

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**  
**CURSO DE GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**MARIA EDUARDA PEREIRA**

**Avaliação da citotoxicidade do extrato aquoso da guabiroba (*Campomanesia xanthocarpa*) em linhagem de células RAW 264.7: ensaio enzimático LDH**

**UBERLÂNDIA**  
**2022**

**MARIA EDUARDA PEREIRA**

**Avaliação da citotoxicidade do extrato aquoso da guabiroba (*Campomanesia xanthocarpa*) em linhagem de células RAW 264.7: ensaio enzimático LDH**

Trabalho de Conclusão de Curso 2 apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária, Curso de Graduação em Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito para aprovação na disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso 2 (TCC 2, GMV054).

Orientadora: Profa. Dra. Celene Maria de Oliveira Simões

**UBERLÂNDIA  
2022**

**MARIA EDUARDA PEREIRA**

**Avaliação da citotoxicidade do extrato aquoso da guabiroba (*Campomanesia xanthocarpa*) em linhagem de células RAW 264.7: ensaio enzimático LDH**

**Trabalho de Conclusão de Curso aprovado para a obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Uberlândia (MG) pela banca examinadora formada por:**

**Uberlândia, 01 de abril de 2022**

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Celene Maria de Oliveira Simões Alves, UFU/MG**

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elisângela Rosa da Silva, UFU/MG**

---

**Prof. Dr. Francisco Cláudio Dantas Mota, UFU/MG**

## RESUMO

Espécies reativas de oxigênio (EROs) e óxido nítrico (NO) são mediadores produzidos por neutrófilos e macrófagos estimulados e exibem importante papel na progressão de respostas inflamatórias. Quando a sua produção excede o sistema antioxidante das células, resulta em estresse oxidativo, um processo deletério que pode causar danos a macromoléculas celulares, incluindo lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos e, portanto, morte celular e várias condições patológicas. *Campomanesia xanthocarpa* é uma espécie vegetal do Cerrado brasileiro, em cujas folhas foram identificados compostos bioativos, incluindo flavonoides e taninos, com propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e analgésicas. Desse modo, o objetivo geral deste estudo é investigar possíveis propriedades anti-inflamatória do extrato aquoso liofilizado das folhas da *C. xanthocarpa* (EACX) em modelos experimentais *in vitro*, utilizando células da linhagem macrophage-like RAW 264.7, as quais representam um modelo para estudo das funções biológicas de macrófagos. Todavia, inicialmente, neste trabalho, o objetivo específico foi avaliar a citotoxicidade do EACX sobre células RAW 264.7. O método utilizado foi a quantificação da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) em sobrenadantes de cultura. Os resultados obtidos mostraram que o EACX, nas concentrações avaliadas, de 500 a 1,953 µg/mL, não diminuiu a viabilidade de células RAW 264.7. Portanto, conclui-se que, nas condições experimentais utilizadas, o EACX não apresenta efeitos citotóxicos.

**Palavras-chave:** *macrophage-like* RAW 264.7; *Campomanesia xanthocarpa*; lactato desidrogenase.

## ABSTRACT

Reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) are mediators produced by stimulated neutrophils and macrophages and play an important role in the progression of inflammatory responses. When its production exceeds the cells' antioxidant system, it results in oxidative stress, a deleterious process that can cause damage to cellular macromolecules, including lipids, proteins, and nucleic acids, and therefore, cell death and various pathological conditions. *Campomanesia xanthocarpa* is a plant species from the Brazilian Cerrado, in whose leaves bioactive compounds were identified, including flavonoids and tannins, with anti-inflammatory, antioxidant and analgesic properties. Thus, the general objective of this study is to investigate possible anti-inflammatory properties of the lyophilized aqueous extract of *C. xanthocarpa* leaves (EACX) in in vitro experimental models, using macrophage-like RAW 264.7 cells, which represent a model for study of the biological functions of macrophages. However, initially, in this work, the specific objective was to evaluate the cytotoxicity of EACX on RAW 264.7 cells. The method used was the quantification of lactate dehydrogenase (LDH) enzyme activity in culture supernatants. The results obtained showed that EACX, at the concentrations evaluated, from 500 to 1,953  $\mu\text{g/mL}$ , did not decrease the viability of RAW 264.7 cells. Therefore, it is concluded that, under the experimental conditions used, EACX does not present cytotoxic effects.

**Keywords:** macrophage-like RAW 264.7; *Campomanesia xanthocarpa*; lactate dehydrogenase.

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	07
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	10
2.1	Inflamação: a importância dos macrófagos, EROS e NO.....	10
2.2	Plantas Medicinais.....	13
2.2.1	<i>Campomanesia xanthocarpa</i> .....	14
2.2.2	<i>C. xanthocarpa</i> e Compostos bioativos.....	14
2.2.2.1	Flavonoides.....	15
2.2.2.2	Taninos.....	15
2.3	Lactato Desidrogenase (LDH).....	16
2.4	Linhagem RAW 264.7.....	17
3	JUSTIFICATIVA.....	18
4	OBJETIVOS.....	19
4.1	Objetivo geral e Específico.....	19
5	METODOLOGIA .....	20
5.1	Local de Execução .....	20
5.2	Material vegetal e obtenção do extrato aquoso da <i>Campomanesia xanthocarpa</i> .....	20
5.3	Modelo experimental <i>in vitro</i> .....	21
5.3.1	<i>Cultura de células macrophage-like RAW 264.7</i> .....	21
5.4	Análise da citotoxicidade do EACX em células RAW 264.7.....	21
5.5	Análise estatística.....	22
6	RESULTADOS.....	23
6.1	Citotoxicidade do EACX.....	23
7	DISCUSSÃO.....	24
8	CONCLUSÃO.....	25
	REFERÊNCIAS.....	26

## 1 INTRODUÇÃO

A resposta inflamatória é descrita como um mecanismo protetor, local ou sistêmico, com o objetivo de eliminar o agente ou estímulo causador, promover cicatrização tecidual e construir uma memória imunológica no caso de infecção para que o organismo, posteriormente, seja mais específico contra o agente, podendo iniciar-se logo após um ferimento ou infecção (FULLERTON, GILROY, 2016).

Os macrófagos são monócitos maduros especializados na neutralização e fagocitose de patógenos, bem como debrís celulares. Existem macrófagos teciduais que não realizam migração e possuem a função de monitorar o tecido (VAROL et al., 2015), além disso, podem realizar a fagocitose de células apoptóticas e organizar a remodelação tecidual. Monócitos circulantes no sangue eventualmente são recrutados para o tecido inflamado e diferenciam-se em macrófagos. Os leucócitos polimorfonucleares neutrófilos, semelhantemente aos monócitos, encontram-se na circulação sanguínea e realizam diapedese quando há infecção ou dano tecidual (ROSOWSKI, 2020). Neutrófilos, além da fagocitose, também podem formar redes extracelulares, referidas na literatura como *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs), para aprisionar e eliminar patógenos (BURDON et al., 2008; HONG et al., 2012).

As células fagocíticas também produzem mediadores com potencial microbicida, tais como as espécies reativas de oxigênio (EROs). Estas, em concentração excedente, podem produzir efeitos deletérios ao organismo, como causar necrose tecidual, induzir apoptose, prejudicar o metabolismo celular e ainda danificar o DNA e RNA (SEGAL, 2005; VALKO et al., 2006; BAE et al., 2011).

