) e citocinas (HWANG *et al*, 2014).

Além disso, conforme CASSINI-VIEIRA *et al* (2015), estudos forneceram evidências de que o NO induzível governa um amplo espectro de processos, como recrutamento e adesão de leucócitos, doenças inflamatórias, cicatrização de feridas, isquemia e angiogênese induzida por tumor.

1.5 Linhagem celular *macrophage-like* RAW 264.7

Segundo GASPARRINI *et al* (2017), os macrófagos são considerados as células predominantemente envolvidas em respostas inflamatórias, desempenhando papel importante nas reações imunológicas e na alergia. Uma vez ativados, macrófagos produzem fatores pró-inflamatórios, citocinas e espécies reativas de oxigênio (ROS), os quais estão diretamente envolvidos na progressão da condição inflamatória.

A linhagem celular *macrophage-like* RAW 264.7 foi estabelecida a partir de um tumor induzido pelo vírus da leucemia murina de Abelson (RASCHKE *et al*, 1978).

Macrófagos RAW 264.7 são muito sensíveis ao lipopolissacarídeo (LPS) e exibem ativação do receptor *Toll-like* 4 (TLR4). Este receptor, na espécie humana, interage com LPS presente em bactérias gram-negativas e desencadeia múltiplos sinais inflamatórios. Assim, a estimulação de células RAW 264.7 com LPS também tem sido utilizada para avaliar efeitos anti-inflamatórios de produtos naturais (ZHAN *et al*, 2018).

1.6 Justificativas

Flavonoides e taninos apresentam atividades anti-inflamatórias e muitas espécies vegetais são capazes de produzir esses metabólitos secundários, como, por exemplo, a *Campomanesia xanthocarpa*. Contudo, não existem trabalhos que tenham avaliado o potencial anti-inflamatório agudo dessa importante espécie do Cerrado brasileiro.

Assim, no presente estudo investigamos os possíveis efeitos citotóxicos e anti-inflamatórios do extrato aquoso das folhas da *Campomanesia xanthocarpa* em células *macrophage-like* RAW 264.7.

Cabe ressaltar que este estudo tem potencial para contribuir com o desenvolvimento da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, aprovada por meio do Decreto Nº 5.813, de 22 de junho de 2006, cujas ações visam, entre outros: (i) promover pesquisa, desenvolvimento de tecnologias e inovações em plantas medicinais e produtos fitoterápicos; (ii) o uso sustentável da biodiversidade (entre os elementos que compõem a biodiversidade, as plantas são a matéria-prima para a fabricação de fitoterápicos e outros medicamentos); (iii) incentivar a formação e capacitação de recursos humanos para o desenvolvimento de pesquisas, tecnologias e inovação em plantas medicinais e fitoterápicos; (iv) fomentar pesquisa, desenvolvimento tecnológico e inovação com base na biodiversidade brasileira, abrangendo espécies vegetais nativas e exóticas adaptadas, priorizando as necessidades epidemiológicas da população (POLÍTICA NACIONAL DE PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS, 2016).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar atividade citotóxica e a produção de óxido nítrico do extrato aquoso liofilizado da espécie *Campomanesia xanthocarpa* em modelo experimental *in vitro* utilizando células *macrophage-like* RAW 264.7.

2.2 Objetivos específicos

- Preparar o extrato aquoso da *Campomanesia xanthocarpa*.
- Analisar a citotoxicidade do extrato aquoso da *C. xanthocarpa* em células da linhagem *macrophage-like* RAW 264.7.
- Quantificar óxido nítrico (NO) em sobrenadante de cultura de células *macrophage-like* RAW 264.7 pré-tratadas com o extrato aquoso da *C. xanthocarpa*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Condição ambiental

Os experimentos foram realizados nos Laboratórios de Farmacologia (Departamento de Farmacologia) e de Cultura de Células (Departamento de Biofísica) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia.

