



Avaliação morfo-histológica e morfo-histométrica de feridas cutâneas tratadas com *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski em ratos

[*Morphohistological and morphohistometric evaluation of skin wounds treated with Sphagneticola trilobata (L.) Pruski in rats*]

A.G.B. Leite, L.R.M. Estevão*, C.J.F.L. Silva, J.L.S. Lima,
A.A.V.C. Bulhões, E.B.A. Soares, J. Evêncio-Neto

Universidade Federal Rural de Pernambuco - Recife, PE

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar macro e microscopicamente a atividade cicatrizante da *Sphagneticola trilobata* em feridas cutâneas induzidas em ratos, a partir da aplicação de creme contendo extrato hidroalcoólico bruto de folhas da planta. A análise fitoquímica apresentou terpenos e flavonoides como compostos majoritários. Sessenta ratos foram divididos em três grupos experimentais (n=20): grupo tratado (GT), grupo controle (GC) e grupo controle absoluto (GCA). Quatro feridas excisionais de 0,8cm de diâmetro foram realizadas no dorso dos animais, tratadas diariamente e avaliadas nos tempos três, sete, 14 e 21 dias de pós-operatório (PO) quanto à contração e à avaliação macroscópica, morfo-histológica e morfo-histométrica. Macroscopicamente, não houve diferença estatística na contração das feridas entre os grupos testados. Na avaliação morfológica e na morfométrica, o GT apresentou menor concentração de células inflamatórias, maior e melhor preenchimento do tecido de granulação pelas fibras colágenas e melhor vascularização das feridas. Não houve diferença entre o GC e o GCA. Conclui-se que o creme à base do extrato hidroalcoólico bruto das folhas de *Sphagneticola trilobata* contribui positivamente para o processo de cicatrização das feridas em pele de ratos.

Palavras-chave: angiogênese, cicatrização, extrato, fitoterápico, pele

ABSTRACT

The objective of this work was to macro and microscopically evaluate the healing activity of *Sphagneticola trilobata* in rat-induced skin wounds by applying cream containing crude hydroalcoholic extract from plant leaves. The phytochemical analysis showed terpenes and flavonoids as major compounds. Sixty rats were divided into three experimental groups (n=20): treated group (GT), control group (CG) and absolute control group (GCA). Four 0.8cm diameter excision wounds were performed on the back of the animals, treated daily and evaluated at the three, seven, 14 and 21 postoperative days (PO) for contraction, macroscopic, morphologic and morphometric evaluation. The TG presented smaller scar area at 21 postoperative days ($P<0.05$). In the morphological and morphometric evaluation, the WG presented lower inflammation, greater and better filling of granulation tissue by collagen fibers and better wound vascularization. There was no difference between GC and GCA. It was concluded that the cream based on the crude hydroalcoholic extract of *Sphagneticola trilobata* leaves contribute positively to the healing process of the skin wounds of rats.

Keywords: angiogenesis, healing, extract, phytotherapeutic, skin

INTRODUÇÃO

O conhecimento sobre as plantas medicinais é muito antigo e, apesar de elas serem utilizadas por várias gerações, é importante ter maiores informações dos efeitos que os fitoterápicos

apresentam (Argenta *et al.*, 2011). Com o avanço das pesquisas, tornaram-se necessários mais estudos envolvendo os fitomedicamentos, estudos esses que apresentam grande potencial para conduzir a um caminho mais seguro e promissor para descobertas de novos fármacos (Maciel *et al.*, 2002).

Recebido em 13 de novembro de 2019

Aceito em 25 de junho de 2020

*Autor para correspondência (*corresponding author*)

E-mail: ligiarme@yahoo.com.br

A cicatrização é um evento complexo, que envolve uma extensa comunicação entre os diferentes constituintes celulares da pele e da sua matriz extracelular, tendo como objetivo restaurar a função e a estrutura dos tecidos lesionados. Tal evento é dinâmico e envolve fenômenos bioquímicos e fisiológicos que se comportam de forma harmoniosa, garantindo a restauração tissular. No entanto, a presença de algumas variáveis, como idade, estado nutricional e doenças sistêmicas, pode retardar o processo cicatricial (Tazima *et al.*, 2008; Eming *et al.*, 2014).

Os custos com tratamentos de feridas crônicas aumentaram a relevância das pesquisas em busca de medicamentos capazes de acelerar o processo cicatricial com menor custo (Mendonça e Coutinho-Neto, 2009). Plantas utilizadas de maneira empírica no tratamento de feridas passaram a receber maior atenção científica (Nitz *et al.*, 2006). Nesse contexto, aparece a importância de pesquisas que comprovem a ação de óleos essenciais e extratos advindos de plantas com potencial terapêutico, no reparo e na regeneração cutânea (Oliveira e Dias, 2012; Santos *et al.*, 2013).

A *Sphagneticola trilobata*, pertencente à família Asteraceae, é uma planta nativa do Brasil, sendo

encontrada em várias regiões, ocorrendo de forma espontânea durante quase todo o ano. Popularmente é chamada de vedélia, margaridão, mal-me-quer-do-brejo e pingo-de-ouro (Corrêa, 1984). Na medicina popular, é muito utilizada na diabetes (Lemões *et al.*, 2012), além de ser indicada como antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana (Balekar *et al.*, 2014; Leite *et al.*, 2019). Surge como promissora em reparo tecidual, tendo este trabalho o objetivo de avaliar a atividade cicatrizante de um creme contendo extrato hidroalcoólico bruto de *Sphagneticola trilobata* em feridas cutâneas em ratos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas sete amostras da planta em floração no *campus* da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), situado sob as coordenadas geográficas de 8°04'03''S e 34°55'00''W, no período da manhã, no mês de maio de 2015. Em seguida, o material foi encaminhado para o Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) para herborização, confecção de exsicata e posterior incorporação ao acervo do Herbário Geraldo Mariz da UFPE, sob o número de registro #78.782 (Fig. 1).



Figura 1. Formação de denso tapete de folhagem (A) e inflorescência da *Sphagneticola trilobata* (B). Exsicata incorporada ao acervo do Herbário Geraldo Mariz/UFRPE (C).

Para a produção do extrato hidroalcoólico bruto, o material vegetal (folhas) foi desidratado em estufa a 40°C, posteriormente triturado e macerado em etanol 70%, por 72 horas. A proporção extrato/planta empregada foi de 2mL de solvente, etanol 70% (etanol PA Merck), para 1 grama do material vegetal, segundo

metodologia descrita por Matos (1997). A solução extrativa foi filtrada e posteriormente concentrada em evaporador rotatório sob pressão reduzida, a 45°C, resultando no extrato hidroalcoólico bruto com uma concentração de 140mg/mL.

