

ARTIGO ORIGINAL

Efeitos da quercetina na cicatrização de ferida cirúrgica contaminada em ratos WistarArmando José d'Acampora¹, Ricardo Tramonte², Dênis Bürger³, Peter Johann Bürger⁴**Resumo**

Introdução: A maioria das complicações na cicatrização é devida à inflamação. Comprovou-se que flavonóides interagem com ampla variedade de sistemas enzimáticos e bioquímicos, exercendo atividade antioxidante, antiinflamatória e antibacteriana. Não há relatos sobre cicatrização cutânea em ratos com administração intraperitoneal do flavonóide quercetina associado à incisão cirúrgica contaminada.

Objetivo: Avaliar os efeitos da administração intraperitoneal de quercetina no processo cicatricial da pele em ratos Wistar associados à incisão cirúrgica contaminada com inóculo bacteriano padrão.

Métodos: Utilizou-se 30 ratos: Grupo 1 (controle): procedimento cirúrgico contaminado, sem quercetina. Grupo 2: quercetina 24 horas antes do procedimento cirúrgico contaminado. Grupo 3: quercetina 24 horas antes e 24 e 48 horas após o procedimento cirúrgico contaminado. Grupo 4: quercetina 24 horas antes e 24, 48 e 72 horas após o procedimento cirúrgico contaminado. Grupo 5 (*sham*): procedimento cirúrgico sem contaminação e sem quercetina. Macroscopicamente, analisou-se deiscência de sutura, necrose de borda e piodermite, mensurando-se a área do abscesso. Microscopicamente analisou-se: reepitelização, intensidade do infiltrado inflamatório e avaliação da distância entre as fibras musculares subcutâneas. Resultados: Os grupos com quercetina apresentaram menor área de abscesso ($p < 0,05$) em relação ao controle.

Deiscência e necrose não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos. Os grupos com quercetina apresentaram melhor reepitelização, celularidade compatível com fase mais avançada do processo cicatricial e menor quantidade de abscesso formado.

Conclusões: A administração de quercetina intraperitonealmente mostrou-se eficaz sobre o processo cicatricial cutâneo em ratos Wistar associado à incisão cirúrgica contaminada com inóculo bacteriano padrão.

Descritores: 1. Quercetina;
2. Cicatrização;
3. Infecção;
4. Ratos Wistar.

Abstract

Background: In most of the cases, complications in wound healing are due to inflammation. Flavonoids interact with a wide variety of biochemical and enzymatic systems, exerting antioxidant, antiinflammatory and antibacterial activity. There are no reports about cutaneous wound healing process in rats with intraperitoneal administration of quercetin associated with contaminated surgical incision.

Objective: To evaluate the effects of the intraperitoneal administration of quercetin over cutaneous wound healing process in Wistar rats associated with contaminated surgical procedure with a standard bacterial inoculum.

Methods: Thirty rats: Group 1 (control): contaminated surgical procedure, without quercetin. Group 2: quercetin 24 hours before the contaminated surgical procedure.

¹ Professor adjunto do Departamento de Clínica Cirúrgica da UFSC – Doutor em Medicina pela Unifesp-EPM.

² Professor adjunto do Departamento de Morfologia da UFSC – Doutor em Histologia pela USP.

³ Acadêmico do 6º ano do Curso Graduação em Medicina da UFSC.

⁴ Professor da Universidade do Sul de Santa Catarina – Doutor em Zootecnia pela UFV.

Group 3: quercetin 24 hours before and 24 and 48 hours after the contaminated surgical procedure. **Group 4:** quercetin 24 hours before and 24, 48 and 72 hours after the contaminated surgical procedure. **Group 5 (sham):** surgical procedure without contamination neither quercetin. Macroscopically, the suture dehiscence, wound edge necrosis and pyodermitis were analyzed. Microscopically: reepithelization, cellularity and qualitative evaluation of the distance between the subcutaneous muscular fibers. Results: The groups treated with quercetin showed smaller area of abscess ($p < 0,05$) compared with Control. Dehiscence and necrosis did not showed significative difference ($p > 0,05$) among the groups. The ones with quercetin showed better reepithelization, cellularity compatible with a more advanced stage of wound healing and lesser quantity of formed abscess.

