

Efeitos da *Passiflora edulis* S. no processo de cicatrização em queimaduras induzidas em camundongos

Effects of Passiflora edulis S. in the healing process burns induced in mice

Esmeralda Maria Lustosa Barros¹, Dalva Karine Bello Santos², Nayana Pinheiro Machado F. Coelho³, Mayara Rafaela Reis⁴, Bianca Gonçalves Bezerra⁵

¹ Enfermeira, Esp. Em Microbiologia, Técnica de Fisiologia da Universidade Federal do Piauí – UFPI. Teresina, PI - Brasil.

² Fisioterapeuta pela Faculdade Integral Diferencial – FACID/DeVry. Teresina, PI - Brasil.

³ Doutora, Fisioterapeuta, professora da Universidade Estadual do Piauí- UESP. Teresina, PI - Brasil.

⁴ Acadêmica de Enfermagem da Faculdade Integral Diferencial-FACID/ DeVry. Teresina, PI - Brasil.

⁵ Acadêmica de Farmácia da Faculdade Integral Diferencial-FACID/ DeVry. Teresina, PI - Brasil.

Endereço de Correspondência

Esmeralda Maria Lustosa Barros
Av. Joaquim Ribeiro, 1291, Centro
64001-480 – Teresina – Piauí [Brasil]
esmeraldalustosa@gmail.com

Resumo

Introdução: Queimaduras levam à destruição parcial ou total dos tecidos expostos. A *Passiflora edulis* S. trata inflamações cutâneas. **Objetivo:** Avaliar os efeitos do extrato da *Passiflora edulis* em queimaduras induzidas em camundongos. **Métodos:** 30 camundongos, divididos aleatoriamente em três grupos iguais: Controle (C), Queimaduras (Q) e Queimadura tratado com extrato da *Passiflora edulis* S. (QT) subdivididos em sete e 14 dias. A avaliação qualitativa se baseou na presença de células inflamatória, fibroblastos e organização das fibras colágenas e a quantitativa no programa Image J®, função “cell counter”. **Resultados:** Houve redução no número das células inflamatórias e aumento no número de fibroblastos no grupo QT aos sete dias, em comparação com os demais grupos. Aos 14 dias observa-se uma organização das fibras colágenas e uma diferença significativa ($p < 0,001$), do número de fibroblastos, quando se relacionam os grupos Q e QT. **Conclusão:** O extrato da *Passiflora edulis* S. acelerou o processo de reparo das queimaduras induzidas em camundongos.

Descritores: *Passiflora*; Queimaduras; Inflamação.

Abstract

Introduction: Burns lead to partial or total destruction of the exposed tissue. The *Passiflora edulis* S. treats skin inflammation. **Objective:** Evaluating the effects of the *Passiflora edulis* S. extract in burns induced in mice. **Methods:** 30 mice, randomly divided in three equal groups: Control (C), Burns (Q) and Burns treated with the *Passiflora edulis* S. extract (QT) split in seven and fourteen days. The qualitative evaluation was based on the presence of inflammatory cells, fibroblasts and organization of the collagen fibers and the quantitative was based on the Image J® program, function “cell counter”. **Results:** A reduction of the amount of inflammatory cells and a raise on fibroblasts was noted on the QT group after seven days. After the fourteen days it was observed an organization of the collagen fibers and a significant difference ($p < 0,001$) on the fibroblasts number when related to the Q and QT groups. **Conclusion:** The *Passiflora edulis* S. extract accelerated the repair process of the induced burns on mice.

Keywords: *Passiflora*; Burns; Inflammation.

Introdução

As queimaduras são feridas cutâneas que apresentam perda da continuidade do tecido e consideradas mundialmente com um dos problemas de saúde pública com índices elevados de mortalidade¹.

O reparo tecidual é um estado dinâmico que compreende diferentes processos, entre eles, inflamação, proliferação celular e síntese de elementos que constituem a matriz extracelular, como colágeno, elastina e fibras reticulares. A síntese de colágeno é processo rápido e harmônico que tem seu início com a lesão intersticial e se estende até o final da fase de cicatrização, quando ocorre a remodelação dos tecidos^{2,3,4}.