O óxido nítrico (NO) é outra substância tóxica produzida por macrófagos e neutrófilos para promover a morte do microrganismo patogênico no interior do fagossomo (TEJERO et al., 2019). A produção do NO é mediada pela ação da enzima óxido nítrico-sintase (NOS). Três isoformas de NOS são descritas na literatura: (i) neuronal (nNOS), (ii) endotelial (eNOS) e (iii) induzível (iNOS); as duas primeiras são constitutivas e a terceira induzível (TEJERO et al., 2019). A iNOS é amplamente expressa em macrófagos e, geralmente, não é ativada no sistema vascular saudável, mas sim em processos patológicos. A produção aumentada de NO, mediada pela enzima iNOS, pode ser prejudicial à função vascular. (GUNNETT et al., 2005; PAUTZ et al., 2010; OLLER et al., 2017). Ademais, a molécula de NO é responsável por várias funções no organismo de mamíferos, como por exemplo adequar o fluxo sanguíneo, promover a vasodilatação, inibir a ativação plaquetária, além de interromper a adesão de moléculas

inflamatórias ao endotélio vascular. Em condições fisiológicas a produção de NO é primordialmente mantida pela NOS endotelial (HUANG, 1995; TEJERO et al., 2019).

De modo geral, a despeito de a produção dos mediadores inflamatórios NO e EROS visar à destruição de um agente nocivo, quando em excesso, produzem efeitos deletérios aos tecidos. Neste sentido, a contenção da resposta inflamatória é de extrema importância devido sua relação com várias doenças crônicas graves, como câncer, doenças cardiovasculares e distúrbios imunológicos (SOOMRO, 2019).

Doenças com etiopatogenia inflamatória são comuns ao redor do mundo e o seu tratamento farmacológico é essencial (VISHAL et al., 2014). Drogas anti-inflamatórias não-esteroidais (AINEs) e esteroidais (AIEs) sintéticas são comumente utilizadas na terapêutica para o controle de processos inflamatórios agudos e crônicos (MOSKOVTCHEK; COGNET, 1976). Entretanto, a maioria desses fármacos possui efeitos adversos importantes, tais como, distúrbios gastrointestinais, insuficiência renal aguda, sangramentos, tromboembolismo, alterações metabólicas, dentre outros (YATOO et al., 2018).

Em decorrências desses efeitos adversos, incitou-se a necessidade de buscar drogas alternativas às atuais para a resolução de processos inflamatórios de forma mais segura. Neste sentido, tem sido crescente o número de pesquisas que investigam a presença de compostos bioativos com potencial uso terapêutico em derivados vegetais, fazendo-se uso da grande biodiversidade de espécies encontradas em diferentes biomas. No Brasil, estudos visando à descoberta de novos agentes terapêuticos de origem vegetal podem contribuir com a Política Nacional de Plantas Mediciniais 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 medicinais e fitoterápicos em nosso país, ao desenvolvimento de tecnologias e inovações, assim como ao uso sustentável da biodiversidade brasileira (BRASIL, 2006).

*C. xanthocarpa* é uma espécie típica do Cerrado brasileiro, pertencente à família Myrtaceae. Estudos fitoquímicos utilizando extratos hidroalcolico e aquoso das folhas da referida planta revelaram a presença de metabólitos secundários, tais como flavonoides, taninos, esteroides e saponinas. Outras substâncias, como ácido clorogênico e gálico, quercetina e teobromina foram encontradas somente no extrato aquoso (MARKMAN, 2002; SANT'ANNA, et al.; 2017). Estes metabólitos, especialmente os flavonoides, possuem propriedades anti-inflamatórias e analgésicas relacionadas ao potencial antioxidante desses compostos (MARKMAN et al., 2004; SANDHAR et al., 2011).

Diante do exposto, considerando que o extrato aquoso das folhas da *C. xanthocarpa* demonstrou, por meio de análise fitoquímica, conter substâncias polifenóis, flavonoides e taninos e que estudos da literatura têm apontado atividades antioxidantes e anti-inflamatórias para essas substâncias, podemos inferir as seguintes hipóteses:

**H0:** o extrato aquoso da *C. xanthocarpa* não apresentará atividades farmacológicas;

**H1:** o extrato aquoso da *C. xanthocarpa* apresentará atividades farmacológicas antioxidantes e anti-inflamatórias.

Contudo, para investigar essas hipóteses, o presente estudo tem por objetivo inicial avaliar o potencial citotóxico do extrato aquoso liofilizado das folhas da *Campomanesia xanthocarpa* em modelo experimental *in vitro*.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Inflamação: a importância dos macrófagos, EROS e NO

Inflamação excessiva tem sido reconhecida como um componente importante associado a diversas condições patológicas crônicas, incluindo asma, doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, infecciosas e autoimunes, como artrite reumatoide e lúpus eritematoso sistêmico (SLE; *systemic lupus erythematosus*) (PARK et al., 2020). Além disto, processos inflamatórios persistentes têm sido relacionados a doenças metabólicas, como obesidade e fibrose (MUSSO, 2018; GREENLEE-WACKER, 2016).

Respostas inflamatórias constituem mecanismos de defesa do organismo animal, desencadeados após infecção ou lesão tecidual. Reações inflamatórias locais ou sistêmicas visam a eliminar os estímulos nocivos, promovem o reparo e cicatrização tecidual e, em casos de infecção, levam ao desenvolvimento de uma memória imunológica (GUO et al., 2012; FULLERTON, GILROY, 2016). Entretanto, a inflamação crônica não controlada pode conduzir a alterações fisiopatológicas importantes (PARK et al., 2020).

A resposta inflamatória aguda inicia-se com a produção de mediadores solúveis, incluindo proteínas do sistema complemento, quimiocinas, citocinas, radicais livres, aminas vasoativas e eicosanoides, produzidos por células residentes (teciduais), como macrófagos, células dendríticas, linfócitos, células endoteliais, fibroblastos e mastócitos. Concomitantemente, por meio de alteração na expressão de moléculas de adesão em células endoteliais e leucócitos circulantes, ocorre influxo de granulócitos, tipicamente polimorfonucleares (PMN) neutrófilos, e monócitos, acompanhado da exsudação de proteínas plasmáticas em direção ao sítio de lesão ou infecção (FULLERTON, GILROY, 2016). O recrutamento e extravasamento dos monócitos, seguidos da sua diferenciação em macrófagos são eventos cruciais em uma resposta inflamatória (GEISSMANN et al., 2010).

Neutrófilos e monócitos/macrófagos são as principais células do sistema imune inato com a função primária de fagocitar e eliminar debris celulares e microrganismos por meio de mecanismos intracelulares envolvendo a produção de mediadores, tais como Espécies Reativas de Oxigênio (EROs; por exemplo:  $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $HOCl$ , e  $\cdot OH$ ), óxido nítrico (NO), citocinas e quimiocinas, mieloperoxidase (MPO) e proteases (FULLERTON, GILROY, 2016). Neutrófilos também podem formar redes extracelulares, referidas na literatura como Neutrophil Extracellular Traps (NETs), para aprisionar e eliminar patógenos. As NETs são estruturas em

forma de teia constituídas de proteínas granulares reunidas sobre cromatina descondensada proveniente do núcleo e do DNA mitocondrial. Essas redes interceptam e eliminam microrganismos, tais como bactérias, fungos, vírus e parasitos (ROSOWSKI, 2020; LOOD et al., 2016; URBAN et al., 2006; SAITOH et al., 2012; ABI ABDALLAH et al., 2012). Embora neutrófilos sejam classicamente associados com a inflamação aguda e imunidade inata, estudos têm demonstrado que neutrófilos são elementos essenciais na elaboração da imunidade adaptativa e resolução da resposta inflamatória crônica (HACHICHA et al., 1995). Neutrófilos podem secretar citocinas, por exemplo, IL-17, que regulam a expressão de fatores pró-inflamatórios em células mesenquimais e mieloides, levando à perpetuação do recrutamento e ativação de neutrófilos adicionais na inflamação crônica (VARRICCHI et al., 2015.)

