



## **ESPILANTOL, UMA MOLÉCULA PROMISSORA PARA O TRATAMENTO DE DISTÚRBIOS INFLAMATÓRIOS: UM ESTUDO IN VITRO E IN SILICO**

Ari Sérgio de Oliveira Lemos<sup>1</sup>, Lara Melo Campos<sup>1</sup>, Jhamine Caroline de Oliveira Freitas<sup>1</sup>,  
Paula Marchesini<sup>2</sup>, Caio Márcio de Oliveira Monteiro<sup>2</sup>, Alan Franco Barbosa<sup>3</sup>, Mário  
Geraldo de Carvalho<sup>4</sup>, Rodrigo Luiz Fabri<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup>*Laboratório de Produtos Naturais Bioativos, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de fora, Juiz de Fora, Brasil.*

<sup>2</sup>*Departamento de Microbiologia, Imunologia, Parasitologia e Patologia, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiás, Brasil.*

<sup>3</sup>*Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso, Campus Sorriso, 78.890-000, Brasil*

<sup>4</sup>*Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rodovia BR 465 - Km 7, Seropédica, RJ 23897-000, Brasil*

### **\*Correspondência do autor**

Rodrigo Luiz Fabri, Laboratório de Produtos Naturais, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais CEP 36036 900, Brasil.

E-mail: [rodrigo.fabri@ufjf.com.br](mailto:rodrigo.fabri@ufjf.com.br)

### **RESUMO**

A inflamação pode levar ao surgimento de várias doenças degenerativas. Além disso, os medicamentos anti-inflamatórios disponíveis podem levar ao surgimento de efeitos adversos, o que desperta o interesse de novas terapias. O espilantol, extraído de *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen possui diversas atividades relatadas, como analgésica e antimicrobiana, mas ainda carece de mais estudos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade anti-inflamatória, citotóxica e genotóxica do espilantol, além de verificar alterações na morfologia celular e caracterizar seus alvos farmacodinâmicos. Macrófagos J774A.1 foram utilizadas nos ensaios *in vitro*. A viabilidade celular e atividade anti-inflamatória foram avaliadas por MTT e dosagem indireta de óxido nítrico (NO), pelo método de Griess respectivamente (Concentrações de 50 - 6,25 µg/mL). A genotoxicidade



foi determinada por citometria de fluxo (Concentração de 50 µg/mL). A morfologia celular foi avaliada por microscopia ótica e os alvos farmacodinâmicos pelo programa PASS *online*. O espilantol não demonstrou citotoxicidade e inibiu significativamente a produção NO em todas as concentrações ( $p < 0,05$ ). A concentração de 50 µg/mL não apresentou alterações morfológicas e efeito genotóxico. Os alvos farmacodinâmicos do espilantol foram: agente anti-inflamatório/imunomodulador por inibição da expressão de TNF e substrato para as isoformas de ciclo-oxigenase. Os resultados encontrados sugerem que o espilantol é uma molécula anti-inflamatória promissora. Além disso, inferimos que o possível efeito anti-inflamatório do espilantol está relacionado à inibição da expressão do TNF. Demais estudos devem ser realizados para confirmar a eficácia e segurança do espilantol para o tratamento de distúrbios inflamatórios.

**Palavras-chave:** Espilantol. Inflamação. MTT. Ciclo celular. Morfologia.

#### **ABSTRACT**

Inflammation can lead to the development of several degenerative diseases. In addition, the available anti-inflammatory drugs can lead to adverse effects, which arouses the interest of new therapies. Spilantol extracted from *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen, has several reported activities, such as analgesic and antimicrobial, but still needs further studies. The objective of this study was to evaluate the anti-inflammatory, cytotoxic and genotoxic activity of spilantol, in addition to verifying cell morphological changes and characterizing its pharmacodynamic targets. Macrophages J774A.1 were used in in vitro assays. Cell viability and anti-inflammatory activity were assessed by MTT and indirect nitric oxide (NO) measurement, using the Griess method, respectively (concentrations of 50 - 6.25 µg / mL). Genotoxicity was determined by flow cytometry (50 µg / mL concentration). The morphology was evaluated by optical microscopy and the pharmacodynamic targets by the PASS online program. Spilantol did not showed cytotoxicity and significantly inhibited NO production at all concentrations ( $p < 0.05$ ). The concentration of 50 µg / mL did not show any morphological changes or genotoxic effect. The pharmacodynamic targets of spilantol were: anti-inflammatory / immunomodulatory agent by inhibiting TNF expression and substrate for cyclooxygenase isoforms. The results found suggest that spilantol is a promising anti-inflammatory molecule. In addition, we infer that the possible anti-inflammatory effect of spilantol is related to the inhibition of TNF expression. Further studies must be carried out to confirm the efficacy and safety of spilantol for the treatment of inflammatory disorders.

