



Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Ariane Harumi Yoshikawa

Perfil Fitoquímico e Citotóxico do Extrato Alcoólico de Folhas da Manga (*Mangifera indica*) como Alternativa Terapêutica em Processos Inflamatórios

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto para obtenção do Título de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas.

São José do Rio Preto

2023

Ariane Harumi Yoshikawa

Perfil Fitoquímico e Citotóxico do Extrato Alcoólico
de Folhas da Manga (*Mangifera indica*) como
Alternativa Terapêutica em Processos Inflamatórios

Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina de São José do Rio Preto
para obtenção do Título de Mestre no
Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde, Eixo Temático:
Medicina e Ciências Correlatas.

Orientadora: Profa. Dra. Dorotéia Rossi Silva Souza

São José do Rio Preto

2023

Yoshikawa, Harumi Arianne

Perfil fitoquímico e citotóxico do extrato alcoólico de folhas de Manga (*Mangifera indica*) como alternativa terapêutica em processos inflamatórios / Arianne Harumi Yoshikawa

São José do Rio Preto, 2023

91p.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP

Eixo temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientadora: Profa. Dra. Dorotéia Rossi Silva Souza

1. *M. Indica*; 2. Peritonite; 3. Anexina A1; 4. NF-κB; 5. Citocinas.

Ariane Harumi Yoshikawa

Perfil Fitoquímico e Citotóxico do Extrato Alcoólico
de Folhas da Manga (*Mangifera indica*) como
Alternativa Terapêutica em Processos Inflamatórios

BANCA EXAMINADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE
MESTRE

Presidente e Orientador: Prof.^a Dr.^a Dorotéia Rossi Silva Souza

2º Examinador: Prof.^a Dr.^a Helena Ribeiro Souza

3º Examinador: Prof.^a Dr.^a Érika Cristina Pavarino

Suplentes: Prof. Dr. Lucas Possebon

Prof.^a Dr.^a Alessandra Vidotto

São José do Rio Preto, 24/03/2023.

Sumário

Dedicatória	ii
Agradecimentos	iii
Epígrafe	v
Lista de Figuras	vi
Lista de Tabelas e Quadros	ix
Lista de Abreviaturas e Símbolos	x
Resumo	xiv
Abstract	xvii
1. Introdução	1
1.1 O Processo Inflamatório e a Peritonite	2
1.2 Fitoterapia e Atividade Anti-Inflamatória de <i>Mangifera indica</i>	7
2. Objetivos	12
2.1 Objetivo Geral	13
2.2 Objetivos Específicos	13
3. Material e Métodos	14
3.1 Aspectos Éticos	15
3.2 Infraestrutura e Coleta de Dados	15
3.3 Métodos de Avaliação	15
3.3.1 Obtenção de extrato alcoólico e fração de acetato de etila	15
3.3.2 Identificação de taninos totais	16
3.3.3 Identificação de saponinas	17
3.3.4 Identificação e quantificação de compostos fenólicos	17

3.3.5 Identificação e quantificação de alcaloides	18
3.3.6 Avaliação da atividade antioxidante	18
3.3.7 Perfil cromatográfico dos extratos	19
3.3.8 Avaliação de citotoxicidade	21
3.3.9 Ensaio da membrana corioalantoide (CAM): efeito toxicológico e na angiogênese	22
3.3.10 Modelo de peritonite, protocolo de tratamento e avaliação.	23
3.3.11 Análise de proteína C reativa – PCR	24
3.3.12 Análise de citocinas	24
3.3.13 Análise de anexina A1	25
3.3.14 Análise de NF-Kb	26
3.4 Análises Estatísticas	26
4. Resultados	28
4.1 Fitoquímicos de Interesse Farmacológico com Atividades Antioxidante e Anti-Inflamatória em EB e AE	29
4.2 Mangiferina é o Principal Composto em AE	32
4.3 AE é Menos Citotóxico que EB	32
4.4 Tratamento com AE Reduz Parâmetros Inflamatórios em Modelo de Peritonite <i>in Vivo</i>	34
5. Discussão	40
6. Conclusões	49
7. Referências Bibliográficas	52
8. Anexos	65

DEDICATÓRIA

Dedicatória

Dedico este trabalho a minha avó Maria Trajano Santana (in memoriam) e tia bisavó Francisca Batista de Assis (in memoriam). Serei eternamente grata por cada ensinamento, por me tornarem quem sou.

Agradecimentos

Primeiramente, agradecer a Deus por esta oportunidade, qual saio mais madura e responsável.

À FAMERP e à Pós-Graduação em Ciências da Saúde, parte integrante do meu currículo e aprendizado.

À minha orientadora, Profa. Dra. Dorotéia Rossi Silva Souza, pela oportunidade dada à realização deste mestrado. Muito obrigada por todo o apoio e confiança depositados em mim.

À Profa. Dra. Ana Paula Girol, por ter aceitado fazer parte desta jornada e como sempre com todo o seu cuidado e carinho por mim.

Aos membros da banca examinadora do meu exame geral de qualificação, Profa. Dra. Sheila de Freitas e Profa. Dra. Érika Pavarino pelas valiosas sugestões que foram enriquecedoras para este trabalho.

À UNIFIPA por me ceder o espaço necessário para o desenvolvimento deste trabalho, juntamente ao CEPEC pelo fomento utilizado.

À Profa. Dra. Andréia de Haro Moreno que me introduziu à pesquisa e mostrou como os fitoterápicos são fascinantes desde a graduação, sendo minha inspiração.

Aos amigos do Laboratório Multidisciplinar – UNIFIPA: Melina Misuzaki Pilon, Sara de Souza Costa, Isabella Gomes e Mariana Balie que me apoiaram e abraçaram durante essa caminhada. Muito obrigada a todos por cada momento, amparo, dica e suporte durante essa empreitada. Lucas Possebon e Helena Souza Ribeiro que mais do que ninguém seguraram a minha mão quando pensei que não iria conseguir, mostraram-me os diversos lados desta vida acadêmica, riram e choraram comigo durante o processo.

Aos meus amigos do trabalho Juarez Pereira e Cristiane Pereira do Carmo que me ajudaram em tudo o que foi possível e sempre estiveram ao meu lado com uma palavra de conforto e um ombro amigo; sou grata a Deus por vocês.

Aos meus pais Gerson Yoshikawa e, em especial, à minha mãe Adriana Santana Yoshikawa, que nunca mediram esforços para que eu pudesse estudar e assim realizar os mais diversos sonhos que tenho; sou eternamente grata por cada palavra de consolo e motivação. Agradeço muito a Deus por ser sua filha, também agradeço ao meu irmão Guilherme Santana Yoshikawa, que do seu jeito me suportou em todas as fases deste projeto.

Agradeço ao Laboratório Multiusuário (LMU) da FAMERP, pelo suporte na utilização do Magpix.

Agradeço à Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP), em especial, à técnica Vânia Blasques Bueno, pelas sugestões e pelo auxílio com o HPLC.

Enfim, agradeço imensamente a cada um que diretamente ou indiretamente contribuiu para que esta dissertação fosse concretizada.

Epígrafe

"Você não compreende agora o que estou fazendo a você;
mais tarde, porém, entenderá" (João 3:7).

Lista de Figuras

- Figura 1.** Ilustração do processo inflamatório na peritonite. 6
- Figura 2.** Visão simplificada das principais rotas de biossíntese dos três grupos de metabólitos secundários do carbono. 8
- Figura 3.** Ilustração simplificada da via de sinalização do fator nuclear kappa B (NF- κ B), com a modulação da mangiferina. (TLR – Receptores Toll-Like, IKK γ – Complexo enzimático I-kappa B quinase, P – Fosforilação, Ub – Ubiquitinação, NF- κ B- Fator Nuclear Kappa B, IL 10– Interleucina 10, IL 8 – Interleucina 8, IL 1 β – Interleucina 1 Beta, TNF- α - Fator de Necrose Tumoral Alfa, COX2 - Ciclooxigenase 2 e ANXA1 – Anexina A1). 11
- Figura 4.** Compostos químicos presentes no extrato bruto de folhas de *Mangifera indica* (puro) e na fração de acetato de etila (AE) (setas), detectados por cromatografia em camada delgada de alta eficiência (HPTLC): catequina (A-B), quercetina (C-D); ácido gálico (E-F); berberina(G-H). 31
- Figura 5.** Concentração de mangiferina na fração acetato de etila do extrato bruto de folhas de *Mangifera indica*. 32
- Figura 6.** Curva de citotoxicidade in vitro de (EB) extrato bruto de folhas de *Mangifera indica* e (AE) extrato acetato de etila. 33
- Figura 7.** Análise da membrana corioalantoide (CAM) em *Gallus gallus*. (A) Controle – Ovo que recebeu soro. (B) Ovo exposto ao extrato bruto (EB) a 10 %; (C) Ovo submetido a fração acetato de etila (AE) a 10 %. (D) Concentração de vasos sanguíneos em membranas corioalantoides expostas a EB, AE e controle. 33
- Figura 8.** Nível de citocinas no lavado peritoneal e plasma, respectivamente, 36

em animais com peritonite induzida por endotoxinas (PIE) e grupo com peritonite tratado com acetato de etila (PIE+TAE), assim como, grupo controle. (A, B) MCP-1; (C, D) TNF- α ; (E, F) IL-1 β ; (G, H) IL-6; (I, J) IL-10.

Figura 9. Nível plasmático da proteína C reativa (PCR) em animais com peritonite induzida por endotoxinas (PIE) e grupo com peritonite tratado com acetato de etila (PIE+TAE), assim como, grupo controle. 37

Figura 10. Nível de leucócitos no peritônio de animais com peritonite induzida por endotoxinas (PIE) e grupo com peritonite tratado com acetato de etila (PIE+TAE), assim como, grupo controle. (A) Monócitos extravasados para a cavidade peritoneal. (B) Polimorfos nucleados extravasados para a cavidade peritoneal. 37

Figura 11. Análise da anexina A1(AnxA1) por Western blotting. (A) Mesotélio; (B) Intestino; (C) α -tubulina usada como peso molecular no mesentério; (D) no intestino; (E) Representação da imunomarcacão da AnxA1 no mesentério; (F) no intestino. 38

Figura 12. Análise da imunomarcacão do fator nuclear kappa B (NF- κ B) no núcleo de células mesoteliais de animais (controle - A), no grupo com peritonite induzida por endotoxinas (PIE - B), e no grupo com PIE e tratamento com acetato de etila (PIE+TAE - C). (D) Imunorreatividade confirmada pelo controle de reação com ausência do anticorpo primário. Setas indicam núcleos das células mesoteliais. (E) Densitometria do NF- κ B no núcleo celular. 39

Figura 13. Atuação da AE (fração Acetato de Etila) no modelo de Peritonite. 1 – Aplicação do modelo de peritonite induzido por LPS (lipopolissacarídeo) por I.P. 2- Receptor Toll like 4 do mesotélio da cavidade reconhece LPS e deflagra o processo inflamatório pela ativação do NF- κ B. 3 – Ocorre a liberação de citocinas e mediadores pró-inflamatórios no peritônio e circulante. 4- Extravasamento de leucócitos no peritônio. Mas quando aplicamos a AE 1h 48

antes do modelo, a mangiferina atua sob a via de NF- κ B impedindo a continuidade do processo inflamatório.

Lista de Tabelas e Quadros

- Tabela 1.** Compostos químicos presentes no extrato bruto de folhas de *Mangifera indica* por testes fitoquímicos qualitativos. 30
- Tabela 2.** Compostos químicos presentes no extrato bruto de folhas de *Mangifera indica* (EB) e na fração de acetato de etila (AE), detectados por testes fitoquímicos quantitativos. 31

Lista de Abreviaturas e Símbolos

° C	Celsius
%	Porcentagem
µg	Micrograma
µm	Micrômetro
AE	Fração Acetato de Etila
AlCl₃	Cloreto de Alumínio
ANXA1	Anexina A1
CAM	Chorioallantoic membrane assay
CD14	Cluster of differentiation 14
CEPEC	Centro de Pesquisa Experimental e Clínica
CEUA	Comissão de Ética para o Uso de Animais
Cm	Centímetro
COX2	Ciclooxigenase 2
DAB	3,3'-Diaminobenzidina
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
DAMPS	Padrões Moleculares Associados a Danos
EB	Extrato Bruto
FAMERP	Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
H	Horas
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HPTLC	High Performance Thin Layer Chromatography
I.P.	Intraperitoneal

IKK	I kappa B quinase
IKKy	Complexo enzimático I-kappa B quinase gama
IKKα	I-kappa B quinase alfa
IKKβ	I-kappa B quinase beta
Ik$\beta$$\alpha$	I-kappa B quinase beta alfa
IL	Interleucina
IL 10	Interleucina 10
IL 1β	Interleucina 1 Beta
IL 8	Interleucina 8
IQ-USP	Instituto de Química da Universidade de São Paulo
L	Litros
LMU	Laboratório Multiusuário
LPS	Lipopolissacarídeo
MCP-1	Proteína quimioatraente de monócitos
MD-2	Proteína mielóide de diferenciação-2
Mg	Miligrama
Min	Minuto
mL	Mililitro
Mm	Milímetro
N	Nitrogênio
N	Normal
N	Amostra
NaCO₃	Carbonato de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio

NEMO	Nuclear factor κ B essential modulator
NF-κB	Fator Nuclear Kappa B
NK	Natural Killer
nL	Nanolitro
NLRP3	Pyrin domain-containing protein 3
Nm	Nanometro
NP-PEG	Natural products-polyethylene glycol reagente
P	Fosforilação
PAMPS/MAMPS	Padrões moleculares associados a patógenos
PBS	Soro Fetal Bovino
PCR	Proteína C reativa
Pg	Picrograma
pH	Potencial hidrogeniônico
PIE	Peritonite Induzida por Endoxina
PRR	Receptores de reconhecimento padrão
Psi	Pound force per square inch
RMN	Ressonância magnética nuclear
Rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
S.E.M	Standard error of the mean
TAE	Tratamento com a fração Acetato de Etila
TLR	Receptores Toll-Like
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
Ub	Ubiquitinação

UDPE Unidade de Pesquisa Experimental

UNIFIPA Centro Universitário Padre Albino

Resumo

Introdução – É crescente o interesse científico no desenvolvimento de fitoterápicos; destacando-se a Manga (*Mangifera indica*) com estudos que comprovam suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes. Nesse contexto tornam-se necessárias investigações sobre a sua eficácia como alternativas terapêuticas é necessária. **Objetivos** – Padronizar e caracterizar o extrato alcoólico (extrato bruto-EB) de folhas de *Mangifera indica* (manga) e fração acetato de etila (AE) e avaliar os efeitos de citotoxicidade, angiogênese, antioxidante e anti-inflamatório em modelo de peritonite. **Material e Métodos** – EB de folhas secas de *Mangifera indica* foi obtido por percolação, e a fração AE preparada com EB removendo-se a parte orgânica. EB e AE foram submetidos à análise qualitativa e por cromatografia (HPTLC e HPLC) para identificação de compostos. A citotoxicidade foi avaliada *in vitro* por hemólise, e *in vivo* pelo teste da membrana corioalantoide de ovo de *Gallus gallus*, também analisada em relação à angiogênese. O efeito anti-inflamatório foi avaliado em ratos da linhagem *Wistar*, com seis semanas, incluindo Grupo Controle: sem peritonite; Grupo Induzido: com peritonite por endotoxinas (PIE); Grupo PIE+TAE: PIE tratado com AE (TAE). Realizou-se a análise de leucócitos no lavado peritoneal, além de citocinas, proteína C reativa (PCR) e anexina A1 em intestino e plasma, assim como, fator nuclear kappa B (NF-κB) no mesotélio por imunomarcacão e densitometria. Admitiu-se um nível de significância para valor $P < 0,05$. **Resultados** – Saponinas, flavonoides, taninos e alcaloides foram detectados em ambos os extratos, com alcaloides em maior concentração em EB (115 µg/mL; AE = 53,158 µg/mL. A atividade antioxidante de AE e EB foi

91% e 89,4%, respectivamente. A análise por HTPLC mostrou catequina, quercetina, ácido gálico e berberina, em ambos os extratos. Mangiferina foi observada em alta concentração, particularmente, em EB 10% (3.055,43 ug/mL; AE=1.170,34 ug/mL. A citotoxicidade foi menor para AE, comparada à EB *in vitro*, assim como, *in vivo*. Notou-se maior concentração de vasos sanguíneos nas membranas corioalantoides que receberam EB, comparado a AE e controles ($P<0,001$). O lavado peritoneal no Grupo PIE+TAE mostrou valor reduzido de proteína quimiotática de monócitos -1 (MCP-1), comparado a PIE ($P<0,01$). No plasma, o mesmo foi observado para todas as citocinas pró-inflamatórias ($P<0,001$). A interleucina-10 (IL-10), anti-inflamatória, mostrou semelhança entre os Grupos PIE e PIE+TAE, em lavado e plasma ($P>0,05$), mas aumento em PIE+TAE, versus controle ($P<0,05$), e PIE no plasma ($P<0,001$). Houve redução no nível sérico de PCR no PIE+TAE ($2,6\pm1,09\text{mg/L}$; PIE= $12,1\pm4,47\text{mg/L}$, assim como, leucócitos na cavidade peritoneal ($P<0,05$). PIE mostrou aumento de NF- κ B versus PIE+TAE ($P<0,05$) e controle ($P<0,001$). A expressão da anexina A1 aumentou em PIE e PIE+TAE ($P<0,001$) no mesentério, enquanto no intestino aumentou em PIE ($P<0,05$) e diminuiu para PIE+TAE, versus controle ($P<0,001$). **Conclusão** – A fração AE de extrato de folhas de *Mangifera indica* destaca-se com baixa citotoxicidade, assim como, também de angiogênese; maior atividade antioxidante e ambos pela presença de compostos bioativos. Ressalta-se a capacidade anti-inflamatória da fração AE no tratamento de peritonite em modelo animal. Este estudo contribui no esclarecimento das propriedades e efeitos de *Mangifera indica* e permiti ampliar as propostas de sua aplicação terapêutica.

