

Avaliação de membrana bioativa enriquecida com extrato vegetal de *Stryphnodendron adstringens* para tratamento de feridas cutâneas

Evaluation of bioactive membrane enriched with plant extract of *Stryphnodendron adstringens* for treatment of skin wounds

Evaluación de membrana bioactiva enriquecida con extracto vegetal de *Stryphnodendron adstringens* para el tratamiento de heridas en la piel

Recebido: 21/03/2024 | Revisado: 31/03/2024 | Aceitado: 05/04/2024 | Publicado: 08/04/2024

Kátia de Cássia Costa

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0054-5567>
Universidade do Vale do Sapucaí, Brasil
E-mail: katiaccosta@hotmail.com

Caroline Sarkís Carneiro Abrahão

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3986-030X>
Universidade do Vale do Sapucaí, Brasil
E-mail: carolsarkis98@gmail.com

Túlio Custódio Reis

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1827-9102>
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Brasil
E-mail: tulio.reis@unesp.br

Rodrigo Machado Pereira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9525-043X>
Universidade do Vale do Sapucaí, Brasil
E-mail: rodrigom@univas.edu.br

Resumo

Este estudo buscou desenvolver e avaliar membranas de gelatina enriquecidas com extrato vegetal de barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) como biomaterial para cicatrização de feridas cirúrgicas. O extrato hidroetanólico de barbatimão foi obtido por maceração dinâmica. A concentração de fenóis totais foi quantificada e sua atividade antimicrobiana foi avaliada *in vitro* contra *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*. As membranas foram preparadas a base de gelatina em solução de ácido acético, glicerol e extrato de barbatimão. Foram confeccionadas membranas sem e com extrato em diferentes concentrações (200 mg e 800 mg), cortadas em discos de 12 mm de diâmetro e coradas com fluoresceína. Para experimentação foram utilizados ratos Wistar, separados em quatro grupos: I (controle), II (membrana sem extrato), III (200 mg) e IV (800 mg). Foi realizada ferida cirúrgica de 10 mm de diâmetro no dorso dos animais até o alcance da camada muscular. As feridas foram tratadas conforme o desenho experimental. A membrana sob o ferimento foi monitorada mediante a marcação com fluoresceína. A retração do diâmetro da ferida foi mensurada após 7, 14 e 21 dias de experimentação. O extrato de barbatimão apresentou rica concentração em compostos fenólicos e atividade contra *S. aureus*. A membrana apresentou consistência adaptável à superfície de lesões cutâneas, com adesão superior a 7 dias e inferior a 14 dias. Os resultados apontam que a membrana desenvolvida apresenta propriedades que favorecem a cicatrização de lesões cutâneas cirúrgicas mediante o índice de retração.

Palavras-chave: Cicatrização; Gelatina; Barbatimão; Procedimento curativo.

Abstract

This study aimed to develop and evaluate gelatin membranes enriched with barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) plant extract as a biomaterial for surgical wound healing. The hydroethanolic extract of barbatimão was obtained through dynamic maceration. The concentration of total phenols was quantified, and its antimicrobial activity was evaluated *in vitro* against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes*. The membranes were prepared based on gelatin in acetic acid solution, glycerol, and barbatimão extract. Membranes were made without extract and with extract at different concentrations (200 mg and 800 mg), cut into 12 mm diameter discs, and stained with fluorescein. Wistar rats were used for experimentation, divided into four groups: I (control), II (membrane without extract), III (200 mg), and IV (800 mg). A 10mm diameter surgical wound was made on the animals' backs until reaching the muscular layer. The wounds were treated according to the experimental design. The membrane over the wound was monitored by fluorescein marking. The wound diameter reduction was measured after 7, 14, and 21 days of experimentation. Barbatimão extract showed a rich concentration of phenolic compounds and activity against *S. aureus*. The membrane exhibited adaptability to the surface of cutaneous lesions, with adhesion exceeding 7 days and less than 14 days. The

results indicate that the developed membrane possesses properties that promote the healing of surgical cutaneous lesions through the retraction index.

Keywords: Healing; Gelatin; Barbatimão; Curative procedure.

Resumen

Este estudio tuvo como objetivo desarrollar y evaluar membranas de gelatina enriquecidas con extracto vegetal de barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) como biomaterial para la cicatrización de heridas quirúrgicas. El extracto hidroetanólico de barbatimão se obtuvo mediante maceración dinámica. Se cuantificó la concentración de fenoles totales y se evaluó su actividad antimicrobiana *in vitro* contra *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*. Las membranas se prepararon a base de gelatina en solución de ácido acético, glicerol y extracto de barbatimão. Se confeccionaron membranas sin extracto y con extracto en diferentes concentraciones (200 mg y 800 mg), se cortaron en discos de 12 mm de diámetro y se tiñeron con fluoresceína. Para la experimentación se utilizaron ratas Wistar, divididas en cuatro grupos: I (control), II (membrana sin extracto), III (200 mg) y IV (800 mg). Se realizó una herida quirúrgica de 10 mm de diámetro en el dorso de los animales hasta alcanzar la capa muscular. Las heridas fueron tratadas según el diseño experimental. La membrana sobre la herida se monitorizó mediante marcaje con fluoresceína. La retracción del diámetro de la herida se midió después de 7, 14 y 21 días de experimentación. El extracto de barbatimão mostró una rica concentración de compuestos fenólicos y actividad contra *S. aureus*. La membrana mostró adaptabilidad a la superficie de lesiones cutáneas, con una adherencia superior a 7 días e inferior a 14 días. Los resultados indican que la membrana desarrollada posee propiedades que favorecen la cicatrización de lesiones cutáneas quirúrgicas mediante el índice de retracción.

