



Abanico Veterinario. Janeiro-Dezembro 2023; 13:1-14. <http://dx.doi.org/10.21929/abavet2023.9>  
Artigo Original. Recebido:27/05/2021. Aceito:28/04/2023. Publicado:02/06/2023. Chave:e2021-32.  
<https://www.youtube.com/watch?v=dJBhroMsr9E>

## ***Salix babylonica*: uma fonte de compostos ativos para o tratamento de doenças inflamatórias em animais**

*Salix babylonica* a source of active compounds for the treatment of inflammatory diseases in animals



Ojeda-Ramírez Deyanira<sup>ID</sup>, Rivero-Perez Nallely<sup>ID</sup>, Ocampo-López Juan<sup>ID</sup>, Zaragoza-Bastida Adrian<sup>ID</sup>, Sosa-Gutiérrez Carolina<sup>ID</sup>, Peláez-Acero Armando\*<sup>ID</sup>

Área Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Av. Universidad Km 1, Ex-Hda. de Aquetzalpa, 43600 Tulancingo, Hidalgo, México. \*Autor responsável e para correspondência: pelaeza@uaeh.edu.; Área Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Av. Universidad Km 1, Ex-Hda. de Aquetzalpa, 43600 Tulancingo, Hidalgo, México. Tel.: 01 771 717 2000. E-mail: dojeda@uaeh.edu.mx, nallely\_rivero@uaeh.edu.mx, jocampo@uaeh.edu.mx, adrian\_zaragoza@uaeh.edu.mx, carolina\_sosa@uaeh.edu.mx, pelaeza@uaeh.edu.mx

### RESUMO

O bem-estar dos animais terrestres descreve as expectativas da sociedade em relação às condições que os animais devem experimentar quando estão sob controle humano. Esses princípios incluem que os animais devem estar livres de dor, lesões e doenças. A inflamação é um mecanismo de defesa do hospedeiro contra infecções bacterianas ou virais, ou lesões físicas ou químicas no hospedeiro. Os metabólitos secundários de plantas são uma alternativa eficaz para o tratamento de doenças inflamatórias. O objetivo desta pesquisa foi avaliar a capacidade anti-inflamatória de um extrato hidroalcoólico de folhas de *Salix babylonica* (HESB) usando o modelo de edema atrial induzido por TPA em camundongos. O HESB apresentou boa atividade anti-inflamatória sem diferença estatística significativa com o medicamento de referência, a indometacina. Por esse motivo, foi realizada uma bipartição do HESB, obtendo-se uma fração aquosa (AFSB) com atividade farmacológica leve ( $30,64 \pm 3,03$  %) e uma fração orgânica (EAFSB) que apresentou o melhor efeito anti-inflamatório ( $67,08 \pm 7,15$  %). Anteriormente, identificamos os flavonoides anti-inflamatórios luteolina e luteolosídeo como os principais componentes da EAFSB, de modo que o efeito anti-inflamatório da *Salix babylonica* pode ser atribuído a esses compostos. Além disso, a análise histopatológica mostrou que as orelhas de camundongos tratados com *Salix babylonica* suprimiram a infiltração de neutrófilos no local da inflamação. Esses resultados apoiam o uso etnomédico dessa planta e fornecem evidências para o possível uso da *Salix babylonica* no tratamento do processo inflamatório em animais.

**Palavras-chave:** *Salix babylonica*, efeito anti-inflamatório, neutrófilos.

### ABSTRACT

The wellbeing of terrestrial animals describes society's expectations for the conditions animals should experience when under human control. These principles include that animals must be free from pain, injury and disease. Inflammation is a host's defensive mechanism against bacterial or viral infection and physical or chemical stimulus to the host. Metabolites from plants are an efficient alternative for treatment of inflammatory diseases. The purpose of this research was to evaluate the anti-inflammatory capacity of a hydro-alcoholic extract from *Salix babylonica* leaves (HESB) employing the auricular edema induced by the



TPA model in mice. The HESB showed good anti-inflammatory activity without significant difference from the reference drug, indomethacin. For this reason, a bipartition of HESB was conducted, obtaining an aqueous fraction (AFSB) with slight activity ( $30.64 \pm 3.03$  %) and an organic fraction (EAFSB), which showed the best anti-inflammatory effect ( $67.08 \pm 7.15$  %). Previously, we identified anti-inflammatory flavonoids luteolin and luteoloside as the major components of EAFSB. In addition, histopathological analysis showed that mouse ears treated with *Salix babylonica* suppressed neutrophil infiltration into the inflammation site. These results support the ethno-medical use of this plant and evidenced that *Salix babylonica*'s applicability and value as an anti-inflammatory treatment for animals.

**Keywords:** *Salix babylonica*, anti-inflammatory effect, neutrophils.

## INTRODUÇÃO

Atualmente, há uma preocupação pública crescente com o tratamento de animais cativos e domesticados, incluindo animais selvagens, de laboratório, de fazenda, de trabalho, de zoológico e de companhia (Webb *et al.*, 2019). O bem-estar animal é uma questão complexa e multifacetada com dimensões científicas, éticas, sociais, religiosas, culturais, políticas e econômicas. De acordo com o American College of Animal Welfare: "O bem-estar animal refere-se ao estado do animal. A avaliação do bem-estar inclui a consideração da saúde, do comportamento e da função biológica do animal"; portanto, qualquer coisa que contribua para o estado normal de um animal ou o deprecie afeta seu bem-estar (Castle *et al.*, 2016). Por outro lado, a saúde se refere ao estado dos sistemas do corpo que combatem patógenos, danos aos tecidos ou distúrbios fisiológicos; em outras palavras, é o estado de um animal em relação às suas tentativas de enfrentar a patologia. Como tal, é um componente importante do bem-estar animal (Broom, 2011).

