



INTER
FACES
CIENTÍFICAS

SAÚDE E AMBIENTE

ISSN IMPRESSO 2316-3313

ISSN ELETRÔNICO 2316-3798

AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA EM ENSAIOS *IN VIVO* DO POTENCIAL CICATRIZANTE DE EXTRATOS BRUTOS DE PROSOPIS JULIFLORA (SWARTZ)

Ana Carla Ferreira Costa¹

Giani Maria Cavalcante²

RESUMO

A cicatrização caracteriza-se com um processo fisiológico dinâmico que concerne em manter a integridade da lesão. O presente trabalho objetivou avaliar morfometricamente, através de ensaios *in vivo*, a cicatrização de feridas cutâneas com uso tópico de extratos de *Prosopis juliflora*. Foram utilizados 27 ratos Wistar, machos e adultos, divididos em três grupos sob os quais foram aplicados, tópica e separadamente, solução fisiológica de NaCl 0,9% (GI), extrato aquoso de folhas de *P. juliflora* (GII) e extrato aquoso de cascas de caule de *P. juliflora* (GIII) em períodos de 7, 14 e 21 dias. A avaliação morfométrica da ferida foi feita diariamente e sua evolução foi acompanhada observando o aspecto da lesão e medida da retração ci-

catricial com paquímetro digital. Os extratos aquosos de folhas e cascas de caule de *Prosopis juliflora* permitiu uma cicatrização gradual e um comportamento estável da ferida, bem como apresentou um processo de reepitelização satisfatória do ponto de vista de tecido de granulação a partir do 7º dia. Ressalta-se a importância da ampliação de estudos experimentais em animais com esses compostos, uma vez que os dados obtidos são incipientes para sua aplicabilidade em seres humanos.

PALAVRAS-CHAVES

Cicatrização. *Prosopis*. Wistar.

ABSTRACT

Wound healing is characterized with a dynamic physiological process that must maintain the integrity of the lesion. This study aimed to evaluate morphometrically through in vivo testing, the healing of skin wounds with topical use of Prosopis Juliflora extracts. 27 male and adults Wistar rats, divided into three groups in which they were applied, topical and separately physiological solution of NaCl 0.9 % (GI) , aqueous extract of leaves of P. Juliflora (GII) and aqueous extract of stem bark of P. Juliflora (GIII) in periods of 7, 14 and 21 days. Morphometric evaluation of the wound was done daily and its evolution was followed by observing the appearance of the lesion and extent of scar retrac-

tion with a digital caliper. The aqueous extracts of the leaves and stem bark of Prosopis juliflora allow a gradual and stable behavior healing of the wound, and showed satisfactory re-epithelialization process from the viewpoint of granulation tissue starting from the 7th day. We emphasize the importance of expanding experimental animal studies with these compounds, since the data obtained are incipient for their applicability in human beings.

KEYWORDS

Healing. Prosopis. Wistar Rats.

RESUMEN

La cicatrización de heridas caracterizase por un proceso fisiológico dinámico que se refiere a mantener la integridad de la lesión . Este estudio tuvo como objetivo evaluar morfo métricamente la curación de las heridas de la piel con el uso tópico de los extractos de Prosopis juliflora . Se utilizaron 27 ratóns Wistar adultos, dividido en tres grupos; GI en que se lo aplicaron solución fisiológica de NaCl al 0,9%, GII em que se utilizaron hojas P. juliflora en extracto acuoso y GIII en que se utilizaron en extracto acuoso corteza del tallo de P. juliflora, en períodos de 7 , 14 y 21 días . La evaluación de la herida se realiza a diario y su evolución fue seguida por la observación la extensión de

la retracción cicatricial de la herida. Los extractos acuosos de las hojas y el tallo de corteza de Prosopis juliflora permiten una curación gradual y estable de la herida, y presentaron un proceso satisfactorio desde el punto de vista del tejido de granulación a partir del séptimo día. Destacamos la importancia de ampliar los estudios experimentales en animales con estos compuestos, ya que los datos son incipientes para su aplicabilidad en humanos.

