



## **EFEITOS DAS FRAÇÕES E SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE *Eugenia mattosii* D. SOBRE MACRÓFAGOS RAW 264.7**

*Roberta Nunes, Larissa Benvenutti, Giovana Vechi, Valdir Cechinel Filho, Nara Lins Meira Quintao, José Roberto Santin*

Área: Fitoquímica, Biotecnologia e Farmacologia de Plantas Medicinais

**Introdução:** A inflamação é a resposta primária a uma infecção ou lesão no organismo e possui importante papel de remover o material lesivo (ou o agente) e promover a reparação tecidual. É caracterizada pela liberação de uma série de mediadores que regulam o aumento da permeabilidade vascular e o recrutamento de leucócitos para o local da lesão (1). Uma das principais células ativadas nesse processo são os macrófagos, os quais são células residentes que, após ativados, produzem uma ampla gama de citocinas, quimiocinas e mediadores químicos que promovem a inflamação (2). O óxido nítrico (NO) secretado pelos macrófagos é um agente citotóxico pró-inflamatório importante que protege o hospedeiro de vários patógenos, inativando e destruindo agentes infecciosos. Contudo, a produção exacerbada pode lesar células saudáveis vizinhas, sendo este mecanismo responsável pela maioria dos processos inflamatórios e autoimunes (2). Apesar dos múltiplos recursos disponíveis atualmente para o tratamento de processos inflamatórios e dolorosos, como acupuntura, técnicas de neuro estimulação e bloqueios anestésicos, a terapia farmacológica ainda é o grande suporte para o tratamento dessas condições clínicas. No entanto, sempre há preocupações em relação aos efeitos adversos que esses fármacos podem gerar, como danos gastrointestinais, renais e cardiovasculares (3; 4). Os produtos naturais (PNs) são uma fonte viável de protótipos e possíveis fármacos e vêm contribuindo para a prevenção ou tratamento das mais variadas patologias. A utilização de PNs é relevante, pois permite avaliar atividades farmacológicas em extratos padronizados, visando a validar o seu uso popular e oferecer maior segurança quanto ao uso terapêutico (5). A espécie *Eugenia mattosii*, popularmente conhecida no Brasil como “cerejinha”, pertence a um gênero importante da família Myrtaceae, conhecida pela diversidade de substâncias bioativas, utilizadas na medicina tradicional para curar diferentes tipos de doenças. Vários estudos já demonstraram atividade antiparasitária (6); gastroprotetiva (7); anti-acetilcolinesterase (8), vasorrelaxante (9); antinociceptiva, antiproliferativa e antimicoplasmática (6). Nesse contexto, estudos que esclareçam o papel da *E. mattosii* sobre os mecanismos envolvidos nos processos inflamatórios são de grande importância, visto que esta condição está presente em boa parte das doenças agudas e crônicas.

**Objetivos:** O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos *in vitro* das frações de clorofórmio (FCL) e acetato de etila (FAE) do extrato das folhas de *E. mattosii* sobre macrófagos RAW 264.7, além dos compostos pinostrobin e cryptostrobin.

**Metodologia:** A linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7 foi adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e mantida em meio DMEM suplementado 10% de SFB (Soro fetal bovino), 100 µg/L de estreptomicina e 100 IU/mL



de penicilina a 37°C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. Para avaliar um potencial efeito citotóxico, a viabilidade celular foi realizada pela técnica de redução do Sal de Tetrazolium (MTT). As culturas celulares de RAW 264.7 foram mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>, plaqueadas em microplacas de 96 poços e mantidas a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Após duas horas, 10 µL de FCL, FAE (1, 10 e 100 µg/mL) e pinostrobin e cryptostrobin (0,1, 1, 10 µg/mL) foram adicionados. Como controle positivo e negativo de citotoxicidade, foram empregados DMSO a 10% e meio DMEM, respectivamente. Após 21 horas de incubação a 37°C com 5% CO<sub>2</sub>, foi adicionado 10 µL de MTT (5 mg/mL) e a placa mantida mais três horas em estufa a 37°C e com 5% CO<sub>2</sub>. Ao término desse período, o sobrenadante foi retirado, e para a dissolução dos cristais formados pela redução do MTT foi adicionado 100 µL de DMSO. A densidade óptica de cada poço foi determinada em espectrofotômetro de microplacas em 570 nm. Após 24 horas de incubação, os macrófagos foram tratados com FCL, FAE (1, 10 e 100 µg/mL) e pinostrobin e cryptostrobin (0,1, 1, 10 e 100 µg/mL), juntamente com LPS (1 µg/mL) por 24 horas. Após esse período, o sobrenadante da cultura de macrófagos foi coletado. A determinação dos níveis de NO, IL-6 e IL-1β no sobrenadante da cultura de macrófagos tratados com FCL, FAE (1, 10 e 100 µg/mL) e pinostrobin e cryptostrobin (0,1, 1 e 10 µg/mL) foi mensurado por meio do método de Griess e ELISA. A análise dos dados foi realizada por meio da variância com comparações múltiplas (ANOVA) e, quando necessário, foram utilizados como pós-teste o Teste de Dunnett. Os dados foram analisados no programa GraphPad Prism 8®, admitindo como significativamente estatístico o  $p < 0,05$ .