Conclusions: Intraperitoneal administration of quercetin improved the cutaneous wound healing process in Wistar rats associated with surgical incision contaminated with a standard bacterial inoculum.

Keywords: 1. *Quercetin*;
2. *Wound healing*;
3. *Infection*;
4. *Wistar rats*.

Introdução

Há apenas um século, a ocorrência da cicatrização complicada e incompleta após um ferimento era mais uma regra que a exceção. A evolução dos cuidados com feridas nos séculos 18 e 19 e a antisepsia mudaram a cirurgia tão dramaticamente quanto a descoberta da anestesia. Ainda assim, má cicatrização, infecção e cicatrização excessiva continuam sendo causas importantes de mortalidade e morbidade^(1,2). O processo de cicatrização divide-se em três fases distintas: inflamação, proliferação e remodelamento⁽³⁾. Na maioria dos casos, a complicação no processo cicatricial é devida à inflamação. Essa resulta na formação contínua de metabólitos reativos. Um desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio e os mecanismos antioxidante de defesa da célula, leva a uma excessiva produção de metabólitos de oxigênio, gerando uma condição de estresse oxidativo que resulta em peroxidação de lipídeos, quebra de DNA e inativação enzimática^(4,5). Vários possíveis antioxidantes são efetivos *in vitro*, mas não *in*

vivo, em virtude de sua meia-vida reduzida^(6,7). A quercetina pertence a um grupo de substâncias conhecidas como flavonóides, que se constituem de polifenóis presentes em relativa abundância entre os metabólitos secundários de vegetais, principalmente em se tratando de angiospermas⁽⁸⁾. A quercetina impede o dano oxidativo e morte celular eliminando radicais de oxigênio, protegendo contra a peroxidação lipídica e interrompendo a reação em cadeia de formação de radicais livres, quelando íons metálicos para formar complexos inertes que não participarão da conversão de radicais superóxido e peróxido de hidrogênio em radicais hidroxila⁽⁹⁾. Além disto, a quercetina demonstrou possuir meia-vida prolongada, de forma a acumular-se no plasma humano durante o dia, mediante a ingestão, tendo meia-vida de 24 horas^(10,11). Nos últimos anos, tem se comprovado que estes compostos interagem com ampla variedade de sistemas biológicos em mamíferos, apresentando atividade antioxidante, antiinflamatória, antibacteriana, antiviral, antimutagênica e com efeitos anticarcinogênicos e antiproliferativos^(12,13,14,15). A revisão realizada não apresentou nenhum trabalho que busque avaliar os efeitos da quercetina, por via intraperitoneal, sobre o processo cicatricial cutâneo após incisão cirúrgica contaminada com inóculo bacteriano padrão.

Métodos

Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso dos Animais (CEUA) da UFSC, cadastrado sob os números 346/CEUA e 23080.011227/2005-56/UFSC.

Foram utilizados 30 ratos da espécie *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar, machos, com idade de 60 dias e peso médio de 275 gramas, distribuídos aleatoriamente em cinco grupos experimentais, com seis animais por grupo ($n=6$), submetidos aos seguintes tratamentos:

Grupo 1 (controle): submetidos ao procedimento cirúrgico contaminado com inóculo padrão, sem administração de quercetina.

Grupo 2: submetidos a uma injeção intraperitoneal de quercetina na dose de 50 mg/Kg, 24 horas antes do procedimento cirúrgico contaminado com inóculo padrão.

Grupo 3: submetidos a três injeções intraperitoneais de quercetina na dose de 50 mg/Kg cada uma. Uma 24 horas antes e duas injeções 24 e 48 horas após o procedimento cirúrgico contaminado com o inóculo padrão.

Grupo 4: submetidos a quatro injeções intraperitoneais de quercetina, na dose de 50 mg/Kg cada uma. Uma 24

horas antes e três injeções 24, 48 e 72 horas após o procedimento cirúrgico contaminado com o inóculo padrão.

Grupo 5 (grupo *sham*): os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico sem contaminação e sem administração de quercetina.

