

Extrato de *dioclea grandiflora* (olho de boi) no processo de cicatrização

Gabriela Oliveira Xavier

Amanda Silva

Bruno Bordino

Rodrigo Sabino

Carlos Rocha Oliveira

Valeria Maria de Souza Antunes

Registro DOI: <http://dx.doi.org/10.22280/revintervol12ed3.420>

Resumo

O olho de boi (*Dioclea grandiflora*) é uma planta encontrada no cerrado e na caatinga do nordeste brasileiro, da família Fabacea. Grande parte da população de cidades nordestinas, principalmente famílias que tem mais acesso ao cerrado, tem utilizado as raízes e principalmente as sementes desta planta. O objetivo do presente trabalho foi aprofundar e verificar as informações passadas pela população e o que se tem hoje na literatura. Nessa perspectiva, foi necessário avaliar a atividade cicatrizante e o doseamento do teor de colágeno do extrato bruto obtido das cascas das sementes de “olho de boi” (*Dioclea grandiflora*) em fibroblastos humanos de recém-nascido do sexo masculino. A proliferação das células ocorreu após o tratamento com diferentes concentrações de extrato hidroalcolólico por 24 horas. O método desenvolvido teve como base todos os experimentos passarem pelo teste de viabilidade celular aplicando o corante azul de tripano e análise e interpretação em câmara hemocitométrica por microscopia, para a verificação da atividade cicatrizante, antioxidante e a presença de metabólitos secundários na semente. Foi um método preciso e de fácil execução. Além disso, é importante mostrar o quanto a biodiversidade brasileira traz de benefícios e avanços para pesquisas no setor de fitoterapia se realizados com ética e seriedade.

Palavras-chave: Atividade cicatrizante. *Dioclea grandiflora*. Corante azul de tripano.

***Dioclea grandiflora* extract (bullseye) on the healing process**

Abstract

The “olho de boi” (*Dioclea grandiflora*) is a plant found in the cerrado and catinga of northeast Brazil, of the Fabacea family. Most of the population of northeastern cities, mainly families that have more access to the cerrado, have used the roots and mainly the seeds of this plant. The objective of the present work was to deepen and verify the information passed by the population and what is today in the literature. In this perspective, it was to evaluate the cicatrizant effect and the determination of the collagen content of the crude extract from the bark of the “olho de boi” (*Dioclea grandiflora*) seeds in human newborn male fibroblasts. Cell proliferation occurred after treatment with different concentrations of hydroalcoholic extract for 24 hours. The method developed was based on all the experiments passed through the cell

viability test using trypan blue dye, analysis, and interpretation in hemocytometric chamber by microscopy. It was a precise and easy-to-execute method. In addition, it is important to show how Brazilian biodiversity brings benefits and advances to research in the phytotherapy sector with ethics and seriousness

Key-words: Cicatrizant effect. Collagen. Dioclea grandiflora. Trypan blue dye. Hemocytometric chambre.

Recebido em 14/12/2018 Aceito em 24/04/2019

1 INTRODUÇÃO

O processo natural de cicatrização do corpo inicia-se após uma lesão com eventos bioquímicos para reparar o dano causado. Tais eventos são diferenciados em algumas fases que desencadeiam mediadores bioquímicos responsáveis por algumas funções específicas. (LIMA et al., 2012). Sua fase inicial, homeostasia, ocorre logo após o ferimento com a atividade plaquetária e a cascata de coagulação com intuito de reduzir a perda sanguínea.

Após formado o coágulo de fibrina, os mediadores do processo inflamatório recrutam neutrófilos e macrófagos que secretam fatores bioquímicos específicos para inflamação, seus principais são: leucócitos polimorfonucleares, macrófagos derivados de monócitos. Na formação do tecido de granulação, ocorre proliferação de fibroblastos responsáveis na reparação do tecido conjuntivo e do epitélio. Com a transformação do fibrinogênio em fibrina, os fibroblastos iniciam secreção e sínteses de componentes da matriz extracelular junto ao crescimento dos capilares, ou seja, iniciam a formação do tecido conjuntivo. Com a migração dos queratinócitos ocorre a epitelização, fase final deste processo, que tem função de fechar as superfícies da lesão. (OLIVEIRA e DIAS, 2012).

