

Verificação da potencialização do efeito cicatrizante do muco de caracóis do gênero *Achatina* promovida por ração à base de Confrei (*Symphytum officinale*)

Verification of the potential healing effect of the sputum of snails from the genus *Achatina* promoted by diet based on Comfrey (*Symphytum officinale*)

Verificación del potencial efecto curativo del esputo de los caracoles del género *Achatina* promovido por la dieta sobre la base de Comfrey (*Symphytum officinale*)

1. **SIRIO, Otavio José.** Mestre em Nutrição e Produção Animal/USP-Pirassununga –SP
2. **MARTINS, Maria de Fátima.** Professora doutora do Departamento de Nutrição e Produção Animal-FMVZ/ USP-Pirassununga-SP. fmartins@usp.br
3. **IYOMASA, Mamie Mizusaki.** Professora Doutora da Faculdade de Odontologia/USP-Ribeirão Preto-SP
4. **YOKOYA, Eugênio.** Mestrando Departamento de Nutrição e Produção Animal/USP-Pirassununga-SP. eugenioyokoya@usp.br
5. **GREGHI, Gisele Fernanda.** Iniciação Científica FAPESP. Departamento de Nutrição e Produção Animal/USP-Pirassununga-SP. gisele.gregghi@usp.br Departamento de Nutrição e Produção Animal/USP-Pirassununga-SP.
6. **SILVA, Michele Ribeiro -** Mestranda Departamento de Nutrição e Produção Animal/USP-Pirassununga-SP.
7. **LIMA, Pollyana Martins Pacheco dos Santos –** Pré Iniciação Científica Colégio John Kennedy e FMVZ/USP, Pirassununga/S.P.
8. **PINHEIRO, Juliana de Vazzi -** Mestranda Departamento de Nutrição e Produção Animal/USP-Pirassununga-SP.

Resumo - O objetivo da presente pesquisa foi o de avaliar macroscópica e histologicamente, os efeitos reparadores do muco dos escargots *Achatina fulica* e *Achatina achatina monochromatica*, em lesões provocadas na pele de camundongos da linhagem “hairless”; verificar sua potencialização após a ingestão de uma ração contendo em sua formulação uma planta com propriedades cicatrizantes comprovadas, o Confrei (*Symphytum officinale*); e analisar bioquimicamente a composição do muco destes caracóis. Foram selecionados caracóis das espécies *Achatina fulica* (n=30) e *Achatina monochromatica monochromatica* (n=30), retirado seu muco através de estimulação manual da glândula podal e verificação de seu efeito reparador. Utilizaram-se camundongos da linhagem “hairless” (n=75), submetidos à intervenção cirúrgica e tratados com muco de ambas as espécies de caracóis. As características macroscópicas da lesão foram registradas em protocolo e avaliadas. Fragmentos de pele foram submetidos à biópsia aos 3, 5 e 7 dias de experimento, fixados em Paraformoldeído, processados e incluídos em parafina. Os cortes foram corados com Hematoxilina-Eosina e Tricrômio de Mason. Macroscopicamente, os animais tratados mostraram edemas menores, maior presença de crosta e maior contração das bordas das feridas ao final do experimento, quando comparados ao grupo controle. Histologicamente, os grupos tratados também revelaram melhor reparação da lesão, apresentando edemas menos intensos, grandes quantidades de tecido de granulação e infiltrados inflamatórios. O grupo tratado com muco de caracóis alimentados com ração contendo *Symphytum officinale* foi o que apresentou melhores resultados.