**Keywords:** Espilantol. Inflammation. MTT. Cell cycle. Morphology.



## 1 INTRODUÇÃO

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

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

O radical NO é produzido mediante a ativação de um importante fator de transcrição, o fator nuclear de transcrição Kapa B (NFkB), uma molécula que exerce uma função essencial na regulação de genes associados à inflamação e está envolvido na sua progressão. A ativação do NFkB é mediada por ligantes que estimulam os receptores TLR (*Toll Like Receptor*) presentes nas células do sistema imune. A ligação nos receptores TLR ativa o fator NFkB e faz com que este desloque-se do citoplasma para o núcleo e acelere a transcrição de genes associados a inflamação, como os genes responsáveis pela produção das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 e da enzima óxido nítrico sintase (iNOS) (AHMED, 2011).



Uma das alternativas para tratamento do processo inflamatório são os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), uma das classes de fármacos mais comumente prescritas para dor e inflamação. Essa classe está entre os medicamentos mais vendidos, alcançando cerca de 5 a 10% de todos os medicamentos prescritos por ano, no mundo todo (WONGRAKPANICH *et al.*, 2018).

Entretanto, devido aos efeitos adversos associados ao uso crônico dos AINEs, tais como úlceras pépticas, insuficiência renal aguda, acidente vascular cerebral e infarto do miocárdio, há um grande interesse das pesquisas em plantas medicinais e substâncias naturais, usadas como suplementos alimentares e medicações, para reduzir a dor e a inflamação (MAROON; BOST, MAROON, 2010; MARCUM; HANLON, 2010). Muitos desses fitocompostos funcionam inibindo as vias inflamatórias de maneira similar aos AINEs (inibição da COX), mas também podem atuar inibindo vias inflamatórias relacionadas à ativação do fator NF- $\kappa$ B (MAROON, BOST e MAROON, 2010).

O espilantol é uma substância encontrada em plantas da família *Solanaceae* e *Piperaceae*, sendo considerado o principal composto responsável pelas atividades biológicas do extrato destas espécies (ALONSO, 2016). O composto encontra-se distribuído de maneira variável em toda a parte aérea do jambu (*Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen), porém, em maior concentração, nas flores (CHENG *et al.*, 2015). Várias atividades farmacológicas já foram atribuídas ao espilantol, como antinociceptiva, neuroprotetora, antioxidante, anti-inflamatória, antimutagênica, anticâncer, antifúngica, antibacteriana, antirugas, anticonvulsivante, afrodisíaca, inibidora da lipase pancreática, diurética, vasorelaxante, antivírus da imunodeficiência humana (BARBOSA *et al.*, 2016). Embora a atividade anti-inflamatória do espilantol já tenha sido descrita, sua segurança e mecanismo anti-inflamatório ainda possuem lacunas que devem ser preenchidas. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade anti-inflamatória, citotóxica e genotóxica de espilantol, além de verificar alterações na morfologia celular e caracterizar seus alvos farmacodinâmicos *in silico*.



## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Material de estudo**

O espilantol, com 98% de pureza, foi obtido conforme metodologia proposta por Barbosa *et al.* (2016), realizada no Laboratório de Produtos Naturais do Instituto de Química da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

### **2.2 Dosagem de NO em sobrenadante de células J774A.1**

As células de macrófagos da linhagem J774A.1 foram transferidas para microplacas de 96 poços ( $2 \times 10^4$  cel/poço) e tratadas com concentrações de 50; 25; 12,5 e 6,25  $\mu\text{g/mL}$  de espilantol. Em seguida foi adicionado o estímulo contendo LPS (lipopolissacáride) a  $1 \mu\text{g/mL}$  mais IFN- $\gamma$  a 0,9  $\text{ng/mL}$  e completado o volume para 200  $\mu\text{L}$ . Como controles negativos foram utilizadas células não tratadas e estimuladas com LPS e IFN- $\gamma$  e células não estimuladas e tratadas apenas com DMSO 0,06% (veículo). As análises foram realizadas em triplicata. Ao final do procedimento as células foram novamente incubadas durante 48 h em estufa à atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  à temperatura de  $37^\circ\text{C}$ .

