

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS-
IMUNOLOGIA E DOENÇAS INFECTO-PARASITÁRIAS**

Ari Sérgio de Oliveira Lemos

**PRODUTOS NATURAIS COM POTENCIAL TERAPÊUTICO: ESTUDOS DO
EFEITO NO ESTRESSE OXIDATIVO, NO PROCESSO INFLAMATÓRIO E EM
*Leishmania amazonensis***

Juiz de Fora

2023

Ari Sérgio de Oliveira Lemos

PRODUTOS NATURAIS COM POTENCIAL TERAPÊUTICO: ESTUDOS DO EFEITO NO ESTRESSE OXIDATIVO, NO PROCESSO INFLAMATÓRIO E EM *Leishmania amazonensis*

Tese de doutorado apresentada à banca examinadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Imunologia e Doenças Infecto Parasitárias como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor.

Orientadora: Profa. Dra. Elaine Soares Coimbra

Co-orientador: Prof. Dr. Rodrigo Luiz Fabri

Juiz de Fora

2023

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

de Oliveira Lemos , Ari Sérgio .
PRODUTOS NATURAIS COM POTENCIAL TERAPÊUTICO:
ESTUDOS DO EFEITO NO ESTRESSE OXIDATIVO, NO
PROCESSO INFLAMATÓRIO E EM *Leishmania amazonensis* / Ari
Sérgio de Oliveira Lemos . -- 2023.
148 p. : il.

Orientadora: Elaine Soares Coimbra
Coorientador: Rodrigo Luiz Fabri
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto
de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Imunologia e Genética, 2023.

1. Produtos Naturais. 2. Leishmaniose. 3. Inflamação. 4. Estresse
Oxidativo. I. Soares Coimbra , Elaine , orient. II. Luiz Fabri, Rodrigo ,
coorient. III. Título.

Ari Sérgio de Oliveira Lemos

PRODUTOS NATURAIS COM POTENCIAL TERAPÊUTICO: ESTUDOS DO EFEITO NO ESTRESSE OXIDATIVO, NO PROCESSO INFLAMATÓRIO E EM *Leishmania amazonensis*

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas. Área de concentração: Imunologia & Doenças infectoparasitárias.

Aprovada em 01 de março de 2023.

BANCA EXAMINADORA

Profª. Drª. Elaine Soares Coimbra - Orientadora

Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF

Prof. Dr. Rodrigo Fabri - Coorientador

Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF

Profª. Drª. Luciana Moreira Chedier

Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF

Profª. Drª. Luciana Maria Ribeiro Antinarelli

Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF

Profª. Drª. Patrícia de Almeida Machado

Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde de Juiz de Fora - FCMS/JF

Drª. Juliana Trindade Granato

Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ

Juiz de Fora, 01/03/2023.



Documento assinado eletronicamente por **Elaine Soares Coimbra, Professor(a)**, em 01/03/2023, às 13:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciana Antinarelli, Servidor(a)**, em 01/03/2023, às 13:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Patrícia de Almeida Machado, Usuário Externo**, em 01/03/2023, às 13:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Juliana da Trindade Granato, Usuário Externo**, em 01/03/2023, às 13:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciana Moreira Chedier, Professor(a)**, em 01/03/2023, às 13:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Luiz Fabri, Professor(a)**, em 01/03/2023, às 13:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **1167366** e o código CRC **FDC61FED**.

DEDICO

Aos meus queridos pais: Nilson Balbino de Lemos e Adilsa
Gonçalves de Oliveira Lemos por todo incentivo e amor em toda
a minha trajetória de vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a DEUS por ter me guiado, iluminado e me dado forças em toda a trajetória da minha vida.

Aos meus pais, pelo amor incondicional e por sempre lutarem para me dar um futuro melhor.

Aos meus irmãos, Ariane e Arivelton por todo o apoio em minha caminhada.

Agradeço a minha orientadora Profa. Dra. Elaine Soares Coimbra, por ter compartilhado comigo seus conhecimentos com paciência e incentivo.

Agradeço ao meu Co-orientador Prof. Dr. Rodrigo Luiz Fabri, do Departamento de Bioquímica, pelos conhecimentos, amizade e inúmeros conselhos.

A todos do Laboratório de Produtos Naturais e Bioativos que contribuíram, de forma direta e indireta, para a realização dos meus trabalhos. Em especial: Lara, Matheus, Priscila, Olívia, Thalita, Thayná e Lucas.

A todos do Laboratório de parasitologia que me receberam e que contribuíram para a realização da atividade antileishmanial. Em especial a Juliana, Patrícia e Luciana

Agradeço aos funcionários e amigos do Departamento de Bioquímica e do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, em especial ao Delfino e a Cristina, que sempre se mostraram eficientes para solucionar qualquer problema no laboratório.

À Plataforma de Metodologia Analítica de Farmanguinhos/FIOCRUZ, pelas análises cromatográficas e espectrométricas realizadas nesse estudo.

À CAPES pela bolsa concedida.

À Coordenação do curso de Pós-Graduação.

E a todos que me apoiaram neste trabalho.

“Se fosse fácil achar o caminho das pedras, tantas pedras no caminho não seriam ruim”
(Engenheiros do Hawaii)

RESUMO

Lantana camara L. e *Mitracrapus frigidus* são espécies com um amplo espectro de bioatividades e apresentam uma grande variedade de metabolitos secundários. Entretanto, ainda existem poucos estudos em relação as atividades antileishmanial, antioxidante, anti-inflamatória e citotóxica dessas espécies. Logo, o objetivo deste trabalho foi investigar afundo a atividade antileishmanial, citotóxica, antioxidante e anti-inflamatória de diferentes extratos dessas espécies. Os extratos de *L. camara* foram produzidos por meio de maceração estática utilizando solventes com ordem crescente de polaridade. O extrato em diclorometano de folhas de *M. frigidus* foi obtido por partição líquido-líquido e o extrato aquoso por infusão seguida de liofilização. Primeiramente os extratos foram testados contra formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis*, macrófagos peritoneais murinos, eritrócitos humanos, teste do DPPH e tiveram seus teores de substâncias fenólicas e terpenos mensurados. Os extratos de *L. camara* foram mais ativos e seletivos para a atividade antileishmanial, apresentaram altos teores de terpenos e atividade hemolítica. Já os extratos de *M. frigidus* apresentaram as melhores atividades antioxidantes, ausência de potencial hemolítico e os maiores teores de substâncias fenólicas. Posteriormente, o extrato etanólico de folhas de *L. camara* (LCE) foi selecionado para a realização do fracionamento e purificação de substâncias com potencial antileishmanial, onde foi observado que LCE apresenta maior atividade biológica e/ou menor toxicidade que suas frações e composto puro. Diante do resultado anterior, LCE teve o seu mecanismo de ação investigado por meio de diferentes ensaios e foi caracterizado por *UFLC-QTOF-MS*. LCE induziu estresse oxidativo e causou alterações na mitocôndria, metabolismo lipídico, núcleo e cinetoplasto de formas promastigotas de *L. amazonensis*, conduzindo a morte celular principalmente por apoptose-like. Além disso, LCE aumentou os níveis de NO em macrófagos infectados com formas amastigotas. LCE apresentou em sua composição triterpenos, flavonoides, iridoides e terpenos glicosilados. Em relação à atividade anti-inflamatória, o extrato aquoso de *M. frigidus* (MFAq) foi selecionado devido a sua melhor atividade antioxidante. MFAq foi caracterizado por *UFLC-QTOF-MS* e teve seu potencial antioxidante investigado mais a fundo. MFAq foi investigado por meio de testes *in vitro*, *in silico* e *in vivo*. Além disso, esse extrato teve seu potencial citotóxico investigado mais a fundo em macrófagos peritoneais murinos e da linhagem J774A.1. MFAq demonstrou uma promissora atividade antioxidante em todos os testes realizados, não causou alterações citotóxicas nas linhagens de macrófagos testados. Os testes *in vitro* demonstraram que MFAq foi capaz de reduzir a produção de NO, TGF- β , PGE₂ e corpúsculos lipídicos em macrófagos estimulados com LPS e IFN- γ . MFAq apresentou a presença de flavonoides, alcaloides, dissacarídeos, ácidos fenólicos e quinonas glicosiladas. A análise *in silico* revelou que rutina e ácido clorogênico presentes em MFAq são inibidores promissores da ciclo-oxigenase 2 (COX-2). Os resultados demonstram que o potencial antileishmanial dos extratos de *L. camara* pode estar relacionado aos teores de terpenos encontrados, dentre eles o ácido ursólico, e que essas substâncias provavelmente agem por meio de sinergia, uma vez que LCE demonstra uma atividade biológica mais promissora que suas frações/composto puro. A atividade anti-inflamatória de MFAq também está relacionada com as substâncias químicas encontradas e provavelmente tem correlação com a presença de substâncias fenólicas.

Palavras chaves: Produtos Naturais, Leishmaniose, Inflamação, Estresse Oxidativo

ABSTRACT

Lantana camara L. and *Mitracrapus frigidus* are species with a broad spectrum of bioactivities and present a wide variety of secondary metabolites. However, there are still few studies regarding the antileishmanial, antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic activities of these species. Therefore, the objective of this work was to investigate the antileishmanial, cytotoxic, antioxidant and anti-inflammatory activities of different extracts of these species. The extracts of *L. camara* L were produced by static maceration using solvents with increasing order of polarity. The dichloromethane extract of *M. frigidus* leaves was obtained by static maceration and the aqueous extract by infusion followed by lyophilization. First the extracts were tested against promastigotes and amastigotes of *L. amazonensis*, murine peritoneal macrophages, human erythrocytes, DPPH test and had their content of phenolic substances and terpenes measured. The extracts of *L. camara* L. were more active and selective for antileishmanial activity, presented high contents of terpenes and hemolytic activity. The extracts of *M. frigidus* showed the best antioxidant activities, absence of hemolytic potential and the highest contents of phenolic substances. Subsequently, the ethanolic extract of *L. camara* L. leaves (LCE) was selected for fractionation and purification of substances with antileishmanial potential, where it was observed that LCE presents higher biological activity and/or lower toxicity than its fractions. Given the previous result, LCE had its mechanism of action investigated by different assays and was characterized by *UFLC-QTOF-MS*. LCE induced oxidative stress and caused alterations in mitochondria, lipid metabolism, nucleus and kinetoplast of *L. amazonensis* promastigotes, leading to cell death mainly by apoptosis-like. In addition, LCE increased NO levels in macrophages infected with amastigote forms. LCE presented in its composition triterpenes, flavonoids, iridoids, and glycosylated terpenes. Regarding anti-inflammatory activity, the aqueous extract of *M. frigidus* (MFAq) was selected due to its better antioxidant activity. MFAq was chemically characterized by means of *UFLC-QTOF-MS* and had its antioxidant potential further investigated. The anti-inflammatory pot

ential of MFAq was investigated by *in vitro*, *in silico* and *in vivo* tests. In addition, this extract had its cytotoxic potential further investigated in murine peritoneal macrophages and the J774A.1 cells. MFAq showed a promising antioxidant activity in all the tests performed, causing no cytotoxic changes in the macrophages strains tested. The *in vitro* anti-inflammatory tests demonstrated that MFAq was able to reduce the production of NO, TGF- β , PGE₂ and lipid bodies in macrophages stimulated with LPS and IFN- γ . Chemical characterization revealed the presence of flavonoids, alkaloids, disaccharides, phenolic acids and glycosylated quinones. *In silico* analysis revealed that rutin and chlorogenic acid present in MFAq are promising inhibitors of cyclooxygenase 2 (COX-2) and make hydrogen bonds with residues present in the catalytic site of this enzyme. The results demonstrate that the antileishmanial potential of *L. camara* L. extracts may be related to the terpene contents found, among them ursolic acid, and that these substances probably act through synergy, since LCE shows a more promising biological activity than its pure fractions/compound. The anti-inflammatory activity of MFAq is also related to the chemicals found and probably correlates with the presence of phenolic substances.

Keywords: Natural Products, Leishmaniasis, Inflammation, Oxidative Stress

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Relação entre a produção de espécies reativas de oxigênio e o desenvolvimento do câncer.....	21
Figura 2- Estrutura química do núcleo dos flavonoides mostrando a diversas posições em que podem ser inseridas as hidroxilas e outras substituições.....	22
Figura 3- Fases de migração leucocitária destacando a presença das citocinas, quimiocinas, integrinas e moléculas de adesão.....	24
Figura 4- Ciclo biológico dos parasitos do gênero <i>Leishmania</i> spp.....	27
Figura 5- Figura ilustrativa da espécie <i>Mitracarpus frigidus</i>	29
Figura 6 - Estruturas químicas das substâncias identificadas e/ou isoladas na espécie <i>Mitracarpus frigidus</i>	31
Figura 7- Imagem de <i>Lantana camara</i> L.....	33
Figura 8- Avaliação da atividade hemolítica em eritrócitos humanos dos diferentes extratos de <i>Lantana camara</i> L. e <i>Mitracarpus frigidus</i>	56
Figura 9- Avaliação da atividade antileishmanial do extrato etanólico de folhas de <i>Lantana camara</i> L.....	65
Figura 10- Avaliação das alterações morfológicas nas formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> após tratamento com o extrato etanólico de folhas de <i>Lantana camara</i> L.....	77
Figura 11- Microscopia eletrônica de varredura das formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> após tratamento com o extrato etanólico de folhas de <i>Lantana camara</i> L. (LCE).....	79
Figura 12- Microscopia eletrônica de transmissão das formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> após tratamento com o extrato etanólico de folhas de <i>Lantana camara</i> L. (LCE).....	80
Figura 13 - Avaliação das alterações no metabolismo lipídico de formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com o extrato etanólico de folhas de <i>Lantana camara</i> L.....	82
Figura 14- Avaliação da indução de EROS e da perda do potencial de membrana mitocondrial em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> nos tempos de 12 e 24h.....	84
Figura 15- Dosagem do número de grupos tiol nas formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com LCE nos valores de CI_{50} e duas vezes a CI_{50} no tempo de 12h utilizando DTNB.....	85
Figura 16- Avaliação da integridade de membrana plasmática em formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com LCE nos valores de CI_{50} e duas vezes a CI_{50} utilizando iodeto de propídeo.....	86
Figura 17- Avaliação da exposição de fosfatidilserina em formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> utilizando anexina V e iodeto de propídeo.....	87
Figura 18- Porcentagem de células marcadas com anexina V e iodeto de propídeo.....	88

Figura 19- Avaliação da indução de NO em macrófagos infectados com as formas amastigotas e tratados com as diferentes concentrações do extrato etanólico de folhas de *Lantana camara* L..... 89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Avaliação da atividade antileishmanial e da citotoxicidade celular dos diferentes extratos de <i>Lantana camara</i> L. e <i>Mitracarpus frigidus</i>	55
Tabela 2- Avaliação da atividade antioxidante e dosagem dos teores de terpenos e fenólicos totais dos diferentes extratos de <i>Lantana camara</i> L. e <i>Mitracarpus frigidus</i>	57
Tabela 3- Compostos identificados no extrato etanólico das folhas de <i>Lantana camara</i> L. (LCE) utilizando <i>UFLC-QTOF-MS</i> em ESI (+)	74
Tabela 4 - Avaliação da atividade antileishmanial e da citotoxicidade celular das frações que apresentaram maior rendimento após fracionamento do extrato etanólico de folhas de <i>Lantana camara</i> L.	76

LISTA DE ABREVIATURAS

AINES	Anti-inflamatórios Não Esteroidais
BOD	Do inglês: <i>Biochemichal Oxygen Demand</i> (Demanda bioquímica de Oxigênio)
CC₅₀	Concentração citotóxica para 50% da população de células
CEUA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CLAE-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de fotodiodo
COX	Ciclo-oxigenase
CTE	Cadeia de transporte de elétrons
DCF	2', 7' – diclorofluoresceína
DMSO	Dimetilsulfóxido
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
FCCP	Carbocianeto-4-(trifluorometoxi)-Fenilhidrazona
HCl	Ácido clorídrico
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
IP	Iodeto de Propídeo
IS	Índice de seletividade
J774A.1	Linhagem de Macrófagos Murinos
MTT	3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NO	Óxido Nitrico
PBS	Do inglês: <i>Phosphate buffer Solution</i> (Solução tampão de fosfato)
RFP	Do inglês: <i>Red fluorescent protein</i> (Proteína vermelho Fluorescente)
RNA	Do inglês: <i>Ribonucleic acid</i> (ácido ribonucleico)
SFB	Soro Fetal Bovino
TLR	<i>Toll Like Receptor</i>
UV	Ultravioleta
WHO	Word healt organization

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1 Radicais livres e substâncias antioxidantes.....	20
2.2 Processo inflamatório.....	23
2.3 Leishmaniose Cutânea.....	26
2.4 <i>Mitracarpus frigidus</i> (Willd. Ex Roem. Schult.) K. Schum.....	29
2.5 <i>Lantana camara</i> L.....	32
3. REFERÊNCIAS.....	35
4. DIVISÃO DOS CAPÍTULOS.....	43
5. CAPÍTULO 1- AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, HEMOLÍTICA, CITOTÓXICA E ANTILEISHMANIAL DE DIFERENTES EXTRATOS DE <i>Lantana camara</i> L. E <i>Mitracarpus frigidus</i>	43
5.1. OBJETIVOS.....	43
5.1.1 Objetivo geral.....	43
5.1.2 Objetivos específicos.....	43
5.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
5.2.1 Material vegetal.....	45
5.2.2 Preparação dos diferentes extratos das folhas de <i>Lantana camara</i> L.....	45
5.2.3 Preparação do extrato aquoso e em diclorometano de partes aéreas de <i>Mitracarpus frigidus</i>	45
5.2.4 Cultivo dos parasitos.....	46
5.2.5 Manutenção da infectividade das linhagens de <i>L. amazonensis</i>	46
5.2.6 Avaliação da toxicidade dos extratos em promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	47
5.2.7 Avaliação da toxicidade dos extratos em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c.....	48
5.2.8 Avaliação da toxicidade dos compostos em amastigotas intracelulares de <i>L. amazonensis</i>	49
5.2.9 Determinação do índice de seletividade (IS) dos extratos.....	50
5.2.10 Avaliação da toxicidade de em eritrócitos humanos.....	50
5.2.11. Determinação da atividade antioxidante por meio do método de sequestro de radicais livres (DPPH•).....	51

5.2.12 Determinação do conteúdo de compostos fenólicos.....	52
5.2.13 Determinação do conteúdo de terpenos.....	52
5.2.14 Análise estatística.....	53
5.3 RESULTADOS.....	54
5.3.1 Avaliação da atividade antileishmanial e citotoxicidade em macrófagos peritoneais de camundongos.....	54
5.3.2 Avaliação da atividade hemolítica em eritrócitos humanos.....	55
5.3.3 Avaliação da atividade antioxidante e determinação dos teores de terpenos e fenólicos totais.....	56
5.4 DISCUSSÃO.....	58
5.5 CONCLUSÃO.....	61
5.6 REFERÊNCIAS.....	62
6. CAPITULO 2- PURIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS E AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO ANTILEISHMANIAL DO EXTRATO ETANÓLICO DE <i>Lantana camara</i> L.....	64
6.1 Seleção dos extratos mais promissores para o estudo do mecanismo de ação antileishmanial e da atividade antioxidante e anti-inflamatória.....	64
6.2. OBJETIVOS.....	66
6.2.1 Objetivo geral.....	66
6.2.2 Objetivos específicos.....	66
6.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	67
6.3.1 Caracterização química por <i>UFLC-QTOF-MS</i>	67
6.3.2 Fracionamento.....	67
6.3.3 Avaliação da atividade antileishmanial e citotoxicidade.....	67
6.3.4 Estudo do mecanismo de ação antileishmanial.....	68
6.3.4.1 Avaliação da morfologia pela microscopia óptica de promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	68
6.3.4.2 Avaliação morfológica utilizando Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) de formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	68
6.3.4.3 Avaliação da alteração em metabolismo lipídico em promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	69

6.3.4.4 Determinação do conteúdo de ergosterol em formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	69
6.3.4.5 Avaliação da alteração do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) em promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	70
6.3.4.6 Avaliação dos níveis da produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) em promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	70
6.3.4.7 Avaliação dos níveis de tiol em formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	71
6.3.4.8 Avaliação da integridade da membrana em promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	72
6.3.4.9 Avaliação da exposição da fosfatidilserina em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> PH8.....	72
6.3.4.10 Determinação dos níveis de óxido nítrico (NO) em macrófagos infectados com <i>L. amazonensis</i>	73
6.4. Análise estatística.....	73
7. RESULTADOS.....	74
7.1 Caracterização química.....	74
7.2 Purificação de substâncias presentes em LCE e biomonitoramento da atividade antileishmanial.....	75
7.3 Estudo do mecanismo de ação de LCE em <i>L. amazonensis</i>.....	77
7.3.1 Alterações morfológicas em formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	77
7.3.2 Avaliação das alterações morfológicas por MEV e MET.....	78
7.3.3 Alterações do metabolismo lipídico em formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	81
7.3.4 Avaliação da indução de EROS e perda do potencial de membrana mitocondrial em formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	83
7.3.5 Avaliação da atividade na tripanotona redutase em formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	85
7.3.6 Avaliação da integridade de membrana em formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	86
7.3.7 Avaliação do tipo de morte celular em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> induzida pelo tratamento com LCE.....	87

7.3.8 Avaliação da indução de oxido nítrico (NO) em macrófagos infectados por amastigotas de <i>L. amazonensis</i>	88
8. DISCUSSÃO.....	90
9. CONCLUSÃO.....	96
10. REFERÊNCIAS.....	97
11. CAPITULO 3- AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIA DE <i>Mitracarpus frigidus</i>.....	101
11.1. OBJETIVOS.....	101
11.1.1 Objetivo geral.....	101
11.1.2 Objetivos específicos.....	101
11.2 ARTIGO 1.....	102
11.3 ARTIGO 2.....	131
12.ANEXOS.....	145
12.1 ANEXO I – Parecer CEUA.....	145
12.2 ANEXO II – Parecer CEUA.....	146
12.3 ANEXO III – Parecer CEUA.....	147
12.4 ANEXO IV – Parecer Consubstanciado do CEP.....	148

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são classificadas como Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) pela Organização Mundial de Saúde (OMS), uma vez que, apesar do grande número de pessoas infectadas, não despertam a atenção de órgãos públicos da saúde bem como de grandes corporações farmacêuticas devido o baixo retorno econômico (WHO, 2018). As leishmanioses atingem aproximadamente 98 países e territórios, com 12 milhões de indivíduos infectados e estima-se que 1,5 a 2 milhões de pessoas desenvolvam a doença anualmente (WHO, 2018). Na América Latina, o Brasil contribui com maior número de casos (OPAS, 2017). Elas podem causar desde simples lesão cutânea, a formas desfigurantes como a cutâneo-mucosa ou a forma visceral, considerada fatal se não tratada. O tratamento é reduzido a poucos medicamentos, com efeitos adversos graves (WHO, 2018).

Uma das características das leishmanioses é o processo inflamatório. Neste caso, a inflamação é um mecanismo de defesa imunológico que o organismo utiliza para combater o agente patogênico. Esse processo libera mediadores químicos no tecido acometido, incluindo aminoácidos excitatórios, espécies reativas de oxigênio (EROS), peptídeos, lipídios e citocinas (CHEN et al., 2016). A produção de radicais livres gerada pelo processo inflamatório, pode ainda por sua vez, causar danos celulares e teciduais, ocasionando o surgimento de lesões inflamatórias e faz com que haja a necessidade de buscar-se substâncias antioxidantes que ajudem a prevenir a inflamação derivada dos processos infecciosos (ARULSELVAN et al., 2016; CONNER; GRISHAM, 1996).

Além disso, a pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos é algo fundamental e, segundo o Ministério da Ciência e Tecnologia do Brasil, esta é uma área estratégica para a independência e desenvolvimento do país (ICQT, 2018). Mais interessante ainda seria se este fármaco pudesse ter amplo espectro de bioatividades, uma vez que essa característica poderia auxiliar no tratamento de pacientes que possuem mais de uma patologia.

Diante do exposto acima, é relevante a busca de novas formas alternativas de tratamento que possam curar ou controlar as enfermidades citadas. Dentro deste contexto, encontram-se os produtos naturais, os quais podem ser considerados como uma alternativa de baixo custo e mais acessível para populações (NEWMAN, 2017). Também, visto nosso grupo de pesquisa já ter resultados preliminares com alguns extratos vegetais, o presente estudo visou avaliar as

atividades citotóxica, antioxidante, anti-inflamatória e antileishmanial de produtos naturais oriundos das espécies *Mitracarpus frigidus* (Willd. Ex Roem. Schult.) K. Schum e *Lantana camara* L.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Radicais livres e substâncias antioxidantes

Os radicais livres são átomos ou moléculas muito instáveis contendo um ou mais elétrons desemparelhados em sua camada de valência (PHANIENDRA; JESTADI; PERIYASAMY, 2015). Eles reagem rapidamente com outros compostos tentando capturar o elétron necessário para ganhar estabilidade, reagindo com as moléculas estáveis mais próximas, "roubando", assim, seus elétrons. Isto faz com que as moléculas anteriormente estáveis se tornem radicais livres, o que inicia uma reação em cascata, que pode culminar na lise celular (ELKHATEEB; ALSHAMMARY, 2017).

Tais radicais são derivados de processos metabólicos de organelas (mitocôndrias, peroxissomos e retículo endoplasmático) presentes em células do corpo humano, sendo as células fagocíticas do sistema imune um dos principais perfis celulares a produzi-las. Contudo, a produção desses radicais não está atrelada apenas a mecanismo endógeno do organismo, eles também podem ser derivados de fontes externas como exposição a raios-X, consumo de álcool e cigarro, exposição a metais pesados, metais de transição, solventes industriais, pesticidas, drogas como o paracetamol, poluentes atmosféricos e produtos químicos industriais (LOBO et al., 2010; PHANIENDRA; JESTADI; PERIYASAMY, 2015).

Em concentrações baixas a moderadas, os radicais livres funcionam em processos celulares fisiológicos, mas em altas concentrações causam danos a componentes celulares como lipídios, proteínas e DNA (Figura 1) (BIRBEN et al., 2012). Desta forma, a grande quantidade desses radicais leva ao chamado estresse oxidativo, favorecendo o surgimento de diversas doenças humanas (MOO-HUCHIN et al., 2015). O corpo humano possui substâncias antioxidantes endógenas como as enzimas superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione redutase ou compostos não enzimáticos, como ácido úrico, bilirrubina e albumina (PISOSCHI; NEGULESCU, 2011). Entretanto, quando as defesas do organismo

falham, podem ocorrer efeitos deletérios ao corpo humano, uma vez que sua capacidade antioxidante está intimamente ligada à saúde. Assim, o desequilíbrio entre a produção de radicais livres e os mecanismos antioxidantes endógenos pode ocasionar o surgimento de diversas patologias, tais como câncer, distúrbios neurológicos, aterosclerose, hipertensão, isquemia, perfusão, diabetes, fibrose pulmonar idiopática, doença pulmonar obstrutiva crônica e asma (BIRBEN et al., 2012; ZHANG; LIU; LIU, 2014).

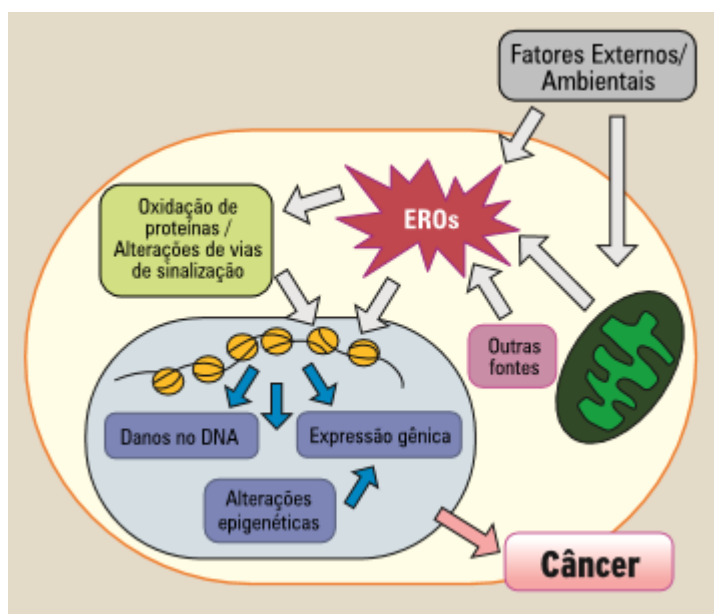


Figura 1- Relação entre a produção de espécies reativas de oxigênio e o desenvolvimento do câncer.
Fonte: SILVA; JASIULIONIS, 2014.

Quando as defesas endógenas não podem assegurar uma proteção completa do organismo contra os radicais livres, surge a necessidade de antioxidantes exógenos, como suplementos nutricionais ou produtos farmacêuticos, que contenham como princípio ativo um ou mais compostos antioxidantes (PISOSCHI; NEGULESCU, 2011). Neste contexto, o uso de substâncias de origem naturais como vitamina C, vitamina E, polifenóis e carotenoides tem ganhado destaque, uma vez que alguns antioxidantes sintéticos amplamente utilizados como o Butil hidroxianisol (BHA), Butil hidroxitolueno (BHT) e tert-butil-hidroquinona (TBHQ) já foram associados ao desenvolvimento de processos carcinogênicos e lesões hepáticas em estudos *in vivo* (HATAMIA et al., 2014; NIMSE; PAL, 2015).

Dentre os antioxidantes exógenos de origem natural, podemos destacar os flavonoides, uma importante classe de substâncias polifenólicas com mais de 10.000 estruturas diferentes,

cujo estrutura básica está apresentada na Figura 2 (BRUNETTI et al., 2013). Estes metabólitos estão presentes comumente nos vegetais e apresentam uma ampla variedade de atividades farmacológicas (PANCHE; DIWAN; CHANDRA, 2014), tais como anti-inflamatória (AMBRIZ-PÉREZ et al., 2016), antitumoral (AL-RIMAWI et al., 2016) e infecções causadas por patógenos (ALVES et al., 2014), as quais, por sua vez, acredita-se estarem associadas às suas propriedades antioxidantes (LIMA; BEZERRA, 2012).

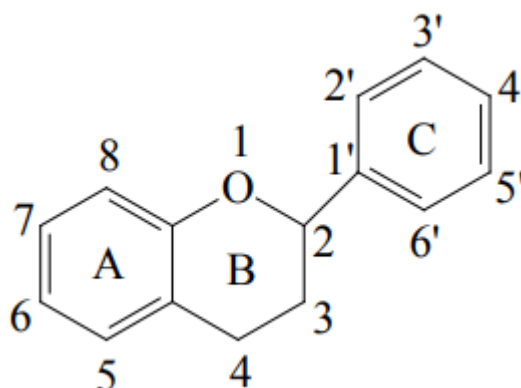


Figura 2- Estrutura química do núcleo dos flavonoides mostrando as diversas posições em que podem ser inseridas as hidroxilas e outras substituições.

Os flavonoides possuem modos abrangentes de combater os radicais livres, capazes de eliminar essas moléculas através da doação de elétrons, supressão de enzimas associadas à sua geração e estimulação de enzimas antioxidantes internas que irão combater a produção desses radicais (BANJARNAHOR; ARTANTI, 2014). A capacidade de doação de elétrons pelos flavonoides está relacionada com a presença e o número de hidroxilas ligadas a seus anéis aromáticos (LIN et al., 2014). As hidroxilas livres podem doar seus átomos de hidrogênios para um radical livre e estabilizá-lo, gerando, assim, o radical fenoxil flavonoide, que é relativamente estável. Posteriormente, esta molécula estável pode reagir com um segundo radical, doando mais um hidrogênio e adotando, ainda, uma estrutura estável de quinona (BANJARNAHOR; ARTANTI, 2014).

Em relação a estrutura atividade antioxidante, a presença das hidroxilas nas posições de C-3' e C- 4' no anel B dos flavonoides conduz ao aumento da atividade antioxidante, enquanto que a presença de açúcares leva a uma perda dessa atividade. Isto faz com que os flavonoides glicosilados tenham uma menor atividade em relação às agliconas, refletindo que,

a capacidade antioxidante depende principalmente do número de hidroxilas fenólicas e depende pouco das hidroxilas presentes nos açúcares (LIN et al., 2014).

2.2 Processo inflamatório

A inflamação é um processo complexo em que várias células e moléculas desempenham papéis diferentes de uma maneira coordenada e controlada. Geralmente é um processo benéfico ao organismo, sendo um mecanismo de defesa vital, uma vez que representa uma das primeiras barreiras contra agente agressores externos e distúrbios internos (CHEN et al., 2018). No entanto, quando o processo inflamatório persiste no organismo, ele pode se tornar crônico e levar ao surgimento de várias doenças degenerativas como câncer, diabetes, doenças autoimunes e doenças cardiovasculares (BAIZABAL-AGUIRRE et al., 2014).

O processo inflamatório ocorre através de uma série de eventos: as aminas vasoativas, como a histamina, levam a dilatação de vênulas e arteríolas conduzindo um aumento na permeabilidade dos vasos sanguíneos, o que ocasiona um aumento do fluxo sanguíneo e a passagem de leucócitos para os tecidos atingidos (ARULSELVAN et al., 2016; ABDULKHALEQ et al., 2018). Poucos minutos após uma lesão ou trauma ocorre a migração celular, na qual os neutrófilos ou polimorfonucleares (PMN), que são os leucócitos mais abundantes no sangue periférico, são recrutados para o local da inflamação, sendo este o perfil celular mais frequente em processos inflamatórios agudos (SUNDD et al., 2011). A principal função dos neutrófilos é destruir antígenos, bactérias, células injuriadas e componentes danificados da matriz que possam estar presentes na ferida. Outro perfil celular que migra dos vasos sanguíneos e direciona-se ao local da inflamação são os monócitos, que ao entrarem no tecido acometido diferenciam-se em macrófagos (GETHIN, 2012).

Um importante fator que contribui para a migração celular é a produção de citocinas, as quais são pequenas proteínas não estruturais de baixo peso molecular que tem influência na regulação da inflamação e imunidade (GULATI et al., 2016). Os macrófagos residuais presentes no tecido atingido produzem citocinas, como TNF- α e IL-1, que estimulam a produção de E-selectinas e P-selectinas (moléculas de adesão) nas paredes dos capilares. Em seguida, os leucócitos se ligam a essas moléculas de adesão e migram pelos capilares seguindo o gradiente das quimiocinas. A migração é cessada quando uma proteína presente na parede dos capilares se liga as integrinas, um outro grupo de moléculas de adesão presente na superfície

dos leucócitos. Além disso, a presença de quimiocinas torna essa interação ainda mais forte. Desta forma, os leucócitos param de migrar pelas paredes do vaso e realizam o processo de diapedese, que é a passagem das células presentes no vaso sanguíneo para o tecido alvo (Figura 3) (HUANG; GHAI; HO, 2004).

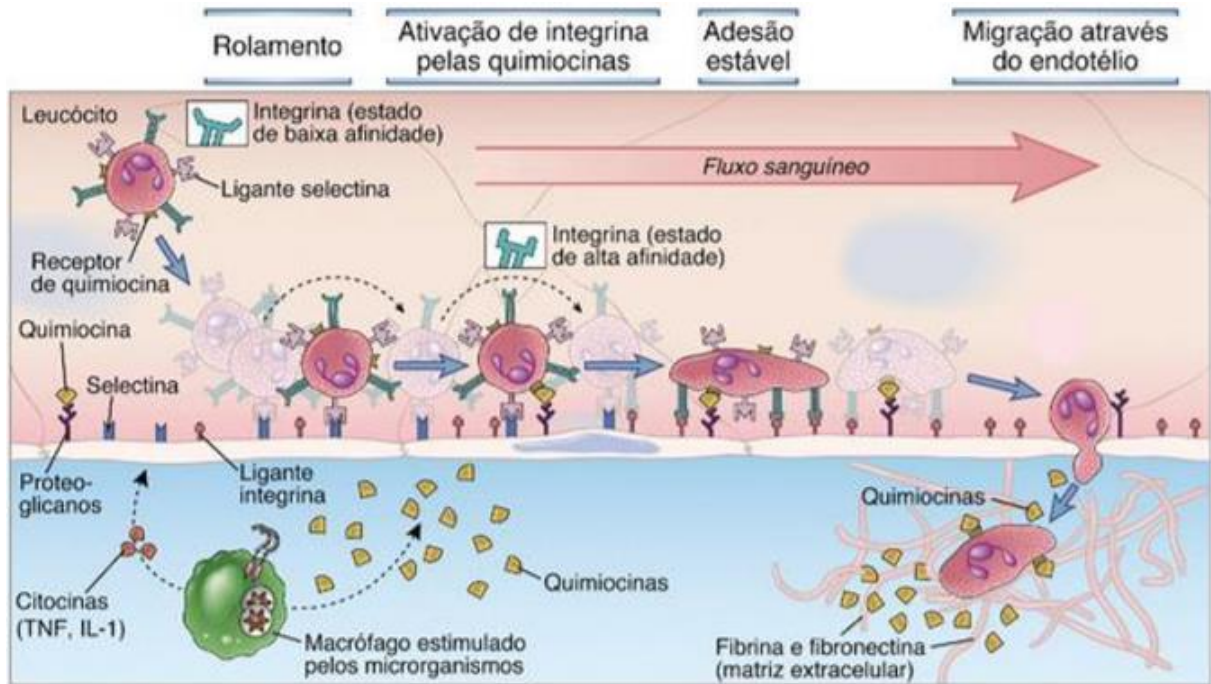


Figura 3- Fases de migração leucocitária destacando a presença das citocinas, quimiocinas, integrinas e moléculas de adesão. Fonte: Adaptado de ABBAS e LICHTMAN, 2009.

As citocinas apresentam outras funções. Essas proteínas são consideradas mensageiros intercelulares no sistema imunológico e integram a função de vários tipos de células em vários compartimentos do corpo, para que assim haja uma resposta imune coerente (GULATI et al., 2016). Estas moléculas possuem tanto atividade pró-inflamatórias (IL-1, TNF- α , IL-6), quanto anti-inflamatórias (IL-10, IL-4, IL-13). Entre as principais citocinas inflamatórias estão a interleucina 1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral (TNF- α), que podem ser estimuladas por eventos que levam a lesão tecidual, onde há a liberação de alguns mediadores químicos como histamina, bradicinina, prostaglandinas, leucotrienos e EROs (ZHANG; AN, 2007). A produção excessiva dessas citocinas inflamatórias medeia a secreção de proteínas de fase aguda como a proteína C-reativa e fatores de coagulação pelas células do fígado. Além disso, as citocinas inflamatórias, induzem o endotélio a produzir prostaglandinas, mediadores que são

responsáveis pelo aparecimento da dor e da febre presentes no processo inflamatório (AHMED, 2011).

Outra molécula importante do processo inflamatório é o óxido nítrico (NO), radical capaz de ativar as enzimas ciclo-oxigenase 1 e ciclo-oxigenase 2 (COX-1 e COX-2), as quais aumentam os níveis de prostaglandinas, agravando ainda mais o processo inflamatório (FANG et al., 2015). Além disso, a vasodilatação, que é um dos sinais cardinais da resposta inflamatória, é desencadeada em grande parte por meio de um processo dependente de NO. Vários mediadores inflamatórios, como a bradicinina e a histamina, produzem vasodilatação por meio da estimulação da liberação endotelial de NO, o qual pode difundir para o músculo liso e ativar a enzima guanilato ciclase, aumentando por sua vez os níveis intracelulares de GMPc, os quais levam ao relaxamento do músculo liso de veias e artérias (WALLACE, 2005).

Ambas citocinas TNF- α , IL-1 e o radical NO são produzidos mediante a ativação de um importante fator de transcrição, o fator nuclear de transcrição Kapa B (NF κ B). Esta molécula exerce uma função essencial na regulação de genes associados à inflamação e está envolvida na sua progressão. A ativação do NF κ B é mediada por ligantes que estimulam os receptores *Toll Like Receptor* (TLR) presentes nas células do sistema imune. A ligação nos receptores TLR ativa o fator NF κ B, deslocando-o do citoplasma para o núcleo e acelera a transcrição de genes associados à inflamação, como os genes responsáveis pela produção das citocinas TNF- α , IL-1 e da enzima óxido nítrico sintase (iNOS) (AHMED, 2011).

Em relação as opções terapêuticas para tratamento de inflamações, existem os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), uma das classes de fármacos mais comumente prescritas para dor e inflamação. Essa classe está entre os medicamentos mais vendidos, alcançando cerca de 5 a 10% de todos os medicamentos prescritos por ano no mundo (WONGRAKPANICH et al., 2018). Além do seu efeito anti-inflamatório, os AINEs têm propriedades antipiréticas e analgésicas. Esses medicamentos inibem as enzimas ciclo-oxigenases (COXs), que como dito anteriormente, são determinantes para a síntese de prostaglandinas e cujo bloqueio na sua produção leva a efeitos analgésico, antipirético e anti-inflamatório (MEEK; LAAR; VONKEMAN, 2010; WONGRAKPANICH et al., 2018).