Palavras-chave: *M. indica*, Peritonite, Anexina A1, NF- κ B, Citocinas.

Abstract

Introduction - The scientific interest on the development of phytotherapeutics is growing, highlighting Mango (*Mangifera indica*) according to studies proving its anti-inflammatory and antioxidant properties; therefore new investigations on its effectiveness as therapeutic alternatives are necessary. **Objectives**- To standardize a as well as to characterize the alcoholic extract (crude extract-EB) of *Mangifera indica* (mango) leaves and ethyl acetate (AE) fraction, and to evaluate their cytotoxicity, angiogenesis, antioxidant and anti-inflammatory effects. **Material and Methods** - EB from dried leaves of *Mangifera indica* was obtained by percolation, and the AE fraction prepared with EB by removing the organic part. EB and AE were submitted to qualitative analysis and by chromatography (HPTLC and HPLC) for identification of compounds. The cytotoxicity was evaluated *in vitro* by hemolysis, and *in vivo* by Gallus gallus egg chorioallantoid membrane test, also analyzed for angiogenesis. The anti-inflammatory effect was evaluated in 6-week-old Wistar rats, including Control Group: without peritonitis; Induced Group: with endotoxin peritonitis (PIE); PIE+TAE Group: PIE treated with AE (TAE). Analysis of leukocytes in the peritoneal lavage was performed, as well as cytokines, C-reactive protein (CRP) and annexin A1 in intestine and plasma, and nuclear factor kappa B (NF- κ B) in the mesothelium by immunolabeling and densitometry. Significance level was admitted for P-value <0.05. **Results** - Saponins, flavonoids, tannins and alkaloids were detected in both extracts, with alkaloids in higher concentration in EB (115 μ g/mL; AE = 53,158 μ g/mL. The antioxidant activity of AE and EB

was 91% and 89.4%, respectively. HPLC analysis showed catechin, quercetin, gallic acid and berberine in both extracts. Mangiferin was observed in high concentration particularly in EB 10% (3,055.43 ug/mL; AE=1,170.34 ug/mL. Cytotoxicity was lower for AE as compared to EB *in vitro* as well as *in vivo*. Higher concentration of blood vessels was noted in the chorioallantoid membranes that received EB, compared to AE and controls ($P<0.001$). Peritoneal lavage in the PIE+TAE Group showed reduced value of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), compared to PIE ($P<0.01$). In plasma, the same was observed for all pro-inflammatory cytokines ($P<0.001$). The anti-inflammatory interleukin-10 (IL-10) showed similarity between PIE and PIE+TAE Groups, in lavage and plasma ($P>0.05$), but increase in PIE+TAE, versus control ($P<0.05$), and PIE in plasma ($P<0.001$). There was a reduction in serum CRP level in PIE+TAE ($2.6\pm1.09\text{mg/L}$; PIE= $12.1\pm4.47\text{mg/L}$, as well as leukocytes in the peritoneal cavity ($P<0.05$). PIE showed increased NF- κ B versus PIE+TAE ($P<0.05$) and control ($P<0.001$). Annexin A1 expression increased in PIE and PIE+TAE groups ($P<0.001$) in the mesentery, while in the intestine it increased in PIE ($P<0.05$) and decreased for PIE+TAE, versus control ($P<0.001$). **Conclusion** - Fraction AE of *Mangifera indica* leaf extract stands out with low cytotoxicity, as well as low angiogenesis, higher antioxidant activity and both due to the presence of bioactive compounds. The anti-inflammatory capacity of the AE fraction can be point out in the treatment of peritonitis in an animal model. This study has provided insight into the properties and effects of *Mangifera indica* and allowed the widening of the possibilities for its therapeutic application.

Keywords: *M. Indica*, Peritonitis, Annexin A1, NF-kB, Cytokines.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1 O Processo Inflamatório e a Peritonite

O processo inflamatório é uma resposta complexa do organismo animal a qualquer dano, causado por lesão ou infecção. Apresenta como sinais clássicos calor, rubor, inchaço, dor e perda da função. Este processo caracteriza-se por vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e extravasamento de leucócitos, dentre outros sintomas. Apesar da inflamação ser uma resposta protetora do organismo, se exacerbada, pode causar lesões teciduais e ocasionar perda de função.⁽¹⁻⁴⁾

Nesse contexto, destacam-se mediadores moleculares, tais como, citocinas, sendo as principais as interleucinas (IL)-1 β , IL-6, IL-10, o fator de necrose tumoral (TNF)- α e a quimiocina proteína quimiotática de monócitos- (MCP)-1.^(1,2,4,5) Estes mediadores são inicialmente liberados por células que captam moléculas relacionadas a infecção por patógenos ou dano celular conhecidos, respectivamente, como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPS/MAMPS) e a danos (DAMPS). Endotélios e leucócitos reconhecem PAMPS e DAMPS por possuírem nas membranas receptores de reconhecimento padrão (PRRs).⁽⁶⁾

O lipopolissacarídeo (LPS) encontrado na membrana externa da parede celular de *Escherichia coli* é um exemplo de PAMP. Reconhecido por receptores Toll (TLR), um PRR encontrado em diversos endotélios, promove cascatas de eventos intracelulares que induzem a liberação de mediadores

inflamatórios por essas células, causando o início de inflamação com atração de leucócitos. ^(1, 4, 5, 7)

Ressalta-se que as citocinas são peptídeos estimulados antigenicamente, que atuam na própria célula produtora (ação autócrina), em células próximas (ação parácrina) ou em células distantes (ação endócrina), sendo as interleucinas produzidas por leucócitos. As citocinas iniciam suas ações pela ligação aos receptores de membrana específicos nas células alvo. Sinais externos regulam a expressão de receptores de citocinas às respostas celulares e para a maioria das citocinas constituem em alterações na expressão gênica em células-alvo. ⁽⁵⁾

Várias citocinas e quimiocinas participam do processo inflamatório, entre elas o TNF- α , uma citocina produzida por macrófagos, células T, células natural killer (NK) e mastócitos. A ligação do TNF- α aos seus receptores ativa fatores de transcrição dentre eles Fator Nuclear Kappa B (NF- κ B), além de atrair e ativar neutrófilos e mastócitos. Já o MCP-1, é uma quimiocina, que atrai macrófagos e mastócitos e regula a migração de leucócitos do sangue para os tecidos mediante ativação de integrinas dos leucócitos. ⁽⁵⁾

A IL-1 β apresenta função semelhante ao TNF, atua em conjunto na imunidade natural e adquirida e o seu efeito depende da sua concentração no local. Por meio da ligação a receptores de membrana, também pode ativar a via do NF- κ B e estimular linfócitos. Outra citocina importante em respostas inflamatórias agudas com ação local e sistêmica é a IL-6, sintetizada por fagócitos, entre outros tipos celulares. Induz a síntese de uma variedade de outros mediadores inflamatórios; estimula a produção de neutrófilos na medula

óssea; expande e ativa células T; promove a diferenciação de células T produtoras de IL-17 e a maturação de células B. Diferentemente, a IL-10 é uma citocina anti-inflamatória inibidora de macrófagos, reguladora de reações inflamatórias, produzida por tipos celulares não linfocitoides, como os queratinócitos. ^(5,8)

Adicionalmente, outros mediadores iniciam alterações na concentração de algumas proteínas plasmáticas, também chamadas reagentes de fase aguda, como por exemplo, a proteína C reativa (PCR), que é liberada pelos hepatócitos após a estimulação pelas citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e IL-6) e liberadas para a corrente sanguínea. A avaliação das concentrações destas proteínas plasmáticas proporciona uma valiosa informação sobre as doenças inflamatórias, e pode ser utilizada não apenas para diagnóstico, mas também para monitoração da evolução e resposta ao tratamento. ⁽⁵⁾

Destaca-se, ainda, a proteína anexina A1 que induz morte de neutrófilos e impede o extravasamento desses, de caráter anti-inflamatório e expresso em diversos tipos celulares, dentre eles leucócitos, exceto o linfócito B. Apresenta sítios de ligação para cálcio e fosfolipídios de membrana, está envolvida na inibição da síntese de eicosanóides e fosfolipase A2 induzida por glicocorticóides.⁽⁹⁾ Ressalta-se a ampla utilização da anexina A1 em experimentos envolvendo inflamação.⁽¹⁰⁾ Outro aspecto interessante a se considerar é que a sua expressão pode ser modulada pela administração de fitoterápicos. ^(11,12)

Nesse contexto, para estudo do processo inflamatório foram estabelecidos modelos sem necessidade de indução de infecções por

microrganismos, como indução de inflamação por endotoxinas que ativam PRRs. Entre as condições inflamatórias facilmente induzíveis está a peritonite, uma inflamação da cavidade peritoneal que causa irritação nos órgãos gastrointestinais (Figura 1). Nesse caso, é comumente usado o modelo de peritonite induzido por LPS, composto por três componentes: o lipídio A (porção principal hidrofóbica que responde pela maior parte dos efeitos imunomoduladores), o núcleo de oligossacarídeo e o antígeno O. ⁽⁸⁾

No modelo, a toxina é injetada no peritônio de animais saudáveis e reconhecida pelo TLR-4 presente no endotélio que recobre essa cavidade. ^(1,4,7) Nesse caso, há envolvimento de macrófagos e de um complexo receptor formado por a) TLR4; b) duas glicoproteínas solúveis secretadas MD-2 (proteína mielóide de diferenciação-2) que funcionam como um correceptor extracelular do TLR4, e c) o CD14 (*cluster of differentiation* = grupamento de diferenciação 14), uma proteína componente do sistema imune inato encontrado tanto na forma solúvel como na superfície celular, que finaliza a sequência de transferência para o complexo TLR4/MD-2. Após a ligação do LPS ao complexo, ocorre a dimerização do receptor composta por TLR4, MD-2 e LPS, desencadeando a ativação da cascata de sinalização. ⁽⁷⁾

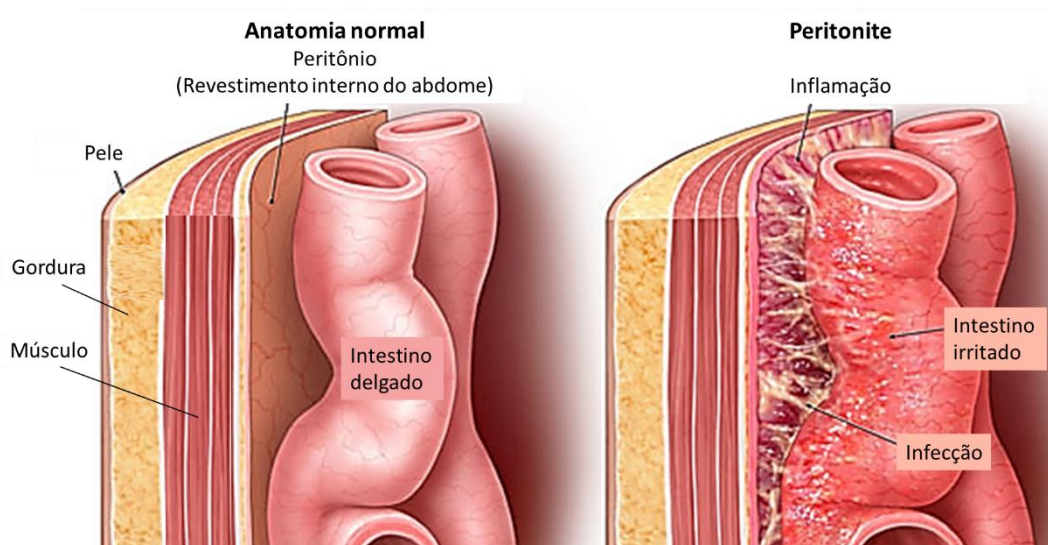


Figura 1: Ilustração do processo inflamatório na peritonite. (<http://www.medicalexhibits.com>).⁽¹³⁾

Para controlar inflamações exacerbadas ou crônicas, anti-inflamatórios esteroides são comumente ministrados, no entanto, esses mediadores causam diversos efeitos colaterais a longo prazo como obesidade, glaucoma, catarata, osteoporose, hipercoagulabilidade do sangue, perda de cálcio, entre outros.⁽¹⁴⁾ Nesse sentido, a pesquisa por novas estratégias terapêuticas tem sido ampliada e os fitoterápicos ganham cada vez mais destaque. Em estudos realizados no modelo de peritonite induzida por LPS, trataram camundongos com fração de Jabuticaba-de-cipó (*Polygala sabulosa*), enquanto outro propôs o tratamento com extrato de folhas de Romã (*Punica granatum*) em ratos. Em ambos os trabalhos, nos grupos tratados com extratos fitoterápicos, via gavagem intragástrica, houve redução da inflamação nos parâmetros analisados, como quantificação de leucócitos extravasados para a cavidade e citocinas inflamatórias.^(1,14)

1.2 Fitoterapia e Atividade Anti-Inflamatória de *Mangifera indica*

Para o tratamento de inflamações, o uso de plantas medicinais pela população, em geral, como terapia alternativa para muitas doenças é secular. Contudo, o interesse científico em comprovar a eficácia das ervas medicinais e desenvolver fitoterápicos aumentou significativamente em todo o mundo nos últimos anos. ⁽¹⁵⁾ Várias plantas na forma de extratos, decocção ou óleos essenciais como passiflora, guaco, espinheira-santa, isoflavona-de-soja, barbatimão, entre outros são indicadas na Medicina popular como anti-inflamatórias, antimicrobianas, cicatrizantes, antioxidantes e antitumorais. ⁽¹⁵⁻¹⁷⁾

A atividade farmacológica dos fitoterápicos, geralmente, é ocasionada pela presença de compostos do metabolismo secundário (produtos naturais) das plantas. As principais classes desses metabólitos são terpenos, compostos sintetizados na via do ácido mevalônico e compostos fenólicos sintetizados a partir do ácido malônico. Destacam-se entre as subclasses de fenóis cumarinas, flavonoides, xantonas e ácidos aromáticos. Assim como, os compostos nitrogenados, sintetizados a partir de aminoácidos, sendo os alcaloides a principal subclasse (Figura 2). ⁽¹⁸⁾ As funções biológicas destes compostos ocorrem por interação com receptores ou enzimas animais, e consequente inibição de rotas de sinalização molecular.

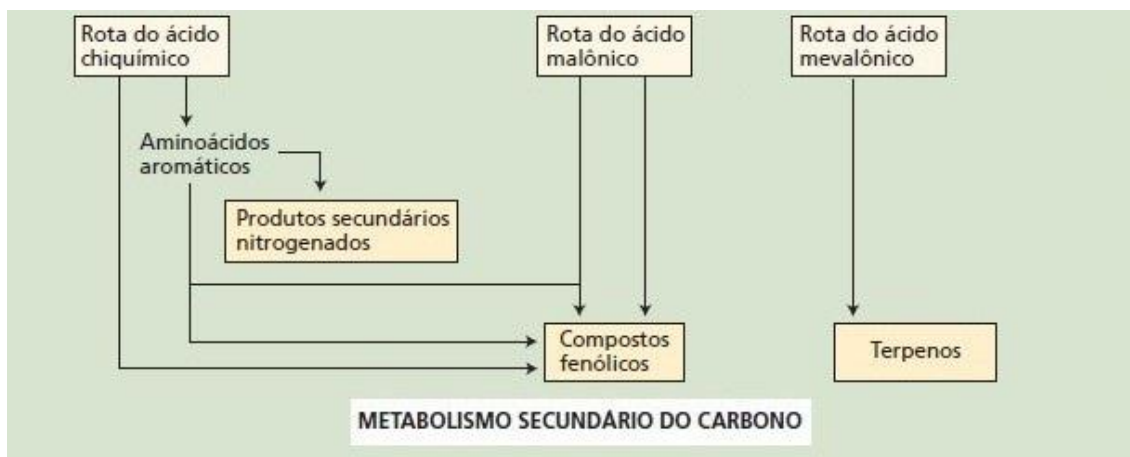


Figura 2. Visão simplificada das principais rotas de biossíntese dos três grupos de metabólitos secundários do carbono. Adaptado de Taiz et al. ⁽¹⁸⁾

No Brasil, a utilização de plantas medicinais no tratamento de diferentes condições clínicas é uma prática comum e, atualmente, alguns medicamentos fitoterápicos estão disponíveis na rede farmacêutica e nas instituições de saúde. ^(17,19) Nesse contexto, têm sido ampliadas as investigações sobre a eficácia de fitoterápicos como alternativas ou adjuvantes no tratamento de diferentes doenças.

