



<http://www.seer.ufms.br/index.php/pecibes/index>

*Autor correspondente:
Diana Figueiredo Santana Aquino, Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul - UEMS.
E-mail do autor:
di_fsa@yahoo.com.br

Palavras-chave:
Carragenina. Inflamação. Edema de pata. *Alibertia edulis*. Rubiaceae.

Key-words: *Carrageenan*. *Inflammation*. *Paw oedema*. *Alibertia edulis*. *Rubiaceae*.

Cicatrização de feridas e efeitos anti-inflamatórios do extrato aquoso de *Alibertia edulis* em camundongos

Wound healing and anti-inflammatory effects of the aqueous extract of *Alibertia edulis* in mice

Diana Figueiredo Santana Aquino¹, Lidiani Figueiredo Santana², Cassiano Aparecido Gimenez de Aquino³, Flávio Tondati Ferreira⁴, Claudia Andrea de Lima Cardoso¹, Maria do Carmo Vieira³, Candida Aparecida Leite Kassuya³.

¹Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil.

²Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

³Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil.

⁴Secretaria Municipal de Saúde de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

Resumo

Alibertia edulis (Rubiaceae) é conhecida como "marmelo-bola". As raízes são utilizadas na medicina popular no Cerrado brasileiro como anti-inflamatório, hipotensor, diurético, calmante e hipoglicêmico. No entanto, não há estudo para confirmar essa propriedade terapêutica. Este estudo avaliou as propriedades anti-inflamatórias e cicatrizantes do extrato aquoso das folhas de *A. edulis* (AEAE) nos modelos de inflamação de edema de pata e pleurisia e excisão na cicatrização de feridas em camundongos. O tratamento com 20 e 40µg/lesão AEAE reduziu 30 ± 3% das lesões, enquanto o iruxol reduziu 22±2% das lesões. No edema de pata, 2 h após a injeção de carragenina, as doses de 200 e 400 mg/kg de AEAE reduziram significativamente a inflamação em 41±6% e 43±5%, respectivamente, enquanto a dexametasona (1 mg/kg), reduziu 85±6%. A dose de 200 mg/kg de AEAE reduziu significativamente a migração de leucócitos e a exsudação de proteínas com inibição de 76±4% e 34±3%, respectivamente. O presente estudo mostra que as folhas de *A. edulis* exercem atividades anti-edematogênicas, anti-inflamatória e cicatrizante, corroborando, pelo menos em parte, com a indicação etnofarmacológica como medicamento anti-inflamatório na medicina popular.

Abstract

Alibertia edulis (Rubiaceae) is known as "marmelo-bola". The roots are used in popular medicine in the Cerrado of Brazil as anti-inflammatory, hipotensor, diuretic, calmative and hipoglycemic. However, there's no study to confirm this therapeutic property. This study evaluated its anti-inflammatory and wound healing properties of the aqueous extract from the leaves of *A. edulis* (AEAE) in the inflammation models of paw oedema and pleurisy, and wound healing excisional in mice. Treatment with 20 and 40µg/injury AEAE reduced 30±3% of the lesions while the iruxol reduced 22±2% of the lesions. In the paw oedema, 2 h after carrageenan injection, the doses of 200 and 400 mg/kg of AEAE significantly reduced the inflammation in 41±6%, and 43±5%, respectively, while dexamethasone (1 mg/kg), reduced 85±6%. The dose of 200 mg/kg of AEAE significantly reduced the leukocyte migration and protein exudation with inhibition of 76±4% and 34±3%, respectively. The present study shows that *A. edulis* leaves exerts anti-oedematogenic, anti-inflammatory and wound healing activities corroborating, at least in part, with the ethnopharmacological indication as anti-inflammatory remedy in the folk medicine.

1. Introdução

O processo inflamatório é descrito como uma resposta do organismo com o objetivo de erradicar o agressor ou agente como microrganismos, queimaduras, traumas físicos ou células tumorais (Martins, 2010; Pioneiro, 2010) e promover a reparação dos tecidos.

A inflamação é considerada um processo biológico crítico e contribui para a compreensão de quase todos os aspectos fisiológicos das doenças (Chung et al., 2011). A inflamação crônica é reconhecida como causa ou consequência de várias doenças humanas, estando presente em qualquer evento que promova a lesão celular como indutora da resposta inflamatória e contribua para a patogênese das doenças inflamatórias crônicas (Martins, 2010).