Entretanto, devido aos efeitos adversos ocasionados ao uso crônico dos AINEs (úlceras pépticas, insuficiência renal aguda, acidente vascular cerebral e infarto do miocárdio), há um interesse maior em substâncias naturais usadas como suplementos alimentares e de medicações a base de plantas medicinais para reduzir a dor e a inflamação (MAROON; BOST; MAROON,

2010; MARCUM; HANLON, 2010). Muitos desses fitocompostos, principalmente os fenólicos, funcionam inibindo as vias inflamatórias de maneira similar aos AINEs (inibição da COX), mas podem atuar também inibindo vias inflamatórias relacionadas a ativação do fator NF- κ B (MAROON; BOST; MAROON, 2010).

2.3 Leishmaniose Cutânea

As leishmanioses são um complexo de doenças infecciosas causadas por mais de 20 espécies de parasitos do gênero *Leishmania* spp, as quais são transmitidas por insetos vetores dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* (WHO, 2021). Elas estão distribuídas em aproximadamente 90 países das regiões tropicais, subtropicais e em toda a Ásia, África, Oriente Médio e América Central e do Sul (CDC, 2022; MANN et al., 2021) e afetam mais de 1 bilhão de pessoas expostas em áreas de risco (WHO, 2018). Além disso, fatores como deslocamento populacional, pobreza, má nutrição, falta de recursos, mudanças climáticas e ambientais estão associadas a expansão dessas doenças (WHO, 2021)

As leishmanioses estão entre as sete doenças tropicais mais importantes e representam um grave problema de saúde mundial (TORRES-GUERRERO et al., 2017). As manifestações clínicas são variadas e causadas por múltiplas espécies de *Leishmania* spp e, a partir de complexas interações com o hospedeiro mamífero, são responsáveis por causar as formas cutânea (LC), mucocutânea (LMC) e a forma visceral (LV), a qual possui um desfecho potencialmente fatal se não tratada (MANN et al., 2021).

O processo infeccioso começa com a picada de flebotomíneos fêmeas infectadas, as quais regurgitam formas promastigotas metacíclicas de sua probóscide durante a refeição sanguínea (Figura 4). As promastigotas que atingem a ferida da punção são fagocitadas por macrófagos e outros tipos de células fagocíticas mononucleares. Após essa etapa, as promastigotas se transformam em formas amastigotas intracelulares que se multiplicam por divisão binária simples e passam a infectar outras células fagocíticas mononucleares quando ocorre a ruptura das células infectadas. Os flebotomíneos se infectam ingerindo células infectadas durante uma nova refeição sanguínea. Nos flebotomíneos, as amastigotas se transformam em promastigotas, desenvolvem-se no intestino e migram para a probóscide do inseto vetor (CDC, 2022). A resposta imune do hospedeiro à picada do inseto vetor também contribui para o sucesso da transmissão, uma vez que estas células são recrutadas logo após a

inoculação e são de grande importância para a sobrevivência do parasito (SERAFIM et al., 2021).

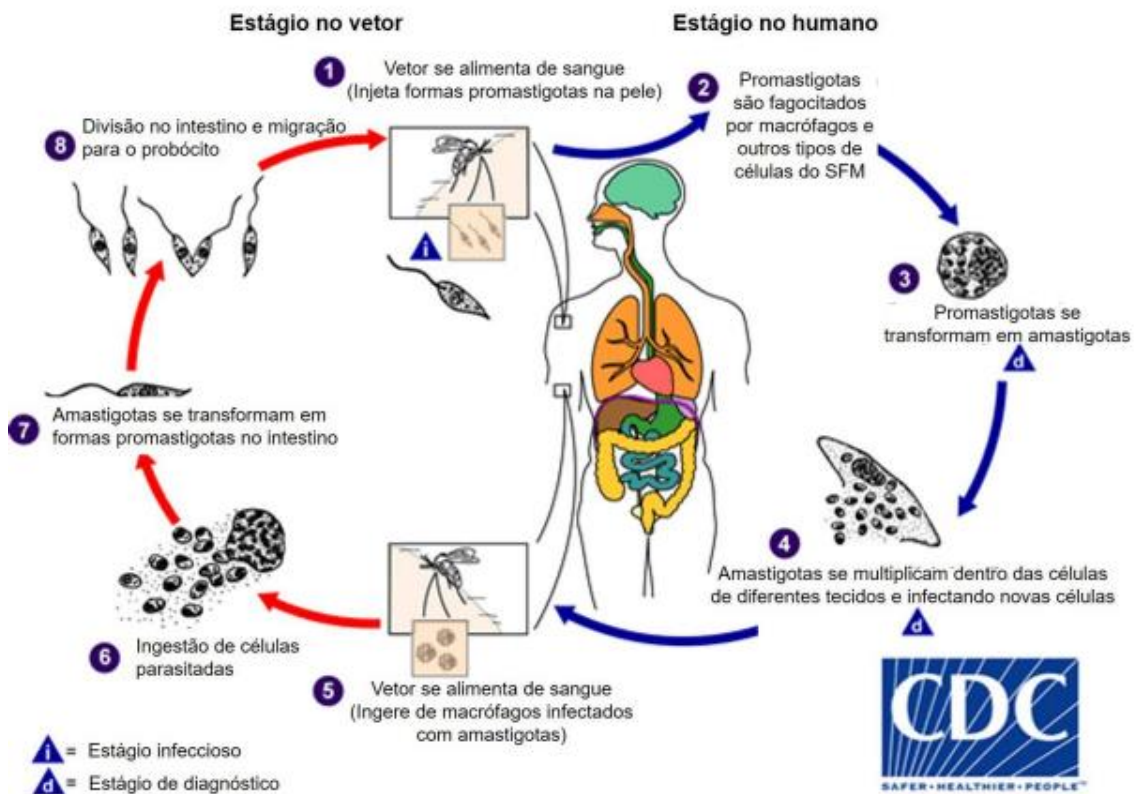


Figura 4- Ciclo biológico dos parasitos do gênero *Leishmania* sp.
Adaptado de CDC – Center of Disease Control and Prevention, 2022.

Nas Américas, a LC tem como responsável várias espécies do parasito, sendo elas a *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) panamensis*. Porém, outras espécies como *L. (V.) peruviana*, *L. (L.) lainsoni* e *L. (L.) shawi* podem também estar envolvidas de maneira mais frequente em infecções na América Central e Região Amazônica (CARVALHO et al., 2019; LOISEAU et al., 2019). Embora seja provavelmente subnotificada, as estimativas mundiais atuais de incidência da LC variam de 700.000 a 1,2 milhão de casos por ano (CDC, 2022; MANN et al., 2021). Cerca de 95% dos casos de LC ocorrem nas Américas, bacia do Mediterrâneo, Oriente Médio e Ásia Central. Em 2020, mais de 85% dos novos casos de LC ocorreram em 10 países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Iraque,

Líbia, Paquistão, Peru, República Árabe da Síria e Tunísia. Nas Américas, o Brasil é o país de maior incidência, com casos da doença em todas as unidades federativas, e alta prevalência na região norte (WHO, 2022).

A *Leishmania (L) amazonensis* é uma das principais espécies que está associada à LC no Brasil. A LC tem como característica a formação de lesões na pele, principalmente ulceradas, em partes expostas do corpo e no local de picada do inseto vetor, deixando ao longo da vida do paciente uma cicatriz que pode refletir em estigma social (WHO, 2022). A lesão primária é geralmente única, embora eventualmente múltiplas picadas do flebotomíneo ou a disseminação do parasito pela via hematogênica ou linfática possam gerar um número elevado de lesões. Entretanto as lesões podem evoluir para cura espontânea e respondem bem ao tratamento habitual (GONTIJO e CARVALHO, 2003).

Além disso, *L. amazonensis* também pode levar a leishmaniose cutânea difusa (LCD), uma patologia que está associada com a indução de anergia em linfócitos T, conduzindo à uma redução de resposta do tipo TH1, causando assim, uma ineficácia de resposta celular (ALMEIDA et al., 2021). A LCD ocorre frequentemente em indivíduos onde a resposta imunológica ao parasito é deficiente (MARIZ et al., 2019; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Inicia-se de maneira silenciosa, com uma lesão única que responde precariamente ao tratamento e evolui de forma lenta, com o aparecimento de múltiplas pápulas e nódulos subcutâneos, formando placas principalmente na região dos ombros, face e lóbulos das orelhas (MARIZ et al., 2019; MOKNI, 2019).

O tratamento das leishmanioses e conseqüentemente da LC, apresenta muitas limitações relacionadas a terapia prolongada, administração parenteral, efeitos adversos intensos e o alto custo de algumas formulações (DE MENEZES et al., 2015). Os antimoniais pentavalentes são os fármacos de primeira escolha para tratamento das leishmanioses, enquanto que a anfotericina B, anfotericina B liposomal e paromomicina, são opções secundárias para casos resistentes. A miltefosina, por sua vez, é o primeiro tratamento oral aprovado para LV na Índia. No entanto, todos esses compostos possuem limitações em seu uso por causa de efeitos colaterais, alto custo e indução de resistência dos parasitos, o que justifica, a pesquisa de novos compostos eficientes e seguros (ALBUQUERQUE et al., 2020).

2.4 *Mitracarpus frigidus* (Willd. Ex Roem. Schult.) K. Schum

A espécie *Mitracarpus frigidus* (Willd. ex Roem. & Schult.) K. Schum. (Figura 5) está distribuída por toda América Tropical e Antilhas e apresenta-se como uma erva perene e ereta. No Brasil, é encontrada desde a região do estado do Amazonas até o Rio Grande do Sul. (SOUZA, 2015). Embora outras espécies do gênero *Mitracarpus* sejam reconhecidas pelo seu uso popular, *M. frigidus* não apresenta relatos sobre seu uso tradicional (FABRI et al., 2013).

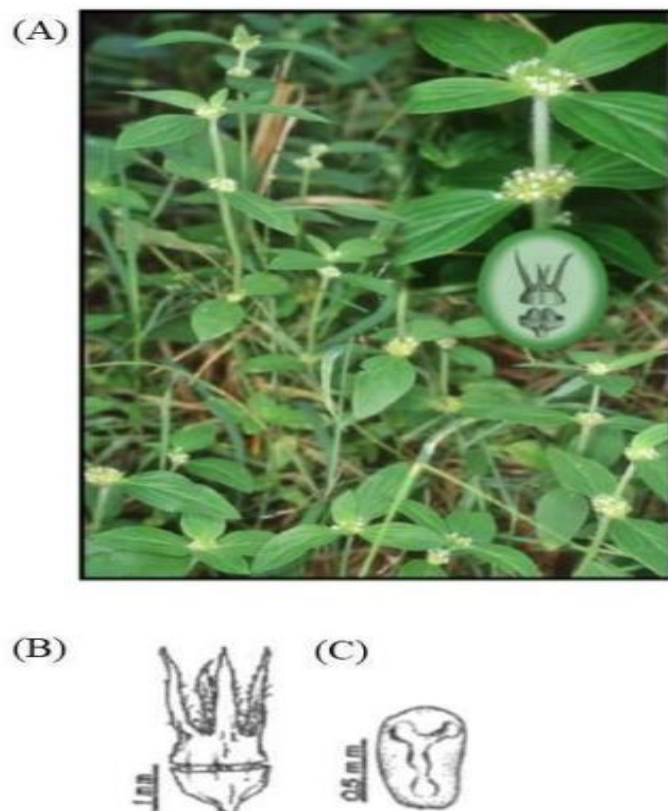


Figura 5- Figura ilustrativa da espécie *Mitracarpus frigidus* (Willd. ex Reem Schult.) K. Schum. Representação das partes aéreas (A), fruto (B) e semente (C). Fonte: PEREIRA, CARVALHO-OKANO e GARCIA, 2006.

Estudos realizados por Fabri et al. (2009) revelaram uma grande diversidade de

substâncias químicas para o extrato metanólico das partes aéreas de *M. frigidus*, bem como suas frações, onde foram encontrados metabólitos especiais como alcaloides, terpenoides, esteroides, saponinas, antraquinonas, substâncias fenólicas, taninos e flavononas. A literatura ainda revela que o extrato metanólico apresenta uma série de atividades biológicas, sendo estas, desde de atividades laxativa, antitumoral (FABRI et al., 2011), antioxidante, anti-inflamatória (FABRI et al., 2013), esquistossomicida (FABRI et al., 2014b) e antifúngica contra *Candida albicans* (CAMPOS et. al, 2018; CAMPOS et. al, 2020) e *Cryptococcus neoformans* (FABRI et al., 2009). Além disso, devido ao seu potencial farmacológico promissor, o extrato metanólico de *M. frigidus* vem sendo utilizado em estudos de novas formulações. Campos et al. (2020) demonstra uma atividade promissora do extrato incorporado em gel de quitosana contra *C. albicans* em um modelo de Candidíase vulvovaginal, onde os resultados dos ensaios *in vivo* mostraram significativa redução da carga fúngica, além da redução da inflamação da mucosa após o tratamento com o gel de quitosana contendo o extrato.

M. frigidus também destaca-se devido ao seu potencial antimicrobiano, uma vez que o extrato metanólico foi capaz de inibir o crescimento de bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus pyogenes*, e Gram-negativas como *Escherichia coli*, *Shigella sonnei*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Salmonella typhimurium* (FABRI et al., 2009) e *Salmonella enteritidis in vitro* (CAMPOS et al., 2019). Fabri et al. (2021) ainda demonstra uma atividade *in vivo* significativa para extrato metanólico, onde este foi analisado às suas atividades antibacteriana e anti-inflamatória *in vivo* utilizando ratos infectados por *S. typhimurium*. Os resultados revelaram que o extrato foi capaz de reduzir significativamente a mortalidade dos animais infectados por *Salmonella sp* sem causar alterações na função hepática.

O óleo essencial das partes aéreas de *M. frigidus* também é descrito por ter uma variedade de substâncias de interesse farmacológico. Dentre elas destacam-se as substâncias linalol e o acetato de eugenol como constituintes majoritários que foram caracterizadas por CG/EM após obtenção do óleo obtido por hidrodestilação. Esse óleo também apresentou outras substâncias identificadas como 5-hidroxi-isobornil isobutirato, 5-metil-1-undeceno e metil salicilato. *M. frigidus* ainda destaca-se pelas suas atividades

antioxidante, leishmanicida para as formas promastigotas de *Leishmania major* e *L. amazonensis*, antifúngica para *Candida albicans* e *C. neoformans*, e antibacteriana para *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter cloacae* (FABRI *et al.*, 2012a). Além disso, outras substâncias também já foram identificadas do extrato etanólico de partes aéreas de *M. frigidus* por meio da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), dentre elas destacam-se caempferol, caempferol-3O-rutenosídeo, rutina, ácido ursólico, psicorrubrina (FABRI *et al.*, 2013; FABRI *et al.*, 2014b), ursolato de metila (FABRI *et al.*, 2014a) e escopoletina (Figura 6) (LEMOS *et al.*, 2020).

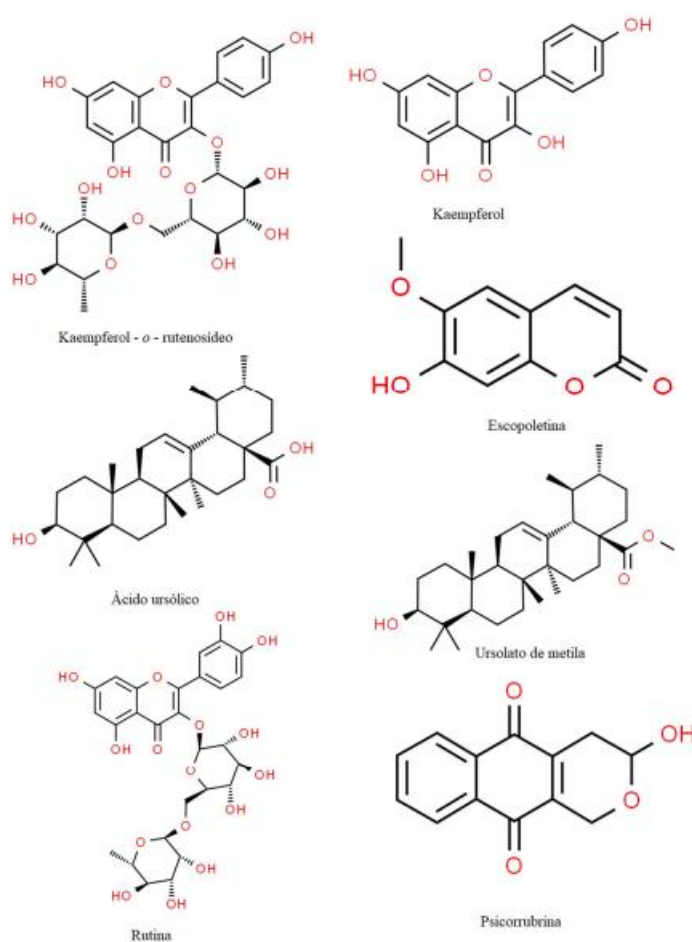


Figura 6 - Estruturas químicas das substâncias identificadas e/ou isoladas na espécie *Mitracarpus frigidus*.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

A naftoquinona psicorrubrina foi isolada a partir da fração em diclorometano oriunda do extrato metanólico de partes aéreas de *M. frigidus* e apresenta atividade

antitumoral, antileishmanial, antifúngica (FABRI et al., 2012b) e antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes* resistentes à meticilina (LEMOS et al., 2018). Outra substância que também foi isolada da fração em diclorometano é a escopoletina, uma cumarina com relevante atividade antifúngica contra uma linhagem multirresistente de *C. tropicalis*, com a capacidade de atuar tanto contra as formas planctônicas quanto no biofilme formado por essa espécie de fungo (LEMOS et al., 2020). Já os triterpenos ácido ursólico e ursolato de metila foram isolados a partir da fração em hexano. Os estudos demonstraram que esses triterpenos apresentam promissora atividade anti-inflamatória e leishmanicida para formas amastigotas de *L. major*. O ácido ursólico ainda apresentou promissora atividade antitumoral (FABRI et al., 2014a). A fração em hexano de *M. frigidus* também vem sendo descrita pela presença de importantes metabolitos secundários tais como alcaloides, triterpenos e esteroides (FABRI et al., 2009). Diante do exposto, embora a literatura aponte vários estudos sobre o óleo, bem como do extrato metanólico e suas frações, o extrato aquoso de *M. frigidus* não foi ainda caracterizado, nem avaliado quanto as atividades antioxidante, antileishmanial e anti-inflamatória. Além do mais, a fração em diclorometano ainda não teve o seu potencial antileishmanial completamente avaliado, visto que, até o momento nenhum estudo relata sua atividade em formas amastigotas. Dessa forma, o estudo das bioatividades a serem desenvolvidas nesse trabalho, torna-se inédito e importante.

2.5 *Lantana camara* L.

O gênero *Lantana* L. é composto por 150 espécies pantropicais distribuídas em todo o mundo que são usadas na medicina tradicional ou são de caráter ornamental. *Lantana camara* L. (Verbenaceae) é comumente conhecida como camará, camará chumbinho, camará-de-cheiro, camará-de-espinho, camará-miúdo-de-espinho, camará-verdadeiro, camará-vermelho, camará, camará-de- duas cores, camará-de-folha grande, chumbinho e chumbinho-roxo (SILVA et al., 2015). Essa espécie atinge cerca de 2-3 m de altura e apresenta galhos com espinhos curvos. As folhas são ovais, arredondadas na base, rugosas e crenadas na porção superior, são ásperas na maturidade e possuem um odor ofensivo (Figura 7). Os frutos são esverdeados nos estágios iniciais e tornam-se azuis escuros após amadurecidos. Os frutos

imaturos são venenosos, enquanto os frutos maduros são saborosos, muitas vezes consumidos por pássaros e seres humanos (KUMAR et al., 2016).



Figura 7- Imagem de *Lantana camara* L.
Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

As diferentes partes (folhas, raízes e flores) de *L. camara* têm sido utilizadas na terapia popular para tratar malária, tuberculose, linfadenite, caxumba, dor de estômago, reumatismo, dor óssea, etc (WU et al., 2020). Alguns metabolitos secundários são descritos como tóxicos para a espécie, com por exemplo o os triterpenos lantadene A e B, que são descritos por apresentarem hepatotoxicidade. Além disso, essa espécie produz outros triterpenos do tipo lantadene, como ácido lantanólico, ácido lântico, ácido 22-b-dimetilacrilóiloxilantanólico, ácido 22-b-dimetilacrilóiloxilantanólico, ácido 22-b-angeloiloxilantanólico e ácido latanólico. A presença de flavonóides, iridóides, oligossacarídeos, glicosídeos, fenilpropanóides e naftoquinonas também tem sido relatada (SILVA et al., 2015).

Outras atividades biológicas já foram descritas para essa planta, como antisséptica, antiespasmódica, carminativa, anti-inflamatória, antipirética e analgésica. O verbascosídeo isolado das folhas dessa espécie também é descrito por possuir atividade antitumoral devido sua ação na proteína quinase C (KUMAR et al., 2014). Ainda em relação à atividade anti-inflamatória, o extrato etanólico das folhas demonstrou efeito anti-inflamatório e inibitório contra a ciclo-oxigenase-2 (COX-2) (IFORA et al., 2020). Alguns estudos também demonstram

a síntese de anti-inflamatórios não esteroidais (AINE), utilizando os lantadenes como moléculas base e mostram que eles apresentaram atividade promissora contra a COX-2 (SUTHAR et al., 2014). Também se acredita que a atividade anti-inflamatória de *L. camara* esteja relacionada à presença de flavonoides, substâncias fenólicas conhecidas por modular vários estágios da inflamação (ASHAL et al., 2020).

O óleo essencial de *L. camara* também é decrito por apresentar atividade antibacteriana. Em um trabalho desenvolvido por Saikia et al (2011), a extração do óleo essencial foi feita através de folhas frescas de *L. camara* por meio de hidro destilação. Posteriormente foi determinada a atividade antimicrobiana para os microrganismos *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, onde foi observada atividade promissora para *B. cereus*, *B. subtilis* e *S. aureus* (SAIKIA et al., 2011). A atividade antitumoral do óleo essencial de *L. camara* é bem reconhecida, mostrando que é eficaz para várias linhagens de tumores, como U-266 (mieloma múltiplo), A+594 (carcinoma de pulmão), HCT-116 (câncer de cólon), MiaPaCa-2 (câncer pancreático) e KBM-5 (leucemia mieloide), por provavelmente suprimir a via do fator de transcrição NF- κ B (SAJID et al., 2021).

A atividade antioxidante de extratos metanólicos de diferentes partes de *L. camara*, incluindo raiz, folha, flor e fruto, também vem sendo estudada. Estudos realizados por Mahdi-Pour et al. (2012) utilizando o ensaio de DPPH mostraram que as folhas dessa espécie apresentaram a melhor propriedade antioxidante, seguida das flores, raízes e frutos. Embora não existam relatos etnofarmacológicos sobre o uso nas leishmanioses, extratos orgânicos preparados de *L. camara* demonstraram apresentar atividade leishmanicida em *L. amazonensis* e *L. mexicana* (DELGADO-ALTAMIRANO et al., 2019). Anteriormente, Begum et al. (2014) relataram que o extrato metanólico obtido das partes aéreas de uma cultivar vermelha de *L. camara* exibiu atividade nas formas promastigotas de *L. major*. Embora a atividade antileishmanial de *L. camara* venha sendo estudada, nenhum trabalho menciona sobre o seu mecanismo de ação antileishmanial. Logo, este estudo torna-se inédito ao estudar os possíveis mecanismos de ação antileishmanial de *L. camara* associados à morte celular de *L. amazonensis*.

3. REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. *Imunologia Básica: Funções e distúrbios do sistema imunológico*. 3ª edição. Rio de Janeiro, Editora Elsevier, 2009, 293p.

ABDULKHALEQ, L.A.; ASSI, M.A.; ABDULLAH, R.; ZAMRI-SAAD, M.; TAUFIQ-YAP, Y.H.; HEZMEE, M.N.M. The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review. **Veterinary World**, v.11, n.5, p.627-635, 2018.

AHMED, A.U. An overview of inflammation: mechanism and consequences. **Frontier in Biology**, v.6, n.4, p. 274–281, 2011.

ALMEIDA, J.V.; SOUZA, C.F.; FUZARI, A.A.; JOYA, C.A.; VALDIVIA, H.O.; BARTHOLOMEU, D.C.; BRAZIL, R.P. Diagnosis and identification of *Leishmania* species in patients with cutaneous leishmaniasis in the state of Roraima, Brazil's Amazon Region. **Parasites Vectors**, v.14, n.32, p.1-9, 2021.

ALVES, C.T.; FERREIRA, I.C.F.R.; BARROS, L.; SILVA, S.; AZEREDO, J.; HENRIQUES, M. Antifungal activity of phenolic compounds identified in flowers from North Eastern Portugal against *Candida* species. **Future Microbiology**, v.9, n.2, p. 139–146, 2014.

AL-RIMAWI, F.; RISHMAWI, S.; ARIQAT, S.H.; KHALID, M.F.; WARAD, I.; SALAH, Z. Anticancer Activity, Antioxidant Activity, and Phenolic and Flavonoids Content of Wild *Tragopogon porrifolius* Plant Extracts. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p.1-8, 2016.

ALBUQUERQUE, R.D.D.G.; OLIVEIRA, A.P.; FERREIRA, C.; CALOS L.A. PASSOS, C.L.A.; FIALHO, F.; SOARES, D.C.; AMARAL, V.F.; BEZERRA, G.B.; ESTEVES, R.S.; SANTOS, M.G.; ALBERT, A.L.M.; ROCHA, L. Anti-*Leishmania amazonensis* activity of the terpenoid fraction from *Eugenia pruniformis* leaves. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** v.92, n.4, p.1-14, 2020.

AMBRIZ-PÉREZ, D.L.; LEYVA-LÓPEZ, N.; GUTIERREZ-GRIJALVA, E.P.; HEREDIA, J.B. Phenolic compounds: Natural alternative in inflammation treatment. A Review. **Cogent Food & Agriculture**, v.2, p.1-14, 2016.

ARULSELVAN, P.; FARD, M.T.; TAN, W.S.; GOTHAI, S.; FAKURAZI, S.; NORHAIZAN, M.E.; KUMAR, S.S. Role of Antioxidants and Natural Products in Inflammation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, p.1-15, 2016.

ASHAL, T.F.; IFORA, I.; OKTAVIA, S. Potential Anti-inflammatory Effects of *Lantana camara* L.: A Review. **International Research Journal of Pharmacy and Medical Sciences**, v.3, n.6, p. 1-4, 2020.

BAIZABAL-AGUIRRE, V.M.; ROSALES, C.; LÓPEZ-MACÍAS, C.; GÓMEZ, M.I. Control and Resolution Mechanisms of the Inflammatory Response. **Mediators of Inflammation**, p.1-2, 2014.

BANJARNAHOR, S.D.S.; ARTANTI, N. Antioxidant properties of flavonoids. **Medical Journal of Indonesia**, v. 23, n. 4, p.239-244, 2014.

BEGUM, S.; AYUB, A.; ZEHRA, S.Q.; SIDDIQUI, B.S.; CHOUDHARY, M.I.; SCIENCES, B. Leishmanicidal triterpenes from *Lantana camara*. **Chemistry & Biodiversity**. v.11, p.709–718, 2014.

BIRBEN, E.; SAHINER, U.M.S.; SACKESEN, C.S.; ERZURUM, S.; KALAYCI, O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. **WAO Journal**, v.5, p.9–19, 2012.

BRUNETTI, C.; FERDINANDO, M.D.; FINI, A.; POLLASTRI, S.; TATTINI, M. Flavonoids as Antioxidants and Developmental Regulators: Relative Significance in Plants and Humans. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p.3540-3555, 2013.

CAMPOS, L. M.; LEMOS, A.S.O.; CRUZ, L.F.; ARAÚJO, M.G.F.; BOTTI, G.C.R.M.; JÚNIOR, J.L.R.; ROCHA, V.N.; DENADAI, A.M.L.; SILVA, T.P.; TAVARES, G.D.; SCIO, E.; FABRI, R.L.; PINTO, P.F. Development and in vivo evaluation of chitosan-gel containing *Mitracarpus frigidus* methanolic extract for vulvovaginal candidiasis treatment. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 130, p. 110609, 2020.

CAMPOS, L. M.; LEMOS, A.S.O.; SILVA, T.P.; OLIVEIRA, L.G.; NASCIMENTO, A.L.R.; CARVALHO, J.J.; MORAES, A.C.N.; ROCHA, V.N.; AGUIAR, J.A.K.; SCIO, E.; APOLÔNIO, A.C.M.; MELO, R.C.N.; FABRI, R.L. *Mitracarpus frigidus* is active against *Salmonella enterica* species including the biofilm form. **Industrial Crops and Products**, v. 141, p. 111793, 2019.

CAMPOS, L.M.; MELO, L.; LEMOS, A.S.O.; GUEDES, M.C.M.R.; SILVA, T.P.; FIGUEIREDO, G.F.; REIS JUNIOR, J.L.; ROCHA, V.N.; MELO, R.C.N.; ARAÚJO, M.G.F.; APOLÔNIO, A.C.M.; SCIO, E.; FABRI, R.L. *Mitracarpus frigidus*: A promising antifungal in the treatment of vulvovaginal candidiasis. **Industrial Crops & Products**, [s. l.], p. 731-739, 2018.

CARVALHO, S. H. FRÉZARD, F.; PEREIRA, N.P.; MOURA, A.S.; RAMOS, L.M.Q.C.; CARVALHO, G.B.; ROCHA, M.O.C. American tegumentary leishmaniasis in Brazil: a critical review of the current therapeutic approach with systemic meglumine antimoniate and short-term possibilities for an alternative treatment. **Tropical Medicine & International Health**, v. 24, n. 4, p. 380–391, 2019.

CDC. Epidemiology and risk factors. Disponível em < <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/epi.html> > . Acessado em 27 de setembro de 2022.

CHEN, H.; PU, J.; LIU, D.; YU, W.; SHAO, Y.; YANG, G.; XIANG, Z.; HE, N. Anti-Inflammatory and Antinociceptive Properties of Flavonoids from the Fruits of Black Mulberry (*Morusnigra* L.). **PLOS ONE**, p-1-14, 2016.

CONNER, E.M.; GRISHAM, M. B. Inflammation, Free Radicals, and Antioxidants. **Nutrition** v. 12, n. 4, p.274-277, 1996.

DELGADO-ALTAMIRANO, R.; LÓPEZ-PALMA, R.I.; MONZOTE, L.; DELGADO-DOMÍNGUEZ, J.; BECKER, I.; RIVERO-CRUZ, JF.; ESTURAU-ESCOFET, N.; VÁZQUEZ-LANDAVERDE, P.A.; ROJAS-MOLINA, A. Chemical Constituents with Leishmanicidal Activity from a Pink-Yellow Cultivar of *Lantana camara* var. *aculeata* (L.) Collected in Central Mexico. *Int. J. Mol. Sci.* v.20, n.872, p.1-17, 2019. doi:10.3390/ijms20040872.

DE MENEZES, J. P. B., GUEDES, C. E. S., PETERSEN, A. L. D. O. A., FRAGA, D. B. M., VERAS, P. S. T. Advances in development of new treatment for leishmaniasis. **BioMed Research International**, v. 2015 p. 1-11, 2015.

ELKHATEEB, Y.A.M.; ALSHAMMARY, M.R. Effects of Fast Foods in Relation to Free Radicals and Antioxidants. **American Journal of Laboratory Medicine**, v.2, n. 6, p.156-162, 2017.

FABRI, R. L.; CAMPOS, L.M.; FLORÊNCIO, J.R.; OLIVEIRA, L.G.; ARAGÃO, D.M.O.; FERREIRA, A.L.P.; AGUIAR, J.A.K.; ANA APOLÔNIO, C.M.; ALVES, M.S.; SCIO, E. *Mitracarpus frigidus* (Rubiaceae) inhibits inflammatory and oxidative stress mediators in *Salmonella sp.* mouse infection. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. [S.L.], p. 82-92. 2021.

FABRI, R.L.; ARAGÃO, D.M.O.; FLORÊNCIO, J.R.; CARDOSO, G.M.M.; SOUZAFAGUNDES, E.M.; CASTANON, M.C.M.N.; SCIO, E. *In-vivo* laxative and toxicological evaluation and *in-vitro* antitumour effects of *Mitracarpus frigidus* aerial parts. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, [s. l.], p. 439-448, 2011.

FABRI, R.L.; ARAGÃO, D.M.O.; FLORÊNCIO, J.R.; PINTO, N.C.C.; MATTOS, A.C.A.; COELHO, P.M.Z.; PINTO, P.F.; SCIO, E. Chromatographic Fingerprint Analysis and Effects of the Medicinal Plant Species *Mitracarpus frigidus* on Adult *Schistosoma mansoni* Worms. **BioMed Research International**, [s. l.], p. 1-10, 2014b.

FABRI, R.L.; COIMBRA, E.S.; ALMEIDA, A.C.; SIQUEIRA, E.P.; ALVES, T.M.A.; ZANI, C.L.; SCIO, E. Essential oil of *Mitracarpus frigidus* as a potent source of bioactive compounds. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [s. l.], v. 84, p. 1073-1080, 2012a.

FABRI, R.L.; GARCIA, R.A.; FLORÊNCIO, J.R.; CARVALHO, L.O.; PINTO, N.C.C.; COIMBRA, E.S.; SOUZA-FAGUNDES, E.M.; RIBEIRO, A.; SCIO, E. Pentacyclic triterpenoids from *Mitracarpus frigidus* (Willd. ex Roem. & Schult.) K. Shum: *in vitro* cytotoxic and leishmanicidal and *in vivo* anti-inflammatory and antioxidative activities. **Medicinal Chemistry Research**, [s. l.], v. 23, p. 5294–5304, 2014a.

FABRI, R.L.; GARCIA, R.A.; FLORÊNCIO, J.R.; PINTO, N.C.C.; OLIVEIRA, L.G.; AGUIAR, J.A.K.; RIBEIRO, A.; SCIO, E. Anti-inflammatory and antioxidative effects of the methanolic extract of the aerial parts of *Mitracarpus frigidus* in established animal models. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, [s. 1.], p. 1--11, 2013.

FABRI, R.L.; NOGUEIRA, M.S.; BRAGA, F.G.; COIMBRA, E.S.; SCIO, E. *Mitracarpus frigidus* aerial parts exhibited potent antimicrobial, antileishmanial and antioxidant effects. **Elsevier**, [s. 1.], p. 428-433, 2009.

FANG, L.; CHANG, H.M.; CHENG, J.C.; LEUNG, P.C.K.; SUN, Y.P. Nitric Oxide and cGMP Induce COX-2 Expression and PGE2 Production in Human Granulosa Cells Through CREB Signaling Pathway. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.100, n.2, p.262–269, 2015.

GETHIN, G. Understanding the inflammatory process in wound healing. **British Journal of Community Nursing**, p.1-4, 2012.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M.L.R. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, n.1, p.71-80, 2003.

GULATI, K.; GUHATHAKURTA, S.; JOSHI, J.; RAI, N.; RAY, A. Cytokines and their Role in Health and Disease: A Brief Overview. **MOJ Immunology**, v. 4, n.2, 1-9, 2016.

HATAMI, T.; EMAMI, S.A.; MIRAGHAEI, S.S.; MOJARRA, M. Total Phenolic Contents and Antioxidant Activities of Different Extracts and Fractions from the Aerial Parts of *Artemisia biennis* Willd. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v.13, n.2, p.551-558, 2014.

HUANG, M.T.; GHAI, G.; HO, C.T. Inflammatory Process and Molecular Targets for Antiinflammatory Nutraceuticals. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v.3, p.127-139, 2004.

ICTQ 2018. Disponível em <<https://www.ictq.com.br/opiniaio/339-desenvolvimento-de-farmacos-no-brasil>> Acessado em 07 de novembro de 2018.

IFORA, I.; FAUZIAH, F.; MAYORA, S.A. “Aktivitas Anti-inflamasi dan Daya Hambat Siklooksigenase-2 Ekstrak Etanol Daun Tembelekan (*Lantana camara* L.),” *J. Farm. Higea*, v. 12, n.1, p.32–39, 2020.

KUMAR, R.; KATIYAR, R.; KUMAR, S.; KUMAR, T.; SINGH, S. **Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences**. v.4(3S), n.2320–8694, p.321-337. 2016.

KUMAR, S.; SANDHIR, R.; OJHA, S. Evaluation of antioxidant activity and total phenol in different varieties of *Lantana camara* leaves. **BMC Research Notes**, v.7, n.560, p.1-9, 2014.

LEMOS, A.S.O.; LEMOS, A.S.O.; FLORÊNCIO, J.R.; PINTO, N.C.C.; CAMPOS, L.M.; SILVA, T.P.; GRAZUL, R.M.; PRISCILA F. PINTO, P.F.; TAVARES, G.D.; SCIO, E.; APOLÔNIO, A.C.M.; MELO, R.C.N.; FABRI, R.L. Antifungal Activity of the Natural Coumarin Scopoletin Against Planktonic Cells and Biofilms From a Multidrug-Resistant *Candida tropicalis* Strain. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 11, p. 1-11, 2020.

LEMOS, A.S.O.; CAMPOS, L.M.; MELO, L.; GUEDES, M.C.M.R.; OLIVEIRA, L.G.; SILVA, T.P.; MELO, R.C.N.; ROCHA, V.N.; AGUIAR, J.A.K.; APOLÔNIO, A.C.M.; SCIO, E.; FABRI, R.L. Antibacterial and Antibiofilm Activities of Psychorubrin, a Pyranonaphthoquinone Isolated From *Mitracarpus frigidus* (Rubiaceae). **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 9, p. 1-11, 2018.

LIMA, F.O.; BEZERRA, A.S. Flavonoides e radicais livres. **Ciências Naturais e Tecnológicas, Santa Maria**, v. 13, n. 1, p. 111-124, 2012.

LOISEAU, R.; LOISEAU, R.; NABET, C.; SIMON, S.; GINOUVES, M.; BROUSSE, P.; BLANCHET, D.; DEMAR, M.; COUPPIE, P.; BLAIZOT, R. American cutaneous leishmaniasis in French Guiana: an epidemiological update and study of environmental risk factors. **International Journal of Dermatology**, v. 58, n. 11, p. 1323–1328, 2019.

LIN, C.Z.; ZHU, C.C.; HU, M.; WU, A.Z.; BAIRU, Z.D.; KANGSA, S.Q. Structure-activity relationships of antioxidant activity *in vitro* about flavonoids isolated from *Pyrethrum tatsienense*. **Journal of Intercultural Ethnopharmacology**, v.3, n.3, p.123-127, 2014.

LOBO, V.; PATIL, A.; PHATAK, A.; CHANDRA, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacognosy Reviews**. v.4, n.8, p.118-126, 2010.

MANN, S.; FRASCA, K.; SCHERRER, S.; HENAO-MARTÍNEZ, A.F.; NEWMAN, S.; RAMANAN, P.; SUAREZ, J.A. A Review of Leishmaniasis: Current Knowledge and Future Directions. **Current Tropical Medicine Reports**. v.8:121–132, 2021.

MARCUM, Z.A.; HANLON, J.T. Recognizing the Risks of Chronic Nonsteroidal AntiInflammatory Drug Use in Older Adults. **Ann Longterm Care**, v.18, n.9, p.24–27, 2010.

MAROON, J.C.; BOST, J.W.; MAROON, A. Natural anti-inflammatory agents for pain relief. **Surgical Neurology International**, v.1, n.80, 2010.

MARIZ, B. A. L. A.; SÁNCHEZ-ROMERO, C.; ALVARADO, N.A.P.; CAMPOS, E.M.M.; ALMEIDA, O.P.; MARTÍNEZ-PEDRAZA, R. Diffuse cutaneous leishmaniasis with oral involvement in a patient of Northern Mexico. **Tropical Doctor**, v. 49, n. 4, p. 303–306, out. 2019.

MEEK, I.L.; LAAR, M.A.F.J.V.; VONKEMAN, H.E. Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs: An Overview of Cardiovascular Risks. **Pharmaceuticals**, v. 3, p.2146-2162, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar [recurso eletrônico]. n. 2.^a edição, p. 182, 2017.

MOO-HUCHIN, V.M.; MOO-HUCHIN, M.I.; ESTRADA-LEÓN, R.J.; CUEVAS-GLORY, L.; ESTRADA-MOTA, I.A.; ORTIZ-VÁZQUEZ, E.; BETANCUR-ANCONA, D.; SAURIDUCH, E. Antioxidant compounds, antioxidant activity and phenolic content in peel from three tropical fruits from Yucatan, Mexico. **Food Chemistry**, v.166, p.17–22, 2015.

MOKNI, M. Leishmanioses cutanées. **Annales de Dermatologie et de Vénérologie**, v. 146, n. 3, p. 232–246, mar. 2019.

NEWMAN, D.J. The Influence of Brazilian Biodiversity on Searching for Human Use Pharmaceuticals. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 3, p. 402-414, 2017.

NIMSE, S.B.; PAL, D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. **Royal Society of Chemistry**, v. 5, p.27986–28006, 2015.

OPAS/OMS 2017. **Informe Epidemiológico das Américas, Leishmanioses**.