Macrófagos, além da habilidade fagocítica, constituem importante classe de células apresentadoras de antígeno (APCs), ativam linfócitos T e B, secretam citocinas pró- e anti-inflamatórias, mitogênicas, angiogênicas e fibrogênicas (BEAUVILLAIN et al., 2007). No contexto dos processos infecciosos, macrófagos são células essenciais para uma resposta imune bem sucedida contra vários patógenos, como demonstrado pela menor taxa de sobrevivência e/ou elevada carga parasitária em modelos experimentais de camundongos depletados de macrófagos e infectados com (i) vírus *Herpes simplex* (PINTO et al., 1991), (ii) bactérias [*Pseudomonas aeruginosa* (KOOGUCHI et al., 1998; MANICONE et al., 2009), *Listeria monocytogenes* (PINTO et al., 1991), *Klebsiella pneumoniae* (CHEUNG et al., 2000)] e fungos [*Candida albicans* (QIAN et al., 1994), *Aspergillus fumigatus* (BHATIA et al., 2011)].

Em uma reação inflamatória, EROs e NO são mediadores importantes na progressão de distúrbios teciduais. Macrófagos são células que produzem grandes quantidades de NO em resposta a estímulos inflamatórios, por meio da atividade da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS: *inducible nitric oxide synthase*), a qual catalisa a formação de NO a partir do aminoácido L-arginina (CERQUEIRA; YOSHIDA, 2002). A ativação do processo de fagocitose estimula em neutrófilos e macrófagos um metabolismo gerador de EROs, 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 EROs (FAURSCHOU; BORREGAARD, 2003).

Lipopolissacarídeo (LPS) derivado da membrana externa de bactérias gram-negativas regula a liberação de mediadores inflamatórios associados com sepse e outras distúrbios inflamatórias. Em macrófagos, LPS ativa a via de síntese e liberação de NO por meio da sua

interação com receptores *Toll like* (TLR4) e subsequente ativação de quinases celulares, resultando na ativação do fator de transcrição NF $\kappa$ -B, principal via que regula a liberação de NO e de várias citocinas durante uma resposta inflamatória (CHOUDHARY et al., 2013; AKTAN, 2004). Estudos da literatura demonstraram o potencial antimicrobiano do NO contra diversos patógenos, incluindo *Clostridium difficile*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Salmonella* entérica (CUNNINGHAM et al.; 2014; MACMACKING et al., 1997; MASTROENI et al., 2000); além da participação do NO na defesa do organismo hospedeiro por meio da regulação da resposta imune (EHRT et al., 2001). Neste sentido, tem sido sugerido que o NO medeia resistência à tuberculose devido, pelo menos em parte, ao efeito negativo do NO sobre o recrutamento de neutrófilos (MISHRA et al., 2017). Contudo, apesar de o NO apresentar ações microbicida e imunomoduladora, a sua produção exacerbada apresenta efeitos patológicos ao organismo hospedeiro (SOOMRO et al.; 2019). No organismo animal, a produção basal de NO é necessária para a função vascular normal. Entretanto, durante a inflamação, a ativação da forma induzível da enzima óxido nítrico sintase (iNOS) pode tornar-se excessiva e causar vasodilatação, resultando em hipotensão e choque séptico (MACDONALD, 2003). Além disto, a reação entre NO e ânions superóxidos ( $O_2^{\bullet -}$ ), gerados durante a fagocitose, leva à síntese de peroxinitrito (ONOO), um dos radicais mais tóxicos derivados do NO. Eventualmente, o ONOO reduz a biodisponibilidade do NO basal e interfere com sua função de relaxamento vascular, causando, portanto, vasoconstrição e hipertensão. Além disto, esses radicais causam nitrosilação de proteínas, evento que contribui para o desenvolvimento de doenças, como o câncer, cardíacas e pulmonares, dentre outras (KARIN, 2009; HATTORI et al., 2004; DING, et al., 2009; LEONI, et al., 2014).

A geração de EROs é mediada por um complexo enzimático denominado NADPH-oxidase, o qual transporta elétrons do NADPH no citoplasma para o  $O_2$  no fluido extracelular ou no espaço intrafagossômico, para formar o radical ânion superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ ). Este ânion é convertido em  $H_2O_2$ , que, por sua vez, gera outras EROs, por meio de reações químicas e enzimáticas (BABIOR, 2000; KITAGAWA et al., 2003; DECOURSEY; LIGETI, 2005). Outra enzima importante no metabolismo gerador de EROs é a MPO (mieloperoxidase), que catalisa a oxidação de íons haleto ( $Cl^-$ ,  $Br^-$ ,  $I^-$ ) para ácidos hipó-halosos, utilizando  $H_2O_2$  como substrato (BABIOR, 1999; PULLAR et al., 2000). As EROs geradas atuam como oxidantes de vários compostos nos sistemas biológicos formando uma grande variedade de espécies químicas reativas, as quais são importantes para degradar o patógeno fagocitado. A presença de EROs no espaço extracelular é controlada por moléculas antioxidantes naturais [NADPH, SOD

(enzima superóxido dismutase), catalase e glutathione peroxidase], que previnem a formação ou sequestram os radicais livres, interrompendo a cadeia de reações de propagação. Todavia, quando a produção de EROs excede o sistema antioxidante das células, resulta em estresse oxidativo, um processo deletério que pode ser importante mediador de danos a macromoléculas celulares, incluindo lipídeos, proteínas, e ácidos nucleicos. Este fenômeno pode causar morte celular e alterações fisiopatológicas. Por exemplo, a modificação oxidativa de proteínas está associada à geração de autoanticorpos em várias doenças autoimunes, como o SLE (KURIEN et al. 2006; SOOMRO et al.; 2019).

Diante do exposto, a descoberta de compostos bioativos com potencial ação antioxidante por interferirem com a geração de EROS e/ou NO durante uma resposta inflamatória pode conduzir futuramente a novas ferramentas farmacológicas com potencial uso terapêutico em doenças inflamatórias crônicas.

## 2.2 Plantas Medicinais

Segundo a Organização Mundial de Saúde plantas medicinais são definidas como: qualquer vegetal que tem em seu interior, substâncias que podem ser utilizadas em fins terapêuticos, ou que sejam precursores de fármacos definidos como semissintéticos (WHO, 1998; JUNIOR et al., 2005). Espécies de plantas desde a antiguidade têm sido utilizadas de forma empírica como instrumentos terapêuticos em várias condições patológicas. Por exemplo, os chineses há 5 mil anos usaram a “Efedra” para tratar a asma. Babilônios e Sumérios, para alívio das dores usavam como tratamento a mandrágora e o ópio (CRAVO, 2002).