Palabras clave: Curación; Gelatina; Barbatimao; Procedimiento curativo.

1. Introdução

A pele desempenha uma variedade de funções vitais, incluindo servir como uma barreira contra a dissecação, regular a temperatura corporal e proteger contra a invasão de patógenos. Quando danificada, essas funções podem ser comprometidas. Por essa razão, foram desenvolvidos diversos tipos de curativos para auxiliar no processo de cicatrização. Esses curativos atuam como uma barreira protetora, impedindo a contaminação bacteriana e absorvendo fluidos exsudativos. Podem consistir em um único produto ou combinar vários princípios ativos (Vowden & Vowden, 2017).

Polímeros biocompatíveis e biodegradáveis são frequentemente utilizados como base para curativos. No entanto, para serem adequados para uso em feridas, é essencial que sejam flexíveis, duráveis, permeáveis ao vapor de água e capazes de aderir à matriz tecidual. Além disso, devem criar um ambiente úmido e proteger a ferida contra infecções. Curativos que liberam agentes na área afetada podem ser uma estratégia eficaz para controlar a inflamação, prevenir infecções e promover a regeneração tecidual (Nascimento et al., 2020).

A gelatina, uma forma hidrolisada de colágeno, é altamente compatível com os tecidos humanos, devido à sua semelhança com a matriz extracelular. Suas propriedades permitem a formação de uma membrana biodegradável que pode ser naturalmente absorvida (Nascimento et al., 2020).

Membranas que contêm moléculas bioativas, como antioxidantes e anti-inflamatórios, têm sido eficazes na redução do tempo de cicatrização. A incorporação de produtos naturais nessas membranas tem se mostrado promissora tanto na redução da inflamação local quanto na melhoria do processo de cicatrização (Naomi et al., 2021). Estudos demonstraram que feridas tratadas com membranas contendo extratos vegetais apresentaram uma reação de granulação favorável, estimulando a produção e migração de fibroblastos e a reepitelização (Basílio, 2018).

O barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*), uma espécie da família Fabaceae, contém princípios ativos comprovadamente cicatrizantes. Pesquisas mostraram seu uso bem-sucedido no tratamento de feridas em pacientes com pé diabético (Ribeiro et al., 2018).

Considerando as excelentes propriedades do colágeno hidrolisado como biomaterial e a atividade cicatrizante do barbatimão, este estudo teve como objetivo principal desenvolver membranas de gelatina contendo diferentes concentrações do extrato de *S. adstringens* para o tratamento de feridas cirúrgicas. Para tanto, o extrato foi elaborado e caracterizado quanto ao teor de compostos fenólicos e atividade antimicrobiana. O potencial cicatrizante das membranas foi analisado em modelo de

experimentação animal.

2. Metodologia

2.1 Obtenção do material vegetal e preparação do extrato

As cascas, ramos, folhas e frutos de barbatimão (*S. adstringens*) foram coletados na zona rural de Santa Rita do Sapucaí - MG (22°17'8.082"S, 45°48'18.174"O) no mês de novembro de 2021. As amostras foram transportadas ao Laboratório de Botânica e Fitoterapia da Universidade do Vale do Sapucaí (Univás, Pouso Alegre, Minas Gerais). O espécime foi identificado com base em critérios anatômicos. Uma exsicata foi depositada com o número de tombo UNIVAS-007 no herbário UNIVAS. As cascas de *S. adstringens* previamente secas em estufa a 55 °C por 5 dias foram trituradas em moinho de facas para obtenção de um material em pó fino e uniforme.

A solução extrativa foi obtida através da técnica de extração sólido-líquido por agitação (maceração dinâmica). Foi utilizado 300mL de etanol a 70% e 15g de amostra vegetal. A mistura foi submetida a agitação mecânica (40 rpm) por 48h em temperatura ambiente (Figura 1). O extrato obtido foi filtrado em papel-filtro e o solvente eliminado em estufa a 55 °C. Após eliminação do solvente, o extrato seco resultante foi armazenado em frascos âmbar (Brandão, 2007).

Figura 1 - Preparação do extrato de *S. adstringens*. À esquerda, o processo de moagem das cascas secas. À direita, agitação mecânica da mistura.



Fonte: Autores (2024).

2.2 Quantificação dos fenóis presentes no extrato

A determinação do teor de fenóis totais presentes no extrato da *S. adstringens* foi baseada no método clássico de Folin e Ciocalteu (1927). Para o preparo da solução estoque padrão, 100 mg de ácido gálico foram pesadas em balança analítica e adicionados à um balão volumétrico de 100 mL, cujo volume foi completado com água destilada. A solução foi homogeneizada e armazenada em frasco âmbar sob refrigeração. A solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3) foi preparada usando 50 g de Na_2CO_3 e 100 mL de água destilada. A solução foi aquecida a 60 °C em micro-ondas para total solubilização, resfriada em temperatura ambiente, e então, o volume foi completado com água destilada para 250 mL em balão volumétrico (concentração

final de 20% m/v). A solução foi armazenada em refrigerador.

Para a curva padrão de ácido gálico foram utilizados setes balões volumétricos de 100 mL com 50 mL de água destilada. Foi transferida uma alíquota diferente da solução estoque do fenol (ácido gálico a 1 mg/mL) para cada balão, formando uma curva de concentração (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 μ L). A preparação das amostras foi realizada em triplicata, foram utilizados três balões volumétricos de 100mL com 50mL de água destilada. Foi transferida alíquotas de 100 μ L de extrato para cada balão.