Na última fase da cicatrização ocorre o remodelamento da cicatriz, age especificamente no colágeno e matriz. Nesta fase os componentes presentes no processo, são transformados em novos tecidos maduros, justamente pela diminuição da atividade celular e de vasos sanguíneos, levando a perda de células que estavam presentes nas etapas anteriores e aumento da síntese de colágeno (EBELING, 2014).

Ativos comuns em formulações cosméticas e medicamentosas contendo ativos hidratantes, antioxidantes, peeling químico são utilizados como coadjuvantes no tratamento de cicatrizes. Dentre eles podemos citar: Ácido hialurônico, Ácido glicólico, Ácido lático, Ácido salicílico, Silicium P, Vitamina C e Vitamina E. Estas substâncias são as mais comuns e utilizadas como potentes antioxidantes, ajudam a manter o equilíbrio natural da pele, agem como redutores de

oxigênio, impedem sua atividade oxidativa, inibem a formação de radicais livres ou restringindo sua atividade através do sequestro dessas partículas instáveis (REISH, 2008).

Adicionalmente aos medicamentos convencionais, os fitoterápicos podem ser uma alternativa interessante como coadjuvantes para benefício em diferentes fases da cicatrização de feridas. Mais de 80% da população mundial continua a depender de medicamentos tradicionais para várias doenças de pele (SHAMUGA, 2002).

Algumas espécies vegetais podem ser utilizadas como auxílio no processo de cicatrização como: Arnica (*Arnica montana L.*), capaz de promover a liberação de NO, TNF- α , IFN- γ e IL-6 (MARCIA, 2006). Contudo, a planta cultivada no Brasil, não tem as mesmas aplicações do que na Europa, pelo motivo de ter um cultivo diferente já que são climas e condições idênticas ao nosso país.; e Calêndula (*Callendula officinalis*) que pode ser utilizada para diversas funções e diferentes formas, tanto para uso interno como externo (PLANTAMED, 2010). “*Tem ação cicatrizante, antisséptica, sudorífica, analgésica, colagoga, anti-inflamatória, antiviral, antiemética, vasodilatadora e tonificante da pele*”. (HAMBURGER et al., 2003; GAZIM et al., 2007).

A *Dioclea grandiflora Mart. ex Benth.*, é uma planta que também pode ser utilizada no processo de cicatrização. Pertencente à família Fabaceae é tradicional das regiões da Caatinga e do Serrado do Nordeste do Brasil. É um cipó vigoroso que origina um fruto que é uma vagem rígida que abriga de três a quatro sementes grandes conhecidas popularmente como “olho-de-boi”, mucunã e mucunã-de-carço. (MAXWELL, 1969).

O presente trabalho tem como objetivo analisar a ação biológica, os indicadores científicos das propriedades químicas presente na semente, a ação proliferativa das células, determinação do teor de colágeno e a atividade cicatrizante (potencial para regeneração cutânea) dos extratos e frações obtidas da casca da semente da *Dioclea grandiflora*, na pele. Além disso, traz uma análise fitoquímica da semente, a presença de fenóis totais, flavonoides e atividade antioxidante.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Delineamento experimental

O Trabalho de Conclusão de Curso foi desenvolvido no laboratório de Biologia Molecular e Cultura de Células da Escola de Ciências da Saúde da Universidade Anhembí. A linhagem de fibroblastos CCD – 1072 Sk, que corresponde a fibroblastos humanos de recém-nascido do sexo masculino, fornecida pela organização ATCC (<http://www.atcc.org>), foi

submetida ao tratamento com diferentes concentrações de extrato bruto hidroalcoólico de *Dioclea grandiflora*, encontrado em São Gonçalo, Ipueiras – Ceará, na (Latitude UTM: 298324.27m e Longitude UTM: 9494339.55 m S) - Universal Transversa de Mercator. Após os tratamentos foram realizadas avaliações da viabilidade celular do composto testado frente à linhagem CCD - 1072Sk.