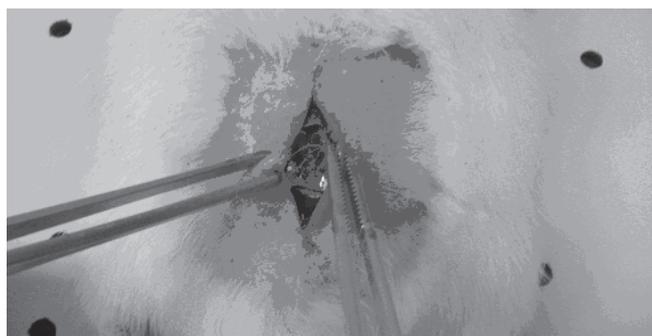
O inóculo foi obtido do Laboratório Médico Santa Luzia (Florianópolis/SC), a partir de colônias de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*. Os inóculos foram dispostos em frascos individualizados com um mililitro de suspensão com 10^9 bactérias/mL cada.

Foi utilizado dihidrato de quercetina ($C_{15}H_{10}O_7 \cdot 2H_2O$), diluída em dimetilsulfóxido P.A. e solução fisiológica em quantidade suficiente para perfazer o volume total para injeção intraperitoneal de 0,5 mL correspondendo a 50mg/Kg.

A anestesia geral foi praticada mediante o uso de cloridrato de ketamina (Ketalar®), e cloridrato de Tiazina (Rompun®), nas doses de 100mg/kg e 10mg/kg, respectivamente (23).

Os animais foram submetidos a uma incisão mediana dorsal de 3 cm de comprimento, seccionando a pele e tecido celular subcutâneo, contaminada com 1 mL de cada inóculo: inicialmente *S. aureus* e em seguida *S. pyogenes* (17,18) (Figura 1).

Figura 1 – Fotografia mostrando incisão de 3 cm no dorso do animal com as bordas suspensas formando cavidade onde o inóculo foi depositado.



Decorridos 15 minutos da contaminação do ferimento, foi realizada síntese cirúrgica, utilizando-se fio Mononylon® 4-0 com cinco pontos simples separados, em plano único.

Nos sete dias subsequentes ao procedimento cirúrgico, foi realizado acompanhamento diário, buscando analisar a presença e a magnitude dos seguintes parâmetros:

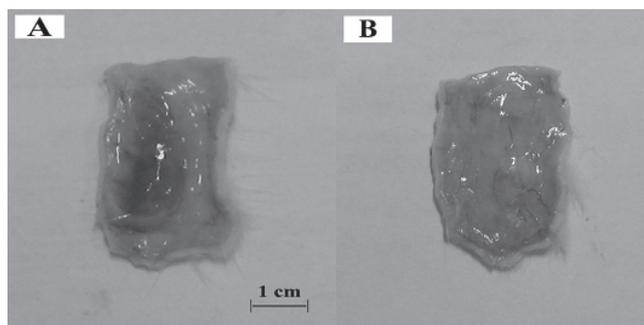
- Deiscência na sutura da ferida operatória;
- Necrose das bordas da ferida operatória;
- Alteração visível na superfície da pele compatível

com piodermite.

A magnitude de cada um destes parâmetros recebeu uma graduação variando de 0 a 3, de acordo com a porcentagem (0, 30, 60 e 90%, respectivamente) de comprometimento da ferida operatória e adjacências. Ao final do sétimo dia os animais foram submetidos à eutanásia (por inalação de dose letal de éter), sendo excisada amostra de 2´4 cm da pele e tecido celular subcutâneo abrangendo a região onde foi realizada a incisão.

As amostras de pele foram dispostas com suas faces internas. Em cada amostra de pele, a mensuração da área do abscesso, quando presente, foi efetuada multiplicando-se a maior largura pelo maior comprimento do abscesso visualizado (Figuras 2A e 2B).

Figura 2 – Fotografias do tecido subcutâneo de amostras de pele com suas faces internas expostas (A) Presença de abscesso visível, com tecido de aspecto escurecido e abaulado. (B) Nota-se, por transparência vasos presentes no subcutâneo e ausência de alteração na coloração ou abaulamento.