3.2 Material vegetal

As folhas da planta *Campomanesia xanthocarpa* foram coletadas em período chuvoso em campos de vegetação espontânea e, posteriormente, transportadas para o Laboratório. O

material vegetal foi identificado por biólogo competente e uma exsicata da espécie foi depositada no herbário da Universidade Federal de Uberlândia (Número de Registro HUFU 65525).

3.3 Obtenção do extrato aquoso

Inicialmente, as folhas foram separadas dos galhos e lavadas em água corrente e, em seguida, em água destilada. Após esse procedimento, as folhas foram colocadas em estufa a 40°C durante dois dias para secagem. Depois de secas, as folhas foram trituradas em liquidificador e tamisadas. As folhas trituradas foram colocadas em provetas contendo água destilada na proporção de 20% (m\v). A extração foi realizada à temperatura ambiente durante 48 horas. Posteriormente, o extrato foi duplamente filtrado, primeiramente em funil contendo algodão e, em seguida, em funil contendo papel de filtro. O extrato obtido foi colocado em tubos falcon de 50 mL e acondicionado à temperatura – 20°C. Após congelamento, os extratos foram liofilizados à – 34°C até a total remoção do conteúdo de água. O material obtido foi pesado e acondicionado em freezer à – 20°C até a data da utilização.

3.4 Cultura de células da linhagem *macrophage-like* RAW 264.7

Macrófagos murinos da linhagem *macrophage-like* RAW 264.7 foram obtidos da *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, EUA) e mantidos em condições de cultura no Laboratório de Cultura de Células da Área de Ciências Fisiológicas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia. As células foram cultivadas em frascos de cultura de 25 cm² contendo meio RPMI 1640 suplementado com 25 mM de HEPES, 2 mM de L-glutamina, 3 mM de bicarbonato de sódio, antibióticos (penicilina G a 100 U/mL e estreptomicina a 100 µg/mL) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA) e 5% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, Brasil) inativado a 56°C por 30 min, e incubadas em atmosfera úmida de 5% de CO₂ a 37°C. Estas células foram mantidas por passagens seriadas a

cada dois dias por remoção da monocamada celular em RPMI sem soro fetal bovino com *cell scraper*. Em seguida, as células foram retiradas dos frascos de cultura e transferidas para tubos falcon de 15 mL e centrifugadas a 400g por 5 minutos à temperatura ambiente. Após descarte do sobrenadante, as células foram homogeneizadas em 1 mL de meio a 10% de SFB e distribuídas em frascos novos de cultura.

3.5 Avaliação da citotoxicidade do extrato aquoso de *C. xanthocarpa* em células *macrophage-like* RAW 264.7

A viabilidade de macrófagos murinos (linhagem *macrophage-like* RAW 264.7) tratados com extrato aquoso de *C. xanthocarpa* foi avaliada por ensaio de MTT (tetrazólio de metiltiazol) (MOSMANN, 1983). Células RAW 264.7 (2×10^4 células/200 μ L/poço) foram cultivadas em placas de 96 poços *overnight* em atmosfera úmida de 5% de CO₂ a 37°C. Em seguida, as células foram tratadas com concentrações crescentes de extrato aquoso de *Campomanesia xanthocarpa* (1,95 a 500 μ g/mL). Como controle negativo para citotoxicidade, somente meio RPMI foi adicionado às células. As células, tratadas com extrato ou não, foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após 24 horas, os sobrenadantes de cultura foram descartados. As células foram pulsadas com 100 μ L/poço de MTT (Sigma Chemical Co.) a 0,5 mg/mL. Após 4 horas, os sobrenadantes foram descartados e os cristais de formazan (partículas insolúveis de coloração roxa produzidas por células viáveis que metabolizaram o reagente MTT) foram solubilizados com 100 μ L/poço de SDS 10% e N,N-dimetil formamida 50%. A leitura da densidade óptica (DO) foi realizada após 30 minutos a 570 nm em leitor de placas (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, McLean, EUA). Os resultados foram expressos como porcentagem da viabilidade celular em relação aos controles.

