Revista de Ciências
Farmacêuticas
Básica e Aplicada
Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences

Rev Ciênc Farm Básica Apl., 2013;34(1):43-46
ISSN 1808-4532

Atividade Anti-inflamatória e Avaliação da Toxicidade do Extrato Hidroetanólico de *Morus alba* (Moraceae)

Camila Bugnotto Pereira[1,*]; Aline Marin[2]; Sérgio Luiz Dalmora[2]; Raquel Medina Martins Necchi[1]; Rafael Noal Moresco[2]; Melânia Palermo Manfron[2]

[1] Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS
[2] Departamento de Farmácia Industrial, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, RS

RESUMO

No presente trabalho, avaliou-se a atividade anti-inflamatória do extrato hidroetanólico das folhas de *Morus alba,* através do modelo de indução de tecido granulomatoso e analisaram-se os efeitos toxicológicos sobre o fígado pela dosagem de AST e ALT e sobre o rim, pela dosagem de creatinina. O extrato hidroetanólico das folhas de *M. alba* foi administrado oralmente, três vezes ao dia, durante 6 dias. A nimesulida (5 mg/kg/dia) foi utilizada como controle positivo e o propilenoglicol 20% como controle negativo. Após o tratamento, foi avaliada a formação do granuloma e realizada a dosagem de AST, ALT e creatinina em todos os grupos. Os animais tratados com o extrato de *M. alba* apresentaram inibição do processo inflamatório de 20,24 ± 6,94%, enquanto que os tratados com controle positivo apresentaram 21,42 ± 6,52%. O extrato hidroetanólico de *M. alba* demonstrou atividade anti-inflamatória semelhante à nimesulida com ausência de indícios de hepatotoxicidade e nefrotoxicidade.

Palavras-chave: *Morus alba.* Anti-inflamatória. Moraceae. Toxicidade. Modelo de inflamação.

INTRODUÇÃO

A família Moraceae é composta por aproximadamente 61 gêneros, com mais de 1000 espécies e está presente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (Joly, 1975; Cronquist, 1981). Espécies do gênero *Morus* como *Morus alba,* cujo nome popular é amoreira branca*,* são utilizadas na medicina chinesa como antioxidante, anti-inflamatória e hipoglicemiante. Estudos com os extratos de *M. alba* revelaram a presença do alcaloide 1-desoxinojirimicina (DNJ), o qual possui promissores efeitos biológicos *in vivo,* similar aos antidiabéticos orais (Asano et al., 2001, Kimura et al., 2004).

Autor correspondente: Camila Bugnotto Pereira - Laboratório de Farmacognosia - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - Universidade Federal de Santa Maria - Prédio 26 Santa Maria - RS - CEP.97105-900 - Brasil - telefone: (055) 96480926 e-mail:camilabugno@hotmail.com.

Os compostos fenólicos são encontrados em várias espécies do gênero *Morus*, sendo constantemente estudados devido às diversas atividades farmacológicas (Nomura & Hano 1994; Birt et al., 2001; Havsteen, 2002). No estudo fitoquímico, o extrato hidroetanólico das folhas de *M. alba* confirmou a presença de um amplo espectro de compostos químicos, sobretudo das classes dos flavonoides, terpenos e taninos (Pereira et al., 2010).

Os flavonoides quercetina, rutina e o alcaloide 1-desoxinojirimicina foram identificados por Kim et al. (1999) e Kimura et al. (2004) nas folhas de *M. alba.* Esses compostos atuam no processo inflamatório, através da inibição das vias ciclooxigenase e lipoxigenase no metabolismo do ácido araquidônico, onde aumentam a permeabilidade capilar, inibem a exsudação de proteínas e migração de leucócitos.

A atividade anti-inflamatória de um determinado fármaco pode ser avaliada através da indução do edema de pata por carragenina em ratos, este modelo possui vários mediadores atuando em sequência para produzir a resposta inflamatória (Winter et al., 1962). Outro método utilizado é o ensaio do granuloma, que consiste na implantação de *pellets* de algodão no dorso de ratos, e se caracteriza pela formação de cápsula fibrosa vascularizada, fibroblastos e células mononucleares infiltrantes. O efeito do fármaco testado é avaliado pelo tamanho da cápsula fibrosa desenvolvida: quanto menor a cápsula fibrosa desenvolvida, mais intenso é o efeito anti-inflamatório do fármaco testado (Bailey et al.,1982; Dalmora et al. 1996). Em um estudo realizado por Padilha et al. (2010) com o extrato de *Morus nigra*, gênero *Morus*, ficou comprovada a atividade anti-inflamatória através do método de indução da formação do tecido granulomatoso.