Cada balão volumétrico preparado (curva e amostra) recebeu uma alíquota de 8 mL do reagente de Folin-Ciocalteu e foi agitado por alguns segundos para homogeneização da solução. No intervalo de 1 a 8 minutos foi acrescido 12 mL da solução de carbonato de sódio a 20%, e em seguida deixou-se reagir em ambiente controlado de luz por 2 horas. Decorrido o tempo, foi acertado o volume dos balões com água destilada até o menisco (100 mL) e agitado por alguns segundos.

As amostras e curvas foram analisadas via espectrofotometria (Espectrofotômetro BEL® modelo UV-M51) a λ de 760 nm. Foram realizadas 3 leituras para cada amostra/curva. Os valores obtidos foram planilhados no Excel para o cálculo da curva-padrão pelo método dos mínimos quadrados, viabilizando a determinação da concentração dos fenóis totais presentes nas soluções. Os resultados foram expressos em microgramas equivalentes de ácido gálico por grama de extrato vegetal (μ g EAG/g).

2.3 Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato pelo método de disco-difusão

Avaliou-se a atividade antimicrobiana do extrato de *S. adstringens*. frente as cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538 e ATCC 25923) e *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615) pelo método de disco-difusão. As cepas bacterianas foram reativadas em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*). Os inóculos bacterianos foram padronizados a 0,5 na escala de Macfarland por espectrofotometria, equivalente a concentração celular de 1,5x10⁸ UFC/mL. Inoculou-se 200 μ L das suspensões bacterianas em meio MHA (*Mueller Hinton Agar*). Previamente, discos brancos estéreis foram impregnados com 10 μ L do extrato na concentração de 100 mg/mL, após completa evaporação do solvente estes foram inseridos na superfície dos inóculos. Para o controle positivo, foram utilizados os antibióticos amoxicilina associado ao ácido clavulânico (Amox., 30 μ g) e a eritromicina (Eri., 10 μ g). As placas foram incubadas a 35°C por 24 horas. Posteriormente, foram medidos os diâmetros dos halos formados ao redor dos discos para determinação da atividade inibitória do extrato sobre as cepas bacterianas testadas.

2.4 Confeção das membranas

A técnica de preparação das membranas de gelatina foi adaptada do método utilizado por Nascimento et al. (2020). O processo consistiu na solubilização de 5g de gelatina PA (Para Análise) em 100 mL de solução de ácido acético a 0,5 M através de agitação manual e aquecimento a 65°C em micro-ondas. Posteriormente, foi adicionado 3,5mL de glicerol e extrato de *S. adstringens* dissolvido em 10 mL de álcool etílico 70%. A mistura foi submetida a aquecimento e agitação até a solubilização total dos componentes empregados. Foram confeccionadas membranas sem extrato e membranas com diferentes concentrações de extrato de barbatimão (200 e 800 mg/100mL) (Figura 2). As misturas gelatinosas foram vertidas em placas de Petri para polimerização em temperatura ambiente. Após 24 horas, foram colocadas em refrigerador por 5 dias para remoção do excesso de umidade.

Figura 2 – Preparação das membranas de gelatina sem e com o extrato de barbatimão. À esquerda, a mistura dos constituintes, e à direita, a polimerização em placas de Petri.



Fonte: Autores (2024).

2.5 Teste de intumescimento da membrana

Para o teste de intumescimento foram utilizadas cinco membranas sem extrato e cinco membranas com extrato de *S. adstringens*, com aproximadamente mesma massa, previamente pesadas. Foi utilizada a metodologia proposta por Mohamed et al. (2011), em que as pesagens das membranas imersas foram realizadas após a remoção do excesso de solução aprisionada na malha. As membranas foram imersas em água destilada e retiradas em intervalos de tempo pré-determinados (15min, 30min, 45min e 60min) para pesagem (Figura 3). O fluido acumulado na superfície foi removido com auxílio de papel de filtro antes de cada pesagem. O grau de intumescimento (GI) das membranas foi calculado conforme a equação $[GI (\%) = 100 * (MI - MS) / MS]$, onde, MI é a massa da membrana intumescida em cada intervalo de tempo, e MS é a massa seca antes do intumescimento.

Figura 3 – Teste de intumescimento das membranas com e sem extrato de *S. adstringens*.

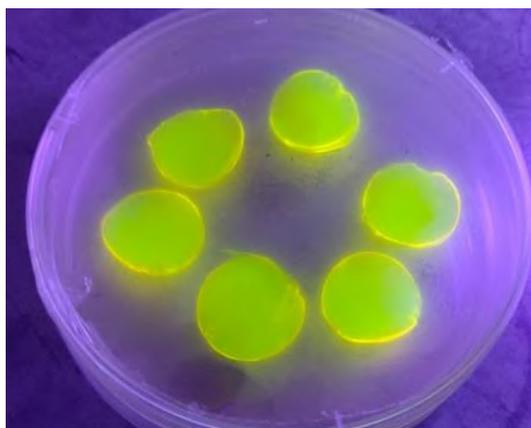


Fonte: Autores (2024).

2.6 Esterilização e coloração das membranas

Para esterilização, as placas com membranas foram submetidas a banhos de radiação ultravioleta por 15 minutos em ambiente asséptico de fluxo laminar antes e após o processo de polimerização e desumidificação. Posteriormente, as membranas foram cortadas em discos de 12 mm de diâmetro e coradas com 100 μ L de fluoresceína a 2% (solução aquosa) (Figura 4). Ao final do processo as membranas foram novamente esterilizadas sob luz ultravioleta.

Figura 4 - Membrana com extrato cortada em discos de 12 mm de diâmetro e coradas com fluoresceína.



Fonte: Autores (2024).