A quantidade de NO foi avaliada pelo método de Griess, por meio da dosagem da concentração de NO (indiretamente determinada pela dosagem de nitrito) no sobrenadante de 48 h de cultura, como na metodologia descrita por SUN *et al.* (2003). Para realização do teste, 50  $\mu\text{L}$  de sobrenadante de cada poço das culturas das células estimuladas foram transferidos para placas de 96 poços, posteriormente foi acrescentado igual volume de reagente de Griess (1% de sulfanilamida, 0,1% de N-(1-naftil)-etileno diamina hidrocloreto, 2,5%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ). A quantidade de NO ( $\mu\text{M}$ ) foi determinada por comparação com uma solução padrão de nitrito de sódio. O comprimento de onda utilizado para realização da leitura foi 540 nm.



### **2.3 Avaliação de viabilidade pelo ensaio de MTT**

Após cultivo em garrafa, as células foram transferidas para microplacas de 96 poços, foi adicionado em cada poço 100 µL de uma suspensão de células a  $2 \times 10^5$  cel/mL, totalizando assim  $2 \times 10^4$  cel/poço. Em seguida foram acrescentadas as concentrações de 50; 25; 12,5 e 6,25 µg/mL de espilantol e o volume final foi completado para 200 µL. Como controle negativo foi utilizado células tratadas com DMSO a 0,06% (veículo). Ao final do procedimento as células foram novamente incubadas durante 48h em estufa à atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e à temperatura de 37 °C.

A citotoxicidade foi avaliada por meio da viabilidade celular por meio do ensaio de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (MOSMANN, 1983). O ensaio para avaliação de viabilidade é baseado na redução metabólica do MTT a formazan (coloração violeta). Após o tempo de cultura de 48h, os sobrenadantes foram descartados e 100 µL de RPMI foram adicionados em todos os poços contendo as células cultivadas por 48h, em seguida 10 µL de MTT (5 mg/mL) também foram acrescentados a cada poço. A placa foi incubada a 37 °C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>. Transcorrido o período de 4h a reação foi finalizada com a retirada do meio de cultura e adição de dimetilsufóxido (DMSO). A absorbância (Abs) foi lida a 570 nm e a viabilidade celular (%) dos macrófagos após tratamento obtido pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ de células viáveis} = \frac{\text{Abs (Amostra)}}{\text{Abs (DMSO 0,06\%)}} \times 100$$

Sendo: Abs (Amostra): Absorbância mensurada após tratamento das células com a amostra; Abs (DMSO 0,06%): Absorbância mensurada após tratamento das células com DMSO a 0,06% (veículo da amostra).



## **2.4 Avaliação da morfologia e densidade celular por microscopia óptica em células J774A.1 tratadas com espilantol**

A avaliação morfológica e a densidade celular de células J774A.1 foram realizadas após tratamento e incubação por 48 h com a concentração de 50 µg/mL de espilantol utilizando microscópio óptico invertido acoplado a uma câmera. Foram registradas fotografias em campos homogêneos utilizando-se a objetiva de 40X. Depois de capturada as imagens, a avaliação da influência do espilantol sobre viabilidade de macrófagos murinos J774A.1 foi avaliada quanto a possíveis alterações em seu ciclo celular.

## **2.5 Análise de ciclo celular**

Embora uma célula seja aparentemente viável após o tratamento, é importante analisar se houve uma alteração em sua capacidade de replicação devido ao dano / parada do DNA em um determinado estágio do ciclo celular. Após a realização dos ensaios de viabilidade, nossos esforços concentraram-se em avaliar possíveis danos ao DNA e / ou parada do ciclo celular em células J774A.1 tratadas com a concentração de 50 µg/mL de espilantol.

O ciclo celular foi realizado de acordo com RICCARDI e NICOLETTI (2006) com algumas modificações.  $2 \times 10^4$  células por poço foram transferidas para placas de 96 poços e incubadas por 48h a 37 ° C e 5% de CO<sub>2</sub> na concentração de 50 µg / mL de espilantol. Ao final do tempo de incubação, os sobrenadantes foram descartados. As células foram colocadas em gelo e coradas com 150 µL de solução de iodeto de propídio (0,05% de iodeto de propídio, 1% de citrato de sódio, 0,5% de triton X 100) 4 horas antes da leitura e coletadas em tubos FACS (CORNING). A leitura das amostras foi realizada em citômetro de fluxo FACS canto II (Becton & Dickinson), onde 3.000 eventos foram adquiridos. As análises foram realizadas usando o software FlowJo<sup>®</sup>, onde a porcentagem da população de células em cada fase do ciclo celular (coloração com iodeto de propídio (IP)) foi



determinada. As células tratadas com DMSO a 0,06% foram usadas como controle negativo. O experimento foi realizado em triplicata.