Cultura celular

As células da linhagem CCD - 1072Sk foram cultivadas em meio ISCOVE´S com 10% de soro fetal bovino, 0,292 g/l de L-glutamina, 1,0 g/l de D-glicose, 2,2 g/l de NaHCO₃, 10.000UI de Penicilina e 0,060 g/l de Estreptomicina. As células foram mantidas em frascos de 25 cm² (1 × 10⁵ cells/mL) em estufa úmida com atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C. Em todos os experimentos as culturas de fibroblastos foram submetidas ao teste de viabilidade celular utilizando o corante azul de tripano e foi realizada a leitura em câmara hemocitométrica por microscopia óptica. Todos os experimentos descritos foram realizados quando a viabilidade celular for igual ou superior a 95%.

Avaliação da citotoxicidade (determinação do IC50)

A citotoxicidade do extrato bruto hidroalcoólico de *Dioclea grandiflora* foi realizada pelo método de incorporação do corante azul de tripano, onde após 24, 48 e 72 horas de incubação com concentrações de 1 à 5 mg/ml do extrato e controles positivos utilizando ácido ascórbico, o conteúdo de cada poço das culturas de fibroblastos foram recolhidos em tubos de 15 mL, e centrifugados a 1500 rpm por 5 minutos. Os pellets foram ressuspensos em 1 mL de meio ISCOVE´S. Após isso, as soluções de células foram diluídas (1:2) em corante de azul de tripano e a contagem das células viáveis e inviáveis foram realizadas em câmara hematocitométrica por microscopia óptica. A soma da contagem de células totais (viáveis e inviáveis de cada poço) foram consideradas como 100% de células, sendo realizados os cálculos para verificar as porcentagens correspondentes às células viáveis e as inviáveis analisadas no experimento.

Ensaio de redução MTT à formazan.

O teste de redução MTT ([3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)2,5-Difenil Brometo de Tetrazólio) foi usado com grande sucesso para estimar o número de células viáveis em um screening inicial de fármacos. Sua interpretação serviu de indicativo da atividade metabólica celular, e o local de ocorrência das reações redox incluiu tanto mitocôndrias como o citosol. A redução do sal de MTT à formazan foi realizada principalmente pela enzima succinato-desidrogenase, e resultou em cristais de formazan insolúveis na cor violeta. A intensidade da coloração foi utilizada para medir a atividade mitocondrial e conseqüentemente a viabilidade celular (MOSMANN et al., 1983). Assim, às células tratadas com diferentes concentrações de extrato bruto hidroalcoólico de *Dioclea grandiflora* e na concentração 5×10^4 células por poço, foram adicionados 10 μ l da solução de MTT 5mg/ml (Sigma-Aldrich) em cada poço. Após 4 horas, a placa foi centrifugada, o sobrenadante de cada poço descartado e o pellet com os cristais formado no fundo da placa dissolvido com 100 μ L de etanol puro e em seguida homogeneizado em agitador de placas por 15 minutos. A densidade óptica foi medida pelo leitor de microplacas (FlexStation® 3 multimode benchtop reader) em 540 nm.

Sirius Red - quantificação de colágeno

As células foram cultivadas e tratadas conforme descrito anteriormente. Após cultivo, o meio foi retirado e os poços lavados três vezes com PBS 0,1M. Foram adicionados 100 μ L de Flúido de Bouin (ácido pícrico, formaldeído e ácido acético glacial) para fixação durante 1 h. As amostras foram lavadas com PBS, em seguida, adicionado o corante Sirius Red. Após o tempo de 1 h, foi removido o máximo do corante e procedendo-se a lavagem com 150 μ L de solução de ácido hidrolórico 0,01M por 30 seg para remoção do corante que não se ligou ao colágeno. Em seguida, o corante foi retirado das camadas celulares com a adição de solução de NaOH 0,1M durante 30 min. Alíquotas de 100 μ L das soluções contidas nos poços foram transferidas para uma nova placa. A absorbância foi medida em um leitor de microplacas Elx-800-UV (Bio-Tek Instruments, EUA) a 570 nm.