O processo inflamatório é uma síndrome comum a várias situações patológicas dos mamíferos. Ele resulta na resposta local ou sistêmica do organismo contra estímulos externos prejudiciais de tipo microbiano, químico ou físico. O objetivo é eliminar o agente causador, bem como reparar o tecido danificado e manter a homeostase. Esse processo pode ser dividido em duas fases: aguda, caracterizada por vasodilatação local e aumento da permeabilidade capilar; e crônica, caracterizada por uma maior resposta imunológica, degeneração tecidual e fibrose (Kumawat *et al.*, 2012). Durante a resposta inflamatória, mediadores pró e anti-inflamatórios são sintetizados e secretados. Essas são substâncias que têm efeito direto sobre as células inflamatórias e os vasos sanguíneos ou que intervêm em reações que geram compostos que atuam nessas células. Entre os mediadores inflamatórios e as vias celulares estão as citocinas (por exemplo, interferons, interleucinas e fator de necrose tumoral  $\alpha$ ), quimiocinas (por exemplo, proteína quimioatraente de monócitos 1), eicosanoides (por exemplo, prostaglandinas e leucotrienos) e o potente fator de transcrição modulador da inflamação fator nuclear  $\kappa$ B (Azab *et al.*, 2016). A maioria dessas moléculas é derivada dos componentes fosfolipídicos das membranas celulares, que são liberados como resultado de sua destruição (Kumawat *et al.*, 2012).



Ao longo dos milênios, as plantas medicinais têm sido usadas para cuidar da saúde humana e animal, pois possuem uma grande diversidade de metabólitos secundários, como terpenos, alcaloides e flavonoides, que têm várias propriedades biológicas (Mayer *et al.*, 2014; Miara *et al.*, 2019; Starlin *et al.*, 2019). Além disso, a preferência pelo uso de plantas medicinais ou fitofármacos obtidos a partir delas continua a aumentar, pois não apresentam efeitos colaterais ou estes são mínimos (Mayer *et al.*, 2014; Miara *et al.*, 2014; Starlin *et al.*, 2019; Laudato & Capasso, 2013).

O gênero *Salix*, pertencente à família Salicaceae, tem sido usado desde os tempos antigos para o tratamento de febre, dor e inflamação. Para esses fins, a casca de *Salix alba* e *Salix nigra*; as flores de *Salix caprea* e as partes aéreas de *Salix canariensis* demonstram uma resposta contra inflamatória (Drummond *et al.*, 2013; Gutiérrez *et al.*, 2017; Sharma *et al.*, 2011; Gyawal *et al.*, 2013; Ahmed *et al.*, 2011).

A *Salix babylonica*, comumente conhecida como salgueiro-chorão, é a espécie mais conhecida dos salgueiros, distribuída em algumas áreas da Ásia, Europa e América. Ela tem sido usada como planta ornamental e medicinal (González-Alamilla *et al.*, 2019). Na medicina tradicional, a ingestão de uma infusão de folhas de salgueiro-chorão permite o alívio de dores, sejam elas reumáticas, musculares, de cabeça, de ouvido ou de dente, entre outras (Waizel-Bucay, 2011). Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade anti-inflamatória *in vivo* de um extrato hidroalcoólico das folhas de *Salix babylonica* e identificar os compostos responsáveis por essa atividade.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Considerações gerais

Os solventes foram eliminados com um evaporador rotativo Büchi (Flawil, Suíça). Acetona, acetato de etila, etanol, 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) e indometacina foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA).

### Material vegetal

As folhas de *Salix babylonica* foram coletadas durante o período de junho a agosto de 2018 em Tulancingo de Bravo, Hidalgo, México (20°50'09" N 98°21'48" W). Para a identificação da planta, o Herbário da UNAM (Universidad Nacional Autónoma de México, Cidade do México, México) foi consultado, e o espécime vegetal foi identificado como *Salix babylonica* L. (IBUNAM: MEXU: 9744). O material vegetal foi seco no escuro, em temperatura ambiente, por três semanas. Em seguida, o material vegetal foi moído em um liquidificador elétrico.



## Preparação do extrato

O material seco e moído (1,5 kg) foi extraído por maceração com etanol: água (60:40 v/v) por um período de 1 dia e foi repetido três vezes. Todas as extrações foram realizadas usando proporções de 1:3 de material vegetal/solvente. O solvente foi eliminado por destilação com pressão reduzida em um evaporador rotativo. O extrato foi armazenado a 4 °C até seu uso.