Dentre as plantas promissoras destaca-se a *Mangifera indica* (manga) da família *Anacardiaceae*, composta por 76 gêneros e 600 espécies, com produção concentrada na Ásia, seguida pela América e África. A manga é rica em minerais essenciais para o homem como cálcio, potássio, magnésio, ferro e zinco, além de fibras e vitaminas diversas. ^(20,21) Também apresenta terpenos, polifenóis e alcaloides, entre outros compostos, sendo considerada uma das frutas com maior valor nutricional. ^(20,22) Pesquisas têm comprovado as propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas, antitumorais e antioxidantes da *Mangifera indica*. ^(23,24) Contudo, ainda são escassos os estudos envolvendo extração alcoólica e frações em testes anti-inflamatórios *in vitro* e *in vivo*, visto que as investigações, em geral, trabalham com sua extração aquosa. ⁽²⁵⁾

A mangiferina é um composto polifenol, uma xantona C- glicosilada (2-C-b-D-glicopirasonil-1,3,6,7-tetrahidroxi-xantona), encontrada em diversas espécies de manga. Reconhecidamente, compõe grande porcentagem dos compostos fenólicos da *Mangifera indica*, sendo detectada no fruto, casca e folha, dentre outros órgãos vegetais.⁽²⁶⁾ Os estudos sobre a mangiferina foram iniciados , em 1956, quando foi isolada por Shun Iseda e, em 1968, teve sua estrutura confirmada por meio da técnica de ressonância magnética nuclear (RMN), por Haynes e Taylor.⁽²⁷⁾

Devido aos seus atributos, hoje a mangiferina é isolada e comercializada na forma de fitoterápico. É utilizada como um suplemento alimentar e cosmético, em diversas formas: comprimidos, suspensão oral, pomadas e afins, com extração aquosa denominada VIMANG®. Em Cuba é administrada para tratar diversas doenças, principalmente estresse e doenças inflamatórias, com eficácia demonstrada em testes e ensaios pré-clínicos.^(25,28–30)

Na década de 70, foi reconhecido inicialmente o efeito da mangiferina na redução do processo oxidativo.⁽³¹⁾ Em amplo levantamento de literatura sobre esse composto (1968-2022) foram registrados 987 artigos publicados. No entanto, os estudos da mangiferina e inflamação iniciaram-se em 2004, com a citação da ação da molécula na expressão de macrófagos e de diversos genes ligados ao NF-κB.⁽³²⁾

A mangiferina age contra os efeitos nocivos de radicais livres, atuando em tratamentos preventivos e ou terapêuticos com ação em diversos órgãos ou tecidos como neurônios, coração, fígado, rins e estômago. Doadores de elétrons são capazes de inibir o processo de oxidação por meio da inativação

de radicais livres, como ânions superóxidos e radicais de peróxidos, tornando as moléculas estáveis ou criando complexos antioxidantes.⁽³³⁾

Destaca-se também o efeito anti-inflamatório da mangiferina pela sua relação com NF- κ B, que representa uma família de fatores de transcrição induzíveis, capazes de regular genes envolvidos na resposta imune e inflamatória (controle da proliferação celular e apoptose).⁽³⁴⁾ A ativação de NF- κ B depende da ação do complexo IKK (I kappa B quinase) formado por IKK α e IKK β e uma subunidade reguladora denominado modulador essencial NF- κ B (NEMO) ou IKK γ . A fosforilação de IKB desencadeia a degradação da subunidade IK β α e a translocação nuclear de NF- κ B. No núcleo NF- κ B promove a transcrição de genes de resposta imune, como citocinas inflamatórias que, depois são liberadas pela célula.⁽³²⁾

No processo inflamatório, a mangiferina atua sob o complexo de IKK, bloqueando a fosforilação e degradação da subunidade IK β α e, assim, impedindo a ativação da via NF- κ B (Figura 3).⁽³⁵⁾ Adicionalmente, bloqueia o TNF que ativa NF- κ B e inibe também sua ativação induzida por outros agentes inflamatórios.^(36,37)

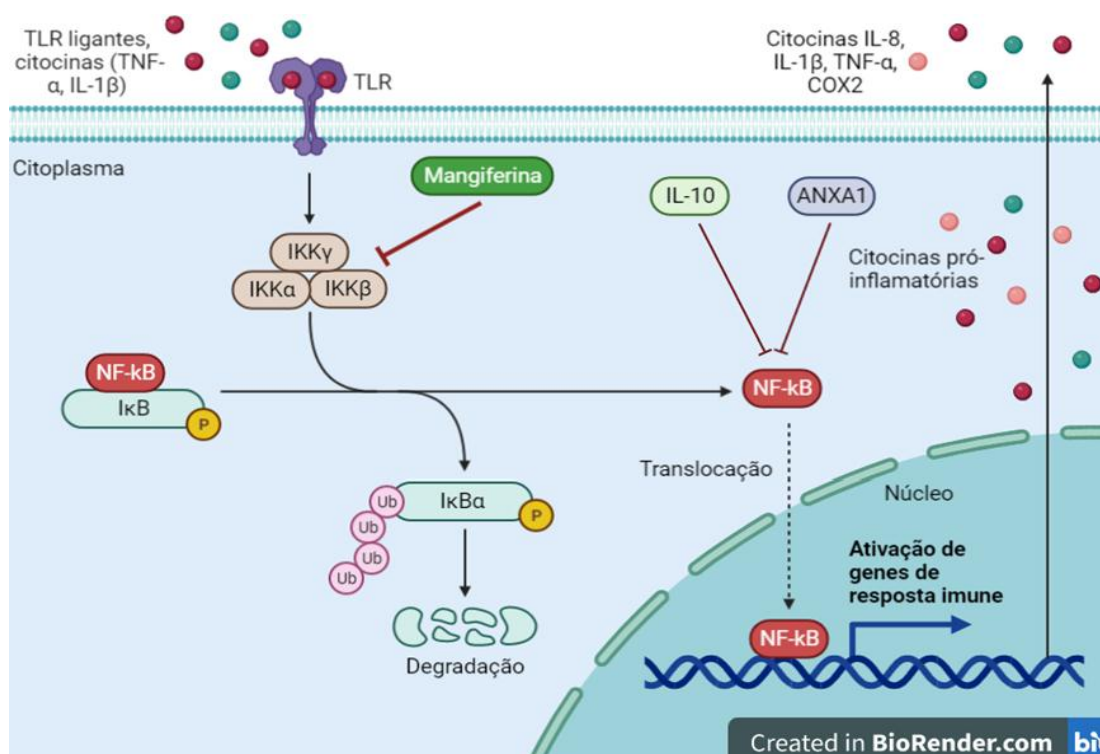


Figura 3. Ilustração simplificada da via de sinalização do fator nuclear kappa B (NF-κB), com a modulação da mangiferina. (TLR – Receptores Toll-Like, IKKγ – Complexo enzimático I-kappa B quinase, P – Fosforilação, Ub – Ubiquitinação, NF-κB- Fator Nuclear Kappa B, IL 10– Interleucina 10, IL 8 – Interleucina 8, IL 1β – Interleucina 1 Beta, TNF-α- Fator de Necrose Tumoral Alfa, COX2 - Ciclooxygenase 2 e ANXA1 – Anexina A1).

Diante do exposto, a caracterização fitoquímica e citotóxica e o reconhecimento das propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes do extrato de folhas de *Mangifera indica*, em modelo animal de peritonite, poderão esclarecer seus efeitos fitoterápicos e contribui no desenvolvimento de novas formulações e opções terapêuticas.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Padronizar e caracterizar o extrato alcoólico de folhas de *Mangifera indica* e avaliar os efeitos da sua administração em modelo de peritonite.

2.2 Objetivos Específicos

1. Identificar compostos fitoquímicos no extrato bruto (EB) de folhas de *Mangifera indica*.
2. Avaliar a atividade antioxidante de EB e fração de acetato de etila (AE).
3. Quantificar compostos fitoquímicos em EB e fração AE.
4. Avaliar o efeito citotóxico in vitro e in vivo em membrana corioalantoide de ovos fertilizados de *Gallus gallus* expostos ao extrato EB e fração AE.
5. No modelo de peritonite induzida por LPS e tratamento com fração AE: analisar a expressão da proteína anti-inflamatória anexina A1 (mesentério e intestino) e NF- κ B (intestino), dosar PCR no soro, bem como, mediadores pró-inflamatórios (MCP- 1, TNF- α , IL-1 β e IL-6) e citocina anti-inflamatória IL-10 no lavado peritoneal e plasma.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

3. Material e Métodos

3.1 Aspectos Éticos

Os procedimentos experimentais foram realizados na Unidade de Pesquisa Experimental (UDPE-UNIFIPA) e conduzidos de acordo com as normas da Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA-UNIFIPA) aprovação Nº 02/20 (Anexo1).

3.2 Infraestrutura e Coleta de Dados

Os procedimentos foram realizados na UDPE, nos Laboratórios Multidisciplinares I e II e Laboratório de Cirurgia Experimental da UNIFIPA-Catanduva; no Laboratório Multiusuário (LMU) da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), e na Central Analítica – Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP).

3.3 Métodos de Avaliação

3.3.1 Obtenção de extrato alcoólico e fração de acetato de etila

As folhas de *Mangifera indica* foram obtidas do Horto do Centro Universitário Padre Albino (UNIFIPA), Catanduva, SP, em 25 de fevereiro 2020 pela manhã. A árvore apresentava alguns frutos e brotos de folhas, tendo sua exsicata depositada no herbário Irina Delanova Gemtchujnicov-Botu, nº 34712. O extrato bruto (EB) foi obtido por percolação, com o uso de 20 g das folhas

secas e trituradas e 100 mL de álcool de cereais. Após a extração líquido-sólido, o álcool foi retirado utilizando o rotaevaporador a 40° C.

O extrato bruto obtido foi colocado na proporção 1:1 com o solvente acetato de etila (AE). Após 24h no escuro, retirou-se a parte orgânica e a mistura foi reeluída em 1 mL de água destilada, resultando na fração AE.

3.3.2 Identificação de taninos totais

Para a análise de taninos totais utilizou-se cloreto férrico, acetato de chumbo e acetato de cobre. Para a reação de cloreto férrico, em um tubo de ensaio foi colocado 1 mL da solução extrativa, 5 mL de água destilada e uma gota de cloreto férrico 2% (escorrendo-o pela parede do tubo). Na reação com acetato de chumbo, 1 mL do extrato foi diluído a uma proporção 1:5, na qual foram adicionadas duas gotas de solução aquosa de acetato neutro de chumbo a 10%. A reação de acetato de cobre foi realizada com 1 mL da solução extrativa diluída na proporção de 1:5 e duas gotas de solução de acetato de cobre a 5%.

A presença de taninos gálicos (hidrolisáveis) foi identificada pela reação de acetato de chumbo e ácido acético glacial, composta por 3 mL do EB e adicionados 2 mL de ácido acético glacial a 10% e 3 mL da solução de acetato de chumbo a 10%. A presença de taninos catequímicos foi verificada pela reação com Reativo de Wasicky, pela eliminação do precipitado da reação com acetato de cobre, por filtração, e utilização do filtrado, no qual foi adicionado 0,5 mL de solução polimetilaminobenzaldeído. E, a seguir, foram detectados visualmente pela alteração de cor do precipitado.

3.3.3 Identificação de saponinas

A reação de Rosenthalen constituiu-se de 5 mL do EB e duas gotas de solução de vanilina a 1% em ácido clorídrico. O extrato no volume de 1 mL foi agitado bruto para observar a obtenção de espuma, indicando a presença de saponinas.

3.3.4 Identificação e quantificação de compostos fenólicos

Foram identificados flavonoides pela reação de Shinoda e utilização de cloreto de alumínio, cloreto férrico e hidróxido de sódio. Na reação de Shinoda utilizou-se 5 mL de EB em um tubo de ensaio, contendo raspas de magnésio metálico. A seguir, foi acrescentado 1 mL de ácido clorídrico. Identificou-se presença de flavonoides pela reação com cloreto de alumínio, na qual foi usado papel de filtro e sobre ele depositadas duas gotas do extrato. Após secagem, foi colocada uma gota de solução de cloreto de alumínio 5% em etanol. A seguir, o papel foi observado sob luz ultravioleta. Para a reação com cloreto férrico, o extrato foi diluído com água na proporção de 1:5, em seguida 5 mL foram colocados em tubo de ensaio. Após, foi adicionada, pela parede do tubo, 1 gota de cloreto férrico a 1%. A reação com hidróxido de sódio constituiu-se de 5 mL do extrato na proporção de 1:5, e duas gotas de NaOH a 5%. Os resultados foram observados, verificando-se as precipitações com alteração de cor na presença dos compostos.

As amostras de EB e AE foram analisadas pelo método de Folin-Ciocalteu, utilizando ácido gálico (1274 - Dinâmica) para construção da curva padrão (0,2; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 µg/mL) com carbonato de sódio (NaCO₃) a 10%

(1,5 mL) e Folin-Ciocalteu (0,5 mL) como reagentes reveladores colorimétricos da curva e das amostras para leitura em espectrofotômetro a 760 nm. ⁽³⁸⁾

A quantificação de compostos fenóis do tipo flavonoides foi determinada por meio da reação estável que forma o cloreto de alumínio (AlCl_3) a esses compostos. Para isso, foi utilizada a quercetina (Q4951 - Sigma) para construção da curva padrão (diluição seriada a partir de 0,25 $\mu\text{g/mL}$ até 0,0156 $\mu\text{g/mL}$). A leitura da mistura de 1 mL das diferentes concentrações da curva, ou 1 mL das amostras adicionadas a 1 mL de solução alcóolica de AlCl_3 a 2% foi realizada 415 nm em espectrofotômetro. ^(16,38)

3.3.5 Identificação e quantificação de alcaloides

Para análise de alcaloides no EB foram utilizados os reagentes de Sheibler, Bourchardat, Mayer e Dragendorff, três gotas adicionados em 1 mL do extrato e 1 mL de água, em tubos de ensaio individuais. Alcaloides que passaram para uma porção clorofórmica, após alcalinização com NaOH 2N foram revelados pelo reagente verde de bromocresol dissolvido em solução tamponada a pH 4,7 com ácido cítrico. Uma curva (40; 60; 80; 100; 120; 140 $\mu\text{g/mL}$) de comparação foi realizada com atropina (A0123 – Sigma) e analisada em espectrofotômetro a 470nm. ^(16,39)

3.3.6 Avaliação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante do extrato (EB e AE) foi determinada pela capacidade de sequestro de radicais livres, com o uso de 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH). Na presença de um antioxidante a coloração púrpura do

DPPH decai, permitindo a leitura por espectrofotômetro. Após adição de solução de DPPH, as amostras foram mantidas ao abrigo da luz durante 30 minutos para posterior leitura em espectrofotômetro a 520 nm. A atividade antioxidante foi expressa como o percentual de inibição do radical DPPH (AA%) e em termos de CE50 (concentração mínima necessária para o antioxidante reduzir em 50% da concentração inicial do DPPH). As determinações foram realizadas em triplicata. ⁽⁴⁰⁾

3.3.7 Perfil cromatográfico dos extratos

HPTLC

Análises de taninos (ácido gálico), flavonoide (quercetina), alcaloides (berberina), catequina e mangiferina no EB e na fração AE, foram realizadas por cromatografia em camada delgada de alta eficiência (HPTLC – *high performance thin layer chromatography*), com o aplicador automático CAMAG Linomat 5 (Lab. Multidisciplinar II/UNIFIPA), com gás N (60 psi) e em placas delgadas (0,2 mm) de sílica 10X10 cm (Ref. 818333 - Macherey-Nagel/Alemanha - ALUGRAM® Xtra SIL G/UV254). O método de aplicação foi o mesmo para todas as análises, utilizando-se seringa da marca Hamilton de tamanho 100 µL, velocidade da dosagem 50 nL/s, pré dosagem de descarte de 0,2 µL, bandas feitas com aplicação de 10 µL e tamanho de 8 mm e distância entre bandas de 5 mm.

