



EFEITOS DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO SECO DE FLORES DE TAGETES ERECTA LINN NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA INATA

Carlos Rafael Vaz, Larissa Benvenutti, Fernanda Goldoni, Gustavo Santin Schneiker, Gabriel Antunes Rosa, Louise Garcia, Nara Lins Meira Quintao, José Roberto Santin

Área: Fitoquímica, Biotecnologia e Farmacologia de Plantas Mediciniais

Introdução: A *Tagetes erecta* L. é conhecida popularmente como cravo-de-defunto, usada como fonte de corantes naturais e produtos bioativos (1). Essa espécie é cultivada em jardins e praças públicas. É uma erva robusta que tem sido utilizada para o tratamento de uma grande variedade de doenças, como distúrbios gastrointestinais, hipertensão, problemas renais, cicatrização de feridas, problemas inflamatórios de pele e reumatismo (2). Estudos fitoquímicos preliminares demonstraram nessa espécie a presença de carotenoides, flavonoides e ácido salicílico que indicam um possível potencial efeito anti-inflamatório para o extrato das flores de *T. erecta* (3). O processo inflamatório resulta em alterações fisiológicas com o objetivo de restaurar o tecido lesionado e manter a homeostase geral do organismo. Todo esse processo é mediado por citocinas e mediadores, como o óxido nítrico, a histamina, fatores de ativação plaquetária e metabólitos do ácido araquidônico como as prostaglandinas (4). Para que ocorra o retorno da homeostasia tecidual, é necessário que se efetive a apoptose de neutrófilos e a eferocitose destes por macrófagos. Os macrófagos ativados realizam a fagocitose de células apoptóticas residentes do tecido, e provocam a liberação de fatores de crescimento, que são essenciais para o reparo tecidual e para a finalização do processo inflamatório (5). A luteína, um dos carotenoides presentes no extrato, pode influenciar na diminuição da inflamação inativando a via NF- κ B (6), e os polifenóis exercem efeitos protetores contra os danos induzidos por radicais livres in vitro. Esses mecanismos estão envolvidos no processo inflamatório podendo, assim, o extrato de flores de *T. erecta* ter potencial uso terapêutico para essa condição.

Objetivos: Investigar o efeito anti-inflamatório do extrato seco de flores de *T. erecta* sobre a inflamação, e os mecanismos envolvidos na inibição da migração e secreção de mediadores inflamatórios de neutrófilos e macrófagos.

Metodologia: O extrato seco de flores de *T. erecta* foi obtido comercialmente pela Hanzhong TRG Biotech® sob o Lote n. CH5210227. A linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7 foi obtida no Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Os neutrófilos murinos foram obtidos a partir de camundongos swiss utilizando a metodologia de glicogênio de ostra. O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Vale do Itajaí sob o parecer 031/21. A atividade anti-inflamatória foi primeiramente investigada utilizando modelos in vitro para avaliar a expressão de mediadores inflamatórios óxido nítrico, TNF, IL-6 e IL-1 β no sobrenadante das culturas celular de neutrófilos e de macrófagos previamente tratados com extrato nas concentrações de 1, 10 ou 100 μ g/mL estimulados, ou não, com lipopolissacarídeo (5 μ g/mL). O óxido nítrico foi quantificado de forma indireta por meio da reação de Griess (7). Os níveis de TNF, IL-6 e IL-1 β foram mensurados pelo método de ELISA (R &



D Systems - DuoSet®). A quimiotaxia de neutrófilos frente ao fMLP foi realizada empregando o teste de quimiotaxia em ágar gel pela técnica adaptada de Nelson, Quie e Simmons (8). As propriedades de resolução do processo inflamatório foram avaliadas empregando o método de eferocitose. A atividade anti-inflamatória in vivo foi investigada por meio do modelo de bolsa de ar, utilizando como agente flogístico carragenina, administrada no tecido subcutâneo de camundongos swiss machos tratados via oral com o extrato nas doses de 30, 100 ou 300 mg/kg (9). Do lavado do infiltrado inflamatório foi realizada a quantificação de leucócitos totais, a mensuração de proteínas totais pelo kit Pierce BCA Protein Assay (Thermoscientific®). E os níveis de TNF e IL-1 β pelo método de ELISA, de acordo com as instruções do Fabricante (R&D Systems - DuoSet®).