Avaliação morfo-histológica...

Foi realizada a triagem fitoquímica do extrato, que verificou a presença de derivados antracênicos, mono, sesqui e diterpenos e análises colorimétricas, que mostraram conteúdos de fenóis totais e flavonoides totais de $21,7 \pm 0,009$ miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de amostra e $0,23 \pm 0,005$ miligramas de equivalentes de catequina por grama de amostra, respectivamente. Terpenos e flavonoides foram os compostos majoritários. O creme foi elaborado por meio da incorporação de 150mL do extrato hidroalcoólico bruto das folhas de *Sphagneticola trilobata*, a 250 gramas de lanolina, obtendo-se um creme homogêneo com concentração de 7,7%, seguindo orientação do Formulário de Fitoterápicos - Farmacopeia Brasileira (Formulário..., 2011). Os procedimentos foram realizados no Laboratório de Farmacologia da UFRPE.

O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética da UFRPE, com o número de licença 12/2017. Sessenta ratos (*Rattus norvegicus albinus*), machos, com peso corporal variando de 250 a 300 gramas e média de 90 dias de idade, foram mantidos em gaiolas individuais e permaneceram em ambiente com temperatura de 23 a 25°C e ciclo claro/escuro controlado de 12 em 12 horas, com ração e água à vontade. Para a realização do experimento, os 60 ratos foram divididos em três grupos, contendo 20 animais cada (GT: grupo tratado, GC: grupo controle e GTA: grupo controle absoluto). Cada grupo foi dividido em quatro subgrupos de tempos (três, sete, 14 e 21 dias).

Após anestesiados com cloridrato de xilazina a 2% (20mg/kg) e cloridrato de cetamina a 10% (80mg/kg), administrados via intramuscular, os animais foram posicionados em decúbito ventral, e as regiões dorsolateral direita e esquerda foram submetidas à tricotomia e à antisepsia com clorexidina a 2%, para a realização das feridas cirúrgicas. Em cada animal foram realizadas quatro incisões de pele e tela subcutânea: dois no antímero direito e dois no antímero esquerdo, com auxílio de um *punch* de oito milímetros de diâmetro. Os diâmetros das feridas foram mensurados com paquímetro digital, e cada falha cutânea recebeu o tratamento após a cirurgia e diariamente, de acordo com a metodologia estabelecida.

Os animais do GT receberam aplicação tópica diária de 0,2mL do creme contendo o extrato hidroalcoólico bruto das folhas de *Sphagneticola trilobata*, associado ao veículo (lanolina); os do GC receberam aplicação de 0,2mL do veículo (lanolina) e os do grupo controle absoluto (GCA) não receberam tratamento (Fig. 2). A quantidade do creme utilizado por ferida para o tratamento foi estipulada em seringas graduadas após se determinar uma amostra suficiente para preenchimento de toda a área com uma fina camada do produto (0,2mL). O creme foi acondicionado, então, em seringas estéreis, e todas as feridas utilizaram a mesma quantidade de creme, diariamente, durante todo o experimento. Para o tratamento diário, não houve necessidade de anestésiar os animais.

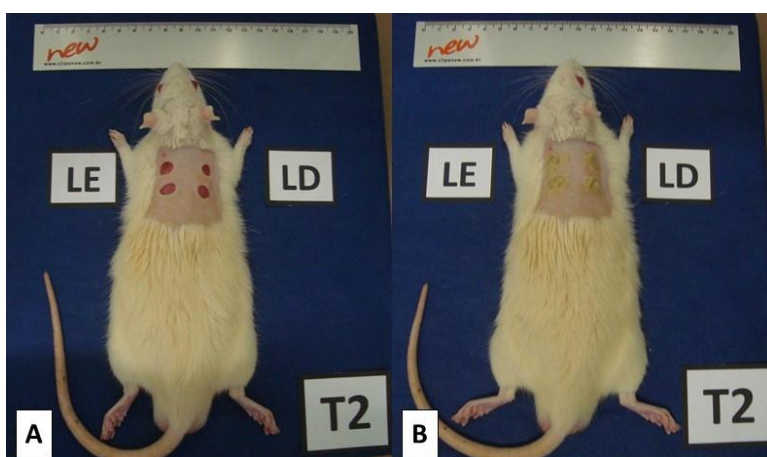


Figura 2. Animal após o procedimento cirúrgico (A) e, em seguida, tratado com o creme contendo o extrato hidroalcoólico bruto das folhas de *Sphagneticola trilobata* (B).

As avaliações clínicas foram realizadas diariamente, observando-se o estado geral dos animais, a presença de hiperemia, edema, exsudato e formação de crosta. Nos dias três, sete, 14 e 21 de PO, os animais foram novamente anestesiados, e as feridas mensuradas com paquímetro digital (King Tools). As mensurações foram realizadas nos eixos horizontal e vertical da ferida e registradas utilizando-se uma câmera fotográfica digital (Kodak Easy Share C143 de 12 megapixels) e microscópio digital (Dino-Lite) com câmera de 1,3 megapixel e zoom de 200x. A área da ferida foi calculada empregando-se a equação $A = \pi.R.r$, em que A representa a área, R o raio maior e r o raio menor da ferida, conforme Estevão *et al.* (2013). Os cálculos do grau de contração foram expressos em percentual, usando-se a equação proposta por Ramsey *et al.* (1995): $100 \times (A_o - A_i) \div A_o = \%$ média de contração +/- DP, na qual A_o é a área inicial da ferida (dia 0) e A_i é a área da ferida no terceiro, sétimo, 14º e 21º dias de PO.

As avaliações histológicas foram realizadas no terceiro, sétimo, 14º e 21º dias de pós-tratamento. Os animais foram anestesiados, utilizando-se cetamina (80mg/kg) e xilazina (20mg/kg) intramuscular e eutanasiados com tiopental (30mg/kg) por via intraperitoneal, para coleta da pele e posterior análise histopatológica e histoquímica. Foram coletados fragmentos da pele mediante incisão abrangendo a pele íntegra e a área anteriormente lesionada. Uma parte do material foi imediatamente fixada em formol tamponado em tampão fosfato a 10% (pH 7,3 e 0,1 M), permanecendo por 24 horas. Em seguida, os fragmentos foram desidratados em álcool etílico, em concentrações crescentes, diafanizados pelo xilol, impregnados pela parafina líquida em estufa regulada na temperatura de 59°C e incluídos em parafina.