A catequina (C1251 - Sigma) foi utilizada na diluição de 500 µg/mL em metanol e a fase móvel acetato de etila / tolueno / metanol (70:30:10). A leitura

foi realizada sob luz UV e posteriormente com revelador próprio para catequinas, sendo constituído de 1% de vanilina diluída em solução de 30% de ácido acético em ácido fosfórico. Adicionou-se 30 mL da solução à 70 mL de etanol, e o revelador foi então vaporizado na placa que permaneceu em estufa a 70 °C por 15 minutos.

O padrão flavonoide utilizado para comparação cromatográfica foi a quercetina (Q4951 - Sigma) na diluição de 100 µg/mL em metanol. Utilizou-se na fase móvel tolueno / acetato de etila / ácido fórmico (5:4:0,2). A leitura foi realizada sob luz UV e posteriormente, com o revelador próprio de flavonoides NP-PEG a 1% vaporizado na placa.

O padrão de tanino utilizado para comparação cromatográfica foi o ácido gálico (1274 - Dinâmica) na diluição de 100 µg/mL em metanol. A fase móvel foi a mesma descrita para flavonoides, com leitura realizada sob luz UV e posteriormente, com o revelador próprio de taninos vaporizado na placa, o FeCl_3 a 0,5%.

Para pesquisa de alcaloides, o padrão utilizado para comparação foi a berberina (B2151 - Sigma), na diluição 100 µg/mL em metanol. A fase móvel utilizada foi tolueno / acetato de etila / metanol / ácido fórmico (6:6:2:1). A leitura foi realizada sob luz UV e, posteriormente, com revelador de alcaloides Dragendorff a 1%.

Finalmente, para detectar a presença de mangiferina (M3547 - Sigma) na diluição de 1µg/ML em metanol; a fase móvel utilizada foi acetato de etila / ácido acético / ácido fórmico/ água (15:4:4:2). Na placa, a ordem das bandas

sempre se iniciou pelos padrões, extrato bruto e acetato de etila a 50% em metanol (diluição para facilitar a eluição na fase móvel).

HPLC

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC - *high performance liquid chromatography*) foi realizada no EB e na fração AE para análise de mangiferina. Para isso realizou-se uma curva de mangiferina, pelo IQ-USP, em modo gradiente, equipado com uma coluna ACE Generix C18 (ACGEN-5C182-1546); tamanho: 15 cm; diâmetro interno: 4,6 mm; tamanho da partícula: 5µm. A metodologia adotada foi fluxo das bombas: 1 mL/min; volume injetado: 10 µL; comprimento de onda (nm): 258; fase móvel: Solvente A – H₂O 0,1% ácido trifluoracético, Solvente B - acetonitrila; modo isocrático: 10%. A temperatura da coluna foi de 40 °C e o tempo de corrida de 15 min. A curva da mangiferina foi realizada a partir de 500 µg/mL em diluição seriada (5X), a fim de quantificar esse composto nos extratos.⁽⁴¹⁾

3.3.8 Avaliação de citotoxicidade

A citotoxicidade foi analisada *in vitro*, em suspensões de 1 mL de hemácias com adição de 1 mL das concentrações de EB e fração de AE diluído em solução glicosiladas crescentes (10%, 20%, 50%, 70% e 100%). Para o controle positivo foi colocado 1 mL da suspensão de hemácias no tubo de ensaio e adicionado 1 mL da solução glicosilada, enquanto no negativo utilizou-se 1 mL da suspensão de hemácias e 1 mL de triton. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm,⁽⁴²⁾ o controle positivo (1.950

Absorbância). Para comparação dos valores de citotoxicidade foi calculado o coeficiente de correlação de Pearson.

3.3.9 Ensaio da membrana corioalantoide (CAM): efeito toxicológico e na angiogênese

O teste CAM (*chorioallantoic membrane assay*) avaliou o efeito toxicológico de EB e fração AE. Os testes in vivo foram realizados em ovos fertilizados de *Gallus gallus* (galinha), incubados à temperatura de 38°C e umidade relativa de 45 a 65% por 3 dias. Os procedimentos experimentais foram realizados nos Laboratórios Multidisciplinares da UNIFIPA e conduzidos de acordo com as normas da Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA- UNIFIPA- protocolo de aprovação 09/21).

Ovos embrionados (N=15) foram distribuídos em: Grupo Controle - ovos permaneceram fechados, sem intervenções; Grupo Sham - os ovos injetados com PBS (solução salina tamponada com fosfato, injetado na câmara de ar); Grupos Tratados - receberam 100 µL do extrato de folha de manga em diferentes concentrações. A casca dos ovos foi perfurada na região da câmara de ar para administração do PBS ou do extrato, após o orifício foi selado com parafilme. No terceiro dia (72h) de incubação, a casca do ovo ao redor da câmara de ar foi removida, para avaliação da vascularização na membrana corioalantoide e o desenvolvimento morfológico do embrião. ⁽⁴³⁾

Todos os embriões foram fotografados e nas imagens adicionou-se intersecções padronizadas de 3 mm. Os vasos localizados nas intersecções das linhas foram quantificados para comparação. ⁽¹⁶⁾

3.3.10 Modelo de peritonite, protocolo de tratamento e avaliação

Ratos da linhagem Wistar, com seis semanas de idade, foram obtidos da Unidade Didática e de Pesquisa Experimental (UDPE), UNIFIPA. Os animais foram divididos em três grupos (n=5/grupo): Grupo Controle - sem peritonite; Grupo Induzido - com peritonite induzida por endotoxina (LPS) e sem tratamento (PIE); Grupo Tratado - com peritonite e submetido ao tratamento com fração acetato de etila (PIE+TAE). Os animais foram mantidos em gaiolas, em ambiente com temperatura controlada (22 a 25 °C), com água e ração *ad libitum*. Os procedimentos experimentais foram acompanhados pelo veterinário da instituição e conduzidos de acordo com as normas da CEUA-UNIFIPA (protocolo de aprovação 02/20) (Anexo1).

A peritonite foi induzida com 1 mg de LPS diluído em 0,5 mL de PBS e aplicado intraperitonealmente (i.p.).⁽¹⁾ O Grupo Tratado recebeu por gavagem 1 mL de solução de extrato fração acetato de etila na concentração de 10%, que foi indicada pelos testes de citotoxicidade in vitro e in vivo 1h antes da indução. Após quatro horas, os animais foram eutanasiados por dose excessiva do anestésico inalatório isoflurano.⁽¹⁾ A pele do abdome foi retirada e com uma seringa adicionou-se, i.p, 4 mL de PBS, seguido de massagem no abdome. Realizou-se uma pequena incisão logo abaixo do externo para retirada do lavado peritoneal, que foi centrifugado a 1500 RPM durante 10 min. Após, o excesso de PBS foi retirado e congelado e o pellet ressuspendido em 900 µL de PBS e 100 µL de Turk para quantificação das células inflamatórias (monócitos e neutrófilos) em câmara de Neubauer (valores como número de células x 10⁴/mL. O sangue foi coletado através de punção cardíaca e

centrifugado para obtenção do plasma que foi armazenado a -80°C . O intestino foi retirado e uma parte armazenada a -80°C , e o restante mantido em formol a 4% para a confecção de lâminas histológicas; o mesmo processo aconteceu com o mesentério.

3.3.11 Análise de proteína C reativa - PCR

Para dosagem sérica da PCR, foi utilizado o kit PCR Turbiquest MAX (Labtest/Brasil; Cat. nº 3002). Foi preparada solução com 800 μL do Reagente 1 (tampão) e 200 μL do Reagente 2 (solução com anti-PCR) do kit, seguido da adição de 10 μL do soro dos animais de todos os grupos ou do padrão (Calibra PCR MAX - Labtest/Brasil; Cat. nº 3003). A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 546 nm.

3.3.12 Análise de citocinas

Para avaliar a inflamação foi realizada a quantificação das citocinas pró-inflamatórias MCP-1, TNF- α , IL-1 β e IL-6, assim como IL-10 com função anti-inflamatória. Adicionou-se ao líquido obtido do lavado peritoneal e no plasma sanguíneo, inibidores de protease e fosfatase, utilizando o Kit MILLIPLEX MAP de citocinas de rato (RECYTMAG-65K; Millipore Corporation, EUA). As análises foram realizadas no equipamento LUMINEX xMAP MAGPIX (*Millipore Corporation, EUA*) do Laboratório Multiusuário da FAMERP. As *beads* magnéticas, soluções controles, tampão de lavagem, soro matriz e padrões foram preparados conforme as instruções descritas no RECYTMAG-65K Milliplex MAP Kit (Millipore).

3.3.13 Análise de anexina A1

A anexina A1 (AnxA1) foi analisada pela técnica de *Western blotting*. Fragmentos do mesentério e intestino foram macerados em nitrogênio líquido e colocados em eppendorfs, seguido da adição de 650 µL da solução de inibidor de proteases (*Protease Inhibitor Cocktail Set I, Millipore Corporation, EUA*) e fosfatases (*PhosphoSafe, Novagen, Millipore Corporation, EUA*), segundo as instruções do fabricante. O material foi incubado por 20 minutos, a 40°C, sob agitação constante, seguido de centrifugação a 14.000 rpm, por 10 minutos, a 4°C, sendo o sobrenadante coletado e congelado a -80°C.

A determinação da concentração de proteínas presentes no sobrenadante foi obtida por ensaio de Bradford (*Biorad, Hemel Hempsted, UK*) e ajustada para 2 mg/mL. Uma alíquota foi misturada (1:1) com 2X *loading buffer* (Tris base a 125 mM, pH 6,8, contendo mercaptoetanol a 10%, dodecil sulfato de sódio a 4%, glicerol a 20%, azul de bromofenol a 0,1%) e desnaturada em água a 100°C por 5 minutos. As amostras (20 mg de proteína por poço) e marcadores de peso molecular foram separados em gel SDS-PAGE (dodecil sulfato de sódio a 10% – gel de poliacrilamida a 10%) e, posteriormente, transferidas para membrana de nitrocelulose. A proteína AnxA1 foi detectada utilizando-se o anticorpo primário anti-AnxA1 (1:1000) (*Life Technologies*). O sinal foi amplificado utilizando anticorpos secundários anti-rabbit IgG HRP conjugado (Promega/EUA; Cat. nº W401B) e o produto da reação visualizado com revelação em DAB (Kit DAB, Invitrogen). A AnxA1 foi quantificada por densitometria (unidades arbitrárias de 0 a 255) no analisador

de imagens (*software Leica Image Analysis*). O anticorpo tubulina (1:500) (Sigma/EUA; Cat. nº T9026) foi usado como controle.

3.3.14 Análise de NF- κ B

Os cortes histológicos do intestino dos animais em espessura de 3 μ m, depositados em lâminas silanizadas, passaram por recuperação antigênica, bloqueio da peroxidase endógena e dos sítios inespecíficos. Em seguida, foram incubados por uma hora com o anti-NF- κ B (Abcam/Reino Unido; Cat. nº ab7970) na diluição de 1:500 em câmara úmida a temperatura ambiente. Após isso, foram incubados com o anticorpo secundário (kit Leica/Alemanha; Novolink Ref. RE7150K), revelados em substrato DAB e contracolorados com hematoxilina. Para controle da reação foi omitido o anticorpo primário. As análises das imunomarcações da proteína foram realizadas no núcleo das células do tecido mesotelial que reveste o intestino, por densitometria às cegas (unidades arbitrárias de 0 a 255) pelo programa analisador de imagem *Leica Image Analysis*.

3.4 Análises Estatísticas

Os dados foram submetidos à análise descritiva e determinação da normalidade. Para distribuição normal foi usada a Análise de Variância (ANOVA), seguida do teste de Bonferroni. Todos os valores foram expressos como média $\pm$ S.E.M. (erro padrão da média). E a Correlação de Pearson foi calculado usando software estatístico R (versão 2.14.0; R Foundation for

Statistical Computing, Vienna, Austria). Admitiu-se nível de significância para valor $P < 0,05$.

RESULTADOS

4. Resultados**4.1 Fitoquímicos de Interesse Farmacológico com Atividades Antioxidante e Anti-Inflamatória em EB e AE**

Os testes fitoquímicos qualitativos em amostras de EB e fração AE detectaram saponinas, terpenos, alcaloides e compostos fenólicos, dentre eles, flavonoides e taninos (Tabela 1). A análise de testes quantitativos de polifenóis totais, flavonoides e alcaloides para ambos os extratos é apresentada na Tabela 2, com destaque para compostos nitrogenados como alcaloides totais em ambos os extratos, particularmente em EB (115 µg/mL; AE = 53,158 µg/mL).

A atividade antioxidante de AE e EB foram 91% e 89,4%, respectivamente. As análises por cromatografia confirmaram a presença de catequinas (Figuras 4 A-B), flavonoides, dentre eles, a quercetina (Figuras 4 C-D), taninos (Figuras 4 E-F), como o ácido gálico, e alcaloides (Figuras 4 G-H), incluindo a berberina.

Tabela 1. Compostos químicos presentes no extrato bruto de folhas de *Mangifera indica* por testes fitoquímicos qualitativos.

TESTES	Positivo	Negativo
Identificação de Terpenos		
Saponinas	X	
Reação de Burchard	X	
Teste de Sesquiterpenos	X	
Teste para Triterpenos Esteroides		X
Identificação de Compostos Fenólicos		
Cloreto Férrico	X	
Reação com Cloreto de Alumínio	X	
Hidróxido de Sódio	X	
Reação de Shinoda	X	
Identificação Genérica de Taninos		
Acetato Neutro de Chumbo	X	
Acetato de Cobre		X
Identificação Específica para Taninos		
Taninos Gálicos (hidrolisáveis)	X	
Taninos Catequímicos		X
Identificação de Cumarinas	X	
Identificação de Alcaloides		
Reação de Bouchardat	X	
Reação de Dragendorff	X	
Reação de Mayer	X	
Reação de Sheibler	X	

Tabela 2. Compostos químicos presentes no extrato bruto de folhas de *Mangifera indica* (EB) e na fração de acetato de etila (AE), detectados por testes fitoquímicos quantitativos.

	Terpenos	Compostos Fenólicos			Compostos nitrogenados
	Sesquiterpenos (Presença)	Polifenóis	Flavonoides Totais	Cumarinas	Alcaloides Totais
EB	+	4,63 µg/mL	3,9 µg/mL	+	115 µg/mL
AE	+	4,63 µg/mL	2,4 µg/mL	+	53,158 µg/mL

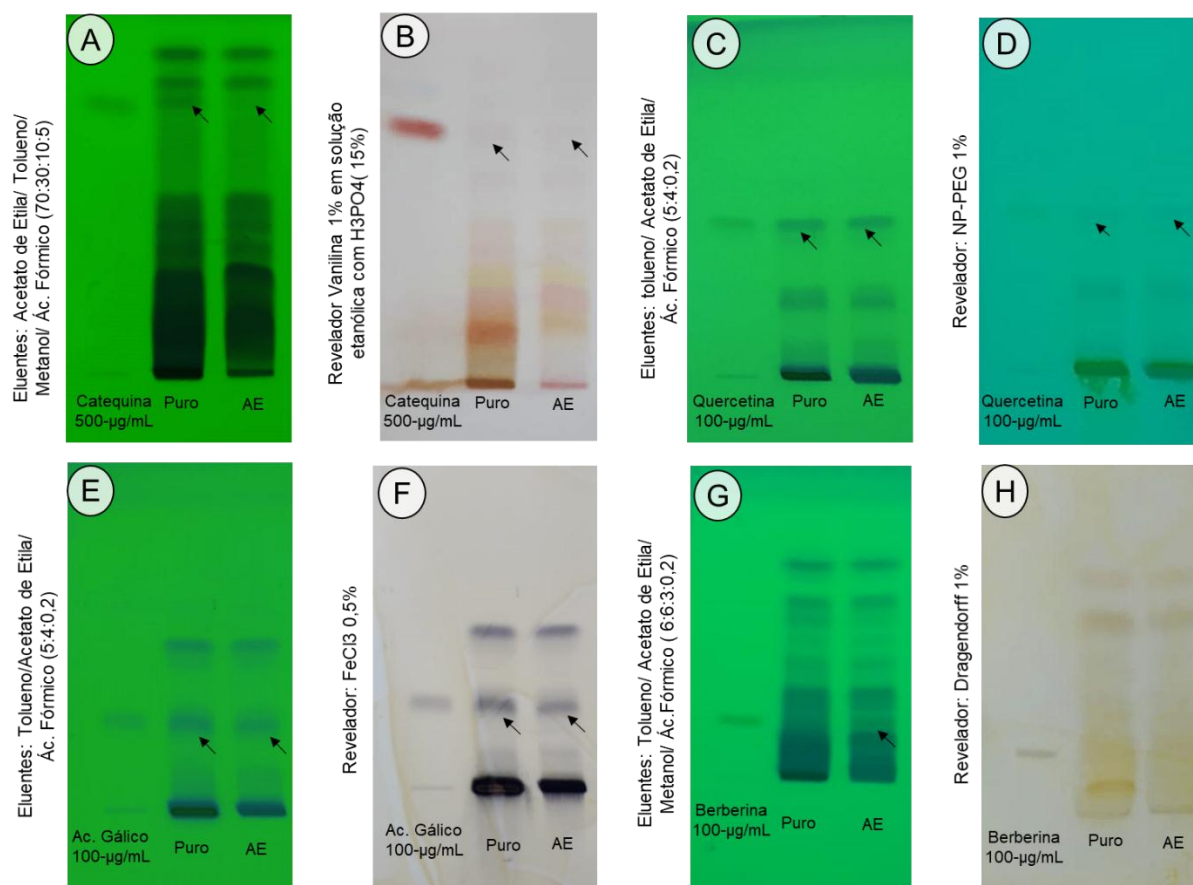


Figura 4. Compostos químicos presentes no extrato bruto de folhas de *Mangifera indica* (Puro) e na fração de acetato de etila (AE) (setas), detectados por cromatografia em camada delgada de alta eficiência (HPTLC): catequina (A-B), quercetina (C-D); ácido gálico (E-F); berberina (G-H).

