



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

ANDRESA GRACIUTTI BOTAN

**CITOTOXICIDADE E AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA *in vitro* DOS
EXTRATOS GLICÓLICOS DE *Morus nigra* (AMORA), *Ziziphus
joazeiro* (JUÁ) E *Vitis vinifera* (UVA)**

2018

ANDRESA GRACIUTTI BOTAN

CITOTOXICIDADE E AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA *in vitro* DOS EXTRATOS GLICÓLICOS DE *Morus nigra* (AMORA), *Ziziphus joazeiro* (JUÁ) E *Vitis vinifera* (UVA)

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área de Microbiologia / Imunologia.

Orientadora: Profa. Adj. Luciane Dias de Oliveira
Coorientadora: Profa. Dra. Graziella Nuernberg Back Brito

São José dos Campos
2018

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2018]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Botan, Andresa Graciutti

Citotoxicidade e ação anti-inflamatória in vitro dos extratos glicólicos de *Morus nigra* (amora), *Ziziphus joazeiro* (juá) e *Vitis vinifera* (uva) / Andresa Graciutti Botan. - São José dos Campos : [s.n.], 2018. 36 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2018.

Orientadora: Luciane Dias de Oliveira

Coorientadora: Graziella Nuernberg Back Brito

1. *Morus nigra*. 2. *Ziziphus joazeiro*. 3. *Vitis vinifera*. 4. Citotoxicidade. 5. Inflamação. I. Oliveira, Luciane Dias de , orient. II. Brito, Graziella Nuernberg Back, coorient. III. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. V. Universidade Estadual Paulista (Unesp). VI. Título.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Adj. Luciane Dias de Oliveira (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Adj. Juliana Campos Junqueira

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Dr. Jonatas Rafael de Oliveira

São José dos Campos, 03 de maio de 2018.

AGRADECIMENTOS

Na poesia da vida e no brilho de cada momento

Nestes singelos versos

Venho prestar meus alegres agradecimentos

A Deus, a Nossa Senhora e ao Santo Anjo

Pela proteção, iluminação, confiança e coragem

Aos meus pais e familiares

Pelo amor, carinho, apoio e por sempre me incentivarem

As orientadoras e professores

Por todas as essenciais e valiosas orientações e conselhos

As amigas, amigos e colegas

Por compartilharem as diversas descobertas e momentos

A UNESP e ao Programa de Pós Graduação

Por abrirem portas ao conhecimento, tecnologia e inovação

A CAPES pela concessão de Bolsa de Mestrado

no período de 12/2016 a 04/2018

Aos funcionários e secretários

Que desde o bom dia na portaria, organização do ambiente

Auxílio em equipamentos, materiais, papeladas e livros

Estavam sempre presentes

No mundo da busca por respostas

Aprendi que a ciência é uma mistura incrível

De conhecimento, sabedoria, paciência, amor e dedicação!

Obrigada a TODOS por me ajudarem a tornar este sonho realidade!

SUMÁRIO

RESUMO	5
ABSTRACT	6
1 INTRODUÇÃO	7
2 PROPOSIÇÃO	10
2.1 Objetivo geral.....	10
2.2 Objetivos específicos.....	10
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1 Extratos vegetais	11
3.2 Cultura celular.....	11
3.3 Avaliação da citotoxicidade – Teste de MTT	11
3.4 Avaliação da atividade anti-inflamatória dos extratos	13
3.4.1 Quantificação de citocinas – Teste imunoenzimático (ELISA)	14
3.4.2 Produção de óxido nítrico – Reação de Griess.....	15
3.5 Análise estatística	15
4 RESULTADOS	16
4.1 Avaliação da citotoxicidade – Teste de MTT	16
4.2 Avaliação da atividade anti-inflamatória dos extratos	19
4.2.1 Determinação de concentrações.....	19
4.2.2 Quantificação de citocinas – Teste imunoenzimático (ELISA)	20
4.2.3 Produção de óxido nítrico – Reação de Griess.....	22
5 DISCUSSÃO	24
6 CONCLUSÃO	28
REFERÊNCIAS	29
ANEXOS	34

Botan AG. Citotoxicidade e ação anti-inflamatória *in vitro* dos extratos glicólicos de *Morus nigra* (amora), *Ziziphus joazeiro* (juá) e *Vitis vinifera* (uva) [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2018.

RESUMO

As plantas medicinais e seus extratos têm sido utilizados na medicina tradicional para fins terapêuticos e como uma atrativa fonte de pesquisa em diversas vertentes científicas, dentre elas, a atividade anti-inflamatória. O objetivo deste estudo foi analisar a citotoxicidade e ação anti-inflamatória *in vitro* dos extratos glicólicos das plantas medicinais *Morus nigra* (amora), *Ziziphus joazeiro* (juá) e *Vitis vinifera* (uva) em macrófagos de camundongo RAW 264.7. A citotoxicidade dos extratos foi analisada pelo teste de viabilidade celular MTT em dois períodos de tratamento, 5 min e 24 h. A ação anti-inflamatória dos extratos foi avaliada em macrófagos RAW 264.7 estimulados pelo lipopolissacarídeo (LPS) por meio da quantificação das citocinas pró-inflamatórias fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6) pelo teste imunoenzimático (ELISA), e da quantificação do óxido nítrico pela reação de Griess. Os valores obtidos foram submetidos à análise estatística ANOVA ou Kruskal-Wallis com comparação múltipla de Tukey ou Dunn, com nível de significância de 5%. Concentrações não citotóxicas foram observadas após exposição por 5 min e 24 h, respectivamente, para os extratos de *M. nigra* (≤ 50 mg/mL e $\leq 1,56$ mg/mL), *Z. joazeiro* ($\leq 6,25$ mg/mL e $\leq 3,12$ mg/mL) e *V. vinifera* (≤ 25 mg/mL e $\leq 3,12$ mg/mL). Em relação à resposta anti-inflamatória, 0,78 e 1,56 mg/mL do extrato de *M. nigra* e 3,12 mg/mL de *V. vinifera* apresentaram inibição significativa na produção da citocina TNF- α , e o extrato de *Z. joazeiro* suprimiu de modo significativo a expressão da citocina TNF- α (3,12 mg/mL) e do óxido nítrico (1,56 e 3,12 mg/mL). O presente trabalho demonstrou que os extratos glicólicos de *M. nigra*, *Z. joazeiro* e *V. vinifera* apresentaram concentrações não citotóxicas em ambos os tempos de tratamento e exerceram efeito anti-inflamatório em macrófagos de camundongo RAW 264.7.

Palavras-chave: *Morus nigra*. *Ziziphus joazeiro*. *Vitis vinifera*. Citotoxicidade. Inflamação.

Botan AG. Cytotoxicity and anti-inflammatory action in vitro of the glycolic extracts of Morus nigra (black mulberry), Ziziphus joazeiro (juá) and Vitis vinifera (grape) [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2018.

ABSTRACT

Medicinal plants and their extracts have been used in traditional medicine for therapeutic purposes and as a source of research in several scientific aspects, e.g. the anti-inflammatory activity. This study aimed to analyze the in vitro cytotoxicity and anti-inflammatory action of the glycolic extracts of the medicinal plants Morus nigra (black mulberry), Ziziphus joazeiro (juá) and Vitis vinifera (grape) in mouse macrophages cells RAW 264.7. The cytotoxicity of the extracts was analyzed by MTT cell viability assay in two periods, 5 min and 24 h. The anti-inflammatory action of the extracts was evaluated in lipopolysaccharide (LPS) stimulated RAW 264.7 cells by quantifying the pro-inflammatory cytokines tumor necrosis factor (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and nitric oxide by Griess reagent. The values obtained were submitted to statistical tests ANOVA or Kruskal-Wallis with post-test Tukey or Dunn multiple comparisons with the significance level of 5%. After exposure for 5 min and 24 h, respectively, non-cytotoxic concentrations were observed for M. nigra (≤ 50 mg/mL and ≤ 1.56 mg/mL), Z. joazeiro (≤ 6.25 mg/mL and ≤ 3.12 mg/mL) and V. vinifera (≤ 25 mg/mL and ≤ 3.12 mg/mL) extracts. Concerning the anti-inflammatory response, 0.78 and 1.56 mg/mL of M. nigra extract and 3.12 mg/mL of V. vinifera extract showed significant inhibition of TNF- α cytokine production. Z. joazeiro extract suppressed significantly the TNF- α cytokine (3.12 mg/mL) and the nitric oxide (1.56 and 3.12 mg/mL) expression. In conclusion, the glycolic extracts of M. nigra, Z. joazeiro, and V. vinifera presented non-cytotoxic concentrations in both treatment periods and showed an anti-inflammatory effect in RAW 264.7 cells.

Keywords: Morus nigra. Ziziphus joazeiro. Vitis vinifera. Cytotoxicity. Inflammation.

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais têm sido utilizadas na medicina tradicional para fins terapêuticos e como fonte de pesquisa de novos medicamentos para tratamento e prevenção de doenças (Alviano et al., 2008; Lima et al., 2017). Os extratos obtidos a partir destas plantas contém uma mistura complexa de diversos componentes que de maneira sinérgica podem contribuir na atividade biológica ou terapêutica (Azab et al., 2016). Diversos extratos vegetais são objetos de estudo em inúmeras pesquisas que avaliam ação antibacteriana (Al-Abd et al., 2015), antiviral (Moradi et al., 2017), antifúngica (Shirani et al., 2017), antidiabético (Rynjah et al., 2018), anti-hipertensiva (Hakkou et al., 2017), antioxidante (Lee et al., 2017), analgésica (Ismail et al., 2015), antipirética (Abotsi et al., 2017), anti-inflamatória (Ezzat et al., 2018), citotoxicidade (Oliveira JR et al., 2013), genotoxicidade (Boriollo et al., 2014), entre outras.

O teste de citotoxicidade *in vitro* utiliza cultura celular para avaliação, triagem ou abandono nos estágios iniciais da pesquisa ou desenvolvimento de um dispositivo médico ou substância, sendo considerado também um preditivo de toxicidade *in vivo* (International Standards Organization, 2009; Eljezi et al., 2017). Outro aspecto que pode ser analisado é a capacidade anti-inflamatória. A inflamação é uma resposta protetora que visa eliminar o agente agressor físico, químico ou biológico, porém, a expressão excessiva e prolongada dos processos celulares e dos mediadores inflamatórios pode causar danos e ser prejudicial para o organismo; sendo assim, a busca de compostos capazes de interferir nesses mecanismos de defesa prevenindo uma inflamação prolongada poderia ser útil para a saúde do indivíduo (Dell'agli et al., 2013; Pereira, 2013).