Os blocos foram cortados em micrótomo do tipo Minot (LEICA®, modelo M2125RT), ajustado para cinco micrômetros (μ m), e submetidos à técnica de coloração por hematoxilina e eosina (HE) e tricrômico de Gomori para análises morfológicas e morfométricas. As análises foram realizadas por meio de um microscópio de luz (Microscópio Trinocular LEICA® DM500) acoplado à câmera ICC50 HD, e as imagens foram digitalizadas por computador por meio do software LEICA® LAS EZ. Todas as análises foram feitas às cegas, por dois avaliadores.

Na avaliação morfo-histológica, foram observados, em todos os tempos, formação crostosa, infiltrado inflamatório, deposição de matriz extracelular, formação vascular e reepitelização, conforme protocolo publicado por Estevão *et al.* (2019). A análise consiste em varredura da lâmina e análise comparativa dos grupos, diferenciando em escores de 0 a 3 para cada parâmetro avaliado. Zero (0) representa ausência do parâmetro testado (pele íntegra); 1, discreta; 2, moderada; e 3, intensa ou completa formação. Após as análises, a média dos dados por grupo foi tabelada para melhor visualização dos resultados.

A morfo-histometria foi composta pela mensuração do comprimento da língua epitelial, pela quantificação de vasos sanguíneos neoformados e pela densidade de colágeno. Para a análise do comprimento da extensão da nova epiderme que está em formação, tomam-se como limites a epiderme e a derme intactas, até a extremidade oposta, em processo de migração/proliferação. As medidas foram realizadas bilateralmente no tempo três dias de PO, utilizando-se fotomicrografias (escala 200 μ m) e o software ImageJ (total de 10 imagens por grupo).

Para contagem dos vasos sanguíneos, foi utilizado o programa ImageLab, após captura aleatória de cinco campos do tecido de granulação recém-formado, seguindo da esquerda para a direita e englobando toda a extensão da área cicatricial, de cada lâmina, em escala 50 μ m, por coloração HE, em todos os tempos (Estevão *et al.*, 2017). Para determinação da densidade das fibras colágenas neoformadas, utilizou-se a mesma metodologia de captura de imagens (cinco campos/lâmina, escala 50 μ m, total de cinco lâminas/grupo), em cortes histológicos das feridas coradas com tricrômico de Gomori em todos os tempos, e as análises foram realizadas no software Gimp2.

A análise estatística foi realizada utilizando-se o software GraphPad Prism 5.0. Os resultados foram apresentados como a média±desvio-padrão. As comparações entre os três grupos foram realizadas usando-se o teste t de Student para comparações múltiplas. Two-way ANOVA foi usada para linhas gráficas e para verificar a interação entre as variáveis independentes no

tempo e o tratamento, seguida do pós-teste de Bonferroni ($P < 0,05$).

RESULTADOS

Macroscopicamente, não houve diferença estatística na contração das feridas entre os

grupos testados. O GT apresentou crostas mais uniformes e hidratadas, diferente dos animais do GC e do GCA, que apresentaram crostas irregulares com áreas ressecadas, nos tempos três e sete dias de PO. A partir de 14 dias de PO, todos os animais apresentaram completa reepitelização (Fig. 3).

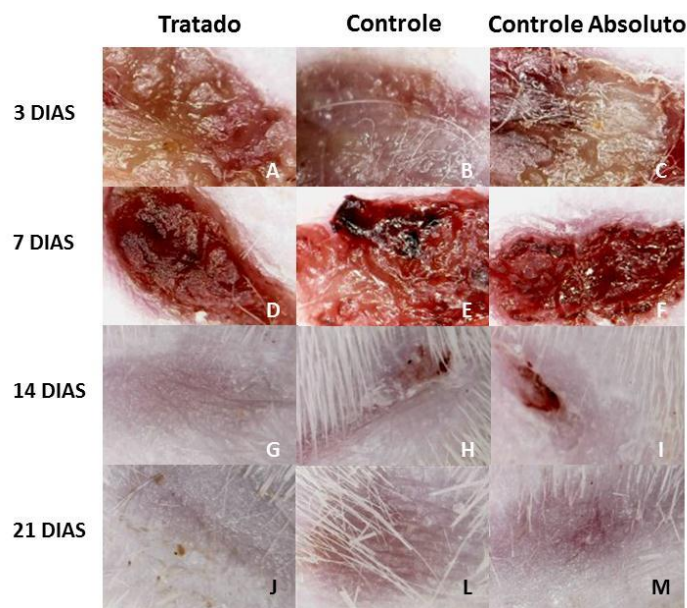


Figura 3. Fotografias de feridas cutâneas em ratos do grupo tratado com o creme à base de extrato hidroalcoólico bruto das folhas de *Sphagneticola trilobata* (A, D, G, J), do grupo controle, apenas com o veículo (lanolina) (B, E, H, L), e do grupo controle absoluto, que não recebeu nenhum tratamento (C, F, I, M), nos dias três, sete, 14, e 21 de pós-operatório, respectivamente. Observar crostas mais uniformes e hidratadas no GT (aumento de 200x).

Com três dias de PO, as feridas do GT e do GC apresentaram crostas com formação discreta, aderidas ao tecido subjacente, enquanto a ferida do GCA apresentou crostas com formação moderada. Nesse momento, foi observada ausência de epiteliação. Na avaliação da matriz extracelular e do infiltrado inflamatório, os grupos apresentaram quantidade discreta de colágeno ($GT > GC > GCA$), mostrando uma matriz extracelular (MEC) frouxa, diferenciando-se na intensidade de concentração de células inflamatórias, observada pela concentração de morfo e mononucleares ($GT < GC < GCA$) (Fig. 4, Tab. 1).

Aos sete dias de PO, o GT apresentou reepitelização em todas as feridas, inclusive com grande diferenciação das camadas epidérmicas, com discreta presença de crosta, presença de matriz extracelular preenchendo toda a área em

processo de reparo ainda com muitos fibroblastos e vasos neoformados e menor concentração de células inflamatórias, quando comparado ao GC e ao GCA. Estes últimos apresentaram muita formação crostosa (escore 2) e reepitelização parcial com presença de língua epitelial ainda em aproximação, presença de matriz extracelular discreta e concentração de células inflamatórias moderada a intensa. Nesta fase, observou-se presença de vasos neoformados em maior concentração no GT (Fig. 5 e 6, Tab. 1).