2.7 Avaliação da atividade sobre a cicatrização de feridas

O ensaio de cicatrização de feridas foi adaptado a partir do método utilizado por Nascimento et al. (2020). Para avaliação do efeito da membrana sobre o processo de cicatrização foram utilizados 20 ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus*), adultos com idade e peso aproximado de 120 dias e 300 gramas, respectivamente. Os animais foram separados aleatoriamente em quatro grupos de cinco indivíduos: Grupo I - animais com ferida sem membrana; Grupo II - animais com ferida coberta com membrana sem extrato; Grupo III - animais com ferida coberta por membrana com extrato de *S. adstringens* em concentração 200 mg/100 mL; Grupo IV – animais com ferida coberta por membrana com extrato de *S. adstringens* em concentração 800 mg/100 mL.

Para confecção das feridas, os animais foram anestesiados com dose de 0,3 mL/0,1 Kg da associação anestésica de Ketamina (50mg) e Xilazina 2% (20mg) por via intramuscular. Após a perda postural do animal pela anestesia, uma área quadrangular de 4 x 4 cm do dorso do animal foi depilada manualmente. A área foi limpa com solução salina a 0,9% e desinfetada por assepsia com clorexidina alcoólica a 0,5%. Realizou-se uma ferida cirúrgica circular de 10 mm de diâmetro no local com auxílio de *punch* de aço inoxidável. A profundidade da incisão foi até o alcance da camada muscular abaixo da hipoderme, com a retirada do panículo carnoso superior (Figura 5).

Figura 5 – Confecção de ferida dorsal para experimentação. À esquerda, depilação de área dorsal, e à direita, elaboração da ferida cutânea.



Fonte: Autores (2024).

Após a confecção das feridas, os animais foram tratados conforme o desenho experimental. Os animais do grupo I não receberam curativo e tiveram suas feridas mantidas abertas. Os indivíduos do grupo II receberam membranas sem o extrato

vegetal (0 mg). Do grupo III, receberam membranas com menor concentração de extrato de *S. adstringens* (200 mg). No grupo IV, os animais foram tratados utilizando membranas com maior concentração extrato de *S. adstringens* (800 mg). Após o procedimento, todos receberam injeção subcutânea de dipirona (500 mg) e foram alocados individualmente em gaiolas.

A presença da membrana sobre o ferimento foi monitorada mediante a marcação com fluoresceína, que possibilitou sua detecção sob luz UV. Para avaliação da retração das feridas, o diâmetro de cada lesão foi mensurado após 7, 14 e 21 dias de experimentação com auxílio de um paquímetro após a desbridamento da ferida com gaze e soro fisiológico. Com 7 dias, as membranas foram substituídas por outras de mesma concentração de extrato.

A área da ferida foi calculada pela fórmula $[A = \pi \cdot r^2]$. O índice de retração foi obtido pela razão da diferença entre a área final (A_f) e inicial (A_i) da lesão pela própria área inicial: $[\%R = (A_i - A_f) / A_i \cdot 100]$. Os dados foram avaliados estatisticamente para determinação da diferença entre os grupos e avaliação do efeito das membranas sobre o processo de cicatrização.

Com os dados tabulados no Microsoft Excel 365 e submetidos à análise estatística, as variáveis quantitativas foram classificadas através de medidas de tendência central e para variáveis categóricas, frequência absoluta e relativa. A análise dos dados foi feita com os programas Minitab (Minitab Inc., State College, PA, USA, versão 19.1) e SPSS (Statistical Package for the Social Sciences Inc., Chicago, USA, versão 26.0). O nível de significância utilizado como critério de aceitação ou rejeição nos testes estatísticos é de 5% ($p < 0,05$). Os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão quando variáveis em distribuição normal. Os testes *t-student* e Anova foram utilizados para as comparações estatística das variáveis paramétricas.

3. Resultados e Discussão

3.1 Concentração de fenóis presentes no extrato

O teor de compostos fenólicos do extrato de *S. adstringens* foi obtido pelo método de Folin-Ciocalteu. Através da curva padrão do ácido gálico, foi possível obter um gráfico linear e extrair a equação da reta. Os valores de transmitância das amostras do extrato foram convertidos em concentração de compostos fenólicos totais, através da equação da curva analítica $[C = 57974 \cdot T - 0,1748]$, onde C (concentração) e T (transmitância). Para tanto, a média da leitura das absorbâncias das amostras do extrato de barbatimão foram substituídas na equação, sendo obtido os valores de 7,814 $\mu\text{g/mL}$, 7,843 $\mu\text{g/mL}$, e 7,761 $\mu\text{g/mL}$, para as amostras A, B, e C, respectivamente. Portanto, observa-se que o extrato avaliado apresentou alta concentração fenólica.

A planta *S. adstringens* constitui-se uma valiosa fonte de moléculas bioativas com grande aplicabilidade, seus órgãos são ricos em compostos fenólicos, havendo predominância de compostos tânicos hidrolisáveis em suas cascas e flavonoides e taninos condensáveis em suas folhas e ramos jovens (Lima et al, 2006).

Os flavonoides estão relacionados a uma grande variedade de atividades biológicas, como ação antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral, antialérgica, antiviral e outras (Flambó, 2013). A aplicação dos taninos está relacionada, principalmente, com suas propriedades adstringentes, resultado de sua capacidade de se complexarem a proteínas. Por via externa, os taninos impermeabilizam as camadas mais expostas da pele e mucosas, protegendo assim as subjacentes. Em feridas cutâneas, os taninos formam uma camada protetora sobre os tecidos lesionados que permite o processo de reparo. Ao precipitar proteínas, os taninos também propiciam um efeito antimicrobiano e antifúngico (Monteiro, et al. 2005).

3.2 Atividade antimicrobiana do extrato

Neste estudo, o extrato hidroetanólico da casca de *S. adstringens* apresentou satisfatória atividade inibitória frente a cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (Figura 6), assim como no trabalho de Fernandes (2020) e Pinho et al. (2012). Segundo Pinho (2012), os extratos obtidos da *S. adstringens* contém metabólitos secundários com potencial antimicrobiano, capaz de inibir o crescimento de cepas de *S. aureus*.