4.2 Mangiferina é o Principal Composto em AE

A análise por HPLC mostrou em EB, concentração de mangiferina a 3.055,43 ug/mL e na fração AE 1.170,34 ug/mL (Figura 5).

Resultado da quantificação de Mangiferina a partir da Fração Acetato de Etila do Extrato da *M. indica*

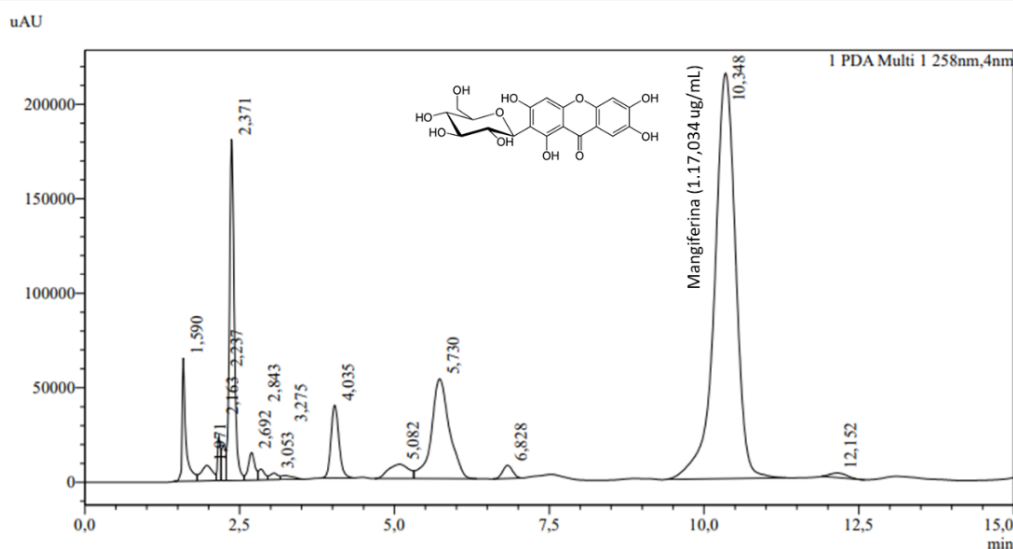


Figura 5. Concentração de mangiferina na fração acetato de etila do extrato bruto de folhas de *Mangifera indica*. O cromatograma (cromatografia líquida de alta eficiência – HPLC) indica que, nessa absorbância há 1.170,34 ug/ml de mangiferina, sendo o principal pico de composto da solução extrativa.

4.3 AE é Menos Citotóxico que EB

A análise de citotoxicidade *in vitro* por hemólise, nas amostras de EB e AE nas concentrações de 2%, 4%, 6%, 8% e 10% mostrou menor citotoxicidade para a fração AE, comparado a EB ($p < 0,01$) (Figura 6). A análise *in vivo* de ambos os extratos a 10% pelo teste CAM comparado ao controle, mostrou menor citotoxicidade para AE demonstrado pela formação de vasos e embrião. Houve menor concentração de vasos sanguíneos nas membranas corioalantoides que receberam AE e Controle comparado a EB ($P < 0,001$, para ambos). (Figura 7).

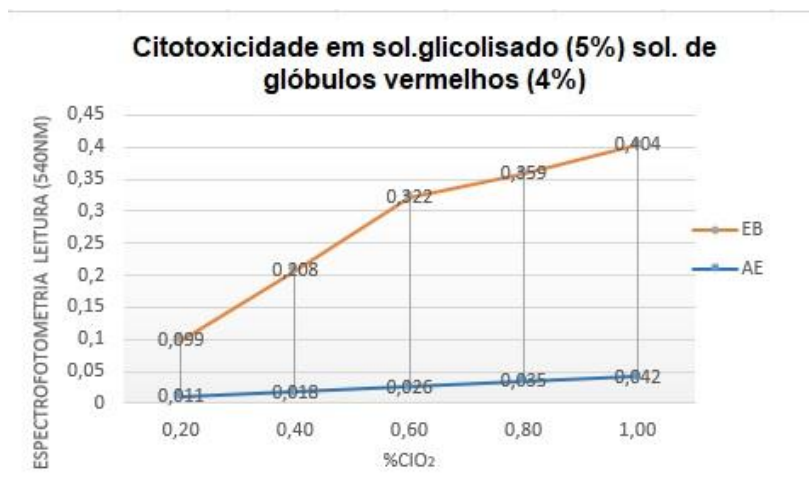


Figura 6. Curva de citotoxicidade in vitro de (EB) extrato bruto de folhas de *Mangifera indica* e (AE) extrato acetato de etila.

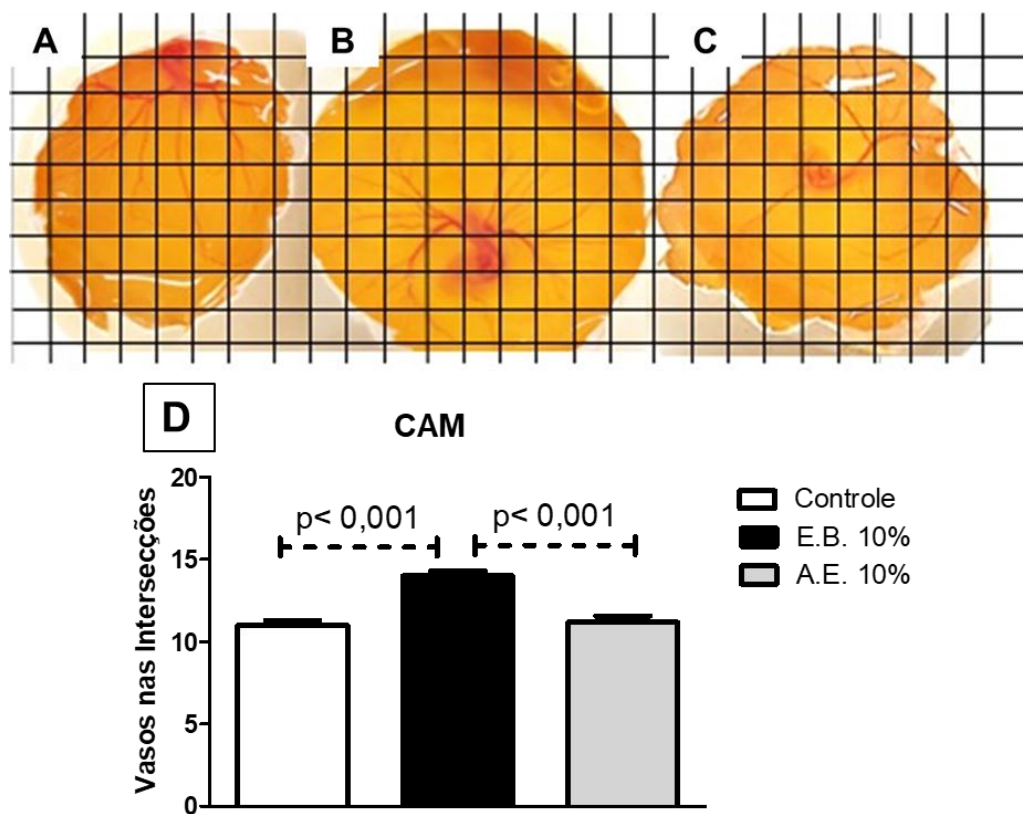


Figura 7. Análise da membrana corioalantoide (CAM) em *Gallus gallus*. (A) Controle – Ovo que recebeu soro. (B) Ovo exposto ao extrato bruto (EB) a 10 %. (C) Ovo submetido a fração acetato de etila (AE) a 10 %. (D) Concentração de vasos sanguíneos em membranas corioalantoides expostas a EB, AE e controle.

4.4 Tratamento com AE Reduz Parâmetros Inflamatórios em Modelo de Peritonite *in Vivo*

A análise das amostras de lavado peritoneal de ratos com peritonite induzida por endotoxinas (PIE), assim como, do plasma mostrou, respectivamente, valores aumentados das citocinas pro-inflamatórias, em relação ao Grupo Controle, incluindo MCP-1 ($P<0,001$, para ambos), TNF- α ($P<0,05$; $P<0,001$), IL-1 β ($P<0,01$; $P<0,001$) e IL-6 ($P<0,05$; $P<0,001$). (Figuras 8A-H). Por outro lado, o grupo tratado com AE (PIE+TAE) apresentou valor reduzido de MCP-1 no lavado peritoneal, comparado àquele sem tratamento (PIE) ($P<0,01$; Figura 7A), enquanto a análise comparativa para as demais citocinas pró-inflamatórias mostrou semelhança entre os grupos ($P>0,05$; Figuras 8C, E, G). Entretanto, no Grupo PIE+TAE houve aumento nos níveis de MCP-1, TNF- α e IL-1 β para amostras de lavado, comparado ao Grupo Controle (Figuras 8A, C, E; $P<0,05$).

Em contrapartida, a análise das citocinas pró-inflamatórias no plasma mostrou níveis reduzidos de MCP-1, TNF- α , IL-1 β e IL-6 no Grupo PIE+TAE, comparado a PIE ($P<0,001$; Figuras 8B, D, F, H). Essas citocinas, exceto TNF- α , apresentaram valores aumentados no plasma para o Grupo PIE+TAE, comparado ao Grupo Controle ($P<0,05$; $P<0,001$; $P<0,05$; Figuras 8B,F,H, respectivamente).

Em relação à IL-10, uma citocina anti-inflamatória, observou-se semelhança entre os Grupos PIE e PIE+TAE, tanto no lavado peritoneal ($P>0,05$; Figura 8 I), como no plasma ($P>0,05$; Figura 8J). Por outro lado, houve aumento de IL-10 no Grupo PIE+TAE, comparado ao Grupo Controle,

tanto no lavado peritoneal como no plasma ($P<0,05$; Figuras 8 I-J). Ressalta-se, ainda, aumento no plasma de IL-10 no Grupo PIE em relação ao Grupo Controle ($P<0,001$; Figura 8J).

Adicionalmente, observou-se redução significativa no nível sérico de PCR no Grupo PIE+TAE ($2,6 \pm 1,1\text{mg/L}$), comparado ao Grupo PIE ($12,1 \pm 4,5\text{mg/L}$; $P<0,05$), que apresentou também valores aumentados em relação ao Grupo Controle ($0,10 \pm 0,0\text{mg/L}$; $P<0,01$; Figura 9).

O Grupo PIE+TAE reduziu, ainda, o extravasamento de monócitos e neutrófilos para a cavidade peritoneal comparado, respectivamente, ao Grupo PIE ($P<0,05$, para ambos; Figuras 10A-B) que mostrou valores aumentados em relação ao Grupo Controle ($P<0,01$ e $P<0,001$). Além disso, para os neutrófilos observou-se também valores aumentados no Grupo PIE+TAE, comparado ao Grupo Controle ($P<0,01$; Figura 10B).

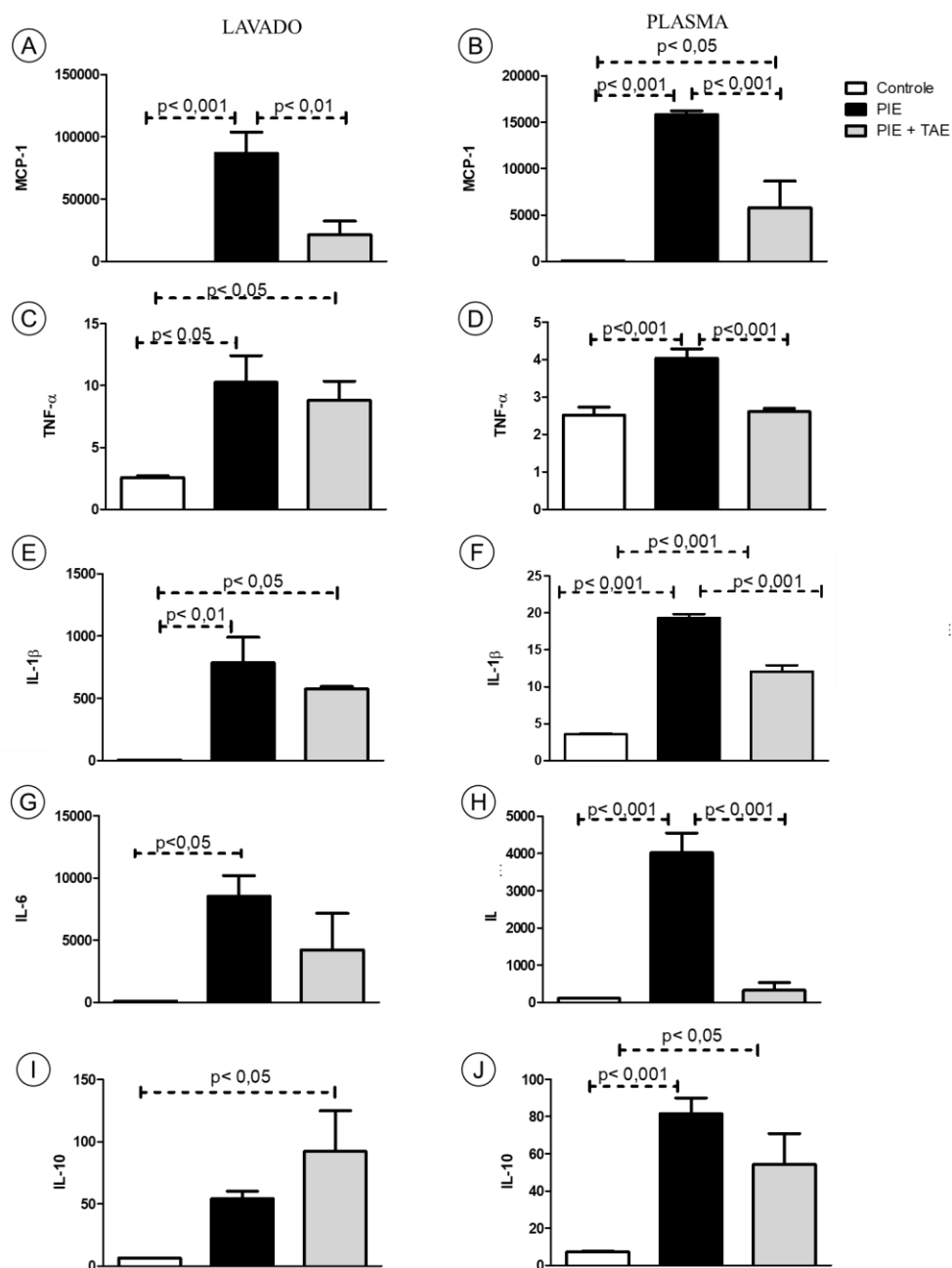


Figura 8. Nível de citocinas no lavado peritoneal e plasma, respectivamente, em animais com peritonite induzida por endotoxinas (PIE) e grupo com peritonite tratado com acetato de etila (PIE+TAE), e grupo controle. (A, B) MCP-1; (C, D) TNF- α ; (E, F) IL-1 β ; (G, H) IL-6; (I, J) IL-10. MCP-1= proteína quimiotática de monócitos -1; TNF- α = fator de necrose tumoral alfa; IL=interleucina.