## Atividade anti-inflamatória

A atividade anti-inflamatória do extrato e das frações foi estudada pelo método de inflamação aguda em orelhas de camundongos induzidos com TPA, conforme descrito por Rivero-Pérez *et al.*, (2016). Camundongos CD-1 machos adultos com peso corporal de 20-25 g foram agrupados (cinco indivíduos por grupo). Os camundongos foram mantidos em condições laboratoriais padrão a 22 °C ± 3 °C, 70 % ± 5 % de umidade, ciclo claro/escuro de 12 horas e comida/água *ad-libitum*. Os camundongos tiveram pelo menos uma semana para se adaptar ao ambiente do laboratório antes de iniciar os experimentos. Os experimentos foram realizados de acordo com a Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 Guidelines (Technical Specifications for the Production, Care, and Use of Laboratory Animals), e o protocolo foi aprovado pelo Comitê Institucional de Diretrizes Éticas para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais da Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (ICSa/CIEQUAL/001/2018).

A inflamação da orelha dos animais foi induzida com 2,5 µg de TPA dissolvidos em 20 µL de acetona aplicados na superfície interna e externa da orelha direita para causar edema. Doses de amostra de 3,2 e 1 mg/ouvido dos extratos e frações, respectivamente, foram aplicadas topicamente. O medicamento anti-inflamatório indometacina foi usado como controle positivo e foi administrado a 0,5 mg/ouvido. O SBHE e o AFSB foram dissolvidos em água destilada, o AEFBS em EtOH:água (1:1 v/v) e a indometacina em acetona. Um grupo de controle negativo recebeu acetona e outro EtOH:água (1:1 v/v) como veículo. Todos os tratamentos foram aplicados topicamente na orelha direita imediatamente após a aplicação de TPA. Seis horas após a aplicação das doses, os animais de cada tratamento foram sacrificados por deslocamento cervical. Seções circulares de 6 mm de diâmetro foram retiradas das orelhas tratadas (t) e não tratadas (nt), que foram pesadas para determinar a inflamação.

A porcentagem de inibição foi determinada usando a seguinte equação:

$$\text{Inibição \%} = \left( \Delta w_{\text{controle}} - \Delta w_{\frac{\text{tratamento}}{\Delta w}} \right) \times 100$$



Onde  $\Delta w = wt - wnt$ , sendo  $wt$  o peso da seção da orelha tratada e  $wnt$  o peso da seção da orelha não tratada.

### Análise histológica

Após a eutanásia dos camundongos, uma amostra circular foi retirada de cada orelha (6 mm) e fixada por imersão em formaldeído a 3,8 %, em solução aquosa, tamponada com fosfato, por 24 horas. Posteriormente, as amostras foram processadas pelo método de inclusão em parafina usando um processador de tecidos automatizado Microm, modelo TP1020, cortadas em um micrótomo Leica modelo 2125RT com 4  $\mu$ m de espessura e coradas com a técnica de hematoxilina-eosina (HE) (Prophet et al., 1995). As preparações histológicas resultantes foram observadas e analisadas em um microscópio composto de campo claro Olympus, modelo BX41. Uma área representativa foi selecionada e a gravidade da inflamação foi posteriormente avaliada qualitativamente com base na infiltração de células inflamatórias. As imagens selecionadas foram capturadas com uma câmera digital MediaCybernetics, modelo Evolution VF, usando o software Image-Pro Express 6.0 (MediaCybernetics), instalado em um computador da marca Vaio com processador Pentium 4 e 1 GB de RAM.

### Análise estatística

Os resultados obtidos no teste farmacológico foram submetidos à análise de variância, seguida do teste de Tukey, utilizando-se o programa SAS, versão 9.0 (SAS, 2006).  $P < 0,01$  foi considerado significativamente diferente.

## RESULTADOS

### Atividade anti-inflamatória *in vivo*

A capacidade anti-inflamatória do extrato hidroalcoólico das folhas de *Salix babylonica* (HESB) e suas frações menos complexas AFSB e EAFSB foram avaliadas no modelo de edema auricular induzido por TPA em camundongos na dose de 3,2 e 1 mg/oreia, respectivamente. Todos os tratamentos foram significativamente diferentes ( $P < 0,01$ ) do grupo de controle negativo, e a SBHE e a EAFSB não apresentaram diferença estatística significativa com o medicamento de referência (indometacina) ou entre eles (Tabela 1).

**Tabela 1. Atividade anti-inflamatória de extratos e frações das folhas de *Salix babylonica***

Tratamento	Dose (mg/oreia)	% de inibição da inflamação $\pm$ EPM
Extrato hidroalcoólico das folhas de <i>S. babylonica</i> (SBHE)	3.2	66.92 $\pm$ 3.20 <sup>a</sup>
Fração aquosa de SBHE (AFSB)	1	30.64 $\pm$ 3.03 <sup>b</sup>
Fração orgânica da SBHE (EAFSB)	1	67.08 $\pm$ 7.15 <sup>a</sup>
Indometacina	0.5	79.54 $\pm$ 6.16 <sup>a</sup>
Controle negativo	0	0 <sup>c</sup>

Diferentes literais na coluna mostraram diferenças significativas ( $P \leq 0,01$ ) entre os compostos avaliados. EPM: erro padrão da média



## Análise histológica

A aplicação tópica de TPA por 6 horas induziu uma resposta inflamatória aguda no nível da derme da orelha dos camundongos e foi observado um aumento acentuado na população de neutrófilos (Figura 1). Não foram observadas alterações na epiderme. Além disso, quando apenas a acetona (veículo do TPA) foi aplicada, essa reação não foi observada, mas manteve a aparência normal da derme, particularmente entre as fibras de colágeno e os fibrócitos/fibroblastos. Da mesma forma, a aplicação de indometacina, do extrato hidroalcoólico de *Salix babylonica* (HESB) e da fração de acetato de etila (EAFSB) obtida do HESB, inibiu uma resposta inflamatória aguda, evidenciada pela baixa população de células inflamatórias, particularmente neutrófilos, associada à derme da pele da orelha (Figura 2).