## **2.6 Predição das bioatividades do espilantol *in silico***

A estrutura química do espilantol foi desenhada no programa *Molinspiration* para se obter a sua notação *smile*. Após a obtenção desta, as propriedades anti-inflamatórias do espilantol foram avaliadas pelo programa *Pass online*. Os valores da capacidade de ser ativo (Pa) e de ser inativo (Pi) foram tabelados, respeitando o ponto de corte acima de 30% de probabilidade (0,30).

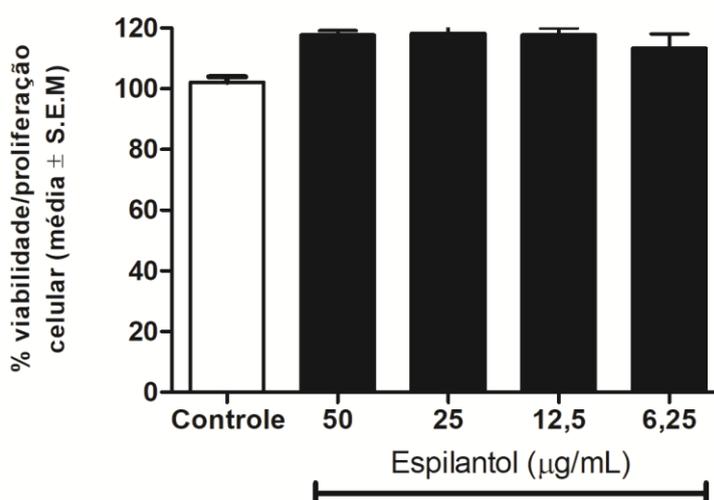
## **2.7 Análise estatística**

A análise estatística dos testes *in vitro* foi realizada pelo teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni, por meio do programa GraphPrism 5.0. As diferenças foram consideradas significantes com  $p < 0,05$ . Os resultados foram expressos na forma de média  $\pm$  desvio padrão.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Avaliação da atividade citotóxica em células J774A.1 pelo ensaio do MTT

A avaliação da atividade citotóxica de espilantol demonstrou que nenhuma das concentrações testadas reduziu significativamente a viabilidade celular em macrófagos (Figura 2).

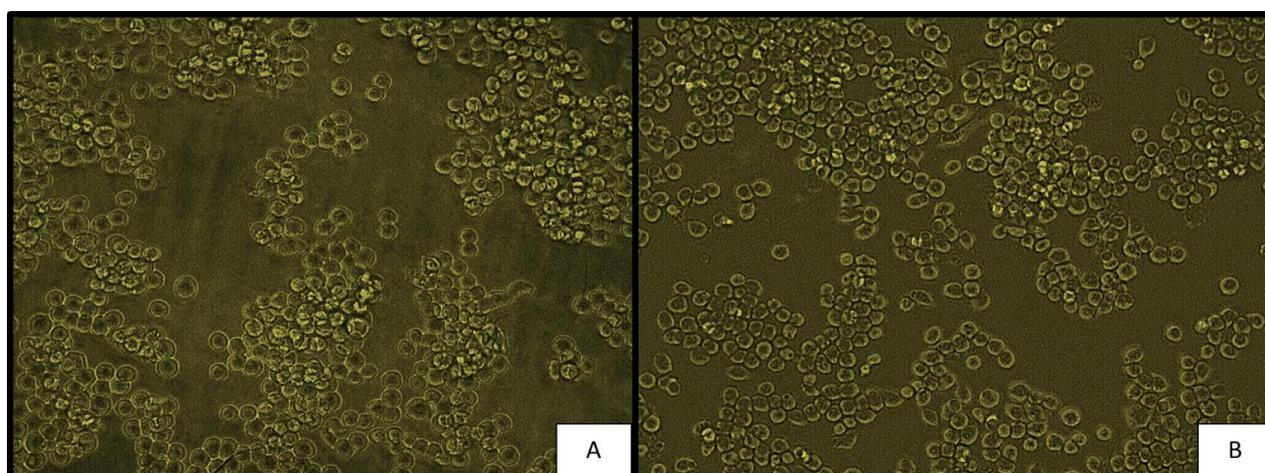


**Figura 2-** Viabilidade celular de macrófagos da linhagem J774A.1 avaliada pelo método de MTT após tratamento com as diferentes concentrações de espilantol. Células tratadas com RPMI + DMSO 0,06%, veículo da amostra (Controle). ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni. Resultados expressos na forma de média  $\pm$  desvio padrão.