Da amostra de pele de cada animal, foram obtidos fragmentos, por secção transversal à incisão cirúrgica, que foram enviados ao laboratório de histologia para obtenção de cortes histológicos pela técnica de rotina, corados por hematoxilina-eosina.

Os parâmetros utilizados para a avaliação microscópica foram os seguintes:

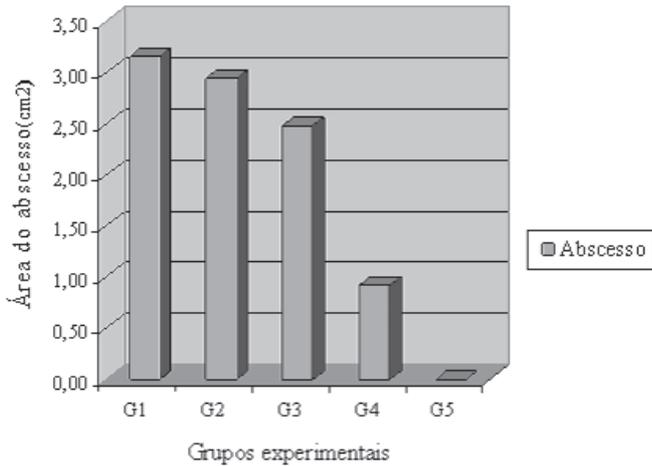
- Presença ou não de reepitelização.
- Presença ou ausência de infiltrado inflamatório e o tipo de celularidade.
- Distância entre as fibras musculares do tecido subcutâneo.

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística com o programa SAS System®, versão 8.0. As diferenças entre as médias foram comparadas através do método do t de Student com nível de significância estabelecido em $p \leq 0,05$.

Resultados

As médias da área do abscesso observado à análise macroscópica (Figura 2), são apresentadas na Figura 3.

Figura 3 – Médias da área do abscesso em cm², à análise macroscópica.



Os valores médios da magnitude dos parâmetros de deiscência de sutura (Figura 4A), piodermite (Figura 4B) e necrose de borda da ferida (Figura 4C) são mostrados na Figura 5.

Figura 4 – Fotografias do dorso dos animais após 7 dias do procedimento experimental.

(A) Presença de deiscência parcialmente cicatrizada no grupo 4. (B) Hiperemia compatível com piodermite no grupo 2. (C) Necrose da borda da ferida com escara no grupo 3.

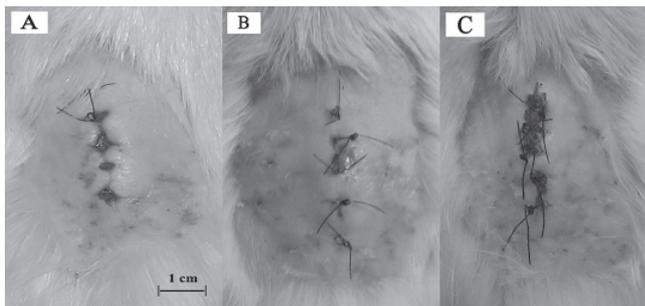
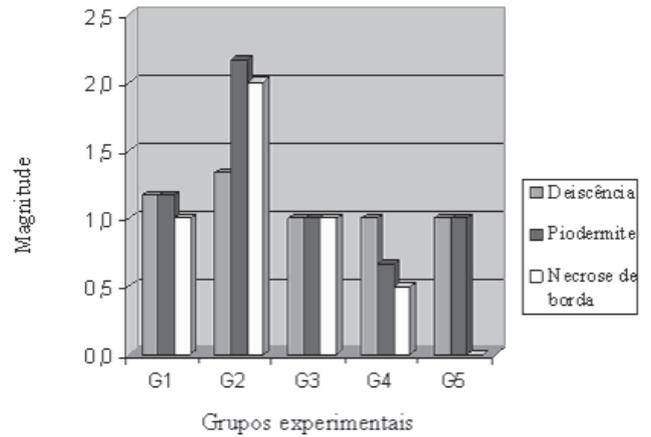


Figura 5 – Médias da magnitude da deiscência, piodermite e necrose de borda à análise macroscópica.



As lâminas mais representativas de cada grupo foram de forma a complementar as diferenças observadas macroscopicamente entre os grupos experimentais (Figuras 6 e 7).