Figura 6 - Placa MHA inoculada com *S. aureus* ATCC 6538. Presença de alo inibitório ao redor do disco-difusão com extrato *S. adstringens*.



Fonte: Autores (2024).

De acordo com Costa et al. (2011), os polifenóis (ácidos fenólicos, cumarinas, taninos, flavonoides etc.) além de atuarem como captadores de radicais oxidantes, agem como agentes antimicrobianos ao se complexarem com polissacarídeos e peptídeos. Para o ensaio microbiano, o extrato não apresentou atividade inibitória frente *Streptococcus pyogenes* (Tabela 1).

Tabela 1 – Atividade antimicrobiana do extrato hidroetanólico de *S. adstringens* e controles sobre as cepas testadas.

Cepa bacteriana	Extrato de <i>S. adstringens</i>	Eritromicina	Amoxicilina + Ácido Clavulânico
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	11,16 ± 0,763 mm	17,6 ± 1,892 mm	25,33 ± 2,020 mm
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	12,66 ± 0,577 mm	22 ± 2,020 mm	29,83 ± 1,607 mm
<i>S. pyogenes</i> ATCC 19615	0,0mm	6,0 ± 5,196 mm	28,6 ± 0,577 mm

Fonte: Autores (2024).

3.3 Propriedades mecânicas da membrana

As propriedades mecânicas são amplamente reconhecidas como parâmetros críticos na análise de membranas, pois exercem influência direta em sua utilidade. Isso se deve ao fato de que tais características definem o comportamento das membranas diante das forças mecânicas externas, desempenhando um papel fundamental em sua eficácia e desempenho. A identificação quanto à adequação de uso de uma membrana é determinada pelas características de flexibilidade, resistência à tração e alongamento adequados (Alves, 2018).

A partir dos procedimentos adotados para a preparação da membrana de gelatina-glicerol foi possível a obtenção de um material com consistência semissólida e flexível, de modo que possa ser adaptável à superfície de lesões cutâneas. As mesmas características foram observadas nas membranas preparadas sem o extrato de barbatimão, quanto aquelas que receberam diferentes quantidades do extrato vegetal (200mg e 800mg) (Figura 7).

Figura 7 - Membranas com propriedades mecânicas (flexibilidade e resistências) ideais para adaptação na superfície de lesões cutâneas. À esquerda, membrana com extrato de *S. adstringens*, e à direita, membrana sem extrato.



Fonte: Autores (2024).

3.4 Capacidade de intumescimento da membrana

O intumescimento é descrito como o aumento do volume do polímero quando imerso em um determinado solvente, ou também pode ser determinado a partir da quantidade da massa do fluido absorvida pelo polímero em relação à sua massa inicial (Campos et al., 2005).

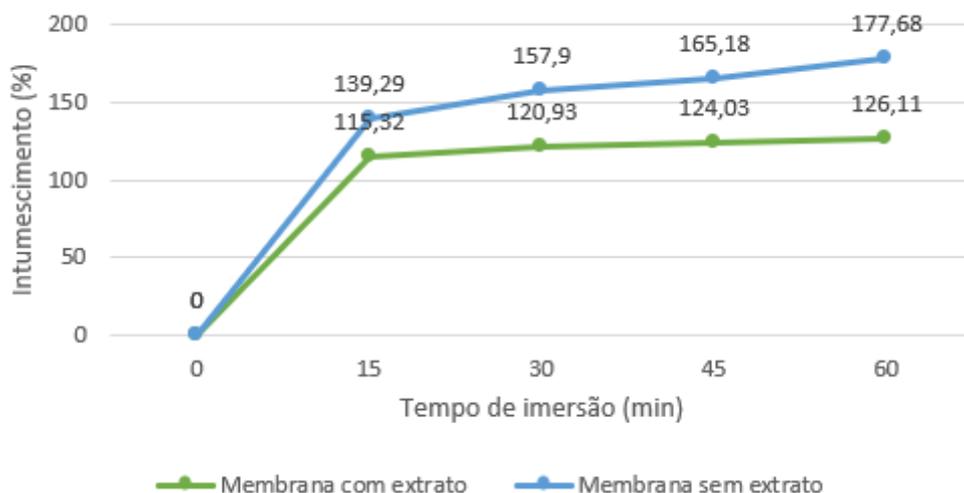
O teste de intumescimento é importante para verificar se o material utilizado apresenta estabilidade estrutural durante o período necessário à formação do novo tecido de regeneração. A capacidade de intumescimento é uma importante característica de materiais para serem aplicados em regeneração cutânea devido a capacidade de absorver o exsudato produzido pelo ferimento e manter o local úmido (Alves, 2018). Contudo, elevadas taxas de absorção podem trazer consequências indesejáveis, uma vez que podem ocasionar a redução da estabilidade estrutural do polímero, além da acelerada degradação e ataque de microorganismos indesejáveis (Santos et al., 2018).

O intumescimento em polímeros depende relativamente da difusão do penetrante e equilíbrio da matriz polimérica. A adsorção física do penetrante sobre a superfície satura as moléculas sujeitas à migração para a matriz, associando-se aos grupos polares intermoleculares. Essa associação leva à solvatação dos grupos iônicos que enfraquece as ligações de hidrogênio, o que provoca uma expansão entre as cadeias e os espaços na matriz, que favorecem a infiltração de água e demais moléculas movidas por forças polares associadas a mecanismos de capilaridade (Assis, 2010).