Doravante no século XIX, iniciou-se o isolamento, a partir de derivados vegetais, de compostos com atividade terapêutica, bem como a síntese química de substâncias biologicamente ativas com o propósito de encontrar-se novas moléculas com potencial uso terapêutico (CUNHA, 2012)

Contudo, atualmente, o uso empírico de preparações caseiras baseadas em plantas para o tratamento de enfermidades ainda é bastante significativo em várias comunidades. No Brasil, algumas infusões contendo folhas, caules e raízes de diferentes espécies de plantas são utilizadas para tratar condições dolorosas (DUTRA, 2016). Espécies da família Myrtaceae, como a *Myrtus communis*, têm demonstrado atividade hipoglicemiante em extrato hidroalcolico (ELFELLAH et al., 1984). De modo empírico, a *C. xanthocarpa*, que também é umas das espécies dessa família, tem sido usada para diminuir níveis de colesterol sanguíneo

(BALLVE, 1995). Estudos científicos recentes fundamentaram o uso popular da *C. xanthocarpa*, provando seus efeitos na redução dos níveis de colesterol, estresse oxidativo e em processos inflamatórios em pacientes hipercolesterolêmicos (VIECILI, 2014).

### **2.2.1 *Campomanesia xanthocarpa***

O Cerrado brasileiro possui grande extensão territorial com mais de 1,8 milhões de km<sup>2</sup>, possuindo variedades de clima, solos, animais e vegetais, com alta diversidade, sendo um importante bioma. Esse domínio inclui muitos ecossistemas, fazendo parte de vários estados brasileiros e representando cerca de 23% de todo o país, incluindo parte dos estados de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Piauí, Maranhão e São Paulo (COUTINHO, 2002).

A espécie *C. xanthocarpa*, da família Myrtaceae, conhecida popularmente como guabirobeira, nativa do Cerrado, é encontrada nos estados brasileiros de Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso do Sul até o Rio Grande do Sul e no nordeste da Argentina, Uruguai e Paraguai. Seu comprimento pode chegar em até 20 metros de altura, com caule apresentando de 30 a 50 centímetros de diâmetro, possuindo folhas membranáceas de 4 a 8 centímetros de comprimento por 3 a 5 centímetros de largura, de aspecto assimétrico. As folhas posicionam-se opostamente, são verde escuras na porção superior, e verde claras na inferior. No inverno, perde suas folhas, assim sendo chamada de decídua; além disto, a *C. xanthocarpa* é mesófito e heliófito produz flores, normalmente entre os meses de setembro a novembro, e frutos. As flores são de coloração branca, hermafroditas, compostas por cinco pétalas, são actinomorfas, ou seja, que podem ser divididas em várias partes iguais e são dispostas em ramos laterais, ou ainda, de forma solitária na axila das folhas. Os frutos amadurecem durante o período de novembro a dezembro, possuem formato arredondado, coloração alaranjada no estado maduro, podendo apresentar diâmetro de até 3 centímetros (REITZ, 1977; LORENZI, 1992; BALLVE, 1995). No interior do fruto são encontradas de 5 a 6 sementes pequenas (CRAVO, 2002).

### **2.2.2 *C. Xanthocarpa* e Compostos bioativos**

Estudos fitoquímicos utilizando extrato hidroalcolólico das folhas da *C. xanthocarpa* revelaram a presença de metabólitos secundários, tais como flavonoides e taninos (HARBORNE; WILLIAMS 2000; DA SILVA et al., 2016; DALASTRA et al., 2019).

### 2.2.2.1 Flavonoides

Flavonoides apresentam o componente estrutural 2- fenil-cromano, contendo pelo menos três hidroxilas fenólicas, sendo uma delas ligada a uma ose. Devido a oxigenação, esses são separados em três grupos: as flavonas (apegenina, luteolina), flavonóis (campferol, quercitina) e flavononas (naringenina, eriodictiol) (CUNHA, 2012).

De modo geral, os flavonoides possuem propriedades anti-inflamatória, antialérgica, hepatoprotetora, antiespasmódica, protetores de mucosa gástrica e antioxidante (SANDHAR et al., 2011; CUNHA, 2012). Os mecanismos moleculares envolvidos nas atividades anti-inflamatórias dos flavonoides incluem, inibição de enzimas pró-inflamatórias, tais como as enzimas ciclooxigenase-2 (COX-2), lipoxigenase e óxido nítrico sintase induzível (iNOS). Além disso, flavonoides foram capazes de 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 264.7, 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) tem sido apontada como possível mecanismo molecular envolvido na ação moduladora dos flavonoides sobre a atividade de citocinas. Assim, os flavonoides mostram atuar sobre diversos alvos na regulação de um processo inflamatório (KIM, 2004; SERAFINI et al., 2010). Estudos também demonstraram ações de vasodilatação pela inibição da proteína quinase C (PKC) ou de fosfodiesterases ou ainda pela diminuição do cálcio intracelular (DUARTE, 1993; FERGUSON, 2001).

### 2.2.2.2 Taninos

Taninos são compostos polifenólicos de alto peso molecular e com afinidade de ligação a proteínas. Os compostos taninos são divididos em dois grandes grupos, os hidrolisáveis (poliésteres de ácidos fenólicos) e os condensados, que se assemelham aos flavonoides (procianidinas). Em grande parte, as suas funções biológicas baseiam-se na capacidade desses compostos em formar ligações com macromoléculas, como as proteínas (enzimas digestivas, proteínas fúngicas ou virais) por meio de ligações reversíveis ou irreversíveis (CUNHA, 2012).

De modo geral, os taninos apresentam potenciais efeitos anticancerígenos, antimicrobianos, anti-helmíntico, antioxidantes, antimutagênicos, cardioprotetores, antitrombóticos e antialérgicos. Além disso, possuem ações imunomoduladoras e anti-

inflamatórias, por meio da inibição de citocinas pró-inflamatórias (AMAROWICZ, 2007; ZHANG et al., 2010; TIAN et al., 2012; PARK, 2013; SMERIGLIO, 2016). Outro fato é que os taninos precipitam alcaloides servindo como antídoto em intoxicações, podendo por isto, efetuar papéis de antimicrobianos e antifúngicos (MELLO; SANTOS, 2001; MONTEIRO et al., 2005).

Recentemente alguns estudos demonstraram que compostos contendo taninos funcionam como sequestradores de radicais livres (AMAROWICZ, 2007). Deste modo, esses compostos podem ser benéficos à saúde, pois patologias como esclerose múltipla, aterosclerose, câncer e até mesmo o envelhecimento são relacionadas a grandes quantidades intracelulares de radicais livres (MELLO; SANTOS, 2001).

### **2.3 Lactato Desidrogenase (LDH)**

Apesar de as espécies vegetais constituírem fontes importantes de inúmeros compostos bioativos com potencial uso terapêutico, muitas dessas substâncias podem exibir efeitos de toxicidade aos animais, incluindo o homem. Nesse sentido, estudos que investigam possíveis propriedades terapêuticas de derivados vegetais ou de substâncias isoladas devem, necessariamente, avaliar seus efeitos de citotoxicidade visando ao uso seguro e eficaz dessas preparações. Existem descritos na literatura vários ensaios para determinação de efeitos citotóxicos produzidos por diferentes substâncias em sistemas biológicos. Um desses ensaios é a quantificação da enzima lactato desidrogenase (LDH) em sobrenadantes de cultura de células.

A enzima LDH é encontrada no citoplasma de diferentes tipos de células. Quando ocorre morte celular e rompimento da membrana plasmática, a enzima é liberada para o meio extracelular e pode ser quantificada. Assim, a mensuração da atividade da enzima LDH em sobrenadantes de cultura de células constitui um método indireto para avaliar morte celular e, portanto, fenômeno de citotoxicidade (DECKER; MATTHES-LOHMANN, 1988).