O ideal de terapias medicamentosas é que estas não apresentem ou tenham baixa toxicidade às células do organismo humano (PICCOLO, MENALE e CRISPI, 2015). Com o intuito de investigar tal propriedade, o ensaio de citotoxicidade celular em células J774A.1 foi realizado. O percentual de viabilidade aceitável foi determinado de acordo com a ISO10993-5 (2009), a qual estabelece que na investigação de citotoxicidade de substâncias *in vitro*, a viabilidade celular não deve ser reduzida para valores inferiores a 70%. Assim, foi possível observar que o espilantol não reduziu a viabilidade celular em macrófago J774A.1 abaixo de 70%, sendo considerada, por essa técnica, uma molécula segura e não tóxica.

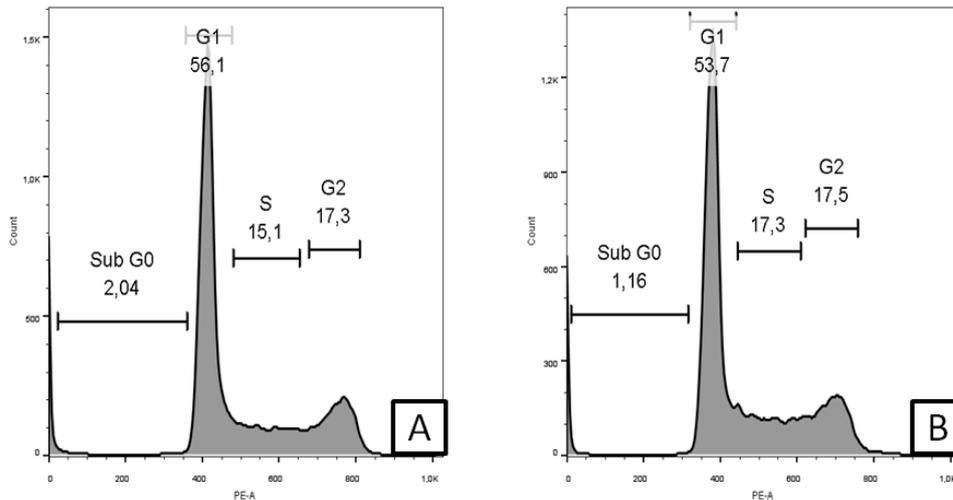
### **3.2 Avaliação morfológica e da densidade celular por microscopia óptica e análise de ciclo celular em células J774A.1**

A análise qualitativa, por microscopia óptica, não demonstrou alterações significativas na morfologia e densidade celular das células J774A.1 tratadas com a concentração de 50 µg/mL de espilantol. O perfil celular permaneceu semelhante ao grupo tratado apenas com DMSO a 0,06% (Figura 3).