Muitos fármacos podem apresentar como reação indesejável a agressão ao fígado, limitando o uso e os benefícios esperados. O dano hepatocelular, induzido por medicamentos, pode ser traduzido pelo aumento das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) na circulação (Setty et al., 2007). Pesquisas vêm sendo realizadas a fim de verificar a toxicidade dos extratos vegetais sobre o fígado e o rim de ratos, conforme o observado no estudo realizado com o extrato hidroalcoólico de *Calendula officinalis* L. (Silva et al., 2005).

Por meio da determinação de constituintes de ocorrência normal no sangue, por exemplo, a creatinina, é possível avaliar a disfunção renal associada ao efeito tóxico. A creatinina é um produto normal do metabolismo, sendo excretada diariamente em quantidade proporcional à massa e à atividade muscular. As situações em que ocorre elevação de creatinina no plasma podem estar associadas à deficiência no processo de filtração glomerular (Lehninger et al.,1995). Assim, o estudo farmacológico de compostos naturais é de grande relevância a fim de desenvolver novos fármacos com menores efeitos adversos que os usuais.

Neste trabalho, os objetivos foram avaliar a atividade anti-inflamatória do extrato hidroetanólico 70% das folhas de *M. alba,* pelo do método de indução de formação do tecido granulomatoso; bem como verificar a toxicidade renal e hepática pela determinação de creatinina, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) séricas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta do material botânico e obtenção do extrato vegetal

As folhas de *M. alba* foram coletadas na cidade de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. Uma amostra do material vegetal foi identificada e depositada no Herbário do Departamento de Biologia da UFSM, conforme exsicata SMDB 13.079. O extrato foi preparado de acordo com a Farmacopeia dos Estados Unidos do Brasil (1959) adaptada. Este foi obtido por maceração a partir do pó da droga vegetal, com solvente hidroetanólico (70%), durante 30 dias e submetido à agitação ocasional com renovação de solvente, de modo a obter um melhor esgotamento dos principios ativos. O extrato foi concentrado, liofilizado e armazendo em frasco ambar, em geladeira, até o momento de uso.

Animais

Ratos Wistar machos, pesando entre 170-200g, foram divididos em 3 grupos de 6 animais. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Farmácia Industrial de Santa Maria (UFSM) sob ciclo claro-escuro de 12 horas e 22 ± 2°C, com livre acesso à comida (dieta padrão roedor) e água. Os procedimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), n°17/2005, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

Ensaio de indução do tecido granulomatoso

Em condições assépticas, os animais foram anestesiados com éter e cilindros de algodão estéril, pesando 40 mg cada, que foram implantados no dorso de cada animal de acordo com Meier et al. (1975) e Niemergeers et al. (1975). O tratamento foi realizado por gavagem durante seis dias consecutivos, com 1,5 mL do extrato hidroetanólico 70% das folhas de *M. alba* (300 mg/kg/dia). A nimesulida foi o anti-inflamatório não esteroidal, utilizado como controle positivo na dosagem de 5 mg/kg/dia, obtida a partir de ensaios preliminares e, como controle negativo, o propilenoglicol em água (20:80 v/v), devido à ausência de toxicidade. No sétimo dia, após a inserção dos cilindros de algodão, procedeu-se a eutanásia para extração dos granulomas, os quais foram secos em estufa de circulação de ar, a 60°C, por 24 horas e imediatamente pesados em uma balança analítica. A diferença entre o peso final e o inicial do granuloma foi considerada como o peso do tecido granulomatoso produzido e a porcentagem da inibição da inflamação foi calculada em relação ao propilenoglicol.

Testes Bioquímicos

As dosagens bioquímicas foram realizadas com os três grupos. No final do tratamento, foram coletados 3 mL de sangue por punção cardíaca e transferidos tubos com anticoagulante EDTA. As amostras foram centrifugadas a 2800 rpm, durante 15 minutos, para separação do plasma. As análises de aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase foram realizadas em temperatura controlada de 25°C, as quais, assim como a creatinina sérica, foram determinadas em analisador automático Cobas Mira ® (Roche Diagnostics), usando kits BIOCLIN ®.

Análise estatística

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão. A análise estatística foi realizada usando Kruskal-Wallis e Mann–Whitney ($p < 0,05$).

RESULTADOS

O tratamento dos animais durante seis dias com extrato hidroetanólico de *M. alba* levou à redução significativa do peso do granuloma. Os animais tratados com nimesulida apresentaram uma inibição do processo inflamatório de 21,42 ± 6,52% e o grupo teste, tratado com o extrato de *M. alba,* apresentou inibição de 20,24 ± 6,94%, comparado com o controle negativo (Figura 1).