PALABRAS CLAVES

Curación. Prosopis. Ratón Wistar.

1 INTRODUÇÃO

O uso de substâncias e compostos orgânicos para fins de atividades biológicas é altamente viável, uma vez que várias pesquisas apontam resultados significativos destes, para as mais diferentes atividades biológicas, potencializando-os como drogas promissoras para produção de fármacos (TSALA et al., 2013)

Dentre as atividades biológicas apresentadas por compostos orgânicos, pode-se destacar àquelas envolvidas em processos de cicatrização e/ou reparação de tecidos lesados (TSALA et al., 2013). Definido como um processo dinâmico de fenômenos bioquímicos e fisiológicos, a cicatrização ocorre por meio de eventos celulares e moleculares, coordenados, que interagem para garantir a restauração e a reconstituição tissular (MAQUART; MOONBOISSE, 2014).

A cada ano aumenta o número de pesquisas com o envolvimento de produtos naturais que objetivam acelerar o processo cicatricial, bem como reduzir as suas complicações. Assim as perspectivas de desenvolvimento de novas tecnologias acerca do uso de produtos naturais são incrementadas como uma opção de tratamento alternativo, frente ao arsenal terapêutico sintético já existente (PEREIRA; BARTOLO, 2013).

A espécie vegetal *Prosopis juliflora* pertencente à família Mimosaceae, é uma espécie exótica, originária do norte da América do Sul e Central, conhecida popularmente como algaroba, com ampla distribuição na Região Nordeste do Brasil, principalmente nos estados da Paraíba, Rio Grande do Norte, Pernambuco, Bahia e Piauí (NASCIMENTO et al., 2014). Dentre as suas muitas utilizações, é possível destacar suas atividades antibacterianas (SHACHI-SINGH; VERMA, 2011), antineoplásicas (SATHIYA; MUTHUCHELIAN, 2011), antioxidantes (NAPAR et al., 2012), antiplasmodiais (RAVIKUMAR et al., 2012).

Com base no amplo espectro de atividades biológicas registradas para a espécie em estudo e a valorização de pesquisas com produtos naturais para utilização nas práticas terapêuticas, foi percebido a oportunidade de realizar um estudo experimental com o objetivo de avaliar morfometricamente, a capacidade de aceleração de eventos de cicatrização em feridas cutâneas, a partir de extratos brutos da espécie *Prosopis juliflora* por meio de ensaios in vivo.

2 MÉTODOS

Este estudo experimental de investigação laboratorial em animais foi realizado no Biotério e no Laboratório Multidisciplinar de Morfologia e Patologia da Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde (FCBS) do Centro Universitário Cesmac (CESMAC), Maceió, Alagoas, após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do CESMAC sob o protocolo nº 067B/09-11. Sendo obedecidos os princípios éticos em experimentação animal preconizado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

2.1 COLETA, PREPARAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL E OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO

As folhas e cascas de caule da espécie vegetal foram obtidas de indivíduos arbóreos situados em área urbana na cidade de Maceió, na Praça Centenária localizada no bairro do Farol, sendo acondicionados em sacos plásticos individuais e levados ao Herbário do Instituto do Meio Ambiente de Alagoas – IMA/AL, para confirmação da espécie e depósito de exsiccatas sob o nº IMAL-9638, para registro da mesma junto ao referido herbário.

Folhas e cascas de caules de *P. juliflora*, foram submetidas à secagem, inicialmente em temperatura ambiente e completada em estufa a 50 °C até obter-se um teor-padrão de umidade de 20%. Em seguida o material foi triturado em moinho e o pó resultante foi acondicionado, separadamente, em fracos de vidros. Prontamente

esses pós foram, separadamente, misturados com água destilada e mantidos em temperatura ambiente por 48h. A solução extrativa foi submetida à secagem em liofilizador e rotaevaporador. Após esse procedimento o extrato aquoso de folha (EAF) e o extrato aquoso de casca de caule (EACC) estavam preparados.