A partir de 14 dias de PO, todas as feridas do GT estavam epiteliaçadas, com MEC ainda com presença de fibroblastos e discreta concentração de células inflamatórias (Fig. 7, Tab. 1). No GC e no GCA, ainda persistiam crostas em poucas feridas e células inflamatórias discretas, porém em maior quantidade em comparação ao GT.

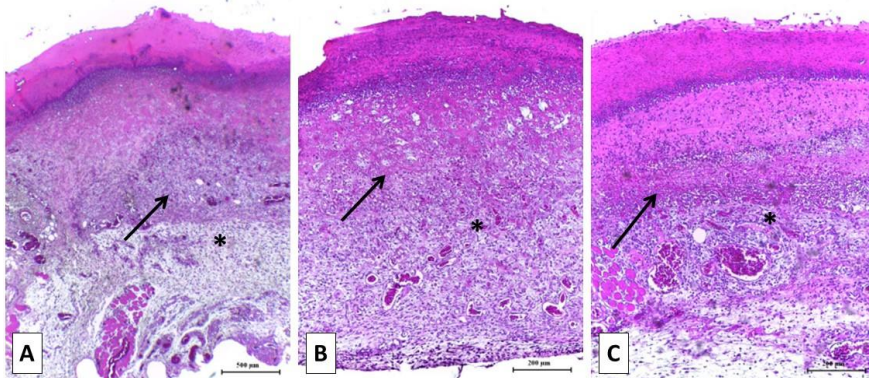


Figura 4. Fotomicrografias de cortes histológicos de feridas cutâneas em ratos com três dias de PO. Grupo tratado (A), grupo controle (B) e grupo controle absoluto (C). Morfologicamente, observa-se uma MEC frouxa, com discreta deposição de colágeno (setas), em todos os grupos, e celularidade (*) moderada, com menor intensidade no GT. Coloração HE, escala: 200µm.

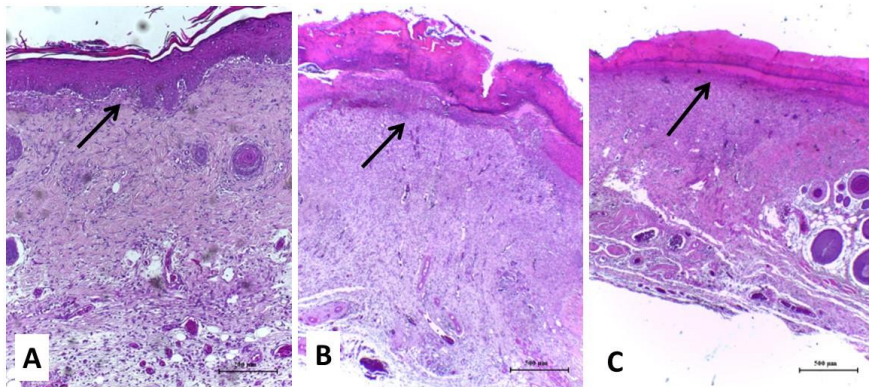


Figura 5. Fotomicrografias de cortes histológicos de feridas cutâneas em ratos com sete dias de PO. Grupo tratado (A), grupo controle (B) e grupo controle absoluto (C). Morfologicamente, observa-se a completa reepitelização no GT e áreas não epitelizadas no GC e no GCA (setas). Coloração HE, escala: 200µm.

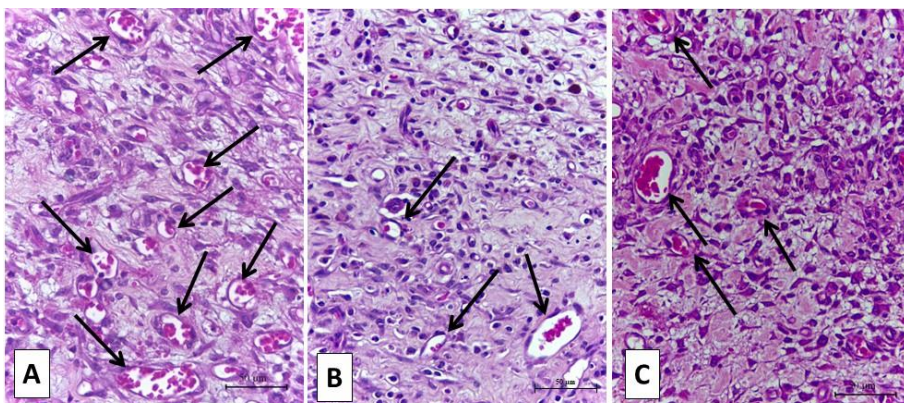


Figura 6. Fotomicrografias de cortes histológicos de feridas cutâneas em ratos com sete dias de PO. Grupo tratado (A), grupo controle (B) e grupo controle absoluto (C). Morfologicamente, observa-se presença de vasos neoformados (setas) em maior concentração no GT e maior infiltrado inflamatório nos GC e GCA. Coloração HE, escala: 50µm.

Avaliação morfo-histológica...

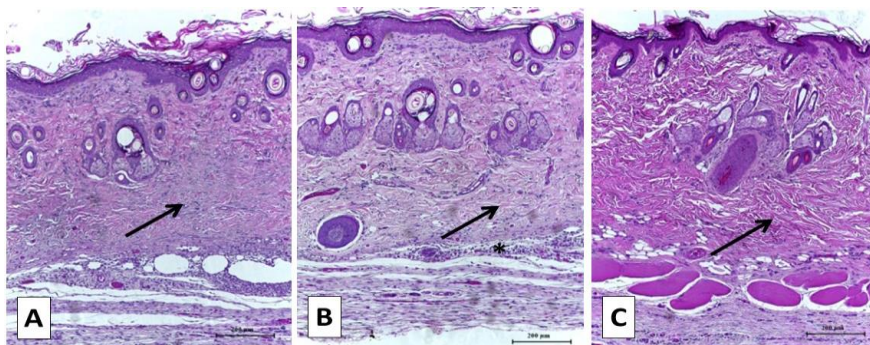


Figura 7. Fotomicrografias de cortes histológicos de feridas cutâneas em ratos com 14 dias de PO. Grupo tratado (A), grupo controle (B) e grupo controle absoluto (C). Morfologicamente, observam-se feridas epiteliizadas, com deposição de fibras colágenas em todos os grupos. Coloração HE, escala: 200µm.