PANCHE, A.N.; DIWAN, A.D.; CHANDRA, S.R. Flavonoids: an overview. **Journal of Nutritional Science**. v.5, n. 47, p. 1- 15, 2016.

PEREIRA, Z. V.; CARVALHO-OKANO, R. M.; GARCIA, F. C. P. Rubiaceae Juss. Da Reserva Florestal Mata de Paraíso. **Acta Botanica Brasilica**, Viçosa, v. 20, n. 10, p.207-224, 2006.

PISOSCHI, A.M.; NEGULESCU, G.P. Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review. **Biochemistry & Analytical Biochemistry**, v.1, n.1, p.1-10, 2011.

PHANIENDRA, A.; JESTADI, D.B.; PERIYASAMY, L. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v.30, n.1, p.11–26, 2015.

SERAFIM, T.D.; COUTINHO-ABREU, I.V.; DEY, R.; KISSINGER, R.; VALENZUELA, J.G.; OLIVEIRA, F.; KAMHAWI, S. Leishmaniasis: the act of transmission. **Trends in Parasitology**, 2021, v. 37, n.11, p.976-987, 2021.

SILVA, C.T.; JASIULIONIS, M.G. Relação entre estresse oxidativo, alterações epigenéticas e câncer. **Revista Ciência e Cultura**, v.66, n.1, p.38-42, 2014.

WHO 2018. Disponível em <http://www.who.int/topics/tropical_diseases/en>Acessado em 11 de novembro de 2018.

SILVA, T.S.C.; SUFFREDINI, I.B.; RICCI, E.L.; FERNANDES, S.R.C.; GONÇALVES, V.JR.; ROMOFF, P.; LAGO, J.H.G.; BERNARDI, M.M.2. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Lantana camara* L. extract in mice. *Rev. Bras. Pl. Med.*, Campinas, v.17, n.2, p.224-229, 2015.

SAJID, A.; MANZOOR, Q.; SAJID, A.; AHMAD, R.S.; HUSSAIN, G.; IMRAN, M.; ASLAM, F.; ARSHAD, M.U.; GONDAL, T.A.; IMRAN, A. Essential Oil and Leaves from *Lantana camara* Significantly Ameliorate Different Cancer Cell Lines by Suppressing the NF- κ B Pathway. **Sains Malaysiana**, v. 50, n.10, p. 2923-2936, 2021.

SAIKIA, A.K.; SAHOO, R. K., Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oil of *Lantana camara* L. **Middle-East Journal of Scientific Research**, v. 8, n. 3, p. 599-602, 2011.

SOUZA, E.B. *Mitracarpus* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB14120>>. BFG. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, v.66, n.4, p.1085-1113, 2015.

SUNDD, P.; POSPIESZALSKA M.K.; CHEUNG, S. L.; KONSTANTOPOULOS, K.; LEY, K. Biomechanics of leukocyte rolling. **Biorheology**, v.48, n.1, p.1–35, 2011.

SUTHAR, S.K.; LEE H.B.; SHARMA, M. The synthesis of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID)–lantadene prodrugs as novel lung adenocarcinoma inhibitors via the inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2), cyclin D1 and TNF- α -induced NF- κ B activation. **RSC Advances**, v.4, p.19283–19293, 2014.

TORRES-GUERRERO, E.; QUINTANILLA-CEDILLO, M.R.; RUIZ-ESMENJAUD, J.; ROBERTO ARENAS, R. Leishmaniasis: a review [version 1; referees: 2 approved]. **F1000Research**, v.6, n.750, p.1-15, 2017.

WALLACE, J.L. Nitric oxide as a regulator of inflammatory processes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.100, n.1, p.5-9, 2005.

WHO. Health topics- leishmaniasis. 2018. https://www.who.int/healthtopics/leishmaniasis#tab=tab_1. Acesso em 07 de julho de 2021.

WHO. Leishmaniasis, 2021. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/factsheets/detail/leishmaniasis>. Acesso em 07 de julho de 2021.

WHO. World Health Organization. Disponível em <<https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/leishmaniasis>> Acessado em 27 de setembro de 2022.

WONGRAKPANICH, S.; WONGRAKPANICH, A.; MELHADO, K.; RANGASWAMI, J. A Comprehensive Review of Non-Steroidal Anti Inflammatory Drug Use in The Elderly. **Aging and Disease**, v. 9, n.1, p.143-150, 2018.

WU, P.; SONG, Z.; WANG, X.; LI, Y.; LI, Y.; CUI, J.; TUERHONG, M.; JIN, D.Q.; ABUDUKEREMU, M.; LEE, D.; XUA, J.; GUO, Y. Bioactive triterpenoids from *Lantana*

camara showing anti-inflammatory activities *in vitro* and *in vivo*. *Bioorganic Chemistry*. v.101, n.104004, p.1-10,2020.

ZHANG, J. M.; AN, J. Cytokines, Inflammation and Pain. **International Anesthesiology Clinics**, v.45, n.2, p. 27–37, 2007.

ZHANG, M.; LIU, N.; LIU, H. Determination of the Total Mass of Antioxidant Substances and Antioxidant Capacity per Unit Mass in Serum Using Redox Titration. **Bioinorganic Chemistry and Applications**, p.1-5, 2014.

4. DIVISÃO DOS CAPÍTULOS

Para melhor compreensão esse trabalho será dividido em capítulos (1, 2 e 3). O primeiro capítulo será relacionado ao processo de triagem para a seleção das atividades biológicas dos extratos; o segundo terá como foco a atividade antileishmanial das frações provindas do extrato com melhor atividade biológica em *L. amazonensis*, assim como o mecanismo de ação e, por último, o terceiro capítulo irá abordar de forma mais aprofundada a capacidade de combater o estresse oxidativo do extrato com o melhor potencial antioxidante, assim como a atividade anti-inflamatória.

5. CAPÍTULO 1- AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, HEMOLÍTICA, CITOTÓXICA E ANTILEISHMANIAL DE DIFERENTES EXTRATOS DE *LANTANA CAMARA L.* E *MITRACARPUS FRIGIDUS*

5.1 OBJETIVOS

5.1.1 Objetivo geral

Avaliar as atividades antioxidante, hemolítica, citotóxica e antileishmanial de diferentes extratos de *Lantana camara L.* e *Mitracarpus frigidus* e correlacionar as propriedades encontradas com os teores de terpenos e fenólicos encontrados.

5.1.2 Objetivos específicos

- Determinar o teor de terpenos e compostos fenólicos nos diferentes extratos;
- Avaliar o efeito antioxidante *in vitro* para verificar a eficácia na eliminação de radicais livres;
- Avaliar a atividade hemolítica *in vitro* em eritrócitos humanos;

- Avaliar o efeito dos extratos em formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, bem como em macrófagos; determinar a seletividade dos extratos.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 Material vegetal

As folhas de *Lantana camara* L. foram coletadas em Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil, em 17 de janeiro de 2020, enquanto que as partes aéreas de *Mitracarpus frigidus* foram coletadas em Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil, em maio de 2009. Um exemplar de ambas espécies (CESJ 30671 e CESJ 46076 respectivamente) foi depositado no Herbário Leopoldo Krieger da Universidade Federal de Juiz de Fora, de acordo com as licenças número A18AB08 e A032F41-23 SISGEN/BRASIL respectivamente.

5.2.2 Preparação dos diferentes extratos das folhas de *Lantana camara* L.

Os diferentes extratos de *Lantana camara* L. foram obtidos após maceração estática de 90g de folhas secas e previamente pulverizadas. Os extratos foram preparados utilizando uma ordem crescente de polaridade (hexano, diclorometano, acetato de etila, etanol e metanol). Após a extração (3 x 500 mL), o líquido resultante foi concentrado à pressão reduzida utilizando o evaporador rotatório (Heidolph – Laborota 4000). Os extratos foram pesados e tiveram seus rendimentos calculados (2,80 ; 5,72; 6,71; 8,39 e 8,52% respectivamente). Os extratos foram mantidos sobre refrigeração até o momento da realização dos testes químicos e biológicos.

5.2.3 Preparação do extrato aquoso e do extrato em diclorometano de partes aéreas de *Mitracarpus frigidus* L.

O extrato aquoso das partes aéreas de *M. frigidus* foi preparado por meio de infusão de 1kg de partes aéreas secas e pulverizadas em água destilada a 80 °C por 2 horas. Após a extração, a solução foi filtrada e liofilizada para remoção do solvente e mantida em frascos hermeticamente tampados sob refrigeração (-4 °C) para posteriores testes biológicos e caracterização química. O material foi denominado MFAq e apresentou rendimento de 12,6%

(126g) em relação ao material vegetal seco. Com o intuito de facilitar a compreensão a fração em diclorometano de *M. frigidus* será tratada como um extrato. A preparação do extrato em diclorometano seguiu a metodologia descrita por Fabri et al. (2020). Em resumo, o extrato metanólico de *M. frigidus* (MFM) foi fracionado por extração líquido-líquido, onde 100g de MFM foram dissolvidos em MeOH-H₂O (8:2) e particionados com hexano (C₆H₁₄), diclorometano (CH₂Cl₂), acetato de etila (EtOAc) e n-butanol (n-BuOH) sucessivamente. Os solventes foram evaporados a fim de obter as diferentes frações. O extrato em CH₂Cl₂ foi denominada de MFD e apresentou 4,8 % de rendimento.

5.2.4 Cultivo dos parasitos

Neste estudo foi utilizada a cepa selvagem de *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) e a cepa de *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) transfectadas com o gene da proteína fluorescente vermelha (Red fluorescent protein-RFP). A cultura das formas promastigotas das *L. amazonensis* RFP foram mantidas em meio 199 (Himedia AT014) suplementado com Hemina bovina, SFB, solução vitamínica MEM (Thermo Fisher 11120052) e solução de penicilina/estreptomicina enquanto os promastigotas da cepa selvagem *L. amazonensis* foram mantidos em meio Warren suplementado com Hemina bovina, SFB e solução de penicilina/estreptomicina. As células foram cultivadas em garrafas para cultivo celular (Corning 430168), mantidas em incubadora denominada BOD (do inglês Biochemical Oxygen Demand” ou Demanda Bioquímica de oxigênio) a 25 °C.

5.2.5 Manutenção da infectividade das linhagens de *L. amazonensis*

Para garantir a infectividade das linhagens de *L. amazonensis* utilizadas neste estudo, foram utilizadas fêmeas de camundongos da linhagem BALB/c com 4 a 6 semanas de idade. Então, as formas promastigotas de *L. amazonensis*, em fase estacionária da curva de crescimento, foram contadas em câmara de *Newbauer*, ajustadas em PBS (“Phosphate Buffer Solution”) para 2×10^6 parasitos e foram inoculados 10 µL no coxim plantar da pata direita traseira dos animais. Após aproximadamente 40 dias de infecção os parasitos foram isolados através de punção da lesão, onde as formas amastigotas foram isoladas e semeadas em meios

de cultivos descritos acima, suplementado com 20% de SFB e 1% de solução de penicilina/estreptomicina e mantidas em BOD para conversão das formas amastigotas em promastigotas. Este protocolo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFJF (CEUA n° 009/2018, Anexo I).

5.2.6 Avaliação da toxicidade dos extratos em promastigotas de *L. amazonensis*

A atividade citotóxica dos extratos em formas promastigotas de *L. amazonensis* PH8 foi determinada através do método colorimétrico do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5 difeniltetrazólico (MTT) (Sigma Chemical Co- St. Louis, MO, USA) (MOSMANN, 1983). Este método consiste na conversão do tetrazólio sódico de cor amarela em cristais de formazam de coloração lilás, por enzimas como oxidorreduções, desidrogenases, oxidases e peroxidases usando NADH, NADPH, succinato ou piruvato, presentes tanto no citoplasma, quanto em mitocôndrias das células (PRÄBST et al., 2017). Desta maneira, formas promastigotas de *L. amazonensis*, em fase logarítmica da curva de crescimento, foram contadas em câmara de Neubauer, ajustadas na concentração de 2×10^6 em seu respectivo meio de cultura em placas de 96 poços (Sarstedt 83.3924.500). Os extratos foram diluídos e adicionados nos poços em concentrações variadas (100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,125 $\mu\text{g/mL}$), obtidas através de diluição seriada. Miltefosina foi utilizada como fármaco de referência. Os tratamentos foram realizados em duplicatas, e os resultados foram obtidos através de três experimentos independentes, nos quais foram reservados poços sem adição dos extratos (controle negativo). Após 72h de incubação em BOD a 25 °C, foram adicionados 10 μL de de MTT na concentração de 5 mg/mL em cada poço e as placas foram novamente incubadas por 4h a 25 °C. Após este período, a reação foi interrompida adicionando 100 μL de uma solução de isopropanol acidificado (0,7% de HCl a 10N). As placas foram lidas em espectrofotômetro a 570nm (Multiskan EX- Thermo Electron Corporation, Vanta, Finlândia). Os valores das leituras foram convertidos em porcentagem de inibição de crescimento dos promastigotas em relação ao controle, e a partir destes, para cada extrato, foi calculado o CI_{50} que é a concentração capaz de inibir 50% do crescimento celular. O CI_{50} foi obtido utilizando o *software* GraFit 5 (Erithacus Sftware Ltda., Horley, U.K.). A miltefosina foi utilizada como fármacos de referência.

5.2.7 Avaliação da toxicidade dos extratos em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c

O potencial citotóxico dos extratos em células de mamíferos foi avaliado utilizando macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c. Para a obtenção dos macrófagos, os animais foram previamente estimulados com 2 mL de caldo tioglicolato a 3%, 72h antes do lavado peritoneal. O lavado peritoneal foi realizado após os animais terem sido eutanasiados. Então, 6 mL de solução de Hank estéril foram injetadas no peritônio dos animais, sendo que cada animal foi submetido ao processo por duas vezes, para garantir uma maior obtenção de células. A solução de células obtida foi transferida para tubos cônicos e centrifugadas a 1000 RPM (centrífuga Thermo Fisher Scientific D37520) durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, as células ressuspensas em meio RPMI 1640 (Sigma Chemical Co- St. Louis, MO, USA) para determinação da concentração através da contagem em câmara de Neubauer. Desta maneira, as células foram ajustadas para a concentração de 2×10^6 células/mL em meio RPMI suplementado com 10% de SFB, 0,5% de solução penicilina/estreptomicina. A solução foi transferida para placas de 96 poços (KASVI® K12-096) e incubadas por um período de 16h em estufa com atmosfera de 5% de dióxido de carbono (CO₂) em uma temperatura de 37 °C, para adesão dos macrófagos. Após este período, as placas foram lavadas com PBS para eliminar células não aderidas, e foi novamente adicionado meio RPMI-1640. Os poços foram tratados com os os diferentes extratos em concentrações variadas (300,0; 150,0; 75,0; 37,5; 18,75 e 9,37µg/mL) através da técnica de diluição seriada e as placas foram novamente incubadas por 72 h. Em seguida, foram adicionados 10 µL de solução de MTT em uma concentração de 5 mg/mL, e as placas foram incubadas por um período de 2 horas (MOSMANN, 1983). Após este período, a reação foi interrompida utilizando uma solução de isopropanol acidificado (7% de HCL a 10N), e as placas foram lidas em espectrofotômetro a 570 nm. A viabilidade celular foi determinada através da porcentagem de inibição de macrófagos tratados em relação ao controle negativo. A partir dos valores obtidos, foi calculado o CC₅₀ (concentração citotóxica capaz de matar 50% dos macrófagos) com ajuda do *software* GraFit 5. Foram realizados três experimentos independentes em duplicata, poços sem tratamento foram utilizados como controle negativo. Miltefosina foi utilizada como fármacos de referência. Este protocolo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFJF (CEUA n° 007/2018, Anexo II).

5.2.8 Avaliação da toxicidade dos extratos em amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*

A atividade antileishmanial dos extratos foram testadas em amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* de RFP (GRANATO et al., 2018). Para isto, os macrófagos obtidos da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c, foram ajustados a uma concentração de 2×10^6 células/mL em meio RPMI-1640 e plaqueados em placas de 24 poços (KASVI® K12-024). As placas foram incubadas em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ a 33 °C por 16 horas. Após este período, os poços foram lavados com PBS para eliminar as células não aderentes. Promastigotas de *L. amazonensis* foram contadas em câmara de Neubauer e ajustadas a uma concentração de 20×10^6 células/mL, em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB e 0,5% de penicilina/estreptomicina, alcançando a proporção de 10 promastigotas para cada macrófago. Em seguida, a solução de meio contendo as promastigotas foi transferida para os poços para interação com os macrófagos por um período de 4 horas. Posteriormente, os poços foram lavados três vezes com PBS, para remoção de promastigotas não fagocitadas, e o meio RPMI-1640 suplementado, foi novamente adicionado aos poços. Os tratamentos com os extratos foram realizados em duplicata e em concentrações variadas (100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,12 µg/mL), obtidas através da técnica de diluição seriada. Então, as placas foram novamente incubadas em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ por 72 horas. Em seguida, o sobrenadante dos poços foi descartado, e foi adicionado 200 µL de água deionizada, os poços foram raspados com intuito de lisar as células, e o seu conteúdo foi transferido para placas negras de 96 poços de fundo transparente. Este processo foi realizado por duas vezes, e em seguida, as placas foram lidas em fluorímetro (FLx800™ Fluorescence Reader, BioTek) em um comprimento de onda de 540 nm de excitação e 600 nm de emissão. Os resultados foram obtidos a partir de três experimentos independentes, realizados em duplicatas. Poços sem adição dos extratos foram utilizados como controle negativo. Também foram utilizados poços de macrófagos não infectados como branco. Miltefosina foi utilizada como fármaco de referência. Este protocolo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFJF (CEUA n° 008/2018, Anexo III).

O extrato mais promissor também foi avaliado quanto a sua atividade anti-amastigota utilizando a linhagem selvagem *L. amazonensis* PH8. O início do processo ocorre de maneira semelhante ao que já foi descrito anteriormente neste ítem. Após 72h. de tratamento, o sobrenadante foi descartado e as células foram fixadas com etanol absoluto e em seguida coradas com GIEMSA. As células então, foram desidratadas em bateria de acetona/xilol (Neon e Merck, respectivamente) em diferentes proporções: Acetona 100%, acetona 90%/xilol 10%; acetona 50%/Xilol 50%; acetona 10%/xilol 90%; e por fim, xilol 100%. Após isto, as lamínulas foram então fixadas sobre lâminas de vidro previamente identificadas, e então analisadas por microscopia de luz (Olympus BX41). A atividade antileishmanial do extrato mais promissor foi avaliada a partir da contagem do número de amastigotas dentro de macrófagos infectados em relação ao controle não tratado. Foram contados um total de 200 macrófagos infectados e não infectados, bem como o número de amastigotas no interior dos macrófagos parasitados. Os resultados foram dados a partir da porcentagem de inibição da carga global de amastigotas em relação ao controle não tratado, e desta maneira, foi possível calcular o CI_{50} do extrato mais promissor utilizando o *software* Probit. Os resultados foram obtidos a partir de três experimentos independentes, realizados em duplicatas. Poços sem adição do extrato foram utilizados como controle negativo.

5.2.9 Determinação do índice de seletividade (IS) dos extratos

O IS demonstra o quanto um composto/extrato pode ser ativo em uma forma parasitária sem causar danos à célula hospedeira. É dado pela razão entre o CC_{50} obtido no teste de citotoxicidade em macrófagos e o CI_{50} obtido para as formas amastigotas, que neste caso é a forma parasitária de interesse, já que é a responsável pelas manifestações clínicas das leishmanioses (TEMPONE; OLIVEIRA; BERLINCK, 2011).

5.2.10 Avaliação da toxicidade dos extratos em eritrócitos humanos

A atividade hemolítica dos extratos foi realizada de acordo com Machado (2017), com pequenas modificações. Inicialmente, foi coletado cerca de 6 mL de sangue total (grupo O, Rh-

negativo) de um doador saudável, em tubo contendo EDTA. O sangue foi transferido para um tubo de centrifugação estéril e centrifugado a 3000 rpm (centrífuga Thermo Fisher Scientific D37520, ano 2011) por 5 minutos. O plasma foi descartado, assim como a camada branca, correspondente aos leucócitos. Os eritrócitos foram lavados 4 vezes com PBS e foi realizada a diluição dessas células, originando uma solução de 50% de eritrócitos, que foi estocada em geladeira. A partir desta, foi preparada uma solução de 1% de células e esta foi distribuída em microplacas de 96 poços, onde os diferentes extratos foram adicionados em concentrações variadas (100 a 0,195 µg/mL). Os extratos foram previamente diluídos em DMSO, sendo que a máxima concentração utilizada desta substância foi de 0,05%, que não apresentou toxicidade para os eritrócitos. Após 24 horas de incubação em estufa a 37°C, as placas foram centrifugadas a 3000 rpm (centrífuga Thermo Fisher Scientific D37520, ano 2011) por 5 minutos e 100 µL do sobrenadante foi coletado e transferido para placa de 96 poços. A lise de hemácias foi determinada pela concentração de hemoglobina presente no sobrenadante das células. A absorbância do sobrenadante foi mensurada em espectrofotômetro (Multiskan EX) a 540 nm. Foram adicionados controles negativo e positivo, representados por PBS puro e SDS 0,1% em água deionizada, respectivamente. A anfotericina foi utilizada como fármaco de referência. A porcentagem de hemólise foi calculada pela fórmula: % hemólise = (Média da absorbância dos tratados – Média da absorbância controle negativo/ Média da absorbância controle positivo) x 100. O experimento foi realizado em triplicata. Este protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa CEP/UFJF (CAAE no. 23779719.1.0000.5147, anexo IV).

5.2.11. Determinação da atividade antioxidante por meio do método de sequestro de radicais livres (DPPH•)

A atividade sequestrante de radicais DPPH• foi determinada pelo método descrito por Brand-Williams et al. (1995). Foram transferidos para um poço de uma placa de 96 poços, 100 µL de uma solução a 1mg/mL dos extratos. Em seguida, foram realizadas diluições sucessivas 1:2 em metanol e adicionados 150 µL de solução de DPPH a 20 µg/mL em metanol, obtendo-se as concentrações de 250 a 0,49 µg/mL. A placa foi incubada ao abrigo da luz e após 30 min a absorbância foi mensurada a 517nm. O branco foi preparado da mesma maneira que as amostras, utilizando-se metanol no lugar da solução de DPPH. Procedeu-se também à medida

da absorbância do DPPH sem as amostras (controle negativo). Os testes foram realizados em triplicata e a porcentagem (%) de inibição de oxidação de MFAq foi calculada da seguinte maneira: % Inibição = $[(Abs_{DPPH} - Abs_{Amostra}) \div Abs_{DPPH}] \times 100$. Sendo: Abs_{DPPH} : absorbância mensurada para o radical DPPH em metanol; $Abs_{amostra}$: absorbância mensurada para as amostras. Foi determinada a concentração inibitória de 50% (CI_{50}) em $\mu\text{g/mL}$ utilizando o *software* GraFit 5, que é a quantidade necessária da amostra para reduzir em 50% a ação oxidante do DPPH. O controle positivo utilizado foi a rutina (um flavonoide já conhecido pelo seu poder antioxidante) cuja concentração variou de 250 a 0,0005 $\mu\text{g/mL}$.

5.2.12 Determinação do conteúdo de compostos fenólicos

A determinação do teor de fenóis foi feita por meio de espectroscopia na região do visível utilizando o método de Folin–Ciocalteu com pequenas modificações (DOWD,1959; FOLIN,1927). O ácido tânico foi utilizado como padrão. A curva de calibração foi preparada, com concentrações que variaram de 7,5 a 350 $\mu\text{g/mL}$ de uma solução metanólica de ácido tânico (500 $\mu\text{g/mL}$). Em microplacas de 96 poços foram adicionados 120 μL do reagente Folin Ciocalteu 20%, 30 μL dos extratos e 100 μL de carbonato de sódio 4%. Decorridos 30 min de incubação ao abrigo da luz, a absorbância foi medida em espectrofotômetro a 770 nm. Para o doseamento dos extratos foi preparada uma solução estoque a 500 $\mu\text{g/mL}$ em metanol ou água. Poços somente com amostra e metanol foram utilizados como branco do teste. Em microplacas de 96 poços foram adicionados 120 μL do reagente Folin Ciocalteu 20%, 30 μL da amostra e 100 μL de carbonato de sódio 4%. Decorridos 30 min de incubação ao abrigo da luz, a absorbância foi medida em espectrofotômetro a 770 nm. Todas as determinações foram realizadas em triplicata e a média \pm desvio padrão foi utilizada para o cálculo do teor de fenóis. O conteúdo total de fenóis foi expresso em mg/g de extrato vegetal, em equivalentes de ácido tânico (EAT). O experimento foi realizado em triplicata.

5.2.13 Determinação do conteúdo de terpenos

A dosagem de terpenos seguiu a metodologia de Pedrosa et al. (2020). A dosagem de triterpenos foi realizada utilizando uma curva padrão do triterpeno lupeol. Primeiramente foi preparada uma solução estoque de 100 $\mu\text{g/mL}$ em etanol, da qual foram pipetados 50, 100, 200,

400, 600, 800 e 1000 μL para a preparação da curva analítica usando lupeol. Os tubos foram mantidos em banho-maria (85°C) até a evaporação completa do solvente e em seguida foram adicionados 250 μL de solução de vanilina a 50 mg/mL e 500 μL de ácido sulfúrico (99,5%). Os tubos foram aquecidos em banho-maria ($60 \pm 1^{\circ}\text{C}$) por 30 min e em seguida, transferidos para banho de gelo. Após esse processo, foi adicionado 2500 μL de ácido acético (99,7%). As soluções resultantes foram mantidas sob resfriamento por 20 min e por mais 20 min à temperatura ambiente. As concentrações de lupeol em cada tubo variaram de 1,5 a 31 $\mu\text{g}/\text{mL}$. O mesmo procedimento foi conduzido após a adição de 1000 μL dos extratos vegetais preparados em etanol na concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Uma solução em branco foi preparada de forma semelhante e as absorvâncias foram determinadas a 548 nm. O conteúdo de terpenos totais foi expresso como mg/g de extrato equivalentes em lupeol.

5.2.14 Análise estatística

A análise estatística foi realizada para ensaios *in vitro*, utilizando o teste de ANOVA seguido pelo pós hoc teste de Bonferroni. As análises foram feitas no *software GraphPrism 5.0* (Erithacus Software Ltda). Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos. Os resultados foram expressos na forma de média \pm desvio padrão.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Avaliação da atividade antileishmanial e citotoxicidade em macrófagos peritoneais de camundongos.

Após a confecção dos diferentes extratos de *L. camara* e *M. frigidus* L. estes foram avaliados em formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*. Além disso, foi avaliada a toxicidade dos extratos em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c. As análises demonstraram que os extratos de *L. camara* foram mais ativos que os extratos de *M. frigidus* com destaque para o extrato etanólico de folhas de *Lantana camara* L (LCE) e para o extrato metanólico de folhas de *Lantana camara* L. (LCM) que apresentaram CI_{50} de $12,20 \pm 0,12$ e $10,90 \pm 0,26$ $\mu\text{g/mL}$, respectivamente para promastigotas e CI_{50} de 7,29 (6,26-8,49) e 7,84 (6,37-9,63) $\mu\text{g/mL}$, respectivamente para amastigotas intracelulares. Além disto, LCE e LCM mostraram-se muito mais tóxicas para o parasito intracelular do que para a célula hospedeira, com índice de seletividade de 30,64 e 33,25 respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1- Avaliação da atividade antileishmanial e da citotoxicidade celular dos diferentes extratos de *Lantana camara* L. e *Mitracarpus frigidus* L.

Extrato	Extratos brutos			Índice de seletividade para formas amastigotas (IS)
	Promastigota CI ₅₀ (µg/mL)	CC ₅₀ (µg/mL)	Amastigota CI ₅₀ (µg/mL)	
LCH	19,61 ± 0,98	>300	17,47 (14,37-21,25)	> 17,47
LCD	9,56 ± 0,33	245,82 ± 29,94	10,68 (8,90-12,80)	22,94
LCA	3,72 ± 0,33 ^a	146,99 ± 22,36	8,25 (7,01-9,72)	17,81
LCE	12,20 ± 0,12	223,40 ± 47,02	7,29 (6,26-8,49)^a	30,64
LCM	10,90 ± 0,26	260,68 ± 32,39	7,84 (6,37-9,63)^a	33,25
MFD	14,48 ± 1,33	42,30 ± 3,76	36,22 (30,62-42,84)	1,16
MFAq	>100	>300	>100	ND
Miltefosina	8,96 ± 0,5	67,93 ± 4,29	5,10 ± 1,79	13,31

Legenda_ ND_ Não determinado; LCH_ Extrato hexânico de folhas de *Lantana camara* L.; LCD_ Extrato diclorometanico de folhas de *Lantana camara* L.; LCA_ Extrato de acetato de etila de folhas de *Lantana camara* L.; LCE_ Extrato etanólico de folhas de *Lantana camara* L.; LCM_ Extrato metanólico de folhas de *Lantana camara* L.; MFD_ Extrato em diclorometano de partes aéreas de *Mitracarpus frigidus*; MFAq _ Extrato aquoso de *Mitracarpus frigidus*.; CI₅₀_ Concentração inibitória de 50%.; CC₅₀_ Citotoxicidade de celular de 50%; IS_ índice de seletividade. ^a- significa diferença estatística em relação ao demais extratos.

5.3.2 Avaliação da atividade hemolítica em eritrócitos humanos

Após a avaliação da atividade antileishmanial e da citotoxicidade celular em macrófagos murinos foi avaliada a atividade hemolítica em eritrócitos humanos. Como controle positivo foi utilizado a anfotericina B, uma vez que esse fármaco é conhecido pelo seu potencial hemolítico. Os resultados demonstraram que os extratos em diclorometano e aquoso de partes aéreas de *M. frigidus* induziram baixas taxas de hemólise (abaixo de 5%), seguidos dos extratos etanólico e

metanólico de folhas de *Lantana camara* L.; sendo, em todas as concentrações testadas, menos hemolíticos que a anfotericina B (Figura 8).

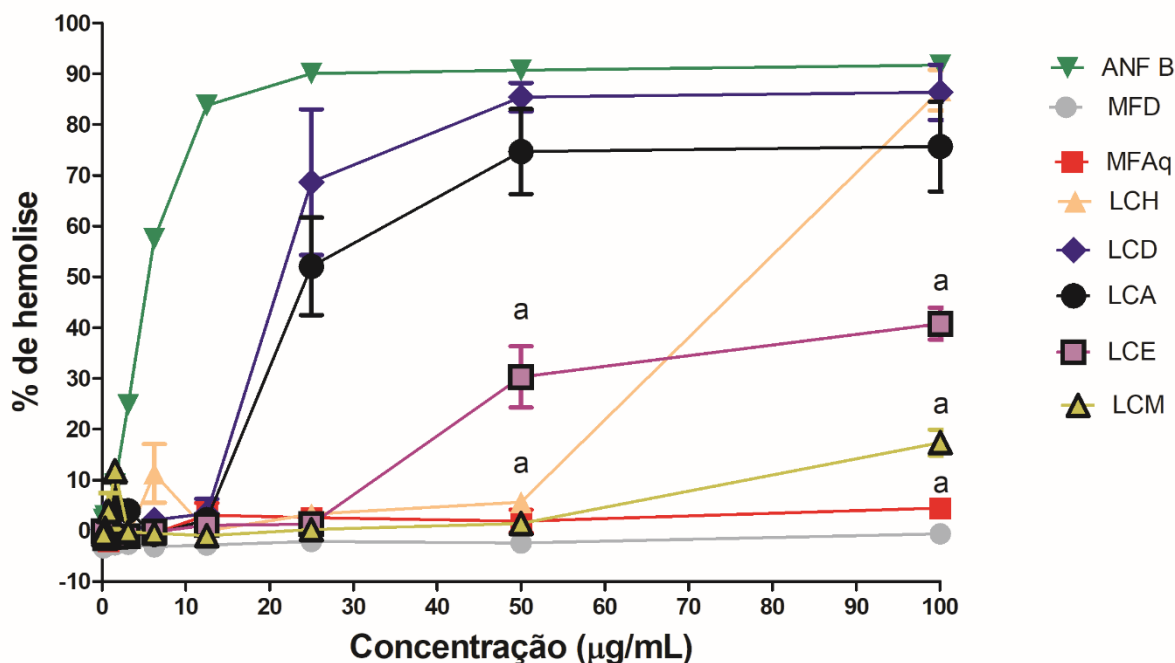


Figura 8- Avaliação da atividade hemolítica em eritrócitos humanos dos diferentes extratos de *Lantana camara* L. e *Mitracarpus frigidus* L. ANF B_ Anfotericina B; LCH_ Extrato hexânico de folhas de *Lantana camara* L.; LCD_ Extrato diclorometânico de folhas de *Lantana camara* L.; LCA_ Extrato de acetato de etila de folhas de *Lantana camara* L.; LCE_ Extrato etanólico de folhas de *Lantana camara* L.; LCM_ Extrato metanólico de folhas de *Lantana camara* L.; MFD_ Extrato em diclorometano de partes aéreas de *Mitracarpus frigidus*; MFAq _ Extrato aquoso de *Mitracarpus frigidus*. ^a- significa diferença estatística em relação ao demais extratos.

5.3.3 Avaliação da atividade antioxidante e determinação dos teores de terpenos e fenólicos totais

A atividade antioxidante e os teores de terpenos e fenólicos totais dos diferentes extratos também foram avaliados. As dosagens revelaram que os extratos de *L. camara* L. são ricos em terpenos e possuem baixos teores de compostos fenólicos. Além disso, estes extratos apresentaram baixo potencial antioxidante, visto que, apresentaram altos valores de CI₅₀ para o

radical livre DPPH. Os extratos de *M. frigidus*, por sua vez, revelaram uma promissora atividade antioxidante, com teores de compostos fenólicos maiores (de 63,47 à 84,19 µg/mL) e teores de terpenos menores (de 52,33 à 220,22 µg/mL) quando comparados aos diferentes extratos de *L. camara* L. (Tabela 2)

Tabela 2- Avaliação da atividade antioxidante e dosagem dos teores de terpenos e fenólicos totais dos diferentes extratos de *Lantana camara* L. e *Mitracarpus frigidus*.

Extrato	Teor de terpenos equivalentes em lupeol (mg/g de extrato)	Teor de substâncias fenólicas equivalentes em ácido tânico (mg/g de extrato)	DPPH CI₅₀ (µg/mL)
LCH	453,26 ± 33,28	24,82 ± 0,15	>250
LCD	878,99 ± 28,93^a	17,73 ± 0,56	>250
LCA	396,50 ± 29,83	24,93 ± 1,46	170,30 ± 57,11
LCE	477,51 ± 26,41	34,80 ± 2,71	83,04 ± 14,98
LCM	458, 44 ± 17,94	43,73 ± 2,78	64,24 ± 4,64
MFD	220,22 ± 1,79	63,47 ± 1,80	10,00 ± 1,00
MFAq	52,33 ± 4,40	84,19 ± 2,10 ^a	6,19 ± 0,98^a
Rutina	-	-	2,27 ± 0,36

Legenda_ DPPH, 2,2-difenil-1-(2,4,6-trinitrofenil)hidrazil. LCH_ Extrato hexânico de folhas de *Lantana camara* L.; LCD_ Extrato diclorometânico de folhas de *Lantana camara* L.; LCA_ Extrato de acetato de etila de folhas de *Lantana camara* L.; LCE_ Extrato etanólico de folhas de *Lantana camara* L.; LCM_ Extrato metanólico de folhas de *Lantana camara* L.; MFD_ Extrato em diclorometano de partes aéreas de *Mitracarpus frigidus*; MFAq _ Extrato aquoso de *Mitracarpus frigidus*. One Way Anova seguido do pós hoc teste de Boneferroni. ^a- significa diferença estatística em relação ao demais extratos.

5.4 DISCUSSÃO

Uma série de fatores limita a utilização de medicamentos para o tratamento de infecções causadas por protozoários, dentre eles podem ser citados: o alto custo, baixa adesão, resistência, baixa eficácia e baixa segurança. Portanto, novos medicamentos que sejam seguros, não tóxicos e com uma boa relação custo-benefício são necessários (CHEMEDA et al., 2022). A quimioterapia antileishmanial atual ainda se baseia em antimoniais pentavalentes, anfotericina B, isetionato de pentamidina, utilizados há mais de 50 anos e com potencial risco tóxico. Apesar da inclusão nesta lista da primeira medicação por via oral, a miltefosina, esta apresenta efeito teratogênico e eficácia variada para as espécies de *Leishmania* do Novo Mundo. Para lidar com as limitações desses medicamentos, várias combinações são testadas e empregadas na prática, como sistemas de “*drug delivery*” menos tóxicos, incorporando esses fármacos a nanopartículas ou lipossomas (OLÍAS-MOLERO et al., 2021). Desta forma, surge a necessidade de novas estratégias terapêuticas contra as leishmanioses, o que torna as plantas medicinais uma fonte de novas substâncias com potencial terapêutico, uma vez que compostos naturais e substâncias derivadas de plantas vem sendo amplamente utilizados contra microrganismos patogênicos (MAHMOUDVAND et al., 2022).

Diante deste contexto, esse trabalho teve como intuito, estudar a atividade antileishmanial de *L. camara* e *M. frigidus*, espécies com um amplo espectro de bioatividades, e correlacionar o seu potencial biológico com o teor de substâncias químicas encontrado. Um dos critérios avaliados na triagem *in vitro* de novos fármacos é o índice de seletividade, que reflete o quanto este fármaco é mais tóxico para o parasito do que em relação a célula de mamífero. Segundo alguns autores, compostos com índice de seletividade maior que 1 são considerados mais seletivos para os parasitos de *Leishmania* spp do que para a célula hospedeira e podem ser um promissor agente para o tratamento das leishmanioses (MAKWALI et al., 2015). Entretanto, altos índices de seletividade sugerem uma menor toxicidade do composto para a célula, estimulando a continuidade dos estudos com a substância e os posteriores testes *in vivo* (DE MUYLDER et al., 2011). Por meio dos resultados encontrados, foi possível observar que os extratos de *L. camara* foram mais ativos em *L. amazonensis* e também mais seletivos que os extratos de *M. frigidus*, sendo assim considerados mais promissores.

Além disso, foi possível observar que os extratos de *L. camara* demonstraram maior teor de terpenos quando comparados aos extratos de *M. frigidus*. Em geral, os terpenos exibem

atividade antileishmanial por ação direta sobre os parasitos ou por ação indireta através da modulação da resposta imune. Neste último, os terpenos promovem um perfil de resposta pró-inflamatória e ativação de mecanismos microbicidas que, por sua vez, levam à produção de EROS com conseqüente redução da carga parasitária. Os terpenos também podem atuar nos parasitos danificando suas membranas plasmáticas ou inibindo a DNA topoisomerase (RAIMUNDO et al., 2022). Assim, essas substâncias presentes em altos teores nos diferentes extratos de *L. camara* podem ser os responsáveis pela sua bioatividade.

Outro teste de toxicidade realizado neste estudo foi a atividade hemolítica. Este ensaio avalia a toxicidade de substâncias, por meio de sua ação nas hemácias humanas, conduzindo assim, a liberação de hemoglobina. A avaliação do potencial hemolítico é recomendada pois a presença de conteúdo eritrocitário no plasma pode causar danos em vários órgãos vitais, como fígado, rins e coração. Além disso, compostos que induzem lise de eritrócitos não podem ser administrados diretamente por via intravenosa. Assim, é necessário observar a atividade hemolítica na triagem das atividades biológicas e toxicológicas de produtos naturais (PEREIRA et al., 2016). Por meio desse ensaio pode-se observar que os extratos de *M. frigidus* são menos hemolíticos que os extratos de *L. camara*. Entretanto, LCE e LCM ainda foram considerados menos hemolíticos que a anfotericina B, mostrando assim, uma promissora atividade.

Em relação ao potencial antioxidante, observa-se que os extratos de *M. frigidus* exibiram uma melhor atividade antioxidante pelo teste de DPPH. Esse potencial biológico pode estar associado a presença das substâncias fenólicas encontradas, que apresentaram um maior teor quando em comparação com os extratos de *L. camara*. A atividade antioxidante dos compostos fenólicos é principalmente devido às suas propriedades redox, essa propriedade faz com que esses compostos possam desempenhar um papel importante na neutralização de radicais livres, como a eliminação de oxigênio singleto e decomposição de peróxidos (ZHENG; WANG, 2001). A inflamação como dito anteriormente, possui uma estreita relação com o estresse oxidativo. Na resposta inflamatória, leucócitos e mastócitos presentes nas regiões afetadas, aumentam o seu “burst” respiratório conduzindo a um maior consumo de oxigênio por essas células e conseqüente aumento e liberação de EROS na área danificada (ARULSELVAN et al., 2016).

Além disso, a inflamação é uma característica do processo infeccioso das leishmanioses. Na LC por exemplo, os parasitos conseguem escapar do mecanismo de morte e a sua

persistência induz uma resposta inflamatória que é caracterizada por uma resposta de perfil TH-1, onde citocinas inflamatórias como IFN- γ , IL-1 β e TNF- α irão contribuir com o surgimento do dano tecidual e o desenvolvimento de úlceras na pele (SALDANHA et al., 2020). Logo, mesmo que os extratos de *M. frigidus* sejam considerados menos ativos que os extratos de *L. camara* eles poderiam auxiliar na eliminação de radicais livres oriundos da inflamação decorrente do processo infeccioso.