Na avaliação da ação anti-inflamatória dos extratos das plantas medicinais, a inibição da produção das citocinas inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF- α) e a interleucina-6 (IL-6) por exemplo, tornou-se uma importante área de investigação (Soromou et al., 2012). O lipopolissacarídeo (LPS) é um componente da parede celular de bactérias Gram-negativas capaz de estimular a resposta inflamatória em macrófagos e outros tipos celulares, acarretando na liberação de diversas citocinas, entre elas o TNF- α e a IL-6 (Soromou et al., 2012). Ambas citocinas desempenham um papel fundamental no processo inflamatório, o TNF- α

atua em leucócitos e no endotélio induzindo a inflamação aguda, podendo causar apoptose, coagulação, ativação de neutrófilos, febre, também pode induzir a liberação da citocina IL-6, esta por sua vez, atua no fígado estimulando a síntese de proteínas de fase aguda e na proliferação e diferenciação dos linfócitos T e B; entretanto, uma expressão elevada destas citocinas pode acarretar danos ao organismo, como trombose e choque séptico (Abbas et al., 2015).

Outro mediador inflamatório que pode ser avaliado é o óxido nítrico, atuante na resposta imunológica em diversas vertentes, com ação pró-inflamatória, promovendo aumento da permeabilidade vascular e vasodilatação; anti-inflamatória, atuando na inibição da agregação plaquetária; e também efeito microbicida nos fagócitos ativados, porém uma expressão exagerada pode causar danos as células do hospedeiro (Rang et al., 2011).

O estudo, obtenção e documentação das informações sobre espécies de plantas medicinais têm sido realizados pela maioria das populações mundiais (Brito et al., 2015). Nas últimas décadas, foram publicados vários artigos de pesquisa e revisões relacionados às atividades anti-inflamatórias de diversas plantas (Azab et al., 2016), como por exemplo, a *Morus nigra*, o *Ziziphus joazeiro* e a *Vitis vinifera*.

Morus nigra L. (Moraceae), conhecida popularmente como amora, é utilizada na medicina tradicional no tratamento da inflamação, sangramento, diabetes, colesterol, problemas cardiovasculares, obesidade, gota e inflamação dentária (Naderi et al., 2004; Oliveira AC et al., 2013; Santana et al., 2016). Pesquisas científicas relataram que o extrato de *M. nigra* apresentou ação antioxidante e protetora contra o dano peroxidativo às biomembranas e biomoléculas (Naderi et al., 2004) e demonstrou efeitos anti-inflamatórios em ratos (Padilha et al., 2010). Em relação a suas frações ou compostos, estudos demonstraram que os flavonóides totais presentes na *M. nigra* possuem propriedades anti-inflamatórias e efeitos analgésicos (Chen et al., 2016), e que determinados constituintes de *M. nigra* apresentaram ação antibacteriana (Mazimba et al., 2011).

Ziziphus joazeiro Mart. (Rhamnaceae), de nome popular juá ou juazeiro, é uma árvore nativa brasileira utilizada tradicionalmente na medicina popular em tratamentos de caspa, tônico de cabelo, reumatismo, problemas de estômago, indigestão, azia, gripe, febre, micoses superficiais, antisséptico, enxaguatório bucal e para limpeza de dentes (Cruz et al., 2007; Cartaxo et al., 2010; Leal et al., 2010).

Estudos experimentais avaliaram a genotoxicidade (Boriollo et al., 2014), ação antifúngica (Cruz et al., 2007), antibacteriana (Alviano et al., 2008; Leal et al., 2010), antioxidante (Silva et al., 2011) e anti-inflamatória (Estevam, 2012) do *Z. joazeiro*.

As sementes e as folhas de *Vitis vinifera* L. (Vitaceae) são utilizadas em fitoterapia e seus frutos são usados como um suplemento dietético (Kouidhi et al., 2015). Nassiri-Asl e Hosseinzadeh (2009) realizaram uma revisão de literatura sobre a *Vitis vinifera*, conhecida popularmente como videira e uva, e seus componentes bioativos, relatando ações antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobianas, cardioprotetoras, hepatoprotetoras e neuroprotetoras. Esatbeyoglu et al. (2016) sugerem que o extrato de raiz de *V. vinifera* possui atividades antioxidantes e anti-inflamatórias *in vitro*. No estudo de Hemmati et al. (2011), a administração tópica do extrato hidroalcoólico de sementes de uva (*V. vinifera*) apresentou boa atividade no processo de cicatrização de feridas em coelhos. Atividades antibacterianas e antioxidantes do extrato de sementes de uva (*V. vinifera*) são reportadas por Jayaprakasha et al. (2003). Rivero-Cruz et al. (2008) relataram que compostos isolados do extrato de uvas passas (*V. vinifera*) sem sementes contém fitoquímicos antimicrobianos capazes de suprimir patógenos orais associados a cáries ou doenças periodontais.

Diante dos relatos de uso na medicina tradicional e experimentos científicos descritos para *M. nigra*, *Z. joazeiro* e *V. vinifera*, torna-se interessante a avaliação da citotoxicidade e ação anti-inflamatória *in vitro* dos extratos glicólicos destas plantas medicinais, como um estudo inicial para encorajar novas pesquisas e formulações de produtos de ação terapêutica ou de higiene pessoal ou oral com estes extratos vegetais.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi analisar *in vitro* os efeitos citotóxicos e anti-inflamatórios dos extratos glicólicos de *Morus nigra* (amora), *Ziziphus joazeiro* (juá) e *Vitis vinifera* (uva) em macrófagos de camundongo RAW 264.7.

2.2 Objetivos específicos

- a) avaliar *in vitro* a ação dos extratos na viabilidade celular de macrófagos de camundongo RAW 264.7 por meio do teste de MTT;
- b) analisar *in vitro* a atividade anti-inflamatória dos extratos sobre as culturas celulares de macrófagos de camundongo RAW 264.7 estimuladas por lipopolissacarídeo (LPS) pelo teste imunoenzimático (ELISA), quantificando as citocinas pró-inflamatórias fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6), bem como a quantificação do óxido nítrico pela reação de Griess.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Extratos vegetais

Os extratos de *M. nigra*, *Z. joazeiro* e *V. vinifera* foram adquiridos comercialmente (Mapric, São Paulo – Brasil) na concentração de 200 mg/mL em propilenoglicol.

Segundo as especificações descritas nos certificados de análises (ANEXO A, B e C) da empresa fornecedora, o extrato de *M. nigra* provém do fruto, a amora; o extrato de *Z. joazeiro* foi obtido das cascas da árvore, raspa de juá; e para obtenção do extrato de *V. vinifera* foi utilizado o fruto, a uva.

3.2 Cultura celular

Os macrófagos de camundongo RAW 264.7, provenientes do Banco de Células do Rio de Janeiro - Associação Técnico Científica Paul Ehrlich (APABCAM, Rio de Janeiro, Brasil), foram cultivados em frasco de cultivo celular com meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco (DMEM - Sigma Aldrich Co.), suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de solução antibiótica penicilina-estreptomicina (DMEM-suplementado). Foram incubados em estufa a 37°C, sob atmosfera úmida de 5% de CO₂. O meio de cultura foi renovado a cada 48 h. As células foram cultivadas até atingirem 80% de subconfluência (ocupação do frasco), sendo removidas por varredura celular para subcultivo ou uso nos experimentos.

3.3 Avaliação da citotoxicidade – Teste de MTT

A avaliação da citotoxicidade foi realizada por meio do teste de MTT, um

ensaio colorimétrico baseado na capacidade da enzima desidrogenase mitocondrial ativa nas células vivas de reduzir o sal de MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide], um substrato amarelo, em cristais de formazan, de coloração violeta (Gomes et al., 2016; Souza et al., 2018).

Os macrófagos de camundongo RAW 264.7 foram removidos do frasco de cultivo celular, centrifugados por 5 min a 3000 rpm e resuspendidos. Em seguida ocorreu a contagem de células viáveis na Câmara de Neubauer.

Em microplacas de 96 poços foram adicionados 200 µL/poço do meio DMEM-suplementado contendo 4×10^4 células viáveis. Estas placas foram incubadas em estufa (37°C, com 5% de CO₂) por 24 h para aderência celular nos poços da microplaca. Após a incubação, o sobrenadante foi descartado.

Cada extrato foi analisado em uma microplaca diferente em dois tempos de tratamento distintos, 5 min e 24 h. O *n* foi igual a 8 para o grupo controle e grupo tratado em todas as concentrações avaliadas (200 mg/mL a 0,39 mg/mL).

A partir do extrato puro (200 mg/mL) foram realizadas as diluições seriadas dos extratos descritas no Quadro 1. As diluições foram realizadas com *Phosphate Buffer Saline* (PBS - Lonza) estéril, no tratamento de 5 min e com DMEM-suplementado na avaliação de 24 h.

Quadro 1 - Diluições seriadas dos extratos de *Morus nigra*, *Ziziphus joazeiro* e *Vitis vinifera*

Extrato puro (200 mg/mL)	Diluições seriadas dos extratos (mg/mL)								
<i>M. nigra</i>	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	0,39
<i>Z. joazeiro</i>	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	0,39
<i>V. vinifera</i>	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	0,39

Legenda: As diluições seriadas foram realizadas a partir do extrato puro (200 mg/mL).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Na análise do tempo de contato de 5 min, foi acrescentado 200 µL/poço do extrato puro (200 mg/mL) e das diluições seriadas (Quadro 1) no grupo tratado, e nos poços referentes ao grupo controle foi adicionado 200 µL/poço do PBS estéril. Na análise do tempo de contato de 24 h, foi acrescentado 200 µL/poço do meio DMEM-suplementado nos poços referentes ao grupo controle e 200 µL/poço das diluições seriadas (Quadro 1) no grupo tratado. Após o período de tratamento em avaliação (5 min ou 24 h), o conteúdo dos poços foi descartado, e os poços foram lavados duas vezes com PBS estéril para retirar as células não aderidas.