Análises estatísticas

Os resultados foram apresentados como média + EPM (erro padrão da média). Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística por análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido de teste a posteriori de Tukey. As semi-quantificações foram analisadas por

test t de Student. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativamente diferentes. As análises foram realizadas no programa GraphPad Prism versão 5.0.

3 RESULTADOS

De acordo com os testes de viabilidade celular com utilização de corante azul de tripano passando por leitura em câmara hemocitométrica, todos experimentos com cultura de fibroblastos obtiveram resultados iguais ou superiores a 95% (controle), ou seja, resultados positivos para o extrato da *Dioclea*. Na proliferação MTT dos fibroblastos, foram obtidos resultados semelhantes aos de viabilidade, conseqüentemente os resultados demonstraram a redução de MTT à formazan. Com último teste em fibroblastos o teor de colágeno não obteve concentração significativa para confirmação e liberação do resultado. Em análise fitoquímica ficou comprovada, no teste de DPPH, a ação cicatrizante e antioxidante pela presença de flavonoides.

Os resultados da ação biológica obtidos pelas técnicas de proliferação mostraram que o extrato hidroalcoólico de olho de boi foi capaz de aumentar o percentual de células após tratamento com diferentes concentrações, por 24 horas (figuras 1 e 2). Neste sentido, o teste de incorporação do azul de tripano permite detectar células inviáveis, que incorporam o corante por apresentarem danos na membrana corando-se em azul; enquanto que as células viáveis, por apresentarem membrana íntegra, bloqueiam a passagem do corante. Assim, após o tratamento com diferentes volumes de óleos essenciais de cravo, canela, orégano e tomilho, observou-se proliferação dos fibroblastos testados. A figura 1 mostra a representação gráfica desse resultado e ainda indica que o extrato hidroalcoólico de olho de boi apresentou maior percentual de proliferação se comparado ao controle (células sem tratamento).

Figura 1

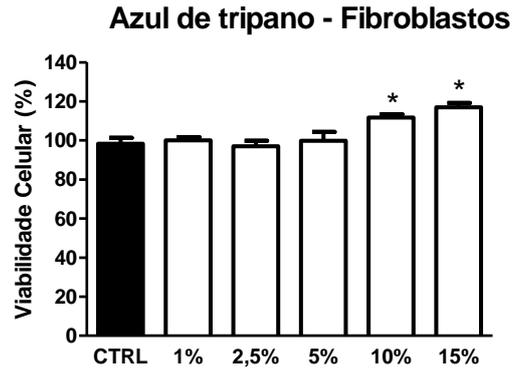


Figura 1: Percentual de viabilidade celular pela técnica de azul de tripano em linhagem de fibroblastos humanos CCD1072Sk tratadas com diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico de olho de boi por 24 horas. Antes do início dos testes, as células foram carenciadas de soro fetal bovino. (*) $P < 0,05$, significativo em relação ao grupo controle (não-tratado), ANOVA, Tukey, GraphPad Prism v5.0.

Já em relação ao teste de proliferação MTT, método que consiste em medir a viabilidade celular pela atividade enzimática mitocondrial das células vivas, a proliferação dos fibroblastos testados, também foi observada, principalmente ao analisarmos a concentração de 15% (Figura 2). Pequenas variações em relação ao teste de azul de tripano poderiam ser justificadas pelo princípio dos métodos, uma vez que no teste de MTT, mesmo com a célula estando inviável, podemos ter elementos capazes de reduzir o MTT à formazan.

Figura 2

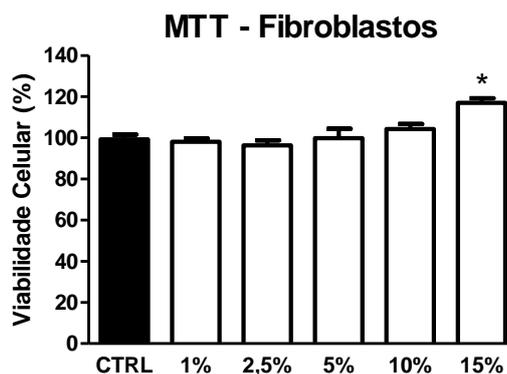


Figura 2: Percentual de viabilidade celular pela técnica de redução do MTT em linhagem de fibroblastos humanos CCD1072Sk tratadas com diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico de olho de boi por 24 horas. (*) $P < 0,05$, significativo em relação ao grupo controle (não-tratado), ANOVA, Tukey, GraphPad Prism v5.0.

