

CONIC·SEMESP

13º Congresso Nacional de Iniciação Científica

Anais do Conic-Semesp. Volume 1, 2013 - Faculdade Anhanguera de Campinas - Unidade 3. ISSN 2357-8904

TÍTULO: EFEITO DO EXTRATO DE HELIOTROPIUM INDICUM L. COMPARADO À COLAGENASE NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS EM RATOS WISTAR

CATEGORIA: CONCLUÍDO

ÁREA: CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SAÚDE

SUBÁREA: MEDICINA

INSTITUIÇÃO: UNIVERSIDADE ANHANGUERA - UNIDERP

AUTOR(ES): JORGE NAGATA JUNIOR, FERNANDA ALMEIDA ANDRADE, JOÃO PEDRO CALDAS QUEVEDO, RODOLFO RODRIGUES TONIASSO

ORIENTADOR(ES): ANDRÉ LUIS ALONSO DOMINGOS, DOROTY MESQUITA DOURADO

Realização:



Apoio:



Efeito do extrato de *Heliotropium indicum* L. comparado à Colagenase na cicatrização de feridas cutâneas em ratos Wistar

Resumo

O objetivo do presente trabalho é comparar o processo de cicatrização entre o extrato de *Heliotropium indicum* L. e a kollagenase®. O processo cicatricial foi averiguado em lesões circulares provocadas cirurgicamente no dorso dos 72 ratos, na região lateral direita, com 2 cm de diâmetro, com centro há 2 cm acima da crista ilíaca e 1,5 cm de distância da coluna vertebral. Para a indução da ferida houve a aplicação de anestesia, quetamina e xilazina, seguido de tricotomia na área dorsal do animal com tamanho de 4 cm por 4 cm. O tratamento iniciou-se após a operação conforme os 3 grupos (n=8): G1: kollagenase® (grupo controle positivo); G2: Carbopol em gel (grupo controle negativo); G3: pomada de Extrato da *Heliotropium indicum* L. a 3% com Carbopol gel. Os ratos Wistar, machos, adultos, pesando entre 200-300 gramas, foram mantidos em gaiolas, com um animal em cada uma, tratados com alimentação balanceada Nuvital e água *ad libitum*. O tratamento teve a duração de 30 dias e foram realizados três pontos de checagem: os dias 7; 14 e 30 dias. Para analisar o desenvolvimento do processo cicatricial foram confeccionadas lâminas histológicas a partir do tecido retirado do grupo que sofreu eutanásia, em coloração Hematoxilina Eosina (HE) e Picrosirius-hematoxilina (PH), para a caracterização em cada ponto de checagem. Baseando-se nos resultados do 7º dia de tratamento, os ratos tratados com a *Heliotropium indicum* L. apresentaram comportamento mais dócil que os demais grupos, com presença marcante de uma neovascularização sem demais presenças de infecção ou inflamação. Além disso, o Colágeno, contado em coloração Picrosirius, revelou um modelamento maior por parte do fitoterápico, na conversão de Colágeno tipo III para Colágeno Tipo I.

Palavras-chave – Fitoterápico; Fedegoso-do-mato; Metabólicos Secundários; Lesão Cutânea.

Introdução

A pele é o maior órgão do corpo, dentre suas funções está o auxílio na manutenção da temperatura, proteção mecânica, em atividades endócrinas, funcionando como uma barreira físico-química para patógenos e agentes tóxicos. A cicatrização, processo que retoma a integridade estrutural do tegumento, é

fundamental para que a manutenção da vida. O ser humano busca entender esse processo há muito mais de 2000 anos, devido sua importância e complexidade.

A *Heliotropium indicum*, também conhecida como “crista-de-galo”, “fedegoso-do-mato”, “borragem-brava”, mede 20-80cm de altura, possui inflorescência escorpioide e flores azuis claras. A planta é uma angiosperma, da família *Boraginaceae*, e é encontrada entre trópicos asiático, africano e americano. É uma planta anual, e tida como daninha usada também como planta ornamental (POTT e POTT, 1994).

Em via popular, essa planta é usada como laxante, para combate à hemorroida, feridas, uso diurético, ulceração na garganta, tratamento de malária, dor abdominal, febre, dermatites, tratamento de doenças venéreas, picadas de insetos, desordem menstrual, urticária e garganta inflamada (DASH e MURTHY, 2011). Além do uso popular, vários estudos comprovaram cientificamente a eficácia da *Heliotropium indicum* como fitoterápico diurético, anti-inflamatório, antitumoral, além de ser abortivo (DASH e MURTHY, 2011). A planta possui atividade tóxica comprovada devido à presença de Alcaloides de Pirrolizidina. (DASH e MURTHY, 2011; SOUZA, 2005).