5.5 CONCLUSÃO

Por meio dos resultados encontrados é possível concluir que os extratos de *L. camara* possuem uma atividade antileishmanial mais promissora dos que os extratos de *M. frigidus*, a qual pode ser observada devido a um maior índice de seletividade. Além disso, essa atividade biológica pode estar relacionada a presença dos altos teores de terpenos, substâncias com potencial antileishmanial já relatado. Em relação aos extratos de *M. frigidus*, os mesmos apresentaram potencial antioxidante mais promissor e foram considerados menos hemolíticos que os extratos de *L. camara*. Em conjunto, estes resultados sugerem que os extratos de *L. camara* podem ser utilizados no tratamento curativo de LC, o qual, associado a extratos de *M. frigidus*, poderá favorecer redução do estresse oxidativo decorrente do processo inflamatório na infecção por *L. amazonensis*.

5.6 REFERÊNCIAS

- ARULSELVAN, P.; FARD, M.T.; TAN, W.S.; GOTHAI, S.; FAKURAZI, S.F.; NORHAIZAN, M.E.; KUMAR, S.S. Role of Antioxidants and Natural Products in Inflammation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. p.1-15, 2016.
- CHEMEDA, G.; BISRAT, D.; YESHAK, M.Y.; ASRES, K. In Vitro Antileishmanial and Antitrypanosomal Activities of Plicataloside Isolated from the Leaf Latex of *Aloe rugosifolia* Gilbert & Sebsebe (Asphodelaceae). **Molecules**, v.27, n.1400, 2022
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie – Food Science and Technology**, v.28, p.25-30, 1995.
- DE MUYLDER, G.; ANG, K. K.; CHEN, S.; ARKIN, M. R.; ENGEL, J. C.; MCKERROW, J. H. A screen against *Leishmania* intracellular amastigotes: comparison to a promastigote screen and identification of a host cell-specific hit. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 5, e1253, 2011.
- DOWD, L. E. Spectrophotometric determination of quercetin. **Analytical Chemistry**, v.31, n.7, p.1184-1187,1959.
- FABRI, R. L.; CUNHA, P. S.; CAMPOS, L. M.; LEMOS, A. S. O.; SOUZA-FAGUNDES, E. M.; SCIO, E. Potencial Antimicrobiano, Citotóxico e Leishmanicida do Extrato diclorometano Das partes Aéreas de *Mitracarpus frigidus* (RUBIACEAE). **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 17, n. 1, p. 1-8, 2020.
- FOLIN, O.; CIOOCALTEAU, V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v.73, p.627, 1927.
- MACHADO, P. DE A. **EFEITO DE BIOISÓSTEROS DO RESVERATROL COMPLEXADOS A METAL EM ESPÉCIES DE LEISHMANIA ASSOCIADAS À LEISHMANIOSE CUTÂNEA E ESTUDO DO MECANISMO DE MORTE DO PARASITO. 163f, 2017.** (Tese de Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, 2017.
- MAHMOUDVAND, H.; YADEGARI, J.G.; KHALAF, A.K.; HASHEMI, M.J.; DASTYARHAGHIGHI, S.; SALIMIKIA, I. Chemical composition, antileishmanial, and cytotoxic effects *Ferula macrecolea* essential oil against *Leishmania tropica*. **Parasite Epidemiology and Control**. V.19, p.1-8, 2022.
- MAKWALI, J.A.; WANJALA, F.M.E.; INGONGA, J.; ANJILI, C.O. In vitro Studies on the Antileishmanial Activity of Herbicides and Plant Extracts Against *Leishmania major* Parasites. **Research Journal of Medicinal Plants**, v. 9, n. 3, p.90-104, 2015.

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

OLÍAS-MOLERO, A.I.; FUENTE, C.L.; CUQUERELLA, M.; TORRADO, J.J.; ALUNDA, J.M. Antileishmanial Drug Discovery and Development: Time to Reset the Model? **Microorganisms**, v. 9, n.2500, p.1-18, 2021.

PEDROSA, A.M.; DE CASTRO, W.V.; CASTRO, A.H.F.; DUARTE-ALMEIDA, J.M. Validated spectrophotometric method for quantification of total triterpenes in plant matrices. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 28, p. 281–286, 2020.

PEREIRA, V.S.S.; OLIVEIRA, C.B.S.; FUMAGALLI, F.; EMERY, F.S.; SILVA, N.B.; ANDRADE-NETO, V.F. Cytotoxicity, hemolysis and in vivo acute toxicity of 2-hydroxy-3-anilino-1,4-naphthoquinone derivatives. **Toxicology Reports**, v. 3, p.756–762, 2016.

RAIMUNDO, V.D.; CARVALHO, R.P.R.; MACHADO-NEVES, M.; MARQUES-DASILVA, E.A. Effects of terpenes in the treatment of visceral leishmaniasis: A systematic review of preclinical evidence. **Pharmacological Research**, v.177, n.106117, p. 1-13, 2022.

SALDANHA, M.G.; PAGLIARI, C.; QUEIROZ, A.; MACHADO, P.R.L.; CARVALHO, L.; SCOTT, P.; CARVALHO, E.M.; ARRUDA, S. Tissue Damage in Human Cutaneous Leishmaniasis: Correlations Between Inflammatory Cells and Molecule Expression. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.10, n.355, p.1-7, 2020.

TEMPONE, A. G.; OLIVEIRA, C. M. DE; BERLINCK, R. G. S. Current Approaches to Discover Marine Antileishmanial Natural Products. **Planta Medica**, v. 77, n. 6, p. 572–585, abr. 2011.

ZHENG, W.; WANG, S.Y. Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.49, n. 11, p.5165–5170, 2001.

6. CAPITULO 2- PURIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS E AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO ANTILEISHMANIAL DO EXTRATO ETANÓLICO DE *LANTANA CAMARA L.*

6.1 Seleção dos extratos mais promissores para o estudo do mecanismo de ação antileishmanial e da atividade antioxidante e inflamatória

Antes de iniciar o estudo dos mecanismos de ação antileishmanial, atividade anti-inflamatória e continuação da atividade antioxidante, foi feita a seleção dos melhores extratos brutos seguindo os seguintes critérios: atividade antileishmanial promissora, atividade antioxidante promissora (uma vez que são produzidos EROS no processo inflamatório), baixa toxicidade em macrófagos murinos e em eritrócitos humanos e o uso de solventes menos tóxicos, afim de se respeitar os princípios da química verde. Diante disso, o extrato LCE foi selecionado para o estudo do mecanismo de ação antileishmanial devido a sua atividade promissora, enquanto que o extrato MFAq foi selecionado para o estudo da atividade anti-inflamatória e continuação da atividade antioxidante. Além disso, o extrato LCE foi novamente testado no ensaio de anti-amastigota para a linhagem selvagem de *L. amazonensis* PH8 antes de ser realizado o mecanismo de ação antileishmanial. Os resultados novamente reforçaram que LCE apresenta uma promissora atividade ($CI_{50} = 7,09$ (5,95-8,43)) e seletividade para essa espécie ($SI = 31,50$). As lâminas de macrófagos infectados com amastigotas de *L. amazonensis* e tratados com LCE foram fotografadas para ilustrar o efeito significativo deste extrato em amastigotas intracelulares, reduzindo consideravelmente o número de amastigotas intracelulares, quando comparado ao controle não tratado (Figura 9).

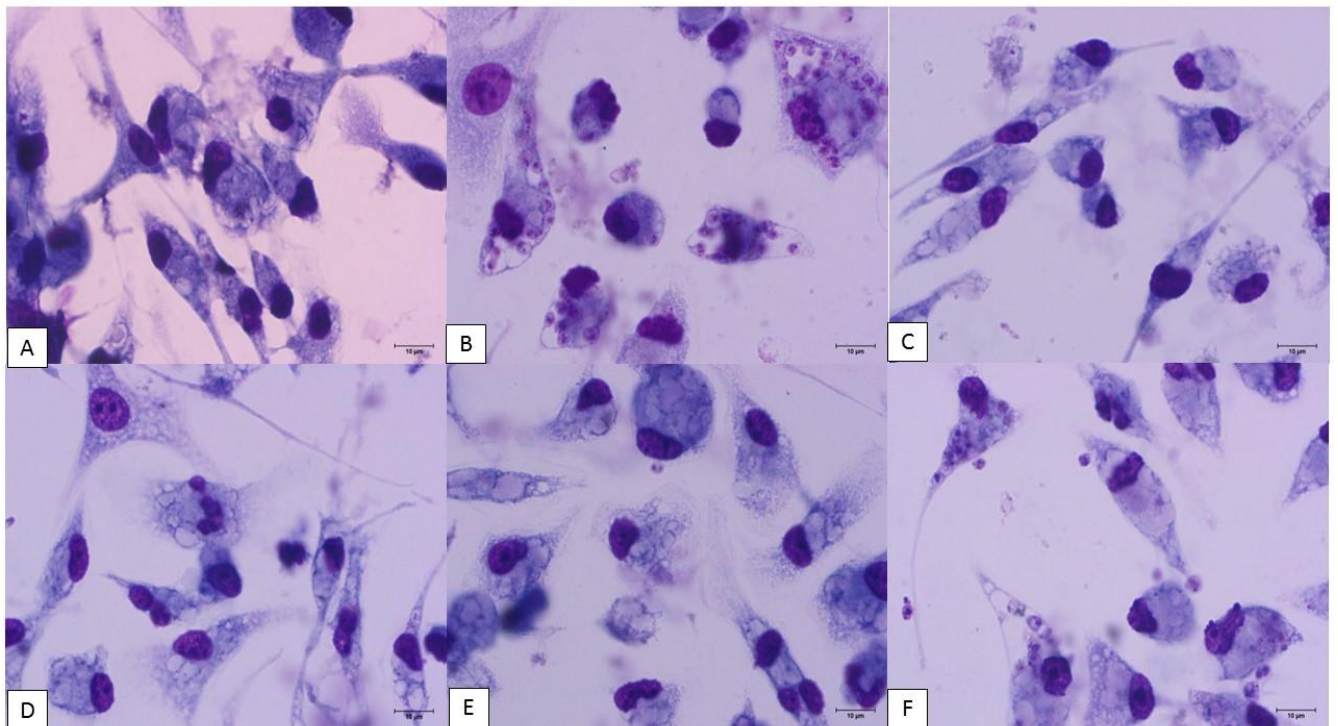


Figura 9- Avaliação da atividade antileishmanial do extrato etanólico de folhas de *Lantana camara*
L. A_ Macrófagos peritoneais murinos não infectados; B_ Macrófagos peritoneais murinos infectados com as formas amastigotas de *L. amazonensis* e sem tratamento; C_ Macrófagos peritoneais murinos infectados com as formas amastigotas de *L. amazonensis* e tratados com a concentração de 50 µg/mL de LCE; D_ Macrófagos peritoneais murinos infectados com as formas amastigotas de *L. amazonensis* e tratados com a concentração de 25 µg/mL de LCE; E_ Macrófagos peritoneais murinos infectados com as formas amastigotas de *L. amazonensis* e tratados com a concentração de 12,5 µg/mL de LCE; F_ Macrófagos peritoneais murinos infectados com as formas amastigotas de *L. amazonensis* e tratados com a concentração de 6,25 µg/mL de LCE.

6.2. OBJETIVOS

6.2.1 Objetivo geral

Avaliar o mecanismo de ação antileishmanial das frações, substâncias puras e/ou extrato etanólico de *Lantana camara* L. de forma a entender seus possíveis alvos biológicos em *L. amazonensis*.

6.2.2 Objetivos específicos

- Fracionar o extrato etanólico de folhas de *Lantana camara* L. afim de obter substâncias puras e/ou frações semipuras.
- Avaliar o efeito das frações e/ou substâncias puras em formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, bem como em células de mamíferos, utilizando macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c.
- Determinar a seletividade das frações puras e/ou compostos puros sobre promastigotas e amastigotas intracelulares em relação à célula hospedeira.
- Selecionar o extrato etanólico de folhas de *Lantana camara* L. ou suas frações/substâncias puras para os estudos de mecanismo de ação antileishmanial.

6.3 MATERIAIS E MÉTODOS

6.3.1 Caracterização química por *UFLC-QTOF-MS*

LCE (5 mg) foi analisado por cromatografia líquida ultrarrápida acoplada à espectrometria de massa no modo de íons positivos usando um Shi-madzu UFLC (modelo Nexera) e um espectrômetro de massa Bruker (modelo QTOF Compact) com uma fonte de ionização por *electrospray*. A fase móvel empregada foi água acidificada com ácido fórmico, pH = 3 (fase A) e metanol (fase B), a vazão de injeção foi de 0,4 mL/min com tempo de corrida de 12 min. A coluna utilizada foi uma Kinetex 2,6 µm, C18-100A, 100 mm × 3,0 mm. A corrida cromatográfica começou com 40% da fase B, aumentando para 70% de B aos 12,20 min e 95% de B aos 15,70 min. Posteriormente, a fase móvel foi devolvida a 40% B aos 17,20 min, para reequilibrar a coluna, seguindo até 18,50 min, a corrida terminou em 20 min. As condições de ionização foram definidas da seguinte forma: voltagem de *electrospray* da fonte de íons 40 V, voltagem capilar de 4500 V e temperatura capilar de 220 °C. A aquisição de massa de varredura completa foi realizada por varredura de 100 a 1000 m/z.

6.3.2 Fracionamento

Com o intuito de obter substâncias puras foi feito o fracionamento de 1,5g de LCE em coluna aberta de gel de sílica. As frações foram agrupadas por CCD e reveladas com valinina sulfúrica 1%, após a análise em CCD as frações foram agrupadas em 19 frações finais. A fração F10, devido o seu maior grau de pureza foi selecionada para o segundo fracionamento, onde foram obtidas 10 frações finais, e das quais a fração 3 foi avaliada por CLAE-DAD e RMN para verificar o seu perfil de pureza e tentar identificar sua possível estrutura química.

6.3.3 Avaliação da atividade antileishmanial e citotoxicidade

A atividade antileishmanial em formas promastigotas, amastigotas e a citotoxicidade celular em macrófagos peritoneais murinos para as frações mais promissoras e/ou substâncias puras de LCE foram avaliadas como descrito no capítulo 1.

6.3.4 Estudo do mecanismo de ação antileishmanial

Para estudo do mecanismo de ação antileishmanial de LCE, foram utilizadas técnicas específicas e variadas. As concentrações escolhidas de LCE foram correspondentes ao valor de CI_{50} e duas vezes o valor de CI_{50} (12,20 e 24,40 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente), em promastigotas de *L. amazonensis* em fase exponencial da curva de crescimento. No geral, o tempo de tratamento foi de 24 horas, com algumas exceções.

6.3.4.1 Avaliação da morfologia pela microscopia óptica de promastigotas de *L. amazonensis*

Após 24h de tratamento, as células foram fixadas em paraformaldeído a 4% por 15 minutos e lavadas por 2 vezes com PBS. Em seguida, as células foram fixadas em lâminas de vidro e coradas com Giemsa (Doles, Goiás, Brasil). As lâminas foram analisadas através da técnica de microscopia óptica (Olympus BX53, Shinjuku, Tokyo, Japan) e fotografadas através de câmera integrada (Olympus DP73, Shinjuku, Tokyo, Japan). Promastigotas sem tratamento submetidas aos mesmos procedimentos das células tratadas foram utilizadas como controle negativo. Os experimentos foram realizados em triplicata.

6.3.4.2 Avaliação morfológica utilizando microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET) de formas promastigotas de *L. amazonensis*

Para avaliar alterações morfológicas induzidas por LCE, os parasitos foram analisados por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET) (MACHADO et al., 2022). Após 24h de tratamento com LCE (12,20 e 24,40 $\mu\text{g/mL}$), promastigotas foram lavadas duas vezes com PBS, dispostas sobre lamínulas tratadas com poli-L-lisina (0,01%) e fixadas com glutaraldeído (2,5%) em 0,1M de tampão cacodilato de sódio por 60 minutos. Então, os parasitos foram pós fixados em tetróxido de ósmio (1%), e após 15 minutos foram desidratados em concentrações progressivas de etanol (7,5% - 100%), por 15 minutos em cada etapa. Então, as amostras foram submetidas à secagem em ponto crítico de

CO₂, e revestidas por uma fina camada (15 nm) de ouro e analisadas em microscópio eletrônico de varredura (Joel JSM 6390, Tóquio, Japão) e microscópio eletrônico de transmissão.

6.3.4.3 Avaliação da alteração em metabolismo lipídico em promastigotas de *L. amazonensis*

Para avaliar a influência do tratamento nos lipídicos de *L. amazonensis*, foi utilizado o Nile Red. Este corante é uma substância lipofílica que é utilizada para a quantificação de lipídeos, ele pode interagir com lipídeos polares ou neutros e então é capaz de emitir fluorescência (SCARIOT et al., 2017). Após 24 h de tratamento com LCE, os promastigotas foram lavados em PBS por três vezes, e ajustados para 1×10^7 em 200 μ L de PBS em placa de 96 poços. Em seguida, foram adicionados 5 μ L de uma solução de Nile Red, chegando na concentração final de 10 μ g/mL nos poços. A placa foi incubada por 20 minutos, em uma temperatura de 25°C e ao abrigo da luz. Em seguida, a intensidade de fluorescência foi obtida em espectrofotômetro (FLx800), nos comprimentos de onda de 485 nm e 528 nm de excitação e emissão, respectivamente para quantificação de lipídeos neutros e nos comprimentos de onda de 540 nm e 600 nm de excitação e emissão, respectivamente para quantificação de lipídeos polares. A miltefosina foi utilizada como controle positivo (1x CI₅₀ e 2x CI₅₀). Parasitos sem tratamento foram utilizados como controle negativo. Os experimentos foram realizados em triplicata.

6.3.4.4 Determinação do conteúdo de ergosterol em formas promastigotas de *L. amazonensis*

O conteúdo de ergosterol na membrana de *L. amazonensis* foi mensurada pelo método descrito por Pereira et al. (2013) com algumas modificações. Após 24 h de tratamento com LCE, os parasitos foram lavados em PBS por três vezes, e tiveram o peso dos pellets medidos. Após este passo, foram adicionados 1mL de Etanol PA e agitado por 1 minuto. A suspensão de células foi incubada por 1 hora a 85°C em banho de água, seguido de centrifugação a 2700 rpms. O ergosterol extraído foi mensurado pela adição de 200 μ L do sobrenadante em placas de 96 poços e realizando-se a leitura em 230 e 281 nm no espectrofotômetro. O conteúdo foi quantificado utilizando a fórmula: $[(A_{281}/290) \times F] / \text{peso do pellet} - [(A_{230}/518) \times F] / \text{peso do pellet} \times 100$, onde F é o fator de diluição; 290 e 518 são valores para o ergosterol cristalino e desidroergosterol, respectivamente. A anfotericina B foi utilizada como controle positivo no

valor de CI_{50} . Os resultados foram expressos na forma de porcentagem de ergosterol extraído (%). Os experimentos foram realizados em triplicata.

6.3.4.5 Avaliação da alteração do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) em promastigotas de *L. amazonensis*

No intuito de avaliar a atuação dos extratos no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) de *L. amazonensis*, promastigotas (1×10^7 células/mL) em fase exponencial da curva de crescimento foram tratadas com o valor de CI_{50} e duas vezes a CI_{50} da amostra mais promissora e incubadas em BOD a 25 °C durante 12 e 24h. Para a avaliação do $\Delta\Psi_m$ foi utilizada a marcação com JC-1 (COIMBRA et al., 2019) que é um corante de carbocianina catiônico, que se acumula no interior da mitocôndria em condições normais do $\Delta\Psi_m$, formando desta maneira o J agregado, que emite fluorescência vermelha. Em mitocôndrias danificadas, onde o $\Delta\Psi_m$ é baixo, o JC-1 em baixas concentrações apresentam-se como monômeros, e emitem fluorescência verde. Após o tratamento, as células foram lavadas em PBS, marcadas com JC-1 (5 µg/mL) e incubadas a 25 °C por 40 minutos. Em seguida, foram lavadas com solução de Hank por 3 vezes, para retirar o excesso dos respectivos marcadores. As amostras foram lidas em espectrofluorímetro a 540 nm de excitação e 600 nm emissão para detecção da marcação com J-agregado. Para detecção de monômeros, a leitura foi realizada a 485 nm de excitação e 528 nm de emissão. Os resultados obtidos foram expressos através da razão entre fluorescência vermelha e verde. Células não tratadas foram utilizadas como controle negativo, e células tratadas com Carbocianeto-4-(trifluorometoxi) - 60 Fenilhidrazona (FCCP) (10 µM) por 20 minutos, foram utilizadas como controle positivo. Os experimentos foram realizados em triplicata.

6.3.4.6 Avaliação dos níveis da produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) em promastigotas de *L. amazonensis*

Além do potencial de membrana mitocondrial, também foi avaliada a atuação na produção de EROS em *L. amazonensis*. Para isto, promastigotas (1×10^7 células/mL) em fase exponencial da curva de crescimento foram tratadas com o valor de CI_{50} e duas vezes a CI_{50} da

amostra mais promissora e incubadas em BOD a 25 °C durante 12 e 24h. Para verificar os níveis de EROS produzidos nos parasitos, foi utilizado o corante 2', 7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H₂DCFDA), uma substância quimicamente reduzida que, no interior da célula, reage com EROS e é oxidado à uma substância altamente fluorescente (2', 7'-diclorofluoresceína (DCF) (GRANATO et al., 2018). Após o tratamento, as células foram lavadas, e em placas de 96 poços, ajustadas para 20 x 10⁶ em 200 µL. Em cada poço foi adicionado 4µL de uma solução de H₂DCFDA a 1 mM. As células foram incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Células não tratadas foram utilizadas como controle negativo. H₂O₂ a 0,5 mM foi utilizado como controle positivo. A intensidade de fluorescência foi determinada utilizando espectrofluorímetro (FLx800) em um comprimento de onda de 485 nm de excitação e 528 nm de emissão. Os experimentos foram realizados em triplicata.

6.3.4.7 Avaliação dos níveis de tiol em formas de *L. amazonensis*

Os níveis de tiol em formas promastigotas de *L. amazonensis* foi avaliada seguindo a metodologia de Lazarin-Bidóia et al (2016). No sistema tripanotona, a tripanotona (T) é reduzida a um ditiol, T(SH)₂, pela tripanotona redutase (TR). A inibição de TR diminui os níveis totais de tiol. Desta forma, foi avaliada a ação em TR por meio da dosagem de grupos tiols utilizando DTNB. Os parasitos foram tratados com a amostra mais promissora nos valores de CI₅₀ e duas vezes o CI₅₀. Transcorrido o tempo de 12h, as células (1x10⁷ células/mL) foram centrifugadas, ressuspensas em tampão glicina-HCL na concentração de 0,1M (pH 2,5), sonicadas em banho de gelo durante 15 minutos e congeladas em nitrogênio líquido durante 1 min (esse ciclo foi repetido 3X). Os detritos celulares foram removidos por centrifugação e 100 µL do sobrenadante e 100 µL de Tris-HCL 0,1M (pH 8,5) foram adicionados em placas de 96 poço, seguido da adição de 20 µL de DTNB a 1 mM. O controle positivo utilizado foi o H₂O₂ a 0,5 mM. Os níveis de tiol foram medidos utilizando uma curva padrão de L- Cisteína (0,015 a 15µM). A absorbância foi medida a 412 nm e os experimentos realizados em triplicata.

6.3.4.8 Avaliação da integridade da membrana em promastigotas de *L. amazonensis*

Além das análises anteriores, foi avaliada também a ação na integridade de membrana de *L. amazonensis*. Desta forma, promastigotas (1×10^7 células/mL) em fase exponencial da curva de crescimento foram tratadas com o valor de CI_{50} e duas vezes a CI_{50} da amostra mais promissora e incubadas em BOD a 25°C durante 12 e 24h. A integridade de membrana foi determinada utilizando-se a marcação com iodeto de propídeo (PI), uma sonda fluorescente capaz de permear somente membranas danificadas e intercalar ao DNA, emitindo assim, fluorescência (GRANATO et al., 2018). Após o tratamento, as células foram lavadas por três vezes em PBS, e ajustadas para 1×10^7 (promastigotas) em 200 μ L. Uma solução de PI a 40 μ g/mL foi adicionada aos poços e a placa foi incubada por 15 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Poços contendo parasitos não tratados, foram utilizados como controle negativo. Parasitos aquecidos a 60 °C por 10 minutos foram utilizados como controle positivo (Promastigotas lisados). A intensidade de fluorescência foi determinada por espectrofluorímetro (FLx800) nos comprimentos de onda de 540 nm de excitação e 600 nm de emissão.

6.3.4.9 Avaliação da exposição da fosfatidilserina em promastigotas de *L. amazonensis* PH8

Para verificar se LCE induz aumento da exposição de fosfatidilserina em promastigotas, utilizou-se dupla marcação com anexina V/FITC e PI (TAVARES et al., 2018). A fosfatidilserina é um fosfolípido do folheto interno da membrana plasmática dos eucariotos. No entanto, a partir de estímulos como estresse gerado pela ação de substâncias químicas, este fosfolípido é translocado para a região externa da membrana plasmática e então é capaz de ser detectado pela anexina V. Esta sonda não é capaz de ultrapassar a bicamada fosfolipídica, no entanto, quando a integridade da membrana plasmática é perdida, a fosfatidilserina presente no interior das células se encontram disponíveis para a ligação à anexina V. Desta maneira, utiliza-se o PI para discriminar células que perderam a integridade de membrana plasmática. Assim, após o tratamento com LCE (12,20 e 24,40 μ g/mL), 5×10^6 promastigotas foram lavadas com

PBS, ressuspendidas em 100 μ L tampão de ligação (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, and 2.5 mM CaCl_2 , pH 7.4) e incubadas com 2,5 μ L de anexina V por 15 minutos. Em seguida, os parasitos foram incubados com PI a 1 μ g/mL por mais 15 minutos. Posteriormente, os parasitos foram analisados em citômetro de fluxo FACSCanto II equipado com o software DIVA. Para isto, foram avaliados 10.000 eventos utilizando os canais FITC e PE. Miltefosina (9,0 e 18 μ g/mL) foi utilizada como controle positivo.

6.3.4.10 Determinação dos níveis de oxido nítrico (NO) em macrófagos infectados com *L. amazonensis*

A dosagem de oxido nítrico (NO) foi realizada no sobrenadante de macrófagos infectados com *L. amazonensis* após tratamento de 72h com as concentrações de 50, 25, 12,5 e 6,25 μ g/mL da amostra mais promissora. O método de Griess foi utilizado para determinar a concentração de nitrito, que é um subproduto estável de NO (SUN et al., 2003). Após 72 horas de incubação, alíquotas de 50 μ L foram retiradas dos poços contendo macrófagos não infectados e infectados com *L. amazonensis*, tratados ou não. Como controle positivo foi utilizado 1 μ g/mL de LPS com 1 ng/mL de $\text{INF-}\gamma$, obtido de sobrenadante de células L1210. Os sobrenadantes recolhidos foram incubados com 50 μ L do reagente de Griess (25 μ l de Sulfanilamida a 1% em ácido fosfórico a 2,5% e 25 μ l de N-(1-naftil) etilenodiamina diidrocloreto a 0,1% em ácido fosfórico a 2,5%) por 10 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm (SpectraMax 190) e a produção de nitrito foi determinada através da curva padrão de NaNO_2 . Os experimentos foram realizados em triplicata.

6.4. Análise estatística

A análise estatística foi realizada para ensaios *in vitro*, utilizando o teste de ANOVA seguido pelo pós hoc teste de Bonferroni. As análises foram feitas no *software GraphPrism 5.0* (Erithacus Software Ltda). Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos. Os resultados foram expressos na forma de média \pm desvio padrão.

7. RESULTADOS

7.1 Caracterização química

O perfil químico de LCE foi caracterizado por *UFLC-QTOF-MS* e sugeriu a presença de 11 substâncias, dentre elas saponinas, flavonoides, triterpenos (esqueleto ursano e oleanano) e iridoides glicosilados (Tabela 3).

Tabela 3- Compostos identificados no extrato etanólico das folhas de *Lantana camara* L. (LCE) utilizando *UFLC-QTOF-MS* em ESI (+).

Classes de substâncias	Substance	Tr (Min)	Perfil de fragmentação	Referências
Saponina	Lamiide	3.4	862,3221 (2M +NH ₄); 440.1776 (M+NH ₄)	EL-BANNA et al., 2022
Flavonoide	Chrisoeriol-O-hexosideo ou Escoparina	3.9	480,2087 (M+NH ₄)	EL-BANNA et al., 2022
Triterpeno do tipo oleanano	Cetona triterpenica	4.5	411,1998 (M+H)	BEGUM et al., 2010
Triterpeno do tipo ursano	Ácido ursólico	5.3	458,1436 (M+2H)	SOUSA; COSTA, 2012
Iridoide glicosilado	Geniposideo	5.8	799,4108 (2M + Na); 411,1996 (M+Na)	EL-BANNA et al., 2022
Flavonoide	Lantosideo	6,4	541,2288 (M+Na); 467,1557 (M+Na -CO ₂ -2CH ₃)	SOUSA; COSTA, 2012
Flavonoide	Pectolarigenina	7.1	337,0900 (M+Na); 153,0548 (M+Na -2CO ₂ - 2H ₂ O - 2CH ₂ O)	SOUSA; COSTA, 2012
Flavonoide	Pectolarina	9.1	640,2236 (M+NH ₄); 503,2115 (M+NH ₄ - C ₈ H ₉ O ₂)	SOUSA; COSTA, 2012
Triterpeno do tipo oleanano	Lantadene B	17.6	553,2994 (M+H)	BEGUM et al., 2015
Triterpeno do tipo oleanano	Lantadene A	18.1	553,4252 (M+H)	BEGUM et al., 2015
Triterpeno do tipo oleanano	Lantandene C	18.2	556,3842 (M+2H)	SOUSA; COSTA, 2012

Tr_ Tempo de retenção.

7.2 Purificação de substâncias presentes em LCE e biomonitoramento da atividade antileishmanial

Antes da realização dos ensaios de mecanismo de ação antileishmanial foi feita a tentativa de purificação de substâncias em LCE utilizando por meio de fracionamento em coluna aberta utilizando gel de sílica. As frações foram reunidas e após análise em CCD, as frações que apresentaram maior rendimento e/ou pureza foram selecionadas para o processo de biomonitoramento nas formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*. As frações também tiveram a citotoxicidade avaliada em macrófagos peritoneais murinos para que posteriormente pudesse avaliar o índice de seletividade (IS). O processo de purificação resultou em 19 frações, das quais 7 frações foram selecionadas para o processo de biomonitoramento (F7, F10, F11, F12, F13, F16 e F19) (Tabela 4). Mediante aos resultados obtidos, foi possível observar que as frações F10 e F11, foram as mais ativas contra as formas amastigotas (CI_{50} de 6,10 (4,95-7,51) e 6,46 (5,41-7,70) $\mu\text{g/mL}$ respectivamente) e com os maiores índices de seletividade (15,20 e 11,62 respectivamente). Desta forma, foi feita a seleção da fração F10 para dar sequência novamente aos estudos de biomonitoramento, onde foi possível obter o composto 1 (Comp 1) com 96% de pureza (pureza determinada por CLAE-DAD). Este composto foi novamente testado e apresentou baixa citotoxicidade para macrófagos, entretanto, mostrou-se menos ativo em amastigotas intracelulares com CI_{50} de 32,28 (26,90-38,74) $\mu\text{g/mL}$. Logo, quando comparados ao extrato bruto LCE (CI_{50} de 7,29 $\mu\text{g/mL}$ para as formas amastigotas e $IS = 30,64$), todas as frações e o composto 1 testados mostraram-se mais tóxicos e/ ou menos ativos com menores valores de IS.

Tabela 4- Avaliação da atividade antileishmanial e da citotoxicidade celular das frações que apresentaram maior rendimento após fracionamento do extrato etanólico de folhas de *Lantana camara* L.

Frações e compostos puros de LCE				
Frações/ compostos puros	Promastigota CI ₅₀ (µg/mL)	CC ₅₀ (µg/mL)	Amastigota CI ₅₀ (µg/mL)	Índice de seletividade para formas amastigotas (IS)
F7	19,79 ± 0,15	84,36 ± 6,97	21,022 (18,56-23,80)	4,01
F10	8,64 ± 0,52	92,77 ± 0,63	6,10 (4,95-7,51)	15,20
F11	16,60 ± 0,90	75,07 ± 1,48	6,46 (5,41-7,70)	11,62
F12	12,27 ± 0,17	67,86 ± 10,54	13,89 (12,01-16,06)	4,88
F13	30,4 ± 1,06	58,88 ± 4,12	34,21 (29,43-39,99)	1,72
F16	>100	125,82 ± 9,49	>100	ND
F19	>100	167,08 ± 9,49	>100	ND
Comp 1	40,03 ± 6,99	258, 41 ± 85,98	32,28 (26,90-38,74)	7,99
Miltefosina	8,96 ± 0,5	67,93 ± 4,29	5,10 ± 1,79	13,31

Legenda_ ND_Não determinado, LCE_ Extrato etanólico de folhas *Lantana camara* L.; F7_ Fração número 7 oriunda de LCE; F10_ Fração número 10 oriunda de LCE; F11_ Fração número 11 oriunda de LCE; F12_ Fração número 12 oriunda de LCE; F13_ Fração número 13 oriunda de LCE; F16_ Fração número 16 oriunda de LCE; F19_ Fração número 19 oriunda de LCE. Comp 1_ Composto puro oriundo da fração número 10 de LCE; CI₅₀_ Concentração inibitória de 50%.; CC₅₀_ Citotoxicidade de celular de 50%; IS_ índice de seletividade.

Diante da menor atividade biológica apresentada pelas frações e composto puro, os estudos do mecanismo de ação em *L. amazonensis* foram realizados utilizando o extrato bruto LCE.

7.3 Estudo do mecanismo de ação de LCE em *L. amazonensis*

7.3.1 Alterações morfológicas em formas promastigotas de *L. amazonensis*

Após o tratamento dos parasitos, foram confeccionadas lâminas que foram coradas com Giemsa (Figura 10). O tratamento dos parasitos com LCE induziu alterações morfológicas nas formas promastigotas de *L. amazonensis*, sendo possível destacar redução do corpo celular em ambos valores de CI_{50} de LCE (Figura 10 B-C, setas vermelhas e verdes), além da ausência de núcleo e cinetoplasto no valor de duas vezes a CI_{50} de LCE (Figura 10 C-D, setas verdes).

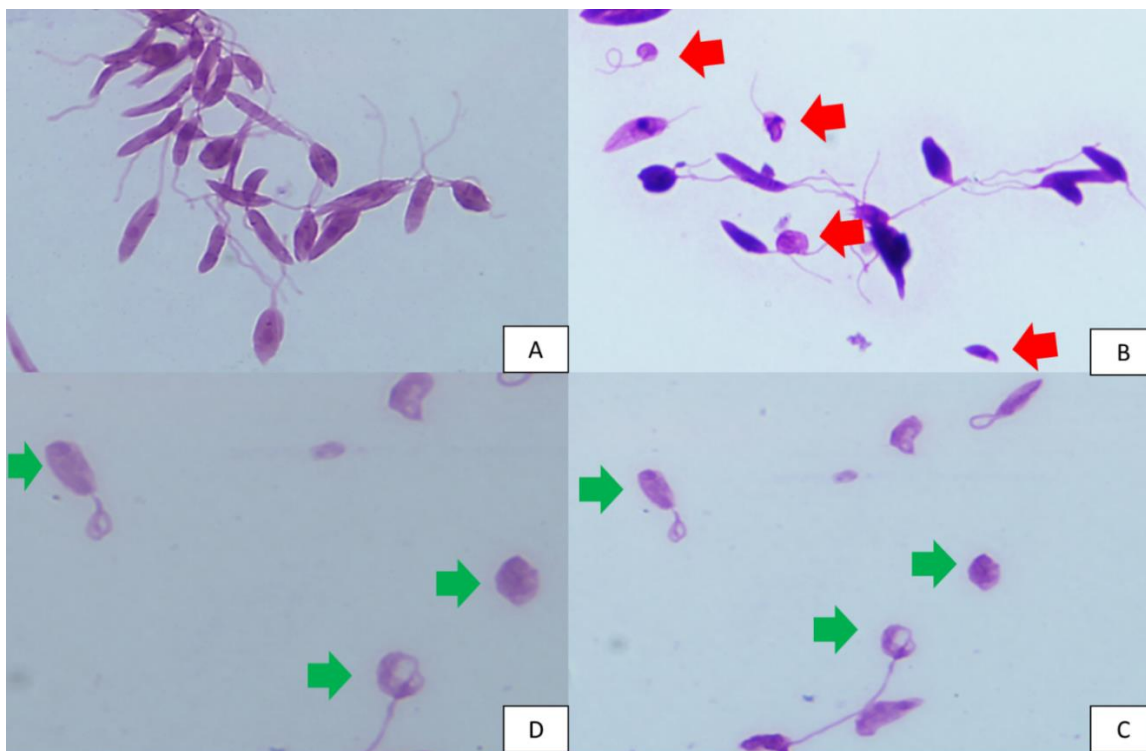


Figura 10- Avaliação das alterações morfológicas nas formas promastigotas de *L. amazonensis* após tratamento com o extrato etanólico de folhas de *Lantana camara* L. A_ Controle; B_ Formas promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com o valor de CI_{50} de LCE; C_ Formas promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com o valor de duas vezes o CI_{50} de LCE. D_ Detalhe da expansão das formas promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com o valor de duas vezes o CI_{50} de LCE.

7.3.2 Avaliação das alterações morfológicas por MEV e MET

Após o tratamento de 24h com LCE, as formas promastigotas foram avaliadas quanto à possíveis alterações morfológicas por meio de MEV e MET (Figuras 11 e 12) . As análises de MEV mostraram uma alteração da morfologia clássica das células, sendo que em ambos os tratamentos (CI_{50} e $2x CI_{50}$) foi observado a presença de células lisadas (cabeça das setas, Figura 11 C-F). Além disso foi possível encontrar a presença de algumas formas promastigotas sem flagelo após o tratamento com $2x CI_{50}$ LCE (Figura 11D). Os dados de MET, por sua vez, mostraram que as células do grupo controle (sem tratamento) mantiveram suas características morfológicas típicas (formato alongado, mitocôndria ramificada e núcleo visível) (Figura 12 A e B). Entretanto, após o tratamento, as células apresentaram a presença de inchaço mitocondrial na região do cinetoplasto (setas, Figura 12 C e E) no valor de CI_{50} e $2x CI_{50}$ de LCE, além de um formato arredondado (redução do corpo celular). Outras alterações observadas foram a perda de material citoplasmático e de conteúdo intracelular (células marcadas com asterisco) (valor de CI_{50} e $2x CI_{50}$) (Figura 12 C e E) e a presença de autofagossomo (Ph) e vacuolo (V) (células tratadas no valor de CI_{50}) (Figura 12 D).

