

Atividade analgésica e anti-inflamatória do composto ácido ferúlico

Autores: Marianna Minaré Vigo¹, Karina Furlani Zoccal²

Colaboradores: Mouzarlem Barros Reis, Cristiane Tefé da Silva

Centro Universitário Barão de Mauá

⁽¹⁾mariannamvigo@hotmail.com, Medicina, ⁽²⁾karina.zoccal@baraodemaua.br

Resumo

Compostos bioativos derivados da própolis têm demonstrado efeitos terapêuticos promissores. Nesse estudo, os animais inflamados que receberam a administração do composto apresentaram redução do recrutamento de leucócitos, edema e citocinas quando comparado ao grupo inflamado, além de promoverem o alívio da dor. Esses dados sugerem que o composto apresenta importante propriedade anti-inflamatória e analgésica.

Introdução

Dor e inflamação fazem parte das respostas complexas do corpo aos estímulos prejudiciais. A inflamação pode ajudar a eliminar a causa inicial da lesão celular e iniciar o reparo tecidual; no entanto, se a inflamação persistir, ela pode se tornar destrutiva e causar danos aos tecidos (PATTON et al., 2003).

A inflamação é um tipo de imunidade que é causada pelo estabelecimento do fluxo da via do ácido araquidônico, com síntese de prostaglandinas, e liberação de citocinas, que causam irritação nos nervos e aumento da permeabilidade (SERHAN; SAVILL, 2005; KOO et al., 2001). As prostaglandinas são produzidas com a ajuda das ciclooxygenases-1 e -2, que têm um papel crucial na indução de dor e inflamação (KOO et al., 2001).

Atualmente, drogas químicas comuns, como esteroides e não esteroides, são usadas no alívio da dor e inflamação (PATIL et al., 2019). No entanto, a maioria delas tem efeitos colaterais. Assim, novas pesquisas recomendam o uso de plantas medicinais, dado que têm demonstrado resultados promissores na prevenção e tratamento de várias doenças. Essas plantas geralmente têm baixo custo e efeitos colaterais mínimos (ASADI-SAMANI et al., 2016; GHASEMI et al., 2016; HAJIAN, 2015). Estudos demonstraram que o ácido linoleico disponível nos ácidos graxos da linhaça tem atividade antioxidante e efeito protetor contra algumas doenças como cardiopatias e aterosclerose (OOMAH, 2001). Os flavonoides, extraídos do processamento das fibras da planta de *Linum usitatissimum* L, demonstraram

atividades analgésicas e anti-inflamatórias (SAMANI et al., 2015). Dados da literatura reportaram que o extrato aquoso de *Prosopis chilensis* tem propriedades antissépticas (RANI et al., 2013). Além disso, o extrato do caule da *Prosopis africana* é usado para tratar a febre, enquanto o extrato de casca é usado como remédio no reumatismo e para picadas de escorpiões (AYANWUYI et al., 2010).

Com a necessidade de explorar novos agentes anti-inflamatórios com ação seletiva e menor toxicidade (PATIL et al., 2019), a própolis tem sido utilizada na medicina popular e alternativa para curar feridas, bem como tratar resfriados, infecções e doenças inflamatórias. Sabe-se ainda que a própolis brasileira têm se tornado de grande interesse nas pesquisas devido suas diferenças em suas composições químicas (SIMÕES et al., 2004). Os principais compostos encontrados na própolis verde brasileira incluem os ácidos fenólicos, tais como: ácidos caféico, ferúlico, *p*-cumárico e cinâmico (COSTA et al., 2019; RODRIGUES et al., 2020; GASTALDELLO et al., 2021; FERREIRA et al., 2021). Esses compostos bioativos demonstram diversos efeitos imunorreguladores, com inúmeros benefícios farmacológicos, que incluem efeitos antioxidantes, antimicrobianos, anti-inflamatórios, antidiabéticos, neuroprotetores, gastroprotetores, imunomoduladores e antitumorais (COSTA et al., 2019; MARUYAMA et al., 2018; RODRIGUES et al., 2020; GASTALDELLO et al., 2021; FERREIRA et al., 2021). Apesar da crescente investigação com produtos naturais para efeitos de tratamento de inúmeras doenças, até o momento, nada se sabe sobre a participação do composto ácido ferúlico, isolado da própolis verde da espécie *Baccharis dracunculifolia* frente a inflamação e analgesia.

Objetivos

O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos anti-inflamatório (método *air pouch*) e analgésico (método *hot plate*), *in vivo*, do ácido ferúlico, isolado da própolis verde.

