

SUMARA MARQUES BARRAL

**O USO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE BARBATIMÃO ASSOCIADO
AO FILME DE QUITOSANA PARA A CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS
CUTÂNEAS COMPLEXAS EM RATAS.**

Belo Horizonte

2014

SUMARA MARQUES BARRAL

**O USO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE BARBATIMÃO ASSOCIADO
AO FILME DE QUITOSANA PARA A CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS
CUTÂNEAS COMPLEXAS EM RATAS.**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutora em Medicina.

Linha de Pesquisa: Fatores Intervenientes na Cicatrização Tecidual

Área de Concentração: Cicatrização

Orientador: Dra. Ivana Duval Araujo

Co-orientadora: Dra. Paula Vieira Teixeira Vidigal

Faculdade de Medicina

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS – UFMG

REITORIA

Reitor: Prof. Dr. Clélio Campolina Diniz

Vice-Reitora: Prof^a. Dra. Rocksane de Carvalho Norton

Pró-Reitor de Pós-Graduação: Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez

Pró-Reitor de Pesquisa: Prof. Dr. Renato de Lima Santos

FACULDADE DE MEDICINA

Diretor: Prof. Dr. Francisco José Penna

Vice-Diretor: Prof. Dr. Tarcizo Afonso Nunes

Coordenador do Centro de Pós-Graduação: Prof. Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha

Subcoordenadora do Centro de Pós-Graduação: Prof^a. Dra. Tereza Cristina de Abreu Ferrari.

DEPARTAMENTO DE CIRURGIA

Chefe do Departamento: Prof. Dr. Marcelo Eller Miranda

Sub-chefe: Prof. Dr. Renato Santiago Gomez

**COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA**

Coordenador: Prof. Dr. Marcelo Dias Sanches

Sub-coordenadora: Prof^ª. Dra. Ivana Duval Araujo

Membros Titulares:

Prof. Dr. Alcino Lázaro da Silva

Prof^ª. Dra. Ivana Duval Araujo

Prof. Dr. Marcelo Dias Sanches

Prof. Dr. Marcio Bittar Nehemy

Prof. Dr. Renato Santiago Gomez

Prof. Dr. Tarcizo Afonso Nunes

Sumara Marques Barral (Representante Discente)

Tese de Doutorado apresentada em sessão pública pela aluna Sumara Marques Barral, do Curso de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, para a comissão examinadora:

Prof. Dr. Armando Chiari Júnior

Profa. Dra. Edna Frasson de Souza Montero

Prof. Dr. Fábio Xerfan Nahas

Prof. Dr. Sérgio Alexandre da Conceição

Professora Doutora Ivana Duval Araujo - Orientadora

Professora Doutora Paula Vieira Teixeira Vidigal - Co-orientadora

Dedicação é entrega. É abnegação. É crença.

À minha mãe, sempre!

Francesco e Giuseppe, frutos
que colherão nossos ensinamentos, nosso elo maior!

AGRADECIMENTOS

Mãe: monossílabo que não canso de repetir durante toda a vida! Deus a fez eterna! Será sempre MÃE! Aquela quem me acolhe e quem é sempre motivo para que eu siga em frente, meu combustível, meu aconchego, meu porto-seguro. A palavra mais confortante, o abraço que afaga e ao mesmo tempo encoraja! Impossível é agradecer de forma sublime e concreta a uma pessoa quem me deu a vida e que ao mesmo tempo me fita com o olhar que remete ao futuro! Sem ela não existiria eu, não existiriam eles, não existiriam as nossas vitórias! Porque eu sou não aquilo que ela projetou em mim, mas um misto de desprendimento e de assertividade sobre tantos projetos que ela construiu comigo! Eu não sou o futuro, mas aquela que carrega o futuro que está por vir – nosso elo. Nós somos o futuro!