3.6 Dosagem de óxido nítrico (NO) em sobrenadante de cultura de células *macrophage-like* RAW 264.7

A dosagem de NO foi realizada pelo método de Griess (GREEN et al.; 1982). Células RAW 264.7 foram adicionadas a placas de cultura de 96 poços (1×10^6 células/200 μ L/poço) e incubadas a 37°C e 5% de CO₂ overnight. Em seguida, as células foram tratadas com extrato aquoso de *Campomanesia xanthocarpa* (em concentração não tóxica, determinada nos ensaios de citotoxicidade) ou com LPS (Lipopolysaccharides from *Escherichia coli* O55:B5, Sigma) a 0,5 μ g/mL (controle positivo) e incubadas a 37°C e 5% de CO₂ por 24 horas. Como controle negativo para a produção de óxido nítrico, somente meio RPMI foi adicionado às células. Os sobrenadantes de cultura de células RAW 264.7 foram utilizados na dosagem de NO, uma vez que a célula que produz o óxido nítrico libera-o para o sobrenadante. Após a reação, a densidade óptica foi determinada em um leitor de microplacas a 570 nm. Os dados foram analisados em relação a uma curva padrão de NO previamente construída com concentrações de nitrito crescentes de 1,6 a 200 μ M.

3.7 Análises estatísticas

Para todos os cálculos estatísticos e confecção dos gráficos, foi utilizado o programa GraphPad Prism versão 6.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, EUA). Os dados foram expressos como a média \pm S.E.M (erro padrão da média). A comparação dos dados obtidos foi analisada por testes paramétricos, após a verificação pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov que as variáveis exibiam distribuição normal. Foi utilizado o teste ANOVA (*one-way*) seguido do teste de comparação múltipla de Bonferroni. Todos os resultados foram considerados significativos para um nível de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação do efeito do extrato aquoso de *C. xanthocarpa* sobre a viabilidade de células RAW 264.7

A viabilidade celular foi avaliada usando o método de conversão de MTT (Figura 1).

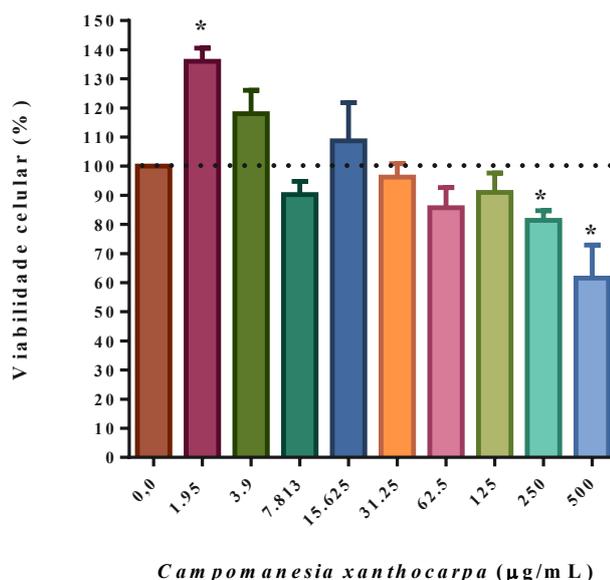


Figura 1. Viabilidade de células RAW 264.7 tratadas com o extrato aquoso da *Campomanesia xanthocarpa*. Células *macrophage-like* RAW 264.7 (2×10^4 células/200 µL/poço) foram cultivadas em placas de 96 poços a 37 °C e 5% de CO₂ durante 24 horas e tratadas com diferentes concentrações do extrato aquoso da *Campomanesia xanthocarpa* por 24 horas. Células tratadas apenas com meio RPMI com 10% de SFB foram utilizadas como controle (100% de viabilidade). A viabilidade celular foi analisada usando o método de conversão de MTT (tetrazólio de metiltiazol). Os dados estão expressos como média ± S.E.M. de seis experimentos independentes, realizados em quadruplicata. *Significância estatística em relação ao controle (Testes ANOVA e pós-teste de Bonferroni para comparações múltiplas, $p < 0,05$).