Durante tal processo os leucócitos do sangue circulante são atraídos para o local lesionado e são estimulados por mediadores inflamatórios caracterizando assim, a fase aguda da inflamação (Bold et al., 1995). Esta série de eventos relaciona-se evoluem para a regeneração celular e posterior recuperação do local lesado sensibilizando o sistema imunológico. Essa ativação induz imunidade inata no tecido saudável sempre que ele for lesado novamente (Sloane et al., 2010).

Em algumas condições fisiopatológicas, a resposta inflamatória pode ser quantitativa e/ou qualitativamente excessiva. Dessa forma, intervenções clínicas são necessárias para diminuir essa resposta inflamatória com a administração de medicamentos anti-inflamatórios (Simons et al., 1979). Na clínica, os anti-inflamatórios esteroidais e não esteroidais são amplamente utilizados na prática e estão associados a um grande espectro de efeitos tóxicos, devido à inibição não seletiva da ciclooxigenase (Silverstein et al., 2000). A descoberta de novos compostos anti-inflamatórios, especialmente de origem natural, tem proporcionado o uso clínico dessas substâncias por terem menos efeitos adversos em comparação aos anti-inflamatórios utilizados na alopatia (Foglio et al., 2006).

Alibertia edulis (Rubiaceae) é uma planta brasileira popularmente conhecida como marmelo-bola ou marmelo do cerrado, sendo comumente encontrada no Cerrado brasileiro. As folhas são consideradas anti-inflamatórias, diuréticas, hipoglicemiantes, hipotensora e calmante (Menegati et al., 2016; Aquino et al., 2017; Aquino et al., 2020). A literatura mostra que a família Rubiaceae possui poucos estudos farmacológicos e perfis toxicológicos. A espécie mais estudada desta família é a *Alibertia* sendo comumente usada para o tratamento de doenças cardiovasculares, infecções urinárias, asma, processo inflamatório e constipação (Aquino et al., 2020).

Os efeitos farmacológicos demonstrados em estudos anteriores com a *A. edulis* de nosso laboratório, demonstraram ação anti-inflamatória *in vitro*. Assim, o objetivo do trabalho foi verificar os possíveis efeitos do *A. edulis* na resposta inflamatória em diferentes modelos experimentais.

2. Material e Métodos

2.1. Preparação do extrato aquoso de *Alibertia edulis* (AEAE)

O mesmo extrato preparado por nosso grupo de pesquisa em trabalhos anteriores (Aquino et al., 2017; Menegati et al., 2016; Aquino et al., 2020) foi utilizado para os estudos farmacológicos.

2.2. Drogas

Foi utilizada as seguintes substâncias: carragenina Lambda tipo IV (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA), dexametasona (Lab) e AEAE. Todos os medicamentos usados foram dissolvidos em solução salina.

2.3. Animais

Os experimentos foram realizados após aprovação do protocolo pelo Comitê de Ética Institucional (nº 04/2015) e de acordo com as diretrizes atuais para o cuidado de animais de laboratório e as diretrizes éticas para investigação de dor experimental em animais conscientes.

Para o delineamento experimental foram utilizados camundongos *Swiss* machos e fêmeas (25-35 g), alojados a 22 ± 2 ° C sob um ciclo de 12 h de luz/12 h de escuridão (luzes acesas às 06:00) e com acesso a comida e água *ad libitum*. Os animais foram aclimatados ao laboratório por pelo menos 1 hora antes do teste e foram usados apenas uma vez ao longo dos experimentos.

2.5. Medição do edema da pata

Os animais foram pré-tratados por via oral (po) com o AEAE nas doses de (200 e 400 mg/kg) ou veículo (solução salina, 0,9%) ou dexametasona (1,0 mg/kg, por via subcutânea, controle positivo), 1 hora antes da indução do edema. Os animais receberam 50 µl s.c. injeção de veículo (solução salina, 0,9%) contendo carragenina (300 µg/pata) na pata traseira direita. A pata contralateral recebeu apenas veículo e foi usada como controle. A espessura do edema da pata foi medida com micrômetro digital antes da indução do edema e em diferentes momentos após a injeção do agente flogístico (0,5, 1, 2 e 4 h) (Zimmermann, 1983).