O gênero *Passiflora* possui um grande número de espécies, 530, sendo cerca de 120 nativas do Brasil⁵. Pertencente ao reino Plantae, da classe Magnoliopsida, o maracujá tem formato arredondado e quando maduro sua casca apresenta-se na cor amarela, juntamente com sua polpa onde se encontra uma grande quantidade de caroços denominando-se sementes. Fruto de fonte de vitaminas A, C e do complexo B apresenta boa quantidade de ferro, sódio, cálcio e fosforo, no organismo humano funcionam como calmante natural.

O maracujá apresenta atividades analgésicas e anti-inflamatórias e na forma de infuso de folhas é usada pela população para combater ansiedade, insônia, epilepsia, febre, cefaleia, neuralgia, tosse, asma, diarreia e dor abdominal. Outra forma de aplicação clínica da *Passiflora edulis* S. é seu preparo como cataplasma e loção, usado para tratar infecções e inflamações cutâneas.

Nos últimos anos, têm se verificado a retomada de práticas terapêuticas, como alternativa ou complemento no uso de fitoterápicos, tornando uma prática promissora e com bons resultados. Muitos estudos já foram realizados e comprovados a sua eficácia, no que diz respeito ao reparo tecidual, como por exemplo, a Aloe e vera (babosa) e óleo de buriti^{6,7,8}.

Assim, mudanças de estratégias terapêuticas poderão ser formuladas a partir da utiliza-

ção da *Passiflora edulis* S. para o tratamento de queimaduras levando à população uma forma de utilização de cicatrizante de baixo custo e fácil acesso.

Os objetivos deste estudo foram: avaliar os efeitos da *Passiflora edulis* S. no processo de cicatrização em queimaduras induzidas em camundongos e verificar qualitativamente e quantitativamente as células inflamatórias no processo de cicatrização de queimaduras induzida em camundongos tratados com *Passiflora edulis* S.

Métodos

Este estudo foi baseado na Lei Federal de Experimentação em Animais nº 11.794/2008, e iniciado após a aprovação do Comitê de Ética em Uso de Animais- CEUA/ Faculdade Integral Diferencial (FACID), Teresina, PI sob o número do protocolo 027/13 mediante a assinatura do termo de autorização da coleta de dados da instituição.

Amostra e identificação dos animais

Foram utilizados 30 camundongos machos (*Mus musculus*), peso corpóreo entre 29-33 g, mantidos no biotério da Faculdade Integral Diferencial, Teresina, PI, em gaiolas individuais, com alimentação e água à vontade, mantidos no ciclo claro escuro – 24 horas.

Os animais foram distribuídos de forma aleatória em três grupos de 10 animais cada, sendo Controle (C); Queimadura (Q) e Queimadura tratada com extrato da *Passiflora edulis* S. (QT). Os mesmos foram pesados e cada gaiola foi identificada com o grupo a que o animal pertencia.

Preparo do extrato da folha da *Passiflora edulis* S

Primeiramente, foram coletadas folhas da espécie *Passiflora edulis* S. íntegras, obtidas de espécimes localizados na região sul do Piauí, na cidade de Baixa Grande do Ribeiro, e em segui-

da foram colocadas para secar por duas semanas à temperatura ambiente. Após esse procedimento, foram colocadas em estufa de secagem para a retirada da umidade em temperatura de 45° a 50°C, por 24 horas. Posteriormente as folhas foram submetidas ao processo de moagem, em liquidificador industrial (METVISA-26FEV14), no laboratório da Faculdade Integral Diferencial, (FACID), de Teresina Piauí. Após a moagem das mesmas foi obtido um pó de coloração esverdeada, ao qual foi adicionado álcool etílico absoluto para extração do óleo. A mistura obtida foi agitada manualmente por cinco minutos a cada duas horas durante 12 horas e filtrada em funil de vidro simples e algodão por três vezes consecutivas. O extrato etanólico foi concentrado em evaporador rotativo (IKA RV-10) sob pressão reduzida e temperatura controlada (50 °C – 55 °C). O material resultante foi conservado em geladeira durante todo o desenvolvimento. O material obtido depois da concentração se apresentou em forma de pasta, sendo desta retiradas as amostras para os testes farmacológicos no laboratório de bioquímica da FACID. Para uso tópico foi retirada 1g de extrato bruto de *Passiflora edulis* S, diluídas em 100 mL de solução salina o que resultou em concentração final de 1mg/mL (Figura 1).