O extrato aquoso da *Campomanesia xanthocarpa* apresentou citotoxicidade em concentrações superiores a 125 µg/mL ($p < 0,05$), como evidenciado pela baixa viabilidade celular quando comparada àquela de células não-tratadas (controles). Em contrapartida, o extrato, na menor concentração utilizada, induziu proliferação das células RAW 264.7.

A maior dose do extrato utilizada (500 $\mu\text{g/mL}$) não foi suficiente para a determinação do valor da IC_{50} (concentração do extrato citotóxica em 50% das células).

Os dados obtidos sugerem que o extrato da *Campomanesia xanthocarpa* apresenta efeito citotóxico e interfere com o ciclo celular em células RAW 264.7 de modo dose-dependente.

4.2 Produção de óxido nítrico (NO) em células RAW 264.7 tratadas com extrato aquoso da *C. xanthocarpa*

Os sobrenadantes de cultura de células RAW 264.7 foram utilizados para quantificar a produção de NO por meio do método de Griess. Após a reação e leitura da densidade óptica, os dados obtidos foram analisados em relação a uma curva padrão de NO construída com concentrações de nitrito crescentes de 1,6 a 200 μM . A curva padrão e a respectiva equação da reta estão apresentadas na Figura 2. A Figura 3 mostra os resultados obtidos.

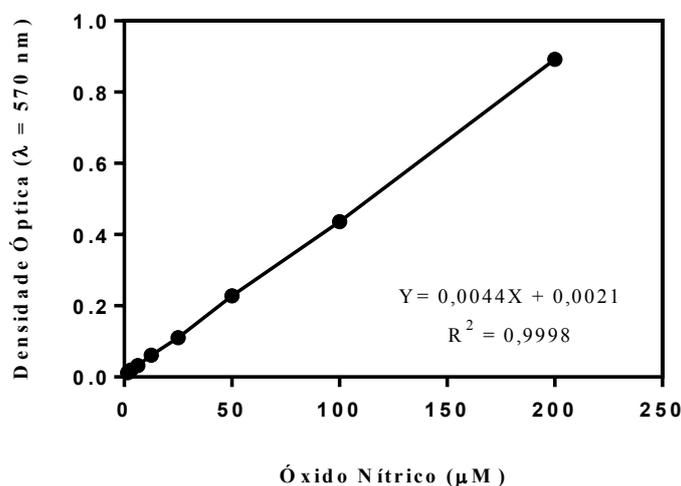


Figura 2. Curva padrão para determinação da concentração de NO em sobrenadantes de cultura de células RAW 264.7.