À Beatriz Aparecida dos Santos Kolansky, quem nos acolhe diariamente com seu sorriso que transborda otimismo! Os deixo em seus braços como se seus fossem, porque sei que os seus ensinamentos vão muito além do prosaico academicismo dos bancos de escola.

Prof^a. Dra. Ivana Duval Araujo: nossa trajetória completa uma década! Quem me ajudou a trilhar esse caminho e esculpiu essa escolha!

Prof^a. Dra. Paula Vieira Teixeira Vidigal: delicadeza e competência conjugadas!

Prof Dr. André Augusto Gomes Faraco: que a sua leveza de viver a Ciência e que seu espírito arguto sejam recompensados! Você é fenomenal!

À Prof^a. Dra. Rachel de Oliveira Castilho, pela gentileza de nos fornecer a matéria prima pra este estudo!

Aos acadêmicos: Gisele Novais e Felipe Carvalho, pelo interesse, pelo carinho! Meus filhos de coração!

À Mônica Souza de Oliveira, pelas doces palavras, pela dedicação e mais: por participar ativamente dos experimentos que conduziram a esta Tese!

Maricrislei Rocha Torres: Um anjo despojado, divertido e assertivo! Ainda bem que a gente tropeçou no mesmo caminho e caímos em gargalhadas!

Ao Fernando Henrique Pereira, estagiário do Núcleo de Apoio de Bioestatística, pela disponibilidade, sem a qual não conseguiria seguir em frente.

Aos amigos do Biotério da Faculdade de Medicina, difícil seria enumerar toda a solidariedade!

Ao Colegiado da Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia: o que no início pudera ser uma atividade representativa se transformou em aprendizado! “O elo que prepara o próximo da corrente. (Ivo Pitanguy)”.

Academia de Comércio Colégio Cristo Redentor, Curso CAVE, Prof^a. Neuza Marques, Prof^a. Ilva Duarte, Prof. Dr. Sérgio Zouain Ferreira (*in memoriam*), Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora: Alicerce!

À Universidade Federal de Minas Gerais: Casa de diversidade e saber.

Às gargalhadas mais gostosas da minha vida: Francesco e Giuseppe, quem alavancam meu caminho e se colocam à frente de qualquer temor! E ao Lênio, que se mostra firme em acreditar nos meus sonhos! Não é o fim de uma etapa: é o começo de outra! Novos desafios!

"Todos nós temos um certo pudor em admitir, em falar sobre nossas próprias lutas. O ser que pensa e produz sabe que não produziu o suficiente. E julga que o que fez é uma parte do muito que poderá ainda fazer. A superação de nossa obra pelos que nos sucedem é o que define o progresso da humanidade. A grande alegria é se sentir um elo que prepara o próximo da corrente."

Ivo Pitanguy

LISTA DE ABREVIATURAS E DE SÍMBOLOS:

a.C.: antes de Cristo

Ai: área inicial

Af: área final

AM: Amazonas

B: Barbatimão

BRA 1C: filme de quitosana monocamada

° C: graus Celsius

CE: Ceará

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

cm: centímetro(s)

cols: colaboradores

DF: Distrito Federal

dp: desvio-padrão

Dr.: Doutor

Dr^a: Doutora

EFS: Extração em Fase Sólida

EUA: Estados Unidos da América

Fig: Figura

Figs: Figuras

g: grama

Graf: gráfico

Grafs: gráficos

HE: hematoxicilina-eosina

ICB: Instituto de Ciências Biológicas

kg: quilograma(s)

L: Luvas

MA: Massachusetts

mg: miligrama(s)

ml: mililitro(s)

n: número de indivíduos por grupo

p/p: por parte

ppi: “pixels per inch”, “pixels” por polegada

Prof.: Professor

Prof^a: Professora

Q: Quitosana

QB: Quitosana-Barbatimão

SF 0,9%: Soro Fisiológico 0,9%

P.A.: para análise

PLL: Partição Líquido-Líquido

p/v: por volume

RJ: Rio de Janeiro

SP: São Paulo

Tab:Tabela

Tabs: Tabelas

TC: Taxa de Cicatrização

TCP: Taxa de Cicatrização Precoce

TCT: Taxa de Cicatrização Tardia

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

200X: duzentas vezes

400X: quatrocentas vezes

LISTA DE QUADROS E DE TABELAS:

Quadro 01 – Classes de coberturas teciduais e de substitutos de pele disponíveis no mercado.