Aos 21 dias de PO, em todos os grupos, o tecido cicatricial apresentou ausência de crosta e inflamação, assim como completa reepitelização. A diferença do GT para o GC e o GCA ocorreu no remodelamento do tecido de granulação, que substituiu esse tecido por uma cicatriz. Nas feridas do GT, foi observado, em coloração por tricrômio de Gomori e HE, um rearranjo de fibras de colágeno, com presença de colágeno mais espesso, que demonstrou interação aumentada e assumiu orientação específica ao longo das linhas de tensão, de forma moderada, ainda com presença de poucos fibroblastos e alguns vasos sanguíneos. No GC e no GCA, esse rearranjo ainda se apresentava discreto a moderado em relação ao GT (Fig. 8, Tab. 1).

Escala de avaliação: formação crostosa avaliada pela quantidade de crosta depositada no processo cicatricial (0: ausência de crosta, 1: presença leve, 2: presença moderada, 3: grande formação crostosa), ocorrência da área reepitelizada avaliada pela língua epitelial em formação e sua

espessura (0: ausência de epiteliização, 1: epiteliização parcial com língua epitelial ocupando até 1/3 da área da ferida, 2: epiteliização parcial com língua epitelial ocupando mais de 1/3 da área da ferida, 3: epiteliização total), intensidade do processo inflamatório avaliado pela celularidade de morfo e polinucleares (0: ausência de inflamação, 1: inflamação discreta, 2: inflamação moderada, 3: inflamação severa) e matriz extracelular avaliada pela quantidade de matriz extracelular em formação, pelo preenchimento da mesma no leito da ferida, pela espessura e organização de fibras colágenas (0: sem formação de tecido de granulação, 1: presença de MEC não ocupando toda a área da ferida, com muitos fibroblastos e fibras colágenas finas, 2: presença de MEC em toda a ferida, com presença de muitos fibroblastos e fibras colágenas finas, 3: presença de MEC preenchendo todo o tecido com menor celularidade e fibras colágenas densas).

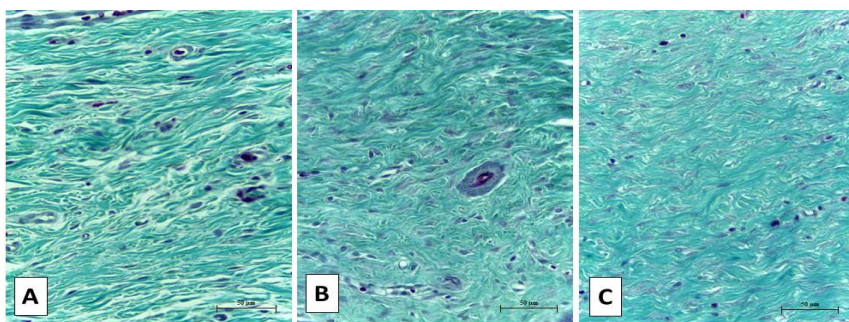


Figura 8. Fotomicrografias de cortes histológicos de feridas cutâneas em ratos com 21 dias de PO. Grupo tratado (A), grupo controle (B) e grupo controle absoluto (C). Morfologicamente, observou-se melhor rearranjo das fibras colágenas e fibras mais espessas no GT, quando comparado aos grupos GC e GCA. Coloração: tricrômio de Gomori, escala: 50µm.

Tabela 1. Média dos escores da avaliação morfo-histológica de feridas cutâneas em ratos com três, sete, 14 e 21 dias de pós-operatório. Grupo tratado com o creme à base de extrato hidroalcoólico bruto das folhas de *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski (T), grupo controle tratado apenas com o veículo (lanolina) (C) e grupo controle absoluto, que não recebeu nenhum tratamento (CA)

Animais (Dias de PO)	Formação cristosa	Área Reepitelizada	Células inflamatórias	Matriz extracelular
T3	1,4	0	2,2	1,4
C3	1,6	0	2,4	0,8
CA3	2,0	0	2,6	0,4
T7	0,4	3	1,4	2
C7	2	1,6	2,0	1,6
CA7	2	0,8	2,6	1,2
T14	0	3	0,2	2,4
C14	0	3	0,6	2,0
CA14	0	3	0,6	2,4
T21	0	3	0	3
C21	0	3	0	2,4
CA21	0	3	0	2,4

Na morfo-histometria, foram avaliados a angiogênese pela contagem de novos vasos, a densidade de fibras colágenas e o comprimento da língua epitelial. O GT apresentou maior número de vasos sanguíneos neoformados aos três dias de PO ($P<0,001$) comparado ao GCA e ao GC e aos sete dias de PO ($P<0,5$) entre o GT e o GC e ($P<0,001$) entre o GT e o GCA (Fig. 9) e

maior densidade de fibras colágenas (três ($P<0,01$), sete, 14 e 21 dias ($P<0,001$)), comparados aos GC e GCA. Entre o GC e o GCA, houve diferença estatística na densidade de colágeno apenas no dia três de PO ($P<0,001$) (Fig. 10). Não houve diferença estatística no comprimento da língua epitelial entre os grupos.

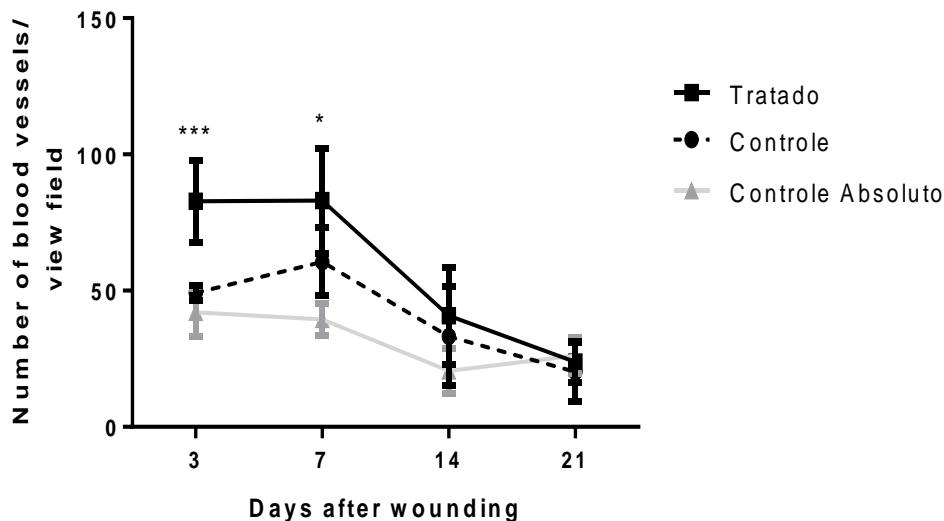


Figura 9. Número de vasos sanguíneos em feridas cutâneas em ratos, grupos tratado (GT), controle (GC) e controle absoluto (GCA), nos dias três, sete, 14 e 21 de PO. Observar diferença significativa em quantidade de vasos no GT. Os dados representam a média±desvio-padrão, n=5 feridas para cada tempo de PO e grupo. *** $P<0,001$ GT versus GC e GCA no terceiro dia de PO; * $P<0,5$ GT versus GC (Two-way ANOVA).