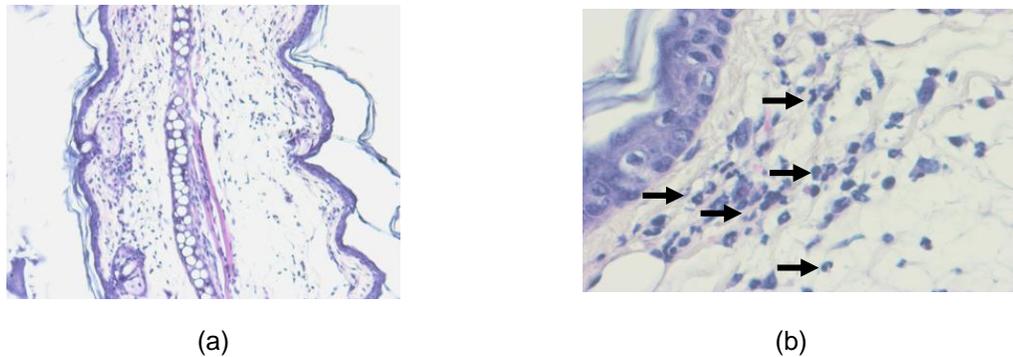


Figura 1. Pele da orelha do camundongo. H-E. 100x (a) e 400x (b). Efeito do TPA, sem a adição de anti-inflamatório. Há um aumento acentuado de neutrófilos na derme (setas, representativas de pelo menos 40 células no campo)

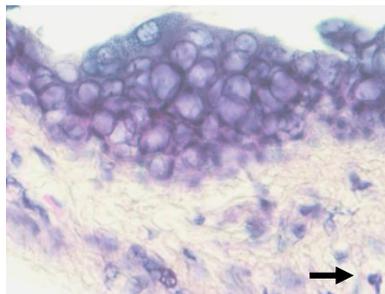


Figura 2. Pele da orelha do camundongo. H-E. 400x. Aplicação da fração orgânica do extrato hidroalcoólico de *S. babylonica*. Como pode ser visto, a presença de células inflamatórias na derme é mínima (seta)



## DISCUSSÃO

De acordo com o Código Terrestre da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), bem-estar animal significa o estado físico e mental de um animal em relação às condições em que ele vive e morre. Os princípios orientadores que informam o trabalho da OIE sobre o bem-estar dos animais terrestres incluem as "Cinco Liberdades", que descrevem as expectativas da sociedade em relação às condições que os animais devem experimentar quando estão sob controle humano, a saber: ausência de fome, desnutrição e sede; ausência de medo e angústia; ausência de estresse térmico ou desconforto físico; ausência de dor, ferimentos e doenças; e ausência de liberdade para expressar padrões normais de comportamento (OIE, 2019).

A inflamação, a resposta de um organismo a uma irritação ou lesão, é caracterizada por vermelhidão, calor, inchaço e dor. Os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) são usados para o tratamento de doenças inflamatórias. Esses compostos afetam a função ou a produção de prostaglandinas. Na medicina veterinária, os AINEs são usados para controlar, entre outras doenças, a dor e a inflamação associadas à osteoartrite em cães e cavalos, bem como a dor pós-operatória em cães e gatos. Entretanto, há riscos potenciais associados ao uso de AINEs, como úlceras/perfurações gastrointestinais e toxicidade hepática e renal (Mathews *et al.*, 2014). Portanto, a busca de novos compostos com reação contra inflamatória, sem os efeitos colaterais dos AINEs, é de vital importância para a manutenção do bem-estar animal. O uso de plantas medicinais é uma alternativa para o tratamento da dor e da inflamação em animais.

As plantas têm se mostrado fontes muito ricas de metabólitos interessantes do ponto de vista estrutural e biológico. Menos de 10 % da biodiversidade mundial foi avaliada quanto à potencial atividade biológica, e muitos outros compostos líderes naturais úteis aguardam descoberta (Gyawali *et al.*, 2013). Além disso, o interesse mundial em produtos à base de plantas cresceu significativamente. Bovinos, equinos, ovinos, caprinos e suínos representam cerca de 70 % dos animais tratados com remédios fitoterápicos, seguidos por aves (9,1 %), cães (5,3 %) e coelhos (4,3 %) (Laudato & Capasso, 2013).