..... 34

Tabela 01 – Médias, medianas, valores mínimos, valores máximos e desvios-padrão das taxas de cicatrização precoce e tardia em valores percentuais, para os grupos Q, QB, H e L.

..... 105

Tabela 02 – Médias, medianas, valores mínimos, valores máximos e desvios-padrão das diferenças entre as taxas de cicatrização tardia e precoce, em valores percentuais, para os grupos Q, QB, H e L. 106

LISTA DE GRÁFICOS E DE FIGURAS

GRÁFICOS:

Gráfico 01 – Comparação das Taxas de Cicatrização Precoce (em valores percentuais) entre os grupos Q, QB, L e H.

..... 66

Gráfico 02 – Comparação das Taxas de Cicatrização Tardia (em valores percentuais) entre os grupos Q, QB, L e H

67

Gráfico 03 – Comparação das diferenças entre as Taxas de Cicatrização Tardia (TCT) e Taxas de Cicatrização Precoce (TCP), em valores percentuais, entre os grupos Q, QB, L e H.

68

Gráfico 04 – Presença de inflamação e sua classificação em leve, moderada ou acentuada, para os grupos QB, Q, H e L ($p=0,001$) no terceiro dia pós-operatório.

..... 69

Gráfico 05 – Tipo predominante de infiltrado inflamatório ou a sua ausência, para os grupos QB, Q, H e L ($p=0,031$) no terceiro dia pós-operatório.

70

Gráfico 06 – Presença de tecido de granulação e sua classificação em ausente, leve, moderada ou acentuada para os grupos QB, Q, H e L ($p=0,002$) no terceiro dia pós-operatório.	70
Gráfico 07 – Presença de angiogênese e sua classificação em ausente, leve, moderada ou acentuada para os grupos QB, Q, H e L ($p=0,001$) no terceiro dia pós-operatório.	71
Gráfico 08 – Presença de Inflamação Leve no terceiro dia pós-operatório, comparando-se os grupos QB, Q, H e L dois a dois; $p=0,007$ quando comparados os grupos H e Q, $p=0,041$ quando comparados os grupos H e QB.	72
Gráfico 09 – Presença de Inflamação Moderada no terceiro dia pós-operatório, comparando-se os grupos QB, Q, H e L dois a dois. O grupo QB apresentou mais Inflamação Moderada que o grupo L ($p=0,007$).	73
Gráfico 10 – Presença de Granulação Acentuada no terceiro dia pós-operatório, comparando-se os grupos QB, Q, H e L dois a dois. Os grupos Q e L apresentaram mais Inflamação Acentuada que o grupo H ($P=0,026$).	74
Gráfico 11 – Tipo de infiltrado inflamatório observado nas amostras teciduais dos grupos QB, Q, H e L, no terceiro dia pós-operatório. Os grupos QB, Q e L apresentaram predomínio do tipo misto quando comparadas individualmente com o grupo H ($p=0,026$).	75