2.2 AMOSTRA, PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE MORFOMÉTRICA

Para a realização deste estudo foram utilizados 27 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), machos, com idade de 90 dias, com peso de aproximadamente 250 gramas, oriundos do biotério da FCBS/CESMAC. Durante as etapas experimentais os animais foram mantidos em gaiolas de propietileno, sob condições controladas de temperatura e ciclo noite/dia bem definido, com acesso livre a alimento e água ad libitum.

Os animais foram distribuídos em três grupos: Grupo I (Controle, recebeu uma aplicação tópica diária de soro fisiológico), Grupo II (Grupo experimental EAF, recebeu uma aplicação tópica diária de extrato aquoso de folhas) e Grupo III (Grupo experimental EACC, recebeu uma aplicação tópica diária de extrato aquoso de cascas de caule). À vista disto, os animais foram redistribuídos em subgrupos: GI7, GII7 E GIII7 (animais tratados durante o intervalo de sete dias, com três animais em cada grupo); GI14, GII14 E GIII14 (animais tratados durante o intervalo de 14 dias, com três animais em cada grupo) e GI21, GII21 E GIII21 (animais tratados durante o intervalo de 21 dias, com três animais em cada grupo);

Passado o período de aclimação dos animais, estes foram submetidos a procedimento cirúrgico, onde foram anestesiados por via intramuscular, pela mistura dos fármacos xilazina (50 mg/kg) e quetamina (15 mg/kg), com seringa descartável, após o período anestésico procedeu-se em todos os animais a depilação, tricotomia e demarcação da área de produção das feridas. A assepsia foi feita com polivinilpirrolidona-iodo. A área da ferida foi delimitada com tinta, onde

um campo fenestrado estéril de 1x1 cm foi preenchido, sendo retirados pele, músculo cutâneo e gordura subcutânea com auxílio de tesoura e pinça anatômica. Posteriormente ao procedimento cirúrgico, as falhas cutâneas foram tratadas diariamente mediante os tratamentos e pelos períodos correspondentes, conforme descrito acima.

Percorridos os períodos estabelecidos de pós-operatório (PO), foram realizadas as análises morfométricas das feridas, com auxílio de um paquímetro, e uso de uma equação $A = \pi \cdot R \cdot r$ (onde: A representa o valor da área calculado em mm², R corresponde à metade do diâmetro maior da ferida e r a metade do diâmetro menor da ferida), para obter o tamanho da área de cada ferida. A reparação tecidual foi analisada por meio de microscópio óptico da marca Olympus®, considerando o grau de reepitelização proposto por (GARROS et al., 2006), sendo os achados histológicos agrupados qualitativamente de acordo com os parâmetros: ausência de alterações, alterações discretas e alterações intensas.

3 ANÁLISE DOS DADOS

Os dados foram analisados pelo programa Bioestat versão 5.0. A área da ferida (mm²) foi avaliada pelo teste T de Student e a comparação das médias pelo teste de Tukey com nível de significância de nulidade de 5% ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

O ato operatório de todos os animais transcorreu sem complicações, não houve registro de óbito. As atividades físicas e a mobilidade diária dos animais transcorreram normalmente e todos apresentaram disposição para alimentação, o que implica dizer que pelas avaliações clínicas diárias, os animais mostraram adequada recuperação.

Na Tabela 1 são apresentados os valores médios das áreas das feridas de todos os grupos em experimentação.

