



**AVALIAÇÃO PRELIMINAR DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE
TABERNAEMONTANA CATHARINENSIS NO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO
DE FERIDAS EM PELE DE RATOS (*RATTUS NORVEGICUS*)**

*PRELIMINARY EVALUATION OF EXTRACT OF TABERNAEMONTHANA
CATHARINENSES IN THE PROCESSO OF WOUND HEALING IN SKIN OF RATS
(RATTUS NORVERGICUS)*

Denise Janning^{1*}, Cláudia A. C. Albuquerque¹, Sara C. Barauna¹

¹Universidade Regional de Blumenau- Blumenau – SC – Brasil

*Autor para correspondência: denisejanning@hotmail.com

Recebido em 28/06/2011, Aceito em 27/08/2011

RESUMO: A pele representa uma barreira física com o meio externo, quando lesionada, o organismo reage para reparação através do processo de cicatrização. Determinadas plantas que possuem componentes farmacológicos ativos são utilizadas para diminuir o período de cicatrização e para alcançar melhores resultados. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a cicatrização de feridas com o extrato de *Tabernaemontana catharinensis*. Foram utilizados 12 ratos (machos) divididos em 3 grupos experimentais, os quais foram submetidos a incisão na região dorso-costal e feito o tratamento tópico durante 7 dias: Grupo Controle (GC) com salina, Grupo Extrato (GE) com extrato hidroalcoólico de *Tabernaemontana catharinensis*, Grupo Fármaco (GF) com Bepantanol®. Os animais do GC e GE foram os quais obtiveram maior sucesso em relação a diminuição da área da ferida no decorrer dos dias, sugerindo que a planta tem um efeito cicatrizante importante sobre a epiderme de ratos.

PALAVRAS-CHAVE: rato; ferida; cicatrização; *Tabernaemontana catharinensis*.

ABSTRACT: The skin is a physical barrier with the outside world, when injured, the body reacts to redress through the healing process. Certain plants that have

pharmacological active components are used to reduce the healing period and to achieve better results. This study aimed to evaluate the healing of wounds with the extract of *Tabernaemontana catharinensis*. We used 12 rats (male) divided into three experimental groups, which underwent incision on the dorsal-rib and made topical treatment for 7 days: control group (CG) with saline, Group Extract (GE) with hydroalcoholic *Tabernaemontana catharinensis*, Drug Group (FG) with Bepantanol ®. The animals were GE and GC which had greater success in regard to reduction in wound area during the day, suggesting that the plant has a significant healing effect on the epidermis of mice.

KEY-WORDS: rat, wound, healing, *Tabernaemontana catharinensis*.

INTRODUÇÃO

A pele e seus anexos constituem o maior órgão do corpo humano e representa a barreira física com o meio que o cerca. A pele é formada pela epiderme, tecido epitelial pavimentoso estratificado queratinizado e a derme constituída de tecido conjuntivo. Quando estes tecidos são lesionados, o organismo reage para reparação do mesmo através do processo de cicatrização(1).

A cicatrização constitui um conjunto dinâmico de alterações teciduais importantes na manutenção da integridade do organismo, envolve inflamação, quimiotaxia, proliferação celular, diferenciação e remodelação(2).

As feridas podem ser classificadas de acordo com o tempo de reparação do tecido, em agudas e crônicas. As agudas são originadas de cirurgia ou trauma e a reparação

ocorre em tempo adequado, sem complicações. As feridas crônicas não são reparadas em tempo esperado e apresentam complicações(3).

O homem sempre tentou interferir no processo de cicatrização de feridas, procurando diminuir o seu período e buscando melhores resultados. A utilização de plantas sempre alcançou um lugar de destaque nestes tratamentos, pois constitui a base terapêutica da prática médica(4).

As plantas estão presentes na natureza em abundância e são de fácil acesso, por isso tornaram-se uma alternativa farmacológica importante para uma série de patologias e formas diferentes de lesões teciduais ou alterações fisiológicas, devido a diversos componentes farmacológicos ativos, como os flavonóides e taninos(5).