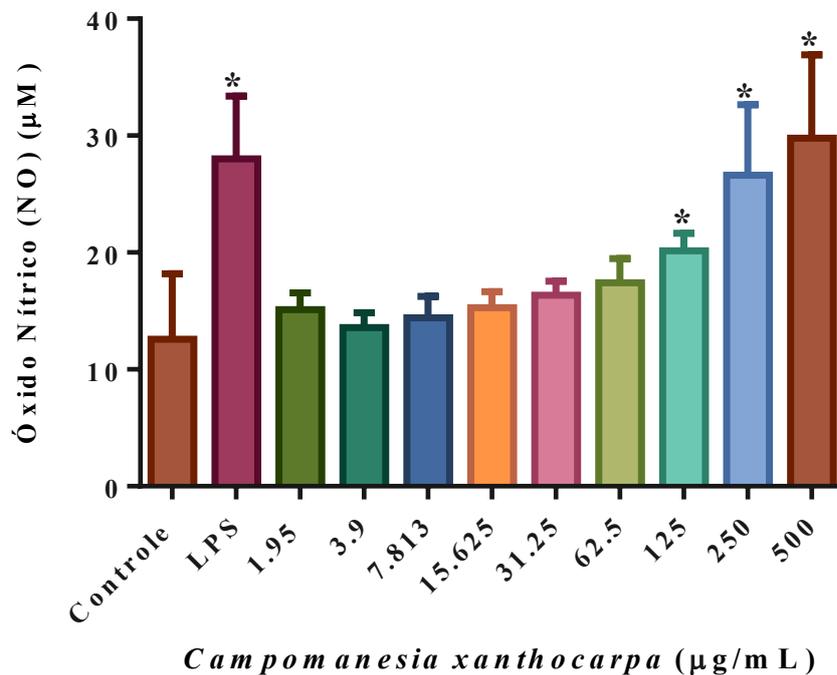


Figura 3. Produção de óxido nítrico (NO) em células RAW 264.7 tratadas com extrato aquoso da *Campomanesia xanthocarpa*. Células *macrophage-like* RAW 264.7 (1×10^6 células/200 μL /poço) foram cultivadas em placas de 96 poços a 37 °C e 5% de CO_2 durante 24 horas e tratadas com diferentes concentrações do extrato aquoso da *Campomanesia xanthocarpa*, ou com LPS (Lipopolysaccharides from *Escherichia coli* O55:B5, Sigma) (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), ou somente meio RPMI. Após 24 horas a 37 °C e 5% de CO_2 , a produção de óxido nítrico (NO) foi determinada pelo método de Griess nos sobrenadantes das culturas, em cada condição de tratamento. Os dados estão expressos como média \pm S.E.M. de valores da concentração de NO (μM) e são representativos de seis experimentos independentes, realizados em quadruplicata. *Significância estatística em relação ao controle (Testes ANOVA e pós-teste de Bonferroni para comparações múltiplas, $p < 0,05$).

Em células RAW 264.7 estimuladas com LPS (controle positivo) houve indução da produção de NO e o tratamento das células com diferentes concentrações do extrato aquoso da *C. xanthocarpa* mostrou que em concentrações iguais ou superiores a 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$, o extrato foi capaz de induzir a produção de NO nesta linhagem celular.

Portanto, em concentrações não citotóxicas, o extrato não constituiu estímulo

suficiente para induzir a produção de NO, com exceção da concentração 125 µg/mL, a qual, embora não citotóxica, induziu produção desse mediador.

5 DISCUSSÃO

Até o presente momento, não há dados disponíveis na literatura que avaliem efeitos mitogênicos da espécie *Campomanesia xanthocarpa*. De modo geral, a proliferação celular em resposta a estímulos mitogênicos pode estar associada à ativação de receptores de superfície celular com ativação de vias de sinalização intracelulares relacionadas à replicação do DNA e divisão celular, como a via das quinases ativadas por mitógenos (*Mitogen-activated protein kinase*, MAPK) (ZHANG, W.; LIU, H. T., 2002). Além disto, o tratamento das células RAW 264.7 com o extrato da *C. xanthocarpa* pode levar à produção e liberação de compostos biologicamente ativos relacionados com a proliferação celular. Outra possibilidade que pode estar relacionada à maior viabilidade celular observada em células RAW 264.7 tratadas com a menor concentração do extrato é a inibição da apoptose. O efeito mitogênico, por sua vez, pode ser importante na reparação tecidual em diversas condições patológicas, como demonstrado em modelo experimental de mesentério perfurado em rato que a ativação de mastócitos, células residentes no tecido conjuntivo, contribuiu para a reparação tecidual (FRANZÉN, L.; GHASSEMIFAR, R.; MALCHEREK, P., 1991). Efeitos mitogênicos também podem estar associados à mutagênese. Estudos demonstraram que extratos de plantas nativas do Brasil, os quais continham flavonoides e taninos entre os seus principais metabólitos, apresentaram padrões diferentes de resposta mutagênica, desde ausência à presença desta atividade (FERNANDES DE SÁ FERREIRA, I. C., FERRÃO VARGAS, V. M., 1999; VARGAS *et al*, 1989). Neste sentido, foi demonstrada atividade mutagênica em modelos de estudo utilizando extrato aquoso da *C. xanthocarpa*.