De acordo com a literatura, a atividade da enzima LDH pode ser quantificada no soro ou outras amostras biológicas utilizando-se um método cinético espectrofotométrico. A enzima LDH catalisa a reação de redução do piruvato em lactato, utilizando a coenzima NADH como doador de equivalentes redutores. Assim, nessa reação, ocorre oxidação de NADH e isto resulta em decréscimo da absorvância da amostra em comprimento de onda ( $\lambda$ ) igual a 340 nm, a qual é proporcional à atividade da enzima. nas amostras. Esse ensaio foi utilizado em modelos experimentais utilizando células macrófagos, monócitos e NK e demonstrou ser uma

ferramenta adequada para avaliar a citotoxicidade (DECKER; MATTHES-LOHMANN, 1988; FOTAKIS; TIMBRELL, 2005).

Além disso, esse método foi eficiente para a determinar a citotoxicidade de compostos bioativos em células H460 tratadas com flavonoide morina e extrato da folha oliveira (*Olea europaea L.*) em várias concentrações (PEREIRA et al., 2015).

#### **2.4 Linhagem RAW 264.7**

Neste estudo, foi utilizada a linhagem celular *macrophage-like* RAW 264.7 para a determinação do potencial citotóxico do extrato aquoso da *C. xanthocarpa*. Essa linhagem de células foi estabelecida a partir de tumor induzido pelo vírus da leucemia murina de Abelson (RASCHKE et al, 1978) e representa um modelo para estudo *in vitro* das funções biológicas de macrófagos (ZHAN et al, 2018).

### 3 JUSTIFICATIVA

A espécie *C. xanthocarpa* contém flavonoides e outros metabólitos secundários com atividades biológicas diversas descritas na literatura, dentre elas ações anti-inflamatória e antioxidante. Contudo, até o presente momento, a literatura não dispõe de trabalhos que tenham avaliado o potencial anti-inflamatório do extrato aquoso liofilizado das folhas dessa importante espécie do Cerrado brasileiro sobre funções biológicas dos macrófagos no contexto de uma resposta inflamatória, como, por exemplo, a fagocitose e a produção de EROs e NO. Contudo, para investigar possível ação anti-inflamatória do referido extrato, em modelo experimental *in vitro* utilizando células RAW 264.7 (linhagem celular *macrophage-like* RAW 264.7), deve-se inicialmente determinar a sua citotoxicidade. Assim, este estudo contribuirá para a descoberta de novos compostos bioativos, os quais possam ser utilizados diretamente como instrumentos terapêuticos, ou, indiretamente, como modelos para a síntese de moléculas úteis no tratamento de doenças inflamatórias.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo Geral e Específico

Determinar a citotoxicidade do extrato aquoso das folhas da *C. xanthocarpa* em células da linhagem *macrophage-like* RAW 264.7, por meio do ensaio enzimático da lactato desidrogenase (LDH).

## 5 METODOLOGIA

### 5.1 Local de Execução

Os experimentos foram realizados nos Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais, Laboratório de Biofísica e Laboratório de Imunocitofisiologia da Reprodução, nos Departamentos de Farmacologia (DEFAR), Biofísica (DBIOF) e Departamento de Biologia Celular, Histologia e Embriologia (DBHEM), respectivamente, do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM) e na Rede de Laboratórios Multiusuários (RELAM) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

### 5.2 Material vegetal e obtenção do extrato aquoso da *Campomanesia xanthocarpa*

A espécie a partir da qual foram coletadas as folhas para a preparação do extrato aquoso da *C. xanthocarpa* (EACX) foi previamente identificada por biólogo competente e uma exsicata foi depositada no herbário da Universidade Federal de Uberlândia (Número de Registro HUFU 65525).

Neste estudo, as folhas da *C. xanthocarpa* foram coletadas em campos de vegetação espontânea em outubro/2018, no Sítio Primavera, Distrito Cruzeiro dos Peixotos, Uberlândia, MG (Coordenadas geográficas: 18°43'46,1'' S; 48°22'07,00'' W; Fonte: Google maps), e, gentilmente, cedidas pelo Prof. Dr. João Batista Ferreira dos Santos, da Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia. Posteriormente, as folhas foram transportadas para o Laboratório de Farmacologia Geral. Para a preparação do extrato aquoso, após a coleta, as folhas foram separadas dos galhos, destacadas dos pecíolos, e selecionadas apenas aquelas que, macroscopicamente, não apresentavam indicativos de contaminação por microrganismos. Em seguida, as folhas foram duplamente lavadas em água corrente e água destilada. Após esse procedimento, as folhas foram colocadas em estufa a 45 °C durante 48 horas para secagem. Depois de secas, as folhas foram trituradas em liquidificador e, em seguida, colocadas em proveta contendo água destilada na proporção de 10% (m/v). A extração foi realizada à temperatura ambiente, durante 48 horas. Posteriormente, o extrato foi filtrado, inicialmente 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 o

congelamento, o extrato foi liofilizado à  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  até a total remoção do conteúdo de água. O material obtido foi pesado e acondicionado em freezer a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  até a data da utilização.

### **5.3 Modelo experimental *in vitro***

#### **5.3.1 Cultura de células *macrophage-like* RAW 264.7**

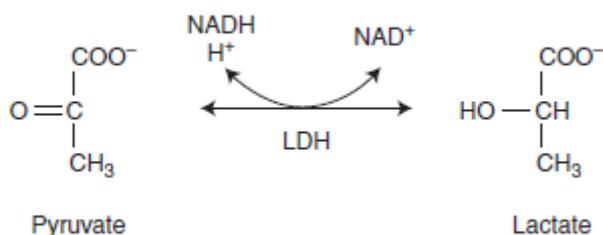
Foram utilizados macrófagos murinos da linhagem *macrophage-like* RAW 264.7, habitualmente armazenados em tanque nitrogênio líquido. No momento do uso, as células foram descongeladas à temperatura ambiente e adicionadas a tubo falcon com 10 mL de meio RPMI incompleto (sem SFB, soro fetal bovino). Em seguida, as células foram centrifugadas por 5 minutos, 1000.g,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . O sedimento foi ressuscitado em 5 mL 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, 2 mM de L-glutamina, 3 mM de bicarbonato de sódio, antibióticos (penicilina G a 100 U/mL e estreptomicina a 100 µg) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA) e 5% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, Brasil) inativado a  $56^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos, e incubadas em atmosfera úmida de 5% de CO<sub>2</sub> a  $37^{\circ}\text{C}$ . A manutenção foi feita por passagens seriadas, utilizando-se *cell scraper*, a cada dois dias com troca do meio RPMI-SFB.

#### **5.4 Análise da citotoxicidade do EACX em células RAW 264.7**

A toxicidade do EACX em células RAW 264.7 foi avaliada pela determinação da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) em sobrenadantes de cultura (LUCISANO-VALIM et al., 2002). Células RAW 264.7 foram cultivadas em placas de 96 poços ( $5 \times 10^4$  células/100 µL/poço) em atmosfera úmida de 5% de CO<sub>2</sub> a  $37^{\circ}\text{C}$ , por 22 horas. Em seguida, os sobrenadantes de cultura foram removidos, as células foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS), pH 7,1 e tratadas com diferentes concentrações do EACX (500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.812, 3.9, 1.953 µg/mL) após incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  e 5% de CO<sub>2</sub>, por mais 22 horas. A liberação basal de LDH foi determinada em sobrenadantes de células não tratadas com o extrato (grupo controle negativo; viabilidade celular 100%); a liberação máxima de LDH foi obtida pelo tratamento das células com Triton X-100 0,2% (controle positivo). Após o período de tratamento, os sobrenadantes livres de células foram coletados de poços

independentes, em quadruplicata, e armazenados em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ . A atividade de LDH liberada nos sobrenadantes foi quantificada usando-se um kit comercial para diagnóstico, seguindo-se as instruções do fabricante (LDH Liquiform, Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, Brasil) e expressa em U/L.