Resultados: Na avaliação do efeito citotóxico do extrato de flores de *T. erecta* sobre neutrófilos murinos, os resultados obtidos demonstraram que o tratamento in vitro, nas concentrações de 1, 10 ou 100 $\mu\text{g/mL}$, não apresentam efeitos citotóxicos para as células testadas. A dosagem de nitrito do sobrenadante do cultivo celular demonstrou que o tratamento com o extrato na concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$ não é capaz de reduzir os seus níveis quando comparado com o controle LPS. No entanto, as demais concentrações de 10 ou 100 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram uma redução significativa da dosagem de nitrito em ambas as células testadas. Os dados obtidos demonstram que o extrato reduziu a produção de IL-6, IL-1 β e TNF no tratamento na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ em macrófagos e neutrófilos estimulados por LPS. No teste de quimiotaxia, observou-se uma redução na cinética neutrofílica nas concentrações de 10 ou 100 $\mu\text{g/mL}$, sugerindo que o extrato possui a capacidade de alterar o processo de migração de neutrófilos em direção ao agente quimioatraente fMLP nessas concentrações. No modelo de eferocitose in vitro, o resultado obtido demonstrou que os grupos tratados com o extrato nas concentrações de 1, 10 ou 100 $\mu\text{g/mL}$ foram capazes de aumentar o processo de eferocitose. No sobrenadante do ensaio de eferocitose foram determinadas as concentrações de TNF e IL-10, ambas foram dosadas no sobrenadante da cultura das células tratadas na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$, durante a junção dos dois diferentes tipos celulares. Os dados obtidos demonstraram que, quando comparado com o grupo basal, houve a redução da concentração de TNF e aumento de IL-10. Os efeitos do extrato sobre a migração de neutrófilos in vivo demonstra que, ao se comparar com o controle (carragenina 1%), os tratamentos nas doses de 30, 100 ou 300 mg/kg diminuíram a migração de leucócitos totais para o foco inflamatório, reduziram a concentração de proteínas totais nos lavados do infiltrado inflamatório de todas as concentrações testadas e redução da concentração de TNF e de IL-1 β nos lavados do infiltrado inflamatório dos grupos tratados na dose de 30 mg/kg.

Considerações finais: Em conjunto, os dados obtidos demonstram que o extrato hidroalcoólico seco de flores de *T. erecta* apresenta importante efeito anti-inflamatório, devido à sua atividade inibitória sobre a migração de neutrófilos e na liberação de mediadores químicos, além de promover a eferocitose, evento-chave na resolução da inflamação.



Financiamento ou apoio: UNIVALI, CAPES, FAPESC.

Referências

1) PICCAGLIA, R.; MAROTTI, M.; GRANDI, S. Lutein and lutein ester contente in diferent types of Tagetes patula and T. erecta. Industrial Crops And Products, v. 8, n.1, p. 45-51,1998. 2) MOLLIK, A. H. et al. A Comparative Analysis of Medicinal Plants Used by Folk Medicinal Healers in Three Districts of Bangladesh and Inquiry as to Mode of Selection of Medicinal Plants. Ethnobotany Journal. Bangladesh, p. 195-218. 2010. 3) DEVIKA, R.; KOILPILLAI, J. Column Chromatographic Separation Of Bioactive Compounds From Tagetes Erecta Linn. International Journal Of Pharmaceutical Sciences And Research, v. 6, n. 2, p. 762-766, 2015. 4) MEDZHITOV, R. The spectrum of inflammatory responses. Science, v. 374, n. 6571, p. 70-1075, 2021. 5) ORTEGA-GÓMEZ, A.; PERRETTI, M.; SOEHNLEIN, O. Resolution of inflammation: an integrated view. Embo Molecular Medicine, v. 5, n. 5, p. 661-674, 2013. 6) KAULMANN, A.; BOHN, T. Carotenoids, inflammation, and oxidative stress—implications of cellular signaling pathways and relation to chronic disease prevention. Nutrition Research, v. 34, n. 11, p. 907-929, 2014. 7) GREEN, L. C. et al. Analysis of Nitrate, Nitrite, and [15N] Nitrate in Biological Fluids. Analytical biochemistry, v. 126, n. 13, p. 1-138, 1982. 8) NELSON, R. D.; QUIE, P. G.; SIMMONS, R. L. Chemotaxis under agarose: a new and simple method for measuring chemotaxis and spontaneous migration of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes. Journal of Immunology, v. 115, n. 6, p.1650-1656, 1975.