

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

GLEYYKA DAISA DE MELO SANTOS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DO ALCALÓIDE
MILONINA FRENTE *Leishmania amazonensis* E O ENVOLVIMENTO DE POSSÍVEIS
MECANISMOS DE AÇÃO**

Recife

2020

GLEYYKA DAISA DE MELO SANTOS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DO ALCALÓIDE
MILONINA FRENTE *Leishmania amazonensis* E O ENVOLVIMENTO DE POSSÍVEIS
MECANISMOS DE AÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos para defesa da Dissertação de Mestrado em Inovação Terapêutica.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Paloma Lys de Medeiros

Coorientadora: Prof^ª. Dra. Eliete Cavalcanti da Silva

Recife

2020

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Santos, Gleyka Daisa de Melo

Avaliação da atividade leishmanicida do alcalóide milonina frente *Leishmania amazonensis* e o envolvimento de possíveis mecanismos de ação / Gleyka Daisa de Melo Santos - 2020.

91 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Paloma Lys de Medeiros

Coorientadora: Eliete Cavalcanti da Silva

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.
Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Inovação
Terapêutica. Recife, 2020.

Inclui referências e apêndice.

1. *Cissampelos sympodialis* Eichl 2. Alcaloides 3. Milonina

I. Medeiros, Paloma Lys de (Orientadora) II. Silva, Eliete Cavalcanti da
(Coorientadora) IV. Título

616.9364

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2022-008

GLEYKA DAISA DE MELO SANTOS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DO ALCALÓIDE MILONINA
FRENTE *Leishmania amazonensis* E O ENVOLVIMENTO DE POSSÍVEIS
MECANISMOS DE AÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos para defesa da Dissertação de Mestrado em Inovação Terapêutica.

Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos Essenciais para a saúde.

DATA DE APROVAÇÃO: 21/02/2020

Banca examinadora:

Prof^a. Dra. Dijanah Cota Machado (Membro externo)

Instituição: Departamento de Biofísica e Radiobiologia (CB/UFPE)

Assinatura: _____

Prof. Dr. Cláudio Gabriel Rodrigues (Membro interno)

Instituição: Departamento de Biofísica e Radiobiologia (CB/UFPE)

Assinatura: _____

Prof^a. Dra. Paloma Lys de Medeiros (Presidente)

Instituição: Departamento de Histologia e Embriologia (CB/UFPE)

Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar forças, me dar sabedoria, me iluminar, me guiar, me dar saúde e me proteger, assim como a todos que são importantes para mim.

Aos meus pais, Miriam Clarice de Melo e Jeremias José dos Santos, por sempre terem feito o melhor para a minha educação e formação. Agradeço pela existência de vocês em minha vida, vocês são muito importantes para mim.

Aos meus irmãos, Jeremias José dos Santos Júnior e Gleyce Hadassa de Melo Santos, por sempre se fazerem presentes em minha vida, vocês também são muito importantes para mim.

Ao meu namorado, Pérsio Alexandre da Silva, que chegou há alguns meses em minha vida, e tem sido uma pessoa de extrema importância para mim, por todo o apoio, companheirismo, pelos momentos que me ouviu desabafar e sempre me acolheu com palavras que me ajudavam a processar melhor os pensamentos e muitas vezes com carinhos que me ajudavam a acalmar mais os pensamentos.

A minha avó, Dona Heronildes Ferreira dos Santos, que sempre se fez presente em toda a minha vida, uma mulher guerreira que ainda me ensina muito, obrigada por existir “Vó”.

A minha Orientadora, Paloma Lys de Medeiros, minha mãe na ciência, pela paciência, sabedoria e racionalidade em tudo que faz, agradeço pelo apoio e por acreditar em mim na construção deste trabalho.

A minha Co-orientadora, Eliete Cavalcanti da Silva, por me receber pelo carinho, paciência e por todos os ensinamentos.

A Erwelly Barros, por me receber no Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Histologia e Embriologia (LCT-DHE) como estudante de Iniciação Científica e ter se tornado uma grande amiga e irmã e por me apoiar sempre nesta caminhada.

A todos os colegas que fazem parte do Laboratório de Cultura de Tecidos (LCT-DHE) pelo companheirismo.

As minhas amigas e irmãs, Laura Izabel do Nascimento Alves, Ana Paula Galdino de Oliveira e Ana Izabel Godoy, por serem mulheres incríveis e sempre estarem ao meu lado compartilhando comigo todas as angústias e vitórias da vida, vocês são muito importantes para mim.

Aos meus amigos Erik, Nínive, Raul, Thales e a professora Norma Gusmão, todos do departamento de antibióticos que também foram chegando aos poucos e se tornaram muito importantes para mim e para que fosse possível a conclusão deste trabalho.

Ao Professor José Maria Barbosa Filho, por ter cedido a substância teste para o desenvolvimento deste trabalho.

A Profa. Dra. Beatriz Stolf, do departamento de Parasitologia da Universidade de São Paulo (USP) por ter me recebido em seu laboratório, pela colaboração para o desenvolvimento de alguns experimentos deste trabalho.

Aos meus familiares, que me acolheram em São Paulo durante o período de realização de parte dos experimentos deste trabalho.

A Coordenadora do Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica (PPGIT), Profa. Dra. Maria Danielly Lima de Oliveira e a todos os professores por oferecerem todo o apoio e ensinamentos para a realização desta pesquisa.

Ao Secretário do Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica (PPGIT), Paulo Germano, pelo suporte, atenção e compromisso com todos os alunos pertencentes ao programa.

As demais pessoas que direta ou indiretamente, contribuíram para a minha formação pessoal, acadêmica e profissional.

Obrigada!

RESUMO

As doenças tropicais negligenciadas são consideradas como um problema global de Saúde Pública, afetando cerca de um bilhão de pessoas, principalmente em países subdesenvolvidos e dentre essas se destacam as leishmanioses, doença de Chagas e doença do sono. Os tratamentos atuais contra a leishmaniose são limitados devido à toxicidade inaceitável, altos custos e significativa resistência aos medicamentos utilizados. Logo, tem sido crescente a busca por novos fitoterápicos com atividade potencialmente leishmanicida e com baixa toxicidade. A milonina, um alcaloide encontrado na planta *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae), tem sido pouco estudada quanto às suas atividades farmacológicas, independente de outras atividades já referidas na literatura. O objetivo desta pesquisa foi avaliar a atividade leishmanicida do alcaloide milonina isolado de *C. sympodialis* Eichl frente *Leishmania* (L.) *amazonensis* e o envolvimento de possíveis mecanismos de ação. Avaliou-se a atividade leishmanicida *in vitro* da milonina frente às formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/77/LTB0016) e (LV79). Verificou-se a infecção de macrófagos medulares de BALB/c pelos parasitos. Foi investigada a atividade citotóxica desse alcaloide frente às células Vero, macrófagos RAW e macrófagos medulares de BALB/c. A morfologia das células Vero foi observada após o teste de citotoxicidade. Determinou-se a produção de óxido nítrico (NO) e a avaliação do potencial antioxidante pelo método DPPH. A milonina apresentou atividade leishmanicida frente às formas promastigotas da *L. (L.) amazonensis* das cepas: MHOM/BR/77/LTB0016 (IC₅₀ = 6,71 µM) e LV79 (IC₅₀ = 3,66 µM). A IC₅₀ da milonina (independente da cepa) reduziu, consideravelmente, o crescimento dos parasitos *in vitro*, em função do tempo de cultivo. A milonina foi citotóxica para as células Vero a partir da concentração de 250 µM e para os macrófagos medulares BALB/c na concentração de 457,5 µM. Alterações morfológicas nas células Vero foram observadas em função de sua toxicidade. Observou-se um aumento de NO pelos macrófagos expostos a milonina e um elevado potencial antioxidante. O presente estudo descreve pela primeira vez a potencial atividade leishmanicida da milonina contra as formas promastigotas de *Leishmania* (L.) *amazonensis* e sugere-se que a milonina pode ser utilizada como um promissor protótipo para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos com atividade leishmanicida, sendo necessários mais estudos para elucidar os possíveis mecanismos de ação desse alcaloide.

Palavras-chave: *Cissampelos sympodialis* Eichl; Alcaloides; Milonina; *Leishmania amazonensis*.

ABSTRACT

Neglected tropical diseases are considered a global public health problem, affecting around one billion people, mainly in underdeveloped countries, among which leishmaniasis, Chagas disease and sleeping sickness stand out. Current treatments against leishmaniasis are limited due to unacceptable toxicity, high costs and significant resistance to the drugs used. Therefore, the search for new herbal medicines with potentially leishmanicidal activity and with low toxicity has been growing. Milonine, an alkaloid found in the *Cissampelos sympodialis* Eichl plant. (Menispermaceae), has been little studied as to its pharmacological activities, regardless of other activities already mentioned in the literature. The objective of this research was to evaluate the leishmanicidal activity of the alkaloid milonine isolated from *C. sympodialis* Eichl against *Leishmania (L.) amazonensis* and the involvement of possible mechanisms of action. *In vitro* leishmanicidal activity of milonine was evaluated against the promastigote forms of *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/77/LTB0016) and (LV79). Infection of BALB/c medullary macrophages by the parasites was observed. The cytotoxic activity of this alkaloid against Vero cells, RAW macrophages and BALB/c medullary macrophages was investigated. The morphology of Vero cells was observed after the cytotoxicity test. The production of nitric oxide (NO) and the evaluation of the antioxidant potential by the DPPH method were determined. Milonine showed leishmanicidal activity against the promastigote forms of *L. (L.) amazonensis* of the strains: MHOM/BR/77/LTB0016 (IC₅₀ = 6.71 μ M) and LV79 (IC₅₀ = 3.66 μ M). The milonine IC₅₀ (independent of the strain) reduced the growth of parasites *in vitro* considerably, depending on the time of cultivation. Milonine was cytotoxic to Vero cells from a concentration of 250 μ M and to medullary BALB/c macrophages at a concentration of 457.5 μ M. Morphological changes in Vero cells were observed due to their toxicity. An increase in NO was observed for macrophages exposed to milonine and a high antioxidant potential. The present study describes for the first time the potential leishmanicidal activity of milonine against the promastigote forms of *Leishmania (L.) amazonensis* and suggests that milonine can be used as a promising prototype for the development of new therapeutic agents with leishmanicidal activity, and further studies are needed to elucidate the possible mechanisms of action of this alkaloid.

Keywords: *Cissampelos sympodialis* Eichl; Alkaloids; Milonine; *Leishmania amazonensis*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Distribuição de casos de Leishmaniose cutânea no mundo (ano de 2013)	18
Figura 2 –	Vetor biológico da Leishmaniose	20
Figura 3 –	Formas evolutivas do parasita <i>Leishmania amazonensis</i>	20
Figura 4 –	Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> spp	21
Figura 5 –	Ciclo de transmissão da <i>Leishmania</i> (<i>Leishmania</i>) <i>amazonensis</i> na Amazônia brasileira	22
Figura 6 –	Ciclo de biossíntese dos metabólitos secundários	25
Figura 7 –	<i>Cissampelos sympodialis</i> Eichl	27
Figura 8 –	Estrutura bidimensional da Milonina	28
Figura 9 –	Delineamento experimental do projeto	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BOD	<i>Biochemical Oxygen Demand</i>
CC ₅₀	Concentração Inibitória de 50% das células
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMEM	<i>Dubelcco's Modified Eagle's Medium</i>
IC ₅₀	Concentração Inibitória de 50% dos parasitas
LCD	Leishmaniose Cutânea Difusa
LIT	<i>Liver Infusion Tryptose</i>
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LT	Leishmaniose Tegumentar
MTT	3-(4,5-dimetylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenil Tetrazolium Bromide
OMS	Organização Mundial de Saúde
SFB	Soro Fetal Bovino
UFs	Unidades Federais

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	JUSTIFICATIVA	15
1.2	OBJETIVOS	16
1.2.1	Objetivo geral	16
1.2.2	Objetivos específicos	16
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
2.1	LEISHMANIOSES	17
2.2	CICLO DE TRANSMISSÃO DA <i>LEISHMANIA (L.) AMAZONENSIS</i>	22
2.3	TRATAMENTO	23
2.4	PLANTAS MEDICINAIS	23
2.5	METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	24
2.6	ALCALÓIDES	25
2.7	<i>CISSAMPELOS SYMPODIALIS</i> EICHL (MENISPERMACEAE)	27
2.8	ALCALÓIDE MILONINA	28
3	MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1	LOCAL DE REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS	31
3.2	COMPOSTO-TESTE	31
3.3	AQUISIÇÃO E CULTIVO DAS FORMAS PROMASTIGOTAS DA <i>LEISHMANIA (L.) AMAZONENSIS</i> (CEPAS: MHOM/BR/77/LTB0016 ELV79)	31
3.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA <i>IN VITRO</i> DA MILONINA FRENTE ÀS FORMAS PROMASTIGOTAS DE <i>LEISHMANIA (L.) AMAZONENSIS</i> (MHOM/BR/77/LTB0016)	32
3.5	INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS <i>IN VITRO</i>	33
3.6	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA <i>IN VITRO</i>	33
3.7	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	33
3.8	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA <i>IN VITRO</i> DA MILONINA FRENTE ÀS FORMAS PROMASTIGOTAS DE <i>LEISHMANIA (L.) AMAZONENSIS</i> (LV79)	34

3.9	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA <i>IN VITRO</i> E INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS MEDULARES DE BALB/C	34
3.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
3.10.1	Análise estatística da atividade leishmanicida (IC₅₀)	35
3.10.2	Análise estatística da atividade citotóxica	36
3.10.3	Análise do índice de infectividade de macrófagos	36
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1	ARTIGO 1- <i>IN-VITRO</i> CYTOTOXICITY OF MILONINE ISOLATED FROM <i>CISSAMPELOS SYMPODIALIS</i> EICHL (MENISPERMACEAE) ON VERO CELL LINE	37
4.2	ARTIGO 2- LEISHMANICIDAL ACTIVITY AND CYTOTOXICITY OF MILONINE ALKALOID AGAINST LEISHMANIA (L.) AMAZONENSIS	38
4.3	ARTIGO 3- MANUSCRITO A SER ENCAMINHADO PARA WORLD JOURNAL OF PHARMACY AND PHARMACEUTICAL SCIENCES	39
5	CONCLUSÕES	41
6	PERSPECTIVAS	42
	REFERÊNCIAS	43
	APENDICE A- <i>IN-VITRO</i> CYTOTOXICITY OF MILONINE ISOLATED FROM <i>CISSAMPELOS SYMPODIALIS</i> EICHL (MENISPERMACEAE) ON VERO CELL LINE	52

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são antroponozoonoses consideradas um grande problema de saúde pública, representando um grupo de doenças infecto-parasitárias com vasto espectro clínico e considerável diversidade epidemiológica (VALE; FURTADO, 2005). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco de contaminação, com a ocorrência de dois milhões de novos casos por ano; sendo 1,5 milhões de casos de leishmaniose tegumentar e 500.000 casos de leishmaniose visceral (WHO, 2010).

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é considerada uma doença negligenciada endêmica em 98 países, estando distribuída nos quatro continentes e com a maioria dos casos identificados, principalmente, em países subtropicais e tropicais em desenvolvimento (WHO, 2017). A LTA tem ampla distribuição mundial e no Continente Americano há registros de casos desde o extremo sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, com exceção do Chile e Uruguai. Em 2014, mais de 90% de novos casos foram reportados pela OMS em seis países, incluindo o Brasil onde se tem registrado o maior número de casos dessa doença com níveis elevados de prevalência, em média 24.230 casos/ano (WHO, 2010; ALVAR et al., 2012; BRASIL, 2013; WHO, 2017).

A doença pode revelar-se com amplas manifestações clínico-patológicas, desde um envolvimento cutâneo localizado (Leishmaniose cutânea) até a destruição de consideráveis áreas de mucosas (Leishmaniose mucosa) (SHAW, 1986). Na Leishmaniose mucosa há ocorrência de disseminação do parasito para áreas da nasofaringe, geralmente acompanhada por infecções secundárias e exacerbada resposta imune devido ao processo inflamatório, podendo causar deformidades indelévels no indivíduo (LESSA et al., 2007). A leishmaniose cutânea difusa caracteriza-se pelas lesões infiltrativas e não ulcerosas e podem ter evolução crônica em indivíduos anérgicos. A evolução e as formas clínicas da doença se devem a uma combinação de fatores, incluindo a susceptibilidade intrínseca do homem à doença, além da espécie e virulência do parasito (SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004).

Leishmaniose cutânea difusa (LCD) ocorre na região Amazônica brasileira, principalmente no Pará e Amapá (SHAW, 1986). No Brasil, esta forma clínica está associada à infecção por *Leishmania amazonensis*, a qual também é responsável por casos de Leishmaniose cutânea e mucosa nas cinco regiões do Brasil. Embora os casos de LCD sejam raros, a doença tem caráter evolutivo crônico, sem resposta aos quimioterápicos convencionais, com tendência de recidivas e piora (SILVEIRA, 2004; MACHADO et al., 2011).

A quimioterapia clássica inclui um pequeno número de drogas que apresentam várias desvantagens, como alta toxicidade, efeitos colaterais adversos, altos custos e desenvolvimento de resistência aos fármacos em uso. Neste contexto, ainda hoje, as principais drogas indicadas para o tratamento da leishmaniose são os antimoniais pentavalentes, considerados fármacos de primeira escolha (Antimoniato de N-metilglucamina, Gluconato de antimônio (V) sódico ou Estibogluconato de sódio e Uréia estibamina), e os fármacos de segunda escolha como a anfotericina B e a pentamidina que são utilizados como tratamento em alguns casos (GADELHA et al., 1990; HERWALDT; BERMAN, 1992 AMATO et al., 1998; MONZOTE, 2007;).

Novos tratamentos surgiram durante os últimos 10 a 15 anos, mas muitos desses não foram capazes de atender as expectativas, como o uso da paromomicina (administrada por via endovenosa por longo tempo e com exigência de internação), a miltefosina (de uso oral por tempo prolongado, com custo elevado e potencial teratogênico), e a anfotericina B lipossomal (uso endovenoso, de custo elevado e com exigência de internação) (NAGLE et al., 2014).

Na ausência de vacinas e de uma terapêutica eficaz, busca-se o desenvolvimento de moléculas candidatas a fármacos com ação leishmanicida, sem as intercorrências daqueles utilizados na prática médica atual. O mercado de medicamentos fitoterápicos e, conseqüentemente, de plantas medicinais é crescente e promissor. O Brasil detém a maior parcela da biodiversidade mundial e é grande a expectativa por espécies ativas contra essa doença. Isto tem incentivado o aumento das pesquisas com potenciais plantas medicinais que se destacam por possuírem substâncias bioativas, também conhecidas por metabólitos secundários, responsáveis pela adaptação das mesmas aos diferentes ecossistemas. Esses compostos são pouco abundantes, não estão diretamente envolvidos com os

processos vitais de biossíntese das plantas e representam uma fonte importante de substâncias farmacologicamente ativas (FUMAGALI et al., 2008; COSTA et al., 2010; OLIVEIRA, et al., 2012).

Os metabólitos secundários são classificados de acordo com a sua rota biosintética e segundo suas características químicas em nitrogenados, terpenóides e fenólicos (CORREA et al., 2008). Dentre os nitrogenados, os alcaloides possuem uma ampla atividade biológica reconhecida como antitumoral, antiplasmódica, antimicrobiana, antibacteriana, anticancerígena (HENRIQUE, 2010). Os terpenóides são conhecidos como defensivos de plantas e têm sido estudados para a melhor compreensão sobre a sua ação repelente, além de estarem presentes em óleos essenciais (JUNIOR, 2003; COLPO et al., 2014). Os fenólicos são utilizados como atrativos para a polinização ou dispersão de sementes e estruturalmente são substâncias que possuem pelo menos um anel aromático no qual um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila, como os flavonóides, taninos, isoflavonóides e cumarinas (BUENO-SANCHEZ et al., 2009; SIMÕES et al., 2010).

A milonina é um alcaloide com poucos estudos desenvolvidos a respeito de suas propriedades farmacológicas. Cavalcante et al. (2011) relataram a atividade espasmolítica da musculatura lisa do endotélio da artéria mesentérica de ratos através de efeitos hipotensivos, ação vasorrelaxante mediado pelo endotélio via liberação de óxido nítrico. Alves (2016) estudou a atividade anti-inflamatória da milonina via inibição da degranulação de mastócitos.

Diante deste cenário, temos como principal objetivo investigar a atividade leishmanicida *in vitro* do alcaloide Milonina frente às formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*, em busca de um potencial metabólito secundário como possível alternativa no tratamento da leishmaniose tegumentar.

1.1 JUSTIFICATIVA

Devido à alta toxicidade dos fármacos tanto de primeira quanto de segunda escolha para o tratamento da leishmaniose, tem aumentado cada vez mais o interesse pela procura de novos tratamentos à base de produtos naturais para essa doença, com comprovada atividade farmacológica, baixa toxicidade, eficácia e que possam ser economicamente acessíveis à população. A busca por moléculas bioativas, dentre elas os metabólitos secundários produzidos pelas plantas como os alcaloides têm sido alvo de muitas pesquisas; uma vez que, esses metabólitos têm demonstrado grande potencial farmacológico, e alguns alcaloides já foram descritos na literatura como eficientes contra as formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania sp.* Um estudo mais aprofundado do alcaloide milonina frente à *Leishmania amazonensis* pode fornecer informações importantes para reforçar o desenvolvimento de um novo fármaco que seja eficaz para o tratamento da leishmaniose.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade leishmanicida do alcaloide milonina isolado de *Cissampelos sympodialis* Eichl frente *Leishmania (L.) amazonensis* e o envolvimento de possíveis mecanismos de ação.

1.2.2 Objetivos específicos

- Avaliar *in vitro* o efeito leishmanicida da milonina sobre formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*;
- Investigar a atividade citotóxica da milonina em células Vero e macrófagos murinos (RAW 264.7 e medulares de BALB/c).
- Detectar modificações morfológicas nas células Vero e macrófagos RAW 264.7 sob ação da milonina, com auxílio de microscópio invertido com contraste de fase;
- Verificar a ação da milonina na proliferação intracelular da *L. (L.) amazonensis* nos macrófagos medulares de BALB/c;
- Determinar a atividade antioxidante da substância-teste pelo método do DPPH.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

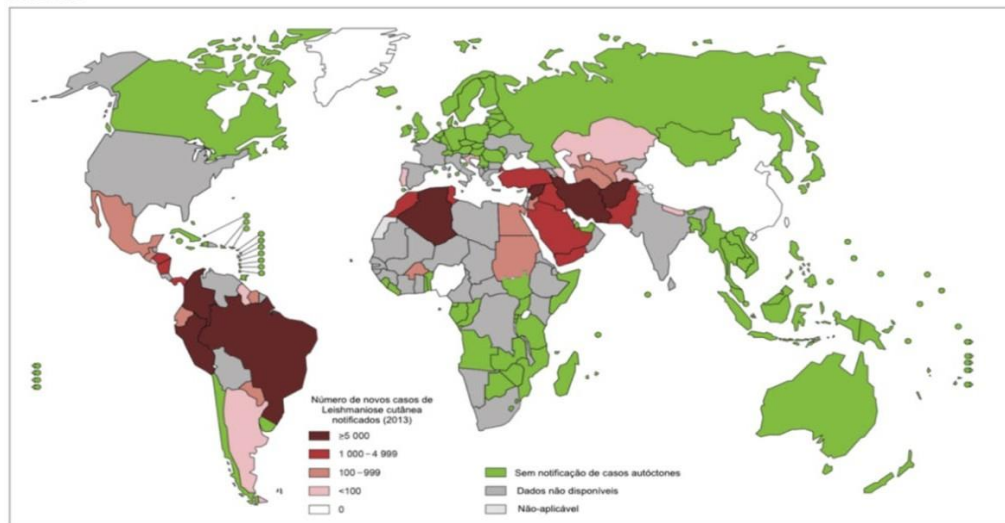
2.1 LEISHMANIOSES

As leishmanioses são antroponoses, representam um complexo de doenças com importante espectro clínico e diversidade epidemiológica, são consideradas um grande problema de saúde pública. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco, com registro aproximado de dois milhões de novos casos das diferentes formas clínicas ao ano (BRASIL, 2017).