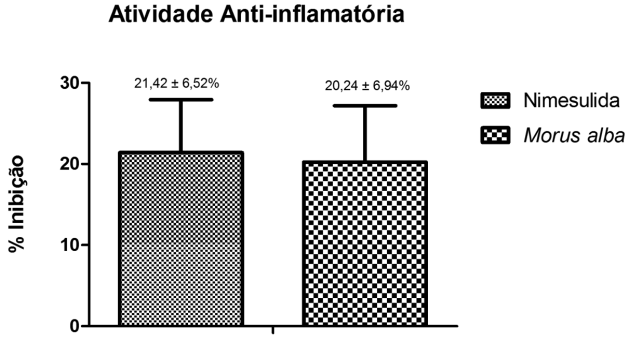

Figura 1. Inibição do processo inflamatório após tratamento com nimesulida e com extrato hidroetanólico de *Morus alba*.

O tratamento com extrato hidroetanólico de *M. alba* e nimesulida, comparado com o controle negativo de propilenoglicol, demonstrou que não há indícios de hepatotoxicidade e nefrotoxicidade nas doses testadas e no tempo avaliado (tabela 1), pois em ambos testes aplicados não houve diferenças, estatisticamente significativas, entre os grupos controle, nimesulida e tratado.

Tabela 1. Determinação da atividade enzimática da AST e ALT no soro e da concentração da creatinina (média ± desvio padrão), usando Cobas Mira apparatus (Roche) e Kits BIOCLIN®.

Dosagem	*Morus alba*	Nimesulida	Propilenoglicol 20%
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
ALT (U/L)	76,5±31,6	55,5±8,76	53,0±14,6
AST (U/L)	130,5±32,10	130,2±14,26	132,7±20,94
Creatinina (mg/dL)	0,15±0,078	0,19±0,086	0,22±0,056

Os dados representam à média e o desvio-padrão (n=6). Nenhuma diferença entre os grupos foi estatisticamente significante, segundo os testes de Kruskal-Wallis e Mann –Whitney (p<0,05).

DISCUSSÃO

Os resultados mostraram que a administração oral por seis dias do extrato hidroetanólico, preparado com as folhas de *M. alba*, de forma geral, não produziu efeitos tóxicos em ratos Wistar adultos, pois durante o tratamento, nenhum sinal clínico visível de toxicidade foi observado, estando de acordo com os valores encontrados nas dosagens de AST, ALT e creatinina, os quais sugerem ausência de hepatotoxicidade e nefrotoxicidade, segundo os parâmetros avaliados.

Com a utilização do mesmo método, foi possível verificar ausência de toxicidade hepática e renal em ratas Wistar, tratadas com o extrato hidroalcoólico de *Calendula officinalis* L. (0,25mg/kg), com valores de 209,5 U/L; 72,8 U/L e 0,64 mg/dL para AST, ALT e creatinina, respectivamente (Silva et al., 2005). Segundo Martin et al. (1981), as análises das enzimas aminotransferases séricas e creatinina são importantes indicadores de lesões nas células hepáticas e renais.

Através do ensaio de indução de formação do tecido granulomatoso foi possível confirmar o uso tradicional das folhas de *M. alba* como anti-inflamatória. O extrato apresentou inibição do processo inflamatório semelhante à nimesulida, podendo isso ser atribuído à presença de flavonoides encontrados no extrato. O mesmo pode ser observado com extrato de *Morus nigra*, o qual apresentou, na dosagem mais elevada (300mg/kg), uma inibição da formação do tecido granulomatoso de 39,7%, em comparação ao grupo controle (Padilha et al., 2010). De acordo com Spector (1969), o modelo de granuloma em ratos, utilizado para avaliação da reação inflamatória crônica pode ser usado de maneira crônica, ou subcrônica na investigação de substâncias antiartríticas.

Como demonstrado, o extrato hidroalcoólico de *M. alba* possui significativo efeito anti-inflamatório no modelo de inflamação crônica, sendo que na dose avaliada não foram constatados efeitos adversos sobre as funções hepática e renal que pudessem caracterizar a toxicidade sobre os sistemas avaliados.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à CAPES pela bolsa concedida.

ABSTRACT

Anti-inflammatory Activity and Biochemical Parameters of the Hydroethanolic Leaf Extract of Morus alba (Moraceae)

In this study, the anti-inflammatory activity of a hydroethanolic extract of leaves of *Morus alba* (white mulberry) was assessed in a model of granulomatous tissue induction and the toxicological effects on the liver were analyzed by assaying AST and ALT, and those on the kidney by determining creatinine. The hydroethanolic leaf extract was administered orally three times a day six days. Nimesulide (5 mg /kg/day) was used as a positive control and 20% propylene glycol as a negative control. After the 6-day treatment, granuloma formation was assessed and the levels of AST, ALT and creatinine assayed in all groups. Animals treated with the extract showed inflammation inhibition of 20.24 ± 6.94%, while those treated with positive control showed 21.42 ± 6.52%. The hydroethanolic extract of *M. alba* thus exhibited anti-inflammatory activity similar to nimesulide, with an absence of hepatotoxicity or nephrotoxicity.