Por fim, em relação à quantificação do colágeno total produzido pela linhagem de fibroblastos CCD-1072SK foi realizada pelo teste de incorporação do corante ácido Sirius Red. Os resultados mostraram que a exposição dos fibroblastos a diferentes volumes do extrato

hidroalcoólico de olho de boi, foi capaz de aumentar o conteúdo de colágeno total nos fibroblastos, embora, neste caso, nenhuma concentração testada aumentou de modo estatisticamente significativo (figura 3).

Figura 3

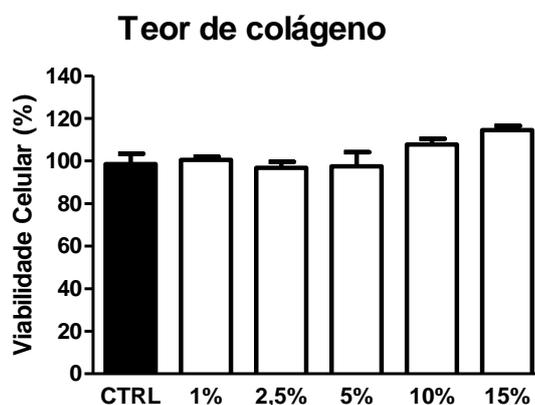


Figura 3: Teor de colágeno total pelo método sirius red em linhagem de fibroblastos humanos CCD1072Sk tratadas com diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico de olho de boi por 24 horas. (*) P<0,05), significativo em relação ao grupo controle (não-tratado), ANOVA, Tukey, GraphPad Prism v5.0.

A análise fitoquímica foi avaliada pelos seguintes métodos:

Sólidos e Solúveis

Tabela 1.

Tabela 1. Cálculo de sólidos e solúveis		
Valor real	(grama)	(mL)
	1,26667	1
	0,972	x
X =		1,2312 g/ml

Fenóis Totais

O extrato foi usado com uma diluição de 1:10 em água. Em um recipiente de 3 mL foi adicionado 200uL desta solução diluída em 1400uL de água.

Foi adicionado 160uL da solução de Sódio Carbonato-Tartarato e em seguida 240uL de Folin-Ciocalteu (Merck®), a amostra foi agitada por alguns segundos e incubada na ausência de luz por 2 horas em temperatura ambiente.

A amostra foi agitada por alguns segundos, novamente, e foi medida a absorbância em um comprimento de onda de 760nm (Cary-50 spectrophotometer, Varian-Inc, USA).

A quantidade total de fenóis (em mg/mL) é dada usando a equação linear do ácido gálico. O procedimento foi feito em triplicata representado pela Tabela 2.

Tabela 2.

No extrato			Na droga vegetal		
Média (m/V)	Desvio	Coefficiente de variação	Média (g/100g)	Desvio	Coefficiente de variação
0,00611	0,00007	1,1248	0,4966	0,0056	1,1248

Flavonoides

O extrato foi usado com uma diluição de 1:5 em metanol. No mesmo recipiente de 3mL foi adicionado 100uL do extrato diluído em 1500uL de Metanol.

Em seguida foi adicionado 400uL de Cloreto de Alumínio em uma concentração de 5% e agitada por alguns segundos. A solução foi incubada por 30 minutos na ausência de luz em temperatura ambiente.

A amostra foi agitada, novamente, por alguns segundos e foi medida a absorbância em um comprimento de onda de 425nm.

A quantidade de flavonoides (em mg/mL) foi determinada usando a equação linear da quercetina. O procedimento foi realizado em triplicata representado na Tabela 3.

Tabela 3

Tabela 3. Resultados de fenóis totais em triplicata utilizando equação linear do ácido gálico.