**Figura 1:** Reação catalisada pela enzima lactato desidrogenase. A enzima LDH catalisa a redução do piruvato a lactato, utilizando a coenzima NADH como doador de equivalentes redutores. No ensaio enzimático, a atividade da enzima é quantificada indiretamente por meio da redução da absorbância do NADH em comprimento de onda ( $\lambda$ ) igual a 340 nm.



Fonte: <http://cshprotocols.cshlp.org/>, 2018.

## 5.5 Análise Estatística

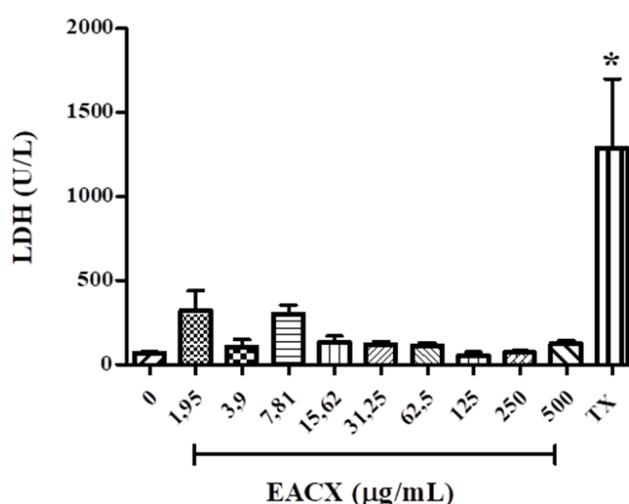
Para os cálculos estatísticos e confecção do gráfico foi utilizado o programa GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, EUA). Os dados foram expressos como a média  $\pm$  S.E.M (erro padrão da média) e analisados utilizando-se o teste ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Bonferroni para comparações múltiplas. Todos os resultados foram considerados significativos para um nível de  $p < 0,05$ .

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Citotoxicidade do EACX

A citotoxicidade induzida pelo EACX sobre células RAW 264.7 foi determinada pela atividade de LDH. Como mostrado na figura 1, os níveis de LDH foram significativamente aumentados em sobrenadantes de cultura de células RAW 264.7 tratadas com Triton X-100 a 0,2%, comparados aos níveis de LDH em sobrenadantes das células tratadas apenas com meio RPMI-SFB 5% ou de células tratadas com EACX, em todas as concentrações utilizadas ( $p < 0,0001$ ). Entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre os níveis de LDH quantificados em sobrenadantes de células tratadas apenas com o meio RPMI-SFB 5% e de células tratadas com as diferentes concentrações do EACX ( $p > 0,05$ ). Estes dados indicam que o EACX, nas concentrações avaliadas, não induz toxicidade sobre células RAW 264.7.

**Figura 2.** LDH liberada por macrófagos murinos da linhagem *macrophage-like* RAW 246.7. Células RAW 264.7 cultivadas em microplacas de 96 poços ( $5 \times 10^4$  células/100  $\mu\text{L}$ /poço) foram tratadas com EACX em diferentes concentrações (500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.812, 3.9, 1.953  $\mu\text{g/mL}$ ) e mantidas a 37 °C e 5% de  $\text{CO}_2$  por 24 horas. Em seguida, os sobrenadantes livres de células foram coletados de poços independentes. A liberação basal de LDH, correspondente à ausência de citotoxicidade, foi determinada em sobrenadantes de células não tratadas com o extrato (0  $\mu\text{g/mL}$ ); a liberação máxima de LDH foi obtida pelo tratamento das células com Triton X-100 0,2% (TX). Os dados estão expressos como média  $\pm$  SEM e são representativos de um experimento realizado em quadruplicata. \*Significância estatística entre a atividade LDH de células RAW 264.7 não tratadas ou tratadas com diferentes concentrações do EACX e o grupo controle TX (Teste ANOVA, *one-way analysis of variance*, seguido do teste Bonferroni para comparações múltiplas (\*\*\*)  $p < 0,0001$ ).



## 7 DISCUSSÃO

A citotoxicidade do EACX em células da linhagem macrophage-like RAW 264.7 foi obtida pelo ensaio de LDH.

Os dados obtidos sugerem que o EACX, nas concentrações utilizadas, não exibe citotoxicidade sobre células RAW 264.7.

Esses dados corroboram com estudos que avaliaram a citotoxicidade do extrato alcoólico das folhas e polpa da guabirobeira, nas concentrações 25, 50, 75 e 100 µg/mL, sobre células tumorais de córtex adrenal (linhagem H295R), utilizando o método tetrazólio de metiltiazol (MTT) e não observaram efeitos citotóxicos (DALASTRA, 2018). O extrato etanólico das folhas de outra espécie do mesmo gênero, *Campomansia adamantium*, utilizado para tratar células de osteosarcoma *in vitro*, também não apresentou ações citotóxicas avaliadas por meio do ensaio de MTT (SILVA, 2018; VIEIRA, 2020).

Um estudo utilizando a mesma linhagem de células *macrophage-like* RAW 264.7, pelo ensaio de MTT, demonstrou não existir atividade citotóxica do extrato aquoso da planta *Eugenia dysenterica*, pertencente à família Myrtaceae, a qual também inclui a *C. xanthocarpa* (SILVA, 2019).

Ademais, o ensaio de LDH foi eficaz para mensurar a viabilidade celular em linhagens de células neoplásicas (H460), quando tratadas com outros extratos vegetais, como o flavonoide morina em concentrações variadas (PEREIRA et al., 2015).

Diante do exposto, apesar de haver vários métodos para avaliação de efeitos citotóxicos mediados por vários compostos em diferentes modelos experimentais, como, por exemplo o ensaio de MTT (tetrazólio de metiltiazol) (MOSMANN, 1983), o método enzimático para determinação da atividade da enzima LDH (LUCISANO-VALIM et al., 2002) está bem estabelecido na literatura para esse objetivo.

A avaliação da citotoxicidade do EACX é de grande valia, pois possibilita determinarmos as doses que poderão ser utilizadas em estudos experimentais futuros. Além disto, a ausência de toxicidade observada pelo método enzimático de LDH sugere que o EACX, nas concentrações utilizadas, não contém compostos nocivos que interferem com a viabilidade de células RAW 264.7.

## 8 CONCLUSÃO

O EACX, nas diferentes concentrações utilizadas neste estudo, não produziu efeitos citotóxicos sobre a linhagem celular *macrophage-like* RAW 264.7.