2.6. Criação de feridas, agrupamento de animais e administração de medicamentos em camundongos

As costas dos camundongos foram raspadas e uma ferida de excisão aberta de 6 mm de espessura total foi feita através da remoção de um pedaço de pele sob anestesia com cetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) (via intraperitoneal) (Suguna et al., 2002).

Um total de 18 animais foram divididos em três grupos (n=6): Grupo controle que recebeu apenas veículo, grupo AEAE e grupo colagenase comercial (que recebeu Irurol®, aplicação tópica). Os camundongos de controle receberam 50 µL de soro fisiológico não tamponado, uma vez ao dia, por um período de 11 dias. Os camundongos AEAE receberam 50 µL do AEAE (200 e 400 mcg/mL) incorporado em gel de natrosol, aplicado topicamente, uma

vez ao dia, por um período de 7 dias. Já o grupo colagenase comercial recebeu 50 µL de iruxol. O fechamento da ferida é expresso em mm.

2.7. Migração de células pleurais e exsudação de proteínas

Os animais foram pré-tratados por via oral (po) com o AEAE nas doses de (100, 300 e 500 mg/kg) ou veículo, 1 h antes da indução da pleurisia com carragenina ou injeção de dexametasona (1,0 mg / kg, subcutânea, controle positivo), e naïve (tratado com solução salina 0,9% - controle negativo), administrado por via oral por gavagem, em diferentes grupos de camundongos.

A pleurisia foi induzida pela injeção intrapleural de 100 µl de carragenina 1%, conforme descrito anteriormente (Zanusso-Junior et al., 2011). A carragenina foi diluída em tampão salino. Resumidamente, uma agulha adaptada foi inserida no lado direito da cavidade torácica dos animais para permitir a administração intratorácica (i.t.) de carragenina. O grupo controle recebeu um volume igual (100 µL) de solução salina isenta de pirogênios estéril. Após 4h, os animais foram eutanasiados e a cavidade torácica lavada com 1mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS).

O volume do exsudato foi medido e uma alíquota de 20µL foi diluída em solução de Turk (1:20) usada para determinar o número total de leucócitos em uma câmara de Neubauer. A exsudação da proteína foi avaliada diretamente da lavagem pela reação de Bradford, utilizando o kit Bradford disponível comercialmente (Bioagency, São Paulo, Brasil). A contagem total de células foi realizada sob microscopia de luz e os resultados são apresentados como o número de células ml de líquido pleural.

2.8. Análise estatística

Os resultados são apresentados como a média±S.E.M., que são relatados como médias geométricas acompanhadas por seus respectivos limites de confiança de 95%. A significância estatística entre os grupos foi avaliada por meio de análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Student-Newman-Keuls, conforme apropriado. Valores de p menores que 0,05 foram considerados indicativos de significância.

3. Resultados

3.1. Efeitos da AEAE na cicatrização de feridas

A aplicação tópica da dose AEAE 400 (g/lesão), diminuiu significativamente o diâmetro da ferida realizada, com a contração de 30±3% após 7 dias, conforme ilustrado na Figura 1.

3.2. Efeitos de AEAE no edema de pata induzido por carragenina

A administração oral de AEAE na dose de 200 e 400 mg/kg inibiu significativamente o edema induzido pela

carragenina, com inibição de 41±6% e 43 ± 5%, duas horas após a injeção de carragenina, respectivamente, conforme ilustrado na Figura 2.