Com relação ao uso de plantas para o tratamento do processo inflamatório em animais, *Geranium robertianum*, *Artemisia abrotanum*, *Brassica oleracea*, *Avena sativa*, *Anagallis arvensis*, *Linum usitatissimum*, *Scrophularia canina*, *Hypericum perforatum*, *Achillea millefolium* e *Buxus sempervirus* são usados para tratar ou prevenir a mastite em bovinos devido ao seu efeito anti-inflamatório (Mayer *et al.*, 2014; Laudato & Capasso, 2013). Além disso, a *Aloe* spp. tem sido usada para o tratamento de inflamação, dores e coceira em vários animais, enquanto o dente-de-leão e a linhaça têm sido usados para o tratamento de inflamação da glândula perianal em cães (Laudato & Capasso, 2013). *Rosa canina*, *Matricaria chamomilla*, *Glycyrrhiza glabra*, *Aegle marmelos*, *Asparagus*



*racemosus* Wild, *Argemone mexicana* Linn, *Datura metal* Linn, *Eclipta prostrata* Linn, *Moringa oleifera* Lamk, *Syzygium cumini*, *Allium cepa*, *Nerium oleander* L, *Anayclus davatus*, *Mentha pulegium* L, *Lawsonia inemis* L, *Olea europaea* L, *Ziziphus lotus* L, *Ruta graveolens* e *Ziziphus jujuba* Linn, são usados para o tratamento de diferentes doenças inflamatórias em ovinos, bovinos, caprinos, coelhos e aves (Miara *et al.*, 2019; Laudato & Capasso, 2013; Verma, 2014).

O gênero *Salix* tem sido usado no tratamento de artrite, dores menstruais, dentárias e nas costas, febres e inflamações. Os salgueiros pertencem à família Salicaceae e os registros de seu uso medicinal remontam a cerca de 6.000 anos (Drummond *et al.*, 2013; Gutiérrez *et al.*, 2017; Gyawali *et al.*, 2013). A *Salix babylonica* demonstrou atividade anti-helmíntica, antisséptica, analgésica, antipirética, antimalárica, antioxidante, anticarcinogênica, adstringente, antifúngica e antibacteriana (González-Alamilla *et al.*, 2019; Abdel Wahab *et al.*, 2018). Neste trabalho, a atividade anti-inflamatória do extrato hidroalcoólico das folhas de *S. babylonica* foi avaliada e descobrimos que ela inibiu a inflamação em  $66,92 \pm 3,20$  %, sem diferenças estatísticas significativas em relação ao medicamento de referência, a indometacina (Tabela 1).

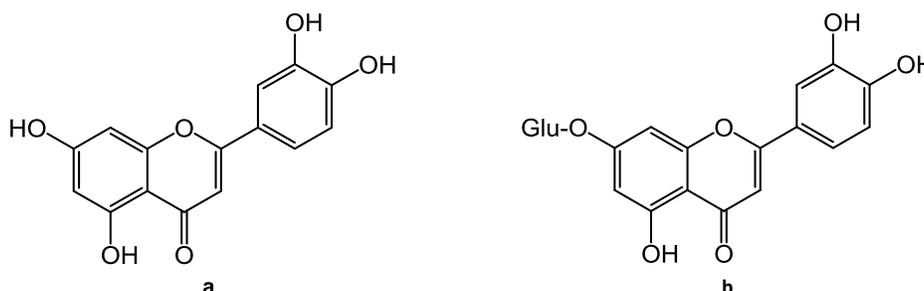
Existem alguns relatos sobre o efeito anti-inflamatório de extratos obtidos de outras espécies de *Salix*; por exemplo, Gyawali *et al.* (2013) avaliaram a capacidade anti-inflamatória de um extrato metanólico da casca de *Salix alba* usando o modelo de edema de pata induzido por formalina em ratos e encontraram uma inibição da inflamação de 74 % em uma dose de 93,5 mg/Kg. Da mesma forma, um extrato aquoso de partes aéreas de *S. canarensis*, obtido por infusão, em uma dose de 105 mg/Kg, causou uma inibição de 78 % da inflamação no mesmo modelo (Gutiérrez *et al.*, 2017). Por outro lado, Ahmed *et al.*, (2011) avaliaram os efeitos anti-inflamatórios dos extratos metanólico e hidroalcoólico de flores de *S. caprea* a 400 µg/mL, usando o método de estabilização de membrana de glóbulos vermelhos humanos (HRCB), e descobriram que esse extrato apresentou 66,78 e 60,49 % de proteção de membrana, respectivamente. No entanto, esses resultados não podem ser comparados diretamente com os obtidos neste trabalho para o extrato hidroalcoólico de *S. babylonica* (HESB), porque os extratos avaliados são de polaridade diferente, obtidos por métodos diferentes e avaliados em modelos farmacológicos diferentes.

A fim de identificar a natureza química dos compostos ativos no extrato hidroalcoólico das folhas de *S. babylonica*, foi realizado um procedimento de bipartição com solventes de água e acetato de etila. A fração aquosa da SBHE (AFSB) e a fração orgânica da SBHE (EAFSB) foram avaliadas em sua capacidade de inibir a inflamação *in vivo*. Conforme mostrado na Tabela 1, a EAFSB ( $66,92 \pm 3,20$  % de inibição da inflamação (% II)) foi mais ativa do que a AFSB ( $30,64 \pm 3,03$  % II), sem diferença estatística significativa com relação ao extrato SBHE, e a dose efetiva foi três vezes menor. Além disso, o EAFSB



não apresentou diferenças estatísticas significativas em relação ao medicamento de referência Indometacina. Esses resultados nos sugeriram que os compostos anti-inflamatórios da *Salix babylonica* estavam na fração orgânica.