A solução de MTT foi preparada na concentração de 0,5 mg do pó de MTT (Sigma Aldrich Co.) diluído em 1 mL de DMEM-suplementado. Foram adicionados 100 µL/poço da solução de MTT e as microplacas foram incubadas em estufa (37°C, com 5% de CO₂) por 4 h, abrigadas da luz. Após, esta solução foi descartada e foram adicionados 100 µL/poço de dimetilsulfóxido (DMSO – LABSYNTH) e incubadas abrigadas da luz em estufa por mais 10 min e, em seguida, agitação em *shaker*, por 10 min. A leitura da absorbância dos poços foi em leitora de microplacas com comprimento de onda de 570 nm. As densidades ópticas (DO) obtidas foram convertidas em percentual de viabilidade celular (% Viabilidade) utilizando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Viabilidade} = (\text{DO Grupo Tratado} \times 100) / \text{Média DO Grupo Controle}$$

A norma ISO 10993-5:2009 determina que se a viabilidade celular obtida for menor que 70%, a substância em estudo apresenta um potencial de citotoxicidade, desta maneira, em conformidade com esta norma, o percentual de viabilidade celular mínimo, da média de cada concentração testada, necessário para ser classificado como não citotóxico foi determinado em 70%.

3.4 Avaliação da atividade anti-inflamatória dos extratos

A avaliação da atividade anti-inflamatória dos extratos foi realizada por meio do teste imunoenzimático (ELISA) e pela reação de Griess. O ELISA analisou a

produção de citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6. A reação de Griess verificou a produção de óxido nítrico.

Os macrófagos de camundongo RAW 264.7 removidos do frasco de cultivo celular foram centrifugados por 5 min a 3000 rpm e resuspendidos. Em seguida ocorreu a contagem de células viáveis na Câmara de Neubauer.

Em placas de 24 poços foram cultivadas 5×10^5 células/mL e incubadas em estufa (37°C, com 5% de CO₂) por 24 h. Após incubação, o sobrenadante foi descartado e foi acrescentado 1 mL/poço das duas maiores concentrações não citotóxicas determinadas pelo teste de citotoxicidade com exposição ao extrato por 24 h (MTT – 24 horas) relativo para cada extrato, respectivamente, no grupo tratado. A diluição dos extratos foi realizada utilizando o meio de cultivo celular (DMEM-suplementado). Nos poços referentes ao grupo controle foi adicionado 1 mL/poço do DMEM-suplementado. Nos grupos contendo lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* (Sigma), o LPS foi acrescentado na concentração de 1 μ g/mL. O *n* foi igual a 10 para todos os grupos.

As placas foram incubadas em estufa (37°C, 5% de CO₂) por 24 h. Após, o sobrenadante foi coletado e armazenado sob refrigeração (-20°C) para posterior quantificação das citocinas TNF- α e IL-6 e do óxido nítrico.

3.4.1 Quantificação de citocinas – Teste imunoenzimático (ELISA)

Placas de microtitulação de 96 poços (Greiner Bio-One) foram sensibilizadas com anticorpos de captura anti-TNF- α ou anti-IL-6 de camundongo (para o sobrenadante dos macrófagos de camundongo - RAW 264.7) (Kits R&D Systems) e mantidas *overnight* em temperatura ambiente.

No dia seguinte, as placas foram lavadas com PBS contendo Tween 20 (PBS-T) e bloqueadas com soro albumina bovina (BSA) por 1 h. Após, as placas foram lavadas com PBS-T e receberam 100 μ L/poço da curva padrão de citocinas e dos sobrenadantes da cultura de células. Após 2 h em temperatura ambiente, as placas foram lavadas com PBS-T e foram acrescentados os anticorpos de detecção anti-TNF- α ou anti-IL-6 marcados com biotina e incubadas por 2 h em temperatura

ambiente. Após, os poços foram lavados com PBS-T e adicionou-se a estreptavidina por 20 min. Posteriormente, a reação foi revelada com solução contendo substrato cromogênico e peróxido de hidrogênio. Após 20 min a reação foi bloqueada com ácido sulfúrico 2N. As densidades ópticas (DO) foram lidas no leitor de microplacas com comprimento de onda de 450 nm.

3.4.2 Produção de óxido nítrico – Reação de Griess

A produção de óxido nítrico presente nos sobrenadantes da cultura celular foi determinada indiretamente pela concentração de nitrito detectada pelo reagente de Griess (Sigma). Em uma microplaca de 96 poços, foram acrescentados a curva padrão de nitrito para cada extrato e 100 µL/poço das amostras dos sobrenadantes e do reagente de Griess. Após 10 min, a leitura foi realizada no leitor de microplacas através do comprimento de onda de 570 nm.

3.5 Análise estatística

Os valores obtidos a partir dos ensaios de citotoxicidade (MTT), quantificação de citocinas (ELISA) e produção de óxido nítrico (reação de Griess) foram submetidos ao teste de normalidade. Os resultados que apresentaram distribuição normal foram submetidos ao teste de análise de variância ANOVA com comparação múltipla de Tukey. Os resultados que não apresentaram distribuição Gaussiana foram analisados pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis com comparação múltipla de Dunn. As análises estatísticas foram realizadas nos *softwares* GraphPad Prism 5.0 e Statistix 8.0. Para todos os testes estatísticos foi adotado nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

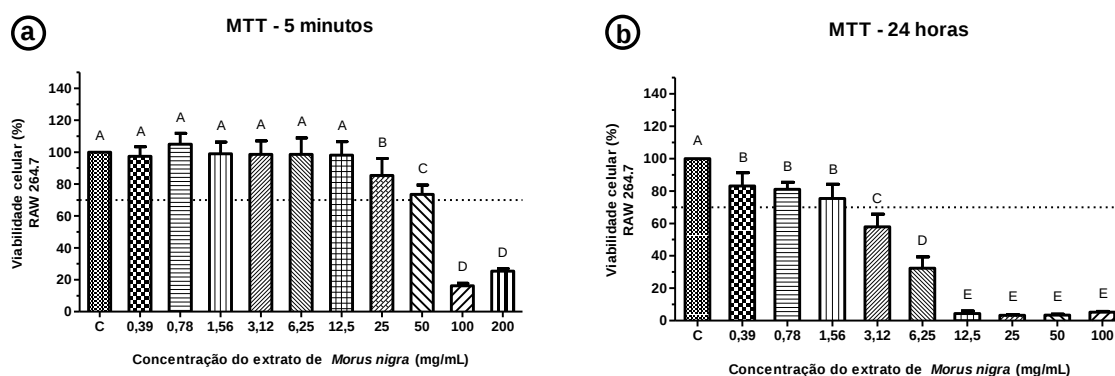
4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da citotoxicidade – Teste de MTT

O extrato de *M. nigra* não apresentou citotoxicidade desde a menor concentração testada (0,39 mg/mL) até a concentração de 50 mg/mL, onde obteve 73,6% de viabilidade celular na exposição por 5 min (Figura 1a).

No tratamento por 24 h com o extrato de *M. nigra*, as células de macrófagos de camundongo apresentaram percentual considerado não citotóxico, segundo a norma ISO 10993-5:2009, nas concentrações 0,39 mg/mL, 0,78 mg/mL e 1,56 mg/mL (Figura 1b).

Figura 1 – Viabilidade celular de macrófagos de camundongo RAW 264.7 analisada pelo teste de MTT após exposição por 5 minutos e 24 horas ao extrato de *Morus nigra*



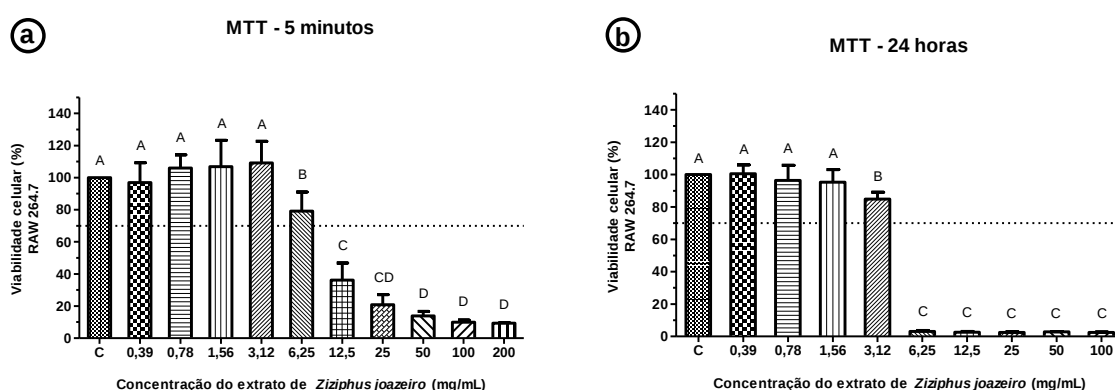
Legenda: C - Controle. A diferença estatística significativa entre os grupos experimentais pode ser observada pelas letras diferentes sobrescritas. ($n = 8$; a) ANOVA, Tukey; b) ANOVA, Tukey; $p < 0,0001$).

Fonte: Elaborada pelo autor.

As concentrações testadas de 0,39 mg/mL a 6,25 mg/mL do *Z. joazeiro* apresentaram viabilidade celular acima de 70% no tratamento por 5 min (Figura 2a).

Entre as concentrações avaliadas do extrato de *Z. joazeiro* no tratamento de 24 h, as concentrações 0,39 mg/mL a 3,12 mg/mL apresentaram ausência de citotoxicidade (Figura 2b). O extrato de *Z. joazeiro* obteve 84,9% de células viáveis na concentração de 3,12 mg/mL na exposição por 24 h (Figura 2b).

Figura 2 – Viabilidade celular de macrófagos de camundongo RAW 264.7 analisada pelo teste de MTT após exposição por 5 minutos e 24 horas ao extrato de *Ziziphus joazeiro*



Legenda: C - Controle. A diferença estatística significativa entre os grupos experimentais pode ser observada pelas letras diferentes sobrescritas. ($n = 8$; a) ANOVA, Tukey; b) ANOVA, Tukey; $p < 0,0001$).