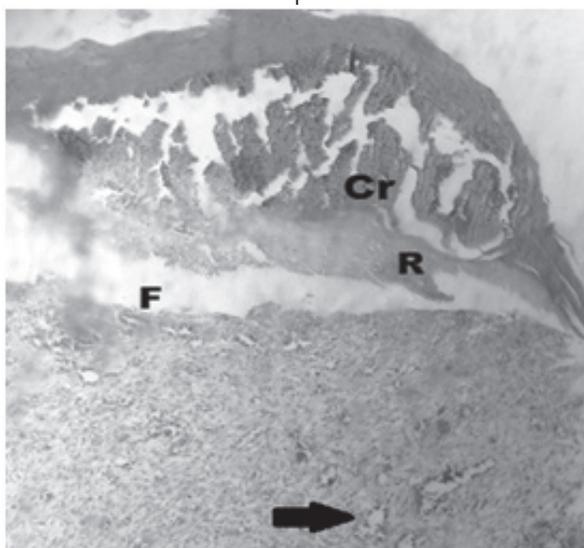
Tabela 1 – Dados morfométricos das médias das áreas dentre os grupos controle e experimentais (GII EAF e GIIIEACC), no 7º, 14º e 21º dias de pós-operatório (PO)

GRUPO	7º DIA	14º DIA	21º DIA
GI	0,34 ± 2,15	0,29 ± 0,81	0,30 ± 1,06
GII	0,54 ± 2,01	0,52 ± 0,54	0,51 ± 2,01
GIII	0,71 ± 1,02	0,16 ± 1,01*	0,18 ± 2,16*

* grupos marcados com asteriscos apontam diferença significativa ($p < 0,05$)
 Fonte: Dados da pesquisa.

As feridas cutâneas apresentaram evolução satisfatória, onde em todos os grupos foram registrados exsudação e formação de crostas delicadas a partir do 2º dia de PO. Foi observado a evolução da crosta para epitelização já no 7º dia de PO (Figura 1).

Figura 1 – Aspecto histológico do grupo GIII no 7º dia de PO, com destaque para presença da Crosta fibro-noleucocitária (Cr) e o processo de reepitelização (R). Falha cutânea (F). A seta indica formação de vasos (Neovascularização). Aumento 10x



Fonte: Dados da pesquisa.

Ainda em relação ao grau de epitelização, ao comparar os achados entre os grupos, observa-se superioridade dos grupos experimentais GII e GIII em relação ao grupo controle, dado sustentado pelo discreto grau de epitelização (Tabela 2).

Tabela 2 – Classificação do Grau de epitelização no 7º dia de PO de extratos brutos de *P. juliflora*

Grupo	Grau de epitelização		
	7º dia	14º dia	21º dia
GI	ausente	leve	acentuado
GII	discreto	leve	acentuado
GIII	discreto	leve	acentuado

Fonte: Dados da pesquisa.

5 DISCUSSÃO

O processo de cicatrização se caracteriza por uma sequência de eventos que interagem, objetivando a restauração do tecido lesado, compreendendo o extravasamento do plasma, a coagulação e agregação plaquetária e por fim a reepitelização e remodelagem tecidual (MENDOÇA; COUTINHO-NETTO, 2009). Deste modo, a utilização de agentes cicatrizantes que possuam a capacidade de agir diretamente no processo, interferindo no reparo ou atuando como agente antisséptico pode ser favorável (CAVALCANTI NETO et al., 2005).

Neste contexto inúmeros estudos apontam a eficiência de compostos naturais oriundos de vegetais frente a processos cicatriciais, como o trabalho de Muniappan e outros autores (2014), que apresentou resultados significativos para processos de cicatrização dos extratos etanólico e etílico das folhas de *Bambusa arundinacea*. Potencialidade cicatrizante, também, foi registrada para os extratos foliar aquoso e metanólico de *Cleome viscosa* (UPADHYAY et al., 2014); assim como foram registradas para os extratos de *Punica granatum* (MO et al., 2014).

No que concerne ao potencial cicatrizante do gênero *Prosopis*, o extrato aquoso da casca do caule da espécie *P. africana*, reduziu de forma significativa a excisão de feridas em ratos (EZIKE et al., 2010), o que aponta a capacidade dos representantes do gênero para uso em estudos que viabilizem o tratamento de feridas. No caso dos extratos de *P. juliflora* já foi possível observar redução da área da lesão a partir do 7º dia de PO, entretanto, apenas a partir do 14º dia essa diferença foi significativa quando se comparou os dados do GIII com o GI, apontando o extrato aquoso da casca de caule como o mais favorável para uso tópico em feridas uma vez que induziu a redução acentuada da área da lesão, sendo observado, também, grande quantidade de fibroplasia e de tecido de granulação, reconhecidos como facilitadores da contração (TSALA et al., 2013).