Representam um conjunto de enfermidades que se diferem entre si, que podem comprometer pele, mucosas e vísceras, dependendo da espécie do parasito e da resposta imune do hospedeiro. Diferentes espécies de protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* são responsáveis pela doença, parasitas com ciclo de vida heteroxênico, vivendo alternadamente em hospedeiros vertebrados (mamíferos) e insetos vetores (flebotomíneos) (BRASIL, 2017).

A leishmaniose Tegumentar (LT) é a forma mais comum (**Figura 1**), representada por lesões na pele que podem ser desfigurantes, e úlceras que podem deixar cicatrizes e/ou deficiências graves. As lesões podem se “auto-curar” em meses ou anos ou podem tornar-se crônicas. A distribuição geográfica é bem ampla e 95% dos casos ocorrem nas Américas, bacia do Mediterrâneo, Oriente Médio e Ásia Central (WHO, 2018).

Figura 1. Distribuição de casos de Leishmaniose cutânea no mundo (ano de 2013)



Fonte: Adaptado de WHO (2015).

A leishmaniose se caracteriza por apresentar expressivas variações no quadro clínico e na epidemiologia de acordo com as espécies de protozoário envolvidas na infecção, os vetores de transmissão, assim com os fatores ligados ao hospedeiro como a resposta imunológica. Os vetores da leishmaniose são fêmeas hematófagas, a maioria tem hábito noturno, da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae; existindo mais de 500 espécies conhecidas, dentre as quais apenas 31 se identificaram como vetores da patologia. Os vetores pertencem ao gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo mundo (MONTALVO et al., 2012).

Em nosso país, Moreira (1895) identificou pela primeira vez a existência do botão endêmico dos países quentes, chamando “Botão da Bahia” ou “Botão de Biskra”. A confirmação de formas de leishmanias em úlceras cutâneas e nasobucofaríngeas ocorreu no ano de 1909, quando Lindenberg encontrou o parasito em indivíduos que trabalhavam em áreas de desmatamentos na construção de rodovias no interior de São Paulo. Splendore (1911) diagnosticou a forma mucosa da doença e Gaspar Vianna deu ao parasito o nome de *Leishmania brazilienses*. No ano de 1922, Aragão, pela primeira vez, demonstrou o papel do flebotomíneo na transmissão da leishmaniose tegumentar e Forattini (1958) encontrou roedores silvestres parasitados em áreas florestais do estado de São Paulo (BRASIL, 2017).

A transmissão da doença vem sendo descrita em vários municípios de todas as unidades federadas (UFs). Nas últimas décadas, as análises epidemiológicas da LT têm sugerido mudanças no padrão de transmissão da doença, inicialmente considerada zoonose de animais silvestres, que acometia ocasionalmente pessoas em contato com as florestas. Posteriormente, a doença começou a ocorrer em zonas rurais, já praticamente desmatadas, e em regiões periurbanas. Três perfis epidemiológicos foram observados: 1) Silvestre, a transmissão ocorre em áreas de vegetação primária (zoonose de animais silvestres); 2) Ocupacional ou lazer, a transmissão está associada à exploração desordenada das florestas (antropozoonose); e 3) Rural ou periurbanas, transmissão em áreas de colonização (zoonose de matas residuais), onde houve adaptação do vetor ao peridomicílio (zoonose de matas residuais e/ou antropozoonose) (BRASIL, 2017).

No Brasil, a LT é uma doença com diversidade de agentes, de reservatórios e de vetores que apresenta diferentes padrões de transmissão e um conhecimento ainda limitado sobre alguns aspectos, o que a torna de difícil controle (BRASIL, 2017).

A leishmaniose se caracteriza por apresentar expressivas variações no quadro clínico e na epidemiologia de acordo com as espécies de protozoário envolvidas na infecção, os vetores de transmissão, assim com os fatores ligados ao hospedeiro como a resposta imunológica. Os vetores da leishmaniose são fêmeas hematófagas, a maioria tem hábito noturno, da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae; existindo mais de 500 espécies conhecidas, dentre as quais apenas 31 se identificaram como vetores da patologia. Os vetores pertencem ao gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo mundo (MONTALVO et al., 2012).

No Brasil, a leishmaniose é transmitida através da picada de fêmeas de flebotomíneos infectados (**Figura 2**), pertencente à ordem Diptera, família Psychodidae, sub-família Phlebotominae, gênero *Lutzomyia*, conhecido popularmente no Brasil como mosquito-palha, birigui, cangalha, orelha-de-veado (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). Existem sete espécies que são responsáveis nos humanos pela Leishmaniose Tegumentar Americana humana (LCT), sendo assim denominadas: *Leishmania (Viannia) brasilienses* (Leishmaniose Mucosa),

Leishmania (Viannia) guyanensis, *Leishmania (Viannia) naiffi*, *Leishmania (Viannia) shawi*, *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *L. (Viannia) lindenberg* (GUEDES et al., 2008; BRASIL, 2013).

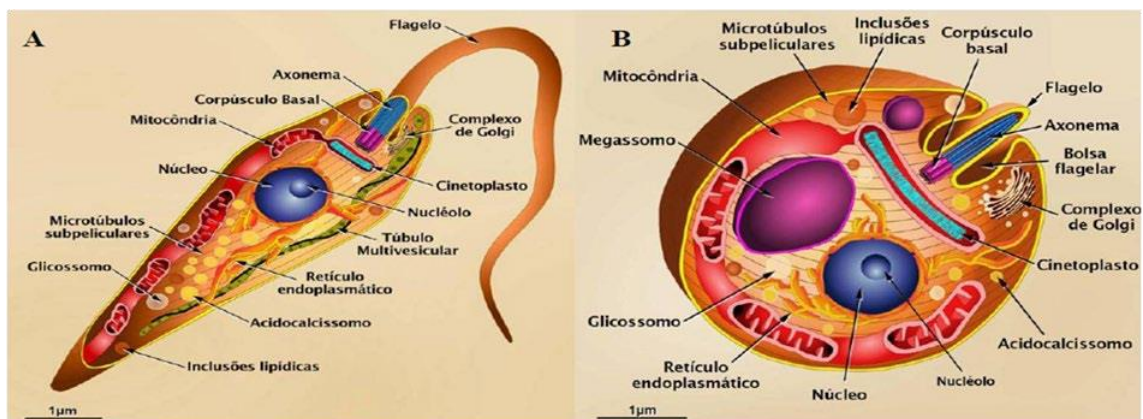
Figura 2. Vetor biológico da Leishmaniose. Fêmea hematófaga de *Lutzomyia longipalpi* após repasto, visualizada sobre uma pele humana



Fonte: Wilson (2009).

A *Leishmania* é um protozoário pertencente à família Trypanosomatidae, parasito intracelular obrigatório das células do sistema fagocítico mononuclear, com duas formas principais: uma flagelada ou promastigota, encontrada no tubo digestivo livre ou aderida à parede do epitélio intestinal do inseto vetor, e outra aflagelada ou amastigota, observada nos tecidos dos hospedeiros vertebrados, no interior de um vacúolo parasitóforo das células do sistema mononuclear fagocitário (**Figura 3**) (ALCOLEA et al., 2010; BRASIL, 2013).

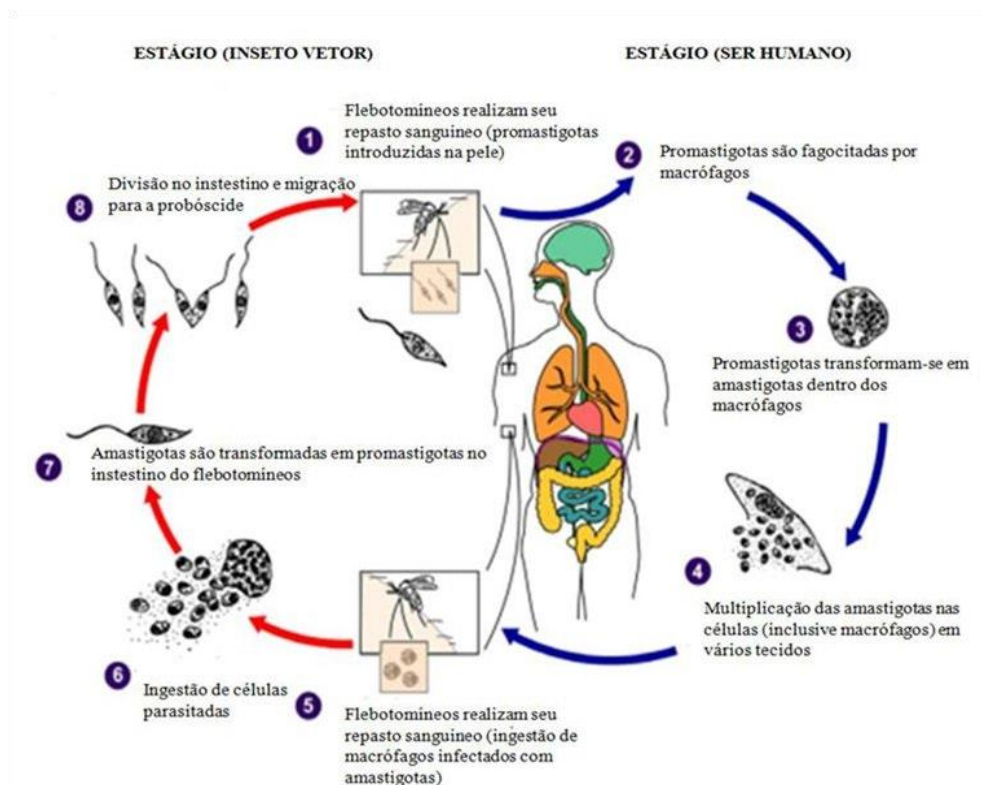
Figura 3. Formas evolutivas do parasita *Leishmania amazonensis*. A) Formas promastigotas encontradas no inseto vetor. B) Formas amastigotas presente do interior das células do sistema fagocitário mononuclear (hospedeiros e reservatórios)



Fonte: Adaptado de Texeira et al.(2013).

O ciclo de transmissão de leishmaniose varia de acordo com a região geográfica, espécie de parasitas, vetores, reservatórios e hospedeiros. O flebotomíneo infectado ao realizar o seu repasto sanguíneo introduz na pele do hospedeiro vertebrado as formas promastigotas metacíclicas. Esses parasitas invadem as células do sistema fagocitário mononuclear (macrófagos) através de vacúolos parasitóforos. Após a sua internalização, os vacúolos parasitóforos se fusionam com lisossomos formando o fagolisossomo, onde se transformam em formas amastigotas, que se multiplicam dentro da célula-hospedeira, culminando no rompimento da mesma e a liberação de parasitas que irão infectar outros macrófagos. Os macrófagos infectados ao serem ingeridos pelo vetor vão para o intestino do inseto, onde sofrem lise liberando as formas amastigotas que se transformam em promastigotas não infectante. As formas promastigotas fixam-se na parede do intestino, e ao serem liberadas, migram para o probóscide do vetor como promastigotas metacíclicas (forma infectante). O ciclo de vida completa-se quando há uma infecção de um novo flebotomíneo ao se alimentar de hospedeiros infectados ou se o vetor realizar outro repasto sanguíneo (**Figura 4**) (KAYE; SCOTT, 2011; NAGLE et al., 2014).

Figura 4. Ciclo biológico da *Leishmania* spp.

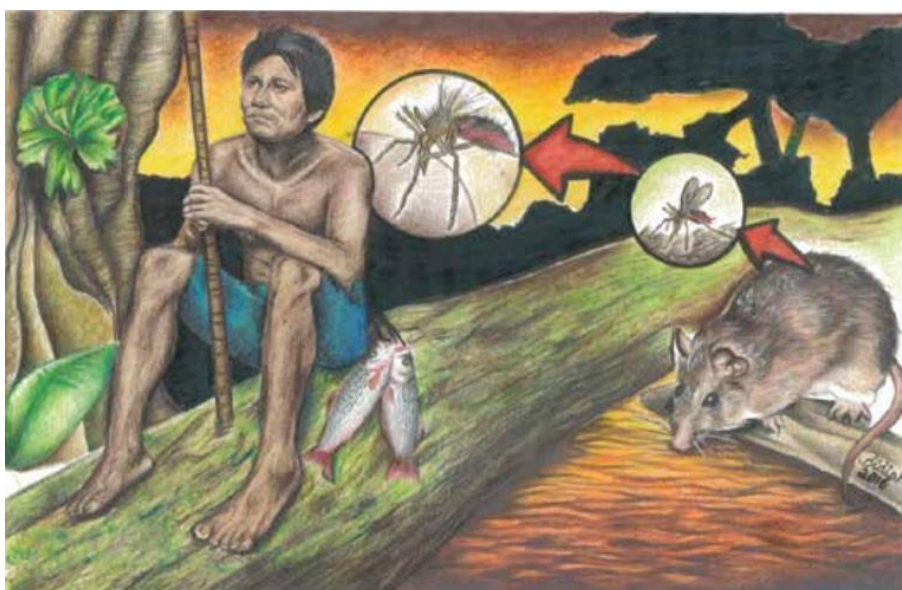


Fonte: Adaptado de Nagle et al. (2014).

2.2 CICLO DE TRANSMISSÃO DA *LEISHMANIA (L.) AMAZONENSIS*

Ocorre em áreas de florestas primárias e secundárias da Amazônia Legal (Amazonas, Pará, Rondônia, Tocantins e Maranhão), e também é verificado nos estados das regiões Nordeste (Bahia), Sudeste (Minas Gerais e São Paulo), Centro-Oeste (Goiás) e Sul (Paraná). O parasito foi isolado de roedores silvestres do gênero *Proechymis* e o *Oryzomys*. Embora o papel desempenhado por estes animais silvestres no ciclo de transmissão ainda não tenha sido bem definido, as evidências encontradas indicam estes roedores como reservatórios desta espécie de *Leishmania*. Os flebotomíneos vetores são *Lu. flaviscutellata*, *Lu. reducta* e *Lu. olmeca nociva* (Amazonas e Rondônia). Estas espécies são pouco antropofílicas, o que justifica uma menor frequência de infecção humana por esta *Leishmania*. Seu principal vetor, *Lu. flaviscutellata*, apresenta ampla distribuição geográfica, sendo encontrado em diferentes habitats de países fronteiriços ao Brasil e nos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins, Bahia, Ceará, Maranhão, Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Espírito Santo, Minas Gerais, São Paulo e Rio de Janeiro, ocorrendo em matas úmidas, que apresentam densidade elevada (**Figura 5**). A *L. amazonensis* causa úlceras cutâneas localizadas e, ocasionalmente, alguns indivíduos podem desenvolver o quadro clássico da leishmaniose cutânea difusa (LCD). (BRASIL, 2017)

Figura 5. Ciclo de transmissão da *Leishmania (L.) amazonensis* na Amazônia brasileira



Fonte: Manual de vigilância da Leishmaniose tegumentar (2017).

2.3 TRATAMENTO

O tratamento dessas doenças vai variar de acordo com diversos fatores, como por exemplo, o tipo da doença, a espécie do parasita, a localização geográfica (WHO, 2017). Embora do número de tratamentos tenham aumentado na última década, ainda há muitos inconvenientes como dificuldade de administração, duração, toxicidade, custo e resistência dos parasitas frente ao medicamento. Os medicamentos mais utilizados são: antimoniais pentavalentes, pentamidinas, anfotericina B, miltefosina, imiquimode (CROFT; OLLIARO, 2011; MCGWIRE; SATOSKAR, 2013).

O fármaco de primeira escolha no Mundo para o tratamento humano é o antimonial pentavalente, na forma de antimoniato de N-metilglucamina. Este antimonial é indicado para tratamento de todas as formas de leishmaniose tegumentar, embora as formas mucosas exijam maior cuidado, podendo apresentar respostas mais lentas e maior possibilidade de recidivas. Anfotericina B, é um antibiótico poliênico e sua ação leishmanicida é bem reconhecida; é o fármaco de segunda escolha, empregada quando não se obtém resposta ao tratamento com antimonial ou na impossibilidade de seu uso. A anfotericina B é considerada mais eficaz que os antimoniais no tratamento das lesões mucosas. A anfotericina B lipossomal, trata-se de uma nova formulação em que a anfotericina B é incorporada dentro de lipossomas feitos com fosfatidilcolina, colesterol e disterolfosfatidilglicerol. Nessa formulação, o princípio ativo atinge níveis plasmáticos mais elevados que o desoxicolato de anfotericina B. Pentamidinas são diamidinas aromáticas que vem sendo utilizadas como fármacos de segunda escolha no tratamento da leishmaniose tegumentar em áreas endêmicas dos continentes americano, asiático e africano (BRASIL, 2017).

2.4 PLANTAS MEDICINAIS

Apesar do avanço ao longo dos últimos 30 anos em relação às políticas públicas, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), ainda há um número alto de indivíduos que não têm como obter medicamentos essenciais ou até mesmo o acesso restrito a serviços de saúde convencionais, principalmente para países em desenvolvimento (ARNOUS et al., 2005). Para suprir esses limitados

recursos, populações utilizam as plantas medicinais como alternativa para tratar suas enfermidades (MOURA et al., 2001).

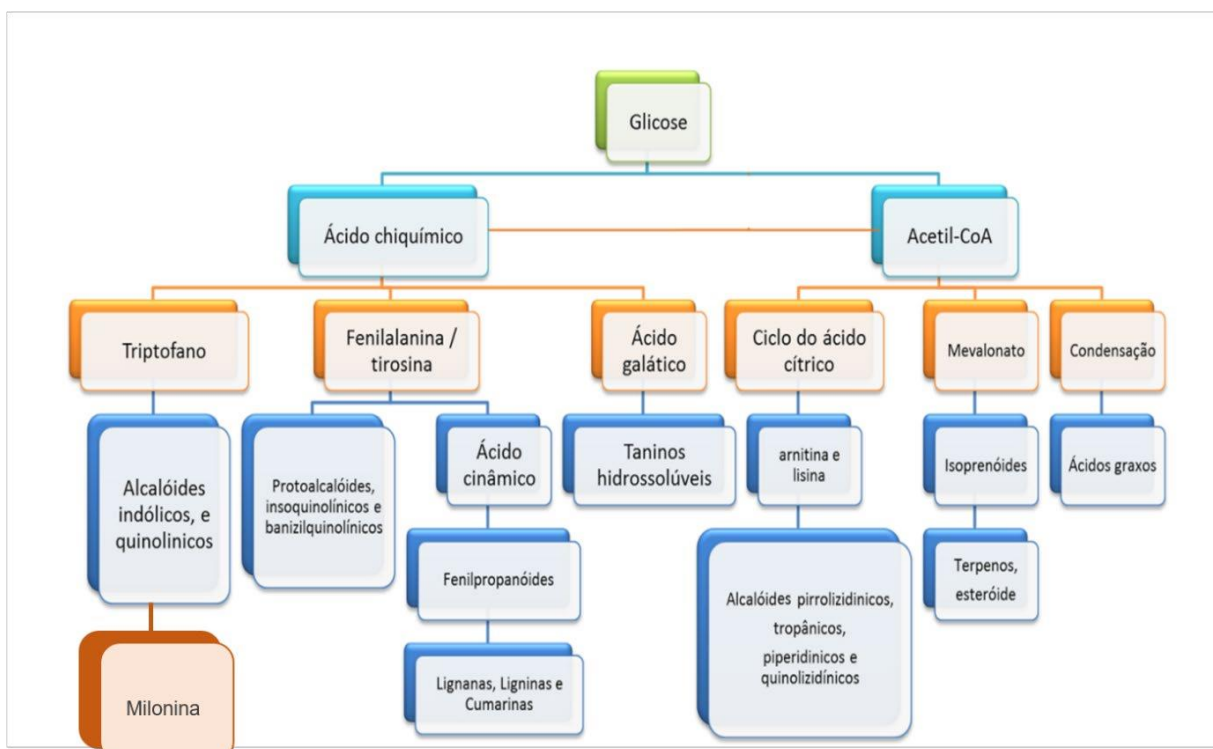
Qualquer planta que apresente em sua composição substâncias para uso terapêutico é considerada planta medicinal ou até mesmo utilizada como início para a síntese de produtos químicos e farmacêuticos, o que conhecemos como fitoterápicos, de acordo com o reconhecimento da OMS. O Brasil, é um país com uma grande diversidade biológica e cultural, abrangendo um vasto acúmulo de conhecimentos tradicionais, dos quais se destacam os ensinamentos e práticas passados por gerações no uso de plantas medicinais (VEIGA et al, 2008; RODRIGUES, 2006).

Com o objetivo de unir esse conhecimento cultural com a realidade atual, estudos científicos de várias regiões do mundo têm sido realizados, no sentido de investigar a atividade farmacológica dos produtos naturais de plantas medicinais para o tratamento de várias doenças (FOGLIO et al., 2006; DORIGONI et al., 2001).

Várias pesquisas com plantas medicinais permitiram a descoberta de centenas de compostos que hoje em dia são bastante utilizados como, a morfina, proveniente do ópio. Os compostos podem ser de muitos tipos, mas a maioria enquadra-se em quatro grandes classes bioquímicas, os alcaloides, glicosídeos, polifenóis e terpenos podendo ser conhecidos também como metabólitos secundários (ATANASOV et al., 2015).

2.5 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Os metabólitos secundários são originados a partir de duas rotas metabólicas derivadas da glicose: o ácido chiquímico e a do acetato (**Figura 6**). Esses metabólitos são encontrados em concentrações relativamente baixas e em determinadas plantas, apresentando-se, geralmente, com uma estrutura complexa, baixo peso molecular; além de possuir marcantes atividades biológicas. Embora não seja essencial para o organismo produtor, os metabólitos secundários são responsáveis pela sobrevivência e perpetuação da espécie, e podem ser influenciados por fatores externos tais como temperatura, radiação ultravioleta, nutrientes, altitude, indução por estímulos mecânicos ou ataques de insetos (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; PEREIRA, 2011).

Figura 6. Ciclo de biossíntese dos metabólitos secundários

Fonte: Adaptado de Simões (2010).

A procura pelo desenvolvimento de novos produtos para o tratamento da leishmaniose, que sejam menos tóxicos, invasivos e principalmente de baixo custo são objetivos de diversos estudos. (BRAGA et al, 2007; POLONIO; EFFERTH, 2008). Produtos de origem vegetal tem demonstrado efeito contra parasitas do gênero *Leishmania*. Ueda-Nakamura et al. (2006) demonstraram a ação leishmanicida do óleo proveniente da planta *Ocimum gratissimum*. O óleo essencial extraído da raiz da planta *Croton cajucara* foi capaz de promover a redução de 100% dos parasitas bem como alterações estruturais (ROSA et al., 2003). O óleo extraído da folha de *Cymbopogon citratus* após tratamento por 72 horas, foi capaz de inibir o crescimento de formas promastigotas do protozoário *Leishmania (L.) amazonensis* (SANTIN et al., 2009). Dentre os metabólitos secundários conhecidos, existem os alcaloides, que são um grupo heterogêneo de substâncias nitrogenadas (SIMOES et al., 2010).