Materiais e Métodos

Animais: Camundongos da linhagem Balb/c, pesando aproximadamente 22 g, foram mantidos no biotério do Centro Universitário Barão de Mauá, em ambiente com umidade, onde receberam dieta padrão e água livre. Todos os procedimentos foram executados de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA) e os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa e Experimentação animal (CEPAN), do Centro Universitário Barão de Mauá de Ribeirão Preto (número do protocolo 387/20).

Isolamento e preparo do ácido ferúlico: o composto ácido ferúlico da espécie *Baccharis dracunculifolia* da própolis verde foi previamente preparado (dissolução em etanol- extração – filtração – evaporação), e suspenso em 997 μ L de PBS (tampão fosfato salino) e 3 μ L de álcool, com concentração final de 1 mg/mL.

Determinação da migração leucocitária: modelo “air pouch”: Este modelo consiste da formação de uma cavidade artificial e estéril no dorso dos animais a partir da injeção subcutânea de ar estéril. Inicialmente, os animais foram anestesiados via intraperitoneal (i.p.) com xilaxina (15 mg/kg) e quetamina (80 mg/kg). Depois foi injetado 3 mL de ar estéril no dorso dos animais via subcutânea com uma agulha de 25 G através de um filtro estéril (Millex GV 0.22 μ m—Merck Millipore Ltd, Tullagreen, IRL). O dia da injeção foi considerado como o primeiro dia. Três dias após, foram injetados mais 3 mL de ar estéril. No sexto dia após a primeira inoculação de ar, os animais receberam 1 mL de Solução Salina Tamponada com Fosfato (PBS) ou lipopolissacarídeo (LPS - 1 μ g/mL, estímulo inflamatório) dentro da cavidade (FERREIRA et al., 2021). E após 1 hora, os animais receberam ou não, o ácido ferúlico (AcF) (500 μ g/kg), conforme demonstrado na tabela 01:

Tabela 1: Grupos de animais utilizados no experimento de *air pouch*

Grupo	Estímulo (1)	Estímulo (2) – após 1h
Controle	1 mL de PBS	1 mL de PBS
LPS	1 mL de LPS	1 mL de PBS
LPS+AcF	1 mL de LPS	1 mL AcF (1000 μ g/kg)

Após 4 h da última injeção, os animais foram eutanasiados com superdose anestésica e as bolsas de ar lavadas com 3 mL de PBS estéril. O lavado da bolha coletado foi utilizado para contagem total e diferencial de células. Após centrifugação dos lavados, os fluidos foram guardados a -20°C para posterior quantificação de mediadores inflamatórios.

Contagem de leucócitos: Para contagem do número total de células presentes no lavado, foram retiradas 20 μ L de cada amostra, as quais foram diluídas em 380 μ L de solução de Turk. A contagem diferencial das células foi feita em esfregaços, preparados em citocentrífuga e corados pelo corante Panótico (Laborclin, Paraná, Brasil). Foram contadas 100 células em diferentes campos, com aumento de 100x, em microscópio óptico.

Quantificação de citocinas por ensaio imunoenzimático (ELISA): Os sobrenadantes da cavidade de ar foram empregados para avaliação de produção da interleucina (IL)-6 e fator de necrose tumoral (TNF)-alpha (R&D Systems, Minneapolis, EUA). As concentrações foram determinadas empregando anticorpos de captura, citocinas padrão e anticorpos associados à biotina e amplificados com estrepto-avidina-peroxidase. A leitura das amostras foi feita em filtro de 450 nm. As concentrações de citocinas foram determinadas utilizando uma curva padrão criada com a citocina recombinante adequada (expressos em pg/mL). Esta dosagem foi realizada no laboratório de imunologia em colaboração com a Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP.

Avaliação da atividade analgésica do ácido ferúlico: Este teste, consiste em colocar os animais sobre uma placa quente (55°C \pm 1,0°C) e observar quanto tempo levam para manifestar uma resposta (lamber, morder, saltar ou levantar as patas). Para isso, 12 camundongos foram divididos aleatoriamente em dois grupos iguais (n = 6), conforme descrito abaixo:

Grupo 1: os animais receberam pela via intraperitoneal (i.p.) 100 mg/kg de peso corporal de suspensão hidroalcoólica do extrato;

Grupo 2: controle negativo, administração por via i.p. com salina;

Após 5 minutos do tratamento, os animais foram colocados na placa quente. O tempo de resposta (tempo de reação) foi registrado: 5, 10, 15, 30 e 60 minutos após o tratamento, utilizando o Hot plate. O tempo de reação foi definido como o intervalo desde o momento em que o animal alcançou a placa quente até o momento em que lambeu o pé ou saltou.

