

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

EFEITO DE FORMULAÇÃO RICA EM VITAMINA C PRESENTE NO
CAMU CAMU (*MYRCIARIA DÚBIA*) NA CICATRIZAÇÃO DE
FERIDAS CIRÚRGICAS

Bolsista: Marjorie Araujo Monteiro
Orientadora: Prof^{fa} Dra Cinthya Iamille Frithz Brandão de Oliveira

MANAUS - AM
2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO PARCIAL
(PIB-S/0197/2013)
EFEITO DE FORMULAÇÃO RICA EM VITAMINA C PRESENTE NO
CAMU CAMU (*MYRCIARIA DÚBIA*) NA CICATRIZAÇÃO DE
FERIDAS CIRÚRGICAS

Bolsista: Marjorie Araujo Monteiro
Orientadora: Prof^ª Dra Cinthya Iamille Frithz Brandão de Oliveira

MANAUS - AM
2014

Todos os direitos deste relatório são reservados à Universidade Federal do Amazonas, ao Instituto de Ciências Biológicas e aos seus autores.

Esta pesquisa, foi financiada pela Fundação de Amparo à pesquisa do Estado do Amazonas, através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica – PIBIC e desenvolvida no Instituto de Ciências Biológicas - ICB, Departamento de Fisiologia com apoio da Faculdade de Ciências Farmacêuticas –FCF.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	5
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
3. JUSTIFICATIVA	Erro! Indicador não definido.
4. OBJETIVOS	7
5. MATERIAL E MÉTODOS	9
5.1 MATERIAL VEGETAL.....	9
5.2 ANIMAIS	9
5.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	9
5.4 PROCEDIMENTO CIRURGICO.....	10
5.5 PRODUÇÃO DA LESÃO.....	10
5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	11
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
7. CONCLUSÃO.....	13
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15

1. INTRODUÇÃO

As tentativas do homem de intervir no processo de cicatrização de feridas remontam à Antiguidade, quando foi reconhecida a importância de protegê-las para evitar complicações. Os portadores de feridas desenvolvem sequelas com frequência, e as consequências sociais podem ser intensas, podendo ocorrer perda de membros e funções, afastando a pessoa do trabalho e, por vezes, obrigando-a à aposentadoria precoce por invalidez (BLANES, L., 2004). Após ocorrer a lesão de um tecido iniciam-se imediatamente fenômenos fisiológicos para o restabelecimento da integridade dos tecidos (POTTER; PERRY, 2003), porém, muitas vezes este processo fisiológico é lento e doloroso, necessitando de intervenções. Existem diversos recursos atualmente disponíveis para auxiliar no processo de cicatrização e sua aplicação na realização de curativos e técnicas para o tratamento de feridas, como ácidos graxos essenciais, alginato de cálcio, antissépticos, degermantes, bandagens de compressão, filmes semipermeáveis, colágeno biológico, fator de crescimento celular. (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003).

A cicatrização de feridas consiste em uma perfeita e coordenada cascata de eventos celulares e moleculares que interagem para que ocorra a repavimentação e a reconstituição do tecido (ORTONNE, CLÉVY, 1994). Tal evento é um processo dinâmico que envolve fenômenos bioquímicos e fisiológicos que se comportam de forma harmoniosa a fim de garantir a restauração tissular. Como desencadeante da cicatrização, ocorre a perda tecidual, a partir da qual o fisiologismo volta-se completamente para o reparo de um evento danoso ao organismo (MANDELBAUM *et al.*, 2003; COTRAN *et al.*, 2000.).