Palavras-chave: CAMUNDONGO, CARACÓIS TERRESTRES, CICATRIZAÇÃO, CONFREI, MUCO

Abstract - The aim of this study was to evaluate through macroscopic and histological techniques the repairing effects of the mucus in the snails *Achatina fulica* and *Achatina achatina monochromatica* in lesions intentionally caused to hairless lineage mice skin; to investigate mucus potential effect after snails have been fed with a diet formulation containing a plant with proved scar properties, the Comfrey (*Symphytum officinale*); and to study the biochemical composition of mucus from these snails. Snails of *Achatina fulica* (n=30) and *Achatina monochromatica monochromatica* (n=30) species were sorted, the mucus extracted through manual stimulation of the podal gland and the repairing effect studied. Hairless lineage mice (n=75) used in this study went through surgery and then treated with mucus from both species of snails. The macroscopic characteristics of the lesion were recorded and assessed. Fragments of skin were taken to biopsy at 3, 5 and 7 days of trial, fixed in paraformaldehyde, processed and embedded in wax. Sections were stained with Hematoxilin-Eosin and Tricromio of Mason. Macroscopically, treated mice showed minor swelling, higher presence of scabs and higher contraction of wound edges at the end of the trial, when compared with control. Histologically, groups that received treatment also showed better lesion repair, presenting less intense swellings, large amount of scar tissue and inflammatory infiltrates. The group treated with mucus from snails that received a diet containing *Symphytum officinale* presented the best results.
Key-words: COMFREY, LAND SNAILS, MICE, MUCUS, SCAR.

Introdução

Os caracóis terrestres pertencem ao Filo Mollusca. São gastrópodes pulmonados que apresentam concha espiralada, cabeça distinta com tentáculos e olhos, pé desenvolvido e massa visceral com giro de 180° (RUPERT & BARNES, 1996).

Liberam uma secreção cutânea composta por uma mistura de materiais provenientes de várias glândulas e exudato geral das células epiteliais (SIMKISS & WILBUR, 1977). Esta secreção é comumente denominada muco e o conhecimento de suas aplicações terapêuticas e cosméticas remontam aos primórdios da humanidade.

A principal finalidade desta secreção é a proteção do corpo do animal contra desidratação. No entanto, a sua viscosidade auxilia em diversas outras funções, sendo relatado que os caracóis terrestres são resistentes a infecções por microorganismos, devido à presença de um fator antimicrobiano nesta secreção (IGUCHI et al., 1982).

Em estudos anteriores, MARTINS, et al. (2003), constataram o alto poder cicatrizante do muco dos caracóis *Achatina fulica*, em experimentos de cicatrização de feridas em coelhos, utilizando variados veículos desta secreção mucosa, avaliando a reparação local e a evolução das feridas cirúrgicas provocadas em coelhos.

É também publicado na literatura, que a dieta dos caracóis terrestres pode influenciar o sabor de sua carne, sendo, possível aromatizá-la ainda em vida, ou seja, incorporar as propriedades do vegetal que consome (GALO, 1984). GOMOT (1997), em seus ensaios com caracóis da espécie *Helix aspersa aspersa*, demonstrou que estes animais podem ser usados como indicadores biológicos, uma vez que retiveram em seus corpos, partículas de metais pesados após a ingestão de diferentes amostras de solo contaminado. Isto indica que o que é consumido pelo caracol, acaba retido em seu corpo.

Partindo de informações empíricas e dados baseados na literatura existente, esta pesquisa teve por objetivos estudar e avaliar o efeito do muco dos caracóis *Achatina fulica* e *Achatina monochromatica monochromatica*, alimentados com duas rações diferentes - contendo ou não, em sua formulação, uma planta com propriedades cicatrizantes comprovadas (POZETTI, 1988), o confrei (*Symphytum officinale*) - na cicatrização de lesões provocadas na pele de camundongos hairless; analisar bioquimicamente o muco dos

caracóis, quantificando os componentes bioquímicos encontrados; avaliar macroscópica e microscopicamente as alterações ocorridas durante o processo de reparo da lesão provocada.

Material e Métodos

Foram utilizados neste estudo sessenta exemplares adultos de caracóis *Achatina fulica* (n=30) e *Achatina monochromatica monochromatica* (n=30) para a coleta do muco.

Os animais foram mantidos em caixas de madeira, sendo metade alimentados a cada 2 dias com uma ração base, e a outra metade alimentados com esta ração base acrescida de Confrei (*Symphytum officinale*).

Os moluscos foram separados e colocados em caixas plásticas de dimensões 75x40x30cm sem fundo de terra e mantidos em jejum por 3 dias antecedentes à coleta do muco.

A análise bioquímica da secreção foi realizada através de dosagens de açúcares totais e redutores, proteínas, mucoproteínas e lipídeos do muco dos moluscos terrestres.

