

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

**Avaliação da viabilidade celular e produção de óxido nítrico em  
células RAW 264.7 tratadas com extrato aquoso das folhas da  
*Eugenia dysenterica***

**Vitor Hugo Sanchez Silva**

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

Uberlândia – MG  
julho/2019

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

**Avaliação da viabilidade celular e produção de óxido nítrico em  
células RAW 264.7 tratadas com extrato aquoso das folhas da  
*Eugenia dysenterica***

**Vitor Hugo Sanchez Silva**

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

Orientador: Profa. Dra. Celene Maria de Oliveira Simões Alves

Uberlândia – MG  
julho/2019

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

**Avaliação da viabilidade celular e produção de óxido nítrico em  
células RAW 264.7 tratadas com extrato aquoso das folhas da  
*Eugenia dysenterica***

**Vitor Hugo Sanchez Silva**

Profa. Dra. Celene Maria de Oliveira Simões Alves

Orientador

Instituto de Ciências Biomédicas

Prof. Dr. Edgar Silveira Campos

Coordenador do Curso de Graduação em Biotecnologia

Uberlândia – MG  
Julho /2019

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

**Avaliação da viabilidade celular e produção de óxido nítrico em  
células RAW 264.7 tratadas com extrato aquoso das folhas da  
*Eugenia dysenterica***

**Vitor Hugo Sanchez Silva**

Aprovado pela Banca Examinadora em: 16/07/2019

## *Agradecimentos*

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação (PROPP) / UFU.

## RESUMO

A *Eugenia dysenterica* é uma espécie vegetal nativa do Cerrado brasileiro, pertencente à família Myrtaceae. Estudos fitoquímicos demonstraram que essa espécie produz, dentre os metabólitos secundários, flavonoides e taninos, os quais podem ser encontrados em suas folhas e possuem atividades anti-inflamatórias. Contudo, até o presente momento, existem poucos estudos sobre o potencial anti-inflamatório da referida espécie. Assim, o presente estudo investigou possíveis efeitos do extrato aquoso das folhas da *Eugenia dysenterica* sobre a viabilidade celular e a capacidade de produção de mediadores inflamatórios em células da linhagem *macrophage-like* RAW 264.7. As células foram tratadas com diferentes concentrações do extrato durante 24 horas. Em seguida, a viabilidade celular foi avaliada por meio do método de conversão do azul de tiazolil (MTT) e a produção de óxido nítrico (NO) foi quantificada nos sobrenadantes das culturas pelo método de Griess. Os níveis da citocina IL-12 foram mensurados por ELISA em sobrenadantes das culturas de células RAW 264.7 tratadas por seis horas com o extrato. Os dados obtidos mostraram que não houve redução da viabilidade celular em todas as concentrações utilizadas do extrato. Ao contrário, em células tratadas com as concentrações intermediárias (31,25 e 62,5 µg/mL) foi observado aumento da viabilidade celular ( $P < 0,05$ ). Portanto, o extrato aquoso das folhas da *Eugenia dysenterica* apresentou um efeito concentração - dependente estimulando a proliferação celular. Nas mesmas concentrações, foi detectada secreção da citocina IL-12. Este efeito pode estar relacionado à presença de substâncias mitogênicas no extrato. Macrófagos ativados expressam a sintase do óxido nítrico induzível (iNOS) e produzem NO, um importante mediador inflamatório; contudo, o extrato não foi capaz de estimular a produção de NO. Assim, apesar de não interferir com a produção de NO, os efeitos mitogênicos do extrato aquoso das folhas da *Eugenia dysenterica* sugerem um possível efeito imunomodulador, cuja natureza pró ou anti-inflamatória merece ser investigada.

**Palavras-chave:** Myrtaceae; Citotoxicidade; Macrófagos.

## SUMÁRIO

1 Introdução.....	8
1.1 Plantas medicinais.....	8
1.2 <i>Eugeniadysentericae</i> metabólitos secundários.....	8
1.3 Inflamação e óxido nítrico.....	11
1.4 Linhagemcelular <i>macrophage-like</i> RAW 264.7.....	12
2 Justificativa.....	13
3 Objetivos.....	14
3.1 Objetivos gerais.....	14
3.2 Objetivos específicos.....	14
4 Metodologia.....	15
4.1 Local de execução.....	15
4.2 Material vegetal.....	15
4.3 Obtenção do extrato aquoso.....	16
4. 4 Cultura de células <i>macrophage-like</i> RAW 264.7.....	16
4.5 Avaliação da viabilidade celular pelo método de conversão do azul de Tiazolil .....	16
4.6 Dosagem óxido nítrico em sobrenadantes de cultura de macrófagos da linhagem <i>macrophage-like</i> RAW 246.7.....	17
4.7 Determinação de citocina.....	18
4.8 Análise estatística .....	18
5 Resultados.....	19
5.1 Avaliação do efeito do extrato aquoso da <i>E. dysenterica</i> sobre a viabilidade de células RAW 264.....	19
5.2 Produção de óxido nítrico (NO) em células RAW 264.7 tratadas com o extrato aquoso da <i>E. dysenterica</i> .....	20
5.3 Efeito do extrato aquoso de <i>E. dysentericas</i> sobre a produção de citocina IL-12 por células RAW 264.7 .....	22
6 Discussão.....	23
7 Conclusão.....	25
Referências.....	26

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 PLANTAS MEDICINAIS

Desde a antiguidade, plantas e produtos delas derivados são usados no tratamento e na cura de enfermidades. De acordo com a OMS (Organização Mundial de Saúde), plantas medicinais são espécies vegetais, cultivadas ou não, utilizadas com propósitos terapêuticos (OMS, 2003). A planta fresca é aquela coletada no momento de uso, enquanto a planta seca é aquela precedida de secagem, equivalendo, portanto, à droga vegetal. Ainda hoje, plantas com propriedades terapêuticas são comercializadas em feiras, mercados populares e encontradas em quintais residenciais em todo o mundo. Mesmo com o avanço tecnológico da medicina moderna em grande parte do mundo, a OMS reconhece que grande parte da população dos países em desenvolvimento ainda depende da utilização de práticas medicinais tradicionais para promover o bem-estar da saúde pública em geral (POLÍTICA NACIONAL DE PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS, 2016).

O estudo das plantas medicinais, a partir de seu emprego por uma dada população, constitui uma ferramenta útil para a descoberta de novos compostos bioativos com potencial aplicação como agentes terapêuticos em diferentes condições patológicas. As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das propriedades terapêuticas de diferentes espécies de vegetais, de modo que a medicina popular oferece uma contribuição cada vez maior às ciências, especialmente na área da farmacologia (AMOROZO, 1996). Neste sentido, o uso de plantas medicinais e a medicina tradicional direcionam a criação de novas tecnologias e medicamentos para investigações científicas, já que esse conhecimento tradicional foi construído ao longo de anos por meio da interação humana com a natureza, de forma experimental no ambiente em que determinada flora se desenvolveu (REZENDE, 2005).

### 1.2 *EUGENIA DYSENTERICA* e metabólitos secundários

Popularmente conhecida como cagaita ou cagaiteira, a *Eugenia dysenterica* é uma espécie da família *Myrtaceae*, nativa do cerrado brasileiro. A cagaita pode chegar até 10 metros de altura e o tronco possui casca grossa, tortuosa e fissurada. O fruto tem formato globoso, cor amarelo-clara, é bacáceo, ligeiramente ácido, epicarpo membranoso e pode ser consumido *in natura* ou processado em outros produtos, tais como licor, sorvete, sucos e



geleias (SILVA 2001). Com relação ao conteúdo de alguns nutrientes, o fruto contém vitamina C em maior quantidade (18,28 mg/100g) maior que a banana Cavendish madura e maçã argentina (6,4 e 5,9 mg/100g respectivamente); maior conteúdo de ácido linoléico que azeitona, dendê e coco e ácido linolênico também se encontra em concentrações maiores do que aquelas encontradas no milho, girassol, amendoim, soja. Além disso, a cagaita tem alto potencial de industrialização devido a sua alta acidez, baixo valor de lipídeos e carboidratos (DA SILVA 2017).