A vitamina C, também conhecida como ácido ascórbico (AA) tem grande importância na cicatrização sendo usado como co-fator do colágeno, proteção contra processo de lesão celular causada por radicais livres e no sistema imune. A ação como co-fator do colágeno pelo AA ocorre em duas enzimas essenciais para a biossíntese do mesmo: a lisil e a prolil-hidroxilase, que catalisam a hidroxilação dos resíduos prolil e lisil nos polipeptídeos colágenos, e essas modificações pós-translacionais permitem a formação e estabilização do colágeno de tripla hélice, e sua subsequente secreção no

espaço extracelular como pró-colágeno (PINNEL e cols., 1987). Esse pró-colágeno é então transformado em tropocolágeno, e finalmente fibras colágenas são formadas por um rearranjo espacial espontâneo das moléculas tropocolágenas (CHAN e cols, 1990). Trabalho recente demonstrou que, embora a capacidade proliferativa e a síntese de colágeno sejam idade-dependentes, o ácido ascórbico é capaz de estimular a proliferação celular, bem como a síntese de colágeno pelos fibroblastos dérmicos, independente da idade do paciente. Nesta pesquisa, o AA foi capaz de vencer a capacidade proliferativa reduzida dos fibroblastos dérmicos de indivíduos idosos (78-93 anos), assim como aumentar a síntese de colágeno em níveis similares aos de células de recém-natos (três a oito dias de vida). (Manela-Azulay, Monica, 2003) A prolina hidroxilase também é necessária à formação do componente C1q do complemento, utilizado no sistema imune. A vitamina C também possui a ação de agente redutor e varredor de radicais livres, minimizando a sua ação sobre os tecidos e diminuindo o envelhecimento cutâneo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Na região amazônica há grande diversidade de espécies vegetais, como os frutos típicos, que, além de outros constituintes, são ricos em vitamina C, como o cupuaçu, maracujá-do-mato, abiu, pitomba, buriti, cajarana, acerola, entre outras (BAPTISTA e cols., 2010). Dentre todas, ressaltamos o camu-camu, que ganhou destaque internacional pelo seu alto potencial de vitamina C, que pode chegar de 2 a 6g/100g de fruto; se formos comparar com outras frutas também ricas nesta vitamina e já preconizadas por diversas culturas, como a laranja, esta possui em média 0,4 g (YUYAMA e cols., 2002).

O camu-camuzeiro, araçá d'água ou caçari (*Myrciaria dúbia* (H.B.K.) Mc Vaugh – Myrtaceae) vem sendo alvo de pesquisas que visam ao fornecimento de informações que servirão para subsidiar seu processo de domesticação. Planta de porte arbustivo que ocorre naturalmente nas bordas de terrenos alagados, entradas de canais e rios de água escura (Suguino, 2002) e também de águas claras (Yuyama et al., 2002) da Amazônia, o potencial econômico do camu-camuzeiro reside no fruto, considerado atualmente a maior fonte natural de vitamina C (Andrade et al., 1991; Yuyama et al., 2002). O fruto, conhecido como camu-camu é muito semelhante a uma cereja, tem sido usado com diversas finalidades, incluindo: antioxidantes, anti-inflamatórias e adstringente (AZAWA *et al.*, 2011; INOUE e cols., 2008). A valorização da utilização das plantas medicinais tem sido estimulada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) desde a Declaração de Alma-Ata, em 1978, na qual foi constatado que no âmbito sanitário 80% da população mundial utilizam plantas ou preparações destas com finalidade terapêutica (BRASIL, MINISTERIO DA SAÚDE, POLITICA NACIONAL DE PRÁTICAS INTEGRATIVAS E COMPLEMENTARES. 2006).

Normalmente, as lesões cutâneas, como em pacientes diabéticos – que localizam-se nos membros inferiores – são de difícil tratamento e o processo de cicatrização é alcançado em 60% a 80% dos destes pacientes (Gottrup, 2005; Oyibo, 2001), com tempo médio de tratamento correspondente a dez semanas, podendo haver recidiva de 13 a 44% após o primeiro ano e de 60% após dois anos (Gottrup, 2005; Faglia et al, 2001).