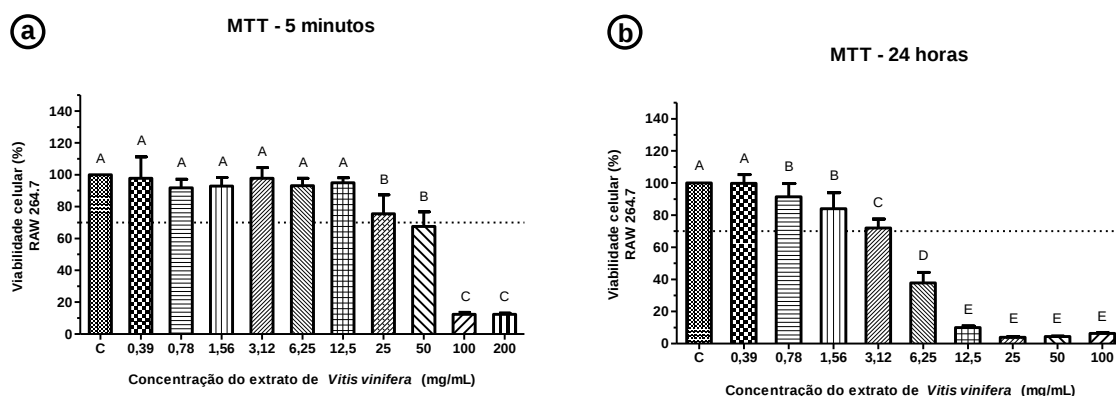
Fonte: Elaborada pelo autor.

Com exposição de 0,39 mg/mL até a concentração de 25 mg/mL do extrato de *V. vinifera*, as células não apresentaram percentual citotóxico no tratamento de 5 min (Figura 3a).

Na avaliação por 24 h, as concentrações mais diluídas do extrato de *V. vinifera*, 0,39 mg/mL, 0,78 mg/mL, 1,56 mg/mL e 3,12 mg/mL apresentaram viabilidade celular acima dos 70% (Figura 3b).

A Figura 4 apresenta a microplaca utilizada para avaliação da viabilidade celular de macrófagos de camundongo RAW 264.7 pelo teste de MTT após exposição por 5 min ao extrato de *V. vinifera* em diferentes concentrações.

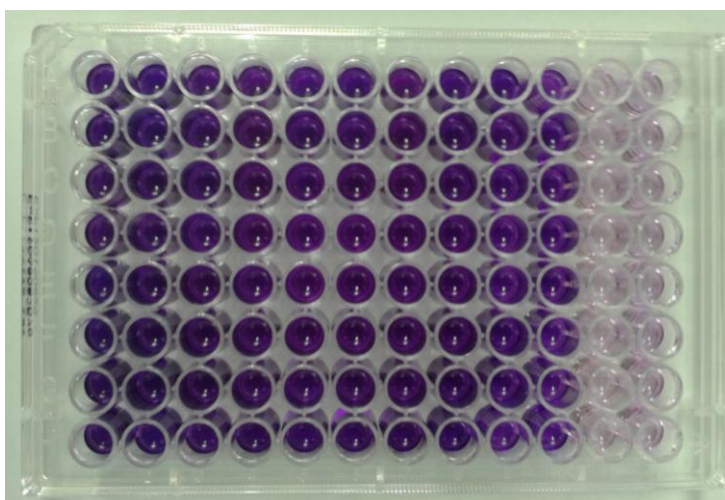
Figura 3 – Viabilidade celular de macrófagos de camundongo RAW 264.7 analisada pelo teste de MTT após exposição por 5 minutos e 24 horas ao extrato de *Vitis vinifera*



Legenda: C - Controle. A diferença estatística significativa entre os grupos experimentais pode ser observada pelas letras diferentes sobrescritas. ($n = 8$; a) ANOVA, Tukey; b) ANOVA, Tukey; $p < 0,0001$).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 4 – Microplaca utilizada para avaliação da viabilidade celular de macrófagos de camundongo RAW 264.7 pelo teste de MTT após exposição por 5 minutos ao extrato de *Vitis vinifera* em diferentes concentrações



Legenda: Da esquerda para direita →, em coluna vertical ($n = 8$) temos o grupo controle e o grupo tratado desde a concentração mais diluída (0,39 mg/mL) até a concentração do extrato puro (200 mg/mL).

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2 Avaliação da atividade anti-inflamatória dos extratos

4.2.1 Determinação de concentrações

Com base nos resultados obtidos no teste de citotoxicidade com exposição ao extrato por 24 h (MTT – 24 horas), foram selecionadas as duas maiores concentrações consideradas não citotóxicas para os macrófagos de camundongo RAW 264.7, relativas a cada extrato, para serem avaliadas no ELISA e na reação de Griess (Quadro 2).

Quadro 2 – Concentrações não citotóxicas dos extratos de *Morus nigra*, *Ziziphus joazeiro* e *Vitis vinifera* para macrófagos de camundongo RAW 264.7 utilizadas nos ensaios de avaliação da atividade anti-inflamatória

Extrato	Concentração (mg/mL)	Viabilidade celular RAW 264.7 (MTT - 24 horas)
<i>M. nigra</i>	0,78	81,1%
	1,56	75,4%
<i>Z. joazeiro</i>	1,56	95,3%
	3,12	84,9%
<i>V. vinifera</i>	1,56	84,1%
	3,12	72,1%

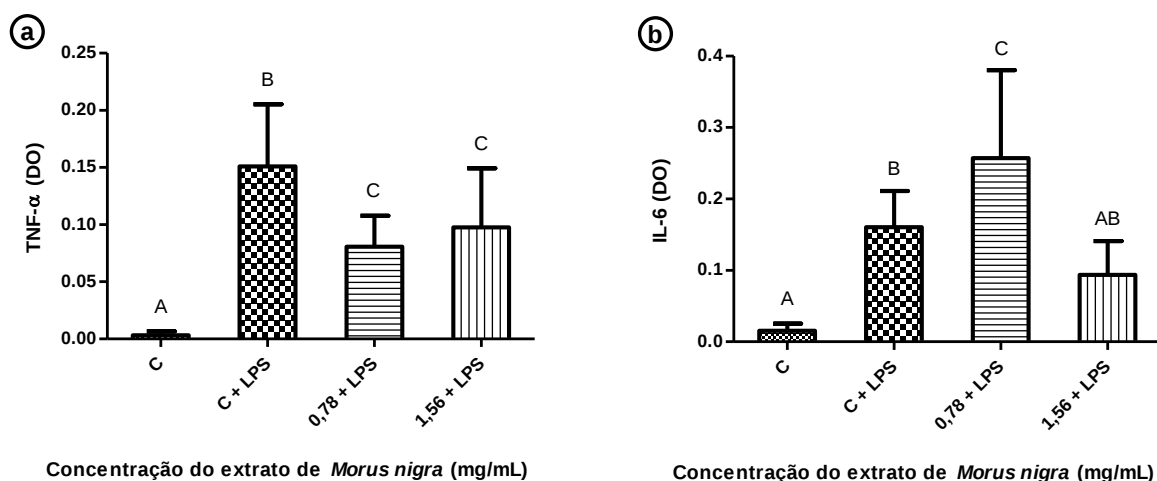
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2.2 Quantificação de citocinas – Teste imunoenzimático (ELISA)

Na avaliação dos três extratos, *M. nigra*, *Z. joazeiro* e *V. vinifera*, o grupo Controle com LPS (C + LPS) apresentou uma produção elevada das citocinas TNF- α e IL-6 em relação ao grupo Controle (C) que não contém o LPS.

As concentrações 0,78 mg/mL e 1,56 mg/mL de *M. nigra* apresentaram diminuição estatisticamente relevante nos valores das citocinas TNF- α em relação ao grupo C + LPS. Ambas as concentrações avaliadas do extrato de *M. nigra* não apresentaram redução estatisticamente significativa na produção da citocina IL-6 em relação ao grupo C + LPS. A Figura 5 apresenta os dados obtidos pelo ELISA do extrato de *M. nigra*.

Figura 5 – Produção das citocinas TNF- α e IL-6 em macrófagos de camundongo RAW 264.7 estimulados pelo LPS e expostos por 24 horas ao extrato de *Morus nigra*

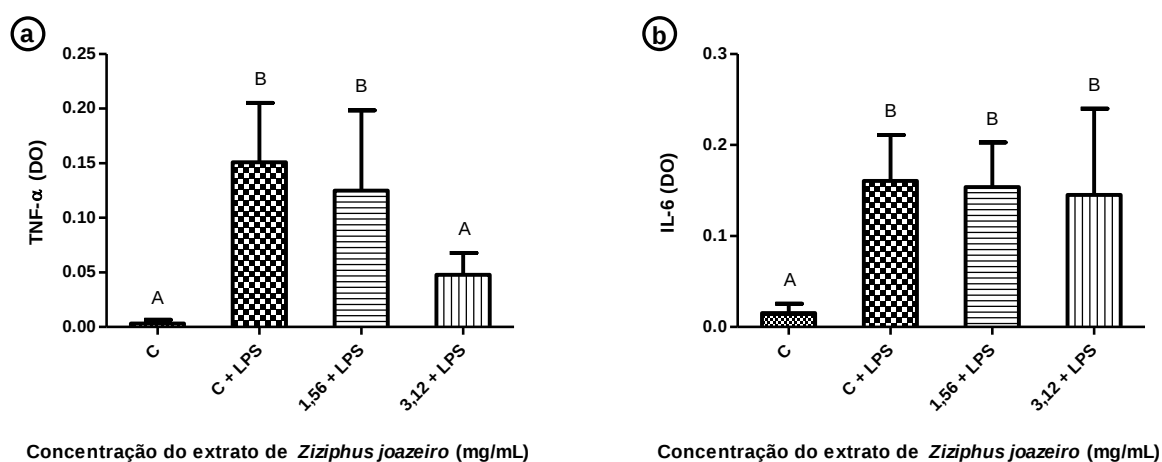


Legenda: C – Controle. LPS – Lipopolissacarídeo. DO – Densidade óptica. O grupo C é referente ao grupo controle exposto apenas ao meio de cultura celular. O grupo C + LPS é referente ao grupo controle contendo o LPS diluído no meio de cultura celular. A diferença estatística significativa entre os grupos experimentais pode ser observada pelas letras diferentes sobrescritas. ($n = 10$; a) ANOVA, Tukey; b) ANOVA, Tukey; $p < 0,0001$).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Na avaliação do extrato de *Z. joazeiro*, a concentração de 3,12 mg/mL apresentou uma redução estatisticamente significativa na produção da citocina TNF- α em relação ao grupo C + LPS. Na avaliação da citocina IL-6, as concentrações 1,56 mg/mL e 3,12 mg/mL de *Z. joazeiro* apresentaram variações não estatisticamente relevantes em comparação com o grupo C + LPS. Os dados da produção das citocinas TNF- α e IL-6 após exposição ao *Z. joazeiro* estão apresentados nos gráficos da Figura 6.