Os flavonóides estimulam a cicatrização, agem como

antioxidantes, combatendo os radicais livres, possuem atividade microbiana e moduladora do sistema imune, apresentam ação antiinflamatória, analgésica, regenerativa de cartilagens, ossos e produzem vasodilatação(6).

Os taninos são substâncias químicas complexas, com atividades antioxidantes e seqüestradora de radicais livres. Têm a propriedade de precipitar proteínas, além de contribuírem para formar uma camada protetora sobre a pele e as mucosas, atuando em processos inflamatórios, causando uma reestruturação do epitélio e a formação de vasos novos(7).

Vários fitoterápicos já foram testados e usados no processo de cicatrização de feridas. A Aloe Vera (Babosa) foi eficaz no tratamento de feridas abertas em ratos diabéticos e normais. O extrato alcoólico de flores de *Ixora coccínea* facilitou os fatores de cicatrização em feridas abertas em ratos(2).

A *Tabernaemontana catharinensis* é uma planta conhecida popularmente como jasmim, jasmim-pipoca, leiteira-dois-irmãos, casca de cobra ou "palo de víbora"(8), é um arbusto que pode medir de 1 a 9 metros de altura, com um tronco de 2 a 35 centímetros de diâmetro(9). Esta espécie pode ser encontrada na Argentina, Uruguai, Paraguai e Sul do Brasil, tendo muitos relatos a respeito

de seus usos, como antídoto para mordedura de serpentes, calmante em dor de dentes e tratamento de verrugas. Outras espécies do gênero são utilizadas para tratamento de feridas, herpes, tumores e ainda como hemostática, hipotensora e cardiotônica(8). No nordeste da Argentina ainda é utilizada para desinfecção de feridas, infecções de garganta, unhas, olhos, gonorréia e também em diarreias frente a infecções por parasitas(9).

Desta forma, buscando obter informações sobre o efeito que esta planta apresenta no processo de cicatrização, o presente estudo teve por objetivo avaliar a cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos, tratados com uso tópico do extrato hidroalcoólico de *Tabernaemontana catharinensis* mediante análise macro e microscópica.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostra

Utilizou-se 12 ratos (machos), com idade média de 2 meses, pesando aproximadamente 180 a 200g. Os animais permaneceram em gaiolas de plástico individuais, em condições controladas de temperatura e ciclo claro-escuro de 12h/12h, com livre acesso a água potável e ração industrial própria para ratos.

Os animais foram divididos em três grupos de quatro animais: Grupo

Controle (GC) tratado com soro fisiológico, Grupo Fármaco (GF), tratado com Bepantol® e Grupo Extrato (GE), tratado com extrato de *Tabernaemontana catharinensis*.

Preparo do material vegetal

Para o preparo do extrato foram utilizadas folhas de *Tabernaemontana catharinensis*, provenientes do Campus I da FURB, onde um exemplar está armazenado no Herbário Dr. Roberto Miguel Klein, sob o número 12906.

As amostras vegetais foram secas em estufa a temperatura inferior a 50°C, e efetuada moagem em um Micro Moinho tipo Willye Te-648.

As folhas secas e moídas foram maceradas com solução hidroalcoólica a 70% por uma semana (168 horas). Em seguida, o material foi filtrado e submetido a mais duas extrações por igual período. Os filtrados foram concentrados sob pressão reduzida em evaporador rotatório, fornecendo um material escuro.

Anestesia e ato operatório

Os ratos foram submetidos à anestesia injetável de 0,3ml/100g do anestésico Ketamina (cloridato de Ketamina), combinado com 0,1ml do anestésico Rompum (cloridato de Xilazina), os animais foram considerados anestesiados pela

imobilidade do corpo, mas com frequência e amplitude respiratória normais.

Depois de anestesiados os animais foram posicionados em decúbito ventral e imobilizados em prancha cirúrgica, com contenção dos membros e submetidos à epilação com "gilete" da região dorso-costal. Após a epilação aplicou-se uma solução antiséptica com álcool 70%.