Gráfico 12 – Presença de granulação observada no terceiro dia pós-operatório, comparando-se os grupos QB, Q, H e L dois a dois, $p=0,007$ quando comparados os grupos QB e Q ou quando comparados os grupos QB e H.	76
Gráfico 13 – Presença de angiogênese observada no terceiro dia pós-operatório, comparando-se os grupos QB, Q, H e L dois a dois; $p=0,026$ quando comparados os grupos QB e Q e $p=0,001$ quando comparados os grupos QB e L.	77
Gráfico 14 – Presença de Angiogênese Moderada observada no terceiro dia pós-operatório, comparando-se os grupos QB, Q, H e L dois a dois; $p=0,026$ quando comparado o grupo QB aos demais, dois a dois.	78
Gráfico 15 – Presença de angiogênese e sua classificação em ausente, leve, moderada ou acentuada para os grupos QB, Q, H e L ($p=0,004$) no oitavo dia pós-operatório.	79
Gráfico 16 – Avaliação da presença de Deposição de Colágeno Jovem e sua classificação em ausente, leve, moderada ou acentuada para os grupos QB, Q, H e L ($p=0,000$) no oitavo dia pós-operatório.	80
Gráfico 17 – Presença de Angiogênese Moderada observada no oitavo dia pós-operatório; $p=0,026$ comparando os grupos QB e Q.	81

Gráfico 18 – Presença de Colágeno Jovem observada no oitavo dia pós-operatório; p=0,026 comparando os grupos QB e Q, p=0,000 comparando QB e L e p=0,026 comparando H e L. 82

Gráfico 19 – Deposição de Colágeno Jovem classificada como Leve observada no oitavo dia pós-operatório; p=0,001 comparando os grupos QB e L e p=0,041 comparando QB e H. 83

FIGURAS:

Figura 01 – Fotografia da árvore de *S. adstringens* em seu bioma natural. Fonte: Wikipedia. Disponível em <http://pt.wikipedia.org/wiki/Barbatim%C3%A3o>. 36

Figura 02 – Fotografia do caule do arbusto de *S. adstringens*, com casca rugosa e descamante. Fonte: Wikipedia. Disponível em <http://pt.wikipedia.org/wiki/Barbatim%C3%A3o>. 37

Figura 03 - Fotografia do *punch* metálico de dois centímetros de diâmetro utilizado para a confecção das feridas. 45

Figura 04 - Esquema gráfico representando a ferida cutânea posicionada no dorso do rato, de modo que o perímetro da circunferência tangenciasse os ângulos inferiores das escápulas do animal. 46

Figura 05 – Fotografia de rato em decúbito ventral, com as patas em extensão. Observar a cobertura de hidrocolóide (setas) posicionada sobre a ferida cutânea, imediatamente após a sua confecção. 48

Figura 06 – Fotografia de rato em decúbito ventral, com as patas em extensão. Observar a cobertura secundária (gaze estéril) posicionada sobre o dorso do animal e fixada com curativo de Brown ou “tie-over” modificado (setas). 48

Figura 07 – Fotografia de rato em decúbito ventral, com as patas em extensão. Observar a cobertura de tira de luvas cirúrgica posicionada ao lado do animal (setas), no momento da sua retirada, terceiro dia pós-operatório.	49
Figura 08 – Fotografia de rato em decúbito ventral, com as patas em extensão. Observar a cobertura de filme de quitosana/barbatimão posicionada sobre a ferida cutânea (setas), no terceiro dia pós-operatório (troca da cobertura).	50
Figura 09 – Fotografia de rato em decúbito ventral, com as patas em extensão. Observar a cobertura de filme de quitosana posicionada sobre a ferida cutânea (setas), no terceiro dia pós-operatório (troca da cobertura).	50
Figura 10 – Esquema gráfico representado a divisão da ferida cutânea em dois hemisférios: superior e inferior, a partir de uma linha imaginária. Como referência, tomou-se o maior diâmetro cefalocaudal.	51
Figura 11 – Esquema gráfico representado a ferida cutânea no dorso do rato no momento da biopsia. Uma linha imaginária traçada no maior diâmetro cefalocaudal determinou o local de retirada das biopsias. Em vermelho está representado o fragmento tecidual ressecado no terceiro dia pós-operatório e em azul, aquele retirado no oitavo dia pós-operatório.	52