Estudos fitoquímicos revelam a presença de alcaloides, taninos e triterpenos. Já nas raízes, há presença também de glicosídeos cardiotônicos (COSTA, 2010). Além disso, o alcaloide helindicina também foi achado nessa espécie. Esse alcaloide, que possui um anel beta lactâmico, indica uma atividade antioxidante relativa (SOUZA, 2005; COSTA, 2010).

Os alcaloides são compostos nitrogenados de ação antisséptica, vasoconstritora, antiespasmódica, anestesia local e analgésica sem risco ao uso tópico (SOUZA, 2009). Os Taninos são compostos fenólicos com ações bactericidas, principalmente contra *S. áureos*, *S. pneumoniae*, mesmo pequenas concentrações, além de ação adstringente. Os Triterpenos são compostos ésteres que apresentam uma ação antiulcerogênica (SOUZA, 2009)

Portanto, esse projeto visa à análise cicatricial potencializada pela *Heliotropium indicum* em comparação à colagenase, um medicamento comercial com poder de cicatrização já comprovado.

Objetivos

Geral: Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do extrato das folhas de *Heliotropium indicum* no processo cicatricial, comparando com grupos controles.

Específicos:

1. Comparar a qualidade da renovação tecidual promovida pelo uso do extrato da planta *Heliotropium indicum* com os grupos controles;
2. Determinar a velocidade cicatricial, considerando suas fases na presença do extrato da planta *Heliotropium indicum* em um estudo comparativo com grupos controles;
3. Quantificar a presença de fibras colágenas do tipo I e III.

Metodologia

Planta

A planta *Heliotropium indicum* L. para a realização do experimento foi obtida em uma Fazenda-Escola da Instituição. Para sua coleta, foi utilizado pá, saco virgem e tesoura de poda. A planta foi totalmente extraída, e posteriormente utilizada somente às folhas. As plantas foram secas em estufa de circulação de ar (Marconi®). Em seguida essas foram trituradas, tamisadas e armazenadas em frascos para realização de testes. As folhas de *Heliotropium indicum* L. foram submetidos à extração por ultrassom digital (Cleaner®), seguido por maceração. O procedimento foi repetido até o esgotamento da droga. O solvente foi evaporado sob vácuo em evaporador rotativo (Tecnal, Modelo MA120), obtendo-se o extrato bruto etanoico.

Animais

Foram usados 72 ratos da linhagem Wistar, machos, adultos, pesando entre 200 e 300 gramas. Eles foram divididos em três linhas de tratamento (24 animais cada): GC- (grupo controle negativo) uso de Carbopol a 0,5%; GC+ (grupo controle positivo) uso de Colagenase e 0,6U/g (Kollagenase®); e GE (grupo experimental) recebeu a aplicação do extrato de *Heliotropium indicum* L. a 3%, com Carbopol 0,5% como veículo. Cada uma das linhas foram divididas em três grupos de observação com 8 animais, sendo cada grupo submetido à eutanásia em 7, 14 e 30 dias. O uso desses animais foram liberados pelo número do CEUA 2803.

Procedimento pré-operatório

A área delimitada para o procedimento foi o dorso do animal, região lateral direita, um espaço tricotomizado. Os animais foram anestesiados por um combinante de quetamina e xilazina, via intramuscular.

Indução da ferida cutânea

Os animais foram pesados, sorteados e receberam identificações individuais. Os ratos foram anestesiados, e logo após, foram posicionados em decúbito ventral em pranchas de parafina. A ferida foi confeccionada com demarcação de o espaço circular, esse possui 2cm de diâmetro. A excisão foi realizada, em área previamente tricotomizada, até a exposição da fáscia muscular. Após o ato operatório, todos os animais receberam aplicação tópica sobre a ferida do composto referido ao grupo. As feridas foram observadas diariamente. Dado os períodos de avaliação e os de eutanásia. Para esta, os animais foram anestesiados.

Análise do desenvolvimento do processo cicatricial

Foi realizada a confecção de lâminas histológicas, dos grupos eutanasiados, em coloração Hematoxilina Eosina (HE) e Picrosirius-hematoxilina (PH) para a caracterização do processo cicatricial.