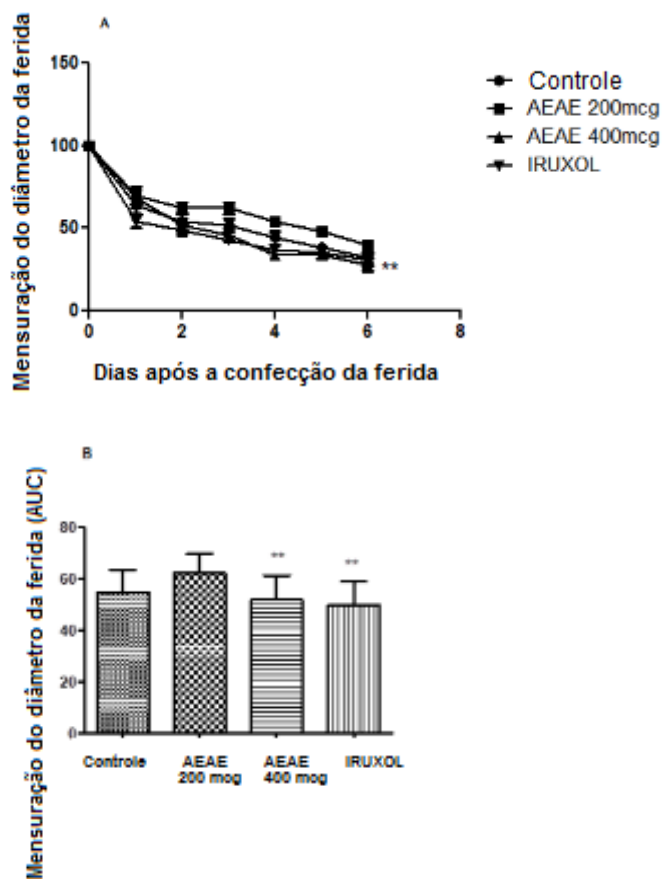


Figura 1. Efeitos da administração local de extrato aquoso de *Alibertia edulis* na cicatrização de feridas em camundongos. A) Cada ponto representa a média de 6 animais e as linhas verticais mostram o S.E.M. Os asteriscos denotam os níveis de significância quando comparados com os valores de controle (base de natosol em gel): *p<0,05, **p<0,01.

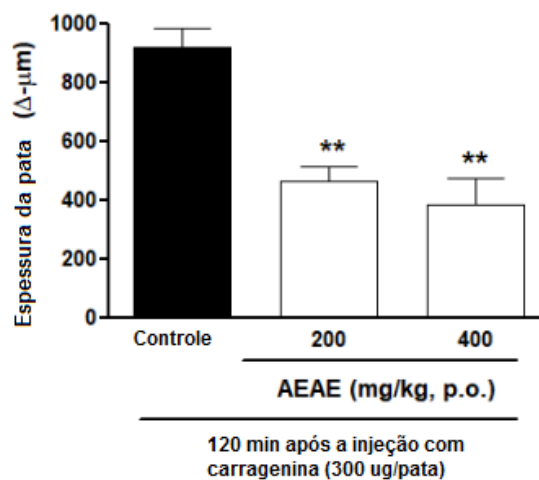


Figura 2. Efeito do extrato aquoso de *Alibertia edulis* administrado por via oral no edema de pata induzido por carragenina em camundongos. A coluna representa a inibição do edema dependente da dose no momento de 120 minutos após a injeção de carragenina, cuja média de 4-6 animais e as linhas verticais mostram o S.E.M. Os

asteriscos denotam os níveis de significância quando comparados com os valores de controle (carragenina): ** $p < 0,01$.

3.3. Efeitos da AEAE na migração de células pleurais e na exsudação de proteínas

Na pleurisia, a dose de 500 mg/Kg, ao contrário de 100 e 300 mg/kg, promoveu a redução da migração de leucócitos e extravasamento de proteínas para a cavidade pleural, conforme visto na Figura 3. As inibições observadas foram de $76 \pm 4\%$ e $34 \pm 3\%$, respectivamente.