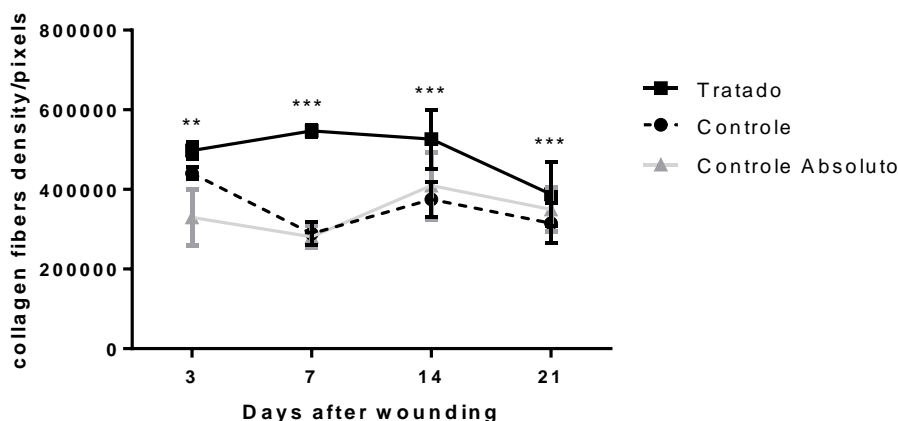


Figura 10. Densidade de fibras colágenas em feridas cutâneas em ratos, grupos tratados (GT), controle (GC) e controle absoluto (GCA), nos dias três, sete, 14 e 21 de PO. Observar diferença significativa em todos os tempos entre GT e GC e GCA. Os dados representam a média±desvio-padrão, n=5 feridas para cada tempo de PO e grupo. ** P<0,01 GT versus GC e GCA no terceiro dia de PO; ***P<0,001 GT versus GC e GCA nos demais tempos (*Two-way ANOVA*).

DISCUSSÃO

Neste artigo foram investigados os efeitos do extrato hidroalcoólico bruto das folhas de *Sphagneticola trilobata* em creme no fechamento de feridas, no infiltrado inflamatório, nos vasos neoformados e na deposição de colágeno na cicatrização de feridas cutâneas após excisão em ratos. Este modelo experimental tem sido utilizado para estudar os mecanismos biológicos envolvidos na cicatrização de feridas cutâneas (Pessoa *et al.*, 2012, 2015; Souza Neto Júnior *et al.*, 2017, 2019; Estevão *et al.*, 2019). O creme contendo 7,7% do extrato foi aplicado topicamente e diariamente, para ser testado como potencial cicatrizante no leito da ferida.

Vários trabalhos têm reportado a *Sphagneticola trilobata* e seus potenciais terapêuticos como antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e cicatrizante (Balekar *et al.*, 2014; Leite *et al.*, 2019). Este estudo demonstrou que a aplicação tópica desse produto, diminuiu a concentração de células inflamatórias, aumentou a angiogênese e a deposição de colágeno em feridas cutâneas em ratos. A primeira resposta a uma lesão é a hemostasia. Essa etapa envolve vasoconstrição, formação do *plug* plaquetário e ativação da cascata de coagulação com a formação do *plug* de fibrina, resultante das plaquetas ativadas, das hemácias, do fluido e da fibrina. Essa MEC provisória irá facilitar a entrada e a adesão de células, além de estabilizar as bordas da ferida, fornecendo alguma proteção e estabilidade. Com o tempo, a superfície do *plug* fibrinoso irá secar e

formar a crosta, permitindo que a cicatrização da ferida continue por baixo (Williams e Moores, 2013).

A *Sphagneticola trilobata* possui importante ação antimicrobiana (Leite *et al.*, 2019) e anti-inflamatória (Balekar *et al.*, 2014). Além disso, a lanolina possui ação emoliente, hidratante, protetora, dispersante, aderente e plasticizante (Coca e Abrão, 2008). Torna a pele mais hidratada e flexível e age como barreira protetora (Brasil, 2012). Macroscopicamente, o GT apresentou formação de crostas mais uniformes e hidratadas e, já no sétimo dia de PO, haviam se desprendido da ferida, comparadas às crostas do GC e do GCA, com desprendimento total dessas no 14º dia de PO. Concomitantemente, a reepitelização no GT foi mais precoce, o tecido de granulação apresentou-se com maior deposição de colágeno e a infiltração leucocitária foi mais atenuada (Tab. 1), indicando boa ação do fitoterápico.

Segundo Eming *et al.* (2014), em condições fisiológicas, a restauração da barreira epidérmica é altamente eficiente e ocorre em poucos dias. Em um estudo realizado por Balekar *et al.* (2012b), o extrato etanólico das folhas de *Sphagneticola trilobata* apresentou atividade cicatrizante devido a uma combinação de antimicrobianos, por estimular o crescimento de fibroblastos e proteger as células de lesões induzidas por peróxido de hidrogênio. Essa atividade também foi comprovada nos resultados do presente estudo, visualizada pela

histomorfometria e histomorfologia de fibras colágenas e pela epitelização.

A resposta inflamatória após lesão tecidual desempenha papéis importantes nos processos de curas tanto fisiológicas como patológicas. Ela fornece proteção contra patógenos invasores e remove tecidos danificados. No entanto, a resposta inflamatória prolongada leva a um atraso nos estágios fisiológicos da cicatrização da ferida (Landén *et al.*, 2016). Fitoterápicos vêm sendo produzidos e testados quanto à ação anti-inflamatória em feridas cutâneas. Entre eles, copaíba (Estevão *et al.*, 2009), aroeira (Estevão *et al.*, 2017) e *Ximênia americana* (Souza Neto Júnior *et al.*, 2019). Estevão *et al.* (2017), ao estudarem *Schinus terebinthifolius*, demonstraram diminuição de células inflamatórias na fase inicial do processo cicatricial, com diminuição de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , CXCL-1 e CCL-2).