Análise macroscópica e histológica

Na análise macroscópica das feridas operatórias, foram verificadas a formação de crosta (avaliadas em cruzes), secreção (presença ou ausência) e epitelização (avaliadas em cruzes). O método de avaliação em cruzes tem por objetivo graduar os resultados obtidos. Logo após a eutanásia, a peça cirúrgica foi encaminhada para processamento histológico, constituindo-se de cicatriz ou lesão cutânea com margem de 1 cm de pele em torno da lesão e com profundidade até a musculatura do animal. Foram incluídas em parafina, submetidas a cortes transversais e coradas pelo método de Hematoxilina-eosina (HE) e Picrosirius-hematoxilina (PH). Os parâmetros avaliativos foram: proliferação vascular (angiogênese), presença de polimorfonucleares (neutrófilos e linfócitos), fibroblastos, fibras colágenas, crosta e epitelização. Para tal foi empregado o método de

graduação em cruzeiros. Foram realizadas fotomicrofotografias usando-se câmera digital acoplada (Evolution LC, MediaCybernetics, USA).

Análise estatística

Utilizou-se o programa BioEstat versão 5.0. Para comparação dos resultados entre os grupos – GC-, GC+ e GE –, entre os períodos decorridos da operação de 7, 14 e 30 dias em cada grupo, foi utilizado o teste Kruskal Wallis, e posteriormente quando necessário, o teste de Student Newman Keuls. O nível de significância adotado será de 5 %.

Desenvolvimento

Após uma série de discussões entre outros pesquisadores, instituições de pesquisas e matemáticos estatísticos, a pesquisa seguiu, de forma rígida, as seguintes diretrizes: O projeto teve 3 grupos de análise: GC+: kollagenase®; GC-: Carbopol em gel; GE: pomada de Extrato da *Heliotropium indicum* a 3% com Carbopol gel em 97%.

Subitem 1: Preparação do extrato bruto etanoico

A planta foi colhida no mês de Janeiro do ano de 2013 na fazenda escola da Instituição. Para sua coleta, foi utilizado pá, saco virgem e tesoura de poda. Foi extraída toda a planta e separada suas partes aéreas. Apenas suas folhas foram usadas na confecção da pomada.

Para obtenção do extrato bruto etanoico, 40g das folhas da *Heliotropium indicum* foram submetidas à extração em banho de ultrassom digital por 60 minutos seguido por maceração, à temperatura ambiente, conforme dito na metodologia.

Subitem 2: Procedimento operatório

Com os ratos já sorteados e separados em cada grupo, os mesmos foram submetidos à anestesia, tricotomia e a confecção da lesão como previamente já citados na metodologia (Indução da ferida cutânea. Após a confecção das lesões, foram obtidas fotos delimitadas por um campo metricamente numerado. A seguir, duas figuras representativas da lesão. A figura 1 uma foto da lesão capturada logo após a confecção da lesão, e a figura 2 uma representação da lesão em imagem

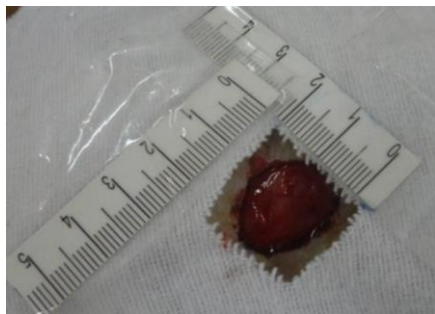


Figura1: Foto da lesão sob um campo traçado

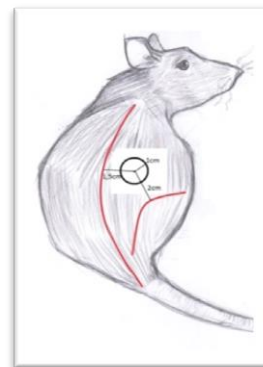


Figura2: Representação da posição e dimensão da lesão

Subitem 3: Aplicação do medicamento

Cada aplicação pesava 0,2g de extrato da *Heliotropium indicum*. O mesmo volume aplicado para o extrato foi usado nos outros dois tratamentos, usando-se uma espátula demarcada, como mostra as figuras 3, 4 e 5, logo abaixo, com suas respectivas demarcações.