Diante da sua cronicidade e da possibilidade de recidiva em maior ou menor período de tempo, essas lesões podem gerar repercussões psicossociais aos pacientes, na medida em que podem provocar mudanças no estilo de vida, prolongar o tempo de afastamento do convívio familiar, provocar alteração da autoimagem, o que afeta diferenciadamente cada indivíduo, em menor ou maior intensidade, além de ser um limitante para o exercício de atividades diárias. No âmbito das instituições hospitalares, demandam aumento dos custos pela dispensação de insumos e cuidados especializados pela equipe assistencial. Considerando tais implicações, coberturas de última geração têm sido desenvolvidas e aplicadas com vistas a auxiliar e favorecer um meio adequado à cicatrização, sendo sua seleção associada a um processo de avaliação crítico e contínuo e à promoção de uma terapêutica com base na visão holística do paciente (Almeida, 2002). É nessa perspectiva que estudos experimentais, à base de plantas medicinais e outros elementos que atuam no processo de cicatrização, estão sendo desenvolvidos, como a pesquisa com o uso da Aloe vera e colágeno (OLIVEIRA, 2010).

3. OBJETIVOS

Acompanhar e avaliar a eficácia do creme de camu-camu (*Myrciaria dúbia*) no processo cicatricial de feridas cirúrgicas quando utilizando topicamente em lesões cutâneas de cobaias.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL VEGETAL

O extrato seco concentrado de Camu-camu (*Myrciaria dúbia*) foi adquirido com o Prof. Doutor Émerson Silva Lima da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas (FCF-UFAM).

4.2 ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar, machos e fêmeas, pesando entre 200 a 400 g, mantidos em gaiolas individuais de polietileno com tampa de aço inox, forradas com maravalha autoclavada, trocada três vezes por semana, em temperatura ambiente em torno de $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, com umidade relativa do ar e ruídos mantidos em condições preconizadas pelo COBEA. Foi obedecido o ciclo claro/escuro de 12 horas, com água e ração padrão *ad libitum*. Este projeto faz parte de um projeto maior referente ao Screening farmacológico e uso de plantas medicinais da Amazônia, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFAM sob o número 043/2011.

4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Após período de adaptação ao local do experimento, os animais foram distribuídos aleatoriamente em gaiolas coletivas, observando-se o gênero, e divididos em 3 grupos:

Grupo 1 - Controle negativo: os animais foram tratados com soro fisiológico a 0,9%, topicamente;

Grupo 2 - Base Lanete: os animais foram tratados, via tópica, com a base Lanete sem a incorporação do Camu-camu;

Grupos 3, 4 e 5 – Teste: neste grupo, os animais foram tratados com o creme de camu-camu nas concentrações de 1, 10 e 30% incorporado à base Lanete, também pela via tópica.

Os animais foram tratados durante 7 dias consecutivos.

4.4 PROCEDIMENTO CIRURGICO

Após a separação dos grupos e antes de iniciar os tratamentos, os animais serão anestesiados com aplicação intra-peritoneal de uretano 1ml para cada 100g. Com a indução anestésica, será realizada a tricotomia com posterior assepsia local com álcool à 70^oGL.

4.5 PRODUÇÃO DA LESÃO

Para a indução das feridas, os animais foram mantidos em decúbito ventral e a lesão foi delimitada em 1cm² e feita com bisturi, em seguida retirada a pele e a tela subcutânea, expondo-se a fáscia muscular dorsal. Após a indução da lesão, foi iniciado imediatamente os tratamentos.

4.6 TRATAMENTO DAS FERIDAS

As feridas foram tratadas diariamente, uma vez ao dia, por 7 dias, aplicando-se os tratamentos diretamente nas lesões, cobrindo-as por completo. A cada nova reposição da medicação, as feridas foram limpas com solução fisiológica 0.9% para a remoção de crostas e resíduos do creme, e novas aplicações serão realizadas com o auxílio de espátula plástica ou cotonete.