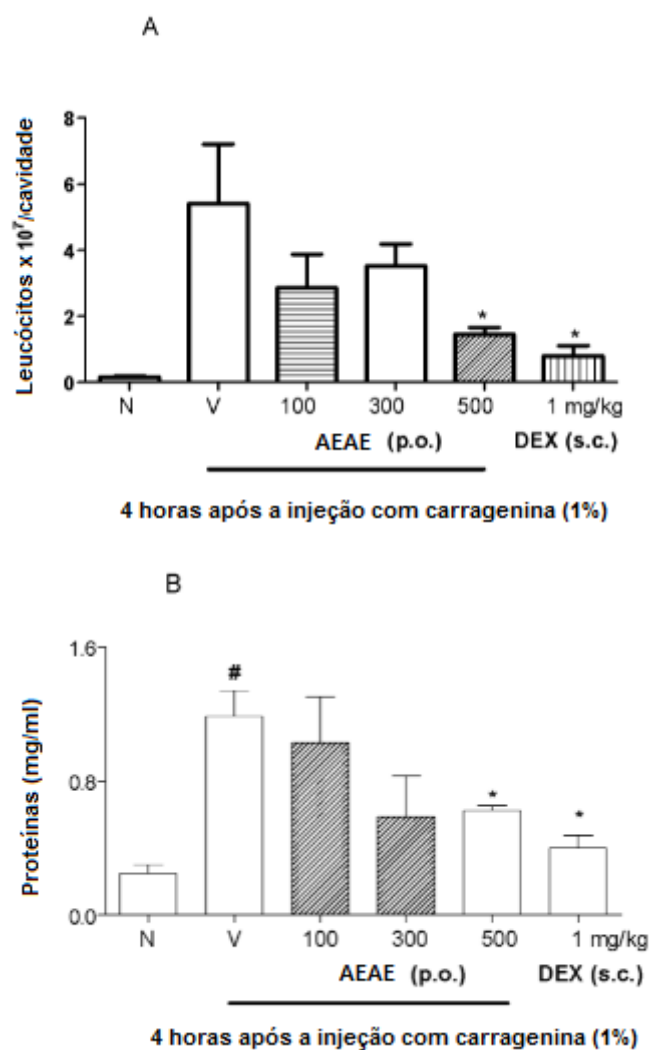


Figura 3. Efeitos do extrato aquoso de *Alibertia edulis* sobre leucócitos totais (A) e extravasamento de proteínas (B) induzido por carragenina na cavidade pleural de camundongos. Os animais receberam o tratamento oral com extrato (200 e 400mg/kg), ou veículo, e após 1h receberam injeção intrapleural de Cg (100 μ l de solução 1%/cavidade). Os animais controle receberam apenas os veículos. Os animais foram mortos após a injeção de Cg. As barras expressam a média \pm SEM de 6 animais, em comparação com veículo (V) vs grupo tratado. * $p < 0,05$, ANOVA de uma via seguida de *Student-Newman-Keuls*.

4. DISCUSSÃO

O desafio de encontrar novas moléculas para o

tratamento da dor e para melhorar a qualidade de vida dos pacientes nessas condições só aumenta as pesquisas com plantas medicinais. As respostas inflamatórias são reações do organismo frente a diversos agentes nocivos, com o objetivo de erradicar o agente patogênico e promover a reparação tecidual (Pioneiro, 2010)

O processo inflamatório promove resposta local, que desencadeia uma complexa cascata de eventos bioquímicos e celulares, caracterizado pelo extravasamento de líquido e formação de edema. Essa complexa cascata de eventos fisiológicos promove proteção aos tecidos, restringindo o dano no local da infecção ou lesão, mas pode ter efeitos deletérios quando exacerbados (Buckley et al, 2015).

A vasodilatação e extravasamento plasmático é uma resposta característica do edema de pata induzido pela carragenina, que é um modelo amplamente utilizado para avaliar o efeito anti-inflamatório agudo. No presente estudo, o tratamento oral de camundongos com o extrato aquoso de *A. edulis*, foi capaz de reduzir o edema de pata, a migração leucocitária e extravasamento protéico induzida por carragenina, após sua administração oral.

A resposta inflamatória induzida por carragenina é caracterizada por uma fase precoce (1-2h) onde ocorre a liberação de mediadores inflamatórios como histamina, serotonina e bradicinina, seguida por um estágio tardio (3-4h) com liberação de prostaglandinas (Zanusso-Junior et al., 2011).

Portanto, nosso estudo demonstrou um efeito anti-inflamatório de AEAE no modelo de edema de pata induzido por carragenina nas doses de 200 e 400mg/kg por via oral 2 horas após a aplicação do agente flogístico, sendo este um efeito dependente do tempo.

Além disso, os efeitos na cicatrização da ferida mostraram que a AEAE foi capaz de contrair o diâmetro da ferida durante cinco dias de tratamento tópico, mostrando seu efeito cicatrizante.

A porcentagem de contração é um parâmetro morfométrico frequentemente usado como indicador de resolução do processo de cicatrização. Este fenômeno ocorre devido à diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos que possuem capacidade contrátil e promovem força de tensão e união das bordas da ferida (Batista et al., 2012; Buckley et al, 2015).

No modelo de pleurisia, houve inibição da migração de células e proteínas de exsudação para a cavidade pleural apenas na dose de 500 mg/kg.