No Gráfico 1, observa-se que as membranas com extrato de *S.adstringens* apresentaram um intumescimento de 126,11% após 1 hora de imersão em água destilada, ao passo que as membranas sem extrato apresentaram grau de intumescimento de 177,68% após o mesmo período. Percebeu-se ainda, que as membranas intumesceram por 1 hora sem apresentar degradação ou perda de massa para a solução.

De acordo com Assis e Albertini (2009) o baixo índice de intumescimento das membranas com extrato promove uma umidade em longo prazo e diminui o risco de ruptura dessas membranas. Quando utilizadas como coberturas de feridas, considera-se essa condição favorável ao microambiente da ferida.

Gráfico 1 - Médias de intumescimento das membranas com extrato e sem extrato (15min-60min).

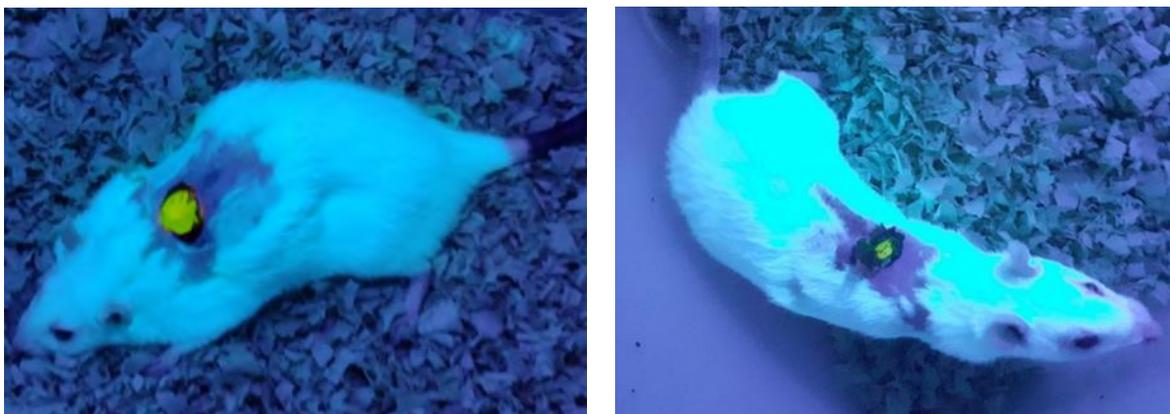


Fonte: Autores (2024).

3.5 Adesão das membranas sobre as feridas

Durante a experimentação animal, a adesão da membrana sobre as feridas foi acompanhada mediante a marcação com fluoresceína (Figura 8). Após a primeira semana, ainda foi possível observar a presença da membrana nas feridas, embora estivesse envolta por material biológico próprio da ferida. Antes do procedimento de desbridamento, a membrana foi evidenciada pois ainda apresentava características de fluorescência. Ao final da segunda semana, as membranas não foram observadas nos animais, pois o processo de cicatrização já estava evoluído.

Figura 8 - Membrana com extrato com boa adesão a ferida cirúrgica de animal do grupo III ao 4º dia, e do grupo IV ao 10º dia de experimentação, respectivamente.



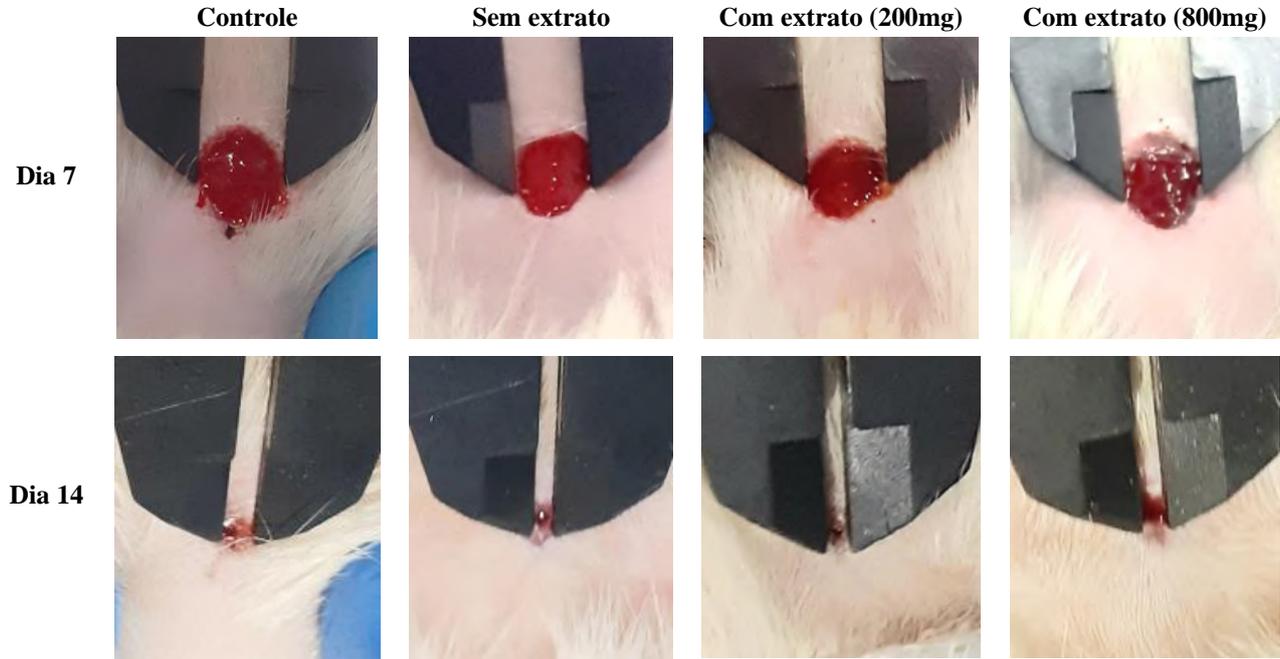
Fonte: Autores (2024).