2.6 ALCALOIDES

Carl Friedrich Wilhelm Meissner (1792-1853) farmacêutico alemão introduziu, pela primeira vez, o termo “alcaloides” em 1818, para denominar estes compostos

de origem vegetal com carácter alcalino. Mais tarde foi demonstrado que a sua alcalinidade é devida à presença de um átomo de nitrogênio. Os alcaloides formam um grupo heterogêneo de compostos naturais que, normalmente, apresentam uma estrutura complexa. São constituídos por carbono, hidrogênio e azoto, o qual, na maioria dos casos, forma parte de um anel heterocíclico, sendo a maioria deles oxigenados. Muitos autores só consideram como verdadeiros alcaloides os compostos com azoto em anéis heterocíclicos e como proto-alcaloides os que o possuem numa cadeia lateral acíclica (MARINHO, 2001).

Os alcaloides podem ser classificados de acordo com os seus precursores biogénéticos, os quais estão envolvidos com suas características estruturais; sendo a maioria desses compostos derivada do metabolismo dos aminoácidos alifáticos (ornitina e lisina) e dos aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano), todavia há vários outros que derivam de terpenos e esteróis. Em função dessas características os alcaloides são providos de importantes atividades farmacológica ou toxicológica. Esses compostos se dividem em várias classes, tais como: alcaloides com grupo amina em cadeia lateral; alcaloides com núcleo pirrolidina, piridina e piperidina; alcaloides com núcleo tropano; alcaloides com núcleo pirrolizidina; alcaloides com núcleo quinolizidina; alcaloides com núcleo quinoleína; alcaloides com núcleo isoquinoleína; alcaloides com núcleo indólico; alcaloides com núcleo imidazol; alcaloides derivados do metabolismo terpénico; alcaloides das Amaryllidaceae; alcaloides betalaínicos e metilxantinas (MARINHO, 2001).

Várias atividades farmacológicas já foram descritas para os alcaloides, entre elas, ansiolítica como a annomontina, e liriodenina (CHANG et. al., 2004), anti-emética como a atropina, analgésica como a morfina, anti-inflamatória como a warifteina e curina (LIMA et. al., 2015; LEITE et. al., 2014), entre outras.

O efeito leishmanicida de alguns alcaloides extraídos de plantas já foi descrita na literatura, com a julocrotina, um alcaloide extraído da planta *Croton pullei* var. *glabrior*, se mostrou eficiente contra formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*, inibindo proliferação dessas formas de maneira dose-dependente sem efeito citotóxico para a célula hospedeira (GUIMARÃES et al., 2010).

O alcaloide coronadine foi capaz de inibir 100% do crescimento após seis dias de tratamento, de formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*, reduzindo também sobrevivência das amastigotas no interior dos macrófagos (DELORENZI et al., 2001).

2.7 CISSAMPELOS SYMPODIALIS EICHL (MENISPERMACEAE)

Cissampelos é um gênero que compreende cerca de 19 espécies, sendo nove delas encontradas no Brasil (RHODES, 1979). No estado da Paraíba são encontradas três espécies em diferentes tipos de habitat, sendo mais comum em regiões de floresta da costa atlântica (MANGUEIRA et al., 2010). Uma dessas espécies é a *Cissampelos sympodialis* Eichl (**Figura 7**), conhecida popularmente como “milona”, “orelha de onça”, “jarrinha” ou ainda “abuteira” (CORREA, 1984).

As folhas e raízes de *Cissampelos sympodialis* Eichl são utilizadas na medicina popular para o tratamento de diversas patologias como: doenças respiratórias, doenças no trato genitourinário, diarreia, doenças cardíacas, entre outras enfermidades (MANGUEIRA et al., 2010). Com o intuito de avaliar o potencial terapêutico e também respaldar cientificamente o uso dessa planta na medicina popular, foram feitos vários estudos utilizando diferentes modelos experimentais com o extrato hidroalcoólico das raízes e folhas.

Figura 7. *Cissampelos sympodialis* Eichl. A. Planta adulta; B. Detalhe das folhas deltóides e os frutos maduros (cor vermelha)



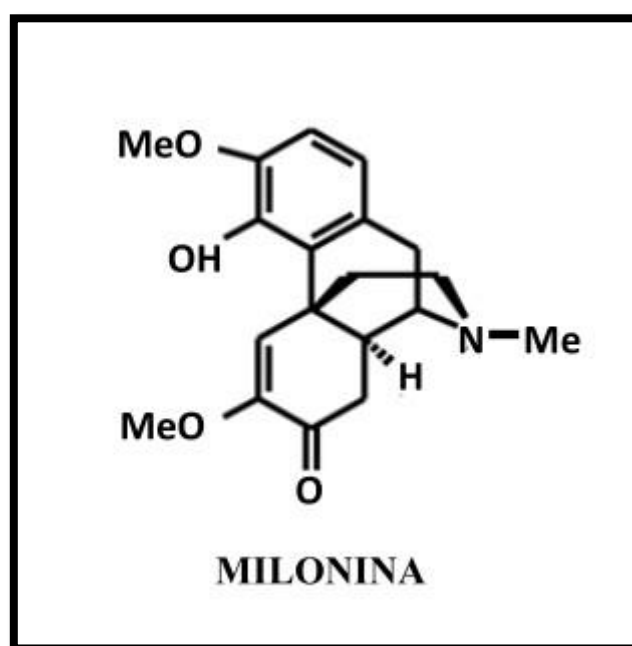
Fonte: CAVALCANTI et al. (2011).

Nas diferentes partes da planta (*C. sympodialis*) foram isolados e identificados os seguintes alcaloides: a metilwarifteína e warifteína, sendo alcaloides do tipo bisbenzilisquinolínico; a milonina, um alcaloide do tipo morfinânico; a liriodenina, alcaloide do tipo oxoaporfínico e a roraimina, um alcaloide do tipo bisbenziltretaisoquinolínico que têm permitido estudos imunofarmacológicos mais precisos sobre os mesmos (BARBOSA-FILHO, AGRA; THOMAS, 1997; DE LIRA et al., 2002). A warifteína foi o composto majoritário isolado do extrato etanólico da raiz do *Cissampelos sympodialis* Eichl, (MELO et al., 2003), com rendimento de 1,4% (MARINHO, 2008) e a milonina foi o composto majoritário do extrato etanólico das folhas (THOMAS et al., 1997).

2.8 ALCALOIDE MILONINA

A milonina (**Figura 8**), um alcaloide 8,14 dihidromorfinandeinônico, isolado e identificado por Freitas e colaboradores (1995), apresentou atividade espasmolítica da musculatura lisa do endotélio da artéria mesentérica de ratos através de efeitos hipotensivos, ação vasorrelaxante mediado pelo endotélio via liberação de óxido nítrico e abertura de canais de potássio (CAVALCANTE et al., 2011).

Figura 8. Estrutura bidimensional da Milonina



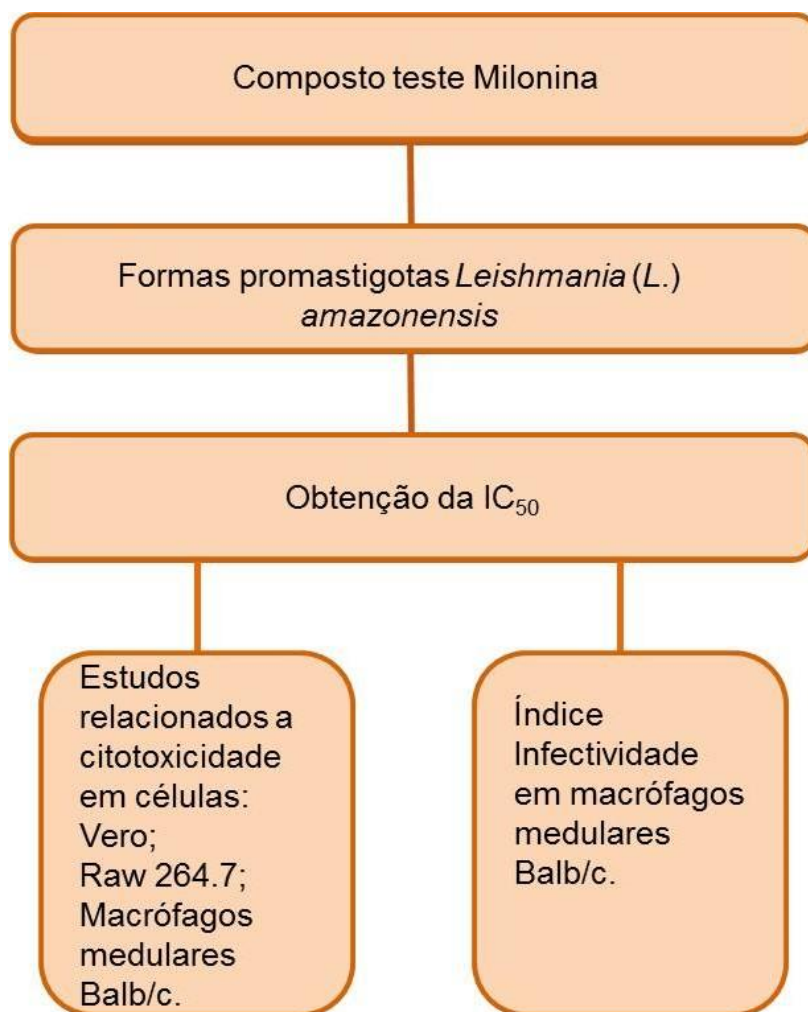
Fonte: Silva, 2017.

Pesquisas recentes desenvolvidas no laboratório de Imunofarmacologia da UFPB/João Pessoa. PB, Brasil, demonstraram que a milonina apresentou atividade antiinflamatória via inibição da degranulação de mastócitos, e que no modelo experimental de choque anafilático induzido por 48/80, aumentou a sobrevivência dos animais (ALVES, 2016).

Estudos citotóxicos a fim de comparar os alcaloides warifteína e milonina *in vitro*, foram avaliados em culturas de hepatócitos e de fibroblastos V79 via o teor de ácido nucleico, a redução de tetrazólio (MTT) e captação de vermelho neutro (NRU), descobriu-se que, em cultura de hepatócitos de ratos e células fibroblastos tratados com cimetidina, um inibidor do citocromo P450, que a milonina se apresentou menos tóxica que a warifteína nos dois tipos celulares. Além disso, observou-se que a cimetidina não conseguiu proteger as células contra a toxicidade dos alcaloides, mostrando que a toxicidade independe do citocromo P450 (MELO, et al, 2003).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Para a melhor compreensão, segue abaixo o delineamento experimental representado na **Figura 9**.



Fonte: Santos, G. D. M. (2019), a autora.

Figura 9. Delineamento experimental do projeto. O composto Milonina foi testado contra as formas promastigotas da *Leishmania (L.) amazonensis*. Em seguida, determinou-se a atividade leishmanicida da milonina (IC_{50}). Foram realizados testes de toxicidade *in vitro* com a utilização de células Vero e macrófagos RAW 264.7, células de mamíferos (eritrócitos humanos). As formas amastigotas intracelulares foram utilizadas nos ensaios de infectividade de macrófagos *in vitro* e na produção de NO.

3.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS

Os experimentos foram realizados prioritariamente no Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Histologia e Embriologia da Universidade Federal de Pernambuco (LCT-DHE). Colaborações foram realizadas com pesquisadores do Setor de Microscopia Eletrônica do LIKA-UFPE e com pesquisadores do Laboratório de Leishmanioses do Departamento de Parasitologia da USP.

3.2 COMPOSTO-TESTE

O composto teste (milonina) foi cedido pelo Professor José Maria Barbosa Filho do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba LTF-UFPB.

3.3 AQUISIÇÃO E CULTIVO DAS FORMAS PROMASTIGOTAS DA *LEISHMANIA (L.) AMAZONENSIS* (CEPAS: MHOM/BR/77/LTB0016 E LV79)

Os parasitos foram cedidos gentilmente pelo Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto do Departamento de Microbiologia do Instituto Aggeu Magalhães/IAM-FIOCRUZ. As formas promastigotas da *Leishmania (L.) amazonensis* (cepa humana: MHOM/BR/77/LTB0016) foram cultivadas em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose* – Himedia Laboratories Pvt. Ltda., Mumbai, Índia) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB – Invitrogen, Califórnia, EUA) inativado, 0,2% de hemina e 0,1% de antibióticos (100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, Gibco BRL, Life Technologies, Paisly, Reino Unido), a 26°C em estufa B.O.D.

Parte dos experimentos foi desenvolvida em colaboração com o grupo de pesquisa da Prof. Dra. Beatriz Simonsen Stolf Carboni, responsável pelo Laboratório de Leishmanioses do departamento de Parasitologia no ICBII da Universidade de São Paulo (USP-SP), onde se utilizou uma cepa murina (LV79) cultivada em meio 199 (Gibco, Invitrogen), contendo HEPES (40 mM), adenina (0,1 mM), hemina (0,0005%), 10% de soro fetal bovino (SFB, Invitrogen), num pH de 7,4 e mantidas a 26°C em estufa B.O.D.

3.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA *IN VITRO* DA MILONINA FRENTE ÀS FORMAS PROMASTIGOTAS DE *LEISHMANIA (L.) AMAZONENSIS* (MHOM/BR/77/LTB0016)

A obtenção da IC₅₀ (concentração do extrato que inibi 50% do crescimento dos parasitas em relação ao controle) foi realizada a partir do método colorimétrico do MTT (MOSMANN, 1983). O brometo de 3-metil [4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio, conhecido como MTT (um sal de coloração amarela e solúvel em água), possibilitou a investigação da atividade metabólica das células com base na redução desse sal por desidrogenases, resultando na produção de cristais de formazan (de cor arroxeada e insolúvel em água) que é proporcional ao número de células metabolicamente ativas.

Os parasitas em fase exponencial de crescimento (três dias) foram distribuídos numa concentração de 1×10^6 parasitas/mL em placas de 96 poços de fundo chato junto com os compostos em estudo. Para os ensaios, as substâncias foram dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO) (Vetec Química Fina, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) e em seguida diluídas em meio LIT nas concentrações de 0,48 a 1000 μ M. A Anfotericina B (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) foi utilizada como controle positivo e como controle negativo foi utilizado meio de cultura e o solvente DMSO (0,5%). A placa contendo os parasitas e os extratos foram incubadas a 26°C em estufa incubadora B.O.D (Caltech Indústria e Comércio LTDA, Franca, São Paulo, Brasil) durante 72 horas.

Após 72 horas de incubação, foi adicionado a cada poço 20 μ L de MTT (5mg/mL) e as placas foram incubadas por três horas em estufa BOD a 26°C. Após esse período, o meio de cultura e o excesso do MTT foram aspirados e adicionados 100 μ L de DMSO por poço durante 30 minutos para dissolver os cristais de formazan. As placas foram lidas em uma leitora de microplacas (SkanIt Software 2.4.5 RE for Varioskan Flash, ThermoScientific, Massachusetts, USA) em 595 nm. Foram realizados três experimentos em triplicatas.

3.5 INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS *IN VITRO*

Os macrófagos foram mantidos em meio DMEM, suplementado com 10 % de soro fetal bovino, 0,1% de antibióticos, a 37°C em estufa de 5% de CO₂. Macrófagos RAW 264.7 serão distribuídos na concentração 2×10^5 em placas de 24 poços e incubados por 24 horas. Após a incubação, os parasitos foram adicionados na proporção 10:1 (parasitos: macrófago). Após três horas de incubação, os parasitos livres foram removidos e foi adicionado meio de cultura com os compostos-teste na concentração da IC₅₀ pré-determinada, posteriormente foram incubados por 72 horas. O material foi corado com *Giemsa*. O percentual de macrófagos infectados foi determinado pela contagem de 200 células/lâmina das triplicatas de cada ensaio, os quais foram repetidos duas vezes. O controle negativo foi realizado sem as substâncias. O cálculo do índice de infecção foi realizado conforme protocolo estabelecido por Pinto-da-Silva et al. (2002).

3.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA *IN VITRO*

As células Vero (células epiteliais do rim do macaco verde africano, *Cercopithecus aethiops*) e os macrófagos RAW 264.7 foram cultivados em meio DMEM suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino inativado e 0,1% de antibióticos em estufa de CO₂ a 5%, 95% de umidade a 37°C. A citotoxicidade das células Vero foi determinada pelo método colorimétrico de MTT. As células foram distribuídas na densidade de 1×10^5 (células/poço) em placas de 96 poços onde foram adicionadas as concentrações de 1,95 a 1000 µM da substância-teste (milonina). Como controles negativos foram usados o meio DMEM e o DMSO (0,5%). A leitura da absorbância foi realizada após dissolução do precipitado com DMSO absoluto (100 µL/poço) em espectrofotômetro (BioRad Mark Microplate Spectrophotometer), no comprimento de 595 nm. Foram realizados três experimentos em triplicatas.

3.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A capacidade antioxidante foi avaliada utilizando o método do sequestro de radicais livres do DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) em microplacas. As substâncias-teste foram dissolvidas em DMSO para obter as concentrações de 50 µg/mL a 1µg/mL. Em seguida 100 µL das amostras foram misturadas com 100 µL de DPPH

(0,15 mM) dissolvido em etanol a 95%. A mistura foi agitada vigorosamente usando um *mixer* e, em seguida, mantida no escuro por 30 minutos. A absorbância da solução resultante foi lida no espectrofotômetro num comprimento de 517 nm.

3.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA *IN VITRO* DA MILONINA FRENTE ÀS FORMAS PROMASTIGOTAS DE *LEISHMANIA (L.) AMAZONENSIS* (LV79)

Os parasitos (LV79) em fase exponencial de crescimento foram distribuídos numa densidade de 1×10^6 parasitos/mL em placas de 96 poços de fundo chato junto com os compostos em estudo. Para os ensaios, a substância foi dissolvida em dimetilsulfóxido (DMSO) (Vetec Química Fina, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) e em seguida diluídas em meio 199 nas concentrações de 0,03 a 50 μ M. A placa contendo os parasitos e os extratos foram incubadas a 26°C em estufa incubadora B.O.D (Caltech Indústria e Comércio LTDA, Franca, São Paulo, Brasil), durante 48 horas.

Após 48 horas de incubação, foi adicionado a cada poço 10 μ L de MTT (5mg/mL) e as placas foram incubadas por três horas em estufa BOD a 26°C. Após esse período, foi adicionado 100 μ L de SDS 10 % em cada poço. As placas foram lidas em uma leitora de microplacas (SkanIt Software 2.4.5 RE for Varioskan Flash, ThermoScientific, Massachusetts, USA) em 595 nm. Os experimentos foram realizados em triplicatas.

3.9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA *IN VITRO* E INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS MEDULARES DE BALB/C

Os macrófagos medulares de BALB/c utilizados nos experimentos foram os mesmos do projeto de pesquisa intitulado como: “Estudo de fatores de virulência de *Leishmania* e de proteínas do macrófago envolvidas na infecção”. Foram isolados pela Pós doutoranda Janaína Teixeira e os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso Animal da Universidade de São Paulo (protocolo no 023/2015/CEUA). Os macrófagos foram mantidos em meio RPMI 1640, pH 7,2 em estufa a 37°C e 5 % de CO₂.

Para o teste de citotoxicidade foi utilizada a densidade de 1×10^6 de células por poço e essas foram mantidas por 24 horas em estufa a 37° e 5 % de CO₂.

Posteriormente, realizou-se a retirada do meio e adicionou-se um novo meio com a substância teste nas concentrações de 1,22 - 457,5 μM . Após 48 horas de incubação o meio de crescimento foi retirado e as células foram lavadas com 200 μL de PBS, antes de ser adicionado 100 μL de MTT e foi feita a incubação por 4 horas; em seguida retirou-se todo o MTT, tendo sido adicionado 100 μL de SDS (10%) e realizada a leitura no comprimento de onda de 595 nm, em uma leitora de microplacas (SkanIt Software 2.4.5 RE for Varioskan Flash, ThermoScientific, Massachusetts, USA). Os experimentos foram realizados em triplicatas.

Para a realização da infecção de macrófagos foi utilizada a densidade de 4×10^5 de células/poço de placas com 24 poços e essas células foram mantidas por 24 horas em estufa a 37°C e 5 % de CO₂, em meio RPMI. Posteriormente, retirou-se o meio e adicionou-se um novo meio com os parasitas numa proporção de 10:1 por poço, procedeu-se a incubação por 4 horas em estufa a 34°C e 5 % de CO₂. Em seguida retirou-se o meio com os parasitas e adicionou-se novo meio até o dia seguinte. Para realização do tratamento dos macrófagos infectados, trocou-se o meio por um novo com a substância teste nas concentrações de 1,22 - 32,94 μM . A incubação na fase de tratamento com a milonina foi a mesma citada anteriormente, por um período de 48 horas e para essa avaliação foram utilizadas lamínulas como suporte para os macrófagos infectados. Após essa etapa todo o meio foi retirado e realizou-se o processo de fixação macrófagos infectados em metanol P.A. (VETEC Química fina), sendo procedida a coloração com o Kit Panótico Rápido (Laborclin, Pinhais, PR, Brasil), conforme instruções do fabricante. As lamínulas foram montadas em lâminas de vidro com *Entellan* (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) e deixadas *overnight* para completa fixação, antes da avaliação microscópica.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

3.10.1 Análise estatística da atividade leishmanicida (IC₅₀)

A IC₅₀ foi determinada por regressão linear. Os dados foram avaliados pelo método de ANOVA seguidos pelo teste de *Dunn* com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

3.10.2 Análise estatística da atividade citotóxica

Para avaliação dos dados da atividade citotóxica foi utilizado o teste de *Kruskal-Wallis* seguido do teste de *Dunn* com valor de $p < 0,05$ (programa estatístico *SigmaStat* versão 3.5).

3.10.3 Análise do índice de infectividade de macrófagos

Os valores dados obtidos nas contagens foram analisados empregando o método ANOVA com pós teste de *Tukey* ($*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$) e o gráfico foi plotado no programa *GraphPad Prism* software (versão 6.0).

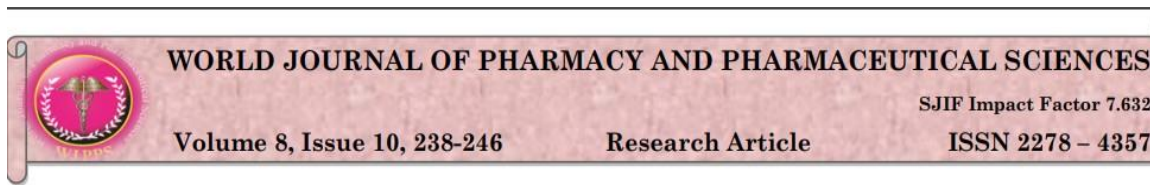
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ARTIGO PUBLICADO NA WORLD JOURNAL OF PHARMACY AND PHARMACEUTICAL SCIENCES

Título: *In-Vitro* cytotoxicity of milonine isolated from *Cissampelos Sympodialis* Eichl (Menispermaceae) on vero cell line

Periódico: World Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences

Qualis CAPES: B1



***IN-VITRO* CYTOTOXICITY OF MILONINE ISOLATED FROM CISSAMPELOS SYMPODIALIS EICHL (MENISPERMACEAE) ON VERO CELL LINE**

Gleyka D. M. Santos^{1,2*}, Erwelly B. Oliveira^{1,2}, Cláudio G. Rodrigues², José M. Barbosa-Filho⁴, Eliete C. Silva^{1,2,3} and Paloma L. Medeiros^{1,2,3}

¹Laboratório de Cultura de Tecidos (LCT) do Departamento de Histologia e Embriologia, Universidade Federal de Pernambuco, 50.670-901, Cidade Universitária, Recife-PE, Brasil.

²Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco, 50.670-901, Cidade Universitária, Recife-PE, Brasil.

³Programa de Pós-graduação em Morfotecnologia, Universidade Federal de Pernambuco, 50.670-901, Cidade Universitária, Recife-PE, Brasil.

⁴Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM), Universidade Federal da Paraíba, Cidade Universitária, 58051900, João Pessoa-PB, Brasil.



**IN-VITRO CYTOTOXICITY OF MILONINE ISOLATED FROM
CISSAMPELOS SYMPODIALIS EICHL (MENISPERMACEAE) ON
VERO CELL LINE**

**Gleyka D. M. Santos^{1,2*}, Erwelly B. Oliveira^{1,2}, Cláudio G. Rodrigues², José M.
Barbosa-Filho⁴, Eliete C. Silva^{1,2,3} and Paloma L. Medeiros^{1,2,3}**

¹Laboratório de Cultura de Tecidos (LCT) do Departamento de Histologia e Embriologia,
Universidade Federal de Pernambuco, 50.670-901, Cidade Universitária, Recife-PE, Brasil.

²Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de
Pernambuco, 50.670-901, Cidade Universitária, Recife-PE, Brasil.

³Programa de Pós-graduação em Morfotecnologia, Universidade Federal de Pernambuco,
50.670-901, Cidade Universitária, Recife-PE, Brasil.

⁴Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IpeFarM), Universidade Federal da
Paraíba, Cidade Universitária, 58051900, João Pessoa-PB, Brasil.

Article Received on
13 August 2019,
Revised on 03 Sept. 2019,
Accepted on 23 Sept. 2019,
DOI: 10.20959/wjpps201910-14874

***Corresponding Author**

Gleyka D. M. Santos

Laboratório de Cultura de
Tecidos (LCT) do
Departamento de Histologia
e Embriologia, Universidade
Federal de Pernambuco,
50.670-901, Cidade
Universitária, Recife-PE,
Brasil.

ABSTRACT

The family Menispermaceae is well known for producing various types of alkaloids, especially morphinandienones. Milonine is a morphinandienone alkaloid from *Cissampelos sympodialis* Eichl, a plant popularly used in northeastern Brazil for inflammatory diseases. The aim of this work was to investigate the cytotoxic effect of milonine on Vero cell line. *In vitro* cytotoxicity of milonine in different concentrations (1.95 a 1000 μ M) was evaluated by MTT assay. Cell morphological were observed by phase-contrast microscopy. Significant toxicity was determined (CC_{50} = 300 μ M). Morphological changes were noted from 250 μ M. The cells changed their spindle-shaped to rounded and wrinkled shapes. Milonine was not toxic to Vero cells at low concentrations and other experiments are being conducted with other cell lines.

KEYWORDS: *Cissampelos sympodialis*, Cytotoxicity *in vitro*, Milonine, Vero cell.

INTRODUCTION

Menispermaceae is a family of seventy genera and distinct 420 species, composed mainly of climbing plants, where many of them are used in the folk medicine. The great majority of the species can be found in countries with a tropical climate.^[1] The genus *Cissampelos* comprises about nineteen species, nine of which occur in Brazil.^[2-4] The specie *Cissampelos sympodialis* Eichl is endemic to Brazil and is found in the Northeast and Southeast, from Ceara to Minas Gerais states.^[5]

In some states of northeastern Brazil, especially in Paraíba, the aqueous infusion of the plant leaves is used for treatment of different respiratory diseases such as asthma and bronchitis, as well as other inflammatory diseases such as arthritis and rheumatic disorders.^[6-8] A bisbenzylisoquinoline alkaloid, warifteine, the major component isolated from the ethanolic extract of *Cissampelos sympodialis*, was found to relax both vascular and nonvascular smooth muscle tissues.^[9]

Milonine, an 8,14-dihydromorphynioneal alkaloid, was isolated and identified according to previously established methodology.^[10] It has been reported that the hypotensive and vasorelaxant effects produced by milonine are mediated by the endothelium, likely via nitric oxide release, activation of nitric oxide-cGMP pathway and opening of K⁺ channels.^[11] The milonine showed anti-inflammatory activity via inhibition of mast cell degranulation.^[12] Cytotoxic studies to compare warifteine and milonine alkaloids *in vitro* were evaluated against hepatocyte and fibroblast cultures, previously treated with cimetidine, and low toxicity was observed with the use of milonine, revealing a cytochrome P450-independent pathway.^[13]

In the present study we evaluated the cytotoxic effect of milonine alkaloid on Vero cell lines and investigated possible modifications in the morphology of these cells.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

The species *Cissampelos sympodialis* (Menispermaceae) is popularly known as “milona”, “jarrinha”, “abuteira” and “orelha-de-onça” (**Figure 1**), and the aqueous fraction of the ethanol extract of its leaves has revealed promising pharmacological actions. The

Menispermaceae family is known by the presence of alkaloids and some studies with this species have shown a considerable amount of phenolic compounds. *C. sympodialis* specimens were primarily collected in the city of Souza, Paraíba, Brazil, and was identified by Dr. Maria de Fátima Agra. A voucher specimen (Agra-1456) was deposited at Herbarium Prof. Lauro Pires Xavier of the Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Brazil.^[14]

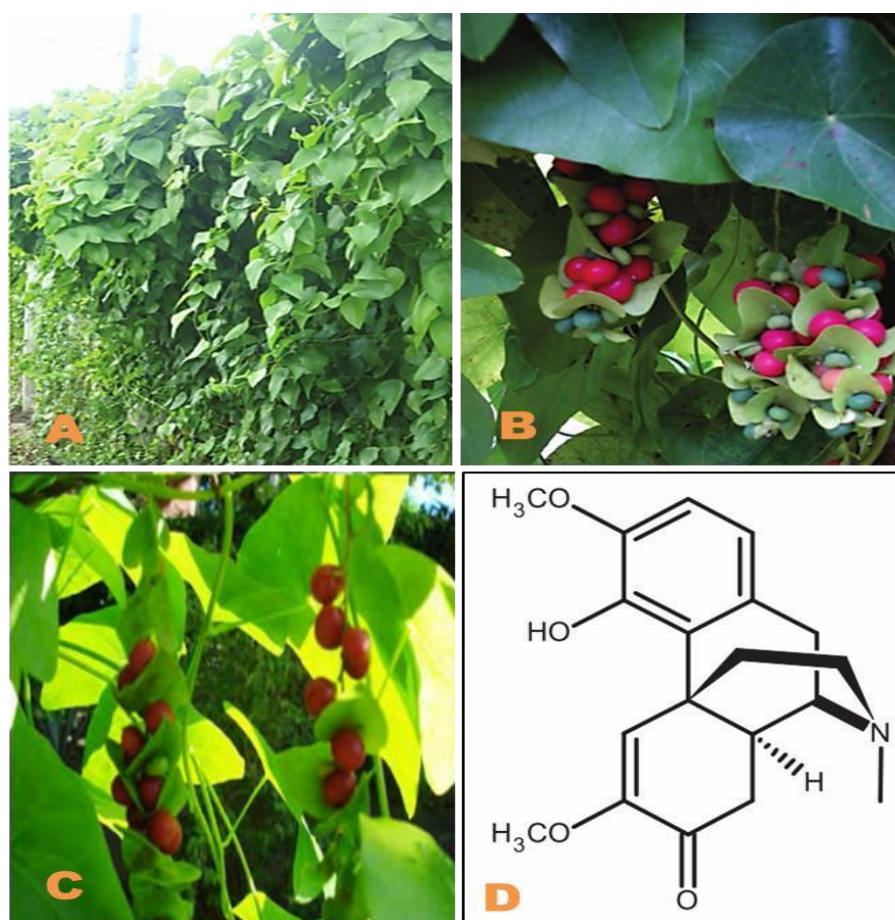


Figure 1: *Cissampelos sympodialis* Eichl (Menispermaceae). A) Adult plant. B and C) detail of deltoids leaves and ripened fruits.^[5] D) Chemical structure of Milonine.^[10]

Milonine

Milonine was provided by Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho from Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM, UFPB), located in João Pessoa, capital of the state of Paraíba, Brazil. The alkaloid was prepared by dissolving 1 mg of the powdered material in 50 μ L of HCl (1 N) and then adding 800 μ L of saline (0.9% NaCl). The pH was adjusted to 7 with sodium hydroxide solution (1 M), and the volume completed to 1000 μ L. The isolation of milonina has been previously described.^[10]

Culture of Vero cells and morphological analysis

Vero cells (kidney fibroblasts from African green monkey) was maintained in the Tissue Culture Laboratory of Histology and Embryology Department (DHE-UFPE, Recife/PE, Brazil), at 37°C in an incubator containing 5% CO₂ and 95% of relative humidity, in DMEM (Sigma[®], St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated FBS (LGC Biotechnology, São Paulo, Brazil), 100 IU penicillin/mL and 100µg/mL streptomycin (Sigma[®], St. Louis, MO, USA, respectively). These cells grown in culture bottles until reached 80-90%. Thereafter, the cells (1×10^5 cell/mL) were transferred to 96-well plates. Morphological changes after the use of milonine were observed at 72 hours. Vero cells were observed by a Leica DMIL inverted phase contrast microscope (Leica microsystems, Wetzlar, Germany) equipped with digital camera (MOTICAM BA 2.000, Campinas, Brazil) and the digital photographs were taken using the Motic Images Plus 2.0 software.

In vitro cytotoxicity activity

Vero cell cytotoxicity was determined by the colorimetric method MTT, that is based on the conversion of the tetrazolium salt into the colored formazan product, the concentration of which can be determined spectrophotometrically.^[15] These cells were seeded (1×10^5 cells/mL) with DMEM medium in 96-well microplates and incubated with 50 µL at different concentrations of milonine (1.95 to 1000µM). Negative control was DMSO. The absorbance was measured by using a multi-well scanning spectrophotometer (SkanIt Software 2.4.5 RE for Varioskan Flash, Thermo Scientific, Massachusetts, USA) at 595nm wavelength. The results were expressed as percentage of relative viability of cell compared to control group. Three independent experiments were performed in triplicate.

Statistical Analysis

All statistical analyses were performed with Origin for Windows (release 8.2, OriginLab, USA). Data from MTT assays were analyzed by ANOVA followed by Tukey's test, with $p < 0.05$. The results were expressed as mean values $\pm$ standard deviation (SD).

RESULTS AND DISCUSSION

In this study, we report for the first time the cytotoxic activity of milonine on Vero cell line. Under effect of milonine, at different concentrations (1.95 to 1000µM), the cell proliferation was not impaired in range of 1.95 to 125µM (detected by MTT-test, after 72 h) and began to decrease from 250µM (**Figure 2**). The CC₅₀ value (concentration of drug required to reduce cell viability by 50%) was determined in 300 µM.

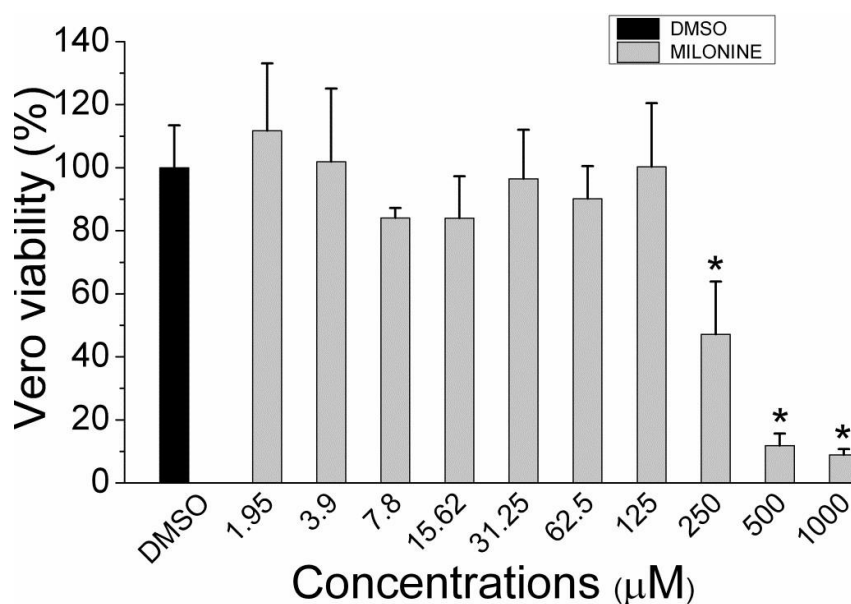


Figure 2: *In vitro* cytotoxic activity of Vero cell line under the effect of Milonine at 72h. Cytotoxic effect (CC_{50}) of milonine was determined at concentrations ranging from 1.95 to 1000 μ M. Statistical analysis of growth differences between treated and control (DMSO) cultures were performed using the ANOVA followed by Tukey's test ($p < 0.05$). The results were expressed as mean values $\pm$ standard deviation (SD). Three independent experiments were performed in triplicate.

Cytotoxicity activity has recently been demonstrated for several other plant-derived bisbenzylisoquinoline alkaloids under investigation as potential antiplasmodial and antiamoebic agents. In general, they were found to be more toxic to *P. falciparum* than to mammalian cells.^[16,17] Cytotoxic studies carried out in KB cell line showed that none of the 24 bisbenzylisoquinoline alkaloids tested exhibited cytotoxicity against this cell line, the most toxic being berbamine.^[16] In this same study it was found that the warifteine had similar cytotoxic effects on V79 cells and hepatocytes, when compared with berbamine on KB cell line. In the investigated models, using V79 cells the milonine alkaloid was less toxic than warifteine (IC_{50} of 290 and 35 μ M, respectively) and also showed slighter toxicity in hepatocytes cultured (IC_{50} around 300 and 400 μ M) compared to warifteine ($IC_{50} = 10 \mu$ M).

Morphological alteration of Vero cells lines upon exposure using milonine was observed under phase contrast microscope (**Figure 3**). At high concentration (250 μ M), the cells were retracted, with the presence of spacing between them. At highest concentration (500 and 1000 μ M) the cells became rounder, shrunk and showed signs of detachment from the surface of the wells denoting cell death.

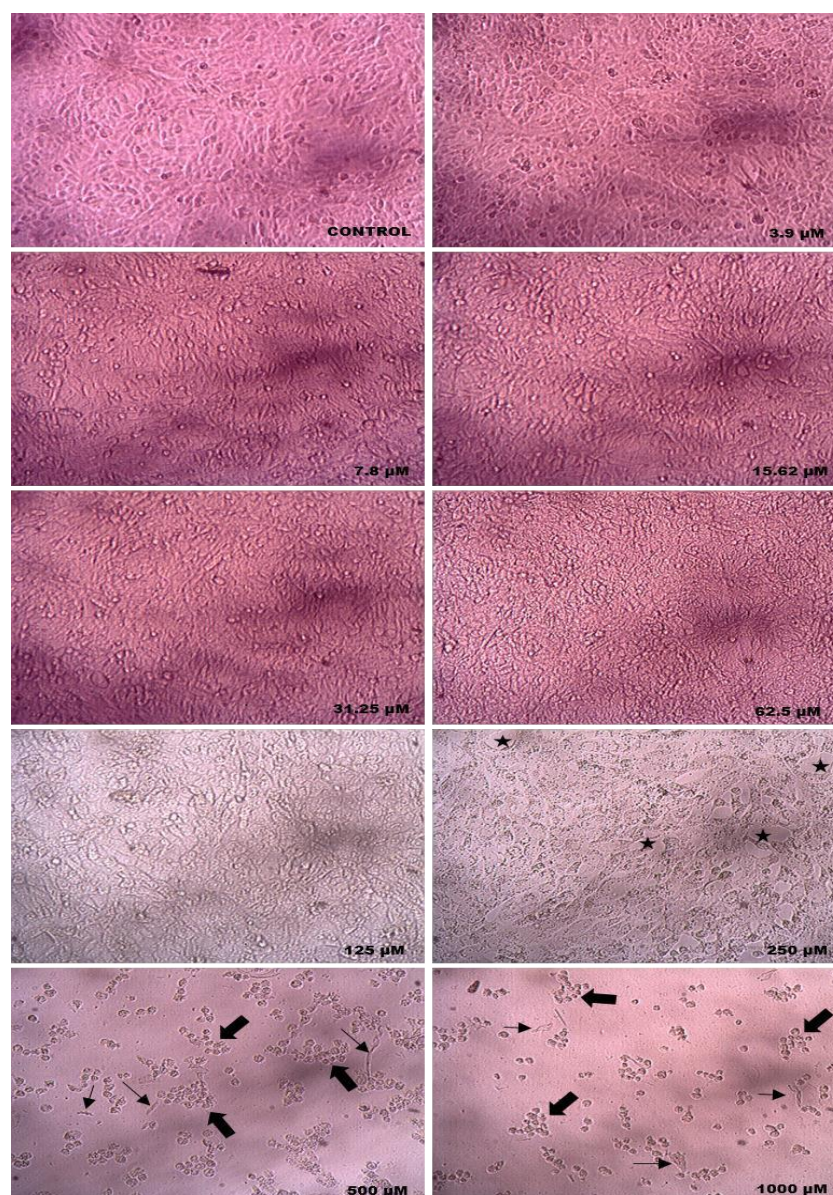


Figure 3: Photomicrographs of Vero cells treated in different concentrations of milonine (1.95 to 1000µM) and control group (DMSO). At concentrations from 1.95 to 125µM, cells grown in monolayers adhered to the culture plate (similar to the control). Cytoplasmic retractions and appearance of cell spacing (asterisks) were observed with 250µM. At the highest concentrations (500 to 1000µM), the following aspects were observed: decreased cell density, presence of rounded and clustered cells (wide arrows) and cellular debris (thin arrows). (Magnitude of the images: 200 ×).

In vitro cytotoxicity assay generally uses established cell lines and changes in cell morphology patterns are usually evaluated. Vero cells come from the kidney of the African green monkey (*Cercopithecus aethiops*) are considered homologous to human body cells, being easily maintained *in vitro* cultures.^[18]

At the highest concentrations (500 to 1000 μ M) of milonine were observed considerable changes in morphology, the cells became rounder, shrunk and showed signs of detachment from the surface of the wells denoting cell death. The data obtained in this study may be associated to the deleterious damage of reactive oxygen species (ROS), responsible for causing cell alterations may lead to programmed cell death.^[19]

Although alkaloids have shown important pharmacological effects, there is no information on the effects of milonine on different systems of the human body.

CONCLUSION

Milonine was not toxic to Vero cells line and studies are being conducted to clarify its pharmacological potential.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors like to express their sincere thanks to Professor José Maria Barbosa Filho, who provided the substance for conducting this research and the Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) that provided financial support to this work.

REFERENCES

1. Jahan R, Khatun A, Nahar N, Jahan FI, Choowdhury AR, Nahar A, Seraj S, Mahal MJ, Khatun Z, Rahmatullah M. Use of Menispermaceae family in folk medicine of Bangladesh. Adv in Nat Appl Sci, 2010; 4: 1-9.
2. Rhodes DG. A revision of the genus *Cissampelos*. Phytologia, 1975; 30: 415-484.
3. Jacques FMB, Bertolino P. Molecular and morphological phylogeny of Menispermaceae (Ranunculales). Plant Syst Evol, 2008; 274: 83-97.
4. Stevens PF et al. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. Bot J Linn Soc, 2016; 181: 1–20.
5. Cavalcanti AC, Melo ICAR, Medeiros AFD, Neves MVM, Pereira AN, Oliveira EJ. Studies with *Cissampelos sympodialis*: the search towards the scientific validation of a traditional Brazilian medicine used for the treatment of asthma. Rev Bras Farmacogn, 2013; 23(3): 527-541.
6. Barbosa-Filho JM, Agra MDF, Thomas G. Botanical, chemical and pharmacological investigation on *Cissampelos* species from Paraíba (Brazil). Journal Braz Assoc Advanc Sci, 1997; 49: 386-394.
7. Barbosa-Filho JM, Piuvezam MR, Moura MD, Silva MS, Lima KVB, da-Cunha EVL,

- Fechine IM, Takemura OS. Anti-inflammatory activity of alkaloids: a twentycentury review. *Rev Bras Farmacogn*, 2006; 16: 109-139.
8. Agra MF, Freitas PF, Barbosa-Filho JM. 2007. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Rev Bras Farmacogn*, 2007; 17: 114-140.
 9. Freitas MR, Cortes SF, Thomas G, Barbosa-Filho JM. Modification of calcium metabolism in the rabbit aorta as a mechanism of spasmolytic action of Warifteine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid isolated from the leaves of *Cissampelos sympodialis* Eichl. *J Pharm Pharmacol*, 1996; 48: 335-338.
 10. Freitas MR. Milonine, an 8,14- dihydromorphinandienone alkaloid from leaves of *C. sympodialis*. *Phytochemistry*, 1995; 40: 1553-5.
 11. Cavalcante HMM, Ribeiro TP, Silva DF, Nunes XP, Barbosa-filho JM, Diniz FFM. Cardiovascular Effects Elicited by Milonine, a New 8,14- Dihydromorphinandienone Alkaloid. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2010; 108(2): 122-130.
 12. Alves AF. Milonina alcalóide de *Cissampelos sympodialis* Eichl (Menispermaceae) inibe inflamação aguda mediada por mastócitos. 2016. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB, Brasil.
 13. Melo PS, Cavalcante HMM, Barbosa-filho JM, Diniz MFFM, Medeiros AIA, Haun M. Warifteine and milonine, alkaloids isolated from *Cissampelos sympodialis* Eichl: cytotoxicology on rat hepatocyte culture and in V79 cells. *Toxicology Lettes*, 2003; 142(1): 143- 151.
 14. Barbosa-filho JM, Agra MF, Thomas G. Botanical, chemical and pharmacological investigation on *Cissampelos* species from Paraíba (Brazil). *Ciência e Cultura*, 1997; 49: 386- 394.
 15. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferat. *J Immunol Methods*, 1983; 65: 55-63.
 16. Marshall SJ, Russell PF, Wright CW, Anderson MM, Phillipson JD, Kirby GC, Warhurst DC, Schiff PL. *In vitro* antiplasmodial, antiamoebic and cytotoxic activities of a series of bisbenzylisoquinoline alkaloids. *Antimicrob Agents Chemother*, 1994; 38: 96-103.
 17. Pang L, Hoult JRS. Cytotoxicity to macrophages of tetrandrine, an antislucosis alkaloid, accompanied by an over production of prostaglandins. *Biochem Pharmacol*, 1997; 53: 773- 782.
 18. Liao TT, Shi YL, Jia JW, Wang L. Sensitivity of morphological change of Vero cells exposed to lipophilic compounds and its mechanism. *J Hazard Mater*, 2010; 179: 1055-64.

19. Salganik RI. The benefits and hazards of antioxidants: controlling apoptosis and other protective mechanisms in cancer patients and the human population. J Am Coll Nutr, 2001; 20(5): 464-472.