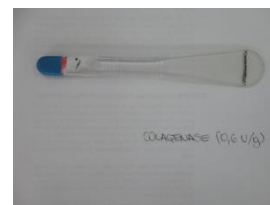
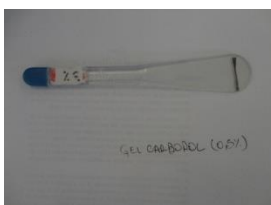
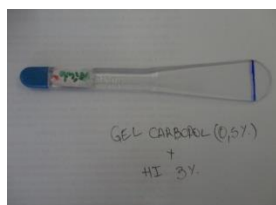


Figura 3: Espátula do grupo GE; Figura 4: Espátula do grupo GC+; Figura 5: Espátula do grupo GC-

Subitem 4: Análise macroscópica e histológica

Na análise macroscópica das feridas operatórias, foram verificadas a formação de crosta (avaliadas em cruzes), secreções (presença ou ausência) e epitelização (em método de cruzes). Para a avaliação da crosta, foram usados 0 ausente; + Moderada; ++ Intermediária; +++ Intensa. Para a epitelização, 0 ausente; + Discreta; ++ Parcial; +++ Completa. Logo após a eutanásia, a peça cirúrgica foi retirada conforme diz a metodologia (análise macroscópica e histológica).

Nas observações de microscopia óptica, foram avaliados: Crosta, Epitelização, Presença de Fibroblastos, Proliferação Vascular, Polimorfonucleares e Mononucleares.

Resultados

Durante o experimento, as feridas cutâneas de todos os animais não apresentaram sinais de infecção. As avaliações macroscópicas e fotográficas diárias demonstraram diminuição da área lesada, as feridas apresentaram bordas

arredondadas com forte presença de crosta de coloração característica ao tratamento nos animais tratados com a pomada de *Heliotropium indicum*, quando comparados ao grupo controle negativo.

Evolução pós-operatória e exame da ferida

O ato operatório de todos os animais transcorreu sem complicações. Não houve óbitos. Todos os ratos recuperaram-se bem da anestesia. As avaliações clínicas diárias mostraram adequada recuperação, com manutenção do estado geral, presença de atividade física e disposição para alimentar-se no grupo GE, além de um comportamento mais dócil quando comparado aos grupos controle.

Análise Microscópica da Lesão

O exame histopatológico das amostras de pele retirada para avaliação das feridas cutâneas experimentais demonstrou que o processo inflamatório com predomínio de neutrófilos estava reduzido no sétimo dia nos grupos controle e tratados. A avaliação histológica foi marcada nas três figuras a seguir, figuras 6, 7, 8, além de uma tabela comparativa semi-quantitativa da questão histopatológica, uma tabela1, semi-quantitativa da contagem de Picrosirius, tabela 2.

	GC- (Carbopol 0,5%)	GC+ (Colagenase)	GE (<i>Heliotropium indicum</i> L. 3%)
Crosta	+++	+++	+++
Epitelização	0	0	0
Fibroblasto	+++	+++	+++
Proliferação Vascular	++	+++	+++
Polimorfonucleares	+++	+++	+++

Tabela1 – Avaliação semi-quantitativa do processo de produção de crosta, reepitelização de feridas cutâneas, proliferação de fibroblastos e vascular e infiltração de polimorfonucleares e mononucleares dos grupos carbopol, colagenase e pomada a base de *Heliotropium indicum* L. 3%) controle (C), colagenase e pomada em 7 dias após o início dos tratamentos.

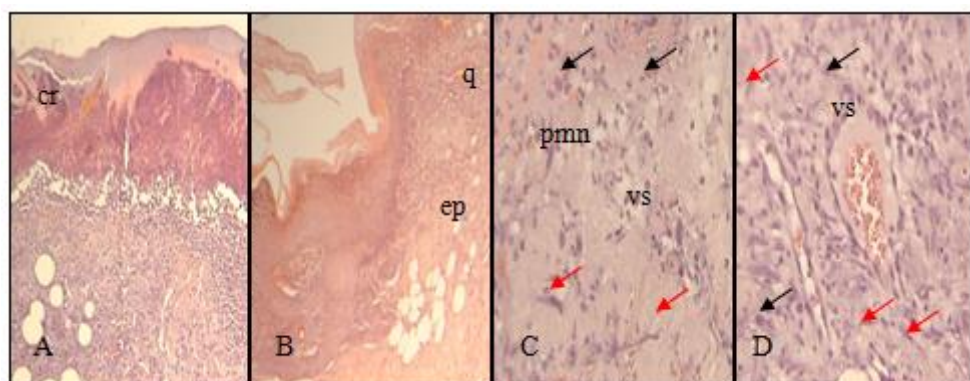


Figura 6: Ratos tratados com a pomada a base de *Heliotropium indicum* L. 3%. crosta fibrinoleucocitária (cr); epiderme (e); queratina (q); vasos sanguíneos (vs); polimorfonucleares (pmn); mononucleares (seta preta); fibroblastos (seta vermelha). Objetiva: 20. HE.