3.6 Avaliação do índice de retração da ferida

Diversos estudos têm demonstrado que um dos principais parâmetros para se analisar a celeridade e a qualidade do processo cicatricial é o índice de retração da ferida (Albuquerque-Júnior et al., 2009; Almeida et al., 2018; Alves, 2018).

Ao final das três semanas de experimentação, todos os animais apresentaram cicatrização completa. Como resultado, o diâmetro das lesões foi medido apenas após a primeira e segunda semana. Para fins de análise quantitativa, foi atribuído um valor de zero para o diâmetro de todas as lesões após 21 dias. Visualmente, notou-se que os animais do grupo controle (sem membrana) apresentaram uma retração menor, embora não tenha sido observada nenhuma diferença evidente entre as diferentes membranas (Figura 9).

Figura 9 - Fotografias dos aspectos das feridas dérmicas durante a debridação e substituição de membrana de mesma concentração para avaliação do índice de retração dos grupos: Grupo I - Controle (indivíduo 1); Grupo II – Membrana sem extrato (indivíduo 2); Grupo III – Membrana com extrato (200mg) (indivíduo 2), Grupo IV – Membrana com extrato (800mg) (indivíduo 3), nos tempos de 7 e 14 dias de confecção da ferida.



Fonte: Autores (2022).

Após a análise estatística, foi constatado que, após 7 dias, a média do índice de retração das feridas é estatisticamente equivalente entre os grupos (Tabela 2). No entanto, após 14 dias, observou-se uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo I (controle) e o grupo II (membrana sem extrato) ($p=0,006$), bem como entre o grupo I e o grupo IV (800mg) ($p=0,008$). Não foram identificadas diferenças entre os grupos I e III (200 mg) ($p=0,079$).

Tabela 2 - Retração das feridas cirúrgicas dos grupos durante o período experimental (valores de média e desvio médio).

Grupos	Diâmetro da ferida (mm)				Índice de retração (%)
	0 dias	7 dias	14 dias	21 dias	14 dias
I - Controle	10,8 ± 0,64	7 ± 1,2	2,77 ± 0,37	-	93,4 ± 1,22
II - Membrana sem extrato	11,6 ± 0,48	6,8 ± 0,32	1,86 ± 0,52*	-	97,2 ± 1,54*
III - Membrana com extrato (200mg)	11,2 ± 0,32	6,4 ± 0,48	2,09 ± 0,73	-	96 ± 2,7
IV - Membrana com extrato (800mg)	11 ± 0,4	6,8 ± 0,96	1,87 ± 0,46*	-	96,9 ± 1,2*
Probabilidade de significância (valor-p)	p>0,05	p>0,05	p<0,05	-	p<0,05

Fonte: Autores (2022).

Estes resultados sugerem que a membrana de gelatina com e sem extrato de barbatimão podem apresentar potencial na cicatrização de feridas. Desta forma, os achados corroboram que a gelatina apresenta potencial como biomaterial para o desenvolvimento de novos curativos (Naomi et al., 2021). Os efeitos de maior cicatrização evidenciados nos animais tratados com a membrana com maior concentração de extrato (800mg) também aponta o evidente potencial cicatrizante do barbatimão, especialmente pela rica composição em taninos (Nascimento et al., 2021). Este modelo adere a outros estudos que avaliaram a

aplicação de curativos de gelatina associados a compostos bioativos de plantas com potencial cicatrizante (Gaspar-Pintilieșcu et al., 2019).

4. Considerações Finais

Os resultados obtidos por meio deste estudo apontam que a membrana desenvolvida a partir de gelatina e glicerol apresenta propriedades que favorecem a cicatrização de lesões cutâneas cirúrgicas, e, portanto, é um produto de caráter inovador. O extrato de barbatimão indicou a presença de compostos fenólicos de atividade antimicrobiana frente a cepa de *S. aureus*. A adição do extrato de barbatimão não alterou as propriedades mecânicas (flexibilidade e resistência) da membrana de gelatina e glicerol, mas reduziu o grau de intumescimento da membrana, concedendo uma característica importante no que versa a diminuir a proliferação de microrganismos indesejáveis na área da lesão.

Os resultados desta pesquisa sugerem que a membrana elaborada a partir de gelatina e glicerol apresenta propriedades vantajosas para facilitar a cicatrização de feridas cirúrgicas na pele. Quanto à inclusão do extrato de barbatimão, os resultados indicam uma leve melhora no processo de cicatrização, embora não sejam conclusivos. Portanto, são necessários mais estudos experimentais para elucidar completamente o potencial cicatrizante da membrana enriquecida com o extrato de barbatimão, considerando que esta planta medicinal demonstrou ter um efeito comprovado nesse aspecto.

Novos estudos podem ser realizados a fim de avaliar o efeito de membranas com concentrações diferentes de extrato das quais foram aqui testadas. Também é interessante observar experimentalmente o efeito da membrana bioativa enriquecida com extrato de barbatimão sobre feridas de dimensões maiores e outras lesões. A atividade antimicrobiana do extrato demonstrada nesta pesquisa aponta para o potencial da membrana na inibição do crescimento de microrganismos, e portanto, seu efeito sobre a evolução de feridas experimentalmente infectadas deve ser investigado.