De modo geral, as folhas, cascas e frutos da cagaita apresentam propriedades medicinais e são usados popularmente para tratar diabetes, icterícia e diarreia. Neste sentido, as ações farmacológicas da cagaita têm sido atribuídas à presença de vários metabólitos secundários (ZUNINGA, 2018).

O conjunto das reações bioquímicas, vias catabólicas e anabólicas, que ocorrem nas células de todos os seres vivos é denominado de metabolismo. As plantas por meio do metabolismo primário produzem energia e renovam biomoléculas necessárias para a síntese de compostos complexos, tais como, celulose, lignina, proteínas, lipídeos, açúcares e outras substâncias importantes para a realização das funções vitais (PEREIRA, CARDOSO, 2012). Todavia, além do metabolismo primário, as plantas possuem o metabolismo secundário, o qual assegura a síntese de compostos quimicamente e funcionalmente diversos, os metabólitos secundários.

Os metabólitos secundários, geralmente de estrutura complexa e baixo peso molecular, ocorrem em baixas concentrações, são variáveis entre as espécies vegetais e várias propriedades biológicas, tais como, ações farmacológicas e terapêuticas como antifúngicas, antivirais, antibióticas, ações tóxicas a outras espécies vegetais e animais como herbicidas e inseticidas, além de fornecerem essências para perfumes e matéria-prima para corantes (FUMAGALI, 2008; GARCÍA, CARRIL, 2009; PEREIRA, CARDOSO, 2012).

Dentre os metabólitos secundários, muitas espécies vegetais produzem polifenóis, como os flavonóides. Estes são os polifenóis mais abundantes e, em geral, possuem propriedades anti-inflamatórias, com variados mecanismos. Os mecanismos moleculares envolvidos nas atividades anti-inflamatórias dos flavonóides incluem, por exemplo, inibição de enzimas pró-inflamatórias, tais como as enzimas ciclooxigenase-2 (COX-2), lipoxigenase e óxido nítrico sintase induzível (iNOS). Além disto, flavonóides foram observados inibir a expressão de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- $\alpha$ , IL 1- $\beta$ , IL-6, IL-8 e MCP-1 (*monocyte-chemoattractant protein-1*), em diferentes tipos celulares, tais

como macrófagos RAW, células T Jurkat e células mononucleares do sangue periférico. A inibição dos fatores de transcrição NF- $\kappa$ B e AP-1 e de MAPKs (proteínas quinases ativadas por mitógenos) têm sido apontados como possíveis mecanismos moleculares envolvidos na ação moduladora dos flavonóides sobre a atividade de citocinas. Assim, os flavonoides mostram atuar sobre diversos alvos na regulação de um processo inflamatório. Por isso, essa subclasse de polifenóis é provavelmente responsável pela atividade anti-inflamatória de alimentos vegetais (SERAFINI et al., 2010).

Os taninos são polifenóis de alto peso molecular, e podem formar ligações de hidrogênio dentro e fora das células e são capazes de interagir com macromoléculas como proteínas e carboidratos. Podem ser classificados em dois grupos, hidrolisáveis e condensados. Os hidrolisáveis são ácidos fracos e se decompõem em substâncias irritantes e hepatotóxicas. Os taninos condensados, também conhecidos como proantocianidinas, são a classe mais abundante de polifenóis em plantas. Esses compostos são de natureza polimérica e de alta complexidade. Recentemente, estudos mostraram que as proantocianidinas e seus monômeros possuem potenciais efeitos imunomoduladores e anti-inflamatórios, por meio da inibição de citocinas pró-inflamatórias, anticancerígenos, antioxidantes, cardioprotetores e propriedades antitrombóticas. Apesar de serem usados como suplementos nutricionais, há poucos indicadores sobre sua potencial toxicidade em longo prazo (PARK, 2013; SMERIGLIO, 2016).

Análises fotoquímicas demonstraram a presença de vários metabólitos secundários em *E. dysenterica*. Sesquiterpenos foram identificados nas folhas, enquanto compostos polifenólicos, tais como catequinas, quercetina, epicatequinas e procianidina B-1, foram identificados em extrato aquoso, etanólico e metanólico das folhas (COSTA et al., 2000; DUARTE et al., 2010; VILELA et al., 2012; PRADO et al., 2014).

Neste sentido, constam na literatura, vários estudos descrevendo ações biológicas da *E. dysenterica*, as quais foram atribuídas aos metabólitos secundários encontrados na referida espécie. Dentre essas, temos atividades anti-helmíntica (GASPAR, 2010), antidiarreica (LIMA, 2011), laxativa (LIMA., 2010), antiviral (CECÍLIO., 2012), genotóxica (VIEIRA, 2012), antioxidante (ALMEIDA, 2013; GENOVESE., 2008; SOUZA, 2012), gastroprotetora (Prado et al., 2014), antifúngica (COSTA., 2000; SOUZA, 2002), emoluscocida (BEZERRA, 2002), além de atividade inibitória da  $\alpha$ -amilase (Souza et al., 2012b),  $\alpha$ -glicosidase (SOUZA, 2012). Catequinas e quercetina são flavonoides com potente ação antioxidante (DAS, 2014). Dados da literatura sugerem que a *E. dysenterica* é capaz de neutralizar citocinas pró-inflamatórias e exibir atividade anti-inflamatória *in vitro*

provavelmente devido às suas altas concentrações de sesquiterpenos, como  $\beta$ -cariofileno e  $\alpha$ -humuleno. Essa atividade farmacológica é baseada na inibição das interleucinas (ILs): IL-2, IL-10, IL-1  $\beta$  e TNF  $\alpha$ , assim como da histamina (MAZUTTI et al., 2018).

### 1.3 INFLAMAÇÃO E ÓXIDO NÍTRICO

O processo que ocorre em resposta a algum dano tecidual, presença de patógeno ou agente estranho, seja biológico, físico ou químico é chamado de inflamação. E sua principal função é restaurar a homeostase tecidual eliminando ou isolando a fonte do desequilíbrio. Quando a reação inflamatória se torna desarmônica e seus mediadores são produzidos em excesso, isso pode causar doenças como artrite, aterosclerose e câncer. Logo, regular a superprodução desses mediadores é um importante tratamento de doenças relacionadas à inflamação (LEYVA 2016).

A inflamação é dividida em aguda e crônica. A inflamação aguda corresponde ao processo inicial de resposta à lesão tecidual, caracterizada por aumento de permeabilidade vascular e migração de leucócitos. Mediadores da inflamação como óxido nítrico (NO), prostaglandina E<sub>2</sub>, e citocinas pró-inflamatórias estão diretamente ligados aos sintomas clássicos da inflamação aguda como dor, vermelhidão, calor, inchaço e perda de função (HWANG 2013). Quando a resposta ao dano tecidual ou agente estranho ocorre de maneira descontrolada e persistente, o resultado é o excesso de dano celular e tecidual que acarreta a inflamação crônica e destruição do tecido normal (LEE, YANG, 2013). A inflamação crônica pode induzir doenças cardiovasculares, auto-imunes, neurológicas, pulmonares, câncer, artrite, diabetes tipo 2 (HWANG 2013). O extravasamento de células do sistema imune inato, especialmente macrófagos e neutrófilos, é característico da inflamação aguda, enquanto de linfócitos T e células plasmáticas é típico da inflamação crônica (FERRERO-MILIANI, 2006).