**Resultados:** A fim de certificarmos que essas frações e compostos provenientes da *E. mattossi* não são citotóxicos para macrófagos, o ensaio de viabilidade celular (MTT) foi realizado. Os resultados obtidos mostram que os tratamentos não promovem citotoxicidade em macrófagos murinos RAW 264.7. Em relação à produção de NO por essas células, os resultados obtidos demonstram que macrófagos tratados com FCL e FAE (1, 10 e 100 µg/mL) e os compostos pinostrobin e cryptostrobin (0,1, 1 e 10 µg/mL) diminuíram a produção de NO. Esses resultados são importantes para elucidar o efeito anti-inflamatório, pois durante o processo inflamatório, há uma estimulação excessiva da atividade da NADPH oxidase por citocinas e outros agentes, que leva a expressão da iNOS. A iNOS sintetiza o NO que tem um papel multifacetado nas reações inflamatórias, desde o aumento da vasodilatação até a formação de edema, por meio da regulação da atividade dos leucócitos (10). A secreção de IL-6 e IL-1β por macrófagos tratados com FCL e FAE (1, 10 e 100 µg/mL) e os compostos pinostrobin e cryptostrobin (0,1; 1 e 10 µg/mL) também diminuíram. As citocinas IL-1β e IL-6 são importantes marcadores de indução da resposta inflamatória, associada à infecção aguda. A diminuição dos níveis dessas citocinas é importante para a diminuição da migração celular e de produção de mais citocinas inflamatórias (11).

**Considerações finais:** O estudo de produtos naturais é importante para conhecer o real potencial terapêutico desses produtos e sua atividade protetora contra doenças inflamatórias. A *E. matosii* é uma planta brasileira que apresenta atividades farmacológicas pouco documentadas. O presente estudo demonstra resultados



preliminares da atividade anti-inflamatória em macrófagos exercida pelas frações e compostos da *E. matosii*. As perspectivas futuras do estudo incluem avaliar outros efeitos anti-inflamatórios da planta em funções de neutrófilos.

*Financiamento ou apoio:* UNIVALI, CAPES.

### **Referências**

- 1) CHEN, K.; KOLLS, J. K. T cell-mediated host immune defenses in the lung. Annual Review of Immunology, 2013.
- 2) XUE, Q. et al. Regulation of iNOS on Immune Cells and Its Role diseases. International Journal of Molecular Sciences, v. 19, n. 3805, 2018.
- 3) BENFARI, R. N. Management of the Patient with Chronic Pain. Critical Care Nursing Clinics North America, v. 27, n. 1, p. 121-127, 2015.
- 4) RONCHETTI, S.; MIGLIORATI, G.; DELFINO, D. V. Association of inflammatory mediators with pain perception. Biomedicine and Pharmacotherapy, v. 96, p. 1445-1452, 2017.
- 5) CRAGG, M. G.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J.; New horizons for old drugs and drugs leads. Journal of natural products, v. 77, n. 3, p. 703-723, 2014.
- 6) VECHI, G. et al. Antiparasitic activity of two Brazilian plants: *Eugenia matosii* and *Marlierea eugeniopsoides*. Natural products Research, v. 35, 2021.
- 7) DOS SANTOS, L. et al. Phytochemical profile and gastroprotective activity of *Eugenia matosii* fruits. Arquivos de Gastroenterologia, 2018.
- 8) TENFEN, A. et al. Phenolic profile by HPLC-ESI-MS/MS of six Brazilian *Eugenia* species and their potential as cholinesterase inhibitors. Natural Product Research, 2021.
- 9) VECHI, G. et al. Mechanisms underlying *Eugenia matosii* D. Legrand leaves extract, fractions and compounds induce relaxation of the aorta from normotensive and hypertensive rats. 3 biotech, 2019.
- 10) TRIPATHI, P.; TRIPATHI, P.; KASHYAP, L.; SINGH, V. The role of nitric oxide in inflammatory reactions. FEMS Immunol Med Microbiol, n. 51, p. 443-452, 2007.
- 11) BARTEKOVA, M.; RODOSINSKA, J.; JELEMENSKY, M.; DHALLA, N. S. Role of cytokines and inflammation in heart function during health and disease. Heart Failure Reviews, v. 23, n. 5, p. 733-758, 2018.