Indução da queimadura

Os animais foram pesados e em seguida anestesiados, com administração via intramuscular de cloridrato de ketamina 10% (dose de 0,1 ml/100g/Kg), associada à mesma dose de cloridrato de xilazina a 2%. A seguir, realizou-se a depilação da área, com 4cm de extensão e 3cm de largura, na região do dorso- e higienização com álcool iodoado a 4%. A indução da queimadura foi utilizado um tubo de ensaio de 4 cm de diâmetro contendo 25 ml de água destilada aquecida em

estado de ebulição (100°C), e tempo de contato do instrumento com a pele de 30 segundos⁹. A fim de aliviar a dor ocasionada pela queimadura induzida, foi administrado morfina (dose de 10 mg/kg) antes da recuperação anestésica e durante um período de pelo menos 12 – 24hs após a recuperação por via subcutânea (SC). Após os procedimentos, os animais ficaram acomodados em gaiolas de polipropileno e mantidos durante todo o experimento em condições ideais de higiene, iluminação e temperatura, e alimentados com ração e água “ad libitum”.

Procedimento experimental

Os animais do grupo queimadura tratado (QT) receberam, de forma tópica, 0,5 ml do extrato da folha da *Passiflora edulis* S., uma vez ao dia, após 24 da indução da queimadura, até o término dos tempos experimentais estudados de 07 e 14 dias.

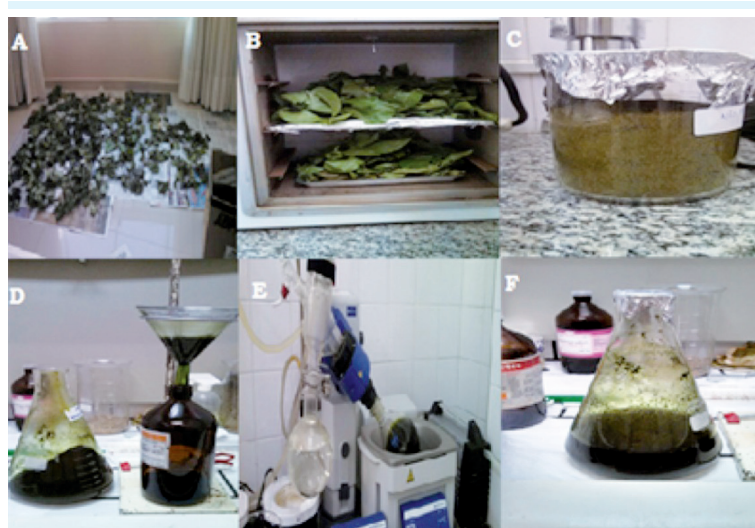


Figura 1: Obtenção do extrato da folha da *Passiflora edulis* S

(A) Folhas em processo de secagem em temperatura ambiente; (B) Folhas no processo de secagem em estufa para a retirada da umidade em temperatura de 45° a 50°C, por 24 horas; (C) Processo de moagem; (D) Mistura filtrada em funil de vidro simples; (E) Extrato etanólico concentrado em evaporador rotativo (IKA RV-10) sob pressão reduzida e temperatura controlada (50 °C – 55 °C); (F) Concentração Final Obtida.

Fonte: Original do autor.

Eutanásia

Os animais receberam uma dose para serem eutanasiados de 0,2ml/100g de cloridrato de morfina a 2% e aplicado uma sobre dose de tiopental, 60mg/Kg.