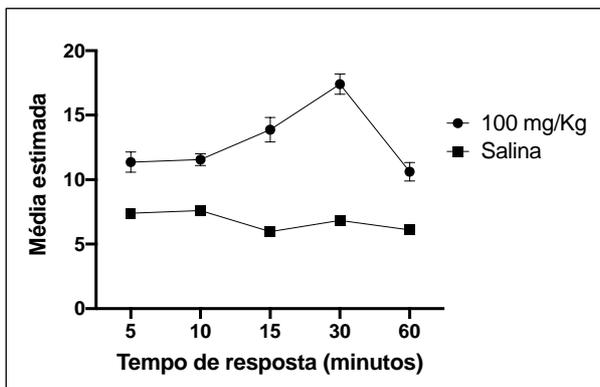
Resultados e Discussão

A dor é suprimida pelo composto bioativo do AcF

A figura 1 mostra a atividade analgésica do composto AcF em comparação com a solução salina em diferentes intervalos de tempo (5, 10, 15, 30 e 60 minutos após a administração i.p. do composto AcF). O composto na dose de 100 mg/kg

aumentou significativamente o tempo de resposta dos camundongos à placa quente em comparação ao controle (salina) ($P < 0.0095$). O pico de resposta foi registrado após 30 minutos da administração i.p. do tratamento com o AcF (Fig. 1). Estudos com outros compostos, como o extrato *Prosopis chilensis*, demonstraram o efeito inibitório do extrato de 30 minutos a duas horas para ser iniciado (MUZAMMIL et al.), o que é comparável ao tempo máximo de resposta analgésica para os camundongos tratados com o AcF no presente estudo. No entanto, mais pesquisas são necessárias para explicar se a ação analgésica do composto AcF se deve à inibição central da dor ou à modificação da liberação do mediador inflamatório hiperalгésico.

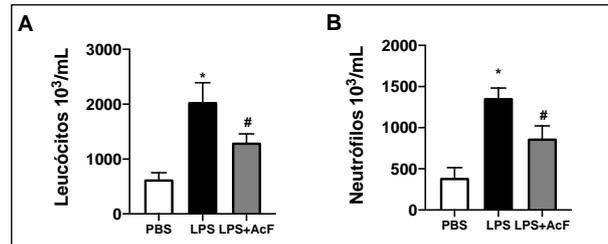
Figura 1. Médias estimadas do tempo de resposta dos grupos estudados à chapa quente em diferentes intervalos de tempo.



AcF reduz a inflamação aguda induzida por LPS

Os neutrófilos estão entre as primeiras células recrutadas para um sítio inflamatório (CASTANHEIRA; KUBES, 2019). Assim, a resposta à injeção do composto AcF em camundongos foi estudada, no intuito de avaliar o comportamento do composto na bolha inflamada. O AcF foi inoculado em camundongos na presença ou ausência de estímulo inflamatório, LPS (1 µg/Kg em 1mL), conforme descrito em materiais e métodos. Após 4h da injeção, como esperado, observamos maior recrutamento de leucócitos e neutrófilos nos animais que receberam LPS, quando comparado ao controle PBS (Figs. 2A e 2B, respectivamente). No entanto, quando os animais com bolsas de ar inflamadas, receberam AcF, demonstramos diminuição no recrutamento de leucócitos (Fig. 2A) e principalmente de neutrófilos (Fig. 2B), quando comparado ao LPS.

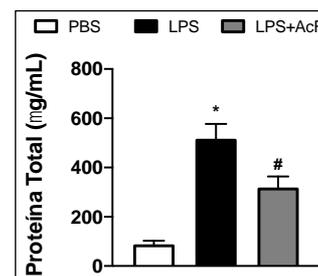
Figura 2. AcF reduz o recrutamento de células sob condições inflamadas.



Bolsas de ar foram inoculadas com PBS ou LPS e, após 1 hora, foram inoculados PBS ou AcF. Após 4 horas da última inoculação, os leucócitos e neutrófilos foram avaliados. Os resultados são apresentados como média±SEM (n=5). Análise estatística significativa para $p < 0.005$, utilizando ANOVA. *PBS versus LPS; #LPS versus LPS+AcF.