Para demarcação da pele retirada, foi utilizado caneta e régua para delimitar a área de aproximadamente 1cm². Em seguida utilizou-se um bisturi e uma pinça para o corte e retirada da pele até o aparecimento da fáscia muscular do animal.

Pós-operatório

Logo após o ato operatório, os animais foram acondicionados em caixas plásticas individuais forradas com maravalha, onde foi realizada a primeira aplicação tópica de 0,1ml do extrato hidroalcoólico de *Tabernaemontana catharinensis* na concentração de 200mg/ml, com seringa de plástico de 1 ml, sem agulha, na ferida cutânea dos ratos do grupo extrato (Figura 1-C). No grupo controle foi aplicado 0,1ml de soro fisiológico e no grupo Fármaco 0,1ml de Bepantanol® em solução (cicatrizante comprado em farmácias), também utilizando seringa sem agulha de 1 ml.

As aplicações foram realizadas durante sete dias, uma vez ao dia. Durante todo o pós-operatório os animais receberam tratamento com analgésico Meperidina® na dose de 20mg/kg via intramuscular a cada 6 horas.

Análise macroscópica

A avaliação macroscópica da ferida foi feita analisando diariamente a presença ou ausência de secreção, crostas ou necrose. Os dados avaliados foram anotados em ficha própria, individual de cada animal.

A avaliação da cicatrização foi realizada em todos os animais mediante mensuração da área de retração do ferimento, medida com paquímetro (Figura 1-B).

Análise microscópica

Após os 7 dias de tratamento os animais foram sacrificados com gás carbônico e a região da lesão dos grupos experimentais analisados foi removida. Foram empregadas as técnicas histológicas de rotina para a preparação de cortes histológicos da área cicatricial.

A peça foi fixada em formalina 10%, e depois seguiu-se os banhos de

etanol e xilol para a inclusão em parafina. Os cortes foram feitos em micrótomo rotativo com cerca de 5µm de espessura e corados em HE e Tricômico de Masson.

As imagens foram analisadas ao microscópio de luz e digitalizadas observando-se o grau de proliferação vascular, presença de células mononucleares e polimorfonucleares, fibroblastos, reepitelização e fibrose. As observações histopatológicas foram registradas e graduadas de acordo com uma escala de severidade de 0 a 3: ausente (0), discreto (1), moderado (2), acentuado (3).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise Macroscópica

A análise macroscópica da ferida foi realizada com base na observação do aspecto da mesma, bem como, a área de sua retração nos três grupos experimentados. Durante o período experimental nenhum dos animais apresentou necrose ou secreção purulenta na ferida. Em relação à retração da ferida, os grupos extrato e controle foram os quais obtiveram maior sucesso (Tabela 1 e Figura 2).



Figura 1. Em A, ferida na região dorso-costal do rato. Em B, mensuração da ferida do animal com paquímetro. Em C, aplicação tópica do extrato hidroalcoólico de *Tabernaemontana catharinensis* sobre a lesão.

TABELA 1. Área da ferida de cada animal no decorrer dos sete dias de observação dos grupos experimentais estudados.

Grupo Controle

	Dia 1 (cm)	Dia 2 (cm)	Dia 3 (cm)	Dia 4 (cm)	Dia 5 (cm)	Dia 6 (cm)
Animal 1	3,00	2,51	2,19	1,88	1,88	1,57
Animal 2	2,51	1,88	1,57	1,25	1,25	1,25
Animal 3	2,51	1,88	1,88	1,57	1,57	1,25
Animal 4	2,51	2,19	2,19	1,88	1,57	1,57