Análise Histológica e Histomorfométrica

Após a eutanásia dos animais, foi retirada a peça anatômica de interesse com ajuda de um bisturi estéril, utilizando uma margem de 1 cm ao redor da lesão e cerca de 3mm de profundidade, esta suficientes para retirado do tecido na dimensão da área lesada. Sendo identificada, eram fixados em formol a 10% e encaminhados para os procedimentos histológicos de rotina, para colorações especificadas. Cortes semi-seriados com aproximadamente 0,5mm, através de micrótomo (Leica DM 1000), foram obtidos, sendo os mesmos submetidos ao sistema de coloração com hematoxilina-eosina (HE) e assim submetido às análises histológicas e histomorfométrica. Esta foi realizada com o auxílio de microscópio óptico (Olimpus, 2000) acoplado a um sistema de câmara digital. Para tanto, foram obtidas imagens de três regiões das lesões cirúrgicas (margem direita, região central e margem esquerda) de cada animal, na objetiva de 40X, utilizando o programa LeicaQwin. Para contagem do número de células inflamatórias utilizou-se o programa de computador Image J®, na sua função “cell conter”. A avaliação qualitativa se baseou nos estudos dos cortes histológicos com relação à presença de células inflamatória, fibroblastos e a disposição das fibras colágenas em relação ao tempo experimental.

Organização e Análise dos Dados

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística utilizando o programa GraphPad

Prisma 5.0 pelo método ANOVA seguido do Teste de Tukey, com intervalo de confiança igual a 95% e $p < 0,05$ ou $p < 0,001$.

Resultados e Discussão

Resultados

Análise qualitativa do processo inflamatório

Com relação à análise qualitativa do processo inflamatório, observou-se que, no tempo experimental de sete dias, os espécimes do grupo queimadura tratado com *Passiflora edulis* S. (QT) apresentaram uma menor quantidade de tecido de granulação, presença de fibroblastos e uma melhor organização das fibras colágenas, quando comparados aos animais do grupo Queimadura (Q) caracterizando, portanto, a fase de proliferação no processo de cicatrização (Figura 2).

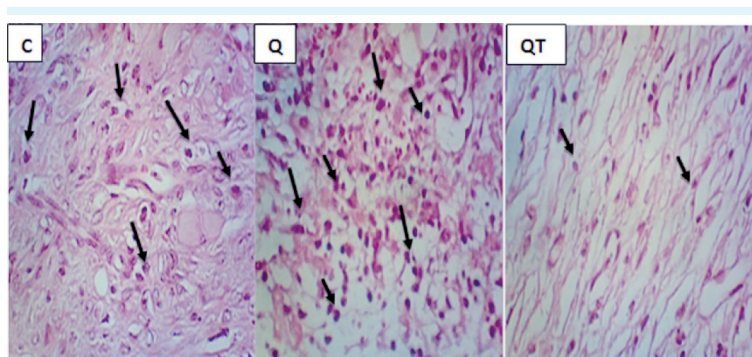


Figura 2: Aspectos qualitativos do processo inflamatório no processo de cicatrização de queimadura tratados com *Passiflora edulis* S (maracujá) no tempo experimental de 7 dias

Legenda: Seta preta – células inflamatórias

Fonte: Original do autor.

Aos 14 dias, o processo inflamatório nos animais do grupo Queimadura (Q) reduziu e o número de fibroblastos aumentou, porém ainda apresentava tecido de granulação. Os animais do grupo queimadura tratado com a *Passiflora edulis* S. (QT), apresentaram fibroblastos maduros, ausência de infiltrado inflamatório e uma completa modelação das fibras colágenas, quando comparados com os animais do grupo quei-

madura (Q) evidenciando a fase de remodelação do processo de cicatrização normal do tecido (Figura 3).

Análise histomorfométrica

Em relação ao número de células inflamatórias, observou-se diferença significativa entre os grupos controle (C) e o grupo Queimadura (Q) ($p < 0,001$) no tempo experimental de sete dias o que permite afirmar a presença do processo inflamatório. Quando comparados os grupos Queimadura (Q) e Queimadura tratado com *Passiflora edulis* S.(QT) observou uma diferença significativa ($p < 0,001$). Os animais do grupo QT, no tempo experimental de 14 dias comparados aos do grupo controle (C), apresentaram diferença estatisticamente significativa com $p < 0,05$ havendo, portanto, uma redução do processo inflamatório (Figura 4).