O NO é produzido pela NO sintase, a qual possui três isoformas: NO sintase neuronal (nNOS), endotelial (eNOS), e induzida (iNOS) (CASSINI-VIEIRA et al.; 2015). A síntese de NO requer o aminoácido L-arginina como substrato para a enzima iNOS. Endotoxinas bacterianas, como o LPS (lipopolissacarídeo) e citocinas podem estimular a síntese de NO em células inflamatórias. Estudos da literatura têm descrito a importância do NO em várias etapas de um processo inflamatório. A produção de NO via iNOS diminui a ativação e adesão leucocitária em células endoteliais microvasculares intestinais humanas e a expressão reduzida de iNOS contribui para a inflamação crônica relacionada à doença intestinal inflamatória (BINION, et al.; 2000). A ausência da enzima iNOS também foi

associada a acentuada resposta inflamatória em camundongos submetidos a implantação subcutânea de matriz sintética de poliuretano-poliéster (CASSINI-VIEIRA et al., 2015).

A expressão de citocinas pró-inflamatórias é regulada pelo fator de nuclear kB (NF-kB), que em condições normais se encontra ligado ao inibidor IκB. Sob a ação de um estímulo inflamatório, o inibidor é fosforilado e degradado por proteossomos. Em seguida, o NF-kB migra ao núcleo e regula a transcrição de genes que codificam a expressão de citocinas pró-inflamatórias. Portanto, qualquer agente que consiga interromper esse processo é candidato a um potencial medicamento contra a inflamação aguda ou crônica (HWANG 2013).

A citocina IL-12 é predominantemente produzida por células dendríticas, monócitos e macrófagos após reconhecimento de estruturas patogênicas via receptores Toll-like e outros. IL-12 induz a produção de IFN- $\gamma$ , a diferenciação de linfócitos T auxiliares em perfil Th1 (T *helper*1) e relaciona as imunidades inata e adaptativa (GUAN, ZHANG, 2017).

#### **1.4 LINHAGEM CELULAR *MACROPHAGE LIKE RAW 264.7***

A linhagem celular *macrophage-like RAW 264.7* é frequentemente usada para estudos para avaliar atividade biológica de extratos naturais (MERLY, 2017). Os macrófagos são as células responsáveis por grande parte das respostas inflamatórias, pois uma vez ativados expressam fatores diretamente ligados a oxidação e respostas inflamatórias. Desta maneira, essa linhagem celular constitui um modelo adequado para investigação *in vitro* de atividades inflamatórias / anti-inflamatórias.

Um importante agente inflamatório é a endotoxinalipopolissacarídeo (LPS), estrutura encontrada na parede células de bactérias gram-negativas e apresenta-se como fator de virulência. Assim, o LPS induz a produção de várias citocinas pró-inflamatórias. A linhagem RAW 264.7, sob estímulo de LPS produz fatores relacionados à inflamação (GASPARRINI 2017).

## 2 JUSTIFICATIVA

A espécie *E. dysenterica*, popularmente conhecida como cagaita produz, dentre os metabólitos secundários, flavonóides e taninos, à semelhança de muitas outras espécies vegetais. Estudos da literatura têm demonstrado que esses compostos apresentam atividades anti-inflamatórias. Assim, tornou-se relevante investigar possíveis ações farmacológicas anti-inflamatórias nessa importante espécie do Cerrado brasileiro, dados ainda pouco investigados. Neste sentido, este estudo poderá contribuir para fornecer subsídios para a utilização da *E. dysenterica* na produção de novos medicamentos úteis no tratamento de doenças inflamatórias. Ademais, estudos visando à descoberta de novos agentes terapêuticos de origem vegetal, como a presente proposta de trabalho podem contribuir com a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, aprovada por meio do decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006, a qual estabelece diretrizes para o desenvolvimento de ações voltadas à garantia do acesso seguro e uso racional de plantas medicinal e fitoterápico em nosso país, ao desenvolvimento de tecnologias e inovações, assim como ao uso sustentável da biodiversidade brasileira (POLÍTICA NACIONAL DE PLANTAS MEDICINAL E FITOTERÁPICO, 2006).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a viabilidade celular e produção de mediadores anti-inflamatórios do extrato aquoso das folhas da espécie vegetal *Eugenia dysenterica*, utilizando modelo experimental *in vitro* de células *macrophage-like* RAW 264.7.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar o extrato aquoso das folhas da *Eugenia dysenterica*;
- Analisar viabilidade celular de células da linhagem *macrophage-like* RAW 264.7 tratadas com diferentes concentrações do extrato aquoso da *Eugenia dysenterica*;
- Quantificar a citocina (IL-12) produzida por macrófagos da linhagem *macrophage-like* RAW 264.7 tratados com o extrato aquoso da *Eugenia dysentericae* estimuladas ou não com LPS;
- Quantificar óxido nítrico (NO) em sobrenadantes de cultura de macrófagos da linhagem *macrophage-like* RAW 246.7 tratados com o extrato aquoso da *E. dysenterica*.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 LOCAL DE EXECUÇÃO

Os experimentos foram realizados nos laboratórios de pesquisa dos Departamentos de Farmacologia (Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais), Biofísica (Laboratório de Biologia Molecular e Celular) e Imunologia (Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica), do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM), da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

### 4.2 MATERIAL VEGETAL

Neste estudo, investigamos possíveis propriedades biológicas do extrato aquoso das folhas da *E. dysenterica*. Para a realização de pesquisas utilizando o derivado vegetal da referida espécie, previamente, uma amostra da *E. Dysenterica* (**Figura 1**) foi coletada em campo de vegetação espontânea e, em seguida, identificada por biólogo qualificado. Posteriormente, uma exsicata (amostra prensada e dessecada) foi depositada no herbário da Universidade Federal de Uberlândia (No de Registro: HUFU-45956).



**Figura 1:** *Eugenia dysenterica*/ Cagaiteira (fonte: Canabrava, H. A. N., 2017). Origem: Fazenda Pasto Velho, Lassance, MG. Latitude mínima: 0° 0' 0" S; Longitude mínima: 0° 0' 0" W. Árvore com, aproximadamente, 2,5 m de altura e com frutos imaturos no momento da coleta da exsicata.

### 4.3 OBTENÇÃO DO EXTRATO AQUOSO

Para obtenção do extrato aquoso, as folhas foram isoladas dos galhos e lavadas em água corrente e, em seguida, em água destilada. Após a lavagem, as folhas foram colocadas em estufa a 45 °C por dois dias para secagem completa. Em seguida, foram trituradas em liquidificador, para realizar a extração, colocadas em provetas contendo água destilada na concentração de 20% (m/v) por 48 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, o extrato foi filtrado duas vezes, primeiro em funil com algodão e, em seguida, em funil contendo papel de filtro. O extrato obtido foi colocado em tubos falcon de 50 mL e mantido à temperatura -20° C. Após o congelamento, os extratos foram liofilizados (processo de desidratação) a -40 °C até a total remoção do conteúdo de água e o material adquirido foi pesado e acondicionado em freezer a - 20 °C até a utilização.

### 4.4 CULTURA DE CÉLULAS *macrophage-like* RAW 264.7

Foram utilizadas células, macrófagos murinos da linhagem *macrophage-like* RAW 246.7, habitualmente armazenadas em tanque nitrogênio líquido. No momento do uso, as células foram descongeladas à temperatura ambiente e adicionadas a tubo falcon com 10 mL de meio RPMI incompleto (sem SFB, soro fetal bovino). Em seguida, as células foram centrifugadas por 5 minutos, 1000g, 4°C. O sedimento foi ressuspensionado em 5mL de meio RPMI contendo SFB a 10% (meio completo, RPMI-SFB). As células foram, então, cultivadas em frascos de 25 cm<sup>2</sup> em meio RPMI 1640 suplementado com 25 mM de HEPES, 2mM de L-glutamina, 3 mM de bicarbonato de sódio, antibióticos (penicilina G a 100 U/mL e estreptomicina a 100 µg) (Sigma ChemicalCo., St Louis, MO, EUA) e 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, Brasil) inativado a 56°C por 30 minutos, e incubadas em atmosfera úmida de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. A manutenção foi feita por passagens seriadas, utilizando-se *cell scraper*, a cada dois dias com troca do meio RPMI-SFB.