Grupo Extrato Hidroalcoólico de *Tabernaemontana catharinensis*

	Dia 1 (cm)	Dia 2 (cm)	Dia 3 (cm)	Dia 4 (cm)	Dia 5 (cm)	Dia 6 (cm)
Animal 1	2,51	1,88	1,57	1,25	1,25	0,94
Animal 2	2,82	2,82	2,51	2,19	2,19	1,88
Animal 3	2,51	2,19	1,88	1,88	1,88	1,57
Animal 4	2,51	2,19	1,88	1,88	1,88	1,88

Grupo Fármaco

	Dia 1 (cm)	Dia 2 (cm)	Dia 3 (cm)	Dia 4 (cm)	Dia 5 (cm)	Dia 6 (cm)
Animal 1	3,50	3,50	3,14	2,82	2,51	2,51
Animal 2	2,51	2,19	2,19	2,19	1,88	1,57
Animal 3	2,51	2,51	2,19	2,19	2,19	1,88
Animal 4	2,82	2,82	2,82	2,82	2,51	2,19

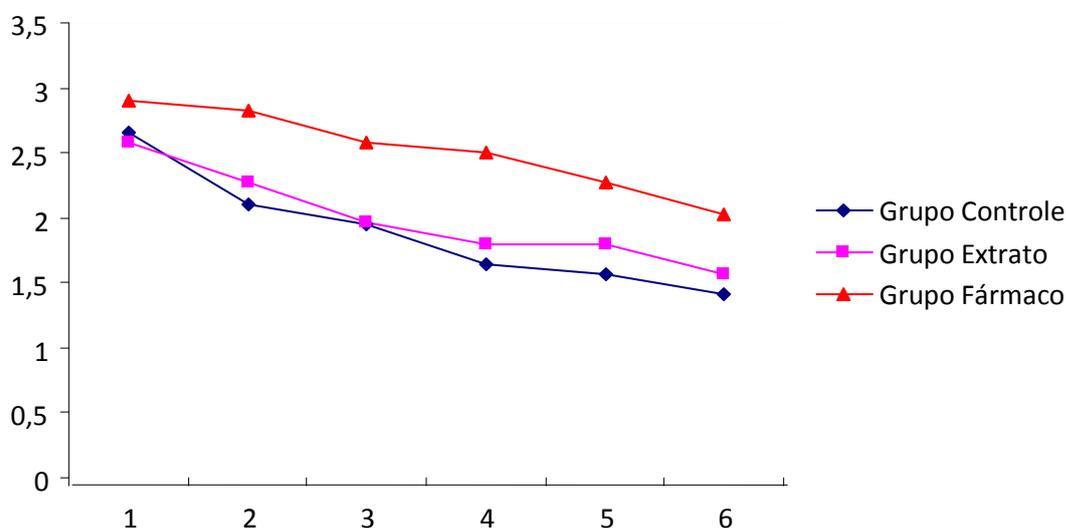


Figura 2. Média da área de retração da ferida entre os grupos controle (GC), grupo extrato hidroalcoólico (GE) e grupo fármaco (GF).

Análise Microscópica

A área observada microscopicamente foi o centro da ferida, uma área ulcerada recoberta por crosta fibrinoleucocitária e abaixo dela tecido conjuntivo com grande número de vasos sanguíneos e fibroblastos (Figura 3 e 4). Os achados foram semelhantes nos três grupos experimentados.

Para proliferação vascular, os achados revelaram uma grande quantidade de vasos sanguíneos, variando entre moderado e acentuado entre os grupos analisados. As células mononucleares são características de infecções crônicas, podendo observar a quase ausência da mesma, pois esta é uma infecção aguda, o que caracteriza o aparecimento de células polimorfonucleares, variando entre moderado e acentuado entre os

grupos, com exceção do GE-I que pode-se classificar como discreto.

Os três grupos analisados apresentaram grande quantidade de fibroblastos aparecendo de forma acentuada nos cortes histológicos. Na reparação do tecido conjuntivo ocorre a formação do tecido de granulação, com proliferação endotelial e fibroblastos. O fibroblasto surge por volta do segundo ou terceiro dia após a cirurgia, estes passam a se multiplicar e a secretar os componentes protéicos do tecido

cicatricial. Ao mesmo tempo ocorre intensa proliferação vascular(3).