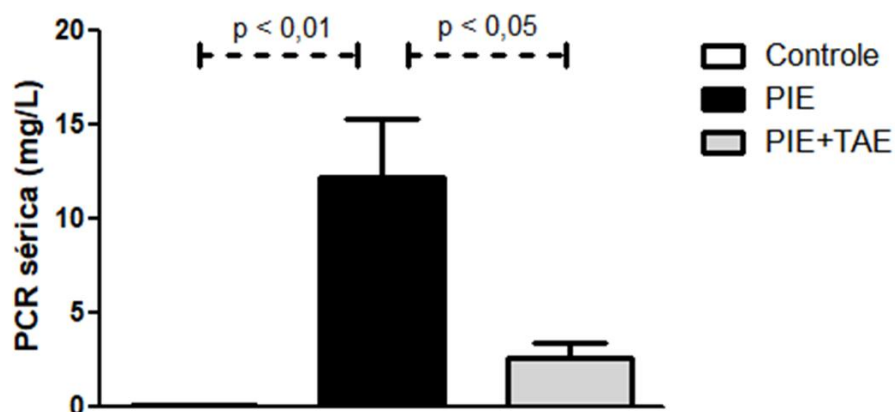


Figura 9. Nível plasmático da proteína C reativa (PCR) em animais com peritonite induzida por endotoxinas (PIE) e grupo com peritonite tratado com acetato de etila (PIE+TAE), e grupo controle.

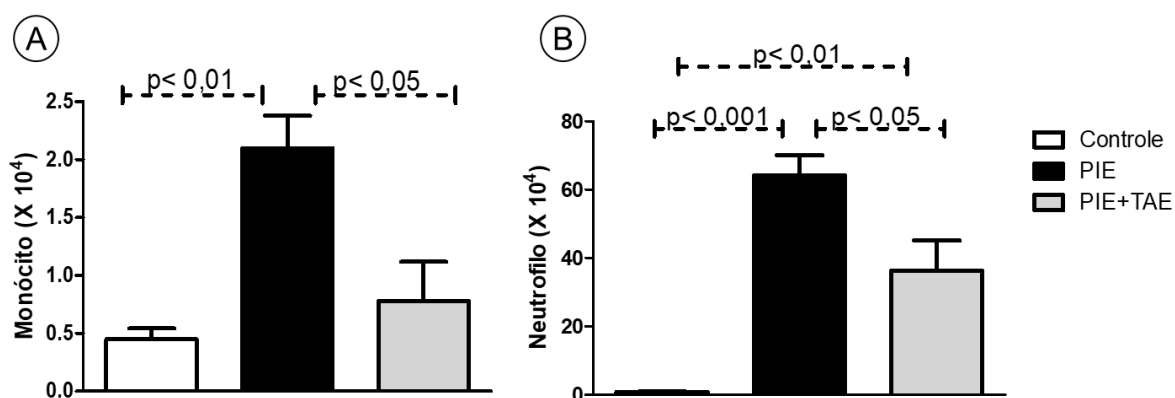


Figura 10. Nível de leucócitos no peritônio de animais com peritonite induzida por endotoxinas (PIE) e grupo com peritonite tratado com acetato de etila (PIE+TAE), e grupo controle. (A) Monócitos extravasados para a cavidade peritoneal. (B) Polimorfos nucleados extravasados para a cavidade peritoneal.

A expressão da anexina A1 clivada (33 kDa) foi detectada no sobrenadante de macerados do mesentério (Figura 11A) e do intestino (Figura 11B). No mesentério, a expressão da proteína aumentou em relação ao controle nos grupos PIE ($P < 0,001$) e PIE+TAE ($P < 0,001$) que mostrou aumento também comparado a PIE ($P < 0,05$) (Figura 11D). No intestino, a proteína

comparada ao grupo controle, aumentou a expressão em PIE ($P < 0,05$) e diminuiu no Grupo PIE+TAE ($P < 0,001$), cujos valores mostraram-se reduzidos em relação a PIE ($P < 0,001$) (Figura 11F). A expressão da proteína tubulina (controle da reação) foi semelhante em todos os grupos, tanto no mesentério (Figura 11C), quanto no intestino (Figura 11D).

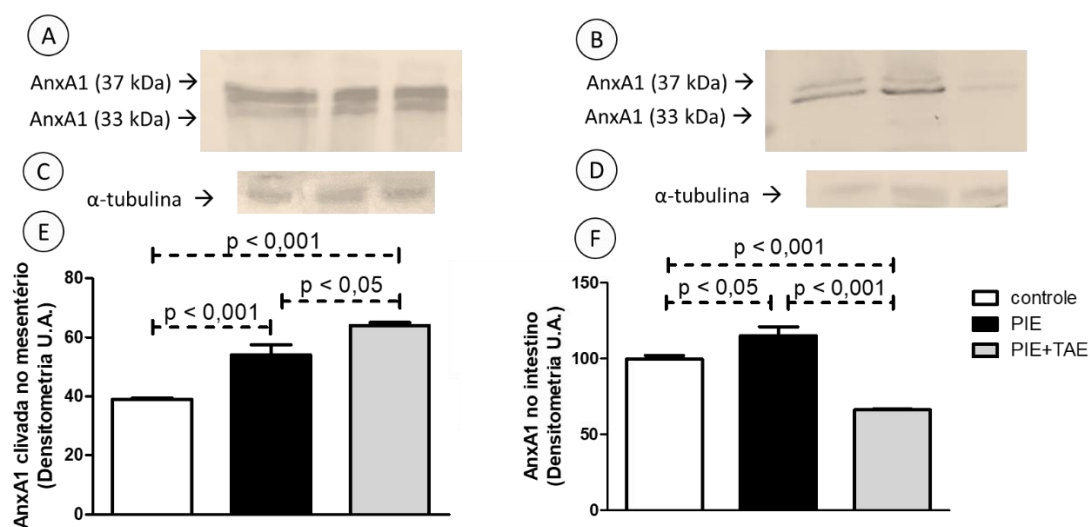


Figura 11. Análise da anexina A1 clivada (AnxA1) por *Western blotting*. (A) Mesotélio; (B) Intestino; (C) α-tubulina usada como controle no mesentério; (D) no intestino; (E). Representação da imunomarcacão da AnxA1 no mesentério; e (F) no intestino. PIE = grupo com peritonite induzida por endotoxinas; PIE+TAE = grupo com peritonite tratado com acetato de etila.

Pela análise imuno-histoquímica observou-se a expressão do NF-κB no núcleo das células mesoteliais (Figura 12A-C). A imunomarcacão nuclear de NF-κB apresentou-se aumentada no Grupo PIE, em relação ao controle ($P < 0,001$) e ao Grupo PIE+TAE ($P < 0,05$), cujos valores mostraram-se aumentados em relação ao grupo controle ($P < 0,001$; Figura 12E). A especificidade da imunomarcacão foi comprovada pela ausência de imunorreatividade no controle da reação (Figura 12D).

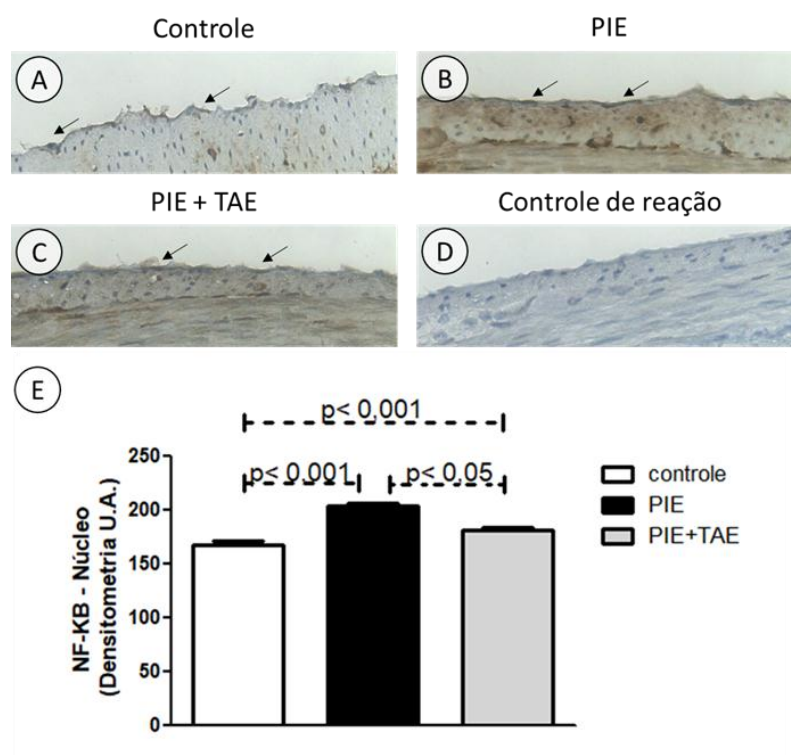


Figura 12. Análise da imunomarcção do fator nuclear kappa B (NF-κB) no núcleo de células mesoteliais de animais (controle - A), no grupo com peritonite induzida por endotoxinas (PIE - B), e no grupo com PIE e tratamento com acetato de etila (PIE+TAE - C). (D) Imunorreatividade confirmada pelo controle de reação com ausência do anticorpo primário. Setas indicam núcleos das células mesoteliais. (E) Densitometria do NF-κB no núcleo celular.

DISCUSSÃO

5. Discussão

Neste estudo, primeiramente, fez-se necessário padronizar e caracterizar os compostos presentes na solução extrativa de *Mangifera indica* para determinarmos os compostos de interesse farmacológico. Assim, realizamos análises fitoquímicas qualitativas, quantitativas, HPTLC e HPLC. Identificamos saponinas, terpenos, sesquiterpenos, compostos fenólicos, flavonoides, taninos e alcaloides totais, além de quercetina, ácido gálico, catequina e berberina. As análises quantitativas indicaram as mesmas concentrações de polifenóis em EB e AE e concentrações menores, mas importantes, de flavonoides totais e alcaloides totais.

Há referência de sesquiterpenos no óleo essencial extraído de folhas de manga. Além disso, observou-se também alcaloides, taninos e saponina no extrato alcóolico. ^(35,44) Vários compostos com a extração aquosa de folhas de *Mangifera indica* foram identificados, entre eles, flavonoides como a quercetina⁽⁴⁵⁾ também detectados, neste estudo na extração etanólica. Adicionalmente, destaca-se a presença de mangiferina, ácido gálico e quercetina por HPLC. ⁽⁴⁶⁾

Ressalta-se que a catequina, composto encontrado na solução extrativa neste trabalho por HPTLC, atua na inibição da inflamação do intestino e estabiliza a flora intestinal, devido à sua ação antioxidante. ⁽⁴⁷⁾ Os resultados ora apresentados, utilizando metodologia quantitativa corroboram com os referidos autores, mesmo diante da utilização do método qualitativo. Há referência ainda de um estudo com Folin–Ciocalteu, que quantificou

46,30 mg/g de polifenóis totais no extrato alcoólico de folhas, ⁽⁴⁸⁾ em concordância com o valor de 4,36 ug/mL ora apresentado.

Ainda, o composto de maior interesse, a mangiferina que é anti-inflamatória, antioxidante, antiproliferativa, antimutagênica e antidiabética, apresentou maior concentração nas soluções extrativas por HPLC. Esse composto foi observado com o mesmo método de extração também em outros trabalhos. ⁽⁴⁹⁻⁵¹⁾ Neste estudo, a atividade antioxidante foi avaliada por DPPH, correspondendo a 89,4% e 91% nas amostras de EB e AE, respectivamente. Um estudo com extrato alcoólico de *Mangifera indica* mostrou 80% de atividade antioxidante. ⁽⁴⁸⁾ Assim, nossos resultados são similares aos encontrados em outras extrações e demonstram alto valor antioxidante.

Para avaliar a segurança na utilização dos extratos in vivo, realizamos testes de citotoxicidade in vitro em várias concentrações (2-10%) de EB e AE, por meio da análise da hemólise e ambos demonstraram baixa citotoxicidade. Para confirmar este resultado realizamos o ensaio in vivo com a membrana corioalantóide (CAM). ⁽¹⁶⁾ O ensaio CAM é um modelo bem estabelecido para avaliar os potenciais angiogênicos, anti-inflamatórios, irritantes e embriotóxicos de produtos naturais e sintéticos, terapêuticos, formulações e cosméticos. ^(52,53) Nesta investigação tanto EB como AE foram inoculados nas câmaras de ar dos ovos a 10%, e após 72h não foram observadas anomalias ou alterações na angiogênese. Entretanto, EB promoveu aumento da angiogênese, mas AE manteve este parâmetro similar ao controle, portanto, considerado seguro.

Um estudo realizou teste de viabilidade celular (MTT), que é utilizado para avaliar a citotoxicidade em linfócitos B cancerígenos de pacientes com leucemia

linfóide crônica e doadores saudáveis, após 24h de exposição das células cancerígenas e saudáveis ao extrato aquoso de *Mangifera indica*. Houve redução de 40% das células cancerígenas, com a manutenção das células saudáveis. ⁽⁵⁴⁾ Ainda, outro estudo com *Garcinia brasiliensis* usou metodologia similar de extração e definição para concentração e percentual de fitoterápico em modelo animal com AE para avaliação de citotoxicidade. ⁽¹⁶⁾

Neste estudo, AE mostrou menor citotoxicidade que EB além de ter a atividade antioxidante maior e compostos farmacológicos de interesse. Esta fração foi selecionada para ser utilizada como o tratamento de peritonite induzida por LPS em modelo animal. Ressalta-se que o LPS aplicado na cavidade intraperitoneal é reconhecido pelo receptor Toll-like 4, que traduz sinais intracelulares por meio da via de sinalização e ativa os fatores de transcrição como o do NF-κB. Reconhecidamente, esse fator induz a expressão dos genes que codificam e aceleram a inflamação, liberando os mediadores pró-inflamatório e ocasionando a peritonite. ⁽⁸⁾

No grupo com peritonite induzida e tratado com AE a 10%, nossos resultados mostraram aumento de MCP-1 no grupo induzido (PIE) e redução no grupo tratado (PIE+TAE), que se mostrou semelhante ao grupo controle no lavado. Por outro lado, no plasma observou-se aumento de MCP-1 principalmente em PIE em relação a TAE, e ambos comparado ao controle. Possivelmente este resultado ocorreu pela ação da mangiferina na via do NF-κB que será discutido adiante. ⁽⁵⁵⁾ MCP-1 trata-se de uma quimiocina que regula a migração de monócitos, ⁽⁵⁾ a redução deste mecanismo de ação

inflamatória contribuiu para reduzir o extravasamento de monócitos, também avaliado nesse estudo.

Houve aumento de TNF- α e IL-1 β no lavado, nos grupos induzido e tratado, comparado ao controle. Esses resultados são discordantes da literatura, em que a mangiferina suprime a ação dessas citocinas, devido à sua atuação na via do NF-kB. É possível que a baixa dosagem utilizada, tenha sido ineficaz com resultados divergentes de outros estudos. ^(36,56-58) Já no plasma houve redução da atuação de TNF- α no grupo tratado, com semelhança ao controle, enquanto o grupo induzido mostrou valor aumentado em relação a ambos os grupos. Para a IL-1 β houve aumento principalmente no grupo induzido, com diferença significativa comparado a TAE, e ambos diferentes do controle. Uma investigação em modelo de edema com administração do VIMANG[®], um fitoterápico obtido a partir da extração aquosa de *M. indica*, mostrou redução da circulação de TNF- α . ⁽²⁹⁾ Nesse caso, por possuir ligações na molécula com c-glicosil e poli-hidroxi a exposição a este fitoterápico contribui para a redução do estresse oxidativo e eliminação de radicais livres, reduzindo a ação de TNF- α e IL-1 β , ⁽⁵⁹⁾ além de agir de maneira dose dependente. ⁽⁶⁰⁾

Para a citocina IL-6 do lavado, houve aumento apenas no grupo induzido em relação ao controle. Por outro lado, no plasma, o grupo induzido mostrou aumento em relação aos grupos controle e tratado, que apresentaram semelhança entre si. Esses resultados corroboram estudos que relatam ação da mangiferina que diminui IL-6 de maneira dose-dependente ⁽⁶¹⁾ e sua atuação na inibição da ativação clássica de macrófagos através da

desregulação da expressão do fator regulador interferon 5.⁽⁶²⁾ Outros estudos destacam NF- κ B e NLRP3 (*pyrin domain-containing protein 3*), que regulam a liberação de citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6.⁽³⁴⁾ Neste estudo, o fator anti-inflamatório IL-10 no lavado mostrou aumento apenas no grupo tratado em relação ao controle, sugerindo uma tentativa de resolução do processo inflamatório. Ressalta-se, nesse caso, já valores reduzidos de MCP-1, TNF- α e IL-1 β , no grupo TAE, embora também sem significância ao grupo induzido. Contudo, IL-6 mostrou redução tanto no lavado como no plasma em relação ao controle. Contata-se a eficácia de TAE na regulação do processo inflamatório. No plasma houve aumento no grupo induzido em relação ao controle, no entanto, com semelhança entre induzido e tratado. Isso demonstra a divergência entre a ação em termos local e sistêmica, provavelmente pela duração do estudo. Há relatos na literatura que mostram a atuação da mangiferina em IL-10, devido à sua regulação na via NF- κ B.⁽⁵⁸⁾ também que a proteína anexina A1 estimula IL-10, sendo seus resultados semelhantes entre si e IL-10 por ter ação apoptótica em neutrófilos atua na redução do seu extravasamento na cavidade peritoneal, como visto neste estudo.⁽⁶³⁾

Observamos, ainda, aumento da PCR sérica no grupo induzido e diminuição no grupo tratado que se mostrou semelhante ao controle. Isso confirma a presença de inflamação aguda que, entretanto, pode ser controlada pelo tratamento com a fração AE. Um estudo avaliou o uso da PCR como marcador para prognóstico de pacientes admitidos por insuficiência cardíaca descompensada e comprovou-se que quanto maior o valor, maior a probabilidade de óbito, podendo então ser considerado um marcador

confiável.⁽⁵⁸⁾ Assim, nossa proposta de tratamento mostrou que a fração AE de folhas de *M. indica* foi capaz de reduzir a inflamação aguda na região da aplicação, por meio do controle da transmigração leucocitária, redução de PCR e modulação de citocinas pró e anti-inflamatórias.