### 4.5 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO DE CONVERSÃO DO AZUL DE TIAZOLIL (MTT)

A viabilidade dos macrófagos murinos da linhagem *macrophage-like* RAW 246.7 foi analisada por ensaio de MTT (tetrazólio de metiltiazol) (MOSMANN, 1983). As células foram retiradas dos frascos de cultura, usando-se o cell scraper, e centrifugadas a 500g/ 5 minutos/4 °C. Em seguida, as células foram ressuspensionadas em 10 mL de meio RPMI completo. O número de células viáveis por mL foi determinado por contagem em câmara de Neubauer usando-se o corante vital Azul de Tripam. Os macrófagos



( $2 \times 10^4$  células/100  $\mu$ L/poço) foram cultivados em placas de 96 poços durante 24 horas em atmosfera úmida de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Após a remoção do meio de cultura, as células foram tratadas com o extrato aquoso da *E. dysenterica*, nas concentrações: 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.812, 3.9, 1.953  $\mu$ g/mL e mantidas overnight a mantidas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Células não tratadas com o extrato constituíram o grupo controle de viabilidade igual a 100%. Em seguida, o meio foi removido e as células foram pulsadas com 100  $\mu$ L/poço de MTT (Sigma Chemical Co.) a 0,5 mg/mL e mantidas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> por 4 horas. Partículas insolúveis de coloração roxa (cristais de formazan) produzidas por células viáveis que metabolizaram o reagente MTT foram solubilizadas com 100  $\mu$ L/poço de DMSO. Após 30 minutos de solubilização, os resultados foram determinados pela leitura de D.O. (densidade óptica) em comprimento de onda igual a 570 nm ( $\lambda = 570$  nm), em um leitor de placas (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, McLean, EUA).

#### **4.6 DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) EM SOBRENADANTES DE CULTURA DE MACROFÁGOS DA LINHAGEM *macrophage-like* RAW 246.7**

A dosagem de NO foi determinada em sobrenadante de cultura de células *macrophage-like* RAW 246.7 pelo método de Griess (GREEN et al.;1982). As células em meio RPMI-SFB foram adicionadas a placas de cultura de 96 poços ( $1 \times 10^6$  células/poço/200  $\mu$ L) e incubadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. Em seguida, o meio de cultura foi removido e as células foram tratadas com o extrato aquoso da *E. dysenterica* (500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.812, 3.9, 1.953  $\mu$ g/mL). Células não tratadas com o extrato ou estimuladas com LPS de *Escherichia coli* (Lipopolysaccharides from *Escherichia coli* O55:B5, Sigma) dissolvido em solução salina (NaCl 0,9% estéril) 1  $\mu$ g/mL e zimosan (concentração de zimosan: 5 x n° de células/poço) constituíram os grupos controles negativo (produção basal) e positivo de produção de NO, respectivamente. Após os tratamentos, as células foram novamente mantidas durante 24 horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, 100  $\mu$ L do sobrenadante de cada poço foram coletados, adicionados a microplacas de 96 poços e acrescentados de 100  $\mu$ L da solução de Griess. Os resultados foram determinados pela leitura de D.O. (densidade óptica) a 570 nm, em um leitor de placas (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, McLean, EUA) e o óxido nítrico produzido foi quantificado por comparação a uma curva padrão construída com concentrações de nitrito crescentes de 1,6 a 200  $\mu$ M.

#### 4.7 DETERMINAÇÃO DE CITOCINA

A citocina IL-12 produzida por macrófagos da linhagem *macrophage-like RAW 264.7* foi quantificada em sobrenadantes das culturas. As células foram adicionadas a placas de cultura 96 poços ( $1 \times 10^6$  células/poço/200 $\mu$ L) e incubadas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> *overnight*. Em seguida, as células foram tratadas com as concentrações 31,25 e 62,5  $\mu$ g/mL do extrato aquoso da *E. dysenterica* e mantidas por seis horas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, os sobrenadantes foram coletados de poços independentes, em quadruplicata, e armazenados a -70 °C para posterior determinação da citocina IL-12.

A dosagem da citocina IL-12 foi realizada pela técnica de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) tipo *sandwich*, seguindo-se o protocolo recomendado pelo fabricante (BD OptEIA™ Mouse IL-12(p40) ELISA set).

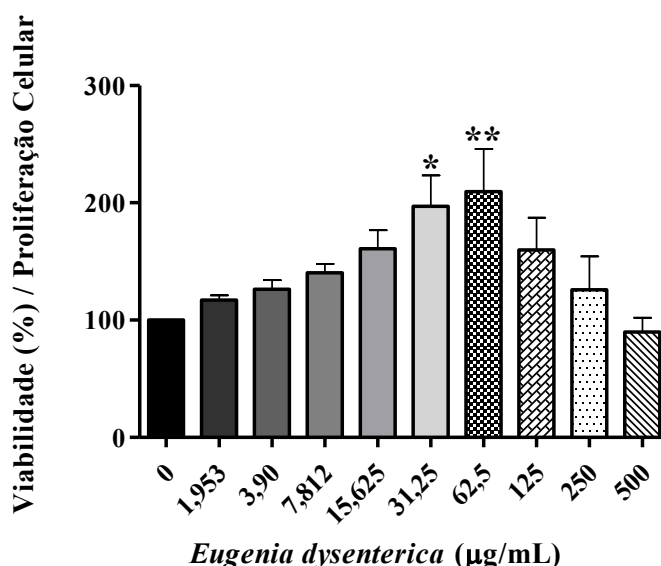
#### 4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O programa GraphPadPrism versão 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, EUA) foi usado para os cálculos estatísticos necessários. Os dados foram expressos como a média  $\pm$  S.E.M (erro padrão da média). Foram utilizados os testes *t* de Student ou ANOVA, seguido do teste de comparação múltipla de Dunnett, quando apropriado. Todos os resultados foram considerados significativos para um nível de  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Avaliação do efeito do extrato aquoso da *E. dysenterica* sobre a viabilidade de células RAW 264.7

A viabilidade celular foi avaliada usando o método de conversão de MTT (**Figura 2**). O extrato aquoso de *E. dysenterica* não apresentou efeitos citotóxicos sobre as células RAW 264.7. Ao contrário, os resultados obtidos sugerem efeito proliferativo dose - dependente como demonstrado pela maior viabilidade nas células tratadas com as concentrações 31,25 e 62,5  $\mu\text{g/ml}$  do extrato.