Em contrapartida, o efeito citotóxico observado em células RAW 264.7 tratadas com as maiores concentrações do extrato pode estar relacionado à ativação celular e consequente geração de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, como demonstrados pela indução da produção de óxido nítrico pelo extrato aquoso da *Campomanesia xanthocarpa* em células RAW 264.7.

A ativação de macrófagos estimula um metabolismo gerador de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio, bem como peroxinitrito, referido na literatura como “burst”, surto ou explosão respiratória, metabólica ou oxidativa, caracterizado pelo aumento do consumo de oxigênio e de ATP (trifosfato de adenosina), aumento da oxidação da glicose pela via da hexose monofosfato, do transporte de elétrons e da geração de ROS (CASTANEDA *et al*, 2017).

A exposição de células ao estresse oxidativo causa alterações nas membranas celulares, danos ao DNA e reduz a capacidade de reparação desta macromolécula (THIRUPURASUNDARI, C. J.; PADMINI, R.; DEVARAJ, S. N. 2009). Estas espécies químicas são altamente reativas e, geralmente, resultam em degradação de proteínas, peroxidação de lipídios e oxidação do DNA. Estes eventos, por sua vez, podem estar relacionados a várias doenças crônicas, tais como, diabetes, câncer, aterosclerose desordens neurodegenerativas e inflamação (RAHMAN *et al*, 2007).

Espécies reativas de nitrogênio são geradas na cadeia respiratória mitocondrial e por meio da ação da enzima óxido nítrico sintase, de modo que a isoforma induzível desta enzima (*inducible NO synthase*, iNOS) é potencialmente induzida em resposta a estímulos pró-inflamatórios. Macrófagos são ativados por interferon- γ e produtos microbianos, como lipopolissacarídeos (LPS), levando à produção de citocinas pró-inflamatórias e altos níveis de NO. O óxido nítrico constitui um potente mediador envolvido nas funções microbicidas dos

macrófagos, tais como citotoxicidade contra patógenos intracelulares, vírus e tumores (MCNEILL *et al*, 2015).

Todavia, embora o NO, seja um importante mediador das funções exercidas pelos macrófagos, sugerimos que a citotoxicidade associada ao extrato, em suas maiores concentrações, possa estar relacionada a um mecanismo concentração dependente do NO produzido pelas células RAW 264.7. Isto se justifica pelo fato de o extrato ser capaz de induzir a produção de NO em concentração não citotóxica (125 µg/mL).

Por outro lado, a citotoxicidade do extrato também pode estar associada à presença de compostos bioativos naturalmente encontrados no extrato aquoso da *Campomanesia xanthocarpa*. Assim, os efeitos opostos observados sobre a viabilidade de células RAW 264.7 parecem estar relacionados a diferenças na concentração de substâncias citotóxicas e mitogênicas no extrato.

6 CONCLUSÃO

O extrato aquoso das folhas da *C. xanthocarpa* apresenta um efeito dual, concentração dependente, sobre a viabilidade celular, induzindo tanto citotoxicidade como estimulando a proliferação celular.

O extrato da *C. xanthocarpa* induziu a produção de óxido nítrico em células RAW 264.7 de modo dose-dependente.

O extrato da *Campomanesia xanthocarpa* parece interferir com o ciclo celular em células RAW 264.7 e, na maioria das concentrações não citotóxicas, não constitui estímulo suficiente para induzir a produção de NO.

7 REFERÊNCIAS

ABE, S. Y.; POSSAMAI, J. C.; NAKASHIMA, T. Prospecção fitoquímica, teor de flavonoides totais e capacidade antioxidante de *Campomanesia xanthocarpa* Mart. ex O. Berg (MYRTACEAE). **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 11, n. 2, p. 14, 2014.