4.2 ARTIGO 2- LEISHMANICIDALACTIVITY AND CYTOTOXICITY OF MILONINE ALKALOID AGAINST *LEISHMANIA (L.) AMAZONENSIS*

Título: Leishmanicidal activity and cytotoxicity of milonine alkaloid against *Leishmania (L.) amazonensis*

Periódico: Natural Product Research

Qualis CAPES: A4



Leishmanicidal activity and cytotoxicity of milonine alkaloid against *Leishmania (L.) amazonensis*

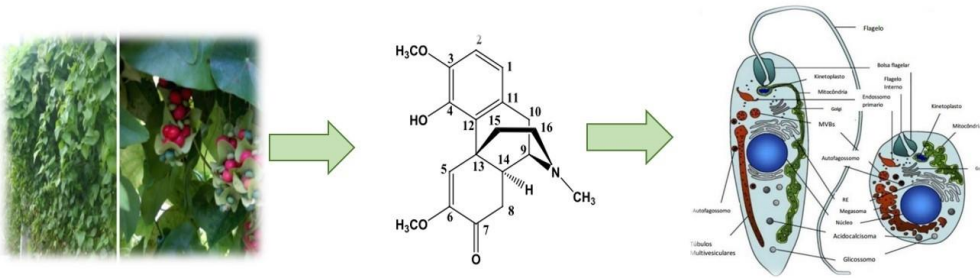
Journal:	Natural Product Research
Manuscript ID	GNPL-2020-0190
Manuscript Type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	21-Jan-2020
Complete List of Authors:	Santos, Gleyka; Universidade Federal de Pernambuco Centro de Biociencias, Histologia e Embriologia Oliveira, Erwelly; Universidade Federal de Pernambuco Centro de Biociencias, Histologia e Embriologia Peixoto, Janaína; Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas Tano, Fábila; Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas Stolf, Beatriz; Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas Filho, José Maria; Universidade Federal da Paraíba, Laboratório de Tecnologia Farmacêutica Prof. Delby Fernandes de Medeiros Cavalcanti, Eliete; Universidade Federal de Pernambuco Centro de Biociencias, Histologia e Embriologia Medeiros, Paloma; Universidade Federal de Pernambuco Centro de Biociencias, Histologia e Embriologia
Keywords:	Cissampelos sympodialis Eichl, Alkaloid, Milonine, Leishmania



Leishmanicidal activity and cytotoxicity of milonine alkaloid against *Leishmania (L.) amazonensis*

Journal:	<i>Natural Product Research</i>
Manuscript ID	GNPL-2020-0190
Manuscript Type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	21-Jan-2020
Complete List of Authors:	Santos, Gleyka; Universidade Federal de Pernambuco Centro de Biociencias, Histologia e Embriologia Oliveira, Erwelly; Universidade Federal de Pernambuco Centro de Biociencias, Histologia e Embriologia Peixoto, Janaína; Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas Tano, Fábila; Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas Stolf, Beatriz; Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas Filho, José Maria; Universidade Federal da Paraíba, Laboratório de Tecnologia Farmacêutica Prof. Delby Fernandes de Medeiros Cavalcanti, Eliete; Universidade Federal de Pernambuco Centro de Biociencias, Histologia e Embriologia Medeiros, Paloma; Universidade Federal de Pernambuco Centro de Biociencias, Histologia e Embriologia
Keywords:	Cissampelos sympodialis Eichl, Alkaloid, Milonine, Leishmania

SCHOLARONE™
Manuscripts



221x68mm (150 x 150 DPI)

**Leishmanicidal activity and cytotoxicity of milonine alkaloid against
*Leishmania (L.) amazonensis***

Gleyka D. de M. Santos^{ab*}, Erwelly B. de Oliveira^{ab}, Janaína C. Peixoto^c,
Fábia T. Tano^c, Beatriz S. Stolf^c, José M. Barbosa-Filho^e, Eliete C. Silva^{abd}
and Paloma L. Medeiros^{abd}

^aTissue Culture Laboratory (LCT), Department of Histology and Embryology, Federal University of Pernambuco, Cidade Universitária, Recife-PE, Brazil. ^bPost-Graduate Program in Therapeutic Innovation, Federal University of Pernambuco, Cidade Universitária, Recife-PE, Brazil. ^cInstitute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo-SP, Brasil. ^dPost-Graduate Program in Morphotechnology, Federal University of Pernambuco, Cidade Universitária, Recife-PE, Brazil. ^eInstitute for Research in Drugs and Medicines (IPEFarM), Federal University of Paraíba, Cidade Universitária, João Pessoa-PB, Brazil.

*Tissue Culture Laboratory (LCT), Department of Histology and Embryology, Federal University of Pernambuco, 50.670-901, Cidade Universitária, Recife-PE, Brazil.

E-mail: gleika_brasil@hotmail.com

Leishmanicidal activity and cytotoxicity of milonine alkaloid against *Leishmania (L.) amazonensis*

Abstract: Milonine is an alkaloid isolated from the plant *Cissampelos sympodialis* Eichl that it is endemic in northeastern Brazil where it is popularly used for inflammatory diseases. Few studies have been carried out regarding its pharmacological activities. In the present study, leishmanicidal activity and cytotoxicity of the milonine alkaloid against *Leishmania (L.) amazonensis* was evaluated *in vitro*.

Keywords: *Cissampelos sympodialis* Eichl; alkaloid; milonine; Leishmania

1. Introduction

Leishmaniasis is an anthroponosis considered a major public health problem, representing a group of infectious parasitic diseases with a wide clinical spectrum and considerable epidemiological diversity (VALE and FURTADO 2005). The World Health Organization (WHO) estimates that 350 million people are at risk of contamination, with two million new cases per year; 1.5 million cases of cutaneous leishmaniasis and 500,000 cases of visceral leishmaniasis (WHO 2010).

Leishmaniasis has been referred to as endemic in the tropics, subtropical and Mediterranean regions. According to the species involved and the parasite-host relationship, leishmaniasis may present different clinical forms such as visceral and integumentary (WANG et al. 2010). *L. (L.) amazonensis* is the etiological agent of cutaneous leishmaniasis and diffuse cutaneous leishmaniasis (WHO 2018). The drugs available today make it difficult to treat this disease due to its high toxicity and many side effects, with increasing resistance of parasites (MCGWIRE and SATOSKAR 2013).

In recent decades, population interest in natural therapies has increased significantly in industrialized countries and the use of medicinal and herbal medicines is expanding (SCHENKEL et al. 2003; BRAZIL 2006). Potentiality directed to medicinal plants is part of new paradigms of social and economic development based on renewable resources; this reinforces the search for new molecules with proven therapeutic activity (RIBEIRO 2019).

Milonine is an alkaloid with few studies developed regarding its pharmacological properties. Cavalcante et al. (2011) reported the spasmolytic activity of smooth muscle of endothelium of rat mesenteric artery through hypotensive effects, endothelium-

mediated vasorelaxant action via nitric oxide release. Alves (2016) studied the anti-inflammatory activity of milonine via inhibition of mast cell degranulation. Its low toxicity to some cell lines makes even more promising studies related to their pharmacological activities (SANTOS 2019).

In the present study, we evaluated the leishmanicidal activity and the cytotoxic effect of milonine alkaloid obtained from the leaves of *Cissampelos sympodialis* Eichl.

2. Results and discussion

The leishmanicidal activity of milonine at different concentrations (0.015 to 50 μM) against *L. (L.) amazonensis* promastigote forms of the murine strain (LV79) cultivated for 48 hours revealed significant inhibition of parasite viability with $\text{IC}_{50} = 3.66 \mu\text{M}$ (Figure 1).

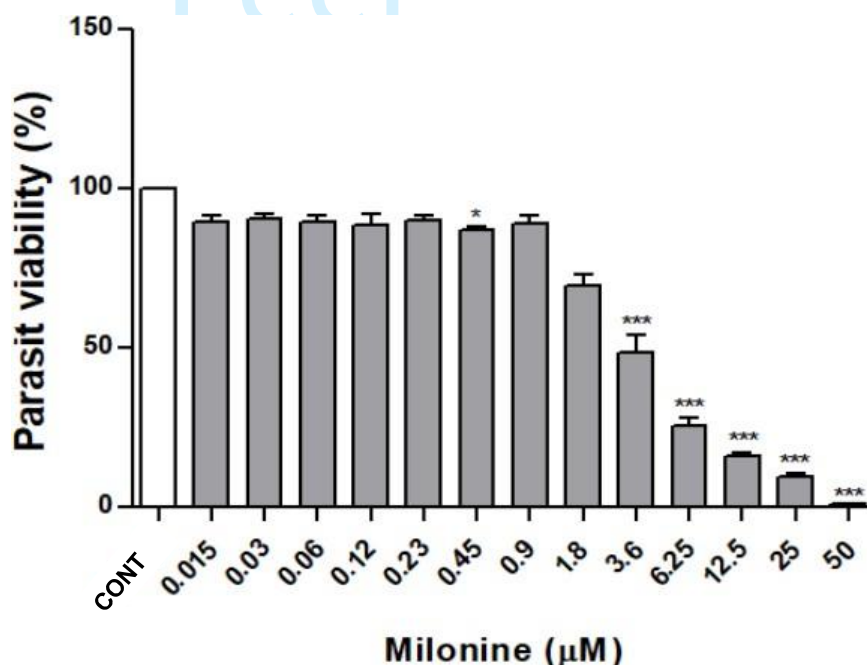


Figure 1. Evaluation of leishmanicidal activity of milonine against promastigote forms of *Leishmania (L.) amazonensis* (LV79).

Promastigote forms were treated with different concentrations (0.015 to 50 μM) of milonine for 48 hours. Results were performed in three independent experiments carried out in triplicate and compared with the control (medium). The values were presented as mean $\pm$ standard deviation of the mean. $*p < 0.05$, $***p < 0.001$. These parameters were performed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by post

hoc test of Tukey. All the statistical analyses were performed using SigmaStat for Windows (Version 3.5, San Jose, CA, USA).

There are not many studies related to the pharmacological activities of milonine, mainly with regard to its leishmanicidal activity, thus making this study a pioneer in terms of this evaluation, according to the results obtained in the tests of anti-promastigote activity. The milonine showed very interesting and satisfactory results; since, with low concentrations, it presented leishmanicidal activity, reinforcing the continuity of studies in the search for the elucidation of possible mechanisms of action.

Secondary metabolites are well known, including alkaloids, which constitute a heterogeneous group of nitrogenous substances (SIMOES et al. 2010). From a chemical point of view, several isoquinoline alkaloids were isolated from *Cissampelos sympodialis*, among which the following stand out: milonine (FREITAS et al. 1995), warifteína (CORTES et al. 1995), methylwarifteína and laurifolina (BARBOSA-FILHO et al. 1997), liriodenine and roraimine (LIRA et al. 2002). Several pharmacological activities have been described for alkaloids, such as: anxiolytic, provided by annomontina and liriodenina (CHANG et al. 2004); analgesic, by morphine (RHOADES 1979); anti-inflammatory, such as warifteine and curine (LEITE et al. 2014; LIMA et al. 2015), among others.

In recent studies developed at the Immunopharmacology laboratory from University Federal of Paraíba, João Pessoa, Brazil, it was demonstrated that milonine showed anti-inflammatory activity by inhibiting mast cell degranulation and that, in the experimental model of anaphylactic shock induced by substance 48/80, it increased the animals' survival. Besides what it has been suggested that antinociceptive activity can act through a peripheral route in contortion test induced with acetic acid (ALVES 2016).

The relaxing effect induced by milonine was attenuated in the presence of KCl, a K(+) efflux modulator, or potassium channel blockers such as glibenclamide, or charybdotoxin plus apamin. In addition, pre-contraction with extracellular potassium saturation was reduced when treated with milonine, inducing this vascular relaxation, the hypotensive and vasorelaxant effects of milonine are, in part, mediated by the endothelium, probably via the release of nitric oxide (NO), activation of the NO-GMPc pathway and opening of K(+) channels (CAVALCANTE et al. 2011).

The potential action of milonine in the infection by *Leishmania (L.) amazonensis* (LV79) in BALB/c medullary macrophages was evaluated at different concentrations of

milonine (1.2 to 32.9 $\mu\text{M/mL}$), which significantly decreased the infection rate ($p < 0.05$) (Figure 2).

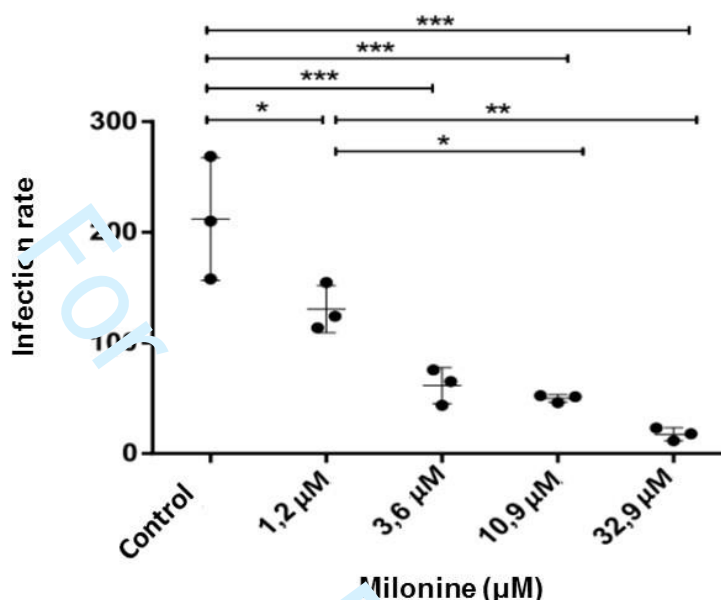


Figure 2. Action of milonine in the infection by *Leishmania (L.) amazonensis* (LV79) on BALB/c medullary macrophages at different concentrations (1.2 to 32.9 μM).

The results were obtained in three independent experiments in triplicate. Infection index was calculated by multiplying the percentage of infected cells by the number of parasites found in 100 cells and divided by 100. With the data obtained in the counts, a graph was plotted using the GraphPad Prism software version 6.0. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (ANOVA followed by post hoc test of Tukey). All the statistical analyses were performed using SigmaStat for Windows (Version 3.5, San Jose, CA, USA).

The mechanism by which milonine reduced the infection rate in macrophages by *Leishmania (L.) amazonensis* (LV79) is still unclear. It is known that the survival of parasites within macrophages is essentially mediated by the balance between the activation of iNOS and arginase I (WANDERLEY et al. 2019). One of the essential mechanisms for the elimination of these parasites by macrophages is the production of toxic metabolites such as superoxide anion (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2) and nitric oxide (NO) (ASSREUY et al 1994).

The cytotoxicity of milonine against BALB/c medullary macrophages was investigated. The viability of these medullary macrophages was evaluated at different

concentrations of milonine (3.66 to 457.5 μ M). In the lowest concentrations of milonine (3.66 to 91.5 μ M) no cytotoxic effects were observed in the macrophages under study, when compared to the control group (Medium and DMSO at different concentrations); where under effect of the highest concentration of milonine (457.5 μ M) the toxicity was considerably significant ($p < 0.05$) (Figure 3).

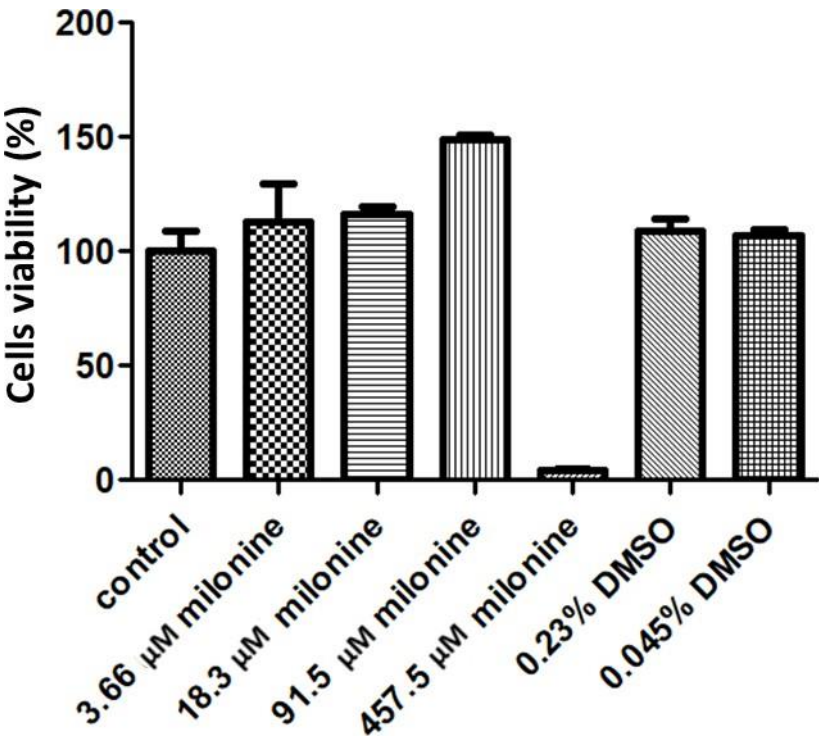


Figure 3. Action of milonine on the *in vitro* viability of BALB/c medullary macrophages at different concentrations (3.66; 18.3; 91.5; 457.5 μ M)

The results were obtained in three independent experiments (in triplicate) and the values were presented as mean $\pm$ standard deviation. *, represent the significant difference ($p < 0.05$, one-way ANOVA followed by the Tukey post-test) versus the control group (DMSO and medium).

Melo et al (2003) reported the cytotoxic effects of warifteine and milonine alkaloids, which were evaluated *in vitro* in cultures of rat hepatocytes and fibroblasts (V79) treated with cimetidine (cytochrome P450 inhibitor). According to these authors, both alkaloids showed cytotoxicity for the strains mentioned; however, milonine was less toxic than warifteine. Cimetidine did not protect cells from the toxic effects of the mentioned alkaloids, proving that cytotoxicity is independent of the cytochrome P450 system. Recently, it was demonstrated that alkaloid milonine was not cytotoxic to the

Vero cell line (SANTOS 2019). In the present study the alkaloid milonine demonstrates cytotoxicity in high concentration, approximately 127 times greater than the IC₅₀ value.

3. Experimental

3.1 Parasite culture

Leishmania (L.) amazonensis promastigote forms of murine strain (LV79) was grown in 199 medium (Gibco, Invitrogen), containing HEPES (40 mM), adenine (0.1 mM), hemin (0.0005%), 10% fetal bovine serum (SFB, Invitrogen), at pH of 7.4 and kept at 26° C in a BOD incubator.

3.2 Evaluation of *in vitro* leishmanicidal activity of milonine against promastigote forms of *Leishmania (L.) amazonensis* (LV79)

The exponentially growing parasites (LV79) was distributed at a density of 1×10^6 parasites/mL in 96-well flat-bottomed plates together with the compounds under study. For the tests, the substance was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) (Vetec Química Fina, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) and then diluted in 199 medium at concentrations of 0.03 to 50 µM/mL. The plate containing the parasites was incubated at 26 °C in a B.O.D incubator (Caltech Indústria e Comércio LTDA, Franca, São Paulo, Brazil) for 48 hours. After 48 hours of incubation, 10µL of MTT (5 mg/mL) was added to each well and the plates were incubated for three hours in a B.O.D. incubator at 26 °C. After that period, 100 µL of 10% SDS was added to each well. The plates were read on a microplate reader (SkanIt Software 2.4.5 RE for Varioskan Flash, ThermoScientific, Massachusetts, USA) at 595 nm. The experiments were carried out in triplicates.

3.3 Evaluation of cytotoxic action and infection of BALB/c medullary macrophages under effect of milonine

The BALB/c medullary macrophages used in the experiments were the same as in the research project entitled: "Study of *Leishmania* virulence factors and macrophage proteins involved in the infection". They were isolated by Postdoctoral fellow Janaína Teixeira and the protocols were approved by the Ethics Committee on Animal Use of the University of São Paulo (protocol no 023/2015 / CEUA). The macrophages were kept in RPMI 1640 medium, pH 7.2 in an oven at 37 °C and 5% CO₂.

For the cytotoxicity test, the density of 1×10^6 cells per well was used and these were maintained for 24 hours in a B.O.D incubator at 37 °C and 5% CO₂. Subsequently, the medium was removed and a new medium was added with the test substance in

concentrations of 1.22-457.5 μ M and incubated for 48h. After this, 200 μ L of PBS, glucose and 100 μ L of MTT were added and new incubation was carried out for 4 hours; then all PBS and MTT were removed, with 100 μ L of SDS (10%) being added and reading at a wavelength of 595 nm in a microplate reader (SkanIt Software 2.4.5 RE for Varioskan Flash, ThermoScientific, Massachusetts, USA). All experiments were carried out in triplicates.

The density of 4×10^5 cells/well of plates with 24 wells was used for macrophage infection and these cells were kept for 24 hours in an oven at 37 °C and 5% CO₂, in RPMI medium. Subsequently, the medium was removed and a new medium was added with the parasites in a proportion of 10: 1 per well, and incubated for 4 hours in an oven at 34 °C and 5% CO₂. Then the medium with the parasites was removed and new medium was added until the next day. For the treatment of infected macrophages, the medium was replaced with a new one with the test substance in concentrations of 1.22-32.94 μ M. The incubation in the milonine treatment phase was the same as mentioned above, for a period of 48 hours and for this evaluation, coverslips were used to support the infected macrophages. After this stage, all the medium was removed and the process of fixing infected macrophages in P.A. methanol (VETEC Fine Chemical) was carried out, and staining was carried out with the Rapid Panotic Kit (Laborclin, Pinhais, PR, Brazil), according to the manufacturer's instructions. The coverslips were mounted on glass slides with Entellan (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and left overnight for complete fixation, before microscopic evaluation.

3.4 Statistical analysis

The leishmanicidal activity of milonine was expressed as the concentration that inhibit the growth of 50 % of *Leishmania (L.) amazonensis* (LV79) promastigote forms. Statistical analysis were performed using nonlinear regression to obtain the values of IC₅₀ and CC₅₀ (cytotoxic concentration for 50 % of murine macrophages) followed by one-way analysis of variance (ANOVA) and post hoc test of Tukey. Growth differences between parasites culture (treated and control) were expressed as mean values $\pm$ standard deviation (* p < 0.05, *** p < 0.001 values, were considered statistically significant). Infection rate was statistically significant for the values of * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 and the cytotoxicity was statistically significant for the values of p < 0.05 versus the control group (DMSO and medium). Graphs were plotted using the GraphPad Prism software version

6.0 and all statistical analyses were performed using SigmaStat for Windows (Version 3.5, San Jose, CA, USA).

4. Conclusion

The present study describes for the first time the potential leishmanicidal activity of alkaloid milonine against *Leishmania (L.) amazonensis* (LV79) promastigote forms and the results suggested that milonine can be used as a promising prototype for drug design and development of novel leishmanicidal therapeutic agents. However, further studies are needed to elucidate the possible mechanisms of action of this alkaloid.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

This research was funded by the Fundação de Apoio à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), where it provided financial support for its development.