## REFERÊNCIAS

- ABI ABDALLAH, D. S. et al. Toxoplasma gondii triggers release of human and mouse neutrophil extracellular traps. **Infect. Immun.** 80, 768–777, 2012.
- AKTAN, F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. **Life Sci.** 75, 639–653, 2004.
- AMAROWICZ, R. Tannins: the new natural antioxidants? **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 109, p. 549–551, 2007.
- BABIOR, B. M. NADPH oxidase: an update. **Blood**, Washington, v. 93, n. 5, p. 1464 – 1476, 1999.
- BABIOR, B. M. Phagocytes and oxidative stress. **American Journal of Medicine**, New York, v. 109, n. 1, p. 33-44, 2000.
- BAE, Y.S. et al. Regulation of reactive oxygen species generation in cell signaling. **Mol Cells**, 32: 491–509, 2011.
- BALLVE, A. C. et al. **Plantas medicinais de uso popular: atlas farmacognóstico**. Canoas: Ulbra, 205 p, 1995.
- BARTŁOMIEJ, T. et al. Evaluation of phenotypic and functional stability of RAW 264.7 cell line through serial passages. **PLoS One**, 13(6), 0198943, 11 jun. 2018.
- BEAUVILLAIN, C. et al. Neutrophils Efficiently Cross-Prime Naive T Cells in Vivo. **Blood**, 2007.
- BHATIA, S. et al. Rapid Host Defense against Aspergillus fumigatus Involves Alveolar Macrophages with a Predominance of Alternatively Activated Phenotype. **PLoS ONE** 6, e15943, 2011.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2006.
- BURDON, P. C. E. et al. Migration across the sinusoidal endothelium regulates neutrophil mobilization in response to ELR + CXC chemokines. **Br J Haematol.** 142:100–8, 2008.
- CHEUNG, D. O. Y. et al. Role of Pulmonary Alveolar Macrophages in Defense of the Lung against Pseudomonas aeruginosa. **Infect. Immun.** 68, 4585-4592, 2000.
- CHOUDHARY, M. I. et al. New inhibitors of ROS generation and T-cell proliferation from Myrtus communis. **Org. Lett**, v. 15, 1862–1865, 2013.
- COUTINHO, L. M. O bioma cerrado. In: **Eugen Warming e o cerrado brasileiro: um século depois**. São Paulo: UNESP, Imprensa Oficial do Estado, 77-128 p. 2002.
- CRAVO, A. B. **Frutas e ervas que curam: Panacéia Vegetal**. 2. ed. São Paulo: Hemus, 108 p. 2002.

- CUNNINGHAM, R. et al. Acidified nitrite: a host defence against colonization with *C. difficile* spores. **J Hosp Infect**, v. 86, 155-157, 2014.
- DA SILVA, E. R. S. et al. Anti-inflammatory Evaluation and Toxicological Analysis of *Campomanesia xanthocarpa* Berg. **Inflammation**. Aug;39(4):1462-8, 2016.
- DALASTRA, V. Avaliação química e biológica de compostos bioativos extraídos da Guabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa* Berg). Dissertação (**Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos**) - Universidade Federal da Fronteira Sul, Laranjeiras do Sul, 2018.
- DALASTRA, V. et al. Flavonoides presentes nos extratos da *campomanesia xanthocarpa* Berg. **Brazilian Journal Of Development**, v. 5, n. 7, p. 8983-8991, 2019.
- DECOURSEY, T. E.; LIGETI, E. Regulation and termination of NADPH oxidase activity. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 62, n. 19-20, p. 2173-2193, 2005.
- DING, J. et al. A pivotal role of endothelial-specific NF-kappaB signaling in the pathogenesis of septic shock and septic vascular dysfunction. **J. Immunol.** 183, 4031–4038, 2009.
- DECKER, T; MATTHES-LOHMANN, M. A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. **J. Immunol. Meth.** 15, 61-69, 1988.
- DUARTE, J. et. al. Vasodilatory effects of flavonoids in rat aortic smooth muscle. Structure activity relationships. **Gen. Pharmacol.**, 24, 857-62, 1993.
- DUTRA, R.C. 2016. Medicinal plants in Brazil: pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**. ano 2016, v. 112, p. 10, 17 jan. 2016.
- EHRT, S. et al. Reprogramming of the macrophage transcriptome in response to interferon-gamma and *Mycobacterium tuberculosis*: signaling roles of nitric oxide synthase-2 and phagocyte oxidase. **J Exp Med.** 194:1123-1140, 2001.
- ELFELLAH, M.S.; AKHTER, M.H.; KHAN, M.T. Anti-hyperglycaemic effect of an extract of *Myrtus communis* in streptozotocin-induced diabetes in mice. **Journal of Ethnopharmacology**. ed. 3, v. 11, p. 275-281, ago. 1984.
- FAURSCHOU, M.; BORREGAARD, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. **Microbes and Infection**, Paris, v. 5, n. 14, p. 1317-1327, 2003.
- FERGUSON, L. R. Role of plant polyphenols in genomic stability. **Mutation Research.**, v. 475, p. 89-111, 2001.
- FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letters**. 160, 171–177, 2005.
- FULLERTON, J.N.; D. W. GILROY, D. W. Resolution of inflammation: A new therapeutic frontier. **Nat. Rev Drug Discov.** 15, 551–567, 2016.

GEISSMANN, F. et al. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. **Science**, 327:656–661, 2010.

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

GREENLEE-WACKER, M. C. Clearance of apoptotic neutrophils and resolution of inflammation. **Immunol Rev**, 273, 357-370, 2016.

GUNN, A. et. al. The influence of nonnociceptive factors on hot-plate latency in rats. **J Pain**. 12:222–7, 2011.

GUO, W. et al. Imperatorin attenuates LPS-induced inflammation by suppressing NF- $\kappa$ B and MAPKs activation in RAW 264.7 macrophages. **Inflammation**, v. 35, 1764–1772, 2012.

GUNNETT, C. A. et al. Mechanisms of inducible nitric oxide synthase-mediated vascular dysfunction. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 25: 1617–1622, 2005.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, A. C. Advances in flavonoids research since 1992. **Phytochemistry**. ano 2000, v. 55, p. 487, 13 jan. 2000.

HATTORI, Y. et al. NO suppresses while peroxynitrite sustains NF- $\kappa$ B: A paradigm to rationalize cytoprotective and cytotoxic actions attributed to NO. **Cardiovasc. Res.** 63, 31–40, 2004.

HONG, C. et al. Coordinate regulation of neutrophil homeostasis by liver X receptors in mice. **J Clin Invest**. 122:337–47, 2012.

HUANG et al. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. **Nature**, 377: 239–242, 1995.

JUNIOR, V. F. V. et al. Plantas medicinais: cura segura? **Quím. Nova**, vol.28 no.3 São Paulo, 2005.

KARAM, T. K. et al. Carqueja (*Baccharis trimera*): utilização terapêutica e biossíntese, **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.15, n.2, p.280–286, 2013.

KARIN, M. NF- $\kappa$ B as a critical link between inflammation and cancer. **Cold Spring Harb Perspect Biol**. 1, 5, 2009.

KIM, H.P. et. al. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. **J. Pharm. Sci.**, 96, 229-45, 2004.

KITAGAWA, R. R. et al. Effect of the isocoumarin paepalantine on the luminol and lucigenin amplified chemiluminescence of rat neutrophils. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 26, n. 6, p. 905-908, 2003.

KOOGUCHI, K. et al. Role of alveolar macrophages in initiation and regulation of inflammation in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. **Infect. Immun.** 66, 3164-3169, 1998. KUMAR, P. et. al. Analysis of Cell Viability by the Lactate Dehydrogenase Assay. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**. 2018.