A reepitelização aparece como ausente em todos os animais analisados, nas feridas com perda total da derme, a epitelização se faz apenas das margens da mesma, pois não há anexos cutâneos remanescentes(3) e a área observada foi o centro da ferida.

A fibrose aparece como moderado e acentuado entre os grupos.

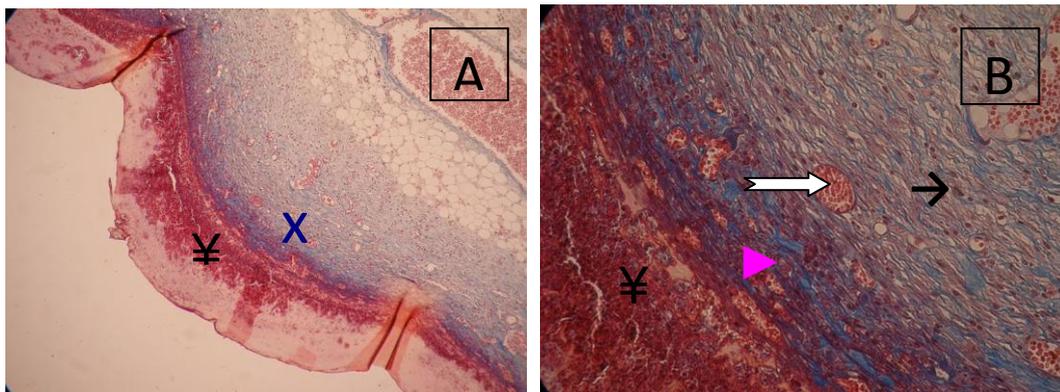


Figura 3. Em A área central da ferida do grupo controle, aspecto da crosta fibrinoleucocitária (≠) e abaixo dela tecido conjuntivo (x). Em B, Grupo Controle, presença da crosta fibrinoleucocitária (≠) com células de defesa e tecido conjuntivo com grande número de vasos sanguíneos (⇨), fibras colágenas (▶) e fibroblasto (→).

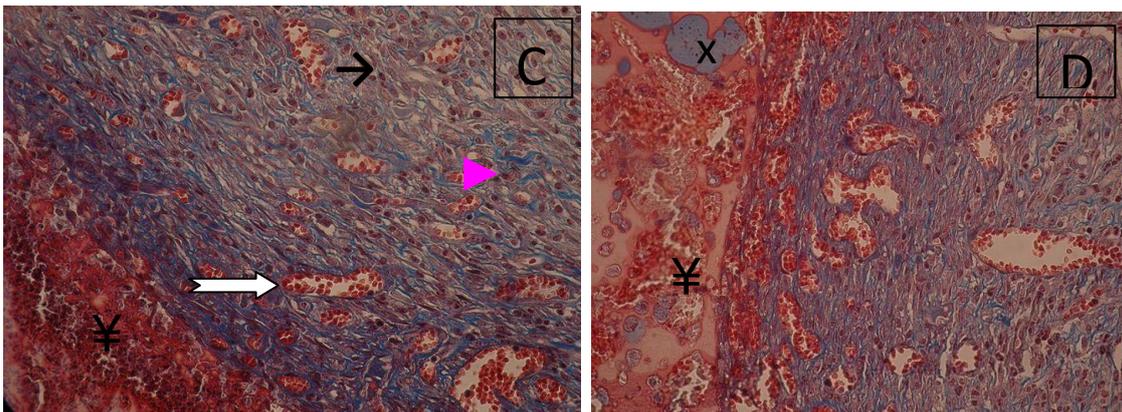


Figura 4. Em C, Grupo Extrato, tecido de granulação com células de defesa (¥), presença de vasos sanguíneos (⇌), fibroblastos (→), colágeno (▶). Em D, Grupo Fármaco, há presença de coágulo (x), tecido de granulação (¥), vascularização intensa, fibroblastos e fibras colágenas.