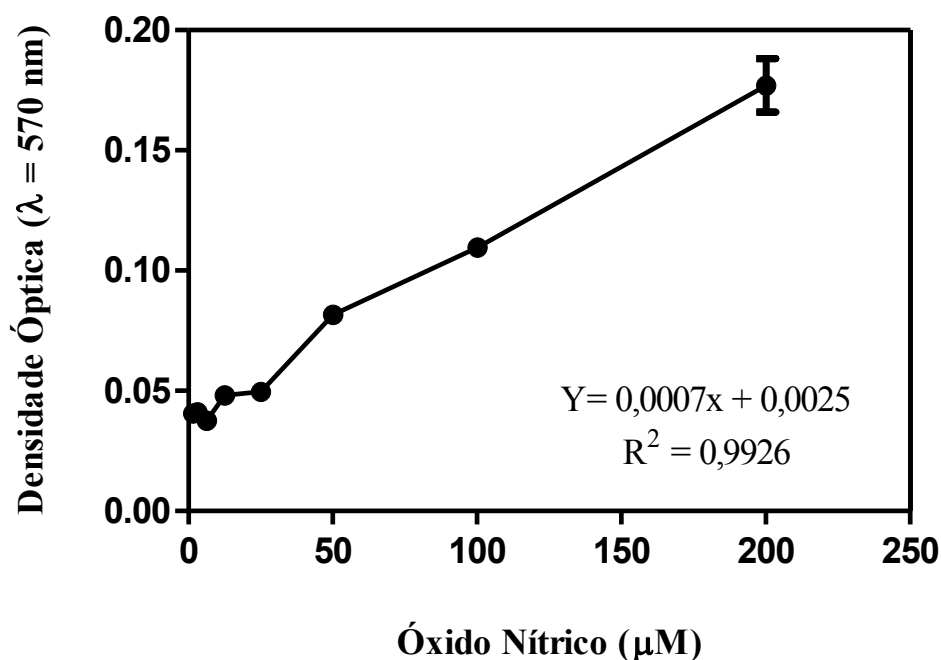


**Figura 2. Viabilidade celular de células RAW 264.7 tratadas com o extrato aquoso da *Eugenia dysenterica*.** Células *macrophage-like* RAW 264.7 ( $2 \times 10^4$  células/200  $\mu\text{L}$ /poço) foram cultivadas em placas de 96 poços a 37 °C e 5% de  $\text{CO}_2$  durante 24 horas e tratadas com diferentes concentrações do extrato aquoso da *Eugenia dysenterica* por 24 horas. Células não tratadas com o extrato (concentração = 0  $\mu\text{g/mL}$ ) constituíram o grupo controle negativo. A viabilidade celular foi analisada usando o método de conversão de MTT (tetrazólio de metiltiazol). Os dados estão expressos como média  $\pm$  S.E.M. de quatro experimentos independentes, realizados em quadruplicata. As comparações entre as médias de diferentes concentrações do extrato e controle foram analisadas utilizando-se ANOVA, seguido do teste de Dunnett para comparações múltiplas (\* $p < 0,05$ ; \*\*  $< 0,01$ ).

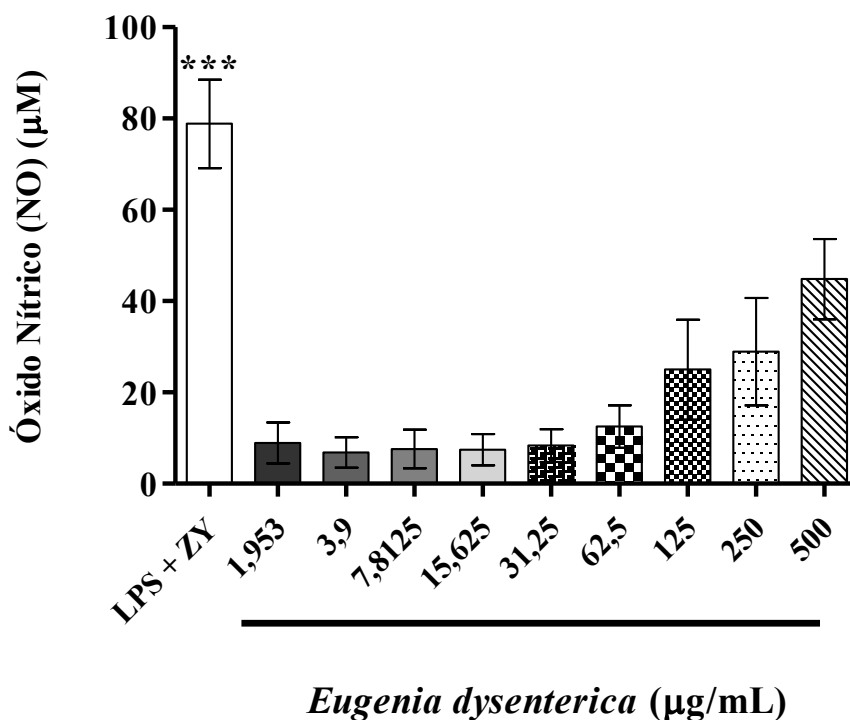
## 5.2 Produção de óxido nítrico (NO) em células RAW 264.7 tratadas com o extrato aquoso da *E. dysenterica*

A produção de NO foi quantificada em sobrenadantes de culturas de células RAW 264.7 por meio do método de Griess. Os dados obtidos (valores de densidade óptica em cada condição experimental) foram analisados em relação a uma curva padrão de NO construída com concentrações de nitrito crescentes de 1,6 a 200  $\mu\text{M}$ . A curva padrão e a respectiva equação da reta estão apresentadas na **Figura 3**.

Os resultados obtidos estão representados na **Figura 4**. A associação LPS – zimosan estimulou a produção de NO em células RAW 264.7, a qual foi significativamente maior, comparada às células tratadas com o extrato aquoso da *E. dysenterica*, em todas as concentrações utilizadas. Não houve diferença estatisticamente significativa na produção de NO entre as células tratadas com as diferentes concentrações do extrato ( $p > 0,05$ ).



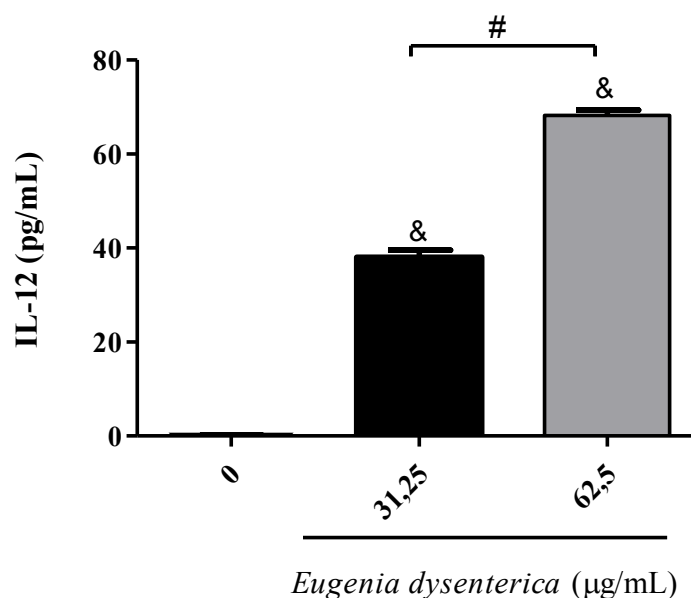
**Figura 3.** Curva padrão para determinação da concentração de NO em sobrenadantes de cultura de células RAW 264.7.



**Figura 4. Produção de óxido nítrico (NO) em células RAW 264.7 tratadas com extrato aquoso da *Eugenia dysenterica*.** Células macrophage-like RAW 264.7 ( $1 \times 10^6$  células/200  $\mu$ L/poço) foram cultivadas em placas de 96 poços a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas e tratadas com diferentes concentrações do extrato aquoso da *Eugenia dysenterica* por 24 horas. Células não tratadas com o extrato (concentração = 0  $\mu$ g/mL) ou estimuladas com LPS 1 $\mu$ g/mL e zimosan (ZY: 5 x n<sup>o</sup> de células/poço) constituíram os grupos controles negativo (produção basal) e positivo de produção de NO, respectivamente. Os valores basais de produção de NO foram subtraídos dos valores obtidos para as células tratadas com LPS-ZY ou extrato. 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 ( $\mu$ M) determinados a partir de quatro experimentos independentes, realizados em quadruplicata. A comparação entre o grupo controle positivo e os grupos tratados foi analisada utilizando-se ANOVA, seguido do teste de *Dunnnett* para comparações múltiplas (\*\*\*)  $p < 0,0001$ ).