Quando ocorre a lesão tissular, a inflamação é o primeiro evento a ser desencadeado iniciando com a hemostasia e deposição de fibrina, gerando uma cascata de células inflamatórias que permitem destruir, diluir ou encerrar o agente agressor e colocar em movimento eventos como a proliferação de fibroblastos e deposição de colágenos que cicatrizam e reconstituem o tecido danificado (BIRDANE et al., 2014). Durante o processo de evolução cicatricial usando os extratos de *P. juliflora*, foi possível observar que a reação inflamatória esteve presente em todos os grupos, porém, com maior acuidade no

grupo controle. Pereira e Bachion (2005) afirmam que a reepitelização a partir das margens da ferida, desempenham um importante papel no fechamento da mesma, sob esse aspecto foi possível observar essa característica em todos os grupos tratados com extratos de *P. juliflora*.

De acordo com Balbino e outros autores (2005), a reepitelização tem início poucas horas após ocorrer a lesão, e após quatro dias já é possível observar a formação de tecido de granulação, cuja a formação é induzida pela cascata de inflamação que está diretamente relacionada com a formação de crosta e neovascularização. Neste trabalho foi observada formação de crosta já a partir do 2º dia de PO, além da presença do fenômeno de neoangiogênese de maneira não igualitária no grupo controle e nos grupos experimentais, e por fim uma disposição de fibras colágenas organizadas nos grupos experimentais após o 21º de PO, igualando-se ao controle, haja vista que ambos atingiram a cicatrização total.

É fundamentalmente importante citar que o uso de soro fisiológico, em todos os dias de PO não influenciou positivamente o processo cicatricial, ao contrario dos extratos de *P. juliflora*.

6 CONCLUSÃO

Aplicação tópica de extratos aquosos de folhas e cascas de caule de *Prosopis juliflora* permitiu uma cicatrização gradual e um comportamento estável da ferida em estudos com animais, bem como apresentou uma histologia satisfatória do ponto de vista de tecido de granulação e reepitelização nos 7º e 14º dias de PO.

É importante ressaltar a necessidade da ampliação de estudos experimentais em animais com esses compostos, uma vez que os dados obtidos são incipientes para sua aplicabilidade em seres humanos.