Figura 6 – Produção das citocinas TNF- α e IL-6 em macrófagos de camundongo RAW 264.7 estimulados pelo LPS e expostos por 24 horas ao extrato de *Ziziphus joazeiro*

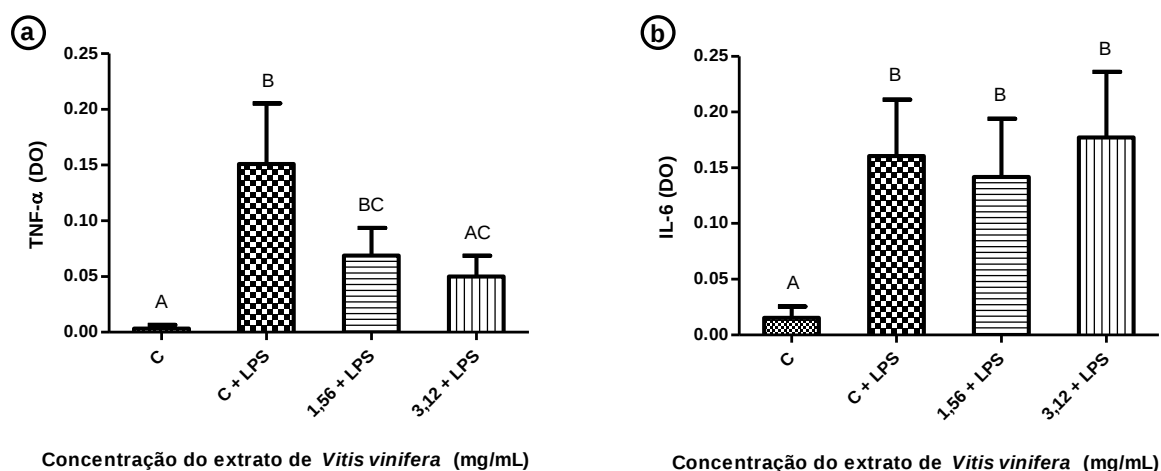


Legenda: C – Controle. LPS – Lipopolissacarídeo. DO – Densidade óptica. O grupo C é referente ao grupo controle exposto apenas ao meio de cultura celular. O grupo C + LPS é referente ao grupo controle contendo LPS diluído no meio de cultura celular. A diferença estatística significativa entre os grupos experimentais pode ser observada pelas letras diferentes sobrescritas. ($n = 10$; a) ANOVA, Tukey; b) Kruskal-Wallis, Dunn; $p < 0,0001$).
Fonte: Elaborada pelo autor.

Em relação à citocina TNF- α , a concentração de 3,12 mg/mL do extrato de *V. vinifera* apresentou uma redução estatisticamente significativa em relação ao grupo C + LPS. As concentrações 1,56 mg/mL e 3,12 mg/mL de *V. vinifera* apresentaram variações não estatisticamente relevantes em comparação com o

grupo C + LPS na avaliação da citocina IL-6. A Figura 7 apresenta os dados descritos do extrato de *V. vinifera*.

Figura 7 – Produção das citocinas TNF- α e IL-6 em macrófagos de camundongo RAW 264.7 estimulados pelo LPS e expostos por 24 horas ao extrato de *Vitis vinifera*



Legenda: C – Controle. LPS – Lipopolissacarídeo. DO – Densidade óptica. O grupo C é referente ao grupo controle exposto apenas ao meio de cultura celular. O grupo C + LPS é referente ao grupo controle contendo LPS diluído no meio de cultura celular. A diferença estatística significativa entre os grupos experimentais pode ser observada pelas letras diferentes sobrescritas. ($n = 10$; a) Kruskal-Wallis, Dunn; b) ANOVA, Tukey; $p < 0,0001$).

Fonte: Elaborada pelo autor.

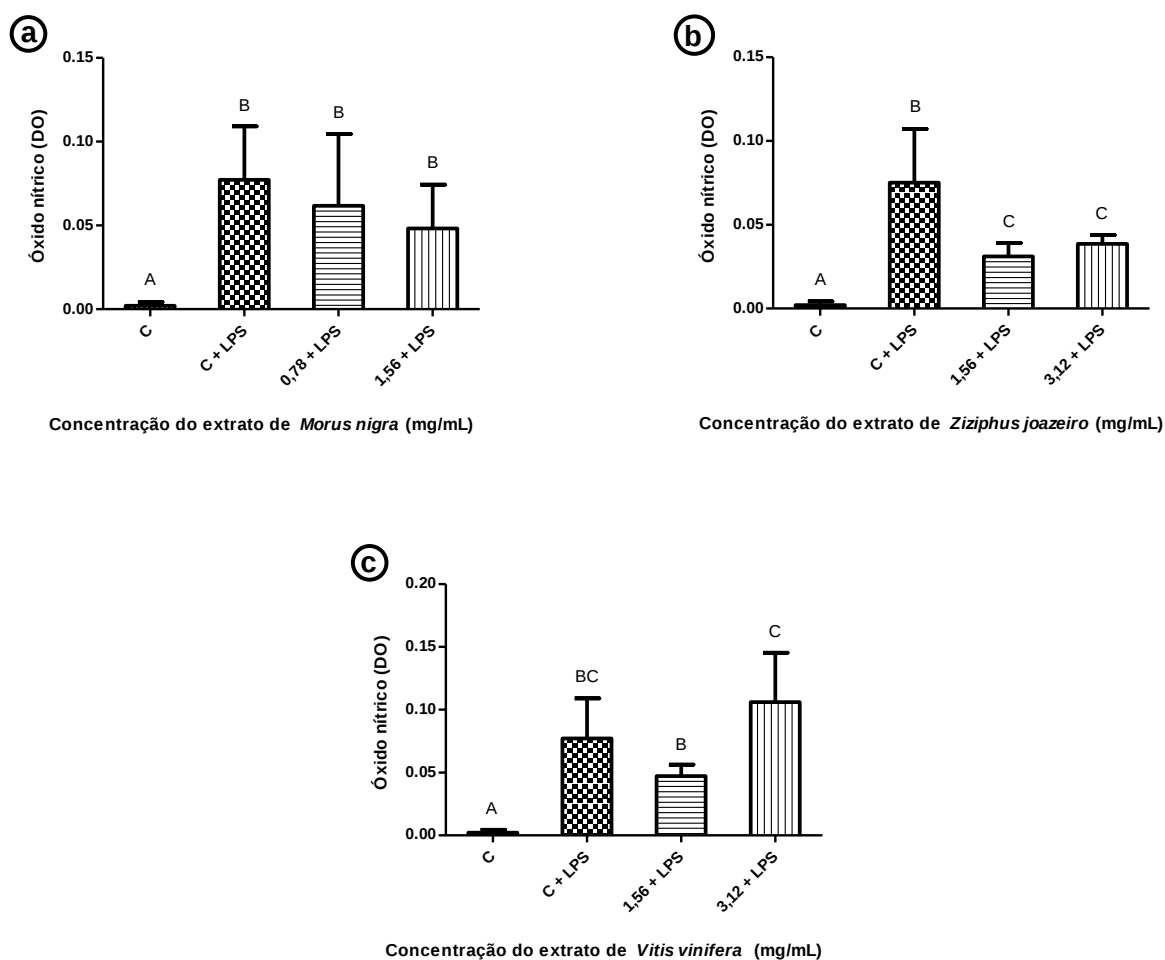
4.2.3 Produção de óxido nítrico – Reação de Griess

O grupo Controle com LPS (C + LPS) apresentou valores estatisticamente superiores de óxido nítrico em relação ao grupo Controle (C) que não contém o LPS nos três extratos avaliados, *M. nigra*, *Z. joazeiro* e *V. vinifera*.

Nos grupos tratados com 1,56 mg/mL e 3,12 mg/mL de *Z. joazeiro*, verificou-se uma diminuição estatisticamente significativa na expressão do óxido nítrico em relação ao grupo C + LPS. Ambas as concentrações avaliadas dos extratos de *M. nigra* e *V. vinifera* apresentaram variações não estatisticamente relevantes na

produção de óxido nítrico em comparação com o grupo C + LPS. A Figura 8 apresenta os dados obtidos pela reação de Griess dos três extratos em estudo.

Figura 8 – Produção de óxido nítrico em macrófagos de camundongo RAW 264.7 estimulados pelo LPS e expostos por 24 horas aos extratos de *Morus nigra*, *Ziziphus joazeiro* ou *Vitis vinifera*



Legenda: C – Controle. LPS – Lipopolissacarídeo. DO – Densidade óptica. O grupo C é referente ao grupo controle exposto apenas ao meio de cultura celular. O grupo C + LPS é referente ao grupo controle contendo LPS diluído no meio de cultura celular. A diferença estatística significativa entre os grupos experimentais pode ser observada pelas letras diferentes sobscritas. ($n = 10$; a) Kruskal-Wallis, Dunn; b) ANOVA, Tukey; c) ANOVA, Tukey; $p < 0,0001$).

Fonte: Elaborada pelo autor.

5 DISCUSSÃO

Diversas metodologias podem ser aplicadas na avaliação da citotoxicidade, dentre elas o teste colorimétrico MTT, que se baseia na redução enzimática deste composto em formazan nas células metabolicamente ativas (International Standards Organization, 2009; Gomes et al., 2016). Os ensaios de viabilidade celular com o teste de MTT na linhagem RAW 264.7 mostraram que a exposição das células aos extratos puros (200 mg/mL), avaliada no tratamento por 5 min, apresentou uma acentuada diminuição da viabilidade celular em relação ao controle, entretanto, este efeito foi atenuado diante dos extratos mais diluídos. O aumento da viabilidade celular diante da exposição a concentrações mais diluídas dos extratos também pode ser observado no tratamento de 24 h. Dentre as concentrações avaliadas no tratamento de 5 min (200 mg/mL a 0,39 mg/mL) as concentrações consideradas não citotóxicas foram de 0,39 a 50 mg/mL para o extrato de *M. nigra* (Figura 1a); 0,39 a 6,25 mg/mL para *Z. joazeiro* (Figura 2a) e 0,39 a 25 mg/mL para *V. vinifera* (Figura 3a). Após exposição por 24 h, a viabilidade celular acima de 70% ocorreu diante das concentrações 0,39 até 1,56 mg/mL no extrato de *M. nigra* (Figura 1b) e da maior diluição avaliada (0,39 mg/mL) até 3,12 mg/mL nos extratos de *Z. joazeiro* e *V. vinifera* (Figura 2b e Figura 3b). Pode-se verificar que a exposição a maiores concentrações do extrato resultou em percentuais de viabilidade menores em ambos os tempos de tratamento e para os três extratos avaliados, sugerindo que algumas concentrações podem interferir no metabolismo celular, prejudicando sua ação enzimática.