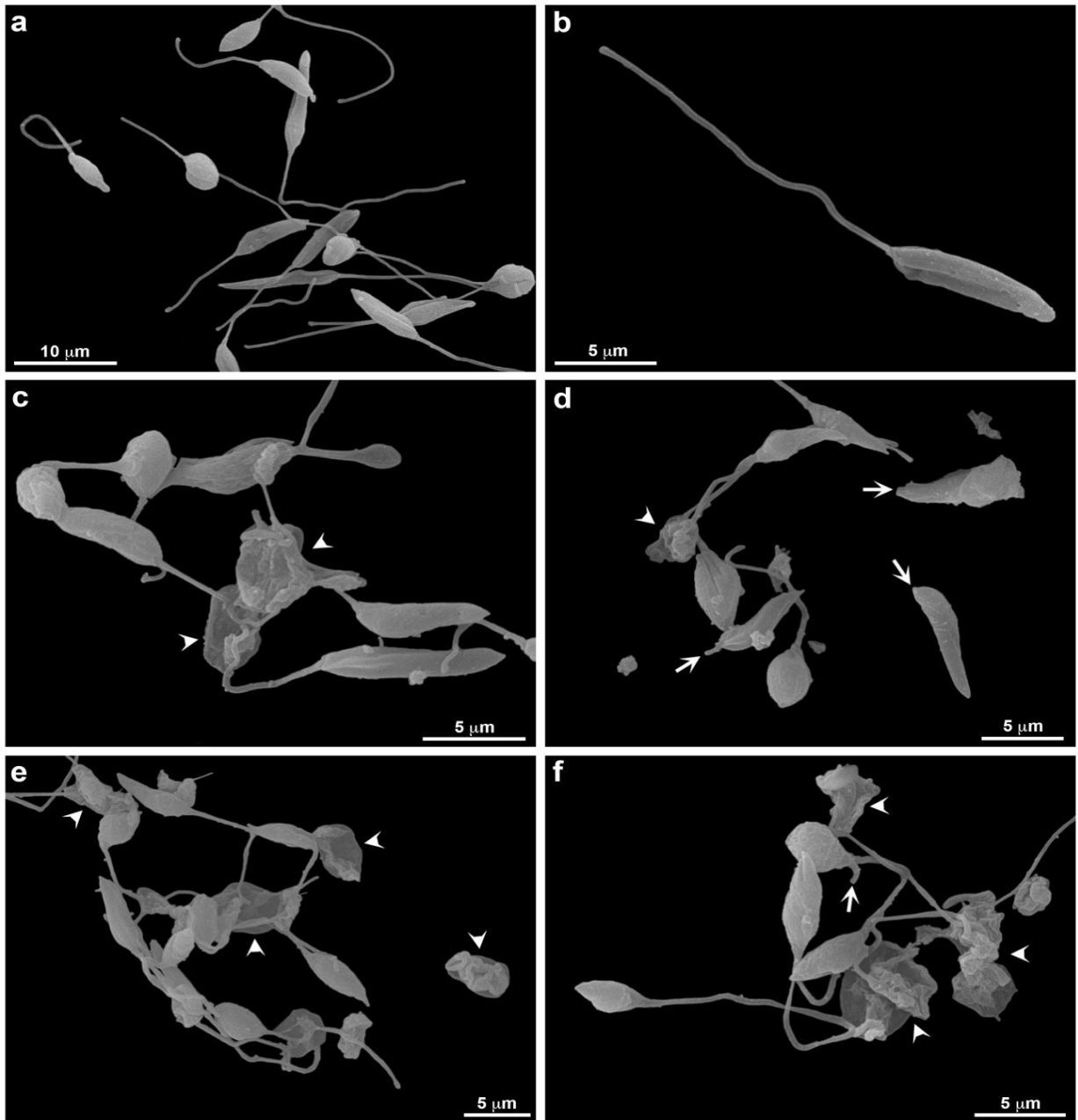


Figura 11- Microscopia eletrônica de varredura das formas promastigotas de *L. amazonensis* após tratamento com o extrato etanólico de folhas de *Lantana câmara* L. (LCE). A-B_ Controle, promastigotas com aspecto regular na morfologia, corpos celulares alongados, flagelos compridos, e algumas células em divisão (células mais arredondadas). C_ Promastigotas tratados com 1x CI₅₀ de LCE apresentando alterações morfológicas severas, como perda da morfologia clássica e células lisadas (cabeça de seta). D-F_ Promastigotas tratados com 2x CI₅₀ de LCE, apresentando alterações severas na morfologia, células lisadas (cabeça de seta) e encurtamento ou perda de flagelos (seta).

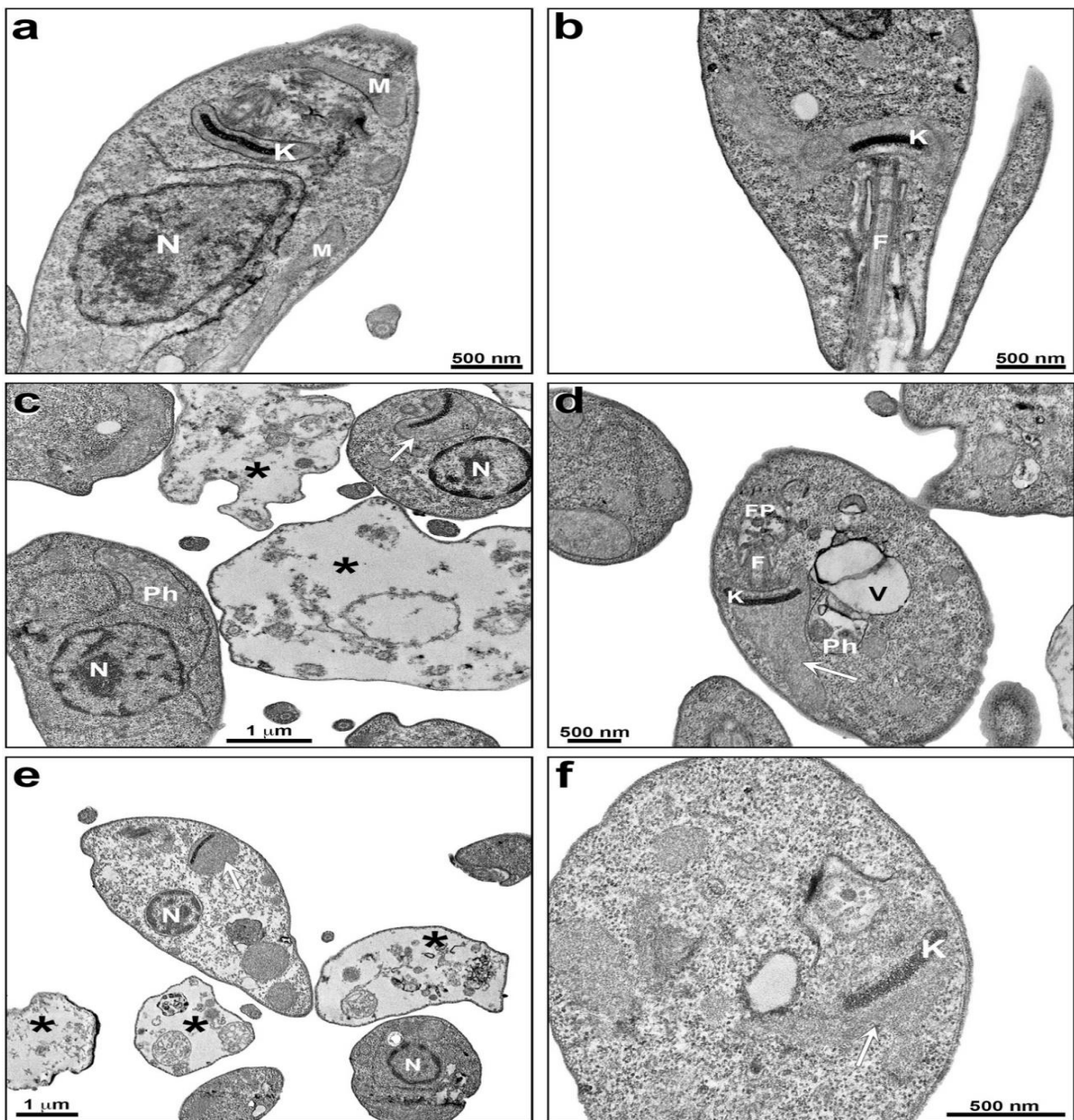


Figura 12- Microscopia eletrônica de transmissão das formas promastigotas de *L. amazonensis* após tratamento com o extrato etanólico de folhas de *Lantana câmara* L. (LCE). A-B_ Promastigotas sem tratamento (controle) apresentando características regulares quando a densidade do citoplasma, cinetoplasto (K), mitocôndria (M), núcleo (N) e flagelo (F). Região do cinetoplasto envolta pela membrana mitocondrial bem próxima. C-D_ Promastigotas tratados com 1x CI₅₀ de LCE, apresentando redução do corpo celular, citoplasma extraído e com perda das estruturas internas (asteriscos), inchaço mitocondrial na região do cinetoplasto (seta), presença de autofagossoma (Ph) e vacúolo (V). E-F_ Promastigotas tratados com 2x CI₅₀ de LCE, presença de muitas células com redução do corpo celular, citoplasma extraído e com perda das estruturas internas (setas), células apresentam citoplasma elétron lucente (bem mais claro) e com aspecto mais relacionado a extração de conteúdo citoplasmático. Inchaço mitocondrial na região do cinetoplasto (seta).

7.3.3 Alterações do metabolismo lipídico em formas promastigotas de *L. amazonensis*

Uma vez que foram observadas alterações morfológicas no corpo celular das formas promastigotas de *L. amazonensis*, o próximo passo do estudo foi avaliar se a redução do corpo celular seria proveniente de alterações do metabolismo lipídico. Diante disso, foram avaliadas possíveis alterações nos níveis de lipídeos polares e neutros, bem como de ergosterol (Figura 13). As análises demonstraram redução nos níveis de lipídeos polares e neutros ($P < 0,05$) (Figura 13A e B), entretanto, não foram observadas alterações nos níveis de ergosterol ($P > 0,05$) (Figura 13C).

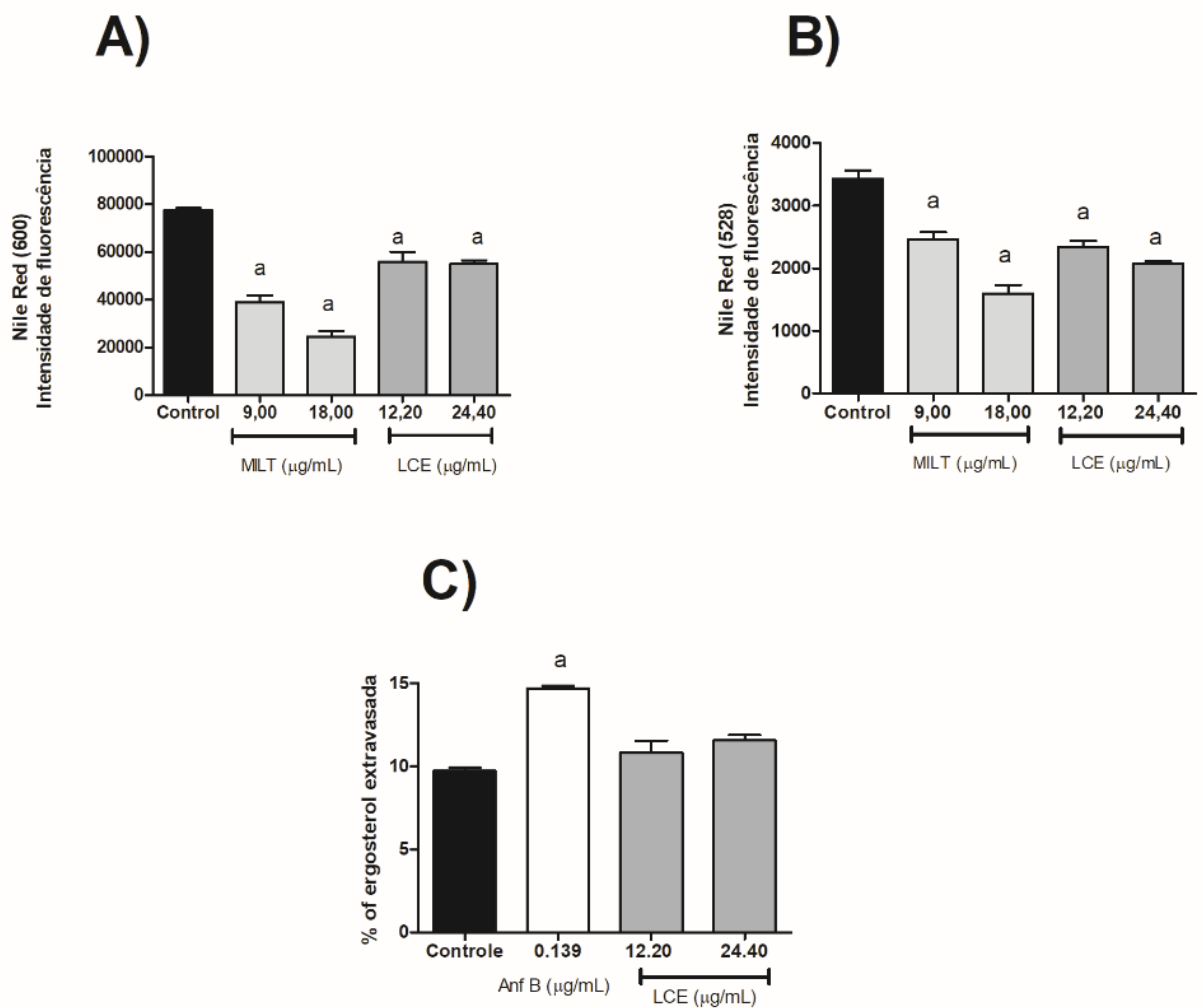


Figura 13 - Avaliação das alterações no metabolismo lipídico de formas promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com o extrato etanólico de folhas de *Lantana camara* L. A_ Quantificação de lipídeos polares; B_ Quantificação de lipídeos neutros; C_ Dosagem de ergosterol. Resultados expressos na forma de média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. One Way Anova seguido do pós hoc teste de Bnferroni. ^a- significa diferença estatística em relação ao grupo controle sem tratamento. Controle_ Controle negativo. LCE_ Extrato etanólico de folhas de *Lantana camara* L. MILT_ miltefosina. Anf B_ Anfotericina

7.3.4 Avaliação dos níveis de EROS e do potencial de membrana mitocondrial em formas promastigotas de *L. amazonensis*

Dentre as organelas com grande participação no metabolismo lipídico, a mitocôndria apresenta destaque. Diante disso, após observadas as alterações do metabolismo lipídico nas formas promastigotas de *L. amazonensis* em 24 horas, foi avaliado se essas alterações poderiam estar associadas a dano mitocondrial. Para isto, foi analisado o potencial de membrana mitocondrial e os níveis de EROS (um evento associado com danos a mitocôndria) após 12 e 24 horas de tratamento (Figura 14). As análises revelaram que LCE induziu a formação de EROS no valor de CI_{50} nos tempos de 12 e 24h e no valor de duas vezes a CI_{50} no tempo de 12h ($P < 0,05$) (Figura 14 A e B). Em relação ao potencial de membrana mitocondrial, não foram observadas alterações no tempo de 12h. Entretanto, quando transcorrido 24h de tratamento pode ser observado um aumento do potencial de membrana no valor de CI_{50} (hiperpolarização) e uma redução do potencial de membrana no valor de duas vezes a CI_{50} (despolarização) ($P < 0,05$) (Figura 14 C e D). Por meio dos resultados obtidos é possível perceber um aumento EROS que antecede as alterações relacionadas com o potencial de membrana mitocondrial.

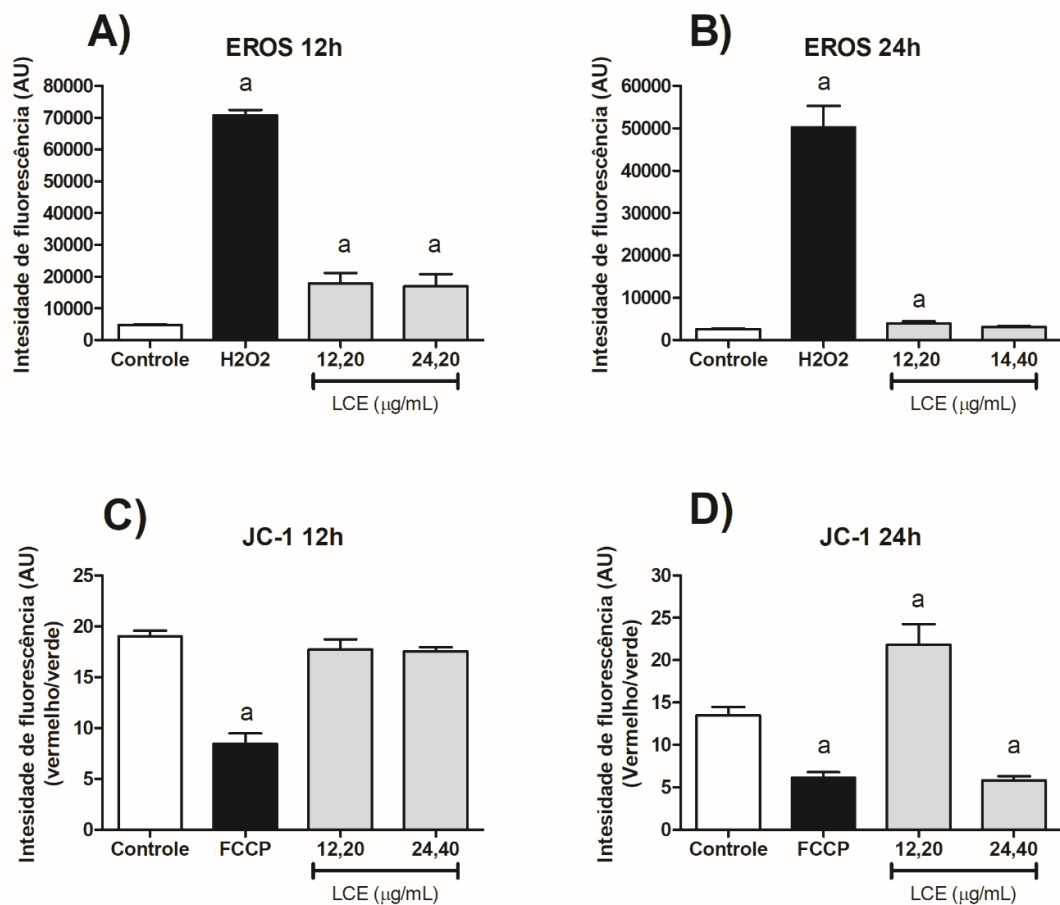


Figura 14- Avaliação da indução de EROS e da perda do potencial de membrana mitocondrial em promastigotas de *L. amazonensis* nos tempos de 12 e 24 horas. A_ Avaliação da indução de EROS em formas promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com LCE nos valores de CI_{50} e duas vezes a CI_{50} no tempo de 12h. B_ Avaliação da indução de EROS nas formas promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com LCE nos valores de CI_{50} e duas vezes a CI_{50} no tempo de 24h. C_ Avaliação da perda de potencial de membrana mitocondrial em formas promastigotas de *L. amazonensis* com LCE nos valores de CI_{50} e duas vezes a CI_{50} no tempo de 12h. D_ Avaliação da perda de potencial de membrana mitocondrial em formas promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com LCE nos valores de CI_{50} e duas vezes a CI_{50} no tempo de 24h. Resultados expressos na forma de média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. One Way Anova seguido do pós hoc teste de Bonferroni. ^a- significa diferença estatística em relação ao grupo controle sem tratamento. Controle_ Controle negativo. LCE_ Extrato etanólico de folhas de *Lantana camara* L.

7.3.5 Avaliação da atividade na tripanotona redutase em formas promastigotas de *L. amazonensis*

A tripanotona redutase é uma enzima antioxidante presente em tripanosomatídeos, incluindo *Leishmania* spp, envolvida com o equilíbrio tioredox do parasito. Esta enzima é responsável pela manutenção do número de tiols, moléculas associadas com a neutralização de EROS. Com o intuito de compreender a origem dos EROS formados em 12h, foi realizado a dosagem do número de grupos de tiol utilizando DTNB neste mesmo tempo de tratamento (Figura 15), uma análise que apresenta uma correlação com a atividade da tripanotona redutase. Os resultados demonstraram que LCE tanto no valor de CI_{50} quanto duas vezes o valor de CI_{50} reduziram significativamente os níveis de grupos tiol quando comparados ao controle negativo ($P < 0,05$)

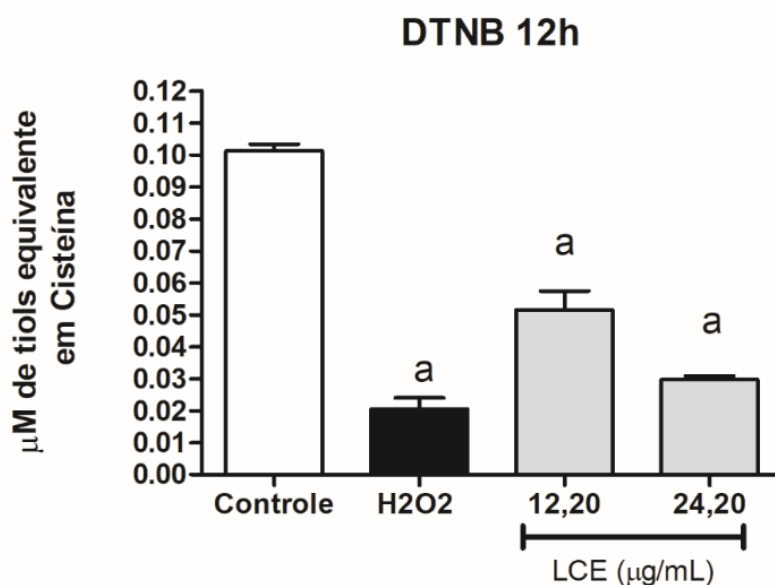


Figura 15- Dosagem do número de grupos tiol nas formas promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com LCE nos valores de CI_{50} e duas vezes a CI_{50} no tempo de 12 horas utilizando DTNB. Resultados expressos na forma de média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. One Way Anova seguido do pós hoc teste de Bonferroni. ^a- significa diferença estatística em relação ao grupo controle sem tratamento. Controle_ Controle negativo. LCE_ Extrato etanólico de folhas de *Lantana camara* L.

7.3.6 Avaliação da integridade de membrana em formas promastigotas de *L. amazonensis*

Além das análises anteriores, também foi avaliado a integridade de membrana em formas promastigotas tratadas em 12h e 24h, utilizando iodeto de propídeo (IP) (Figura 16). Os resultados demonstram que não houve alteração na integridade da membrana plasmática tanto no valor de CI_{50} quanto no valor de duas vezes o CI_{50} de LCE em ambos tempos avaliados ($P > 0,05$).

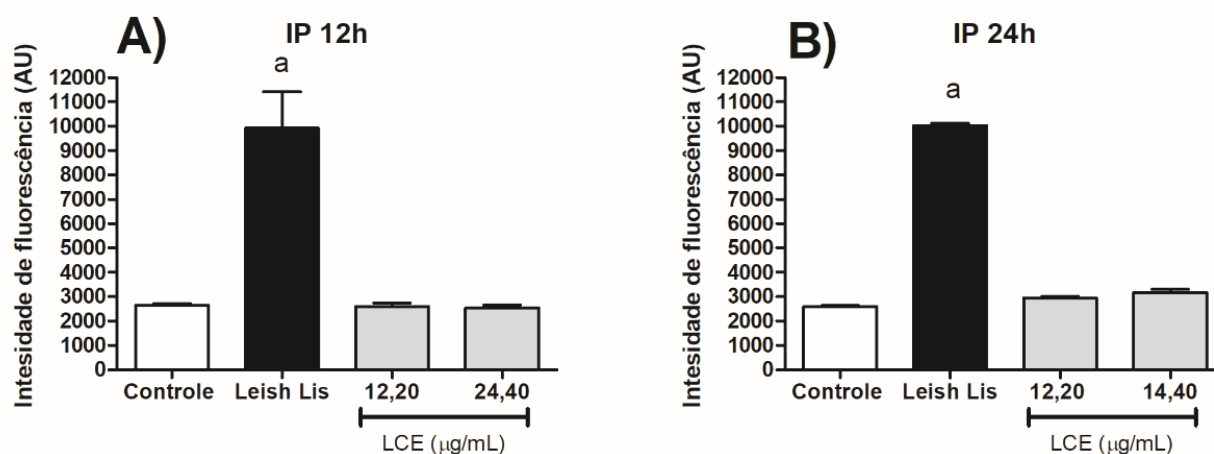


Figura 16- Avaliação da integridade de membrana plasmática em formas promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com LCE nos valores de CI_{50} e duas vezes a CI_{50} utilizando iodeto de propídeo. A_ Avaliação da integridade de membrana plasmática em formas promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com LCE nos valores de CI_{50} e duas vezes a CI_{50} no tempo de 12h. B_ Avaliação da integridade de membrana plasmática em formas promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com LCE nos valores de CI_{50} e duas vezes a CI_{50} no tempo de 24h. Resultados expressos na forma de média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. One Way Anova seguido do pós hoc teste de Bonferroni. ^a- significa diferença estatística em relação ao grupo controle sem tratamento. Controle_ Controle negativo. LCE_ Extrato etanólico de folhas de *Lantana camara* L.; Leish Lis_ Formas promastigotas de *L. amazonensis* lisadas.

7.3.7 Avaliação do tipo de morte celular em promastigotas de *L. amazonensis* induzida pelo tratamento com LCE

O tipo de morte celular induzida por LCE foi analisado por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo e anexina V (Figuras 17 e 18). Os resultados demonstraram que LCE (12,20 e 24,40 $\mu\text{g/mL}$) induziu morte celular nas formas promastigotas de *L. amazonensis* de forma semelhante a miltefosina. Além disso, pode ser observado uma predominância de morte por apoptose-like (marcação com Anexina V⁺, Q3). Entretanto, quando comparado ao controle também é possível observar, porém em menor quantidade, um aumento de células morta por necrose (marcação com IP⁺, Q1) e por apoptose tardia (marcação com Anexina V⁺ e IP⁺, Q2) após tratamento com o 1x CI₅₀ e 2x CI₅₀ de LCE. Dados que corroboram com a presença de células lisadas observadas por MEV e MET.

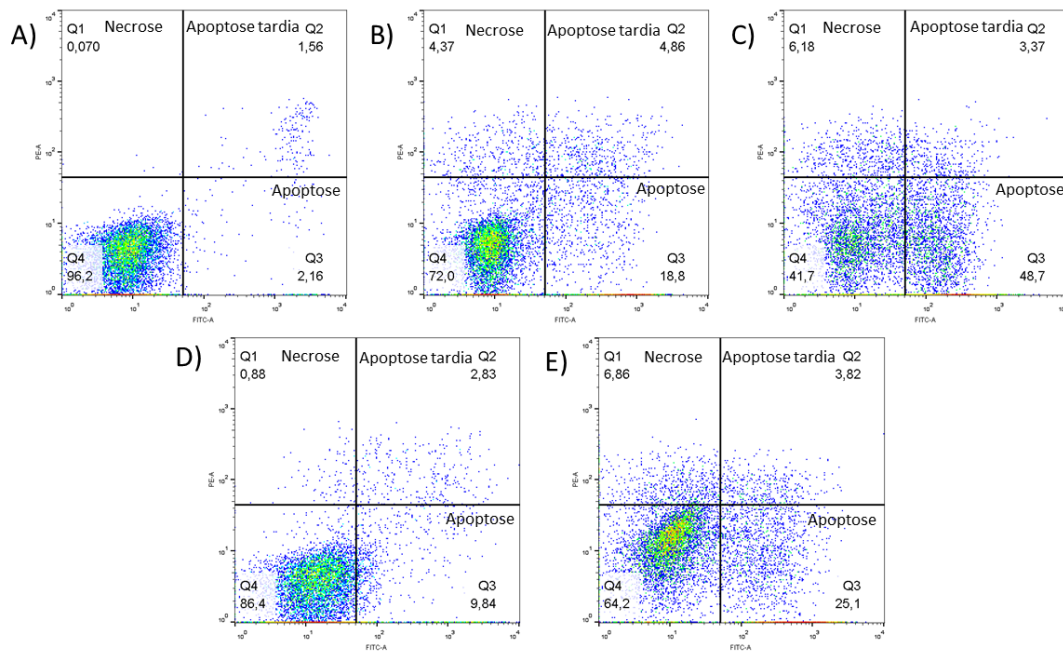


Figura 17- Avaliação da exposição de fosfatidilserina em formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* utilizando anexina V e iodeto de propídeo. A_ Formas promastigotas de *L. amazonensis* sem tratamento (Controle). B_ Formas promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com LCE no valor de CI₅₀. C_ Formas promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com LCE no valor de duas vezes a CI₅₀. D_ Formas promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com miltefosina no valor de CI₅₀. E_ Formas promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com miltefosina no valor de duas vezes o CI₅₀. Resultados expressos na forma de média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. One way Anova seguido do pós hoc teste de Bonferroni. ^a_ significa diferença estatística em relação ao grupo controle sem tratamento. Controle_ Controle negativo. LCE_ Extrato etanólico de folhas de *Lantana camara* L.

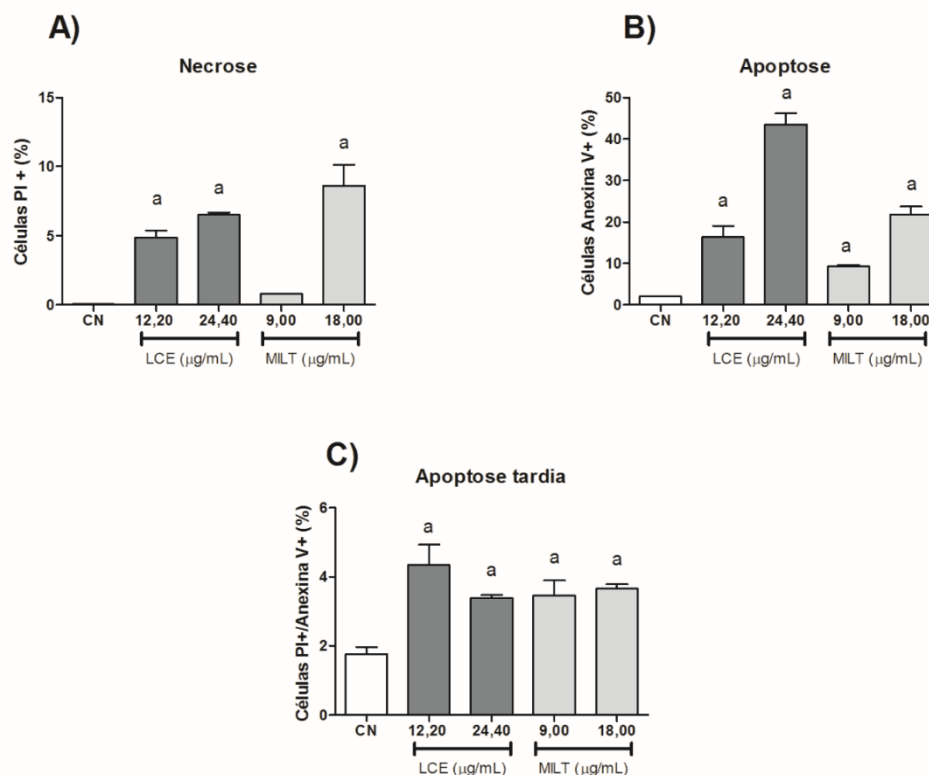


Figura 18- Porcentagem de clulas marcadas com anexina V e iodeto de propídeo . A_ Células PI + (Morte celular do tipo necrose). B_ Células Anexina V + (Morte celular do tipo apoptose-like).C_ Células PI +/Anexina V + (Morte do tipo apoptose tardia). Resultados expressos na forma de média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. One way Anova seguido do pós hoc teste de Bonferroni. ^a- significa diferença estatística em relação ao grupo controle sem tratamento. CN_ Controle negativo. LCE_ Extrato etanólico de folhas de *Lantana camara* L. MILT_ Miltefosina.

7.3.8 Avaliação dos níveis de óxido nítrico (NO) em macrófagos infectados com *L. amazonensis*

Além dos ensaios de mecanismo de ação nas formas promastigotas, também foi avaliado se nas diferentes concentrações (50 a 6,25 µg/mL) utilizadas no tratamento de macrófagos infectados com *L. amazonensis* poderiam induzir a produção de óxido nítrico (NO). Desta forma, após o tempo de 72h de tratamento e calculado o valor de CI₅₀ para as formas amastigotas, o sobrenadante foi recolhido e utilizado para a dosagem de NO. Os resultados

demonstram que as concentrações de 50, 25 e 12,5 de LCE induziram a produção de NO de formas significativa (Figura 19), quando comparado ao grupo controle sem tratamento (macrófagos sem tratamento e infectado com as formas amastigotas).

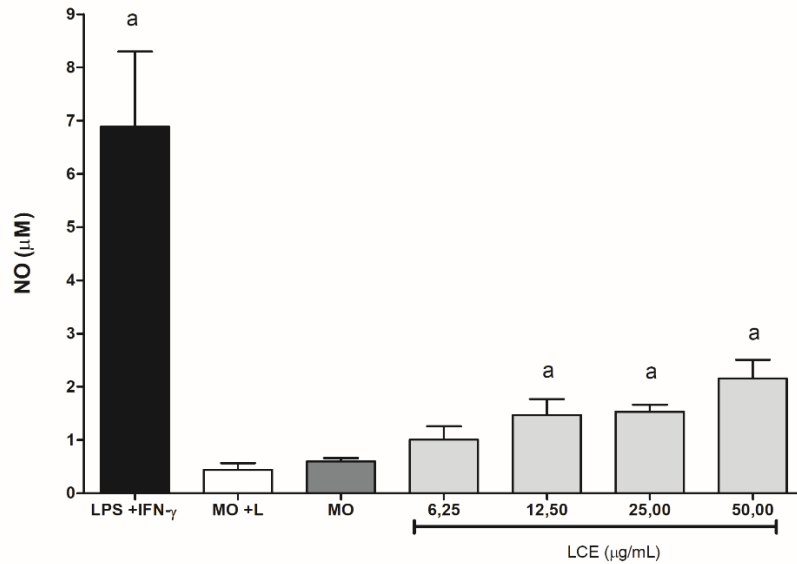


Figura 19- Avaliação da indução de NO em macrófagos infectados com *L. amazonensis* tratados com as diferentes concentrações do extrato etanólico de folhas de *Lantana camara* L. Resultados expressos na forma de média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. One Way Anova seguido do pós hoc teste de Bonferroni. ^a- significa diferença estatística em relação ao grupo controle sem tratamento. MO+L_ Macrófagos peritoneais murinos infectados com as formas amastigota de *L. amazonensis* e sem tratamento; MO_ Macrófagos peritoneais murinos sem infecção; LCE_ Extrato etanólico de folhas de *Lantana camara* L.

8. DISCUSSÃO

Com o intuito de avaliar o potencial biológico das substâncias químicas de LCE, foi realizado o processo de biomonitoramento das frações que apresentaram maior rendimento ou foram considerados mais puras. Os resultados demonstraram que as frações e composto puro de *L. camara* L. foram considerados menos ativos/ou mais tóxicas que o extrato bruto LCE sugerindo que a atividade biológica poderia estar associada a uma atividade sinérgica. O sinergismo é um processo no qual as substâncias interagem entre si para alcançar um efeito combinado maior que a soma de seus efeitos separados. Essa interação é de grande importância, uma vez que as melhorias trazidas por esse tipo de atividade podem ser vantajosas e utilizada para tratar distúrbios humanos (PEZZANI et al., 2019). Na segunda tentativa de realizar a purificação de substâncias, a fração F10 foi novamente cromatografada e com isso foi possível obter o composto 1, este composto foi testado novamente e quando avaliado, mostrou-se menos ativo do que a sua fração de origem, reforçando novamente que existe uma interação sinérgica no extrato.

Diante dos resultados encontrados, os estudos de mecanismo de ação foram realizados utilizando o extrato bruto LCE. O primeiro teste realizado foi a análise morfológica utilizando coloração por Giemsa e visualização por microscopia óptica, de forma a investigar possíveis alterações nas formas promastigotas de *L. amazonensis* após tratamento de 24h. A arquitetura do corpo celular das formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania* spp é definida por ligações cruzadas de microtúbulos (SUNTER; GULL, 2017). Uma vez que os parasitos tratados apresentaram redução do corpo celular, estas alterações sugerem que LCE pode interferir na produção dessas proteínas e causar alterações morfológicas nas formas promastigotas.

Outra alteração morfológica significativa foi a ausência de núcleo nos parasitos tratados, principalemnete no valor de 2x o CI₅₀. O núcleo é o principal local onde a informação genética nas células eucariotas está contida e é nesta organela que ocorre a replicação de DNA, transcrição e o “*splicing*” de RNA (BACHS; AGELL, 1995). Assim, a ausência de núcleo induzida por LCE é de grande relevância, uma vez que este evento poderia levar a alterações proteicas e na replicação do DNA. Também foi observado que algumas promastigotas tratadas com 2x o CI₅₀ de LCE apresentaram ausência do cinetoplasto. Em *Leishmania* spp, semelhante a outros tripanossomatídeos, além da mitocôndria ser única e altamente ramificada, existe uma porção densa e rica em DNA, também chamado de DNA mitocondrial (mtDNA) ou kDNA,

denominada de cinetoplasto (CAVALCANTI et al., 2018; SUNTER; GULL, 2017). Desta forma, as alterações no cinetoplasto após tratamento com LCE podem afetar a mitocôndria do parasito, uma vez que o mtDNA codifica as proteínas mitocondriais.

A mitocôndria é uma organela que desempenha funções metabólicas essenciais nas células e seu bom funcionamento torna-se um fator essencial para a sobrevivência de parasitos, como *Leishmania* spp. Diante disso, a mitocôndria tem sido considerada um promissor alvo para a ação de compostos com ação antileishmanial e está associada a vários processos de morte celular (MENNA-BARRETO; CASTRO, 2014). Logo, de forma a corroborar com os resultados encontrados na coloração com Giemsa, foi realizada a análise morfológica das formas promastigotas tratadas com LCE por meio de MEV e MET. Os resultados demonstraram um “inchaço” mitocondrial na região do cinetoplasto quando as células foram analisadas por MET, sugerindo uma possível ação de LCE na mitocôndria de *L. amazonensis*.

Após analisado possíveis alterações morfológicas por meio de microscopia, foi investigado se a redução do corpo celular (observado pela coloração com Giemsa e MET) também estaria relacionada ao metabolismo lipídico, uma vez que as membranas celulares são formadas a partir de uma grande diversidade de lipídios com quantidades e proporções diferentes (HARAYAMA; RIEZMAN, 2018). Para avaliar possíveis alterações lipídicas foi utilizado o Nile Red, um corante que emite fluorescência vermelha na presença de lipídeos polares (fosfolipídios) e fluorescência amarelo-esverdeado na presença de lipídeos neutros (como por exemplo, esteroides) (BASSELIN; ROBERT-GERO, 1998). Os resultados obtidos com Nile Red demonstram que LCE pode interferir tanto no metabolismo de lipídeos polares quanto no metabolismo de lipídeos neutros, de forma semelhante a miltefosina, o qual poderia contribuir para as alterações da membrana plasmática e corpo celular de *L. amazonensis*.

Uma vez que os esteróis da membrana plasmática regulam a fluidez da membrana e contribuem para a sua organização, o nível destes lipídeos foi também avaliado. Ao contrário das células de mamíferos, mas semelhantes aos fungos, as membranas celulares de parasitos do gênero *Leishmania* spp e *Trypanosoma* spp contêm ergosterol e esteróis semelhantes ao ergosterol (MCCALL et al., 2015). O ergosterol é alvo molecular de alguns agentes antiparasitários, como por exemplo a anfotericina B. Ao se associar com o ergosterol de membrana, este fármaco cria canais transmembrana que irão tornar as células mais permeáveis a íons e pequenas moléculas de soluto levando à morte celular (CHATTOPADHYAY; JAFURULLA, 2011). No ensaio de ergosterol, o aumento desse lipídeo no sobrenadante da

célula após tratamento, está relacionado com danos na membrana, visto que esta alteração facilita a sua liberação (ARTHINGTON-SKAGGS et al. 2000). Assim, de forma a avaliar se LCE poderia alterar os níveis de ergosterol na célula, e agir de forma semelhante a anfotericina, foi feita a dosagem de ergosterol por meio de um método espectrofotométrico. Apesar dos resultados com Nile Red demonstrarem que LCE interfere nos níveis de lipídeos neutros, não houve alterações significativas nos níveis de ergosterol. Isto sugere que LCE apresenta um mecanismo de ação diferente da anfotericina B.

Este metabolismo lipídico está relacionado com a função mitocondrial. Além disso, também está associado a biossíntese dos fosfolipídeos, fosfatidiletanolamina, cardiolipina, fosfatidilglicerol (MAYR et al., 2015) e esteroides (DUARTE et al., 2012). Logo, perturbações nesta organela podem levar a alterações nos constituintes de membrana. Para avaliar se essa alteração lipídica poderia estar associada a uma alteração da função mitocondrial, foi avaliado o potencial de membrana mitocondrial utilizando a sonda JC-1. É sabido que o bombeamento de H^+ pela CTE gera um gradiente de prótons através da membrana interna da mitocôndria que conduz a formação de um potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), o qual é vital para a manutenção celular (REERS et al., 1995). JC-1 pode ser usado para avaliar o $\Delta\Psi_m$ tanto em mitocôndrias isoladas quanto em tecidos. Este corante apresenta uma característica lipofílica, catiônica (exibindo naturalmente fluorescência verde), sendo desta forma, capaz de entrar na mitocôndria onde se acumula e forma complexos reversíveis chamados de J agregados. Esses J agregados exibem excitação e emissão no espectro vermelho (máximo em ~ 590 nm) ao invés de verde. Assim, em células saudáveis com $\Delta\Psi_m$ normal, o JC-1 entra e se acumula nas mitocôndrias carregadas negativamente e forma espontaneamente J agregados que florescem no vermelho. Em contraste, em células com potencial de membrana mitocondrial alterado, o JC-1 também entra na mitocôndria, mas em menor quantidade, uma vez que o interior da mitocôndria é menos negativo devido a perda do $\Delta\Psi_m$. Com base nessas premissas, a razão de fluorescência vermelho/verde do corante na mitocôndria, pode ser usado para avaliar o estado da polarização das mitocôndrias, visto que, quanto maior o $\Delta\Psi_m$, mais elevado é a fluorescência vermelha do corante (mais J agregados são formados) e caracteriza um estado de hiperpolarização. Já o contrário favorece a fluorescência verde do JC-1 e caracteriza uma despolarização da mitocôndria (SIVANDZADE et al., 2019).