REFERÊNCIAS

- BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.41, n.1, p.27-51, 2005.
- BIRDANE, L.; SAN, T.; MULUK, N. B. BURUKOGLU, D.; CINGI, C. Efficacy of curcumin in the healing of paracentesis in rats. **International Journal of pediatric otorhinlaryngology**, v.78, n.1, p.280-281, 2014.
- CAVALCANTI NETO, A. T.; ARRUDA, T. E. P.; PEREIRA, S. L. S.; TURATTU, E. Análise comparativa entre o óleo-resina de copaíba e o digluconato de clorexidina no processo de cicatrização tecidual. Estudo histológico em dorso de ratos. **Revista de Odontologia da Unesp**, v.34, n.3, p.107-112, 2005.
- EZIKE, A. C.; ARAK, P. A.; OKOOLI, C. O.; UDEGBUNAN, S.; OOKWUME, N.; OKEKE, C.; LLOANI, O. Medicinal plants used in wound care: a study of *Prosopis africana* (Fabaceae) stem Bark. **Indian journal pharmacology science**. v.73, n.3, p.334-339, 2010.
- GARROS, I. C.; CAMPOS, A. C. L.; TAMBARA, E. M.; TENÓRIO, S. B.; TORRES, O. J. M.; AGULHAM, M. A.; ARAUJO, A. C. F.; SANTIS-ISOLAN, P. M. B.; OLIVEIRA, R. M.; ARRUDA, E. C. M. Extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos: estudo morfológico e histológico. **Acta cirúrgica brasileira**. v.21, n.3, p.55-66, 2006.
- MAQUART, F. X.; MONBOISSE, J. C. Extracellular matrix and wound healing. **Pathologie Biologie**, v.22, n.1, p.1-15, 2014.
- MENDONÇA, R. J.; COUTINHO-NETO, J. Aspectos celulares da cicatrização. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n.3, p.257-262, 2009.
- MO, J.; PANICHAYAPAKARANANT, P.; KAEWNOOPPARAT, N.; NITERUANGJARAS, A.; REANMONGKOL, W. Wound healing activities of standardized pomegranate rind extracts and its major antioxidant ellagic acid in rat dermal wounds. **Journal natural medicine**, v.68, n.1, p.377-386, 2014.
- MUNIAPPAN, M.; JAGADEESH, J. S.; INBARAJ, S. D. Evaluation of *Bambusa arundinaceae* leaves for wound healing in albino rats. **Global Journal of Pharmacology**, v.8, n.1, p.84-86, 2014.
- NAPAR, A. A.; BUX, H.; ZIA, A.M.; AHMAD, M. Z.; ROOMI, S.; MUHAMMAD, I.; SHAH, S. H. Antimicrobial and antioxidant activities of mimosaceae plants: *Acacia modesta* Wall, *Prosopis cineraria* (Linn) and *Prosopis juliflora* (Swartz). **Journal of medicinal plants research**, v.6, n.15, p.2962-2970, 2012.
- NASCIMENTO, C. E.; TABARELLI, M.; SILVA, C. A.D; LEAL, I. R.; TAVARES, W. S.; SERRÃO, J. E.; ZANUNCIO, J. C. The introduce tree *Prosopis juliflora* is a serious threat to native species of the Brazilian caatinga vegetation. **Science of the total environment**, v.482, n.1, p.108-113, 2014.
- PEREIRA, A. L.; BACHION, M. M. tratamentos de feridas: análise da produção científica publicada na revista brasileira de enfermagem. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v.58, n.2, p.208-213, 2005.
- PEREIRA, R. F.; BARTOLO, P. Traditional therapies for skin wound healing. **Advances in wound care**, v.8, n.2, p.1-22, 2013.
- RAVIKUMAR, S.; INBANESON, S. J.; SUGANTHI, P. In vitro antiplasmodial activity of ethanolic extracts of south Indian medicinal plantas against *Plasmodium falciparum*. **Asian Pacific Journal of tropical disease**, v.13, n.1, p.180-183, 2012.

SATHIYA, M.; MUTHUCHELIAN, K. Anti tumoral potential of total alkaloid extract of Prosopis juliflora leaves against Molt-4-cell in vitro. **African journal of Biotechnology**, v.10, n.44, p.6-17, 2011.

SHACHI-SINGH, S.; VERMA, S. K. Antibacterial properties of alkaloid rich fractions obtained from various parts of Prosopis juliflora. **International journal of pharmaceutical sciences and research**, v.2, n.3, p.114-120, 2011.

TSALA, D. E.; AMADOU, D.; HABTEMARIAN, S. Natural wound healing and bioactive natural products. **Phyto-pharmacology**, v.4, n.3, p.532-560, 2013.

UPADHYAY, A.; CHATTOPADHYAY, P.; GOYARY, D.; MAZUMDER, P. M.; VEER, V. In vitro fibroblast growth stimulatory and in vivo wound healing activity of Cleome viscosa. **Orient pharmacology experimental medicine**, v.5, n.1, p.1-10, 2014.

Recebido em: 24 de Abril de 2014
Avaliado em: 22 de Maio de 2014
Aceito em: 14 de Julho de 2014

1. Curso de Biologia do Centro Universitário Cesmac.

2. Professora do Centro Universitário Cesmac, Bióloga e Mestre em Ciência Biológicas. E-mail: gianime@icloud.com