### 5.3 Efeito do extrato aquoso de *E. dysenterica* sobre a produção de citocina IL-12 por células RAW 264.7

A produção da citocina IL-12 foi avaliada em sobrenadantes das culturas de células RAW 264.7 tratadas com o extrato aquoso de *E. dysenterica* após 6 horas de cultura (Figura 5). Os níveis de IL-12 foram significativamente aumentados em sobrenadantes das células tratadas com o extrato aquoso nas concentrações 31,25 e 62,5  $\mu\text{g/mL}$  ( $p < 0,001$ ).



**Figura 5. Produção da citocina IL-12 por células RAW 264.7 tratadas com extrato aquoso de *Eugenia dysenterica*.** Células macrophage-like RAW 264.7 ( $1 \times 10^6$  células/200  $\mu\text{L}$ /poço) foram cultivadas em placas de 96 poços a 37 °C e 5% de  $\text{CO}_2$  durante 24 horas e tratadas com diferentes concentrações do extrato aquoso da *Eugenia dysenterica* (31,25 e 62,5  $\mu\text{g/mL}$ ) por 6 horas. Os sobrenadantes livres de células foram coletados para quantificação da citocina por ELISA. Células não tratadas com o extrato (concentração = 0  $\mu\text{g/mL}$ ) constituíram o grupo controle negativo (produção basal de IL-12). Os dados estão expressos como média  $\pm$  S.E.M. Significância estatística foi analisada por & comparações entre os grupos tratados e o controle negativo e # comparação entre as células RAW 264.7 tratadas com concentrações diferentes do extrato (31,25 versus 62,5  $\mu\text{g/mL}$ ) (teste *t* de Student, \*\*\*  $p < 0,001$ ).

## 6 DISCUSSÃO

*E. dysenterica*, espécie da família Myrtaceae, tem sido utilizada em vários estudos que investigam potenciais atividades biológicas e farmacológicas em espécies vegetais nativas do Brasil. Compostos bioativos, tais como taninos, flavonóides, terpenos e saponinas têm sido identificados em partes distintas da planta, como nos frutos e nas folhas da *E. dysenterica* (COUTO, 2011; PRADO, 2014; MOREIRA, 2016; ÁVILA, 2016) e a eles têm sido atribuídas várias atividades biológicas, dentre elas, atividades antioxidantes e anti-inflamatórias (INFANTE, 2016). Na maioria dos estudos, utilizam-se extratos ou frações alcoólicas ou substâncias isoladas a partir de tais extratos. Nesse sentido, até o presente momento, ainda não existem dados na literatura sobre possíveis ações anti-inflamatórias do extrato aquoso da *E. dysenterica*. Portanto, o objetivo deste estudo foi utilizado extrato aquoso para avaliar a citotoxicidade, bem como efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios sobre células RAW 264.7 (*macrophagecellline*). Para isto, foi utilizado o método de conversão de MTT, ensaio para dosagem de óxido nítrico e o método de ELISA para quantificar a citocina IL-12, os dois últimos determinados em sobrenadantes de culturas.

Os dados obtidos no ensaio para avaliar o efeito do extrato aquoso sobre a viabilidade de células RAW 264.7 mostraram que não houve efeito citotóxico em todas as concentrações do extrato utilizadas. Ao contrário, observou-se indução da proliferação celular nas concentrações intermediárias (31,25 e 62,5 µg/ml). Estes dados corroboram com aqueles descritos na literatura utilizando-se modelos experimentais diferentes. O tratamento de células HFF-1 (*humanforeskinfibroblasts*) com extrato hidroalcoólico de *E. dysenterica*(EDE), após exposição à radiação UVA, promoveu a regeneração celular e a manutenção da viabilidade em > 99%. Além disso, o EDE promoveu efeitos dose-dependentes sobre queratinócitosHaCat, com redução da viabilidade celular em concentrações elevadas (200 e 400 µg/mL) após 24 horas de tratamento, enquanto houve aumento da proliferação dos HaCat expostos às concentrações 6,25 a 100 µg/mL (MOREIRA, 2017). Os mesmos autores observaram que o EDE inibiu a atividade das enzimas colagenase, elastase e tirosinase. A viabilidade celular de fibroblastos gengivais humanos foi avaliada após tratamento com uma fração do extrato aquoso de *E. dysenterica* solúvel em acetona (AFED;*acetonefractionofcrudeaqueousextract*) associada ou não com digliconato de clorexidina (CHX). Neste estudo, os resultados demonstraram que o extrato (0,25 µg/mL e 0,5 µg/mL) não apresentou efeito citotóxico, enquanto, CHX (0,12 e 0,2%) diminuiu a viabilidade das células HFF-1; além disto, houve aumento na viabilidade celular

quando as diferentes concentrações de CHX foram combinadas com o AFED (COSTA, 2019). Diante do exposto, tem sido sugerido que compostos antioxidantes, como substâncias fenólicas, os quais já foram detectados em extratos da *E. dysenterica*, exercem efeitos modulatórios sobre funções celulares relacionadas ao crescimento, proliferação e apoptose (CROZIER, 2009). Entre esses compostos, o flavonoide catequina tem sido referido como um biomarcador dos extratos de *E. dysenterica*, uma vez que é um metabólito secundário encontrado em concentrações significativas na referida espécie (ZORZIN, 2015; CHAGAS, 2016). Taninos, flavonóides, terpenos e saponinas, os quais detêm propriedades antioxidantes, também foram encontrados em extratos etanólicos de *E. dysenterica* (CECÍLIO, 2012). De modo geral, essas ações antioxidantes são importantes para evitar danos celulares oxidativos e, portanto, conferir citoproteção (SIENIAWSKA, 2015; COSTA, 2019). Tem sido demonstrado que o extrato aquoso das folhas da *E. dysenterica* apresenta atividade antiulcerogênica em modelo de lesões gástricas induzidas pela administração de solução hidroalcoólica acidificada e que este efeito citoprotetor deve-se à presença de uma série de taninos condensados (PRADO., 2014). Efeitos citoprotetores também foram observados em macrófagos alveolares pulmonares murinos expostos ao crômio, bem como maior sobrevivência dos animais expostos a doses letais desse elemento químico (ÁVILA, 2016). Vale ressaltar que a inibição das enzimas collagenase, elastase e tirosinase pelo extrato da *E. dysenterica* também poderia explicar a proliferação celular observada em nosso estudo. Colágeno e elastina são proteínas da matriz extracelular e a degradação das mesmas está associada a processos patológicos importantes como metástase tumoral (YOON, 2003), inflamação, enfisema pulmonar, artrite reumatoide, trombose, acidente vascular encefálico (WIEDOW, 1990; DELL'AICA, 2007; SARTOR, 2002). Em conjunto, sugerimos que os efeitos antioxidantes e inibidores das enzimas supracitadas, mediados pelo extrato aquoso da *E. dysenterica* podem caracterizar um efeito mitogênico sobre as células RAW 264.7.

Considerando os dados de aumento da proliferação celular obtidos com as concentrações 31,25 e 62,5 µg/ml do extrato aquoso da *E. dysenterica*, os níveis da citocina IL-12 foram mensurados em sobrenadantes das culturas de células RAW 264.7 nas referidas concentrações, as quais promoveram significativa produção de IL-12, em comparação ao grupo controle e de modo dose-dependente. Em processos inflamatórios, macrófagos expressam TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12, and IL-1 (DALEY, 2010; BRANCATO, ALBINA, 2011). Este perfil de citocinas pró-inflamatórias exerce efeitos quimiotáticos para neutrófilos e impulsiona a resposta inflamatória para remoção dos debris celulares.



Macrófagos também secretam citocinas anti-inflamatórias para iniciar a fase proliferativa do reparo tecidual em processos inflamatórios (SINDRILARU, SCHARFFETTER-KOCHANNEK, 2013; NOVAK, KOH, 2013a, 2013b).