Diante do exposto anteriormente, foi possível constatar que em 24h no valor de CI_{50} de LCE, as formas promastigotas tratadas e marcadas com JC-1 apresentaram uma

hiperpolarização, enquanto que o valor de 2x o CI_{50} de LCE induziu um processo de despolarização mitocondrial. Nenhuma alteração significativa foi observada em 12h. A hiperpolarização das mitocôndrias pode estar associada a eventos de morte celular provocados por estresse oxidativo, como por exemplo apoptose induzida por H_2O_2 . Neste caso, a hiperpolarização mitocondrial é um evento que antecede a externalização da fosfatidilserina (FS) e a perda de $\Delta\Psi_m$ (GERGELY et al., 2002). Os resultados encontrados com JC-1 sugerem que a hiperpolarização observada no valor de CI_{50} , é um evento inicial que antecipa a perda do potencial de membrana mitocondrial, que só é visto no valor de 2x CI_{50} de LCE provavelmente devido a um excesso de extrato.

Uma vez que a mitocôndria dos tripanossomatídeos é um dos principais locais de produção de EROS tanto sob ação de estresse ou em condições fisiológicas, a disfunção da cadeia respiratória nas cristas mitocondriais, muitas vezes promovida por agentes químicos, pode resultar numa exacerbada produção de EROS (FIDALGO; GILLE, 2011; MENNA-BARRETO; DE CASTRO, 2014). Acredita-se que isto aconteça pela interrupção do fluxo de elétrons e desequilíbrio no funcionamento da cadeia de transporte de elétrons (MENNA-BARRETO; DE CASTRO, 2014; TOMÁS; CASTRO, 2013). Em virtude disso, foi interessante avaliar se alterações no funcionamento da mitocôndria induzidas pelo tratamento de promastigotas com LCE poderiam interferir na produção de EROS. Para avaliar esse evento foi feita a dosagem de EROS utilizando H_2DCFDA . Esta sonda é uma substância quimicamente reduzida e no interior da célula, quando na presença de EROS, é oxidada a uma substância com fluorescência verde (2', 7'-diclorofluoresceína (DCF)) (OPARKA et al., 2016). Os resultados observados em 24h demonstraram um aumento dos níveis de EROS no valor de CI_{50} de LCE. Entretanto, após realizar o tratamento no período de 12h foi observado um aumento significativo de EROs em ambos valores de CI_{50} e 2x CI_{50} . Estes resultados sugerem que a presença de EROS é um evento que antecede a perda do $\Delta\Psi_m$. Em conjunto, os resultados sugerem que a alteração do $\Delta\Psi_m$ pode ser provocada por EROs. Estes resultados estão de acordo com os dados da literatura, que mostram que a presença de EROs produzida em resposta a estresse induzido por compostos promovem o colapso mitocondrial (SILVA-SILVA et al., 2022).

Uma vez estabelecido que a presença de EROs antecede às alterações observadas na mitocôndria, foi realizada a dosagem de grupos tiol (grupos sulfidrilas da tripanotiona reduzida) nas formas promastigotas tratadas. O grupo tiol é produzido pela tripanotiona redutase, uma

enzima que participa da redução da tripanotona (TURCANO et al., 2018), aumentando os níveis de tiol intracelular, moléculas que tem participação na regulação do equilíbrio tioredox e que são responsáveis pela neutralização de EROs em *Liehsmania* spp, dentre eles H₂O₂ (LIMA et al., 2015). A dosagem de grupo tiol realizada em 12h mostrou redução significativa dessas moléculas após o tratamento dos promastigotas com LCE. Assim, sugere-se que o aumento dos níveis de EROs observado em 12h pode estar relacionado com a inibição da tripanotona redutase induzida por LCE.

Em associação aos eventos acima, foi investigado também se o tratamento com LCE induziria perda da integridade da membrana plasmática em promastigotas de *L. amazonensis*, sinal indicativo de morte celular por necrose (GOLSTEIN; KROEMER, 2006). Para tal finalidade, foi utilizado o iodeto de propídeo, um marcador de DNA que pode ser usado para avaliar permeabilidade da membrana plasmática, uma vez que este corante não consegue penetrar em células com a membrana celular intacta (LIGASOVÁ KOBERNA, 2021). As análises com iodeto de propídeo não demonstraram alterações singificativas em 12 ou 24h, sugerindo que o mecanismo de morte induzido por LCE não é por necrose.

Finalmente, após analisadas várias alterações oriundas do tratamento com LCE, foi realizado a dupla marcação das formas promastigotas com Anexina V e IP. Os resultados revelaram que LCE induz morte celular principalmente por apoptose-like. A morte por apoptose-like vem sendo descritas por diversos autores, e estudos demonstram que a indução de estresse celular por tratamento com farmacos e peróxido de hidrogênio pode desencadear esse evento (ALZATE et al., 2006; DAS, MUKHERJEE; SHAHA, 2001; PARIS et al., 2004;). Além disso, a mitocôndria desempenha um papel importante na iniciação da apoptose (MENNA-BARRETO; CASTRO, 2014). Algumas das principais características fenotípicas observadas na apoptose-like são exposição de fosfatidilserina e despolarização da membrana mitocondrial (MENNA-BARRETO, 2019). Logo, as alterações observadas na mitocôndria de *L. amazonensis* após tratamento com LCE, podem ser eventos iniciais que antecedem a apoptose. Somado a isso, ainda temos a redução do número de tiols, que pode por sua vez, conduzir ao aumento de H₂O₂, que como dito anteriormente, leva à apoptose-like acompanhada de hipepolarização mitocondrial.

Embora o processo de morte celular por apoptose-like seja o evento principal, ainda foi possível observar um aumento menor, entretanto significativo, de promastigotas que morreram por necrose, corroborando com os achados de MEV e MET, onde foram encontrados

promastigotas lisados e sem conteúdo citoplasmático. Já é descrito pela literatura, que o estresse oxidativo pode induzir necrose devido a peroxidação lipídica e perda da integridade da membrana plasmática, culminando em lise celular (MENNA-BARRETO et al., 2019). Logo, nossos resultados sugerem que o processo de necrose, pode ser um evento oriundo do estresse oxidativo após tratamento e que deve ser considerado como um evento secundário, que só foi percebido pela técnica de citometria de fluxo, onde a robustez é maior.

Além dos testes nas formas promastigotas, foi dosado os níveis de NO em macrófagos infectados com *L. amazonensis*, uma vez que esta molécula é essencial para o controle da infecção. O NO é produzido via NO sintase dos macrófagos infectados após a ativação por IFN- γ e TNF- α , resultando na eliminação dos parasitos intracelulares (CARNEIRO et al., 2016). A dosagem de NO revelou que após o tratamento com LCE no tempo de 72h, as concentrações de 50,0; 25,0; e 12,5 $\mu\text{g/mL}$ induziram um aumento significativo de NO quando comparado os macrófagos infectados e sem tratamentos. Este dado sugere que a produção de NO induzida por LCE, pode ser um dos mecanismos de ação envolvidos na eliminação das formas intracelulares do parasito.

Com o intuito de investigar quais substâncias químicas estariam presentes em LCE e que poderiam ser responsáveis pela a atividade antileishmanial, foi feita a caracterização química por *UFLC-QTOF-MS*. A análise mostrou principalmente a presença de triterpenos, dentre eles os lantadenes A,B e C, substâncias consideradas marcadores químicos da espécie. Além disso, foi observado a presença de flavonoides, logo, esses dados corroboram com as dosagens encontradas anteriormente (BEGUM et al., 2015). Os triterpenos, substâncias majoritárias em LCE, já vem sendo estudados devido ao seu potencial antileishmanial (RAIMUNDO et al., 2022). Além disso, estudos mostram que o triterpeno ácido ursólico, encontrado em LCE, possui atividade biológica contra a espécie *L. amazonensis*, induzindo morte celular do tipo apoptose-like que é antecedida por um processo de hiperpolarização mitocondrial (YAMAMOTO et al., 2015). Logo, essas substâncias podem ser as responsáveis pelas atividade biológicas encontradas.

9. CONCLUSÃO

Os resultados encontrados sugerem que o sinergismo presente em LCE confere seletividade, favorecendo a atividade antileishmanial ou redução da toxidez da célula de mamífero, quando comparado às frações e/ou composto puro. No estudo do modo de ação, os resultados indicam que LCE inibe a tripanotona redutase de promastigotas de *L. amazonensis*, elevando os níveis de EROs, os quais irão induzir alterações do $\Delta\Psi_m$. Estas, por sua vez, estão associadas com alterações no metabolismo lipídico, que a princípio, não interferem nos níveis de ergosterol. O tratamento também induziu alterações morfológicas, como inchaço mitocondrial e redução do corpo celular das formas promastigotas. Além disso, a marcação com anexina V revelou um aumento da exposição por fosfatidilserina na membrana dos parasitos, sugerindo que LCE induz, principalmente, morte celular do tipo apoptose-like e que as alterações anteriores são etapas iniciais que antecedem a morte celular. Entretanto, também foram encontrados ausência de núcleo e cinetoplasto nos promastigotas tratados, indicando que outros mecanismos, incluindo interferência na síntese de DNA, podem estar associados com o efeito antileishmanial de LCE. Em adição, LCE ainda tem atividade imunomoduladora em macrófagos infectados com *L. amazonensis*, uma vez que o mesmo induziu aumento dos níveis de NO. Ensaios posteriores poderão auxiliar no melhor entendimento sobre o modo de ação de LCE e, conseqüentemente, propor uma seqüência de possíveis eventos associados a morte de *L. amazonensis*.

10. REFERÊNCIAS

ALZATE, J. F.; ALVAREZ-BARRIENTOS, A.; GONZALEZ, V. M.; JIMENEZ-RUIZ, A. Heat-induced programmed cell death in *Leishmania infantum* is reverted by Bcl-X L expression. **Apoptosis**, v. 11, p. 161-171, 2006.

ARTHINGTON-SKAGGS, B.A.; WARNOCK, D.W.; MORRISON, C.J. Quantitation of *Candida albicans* Ergosterol Content Improves the Correlation between *In Vitro* Antifungal Susceptibility Test Results and In Vivo Outcome after Fluconazole Treatment in a Murine Model of Invasive Candidiasis. **ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY**, v. 44, n.8, p. 2081–2085, 2000.

BACHS, O.; AGELL, N. The Cell Nucleus: Structure and Main Functions. In: Calcium and Calmodulin Function in the Cell Nucleus. **Molecular Biology Intelligence Unit**. Springer, Berlin, Heidelberg. P.11–19 1995.

BASSELIN, M.; ROBERT-GERO, M. Alterations in membrane fluidity, lipid metabolism, mitochondrial activity, and lipophosphoglycan expression in pentamidine-resistant *Leishmania*. **Parasitology Research**, v.84: p.78-83, 1998.

BEGUM, S.; AYUB, A.; SIDDIQUI, B.S.; FAYYAZ, S.; KAZI, F. Nematicidal Triterpenoids from *Lantana camara*. **Chemistry & Biodiversity**, v.12, p. 1435-1442, 2015.

BEGUM, S.; ZEHRA, S.Q.; AYUB, A.; SIDDIQUI, B.S. A new 28-noroleanane triterpenoid from the aerial parts of *Lantana camara* L. **Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters**. v.24, n.13, p.1227–1234, 2010.

CAVALCANTI, D.P.; SOUZA., W. The Kinetoplast of Trypanosomatids: From Early Studies of Electron Microscopy to Recent Advances in Atomic Force Microscopy. **Scanning**, p.1-14, 2018.

CARNEIRO, P.P.; CONCEIÇÃO, J.; MACEDO, M.; MAGALHÃES, V.; CARVALHO, E.M.; BACELLAR, O. The Role of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in the Killing of *Leishmania braziliensis* by Monocytes from Patients with Cutaneous Leishmaniasis. **PLOS ONE**, v.11, n.2, p.1-16, 2016.

CHATTOPADHYAY, A.; JAFURULLA, M. A. novel mechanism for an old drug: Amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.416, p.7–12, 2011.

COIMBRA, E.S.; SOUZA, M.V. N.; TERROR, M.S.; PINHEIRO, A.C.; DA TRINDADE GRANATO, J.T. Synthesis, biological activity, and mechanism of action of new 2-pyrimidinyl hydrazone and N-acylhydrazone derivatives, a potent and new classes of antileishmanial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.184, n.111742, p.1-11, 2019.

DAS, M.; MUKHERJEE, S. B.; SHAHA, C. Hydrogen peroxide induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. **Journal of Cell Science**, v. 114, p. 2461-2469, 2001.

DUARTE, A.; PODEROSO, C.; COOKE, M.; SORIA, G.; MACIEL, F.C.; GOTTIFREDI, V.; ERNESTO J. PODESTA, E.J. Mitochondrial Fusion Is Essential for Steroid Biosynthesis. **PLOS ONE**, v.7, n.9, p.1-12, 2012.

EL-BANNA, A.A.; DARWISH, R.S.; GHAREEB, D.A.; YASSIN, A.M.; ABDULMALEK, S.A.; DAWOOD, H.M. Metabolic profiling of *Lantana camara* L. using UPLC-MS/ MS and revealing its inflammation-related targets using network pharmacology-based and molecular docking analyses. **Scientific Reports**, v.12, n.14828, p.1-17, 2022.

FIDALGO, L. M.; GILLE, L. Mitochondria and Trypanosomatids: Targets and Drugs. **Pharmaceutical Research**, v. 28, n. 11, p. 2758–2770, nov. 2011.

GERGELY, J.P.; GROSSMAN, C.; NILAND, B.; PUSKAS, F.; NEUPANE, H.; ALLAM, F.; BANKI, K.; PHILLIPS, P.E.; PERL, A. Mitochondrial Hyperpolarization and ATP Depletion in Patients With Systemic Lupus Erythematosus. **Arthritis & Rheumatology**, v.46, n1, p.175–190, 2002.

GOLSTEIN, P.; KROEMER, G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. **TRENDS in Biochemical Sciences**, v.32, n.1, 37-43, 2006.

GRANATO, J.T.; SANTOS, J.A. S.; CALIXTO, S.L.; SILVA, N.P.; MARTINS, J. S.; SILVA, A.D.; COIMBRA, E.S. Novel steroid derivatives: synthesis, antileishmanial activity, mechanism of action, and in silico physicochemical and pharmacokinetics studies. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.106, p.1082–1090, 2018.

HARAYAMA, T.; RIEZMAN, H. Understanding the diversity of membrane lipid composition. **Molecular Cell Biology**. v.19, p.281-296, 2018.

LAZARIN-BIDÓIA, D.; DESOTI, V.C.; MARTINS, S.C.; RIBEIRO, F.M.; DIN, Z.U.; RODRIGUES-FILHO, E.; UEDA-NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C.V.; SILVA, S.O. Dibenzylideneacetones Are Potent Trypanocidal Compounds That Affect the *Trypanosoma cruzi* Redox System. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.60, n.2, p. 890-903, 2016.

LIGASOVÁ, A.; KOBERNA, K. DNA Dyes—Highly Sensitive Reporters of Cell Quantification: Comparison with Other Cell Quantification Methods. **Molecules**, v.26, 5515, p.1-16, 2021.

LIMA, G.S.; CASTRO-PINTO, D.B.; MACHADO, G.C.; MACIEL, M.A.M., ECHEVARRIA, A. Antileishmanial activity and trypanothione reductase effects of terpenes from the Amazonian species *Croton cajucara* Benth (Euphorbiaceae). **Phytomedicine**, v.22, p.1133–1137, 2015.

MAYR, J.A. Lipid metabolism in mitochondrial membranes. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v.38, p.137–144, 2015.

MCCALL, L.I.; AROUSSI, A.E.; CHOI, J.Y.; VIEIRA, D.F.; MUYLDER, G.; JOHNSTON, J.B.; CHEN, S.; KELLAR, D.; SIQUEIRA-NETO, J.L.; ROUSH, W.R.; PEREIRA, F. O.; MENDES, J. M.; LIMA, E. O. Investigation on Mechanism of Antifungal Activity of Eugenol against *Trichophyton rubrum*. **Medical Mycology**, v.51, n.5, p.507–513, 2013.

MACHADO, P.A.; GOMES, P.S.; CARNEIRO, M.P.D.; MIDDLEJ, V.; COIMBRA, E.S.; GUEDES, H.L.M. Effects of a Serine Protease Inhibitor N-p-Tosyl-L-phenylalanine Chloromethyl Ketone (TPCK) on *Leishmania amazonensis* and *Leishmania infantum*. **Pharmaceutics**, v.14, 1373, p.1-21, 2022.

MENNA-BARRETO, R. F. S. Cell death pathways in pathogenic trypanosomatids: lessons of (over) kill. **Cell death & disease**, v.10, p. 1-11, 2019.

MENNA-BARRETO, R. F. S.; DE CASTRO, S. L. The Double-Edged Sword in Pathogenic Trypanosomatids: The Pivotal Role of Mitochondria in Oxidative Stress and Bioenergetics. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–14,2014.

OPARKA, M.; WALCZAK, J.; MALINSKA, D.; OPPEN, L.M.P.E.V.; SZCZEPANOWSKA, J.; KOOPMAN, W.J.H.; WIECKOWSKI, M.R. Quantifying ROS levels using CM-H2DCFDA and HyPer. **Methods**, v.109, p.3–11, 2016.

PEZZANI, R.; SALEHI, B.; VITALINI, S.; IRITI, M.; ZUÑIGA, F.A.; SHARIFI-RAD, J.; MARTORELL, M.; MARTINS, N. Synergistic Effects of Plant Derivatives and Conventional Chemotherapeutic Agents: An Update on the Cancer Perspective. **Medicina**, v.55, n.110, p.1-16, 2019.

PARIS, C.; LOISEAU, P. M.; BORIES, C.; BRÉARD, J. Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p. 852-859, 2004.

REERS, M.; SMILEY, S.T.; MOTTOLA-HARTSHORN, C.; CHEN, A.; LIN, M.; CHEN, L.B. Mitochondrial membrane potential monitored by JC-1 dye. **Methods in Enzymology**. v.260, p. 406–417, 1995.

SCARIOT, D. B. et al. Induction of Early Autophagic Process on *Leishmania amazonensis* by Synergistic Effect of Miltefosine and Innovative Semi-synthetic Thiosemicarbazone. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017.

SILVA-SILVA, J.V.; MORAGAS-TELLIS, C.J.; CHAGAS, M.S.S.; SOUZA, P.V.R.; MOREIRA, D.L.; HARDOIM, D.J.; TANIWAKI, N.N.; COSTA, V.F.A.; BERTHO, A.L.; BRONDANI, D.; ZAPP, E.Z.; OLIVEIRA, A.S.; CALABRESE, K.S.; BEHRENS, M.D.; ALMEIDA-SOUZA, F. Carajurin Induces Apoptosis in *Leishmania amazonensis*

Promastigotes through Reactive Oxygen Species Production and Mitochondrial Dysfunction. **Pharmaceuticals**, v.15, n.331, p.1-18, 2022.

SIVANDZADE, F.; BHALERAO, A.; CUCULLO, L. Analysis of the Mitochondrial Membrane Potential Using the Cationic JC-1 Dye as a Sensitive Fluorescent Probe. **Bio Protocol**, v.9, n.1, p.1-13, 2019.

SOUSA, E.O.; COSTA, J.G.M. Genus *Lantana*: chemical aspects and biological activities. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.22, n.5, p.1155-1180, 2012.

SUN, J.; ZHANG, X.; BRODERICK, M.; FEIN, H. Measurement of Nitric Oxide Production in Biological Systems by Using Griess Reaction Assay. **Sensors**, v.3, p. 276-284, 2003.

SUNTER, J.; GULL, K. Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. **Open Biology**. v.7, n.170165, p.1-13, 2017.

TAVARES, G. S.V.; MENDONÇA, D.V.C.; LAGE, D.P.; GRANATO, J.T.; OTTONI, F.M.; LUDOLF, F.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M.A.; DUARTE, M.C.; TAVARES, C.A.P.; ALVES, R.J.; COIMBRA, E.S.; COELHO, E.A.F. Antileishmanial Activity, Cytotoxicity and Mechanism of Action of Clioquinol Against *Leishmania infantum* and *Leishmania amazonensis* Species. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology** 123, 236–246, 2018.

TOMÁS, A. M.; CASTRO, H. Redox Metabolism in Mitochondria of Trypanosomatids. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 19, n. 7, p. 696–707, set. 2013.

TURCANO, L.; TORRENTE, E.; MISSINEO, A.; ANDREINI, M.; GRAMICCIA, M.; MUCCIO, T.D.; GENOVESE, I.; FIORILLO, A.; HARPER, S.; BRESCIANI, A.; COLOTTI, G.; ILAR, A. Identification and binding mode of a novel *Leishmania* Trypanothione reductase inhibitor from high throughput screening. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, p.1-21, 2018.

YAMAMOTO; E.S.; CAMPOS, B.L.S.; JESUS, J.A.; LAURENTI, M.D.; RIBEIRO, S.P.; KALLÁS, E.G.; FERNANDES, M.R.; GOMES, G.S.; SILVA, M.S.; SESSA, D.P.; LAGO, J.H.G.; LEVY, D.; PASSERO, L.F.D. The Effect of Ursolic Acid on *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* Is Related to Programed Cell Death and Presents Therapeutic Potential in Experimental Cutaneous Leishmaniasis. **PLoS ONE** v.10, n.12, p.1-19, 2015.

11. CAPITULO 3- AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIA DE *MITRACARPUS FRIGIDUS*

Com o intuito de melhorar a compreensão o capítulo 1 foi dividido em 2 artigos científicos. O artigo 1, contendo os resultados sobre a atividade anti-inflamatória e a continuação da atividade antioxidante de MFAq foi publicado na revista **Journal Pharmacy and Pharmacology**. Já o artigo 2, o qual se refere a um estudo mais aprofundado da atividade anti-inflamatória *in vitro* e *in silico* de MFAq, está na fase de submissão para a mesma revista.

11.1. OBJETIVOS

11.1.1 Objetivo geral

- Avaliar as atividades antioxidante e anti-inflamatória *in vitro*, *in vivo* e *in silico* do extrato aquoso de *Mitracarpus frigidus* (MFAq)

11.1.2 Objetivos específicos

- Determinar a estrutura química e o teor das substâncias presentes no extrato aquoso de *M. frigidus*.
- Investigar o efeito antioxidante *in vitro* por diferentes ensaios para verificar a eficácia na eliminação de radicais livres;
- Avaliar o efeito citotóxico em macrófagos da linhagem J774A.1 e macrófagos intraperitoneais de camundongos BALB/c
- Avaliar o efeito anti-inflamatório *in vitro* em macrófagos da linhagem J774A.1 e macrófagos intraperitoneais de camundongos BALB/c
- Avaliar o mecanismo de ação das substâncias químicas presentes em MFAq na enzima ciclo-oxigenase 2 (COX-2) murina por meio de *docking* molecular.
- Avaliar o potencial anti-inflamatório *in vivo* de *M. frigidus* utilizando modelo murino de inflamação aguda tópica.

11.2 ARTIGO 1 (PUBLICADO NA JOURNAL PHARMACY AND PHARMACOLOGY)

JOURNAL ARTICLE

Pharmacological investigation of antioxidant and anti-inflammatory activities of aqueous extract from *Mitracarpus frigidus* (Rubiaceae) [Get access >](#)

Ari Sérgio de O Lemos, Lara M Campos, Thalita de F Souza, Priscila de L Paula, Juliana da T Granato, João Victor G da Silva, Danielle M O Aragão, Vinicius N Rocha, Elaine S Coimbra, Rodrigo L Fabri 

Journal of Pharmacy and Pharmacology, Volume 74, Issue 5, May 2022, Pages 750–760,
<https://doi.org/10.1093/jpp/rgac005>

Published: 23 March 2022 **Article history** ▼

 Cite  Permissions  Share ▼

Abstract

Objectives

This study aimed to evaluate the potential of aqueous extract from *Mitracarpus frigidus* aerial parts (MFAq) in the treatment of inflammation and oxidative stress, as well as to characterize its chemical constituents.

Methods

Pharmacological investigation of antioxidant and anti-inflammatory activities of aqueous extract from *Mitracarpus frigidus* (Rubiaceae)

Ari Sérgio de O. Lemos¹, Lara M. Campos¹, Thalita de F. Souza¹, Priscila de L. Paula¹, Juliana da T. Granato³, João Victor G. da Silva², Danielle M. O. Aragão¹, Vinicius N. Rocha⁴, Elaine S. Coimbra³, Rodrigo L. Fabri^{1*}

¹Bioactive Natural Products Laboratory, Department of Biochemistry, Biological Sciences Institute, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brazil.

²Postgraduate Program in Biological Sciences, Biological Sciences Institute, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brazil.

³Department of Parasitology, Microbiology, and Immunology, Biological Sciences Institute, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brazil.

⁴Department of Veterinary Medicine, Faculty of Medicine, Federal University of Juiz de Fora, Campus, Juiz de Fora, MG, Brazil.

*Corresponding author at: Bioactive Natural Products Laboratory, Department of Biochemistry, Institute of Biological Sciences, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais CEP 36036-900, Brazil. E-mail address: rodrigo.fabri@ufjf.edu.br (R.L. Fabri).
Phone: +55 32 2102 3208 Fax: +55 32 2102 3216.

ABSTRACT

Objectives This study aimed to evaluate the potential of aqueous extract from *Mitracarpus frigidus* aerial parts (MFAq) in the treatment of inflammation and oxidative stress, as well as to characterize its chemical constituents.

Methods Total phenolic and flavonoid contents were determined, and phytoconstituents were detected by *UFLC-QTOF-MS*. The antioxidant activity was evaluated by DPPH, TAC, and β -carotene/linoleic acid assays. *In vitro* anti-inflammatory activity, cell viability, and cell cycle were performed in J774A.1 cell line. *In vivo* anti-inflammatory activity was investigated by two ear edema assays (croton oil and phenol).

Key findings Chlorogenic acid, clarinoside, quercetin-hexosylpentoside, rutin, kaempferol-3-O-rutinoside, kaempferol-rhamnosylhexoside, quercetin-pentosylrhamnosylhexoside, harounoside, 2-azaanthraquinone, and sucrose were identified by *UFLC-QTOF-MS*. MFAq showed antioxidant activity, which was positively correlated to the content of phenolic compounds. MFAq significantly inhibited the production of nitric oxide, did not decrease viability in MTT assay (all concentrations) and showed no changes in membrane permeability and cell cycle of J774A.1 cell line. Furthermore, MFAq showed a reduction in ear edema in all tested doses.

Conclusion MFAq was effective in some antioxidant and inflammatory parameters, in the experimental conditions that were used in the study. This is the first report of chemical composition and bioactivities from this extract.

Keywords: Phytochemistry, *Mitracarpus frigidus*, inflammation, oxidative stress

Introduction

Inflammation is an immune response to harmful stimuli, which acts removing pathogens, damaged cells, or toxic compounds and initiating the healing process. ^[1] Signs of inflammation are well known and include different stimuli such as heat, redness, tumor, loss of function, and pain. ^[2] The painful stimuli are attributed to inflammatory mediators generated throughout the inflammatory process. ^[3]

Evidence indicates that oxidative stress plays a pathogenic role in chronic inflammatory diseases, due to reactive oxygen species (ROS) production in biological systems to modulate cellular activities such as cell survival, stressor responses, and inflammation that might generate

oxidized proteins, glycated products, and lipid peroxidation. ^[4, 5] This event is considered a disturbance between the generation of pro- and antioxidant species, which leads to molecular and cellular damage. ^[5] Macrophages play an important role in the inflammatory process being the major source of free radicals such as nitric oxide (NO), inducible nitric oxide synthase (iNOS), and superoxide, by NADPH oxidase. ^[2, 6] The reaction of superoxide with NO leads to peroxynitrite formation, another free radical that has been attributed to inflammation complications and which might lead to stroke, myocardial infarction, chronic heart failure, diabetes, circulatory shock, cancer, and neurodegenerative disorders *in vivo*. ^[6]

Additionally, NO is involved in the modulation of prostaglandin E2 (PGE2) synthesis in macrophage cells, resulting in increased prostaglandin production, further aggravating the inflammatory process. ^[7] Moreover, the signaling pathways that activate the iNOS also lead to an enhancement of cyclooxygenase 2 (COX-2) activity, a key enzyme in prostaglandin synthesis and a frequent target of non-steroidal anti-inflammatory drugs. ^[8] Anti-inflammatory therapies can reduce inflammation and pain by blocking isoforms of cyclooxygenase enzyme (COX-1 and/or COX-2). However, many side effects are attributed to the administration of anti-inflammatory drugs, which highlights the need for new therapies. Hence, the use of medicinal plants has become a new strategic tool capable of presenting molecules with therapeutic effects and little or no side effects. ^[9]

Brazil presents the greatest biodiversity in the world, with a large number of medicinal plants with therapeutic potential. This rich diversity of natural compounds is very important since plant-derived compounds are still one of the most sophisticated sources of new molecular models for medicinal chemistry. ^[10] However, despite the abundance of plants, only 15% of species were investigated for chemical and pharmacological properties. ^[11]

Some species of the genus *Mitracarpus* (Rubiaceae) have many ethnopharmacological uses. For example, *M. scaber* Zucc. ex Schult. & Schult. F. is used in traditional medicine in West Africa for headaches, toothache, amenorrhoea, dyspepsia, hepatic and venereal diseases, and leprosy. The juice of the plant is applied topically for the traditional treatment of diseases of the skin. ^[12]

There are no reports however on the traditional uses of *M. frigidus* (Willd. ex Roem. & Schult.) K. Shum, an annual shrub commonly found in South America, including Brazil. ^[13] This species is a perennial herb or sub-shrub, erect or ascending. It inhabits sandy soils, usually in wetter areas, on rocky outcrops and inselbergs. It also occurs as a ruderal plant in scrub,

secondary vegetation and path margins. As for its conservation status, the species is considered non-threatened. ^[14]

This species is extensively studied by our research group and shows several biological activities reported, ^[15, 16, 17, 18] as well as no toxicity in an animal model. ^[19] The phytoconstituents found in *M. frigidus* are flavonoids, coumarins, anthraquinones, naphthoquinones, and terpenes. ^[20, 21, 22, 23]

The study of the chemical and biological potential of *M. frigidus* focuses on extract production by organic solvents. Therefore, using non-toxic solvents ("green solvents"), for example, for aqueous extract production, is a viable strategy, since these solvents are used in the popular knowledge of medicinal plants as "teas" or infusions. ^[24, 25, 26] Thus, our objective was to evaluate, for the first time, the therapeutic potential of the aqueous extract from *M. frigidus* aerial parts for the treatment of inflammation and oxidative stress.

Material and Methods

Plant material

Mitracarpus frigidus aerial parts were collected in Juiz de Fora, state of Minas Gerais, Brazil, in May 2019, at the following coordinates 21° 41' 20" S; 43° 20' 40" O. A voucher specimen (CESJ 46076) was deposited at the Leopoldo Krieger Herbarium at the Federal University of Juiz de Fora; according to the license number A032F41-23 SISGEN/BRAZIL.

Preparation of the aqueous extract of M. frigidus aerial parts (MFAq)

The aqueous extract from *M. frigidus* aerial parts was prepared by infusing 1 kg of powdered aerial parts in distilled water at 80 °C for 2 hours. The infusion was filtered and the supernatant was lyophilized to yield 12.6% of aqueous extract (126 g).

Determination of total phenolic content

The total phenolic content was determined by Folin-Ciocalteu method with some modifications. ^[27, 28, 29] The calibration curve was prepared using tannic acid as a standard. All reactions were performed in triplicate. The content of phenolic compounds was expressed as the mean \pm standard deviation corresponding to mg tannic acid equivalents per g dry plant sample (mg TAE/g).

Quantification of flavonoid content

The flavonoids content was determined, following a modified version of the method described by Miliauskas *et al.* [30]. The calibration curve was prepared using rutin as standard. All determinations were performed in triplicate. Total flavonoid content was expressed as the mean \pm standard deviation corresponding to mg rutin equivalents per g dry plant sample (mg RE/g).

Chromatographic conditions

MFAq was analyzed by chromatography/mass spectrometry techniques (UFLC Shimadzu Nexera model, QTOF-MS Bruker Compact model electrospray ionization source). The mobile phase used consisted of acidified water, pH = 3, with formic acid (phase A) and methanol (phase B). The injection flow was set to 0.4 ml/min and the running time, to 12 min. The column used was the Kinetex 2.6 μ m - C18 - 100A, length 100 mm X 3.0 mm. The chromatographic run began with 40% phase B at 0.01 min, reaching up to 70% phase B at 8.20 min and 95% phase B at 9.70 min, with a subsequent return to 40% phase B at 10.20 min, the running ended in 12 min. The ionization conditions were in positive $[M + H]^+$ mode with the following specifications: ion source electrospray voltage of 40 V, a capillary voltage of 4500 V, and a capillary temperature of 220 °C. The full scan mass acquisition was performed by scanning from 100 up to 1000 m/z range.

Evaluation of antioxidant activity

2,2-diphenyl-1-(2,4,6-trinitrophenyl) hydrazyl (DPPH) radical scavenging method

The free radical scavenging activity of MFAq was evaluated by the DPPH method described by Brand-Williams *et al.* [31]. This assay consists in the reduction of DPPH by antioxidant substances. Successive dilutions of MFAq were made in a 96-well plate (250 to 0.49 μ g/mL). Rutin was used as the positive control (250 to 0.0005 μ g/mL). The experiment was performed in triplicate. The results were expressed as CI_{50} which corresponds to the concentration required to inhibit 50% of the DPPH radical.

Total antioxidant capacity by phosphomolybdenum assay

The total antioxidant capacity (TAC) was determined by the phosphomolybdenum assay based on the method proposed by Prieto *et al.* [32]. Results were expressed as the percentage of

relative antioxidant activity (RAA%) with the positive controls, according to the equation: $RAA\% = [(Abs_{Sample} - Abs_{Blank\ of\ sample}) / (Abs_{Positive\ control} - Abs_{Blank\ of\ positive\ control})] \times 100$ [33, 34]. Where Abs_{Sample} : absorbance measured for the sample; $Abs_{Positive\ control}$: absorbance measured for the positive controls; $Abs_{Blank\ of\ sample}$: absorbance measured for the sample blank; $Abs_{Blank\ of\ positive\ control}$: absorbance measured for the positive control blank. The experiment was performed in triplicate.

β -carotene/linoleic acid system

We evaluated the lipid peroxidation inhibition activity by the β -carotene/linoleic acid method described by Melo and Mancini Filho [35] with some modifications. MFAq or rutin (positive control) solutions (final concentration of 38.46 μ g/ml) were added in a 96-well microplate. Readings were taken at zero time and in 15 min intervals until completing 120 min of reaction.

The decrease in sample absorbance (Abs_{Sample} (0 min to 120 min time)) was related to the decrease in absorbance of the negative control ($Abs_{Control}$ (0 min to 120 min time)), obtaining the percentage of lipid peroxidation inhibition (% I) by the formula: $\% I = (Abs_{Control} - Abs_{Sample}) / Abs_{Control} \times 100$. The oxidation curve was evaluated to find the values of F1 (capacity of blocking hydroperoxide formation) between 15 and 45 min after the beginning of the reaction and F2 (capacity of inhibiting other reactions during the oxidative process, which produce radical species) between 75 and 90 min after the beginning of the reaction using the following formulas: $F1 = tg\ solution\ Abs_{Sample} / tg\ Abs_{Control}$; $F2 = tg\ solution\ Abs_{Sample} / tg\ Abs_{Control}$. [36] Where $Abs_{Control}$: absorbance measured for negative control; Abs_{Sample} : absorbance measured for the sample; % I: percentage of lipid peroxidation inhibition; tg: tangent. The experiment was performed in triplicate.

Cell viability and cell cycle analysis

Cell line

J774A.1 cells (murine macrophages) were grown in culture bottles with RPMI-1640 medium supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 μ g/mL antibiotic (streptomycin and penicillin), 5% fetal bovine serum (FBS) and kept in an incubator at 5% CO_2 at 37 °C until the day of the test.

Cell viability assessment

MTT assay

J774A.1 cells were transferred to 96-well plates at 2×10^4 cells/well and treated with MFAq at concentrations ranging from 200 to 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. For the negative control, cells were treated only with 0.06% DMSO (vehicle). The cells were reincubated for 48 h in 5% CO_2 at 37 °C. The cell viability was assessed by the 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay.^[37] Absorbance was read at 570 nm and cell viability (%) of macrophages after treatment was obtained by the following formula: % viable cells = $[(\text{Abs}_{\text{Sample}}) / \text{Abs}_{0.06\% \text{ DMSO}}] \times 100$. Where: $\text{Abs}_{\text{sample}}$: absorbance measured after treatment of cells with the sample; $\text{Abs}_{0.06\% \text{ DMSO}}$: absorbance measured after treatment of cells with 0.06% dimethyl sulfoxide (DMSO). The experiment was performed in triplicate.

Plasma membrane permeability

The ability of MFAq to induce loss of plasmatic membrane permeability in J774A.1 macrophages, causing damage in cell viability, a flow cytometry assay was performed using propidium iodide (staining DNA of cells with compromised membrane permeability) following the methodology of Crowley *et al.*^[38] with some modifications. A total of 2×10^4 cells per well were transferred to 96-well plates and incubated for 48 h at 37 °C in 5% CO_2 at concentrations of 200 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Negative control was treated with 0.06% DMSO (vehicle). The cells were stained with propidium iodide (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 15 min before reading and collected into FACS (CORNING) tubes. Sample reading was performed in a FACS canto II flow cytometer (Becton & Dickinson). Analyzes were performed using the FlowJo[®] software. The experiment was performed in triplicate.

Cell cycle analysis

Although a cell might look viable after treatment, it is important to analyze if there has been a change in its ability to replicate, due to possible DNA damage at a particular stage of the cell cycle. The cell cycle analysis was performed according to the method proposed by Riccardi and Nicoletti^[39] with some modifications. For this assay, a J774A.1 cell line was cultured as described in MTT assay. Then, 2×10^4 cells per well were transferred to 96-well plates and incubated for 48 h at 37°C in 5% CO_2 at concentrations of 200 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The cells were placed on ice, stained with 150 μL HFS solution (0.05% propidium iodide, 1% sodium citrate,

0.5% triton X 100) 4 hours before reading and collected into FACS (CORNING) tubes. Sample reading was performed in a FACS canto II flow cytometer (Becton & Dickinson). Analyzes were performed using the FlowJo[®] software. Cells treated with 0.06% DMSO were used as negative control (Control). The experiment was performed in triplicate.

In vitro anti-inflammatory activity by NO dosage

After grown, J774A.1 cells were transferred to 96-well plates (2×10^4 cell per well) and treated with MFAq at concentrations ranging from 200 to 6.25 $\mu\text{g/mL}$. Subsequently, LPS (lipopolysaccharide) at 1 $\mu\text{g/mL}$ and IFN- γ at 0.9 ng/mL were added and the volume was completed to 200 μL with RPMI medium. Negative control (Control) was stimulated with LPS and IFN- γ and treated only with 0.06% DMSO (sample vehicle). Cells without any treatment and no stimulation were used to assess basal NO production (Basal). The cells were incubated for 48 h in 5% CO₂ at 37 °C. Then, NO production was evaluated by the Griess method (indirect NO dosing) in recovered culture supernatant as described by Sun *et al.* [40] The experiment was performed in triplicate.

In vivo anti-inflammatory activity

Animals

Male Swiss mice of 30 days old, weighing 20 - 25 g, were obtained from the Reproduction Biology Center of the Federal University of Juiz de Fora. This study was carried out in strict accordance with the recommendations in the Ethical Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health. The protocol was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the Federal University of Juiz de Fora on May 10, 2019 (Protocol Number: 07/2019).

Experimental procedure

After acclimatization, mice were randomly divided into seven groups, as follows: Group A (n = 6): Basal group - no induction of inflammatory process and nontreatment; Group B (n = 6): Negative control - induction of inflammatory process and nontreatment; Group C (n = 6): Positive control drug - induction of inflammatory process and treatment with dexamethasone 0.1 mg/ear; Group D (n = 6): induction of inflammatory process and treatment with MFAq 0.1 mg/ear; Group E (n = 6): induction of inflammatory process and treatment with MFAq 0.5

mg/ear; Group F (n = 6): induction of inflammatory process and treatment with MFAq 1.0 mg/ear. Group G (n = 6): Vehicle - no induction of inflammatory process and treatment with acetone P.A.

The vehicle group was studied to verify possible inflammatory changes caused by the solvent used. The average weight of the vehicle group was used to calculate the exact weight of the other groups (Δ ears weight = ears weight of different groups - ears weight of vehicle group). Possible alterations in the ears due to the use of this solvent were also observed in the histological analysis.

Croton oil single application-induced ear edema test

The croton oil assay was carried out by the method described by Schiantarelli *et al.* [41] The animals received topical treatment with MFAq (0.1, 0.5, and 1.0 mg/ear) or the positive control, dexamethasone (0.1 mg/ear). The negative control received only the phlogistic agent (croton oil 2.5% (v/v) solution) and in the vehicle group was only administrated acetone. The basal group did not receive any treatment. Four hours after the topical applications, the animals were euthanized and 10 mm diameter ear punch biopsies were collected and subjected to ear edema measurement.