- KURIEN, B. T. et al. Oxidatively modified autoantigens in autoimmune diseases. **Free Radic Biol Med.** 41:549–556, 2006.
- LEONI, L. A. et al. Physical activity on endothelial and erectile dysfunction: A literature review. **Aging Male.** 4, 1–6, 2014.
- LOOD, C. et al. Neutrophil extracellular traps enriched in oxidized mitochondrial DNA are interferogenic and contribute to lupus-like disease. **Nat. Med.** 22, 146–153, 2016.
- LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas do Brasil.** São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 256 p. 1992.
- LUCISANO-VALIM, Y. M. et al. A simple method to study the activity of natural compounds on the chemiluminescence of neutrophils upon stimulation by immune complexes. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods.** 47:53-58, 2002.
- MACDONALD, J. et al. Oxidative stress and gene expression in sepsis. **Br. J. Anaesth.** 90, 221–232, 2003.
- MACMACKING, J.D. et al. Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. **Proc. Natl. Acad Sci U.S.A.** 94:5243-5248, 1997.
- MANICONE, A. M. et al. Epilysin (MMP28) restrains early macrophage recruitment in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. **J. Immunol.** 182, 3866-3876, 2009.
- MARKMAN, B. E. O. Caracterização farmacognóstica de *Campomanesia xanthocarpa*, Myrtaceae. 2002. 162 f. **Dissertação (Mestrado em Farmacognosia)** - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.
- MARKMAN, B. E. O. et al. Antiulcerogenic effects of *Campomanesia xanthocarpa*. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 94, nº 1, pp. 55–57, 2004.
- MASTROENI, P. et al. Antimicrobial actions of the NADPH phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase in experimental salmonellosis. II. Effects on microbial proliferation and host survival in vivo. **J. Exp Med.** 192:237-248, 2000.
- MELLO, J. P. C.; SANTOS, S. C. **Em Farmacognosia: da planta ao medicamento;** Simões, C. M. O.; Schenckel, E. P., orgs.; Ed. UFSC: Porto Alegre; 3ª ed., 2001.
- MERLY, L.; SMITH, S. L. Murine RAW 264.7 cell line as an immune target: are we missing something?, **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, 39:2, 55-58, 2017.
- MISHRA, B. B. et al. Nitric oxide prevents a pathogen-permissive granulocytic inflammation during tuberculosis. **Nat Microbiol.** 2:17072, 2017.
- MONTEIRO, J. M. et al. **Taninos: uma abordagem da química à ecologia.** São Paulo, Quím. Nova, v. 28, n.5, 2005.
- MOSKOVITCHENKO, J. F. COGNET, J.B. Classification of corticoids. **Ann Anesthesiol Fr**, 17(4): 399-405, 1976.

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.

MUSSO, G. et al. Specialized Proresolving Mediators: Enhancing Nonalcoholic Steatohepatitis and Fibrosis Resolution, **Trends Pharmacol Sci** 39, 387-401, 2018.

OLLER et al. Nitric oxide mediates aortic disease in mice deficient in the metalloprotease Adamts1 and in a mouse model of Marfan syndrome. **Nat Med**, 23: 200–212, 2017.

PARK, M. et al. 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.

PARK, J. et al. New Advances in Targeting the Resolution of Inflammation: Implications for Specialized Pro-Resolving Mediator GPCR Drug Discovery. **ACS Pharmacology and Translational Sciences**, 2020.

PAUTZ et al. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. **Nitric Oxide**, 23: 75–93, 2010.

PEREIRA, W. L. et al. Ação antiproliferativa do flavonoide morina e do extrato da folha de oliveira (*Olea europaea* L.) contra a linhagem de célula H460. **Rev. Bras. Pl. Med.** p.798-806, 2015.

PINTO, A. J. et al. Selective Depletion of Liver and Splenic Macrophages Using Liposomes Encapsulating the Drug Dichloromethylene Diphosphonate: Effects on Antimicrobial Resistance. **J. Leukoc. Biol.** 49, 579-586, 1991.

PULLAR, J. M. et al. Living with a killer: the effects of hypochlorous acid on mammalian cells. **IUBMB Life**, Philadelphia, v. 50, n. 4-5, p. 259-266, 2000.

QIAN, Q. et al. Elimination of mouse splenic macrophages correlates with increased susceptibility to experimental disseminated candidiasis. **J. Immunol.** 152, 5000-5008, 1994.

RASCHKE, W.C. et al. Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. **Cell**.15, 261–267, 1978.

ROSOWSKI, E. E. Determining macrophage versus neutrophil contributions to innate immunity using larval zebrafish. **Dis. Model. Mech.** 13, 2020.

SAITOH, T. et al. Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1. **Cell Host Microbe** 12. 109–116, 2012.

SANDHAR, H.K. et al. A Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. **Internationale Pharmaceutica Scientia**, v.1, n.1, p. 25–41, 2011.

SANT'ANNA, L. S. et al. Chemical Composition and Hypotensive Effect of *Campomanesia xanthocarpa*. **Hindawi Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. 11p, 2017.

- SEGAL, A. W. How neutrophils kill microbes. **Annu. Rev. Immunol.** 23, 197-223, 2005.
- SERAFINI, M. et al. Session 1: Antioxidants and the immune system, Flavonoids as anti-inflammatory agents, **Proceedings of the Nutrition Society.** 69, p. 273–278, 2010.
- SILVA, N. C. Citotoxicidade de extratos das folhas de gabirobeira (*Campomanesia adamantium*) em células de osteossarcoma in vitro. 2018. 52 f. Dissertação (**Mestrado em Ciência Animal**) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2018.
- SILVA, V. H. S. Avaliação da viabilidade celular e produção de óxido nítrico em células RAW 264.7 tratadas com extrato aquoso das folhas da *Eugenia dysenterica*. **Monografia de Biotecnologia** - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019.
- SMERIGLIO, A. et al. Proanthocyanidins and hydrolysable tannins: occurrence, dietary intake and pharmacological effects, **British Journal of Pharmacology**, 2016.
- SOOMRO, S. et al. Inhibitory Effects of Myrtucommuacetalone 1(MCA-1) from *Myrtus Communis* on Inflammatory Response in Mouse Macrophages. **Molecules**, 2019.
- TEJERO, J.; SHIVA, S.; GLADWIN, M.T. Gladwin, Sources of vascular nitric oxide and reactive oxygen species and their regulation, **Physiol. Rev.** 99. 311–379, 2019.
- TIAN, Y. et al. High molecular weight persimmon tannin is a potent antioxidant both ex vivo and in vivo. **Food Research International**, v. 45, p. 26–30, 2012.
- URBAN, C. F. et al. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. **Cell. Microbiol.** 8, 668–676, 2006.
- VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem. Biol. Interact.** 160, 1-40, 2006.
- VAROL, C. et al. Macrophages: Development and Tissue Specialization. **Annual Review of Immunology**, 33(1), 643–675, 2015.
- VARRICCHI, G. et al. Angiogenesis and lymphangiogenesis in inflammatory skin disorders. **J Am Acad Dermatol.** 73:144–53, 2015.
- VIECILI, P. R. et al. Effects of *Campomanesia xanthocarpa* on inflammatory processes, oxidative stress, endothelial dysfunction and lipid biomarkers in hypercholesterolemic individuals. **Atherosclerosis.** v. 234, p. 85-92, 2014.
- VIEIRA, V. S. Efeitos dos extratos de folhas *Campomanesia adamantium* e *Hymenaea martiana* Hayne sobre células de osteossarcoma canino e células endoteliais humanas. Dissertação (**Doutorado em Ciência Animal**) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2020.
- VISHAL, V. et al. A review on some plants having anti-inflammatory activity. **Journal of Phytopharmacology**, 2, 214–221, 2014.
- YATOO, M. I. et al. Anti-inflammatory drugs and herbs with special emphasis on herbal medicines for countering inflammatory diseases and disorders -a review. **Drug Discov.** 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, S. H. et al. Antioxidant tannins from stem bark and fine root of *Casuarina equisetifolia*. **Molecules**, v. 15, p. 5658-5670, 2010.