As lesões foram mensuradas no primeiro e último, antes dos tratamentos, com o auxílio de paquímetro.

4.7 PREPARAÇÕES

Base Lanete

Trata-se de um creme aniônico (Lanette), composto de álcoois graxos superiores e alquil sulfato, hidratante e emoliente, de baixa oleosidade, de toque suave à alta resistência aos princípios ativos que requerem veículos com este caráter. É compatível com todos cosméticos e farmacêuticos que toleram emulsões aniônicas. Será adquirida comercialmente.

Creme de camu-camu

Será incorporado à base Lanete, 1, 10 e 30% de extrato liofilizado da polpa de camu-camu, perfazendo 3 formulações distintas para avaliar também a curva dose-resposta desta formulação. No controle de qualidade teremos a colaboração da FCF-UFAM.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a avaliação dos diferentes grupos experimentais, foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA), e para comparação entre as médias pelo teste de Tukey. Foram considerados como estatisticamente significativos os valores de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos, após os testes preliminares e formatação do modelo padrão, apontaram para um efeito cicatrizante eficiente, em alguns casos, antes mesmo do tempo total do protocolo experimental.

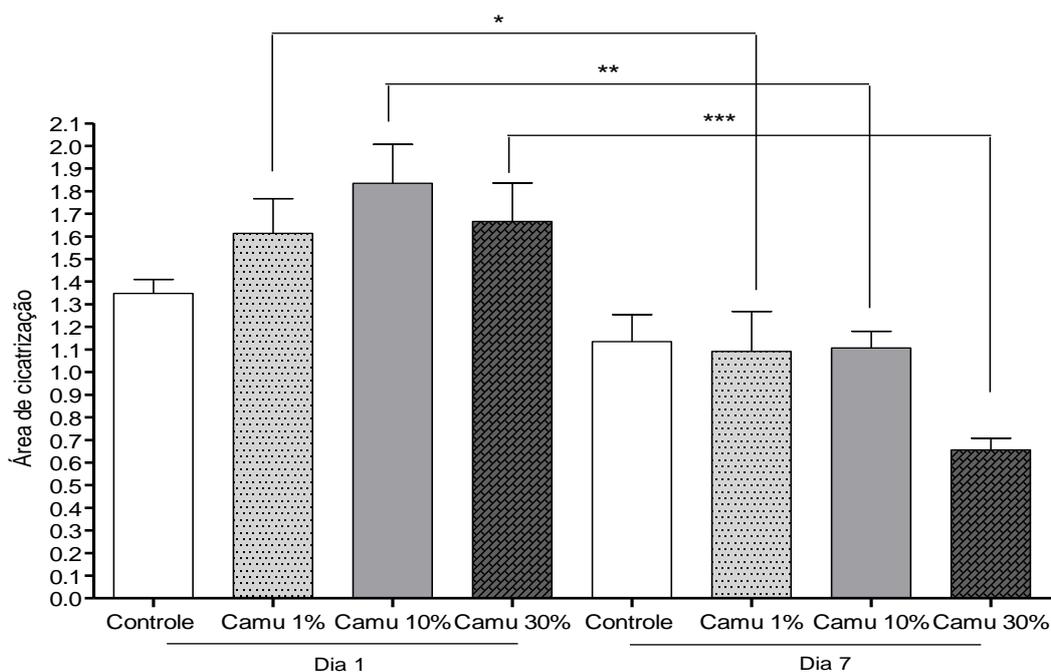


Figura. 2. Avaliação dos efeitos dos extratos concentrados de camu-camu, em formulação cremosa, à 1, 10 e 30% em ratos submetidos à lesão superficial cirurgicamente, tratados por 7 dias/dose diária. ANOVA, seguida Newman-Kews-Kews Test, onde $p < 0,05$.

