
ARTIGO ORIGINAIS

*Estudo morfométrico no processo de cicatrização de feridas cutâneas em ratos, usando: *Coronopus didymus* e *Calendula officinalis**

Antonio Carlos Nitz², Jorge Bins Ely³, Armando José d'Acampora⁴, David Rivero Tames⁵,
Beatris Pacheco Corrêa⁶

Resumo

Introdução: Há milênios o homem utiliza plantas medicinais com a finalidade de acelerar o processo de cicatrização de feridas cutâneas. Apesar do uso sistemático algumas plantas medicinais ainda não receberam o devido respaldo científico através da experimentação.

Objetivo: Estudar comparativamente, através de metodologia histométrica, o potencial cicatrizante dos extratos aquosos de *Coronopus didymus* e *Calendula officinalis*.

Métodos: 15 ratos Wistar, machos, pesando aproximadamente 250 g foram submetidos ao resseccionamento de um fragmento cutâneo circular de aproximadamente 1 cm de diâmetro, até a exposição da fáscia muscular. Os animais foram divididos em dois grupos. O grupo controle recebeu diariamente sobre o ferimento uma gota de soro fisiológico. O grupo experimental foi redistribuído em 2 subgrupos. O Subgrupo CD recebeu diariamente uma gota de extrato aquoso de *Coronopus didymus* e no Subgrupo CO aplicou-se diariamente uma gota de extrato aquoso de *Calendula officinalis*. Decorridos sete dias de experimento, os animais foram submetidos à eutanásia.

A área em cicatrização foi removida e processada para confecção de lâminas histológicas coradas com H. E. Para a avaliação morfométrica utilizou-se uma ocular histométrica dotada de um retículo de 100 pontos e empregou-se uma objetiva de 100x.

Resultados: A avaliação histométrica permitiu observar que o grupo controle apresentou em média 14,51 fibroblastos e 64,63 fibras colágenas por campo observado; o Subgrupo *Coronopus didymus* apresentou em média 19,06 fibroblastos e 70,95 fibras colágenas e o Subgrupo *Calendula officinalis* apresentou em média 17,89 fibroblastos e 68,54 fibras colágenas.

Conclusões: Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que o extrato aquoso de *Coronopus didymus* mostrou-se eficiente no processo cicatricial de feridas cutâneas em ratos Wistar, uma vez que promoveu um aumento, estatisticamente significativo, do número de fibroblastos e fibras colágenas.

O extrato aquoso de *Calendula officinalis*, apesar de proporcionar um maior número de fibras colágenas e fibroblastos que o grupo controle, não apresentou diferença estatisticamente significativa.

Descritores: 1. *Coronopus didymus*;
2. *Calendula officinalis*;
3. Cicatrização.

Abstract

Introduction: Herbal medicine has been used to accelerate wound healing process for thousand years. In

¹ Mestre em Ciências Médicas pela UFSC, Professor Adjunto de Histologia da Universidade do Vale do Itajaí

² Doutor em Medicina pela UNIFESP-EPM, Professor Adjunto do Departamento de Clínica Cirúrgica da Universidade Federal de Santa Catarina

³ Doutor em Medicina pela UNIFESP-EPM, Professor Adjunto Departamento de Clínica Cirúrgica da Universidade Federal de Santa Catarina

⁴ Doutor em Morfologia pela UNIFESP-EPM, Professor Adjunto de Histologia Buco-Dental da Universidade do Vale do Itajaí

⁵ Enfermeira e Técnica em Histologia

spite of the systematic use of medical plants, some of them have not received an adequate scientific investigation through experimentation.

Objective: Study comparatively, through histometric methodology, the healing potential of the aqueous extracts of *Coronopus didymus* and *Calendula officinalis*.

Method: 15 male Wistar rats, weighing about 250 g were submitted to a resection of a circular skin fragment of about 1 cm in diameter until exposing the muscular fascia. The animals were divided in three groups and during seven days group I received a drop of physiologic serum over the wound daily, group II received a drop of aqueous extract of *Coronopus didymus* daily and group III received a drop of aqueous extract of *Calendula officinalis* daily. Passed the experimental period of seven days, the rats were euthanized. The healing area was removed and processed for the preparation of histological slides colored with H. E. In order to process the morphological evaluation, it was used an histometric eyepiece of 100 points and a 100x objective lens.