Análise da propriedade cicatrizante do muco dos caracóis terrestres

a) *Ensaio Biológico*: Foram utilizados 75 camundongos “Hairless” (*Mus musculus*, Linhagem HRS/J), machos, com peso médio de 35g. Estes animais foram divididos em grupos de acordo com o tratamento a ser recebido:

C – grupo controle;

F – grupo tratado com o muco do escargots *Achatina fulica* alimentados com a ração base;

M - grupo tratado com o muco do escargots *Achatina monochromatica monochromatica* alimentados com a ração base;

Fc - grupo tratado com o muco dos escargots *Achatina fulica* alimentados com a ração base acrescida da planta medicinal, *Symphytum officinale* (confrei);

Mc - grupo tratado com o muco dos escargots *Achatina monochromatica monochromatica* alimentados com a ração base acrescida da planta medicinal *Symphytum officinale* (confrei).

Cada grupo de camundongos (15 do grupo C, 15 do grupo F, 15 do grupo M, 15 do grupo Fc e 15 do grupo Mc) foi subdividido em:

Subgrupo que recebeu tratamento por 3 dias

Subgrupo que recebeu tratamento por 5 dias

Subgrupo que recebeu tratamento por 7 dias

b) *Indução da lesão*: Os camundongos foram anestesiados e em cada um deles, realizada uma lesão circular de 0,5mm de diâmetro, na pele do dorso. Após a lesão, os animais foram separados aleatoriamente de acordo com os tratamentos e o muco foi aplicado com auxílio de conta-gotas sobre a área da lesão.

c) *Análise Macroscópica*: Para este estudo, os animais foram acompanhados diariamente através de observações clínicas do reparo da lesão, as quais foram registradas conforme protocolo e documentadas através de fotografias.

d) *Obtenção das amostras para estudo microscópico de luz*: Para a realização dos exames histológicos, os animais foram submetidos à eutanásia e realizadas biópsias de fragmentos de pele do dorso dos camundongos.

Cada fragmento da lesão foi removido com margem de segurança, seguindo protocolo para análises histológicas.

Para os experimentos de avaliação do reparo tecidual, a análise estatística dos dados obtidos foram realizadas de acordo com o teste T student, considerando os valores de $p = 0,05$ ou $p = 0,01$ como significativos. Ao passo que para os experimentos contendo diferentes rações acrescidas da planta medicinal, a análise estatística paramétrica foi

realizada de acordo com a ANOVA “one way”, pelo método de múltiplas comparações versus grupo controle, considerando os valores de $p = 0,05$ ou $p = 0,01$ como significativos.

Resultados e

Realizadas as
cada fração
muco,

amostra	Açúcar Total (g%)	Açúcar redutor (g%)	Proteína (g%)	lipídeo (g%)	Mucoproteína (g%)
FSF	3,67	0,70	78,76	7,18	0,25
FSM	5,35	0,77	90,21	2,48	0,19

os seguintes resultados expressos na TABELA 1:

Discussão

dosagens de
solúvel do
obtiveram-se

Tabela 1 - Composição da fração solúvel do muco das espécies *A. fulica* (FSF) e *A. monochromatica monochromatica* (FSM).

Observaram-se diferenças significativas ($p = 0,05$), entre as composições do muco das espécies *A. fulica* e *A. monochromatica monochromatica*, principalmente as dosagens de açúcar total, proteínas e lipídios. Essas diferenças poderiam explicar a divergência de resultados encontrados entre os grupos de camundongos tratados com os mucos de ambas as espécies, haja vista que se supõe que o princípio ativo desta secreção pertença ao grupo das proteínas, presente em maior quantidade percentual (90,21%) no muco da espécie *A. monochromatica monochromatica*,

Ao longo do experimento, observou-se melhor reparação tecidual dos camundongos tratados quando comparados àqueles que não receberam qualquer tipo de tratamento. Analisando a regressão das bordas das feridas, constatou-se que os animais tratados com muco da espécie *A. monochromatica monochromatica* alimentados com Confrei apresentaram melhor resultado (1,8 mm de contração da ferida após 3 dias de tratamento, 2,0 mm aos 5 dias e 3,6 mm após 7 dias de tratamento).

A coloração da ferida dos camundongos em todos os tratamentos e grupo controle, apresentou-se normal, variando apenas de clara à escura, ou amarelada, de acordo com sua presença ou não e o tipo de crosta (hemática ou melicérica).

Nenhum animal apresentou exudato durante o período experimental.