Outro importante mediador inflamatório que mostrou modulação pelo tratamento com AE foi a proteína anti-inflamatória anexina A1 (AnxA1). No grupo induzido com LPS e sem tratamento ocorreu aumento da proteína, com relação ao grupo controle. Esse aumento está relacionado ao processo natural do organismo de combate a inflamação, como já observado em estudos de uveíte induzida por LPS.^(12,65,66) Além disso, a ausência da AnxA1 endógena provocou o aumento do influxo de neutrófilos e a exacerbação do processo inflamatório em diferentes modelos de inflamação com animais nocaute para a AnxA1.^(9,10,12,67,68) Nosso trabalho, devido à presença de AnxA1 no mesentério, indica também a redução da transmigração de neutrófilos e monócitos extravasados.

O tratamento com AE alterou a expressão da AnxA1 de maneira diferencial, com aumento no sobrenadante do macerado do peritônio e concomitante redução no macerado do intestino; o que pode estar relacionado à atuação mais rápida e local da proteína no peritônio, induzida pelo AE. Um estudo mostrou que a AnxA1 pode desempenhar diferentes papéis na sinalização do inflamassoma NLRP3 com base em sua localização intra ou extracelular e tipo celular. Nos neutrófilos, a AnxA1 endógena é essencial para ativar a maquinaria do NLRP3 e liberar IL-1 β , mas, uma vez no microambiente

extracelular, atua no controle da liberação dessa citocina e consequente resposta inflamatória.⁽⁶⁹⁾

Estudos mostram que o uso de ervas medicinais e compostos bioativos de plantas aumentam a expressão da AnxA1 e potencializam sua ação anti-inflamatória.^(66,70-72) O uso de fitoterápicos pode reduzir a expressão da proteína, o que indica uma via de regulação da inflamação independente da AnxA1.⁽¹¹⁾ Destaca-se neste estudo ambas ações dependendo do seu local de atuação. O uso de piperlongumina que é um alcaloide amida constituinte do fruto da pimenta longa, promoveu aumento da ação da AnxA1 e manteve os níveis da proteína elevados no processo inflamatório pulmonar induzido por benzopireno e na uveíte induzida por LPS ⁽⁶⁶⁾. O presente estudo corrobora estes achados, tendo em vista a ação local e eficaz da AE na inflamação aguda do peritônio, com ativação da AnxA1.

Ressalta-se também neste estudo o aumento da ativação de NF-κB no grupo induzido e redução da ativação no grupo tratado, ambos significantes em relação ao controle no núcleo das células mesoteliais. Corroboram outras pesquisas, indicando que a mangiferina suprime a via clássica e a via alternativa de ativação do NF-κB, ^(34,37,55,73) com atuação no complexo de IKK. Desse modo, é impedida a fosforilação e a translocação de NF-κB para o núcleo e, consequentemente, a continuidade da via. Além de mangiferina, outros compostos, como o ácido gálico, também identificado em AE tem importante efeito inibidor sobre o NF-κB. Um estudo com Vimanq®, mangiferina e ácido gálico, demonstrou redução significativa na expressão dos genes alvos

do NF- κ B (IL-6 entre outros),^(74,75) o que pode explicar os mecanismos de ação de AE no processo inflamatório, a ser ainda esclarecido.

Concluindo, este estudo confirma a potencialidade terapêutica do extrato de *Mangifera indica* para o desenvolvimento de futuros medicamentos anti-inflamatórios. Nesse contexto, a Figura 13 ilustra as etapas desenvolvidas no estudo e a sinalização dos mecanismos inflamatórios em modelo animal, indicando a possibilidade de controle da via inflamatória diante das propriedades fitoterápicas de *M. indica*.

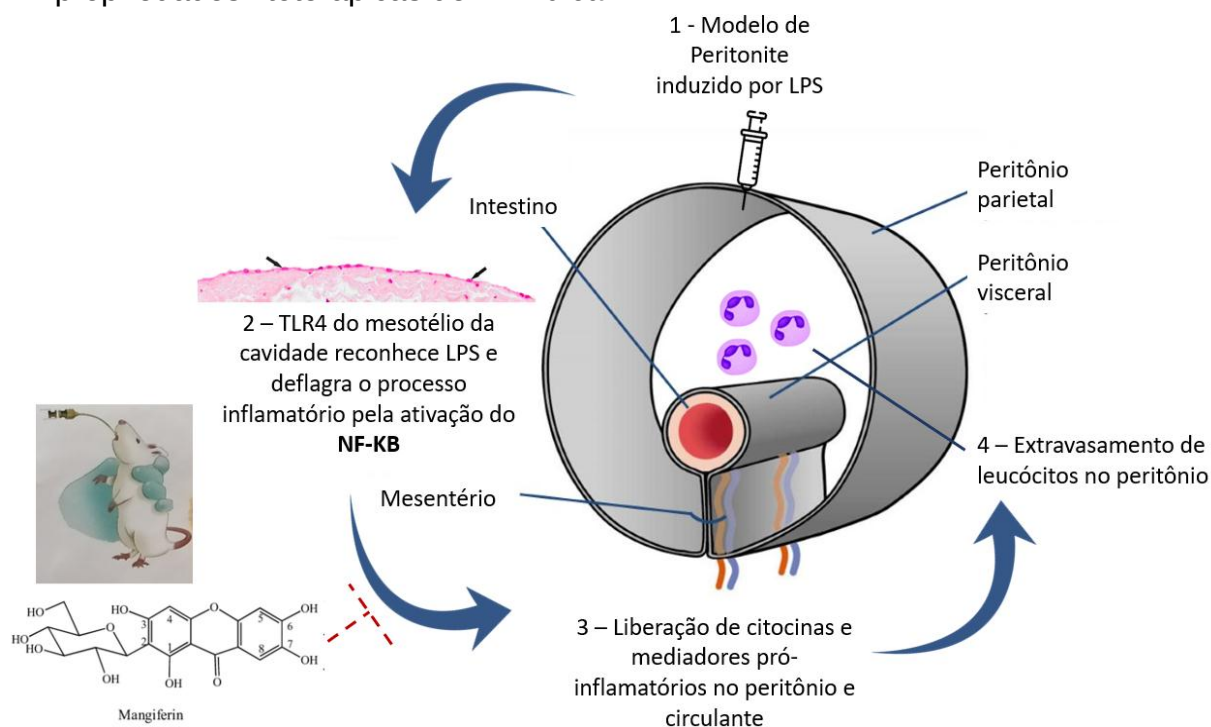


Figura 13. Atuação da fração acetato de etila (AE) no modelo de peritonite. 1 - Aplicação do modelo de peritonite induzido por lipopolissacarídeo (LPS) intra-peritoneal. 2 - Receptor Toll like 4 (TLR4) do mesotélio da cavidade reconhece LPS e deflagra o processo inflamatório pela ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B). 3 - Ocorre a liberação de citocinas e mediadores pró-inflamatórios no peritônio e circulante. 4 - Extravasamento de leucócitos no peritônio. Quando aplicamos a AE 1h antes do modelo, a mangiferina atua sobre a via de NF- κ B impedindo a continuidade do processo inflamatório.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

6. Conclusões

Este estudo contribui no esclarecimento das propriedades e efeitos de *Mangifera indica* e permite ampliar as propostas de sua aplicação terapêutica, tendo em vista as conclusões apresentadas.

1 - A composição fitoquímica de EB alcoólico de folhas de *Mangifera indica* inclui saponinas, terpenos, alcaloides, compostos fenólicos, dentre eles, flavonoides e taninos, assim como catequinas, quercetina, ácido gálico, berberina e mangiferina.

2 - *Mangifera indica* apresenta atividade antioxidante, com destaque para a fração de acetato de etila, também identificada no extrato bruto alcoólico.

3 - Polifenóis e flavonoides detectados em EB e AE, assim como, alcaloides e mangiferina, com destaque em EB, confirmam o caráter antioxidante, antimicrobiano, antitumoral e anti-inflamatório de *Mangifera indica*.

4 - Ressalta-se a baixa citotoxicidade de folhas de *Mangifera indica* com destaque para a fração de acetato de etila, comparada ao extrato bruto, tanto em ensaios in vitro como in vivo.

5 - *Mangifera indica*, representada pela fração AE, é eficaz na regulação do processo inflamatório (peritonite induzida por LPS), envolvendo controle de leucócitos, redução de NF- κ B e citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e

quimiocina MCP-1), e aumento de IL-10 de caráter anti-inflamatório, assim como, AnXA1 que apresenta diferencial na atuação local e sistêmica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. Referências Bibliográficas

1. Marques L, Pinheiro A, Araújo J, Oliveira Rag De, Silva S, Abreu I, et al. Anti-inflammatory effects of a pomegranate leaf extract in lps-induced peritonitis. *Planta Med* [Internet]. 2016 Dec; 82:1463–7. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27352385/>.
2. Roe K. An inflammation classification system using cytokine parameters. *Scand J Immunol* [Internet]. 2021 Dec; 93. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32892387/>.
3. Fullerton Jn, Gilroy Dw. Resolution of inflammation: A new therapeutic frontier. *Nat Rev Drug Discov* [Internet]. 2016 Dec; 15:551–67. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27020098/>.
4. Liu S, Zhang S, Sun Y, Zhou W. Transcriptomics changes in the peritoneum of mice with lipopolysaccharide-induced peritonitis. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021 Dec 22:13008. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/23/13008/htm>.
5. Abbas Ak, Lichtman Ah, Pillai S, editores. *Imunologia Celular E Molecular* 8^a Edição. Rio de Janeiro; Elsevier; 8. ed; 2015.
6. Zindel J, Kubes P. Damps, Pamps, and Lamps in immunity and sterile inflammation. *Annu Rev Pathol* [Internet]. 2020 Dec; 15:493–518. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31675482/>.
7. Borghi Sm, Mizokami Ss, Carvalho Tt, Rasquel-Oliveira Fs, Ferraz Cr, Fattori V, et al. The diterpene from sphagneticola trilobata (l.) pruski, kaurenoic acid, reduces lipopolysaccharide-induced peritonitis and pain in mice. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2021 Dec; 273. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33652112/>.

8. Kany S, Vollrath Jt, Relja B. Cytokines in inflammatory disease. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2019 Dec. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31795299/>.
9. Chatterjee Be, Yona S, Rosignoli G, Young Re, Nourshargh S, Flower Rj, et al. Annexin 1-deficient neutrophils exhibit enhanced transmigration in vivo and increased responsiveness in vitro. *J Leukoc Biol* [Internet]. 2005 Sep 78:639–46. Disponível em: [HTTPS://Pubmed. Ncbi.Nlm.Nih.Gov/16000391](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16000391/).
10. Galvão I, Vago Jp, Barroso Lc, Tavares Lp, Queiroz-Junior Cm, Costa V V., Et al. Annexin a1 promotes timely resolution of inflammation in murine gout. *Eur J Immunol* [Internet]. 2017 Mar; 47:585–96. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27995621/>.
11. Possebon L, De Souza Lima Lebron I, Furlan Da Silva L, Tagliaferri Paletta J, Glad Bg, Sant'ana M, et al. Anti-inflammatory actions of herbal medicines in a model of chronic obstructive pulmonary disease induced by cigarette smoke. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018 Mar 1; 99:591–7.
12. Girol Ap, Mimura Kko, Drewes Cc, Bolonheis Sm, Solito E, Farsky Shp, Et al. Anti-inflammatory mechanisms of the annexin a1 protein and its mimetic peptide ac2-26 in models of ocular inflammation in vivo and in vitro. *J Immunol* [Internet]. 2013 Jun 1; 190:5689–701. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23645879/>.
13. Peritonitis: Inflammation of the peritoneum, 2016; [Http://www.medicalexhibits.com](http://www.medicalexhibits.com).
14. Borges Frm, Silva Md, Córdova Mm, Schambach Tr, Pizzolatti Mg, Santos Ars. Anti-inflammatory action of hydroalcoholic extract, dichloromethane fraction and steroid α -spinasterol from *polygala sabulosa* in lps-induced

- peritonitis in mice. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2014 Jan 151:144–50. Disponível em: [HTTPS://Pubmed.Ncbi.Nlm.Nih.Gov/24161429/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24161429/).
15. Dutra Rc, Campos Mm, Santos Ars, Calixto Jb. Medicinal plants in brazil: pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. *Pharmacol Res* [Internet]. 2016 Dec; 112:4–29. Disponível em: [Https://Pubmed.Ncbi.Nlm.Nih.Gov/26812486/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26812486/).
16. Souza Hr, Zucoloto Ar, Francisco Itp, Rays Hp, Tinti Np, Matta Nj Della, et al. Evaluation of the healing properties of garcinia brasiliensis extracts in a cutaneous wound model. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2022 Dec; 295. Disponível em: [Https://Pubmed.Ncbi.Nlm.Nih.Gov/35597412/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35597412/).
17. Antonio Gd, Tesser Cd, Moretti-Pires Ro. Phytotherapy in primary health care. *Rev Saude Publica* [Internet]. 2014; 48:541–53. Disponível em: [Https://Pubmed.Ncbi.Nlm.Nih.Gov/25119949/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25119949/).
18. Taiz L, Zeiger Ian Max Møller E, Murphy A. Fisiologia e desenvolvimento vegetal - 6ª Edição. Porto Alegre: Editora Artmed. 2017
19. Caccia-Bava M Do Cgg, Bertoni Bw, Pereira Ams, Martinez Ez. Disponibilidade de medicamentos fitoterápicos e plantas medicinais nas unidades de atenção básica do estado de são paulo: resultados do programa nacional de melhoria do acesso e da qualidade da atenção básica (Pmaq). *Cien Saude Colet* [Internet]. 2017 May; 22:1651–9.
20. Ediriweera Mk, Tennekoon Kh, Samarakoon Sr. A review on ethnopharmacological applications, pharmacological activities, and bioactive compounds of mangifera indica (mango). *Evid Based Complement Alternat Med* [Internet]. 2017. Disponível em: [Https://Pubmed.Ncbi.Nlm.Nih.Gov/29456572/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29456572/).