Em nosso estudo, não houve indução da produção de NO em células RAW 264.7 tratadas com o extrato. Isto sugere que o extrato não exibiu atividade pró-inflamatória sobre essa linhagem celular.

Assim, apesar de o extrato aquoso da *E. dysenterica* não interferir com a produção de NO, os efeitos mitogênicos do extrato aquoso das folhas da *Eugenia dysenterica*, bem como o estímulo à secreção de IL-12 sugerem um possível efeito imunomodulador, cuja natureza pró ou anti-inflamatória merece ser investigada.

## 7 CONCLUSÃO

Esse trabalho mostrou que a proliferação celular da linhagem *macrophage-like* RAW 264.7 é aumentada quando tratada com o extrato aquoso das folhas de *Eugenia dysenterica* nas concentrações de 31,25 e 62,5 µg/ml, através do método MTT. E que, nessas mesmas concentrações, também há estímulo da produção de IL-12, quantificado por ELISA. A produção de NO não foi observada em nenhuma das concentrações testadas pelo método de Griess. Assim, não foi possível determinar se o extrato aquoso possui efeito pró ou anti-inflamatório, mas abre novos caminhos para uma investigação sobre um provável efeito imunomodulador e fortalece os dados já existentes na literatura atual.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, E; ROSA, F, FUSTINONI, A; SANT'ANA, L; ARRUDA, S. Brazilian savanafruits contain higher bioactive compounds content and higher antioxidant activity relative to the conventional red delicious apple. **PLOS ONE**8, 1-8, 2013.

ÁVILA, R.I; et al. *Eugenia dysenterica* DC. (Myrtaceae) exerts chemopreventive effects against hexavalent chromium-induced damage in vitro and in vivo. **Pharm. Biol.** 54, 2652-2663, 2016.

AMOROZO, M.C.M. A abordagem etnobotânica na pesquisa de plantas medicinais. In: STASI, L.C. di (org.). **Plantas medicinais: arte e ciência: um guia interdisciplinar**, São Paulo: Editora da UNESP, p. 47-68, 1996.

BEZERRA, J.C; SILVA, I.A; FERREIRA, H.D; FERRI, P.H; SANTOS, S.C. Molluscicidal activity against Biomphalariaglabrata of Brazilian Cerrado medicinal plants. **Fitoterapia** 73, 428-430 2002.

BINION, D.G; et al. DEFICIENT iNOS IN INFLAMMATORY BOWEL DISEASE INTESTINAL MICROVASCULAR ENDOTHELIAL CELLS RESULTS IN INCREASED LEUKOCYTE ADHESION. **Free Radical Biology & Medicine**, Vol. 29, No. 9, pp. 881–888, 2000

BRANCATO, S.K; ALBINA, J.E. Wound macrophages as key regulators of repair: origin, phenotype, and function. **American Journal Of Pathology** 178:19–25, 2011.

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

CHAGAS, V.T; FRANÇA, L.M; MALIK, S; & PAES, A.M.A. *Syzygiumcumini*( L .) Skeels: a prominent source of bioactive molecules against cardiometabolic diseases. **Frontiersin Pharmacology**, 6, 1-8, 2015.

CECÍLIO, A.B; FARIA, D; OLIVEIRA, P; CALDAS, S; OLIVEIRA, D; SOBRAL, M.E; DUARTE, M.G; MOREIRA, C.P; SILVA, C; ALMEIDA, V.L. ScreeningofBrazilian medicinal plants for antiviral activityagainststrotavirus. **J. Ethnopharmacol.** 141, 975-981, 2012.

COSTA, T.R; FERNANDES, O.F; SANTOS, S.C; OLIVEIRA, C.I; LIAO, L.M; FERRI, P.H; PAULA, J.R; FERREIRA, H.D; SALES, B.H; SILVA, M.R. Antifungalactivityofvolatileconstituentsof *Eugenia dysenterica*leafoil. **J. Ethnopharmacol.** 72, 111-117 2000.

COSTA, C. R. R.; et al. In vitro evaluation of *Eugenia dysenterica* in primary culture of human gingival fibroblast cells. **Braz. Oral Res.** vol33.0035, 2019.

COUTO, R.O.; ARAÚJO, R.R.; TACON, L.A.; CONCEIÇÃO, E.C.; BARA, M.T.F.; PAULA, J.A.M; FREITAS, L.A.P. Development of a phytopharmaceutical intermediate product. **Dry. Technol.** 29, 709–718, 2011.

- CROZIER, A; JAGANATH, I.B; CLIFFORD M.N; Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. **Nat Prod Rep.** Aug;26(8):1001-43, 2009.
- DALEY, J.M; BRANCATO, S.K; THOMAY, A.A; REICHNER, J.S; ALBINA, J.E.The phenotype of murine wound macrophages.**J LeukocBiol**87:59–67, 2010.
- DAS, S; MITRA, I; BATUTA, S; ALAM, M.N; ROY, K; BEGUM, N.A; Design, synthesis and exploring the quantitative structure–activity relationship of some antioxidant flavonoid analogues. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** 24, 5050-5054 2014.
- DA SILVA, M. M. M; DA SILVA, E. P; DA SILVA, F. A; OGANDO, F. I. B; DE AGUIAR C. L; DAMIANI C. **FoodChemistry** v. 217, p. 74–80, 2017.
- DELL’AICA, I; NIERO, R; PIAZZA, F; CABRELLE, A; SARTOR, L; COLALTO, C; BRUNETTA, E; et al. Hyperforin blocks neutrophil activation of matrix metalloproteinase-9, motility and recruitment, and restrains inflammation-triggered angiogenesis and lung fibrosis. **J PharmacolExp Ther.**321: 492–500, 2007.
- DUARTE, A.R; NAVES, R.R; SANTOS, S.C; SERAPHIN, J.C; FERRI P.H.Genetic and environmental influence on essential oil composition of *Eugenia dysenterica*.**J. Braz. Chem. Soc.** 21, 1459-1467 2010.
- FERRERO-MILIANI, L; NIELSEN, O. H; ANDERSEN, P. S; GIRARDIN, S. E. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 $\beta$  generation. **British Society for Immunology, Clinical and Experimental Immunology**, 147: 227–235, 2006.
- FUMAGALI, E; GONÇALVES, R. A. C; MACHADO, M. F. P. S; VIDOTI, G. J; DE OLIVEIRA, A. J. B. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18(4): p. 627-641, Out./Dez, 2008.
- GARCIA, A.A; CARRIL, E.P. Metabolismo secundario de plantas.**Reduca (Biologia)**. Serie Fisiología Vegetal. 2 (3): 119-145, 2009
- GASPAR, A.T; HENRIQUE, R.G; ARAUJO, A.H; AGUIAR, F.G; ZILS, T; SILVA, B.V; BARROS, E.L; OLIVEIRA, Q.M; MOLICA, M.E; MELO, R.F. Haemonchus contortus: in vivo anthelmintic activity of *Eugenia dysenterica* DC. and *Caryocar brasiliense* Cambess leaves in sheep. **Planta Med.** 76, P636 2010.
- GASPARRINI, M; FORBES-HERNANDEZ, T.Y; GIAMPIERI, F; AFRIN, S; ALVAREZ-SUAREZ, J.M; MAZZONI, L; MEZZETTI, B; QUILES, J.L; BATTINO, M. Anti-inflammatory effect of strawberry extract against LPS-induced stress in RAW 264.7 macrophages, **Food and Chemical Toxicology**, 2017.
- GENOVESE, M.I; PINTO, M; GONÇALVES, A.E; LAJOLO, F.M; Bioactive compounds and antioxidant capacity of exotic fruits and commercial frozen pulps from Brazil. **Food Sci. Technol.** 14, 207-214, 2008.
- GUAN, Q; ZHANG, J. Recent Advances: The Imbalance of Cytokines in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease.**Mediators of Inflammation**

Volume 2017, Article ID 4810258.