Quando se relacionam os números de fibroblastos presentes nos grupos Queimadura (Q) com Queimadura tratado com *Passiflora edulis* S., aos sete dias, há diferença estatística significativa ($p < 0,001$). No tempo experimental de 14 dias verifica-se que entre os animais dos grupos C, Q e QT há diferença significativa ($p < 0,05$) e ($p < 0,001$), ou seja, uma maior presença de fibroblastos, caracterizando a fase de proliferação do processo de cicatrização normal tecidual (Figura 5).

Discussão

Os fibroblastos são estimulados a migrar para a área da lesão e a produzir fibras colágenas para efetivar o processo de reparo tecidual, em condições normais¹⁰. Assim, é possível avaliar a etapa em que se encontra esse processo, pela análise histológica, qualitativa e quantitativa, das principais características que evidenciam a evolução desse processo: células inflamatórias, angiogênese, fibroblastos e a deposição e organização das fibras colágenas^{6,11}.

No Brasil, plantas medicinais oferecem, aos pesquisadores, substâncias que apresentam

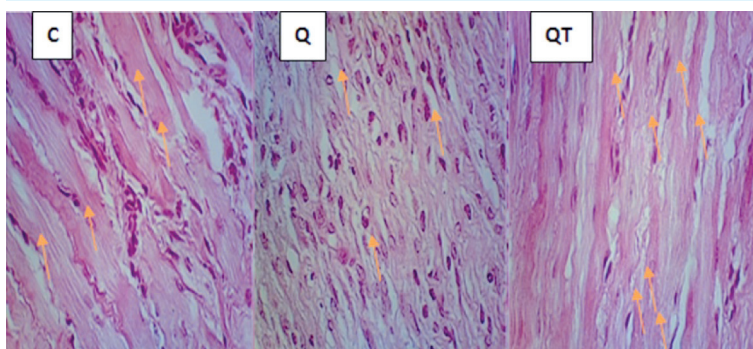


Figura 3: Aspectos qualitativos do processo inflamatório no processo de cicatrização de queimadura tratados com *Passiflora edulis* S no tempo experimental de 14 dias
Legenda: Seta laranja – fibroblastos
Fonte: Original do autor.

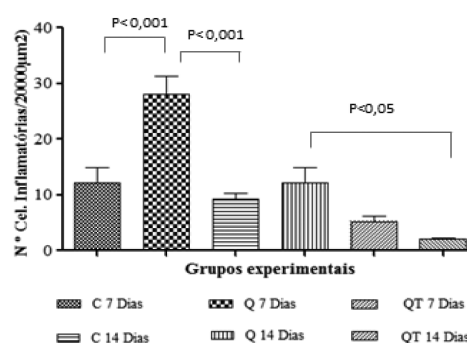


Figura 4: Número de células inflamatórias (20.000und/μm²) nos grupos estudados em tempos experimentais de 7 e 14 dias tratados com *Passiflora edulis* S
Fonte: Original do autor.

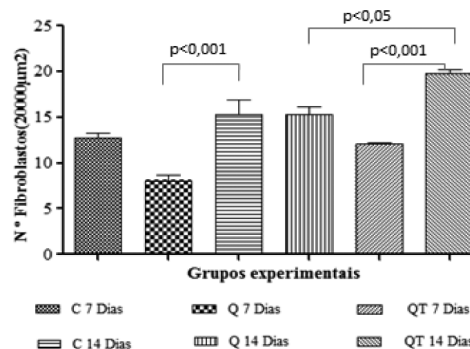


Figura 5: Número de fibroblastos (20.000und/μm²) nos grupos estudados em tempos experimentais de 7 e 14 dias tratados com *Passiflora edulis* S
Fonte: Original do autor.

ação terapêutica, tendo nos seus princípios ativos, componentes bioquímicos que atuam no processo de reparo tecidual^{10,11,12,13,14}. Nesse contexto o estudo da *Passiflora edulis* em queimaduras induzida pode levar à sua aplicação na área da saúde.