References

- Alves, AF 2016. Milonina alcalóide de *Cissampelos sympodialis* EICHL (Menispermaceae) inibe inflamação aguda mediada por mastócitos [master's thesis] Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa/PB.
- Assreuy J, Cunha FQ, Epperlein M, Noronha-Dutra A, O'Donnell CA, Liew FV. 1994. Production of nitric oxide and superoxide by macrophages and killing of *Leishmania major*. *European Journal immunology* 24:672-676.
- Barbosa-Filho JM, Agra MDF, Thomas G. 1997. Botanical, chemical and pharmacological investigation on *Cissampelos* species from Paraíba (Brazil). *Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science*. 49:386-394.
- Barbosa-Filho JM, Piuvezam MR, Moura MD, Silva MS, Lima KVB, da-Cunha EVL, Fachine IM, Takemura OS. 2006. Anti-inflammatory activity of alkaloids: a twentycentury review. *Revista Brasileira Farmacognosia*, 16:109-139.
- BRASIL. 2006. Ministério da Saúde. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília.
- Cavalcanti AC, Melo ICAR, Medeiros AFD, Neves MVM, Pereira AN, Oliveira EJ. 2011. Studies with *Cissampelos sympodialis*: the search towards the scientific

- validation of a traditional Brazilian medicine used for the treatment of asthma. *Revista Brasileira Farmacognosia*, 23(3): 527-541.
- Chang Hui-Chiu, Chang Fang-Rong, Wu Yang-Chang, Lai Yunghsiung. 2004. Anti-cancer effect of liriodenine on human lung cancer cells. *Kaohsiung Journal of Medical Sciences* 20.
- Cortes SF, Alencar JL, Thomas G, Barbosa-Filho JM. 1995. Spasmolytic actions of warifteine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid isolated from the root bark of *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae). *Phytotherapy Research*. 9:579-583.
- Leite Fagner Carvalho, 2014. Curine, an Alkaloid Isolated from *Chondrodendron platyphyllum* Inhibits Prostaglandin E2 in Experimental Models of Inflammation and Pain. *Planta Medica*; 80:1072–1078.
- Lima TFA, Rocha JDB, Guimarães-Costa AB, Barbosa-Filho J M, Decoté-Ricardo D, Saraiva EM, Arruda LB, Piuvezam MR, Peçanha LMT. 2014. Warifteine, an Alkaloid Purified from *Cissampelos sympodialis*, inhibits Neutrophil Migration in Vitro and in Vivo. *Journal of Immunology Research*.
- Lira GA, Andrade LM, Florêncio KC, Silva MS, Barbosa-Filho JM, Cunha EVL. 2002. Roraimine: a bisbenzylisoquinoline alkaloid from *Cissampelos sympodialis* roots. *Fitoterapia*. 73:356-358.
- McGwire BS, Satoskar, AR. 2013. *Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment*. Oxford University Press. USA.
- Melo PS, Cavalcante HMM, Barbosa-Filho JM, Diniz MFFM, Medeiros IA, Haun, M. 2003. Warifteine and milonine, alkaloids isolated from *Cissampelos sympodialis* Eichl: cytotoxicology on rat hepatocyte culture and in V79 cells. *Toxicology Lettes*. 142(1): 143- 151.
- Rhoades DF. 1979. Evolution of Plant Chemical Defense against Herbivores. In Rosenthal GA, Janzen DH. *Herbivores: Their Interaction with Secondary Plant Metabolites*. New York: Academic Press. p. 41. ISBN 0-12-597180-X.
- Ribeiro LHL. 2019. Análise dos programas de plantas medicinais e fitoterápicos no Sistema Único de Saúde (SUS) sob a perspectiva territorial. *Ciência & Saúde Coletiva*, 24 (5):1733-1742.
- Santos GDM, Oliveira EB, Rodrigues CG, Barbosa-Filho JM, Silva EC, Medeiros PL. 2019. In-vitro cytotoxicity of milonine isolated from *Cissampelos sympodialis* Eichl (Menispermaceae) on Vero cell line. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 8(10): 238-246.

- Schenkel EP, Gosmann G, Petrovick PR. 2003. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira (Org.) et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5. ed. Revista. ampliada. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC. 371-400.
- Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. 2010. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre: Editora UFRGS; Florianópolis: Editora UFSC, 6º ed., 1-1102.
- Vale ECS, Furtado T. 2005. Leishmaniose tegumentar no Brasil: revisão histórica da origem, expansão e etiologia. Anais Brasileiro de Dermatologia. 80(4): 421-428.
- Wanderley JLM, Deolindo P, Carlsen E, Portugal AB, DaMatta RA, Barcinski MA and Soong L. 2019. CD4+ T Cell-Dependent Macrophage Activation Modulates Sustained PS Exposure on Intracellular Amastigotes of *Leishmania amazonensis*. Front. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 9(105):1-13.
- Wang, MZ, et al. 2010. Novel arylimidamides for treatment of visceral leishmaniasis. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 54(6): 2507-16.
- WHO. 2018. Status of endemicity of cutaneous leishmaniasis worldwide, 2015. [accessed 2019 mar 04] <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/Status>
- WHO. 2010. Meeting of the WHO expert committee on the control of leishmaniasis. WHO Technical Reports Series 949. Geneva.

4.3 MANUSCRITO A SER ENCAMINHADO PARA WORLD JOURNAL OF PHARMACY AND PHARMACEUTICAL SCIENCES

Título: *In vitro* evaluation of cytotoxic and antioxidant activities of milonine

Periódico: World Journal of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences

Qualis CAPES: B1

IN VITRO EVALUATION OF CYTOTOXIC AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF MILONINE

Gleyka D. M. Santos^{1,2*}, Erwelly B. Oliveira^{1,2}, Cláudio G. Rodrigues², José M. Barbosa-Filho⁴, Eliete C. Silva^{1,2,3}, Thales H. B. Oliveira⁵, Erik J. V. Melo⁵, and Paloma L. Medeiros^{1,2,3}

¹Laboratório De Cultura De Tecidos (LCT) Do Departamento de Histologia e Embriologia, Universidade Federal de Pernambuco, 50.670-901, Cidade Universitária, Recife-PE, Brasil.

²Programa De Pós-Graduação Em Inovação Terapêutica, Universidade Federal De Pernambuco, 50.670-901, Cidade Universitária, Recife-PE, Brasil.

³Programa De Pós-Graduação Em Morfotecnologia, Universidade Federal De Pernambuco, 50.670-901, Cidade Universitária, Recife-PE, Brasil.

⁴Instituto de Pesquisa Em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM), Universidade Federal Da Paraíba, Cidade Universitária, 58051900, João Pessoa-PB, Brasil.

⁵Laboratório de Microbiologia Ambiental e Industrial, Universidade Federal de Pernambuco, 50.670-901, Cidade Universitária, Recife-PE, Brasil.

IN VITRO EVALUATION OF CYTOTOXIC AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF MILONINE

Gleyka D. M. Santos^{1,2*}, Erwelly B. Oliveira^{1,2}, Cláudio G. Rodrigues², José M. Barbosa-Filho⁴, Eliete C. Silva^{1,2,3}, Thales H. B. Oliveira⁵, Erik J. V. Melo⁵, and Paloma L. Medeiros^{1,2,3}

¹Laboratório De Cultura De Tecidos (LCT) Do Departamento de Histologia e Embriologia, Universidade Federal de Pernambuco, 50.670-901, Cidade Universitária, Recife-PE, Brasil.

²Programa De Pós-Graduação Em Inovação Terapêutica, Universidade Federal De Pernambuco, 50.670-901, Cidade Universitária, Recife-PE, Brasil.

³Programa De Pós-Graduação Em Morfotecnologia, Universidade Federal De Pernambuco, 50.670-901, Cidade Universitária, Recife-PE, Brasil.

⁴Instituto de Pesquisa Em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM), Universidade Federal Da Paraíba, Cidade Universitária, 58051900, João Pessoa-PB, Brasil.

⁵Laboratório de Microbiologia Ambiental e Industrial, Universidade Federal de Pernambuco, 50.670-901, Cidade Universitária, Recife-PE, Brasil.

***Corresponding Author:** Gleyka D. M. Santos, Pharmaceutical, MSc student (Postgraduate Program in Therapeutic Innovation - PPGIT/UFPE). Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Histologia e Embriologia, Universidade Federal de Pernambuco, 50.670-901, Cidade Universitária, Recife-PE, Brasil.

ABSTRACT

Milonine is an alkaloid found in the leaves of *Cissampelos sympodialis* Eichl, a plant popularly used in northeastern Brazil for inflammatory diseases. The aim of this work was to investigate the antioxidant potential by testing 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazil (DPPH) and cytotoxic activity on milonine RAW macrophages. In the evaluation of the antioxidant potential, concentrations (10-100 µM) were used in the *in vitro* cytotoxicity of milonine, the concentrations were (0.91 to 500 µM) evaluated by the MTT assay. Cell morphology was observed by phase contrast microscopy. Morphological changes were observed from 31.25 µM. The cells changed their axis shape to round and wrinkled shapes. Milonine showed satisfactory antioxidant activity and was not toxic to low-concentration RAW macrophages and other studies are being carried out to better clarify the pharmacological potential of this alkaloid.

KEYWORDS: Milonine, Antioxidant, Cytotoxicity *in vitro*, DPPH, RAW macrophages.

INTRODUCTION

Oxidation is a necessary process for the maintenance of life, the existence of free radicals in the body is a natural process, being essential for various functions such as energy production, regulation of cell growth, intercellular signaling, synthesis of biological substances; however, its excess can cause damage to the body.^[1, 2]

Many studies have shown evidence that free radicals and other oxidants are responsible for aging and the degenerative diseases associated with it, such as cancer, cardiovascular disease, brain dysfunction.^[3] Free radicals are highly unstable molecules, as they have a deficiency of electrons in their structure, through the process of oxygen reduction. They form naturally in the body or are caused by external agents. The presence of free radicals in the body is indispensable, they participate in various metabolic activities, such as the cell respiration process, help the immune system to develop its protective role against infectious agents to the health of the individual, are found in phagocytosis, regulation of cell growth, intercellular signaling.^[4] To obtain stability, the molecules capture electrons from other molecules, producing a chain reaction, called oxidative stress.^[1] This oxidative stress causes overproduction of reactive oxygen species (ROS), which generates oxidative damage to biological systems.^[5]

The production of free radicals in living beings can be controlled by antioxidant compounds of endogenous origin and / or from the diet, such as tocopherols (vitamin E), ascorbic acid (vitamin C), polyphenols, selenium and carotenoids ^[5,6].

According to Sousa et al.^[3] classify antioxidants as substances that present themselves in low concentrations in comparison with the oxidizable substrate that significantly retard or inhibit the oxidation of the substrate, called antioxidants.^[1,2] Antioxidant substances are essential to fight free radicals, lose electrons and remain stable. Therefore, the search for medicinal plants with these properties has increased significantly.^[7]

Recently, there has been an increase in interest in the therapeutic potentials of secondary metabolites produced by medicinal plants as antioxidants, among which alkaloids stand out. The alkaloid milonine has demonstrated important pharmacological activities, such

as anti-inflammatory, leishmanicidal, vasorelaxant and low toxicity in some cell lines, increasing the interest in investigating more activities related to this alkaloid.^[8]

One of the methods used to identify the antioxidant capacity of a given material is the DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazil) method, in which it is characterized as a stable free radical due to the electron reallocation on the molecule. When the material under analysis has some antioxidant character, it reacts with DPPH, giving rise to the reduced form of the reagent (DPPH-H). The reduction causes its color to change from violet to yellow.^[9]

In this context, the present study aimed to evaluate the antioxidant activity of milonine, in addition to analyzing the cytotoxic activity and its action on the morphology of RAW macrophages.

MATERIALS AND METHODS

Milonine

Milonine was provided by Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho from Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPEFarM, UFPB), located in João Pessoa, capital of the state of Paraíba, Brazil. The alkaloid was prepared by dissolving 1 mg of the powdered material in 50 µL of HCl (1 N) and then adding 800µL of saline (0.9% NaCl). The pH was adjusted to 7 with sodium hydroxide solution (1 M), and the volume completed to 1000 µL. The isolation of milonina has been previously described.

Culture of RAW macrophages and morphological analysis

RAW macrophages (kidney fibroblasts from African green monkey) was maintained in the Tissue Culture Laboratory of Histology and Embryology Department (DHE-UFPE, Recife/PE, Brazil), at 37°C in an incubator containing 5% CO₂ and 95% of relative humidity, in DMEM (Sigma[®], St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated FBS (LGC Biotechnology, São Paulo, Brazil), 100 IU penicillin/mL and 100µg/mL streptomycin (Sigma[®], St. Louis, MO, USA, respectively). These cells grown in culture bottles until reached 80-90%. Thereafter, the cells (1×10⁵cell/mL) were transferred to 96-well plates. Morphological changes after the use of milonine were observed at 72hours. RAW macrophages were observed by a Leica DMIL inverted phase contrast microscope (Leica microsystems, Wetzlar, Germany) equipped with

digital camera (MOTICAM BA 2.000, Campinas, Brazil) and the digital photographs were taken using the Motic Images Plus 2.0 software.

Antioxidant activity by DPPH

The potential scavenger of milonine to the DPPH radical was evaluated as described by Molyneux (2004). A methanolic solution of DPPH was prepared at a concentration of 0.0047% (120 μ M), 300 μ L of the DPPH solution was combined with 300 μ L of the dilutions of the alkaloid (100-10 μ M) and incubated in the dark for 30 minutes. The absorbance was measured at 517 nm in a UV / Vis spectrophotometer (Evolution60 manufactured by Thermo Scientific®). The experiments were carried out in triplicate. Ascorbic acid (1mg / mL) was used to validate the method. The scanning ability of the alkali to the DPPH radical was calculated using the following formula:

$$\% \text{ sweep} = \frac{ABSc - ABSs}{ABSc} \times 100$$

Statistical Analysis

All results obtained in this study were presented as mean values $\pm$ standard deviation (SD) of three independent experiments, performed in triplicate. The data were analyzed using Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). ANOVA (Analysis of Variance) was performed and followed by Tukey's post-test ($p < 0.05$).

RESULTS AND DISCUSSION

Antioxidant activity of milonine

The antioxidant potential of milonine was evaluated using the DPPH method and is shown in **Figure 1**. The results obtained indicate that there is a concentration-dependent relationship of this activity, since the ability to convert the stable radical DPPH (purple color) into the DPPH-H (yellow color).

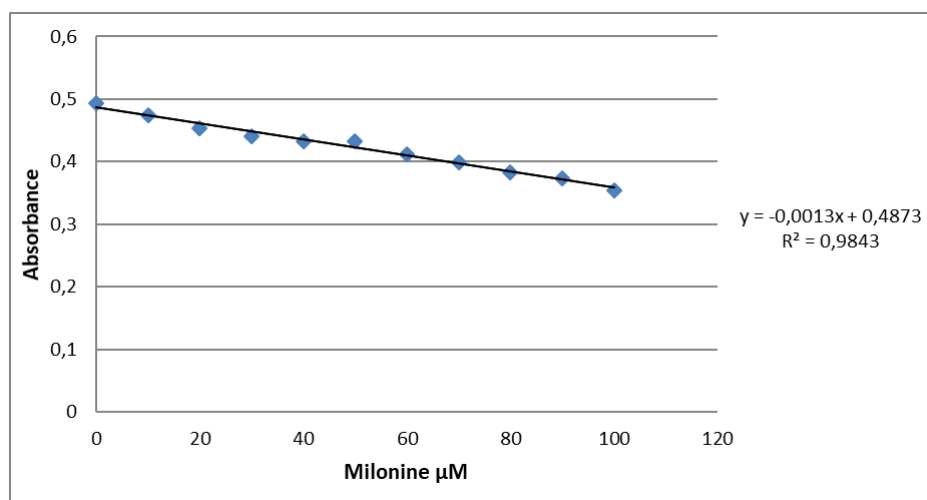


Figure 1: Elimination activity of the DPPH radical of milonine (10 to 100 μM). Determination coefficient, $R^2 = 0.984$.

The compounds that present phenolic groups are also known for their antioxidant capacity.^[9] The phenolic aromatic arrangement directly influences the antioxidant activity of phenolic acids. Consequently, several factors, such as the number and position of the -OH group, the presence of other functional groups and their position in relation to the -OH groups, have been shown to influence antioxidant and anti-radical activities.^[10-12]

It is possible that alkaloids have an antioxidant action, acting by the non-enzymatic pathway of the response to oxidative stress.^[13] The potential for radical elimination by milonine may be linked to the hydroxyl group and phenolic group present in its molecule. This not only influences the antioxidant capacity by intramolecular hydrogen bonding, but also tends to stabilize the antioxidant radical formed.^[14]

***In vitro* cytotoxic effect of milonina on RAW macrophages**

The cytotoxicity of milonine in RAW macrophages was determined by the MTT method with 72h. The percentage viability of these cells was established according to the concentrations (0.91-500 μM) The lowest concentrations of milonine exhibited viability very close to those of the control (DMSO) and higher concentrations (125 to 500 μM) were ineffective in preventing loss cell viability (Figure 2). Our results were statistically significant ($p < 0.05$) when compared to the control (DMSO). The results obtained in this work suggested that milonine could promote or inhibit the viability of normal cells in a concentration-dependent manner.^[8]

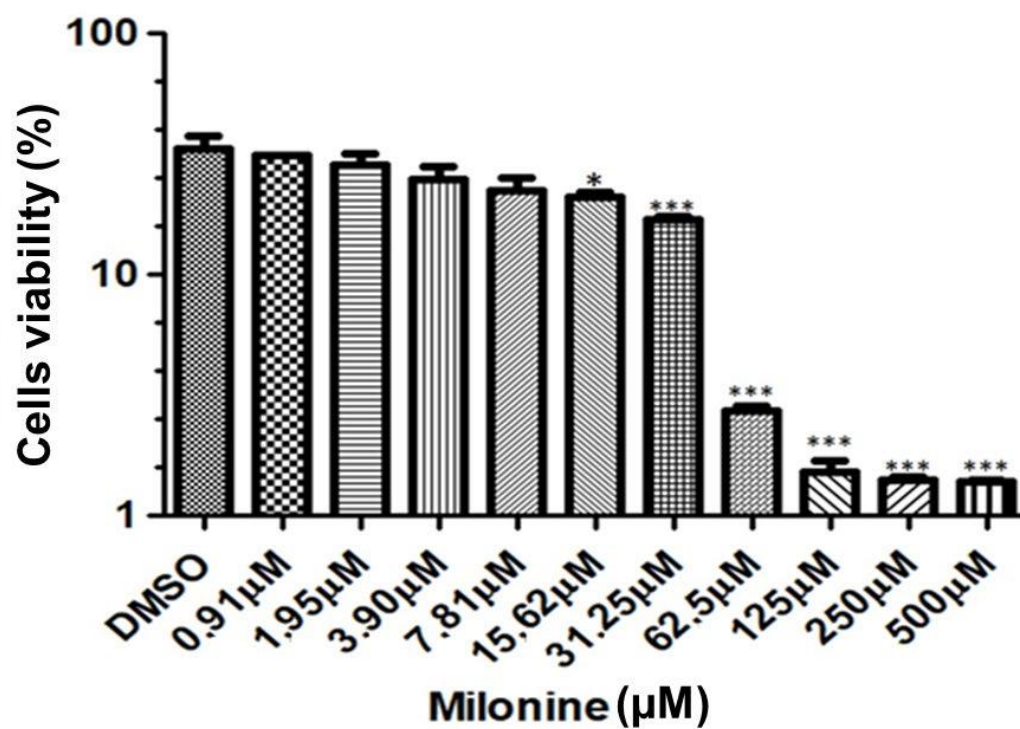


Figure 2: Cytotoxic activity of milonine in the RAW cell line. Statistical analysis of growth differences between treated and control cultures was performed using ANOVA followed by the Tukey test ($p < 0.05$). The results were expressed as mean values $\pm$ standard deviation (SD) of three independent experiments tested by the MTT assay.

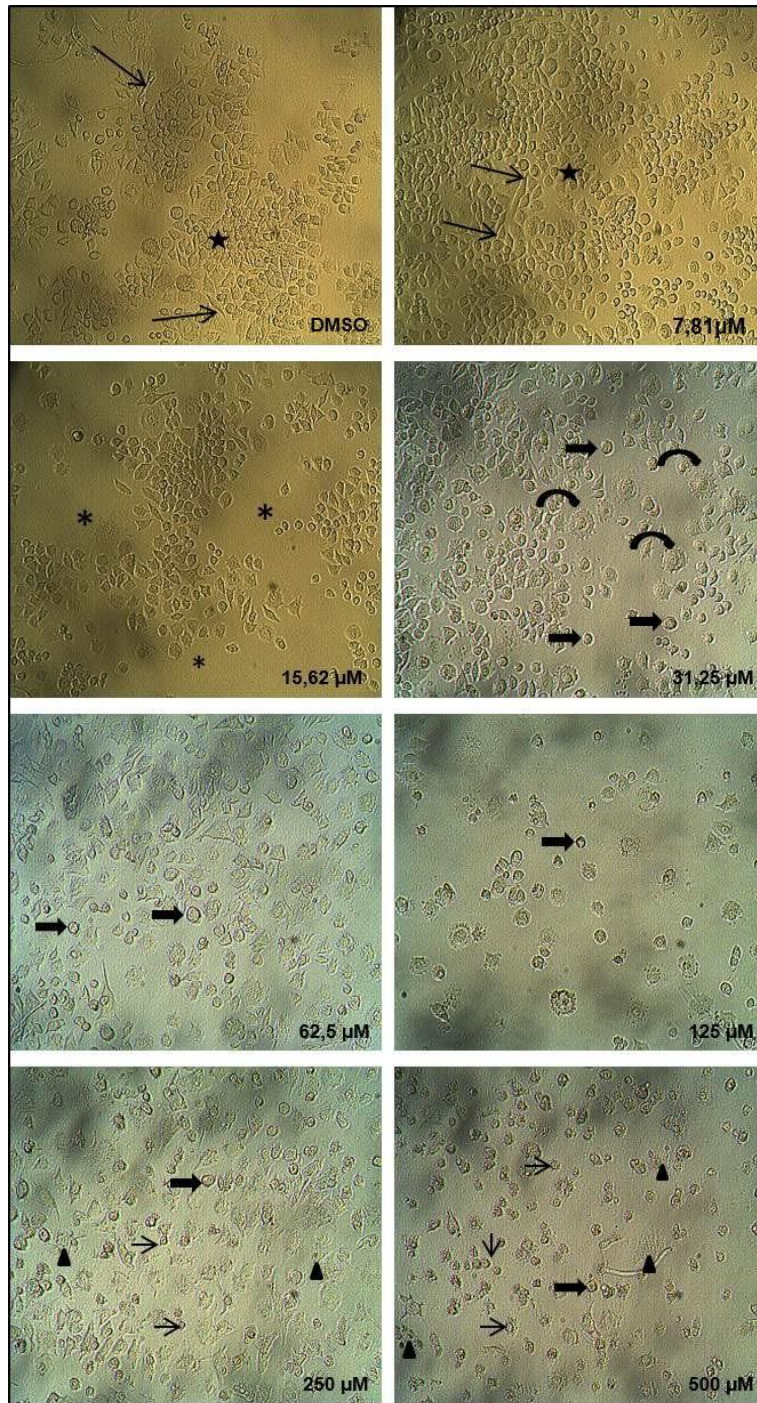


Figure 3 Morphological changes in RAW 264.7 cell line treated with milonine were observed by optical microscopy ($\times 200$). Control group (DMSO) were appeared with cuboidal shape (stars) and some cells presented with thin extensions (long thin arrows). Cells treated with milonine until the concentration of $7.81 \mu\text{M}$ behaved like the control. Considerable spacing between cells (asterisks) was observed at $15.62 \mu\text{M}$. From concentration of 31.25 of milonine, we noticed flat rounded cells (thick arrows) and some visibly flattened (curved arrows). At the highest concentrations (62.5 to $500 \mu\text{M}$), the following aspects were observed: decreased cell density, presence of rounded (thick arrows) and significant cell shrinkage (short thin arrows) and cellular debris (arrowhead).