Figura 1 – Camundongo do grupo tratado com o muco dos caracóis alimentados com a ração acrescida de Confrei (A), não apresenta exudato nem edema e a contração do diâmetro da ferida é maior que o camundongo do grupo controle (B).

Uma observação interessante, é que aos primeiros dias de tratamento (3 dias), os camundongos que receberam muco, apresentaram diferenças mais significativas ($p = 0,01$) quanto à contração das bordas das feridas quando comparados àqueles do grupo controle. Ao final dos sete dias experimentais, essas diferenças diminuíram, indicando que o muco deve atuar como um indutor inicial do processo de cicatrização.

Em relação à presença de edemas encontrados ao redor das feridas dos camundongos, estes foram observados menos intensos e em menor proporção nos grupos tratados quando comparados ao grupo controle. Estes dados foram confirmados pelos achados histológicos. Os tratamentos que apresentaram melhores resultados foram aqueles aos quais foram aplicados muco de animais alimentados com *Symphytum officinale* (confrei), sendo que, o grupo tratado com muco da espécie *A. monochromatica monochromatica* alimentados com a planta cicatrizante demonstrou resultados mais eficientes. No decorrer do experimento, constatou-se a regressão do edema para os grupos tratados com os diferentes tipos de muco. Nas figuras a seguir estão ilustradas as imagens das lesões experimentais tratadas com o muco de *Achatia sp* submetidos a diferentes dietas.

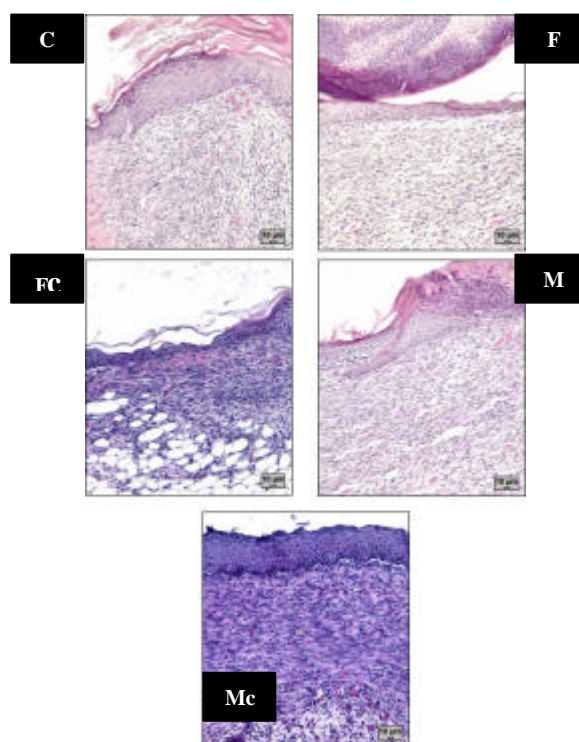


Figura 2 - Fotomicrografias das feridas dos camundongos aos 7 dias de experimento. (C) Tecido de granulação e infiltrado inflamatório mínimos; fibrinas moderadas e presença intensa de edema. (F) Presença de tecido de granulação de moderada à intensa; infiltrado inflamatório, fibrinas edema com presenças moderadas. (Fc) Intensa presença de tecido de granulação e moderada presença de fibrina e infiltrado inflamatório; edema não foi observado. (M) Apresentou-se com tecido de granulação moderado à intenso e infiltrado inflamatório moderado; as fibrinas mostraram-se mínimas; não foi observada a presença de edema. (Mc) O tecido de granulação apresentou-se intenso. Infiltrado inflamatório apresentou-se de maneira moderada à intensa, enquanto que fibrinas revelaram-se mínimas; não foi observado edema.

A análise histológica do tecido conjuntivo revelou aos três, cinco e sete dias de experimento, uma melhor combinação de variáveis dos grupos tratados com o muco dos

caracóis quando comparados ao grupo controle, indicando um melhor arranjo celular para o processo de reparo da ferida.

Os resultados macroscópicos evidenciaram que os grupos tratados com o muco de caracóis apresentaram crostas mais intensas em relação ao grupo controle durante todo o período experimental. Porém, histologicamente não foram observadas diferenças quanto à presença de crosta e sua intensidade.