Results: It has been observed through histometrical evaluation that Group I (control) presented an average of 14,51 fibroblasts and 64,63 collagenous fibers by field observed. Group two (*Coronopus didymus*) presented an average of 19,06 fibroblasts and 70,95 collagen fibers and Group III (*Calendula officinalis*) presented an average of 17,89 fibroblasts and 68,54 collagen fibers.

Conclusions: based on this investigation, it is concluded that the aqueous extract of *Coronopus didymus* showed efficiency in the process of accelerating wound healing in Wistar rats, as it has promoted a statistically significant increase in the number of fibroblasts and collagen fibers.

The aqueous extract of *Calendula officinalis* has also promoted an increase in fibroblasts and collagen fibers compared to the control group but it was not a statistically significant difference.

Keywords: 1. *Coronopus didymus*;
2. *Calendula officinalis*;
3. Healing process.

Introdução

A camada mais externa da pele é formada por tecido epitelial, do tipo pavimentoso estratificado queratinizado, que constitui a epiderme. Abaixo desta, encontramos um tecido conjuntivo denominado derme. O tecido epitelial apresenta uma grande coesão entre suas células, mas é sensível a solução de continuidade, que se ocorrer, é precipitada por fatores agentes, expondo o tecido conjuntivo subjacente. A cicatrização da pele, ou seja, a reparação dos tecidos lesados, pode se dar de duas formas: espontaneamente ou por primeira intenção ou então, quando a lesão apresenta-se extensa e infectada, com grande destruição tecidual e os bordos não se mantém coaptados também denominada segunda intenção.¹ Os dois mecanismos de cicatrização seguem o mesmo processo, ocorrendo apenas diferenças quantitativas e não qualitativas.² Logo após o ferimento, o sangue preenche a área lesada, seguido da coagulação, desidratação e formação de crosta, protegendo a lesão. Com a liberação de mediadores químicos por parte do coágulo, desenvolve-se uma reação inflamatória aguda. Neutrófilos, seguido dos macrófagos e finalmente monócitos e linfócitos invadem a área lesada, respectivamente.³ Dentro de 3 a 5 dias, forma-se tecido de granulação,⁵ mediado por: fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e PDGF e a citonina TNF α .³ Os capilares neoformados possuem grande permeabilidade, favorecendo o aspecto edemacado de tecido de granulação.⁷ Fibroblastos, capilares neoformados e células inflamatórias residuais, passam a constituir o tecido de granulação. Miofibroblastos migram para a lesão após dois ou três dias, unem-se e, através de sua capacidade contrátil, promovem uma retração da ferida, que pode atingir de 50 a 70% do tamanho inicial.⁶ Simões e col. e Sanchez Neto e col. afirmam que os fibroblastos atingem seu maior número no 7º dia, ocorrendo um decréscimo a partir de então.^{7,8} O aumento da densidade de fibras colágenas e suas retratações, por sinérese, promovem a redução do diâmetro de um certo número de capilares, o endotélio desses vasos prolifera para a luz causando sua obstrução, ocorre a diminuição do fluxo sanguíneo, determinando uma redução dos constituintes do tecido de granulação.¹ Arteríolas e vênulas surgem na área lesada por diferenciação de células mesenquimais em células musculares que envolvem os capilares, passando a constituir a parede desses novos vasos. Estas alterações fazem com que o tecido de granulação mude sua estrutura, constituindo

um tecido conjuntivo típico.⁶

Já nos primórdios da humanidade, o homem, ao procurar nas plantas uma fonte de alimento, observou que algumas delas promoviam efeitos terapêuticos.⁹ Muitas plantas ditas medicinais não possuem o respaldo científico por não terem sido objeto de experimentação. Uma das plantas medicinais que ainda é utilizada nos dias de hoje é o mastruz, que tem como nome científico *Coronopus didymus*. O único trabalho encontrado nas bases Lilacs e Medline versando sobre a ação de *Coronopus didymus* no processo de cicatrização foi realizado por Prabhakar e col. que se utilizaram dessa planta sob a forma oral.¹¹ Entretanto, não encontramos na literatura, experimentos sobre o uso tópico.

Outro fitoterápico freqüentemente pesquisado é a *Calendula officinalis*, conhecida popularmente apenas como calêndula. É anti-inflamatória, cicatrizante, analgésica, colerética e antitumoral, é usada sob as mais variadas formas, tais como: infusões, tintura, unguento, utópico, por via oral e através de uso homeopático.^{4,10,15}

Levando em consideração os aspectos colocados, julgou-se oportuna a realização de estudo experimental que pretende avaliar, morfometricamente, a possibilidade de aceleração dos eventos das cicatrizações em feridas cirúrgicas cutâneas realizadas em ratos, através da utilização das plantas medicinais *Coronopus didymus* e *Calendula officinalis*.