No extrato			Na droga vegetal		
Média (m/V)	Desvio	Coefficiente de variação	Média (g/100g)	Desvio	Coefficiente de variação
0,00588	0,00045	7,6955	0,4035	0,0311	7,6955

Atividade Antioxidante (DPPH)

A atividade do extrato de olho de boi contra os radicais livres foi realizada usando o DPPH (1,1-diphenyl- 2-picrylhydrazyl radical). A atividade de captura dos radicais livres do DPPH pelos compostos fenólicos foi avaliada seguindo os métodos de Brand-Willians et al. (1995) com algumas modificações.

O extrato foi diluído para que a concentração de sólidos e solúveis se igualasse a 0,1%. Com o extrato na concentração ideal, foi feita uma curva de decaimento dos radicais livres, em que a Abs inicial = 0,7300 (aproximadamente).

A curva foi feita com onze recipientes de 3mL com o aumento gradativo de 40uL de extrato a 0,1%, ou seja, o primeiro recipiente possuía 1000uL de etanol e 0uL de extrato, o segundo, 960uL de etanol e 40uL de extrato, e assim sucessivamente.

Após o preparo dos recipientes, foi adicionado 1000uL de DPPH em cada um deles com a diferença de 1 minuto por recipiente, e incubado por 30 minutos em temperatura ambiente na ausência de luz.

O Decaimento da absorbância foi medido em 517nm, e a CE50 (Metade da Concentração Inibitória Máxima) foi calculada com uma regressão não linear por plotagem de Log (concentração) versus a porcentagem de inibição com Graph Pad Prism 6 representado na Tabela 4.

Tabela 4

Tabela 4. Análise de DPPH utilizando cálculo com uma regressão não linear por plotagem de Log (concentração) versus a porcentagem de inibição com Graph Pad Prism 6 para estabelecer a concentração de absorbância contra inibição do agente utilizado na ação antioxidante.

Concentração (µg/mL)	Concentração (%)	Desvio Padrão
----------------------	------------------	---------------

0	100	0
20	95,18	0,1689
40	83,03	0,5206
60	72,73	0,2607
80	63,62	2,1331
100	51,12	0,3613
120	36,65	0,2659
140	34,56	0,3979
160	21,28	0,0242
X = CE50 =	103,59	microgramas/mL

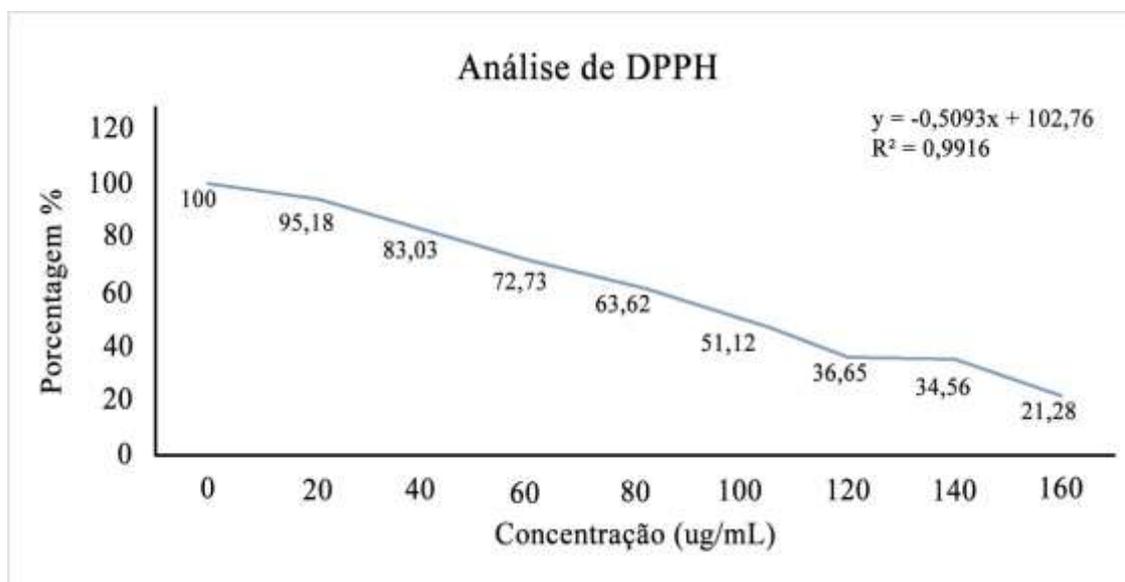


Gráfico representativo da análise de DPPH demonstrando as variações de regressão da porcentagem em relação a concentração de absorbância de antioxidante em microgramas/mL.