A utilização de produtos naturais tem evidenciado que do 4º ao 7º dia de tratamento, ocorre uma redução do processo inflamatório uma acentuada quantidade de fibroblastos e uma hiperplasia de epitélio. Podem ser citados o extrato aquoso da semente de urucum, *Mauritia flexuosa* L., *Cenostigma macrophyllum*, *aloe vera* e ipê roxo, pois apresentam componentes que modelaram a fase inflamatória e permitiram uma ação cicatrizante promovendo um reparo tecidual mais eficaz^{6,7,8,11,14,15}. Tais estudos corroboram com esta pesquisa, pois, o uso do extrato da *Passiflora edulis* S. acelerou a formação de fibras colágenas no 7º dia e uma redução do processo inflamatório.

Pesquisas realizadas com o óleo de pequi no processo de cicatrização de feridas constataram, ao 7º dia de tratamento, uma redução do infiltrado inflamatório e uma proliferação fibroblástica. Aos 14 dias ocorreu a etapa final do processo de cicatrização¹⁶. Resultados esses que corroboram com este estudo.

O óleo de semente de maracujá a base de pomada também foi estudado no tratamento de lesões cutâneas em coelhos cujos efeitos de sua aplicação aceleraram o processo da cicatrização¹⁷. Fato semelhante foi observado no estudo com óleo de copaíba¹⁸. Neste estudo, os animais do grupo tratado com extrato da *Passiflora edulis* S. apresentaram maior formação de fibras colágenas quando comparado ao grupo controle e uma completa reorganização das fibras colágenas aos 14 dias de tempo experimental, o que vem a corroborar com as pesquisas já publicadas.

A *Copernicia prunifera* (Carnaúba) foi estudada no processo de cicatrização feridas em *Rattus norvegicus*, e aos 14 dias observou que ocorreu uma completa organização das fibras colágenas¹⁹. No estudo em queimadura cutânea

em rato utilizando óleo de copaíba, verificou-se aos 14 dias de tratamento uma acentuada presença de fibroblastos, deposição de fibras colágenas e processo de reepitelização intenso²⁰ Fato ocorrido nesta pesquisa no tempo experimental de 14 dias.

Conclusão

O extrato da *Passiflora edulis* S. acelerou o processo de reparo das queimaduras induzidas em camundongos. Houve uma redução do número de células inflamatórias no tempo de 7 dias e um aumento do número de fibroblastos e uma maior deposição e organização das fibras colágenas nos animais do grupo tratado com a *Passiflora edulis* S. no tempo experimental de 14 dias.

Referências

1. Fernandes FMFA, Torquato IMB, Dantas MAS, Pontes Júnior FAC, Ferreira JA, Collet N Queimaduras em crianças e adolescentes: caracterização clínica e epidemiológica. Rev. Gaucha Enferm. 2012; 33(4).
2. Cezar-Vaz MR, Bonow CA, Sant'Anna CF, Cardoso LS, Almeida MCV. Identificação de queimaduras térmicas como injúria relacionada ao trabalho de soldadores. Acta paul. enfermagem. 2015; 28(1):74-80.
3. Isaac C, Ladeira PRS, Rego FMP et al. Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. Rev. Med. 2010; 89:125-131.
4. Laureano A, Rodrigues AM. Cicatrização de feridas. Rev. SPDV. 2011; 69(3): 355-367.
5. Beraldo J, Kato ETM. Morfoanatomia de folhas e caules de *Passiflora edulis* Sims, Passifloraceae. Rev. Bras. Farmacogn. 2010; 20(2): 233-239.
6. Oliveira SHSO, Soares MJGO, Rocha PS. Uso de cobertura com colágeno e aloe vera no tratamento de ferida isquêmica: estudo de caso. Rev Esc Enferm.2012; 44(2):346-351.
7. Ramos AP, Pimentel LC. Ação da Babosa no reparo tecidual e cicatrização. Brazilian Journal of Health. 2011; 2 (1):40-48.