Figura 6 – Fotomicrografias de cortes histológicos sobre a região da incisão (40[×]HE).

(A) reepitelização (R) completa e ausência de infiltrado inflamatório na derme subjacente, onde se visualiza a região onde a incisão (I) foi realizada. (F): folículo piloso. Grupo 4. (B) infiltrado intradérmico (I) compondo abscesso. (D): derme. (E):escara. Grupo 1.

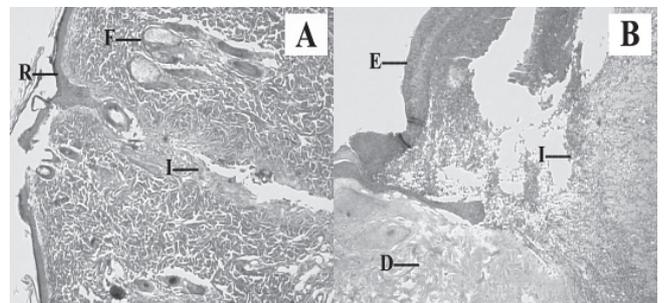
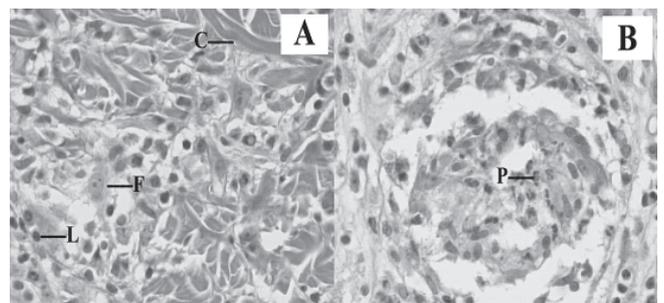


Figura 7 – Fotomicrografias de cortes histológicos sobre a região da incisão (100[×]HE).

(A) infiltrado na derme com presença de celularidade contendo linfócitos (L) e fibroblastos (F) com



Discussão

Adotou-se neste experimento o modelo *in vivo*, pois assim a substância tem de interagir com os diversos sistemas orgânicos do animal, em condições semelhantes as que seriam apresentadas em um contexto de uso clínico em seres humanos. A administração intraperitoneal de quercetina visou padronizar a biodisponibilidade, pois sua absorção enteral ocorre em quantidades variáveis de 20 a 50%⁽¹¹⁾. Além disto, este flavonóide sofre degradação oxidativa nas células intestinais e metabolismo de primeira passagem hepática⁽¹²⁾. Provavelmente a causa mais comum de atraso no processo cicatricial é a infecção da ferida. A presença de bactérias prolonga a fase inflamatória e interferem com a epitelização, contração e deposição de colágeno. As endotoxinas por si só estimulam a fagocitose e a liberação de collagenase que contribuem para a degradação do colágeno e a destruição do tecido vizinho previamente saudável⁽¹⁹⁾. Investigações bioquímicas do mecanismo de ação dos flavonóides têm mostrado que eles inibem uma grande variedade de sistemas enzimáticos. Entre eles, diversas oxigenases, como a prostaglandina-sintetase, enzima chave na biossíntese de eicosanóides, que tem papel fundamental, na inflamação, sensação dolorosa e reparo tissular. Atuam também inibindo a enzima hialuronidase, de forma a preservar os proteoglicanos do tecido conjuntivo prevenindo a disseminação bacteriana ou de metástases tumorais⁽¹²⁾. As reações de oxidação, onde os flavonóides são preferencialmente oxidados, preservam antioxidantes naturais do organismo como o ácido ascórbico^(20,21). A estes fatores somam-se suas propriedades antioxidantes incluindo eliminação de radicais livres e prevenção de peroxidação lipídica⁽²²⁾. Morikawa *et al.*⁽²³⁾ estudaram os efeitos da quercetina em modelo de inflamação utilizando carragenina⁽²⁴⁾, através injeção de ar no subcutâneo do dorso de ratos Wistar, formando bolsa onde foi injetada a quercetina, e posteriormente a carragenina. *A análise histológica da espessura da parede da bolsa evidenciou diminuição significativa nos animais tratados com quercetina.* Rotelli *et al.*⁽²⁵⁾ estudando o efeito de alguns flavonóides, incluindo a quercetina, em modelos experimentais de inflamação em ratos, demonstrou haver inibição significativa da formação de granuloma em chumaço de algodão introduzido na pele e do edema articular induzido pela carragenina com a injeção intraperitoneal prévia de quercetina em doses de 50mg/Kg e 75mg/Kg, respectivamente. Houve formação de abscesso em todos os animais dos grupos 1, 2, 3 e 4, sendo a diferença na