A análise das áreas de cicatrização demonstrou que houve diferença estaticamente significativa quando comparada a área de cicatrização dos grupos antes e depois do tratamento com creme de camu-camu e grupo controle.

Pode-se observar que o grupo com maior significância foi o tratado com creme de camu-camu 30% onde $p < 0,001$, seguidos pelo grupo tratado com creme de camu-camu 10% onde $p < 0,01$ e grupo tratado com creme de camu-camu 1% onde $p < 0,05$. Os dados obtidos é permitido associar que o uso de creme de camu-camu tenha auxiliado no processo de cicatrização e quanto maior sua concentração melhores os resultados mostrados em relação a diminuição a área.

Os valores médios da área de cicatrização foram comparados nos 4 grupos, e ratificou que os ratos tratados com creme camu-camu 30% tiveram maior diferença entre a área de cicatrização antes e depois.

Tabela 1. Avaliação dos efeitos dos extratos concentrados de camu-camu, em formulação cremosa, à 1, 10 e 30% em ratos submetidos à lesão superficial cirurgicamente, tratados por 7 dias/dose diária. Resultados expressos em Média±Erro padrão da média. ANOVA, seguida Newman-Kews-Kews Test, onde $p < 0,05$.

Controle		Camu-camu 1%		Camu-camu 10%		Camu-camu 30%	
Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois
1,29±0,17	1,025±0,10	1,61±0,15	1,09±0,17	1,83±0,17	1,11±0,07	1,66±0,17	0,77±0,12

6. CONCLUSÃO

Nesta pesquisa observamos a eficácia do modelo utilizado bem como o tipo de resposta que o organismo desenvolve naturalmente para diminuir um dano tecidual. Com base nas observações, afirma-se que o tempo máximo de espera de recuperação do tecido lesionado na espécie estudada é de 7 dias, podendo perceber um pico de efeito à partir do quarto dia.

Nos testes realizados, os animais apresentaram recuperação das lesões já no terceiro dia, e os que foram tratados com o extrato mais concentrado demonstrou um efeito cicatrizante mais eficiente que os demais, com o menor índice de sinal de cicatrização.

O efeito cicatrizante foi efetivo nas três formulações testadas, apresentando dose/dependência, com a necessidade futura de ser determinada a dose eficaz para a formulação em questão, além do estudo de toxicidade tópica atrelado a altas doses.

No entanto, como sistema imunológico e de recuperação tecidual de roedores é muito mais eficiente que dos humanos, e os resultados aqui expressos necessitam de testes neste segundo grupo a fim de observar se a ação cicatrizante e estimuladora de crescimento tecidual podem realmente ser efetivas em humanos, entendemos ser importante a continuidade dos testes prevendo-se a extrapolação para estes agentes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abreu, J.A.C. Análise histológica da cicatrização de feridas cutâneas experimentais sob ação do laser de baixa potência. *Scientia Medica (Porto Alegre)* 2011; volume 21, número 3, p. 96-100

Almeida ET. Manual para realização de curativos. Rio de Janeiro: Cultura Médica; 2002.

ANDRADE, J.S.; GALEZZI, M.A.; ARAGÃO, C.G.; CHAVES-FLORES, W.B. Valor nutricional do camu-camu (*Myciaria dubia* (H.B.K.) Mc Vaugh Myrtaceae) cultivado em terra firme na Amazônia Central, *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.13, n.3, p.307-311, 1991.

Blanes L. Tratamento de feridas. In: Baptista-Silva JCC, editor. *Cirurgia vascular: guia ilustrado*. São Paulo: [s.n]; 2004.[23 p.]. Disponível em: <http://bapbaptista.com.br/feridasLeila.pdf>

Chan D, Lamande SR, Cole WG, and Bateman JF. Regulation of procollagen synthesis and processing during ascorbate-induced extracellular matrix accumulation *in vitro*. *J Biol Chem*, 1990;269(1):175-81

Cotran RS, Kumar V &, Collins T . *Robbins: patologia estrutural e funcional*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,2000

Diabetes Care. 2001;24(1):78-83

Faglia E, Favales F, Morabito A. New ulceration, new major amputation, and survival rates in diabetic subjects hospitalized for foot ulceration from 1990 to 1993: a 6.5 year follow-up.