8. Batista JS, Olinda RG, Medeiros VB, Rodrigues CMF, Oliveira AF, Paiva ES, Freitas CIA, Medeiros AC. Atividade antibacteriana e cicatrizante do óleo de buriti *Mauritia flexuosa* L. *Ciência Rural*. 2012; 42(1):136-141
9. Coelho JM, Antonioli AB, Silva DN, Carvalho TMMB, Pontes ERJC, Odashiro AN. O efeito da sulfadiazina de prata, extrato de ipê-roxo e extrato de barbatimão na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. *Rev. Col. Bras. Cir.* 2010; 37(1): 45-51.
10. Batista JS, Silva AE, Rodrigues CMF, Costa KMFM, Oliveira AF, Paiva ES, Nunes FVA, Olinda RG. Avaliação da atividade cicatrizante do óleo de pequi (*CARYOCAR CORIACEUM WITTM*) em feridas cutâneas produzidas experimentalmente em ratos. *Arq. Inst. Biol.* 2010; 77(3):441-447.
11. Oliveira AF, Batista JS, Paiva ES, Silva AE, Farias YJMD, Damasceno CAR, Brito PD, Queiroz SAC, Rodrigues CMF, Freitas CIA. Avaliação da atividade cicatrizante do jucá (*Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. var. *ferrea*) em lesões cutâneas de caprinos. *Rev Bras Plantas Med.* 2010;12(3):302-310.
12. Coelho NPM, Nogueira VC, Cardoso MAG, Lopes LS, Nascimento PP, Rocha ES, Silva CLP, Arisawa EAL. *Cenostigma macrophyllum* Tul. On the heling of skin wounds in rats with Diabetes mellitus. *Acta Cirur. Bras.* 2013; 28(8): 594-600.
13. Ribeiro DA, Macedo DG, Oliveira LGS. et al. Potencial terapêutico e uso de plantas medicinais em uma área da Caatinga no estado do Ceará, nordeste do Brasil. *Rev. Bras. PL. Med.* 2014; 16:912-930.
14. Santos JAA, Sousa MFAM, Silva ELV, Aguiar Junior FCA. Avaliação histomorfométrica do efeito do extrato aquoso de urucum(norbixina) no processo de cicatrização de feridas cutâneas em ratos. *Rev. Bras. Pl Med.* 2014; 16(3): 637-643.
15. Capella SO, Tillmann MT, Félix AOC, Fontoura EG, Fernandes CG, Freitag RA, Santos MAS, Félix SR, Nobre MO. Potencial cicatricial da Bixa orellana L. em feridas cutâneas: estudo em modelo experimental. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 2016; 68(1):104-112.
16. Batista JS, Silva AS, Rodrigues CMF, Costa KMFM, Oliveira AF, Paiva ES, Nunes FVA, Olinda RG. Avaliação da atividade cicatrizante do óleo de pequi (*Caryocar coriaceum wittm*) em feridas cutâneas produzidas experimentalmente em ratos. *Arq. Inst. Biol.* 2010; 77(3):441-447.
17. Marques ICDS. Pomada a base de óleo de semente de maracujá no tratamento de lesões cutâneas em coelhos [dissertação]. São Paulo: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho; 2012.
18. Giesbrecht PCP. Efeitos da pomada de óleo de copaíba em queimadura cutânea em rato [dissertação]. Vila Velha: Universidade de Vila Velha, 2011.
19. Silva CES, Santos OJ, Ribas Filho JM, Tabushi FI, Kume MH, Jukonis LB, Cella IF. Efeito da Carapa guianensis Aublet(Andiroba) e Orbignya phalerata(Babauçu) na cicatrização de colorrafias em ratos. *Rev. Col. Bras. Cir.* 2015; 42(6): 399 -406.
20. Godeiro JRG, Batista JS, Reis PFCC, Olinda RG, Vale RG, Calado EB, Barros L ES, Oliveira AF, Feijó FMC. Avaliação da atividade cicatrizante de creme à base de triticum vulgare em feridas cutâneas de gatas submetidas à ovários salpingohisterectomia. *Acta Veter. Bras.* 2010; 4 (2):78-80