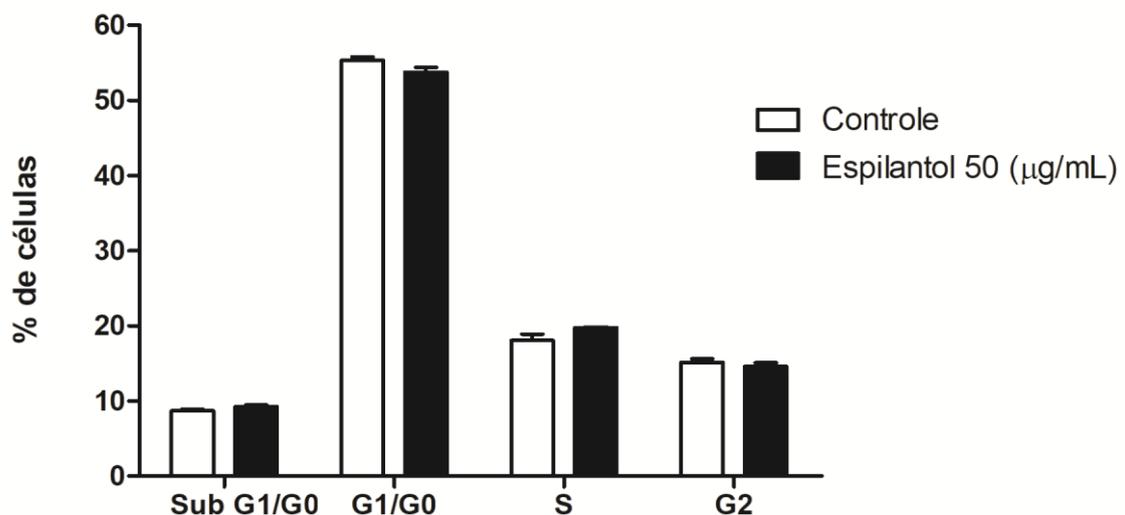


**Figura 3-** Microscopia óptica (Magnificação de 400X) da densidade celular e da morfologia de macrófagos murinos da linhagem J774A.1 após tratamento com a concentração de 50 µg/mL do espilantol. Células cultivadas com meio de cultura RPMI acrescido de 0,06% de DMSO (Controle) (A). Células tratadas com a concentração de 50 µg/mL do espilantol (B).

Para avaliar se a presença do espilantol, na maior concentração, poderia afetar à perda da capacidade replicativa e/ou danos ao DNA em macrófagos J774A.1, foi utilizada a técnica de citometria de fluxo e coloração com IP durante as várias fases do ciclo celular (Sub G1/G0; G1/G0; S e G2/M) (Figura 4). Os resultados demonstraram que não houve mudança significativa em nenhuma das fases do ciclo celular da população de células analisadas (Figura 5).



**Figura 4** – Histograma das populações de macrófagos J774A1 em cada fase do ciclo celular. Células tratadas com RPMI + DMSO 0,06%, veículo da amostra (Controle) (A). Células tratadas com a concentração de 50 µg/mL de espilantol (B).



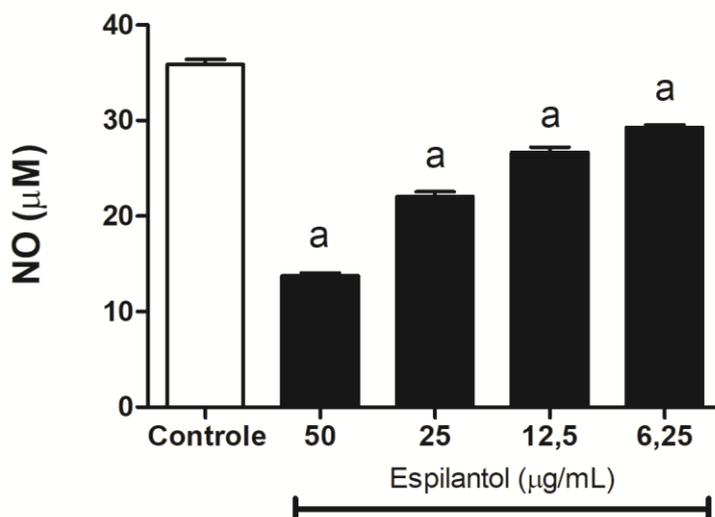
**Figura 5**- Análise de ciclo celular da concentração de 50 µg/mL do espilantol em macrófagos da linhagem J774A.1. Células tratadas com RPMI + DMSO 0,06%, veículo da amostra (Controle). ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni. Resultados expressos na forma de média ± desvio padrão.



A proliferação celular é vital para a morfogênese do tecido e a perda desse controle pode levar a patologias como o câncer. Portanto, é extremamente importante investigar a capacidade de proliferação celular (CECCHINI *et al.*, 2012). Neste trabalho, após comprovar a baixa toxicidade de espilantol, foi realizada a análise do ciclo celular (genotoxicidade) por iodeto de propídeo utilizando a citometria de fluxo para a maior concentração do composto. Não foi observada diferença estatística entre as células tratadas com DMSO a 0,06% (Controle) e a concentração de 50 µg/mL ( $p > 0,05$ ). Os resultados encontrados reforçam a segurança do espilantol, uma vez que, nenhuma alteração no conteúdo de DNA foi observada em nenhuma das fases do ciclo celular. Além disso, nenhuma alteração morfológica e de densidade foi encontrada nos macrófagos tratados com a maior concentração testada, sugerindo assim ausência de efeitos tóxicos.