Keywords: *Morus alba*. Anti-inflammatory. Moraceae. Toxicity. Model of inflammation.

REFERÊNCIAS

Asano N, Yamashita T, Yasuda K, Ikeda K, Kizu H, Kameda Y, Kato A, Nash RJ, Lee HS, Ryu KS. Polyhydroxylated alkaloids isolated from mulberry trees (*Morus alba* L.) and silkworms (*Bombyx mori* L.). J Agric Food Chem. 2001;49(9):4208-13.

Bailey PJ. Biochemical study of the cotton pellets granuloma in rats. Biochem Pharmacol. 1982;31(7):1213-18.

Birt DF, Hendrich S, Wang W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. Pharmacol Ther. 2001;90(2-3):157-77.

Cronquist A. An Integrated System of Classification of Flowering Plants. New York: Columbia University Press; 1981.

Dalmora MEA. Interação do piroxicam com microemulsão catiônica e β-ciclodextrina: Formulação *in vitro* e avaliação biológica. [Dissertação]. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, UFSM; 1996.

Farmacopeia dos Estados Unidos do Brasil. 2 ed. São Paulo: Siqueira; 1959.

Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. Pharmacol Ther. 2002;96(2-3):67-202.

Joly AB. Introdução à Taxonomia Vegetal. São Paulo: Câmara Brasileira do Livro; 1975.

Kim HB, Choung WY, Ryu KS. Sensory characteristics and blood glucose lowering effect of ice-cream containing mulberry leaf powder. Korean J Seric Sci. 1999:129-134.

Kimura T, Kiyotaka N, Yuko S, Kenji Y, Masahiro S, Kohji Y, Hiroshi S, Teruo M. Determination of 1 Deoxynojirimycin in Mulberry Leaves Using Hydrophilic Interaction Chromatography with Evaporative Light Scattering Detection. J Agric Food Chem. 2004;52(6):1415-18.

Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. Princípios de bioquímica. Tradução de WR Loodi, AA Simões. 4 ed. São Paulo: Sarvier; 1995.

Martin DW, Mayes PA, Rodwell YW. Harper's Review of Biochemistry. California: Lange Medical; 1981.

Meier R, Schuler W, Desaulles PL. Unisc Acid: tumor inhibitor isolated from Lichens. Experimentia. 1975;31(6):625.

Niemegeers CJE, Awouters F, Lenaerts FM, Janssey AJ. The activity of suprofen on nystatin-induced paw oedema in rats. Arzneimittelforschung. 1975;25(10):1516-19.

Nomura T, Hano Y. Isoprenoid-substituted phenolic compounds of moraceus plantas. Nat Prod Rep**.** 1994;11(2):205-18.

Padilha MM, Vilela FC, Rocha CQ, Dias MJ, Soncini R, Santos MH, Alves da Silva G, Giusti-Paiva A. Antiinflammatory properties of Morus nigra leaves. Phytother Res. 2010; 24(10):1496.-

Pereira CB, Necchi RMM, Casoti R, Maki TDT, Marin A, Manfron MP. Análise Fitoquímica Qualitativa das folhas *Morus alba.* In: 3. Jornada Interdisciplinar em saúde; 2010; Santa Maria: Universidade Federal de Santa maria; 2010..

Setty SR, Quereshl AA, Swamy V, Patil T, Prakash T, Prabhu K, Gouda AV. Hepatoprotective activity of *Calotropis procera* flowers against paracetamol-induced hepatic injury in rats. Fitoterapia. 2007;78(7-8):451-4.

Silva EJR, Aguiar FJS, Gonçalves ES, Sousa IMV, Dimech GS, Fraga MCCA, Coelho MCOC, Almir GW. Avaliação do tratamento subcrônico com o extrato hidroalcoólico de *Calendula officinalis* L. sobre os parâmetros bioquímicos e hematológicos em ratas Wistar. Rev Bras Farmacogn. 2005;15(2):88-93.

Spector, W.G. The granulomatous inflammation exudates. Intern R Exp Phatol. 1969; 8:1-55.

Winter CA, Risley EA, Nuss GW. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. Proc Soc Exp Biol. 1962;111:544-7.

Recebido em 30 de abril de 2012

Aceito para publicação em 24 de julho de 2012