Outras pesquisas também avaliaram a atividade citotóxica destes três extratos. Freitas et al. (2016) avaliaram pelo método colorimétrico MTT a citotoxicidade do extrato etanólico das folhas de *M. nigra* exposto por 24 h nas concentrações de 0,98 µg/mL a 2000 µg/mL em três linhagens celulares, queratinócitos humanos (HaCat), fibroblasto (L-929) e melanoma (B16F10) e relataram que a concentração 1000 µg/mL foi citotóxica para as três linhagens, o que difere do encontrado no presente estudo, em que a concentração de 1,56 mg/mL do extrato de *M. nigra* não foi considerada citotóxica, porém os diferentes

resultados descritos podem ser advindos das diferentes condições experimentais, características dos extratos e células utilizadas.

Gomes et al. (2016) avaliaram através do teste de MTT a citotoxicidade do extrato aquoso de cascas do *Z. joazeiro*, nas concentrações entre 0,55 a 2,7 mg/mL, e da sua fração de saponinas, com concentrações de 0,25 a 1,2 mg/mL, ambos expostos por 24 h sobre a linhagem de células Vero, obtendo o valores de IC_{50} de 0,75 mg/mL para o extrato aquoso e 0,20 mg/mL para a fração de saponinas. O valor de IC_{50} representa a concentração necessária do agente em estudo para inibir 50% a proliferação celular. Em sua discussão, Gomes et al. (2016) sugeriram que as saponinas podem ser responsáveis pelo efeito citotóxico do *Z. joazeiro* e também relataram que possivelmente apresentem variações na sua toxicidade de acordo com a linhagem celular utilizada.

A avaliação da citotoxicidade em células RAW 264.7 realizada por Esatbeyoglu et al. (2016) com o teste de Vermelho Neutro, demonstrou que após a exposição ao extrato etanólico de raiz de *V. vinifera* por 24 h em concentrações de 1 a 50 μ g/mL, concentrações de 1 a 20 μ g/mL não apresentaram citotoxicidade. Os resultados descritos acima para *V. vinifera* diferem dos obtidos neste estudo (0,39 até 3,12 mg/mL após exposição por 24 h), entretanto, é provável que estas divergências possam ser advindas dos procedimentos metodológicos e das características dos extratos, sendo de grande importância a definição específica do tipo de extrato para correta indicação terapêutica de cada formulação, como ação anti-inflamatória, por exemplo.

Neste estudo a ação anti-inflamatória dos extratos *M. nigra*, *Z. joazeiro* e *V. vinifera* foi avaliada nas culturas celulares de macrófagos de camundongo RAW 264.7 estimuladas pela presença do LPS por meio da quantificação da produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6 e do óxido nítrico.

As concentrações 0,78 mg/mL e 1,56 mg/mL avaliadas do extrato glicólico de *M. nigra* demonstraram ação inibitória para TNF- α (Figura 5a). Zelová et al. (2014) verificaram que determinados compostos extraídos de *Morus alba* e *Morus nigra* afetaram a produção da citocina TNF- α em macrófagos estimulados pelo LPS. No estudo de Chen et al. (2016), os flavonóides totais de *M. nigra* inibiram a produção de TNF- α na avaliação do soro de ratos após presença de lesão, e *in vitro*, sobre células RAW 264.7, apresentaram inibição da produção de óxido nítrico. No

trabalho de Chen et al. (2017), o tratamento com 50 mg/mL de flavonóides totais de *M. nigra*, em células RAW 264.7, apresentou inibição da expressão de IL-6. No presente estudo, o extrato glicólico de *M. nigra* não apresentou efeito inibitório para IL-6 e óxido nítrico (Figura 5b e Figura 8a), porém deve-se atentar ao fato de compararmos um extrato bruto a frações isoladas da planta. No estudo de Boeing et al. (2014), com *Morus nigra*, *Rubus ulmifolius* e *Fragaria x ananassa*, demonstraram que a extração de compostos fenólicos e antocianínicos e a capacidade antioxidante deles foram significativamente afetadas pela combinação de solvente utilizada. Pode-se sugerir que o solvente utilizado na extração glicólica de *M. nigra* poderia ter afetado a presença, concentração ou ação de possíveis compostos anti-inflamatórios atuantes para IL-6 ou óxido nítrico. Outra sugestão seria que outras concentrações possam atuar inibindo a produção da citocina IL-6 e do óxido nítrico.

No estudo de Estevam (2012), foi relatado que o extrato etanólico das cascas do caule de *Z. joazeiro* apresentou ação cicatrizante em feridas cutâneas e ação anti-inflamatória na redução do edema de pata e da migração leucocitária local em modelo animal. Silva et al. (2011) relataram que o *Z. joazeiro* possui propriedades antioxidantes, característica que pode contribuir para a ação anti-inflamatória (Ferreira Júnior et al., 2011). Os dados reportados são condizentes com os resultados encontrados neste estudo em que a síntese da citocina TNF- α foi suprimida diante do tratamento com 3,12 mg/mL do extrato de *Z. joazeiro* (Figura 6a) e a expressão do óxido nítrico foi atenuada em ambas as concentrações analisadas (1,56 mg/mL e 3,12 mg/mL) deste extrato (Figura 8b).

Diversos estudos avaliaram *in vivo* ou *in vitro* a ação de *V. vinifera* sobre os mediadores TNF- α , IL-6 e óxido nítrico. Arora et al. (2016) avaliando o tratamento com extrato alcoólico de *V. vinifera*, constataram diminuição dos níveis de TNF- α e óxido nítrico no soro e na lavagem broncoalveolar de ratos. Costa et al. (2017) avaliaram o tratamento com extrato de *V. vinifera* rico em polifenóis e verificaram redução nos níveis das citocinas TNF- α e IL-6 no plasma de ratos. Queiroz et al. (2017) avaliaram *in vitro* a ação do extrato polifenólico e compostos isolados de *V. vinifera* na redução do óxido nítrico, e descreveram que os compostos isolados apresentaram maior potencial inibitório que o extrato polifenólico avaliado. Neste estudo, 3,12 mg/mL do extrato glicólico de *V. vinifera* apresentou inibição da síntese da citocina TNF- α (Figura 7a), o que condiz com os resultados apresentados nos

estudos de Arora et al. (2016) e Costa et al. (2017), porém não apresentou diminuição significativa dos outros mediadores avaliados. Nas uvas, os níveis de vitaminas, compostos voláteis, fitoquímicos podem ser influenciados por múltiplos fatores ambientais, genéticos e práticas de cultivo (Pawlus et al., 2012; Aubert, Chalot, 2018). O procedimento de extração e a parte da planta utilizada também são fatores importantes no estudo do potencial bioativo das plantas (Alviano et al., 2008). Os diferentes resultados obtidos neste trabalho em relação aos outros anteriormente citados, podem ser devido aos testes, características e origens distintas dos extratos utilizados, sendo que cada estudo traz contribuição relevante para as indicações terapêuticas dos extratos.

O presente trabalho demonstrou que extratos glicólicos de *M. nigra*, *Z. joazeiro* e *V. vinifera* podem ser promissores produtos naturais no desenvolvimento de formulações de produtos de ação terapêutica ou de higiene pessoal ou oral, pois concentrações não citotóxicas avaliadas exerceram efeito inibitório em determinadas vertentes inflamatórias analisadas. Este estudo realizou uma triagem inicial do perfil imunomodulador dos extratos, porém outros estudos são necessários para caracterizar os efeitos e mecanismos anti-inflamatórios, determinar os potenciais e concentrações terapêuticas, ensaios clínicos, eficácia e segurança dos extratos, entre outros.

6 CONCLUSÃO

Os extratos de *M. nigra*, *Z. joazeiro* e *V. vinifera* não foram citotóxicos nas concentrações de 0,39 a 50 mg/mL, 0,39 a 6,25 mg/mL e 0,39 a 25 mg/mL, respectivamente, diante do tratamento de 5 min. Após exposição por 24 h, o extrato de *M. nigra* não apresentou citotoxicidade nas concentrações de 0,39 a 1,56 mg/mL, e os extratos de *Z. joazeiro* e *V. vinifera* apresentaram viabilidade celular acima de 70% nas concentrações de 0,39 a 3,12 mg/mL.

Em relação a produção das citocinas pró-inflamatórias, 0,78 e 1,56 mg/mL do extrato de *M. nigra*, 3,12 mg/mL de *Z. joazeiro* e 3,12 mg/mL de *V. vinifera* apresentaram redução nos níveis de TNF- α , entretanto, nenhuma das concentrações avaliadas no ELISA dos três extratos em estudo demonstraram ação atenuante na produção da IL-6.

Na avaliação da expressão do óxido nítrico, as concentrações 1,56 e 3,12 mg/mL do extrato de *Z. joazeiro* apresentaram diminuição nos níveis deste mediador inflamatório. Ambas as concentrações avaliadas na reação de Griess dos extratos de *M. nigra* e *V. vinifera* não demonstraram redução na produção do óxido nítrico.

Os três extratos glicólicos avaliados apresentaram ação anti-inflamatória *in vitro* em macrófagos de camundongo RAW 264.7 estimulados por LPS, pois concentrações não citotóxicas de *M. nigra* (0,78 e 1,56 mg/mL), *Z. joazeiro* (3,12 mg/mL) e *V. vinifera* (3,12 mg/mL) inibiram a produção da citocina pró-inflamatória TNF- α e as concentrações 1,56 e 3,12 mg/mL do extrato de *Z. joazeiro* atenuaram a expressão do óxido nítrico.