Em resumo, a administração oral de AEAE em camundongos nas doses de 200 e 400mg/kg inibiu significativamente o edema da pata, controlando os efeitos da inflamação, mas inibiu a migração de leucócitos e a exsudação de proteínas na cavidade pleural apenas na dose de 500 mg/kg, sendo este um efeito necessário para a estabilização e recuperação do processo inflamatório do local lesado. Na forma tópica, a AEAE foi capaz de promover a retração da ferida feita no modelo de cicatrização de feridas, demonstrando um efeito cicatrizante significativo. Porém, mais estudos são necessários para elucidar o possível composto responsável por essas

atividades, bem como seu mecanismo de ação.

Agradecimentos

FUNDECT, CAPES, CNPq e FAPESP.

Declaração

Os autores declaram estar cientes e terem atendido integralmente às normas preconizadas para as pesquisas experimentais de acordo com a Declaração Universal do Direito dos Animais. Os autores declaram ainda ausência de conflito de interesse.

5. Referências

- Aquino DFS, Tirloni CAS, Menegati SEL, Cardoso CAL, Vieira SCH, Vieira AmdoC, Morales AMS, Dominguez FAM, Gasparotto AJ. *Alibertia edulis* (L.C. RICH.) A.C. RICH - A potent diuretic arising from brazilian indigenous species. *Journal of Ethnopharmacology*, 196, 196-200, 2017.
- Aquino DFS, Monteiro TA, Cardoso CAL, Vieira SCH, do Carmo Vieira M, de Picoli Souza K, Morato, PN. Investigation of the antioxidant and hypoglycemic properties of *Alibertia edulis* (L.C. Rich.) AC Rich. leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, 253, 112648, 2020.
- Buckley CD. Stromal Cells in Chronic Inflammation and Tertiary Lymphoid Organ Formation. *Annual Review Immunology*, v. 33, p. 715-45, 2015.
- Bolt J, Osmer C, Linke LC, Dapper F, Hempelmann G. Circulating adhesion molecules in pediatric cardiac surgery. *Anesthesia & Analgesia*, 81, 1129-1135, 1995.
- Chung H, Lee EK, Choi YJ, Kim JM, Kim DH, Zou Y, Yu BP. Molecular inflammation as an underlying mechanism of the aging process and age-related diseases. *Journal of Dental Research*, 90, 830-840, 2011.
- Foglio MA, Queiroga CL, Sousa IDO, Rodrigues RAF. Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: um modelo multidisciplinar. *Construindo a História dos Produtos Naturais*, 7, 1-8, 2006.
- Martins AB. *Concentração e atividade sérica da mieloperoxidase em indivíduos tabagistas*, 2010. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual "Julio de Mesquita Filho"- UNESP, São Paulo/SP.
- Menegati SELT, De Lima FF, Traesel GK, Souza RIC, Dos Santos AC, De Santana DFA, Oesterreich SA. Acute and subacute toxicity of the aqueous extract of *Alibertia edulis* (Rich.) A. Rich. ex DC. in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 52, 2016.
- Pioneiro, R. dos R.. Atividade antiinflamatória de *Gochmatia polymorpha ssp. floccosa* em camundongos, 2010. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba/PR.
- Silverstein FE, Faich G, Goldstein JL, Simon LS, Pincus T, Whelton A, Geis GS. Gastrointestinal toxicity with celecoxib vs nonsteroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: the CLASS study: a randomized controlled trial. *JAMA: the Journal of the American Medical Association*, 284, 1247-1255, 2001.
- Simons S, Thompson EB, Johnson DF. Anti-inflammatory pyrazolo-steroids: potent glucocorticoids containing bulky A-ring substituents and no C3-carbonyl. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 86, 793-800, 1979.
- Sloane JA, Blitz D, Margolin Z, Vartanian T. A clear and present danger: endogenous ligands of Toll-like receptors. *Neuromolecular Medicine*, 12, 149-163, 2010.
- Suguna L, Chandrakasan G, Joseph KT. Influence of honey on biochemical and biophysical parameters of wounds in rats. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 14, 91-99, 1999.
- Zanusso-Junior G, Melo JO, Romero AL, Dantas JA, Caparroz-Assef SM, Bersani-Amado CA, Cuman RKN. *Avaliação da atividade antiinflamatória do coentro (Coriandrum sativum L.) em roedores*. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, 13, 17-23, 2011.
- Zimmernann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*, 16, 109-110, 1983.