AUHAREK, S. A. *et al.* Reproductive toxicity of *Campomanesia xanthocarpa* (Berg.) in female Wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 148, n. 1, p. 341-343, 2013.

BERNARDES, R. S. *et al.* Efeito de extrato aquoso de *Campomanesia xanthocarpa* sobre o ciclo de vida da traça das crucíferas (*Plutella xylostella*)(L.)(lepidoptera: plutellidae). **Cadernos de Agroecologia**, v. 11, n. 2, 2017.

BRANDELLI, C. L. C. *et al.* Remarkable anti-*Trichomonas vaginalis* activity of plants traditionally used by the Mbyá-Guarani indigenous group in Brazil. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

CASSINI-VIEIRA, P. *et al.* iNOS activity modulates inflammation, angiogenesis, and tissue fibrosis in polyether-polyurethane synthetic implants. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, 2015.

CASTANEDA, O. A. *et al.* Macrophages in oxidative stress and models to evaluate the antioxidant function of dietary natural compounds. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 25, n. 1, p. 111-118, 2017.

DALANHOL, S. J. *et al.* Efeito de micorrizas e da fertilização no crescimento de mudas de *Campomanesia xanthocarpa* (mart.) O. Berg., produzidas em diferentes substratos. **Ciência Florestal**, v. 27, n. 3, 2017.

DE SOUZA, C. N. *et al.* Atividade antimicrobiana de plantas medicinais do cerrado mineiro frente a bactérias isoladas de ovinos com mastite. **Unimontes Científica**, v. 19, n. 2, p. 51-61, 2017.

FERNANDES DE SÁ FERREIRA, I. C.; FERRÃO VARGAS, V. M. Mutagenicity of medicinal plant extracts in *Salmonella*/microsome assay. **Phytotherapy Research**, v. 13, n. 5, p. 397-400, 1999.

FERREIRA, D. de F. *et al.* Characterization of odor-active compounds in gabioba fruits (*Campomanesia xanthocarpa* O. Berg). **Journal of Food Quality**, v. 39, n. 2, p. 90-97, 2016.

FRANZÉN, L.; GHASSEMIFAR, R.; MALCHEREK, P. Experimental mast cell activation improves connective tissue repair in the perforated rat mesentery. **Agents and Actions**, v. 33, n. 3-4, p. 371-377, 1991.

FUNK, C. D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. **Science**, v. 294, n. 5548, p. 1871-1875, 2001.

GASPARRINI, M. *et al.* Anti-inflammatory effect of strawberry extract against LPS-induced stress in RAW 264.7 macrophages. **Food and Chemical Toxicology**, v. 102, p. 1-10, 2017.

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

HWANG, S. J. *et al.* Anti-inflammatory effects of chlorogenic acid in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. **Inflammation Research**, v. 63, n. 1, p. 81-90, 2014.

KATAOKA, V. M. F.; CARDOSO, C. A. L. Avaliação do perfil cromatográfico obtidos por CLAE-DAD e da atividade antioxidante das folhas de espécies *Campomanesia sessiliflora* (O. Berg) Mattos e *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 1, p. 121-129, 2013.

KAUR, S.; MONDAL, P. Study of total phenolic and flavonoid content, antioxidant activity and antimicrobial properties of medicinal plants. **Journal of Microbiology & Experimentation**, v. 1, n. 1, p. 00005, 2014.

KLAFKE, J. Z. *et al.* Effects of *Campomanesia xanthocarpa* on biochemical, hematological and oxidative stress parameters in hypercholesterolemic patients. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, n. 2, p. 299-305, 2010.

LEYVA-LÓPEZ, N. *et al.* Protective role of terpenes and polyphenols from three species of Oregano (*Lippia graveolens*, *Lippia palmeri* and *Hedeoma patens*) on the suppression of lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW 264.7 macrophage cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 187, p. 302-312, 2016.

MCNEILL, E. *et al.* Regulation of iNOS function and cellular redox state by macrophage Gch1 reveals specific requirements for tetrahydrobiopterin in NRF2 activation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 79, p. 206-216, 2015.