REFERÊNCIAS*

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Imunidade inata. In: Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia celular e molecular*. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2015. Cap. 4, p. 51-86.

Abotsi WK, Lamptey SB, Boakye-Gyasi E, Woode E. *Albizia zygia* (DC.) J.F. Macbr. (Leguminosae-Mimosoideae) root extract exhibits anti-nociceptive and antipyretic activities in murine models. *J Ethnopharmacol*. 2017;199:183-93. doi: 10.1016/j.jep.2017.02.007.

Al-Abd NM, Mohamed Nor Z, Mansor M, Azhar F, Hasan MS, Kassim M. Antioxidant, antibacterial activity, and phytochemical characterization of *Melaleuca cajuputi* extract. *BMC Complement Altern Med*. 2015;15:385. doi: 10.1186/s12906-015-0914-y.

Alviano WS, Alviano DS, Diniz CG, Antoniolli AR, Alviano CS, Farias LM, et al. *In vitro* antioxidant potential of medicinal plant extracts and their activities against oral bacteria based on Brazilian folk medicine. *Arch Oral Biol*. 2008;53:545–52. doi:10.1016/j.archoralbio.2007.12.001.

Arora P, Ansari SH, Najmi AK, Anjum V, Ahmad S. Investigation of anti-asthmatic potential of dried fruits of *Vitis vinifera* L. in animal model of bronchial asthma. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2016;12:42. doi: 10.1186/s13223-016-0145-x.

Aubert C, Chalot G. Chemical composition, bioactive compounds, and volatiles of six table grape varieties (*Vitis vinifera* L.). *Food Chem*. 2018;240:524-33. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.07.152.

Azab A, Nassar A, Azab AN. Anti-inflammatory activity of natural products. *Molecules*. 2016;21:1321. doi: 10.3390/molecules21101321.

Boeing JS, Barizão ÉO, Silva BC, Montanher PF, Almeida VC, Visentainer JV. Evaluation of solvent effect on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities from the berries: application of principal component analysis. *Chem Cent J*. 2014;8:48. doi: 10.1186/s13065-014-0048-1.

Boriollo MF, Resende MR, Silva TA, Públio JY, Souza LS, Dias CT, et al. Evaluation of the mutagenicity and antimutagenicity of *Ziziphus joazeiro* Mart. bark in the micronucleus assay. *Genet Mol Biol*. 2014;37(2):428-38.

Brito SM, Coutinho HD, Talvani A, Coronel C, Barbosa AG, Vega C, et al. Analysis of bioactivities and chemical composition of *Ziziphus joazeiro* Mart. using HPLC–DAD. *Food Chem*. 2015;186:185–91. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.10.031.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 04 nov 2015; acesso em 25 jun 2017]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Cartaxo SL, Souza MM, Albuquerque UP. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. *J Ethnopharmacol.* 2010;131:326–42. doi:10.1016/j.jep.2010.07.003

Chen H, Pu J, Liu D, Yu W, Shao Y, Yang G, et al. Anti-Inflammatory and antinociceptive properties of flavonoids from the fruits of black mulberry (*Morus nigra* L.). *PLoS ONE.* 2016 Apr 5;11(4):1-14. doi:10.1371/journal.pone.0153080.

Chen H, Yu W, Chen G, Meng S, Xiang Z, He N. Antinociceptive and antibacterial properties of anthocyanins and flavonols from fruits of black and non-black mulberries. *Molecules.* 2017 Dec 21;23:1-13. doi: 10.3390/molecules23010004.

Costa GF, Santos IB, Bem GF, Cordeiro VS, Costa CA, Carvalho LC, et al. The beneficial effect of anthocyanidin-rich *Vitis vinifera* L. grape skin extract on metabolic changes induced by high-fat diet in mice involves antiinflammatory and antioxidant actions. *Phytother Res.* 2017;31:1621-32. doi: 10.1002/ptr.5898.

Cruz MC, Santos PO, Barbosa Júnior AM, Mélo DL, Alviano CS, Antonioli AR, et al. Antifungal activity of Brazilian medicinal plants involved in popular treatment of mycoses. *J Ethnopharmacol.* 2007;111:409–12. doi:10.1016/j.jep.2006.12.005.

Dell'agli M, Di Lorenzo C, Badea M, Sangiovanni E, Dima L, Bosisio E, et al. Plant food supplements with anti-inflammatory properties: a systematic review (I). *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2013;53(4):403–13. doi: 10.1080/10408398.2012.682123.

Eljezi T, Pinta P, Richard D, Pinguet J, Chezal JM, Chagnon MC, et al. *In vitro* cytotoxic effects of DEHP-alternative plasticizers and their primary metabolites on a L929 cell line. *Chemosphere.* 2017;173:452-59. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.01.026

Esatbeyoglu T, Ewald P, Yasui Y, Yokokawa H, Wagner AE, Matsugo S, et al. Chemical characterization, free radical scavenging, and cellular antioxidant and anti-inflammatory properties of a stilbenoid-rich root extract of *Vitis vinifera*. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;1–11. doi: 10.1155/2016/8591286.

Estevam EC. Ensaios farmacológicos e toxicológicos pré-clínicos com *Zizyphus joazeiro* Mart [tese]. João Pessoa (PB): Universidade Federal da Paraíba, UFPB; 2012.

Ezzat SM, Ezzat MI, Okba MM, Menze ET, Abdel-Naim AB. The hidden mechanism beyond ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) potent *in vivo* and *in vitro* anti-inflammatory activity. *J Ethnopharmacol.* 2018;214:113-23. doi: 10.1016/j.jep.2017.12.019.

Ferreira Júnior WS, Ladio AH, Albuquerque UP. Resilience and adaptation in the use of medicinal plants with suspected anti-inflammatory activity in the Brazilian Northeast. *J Ethnopharmacol.* 2011;138:238-52. doi: 10.1016/j.jep.2011.09.018.

Freitas MM, Fontes PR, Souza PM, Fagg CW, Guerra EN, Nóbrega YK, et al. Extracts of *Morus nigra* L. leaves standardized in chlorogenic acid, rutin and isoquercitrin: tyrosinase inhibition and cytotoxicity. PLoS ONE. 2016 Sep 21;11(9):1-24. doi: 10.1371/journal.pone.0163130.

Gomes DC, Lima HG, Vaz AV, Santos NS, Santos FO, Dias ÊR, et al. *In vitro* anthelmintic activity of the *Zizyphus joazeiro* bark against gastrointestinal nematodes of goats and its cytotoxicity on Vero cells. Vet Parasitol. 2016;226:10-6. doi: 10.1016/j.vetpar.2016.06.004.

Hakkou Z, Maciuk A, Leblais V, Bouanani NE, Mekhfi H, Bnouham M, et al. Antihypertensive and vasodilator effects of methanolic extract of *Inula viscosa*: biological evaluation and POM analysis of cynarin, chlorogenic acid as potential hypertensive. Biomed Pharmacother. 2017;93:62-9. doi: 10.1016/j.biopha.2017.06.015.

Hemmati AA, Aghel N, Rashidi I, Gholampur-Aghdami A. Topical grape (*Vitis vinifera*) seed extract promotes repair of full thickness wound in rabbit. Int Wound J. 2011;8(5):514–20. doi: 10.1111/j.1742-481X.2011.00833.x.

International Standards Organization. ISO 10993-5: 2009: biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity. Geneva: International Standards Organization; 2009.

Ismail HF, Zezi AU, Hamza YA, Habib DU. Analgesic, anti-inflammatory and antipyretic activities of the methanol leaf extract of *Dalbergia saxatilis* Hook.F in rats and mice. J Ethnopharmacol. 2015;166:74-8. doi: 10.1016/j.jep.2015.03.007.

Jayaprakasha GK, Selvi T, Sakariah KK. Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. Food Res Int. 2003;36:117–22. pii: S0963-9969(02)00116-3. doi: 10.1016/S0963-9969(02)00116-3.

Kouidhi B, Al Qurashi YM, Chaieb K. Drug resistance of bacterial dental biofilm and the potential use of natural compounds as alternative for prevention and treatment. Microb Pathog. 2015;80:39–49. doi: 10.1016/j.micpath.2015.02.007.

Leal IC, Santos KR, Itabaiana Júnior I, Antunes OA, Porzel A, Wessjohann L, et al. Ceanothane and lupane type triterpenes from *Zizyphus joazeiro* - an anti-staphylococcal evaluation. Planta Med. 2010;76:47–52. doi: 10.1055/s-0029-1185947.

Lee D, Lee OH, Choi G, Kim JD. Antioxidant and anti-adipogenic activities of *Trapa japonica* shell extract cultivated in Korea. Prev Nutr Food Sci. 2017;22(4):327-34. doi: 10.3746/pnf.2017.22.4.327.

Lima GR, Machado FD, Périco LL, Faria FM, Luiz-Ferreira A, Brito AR, et al. Anti-inflammatory intestinal activity of *Combretum duarteanum* Cambess. in trinitrobenzene sulfonic acid colitis model. World J Gastroenterol. 2017 Feb 28;23(8):1353-66. doi: 10.3748/wjg.v23.i8.1353.

Mazimba O, Majinda RR, Motlhanka D. Antioxidant and antibacterial constituents from *Morus nigra*. African J Pharm Pharmacol. 2011 Jun;5(6):751–4. doi: 10.5897/AJPP11.260.

Moradi MT, Karimi A, Fotouhi F, Kheiri S, Torabi A. *In vitro* and *in vivo* effects of *Peganum harmala* L. seeds extract against influenza A virus. Avicenna J Phytomed. 2017;7(6):519-30.

Naderi GA, Asgary S, Sarraf-Zadegan N, Oroojy H, Afshin-Nia F. Antioxidant activity of three extracts of *Morus nigra*. Phyther Res. 2004;18:365–9. doi: 10.1002/ptr.1400.

Nassiri-Asl M, Hosseinzadeh H. Review of the pharmacological effects of *Vitis vinifera* (grape) and its bioactive compounds. Phyther Res. 2009;23:1197–204. doi: 10.1002/ptr.2761.

Oliveira AC, Oliveira AP, Guimarães AL, Oliveira RA, Silva FS, Reis SA, et al. Avaliação toxicológica pré-clínica do chá das folhas de *Morus nigra* L. (Moraceae). Rev Bras Pl Med. 2013;15(2):244–9. doi: 10.1590/S1516-05722013000200012.