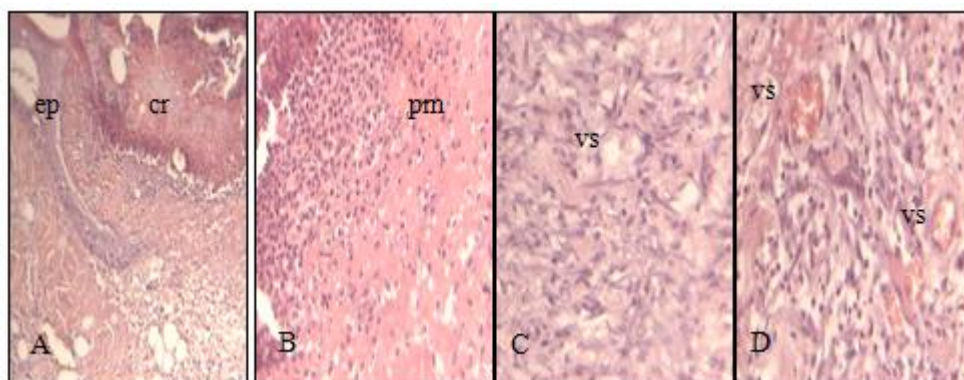


Figura 7: Ratos tratados com Carbopol 5%. crosta fibrinoleucocitária (cr); epiderme (e); queratina (q); vasos sanguíneos (vs); polimorfonucleares (pmn); mononucleares (seta preta); fibroblastos (seta vermelha). Objetiva: 20. HE.

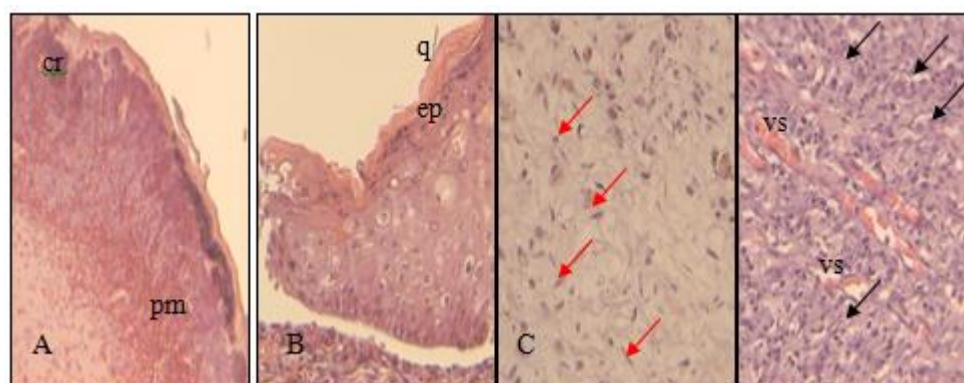


Figura 8: Ratos tratados com colagenase. crosta fibrinoleucocitária (cr); epiderme (e); queratina (q); vasos sanguíneos (vs); polimorfonucleares (pmn); mononucleares (seta preta); fibroblastos (seta vermelha). Objetiva: 20. HE.

Grupo: H.I. 3% 7 dias									
		Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Animal 5	Animal 6	Animal 7	Animal 8
Média	Colágeno Tipo I	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	Colágeno Tipo III	0	+	0	+	0	0	0	0
Grupo: Colagenase 7 dias									
		Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Animal 5	Animal 6	Animal 7	Animal 8
Média	Colágeno Tipo I	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	Colágeno Tipo III	0	0	0	0	0	0	0	0
Grupo: Carbopol 7 dias									
		Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Animal 5	Animal 6	Animal 7	Animal 8
Média	Colágeno Tipo I	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	Colágeno Tipo III	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabela2 – avaliação semi-quantitativa da contagem de picosirius. Para o Colágeno Tipo III: 0%-5,5% = 0; 5,5%-11% = +; 11%-16,5% = ++; 16,5%-22% = +++. Para o Colágeno Tipo I: 78%-83,5% = 0; 83,5%-89% = +; 89%-94,5% = ++; 94,5%-100% = +++.