Anteriormente, identificamos as flavonas luteolina (Figura 3a) e luteolosídeo (luteolina 7-O-glucosídeo) (Figura 3b) como os principais componentes da fração de acetato de etila obtida por bipartição do extrato hidroalcoólico das folhas de *Salix babylonica* (González-Alamilla *et al.*, 2019).



**Figura 3. Estrutura química dos flavonoides identificados como componentes principais da EAFSB. (a) luteolina (3',4',5,7-tetrahidroxiflavona) e (b) luteolosídeo (3',4',5,7tetrahidroxiflavona-7-O-glucosídeo)**

A luteolina é uma 3',4',5,7-tetrahidroxiflavona, um tipo de flavonoide com uma ligação dupla entre C2 e C3 e um grupo carboxila na posição 4 do anel C. A luteolina foi isolada de vegetais, frutas e plantas medicinais. Há relatos que evidenciam sua atividade antioxidante, antimicrobiana, antidiabética, quimioprotetora, quimioterápica, neuroprotetora, antialérgica e anti-inflamatória. Além disso, essa molécula é considerada não tóxica (González-Alamilla *et al.*, 2019; Aziz *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2018). Em relação às respostas anti-inflamatórias, a luteolina suprime a expressão de citocinas pró-inflamatórias, incluindo interleucina (IL)-6, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-8, IL-12, IL17, TNF- $\alpha$ , interferon (INF)- $\beta$ , fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos e aumenta o nível de citocina anti-inflamatória IL-10. Ele também inibe a indução de oxigênio nítrico sintase (iNOS) e sua expressão ativa, bem como a produção de NO, ROS e quimiocinas. Essas auxiliam no controle da migração e do posicionamento das células imunológicas, como a quimiocina (motivo C-X-C) ligante 2 (CXCL2), quimiocina (motivo C-C) ligante 2 (CCL2), CXCL9 e CXCL8 (IL-8). Além disso, ele também inibe a produção e a liberação de eicosanoides, prostaglandinas e leucotrienos, bem como moléculas de adesão pró-inflamatórias, como a proteína quimioatraente de monócitos-1 (MCP-1), a molécula de adesão intercelular-1 (ICAM) e a molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM). Da mesma forma, evita a via NF- $\kappa$ B, a proteína quinase B (AKT) e a via da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK); a atividade da hialuronidase e da elastase; a estabilização dos mastócitos; a redução da permeabilidade vascular; modulação da fluidez da



membrana celular, enzimas antioxidantes ativas e impede que o trifosfato de adenosina (ATP) se ligue à tirosina quinase do baço (Syk) ou à tirosina quinase proto-oncogene (Aziz *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2019). Além disso, a luteolina 7-O-glucosídeo (luteolosídeo) também possui atividade anti-inflamatória, esse flavonoide inibe a liberação de  $\beta$ -hexosaminidase (um marcador de desgranulação em mastócitos), leucotrieno C4 (LTC4), produção de NO e PGE2; bem como a atividade enzimática de COX-2 e iNOS. Além disso, o luteolosídeo é um inibidor potente da JNK3, uma proteína quinase da família MAPK que é ativada de forma potente por uma variedade de estresse ambiental e citocinas pró-inflamatórias (Aziz *et al.*, 2018).

Por outro lado, a aplicação tópica de TPA em orelhas de camundongos produziu edema com seus sintomas típicos: inchaço, aumento da espessura e infiltração de células pró-inflamatórias, como neutrófilos, leucócitos e linfócitos. Essas células são os principais componentes que se infiltram primeiro no local da inflamação e promovem as funções de defesa do hospedeiro e são agregadas e ligadas às paredes dos vasos sanguíneos no intervalo de 4 a 6 horas após a aplicação do TPA (Hernandez-Valle *et al.*, 2014; Mendes *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2017). No presente estudo, as amostras para análise histológica foram coletadas 6 h após a estimulação com TPA, conforme mostrado na figura 1. O TPA gerou edema, extravasamento de fluidos e aumento de neutrófilos na derme. Quando a indometacina, uma droga anti-inflamatória esteroidal amplamente usada como validação para o modo farmacológico, foi aplicada, a inflamação local diminuiu; um resultado semelhante foi observado em animais que receberam tratamento com extrato hidroalcoólico SBHE ou EAFSB (fig. 2). Em outras palavras, o SBHE e o EAFSB induziram a mesma resposta em comparação com o medicamento de controle. Em conclusão, a análise histológica das orelhas de camundongo coradas com H-E mostra que a *Salix babylonica* suprime a infiltração de células no local da inflamação induzida pelo TPA.

## CONCLUSÕES

O extrato hidroalcoólico SBHE das folhas de *Salix babylonica* e suas frações AFSB e EAFSB apresentam atividade anti-inflamatória, sendo a EAFSB a fração mais ativa. Anteriormente, relatamos que a análise química da fração EAFSB por HPLC revelou a presença de flavonoides luteolina e luteolosídeo (luteolina-7-O-glucosídeo) como compostos principais. Como consequência, o efeito anti-inflamatório demonstrado pelas folhas de *S. babylonica* pode ser atribuído à presença desses compostos anti-inflamatórios. A análise histológica das orelhas tratadas com *S. babylonica* sugere que esses compostos regulam negativamente a migração de neutrófilos patogênicos para o local da inflamação, diminuindo a produção de citocinas inflamatórias. Por fim, nossos resultados mostram que a *S. babylonica* é capaz de diminuir a inflamação e pode servir como uma alternativa valiosa para o tratamento de processos inflamatórios em animais.



## AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer a assistência financeira da Secretaria de Pesquisa da Universidade Autônoma do Estado de Hidalgo (UAEH).

Conflitos de interesse: Os autores declaram não haver conflito de interesses.

## LITERATURA CITADA

ABDEL WAHAB G, Sallam A, Elgaml A, Lahloub MF, Afifi MS. 2018. Antioxidant and antimicrobial activities of *Salix babylonica* extracts. *World Journal of Pharmaceutical Sciences*. 6(4):1–6. ISSN: 2321-3086.

<https://www.wjpsonline.org/admin/uploads/Z3D48w.pdf>

AHMED A, Shah W, Akbar S, Kumar D, Kumar V, Younis M. 2011. *In-vitro* anti inflammatory activity of *Salix caprea* linn. (goat willow) by HRBC membrane stabilization method. *Journal of Pharmacy Research*. 4(4):1067–1068. ISSN: 0974-6943.

<http://jprsolutions.info/newfiles/journal-file-56d274fdc5d1e9.78679338.pdf>

AZAB A, Nassar A, Azab AN. 2016. Anti-inflammatory activity of natural products. *Molecules*. 21(10):1–19. ISSN:1420-3049. <https://doi.org/10.3390/molecules21101321>

AZIZ N, Kim MY, Cho JY. 2018. Anti-inflammatory effects of luteolin: a review of *in vitro*, *in vivo*, and *in silico* studies. *Journal of Ethnopharmacology*. 225 (May): 342–358. ISSN: 0378-8741. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.05.019>

BROOM D. 2011. Animal Welfare: Concepts, Study Methods and Indicators. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 24(3):306–321. ISSN: 2256-2958. <https://revistas.udea.edu.co/index.php/rccp/article/view/324688/20782027>

CASTLE K, Gillin C, Hernandez S, Justice-Allen A, Lamberski N, Nichols M, Wolff P. 2016. Advances in animal welfare for free-living animals. *Journal of Wildlife Diseases*. 52(2): S4–S13. ISSN: 0090-3558. <https://doi.org/10.7589/52.2S.S4>

DRUMMOND EM, Harbourne N, Marete E, Martyn D, Jacquier JC, O’Riordan D, Gibney ER. 2013. Inhibition of proinflammatory biomarkers in THP1 macrophages by polyphenols derived from Chamomile, Meadowsweet and Willow Bark. *Phytotherapy Research*. 27(4): 588–594. ISSN: 1099-1573. <https://doi.org/10.1002/ptr.4753>

GONZÁLEZ-ALAMILLA EN, Gonzalez-Cortazar M, Valladares-Carranza B, Rivas-Jacobo MA, Herrera-Corredor CA, Ojeda-Ramírez D, Zaragoza-Bastida A, Rivero-Perez, N. 2019. Chemical Constituents of *Salix Babylonica* L. and Their Antibacterial Activity



Against Gram-Positive and Gram-Negative Animal Bacteria. *Molecules*. 24 (16):2992. ISSN:1420-3049. <https://doi.org/10.3390/molecules24162992>

GUTIÉRREZ SD, Kuri SA, Martín-Herrera D. 2017. The bioguided fractionation and pharmacological activity of an endemic *Salix canariensis* species. *Acta Pharmaceutica*. 67(2):265–273. ISSN: 1846-9558. <https://doi.org/10.1515/acph-2017-0012>

GYAWALI R, Bhattarai P, Dhakal S, Jha B, Sharma S, Poudel PN. 2013. Analgesic and anti-inflammatory properties of *Salix alba* Linn and *Calotropis procera* (Aiton) Dryand. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*. 4(5):873–877. ISSN: 0976-3333. <https://www.ijpba.info/ijpba/index.php/ijpba/article/view/1129>

HERNÁNDEZ-VALLE E, Herrera-Ruiz M, Salgado GR, Zamilpa A, Ocampo MLA, Aparicio AJ, Tortoriello J, Jiménez-Ferrer E. 2014. Anti-inflammatory effect of 3-O-[(6'-O-palmitoyl)- $\beta$ -D-glucopyranosyl sitosterol] from *Agave angustifolia* on ear edema in mice. *Molecules*. 19 (10): 15624–15637. ISSN: 1420-3049. <https://doi.org/10.3390/molecules191015624>

KUMAWAT R, Sharma S, Vasudeva N, Kumar S. 2012. *In vivo* anti-inflammatory potential of various extracts of *Sida tiagii* Bhandari. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2(2SUPPL.):S947–S952. ISSN: 2221-1691. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60342-6](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60342-6)

LAUDATO M, Capasso R. 2013. Useful plants for animal therapy. *OA Alternative Medicine*. 1 (1):1–6. ISSN: 2052-7845. <https://doi.org/10.13172/2052-7845-1-1-327>

LI L, Luo W, Qian Y, Zhu W, Qian J, Li J, Jin Y, Xu X, Liang G. 2019. Luteolin protects against diabetic cardiomyopathy by inhibiting NF-KB-mediated inflammation and activating the Nrf2-mediated antioxidant responses. *Phytomedicine*. 5:152774. ISSN: 0944-7113. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.11.034>