Métodos

Para a realização deste estudo foram utilizados 15 ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) machos, com idade média de 2 meses, pesando aproximadamente 250 g, fornecidos pelo biotério central da UNIVALI. Durante as etapas experimentais, os animais foram mantidos no Biotério de Recepção, em gaiolas individuais, em ambiente com controle de temperatura e ciclo noite/dia bem definido, ração própria para a espécie e água “*ad libitum*”.

Os animais foram distribuídos em dois grupos e um deles, redistribuído em 2 subgrupos:

Grupo (I) controle com 5 ratos. *Grupo (II) experimental* dividido em subgrupo CD com 5 ratos e subgrupo CO também com 5 ratos.

Após anestesia com Kensol® 10 mg/kg e Vetanarcol® 25 mg/kg procedeu-se em todos os animais a epilação, por arrancamento, de uma área na região dorso costal. Em seguida demarcou-se, com auxílio de uma caneta hidrocor, uma área circular de 1 cm de diâmetro. Utilizando-se uma tesoura foi seccionado um fragmento

cutâneo, correspondendo a área demarcada, até a exposição da fáscia muscular. (Figuras 1 e 2)

Em seguida ao procedimento cirúrgico cada animal recebeu topicamente, uma gota das soluções (soro fisiológico, extrato aquoso de *Coronopus didymus* e extrato aquoso de *Calendula officinalis*), conforme o grupo ao qual pertencia. A cada dia do experimento, que durou sete dias, os animais receberam uma gota das respectivas soluções. (Figuras 3 e 4)

Decorrido os sete dias do experimento os animais foram sacrificados, as áreas em processo de cicatrização foram ressecadas e submetidas às técnicas habituais para coloração em Hematoxilina-Eosina. Em cada lâmina foram fixados dois cortes histológicos da mesma ferida e para cada ferida foram confeccionadas cinco lâminas.

Para a avaliação histológica utilizou-se um microscópio óptico marca Olympus® modelo CH 30, adaptado com uma ocular histométrica Karl Zeiss Jena® modelo GF – P 10x dotada de um retículo de 100 pontos. A objetiva empregada foi de 100x. Em cada lâmina foram observados cinco campos, dois campos próximos à região de transição ferida/pele normal, em lados opostos, um campo central de fragmentos e mais dois campos da região de transição ferida/pele normal, em lados opostos do outro fragmento. Contou-se o número de fibroblastos, fibras colágenas e vasos sanguíneos. Os elementos que não compreendiam os três itens anteriores eram classificados como outros. Para auxiliar na contagem, utilizou-se um contador eletrônico de células sanguíneas marca KACIL® modelo CCS-01.

Figura 1 - Arruela metálica posicionada sobre a área



Figura 2 - Medida do diâmetro crânio-caudal da ferida.