Phenol-induced ear edema test

The phenol-induced ear edema assay was used to irritate the mice's ears and to simulate contact. [42] Each mouse was immobilized by hands and, then, 20 μ L of phenol 10% (v/v) solution in acetone, prepared before use, were topically applied, similarly to croton oil assay. One hour after the topical applications of phenol, the animals were euthanized and 10 mm diameter ear punch biopsies were subjected to ear edema measurement.

Histological processing

Histological analysis was performed for the ear edema assay with croton oil. Samples were fixed in 10% buffered formalin, transversely cleaved, and then processed. In sequence, they were dehydrated in ethyl alcohol baths, diaphonized in xylene, embedded in paraffin blocks, and cut at five μ m. The sections were stained with hematoxylin and eosin (HE) or blue toluidine.

Morphometric measurements and mast cell counting analysis in croton oil induced ear edema test.

Morphometric measurements and mast cell count were performed in the tissue affected by the croton oil after staining with HE and toluidine blue, respectively. Morphometric and quantitative analyzes of digital images (Axiocam 105 color camera and Carl Zeiss microscope) were performed using the IMAGE J[®] software. Each animal had three different regions of the ear measured (base, middle, and tip) and these values were used to calculate the mean ear thicknesses (final value). Mast cells were quantified in the different ear regions for each animal and the sum of the three regions was used as the final amount.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed, for *in vitro* assays, by ANOVA followed by Bonferroni and, for *in vivo* assays; ANOVA was performed and followed by Newman-Keuls. All analyzes were done using the GraphPrism 5.0 software (*Erithacus Software Ltda*). In some cases, the Student's *t*-test was applied. Values of $P < 0.05$ were considered significant. Results were expressed as mean \pm standard deviation.

Results

Content of phenols and flavonoids

Phytochemical analyzes showed total phenolic and flavonoids content of 84.19 ± 2.10 mg TAE/g extract and 81.66 ± 4.45 mg RE/g extract, respectively.

Chemical profile of MFAq by UFLC-QTOF-MS

According to the chromatographic profile analysis obtained by *UFLC-QTOF-MS*, 10 compounds were identified through a comparison of their mass fragmentation with those of literature (Table 1).

Table 1 MS data in (+) ESI mode and the identification results for the bioactive compounds in aqueous extract of *Mitracarpus frigidus* aerial parts by *UFLC-QTOF-MS*.

Substances	Main MS fragmentation ions	Retention time (min.)	References
Sucrose	707.2186 [2M+Na] ⁺ ; 381.0784 [M+K] ⁺ ; 219.00 [M+K-hexose] ⁺ ; 203.0515 [M+Na-hexose] ⁺	1.1	Amorim et al. [43]
Chlorogenic acid	355.1003 [M+H] ⁺ ; 163.0413 [M+H-quinic acid] ⁺	1.3	Lin et al. [44]
Harounoside	556.2012 [M+NH ₄] ⁺ ; 539.4821 [M+H] ⁺ , 377.3419 [M+H- glucose] ⁺ , 215.1943 [M+H- glucose] ⁺ , 187.1825 [M+H-glucose-glucose- CO] ⁺	1.4	Audoin et al. [45]
Clarinoside	540.2078 [M+NH ₄] ⁺ ; 523.1801 [M+H] ⁺ ; 361.1276 [M+H-glucose] ⁺ ; 215.0697 [M+H- glucose-rhamnose] ⁺	1.7	Audoin et al. [45]
Quercetin-pentosylrhamnosylhexoside	743.2055 [M+H] ⁺ ; 611.1626 [M+H-pentose] ⁺ ; 465.1021 [M+H-pentose-rhamnose] ⁺ ; 303.0497 [M+H-pentose-rhamnose-hexose] ⁺	2.8	Barros et al. [46]
Quercetin- pentosylhexoside	597.1433 [M+H] ⁺ ; 465.1013 [M+H- pentose] ⁺ ; 303.0486 [M+H- pentose-hexose] ⁺	3.1	Lin et al. [47]
Rutin	611.1599 [M+H] ⁺ ; 465.1016 [M+H-rhamnose] ⁺ ; 303.0486 [M+H-rhamnose-glucose] ⁺	4.0	Rey et al. [48]
Kaempferol-3O-rutinoside	595.1686 [M+H]; 449.1101 [M+H-rhamnose] ⁺ ; 287.0567 [M+H-rhamnose-glucose] ⁺	4.9	Jang et al. [49]
Kaempferol-rhamnosylhexoside	595.1685 [M+H] ⁺ ; 449.1101 [M+H-rhamnose] ⁺ ; 287.0572 [M+H-rhamnose-hexose] ⁺	5.3	Guimarães et al. [50]
2-Azaanthraquinone	441.2447 [2M+Na] ⁺ ; 210.0535 [M+H] ⁺	8.8	Gbaguidi [51]; Okunade et al. [52]

Antioxidant activity

The antioxidant capacity of MFAq was assessed using DPPH, phosphomolibdenum, and β -carotene/linoleic acid assays. The results are shown in Table 2 and Figure 1. MFAq demonstrated significant antioxidant potential in all tests performed. For the DPPH radical scavenging activity, MFAq showed an IC₅₀ of 6.19 \pm 0.98 μ g/mL, while rutin presented an IC₅₀ of 2.27 \pm 0.36 μ g/mL (Table 2).

MFAq showed no statistical difference when compared with rutin (RAA% of 96.21 \pm 8.91, $P > 0.05$), but in relation to quercetin, MFAq was less active (RAA% 37.00 \pm 3.42, $P < 0.05$) by phosphomolybdenum assay (Table 2).

MFAq was also evaluated by the β -carotene/linoleic acid system assay, in which the percentage of inhibition, its antioxidant efficiency (F1 and F2), and the decay curve for linoleic acid oxidation were calculated (Table 2 and Figure 1). MFAq showed a similar inhibition percentage of linoleic acid oxidation, F1 and F2 values, and preservation of β -carotene/linoleic acid system coloration at 470 nm for over 120 min compared to rutin ($P > 0.05$, Table 2 and Fig. 1).

Table 2 - Antioxidant activity of aqueous extract of *Mitracarpus frigidus* aerial parts (MFAq) by DPPH, total antioxidant capacity by phosphomolybdenum (TAC) and inhibition of the β -carotene/linoleic acid system assays.

Samples	DPPH IC ₅₀ (μ g/ml)	TAC (% RAA)		β -Carotene / linoleic acid system		
		Rutin	Quercetin	Inhibition (%)	F1	F2
Rutin	2.27 \pm 0.36	-	-	51.58 \pm 2.33	0.51 \pm 0.09	0.81 \pm 0.07
MFAq	6.19 \pm 0.98 ^a	96.21 \pm 8.91	37.00 \pm 3.42	57.29 \pm 3.59	0.58 \pm 0.05	1.21 \pm 0.24 ^a

DPPH, 2, 2-diphenyl-1-(2,4,6-trinitrophenyl) hydrazyl. IC₅₀, inhibitory concentration of 50%. % RAA, relative antioxidant activity percentage. F1, relation between the tangent values of the sample and negative control between 15 and 45 min. F2, relation between the sample values and the negative control between 75 and 90 min. ^aStatistical difference between MFAq and rutin. Results expressed as mean \pm standard deviation of three independent experiments. Statistical analysis performed with Student's t test.

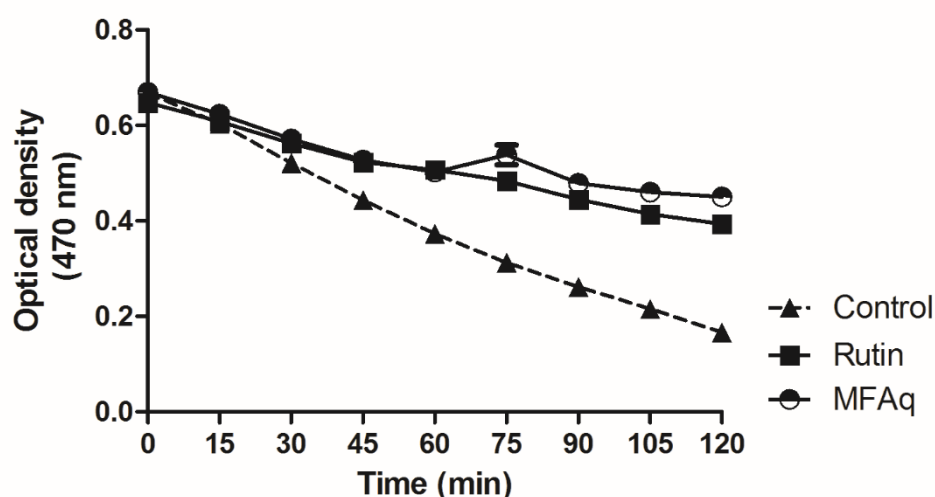


Figure 1 Oxidation curve of β -carotene, with absorbance evaluated at 470 nm, demonstrating the preservation of its coloration during the 120 minutes of reaction when MFAq and the positive control rutin were used as treatment. Results were expressed as mean \pm standard deviation of three independent experiments. MFAq - Aqueous extract from *M. frigidus* aerial parts. Control - Negative control. RUT - Rutin.

Cell viability alterations and cell cycle damage

In the MTT assay, J774A.1 cells treated with MFAq had no viability reduction ($P > 0.05$) in any concentration (Figure 2A). Furthermore, MFAq no induces alteration in the membrane permeability of the macrophage cell line, using propidium iodide (PI) staining (82.7 ± 1.9 and 88.1 ± 3.4 % of viable cells after treatment with 200 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectively) (Figure 2B) and also no showed alterations in replicative capacity and/or damage to macrophage DNA (Sub G1/G0; G1/G0; S and G2/M cell cycle phases) after treatment with concentrations of 200 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ when stained with HFS (Figure 2C).

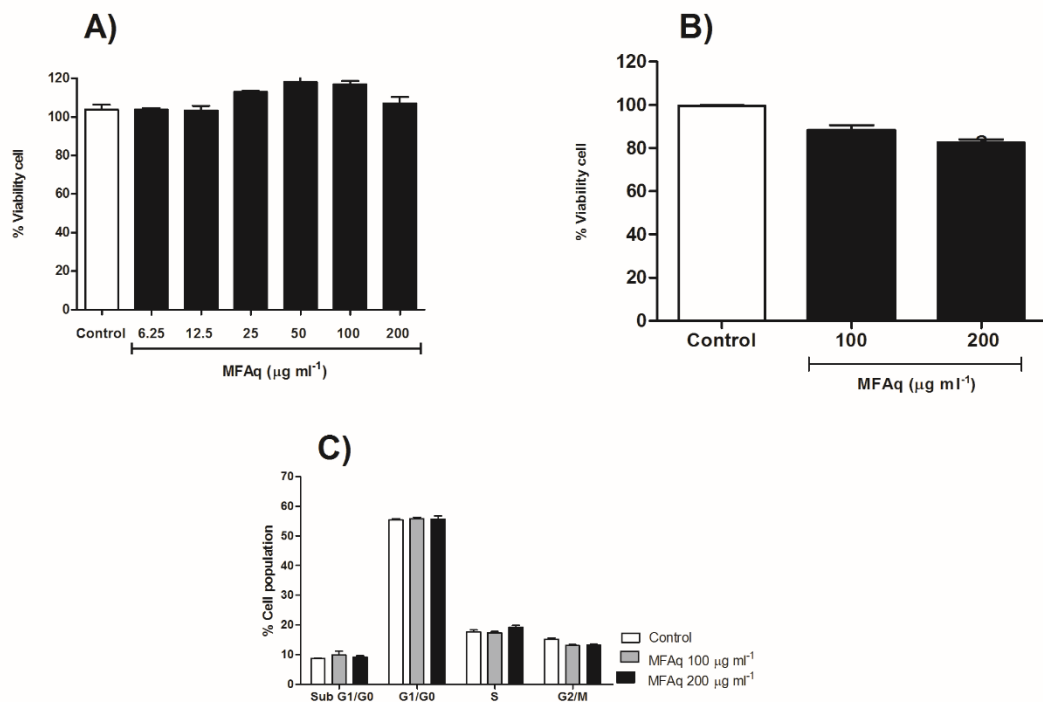


Figure 2 Evaluation of cell viability and cell cycle analysis in J774A.1 macrophage cell line treated with aqueous extract from *M. frigidus* aerial parts (MFAq). A) MTT method; B) % of cells without alterations in plasma membrane permeability when treated with concentrations of 200 and 100 µg/mL of MFAq using PI staining; C) Cell cycle analysis using HFS staining of concentrations of 200 and 100 µg/mL. Control - Negative control. ^aStatistical difference when compared to control ($P < 0.05$). Results were expressed as mean \pm standard deviation of three independent experiments. One way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test.

In vitro anti-inflammatory activity

MFAq reduced NO levels in all tested concentrations ($P < 0.05$) (Figure 3). The concentrations of 200 and 100 µg/mL inhibited 78.13 ± 1.42 and 70.9 ± 0.98 % of NO production, respectively. No statistical differences between 200, 100, and 50 µg/mL and between 25, 12.5, and 6.25 µg/mL were observed ($P > 0.05$). Moreover, 200 µg/mL was statistically similar to the basal group ($P > 0.05$)

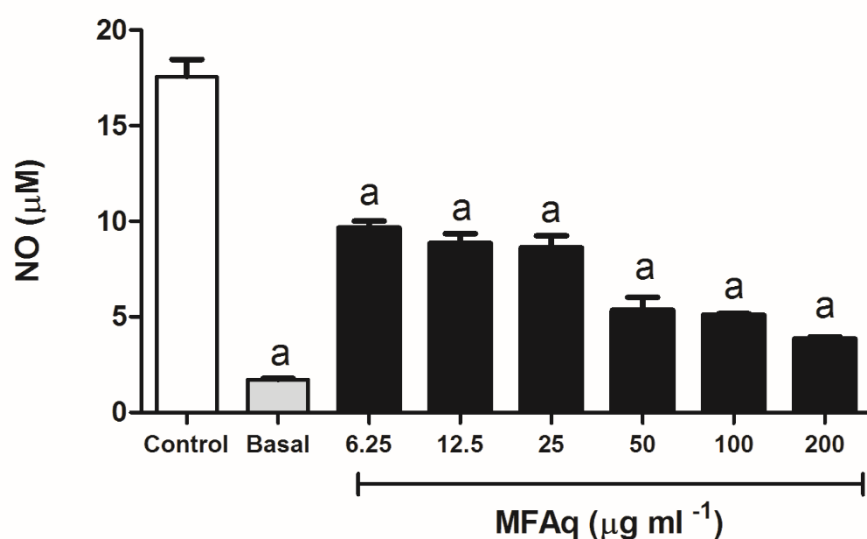


Figure 3 Anti-inflammatory activity of the aqueous extract from *M. frigidus* aerial parts (MFAq) by the nitric oxide method. ^aStatistical difference when compared to control ($P < 0.05$). Control - Negative control. Basal - Cells without treatment and no stimulation with LPS. Results were expressed as mean \pm standard deviation of three independent experiments. One Way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test.

In vivo anti-inflammatory activity

The treatment with MFAq showed a decrease in ears weight differences (Δ ears weight) for all concentrations ($P < 0.05$) in both tests (Figure 4A and Figure 4B), suggesting a promising effect of MFAq in acute inflammation treatment. No statistical differences were observed between MFAq, basal, and dexamethasone groups in both assays. Moreover, we also did not observe statistical differences between the MFAq concentrations (0.1; 0.5 and 1.0 mg/ear).

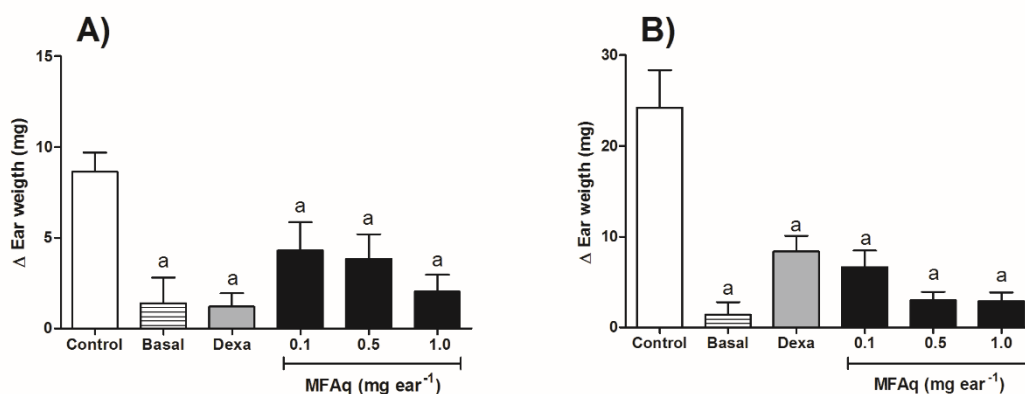


Figure 4 *In vivo* anti-inflammatory activity of the aqueous extract from *M. frigidus* aerial parts (MFAq) at 0.1 mg, 0.5 mg and 1 mg/ear. A) Croton oil assay; B) Phenol assay. *Statistical difference when compared to the animals treated with croton oil/ Phenol (Control) ($P < 0.05$). Results were expressed as mean \pm standard deviation for the two independent experiments. One way ANOVA followed by Newman-Keuls post-hoc test.

Morphometric analysis and mast cell count

MFAq and dexamethasone groups showed a decrease of ear edema by croton oil assay (Figure 5). Additionally, MFAq reduced the ear thickness in all concentrations when compared to the negative control ($P < 0.05$). The ears treated with 0.1 and 0.5 mg/ear were statistically similar to the basal, positive control, and vehicle groups ($P > 0.05$). The 1.0 mg/ear concentration showed less ability to reduce the ear thickness when compared to the other groups ($P < 0.05$) (Figure 6A).

A reduction in the number of mast cells for all MFAq groups ($P < 0.05$) was also observed (Figure 6B). No statistical differences were observed between different concentrations of MFAq, basal, dexamethasone, and vehicle groups ($P > 0.05$).

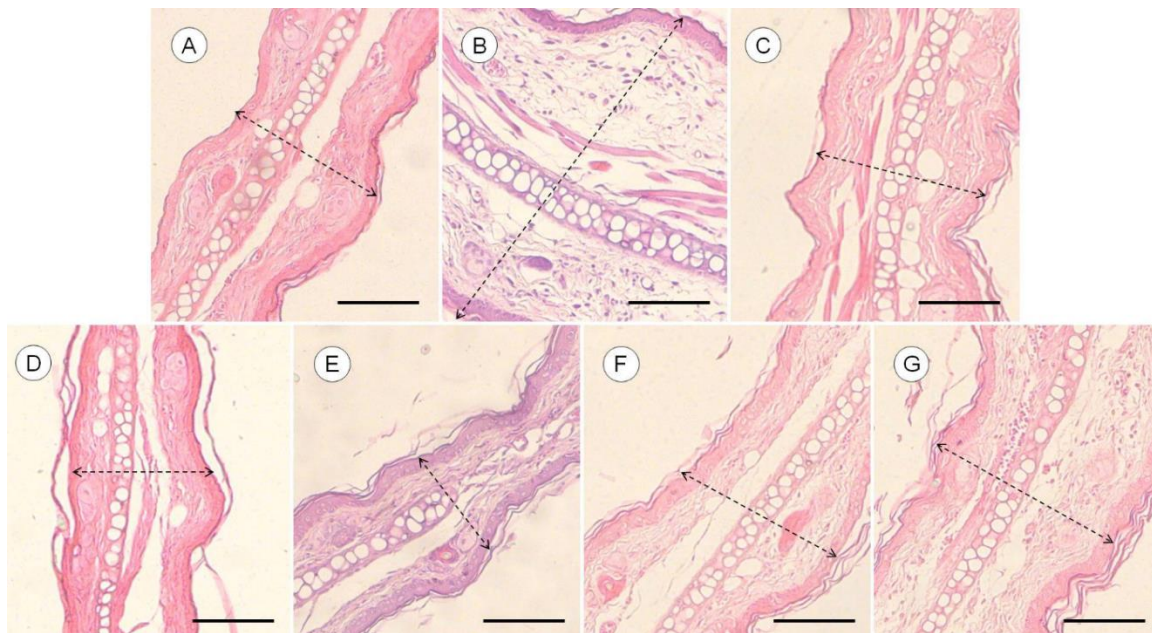


Figure 5 Representative photomicrographs of transverse sections of mice ear biopsies (100x magnification; hematoxylin and eosin staining). A) Basal group; B) Negative control (Control); C)

Positive control (Dexamethasone); D) Vehicle; E) MFAq at 0.1 mg/ear; F) MFAq at 0.5 mg/ear; G) MFAq at 1.0 mg/ear. MFAq - Aqueous extract from *M. frigidus* aerial parts.

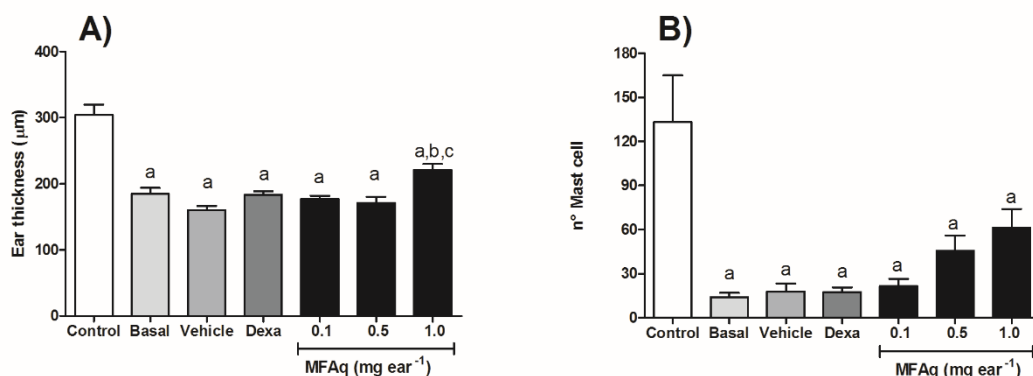


Figure 6 Morphometric analysis and mast cell count for different doses of aqueous extract from *M. frigidus* aerial parts (MFAq) in croton oil assay. A) Morphometric analysis; B) Mast cell count. ^aStatistical difference when compared to control ($P < 0.05$). ^bStatistical difference between the MFAq at 1.0 mg/ear when compared with basal, vehicle and positive control (Dexa) groups. ^cStatistical difference between the 1.0 mg/ear when compared with 0.1 and 0.5 mg/ear of MFAq. Dexa - Dexamethasone. Results were expressed as mean \pm standard deviation of two independent experiments. One way ANOVA followed by Newman-Keuls post-hoc test.

Discussion

Oxidative stress is caused by an imbalance between the production and accumulation of oxygen reactive species (ROS) in cells and tissues and the ability of the organism to detoxify these reactive products. This excessive production of ROS occurs mainly by mitochondria during normal physiological conditions. However, in some pathological conditions, enzymes such as cyclooxygenases (COX), during the arachidonic acid metabolism, and inflammatory cells may contribute to the increase of these free radicals. ^[53] So, considering that the production of free radicals, including reactive oxygen species, are crucial inflammation mediators and can cause cell damage ^[54], different antioxidant tests were performed.

The DPPH assay is a method to measure the antioxidant capacity of compounds that can act as free radical scavengers or hydrogen donors. ^[55] Herein, MFAq showed promising results of inhibiting concentration of 50% DPPH ($IC_{50} = 6.19 \pm 0.98 \mu\text{g/mL}$). MFAq showed to be

more active than the methanolic extract of *M. frigidus* ($IC_{50} = 29.7 \pm 3.2 \mu\text{g/mL}$) performed by Fabri et al. [56]. This result is related to the use of water as the extraction solvent that favored a greater amount of antioxidant substances in MFAq. Phosphomolybdenum assay, in turn, measures the reduction degree of Mo (VI) to Mo (V), by the formation of a green phosphomolybdenum complex that absorbs in 695 nm. [57, 58] Our results showed a relevant activity for this assay, in which no statistical difference was observed between MFAq and rutin. This finding proved that this extract shows substances that can donate electrons and stabilize oxidized molecules, corroborating with the results from the DPPH assay.

The presence of free radicals due to pathological conditions increases the rate of lipid peroxidation, a cascade event that promotes the formation of other several free radicals. Aldehydes are one of the main by products from cascade reaction responsible for causing cellular damage, such as malondialdehyde, propanal, hexanal, and 4-hydroxynonenal. [59, 60] The principle of the β -carotene/linoleic test is the lipid peroxidation of linoleic acid, which will lead to the formation of radicals capable of degrading the chromophore group of β -carotene. [36] The results found by the inhibition of linoleic acid peroxidation were promising, considering MFAq similar to rutin. Thus, MFAq may prove to be a promising source of substances for the control of lipid peroxidation resulting from increased oxidative stress.

In addition, F1 and F2 values were used to evaluate the antioxidant action on the propagation stages, where there is the formation of hydroperoxides (F1 value), and the terminal, where there is the presence of aldehydes formed in the cascade of lipid peroxidation (F2 value). Specifically, the lower the value for these constants, the bigger will the antioxidant capacity be to act in one of these phases. [36] Therefore, F1 and F2 values showed that MFAq, as well as rutin, has a great capacity to block the formation of radicals produced in the first stages.

The cell viability of the J774A.1 cell was also evaluated by MTT and staining with PI using flow cytometry methods. As a standard reference for *in vitro* toxicity tests, we used the ISO 10993-5 [61], which considers cell viability above 70%, a feature of low toxicity compounds. Our results showed percentages of viability in acceptable standards, demonstrating that MFAq has no toxicity to J774A.1 cell lines by MTT assay. Moreover, no significant damage to the cell membrane was observed in 200 and 100 $\mu\text{g/mL}$ concentrations by PI staining.

Cell proliferation is vital to tissue morphogenesis and the loss of this control can lead to pathologies like cancer. Therefore, it is extremely important to investigate the cell proliferation capacity. [62] In this work, after proving the negligible toxicity of MFAq, we focused on

evaluating possible DNA damage and/or cell cycle interruption in J774A.1 cells treated with MFAq using flow cytometry to investigate the proportion of cells in each cycle phase. The results reinforced the safety of MFAq, since no change in the DNA content was observed in any of the phases of the cell cycle in treated cells as compared to cells without treatment.

Anti-inflammatory drugs are known worldwide for their effectiveness. However, they might cause a range of side effects, such as ulcers, anemia, osteoporosis, and endocrine disruption, which leads to the search for new therapeutic agents with fewer adverse effects. [3] The use of plants or plant-derived products has been an alternative strategy to treat several pathologies and disorders and can also present fewer side effects. [63] For this reason, the MFAq ability to reduce the production of NO was evaluated. NO is an important inflammatory mediator with increased concentration in inflammatory responses. [64] A promising decrease in free radical NO was observed in the *in vitro* assay. Thus, the inhibitory activity of MFAq is an advantageous therapeutic property for the control of inflammatory diseases.

The anti-inflammatory potential of MFAq was evaluated by *in vivo* anti-inflammatory tests using the ear edema model with croton oil and phenol as phlogistic agents. The croton oil presents constituents that stimulate the release of nuclear factor κ B (NF- κ B) and the activating protein-1 (AP-1), essential factors for the activation of inflammatory cytokines (IL-1 β , TNF- α , and IL-6), phospholipase-A2, (PLA2), platelet activating factor (PAF) and arachidonic acid (AA). The activation of these inflammatory pathways increases the vascular permeability, vasodilation, leukocyte emigration, release of histamine and serotonin, and eicosanoids synthesized by cyclooxygenase (COX) and 5-lipoxygenase (5-LOX) enzymes, which are typical events of the inflammatory process. [65] As for the phenol ear edema model, important chemical mediators are produced in primary contact, including, also inflammatory cytokines. Phenol promotes cutaneous irritation that leads to the rupture of the plasma membrane of keratinocytes through a direct effect, resulting in the release of IL-1 α , AA metabolites, and reactive oxygen species (ROS). [66]

The basophils and mast cells are important cells in the inflammatory process, which secrete histamine, a known inflammatory mediator. These vasoactive amines play an important role in inflammation, since they induce a rapid increase in vascular permeability, vasodilation, and leukocyte chemotaxis, thus increasing the edema and formation of leukocyte infiltrations in the affected tissue. [67] Our results demonstrate that MFAq was able to reduce the number of mast cells in the affected site for croton oil and, consequently, the edematous process.

Therefore, the studies conducted in this work demonstrated the potential of MFAq as a therapeutic agent for the inflammatory process and also for the treatment of oxidative stress that can derive from this pathological state.

Phytochemical composition analysis of the *M. frigidus* aqueous extract demonstrated that 96.99% of the total content of phenolic compounds are flavonoids. Moreover, we identified the presence of chlorogenic acid, clarinoside, quercetin-hexosylpentoside, rutin, kaempferol-3*O*-rutinoside, kaempferol-rhamnosylhexoside, quercetin-pentosylrhamnosylhexoside, harounoside, 2-azaanthraquinone, and sucrose by *UFLC-QTOF-MS*. Flavonoids are excellent antioxidants due to their potential proton-donating capacity.^[68] The anti-inflammatory activity of these compounds can be evidenced by the neutralization of reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS, respectively) and by the inhibition of inflammatory enzymes.^[69, 9] Therefore, we can infer that the *M. frigidus* (MFAq) aqueous extract has significant biological activities due to its high phenolic composition and mainly flavonoids.

Conclusion

The chemical characterization of the aqueous extract from *Mitracarpus frigidus* aerial parts (MFAq), by *UFLC-QTOF-MS*, revealed the presence of phenolic compounds, flavonoids, alkaloids, quinones, and disaccharides. Promising results were observed for the treatment of inflammation and oxidative stress, and these activities are probably related to the flavonoids identified in MFAq. No toxicity and alterations in the cell cycle phases were observed on mammalian cells. This is the first report of bioactivities and chemical composition from *M. frigidus* aqueous extract, which demonstrates the therapeutic potential for the treatment of inflammation and oxidative stress.

Acknowledgments

The authors are grateful to Dr. Vinícius Antônio de Oliveira Dittrich from the Department of Botany/Federal University of Juiz de Fora for the botanical identification of the species.

Funding

This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

(Grant Numbers: APQ-01059-14 for RF). Scholarships were provided by Federal University of Juiz de Fora (UFJF/Brazil) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil).

Author contributions

R.L.F., E.S.C. provided the study design, study mentorship, and critical editing of the manuscript. A.L.P.F., J.V.G.S., and V.N.R. contributed to the study design. L.M.C., T.F.S., P.L.P., and J.T.G. performed experiments and acquired and analyzed the data. All authors contributed in part to writing and editing the manuscript and approved the final version.

Conflict of interest

The authors declare no competing financial interest.

References

1. Chen L, Deng H, Cui H *et al.* Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget* 2018; 9: 7204-7218. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23208>
2. Gallo J, Raska M, Kriegova E *et al.* Inflammation and its resolution and the musculoskeletal system. *J Orthop Translat* 2017; 10: 52-67. <https://doi.org/10.1016/j.jot.2017.05.007>
3. Khan H, Pervaiz A, Intagliata S *et al.* The analgesic potential of glycosides derived from medicinal plants. *DARU J Pharm Sci* 2020; 28: 387-401. <https://doi.org/10.1007/s40199-019-00319-7>
4. Hussain T, Tan B, Yin Y *et al.* Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? *Oxid Med Cell Longev* 2016; 1-9. <https://doi.org/10.1155/2016/7432797>
5. Tan BL, Norhaizan ME, Liew WPP *et al.* Antioxidant and Oxidative Stress: A Mutual Interplay in Age-Related Diseases. *Front Pharmacol* 2018; 9: 1-28. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01162>

6. Castaneda OA, Lee SC, Hoc CT *et al.* Macrophages in oxidative stress and models to evaluate the antioxidant function of dietary natural compounds. *J Food Drug Anal* 2017; 25: 111-118. <http://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.11.006>
7. Sharma JN, Al-omran A, Parvathy SS. Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacology* 2007; 15: 252–259. <http://doi.org/10.1007/s10787-007-0013-x>
8. Ling JJ, Sun YJ, Zhu DY *et al.* Potential Role of NO in Modulation of COX-2 Expression and PGE2 Production in Pancreatic β -cells. *Acta Biochim. Biophys Sin* 2005; 37: 139–146. <https://doi.org/10.1093/abbs/37.2.139>
9. Oguntibeju OO. Medicinal plants with anti-inflammatory activities from selected countries and regions of Africa. *J Inflamm Res* 2018; 11: 307–317. <http://doi.org/10.2147/JIR.S167789>
10. Valli M, Russo HM, Bolzani VS. The potential contribution of the natural products from Brazilian biodiversity to bioeconomy. *An Acad Bras Ciênc* 2018; 90: 763-778. <http://doi.org/10.1590/0001-3765201820170653>
11. Wurtzel ET, Kutchan TM. Plant metabolism, the diverse chemistry set of the future. *Science* 2016; 353: 1232–1236. <http://doi.org/10.1126/science.aad2062>
12. Bisignano G, Sanogo R, Marino A *et al.* Antimicrobial activity of *Mitracarpus scaber* extract and isolated constituents. *Lett Appl Microbiol* 2000; 30: 105–108. <http://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2000.00692.x>
13. Pereira ZV, Carvalho-Okano RM, Garcia FCP. **Rubiaceae Juss. da Reserva Florestal Mata de Paraíso, Viçosa, MG, Brasil.** *Acta Bot Bras* 2006; 20: 207-22. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062006000100020>
14. Souza EB, Fader AAC, Cabral EL *et al.* *Mitracarpus* in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Available at: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB14120>>. Accessed on: 21 Dec. 2021
15. Campos LM, Lemos ASO, Cruz LF *et al.* Development and in vivo evaluation of chitosan-gel containing *Mitracarpus frigidus* methanolic extract for vulvovaginal candidiasis treatment. *Biomed Pharmacother* 2020; 130: 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110609>

16. Fabri RL, Campos LM, Florêncio JR *et al.* *Mitracarpus frigidus* (Rubiaceae) inhibits inflammatory and oxidative stress mediators in *Salmonella* sp. mouse infection. *J Pharm Pharmacol* 2021; 73(1): 82-92. <http://doi.org/10.1093/jpp/rgaa001>
17. Campos LM, Lemos ASO, Silva TP *et al.* *Mitracarpus frigidus* is active against *Salmonella enterica* species including the biofilm form. *Ind Crop Prod* 2019; 141: 1-8. <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111793>
18. Fabri RL, Cunha PS, Campos LM *et al.* Potencial antimicrobiano, citotóxico e leishmanicida do extrato diclorometano das partes aéreas de *Mitracarpus frigidus* (Rubiaceae). *Rev Eletronica Farm* 2020; 17: 1-9. <https://doi.org/10.5216/ref.v17.5433>
19. Fabri RL, Aragão DMO, Florêncio JR *et al.* Chromatographic Fingerprint Analysis and Effects of the Medicinal Plant Species *Mitracarpus frigidus* on Adult *Schistosoma mansoni* Worms. *Biomed Res Int* 2014; 1-10. <https://doi.org/10.1155/2014/941318>
20. Lemos ASO, Florêncio JR, Pinto NCC *et al.* Antifungal Activity of the Natural Coumarin Scopoletin Against Planktonic Cells and Biofilms from a Multidrug-Resistant *Candida tropicalis* Strain. *Front Microbiol* 2020; 11: 1-11. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01525>
21. Fabri RL, Grazul RM, Carvalho LO *et al.* Antitumor, Antibiotic and Antileishmanial Properties of the Pyranonaphthoquinone Psychorubrin from *Mitracarpus frigidus*. *An Acad Bras Cienc* 2012a; 84: 1081-1089. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652012005000064>
22. Fabri RL, Garcia RA, Florêncio JR *et al.* Anti-inflammatory and antioxidative effects of the methanolic extract of the aerial parts of *Mitracarpus frigidus* in established animal models. *J Pharm Pharmacol* 2013; 66: 722–732. <http://doi.org/10.1111/jphp.12189>
23. Fabri RL, Aragão DMO, Florêncio JR *et al.* In-vivo laxative and toxicological evaluation and in-vitro antitumour effects of *Mitracarpus frigidus* aerial parts. *J Pharm Pharmacol* 2012b; 64: 439–448. <http://doi.org/10.1111/j.2042-7158.2011.01420.x>
24. Rashid N, Gbedomon RC, Ahmad M *et al.* Traditional knowledge on herbal drinks among indigenous communities in Azad Jammu and Kashmir, Pakistan. *J Ethnobiol Ethnomed* 2018; 14: 1-20. <https://doi.org/10.1186/s13002-018-0217-8>
25. Woo CSJ, Lau JSH, El-nezami A. Herbal Medicine: Toxicity and Recent Trends in Assessing Their Potential Toxic Effects. *Adv Bot Res* 2012; 62: 365-384. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394591-4.00009-X>

26. Wolfson A, Dlugy C, Shotland, Y. Glycerol as a green solvent for high product yields and selectivities. *Environ Chem Lett* 2007; 5: 67–71. <http://doi.org/10.1007/s10311-006-0080-z>
27. Alhakmani F, Kumar S, Khan SA. 2013. Estimation of total phenolic content, in-vitro antioxidant and anti-inflammatory activity of flowers of *Moringa oleifera*. *Asian Pac J Trop Biomed* 2013; 3: 623-627. [http://doi.org/10.1016/S2221-1691\(13\)60126-4](http://doi.org/10.1016/S2221-1691(13)60126-4)
28. Dowd LE. Spectrophotometric determination of quercetin. *Anal Chem* 1959; 31: 1184-1187. <https://doi.org/10.1021/ac60151a033>
29. Folin O, Ciocalteu V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *J Biol Chem* 1927; 73: 627-650. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)84277-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)84277-6)
30. Miliauskas G, Venskutonis PR, Van-beer TA. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and plant extracts. *Food Chem* 2004; 85: 231-237. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.05.007>
31. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebens Wiss Technol* 1995; 28: 25-30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
32. Prieto P, Pineda M, Aguilar M. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E. *Anal Biochem.* 1999; 269: 337-341. <http://doi.org/10.1006/abio.1999.4019>
33. Negri MLS, Possamai JC, Nakashima T. Atividade antioxidante das folhas de espinheira-santa- *Maytenus ilicifolia*. Ex Reiss., secas em diferentes temperaturas. *Braz J Pharmacogn* 2009; 19: 553-556. <http://doi.org/10.1590/S0102-695X2009000400007>
34. Zocoler AMD, Sanches ACC, Albrecht I *et al.* Antioxidant capacity of extracts and isolated compounds from *Stryphnodendron obovatum* Benth. *Braz J Pharm Sci* 2009; 45: 551-562. <http://doi.org/10.1590/S1984-82502009000300009>
35. Melo MSOM, Mancini Filho J. Antioxidantes naturais do fruto do dendezeiro (*Elaeis guineensis*, Jacq). *Rev Farm Bioquim* 1989; 25: 147-157.
36. Duarte-Almeida JM, Santos RJ, Genovese MI. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β caroteno/ácido linoleico e método de sequestro de radicais DPPH•. *Cienc Tecnol Aliment* 2006; 26: 446-452. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612006000200031>

37. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65: 55-63. [http://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](http://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
38. Crowley LC, Marfell BJ, Scott AP *et al.* Triggering apoptosis in hematopoietic cells with cytotoxic drugs. *Cold Spring Harb Protoc* 2016a; 635-638. <http://doi.org/10.1101/pdb.prot087130>
39. Riccardi C, Nicoletti I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat Protocol* 2006; 1: 1458-1461. <http://doi.org/10.1038/nprot.2006.238>
40. Sun J, Zhang X, Broderick M *et al.* Measurement of Nitric Oxide Production in Biological Systems by Using Griess Reaction Assay. *Sensors* 2003; 3: 276-284. <http://doi.org/10.3390/s30800276>
41. Schiantarelli P, Cadel S, Acerbi D *et al.* Anti-inflammatory activity and Bioavailability of percutaneous piroxicam. *Drug Res* 1982; 32: 230–235.
42. Gábor M. Mouse Ear Inflammation Models and Their Pharmacological Applications. First ed Akadémiai Kiadó, Budapest 2000.
43. Amorim ACL, Hovell AMC, Pinto AC *et al.* Green and Roasted Arabica Coffees Differentiated by Ripeness, Process and Cup Quality via Electrospray Ionization Mass Spectrometry Fingerprinting. *Braz Chem Soc* 2009; 20: 313-321. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532009000200017>
44. Lin Y, Xu W, Huang M *et al.* Qualitative and Quantitative Analysis of Phenolic Acids, Flavonoids and Iridoid Glycosides in Yinhuo Kanggan Tablet by *UPLC-QqQ-MS/MS*. *Molecules* 2015; 20: 12209-12228. <http://doi.org/10.3390/molecules200712209>
45. Audoin C, Zampalégré A, Blanchet N *et al.* MS/MS-Guided Isolation of Clarinoside, a New Anti-Inflammatory Pentalogin Derivative. *Molecules* 2018; 23, 1-9. <http://doi.org/10.3390/molecules23051237>
46. Barros L, Pereira E, Calhella RC *et al.* Bioactivity and chemical characterization in hydrophilic and lipophilic compounds of *Chenopodium ambrosioides* L. *J Funct Foods* 2013; 5: 1732-1740. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.07.019>
47. Lin LZ, Harnly JM, Pastor-corrales MS *et al.* The polyphenolic profiles of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chem* 2008; 107: 399–410. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.038>

48. Rey BGD, Guimarães LL, Toledo MS *et al.* The antiulcer and antioxidant mechanisms of the butanolic fraction extract obtained from *Bauhinia forficata* leaves: A medicinal plant frequently used in Brazilian folk medicine. *J Med Plants Res* 2018; 12: 69-76. <https://doi.org/10.5897/JMPR2017.6554>
49. Jang GH, Kim HW, Lee MK *et al.* Characterization and quantification of flavonoid glycosides in the *Prunus* genus by UPLC-DAD-QTOF/MS. *Saudi J Biol Sci* 2018; 25: 1622–1631. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.08.001>
50. Guimarães R, Barros L, Dueñas M *et al.* Characterization of phenolic compounds in wild fruits from Northeastern Portugal. *Food Chem* 2013; 141, 3721-3730. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.071>
51. Gbaguidi F, Muccioli G, Accrombessi G. Densitometric HPTLC Quantification of 2-Azaanthraquinone Isolated from *Mitracarpus scaber* and Antimicrobial Activity against *Dermatophilus congolensis*. *JPC- J Planar Chromat* 2005; 18: 377-379. <https://doi.org/10.1556/jpc.18.2005.5.8>
52. Okunade AL, Ciark AM, Hufford, CD *et al.* Azaanthraquinone: An Antimicrobial Alkaloid from *Mitracarpus scaber*. *Planta Med* 1999; 65: 447-448. <http://doi.org/10.1055/s-2006-960807>.
53. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M *et al.* Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev* 2017; 1-13. <https://doi.org/10.1155/2017/8416763>
54. Conner EM, Grisham MB. Inflammation, Free Radicals, and Antioxidants. *Nutrition* 1996; 12: 274-277. [https://doi.org/10.1016/S0899-9007\(96\)00000-8](https://doi.org/10.1016/S0899-9007(96)00000-8)
55. Kedare SB, Singh RP. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol* 2011; 48: 412–422. <http://doi.org/10.1007/s13197-011-0251-1>.
56. Fabri RL, Nogueira MS, Braga FG *et al.* *Mitracarpus frigidus* aerial parts exhibited potent antimicrobial, antileishmanial, and antioxidant effects. *Bioresour Technol* 2009; 100: 428–433. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.05.053>
57. Mendes RF, Pinto NCC, Silva JM *et al.* The essential oil from the fruits of the Brazilian spice *Xylopiya sericea* A. St.-Hil. presents expressive *in-vitro* antibacterial and antioxidant activity. *J Pharma Pharmacol* 2017; 69: 341–348. <http://doi.org/10.1111/jphp.12698>
58. Phatak RS, Hendre AS. Total antioxidant capacity (TAC) of fresh leaves of *Kalanchoe pinnata*. *J Pharmacogn Phytochem* 2014; 2: 32-35.

59. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxid Med Cell Longev* 2014; 1-3. <http://doi.org/10.1155/2014/360438>.
60. Yadav UCS, Ramana KV. Regulation of NF- κ B-Induced Inflammatory Signaling by Lipid Peroxidation-Derived Aldehydes. *Oxid Med Cell Longev* 2013; 1-11. <http://doi.org/10.1155/2013/690545>
61. ISO 10993-5. Biological Evaluation of Medical Devices. Part 5: Tests for *In Vitro* Cytotoxicity. International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland 2009.
62. Cecchini MJ, Amiri M, Dick FA. Analysis of Cell Cycle Position in Mammalian Cells. *J Vis Exp* 2012; 1-7. <http://doi.org/10.3791/3491>
63. Mokhtari-zaer A, Norouzi F, Askari VR *et al.* The protective effect of *Nigella sativa* extract on lung inflammation and oxidative stress induced by lipopolysaccharide in rats. *J Ethnopharmacol* 2020; 253, 1-9. <http://doi.org/http://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112653>
64. Wallace JL. Nitric oxide as a regulator of inflammatory processes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100: 5-9. <http://doi.org/10.1590/s0074-02762005000900002>
65. Pinto NCC, Machado DC, Silva JM *et al.* *Pereskia aculeata* Miller leaves present in vivo topical anti-inflammatory activity in models of acute and chronic dermatitis. *J Ethnopharmacol* 2015; 173: 330–337. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.07.032>
66. Santos IJM, Leite GO, Costa JGM *et al.* Topical Anti-Inflammatory Activity of Oil from *Tropidurus hispidus* (Spix, 1825). *Evid-Based Complementary Altern Med* 2015; 1-7. <https://doi.org/10.1155/2015/140247>
67. Kimura LF, Prezotto-neto JP, Tavora BCLF. Mast cells and histamine play an important role in edema and leukocyte recruitment induced by *Potamotrygon motoro* stingray venom in mice. *Toxicon* 2015; 103: 65-73. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.06.006>.
68. Tanase C, Cosarca S, Muntean DL. A Critical Review of Phenolic Compounds Extracted from the Bark of Woody Vascular Plants and Their Potential Biological Activity. *Molecules* 2019; 24: 1-18. <http://doi.org/10.3390/molecules24061182>.

69. Bakasatae N, Kunworarath N, Yupanqui CT *et al.* Bioactive components, antioxidant, and anti-inflammatory activities of the wood of *Albizia myriophylla*. *Rev bras Farmacogn* 2018; 28: 444–450. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2018.05.010>.

11.3 ARTIGO 2



RODRIGO LUIZ FABRI <rodrigo.fabri@ufjf.br>

Para: Você



Qui, 20/10/2022 06:00

----- Forwarded message -----

De: **JPP Editorial Office** <JPPEditorialOffice@oup.com>

Date: qui, 20 de out de 2022 05:18

Subject: Re: Journal of Pharmacy and Pharmacology - JPP-22-0674

To: RODRIGO.FABRI@UFJF.EDU.BR <RODRIGO.FABRI@ufjf.edu.br>

Dear Dr Fabri,

We have received one report, but we are still waiting for a second reviewer to agree. I have now invited 24 reviewers and when I hear further, I will contact you.

Best regards,

Sylvia Hales
Editorial Office
Journal of Pharmacy & Pharmacology

***Mitracarpus frigidus* reduces lipid metabolism and PGE₂ levels in inflammatory cells**

Ari Sérgio de O. Lemos¹, Lara M. Campos¹, Juliana da T. Granato², Priscila V. Z. C. Goliatt³, Paula R.B. Dib⁴, Eugenio D. Hottz⁴, Laíris C. Campos⁵, Heloisa D. S. Bizarro⁵, Luciana M. Chedier⁶, Elaine S. Coimbra^{2*}, Rodrigo L. Fabri^{1*}

¹Bioactive Natural Products Laboratory, Department of Biochemistry, Biological Sciences Institute, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, CEP 36036-900, Brazil.

²Department of Parasitology, Microbiology, and Immunology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, CEP 36036-900, Brazil.

³Department of Computer Science, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brazil.

⁴Laboratory of Immunothrombosis, Departamento of Biochemistry, Institute of Biological Sciences, Federal University of Juiz de Fora, Minas Gerais CEP 36036-900, Brazil.

⁵Laboratory of Cellular Biology, Department of Biology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Juiz de Fora, Minas Gerais CEP 36036-900, Brazil.

⁶Plant Chemistry Laboratory, Department of Botany, Biological Sciences Institute, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, CEP 36036-900, Brazil.

*Corresponding authors: elaine.coimbra@ufjf.br (Elaine S. Coimbra) and rodrigo.fabri@ufjf.br (Rodrigo L. Fabri).

ABSTRACT

Objectives: The aim of this study was to evaluate the ability of aqueous extract of *Mitracarpus frigidus* (MFAq) to inhibit lipid bodies formation and inflammatory mediators production in macrophages stimulated with LPS and IFN- γ .

Methods: MFAq was chemically characterized by *UFLC-QTOF-MS*. The macrophages obtained from the peritoneal cavity of BALB/c mice were incubated with MFAq. Viability and membrane integrity were evaluated by MTT and PI assay, respectively. NO, TGF- β , PGE₂ levels, and lipid bodies quantification were performed in macrophages stimulated with LPS and IFN- γ and treated with MFAq. Molecular docking analysis on the COX-2 enzyme was also investigated.

Key findings Chlorogenic acid, clarinoside, harounoside, rutin, kaempferol-3*O*-rutinoside, and 2-azaanthraquinone were identified in MFAq. MFAq significantly inhibited nitric oxide and lipid bodies, did not affect membrane integrity of macrophages. MFAq-treated cells showed significantly lower levels of TGF- β and PGE₂. Molecular docking demonstrated that compounds found in MFAq are able to inhibit COX-2 by binding to important residues present in the catalytic site.

Conclusion: MFAq interferes with lipid metabolism in stimulated macrophages, leading to the reduction of important inflammatory mediators. Furthermore, MFAq can directly inhibit the enzyme COX-2 or inhibit its expression due to its ability to reduce NO production.

Keywords: *Mitracarpus frigidus*, Lipid metabolism, PGE₂, TGF- β , anti-inflammatory activity

Abbreviation list: COX-2- cyclooxygenase 2; LPS- lipopolysaccharide; LBs- lipid bodies; PGE₂- prostaglandin E₂; IFN- γ - interferon gama; PI- propidium iodide.

1. INTRODUCTION

The inflammation is a complex process, which includes a series of events that can be related to many chronic diseases including diabetes, cardiovascular disease, and cancer^[1]. The cyclooxygenase 2 (COX-2) is a key enzyme in this process and which can be activated in response to various stimuli, among them, lipopolysaccharide (LPS), interleukin-1 (IL-1), tumour necrosis factor (TNF), epidermal growth factor (EGF), platelet activating factor (PAF)

and arachidonic acid ^[2]. Lipid bodies (LBs), are dynamic organelles that are involved in lipid metabolism and inflammation too. The localization of COX-2 at LBs was already confirmed, demonstrating that these organelles cells are sources of eicosanoids synthesis ^[3].

There are highly effective drug class for inflammation treatment due to its action on COX-2, however, these drugs have multiple adverse effects ^[4]. Interest has arisen in the discovery of new anti-inflammatory therapies. Among the alternative therapy options, we can mention the use of natural products, since these, can present anti-inflammatory therapeutic effects and low side effects ^[5]. *Mitracarpus frigidus* (Willd. ex Roem. & Schult.) K. Schum. is a plant that has been studied by our research group and has stood out for its great therapeutic potential in the studies carried, such anti-inflammatory activity ^[6,7] as well as no toxicity in animal model ^[8]. Recently, Lemos *et al.* ^[6] reported the anti-inflammatory activity of the aqueous extract of *M. frigidus* (MFAq) and linked this activity to the compounds identified by *UFLC-QTOF-MS*. However, no study has ever reported the mechanism of action of *M. frigidus* in relation to lipid metabolism and in the production of prostaglandin E₂ (PGE₂) in macrophages. Thus, the aim of this work was to evaluate whether MFAq can interfere with the synthesis of lipid and inflammatory mediators associated with lipid metabolism.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Plant Material

M. frigidus aerial parts were collected in Juiz de Fora, MG state, Brazil, in May, 2009 according to the license number A032F41-23 SISGEN/BRAZIL. A voucher specimen (CESJ 46076) was deposited at the CESJ Herbarium.

2.2. Preparation of the Aqueous Extract of M. frigidus Aerial parts (MFAq)

The aqueous extract of *M. frigidus* aerial parts (MFAq) was prepared following the methodology of Lemos *et al.* ^[6].

2.3. Chemical Profile of MFAq by UFLC-QTOF-MS

MFAq was chemically characterized by *UFLC-QTOF-MS* according the methodology of Lemos *et al.* ^[6].

2.4. Animal Procurement

Male BALB/c mice of 30 days old, weighing 20–25 g, were obtained from the Reproduction Biology Center of the Federal University of Juiz de Fora. This study was carried out in strict accordance with the recommendations in the Ethical Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health. The protocol was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the Federal University of Juiz de Fora on 10 May 2018 (Protocol Number: 07/2018-CEUA).

2.5. Cytotoxicity on mammalian cells

The macrophages at 2×10^5 cells/well obtained from the peritoneal cavity of BALB/c mice (After 72h of inoculation with 2% thioglycolate) were transferred to 96-well microplates and cultured on RPMI medium for 24h. After this time, the cells were treated with MFAq at concentrations of 18.75 to 300.00 $\mu\text{g/mL}$. For the negative control, cells were treated only with 0.06% DMSO (vehicle). The cells were incubated for 48 h for at 37°C and 5% CO_2 atmosphere. Cytotoxicity was assessed by cell viability using the 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay [9]. Absorbance was read at 570 nm. The experiment was performed in triplicate.

2.6. Evaluation of anti-inflammatory activity

2.6.1 NO dosage

NO production was evaluated by the Griess method (an indirect NO measurement by nitrite dosing) as described by Sun *et al.* [10]. Nitrite production was determined in the culture supernatants of macrophages after incubated for 48 h in the presence of MFAq (18.75 - 300.00 $\mu\text{g/mL}$) and stimulated with LPS at 1 $\mu\text{g/mL}$ and IFN- γ at 1 ng/mL. The cells were incubated for 48 h at 37°C and 5% CO_2 atmosphere. The spectrophotometric measurement was performed at 540 nm and the experiment was performed in triplicate (n=3).

2.6.2 Evaluation of plasma membrane integrity of macrophages after treatment with MFAq

To assess whether treatment with MFAq alters the integrity of the cell membrane, macrophages obtained from the peritoneal cavity of BALB/c mice (2×10^5 cells per well) were incubated in the absence and presence of the extract (300.00 $\mu\text{g/mL}$) for 48 h at 37°C and 5% CO_2 . This time elapsed, the cells were washed with PBS (phosphate buffered saline, PH = 7.4)

and staining with PI (propidium iodide, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (1 µg/mL) during 15 min at the room temperature, in the dark. The intensity of fluorescence was measured by spectrofluorimeter (FLx800) at 540/600 nm of excitation and emission, respectively. Data were obtained from at the three independent experiments performed in duplicates ^[11].

2.6.3 Evaluation of the accumulation of lipid bodies (LBs) in macrophages stimulated with LPS and IFN-γ

The accumulation of LBs was performed in peritoneal macrophages of BALB/c mice, in the presence of MFAq (300.00 µg/mL) stimulated with LPS and IFN-γ. After this step, the cells were stained with the Nile Red (9-diethylamino-5Hbenzo[α] phenoxazine-5-one). The protocol was established according to Godinho *et al* ^[12], with some modifications. Macrophages were plated at a concentration of 2 x 10⁵ cells per well and stimulated for 48 h at 37°C and 5% CO₂. Cells were washed with PBS and stained with 200 µL of Nile Red (10 µg/mL) in PBS for 20 min at 25 °C. The reading was performed in a spectrofluorimeter (FLx800), at wavelengths of 540/600 nm of excitation and emission, respectively.

2.6.4 Quantification of TGF-β levels

Macrophages obtained from the peritoneal cavity of BALB/c mice were cultured and stimulated with LPS+ IFN-γ in the presence of MFAq (300.0 µg/mL). After 48 h post-stimulation the supernatants were harvested and the concentrations of TGF-β were quantified using standard commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) according to the manufacturer's instructions (R&D systems).

2.6.5 Quantification of PGE₂ levels

The dosage of prostaglandin E₂ (PGE₂) produced by peritoneal macrophages stimulated and treated with MFAq (300.00 µg/mL) was performed in the supernatant of the cultures by the Enzyme Immunoassay (EIA) following the manufacturer's guidelines (Cayman Chemical, USA).

2.7. In silico analysis

2.7.1 Molecular modeling

Molecular modeling of the cyclooxygenase 2 enzyme followed the methodology De Assis *et al.* [13] and Lemos *et al.* [14] with adaptations. For the molecular modeling study, a model of COX-2 from the *Mus musculus* organism was constructed, using the sequence: Uniprot ID = Q05769 and 3NT1 template as the base structure. Then, the quality of the models was analyzed using the Ramachandran graph generated by the PROCHECK[®] and MOLPROBITY[®] programs.

2.7.2. Molecular docking studies

The molecular docking analyzes were performed for compounds already identified in MFAq [6] and followed the methodology described by Lemos *et al.* [14]. The most promising structure was selected based on energy parameters and interactions formed between COX-2 and ligands. Ki values (Affinity constant given in μM) were calculated for the best poses based on the binding energy generated by the Auto Dock Vina[®].

2.7. Statistical analysis

Statistical analysis was performed by the ANOVA test followed by Bonferroni pos hoc test using the software GraphPrism 5.0. In some cases, the Student's *t* test was applied. Values of $P < 0.05$ were considered significant. Results were expressed as mean \pm standard deviation.

3. RESULTS AND DISCUSSION

As a standard reference for *in vitro* toxicity tests, we used the ISO 10993-5 2009 [15]. The results demonstrated that MFAq has low toxicity for the cells tested, since no statistical difference was observed in all tested concentration (Figure 1A). We also investigated whether MFAq can reduce NO levels, a free radical that is related to the activation and expression of COX-2, by using an indirect [16]. The results showed a significant reduction of nitrite production in all concentrations evaluated ($P < 0.05$) (Figure 1B), suggesting that MFAq can reduce the production of this free radical. In addition, a dose response effect was observed for the concentrations of 300.00; 150.00 and, 75.00 $\mu\text{g/mL}$. Before performing the quantification of LBs in macrophages treated with MFAq (300.00 $\mu\text{g/mL}$), the membrane integrity of these cells were evaluated using PI. In cells that have lost membrane integrity, PI can enter and intercalate to DNA and it emits fluorescence, while cells with intact membranes are impermeable to PI and

do not fluoresce [17]. The results observed in PI staining (Figure 2A) reveal that the higher concentration of MFAq did not lead to loss of membrane integrity in macrophages ($P > 0.05$), corroborating the MTT data where no loss of viability was observed.

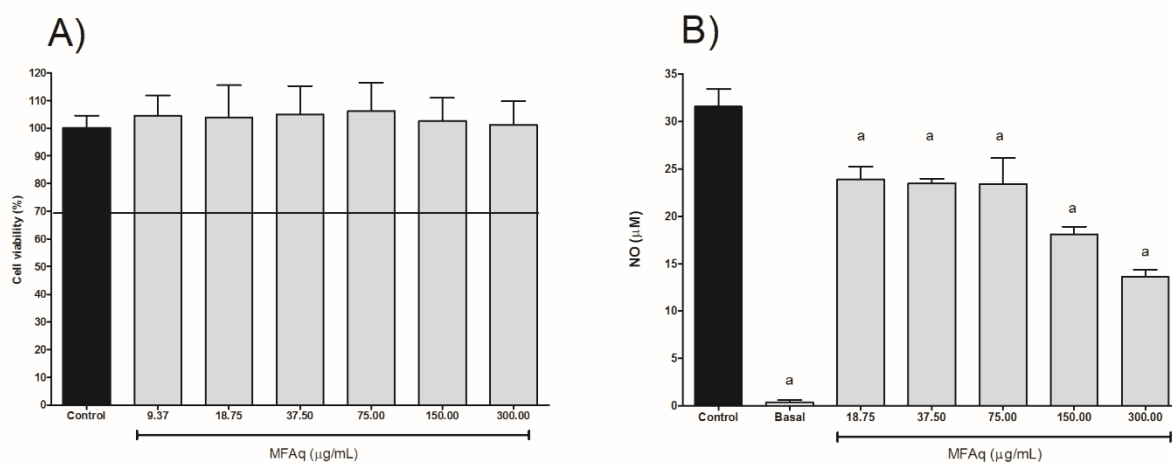


Figure 1- A) Evaluation of cell viability in macrophages obtained from BALB/c mice treated with aqueous extract from *M. frigidus* aerial parts (MFAq) by MTT assay. B) Evaluation of nitric oxide (NO) production in macrophages obtained from BALB/c mice stimulated with LPS at 1 µg/mL and IFN- γ at 1 ng/mL and treated with MFAq. ^aStatistical difference when compared to control ($P < 0.05$). Results were expressed as mean \pm standard deviation of three independent experiments. One-way ANOVA followed Bonferroni post-hoc test.

LBs are composed of an outer monolayer of phospholipids and possess a neutral lipid-rich core with variable protein composition [18]. LPS in dose-dependent induced significant increase of LB numbers and levels of leukotriene B₄ (LTB₄) and PGE₂ in leukocytes isolated from the mice pleural cavity. In this work, an increase in the formation of LBs in macrophages stimulated with LPS and IFN- γ was observed, corroborating with the literature data [19]. The results demonstrated that the cells treated with MFAq showed a decreased of LBs formation, when stained with Nile Red and compared to the control ($P < 0.05$) (Figure 2B).

The production of PGE₂ related to the biosynthetic pathway of LBs was evaluated, since these organelles are associated with the production of this inflammatory mediator [5]. Besides, the quantification of TGF- β , a cytokine involved in the formation of LBs [20], was performed and our results demonstrated a decrease in the production of TGF- β and PGE₂ ($P < 0.05$) in

treated cells (Figure 2C and 2D), reinforcing the hypothesis that MFAq can interfere in the production of LBs.

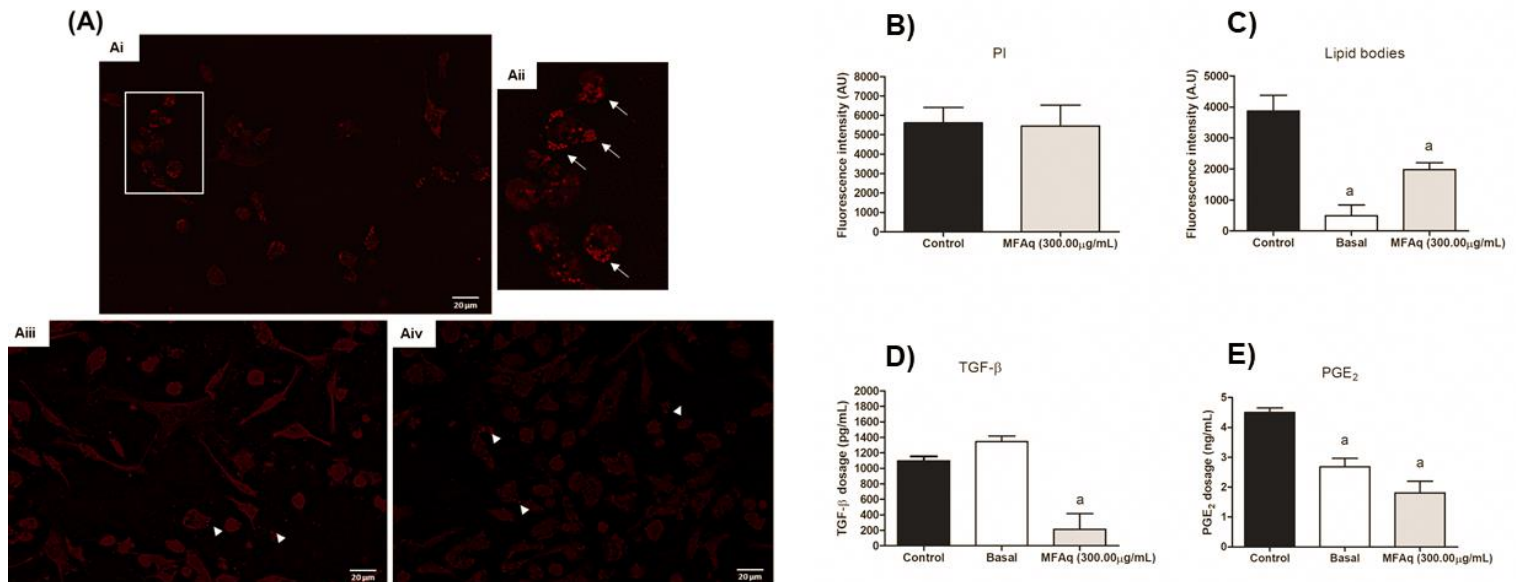


Figure 2- Anti-inflammatory activity of the aqueous extract from *M. frigidus* aerial parts (MFAq). A) Illustrative microphotographs of macrophages stained with Nile red. (Ai) Macrophages obtained from BALB/c mice and stimulated with LPS at 1 μ g/mL and IFN- γ at 1 ng/mL (control). (Aiii) macrophages without stimulation (basal). (Aiv) stimulated macrophages and MFAq-treated at 300.0 μ g/mL. Note in highlight (Aii) an increase in lipid bodies (LB) (arrows). In (Aiii) and (Aiv) showed a decrease of LB (arrowheads). B) Evaluation of plasma membrane integrity using PI. C) Quantification of lipid bodies using Nile Red. D) Dosage of TGF- β levels. E) Dosage of PGE₂ levels. ^aStatistical difference when compared to control ($P < 0.05$). Control - Cells stimulated with LPS and IFN- γ . Basal - Cells without stimulation. Results were expressed as mean \pm standard deviation of three independent experiments. One way ANOVA followed One-way ANOVA followed Bonferroni post-hoc test.

The chemical *UFLC-QTOF-MS* showed the presence of chlorogenic acid, clarinoside, harounoside, rutin, kaempferol-3*O*-rutinoside, and 2-azaanthraquinone. After the chemical characterization, we performed a molecular docking analysis to investigate the possible mechanism of action of the compounds found in MFAq on COX-2, in order to understand which substances would be the best inhibitors for this enzyme. The enzymatic COX-2 reaction requires a hydroperoxide, which is obtained through the oxidation of the heme group at the

peroxidase site by nitric oxide [17]. The heme group is then oxidized, oxidizes the Tyr residue 385 and this one in turn, removes the hydrogen atom on carbon 13 of the arachidonic acid (AA). The amino acid Arg 120 also plays a very important role in this catalysis, as it serves as an AA “anchor” at the active site. After the initiation of the cyclooxygenase reaction, peroxidase site reduces the 15-hydroperoxy of prostaglandin G₂ (PGG₂) that was formed at the catalytic site due to the catalysis of AA to prostaglandin H₂ (PGH₂). The PGH₂ is used in other reactions to produce PGE₂ [21].

The results of molecular docking (Table 1) showed that rutin and chlorogenic acid were the substances with the greatest potential for inhibit COX-2 by hydrogen bonding with active site residues responsible for arachidonic acid binding (Tyr 355, Arg 120) or that participate directly in the catalytic mechanism through electron transfer for heme group (Tyr 385) [21]. Rutin showed His 90 interaction, an amino acid that has showed interaction with SC-58 (selective inhibitor for COX-2) *in silico* study [22].

Table 1- Molecular docking of substances identified in the aqueous extract from *M. frigidus* aerial parts (MFAq) for COX-2 enzyme.

Compound*	Energy (Kcal/mol)	Ki values (μM)	Residues interaction
2-Azaantraquinone	-6.9	8.75	Tyr 355
Clorogenic acid	-7.7	2.26	Arg 120, Tyr 355 and Tyr 385
Clarinoside	-2.6	12421.47	Arg 120 and Tyr 355
Harounoside	-3.1	5341.55	Arg 120 and Tyr 355
Kaempferol-3O- rutinoside	-4.3	704.78	His 90, Arg 120 and Tyr 355
Rutin	-7.1	6.24	His 90, Arg 120 and Tyr 355

Tyr, Tyrosine; Arg, Arginine, His, Histidine; Ki, inhibition constant. * Compounds identified in MFAq by Lemos *et al.* [8].

4. CONCLUSION

MFAq showed low toxicity and can reduce the lipid metabolism in macrophages stimulated with IFN- γ and LPS without leading the loss of membrane integrity. Regarding of anti-inflammatory activities, it can be observed that the decrease in TGF- β and PGE₂ corroborates with the results found for LBs. Furthermore, it was possible to observe that the compounds present in MFAq can reduce the levels of NO. Consequently, it reflects the decrease of the enzymatic activity/expression of COX-2, or the direct interaction with amino acid residues of the catalytic site of this enzyme.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

R.L.F. and E.S.C. provided the study design, study mentorship and critical editing of the manuscript. L.M.C., P.V.Z.C.G., E.D.H, and H.D.S.B contributed to the study design. A.S.O.L., L.M.C., J.T.G., P. R.B.D., and L.C.C. performed experiments, acquired, and analyzed the data. All authors contributed in part to writing and editing the manuscript and approved the final version.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Dr. Vinícius Antônio de Oliveira Dittrich from the Department of Botany/Federal University of Juiz de Fora for the botanical identification of the species.

FUNDING

This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Grant Numbers: APQ-01059-14 and APQ-01357-21 for Rodrigo L. Fabri). Scholarships were provided by Federal University of Juiz de Fora (UFJF/Brazil) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no competing financial interest.

DATA AVAILABILITY

All the data from this work is available in the paper. The authorization for use of the plant species is registered in SISGEN/ Brazil - A032F41.

REFERENCES

1. Zhong J, Shi G. Editorial: Regulation of Inflammation in Chronic Disease. *Front Immunol* 2019; 10: 737. doi: 10.3389/fimmu.2019.00737.
2. Gandhi J *et al.* Role of Modulator of Inflammation Cyclooxygenase-2 in Gammaherpesvirus Mediated Tumorigenesis. *Front Microbiol* 2017; 8: 1-12. doi: 10.3389/fmicb.2017.00538.
3. Accioly MT *et al.* Lipid bodies are reservoirs of cyclooxygenase-2 and sites of prostaglandin-E2 synthesis in colon cancer cells. *Cancer Res* 2008; 68: 1732-40. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-1999.
4. Wongrakpanich S *et al.* A Comprehensive Review of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug Use in The Elderly. *Aging Dis* 2018; 9: 143-150. doi: 10.14336/AD.2017.0306.
5. Oguntibeju O. Medicinal plants with anti-inflammatory activities from selected countries and regions of Africa. *J Inflamm Res* 2018; 11: 307–317. doi: 10.2147/JIR.S167789
6. Lemos ASO *et al.* Pharmacological investigation of antioxidant and anti-inflammatory activities of aqueous extract from *Mitracarpus frigidus* (Rubiaceae). *J Pharm Pharmacol* 2022; 74: 750-76. doi.org/10.1093/jpp/rgac005.
7. Fabri RL *et al.* Anti-inflammatory and antioxidative effects of the methanolic extract of the aerial parts of *Mitracarpus frigidus* in established animal models. *J Pharm Pharmacol* 2013; 66: 722–732. doi: 10.1111/jphp.12189. Epub 2013 Dec 18.
8. Fabri RL *et al.* In-vivo laxative and toxicological evaluation and in-vitro antitumour effects of *Mitracarpus frigidus* aerial parts. *J. Pharm. Pharmacol* 2012b; 64: 439–448. doi: 10.1111/j.2042-7158.2011.01420.x.
9. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol. Methods.* **1983**, 65: 55-63.

10. Sun J *et al.* ‘Measurement of Nitric Oxide Production in Biological Systems by Using Griess Reaction Assay’, *Sensors* 2003, 3: 276-284. <https://doi.org/10.3390/s30800276>.
11. Granato JT *et al.* Novel steroid derivatives: synthesis, antileishmanial activity, mechanism of action, and *in silico* physicochemical and pharmacokinetics studies. *Biomed Pharmacother* 2018, 106: 1082–1090. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.056>.
12. Basselin M, Robert-Gero M. Alterations in membrane fluidity, lipid metabolism, mitochondrial activity, and lipophosphoglycan expression in pentamidine-resistant *Leishmania*. *Parasitol Res* 1998; 84: 78-83. doi: 10.1007/s004360050361.
13. De Assis PM *et al.* *In silico*, *in vitro* and *in vivo* studies indicate resveratrol analogue as a potential alternative for neuroinflammatory disorders. *Life Sci* 2020; 249: 1-14. doi: 10.1016/j.lfs.2020.117538.
14. Lemos ASO *et al.* Avaliação da atividade anti-inflamatória *in silico* dos flavonoides de *Lantana camara* L. frente à enzima ciclooxigenase-2. *Biofar: Revista de Biologia e Farmácia* 2021; 17: 930-949. ISSN 1983-4209.
15. ISO 10993-5. Biological Evaluation of Medical Devices. Part 5: Tests for *In Vitro* Cytotoxicity. International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland. 2009.
16. Fang L *et al.* Nitric Oxide and cGMP Induce COX-2 Expression and PGE₂ Production in Human Granulosa Cells Through CREB Signaling Pathway. *J Clin Endocrinol Metab* 2015; 100: 262–269.
17. Silveira MG *et al.* Flow Cytometric Assessment of Membrane Integrity of Ethanol-Stressed *Oenococcus oeni* Cells. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68: 6087–6093.
18. Bozza PT *et al.* Leukocyte lipid bodies regulation and function: Contribution to allergy and host defense. *Pharmacol Ther* 2007; 113: 30–49. doi: 10.1016/j.pharmthera.2006.06.006.
19. Pacheco P *et al.* Lipopolysaccharide-Induced Leukocyte Lipid Body Formation In Vivo: Innate Immunity Elicited Intracellular Loci Involved in Eicosanoid Metabolism. *J Immunol* 2002; 169: 6498-6506. doi: 10.4049/jimmunol.169.11.6498.
20. D'avila H *et al.* Host cell lipid bodies triggered by *Trypanosoma cruzi* infection and enhanced by the uptake of apoptotic cells are associated with prostaglandin E (2)

generation and increased parasite growth. *J Infect Dis* 2011; 204: 951–961. doi: 10.1093/infdis/jir432.

21. Rouzer CA, Marnett LJ. Cyclooxygenases: structural and functional insights. *J Lipid Res* 2009; 29-34. doi: 10.1194/jlr.R800042-JLR200.
22. Levita J *et al.* Discovering COX-2 Inhibitors from Flavonoids and Diterpenoids. *J Appl Pharm Sci* 2017; 7: 103-110. DOI: 10.7324/JAPS.2017.70716.

12. ANEXOS

12.1 ANEXO I – Parecer CEUA



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

CERTIFICADO

A COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 08/05/2018, analisou o protocolo nº 009/2018 intitulado "Manutenção da infectividade das cepas de *leishmania sp* através de passagens em camundongos BALB/c", projeto de pesquisa sob a responsabilidade de Elaine Soares Coimbra e colaboração de Ayla das Chagas Almeida e Juliana da Trindade Granato a ser realizado no período de 01/01/2019 a 31/12/2021. Por estar de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovado pela CEUA. Serão utilizados 24 fêmeas de Camundongo isogênico BALB/c de 4-6 semanas, projeto a ser realizado no biotério Localizado no Centro de Biologia da Reprodução(CBR) no Campus da Universidade Federal de Juiz de Fora. O prazo de validade desse certificado é equivalente a vigência do projeto prorrogável por mais um ano, desde que seja enviada justificativa a CEUA durante a vigência do projeto de acordo com orientação técnica do CONCEA.

CERTIFICATE

We certify that the protocol no. 009/2018 - CEUA about "Manutenção da infectividade das cepas de *leishmania sp* através de passagens em camundongos BALB/c" under responsibility of Elaine Soares Coimbra and collaboration of Ayla das Chagas Almeida and Juliana da Trindade Granato is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian Council for Control of Animal Experimentation (Concea) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL HANDLING (CEUA) in 08/05/2018. For the development of this research 24 mice of lineage BALB/C (24 females) of 4-6 week old, will be delivered as requested in the period period of 01/01/2019 to 12/31/2021. The Project will be performed at Biology Reproduction Center located at Federal University of Juiz de Fora. The term of validity of this certificate might be extended for one more year by means of justification during the period of vality.

Juiz de Fora, 09 de Maio de 2018.



Vice-coordenadora
CEUA



Coordenadora
CEUA

12.2 ANEXO II – Parecer CEUA



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA**

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº. 007/2018 – CEUA sobre "Avaliação da citotoxicidade *in vitro* de compostos sintéticos ou naturais em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, referentes aos lotes 2019,2020 e 2021", projeto de pesquisa sob a responsabilidade de Elaine Soares Coimbra a colaboração de Ayla das Chagas Almeida e Juliana da Trindade Granato, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF em reunião realizada em 03/04/2018. Para o desenvolvimento da pesquisa serão utilizados 108 fêmeas sendo Camundongo isogênico BALB/c de 4-6 semanas, projeto a ser realizado no biotério localizado no Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, da Universidade Federal de Juiz de Fora, conforme solicitado e que serão utilizados no período 01/01/2019 a 31/12/2021. O prazo de validade desse certificado é equivalente a vigência do projeto prorrogável por mais um ano, desde que seja enviado justificativa a CEUA durante a vigência do projeto.

CERTIFICATE

We certify that protocol no. 007/2018 - CEUA on "Evaluation of the *in vitro* cytotoxicity of synthetic or natural compounds in peritoneal macrophages of BALB / c mice, for lots 2019,2020 and 2021", research project under the responsibility of Elaine Soares Coimbra Ayle collaboration of Chagas Almeida and Juliana da Trindade Granato, is in accordance with the Ethical Principles on Animal Experimentation, adopted by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was approved by the ANIMAL ETHICS COMMISSION (CEUA) of PRÓ- REITORIA DE PESQUISA / UFJF at a meeting held on 04/03/2018. For the development of the research, 108 females will be used, being a BALB / c isogenic mouse of 4-6 weeks, a project to be carried out in the laboratory located at the Institute of Biological Sciences Department of Parasitology, Microbiology and Immunology, Federal University of Juiz de Fora, according to and will be used in the period 01/01/2019 to 12/31/2021. The term of validity of this certificate is equivalent to the validity of the project extendable for another year, provided that justification is sent to CEUA during the validity of the project.

Juiz de Fora, 04 de abril de 2018.

Vice-coordenadora
CEUA

Coordenadora
CEUA

12.3 ANEXO III – Parecer CEUA



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA**

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº. 008/2018 – CEUA sobre “Avaliação da atividade antileishmanial *in vitro* de compostos sintéticos ou naturais em macrófagos infectados com *Leishmania sp.*, referentes aos lotes 2019, 2020 e 2021”, projeto de pesquisa sob a responsabilidade de Elaine Soares Coimbra a colaboração de Ayla das Chagas Almeida e Juliana da Trindade Granato, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF em reunião realizada em 03/04/2018. Para o desenvolvimento da pesquisa serão utilizados 432 fêmeas sendo Camundongo isogênico BALB/c de 4-6 semanas, projeto a ser realizado no biotério localizado no Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora, conforme solicitado e que serão utilizados no período 01/01/2019 a 31/12/2021. O prazo de validade desse certificado é equivalente a vigência do projeto prorrogável por mais um ano, desde que seja enviada justificativa a CEUA durante a vigência do projeto.

CERTIFICATE

We certify that protocol no. 008/2018 – CEUA on “Evaluation of the *in vitro* antileishmania activity of synthetic or natural compounds in *Leishmania sp* infected macrophages referring to lots 2019, 2020 and 2021”, research project under the responsibility of Elaine Soares Coimbra, the collaboration of Ayla Chagas Almeida and Juliana da Trindade Granato, is in accordance with the Ethical Principles on Animal Experimentation, adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was approved by the PRE-RECTORIAL ANIMAL ETHICS COMMISSION (CEUA) OF RESEARCH / UFJF at a meeting held on 04/03/2018. For the development of the research will be used 432 females being isogenic mouse BALB / c of 4-6 weeks, a project to be carried out in the bioterium located at the Reproductive Biology Center of the Federal University of Juiz de Fora, as requested and that will be used in the period 01/01/2019 to 12/31/2021. The term of validity of this certificate is equivalent to the validity of the project extendable for another year provided that justification is sent to CEUA during the validity of the project.

Juiz de Fora, 04 de abril de 2018.

P: 

Vice-coordenadora
CEUA



Coordenadora
CEUA

12.4 ANEXO IV – Parecer Consubstanciado do CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação do efeito de compostos sintéticos e naturais com potencial atividade antileishmanial em eritrócitos humanos.

Pesquisador: ELAINE SOARES COIMBRA

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 23779719.1.0000.5147

Instituição Proponente: Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia/UFJF

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.697.188

Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo Informações Básicas da Pesquisa. Será realizado um estudo experimental in vitro buscando determinar o efeito citotóxico de compostos sintéticos e naturais em eritrócitos humanos. Este trabalho está inserido dentro do projeto que visa a descoberta de novos compostos sintéticos e naturais com ação antileishmanial, o qual objetiva a busca não apenas de compostos que matem o parasito causador das leishmanioses, mas que também não sejam tóxicos para o homem.

Assim, apenas os compostos que mostrarem atividade antileishmanial promissora é que serão avaliados quanto à toxicidade em eritrócitos humanos. Os eritrócitos serão submetidos ao teste de hemólise buscando selecionar compostos com baixa toxicidade hemolítica permitindo, desta maneira, a continuidade dos estudos para posteriores ensaios em animais de laboratório. O sangue do doador será utilizado exclusivamente para avaliar a toxicidade dos compostos testadas e não será avaliado, ou colhido, ou medido, nenhum tipo de dado do sangue coletado, nem haverá nenhum tipo de seguimento dos indivíduos doadores, pois

não é objetivo do projeto. Os indivíduos serão apenas doadores do sangue. Apresentação do projeto está clara, detalhada de forma objetiva, descreve as bases científicas que justificam o estudo, estando de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12 de 2012, item III.

Endereço: JOSE LOURENCO KELMER S/N
Bairro: SAO PEDRO **CEP:** 36.036-900
UF: MG **Município:** JUIZ DE FORA
Telefone: (32)2102-3788 **Fax:** (32)1102-3788 **E-mail:** cep.propesq@ufjf.edu.br