Sabe-se que as contrações linfáticas são reguladas negativamente por vários mediadores inflamatórios. Assim, o rápido extravasamento de plasma e o edema ocorrem em uma escala de tempo mais rápida do que a infiltração de células imunes (SCHWAGER; DETMAR, 2019; MATSUDA; HUH; JI, 2018). O extravasamento proteico, com a consequente formação de edema local, foi observado após 4 horas. Como esperado, houve aumento de proteínas totais nos animais que receberam LPS, quando comparado ao grupo controle PBS (Fig. 3). Entretanto, quando os animais com bolsas de ar inflamadas, receberam AcF, observamos diminuição considerável de extravasamento proteico, quando comparado ao grupo LPS (Fig. 3).

Figura 3. O edema induzido pelo LPS é diminuído pela ação do AcF.

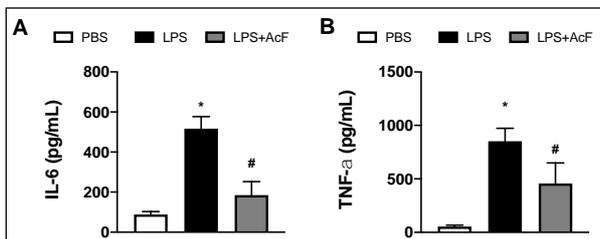


Bolsas de ar foram inoculadas com PBS ou LPS e, após 1 hora, foram inoculados PBS ou AcF. Após 4 horas da última inoculação, os lavados das bolsas de ar, foram coletados, conforme descrito em Materiais e Métodos. A quantidade de proteína total foi avaliada pelo método de Bradford. Os resultados são apresentados como média±SEM (n=5). Análise estatística significativa para $p < 0.0001$, utilizando ANOVA. *PBS versus LPS; #LPS versus LPS+AcF.

Na fase aguda da resposta inflamatória, as células do sistema imunológico migram para o local da lesão em uma sequência de eventos, facilitada por mediadores solúveis, como citocinas. As vias de

sinalização desencadeadas por citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-6 têm sido intensamente estudadas (GERMOLEC et al, 2018; LEI et al, 2019), e, dessa maneira, a produção dessas citocinas foi analisada após 4 horas da última injeção. Como esperado, observamos aumento na produção de IL-6 (Fig. 4A) e TNF- α (Fig. 4B) nos animais que receberam apenas LPS, quando comparado ao controle PBS. Entretanto, quando os animais com bolsas de ar inflamadas, receberam AcF, observamos diminuição significativa na produção de citocinas (Figuras 4A e 4B), quando comparado ao LPS.

Figura 4. AcF diminui a produção de citocinas induzida pelo LPS.



Bolsas de ar foram inoculadas com PBS ou LPS e, após 1 hora, foram inoculados PBS ou AcF. Após 4 horas da última inoculação, os lavados das bolsas de ar, foram coletados, conforme descrito em Materiais e Métodos. As citocinas IL-6 (A) e TNF- α (B) foram avaliadas por ELISA. Os resultados são apresentados como média \pm SEM (n=5). Análise estatística significativa para $p < 0.0001$, utilizando ANOVA. *PBS versus LPS; #LPS versus LPS+AcF.

Conclusão

Esses achados sustentam a ideia de que a administração do composto AcF, isolado da própolis verde, apresenta resultados promissores em modelo de inflamação aguda, apresentando ação analgésica, diminuindo o extravasamento proteico, e consequentemente a formação de edema local, além de reduzir o recrutamento de neutrófilos e a produção de citocinas inflamatórias. Assim, os dados favorecem a descoberta de novos compostos com ação terapêutica para o tratamento de doenças inflamatórias. No entanto, mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos envolvidos na ativação de leucócitos e modulação da resposta imune.

Referências

ASADI-SAMANI, M. et al. A Systematic Review of Iran's Medicinal Plants With Anticancer Effects. **Journal Of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine**, [S.L.], v. 21, n. 2, p. 143-153, 2015.

AYANWUYI, L. O.; YARO, A. H.; ABODUNDE, O. M. Analgesic and anti-inflammatory effects of the methanol stem bark extract of *Prosopis africana*. **Pharmaceutical Biology**, [S.L.], v. 48, n. 3, p. 296-299, 2010.

CASTANHEIRA, F. V. S.; KUBES, P. Neutrophils and NETs in modulating acute and chronic inflammation. **Blood**, [S.L.], v. 133, n. 20, p. 2178-2185, 2019.