### **3.3 Atividade anti-inflamatória *in vitro***

Os resultados anti-inflamatórios encontrados demonstraram que o espilantol conseguiu reduzir significativamente ( $p < 0,5$ ) a concentração de NO em todas as concentrações avaliadas (Figura 6). As concentrações de 50 e 25 µg/mL foram consideradas as mais promissoras com  $61,69 \pm 1,86$  e  $38,55 \pm 3,08$  % de inibição, respectivamente.



**Figura 6** - Avaliação do potencial anti-inflamatório do espilantol em diferentes concentrações por meio da dosagem de óxido nítrico em células J774A.1. Produção de óxido nítrico por células estimuladas com INF- $\gamma$  e com LPS e cultivadas com RPMI + DMSO 0,06% (controle). Células tratadas com diferentes concentrações do espilantol (50; 25; 12,5 e 6,25  $\mu\text{g/mL}$ ). a, Diferença estatística em relação as células estimuladas com INF- $\gamma$  e com LPS e cultivadas com RPMI + DMSO 0,06% ( $p < 0,05$ ). ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni. Resultados expressos na forma de média  $\pm$  desvio padrão.

A atividade anti-inflamatória de espilantol pela redução de óxido nítrico foi investigada e foi possível observar uma redução significativa na concentração deste radical livre em todas as concentrações testadas de espilantol. Estes resultados são encorajadores, uma vez que o NO é uma molécula de sinalização que desempenha um papel fundamental na patogênese da inflamação, sendo considerado um mediador pró-inflamatório (SHARMA; AL-OMRAN; PARVATHY, 2007). Desta forma, a descoberta de novas substâncias que possam ser usadas em terapias anti-inflamatórias pode ser considerada de grande relevância, uma vez que alguns dos fármacos anti-inflamatórios disponíveis no mercado, como os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), podem aumentar o risco de complicações gastrointestinais e cardiovasculares (SOSTRES *et al.*, 2010).



### 3.4 Predição de bioatividades *in silico*

A análise *in silico* realizada para o espilantol e as suas bioatividades foram apresentadas na Tabela 1. Foram consideradas como promissoras apenas bioatividades com probabilidade > 30%. Os resultados das análises demonstraram que a melhor correlação dos alvos farmacodinâmicos com a estrutura do espilantol e a atividade anti-inflamatória foram: inibidor da expressão de TNF, anti-inflamatório, imunomodulador e substrato para as isoformas da enzima ciclo-oxigenase. Dentre as probabilidades de atividade, a inibição da expressão de TNF foi a mais promissora, com valor de Pa igual a 0,537 (53,7% de probabilidade).

**Tabela 1-** Bioatividades *in silico* do espilantol relacionadas com a atividade anti-inflamatória utilizando o programa Pass *online*.

Probabilidade de atividade (Pa)	Probabilidade de inatividade (Pi)	Atividade/Alvo molecular
0,537	0,022	Inibidor da expressão de TNF
0,329	0,137	Anti-inflamatório
0,308	0,066	Imunomodulador
0,307	0,015	Substrato para isoformas da ciclo-oxigenase

Com o intuito de aprofundar os estudos sobre o potencial anti-inflamatório de espilantol, seus possíveis alvos farmacodinâmicos foram avaliados e as seguintes bioatividades foram encontradas: inibidor da expressão de TNF, anti-inflamatório, imunomodulador e substrato para ciclo-oxigenase. Desta forma, o potencial anti-inflamatório e imunomodulador de espilantol podem estar relacionados com a inibição de



TNF e por ser substrato da enzima ciclo-oxigenase. O TNF $\alpha$ , por exemplo, aumenta a expressão da óxido nítrico induzível (iNOS) em macrófagos, células endoteliais vasculares e no músculo liso. Em condições normais, a atividade iNOS é muito baixa. No entanto, iNOS é estimulada durante a inflamação por citocinas como o TNF $\alpha$  e a quantidade de NO produzida pela iNOS pode ser 1.000 vezes maior do que a produzida pela óxido nítrico endotelial (eNOS) (GONZALEZ-GAY *et al.*, 2009).