Foram observados infiltrados inflamatórios mais intensos aos três, cinco e sete dias nos grupos tratados quando comparados ao grupo controle. Apesar de não ter havido diferenças significativas entre os grupos tratados, observou-se um maior número deste conjunto de células nos animais tratados com muco da espécie *A. monochromatica monochromatica* alimentados com *Symphytum officinale* (confrei). O processo inflamatório é a reação local dos tecidos à agressão local. Provavelmente o muco atuou como agente hiperimizante desencadeando maior resposta inflamatória que as feridas dos animais do grupo controle.

Nesta pesquisa, observou-se tecido de granulação mais desenvolvido nas feridas dos animais tratados quando comparados ao grupo controle, em todos os dias de experimentação. O grupo que apresentou maior quantidade de tecido de granulação foi o tratado com muco da espécie *A. monochromatica monochromatica* alimentados com *Symphytum officinale* (confrei).

Em relação ao epitélio, este se manifestou de maneira similar em todos os grupos da pesquisa, iniciando-se mais espesso e sob a crosta nas margens da lesão e, ao final, cobrindo grande parte da mesma, porém com poucas camadas de células. Estes dados estão em acordo com os achados de MONTENEGRO & FRANCO (2003), que relatam o epitélio, em processos de reparo de lesões, crescendo das bordas para o centro e, ao se encontrarem após fechar a lesão, cessa de crescer.

A presença de fibroblastos, fibrinas e fibrilas colágenas, em todos os dias do experimento, mostrou-se variável, não apresentando diferenças entre os grupos tratados e grupo controle.

A presença de fibroblastos, em fases relativamente precoces de uma ferida, indica o início da produção de fibras colágenas e prossegue por vários dias, dependendo do processo reacional de cada animal testado. Notamos que o epitélio tratado era praticamente similar ao controle, porém um pouco mais espesso, apresentando papilas, folículos pilosos e inclusive glândulas. Assim como no controle, a região de regenerada apresentou-se um pouco mais elevada que o normal.

Conclusões - As feridas dos camundongos tratadas com muco de caracóis alimentados com ração base e com ração contendo *Symphytum officinale* (confrei), apresentaram melhor recuperação da ferida tanto clínica quanto histologicamente, quando comparados ao grupo controle. O muco de caracóis da espécie *A. monochromatica monochromatica* alimentados com *Symphytum officinale* foi o que melhor auxiliou no processo de reparo de feridas em camundongos da linhagem hairless, tanto clinicamente quanto histologicamente. A análise bioquímica evidenciou que o muco do caracol *A. monochromatica monochromatica* apresenta diferenças bastante significativas quando comparado ao muco da espécie *A. fulica*, principalmente para lipídios, proteínas e açúcares redutores.

Literatura Citada

GALO, G. **El caracol: cria y explotacion**. 2a. ed. Madrid: Ediciones Mundi-prensa. 1984. 179p.

GOMOT, A. Effets de métaux lourds sur le developement des escargots. Utilisation des escargots comme bio-indicateurs de pollution per les métaux lourds pour la preservation de la santé de l'homme. **Bulletin de l'Académie de Médecine**. v.181, n. 1, p. 59-75, 1997.

IGUCHI, S. M. M. AIKAWA, T. MATSUMOTO, I J. Antibacterial activity of snail mucus mucin. . **Comparative Biochemical Physiology**. v. 72A, n.3, p. 571-574, 1982.

MARTINS, MF.et al.; CAETANO, F.A.M.et al.; SÍRIO, O.J.et al.; YIOMASA, M.M.; MIZUSAKI, C.I.; FIGUEIREDO, L.D.; PACHECO, P. Avaliação macro e microscópica da cicatrização de lesões experimentalmente provocadas em pele de coelhos tratadas com secreção mucoglicoproteica do escargot *Achatina fulica*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. São Paulo, v.40, p.213-218, 2003. (Suplemento 3).

MONTENEGRO, M.R.; FRANCO, M. **Patologia**: processos gerais. 4.ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2003. 320 p.

POZETTI, G. L. **Medicamentos homeopáticos**: algumas monografias. Ribeirão Preto: Instituto François Lamasson, 1988. 100 p.

RUPPERT, E. E.; BARNES, R. D. **Zoologia dos invertebrados**. 6.ed. São Paulo: Roca, 1996. p. 332-352.

SIMKISS, K.; WILBUR, K.M. The molluscan epidermis and its secretions. **Symposia of the Zoological Society of London**. v. 39, p. 35-76, 1977.