Oliveira JR, Castro VC, Vilela PG, Camargo SE, Carvalho CA, Jorge AO et al. Cytotoxicity of Brazilian plant extracts against oral microorganisms of interest to dentistry. BMC Complement Altern Med. 2013;13:208. doi: 10.1186/1472-6882-13-208.

Padilha MM, Vilela FC, Rocha CQ, Dias MJ, Soncini R, Santos MH, et al. Antiinflammatory properties of *Morus nigra* leaves. Phyther Res. 2010;24:1496–500. doi: 10.1002/ptr.3134.

Pawlus AD, Waffo-Tégou P, Shaver J, Mérillon JM. Stilbenoid chemistry from wine and the genus *Vitis*, a review. J Int Sci Vigne Vin. 2012; 46(2):57–111. doi: 10.20870/oeno-one.2012.46.2.1512.

Pereira FE. Inflamações. In: Bogliolo L. Bogliolo, patologia geral. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2013. Cap. 4, p. 65–117.

Queiroz M, Oppolzer D, Gouvinhas I, Silva AM, Barros AI, Domínguez-Perles R. New grape stems' isolated phenolic compounds modulate reactive oxygen species, glutathione, and lipid peroxidation *in vitro*: combined formulations with vitamins C and E. Fitoterapia. 2017;120:146-57. doi: 10.1016/j.fitote.2017.06.010.

Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G. Hormônios locais: citocinas, lipídeos biologicamente ativos, aminas e peptídeos. In: Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G. Rang & Dale: farmacologia. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2011. Cap. 17, p. 208–20.

Rivero-Cruz JF, Zhu M, Kinghorn AD, Wu CD. Antimicrobial constituents of Thompson seedless raisins (*Vitis vinifera*) against selected oral pathogens. Phytoch Letters. 2008;1:151-4. doi:10.1016/j.phytol.2008.07.007.

Rynjah CV, Devi NN, Khongthaw N, Syiem D, Majaw S. Evaluation of the antidiabetic property of aqueous leaves extract of *Zanthoxylum armatum* DC. using *in vivo* and *in vitro* approaches. J Tradit Complement Med. 2018;8(1):134-40. doi: 10.1016/j.jtcme.2017.04.007.

Santana BF, Voeks RA, Funch LS. Ethnomedicinal survey of a maroon community in Brazil's Atlantic tropical forest. J Ethnopharmacol. 2016;181:37–49. doi: 10.1016/j.jep.2016.01.014.

Shirani M, Samimi A, Kalantari H, Madani M, Kord Zanganeh A. Chemical composition and antifungal effect of hydroalcoholic extract of *Allium tripedale* (Tvautv.) against *Candida* species. Curr Med Mycol. 2017;3(1):6-12. doi: 10.18869/acadpub.cmm.3.1.6.

Silva TC, Almeida CC, Veras Filho J, Peixoto Sobrinho TJ, Amorim EL, Costa EP, et al. Atividades antioxidante e antimicrobiana de *Ziziphus joazeiro* mart. (Rhamnaceae): avaliação comparativa entre cascas e folhas. Rev Ciênc Farm Básica Apl. 2011;32(2):193-99.

Soromou LW, Zhang Z, Li R, Chen N, Guo W, Huo M, et al. Regulation of inflammatory cytokines in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 murine macrophage by 7-O-methyl-naringenin. Molecules. 2012;17:3574-85. doi: 10.3390/molecules17033574.

Souza GR, Oliveira-Junior RG, Diniz TC, Branco A, Lima-Saraiva SR, Guimarães AL, et al. Assessment of the antibacterial, cytotoxic and antioxidant activities of *Morus nigra* L. (Moraceae). Braz J Biol. 2018;1-7. doi: 10.1590/1519-6984.05316.

Zelová H, Hanáková Z, Čermáková Z, Šmejkal K, Dalí Acqua S, Babula P, et al. Evaluation of anti-inflammatory activity of prenylated substances isolated from *Morus alba* and *Morus nigra*. J Nat Prod. 2014;77(6):1297-303. doi: 10.1021/np401025f.

ANEXO A - Certificado de análise do extrato glicólico de *Morus nigra*
CERTIFICADO DE ANÁLISE
EXT. GLIC. AMORA 50LT

OP: 100066
 Fabricação: 11/01/17
 Origem: Brasil
 Nomenclatura INCI: Morus Nigra Fruit Extract
 Parte utilizada: Fruto
 Planta utilizada: Morus nigra L.

Lote: PROD100066
 Validade: 11/01/20
 Procedência: Brasil
 No CAS: 90064-11-2

Parâmetros	Especificado	Resultados
Densidade (g/cm3)	Entre 1,000 e 1,100	1,021
pH (sol a 10%)	Entre 3,00 e 5,00	3,53
Aparência	Líquido	De acordo
Bolores e Leveduras	Max 100 UFC/ g	< 10
Coliformes Fecais	Ausente	De acordo
Coliformes Totais	Ausente	De acordo
Contagem total	Max. 100 UFC / g	< 10
Cor	Rosa escuro a vermelho escuro	De acordo
Odor	Característico	De acordo
Solubilidade	Solúvel em etanol, propilenoglicol, glicerina, sorbitol, e água.	De acordo

Monografia: FB 5º ED / MICROBIOLOGIA METODOLOGIA 3M

Armazenamento: Acondicionar em recipiente hermético, ao abrigo de calor e de luz solar direta. Com o tempo pode sofrer turvação e/ou precipitação.

OBS: ** Poderá haver alteração de cor por modificação dos componentes coloridos da planta ou de acordo com o lote/safra utilizada.

USO: EXTERNO

OBS: As assinaturas somente serão válidas quando estiverem acompanhadas da nota fiscal

Dr. Luiz Gustavo Martins Matheus
 Farmacêutico Bioquímico
 CRF - SP: 14.851

Dr. Valdir Martin Caña
 Farmacêutico Industrial
 CRF- SP 32.352

28/03/17

Departamento técnico

Data de emissão

Av. Dr. Gentil de Moura, 194 CEP - 04278-080 Ipiranga São Paulo SP Tel/Fax 55(11) 5061.5282
mapric@mapric.com.br www.mapric.com.br

ANEXO B - Certificado de análise do extrato glicólico de *Ziziphus joazeiro*
CERTIFICADO DE ANÁLISE
EXT. GLIC. RASPA JUA 1 LT

OP: 019145
 Fabricação: 09/09/15
 Origem: Brasil
 Nomenclatura INCI: Zizyphus Joazeiro Bark Extract
 Parte utilizada: Casca
 Planta utilizada: Zizyphus joazeiro Martius

Lote: PROD019145
 Validade: 09/09/18
 Procedencia: Brasil
 No CAS: 223749-07-3

Parâmetros	Especificado	Resultados
Densidade (g/cm3)	Entre 1,000 e 1,100	1,005
pH (sol a 10%)	Entre 4,00 e 6,00	5,80
Aparência	Líquido	De acordo
Bolores e Leveduras	Max 100 UFC/ g	< 10
Coliformes Fecais	Ausente	De acordo
Coliformes Totais	Ausente	De acordo
Contagem total	Max. 100 UFC / g	< 10
Cor	Âmbar a amarelo	De acordo
Odor	Característico	De acordo
Solubilidade	Solúvel em propilenoglicol, glicerina, sorbitol e água. Pode sofrer turvação em etanol.	Ocorreu turvação em etanol

Monografia: METODOLOGIA INTERNA

Armazenamento: Acondicionar em recipiente hermético, ao abrigo de calor e de luz solar direta. Com o tempo pode sofrer turvação e/ou precipitação.

OBS: ** Poderá haver alteração de cor por modificação dos componentes coloridos da planta ou de acordo com o lote/safra utilizada.

USO: Externo

OBS: As assinaturas somente serão válidas quando estiverem acompanhadas da nota fiscal

Dr. Luiz Gustavo Martins Matheus
 Farmacêutico Bioquímico
 CRF - SP: 14.851

Dr. Valdir Martin Caña
 Farmacêutico Industrial
 CRF- SP 32.352

28/03/17

Departamento técnico

Data de emissão

Av. Dr. Gentil de Moura, 194 CEP - 04278-080 Ipiranga São Paulo SP Tel/Fax 55(11) 5061.5282
mapric@mapric.com.br www.mapric.com.br

ANEXO C – Certificado de análise do extrato glicólico de *Vitis vinifera*
CERTIFICADO DE ANÁLISE
EXT. GLIC. UVA

OP: 019573
 Fabricação: 04/05/16
 Origem: Brasil
 Nomenclatura INCI: Vitis Vinifera Fruit Extract
 Parte utilizada: Frutos
 Planta utilizada: Vitis vinifera L.

Lote: PROD019573
 Validade: 04/05/19
 Procedência: Brasil
 No CAS: 85594-37-2 / 84929-27-1

Parâmetros	Especificado	Resultados
Densidade (g/cm ³)	Entre 1,000 e 1,100	1,012
pH (sol a 10%)	Entre 3,30 e 5,30	3,70
Aparência	Líquido	De acordo
Bolores e Leveduras	Max 100 UFC/ g	< 10
Coliformes Fecais	Ausente	De acordo
Coliformes Totais	Ausente	De acordo
Contagem total	Max. 100 UFC / g	< 10
Cor	Rosa claro a rosa escuro	De acordo
Odor	Cracterístico	De acordo
Solubilidade	Solúvel em propilenoglicol, glicerina, sorbitol, etanol e água.	De acordo

Monografia: METODOLOGIA INTERNA

Armazenamento: Acondicionar em recipiente hermético, ao abrigo de calor e de luz solar direta. Com o tempo pode sofrer turvação e/ou precipitação.

USO: Externo

OBS: As assinaturas somente serão válidas quando estiverem acompanhadas da nota fiscal

Dr. Luiz Gustavo Martins Matheus
 Farmacêutico Bioquímico
 CRF - SP: 14.851

Dr. Valdir Martin Caña
 Farmacêutico Industrial
 CRF- SP 32.352

28/03/17

Departamento técnico

Data de emissão

Av. Dr. Gentil de Moura, 194 CEP - 04278 080 Ipiranga São Paulo SP Tel/Fax 55(11) 5061.5282
 mapric@mapric.com.br www.mapric.com.br