As terapias anti-inflamatórias são capazes de reduzir a dor e a inflamação por meio do bloqueio das isoformas da enzima ciclo-oxigenase (COX-1 e /ou COX-2), que são enzimas inflamatórias. Neste trabalho, identificamos que as isoformas da ciclo-oxigenases podem ser possíveis alvos farmacodinâmicos de espilantol. Desta forma, o espilantol pode vir a se tornar uma substância promissora para a inibição da produção de mediadores inflamatórios produzidos pelas isoformas da COX (OGUNTIBEJU, 2018). Além disso, a inibição da produção de NO pode reduzir a ativação da COX, o que torna os resultados de espilantol ainda mais promissores (FANG *et al.*, 2015).

#### **4 CONCLUSÃO**

O espilantol apresenta um possível potencial anti-inflamatório pela redução de NO em macrófagos estimulados. Além disso, os ensaios de cito e genotoxicidade não demonstraram alterações significantes na maior concentração testada de espilantol, demonstrando que este composto pode vir a ser usado de forma segura. Nos ensaios *in silico*, observa-se que, outras vias estão relacionadas ao potencial anti-inflamatório do espilantol, como a inibição da expressão de TNF e substrato para as isoformas da COX, uma vez que essas vias ligadas com a diminuição da produção de NO.



## REFERÊNCIAS

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

ALONSO, I. G. **Nova abordagem para a síntese total do espilantol e avaliação da atividade antinociceptiva**. 2016. 163 f. Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2016.

BAIZABAL-AGUIRRE *et al.* Control and Resolution Mechanisms of the Inflammatory Response. **Mediators of Inflammation**, p.1-2, 2014.

BARBOSA, A. F. *et al.* Effects of *Acmella oleracea* methanolic extract and fractions on the tyrosinase enzyme. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, p. 321-325, 2016.

CECCHINI, M.J., AMIRI, M., DICK, F.A. Analysis of Cell Cycle Position in Mammalian Cells. **Journal of Visualized Experiments**, v.59, p.1-7, 2012.

CHEN *et al.* Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. **Oncotarget**, v. 9, n. 6, p.7204-7218, 2018.

CHENG *et al.* Alkylamides of *Acmella oleracea*. **Molecules**. v. 20, n. 4, p. 6970-6977, 2015.

FANG *et al.* Nitric Oxide and cGMP Induce COX-2 Expression and PGE2 Production in Human Granulosa Cells Through CREB Signaling Pathway. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.100, n.2, p.262–269, 2015.

GONZALEZ-GAY *et al.* Short-term effect of anti-TNF- $\alpha$  therapy on nitric oxide production in patients with severe rheumatoid arthritis. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v.27, p.452-458, 2009.

ISO, E. N. 10993-5. **Biological Evaluation of Medical Devices. Part 5: Tests for In Vitro Cytotoxicity**. International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland, 2009.

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

MAROON, J.C.; BOST, J.W.; MAROON, A. Natural anti-inflammatory agents for pain relief. **Surgical Neurology International**, v.1, n.80, p.1-10, 2010.

MOLINSPIRATION Cheminformatics. 2020. Desenvolvido pela Universidade de Bratislava. Disponível em: <<https://www.molinspiration.com/>>. Acesso em: 01 jul. 2020.



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

OGUNTIBEJU, O, O. Medicinal plants with anti-inflammatory activities from selected countries and regions of Africa. **Journal of Inflammation Research**, v.11, p.307–317, 2018.

PASS online. Disponível em <<http://www.pharmaexpert.ru/passonline/>> acessado em 02 de setembro de 2020.

PICCOLO, M.T.; MENALE, C.; CRISPI, S. Combined anticancer therapies: an overview of the latest applications. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v.15, n.4, p.408-422, 2015.

RICCARDI, C.; NICOLETTI, I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Nature Protocols**, v.1, n.3, p.1458-1461, 2006.

SHARMA, J.N.; AL-OMRAN, A.; PARVATHY, A.S.S. Role of nitric oxide in inflammatory diseases. **Inflammopharmacology**, v.15, p. 252–259, 2007.

SOSTRES *et al.* Adverse effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs, aspirin and coxibs) on upper gastrointestinal tract. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 24, p.121–132, 2010.

SUN *et al.* Measurement of Nitric Oxide Production in Biological Systems by Using Griess Reaction Assay. **Sensors**, v.3, p. 276-284, 2003

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

WONGRAKPANICH *et al.* A Comprehensive Review of Non-Steroidal Anti-inflammatory Drug Use in The Elderly. **Aging and Disease**, v. 9, n.1, p.143-150, 2018.

**Received:** 09 September 2020

**Accepted:** 20 September 2020

**Published:** 02 April 2021