Neste experimento, foi observada uma diminuição na concentração de células inflamatórias no GT no terceiro e sétimo dias de PO, avaliado morfologicamente, pela concentração de morfo e polinucleares. Também utilizando a avaliação morfológica, Buch *et al.* (2008), no trabalho com *Jatropha multifida*, diferentemente deste experimento, relataram processo inflamatório agudo intenso nesse período cicatricial. Estudos realizados com outros fitoterápicos revelaram resultados importantes, diferentes dos observados neste experimento, como Batista *et al.* (2010), que verificaram no GT com óleo de *Caryocar coriaceum* wittm feridas hiperêmicas, bordos edemaciados e sem formação de crosta, e Parente *et al.* (2009), que observaram a presença de exsudação serosa nos animais do GT com extrato etanólico de *Calendula officinalis* L. até o quarto dia de PO.

Existem evidências consideráveis para sugerir que a angiogênese e a inflamação são codependentes (Jackson *et al.*, 1997). A angiogênese é fundamental para o reparo de feridas, o processo é importante para fornecer nutrição e oxigênio aos tecidos em crescimento (Li *et al.*, 2003). É um evento complexo e depende da interação da MEC com mediadores liberados por diversas células, dentre elas macrófagos, que estimulam a migração e a proliferação das células endoteliais. Estímulos

fortes para migração endotelial incluem mediadores químicos como VEGF, FGF, TGF- β e angiopetina (Willians e Moores, 2013). Lu *et al.* (2016) relataram que uma grande variedade de compostos à base de plantas atua no processo de angiogênese; dentre eles polifenóis, alcaloides, terpenoides e taninos.

Neste experimento, houve aumento do número de vasos sanguíneos neoformados nos tempos três e sete de PO no GT, confirmando que os diterpenos estão envolvidos no processo. Outros experimentos contendo esses compostos também demonstraram ação angiogênica no processo cicatricial, dentre eles Pessoa *et al.* (2012), com extrato hidroalcoólico da casca e entrecasca de *Anadenanthera colubrina* var. *Cebil*, Estevão *et al.* (2017), com óleo essencial de aroeira, e Souza Neto Júnior *et al.* (2019), com extrato hidroalcoólico de *Ximènia americana*.

A avaliação da densidade das fibras colágenas é outro ponto importante, já que a transição entre as fases inflamatória e de reparação é marcada pelo aumento de fibroblastos e acúmulo de colágeno na ferida. Muitos fatores de crescimento estão envolvidos na proliferação e estimulação fibroblástica, incluindo PDGF, TGF- β , EGF, FGF-2, IGF-1, entre outros (Williams e Moores, 2013). Seguindo-se a diminuição do infiltrado inflamatório e o aumento da angiogênese nas fases iniciais da cicatrização, o extrato estudado demonstrou ação importante na formação do colágeno, comprovada morfometricamente pelo aumento da deposição de colágeno e morfologicamente pela estrutura de matriz extracelular.

Corroboram esses achados trabalhos *in vitro* realizados por Balekar *et al.* (2012a) com frações do extrato etanólico das folhas de *Sphagneticola trilobata*. Segundo esses autores, esse extrato foi favorável na proliferação de fibroblastos e na síntese de fibras colágenas, verificadas com base em uma curva padrão de colágeno solúvel (*kit* de ensaio de colágeno Sircol[®]). A produção de fibras colágenas é importante para sustentação e força tênsil da cicatriz (Tazima *et al.*, 2008). Outros fitoterápicos também foram favoráveis à deposição de colágeno em modelos de feridas cutâneas, dentre eles *Calendula officinalis* L. (Parente *et al.*, 2009), *Schinus terebinthifolius* Raddi (Estevão *et al.*, 2013).

De acordo com Tazima *et al.* (2008), nas primeiras 24 a 36 horas após o trauma, são liberados fatores de crescimento epidérmicos que estimulam a proliferação de células epiteliais e a reepitelização da ferida. O estímulo para a migração e a proliferação das células epidérmicas inclui EGF, TGF- α e KGF, produzidas por células da epiderme, fibroblastos e macrófagos da ferida (Willians e Moores, 2013). Neste estudo foi possível observar o crescimento da língua epitelial em todos os grupos, com completa área epitelizada no GT no sétimo dia de PO, juntamente com maior número de vasos e colágeno, demonstrando a ação benéfica desse extrato diante desses estímulos na fase proliferativa do reparo cutâneo.

CONCLUSÃO

A aplicação tópica de creme fitoterápico contendo extrato hidroalcoólico bruto das folhas de *Sphagneticola trilobata* na concentração de 7,7% surge como uma alternativa ao tratamento de feridas cutâneas nas medicina humana e veterinária, uma vez que atua nas fases de inflamação, proliferativa e de remodelamento da cicatrização, com formação de crosta uniforme, boa vascularização, diminuição do infiltrado inflamatório e boa deposição de colágeno.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (Facepe) e à Universidade Federal Rural de Pernambuco, pelo apoio financeiro e auxílio no desenvolvimento da pesquisa.