MENDES, R. M. *et al.* Determinação dos compostos bioativos da gabioba. **Agrarian**, v. 11, n. 39, p. 68-72, 2018.

MENEGUELLI, A. Z. *et al.* A utilização de plantas medicinais e fitoterápicos na saúde pública brasileira. **Revista Enfermagem e Saúde Coletiva-REVESC**, v. 1, n. 1, 2018.

MOREIRA, G. A. M.; SPERANDIO, E. M.; DO VALE, H. M. M. Leveduras associadas a frutos de plantas nativas do Cerrado: *Eugenia lutescens* Cambess, *Campomanesia xanthocarpa* (Mart.) O. Berg e *Brosimum guadichaudii* Tréc. **Revista de Biologia Neotropical**, v. 12, n. 2, p. 104-111, 2016.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n 1-2, p. 55-63, 1983.

OMS. Organização Mundial de Saúde. **Estratégia sobre Medicina Tradicional: 2014-2023**. <http://www.who.int/medicines/publications/traditional/trm_strategy14_23/en/>. Acesso em: 11 de julho de 2018.

PADILLA, M. A. *et al.* In vitro antiviral activity of Brazilian Cerrado plant extracts against animal and human herpesviruses. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 12, n. 10, p. 106-115, 2018.

PASTORI, T. *et al.* Genotoxic effects of *Campomanesia xanthocarpa* extracts on *Allium cepa* vegetal system. **Pharmaceutical Biology**, v. 51, n. 10, p. 1249-1255, 2013.

PEREIRA, M. C. *et al.* Nanoencapsulation of hydrophobic phytochemicals using poly (DL-lactide-co-glycolide)(PLGA) for antioxidant and antimicrobial delivery applications: Guabiroba fruit (*Campomanesia xanthocarpa* O. Berg) study. **LWT-Food Science and Technology**, v. 63, n. 1, p. 100-107, 2015.

RAHMAN, K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. **Clinical Interventions in Aging**, v. 2, n. 2, p. 219, 2007.

RASCHKE, W. C. *et al.* Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. **Cell**, v. 15, n. 1, p. 261-267, 1978.

SANT'ANNA, L. S. *et al.* Chemical composition and hypotensive effect of *Campomanesia xanthocarpa*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, 2017.

SERAFINI, M.; PELUSO, I.; RAGUZZINI, A. Flavonoids as anti-inflammatory agents. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 69, n. 3, p. 273-278, 2010.

SOARES, D. J. *et al.* Atividade antiinflamatória de frutas. **Saúde em Revista**, v. 15, n. 39, p. 33-45, 2015.

THIRUPURASUNDARI, C. J.; PADMINI, R.; DEVARAJ, S. N. Effect of berberine on the antioxidant status, ultrastructural modifications and protein bound carbohydrates in azoxymethane-induced colon cancer in rats. **Chemico-Biological Interactions**, v. 177, n. 3, p. 190-195, 2009.

VALLILO, M. I. *et al.* Composição química dos frutos de *Campomanesia xanthocarpa* Berg-Myrtaceae. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. suppl 0, p. 231-237, 2008.

VARGAS, V. M. F. *et al.* Estudo de atividade mutagênica de extratos vegetais com uso em medicina popular. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 70, n. 3, p. 1-3, 1989.

VERRI, A. M.; MOURA, A de A.; DE MOURA, V. M. Testes citogenéticos na avaliação da genotoxicidade de produtos naturais provindos de plantas medicinais. **Revista Uningá Review**, v. 30, n. 1, 2018.

ZHAN, R. *et al.* Polysaccharide isolated from Chinese jujube fruit (*Zizyphus jujuba* cv. *Junzao*) exerts anti-inflammatory effects through MAPK signaling. **Journal of Functional Foods**, v. 40, p. 461-470, 2018.

ZHANG, W.; LIU, H. T. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. **Cell Research**, v. 12, n. 1, p. 9, 2002.