Cromatografia (HPLC)

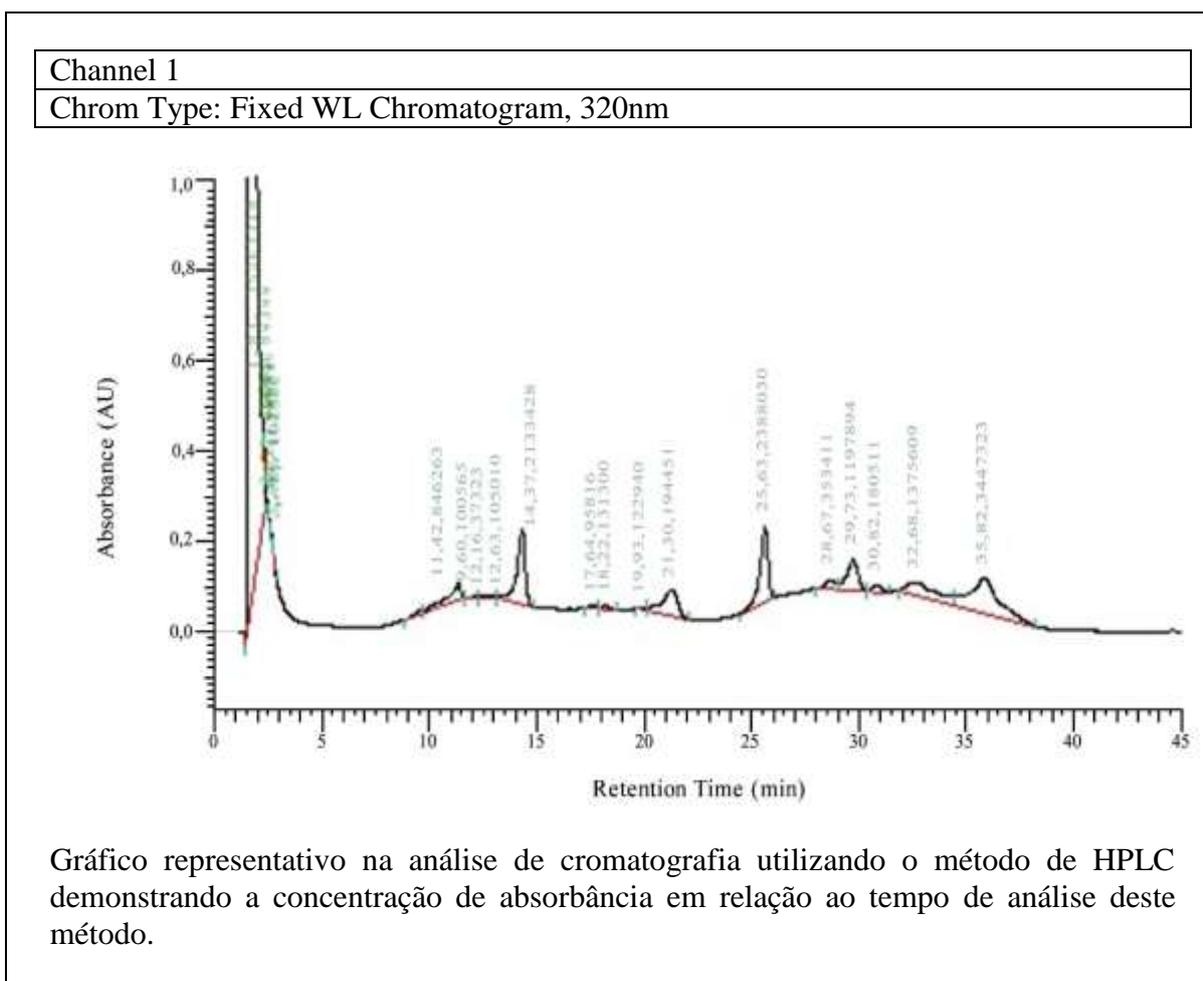
Condições Cromatográficas: HPLC LaChrom série L7100 com detector de rede diodos série L7455 da Merck e Hitachi (Alemanha).