REFERÊNCIAS

- ARGENTA, S.C.; ARGENTA, L.C.; GIACOMELLI, S.R. *et al.* Plantas medicinais: cultura popular versus ciência. *Vivências*, v.7, p.51-60, 2011.
- BALEKAR, N.; KATKAM, N.G.; NAKPHENG, T. *et al.* Evaluation of the wound healing potential of *Wedelia trilobata* (L.) leaves. *J. Ethnopharmacol.*, v.141, p.817-824, 2012a.
- BALEKAR, N.; NAKPHENG, T.; KATKAM, N.G.; SRICHANA, T. Wound healing activity of ent-kaura-9(11),16-dien-19-oic acid isolated from *Wedelia trilobata* (L.) leaves. *Phytomedicine*, v.19, p.1178-1184, 2012b.
- BALEKAR, N.; NAKPHENG, T.; SRICHANA, T. *Wedelia trilobata* L.: a phytochemical and pharmacological review. *Chiang Mai J. Sci.*, v.41, p.590-605, 2014.
- BATISTA, J.S.; SILVA, A.E.; RODRIGUES, C.M.F. *et al.* Avaliação da atividade cicatrizante do óleo de pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm) em feridas cutâneas produzidas experimentalmente em ratos. *Arq. Inst. Biol.*, v.77, p.441-447, 2010.
- BUCH, D.R.; ARANTES, A.B.; CAMPELO, P.M.S. Verificação da atividade cicatrizante do exudato de folhas de *Jatropha multifida* L. *Rev. Bras. Farm.*, v.89, p.142-145, 2008.
- COCA, K. P.; ABRÃO, A. C. F. V. An evaluation of the effect of lanolin in healing nipple injuries. *Acta Paul Enferm*; v.21, n.1, p. 11-6, 2008.
- CORREIA, P.M. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. 5.ed. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1984.
- EMING, S.A.; MARTIN, P.; TOMIC-CANIC, M. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. *Sci. Transl. Med.*, v.6, p.1-16, 2014.
- ESTEVIÃO, L.R.M.; CASSINI-VIEIRA, P.; LEITE, A.G.B. *et al.* Morphological evaluation of wound healing events in the excisional wound healing model in rats. *Bio Protocol.*, v.9, p.e3285, 2019.
- ESTEVIÃO, L.R.M.; MEDEIROS, J.P.; SCOGNAMILLO-SZABÓ, M.V.R. *et al.* Neoangiogênese de retalhos cutâneos em ratos tratados com óleo de copaíba. *Pesqui. Agropecu. Bras.*, v.44, p.406-412, 2009.
- ESTEVIÃO, L.R.M.; MENDONÇA, F.S.; BARATELLA-EVÊNCIO, L. *et al.* Effects of aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) oil on cutaneous wound healing in rats. *Acta Cir. Bras.*, v.28, p.202-209, 2013.
- ESTEVIÃO, L.R.M.; SIMÕES, R.S.; CASSINI-VIEIRA, P. *et al.* *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira) leaves oil attenuates inflammatory responses in cutaneous wound healing in mice. *Acta Cir. Bras.*, v.32, p.726-735, 2017.
- FORMULÁRIO de fitoterápicos - farmacopeia brasileira. Brasília: ANVISA 2011.

- JACKSON, J.R.; SEED, M.P.; KIRCHER, C.H. *et al.* The codependence of angiogenesis and chronic inflammation. *FASEB J.*, v.11, p.457-65, 1997.
- LANDÉN, N.X.; LI D.; STAHL M. Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing. *Cell Mol. Life Sci.*, v.73, p.3861-3885, 2016.
- LEITE, A.G.B.; FARIAS, E.T.N.; OLIVEIRA, A.P. *et al.* Phytochemical screening and antimicrobial activity testing of crude hydroalcoholic extract from leaves of *Sphagneticola trilobata* (Asteraceae). *Ciênc. Rural*, v.49, n.04, 2019.
- LEMÕES, M.A.M.; JACONDINO, M.; CEOLIN, T. *et al.* The use of the plant *Sphagneticola trilobata* farmers affected by diabetes mellitus. *Rev. Pesqui. Cuidado Fund.*, v.4, p.2733-2739, 2012.
- LI, J.; ZHANG, Y.P.; KIRSNER, R.S. Angiogenesis in wound repair: angiogenic growth factors and the extracellular matrix. *Microsc. Res. Tech.*, v.60, p.107-14, 2003.
- LU, K.; BHAT, M.; BASU, S. Plants and their active compounds: natural molecules to target angiogenesis. *Angiogenesis*, v.19, p.28795, 2016.
- MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA JÚNIOR, V.F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Quím. Nova*, v.25, p.429-438, 2002.
- MATOS, F.J.A. *Introdução à fitoquímica experimental*. 2.ed. Fortaleza: UFC Edições, 1997. 141p.
- MENDONÇA, R.J.; COUTINHO-NETO, J. Aspectos celulares da cicatrização. *Bras. Dermatol.*, v.84, p.257-262, 2009.
- NITZ, A.C.; ELY, J.B.; D'ACAMPORA, A.J. *et al.* Estudo morfológico no processo de cicatrização de feridas cutâneas em ratos, usando: *Coronopus didymus* e *Calendula officinalis*. *Arq. Catarinense Med.*, v.35, p.74-79, 2006.
- OLIVEIRA, I.V.P.M.; DIAS, R.V.C. Cicatrização de feridas: fases e fatores de influência. *Acta Vet. Bras.*, v.6, p.267-271, 2012.
- PARENTE, L.M.L.; SILVA, M.S.B.; BRITO, L.A.B. *et al.* Efeito cicatrizante e atividade antibacteriana da *Calendula officinalis* L. cultivada no Brasil. *Rev. Bras. Plantas Med.*, v.11, p.383-391, 2009.
- PESSOA, W.S.; ESTEVÃO, L.R.M.; SIMÕES, R.S. *et al.* Effects of angico extract (*Anadenanthera colubrina* var. *cebil*) in cutaneous wound healing in rats. *Acta Cir. Bras.*, v.27, p.665-670, 2012.
- PESSOA, W.S.; ESTEVÃO, L.R.M.; SIMÕES, R.S. *et al.* Fibrogenesis and epithelial coating of skin wounds in rats treated with angico extract (*Anadenanthera colubrina* var. *cebil*). *Acta Cir. Bras.*, v.30, p.353-358, 2015.
- RAMSEY, D.T.; POPE, E.R.; WAGNER-MANN, C.; BERG, J.N.; SWAIM, S.F. Effects of three occlusive dressing materials on healing of full-thickness skin wounds in dogs. *Am. J. Vet. Res.*, v.56, p.941-949, 1995.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na atenção básica. Brasília, 2012. 154 p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos) (Cadernos de atenção básica, n. 31).
- SANTOS, O.J.; MALAFAIA, O.; RIBAS-FILHO, J.M. *et al.* Efeito de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira) e *Carapa guianensis* Sublet (Andiroba) na cicatrização de gastrorrafias. *Arq. Bras. Cir. Dig.*, v.26, p.84-91, 2013.
- SOUZA NETO JUNIOR, J.C.; ESTEVÃO, L.R.M.; BARATELLA-EVÊNCIO, L. *et al.* Mast cell concentration and skin wound contraction in rats treated with *Ximenia americana* L. *Acta Cir. Bras.*, v.32, p.148-156, 2017.
- SOUZA NETO JÚNIOR, J.C.; ESTEVÃO, L.R.M.; FERRAZ, A.D. *et al.* Ointment of *Ximenes americana* promotes acceleration of wound healing in rats. *Acta Cir. Bras.*, v.34, p.1-8, 2019.
- TAZIMA, M.F.G.S.; VICENTE, Y.A.M.V.A.; MORIYA, T. Biologia da ferida e cicatrização. *Medicina*, v.41, p.259-64, 2008.
- WILLIAMS, J.; MOORES, A. *Manual de feridas em cães e gatos*. 2.ed. São Paulo: Roca, 2013. 276p.