Análise Macroscópica da Lesão

Durante o experimento, as feridas cutâneas de todos os animais não apresentaram sinais de infecção. Com a avaliação macroscópica e fotográfica pode observar diminuição da área lesada. As feridas apresentaram bordas arredondadas e bem definidas nos animais tratados de todos os grupos, demonstrando um bom desenvolvimento fisiológico de todos os animais. Sendo os grupos GC+ e GE com a melhor regressão quando comparados ao GC-. Os animais tratados com a pomada fitoterápica apresentaram uma crosta mais espessa de coloração característica. A seguir, observa-se uma tabela comparativa de Secreção; Crosta e Epitelização, tabela 3. Além de três imagens finais de cada tratamento ao final de 7 dias, figuras 9, 10 e 11.

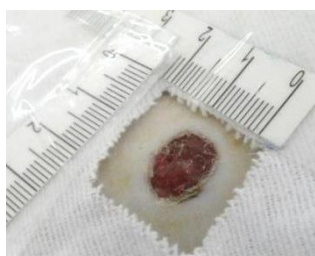


Figura 9: Lesão submetida ao tratamento de *Heliotropium indicum* 7 dias

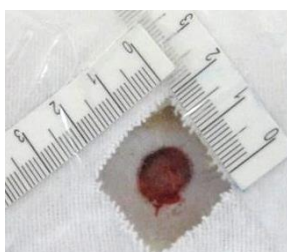


Figura 10: Lesão submetida ao tratamento de Carbopol 7 dias

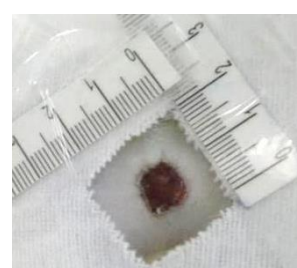


Figura 11: Lesão submetida ao tratamento de Kollagenase® 7 dias

7 dias	Carbopol	Colagenase	H.I.
Crosta	+	+	++
Epitelização	0	0	0
Secreção	0	0	0

Tabela3 – Tabela semi-quantitativa entre os três tratamentos, durante 7 dias, com os itens Crosta; Epitelização e Secreção

Considerações Finais

O objetivo do trabalho foi a comparação da cicatrização entre a pomada fitoterápica a base de *Heliotropium indicum* em comparação com os grupos controles. Destarte, realizou-se uma avaliação comparativa com os três grupos de tratamento. O tratamento foi diário e concomitante às anotações de comportamento e alterações macroscópicas; a análise histopatológica foi efetuada através das lâminas confeccionadas com parte tecidual da lesão. Os resultados obtidos revelam que durante o tratamento, os ratos tratados do grupo GE estavam mais dóceis, ativos e com maior disposição para alimentar-se. Todos os grupos apresentaram diminuição da ferida, sendo que os grupos GC+ e GE obtiveram melhores

resultados; nenhum grupo apresentou sinais de inflamação e infecção; e em todos houve a formação de crosta, a qual foi mais espessa e de cor característica no grupo GE. Com relação aos achados histopatológicos, conclui-se que em nenhum grupo houve reepitelização completa, visto que é o primeiro ponto de checagem e fisiologicamente não apareceria; em todos há proliferação intensa de fibroblastos, infiltração de polimorfonucleares e angiogênese. Com base nos resultados obtidos na avaliação do tratamento dos grupos no primeiro ponto de checagem (7 dias), há uma percepção que tanto o grupo controle positivo e o grupo tratado com o extrato da planta estão respondendo ao que era esperado e que tudo indica que a planta em questão possui efetividade na reconstrução tecidual.

Referências Bibliográficas

- COSTA; R.S.; **Estudos de Pré-Formulação e Formulação de *Heliotropium indicum* (L.) DC (Boraginaceae)**; Universidade Federal do Pará; Belém – PA; 2010.
- DASH, G.K.; MURTHY, P. N.; Studies on Wound Healing Activity of *Heliotropium indicum* Linn. Leaves on Rats; **International Scholarly Research Network Pharmacology**; v. 2011; [S.I.]; 2011.
- POTT, A.; POTT, V.J.; **Plantas do Pantanal**; Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária; Centro de Pesquisa Agropecuária do Pantanal; Corumbá – MS: EMBRAPA-SPI; 1994.
- SOUZA, J.S.N.; et al. Pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium indicum*; **Journal of the Brazilian Chemical Society**; v. 16; nº 6b; p. 1410-1414; 2005.
- SOUZA, V.F.L.; **Levantamento de plantas medicinais utilizadas pela Comunidade do Jardim Campestre**; Embú-guaçú, SP; In: Congresso de Iniciação Científica; 12^a ed; UNISA – Universidade de Santo Amaro; p. 284-289; 2009.