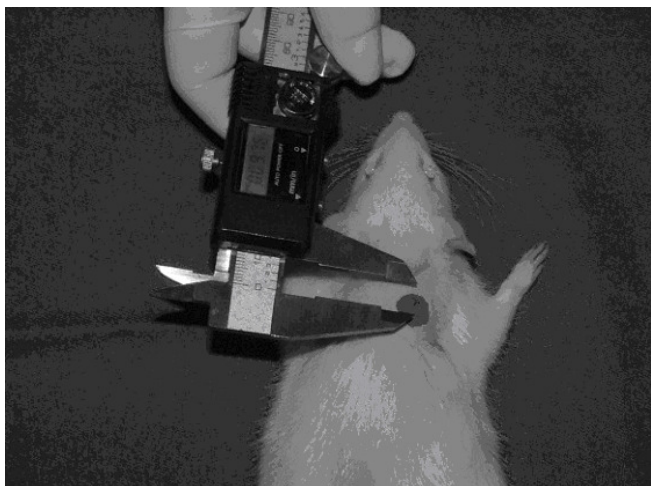


Figura 3 - *Coronopus didymus*

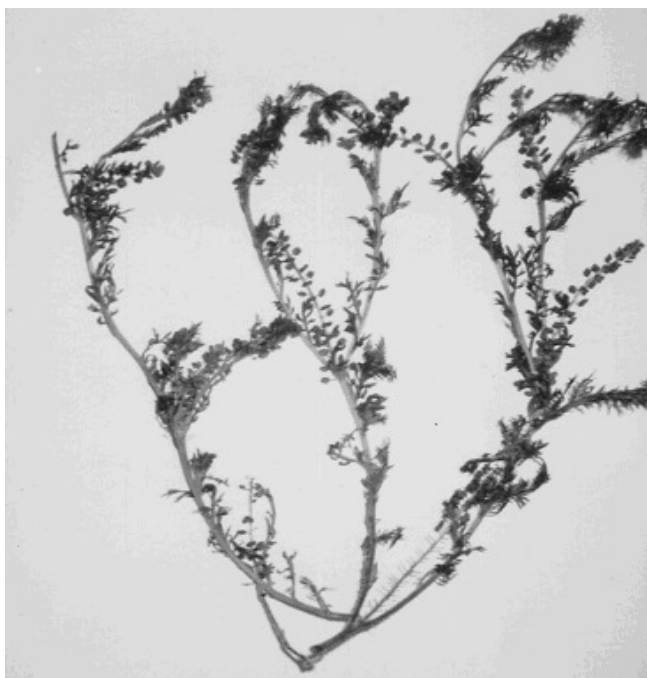


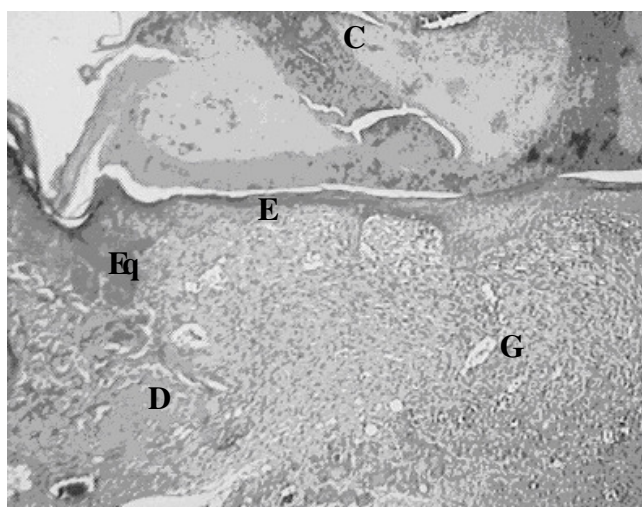
Figura 4 - *Calendula officinalis*.



Resultados

Na análise estatística, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey fixando em 0,05 ou 5% o nível de rejeição da hipótese de nulidade, que permitiu observar diferença estatisticamente significativa somente entre as médias de fibroblastos e fibras colágenas do grupo controle e do grupo *Coronopus didymus*, sendo as médias favoráveis ao grupo *Coronopus didymus* no processo de cicatrização. (Figuras 5 e 6).

Figura 05 - Fotomicrografia do grupo *Coronopus didymus*.



Observar crosta fibrino-leucocitária (C), epitélio neoformado (E), tecido de granulação (G), a pele normal com epitélio pavimentoso estratificado queratinizado (Eq) e a derme (D). H.E. Objetiva de 4x.

Figura 06 - Fotomicrografia do grupo *Calendula officinalis*.

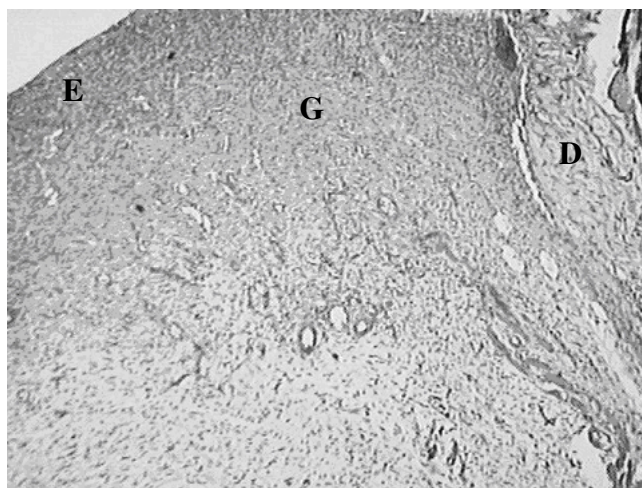


Tabela 1 – Contagem de fibroblastos, fibras colágenas, vasos sanguíneos e outros constituintes do tecido conjuntivo no grupo controle.