COSTA, P. et al. Hydroalcoholic extract from *Baccharis dracunculifolia* recovers the gastric ulcerated tissue, and p-coumaric acid is a pivotal bioactive compound to this action. **Biofactors**, Malden, v. 45, n. 3, p. 479-489, 2019.

FERREIRA, J. C. et al. Baccharin and p-coumaric acid from green propolis mitigate inflammation by modulating the production of cytokines and eicosanoids. **Journal Of Ethnopharmacology**, [S.L.], v. 278, p. 114255, 2021.

GASTALDELLO, G. H. et al. Green Propolis Compounds (Baccharin and p-Coumaric Acid) Show Beneficial Effects in Mice for Melanoma Induced by B16f10. **Medicines**, [S.L.], v. 8, n. 5, p. 20, 2021.

GERMOLEC, D. R. et al. Markers of Inflammation. **Methods In Molecular Biology**, [S.L.], v. 1803, p. 57-79, 2018.

GHASEMI, S; LORIGOOINI, Z. A review of significant molecular mechanisms of flavonoids in prevention of prostate cancer. **Journal Of Chemical And Pharmaceutical Sciences**, [S.L.], v. 9, n. 4, p. 3388-3394, 2016.

HAJIAN, S. Positive effect of antioxidants on immune system. **Immunopathol Persa**, [S.L.], v. 1, n. 1, p. e02, 2015.

KOO, K. L. K. et al. Gingerols and Related Analogues Inhibit Arachidonic Acid-Induced Human Platelet Serotonin Release and Aggregation. **Thrombosis Research**, [S.L.], v. 103, n. 5, p. 387-397, 2001.

LEI, C. Q. et al. USP19 Inhibits TNF- α - and IL-1 β -Triggered NF- κ B Activation by Deubiquitinating TAK1. **The Journal Of Immunology**, [S.L.], v. 203, n. 1, p. 259-268, 2019.

MARUYAMA, H. et al. Biochemical Characterization of Ferulic Acid and Caffeic Acid Which Effectively Inhibit Melanin Synthesis via Different Mechanisms in B16 Melanoma Cells. **Biological And Pharmaceutical Bulletin**, [S.L.], v. 41, n. 5, p. 806-810, 2018.

MATSUDA, M.; HUH, Y.; JI, R. R. Roles of inflammation, neurogenic inflammation, and neuroinflammation in pain. **Journal Of Anesthesia**, [S.L.], v. 33, n. 1, p. 131-139, 2018.

MUZAMMIL, A. S.; FARHANA, A.; SALMAN, A. Analgesic activity of leaves extracts of samanea saman merr., and prosopis cineraria druce. **International Research Journal Of Pharmacy**, [S.L.], v. 4, n. 1, p. 93-95, 2013.

OOMAH, B. D. Flaxseed as a functional food source. **Journal Of The Science Of Food And Agriculture**, [S.L.], v. 81, n. 9, p. 889-894, 2001.

PATIL, K. R. et al. Animal Models of Inflammation for Screening of Anti-inflammatory Drugs. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 20, n. 18, p. 4367, 2019.

PATTON HD, FUCHS AF, HILLS AF, SCHER AM, STEINER R. **Textbook of Physiology**. Philadelphia: Wb Saunders, 2003. 21 v.

RANI, B. et al. Prosopis cineraria (L) Druce: A Desert Tree to Brace Livelihood in Rajasthan. **Asian Journal Of Pharmaceutical Research & Health Care**, [S.L.], v. 5, n. 2, p. 58-64, 2013.

RODRIGUES, D. M. et al. The Role of Baccharis dracunculifolia and its Chemical Profile on Green Propolis Production by Apis mellifera. **Journal Of Chemical Ecology**, [S.L.], v. 46, n. 2, p. 150-162, 2019.

SAMANI, B. H. et al. Analysis of the combinative effect of ultrasound and microwave power on Saccharomyces cerevisiae in orange juice processing. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, [S.L.], v. 32, p. 110-115, 2015.

SCHWAGER, S.; DETMAR, M. Inflammation and Lymphatic Function. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 10, p. 1-11, 2019.

SERHAN, C. N; SAVILL, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. **Nature Immunology**, [S.L.], v. 6, n. 12, p. 1191-1197, 2005.

SIMÕE, L. M. C. et al. Effect of Brazilian green propolis on the production of reactive oxygen species by stimulated neutrophils. **Journal Of Ethnopharmacology**, [S.L.], v. 94, n. 1, p. 59-65, 2004.