The cytotoxic effect observed in RAW cells treated with the highest concentrations of milonine may be related to cell activation and consequently the generation of reactive oxygen and nitrogen species, causing the morphological changes observed in the study.^[15]

In addition, at the highest concentrations (125 to 500 μM), drastic changes in the morphological characteristics of macrophages were observed, revealing a decreased total cell density, as well as cell shrinkage and dense protrusions that grow at the edges of cells. The cells showed failure to reestablish intercellular associations and the growth pattern as an adherent monolayer.^[16]

CONCLUSION

Milonine had a very interesting antioxidant effect, significantly reducing the free radical DPPH and showed no cytotoxicity to RAW macrophages at low concentrations and further studies are being carried out to clarify its pharmacological potential.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors like to express their sincere thanks to Professor José Maria Barbosa Filho, who provided the substance for conducting this research and the Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) that provided financial support to this work.

REFERENCES

1. JONES, D. P. Radical-free biology of oxidative stress. American Journal of Physiology-Cell Physiology, Am Physiological Soc, 2008; 295(4): 849–868.
2. Barreiros, A. L. B. S.; David, J. M.; David, J. P. Quim. Nova, 2006; 29:113.
3. Sousa, C. M. M.; Silva, H. R.; Vieira-Jr, G. M.; Ayres, M. C. C.; Costa, C. L. S. C.; Araujo, D. S.; Cavalcante, L. C. D.; Barros, E. D. S.; Araújo, P. B. M.; Brandão, M. S.; Chaves, M. H. Quim. Nova, 2007; 30: 351.
4. El-Agamey, A.; Lowe, G. M.; McGarvey, D. J.; Mortesen, A.; Phillip, D. M.; Truscott, T. M.; Young, A. J. Arch. Biochem. Biophys, 2004; 37: 430.
5. Omoni, A. O.; Aluko, R. E. Trends Food Sci. Technol, 2005; 16: 344.
6. Valko, M.; Izakovic, M.; Mazur, M.; Rhodes, C. J.; Telser, J. Mol. Cell. Biochem. 2004, 266, 37.
7. SIES, H. Hydroperoxides and thiol oxidants in the study of oxidative stress in intact cells and organs. Oxidative stress, Elsevier, 2013; 73–90,.

8. SANTOS, G. Oliveira EB, Rodrigues CG, Barbosa-Filho JM, Silva EC, Medeiros PL. In-vitro cytotoxicity of milonine isolated from *Cissampelos sympodialis* Eichl (Menispermaceae) on Vero cell line. World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 2019; 8(10): 238-246.
9. AGATI, G., AZZARELLO, E., POLLASTRI, S. & TATTINI, M.. Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. Plant Science, 2012;196: 67- 76.
10. Sroka Z, Cisowski W. Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. Food Chem Toxicol, 2003; 41: 753–8.
11. Galato D, Ckless K, Susin MF et al. Antioxidant capacity of phenolic and related compounds: correlation among electrochemical, visible spectroscopy methods and structure–antioxidant activity. Redox Rep, 2001; 6:243–50.
12. Lu Z, Nie G, Belton PS et al. Structure–activity relationship analysis of antioxidant ability and neuroprotective effect of gallic acid derivatives. Neurochem Int, 2006; 48: 263–74.
13. TANG, Z., YANG, L., ZU, Y. & GUO, X. Variations of vinblastine accumulation and redox state affected by exogenous H₂O₂ in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Plant Growth Regulation, 2009; 57: 15–20.
14. Topal F, Nar M, Gocer H, Kalin P, Kocyigit UM, Gulc I, Alwasel SH. Antioxidant activity of taxifolin: an activity–structure relationship. J Enzyme Inhib Med Chem, 2016; 31(4): 674–683.
15. CASTANEDA, O. A. et al. Macrophages in oxidative stress and models to evaluate the antioxidant function of dietary natural compounds. Journal of Food and Drug Analysis, 2017; 25(1): 111-118.
16. Oliveira EB, Luz JSB, Santos GDM, Barbosa-Filho JM, Araújo RSA, Rodrigues CG, Machado DC4, Silva EC, Medeiros PL. Cytotoxic activity of coumarin derivative on vero and hela cell lines. WJPS, 2020; 9(1): 266-280.

5 CONCLUSÕES

- A milonina apresentou potencial atividade leishmanicida frente às formas promastigotas da *Leishmania (L.) amazonensis* das cepas: MHOM/BR/77/LTB0016 ($IC_{50} = 6,71 \mu M$) e LV79 ($IC_{50} = 3,66 \mu M$);
- A IC_{50} da milonina, independente da cepa utilizada, reduziu consideravelmente o crescimento dos parasitos *in vitro*;
- A milonina foi citotóxica para as células Vero a partir da concentração de $250 \mu M$ e para os macrófagos medulares BALB/c na concentração de $457,5 \mu M$;
- Alterações morfológicas nas células Vero foram observadas com elevadas concentrações de milonina em função de sua toxicidade.
- A milonina apresentou maior capacidade antioxidante, reforçando a eficiência de sua atividade biológica.

6 PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos sugerem, pela primeira vez, que a milonina pode ser utilizada como um promissor protótipo para o desenvolvimento de novas drogas no tratamento da leishmaniose tegumentar.

Neste contexto, temos a intensão de:

- Continuar os estudos para elucidação de prováveis mecanismos de ação da Milonina, ampliando as interfaces de investigação (biológica, química e molecular);
- dar andamento a avaliação morfológica e ultraestrutural das formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* sob ação da milonina, a partir de colaboração firmada com pesquisadores da microscopia eletrônica da UFPE;
- avaliar a atividade leishmanicida da milonina frente outras espécies de *Leishmania*, em função de graus variáveis de sensibilidade da *Leishmania* spp.

REFERÊNCIAS

- ALCOLEA, P. J. et al. Temperature increase prevails over acidification in gene expression modulation of amastigote differentiation in *Leishmania infantum*. **BMC genomics**, v. 14, p. 11-31, 2010.
- ABID, S.; KHAJURIA, A.; PARVAIZ, Q.; SIDIQ, T.; BHATIA, A.; SINGH, S.; AHMAD, S.; RANDHAWA, M. K.; SATTI, N. K.; DUTT, P. Immunomodulatory studies of a bioactive fraction from the fruit of *Prunus cerasus* in BALB/c mice. **International Immunopharmacology**, v. 12, p. 626-634, 2012.
- ALVAR, J et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.
- ALVES, AF. Milonina alcaloide de *Cissampelos sympodialis* EICHL (Menispermaceae) inibe inflamação aguda mediada por mastócitos. 2016. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa – PB.
- ANISZEWSKI, T. Alkaloids – Secrets of Life. 1ed p. 334, 2007.
- ARNOUS, A.H. et. al. Plantas medicinais de uso caseiro – Conhecimento popular e interesse por cultivo comunitário. **Revista Espaço para a Saúde**, v. 6, n. 2, p. 1-6, 2005.
- ASSREUY J, CUNHA FQ, EPPERLEIN M, NORONHA-DUTRA A, O'DONNELL CA, LIEW FY. Production of nitric oxide and superoxide by macrophages and killing of *Leishmania major*. **Eur J immunol** V.24, p. 672-676,1994.
- ATANASOV, A.G.; WALTEBERGER, B.; PFERSCHY-WENZIG, E-M.; et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology advances**. v.33, n.8, p.1582-1614, 2015.
- BARBOSA-FILHO, J. M.; AGRA, M. F.; THOMAS, G. Botanical, chemical and pharmacological investigation on *Cissampelos* species from Paraíba (Brazil). **Ciência e Cultura**, v. 49, p.386-394, 1997.

BARBOSA-FILHO, J. M.; DA CUNHA, E. V. L.; GRAY, A. I. Alkaloids of the menispermaceae. **The Alkaloids: Chemistry and Biology**. Elsevier, v. 54, p. 1-190, 2000.

BERG, J. M. T.; LUBERT, J. (2008), Bioquímica. 6^a. Ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 545p.

BRASIL. Ministério da Saúde. POLÍTICA NACIONAL DE PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS. Brasília: **Editora MS**. 2006.

BRASIL. Manual de Vigilância de Leishmaniose Tegumentar Americana. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília: **Editora MS**, 2^o Ed. Atualizada, 2013.

BRASIL. Manual de Vigilância de Leishmaniose Tegumentar Americana. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília: **Editora MS**. Atualizada, 2017.

BUENO-SANCHEZ, J. G. et al. Actividad antimicrobacteriana de terpenos. **Rev. Univ. Ind. Santander. Salud**, v.41, n.3, p. 231-235, 2009. ISSN 0121-0807.

CAVALCANTE, H. M.M.; RIBEIRO, T. P.; SILVA, D. F.; NUNES, X. P.; BARBOSA-FILHO, J. M.; DINIZ, M. F. F. M. Cardiovascular Effects Elicited by Milonine, a New 8,14- Dihydromorphinandienone Alkaloid. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**. V. 108, n. 2, p. 122-13-, 2010.

CHANG, HUI-CHIU; CHANG, FANG-RONG; WU, YANG-CHANG; LAI, YUNGHSIUNG. Anti-cancer effect of liriodenine on human lung cancer cells. **Kaohsiung J Med Sci** v. 20, n 8. 2004.

CHIOU, Y. L.; LIN, C. Y. The Extract of Cordyceps sinensis Inhibited Airway Inflammation by Blocking NF- κ B Activity. **Inflammation**, v. 35, p. 985-993, 2012.

CHUNG, Y.-M.; CHANG, F.-R.; TSENG, T.-F. et al. A novel alkaloid, aristopyridinone A and anti-inflammatory phenanthrenes isolated from Aristolochia manshuriensis. Bioorganic & **Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, n. 6, p. 1792-1794, 2011.

COLARES AV, FERNANDO AV, ALMEIDA-SOUZA F, TANIWAKI NN, SOUZA CSF, COSTA JGM, et al. *In Vitro* Antileishmanial Activity of Essential Oil of *Vanillosmopsis arborea* (Asteraceae) Baker. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013; 7 pages, 2013.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: IBDF; 1984.

CORREA, P. G. et al. Herbivoria e anatomia foliar em plantas tropicais brasileiras. **Ciências e Cultura**, v. 60, n. 3, p. 54-57, 2008.

COSTA, H. F. et al. Warifteine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid, decreases immediate allergic and thermal hyperalgesic reactions in sensitized animals, **International Immunopharmacology**, v. 8, p. 519-525, 2008.

COSTA FILHO, A. V. et al. Estudo comparativo entre miltefosina oral e antimoniato de N-metil glucamina parenteral no tratamento da leishmaniose experimental causada por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 4, p. 424-427, 2010.

Croft SL, Olliaro P. quimioterapia Leishmaniose - desafios e oportunidades. **Clin Microbiol Infect**. P. 1478-83, 2011.

COLPO, J. F. et al. Potencial inseticida de óleos de origem vegetal sobre *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 2, p. 182-188, 2014.

CORTES, S.F.; ALENCAR, J.L.; THOMAS, G.; BARBOSA-FILHO, J.M. Spasmolytic actions of warifteine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid isolated from the root bark of *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae). **Phytotherapy Research**, v. 9, p. 579-583, 1995.

DE LIRA, G.A.; et al. Roraimine: a bisbenzylisoquinoline alkaloid from *Cissampelos sympodialis* roots. **Fitoterapia**. v.73, n.4, p. 356-358, 2002.

DELORENZI, JC, ATTIAS M, GATTASS CR, ANDRADE M., REZENDE C, PINTO AC, HENRIQUES AT, BOU-HABIB DC, SARAIVA E. Atividade antileishmanial de um alcaloide indol de *Peschiera australis*. *Antimicrob Agents Chemother* 45 : P. 1349-1354, 2001

DORIGONI, P.A.; et al. Levantamento de dados sobre plantas medicinais de uso popular no município de São João do Polêsine, RS, Brasil. I – Relação entre

enfermidades e espécies utilizadas. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. v.4, n.1, p. 69–79, 2001.

FALCÃO, H.S.; LEITE, J.A.; BARBOSA-FILHO, J.M.; ATHAYDE-FILHO, P.F.; CHAVES, M.C.O.; MOURA, M.D.; FERREIRA, A.L.; ALMEIDA, A.B.A.; SOUZA-BRITO, A.R.M.; DINIZ, M.F.F.M.; BATISTA, L.M. Gastric and duodenal antiulcer activity of alkaloids: a review. **Molec** 13: 3198-3223. 2008.

FAULKNER, J.R.; HUSSAINI, S.R.; BLANKENSHIP, J.D.; PAL S.; BRANAN, B.M.; GROSSMAN, R.B.; SCHARDL, C.L. "On the sequence of bond formation in loline alkaloid biosynthesis". **Chembiochem** 7:1078–1088, 2006.

FOGLIO, M.A.; et al. Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. **Multiciência: Construindo a História dos Produtos Naturais**. v.7, 2006.

FREITAS, M. R. et al. Modification of calcium metabolism in rabbit aorta as a mechanism of spasmolytic Action of warifteine, a bisbenzylisoquiniline alkaloid isolated from the leaves of *Cissampelos sympodialis* Eichl. **Journal Pharmacy and Pharmacology**, v.48, p. 335-338, 1996.

FUMAGALI, E. et al. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 627-641, 2008.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quím. Nova.**, v. 30, n. 2, pp. 374-381, 2007. ISSN 0100-4042.

GUEDES, A. C. M. et al. Leishmaniose tegumentar americana: apresentação pouco comum. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 83, n. 5, p. 445-449, 2008.

GUIMARÃES, RODRIGUES. L. et al. Activity of the julocrotine, a glutarimide alkaloid from *Croton pullei* var. *glabior*, on *Leishmania* (L.) *amazonensis*. **Parasitology Research**. V. 107, n.5,p.1075-1081,2010.

HENRIQUE, M. C. Alcaloides indólicos de cascas de *Aspidosperma vargasii* E A. *desmanthum*. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 284-287, 2010.

- HOTEZ N. Control of neglected tropical diseases. *N Engl J Med*.357: 1018–27,2007.
- JUNIOR, C. V. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 390-400, 2003.
- KATE, P; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. **Nature**, v.9, p.604-15, 2011.
- LAURELLA, L. C. *et al.* *In vitro* evaluation of atiprotozoal and activities of extracts from Argentinean Mikania species. **Scientific Wold Journal**, v. 2012, p. 121253, 2012.
- LEITE, FAGNER CARVALHO, 2014. Curine, an Alkaloid Isolated from *Chondrodendron platyphyllum* Inhibits Prostaglandin E2 in Experimental Models of Inflammation and Pain. **Planta Medica**; 80:1072–1078. 2014.
- LESSA, M.M. *et al.* Leishmaniose mucosa: aspectos clínicos e epidemiológicos. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 73, n. 6, p. 843-847.
- LIMA, THALINE F. A.; ROCHA, JULIANA D. B.; GUIMARÃES-COSTA, ANDERSON B.;BARBOSA-FILHO, JOSÉ M.; DECOTÉ-RICARDO, DÉBORA; SARAIVA, ELVIRA M.; ARRUDA, LUCIANA B.; PIUVEZAM, MARCIA R.; PEÇANHA, LIGIA M. T. Warifteine, an Alkaloid Purified from *Cissampelos sympodialis*,inhibits Neutrophil Migration In Vitro and In Vivo. **Journal of Immunology Research** Volume 2014.
- LIRA, G.A.; ANDRADE, L.M.; FLORÊNCIO, K.C.; SILVA, M.S.; BARBOSA-FILHO, J.M.; CUNHA, E.V.L. Roraimine: a bisbenzylisoquinoline alkaloid from *Cissampelos sympodialis* roots. **Fitoterapia**, v. 73, p. 356-358, 2002.
- LOPEZ-GONZALEZ, J. S.; PRADO-GARCIA, H; AGUILAR-CAZARES, D *et al.* Apoptosis and cell cycle disturbances induced by coumarin and 7-hydroxycoumarin on human lung carcinoma cell lines. **Lung Cancer**, v. 43, p. 275-283, 2004.
- LUCH, A. Alkaloids – biological activity. Molecular, clinical and environmental toxicology. **Springer**. ISBN 3-7643-8335-6, 20, 2009.
- MACHADO PR, ROSA MEA, COSTA D, MIGNAC M, SILVA JS, SCHRIEFER A, *et al.* Reappraisal of the immunopathogenesis of disseminated leishmaniasis: *in situ*

and systemic immune response. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 105, p. 438-444, 2011.

MANGUEIRA, L.F.; BRAZ, A.S.; MANGUEIRA, D.B. & DINIZ, M.F.F.M. A Ação do *Cissampelos Sympodialis* Eichl: uma Perspectiva para o Tratamento da Asma. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**. v. 14, n. 2, p. 77-86, 2010.

MARINHO, A.F. Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação da warifteína em extrato de *Cissampelos sympodialis* Eichl (Milona). 2008. 159f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa – PB.

MARINHO, A. F.; BARBOSA-FILHO, J. M., OLIVEIRA, E. J. A validated method for the simultaneous quantitation of bioactive alkaloid markers in the leaf ethanolic extract of *Cissampelos sympodialis* Eichl.: a phenological variation study. **Phytochem Anal.**, v. 23, p.426-32, 2012.

MATOS, F.J.A.. Introdução à fitoquímica experimental. 2º Ed., **Edições UFC**,1997. 141pp. HOTEZ N. Control of neglected tropical diseases. **N Engl J Med**.357: 1018–27,2007.

MCGWIRE, B.s.; SATOSKAR, A.r.. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **Oxford University Press**. USA, p. 7-14. 05 jun. 2013.

MELO, P. S.; CAVALCANTE, H. M.M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; DINIZ, M. F. F. M. MEDEIROA, I. A.; HAUN, M. Warifteine and milonine, alkaloids isolated from *Cissampelos sympodialis* Eichl: cytotoxicology on rat hepatocyte culture and in V79 cells. **Toxicology Lettes**. V. 142, n. 1, p. 143- 151, 2003.

MONTALVO, A. M et al. Diagnóstico de la leishmaniasis: de la observación microscópica del parásito a la detección del ADN. **Revista Cubana de Medicina Tropical [online]**, v. 64, n. 2, p. 108-131, 2012.

MOREIRA, M. E. C.; BARCINSKI, M. A. Apoptotic cell and phagocyte interplay: recognition and consequences in different cell systems. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 1, p. 93-115, 2004.

- MOURA, M.D.; et al. As plantas medicinais nas feiras de saúde da Paraíba. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Science**. v. 37, n. 2, p. 119, 2001.
- NAGLE, A. D. et al. Recent Developments in Drug Discovery for Leishmaniasis and Human African Trypanosomiasis. **Chemical Reviews**, v. 114, p. 11305–11347, 2014.
- NUNES, R.K. Avaliação da atividade tripanocida e leishmanicida de produtos naturais da flora matogrossense. Trabalho de Conclusão de Curso – Centro de Ciências Biológicas – CCB, Universidade Federal de Santa Catarina, 2008.
- OLIVEIRA YLC, SILVA LCN, SILVA AG, MACEDO AJ, ARAUJO JM, CORREIA MTS, et al. Antimicrobial Activity and Phytochemical Screening of *Buchenavia tetraphylla* (Aubl.) R. A. Howard (Combretaceae: Combretaceae). **Sci. World J.** 2012; 2012: 6 pages. doi: 10.1100/2012/849302 PMID: 23365533
- PEREIRA, R. J. Composição centesimal, aspectos fitoquímicos, atividades antioxidante, hipoglicemiante e anti-hiperlipidêmica de frutos do gênero *Syzygium*. 156 p. Tese (doutorado). Universidade Federal de Lavras, 2011.
- POLONIO, T.; EFFERTH, T. Leishmaniasis: drug resistance and natural products (review). **International Journal of Molecular Medicine**. V. 22, n. 3, p. 277-86, 2008.
- RHOADES, D. F. Evolution of Plant Chemical Defense against Herbivores". In ROSENTHAL, G. A., JANZEN, D. H. Herbivores: Their Interaction with Secondary Plant Metabolites. **New York: Academic Press**. p. 41. ISBN 0-12-597180-X, 1979.
- RODRIGUES, A.G. Fitoterapia no Sistema Único de Saúde. **Anais de V Jornada Catarinense e I Jornada Internacional de plantas medicinais**. Joinville, 2006.
- ROSA, M. S. S. et al. Antileishmanial Activity of a Linalool-Rich Essential Oil from *Croton cajucara*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, V. 47, n. 6, p. 1895-1901, 2003.
- SALES, I. R. P.; LIMA, G.R.M.; CALDAS-FILHO, M. R. D.; FALCAO, H. S.; BARBOSA-FILHO, J.M.; BATISTA, L. M. . Gastroprotective effect of *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae): role of sulphydryl compounds and nitric oxide. **Experimental Pathology and Health Sciences - Research, clinics, teaching and society**, 5:130-130, 2011.

SANTIN, M.R. et al. In vitro activity of the essential oil of *Cymbopogon citratus* and its major component (citral) on *Leishmania amazonensis*. **Parasitology Research**, v. 105 (6), p.1489-1496, 2009.

SALGANIK, R. I., 2001. The benefits and hazards of antioxidants: controlling apoptosis and other protective mechanisms in cancer patients and the human population. **Journal of the American College of Nutrition**. v. 20, n. 5, p. 464-472.

SCHENKEL, Eloir Paulo; GOSMANN, Grace; PETROVICK, Pedro Ros. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira (Org.) et al. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5. ed. rev. **ampl. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC**, 2003, cap. 15, p. 371-400.

SHAW JJ, LAINSON R, MCMAHON-PRATT D, DAVID JR. Serodemes of the *Leishmania braziliensis* complex. In: Rioux J (ed) **Leishmania Taxonomie et phylogénèse. Applications éco-épidémiologiques**. Colloque International, IMEEE, Montpellier, pp. 179-183, 1986.

SILVA, E.C. et al. Antileishmanial Activity of Warifteine: A Bisbenzylisoquinoline Alkaloid Isolated from *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae). **The Scientificworld Journal**, p. 1-5, 2012.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. Further observations on clinical, histopathological, and immunological features of borderline disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. v. 5, 2004.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora UFRGS; Florianópolis: Editora UFSC, 6º ed., 1-1102, 2010.

TEXEIRA, D. E. et al. Atlas didático: Ciclo de vida da *Leishmania*. 1º edição. Rio de Janeiro. **Fundação CECIERJ**, Consórcio CECIERJ, 2013.

THOMAS, G.; ARAÚJO, C. C.; AGRA, M. de F.; DINIZ, M. de F. F. - Preliminary studies on the hydroalcoholic extract of the root of *Cissampelos sympodialis* Eichl. in guinea-pig tracheal strips and bronchoalveolar leucocytes. **Phyto Res.** 9473;477, 1995.

UEDA-NAKAMURA, T., et al. Antileishmanial activity of Eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. **Parasitology International**. V. 55, n. 2, p. 99-105, 2006

VALE, E.C.S.; FURTADO, T. Leishmaniose tegumentar no Brasil: revisão histórica da origem, expansão e etiologia. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 80, n. 4, p. 421-428, 2005.