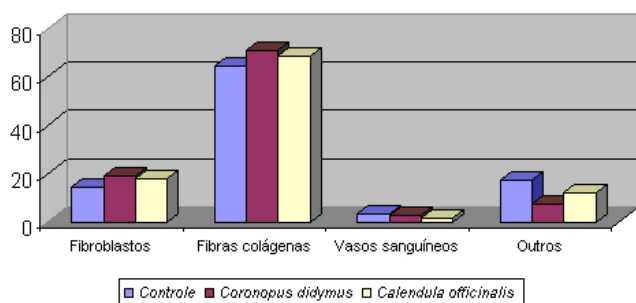
Animal	Fibroblastos	Fibras colágenas	Vasos sanguíneos	Outros
1	14,56	60,12	7,28	18,04
2	12,77	60,14	3,93	23,16
3	17,05	73,72	1,80	7,43
4	16,00	64,12	1,68	18,20
5	12,16	65,08	2,36	20,40
Média	14,51	64,63	3,41	17,45

Tabela 2 – Contagem de fibroblastos, fibras colágenas, vasos sanguíneos e outros constituintes do tecido conjuntivo no grupo *Coronopus didymus*.

Animal	Fibroblastos	Fibras colágenas	Vasos sanguíneos	Outros
1	17,96	69,12	7,84	5,08
2	21,80	71,40	1,52	5,28
3	18,08	70,99	0,88	10,05
4	20,72	69,52	1,44	8,32
5	16,76	73,72	2,00	7,52
Média	19,06	70,95	2,74	7,25

Tabela 3 – Contagem de fibroblastos, fibras colágenas, vasos sanguíneos e outros constituintes do tecido conjuntivo no grupo *Calendula officinalis*.

Animal	Fibroblastos	Fibras colágenas	Vasos sanguíneos	Outros
1	20,88	67,88	3,00	8,24
2	16,28	65,60	2,16	15,96
3	18,52	71,84	1,41	8,23
4	17,79	70,92	0,51	10,78
5	16,00	66,44	0,72	16,84
Média	17,89	68,54	1,56	12,01

Gráfico 1 – Percentagem de fibroblastos, fibras colágenas, vasos sanguíneos e outros constituintes do tecido de granulação no grupo controle e sub-grupos *Coronopus didymus* e *Calendula officinalis*.

Discussão

Algumas plantas medicinais intensamente utilizadas de uma maneira empírica ao longo dos milênios passaram a receber, atualmente, uma atenção científica.

Coronopus didymus, popularmente conhecido como mastruz, é largamente utilizado como agente cicatrizante para feridas cutâneas e também nos casos de úlcera gástrica quando ingerido com leite. Apesar do uso rotineiro do mastruz, poucos trabalhos científicos são encontrados na literatura e assim pareceu justificável um experimento com essa planta medicinal. Escolheu-se ainda a *Calendula officinalis* como um controle positivo, uma vez que tem sido alvo de muitos estudos e é facilmente encontrada em nosso meio.^{7,10,12,16,17}

Neste experimento o subgrupo *Coronopus didymus* apresentou o maior número de fibroblastos e fibras colágenas. Houve diferença estatística em relação ao grupo controle. Com relação ao subgrupo *Calendula officinalis* apesar da diferença numérica, estatisticamente, pelo teste de Tukey, a diferença não foi observada. Portanto, podemos afirmar que o uso tópico do extrato aquoso de *Coronopus didymus* é eficiente no processo de cicatrização de feridas cutâneas em ratos Wistar quando comparado com o grupo controle.

A eficiência dos fitoterápicos no processo de cicatrização está relacionada, principalmente, aos flavonóides,^{9,13,14} Sugere-se, ainda, que taninos e saponinas também participam dessa capacidade.⁹ Os resultados cicatrizantes obtidos com *Coronopus didymus* provavelmente devem ser creditadas a essas substâncias.

Os achados deste experimento vão de encontro às conclusões de Prabhakar e col. que obtiveram resultados favoráveis no processo de reparo com o uso via oral de *Coronopus didymus* em solução aquosa e etanólica na dosagem de 200mg/kg. Entretanto, existem duas diferenças básicas entre esses dois trabalhos. No primeiro, a planta medicinal foi utilizada topicamente e o resultado foi constatado mediante a contagem de fibroblastos e fibras colágenas. No experimento de Prabhakar e col., a via de aplicação foi oral e os resultados foram obtidos de forma indireta através da resistência à tensão.¹¹

A frequência de aplicação do fitoterápico também não está estandarizada na literatura. A aplicação com períodos mais curtos poderia determinar resultados diferentes, utilizando-se do uso via oral associado ao uso tópico pode potencializar o seu efeito curativo.