área dos abscessos estatisticamente significativa ($p < 0,05$), de maneira dose-dependente. Para este parâmetro de deiscência de sutura não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre os diferentes tratamentos. Piodermite apresentou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), com maior média de intensidade nos animais do grupos 2 em relação aos outros grupos. Necrose da borda diferiu de forma estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre os grupos. Nitz *et al.*²⁶ estudando o efeito de extratos aquosos de *Coronopus didymus* e *Calendula officinalis* (que apresentam flavonóides em sua composição) sobre o processo cicatricial de feridas cutâneas em ratos Wistar, concluiu haver à microscopia aumento significativo do número de fibroblastos e fibras colágenas nos grupos tratados com o extrato destas plantas. Silva⁽²⁷⁾ estudou a cicatrização de feridas contaminadas com inóculo padrão em ratos Wistar, avaliando o efeito da aplicação tópica de anti-sépticos (solução salina, clorexidina e polivinil pirrolidona iodo) e também não encontrou diferença marcante nos parâmetros de deiscência, necrose e piodermite entre os diferentes grupos experimentais. No entanto à microscopia, a intensidade do infiltrado inflamatório sofreu influência significativa, com uma tendência a resultados melhores com a clorexidina, denotando que os parâmetros externos parecem não ser sobremaneira influenciados, tanto quanto a intimidade da ferida cirúrgica onde o inóculo bacteriano foi de fato depositado. d'Acampora *et al.*⁽²⁸⁾ estudando microscopicamente o processo cicatricial de feridas cutâneas contaminadas em ratos Wistar, avaliando o efeito da aplicação tópica de anti-sépticos observou que a celularidade predominante no grupo experimental sem tratamento era de um infiltrado neutrofílico discreto, associado a infiltrado macrofágico e linfocíticos moderados. No presente experimento, à microscopia, observou-se melhor reepitelização nos grupos tratados com quercetina em relação ao controle. As lâminas dos grupos tratados com quercetina demonstravam coaptação das margens da incisão havendo também menor separação entre as fibras musculares subcutâneas. No que tange à celularidade, esta se apresentava com melhor estrutura, com presença de fibroblastos e deposição de colágeno, linfócitos entremeados e reconstituição parcial da derme, num estágio do processo cicatricial mais avançado comparativamente ao grupo controle, onde havia infiltrado neutrofílico intenso e monótono, compondo quase a totalidade do campo, sem identificação das estruturas da derme subjacente por intensa destruição

tecidual. De forma que havia atraso do processo cicatricial com perpetuação da fase inflamatória, em relação aos grupos tratados com quercetina. Assim, a administração de quercetina por via intraperitoneal mostrou-se eficaz na melhoria do processo cicatricial cutâneo em ratos Wistar, após incisão cirúrgica contaminada com inóculo bacteriano padrão.

Referências Bibliográficas:

- Hunt TK. Wound Healing. In: Way L, Doherty G, editors. Current: Surgical Diagnosis and Treatment, 12.ed. Lange Medical Publications, 2006;75-88.
- Leong M, Phillips LG. Wound Healing. In: Townsend CM, Beauchamp DB, Evers BM, Mattox KL, editors. Sabiston Textbook of Surgery: The Biological Basis of Modern Surgical Practice. Philadelphia, Pennsylvania, Elsevier-Sounders, 2004;183-208.
- Broughton G; Janis J.; Attinger C. Wound Healing: An Overview. *Plast Reconstr Surg.* 2006;117 (7):1e-S-32e-S.
- Gomathi K, Gopinath D, Ahmed M, Jayakumar R. Quercetin incorporated collagen matrices for dermal wound healing processes in rat. *Biomaterials.* 2003;24(16):2767-72.
- Kessler M, Ubeaud G, Jung L. Anti and pro-oxidant activity of rutin and quercetin derivatives. *J Pharm Pharmacol.* 2003;55:131-42.
- Holman PCH, Arts ICW. Review – Flavonoids, flavones and flavanols – nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Agric.* 2000;80:1081-93.
- Hollman PCH. Absorption and disposition kinetics of the dietary antioxidant quercetin in man. *Free Rad Biol Med.* 1996;21:703-7.
- Middleton E, Kandaswami C. The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer. In *The Flavonoids: Advances in Research since 1986.* Harbone JB, 1993.
- Cotelle N. Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr Top Med Chem.* 2001;1:569-90.
- Hollman PCH. Relative bioavailability of the antioxidant quercetin from various foods in man. *FEBS Lett.* 1997;418:152-6.
- Hollman PCH. Absorption and disposition kinetics of the dietary antioxidant quercetin in man. *Free Rad Biol Med.* 1996;21:703-7.
- Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther.* 2002; 96(2-3):67-202.
- Puupponen-Pimiä R, Nohynek L, Meier C, Kähkönen M, Heinonen M, Hopia A, Oksman-Caldentey KM. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *J Appl Microbiol.* 2001;90(4):494-507.
- Timofeev AA, Maksjutina NP, Voitenko GN, Dobrovol'skii I. **The use of quercetin granules for treating suppurative soft-tissue wounds of the maxillofacial area and neck.** *Stomatologia (Mosk).* 1989;68(6):11-3.
- Cowan MM. **Plant Products as Antimicrobial Agents.** *Clin Microbiol Rev.* 1999;12:564-82.
- Elek SD. Experimental staphylococcal infections in the skin of man. *Ann NY Acad Sci.* 1956;65:85-90.
- Roeitingner W, Edgerion M, Kurtz LD. Role of inoculation site as a determinant of infection in soft tissue wounds. *Am J Surg.* 1973;126:354-8.
- Robson MC, Hegggers JP: Surgical infection: II. The β -hemolytic streptococcus. *J Surg Res.* 1969; 9:289-92.
- Di Carlo G, Mascolo N, Izzo AA, Capasso F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci* 1999;65:337-3.
- Korkina, LG, Afanas'ev, IB. Antioxidant and chelating properties of flavonoids. *Adv Pharmacol.* 1997;38:151-3.
- Torel J, Cillard J, Cillard P. Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. *Phytochemistry.* 1986;25:383-5.
- Morikawa K, Nonaka M, Narahara M, Torii I, Kawaguchi K, Yoshikawa T. Inhibitory effect of quercetin on carrageenan-induced inflammation in rats. *Life Sci.* 2003;74(6):709-21
- Masferrer JL, Zweifel BS, Manning PT, Hauser SD, Leahy KM, Smith WG, et al. Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is anti-inflammatory and nonulcerogenic. *Proceedings of National Academy of Science of the United States of America.* 1994:3228-2.
- Rotelli AE, Guardia T, Juarez AO, de la Rocha NE, Pelzer LE. Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. *Pharmacol Res.* 2003;48(6):601-6.
- Nitz AC, Bins-Ely J, d'Acampora AJ, Tames DR, Corrêa ML. Estudo morfométrico na cicatrização de feridas cutâneas em ratos utilizando *Coronopus didymus* e *Calendula officinalis*. *Arq Catarin Med.* 2006; 35(4):74-9
- Silva MT. Análise da cicatrização após o uso de três

diferentes agentes para a limpeza de feridas potencialmente infectadas. Estudo experimental em ratos Wistar. [dissertação] (Mestrado em Ciências Médicas) - Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2004.

27. d'Acampora AJ, Vieira DSC, Silva MT, Farias DC, Tramonte R. Análise morfológica de três tipos de limpeza em feridas cutâneas potencialmente infectadas - Estudo experimental em ratos Wistar. Acta Cir Bras. 2006;21(5):332-40.

Endereço para Correspondência:

Armando José d'Acampora

E-mail: dacampora@gmail.com