Agradecimentos

Este estudo foi realizado com recursos oriundos da Universidade do Vale do Sapucaí (Univás, Pouso Alegre, Minas Gerais) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

Referências

- Albuquerque-Júnior, R. L. C. D., Barreto, A. L. S., Pires, J. A., Reis, F. P., Lima, S. O., Ribeiro, M. A. G., Cardoso & J. C. (2009). Effect of bovine type-I collagen-based films containing red propolis on dermal wound healing in rodent model. *Int J Morphol*, 27(4), 1105-1110. <https://www.scielo.cl/pdf/ijmorphol/v27n4/art25.pdf>
- Almeida, W. A., Ferreira, A. M., Ivo, M. L., Rigotti, M.A. & Barcelos, L.S. (2018). Factors associated with quality of life of people with chronic complex wounds. *Rev Fund Care Online*, 10 (1), 9-16. <http://dx.doi.org/10.9789/2175-5361.2018.v10i1.9-16>
- Alves, M. C. M. A. (2018). *Efeito cicatrizante de membranas contendo extratos de Stryphnodendron adstringens e Abarema cochliacarpus em feridas abertas em modelo animal*. Dissertação (Doutorado em Saúde e Ambiente). Universidade Tiradentes, Aracaju, Brasil
- Assis, O. B. G. & Albertini, L. L. (2009). Water Sorption of Chitosan films: Preliminary Study for Protective Coatings on Sliced Fruits, in: Proceedings of the 4th ISNAPOL (Natural Polymers and Composites IV). p 390.
- Assis, O. B. G. (2010). Alteração do caráter hidrofílico de filmes de quitosana por tratamento de plasma de HMDS. *Química Nova*, 33 (3), 603-606.
- Basílio, J. A. D. (2018). *Desenvolvimento e avaliação in vitro da atividade cicatrizante de membranas poliméricas incorporadas com própolis vermelha*. Dissertação (Doutorado em Biotecnologia). Universidade Federal de Alagoas, Maceió, Brasil.
- Brandão, M. G. L. (2007). Produção de chás e extratos de plantas medicinais. Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas. Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais (CETEC).
- Campos, S. D., Campos, E. A., Silveira, C. B. & Bini, R. A. (2005). Biomaterials based on Na₂O-CaO-SiO₂-P₂O₅, prepared with sawdust or corn glucose: effects on porosity and crystallinity. *Ceramic*, 51(1), 274-279. <https://doi.org/10.1590/S0366-69132005000300016>
- Costa, J. P. R., Almeida, A. C. D., Martins, E. R., Rodrigues, M. N., Santos, C. A. D. & Menezes, I. R. (2011). Atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim-pimenta e do extrato bruto seco do barbatimão diante de bactérias isoladas do leite. *Biotemas*, 24(4), 1-6. <https://doi.org/10.5007/2175-7925.2011v24n4p1>

- Fernandes, W. R. (2020). *Avaliação da atividade antimicrobiana da planta Stryphnodendron adstringens (barbatimão)*. Monografia (Graduação - Farmácia), Centro Universitário Uniguairaca, Guarapuava, Brasil.
- Flambó, D. F. A. L. P. (2013). *Atividades biológicas dos flavonoides: atividade antimicrobiana*. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde), Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, Portugal.
- Folin, O., & Ciocalteu, V. (1927). On tyrosine and tryptophane determination in proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 27, 239–343.
- Gaspar-Pintilieșcu, A., Stanciuc, A. M., & Craciunescu, O. (2019). Natural composite dressings based on collagen, gelatin and plant bioactive compounds for wound healing: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 138, 854-865.
- Lima, R. J. C., Moreno, A. J. D. D., De Castro, S. L. F., Gonçalves, J. D. R. S., De Oliveira, A. B., Sasaki, J. M. & Freire, P. D. T. C. (2006). Taninos hidrolisáveis em *Bixa orellana* L. *Quim Nova*, 29 (3), 507-509. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000300019>
- Naomi, R., Bahari, H., Ridzuan, P. M. & Othman, F. (2021). Natural-Based Biomaterial for Skin Wound Healing (Gelatin vs. Collagen): Expert Review. *Polymers*, 13, 2319. <https://doi.org/10.3390/polym13142319>
- Nascimento, M. F., Cardoso, J. C., Santos, S. S., Tavares, L. A., Pashirova, T. N., Severino, P., Souto, E. B. & Albuquerque-Junior, R. L. C. (2020). Development and Characterization of Biointeractive Gelatin Wound Dressing Based on Extract of *Punica granatum* Linn. *Pharmaceutics*, 12 (12), 1204. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12121204>
- Nascimento, I. J. R., Jesus, H. S., & Oliveira Alvim, H. G. (2021). Uso dos taninos provenientes do barbatimão para cicatrização de ferimentos. *Revista JRG de Estudos Acadêmicos*, 4(8), 201-212.
- Monteiro, J. M. et al (2005). Taninos: uma abordagem da química a ecologia. *Química Nova*, 28 (5), 892-893.
- Mohamed, M. I., Haider, M. & Ali, M. A. M. (2011). Buccal mucoadhesive films containing antihypertensive drug: invitro/in vivo evaluation. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 3(6), 665-668.
- Pinho L., Souza P. N. S., Sobrinho E. M., Almeida A.C. & Martins E.R. (2012). Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos das folhas de alecrim-pimenta, aroeira, barbatimão, erva baleeira e do farelo da casca de pequi. *Ciê n Rural*, 42 (12), 326-31.
- Ribeiro, C. R. G. (2018). *Efeito do Stryphnodendron adstringens na cicatrização de feridas complexas de pessoas com pé diabético*. Dissertação (Mestrado em Enfermagem). Universidade Federal de Alfenas, Brasil.
- Santos, A. R. S. et al. (2018) Avaliação toxicológica frente as larvas da *Artemia salina* Leach do 1,2:3,4-di-O-isopropilideno-alfa-D-galactopiranosose. *Educação, Ciência e Saúde*, 5 (5), 1-14.
- Vowden, K. & Vowden, P. (2017). Wound dressings: principles and practice. *Bradford*, 35 (9), 489-494.