MATHEWS K, Kronen PW, Lascelles D, Nolan A, Robertson S, Steagall PV, Wright B, Yamashita K. 2014. Guidelines for recognition, assessment and treatment of pain. *Journal of Small Animal Practice*. 6(3):164–173. ISSN: 224510. <https://doi.org/10.1111/jsap.12200>

MAYER M, Vogl CR, Amorena M, Hamburger M, Walkenhorst M. 2014. Treatment of organic livestock with medicinal plants: a systematic review of European ethnoveterinary research. *Forschende Komplementärmedizin = Research in complementary medicine*. 21 (6): 375–386. ISSN: 1661-4127. <https://doi.org/10.1159/000370216>



MENDES DAGB, Soley B da S, Prudente A da S, Sponchiado G, Ferreira BGA, dos Santos MC, de Andrade ASM, Amorim C de M, Bresolin TMB, Meyre-Silva C.; et al. 2016. Hydroalcoholic extract of *Sapium glandulatum* (Vell.) Pax displays potent anti-inflammatory activities through a glucocorticoid receptor-dependent pathway. *Phytomedicine*. 23(13):1610–1620. ISSN: 0944-7113.  
<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2016.10.003>

MIARA MD, Bendif H, Ouabed A, Rebbas K, Ait Hammou M, Amirat M, Greene A, Teixidor-Toneu I. 2019. Ethnoveterinary remedies used in the Algerian steppe: exploring the relationship with traditional human herbal medicine. *Journal of Ethnopharmacology*. 44(August):112164. ISSN: 0378-8741. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112164>

OIE (World Organization for Animal Health). Animal welfare.  
<https://www.oie.int/en/animal-welfare>

PROPHET EB, Mills B, Arrington J, Sobón L. 1995. *Métodos Histotecnológicos*. Washington, DC, USA: Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América, Washington DC, Registro de Patología de los Estados Unidos de América (ARP) e Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (AFIP). Pp. 280. ISBN: 1881041212 9781881041214.

RIVERO-PEREZ N, Ayala-Martinez M, Zepeda-Bastida A, Meneses-Mayo M, Ojeda-Ramirez D. 2016. Anti-inflammatory effect of aqueous extracts of spent *Pleurotus ostreatus* substrates in mouse ears treated with 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Indian Journal of Pharmacology*. 48 (2):141–144. ISSN: 0253-7613.  
<https://doi.org/10.4103/0253-7613.178826>

SAS INSTITUTE. 2006. *Statistical Analysis Software SAS/STAT®*. Ver 9.0, Cary, N.C., USA: SAS Institute Inc., ISBN: 978-1-60764-599-3.

SHARMA S, Sahu D, Das HR, Sharma D. 2011. Amelioration of collagen-induced arthritis by *Salix nigra* bark extract via suppression of pro-inflammatory cytokines and oxidative stress. *Food and Chemical Toxicology*. 49(12):3395–3406. ISSN: 0278-6915.  
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.08.013>

SILVA JB da, Mendes R de F, Tomasco V, Pinto N de CC, de Oliveira LG, Rodrigues M N, Aragão DM de O, Aguiar JAK de, Alves MS, Castañón MCNM.; et al. 2017. New aspects on the hepatoprotective potential associated with the antioxidant, hypocholesterolemic and anti-inflammatory activities of *Vernonia condensata* baker. *Journal of Ethnopharmacology*. 198:399–406. ISSN: 0378-8741.  
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.01.039>



STARLIN T, Saravana Prabha P, Thayakumar BKA, Gopalakrishnan VK. 2019. Screening and GC-MS profiling of ethanolic extract of *Tylophora pauciflora*. *Bioinformation*. 15 (6):425–429. ISSN: 0973-2063. <https://doi.org/10.6026/97320630015425>

VERMA RK. 2014. An ethnobotanical study of plants used for the treatment of livestock diseases in Tikamgarh district of Bundelkhand, Central India. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 4(Supp 1): S460–S467. ISSN: 2221-1691. <https://doi.org/10.12980/APJTB.4.2014C1067>

WAZEL-BUWAY J. 2011. Plantas y compuestos importantes para la medicina: los saucos, los salicilatos y la aspirina. *Revista de Fitoterapia*. 11 (1): 61–75. ISSN: 1576-0952. [https://www.fitoterapia.net/php/descargar\\_documento.php?id=4456&doc\\_r=sn&num\\_volumen=28&secc\\_volumen=5961](https://www.fitoterapia.net/php/descargar_documento.php?id=4456&doc_r=sn&num_volumen=28&secc_volumen=5961)

WEBB LE, Veenhoven R, Harfeld JL, Jensen MB. 2019. What Is Animal Happiness? *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1438(1):62–76. ISSN: 1749-6632. <https://doi.org/10.1111/nyas.13983>

ZHANG BC, Li Z, Xu W, Xiang CH, Ma YF. 2018. Luteolin alleviates NLRP3 inflammasome activation and directs macrophage polarization in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells. *American Journal of Translational Research*. 10 (1):265–273. ISSN: 1943-8141. <http://www.ajtr.org/files/ajtr0067047.pdf>

#### [Errata Erratum](#)

<https://abanicoacademico.mx/revistasabanico-version-nueva/index.php/abanico-veterinario/errata>