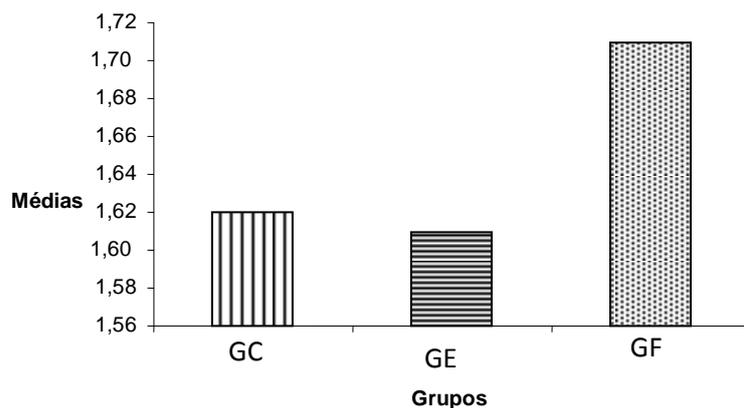


Figura. 5. Médias dos escores de cicatrização entre os grupos controle (GC), grupo extrato hidroalcoólico (GE) e grupo fármaco (GF).

De acordo com a figura 5, o grupo que apresentou os componentes do processo de cicatrização (proliferação vascular, presença de células mononucleares e polimorfonucleares, fibroblastos, reepitelização e fibrose) em maior escala foi o grupo fármaco, sendo que este ao final do tratamento era o grupo que apresentava maior dimensão de área na ferida, sugere-se portanto que como os grupos controle e extrato já estavam em um estágio mais avançado de cicatrização da ferida, os valores dos escores destes apresentaram-se menores, considerando que o grupo fármaco

estava no processo de cicatrização mais tardio, apresentando valores maiores dos componentes do processo de cicatrização.

Vários autores já avaliaram o emprego tópico de inúmeros fitoterápicos com o objetivo de influenciar o processo cicatricial, com resultados variados. Contrera e colaboradores(10), testaram a tintura mãe de raízes de *Lichnophora ericoides* (arnica-da-serra-dourada), de *Aristolochia esperanzae* (papodeperú) e de *Solidago microglossa* (falsa-arnica) no tratamento de feridas cutâneas em ratos,

apresentando retardo na cicatrização das mesmas.

Eurides e colaboradores(11), testaram a solução aquosa de barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman martius*) na evolução cicatricial de feridas cutâneas em dorso de camundongos. Os resultados mostraram que esta solução apresentou eficiência no auxílio da reparação cicatricial das feridas dos mesmos.

Santos e colaboradores(12), utilizaram o extrato bruto de *Jatropha gossypifolia* L. na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. No aspecto macroscópico o resultado do grupo *Jatropha* foi semelhante ao controle, mostrando melhora comparativa na cicatrização no aspecto microscópico com o extrato. O que se mostrou o contrário se tratando do presente estudo, pois no aspecto macroscópico, o grupo extrato mostrou efeito

cicatrizante positivo, enquanto no aspecto microscópico, os três grupos experimentados apresentaram resultados semelhantes.

Na revisão de literatura realizada, não foi encontrado nenhum trabalho experimental que tenha avaliado o extrato hidroalcoólico de *Tabernaemontana catharinensis* no processo de cicatrização de ferida aberta no dorso de ratos. Sendo desta forma imperativo a necessidade de outros estudos com esta planta nos processos de reparação tecidual. Mas que levando em consideração a análise macroscópica, onde a contração da ferida ocorreu com mais sucesso no grupo experimentado do que no fármaco, e que o grupo extrato e o grupo controle apresentaram aspectos de contração da ferida semelhantes, pode-se sugerir que o extrato de *Tabernaemontana catharinensis* contém propriedades cicatrizantes.