VEIGA, V.F. & MELLO, J.C.P. As monografias sobre plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 18, n. 3 p. 464-71, 2008.

WANG, M. Z., et al. Novel arylimidamides for treatment of visceral leishmaniasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. V. 54,n.6,p.2507-16, 2010.

WILSON, R. PLoS Pathogens Issue Image. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 8, 2009.

WHO. **Meeting of the WHO expert committee on the control of leishmaniasis**. WHO Technical Reports Series 949. Geneva, March 2010.

WHO, 2018. **Status of endemicity of cutaneous leishmaniasis worldwide, 2015**, http://www.who.int/leishmaniasis/burden/Status_of_endemicity_of_CL_worldwide_2015_with_imported_cases.pdf?ua=1&ua=1. Acesso em 04/03/2019.

**APENDICE A- *IN-VITRO* CYTOTOXICITY OF MILONINE ISOLATED FROM
CISSAMPELOS SYMPODIALIS EICHL (MENISPERMACEAE) ON VERO CELL
LINE**



**IN-VITRO CYTOTOXICITY OF MILONINE ISOLATED FROM
CISSAMPELOS SYMPODIALIS EICHL (MENISPERMACEAE) ON
VERO CELL LINE**

**Gleyka D. M. Santos^{1,2*}, Erwelly B. Oliveira^{1,2}, Cláudio G. Rodrigues², José M.
Barbosa-Filho⁴, Eliete C. Silva^{1,2,3} and Paloma L. Medeiros^{1,2,3}**

¹Laboratório de Cultura de Tecidos (LCT) do Departamento de Histologia e Embriologia,
Universidade Federal de Pernambuco, 50.670-901, Cidade Universitária, Recife-PE, Brasil.

²Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de
Pernambuco, 50.670-901, Cidade Universitária, Recife-PE, Brasil.

³Programa de Pós-graduação em Morfotecnologia, Universidade Federal de Pernambuco,
50.670-901, Cidade Universitária, Recife-PE, Brasil.

⁴Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM), Universidade Federal da
Paraíba, Cidade Universitária, 58051900, João Pessoa-PB, Brasil.

Article Received on
13 August 2019,
Revised on 03 Sept. 2019,
Accepted on 23 Sept. 2019,
DOI: 10.20959/wjpps201910-14874

***Corresponding Author**

Gleyka D. M. Santos

Laboratório de Cultura de
Tecidos (LCT) do
Departamento de Histologia
e Embriologia, Universidade
Federal de Pernambuco,
50.670-901, Cidade
Universitária, Recife-PE,
Brasil.

ABSTRACT

The family Menispermaceae is well known for producing various types of alkaloids, especially morphinandienones. Milonine is a morphinandienone alkaloid from *Cissampelos sympodialis* Eichl, a plant popularly used in northeastern Brazil for inflammatory diseases. The aim of this work was to investigate the cytotoxic effect of milonine on Vero cell line. *In vitro* cytotoxicity of milonine in different concentrations (1.95 a 1000 µM) was evaluated by MTT assay. Cell morphological were observed by phase-contrast microscopy. Significant toxicity was determined (CC₅₀ = 300 µM). Morphological changes were noted from 250 µM. The cells changed their spindle-shaped to rounded and wrinkled shapes. Milonine was not toxic to Vero cells at low concentrations and other experiments are being conducted with other cell lines.

KEYWORDS: *Cissampelos sympodialis*, Cytotoxicity *in vitro*, Milonine, Vero cell.

INTRODUCTION

Menispermaceae is a family of seventy genera and distinct 420 species, composed mainly of climbing plants, where many of them are used in the folk medicine. The great majority of the species can be found in countries with a tropical climate.^[1] The genus *Cissampelos* comprises about nineteen species, nine of which occur in Brazil.^[2-4] The specie *Cissampelos sympodialis* Eichl is endemic to Brazil and is found in the Northeast and Southeast, from Ceara to Minas Gerais states.^[5]

In some states of northeastern Brazil, especially in Paraíba, the aqueous infusion of the plant leaves is used for treatment of different respiratory diseases such as asthma and bronchitis, as well as other inflammatory diseases such as arthritis and rheumatic disorders.^[6-8] A bisbenzylisoquinoline alkaloid, warifteine, the major component isolated from the ethanolic extract of *Cissampelos sympodialis*, was found to relax both vascular and nonvascular smooth muscle tissues.^[9]

Milonine, an 8,14-dihydromorphynioneal alkaloid, was isolated and identified according to previously established methodology.^[10] It has been reported that the hypotensive and vasorelaxant effects produced by milonine are mediated by the endothelium, likely via nitric oxide release, activation of nitric oxide-cGMP pathway and opening of K⁺ channels.^[11] The milonine showed anti-inflammatory activity via inhibition of mast cell degranulation.^[12] Cytotoxic studies to compare warifteine and milonine alkaloids *in vitro* were evaluated against hepatocyte and fibroblast cultures, previously treated with cimetidine, and low toxicity was observed with the use of milonine, revealing a cytochrome P450-independent pathway.^[13]

In the present study we evaluated the cytotoxic effect of milonine alkaloid on Vero cell lines and investigated possible modifications in the morphology of these cells.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

The species *Cissampelos sympodialis* (Menispermaceae) is popularly known as “milona”, “jarrinha”, “abuteira” and “orelha-de-onça” (**Figure 1**), and the aqueous fraction of the ethanol extract of its leaves has revealed promising pharmacological actions. The

Menispermaceae family is known by the presence of alkaloids and some studies with this species have shown a considerable amount of phenolic compounds. *C. sympodialis* specimens were primarily collected in the city of Souza, Paraíba, Brazil, and was identified by Dr. Maria de Fátima Agra. A voucher specimen (Agra-1456) was deposited at Herbarium Prof. Lauro Pires Xavier of the Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Brazil.^[14]

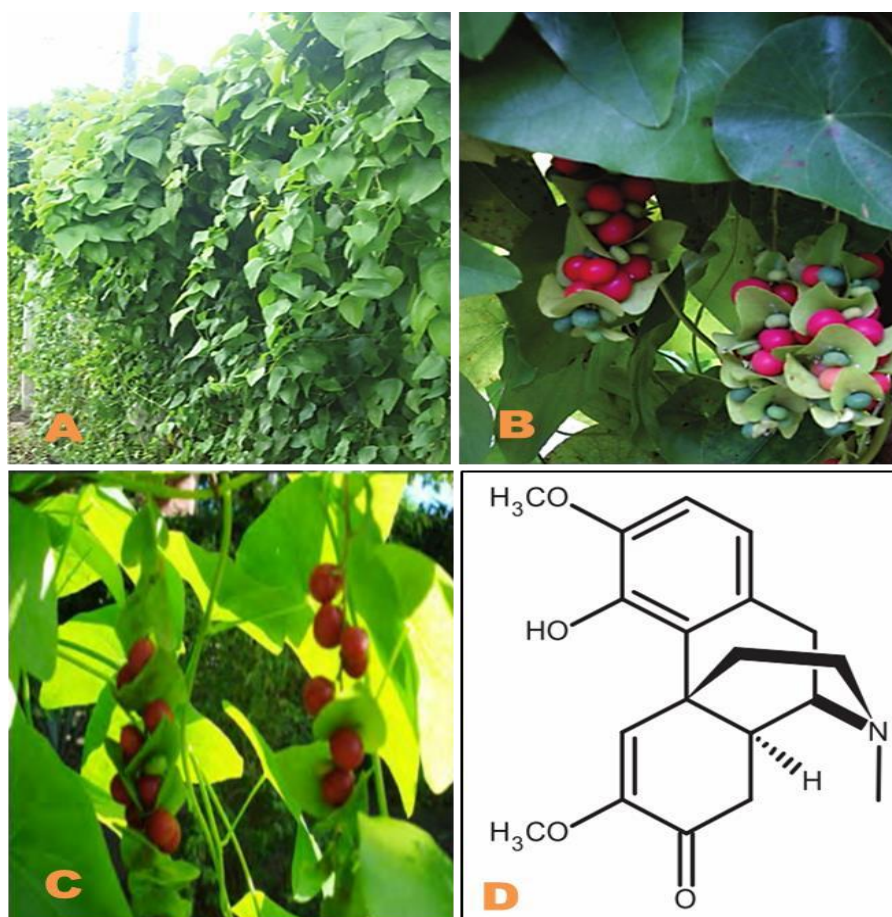


Figure 1: *Cissampelos sympodialis* Eichl (Menispermaceae). A) Adult plant. B and C) detail of deltoids leaves and ripened fruits.^[5] D) Chemical structure of Milonine.^[10]

Milonine

Milonine was provided by Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho from Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM, UFPB), located in João Pessoa, capital of the state of Paraíba, Brazil. The alkaloid was prepared by dissolving 1 mg of the powdered material in 50 μ L of HCl (1 N) and then adding 800 μ L of saline (0.9% NaCl). The pH was adjusted to 7 with sodium hydroxide solution (1 M), and the volume completed to 1000 μ L. The isolation of milonina has been previously described.^[10]

Culture of Vero cells and morphological analysis

Vero cells (kidney fibroblasts from African green monkey) was maintained in the Tissue Culture Laboratory of Histology and Embryology Department (DHE-UFPE, Recife/PE, Brazil), at 37°C in an incubator containing 5% CO₂ and 95% of relative humidity, in DMEM (Sigma[®], St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated FBS (LGC Biotechnology, São Paulo, Brazil), 100 IU penicillin/mL and 100µg/mL streptomycin (Sigma[®], St. Louis, MO, USA, respectively). These cells grown in culture bottles until reached 80-90%. Thereafter, the cells (1×10^5 cell/mL) were transferred to 96-well plates. Morphological changes after the use of milonine were observed at 72 hours. Vero cells were observed by a Leica DMIL inverted phase contrast microscope (Leica microsystems, Wetzlar, Germany) equipped with digital camera (MOTICAM BA 2.000, Campinas, Brazil) and the digital photographs were taken using the Motic Images Plus 2.0 software.

In vitro cytotoxicity activity

Vero cell cytotoxicity was determined by the colorimetric method MTT, that is based on the conversion of the tetrazolium salt into the colored formazan product, the concentration of which can be determined spectrophotometrically.^[15] These cells were seeded (1×10^5 cells/mL) with DMEM medium in 96-well microplates and incubated with 50 µL at different concentrations of milonine (1.95 to 1000µM). Negative control was DMSO. The absorbance was measured by using a multi-well scanning spectrophotometer (SkanIt Software 2.4.5 RE for Varioskan Flash, Thermo Scientific, Massachusetts, USA) at 595nm wavelength. The results were expressed as percentage of relative viability of cell compared to control group. Three independent experiments were performed in triplicate.

Statistical Analysis

All statistical analyses were performed with Origin for Windows (release 8.2, OriginLab, USA). Data from MTT assays were analyzed by ANOVA followed by Tukey's test, with $p < 0.05$. The results were expressed as mean values $\pm$ standard deviation (SD).

RESULTS AND DISCUSSION

In this study, we report for the first time the cytotoxic activity of milonine on Vero cell line. Under effect of milonine, at different concentrations (1.95 to 1000µM), the cell proliferation was not impaired in range of 1.95 to 125µM (detected by MTT-test, after 72 h) and began to decrease from 250µM (**Figure 2**). The CC₅₀ value (concentration of drug required to reduce cell viability by 50%) was determined in 300 µM.

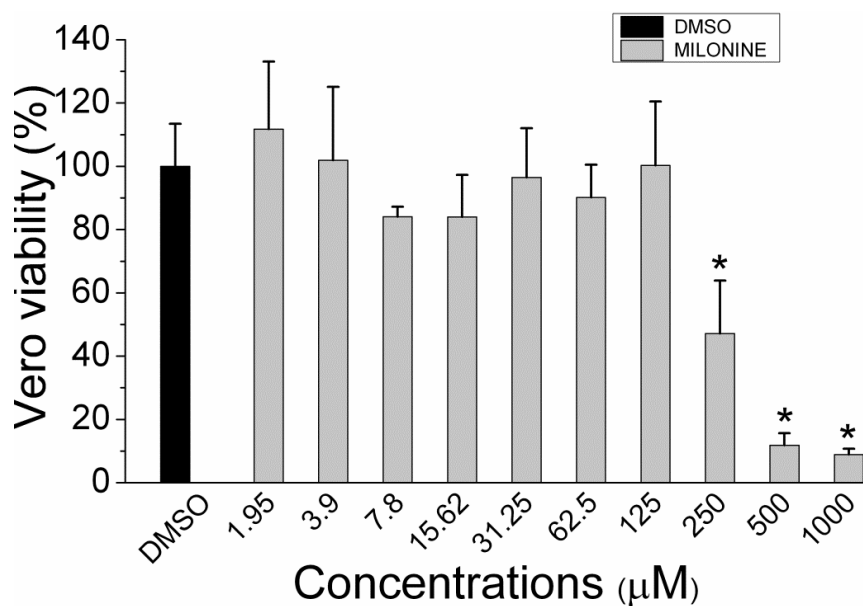


Figure 2: *In vitro* cytotoxic activity of Vero cell line under the effect of Milonina at 72h. Cytotoxic effect (CC_{50}) of milonine was determined at concentrations ranging from 1.95 to 1000 μ M. Statistical analysis of growth differences between treated and control (DMSO) cultures were performed using the ANOVA followed by Tukey's test ($p < 0.05$). The results were expressed as mean values $\pm$ standard deviation (SD). Three independent experiments were performed in triplicate.

Cytotoxicity activity has recently been demonstrated for several other plant-derived bisbenzylisoquinoline alkaloids under investigation as potential antiplasmodial and antiamoebic agents. In general, they were found to be more toxic to *P. falciparum* than to mammalian cells.^[16,17] Cytotoxic studies carried out in KB cell line showed that none of the 24 bisbenzylisoquinoline alkaloids tested exhibited cytotoxicity against this cell line, the most toxic being berbamine.^[16] In this same study it was found that the warifteine had similar cytotoxic effects on V79 cells and hepatocytes, when compared with berbamine on KB cell line. In the investigated models, using V79 cells the milonine alkaloid was less toxic than warifteine (IC_{50} of 290 and 35 μ M, respectively) and also showed slighter toxicity in hepatocytes cultured (IC_{50} around 300 and 400 μ M) compared to warifteine ($IC_{50} = 10 \mu$ M).

Morphological alteration of Vero cells lines upon exposure using milonine was observed under phase contrast microscope (**Figure 3**). At high concentration (250 μ M), the cells were retracted, with the presence of spacing between them. At highest concentration (500 and 1000 μ M) the cells became rounder, shrunk and showed signs of detachment from the surface of the wells denoting cell death.

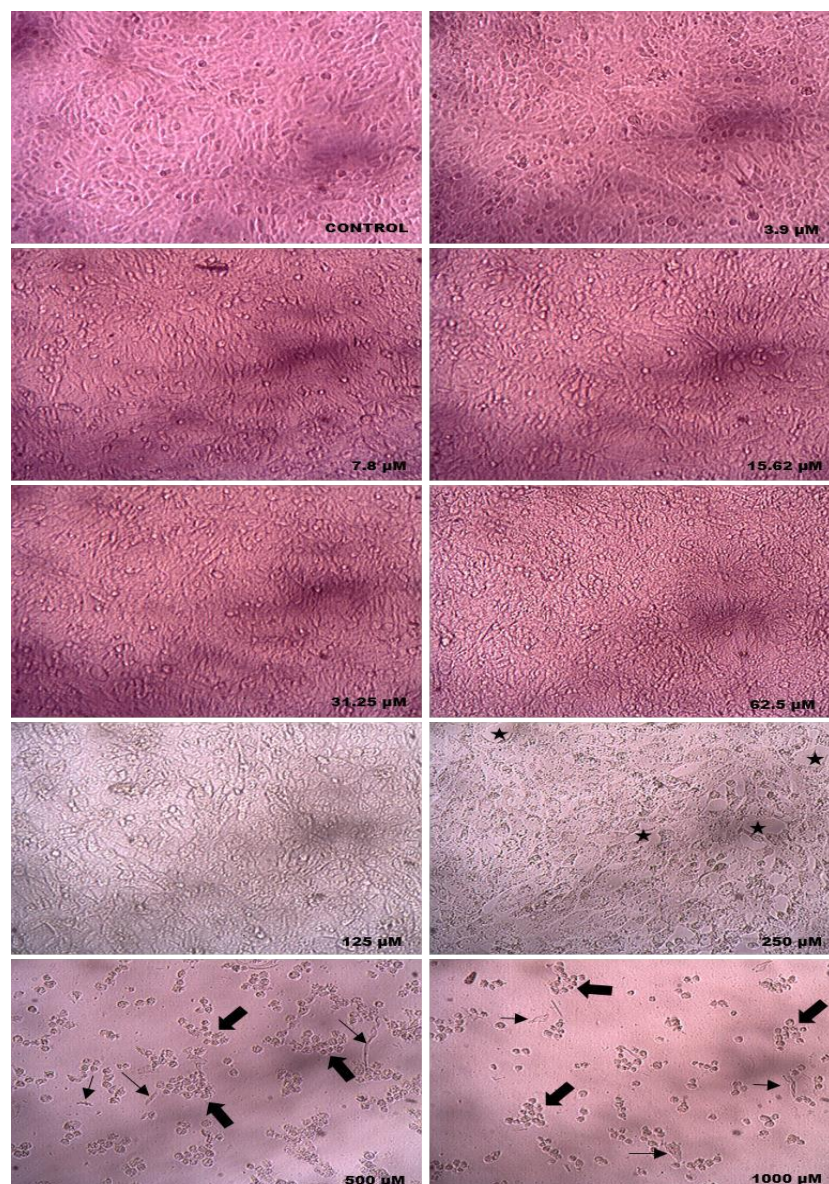


Figure 3: Photomicrographs of Vero cells treated in different concentrations of milonine (1.95 to 1000 μ M) and control group (DMSO). At concentrations from 1.95 to 125 μ M, cells grown in monolayers adhered to the culture plate (similar to the control). Cytoplasmic retractions and appearance of cell spacing (asterisks) were observed with 250 μ M. At the highest concentrations (500 to 1000 μ M), the following aspects were observed: decreased cell density, presence of rounded and clustered cells (wide arrows) and cellular debris (thin arrows). (Magnitude of the images: 200 $\times$).

In vitro cytotoxicity assay generally uses established cell lines and changes in cell morphology patterns are usually evaluated. Vero cells come from the kidney of the African green monkey (*Cercopithecus aethiops*) are considered homologous to human body cells, being easily maintained *in vitro* cultures.^[18]

At the highest concentrations (500 to 1000 μ M) of milonine were observed considerable changes in morphology, the cells became rounder, shrunk and showed signs of detachment from the surface of the wells denoting cell death. The data obtained in this study may be associated to the deleterious damage of reactive oxygen species (ROS), responsible for causing cell alterations may lead to programmed cell death.^[19]

Although alkaloids have shown important pharmacological effects, there is no information on the effects of milonine on different systems of the human body.

CONCLUSION

Milonine was not toxic to Vero cells line and studies are being conducted to clarify its pharmacological potential.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors like to express their sincere thanks to Professor José Maria Barbosa Filho, who provided the substance for conducting this research and the Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) that provided financial support to this work.

REFERENCES

1. Jahan R, Khatun A, Nahar N, Jahan FI, Choowdhury AR, Nahar A, Seraj S, Mahal MJ, Khatun Z, Rahmatullah M. Use of Menispermaceae family in folk medicine of Bangladesh. *Adv in Nat Appl Sci*, 2010; 4: 1-9.
2. Rhodes DG. A revision of the genus *Cissampelos*. *Phytologia*, 1975; 30: 415-484.
3. Jacques FMB, Bertolino P. Molecular and morphological phylogeny of Menispermaceae (Ranunculales). *Plant Syst Evol*, 2008; 274: 83-97.
4. Stevens PF et al. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Bot J Linn Soc*, 2016; 181: 1–20.
5. Cavalcanti AC, Melo ICAR, Medeiros AFD, Neves MVM, Pereira AN, Oliveira EJ. Studies with *Cissampelos sympodialis*: the search towards the scientific validation of a traditional Brazilian medicine used for the treatment of asthma. *Rev Bras Farmacogn*, 2013; 23(3): 527-541.
6. Barbosa-Filho JM, Agra MDF, Thomas G. Botanical, chemical and pharmacological investigation on *Cissampelos* species from Paraíba (Brazil). *Journal Braz Assoc Advanc Sci*, 1997; 49: 386-394.
7. Barbosa-Filho JM, Piuvezam MR, Moura MD, Silva MS, Lima KVB, da-Cunha EVL,

- Fechine IM, Takemura OS. Anti-inflammatory activity of alkaloids: a twentycentury review. *Rev Bras Farmacogn*, 2006; 16: 109-139.
8. Agra MF, Freitas PF, Barbosa-Filho JM. 2007. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Rev Bras Farmacogn*, 2007; 17: 114-140.
 9. Freitas MR, Cortes SF, Thomas G, Barbosa-Filho JM. Modification of calcium metabolism in the rabbit aorta as a mechanism of spasmolytic action of Warifteine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid isolated from the leaves of *Cissampelos sympodialis* Eichl. *J Pharm Pharmacol*, 1996; 48: 335-338.
 10. Freitas MR. Milonine, an 8,14- dihydromorphinandienone alkaloid from leaves of *C. sympodialis*. *Phytochemistry*, 1995; 40: 1553-5.
 11. Cavalcante HMM, Ribeiro TP, Silva DF, Nunes XP, Barbosa-filho JM, Diniz FFM. Cardiovascular Effects Elicited by Milonine, a New 8,14- Dihydromorphinandienone Alkaloid. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2010; 108(2): 122-130.
 12. Alves AF. Milonina alcalóide de *Cissampelos sympodialis* Eichl (Menispermaceae) inibe inflamação aguda mediada por mastócitos. 2016. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB, Brasil.
 13. Melo PS, Cavalcante HMM, Barbosa-filho JM, Diniz MFFM, Medeiros AIA, Haun M. Warifteine and milonine, alkaloids isolated from *Cissampelos sympodialis* Eichl: cytotoxicology on rat hepatocyte culture and in V79 cells. *Toxicology Lettes*, 2003; 142(1): 143- 151.
 14. Barbosa-filho JM, Agra MF, Thomas G. Botanical, chemical and pharmacological investigation on *Cissampelos* species from Paraíba (Brazil). *Ciência e Cultura*, 1997; 49: 386- 394.
 15. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferat. *J Immunol Methods*, 1983; 65: 55-63.
 16. Marshall SJ, Russell PF, Wright CW, Anderson MM, Phillipson JD, Kirby GC, Warhurst DC, Schiff PL. *In vitro* antiplasmodial, antiamoebic and cytotoxic activities of a series of bisbenzylisoquinoline alkaloids. *Antimicrob Agents Chemother*, 1994; 38: 96-103.
 17. Pang L, Hoult JRS. Cytotoxicity to macrophages of tetrandrine, an antislucosis alkaloid, accompanied by an over production of prostaglandins. *Biochem Pharmacol*, 1997; 53: 773- 782.
 18. Liao TT, Shi YL, Jia JW, Wang L. Sensitivity of morphological change of Vero cells exposed to lipophilic compounds and its mechanism. *J Hazard Mater*, 2010; 179: 1055-64.

19. Salganik RI. The benefits and hazards of antioxidants: controlling apoptosis and other protective mechanisms in cancer patients and the human population. J Am Coll Nutr, 2001; 20(5): 464-472.