Coluna C18 Lichrocart 125-4mm, 5 micrometros, solvente A água acidificada com ac. Fórmico a 5% e solvente B metanol.

O volume de injeção foi de 120 µl, detecção em 320 nm, consistindo de um gradiente iniciando-se com 100% de A, 5 minutos 80% de A, 21 minutos 70% de A e 34 minutos 100% de A, o fluxo é 0,8ml/minuto, tempo de corrida 45 minutos representado na tabela 5.

Tabela 5

Tabela 5. Análise de Cromatografia			
Analyzed:	09/18/18 01:48 PM	Reported:	09/18/18 03:54 PM
System Name:	Sistema 1		
Proc. Method:	Proj4ervasNOV2010		
Application:	Métodos 2009	Series:	1208
Vial Number:	4	Sample Name:	Olho de Boi
Vial Type:	UNK	Volume:	100,0 µL
Injection from vial:	1 of 1	Sample Description:	



4 CONCLUSÃO

Podemos concluir que, a partir das concentrações testadas, o extrato de olho de boi foi capaz de aumentar a proliferação dos fibroblastos testados, quando comparados às células do grupo controle (células não tratadas). Além disso, no teste de DPPH, mesmo resultando em uma quantidade não muito grande de flavonoides, a mesma foi muito significativa, pois justificou a atividade cicatrizante e antioxidante da semente. Futuros trabalhos deverão ser conduzidos para elucidar o real mecanismo proliferativo deste extrato, bem correlacionar sua ação proliferativa a um ou mais metabólitos secundários que possam estar presentes no referido extrato.

REFERÊNCIAS

- QUEIROZ, L.P. Dioclea in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Atualizada em: 24/02/2015. Acesso em: 210/2018. Dioclea Kunth, 2. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB22941>>.
- MAXWELL, R.H. The genus Dioclea (Fabaceae) in the New World. Illinois. Southern Illinois University, 1969.
- ILLANNA PRISTO. Cicatrização de feridas: Fases e fatores de influência. Rio Grande do Norte. Universidade Federal Rural do Semi-Árido. (2012).
- FERREIRA, E. C.; SILVA, J. L. L.; SOUZA, R. F. As propriedades medicinais e bioquímicas da planta *Stryphnodendron adstringens*, “barbatimão”. PMBPSAB. 10/03/2013. 14 a 32 DOI: 10.25242/886831120139.
- HERNANDES, L. MARQUES DA S. P. L, PALAZZO F., CARLOS P. DE MELLO, J. Wound-healing evaluation of ointment from *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) in rat skin. Brazil Journal of Pharmaceutical Sciences, 24/03/2010, V 46, n 3.
- FERREIRA, E. C.; SILVA, J. L. L.; SOUZA, R. F. As propriedades medicinais e bioquímicas da planta *Stryphnodendron adstringens* “barbatimão”. Perspectivas online: Biológicas & Saúde, v.11, n.3, p. 14-32, 2013.
- LEACH J. M., *Calendula officinalis* and Wound Healing: A Systematic Review, Wounds, 08 de agosto de 2018, v 20.
- ROQUE, A.A.; ROCHA, R.M.; LOIOLA, M.I.B. Uso e diversidade de plantas medicinais da Caatinga na comunidade rural de Laginhas, município de Caicó, Rio Grande do Norte (Nordeste do Brasil). Revista Brasileira de Plantas Medicinais, Botucatu, 2010, v.12, n.1, p.31-42.
- LEITE N. S, LIMA A. et al. Avaliação das atividades cicatrizante, anti-inflamatória tópica e antioxidante do extrato etanólico da *Sideroxylon obtusifolium* (quixabeira). Revista Brasileira de plantas medicinais, Campinas, 2015, vol.17, n.1, p 164-170.