Conclusão

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que o extrato aquoso de *Coronopus didymus* mostrou-se eficiente no processo cicatricial de feridas cutâneas em ratos Wistar, uma vez que promoveu um aumento, estatisticamente significativo, do número de fibroblastos e fibras colágenas. O extrato aquoso de *Calendula officinalis*, apesar de proporcionar um maior número de fibras colágenas e fibroblastos que o grupo controle, não apresentou diferença estaticamente significativa. Através da experimentação e de uma avaliação histométrica, torna-se possível, porém, que essas plantas medicinais recebam o devido respaldo científico.

Referências

1. Becker PFL. Patologia geral. São Paulo: Sarvier; 1997; 127-33.
2. Martinez-Hernandez A. Reparação, Regeneração e Fibrose. In: Rubin E, Farber J. Patologia. 3rd ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999; 75-97.
3. Brasileiro Filho G. Bigliolo Patologia geral. 3rd ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004; 75-80.
4. Balducci-Roslindo E, Silvério KG, Malagoli DM. Processo de reparo em feridas de extração dentária em camundongos tratados com o complexo *Symphitum officinale* e *Calendula officinalis*. Rev Odontol Univ São Paulo 1999;13(2):181-7.
5. Cotran RS, Kumar V, Robbins, ST. Patologia estrutural e funcional. 6th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000; 87-99.
6. Montenegro MR, Franco M. Patologia processos gerais. 4th ed. São Paulo: Atheneu; 1999; 146-50.
7. Trowbridge HO, Emling RC. Inflamação; uma revisão do processo. 4th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan: Quintessence Books; 1998; 137-52.
8. Sanchez Neto R, Barone B, Tevês DC, Simões MJ, Novo NF, Juliano Y. Aspectos morfológicos e morfométricos da reparação tecidual de feridas cutâneas de ratos com e sem tratamento com solução de papaína a 2%. Acta Cir Bras 1993;8(1):18-23.
9. Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR (Org). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5th ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC; 2003; 833.
10. Parente LML, Paula JR, Costa EA, Silveira NA. *Calendula officinalis*: características, propriedades químicas e terapêuticas. Arq. Ciências Saúde UNIPAR 2002;6(2); 165-9.
11. Prabhakar KR, Srinivasan KK, Rao PGM. Chemical investigation, anti-inflammatory and wound healing properties of *Coronopus didymus*. Pharm Biol 2002;40(7); 490-3.
12. Campos MCPS, Coelho MCOC, Silva LBG, Monteiro VLC, Lima ET, Aceto ML. Tratamento de feridas infectadas utilizando *Calendula officinalis*. Hom Bras 2000;6(1); 22-8.
13. Pérez-Carreón JI, Cruz-Jimenez G, Licea-Vega JA, Popoca EA, Fazenda SF, Villa-Trevino S. Genotoxic and anti-genotoxic properties of *Calendula officinalis* extracts in rat liver cell cultures treated with Diethylnitrosamine. Toxicology in Vitro 2002;16(3); 253-8.
14. Peruchi CMS, Silva EB, Andrade RA, Franco SL, Ramalho L. Efecto del propóleos en la cicatrización de lesiones subcutâneas inducidas en el dorso de ratones: estudio histológico. Rev Fac Odontol Univ Chile 2001;19(2);.23-34.
15. Figueiredo HF, *Calendula officinalis* – A cura de verrugas. Hom Bras 1997;3(3); 421-2.
16. Gil BA, Castillo RM, Roque CG, Fernández DF. Extracto acuoso de *Calendula Officinalis*. Estudio preliminar de sus propiedades. Rev Cubana Plant Med 2000;5(1); 30-1.
17. Carvalho PSP, Tavagliavini DG, Tavagliavini RL. Cicatrização cutânea após aplicação tópica de creme de calêndula e da associação de confrei, própolis e mel em feridas infectadas: estudo clínico e histórico em ratos. São Paulo: Rev Cienc Biomed 1991;12:39-50.

Endereço para correspondência:

Antônio Carlos Nitz
Rua: 2950, nº 671
CEP 88330-000
Balneário Camboriú / SC