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, 2013.

INFANTE, J; ROSALEN, P.L; LAZARINI, J.G; FRANCHIN, M; de ALENCAR, S.M. Antioxidant and anti-inflammatory activities of unexplored Brazilian native fruits. **PLoS ONE** 11, e0152974, 2016.

LEE, I.T; YANG, C.M. Inflammatory Signalings Involved in Airway and Pulmonary Diseases, **Mediators of Inflammation**, v. 2013, ID 791231, 2013.

LEYVA, N. L; 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.

LIMA, T.B; SILVA, O.N; OLIVEIRA, J.T; VASCONCELOS, I.M; SCALABRIN, F; ROCHA, T.L; GROSSI, M.F; SILVA, L.P; GUADAGNIN, R.V; QUIRINO, B.F. Identification of *E. dysenterica* laxative peptide: A novel strategy in the treatment of chronic constipation and irritable bowel syndrome. **Peptides** 31, 1426-1433, 2010.

LIMA, T.B; SILVA, O.N; SILVA, L.P; ROCHA, T.L; GROSSI, M.F; FRANCO, O.L; LEONARDECZ, E. In vivo effects of Cagaita (*Eugenia dysenterica*, DC.) leaf extracts on diarrhea treatment. **Evid. Based Complement. Altern. Med.** 1-10, 2011.

MAZUTTI, S.M. et al; Wound Healing Effect of Essential Oil Extracted from *Eugenia dysenterica* DC (Myrtaceae) Leaves. **Molecules** 2019, 24, 2;

MERLY, L; SMITH, S. L. Murine RAW 264.7 cell line as an immune target: are we missing something? **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, VOL. 39, NO. 2, p. 55-58, 2017.

MOREIRA, L. C; et al. In vitro safety and efficacy evaluations of a complex botanical mixture of *Eugenia dysenterica* DC. (Myrtaceae): Prospects for developing a new dermocosmetic product. **Toxicology in Vitro** Volume 45, Part 3, Pages 397-408, December 2017.

NOVAK, M.L; KOH, T.J. Phenotypic transitions of macrophages orchestrate tissue repair. **American Journal Of Pathology** 183:1352-1363, 2013a.

NOVAK, M.L; KOH, T.J. Macrophage phenotypes during tissue repair. **J Leukoc Biol** 93:875-881, 2013b.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Guidelines on good agricultural and collection practices (GACP) for medicinal plants**. Geneve, 1 vol, 2003.

PARK, M; CHO, H; JUNG H; LEE, H; HWANG K. T; Antioxidant and anti-inflammatory activities of tannin fraction of the extract from black raspberry

seeds compared to grape seeds, **Journal of Food Biochemistry**, Wiley Periodicals, v.38, p.259–270, 2013.

PEREIRA, R.J; CARDOSO, M.G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology Biodiversity** v. 3, N.4: pp. 146-152, Nov. 2012 **Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos**. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica, 60 p. (Série B. Textos Básicos de Saúde), 2016.

PRADO, L.C; SILVA, D.B; OLIVEIRA-SILVA, G; HIRAKI, K.R; CANABRAVA, H.A; BISPO, L.B. The gastroprotective effects of *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae) leaf extract: The possible role of condensed tannins. **Biol. Pharm. Bull.** 37, 722-730 2014.

REZENDE, E.A; RIBEIRO, M.T.F. Conhecimento tradicional, plantas medicinais e propriedade intelectual: biopirataria ou bioprospecção? **REV.BRAS.PL.MED.**, Botucatu, v.7, n.3, p.37-44, 2005.

SARTOR, L; PEZZATO, E; DELL'AICA, I; CANIATO, R; BIGGIN, S; GARBISA, S. Inhibition of matrix-proteases by polyphenols: chemical insights for anti-inflammatory and anti-invasion drug design. **Biochem Pharmacol** 64: 229–237, 2002.

SERAFINI, M; PELUSO, I; RAGUZZINI, A. Session 1: Antioxidants and the immune system, Flavonoids as anti-inflammatory agents, **Proceedings of the Nutrition Society**. 69, p. 273–278, 2010.

SIENIAWSKA, E. Activities of tannins: from in vitro studies to clinical trials. **Nat Prod Commun**. Nov;10(11):1877-84, 2015.

SILVA, R. S. M; CHAVES, L. J; NAVES, R. V. Caracterização de frutos e árvores de cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) no Sudeste do estado de Goiás, Brasil. **Revista Brasileira Fruticultura**. Jaboticabal – São Paulo, v.23, n. 2, p. 330-334, 2001.

SINDRILARU, A; SCHARFFETTER-KOCHANNEK, K. Disclosure of the Culprits: Macrophages-Versatile Regulators of Wound Healing. **Advances in Wound Care** 2:357–368, 2013.

SMERIGLIO, A; BARRECA, D; BELLOCCO, E; TROMBETTA, D; Proanthocyanidins and hydrolysable tannins: occurrence, dietary intake and pharmacological effects, **British Journal of Pharmacology**, 2016.

SOUZA, L.K; OLIVEIRA, C.M; FERRI, P.H; SANTOS, S; OLIVEIRA, J; MIRANDA, A.T.; LIAO, L.M; SILVA, M.R. Antifungal properties of Brazilian Cerrado plants. **Braz. J. Microbiol.** 33, 247-249 2002.

SOUZA, P; SALES, P.M; SIMEONI, L.A; SILVA, E.C; SILVEIRA, D; OLIVEIRA, P.O. Inhibitory activity of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase by plant extracts from the Brazilian Cerrado. **Planta Med.** 78, 393-399 2012.

VIEIRA, P.M; VERONEZI, E; SILVA, C.R; CHEN-CHEN, L. Detection of genotoxic, cytotoxic, and protective activities of *Eugenia dysenterica* DC. (Myrtaceae) in mice. **J.**

**Med. Food.**15, 563-567, 2012.

VILELA, E.C; CARVALHO, T.C; DUARTE, A.R; NAVES, R.R; SANTOS, S.C; SERAPHIN, J.C; FERRI, P.H. Spatial structure of *Eugenia dysenterica* based on essential oil chemovariations and implications for conservation and management of the genetic diversity of its populations. **J. Braz. Chem. Soc.** 23, 1776-1782 2012.

WIEDOW, O; SCHRODER, J.M; GREGORY, H; YOUNG, J.A; CHRISTOPHERS, E. Elafin: an elastase-specific inhibitor of human skin. Purification, characterization, and complete amino acid sequence. **J Biol Chem.** 265:14791–14795, 1990.

YOON, S.O; PARK, S.J; YUN, C.H; CHUNG, A.S; Roles of matrix metalloproteases in tumor metastasis and angiogenesis. **J BiochemMolBiol**, 36: 128–137, 2003.

ZORZIN, F.M; SILVA, S.M.M; FREITAS, M.M; COPINNI, R.P.A; SOUZA, P.M; SILVEIRA, D; FONSECA, Y.M; SIMEONI, L.A; HOMEM-DE-MELO, M; & MAGALHAES, P.O. Validation of the analytical method by HPLC for determination of catechin in *Eugenia dysenterica* DC. dry aqueous extract a Brazilian savannah native plant. **Pharmacology Online.** 2, 100-107, 2015.

ZUNINGA A; COQUEIRO K. T. O; SIQUEIRA M. A. S. Capacidade antioxidante de frutos nativos do cerrado (*Hancorniaspeciosa*, *Campomanesiaxanthocarpa*, *Eugenia dysenterica*) uma breve revisão. **Revista Desafios** – v. 05,n. 01, 2018.