REFERÊNCIAS

- 1- NITZ, A.I.C. Estudo morfométrico na cicatrização de feridas cutâneas em ratos, utilizando *Coronopus didymus* e *Calendula officinalis*. [dissertation]. Florianópolis: UFSC, 2005.
- 2- GARROS, I.C.; CAMPOS, A.C.L.; TÂMBARA, E.M.; TENÓRIO, S.B.; TORRES, J.M.; AGULHAM, M.A. et al. Extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos: Estudo morfológico e Histológico. Rev Acta Cirúrgica Brasileira, 2006. 21 (3): 55-65.

3- BLANES, L. Tratamento de feridas. Baptista-Silva JCC, editor. Cirurgia vascular: guia ilustrado. 2004. São Paulo. Disponível em: URL: <http://www.bapbaptista.com>

4- NETO, M.L.C.B.; FILHO, J.M.R.; MALAFAIA, O.; FILHO, M.A.O.; CZECHKO, N.G.; AOKI, S. et al. Avaliação do extrato hidroalcoólico (*Schinus terebenthifolius Raddi*) no processo de cicatrização de feridas em pele de ratos. Rev Acta Cirúrgica Brasileira, 2006. 21(2).

5- BORGES, M.H.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M.; OLIVEIRA, F.; FRANSCHESCHI, A.M.; RUCAVADO, A. et al. Neutralization of proteases from *Bothrops* snake venoms by the aqueous extract from *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae). Toxicon, 2001, v. 39, p. 1863-1869.

6- VIEIRA, A.P.; SANTOS, N.R.; BORGES, J.H.S.; VICENZI, M. P. A.; SCHMITZ, W. O. Ação dos flavonóides na cicatrização por segunda intenção em feridas limpas induzidas cirurgicamente em ratos Wistar. Semina: Ciências Biológicas e da saúde, 2008, Londrina, v.29, n.1, p. 65-74.

7- ROCHA, A.A. Obtenção e avaliação das atividades analgésica e antiinflamatória do extrato hidroalcoólico bruto da arnica brasileira (*Solidago microglossa*, DC). Universidade de Franca, 2006.

8- RATES, S.M.; CAUDURO, A.D.; SALAZAR, V.; MORENO, P.R.H.; HENRIQUES, A.T. Alcalóides indólicos em *Peschiera australis* (Muell. Arg.) Miers. Var. australis. Caderno de Farmácia, 1988. 1-2(4): 51-62.

9- GUIDA, A.; KRAMER, F.; JORDÁ, G.; AMER, L.,; MEDVEDEFF, M.; BARGARDI, S. *Staphylococcus aureus* Meticilino-resistentes, sensible a Extractos de *Tabernaemontana catharinensis* A.DC. Acta Farm. Bonaerense;2001. 20(3): 205-8.

10- CONTRERA, A.; BERNARDI, A.C.; POZETTI, G.L.; LOPES, R.A.; CONTRERA, M.G.D. Ação da tintura-mãe de *Lichnophora ericoides*, *Aristolochia esperanzae* e *Solidago microglossa*, em feridas cutâneas de ratos. Rev Esc Farm Odont. 1985; 11: 157-60.

11- EURIDES, D.; MAZZANTI, A.; BELLETI, M.E.; SILVA, L.A.F.; FIORAVANTE, M.C.S.; TRONCOSO NETO, N.S. et al. Morfologia e morfometria da reparação tecidual de feridas cutâneas de camundongos tratadas com solução aquosa de barbatimão (*Stryphnodendron Barbatiman* Martius). Revista da FZVA Uruguaiana, 1995/1996.v. 2/3, n. 1, p. 30-40.

12- SANTOS, M.F.S.; CZECHKO, N.G.; NASSIF, P.A.N.; RIBAS-FILHO, J.M.; ALENCAR, B.L.F.; MALAFAIA, O. et al. Avaliação do Uso do Extrato Bruto de *Jatropha Gossypifolia* L. na Cicatrização de Feridas Cutâneas em Ratos. Acta Cirúrgica Brasileira, 2006- Vol 21 (Suplemento 3).