Filho,A.G. Efeito do extrato de *Passiflora edulis* (maracujá) na cicatrização de bexiga em ratos: estudo morfológico. *Acta Cirúrgica Brasileira - Vol 21,Suplemento 2*, 2006.

GISELE ANDRÉ BAPTISTA CANUTO, , ANA AUGUSTA ODORISSI XAVIER, LEANDRO CAMARGO NEVES, MARTA DE TOLEDO BENASSI. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE POLPAS DE FRUTOS DA AMAZÔNIA E SUA CORRELAÇÃO COM A ATIVIDADE ANTI-RADICAL LIVRE. Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal - SP, v. 32, n. 4, p. 1196-1205, Dezembro 2010

Gottrup F. Management of the diabetic foot: surgical and organizational aspects. Horm Metab Res. 2005;37(1 Suppl):69-75.

Kazunaga Y, AZAWA, Katsumi SUGA, Atsushi HONMA, Miyuki SHIROSAKI and Tomoyuki KOYAMA. Anti-Inflammatory Effects of Seeds of the Tropical Fruit Camu-Camu (Myrciaria dubia). J. Nutr Sci Vitaminol, 57, 104–107, 2011.

MANDELBAUM,Samuel; DI SANTIS, Érico; MANDELBAUM Maria.Cicatrização:conceitos atuais e recursos auxiliares – Parte I, 2003.Disponível: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0365-05962003000300002&script=sci_arttext

MANDELBAUM,Samuel; DI SANTIS, Érico; MANDELBAUM Maria.Cicatrização:conceitos atuais e recursos auxiliares – Parte II, 2003.Disponível em : http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0365-05962003000500002&script=sci_arttext

Manela-Azulay,Monica.Vitamina C , An. Bras. Dermatol. vol.78 no.3 Rio de Janeiro May/June ,2003

Ortonne JP, Clévy JP. Physiologie de la cicatrisation cutanée. Ver Prat 1994; 44(13): 1733-4

Oyibo SO, Jude EB, Tarawnweh Y, Nguyen HC, Armstrong DG, Harkless LB, et al. The effects of ulcer size and site, patient's age, sex and type and duration of diabetes on the outcome of diabetic foot ulcers. *Diabet Med*. 2001;18(2):133-8.

Pinnel SR, Murad S, and Darr D, Induction of collagen synthesis by ascorbic acid. A possible mechanism. *Arch Dermatol*,1987;23(12):1684-6

Potter,P.A. & Perry , A.G. Fundamentos de Enfermagem .5° Ed, Loures:Lusociência,2003

Simone Helena dos Santos Oliveira, Maria Julia Guimarães Oliveira Soares, Pascalle de Sousa Rocha. Uso de cobertura com colágeno e aloe vera no tratamento de ferida isquêmica: estudo de caso. *Rev Esc Enferm USP* 2010; 44(2):346-5

SUGUINO, E. Propagação vegetativa do camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) Mc Vaugh) or meio da garfagem em diferentes porta-enxertos da família Myrtaceae. Piracicaba, 2002. 2p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Engenharia Agrônômica, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.

Teruo Inoue, Hiroshi Komoda, Toshihiko Uchida, Koichi Node. Tropical fruit camu-camu (*Myrciariadubia*) has anti-oxidative and anti-inflammatory properties. *Journal of Cardiology* (2008) 52, 127—132.

YUYAMA, K.; AGUIAR, J.P.L.; YUYAMA, L.K.O. Camu-camu: um fruto fantástico como fonte de vitamina C,*Acta Amazonica*, v.32, n.1, p.169-174, 2002.