21. Ribeiro Smr, Schieber A. Bioactive compounds in mango (*mangifera indica* l.). Bioactive Foods in Promoting Health. 2010; 507–23.
22. Kumar M, Saurabh V, Tomar M, Hasan M, Changan S, Sasi M, et al. Mango (*mangifera indica* l.) leaves: nutritional composition, phytochemical profile, and health-promoting bioactivities. antioxidants (basel) [Internet]. 2021 Dec; 10:1–23.
23. Ajila Cm, Rao Lj, Rao Ujsp. Characterization of bioactive compounds from raw and ripe *mangifera indica* l. peel extracts. Food Chem Toxicol [Internet]. 2010 Dec; 48:3406–11.
24. Boas Grv, Lemos Jmr, De Oliveira Mw, Dos Santos Rc, Da Silveira Aps, Bacha Fb, et al. Preclinical safety evaluation of the aqueous extract from *mangifera indica* linn. (anacardiaceae): genotoxic, clastogenic and cytotoxic assessment in experimental models of genotoxicity in rats to predict potential human risks. J Ethnopharmacol. 2019 Dec; 243:112086.
25. Dorighello Gg, Inada Nm, Paim Ba, Pardo-Andreu Gl, Vercesi Ae, Oliveira Hcf. *Mangifera indica* l. extract (vimang®) reduces plasma and liver cholesterol and leucocyte oxidative stress in hypercholesterolemic ldl receptor deficient mice. Cell Biol Int [Internet]. 2018 Dec; 42:747–53.
26. Du S, Liu H, Lei T, Xie X, Wang H, He X, et al. Mangiferin: An effective therapeutic agent against several disorders (review). Vol. 18, Molecular Medicine Reports. Spandidos Publications; 2018. P. 4775–86.
27. Marques Canuto K, Semi-Árido E. Documentos 218 empresa brasileira de pesquisa agropecuária embrapa semiárido ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. 2009; Disponível em: [Http://www.Cpatsa.Embrapa.Br](http://www.Cpatsa.Embrapa.Br).

28. Rodeiro I, Donato Mt, Jiménez N, Garrido G, Delgado R, Gómez-Lechón Mj. Effects of mangifera indica l. aqueous extract (vimang) on primary culture of rat hepatocytes. Food and Chemical Toxicology. 2007 Dec; 45:2506–12.
29. Garrido G, González D, Lemus Y, García D, Lodeiro L, Quintero G, et al. In vivo and in vitro anti-inflammatory activity of mangifera indica l. extract (vimang®). Pharmacol Res [Internet]. 2004 Dec; 50:143–9.
30. Pardo-Andreu Gl, Barrios Mf, Curti C, Hernández I, Merino N, Lemus Y, et al. Protective effects of mangifera indica l extract (vimang), and its major component mangiferin, on iron-induced oxidative damage to rat serum and liver. Pharmacol Res [Internet]. 2008 Dec; 57:79–86. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18243014/>.
31. Chattopadhyay, S., Chattopadhyay, U, Shukla, S.P. et al. Effect of mangiferin, a naturally occurring glucosylxanthone, on reproductive function of rats. Pharm Res 1, 279–282 (1984). <https://doi.org/10.1023/A:1016306304849>.
32. Leiro J, Arranz Ja, Yáñez M, Ubeira Fm, Sanmartín MI, Orallo F. Expression profiles of genes involved in the mouse nuclear factor-kappa b signal transduction pathway are modulated by mangiferin. Int Immunopharmacol. 2004 Jun; 763–78.
33. Mei S, Ma H, Chen X. Anticancer and anti-inflammatory properties of mangiferin: A review of its molecular mechanisms. Food and Chemical Toxicology. 2021 Mar 1; 149.
34. Lei Ly, Wang Rc, Pan Yl, Yue Zg, Zhou R, Xie P, et al. Mangiferin inhibited neuroinflammation through regulating microglial polarization and suppressing nf-kb, nlrp3 pathway. Chin J Nat Med [Internet]. 2021 Dec; 19:112–9.

35. Yap Km, Sekar M, Seow Lj, Gan Sh, Bonam Sr, Mat Rani Nni, et al. *Mangifera indica* (mango): a promising medicinal plant for breast cancer therapy and understanding its potential mechanisms of action. *Breast Cancer* (Dove Med Press) [Internet]. 2021; 13:471–503. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34548817/>.
36. Jeong Jj, Jang Se, Hyam Sr, Han Mj, Kim Dh. Mangiferin ameliorates colitis by inhibiting irak1 phosphorylation in nf-kb and mapk pathways. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 2014 Dec; 740:652–61. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24972244/>.
37. Sarkar A, Sreenivasan Y, Ramesh Gt, Manna Sk. Beta-d-glucoside suppresses tumor necrosis factor-induced activation of nuclear transcription factor kappab but potentiates apoptosis. *J Biol Chem*. 2004 Dec; 279:33768–81.
38. Arwa Ps, Zeraik Ml, Ximenes Vf, Fonseca Lm Da, Bolzani Vds, Silva Dhs. Redox-active biflavonoids from *garcinia brasiliensis* as inhibitors of neutrophil oxidative burst and human erythrocyte membrane damage. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2015 Dec; 174:410–8. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26320685/>.
39. Shamsa F, Monsef H, Ghamooshi R, Verdian-Rizi M. Spectrophotometric determination of total alkaloids in some iranian medicinal plants. Vol. 32, *Thai J. Pharm. Sci*. 2008. P. 17–20.
40. Do M, Rufino Sm, Alves Re, Sousa De Brito E, Maia De Moraes S, De Goes Sampaio C, et al. Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre dpqh introdução.
41. Zhang X, Su B, Li J, Li Y, Lu D, Zhu K, et al. Analysis by rp-hplc of mangiferin component correlation between medicinal loranthus and their

- mango host trees. J Chromatogr Sci [Internet]. 2014 Dec; 52:1–4. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23247031/>.
42. Desoti, V. C.; Maldaner, C. L.; Carletto, M. S.; Heinz, A. A.; Coelho, M. S.; Piat, D; et al. Triagem fitoquímica e avaliação das atividades antimicrobiana e citotóxica de plantas medicinais nativas da região oeste do estado do Paraná. Arq. Ciênc. Saú-de UNIPAR, Umuarama, v. 15, n. 1, p. 3-13, jan./abr. 2011.
 43. Kundeková B, Máčajová M, Meta M, Čavarga I, Bilčík B. Chorioallantoic membrane models of various avian species: differences and applications. Biology (Basel). 2021 Apr 1; 10.
 44. Gebara Ss, De Oliveira Ferreira W, Ré-Poppi N, Simionatto E, Carasek E. Volatile compounds of leaves and fruits of mangifera indica var. coquinho (anacardiaceae) obtained using solid phase microextraction and hydrodistillation. Food Chem. 2011 Jul 15; 127:689–93.
 45. Villas Boas Gr, Rodrigues Lemos Jm, De Oliveira Mw, Dos Santos Rc, Stefanello Da Silveira Ap, Bacha Fb, et al. Preclinical safety evaluation of the aqueous extract from mangifera indica linn. (anacardiaceae): Genotoxic, clastogenic and cytotoxic assessment in experimental models of genotoxicity in rats to predict potential human risks. J Ethnopharmacol. 2019 Oct 28; 243.
 46. Wu L, Wu W, Cai Y, Li C, Wang L. Hplc fingerprinting-based multivariate analysis of phenolic compounds in mango leaves varieties: correlation to their antioxidant activity and in silico α -glucosidase inhibitory ability. J Pharm Biomed Anal. 2020 Nov 30; 191.
 47. Fan Fy, Sang Lx, Jiang M, Mcphee Dj. Catechins and their therapeutic benefits to inflammatory bowel disease. Molecules. 2017 Dec. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28335502/>.

48. Sferrazzo G, Palmeri R, Vanella L, Parafati L, Ronsisvalle S, Biondi A, et al. *Mangifera indica* L. leaf extract induces adiponectin and regulates adipogenesis. *Int J Mol Sci*. 2019 Jul.
49. Khan Maa, Islam Mt. Analgesic and cytotoxic activity of *acorus calamus* L., *kigelia pinnata* L., *mangifera indica* L. and *tabernaemontana divaricata* L. *J Pharm Bioallied Sci* [Internet]. 2012 Dec; 4:149. Disponível em: [/Pmc/Articles/Pmc3341719/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23608334/).
50. Ronchi Sn, Brasil Ga, Nascimento Am, Lima Em, Scherer R, Boëchat Gap, et al. Phytochemical and in vitro and in vivo biological investigation on the antihypertensive activity of mango leaves (*mangifera indica* L.). *Ther Adv Cardiovasc Dis* [Internet]. 2015 Feb; 9:244–56. Disponível em: <https://Europepmc.Org/Article/Med/25724882>
51. Mohan Cg, Deepak M, Viswanatha Gl, Savinay G, Hanumantharaju V, Rajendra Ce, Et al. Anti-Oxidant And Anti-Inflammatory Activity Of Leaf Extracts And Fractions Of *Mangifera Indica*. *Asian Pac J Trop Med* [Internet]. 2013 Dec; 6:311–4. Disponível em: [https://Pubmed.Ncbi.Nlm.Nih.Gov/23608334/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23608334/).
52. Öztürk AA, Yenilmez E, Şenel B, Kıyan HT, Güven UM. Effect of different molecular weight PLGA on flurbiprofen nanoparticles: formulation, characterization, cytotoxicity, and in vivo anti-inflammatory effect by using HET-CAM assay. *Drug Dev Ind Pharm*. 2020 Apr; 682-695. doi: 10.1080/03639045.2020.1755304. Epub 2020 Apr. PMID: 32281428.
53. Ribatti D. The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM). A multifaceted experimental model. *Mech Dev*. 2016 Aug 70-77. doi: 10.1016/j.mod.2016.05.003. Epub 2016 May. PMID: 27178379.
54. Ayatollahi A, Rahmati J, Salimi A, Pourahmad J. A comparison of cytotoxic effects of *mangifera indica* L. and *juglans regia* aqueous extract on human

- chronic lymphocytic leukemia. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 2019 Sep; 18:1843–53.
55. Gold-Smith F, Fernandez A, Bishop K. Mangiferin and cancer: Mechanisms of action. *Nutrients* [Internet]. 2016 Dec; 8(7). Disponível em: /Pmc/Articles/Pmc4963872/.
 56. Lin H, Teng H, Wu W, Li Y, Lv G, Huang X, et al. Pharmacokinetic and metabolomic analyses of mangiferin calcium salt in rat models of type 2 diabetes and non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Pharmacol Toxicol*. 2020 Aug. doi: 10.1186/s40360-020-00438-x. PMID: 32762728; PMCID: PMC7409647.
 57. Hou S, Wang F, Li Y, Li Y, Wang M, Sun D, et al. Pharmacokinetic study of mangiferin in human plasma after oral administration. *Food Chem*. 2012 May; 289-94. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.10.079. Epub 2011 Nov. PMID: 26434292.
 58. Laurindo Lf, Santos Ar De O Dos, Carvalho Aca De, Bechara Md, Guiguer El, Goulart R De A, et al. Phytochemicals and regulation of nf-kb in inflammatory bowel diseases: An overview of in vitro and in vivo effects. *Metabolites*. 2023 Jan; 13:96.
 59. Morais Tc, Arruda Br, De Sousa Magalhães H, Trevisan Mts, De Araújo Viana D, Rao Vs, et al. Mangiferin ameliorates the intestinal inflammatory response and the impaired gastrointestinal motility in mouse model of postoperative ileus. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2015 Apr 15; 388:531–8.
 60. Pan CW, Pan ZZ, Hu JJ, Chen WL, Zhou GY, Lin W, et al. Mangiferin alleviates lipopolysaccharide and D-galactosamine-induced acute liver injury by activating the Nrf2 pathway and inhibiting NLRP3 inflammasome

- activation. *Eur J Pharmacol.* 2016 Jan 770:85-91. doi: 10.1016/j.ejphar.2015.12.006. Epub 2015 Dec. PMID: 26668000.
61. Li H, Wang Q, Chen X, Ding Y, Li W. Mangiferin inhibits lipopolysaccharide-induced production of interleukin-6 in human oral epithelial cells by suppressing toll-like receptor signaling. *Arch Oral Biol.* 2016 Nov.155-161. doi: 10.1016/j.archoralbio.2016.08.003. Epub 2016 Aug. PMID: 27517515.
 62. Wei Z, Yan L, Chen Y, Bao C, Dang J, Deng J. Mangiferin inhibits macrophage classical activation via downregulating interferon regulatory factor 5 expression. *Mol Med Rep.* 2016 Aug; 14:1091–8.
 63. Ferlazzo V, D'agostino P, Milano S, Caruso R, Feo S, Cillari E, et al. Anti-inflammatory effects of annexin-1: Stimulation of il-10 release and inhibition of nitric oxide synthesis. *Int Immunopharmacol.* 2003; (10–11):1363–9.
 64. Villacorta H, Masetto AC, Mesquita ET. C-reactive protein: an inflammatory marker with prognostic value in patients with decompensated heart failure. *Arq Bras Cardiol.* 2007 May; 88:585-9. English, Portuguese. doi: 10.1590/s0066-782x2007000500014. PMID: 17589635.
 65. Da Silva Ps, Giro Ap, Oliani Sm. Mast cells modulate the inflammatory process in endotoxin-induced uveitis. *Mol Vis* [Internet]. 2011; 17:1310. Disponível em: /Pmc/Articles/Pmc3103740/.
 66. Girol Ap, Zanon C De F, Caruso Íp, Costa S De S, Souza Hr, Cornélio Ml, et al. Annexin A1 mimetic peptide and piperlongumine: anti-inflammatory profiles in endotoxin-induced uveitis. *Cells* [Internet]. 2021 Nov. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34831393/>.
 67. Hannon R, Croxtall Jd, Getting Sj, Roviezzo F, Yona S, Paul-Clark Mj, et al. Aberrant inflammation and resistance to glucocorticoids in Annexin 1-/-

- mouse. *Faseb J* [Internet]. 2003; 17:253–5. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12475898/>.
68. Gímenes Ad, Andrade Trm, Mello Cb, Ramos L, Gil Cd, Olíani Sm. Beneficial effect of annexin a1 in a model of experimental allergic conjunctivitis. *Exp Eye Res* [Internet]. 2015 May 134:24–32. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25795053/>.
69. Sanches Jm, Correia-Silva Rd, Duarte Ghb, Fernandes Amap, Sánchez-Vinces S, Carvalho Po, et al. Role of annexin a1 in nlrp3 inflammasome activation in murine neutrophils. 2021; Disponível em: <https://doi.org/10.3390/Cells10010121>.
70. Lu Qy, Jin Y, Mao Jt, Zhang Zf, Heber D, Dubinett Sm, et al. Green tea inhibits cyclooxygenase-2 in non-small cell lung cancer cells through the induction of Annexin-1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Nov; 427(4):725–30.
71. Sant'ana M, Souza Hr, Possebon L, Cornélio Ml, Ríffo-Vasquez Y, Girol Ap, et al. Effect of piperlongumine during exposure to cigarette smoke reduces inflammation and lung injury. *Pulm Pharmacol Ther*. 2020 Apr; 61.
72. Ashino Teb, Sant'Ana Ml, Yoshikawa Ah, Possebon L, De Souza Costa S, Iyomasa-Pilon Mm, et al. Protective effects of piperlongumin in the prevention of inflammatory damage caused by pulmonary exposure to benzopyrene carcinogen. *Int Immunopharmacol*. 2021 Dec 101.
73. Leiro J, Arranz Ja, Yáñez M, Ubeira Fm, Sanmartín Ml, Orallo F. Expression profiles of genes involved in the mouse nuclear factor-kappa b signal transduction pathway are modulated by mangiferin. *Int Immunopharmacol* [Internet]. 2004 Dec; 4:763–78. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15135318/>.

74. Yap Km, Sekar M, Seow Lj, Gan Sh, Bonam Sr, Rani Nnim, et al. *Mangifera indica* (mango): A promising medicinal plant for breast cancer therapy and understanding its potential mechanisms of action. *Breast Cancer* (Dove Med Press) [Internet]. 2021; 13: 471–503. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34548817/>.
75. García-Rivera D, Delgado R, Bougarne N, Haegeman G, Vanden Berghe W. Gallic acid indanone and mangiferin xanthone are strong determinants of immunosuppressive anti-tumour effects of *mangifera indica* l. bark in mda-mb231 breast cancer cells. *Cancer Lett* [Internet]. 2011 Jun 30;305:21–31. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21420233/>.

ANEXOS

ANEXOS

8. Anexos

Anexo 1 – Certificado de aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).

CENTRO UNIVERSITÁRIO PADRE ALBINO
MANTIDO PELA FUNDAÇÃO PADRE ALBINO
Rua dos Estudantes, 225 - CEP 15809-144 - Catanduva-SP
www.unifipa.com.br

**C E R T I F I C A D O****Nº 02/20**

Certificamos que a proposta intitulada “Perfil Fitoquímico, microbiológico e citotóxico do extrato alcoólico de folhas da Manga (*Mangifera indica*) como alternativa terapêutica em processos inflamatórios”, registrada com o Número 02/20, sob a responsabilidade de Prof.^a Dr.^a Ana Paula Girol – que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) do Centro Universitário Padre Albino – UNIFIPA, em reunião de 24/03/2020.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/04/2020 a 31/12/2021
Espécie/ Linhagem/ Raça	<i>Rattus norvegicus</i> / Wistar
Nº de animais	15
Peso/Idade	200-300g
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério UNIFIPA

Catanduva (SP), 24 de Março de 2020.

Profa. Dra. Andréia de Haro Moreno
Coordenadora da CEUA-UNIFIPA