Figura 12 – (A) Imagem digitalizada da lâmina de retroprojeter: em azul, as bordas das feridas delineadas com caneta marcadora permanente. (B) Imagem reproduzida do programa AutoCAD Release: em preto, a plotagem dos perímetros; em alaranjado, as áreas preenchidas para o cálculo com até quatro casas decimais de aproximação. 54

Figura 13 - Fotomicrografia de corte histológico da borda cutânea de rato, corado com hematoxilina e eosina, analisado com microscopia óptica no aumento de 200X. Observar infiltrado inflamatório classificado como Leve (setas). 58

Figura 14 - Fotomicrografia de corte histológico da borda cutânea de rato, corado com hematoxilina e eosina, analisado com microscopia óptica no aumento de 200X. Observar infiltrado inflamatório classificado como Moderado (setas). 58

Figura 15 - Fotomicrografia de corte histológico da borda cutânea de rato, corado com hematoxilina e eosina, analisado com microscopia óptica no aumento de 200X. Observar infiltrado inflamatório classificado como Acentuado (setas). 59

Figura 16 - Fotomicrografia de corte histológico da borda cutânea de rato, corado com hematoxilina e eosina, analisado com microscopia óptica no aumento de 400X. Observar infiltrado inflamatório do tipo misto, com a presença de célula polimorfonuclear (seta) e de célula mononuclear (círculo). 59

- Figura 17** - Fotomicrografia de corte histológico da borda cutânea de rato, corado com hematoxilina e eosina, analisado com microscopia óptica no aumento de 200X. Observar o tecido de granulação classificado como Leve, com a presença de fibroblastos (seta) e de vasos neoformados (círculos). 60
- Figura 18** - Fotomicrografia de corte histológico da borda cutânea de rato, corado com hematoxilina e eosina, analisado com microscopia óptica no aumento de 200X. Observar o tecido de granulação classificado como Moderado, com a presença de vasos neoformados (círculos). 60
- Figura 19** - Fotomicrografia de corte histológico da borda cutânea de rato, corado com hematoxilina e eosina, analisado com microscopia óptica no aumento de 200X. Observar o tecido de granulação classificado como Acentuado, com a presença de vários vasos neoformados (círculos). 61
- Figura 20** - Fotomicrografia de corte histológico da borda cutânea de rato, corado com hematoxilina e eosina, analisado com microscopia óptica no aumento de 200X e classificado como Angiogênese do tipo Leve, com a presença de poucos vasos por campo (círculos). 61
- Figura 21** - Fotomicrografia de corte histológico da borda cutânea de rato, corado com hematoxilina e eosina, analisado com microscopia óptica no aumento de 200X e classificado como Angiogênese do tipo Moderada, com a presença de alguns vasos por campo (círculos). 62

Figura 22 - Fotomicrografia de corte histológico da borda cutânea de rato, corado com hematoxilina e eosina, analisado com microscopia óptica no aumento de 200X e classificado como Angiogênese do tipo Acentuada, com a presença de muitos vasos por campo (círculos). 62

Figura 23 - Fotomicrografia de corte histológico da borda cutânea de rato, corado com hematoxilina e eosina, analisado com microscopia óptica no aumento de 200X e classificado como Deposição de Colágeno do tipo Leve, com a presença de poucas fibras colágenas por campo (setas). 63

Figura 24 - Fotomicrografia de corte histológico da borda cutânea de rato, corado com hematoxilina e eosina, analisado com microscopia óptica no aumento de 200X e classificado como Deposição de Colágeno do tipo Moderada, com a presença de algumas fibras colágenas por campo (setas). 63

Figura 25 - Fotomicrografia de corte histológico da borda cutânea de rato, corado com hematoxilina e eosina, analisado com microscopia óptica no aumento de 200X e classificado como Deposição de Colágeno do tipo Acentuada, com a presença de várias fibras colágenas por campo (setas). 64

ÍNDICE:

1. INTRODUÇÃO	29
2. OBJETIVO	39
3. MATERIAIS E MÉTODO	40
3.1- Animais utilizados e cuidados dispensados	40
3.2- Método	40
3.2.1 - Delineamento experimental	41
3.2.2 - Coberturas utilizadas	42
3.2.3 - Obtenção do Extrato Hidroalcoólico de Barbatimão	44
3.2.4 - Obtenção da Fração Purificada de Barbatimão	44
3.2.5 - Confeção do defeito cutâneo dorsal	45
3.2.6 - Aplicação da cobertura primária e da cobertura secundária	47
3.2.7 - Coleta das amostras	51
3.2.8 - Eutanásia	53
3.2.9 - Documentação fotográfica	53
3.2.10 - Representação gráfica	53
3.2.11 - Avaliação macroscópica	54
3.2.12 - Cálculo das taxas de cicatrização	55
3.2.13 - Avaliação microscópica morfológica	56
3.2.14 - Análise estatística	65

4. RESULTADOS	66
4.1- Avaliação macroscópica	66
4.1.1 - Avaliação das Taxas de Cicatrização Precoce	66
4.1.2 - Avaliação das Taxas de Cicatrização Tardia	67
4.1.3 - Avaliação da diferença entre a taxa de cicatrização tardia e a taxa de cicatrização precoce	68
4.2 - Avaliação histológica	69
4.2.1 - Avaliação da Cicatrização Precoce	69
4.2.2 - Avaliação da Cicatrização Tardia	79
5. DISCUSSÃO	84
6. CONCLUSÃO	94
7. PERSPECTIVAS FUTURAS	95
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
9. APÊNDICE	105
10. ANEXO	107

RESUMO

Introdução: O barbatimão é um fitoterápico tradicionalmente usado para a cicatrização de feridas, especialmente nas regiões do cerrado brasileiro, embora as suas propriedades ainda não tenham sido estudadas detalhadamente. Por outro lado, a partir da quitosana, um aminopolissacarídeo obtido por meio da desacetilação alcalina da quitina, pode ser preparada uma cobertura tecidual promissora para acelerar a cicatrização cutânea. Nesse contexto, as propriedades anti-inflamatórias e antimicrobianas do barbatimão, associados à estabilidade, à biocompatibilidade e à flexibilidade do filme de quitosana poderiam aumentar o afluxo celular e o gradiente de interleucinas, otimizando a cicatrização de feridas. **Objetivo:** Avaliar a cicatrização de feridas cutâneas complexas de ratos, com o uso de filme de quitosana associado ao extrato hidroalcoólico de barbatimão. **Método:** Trinta e duas ratas Wistar foram submetidas à confecção de defeitos cutâneos dorsais com *punch* de dois centímetros de diâmetro. Posteriormente, foram distribuídas em quatro grupos, conforme o tipo de tratamento que foi aplicado: 1) Grupo Q: uso do filme de quitosana; 2) Grupo QB: uso do filme de quitosana associado ao extrato hidroalcoólico de barbatimão; 3) Grupo L: uso de tiras de látex, 4) Grupo H: uso de placas de hidrocolóide. Três dias após a intervenção cirúrgica, as bordas das feridas foram representadas graficamente, foram feitas biopsias de pele e novas coberturas foram aplicadas, de acordo com o grupo ao qual pertencia cada indivíduo. Esses procedimentos foram repetidos no oitavo dia pós-operatório. Foi feito o cálculo das áreas das feridas imediatamente após a sua confecção, no terceiro e no oitavo dias de avaliação. As taxas de cicatrização foram calculadas e comparadas entre os grupos. Também foi realizada a avaliação histológica, observando-se os seguintes critérios: inflamação, infiltrado inflamatório, granulação, angiogênese, depósito de colágeno e reação gigantocelular.

Resultados: O grupo QB apresentou maiores taxas de cicatrização precoce e tardia do que o grupo H ($p=0,002$ e $p=0,015$ respectivamente), do que o grupo Q ($p=0,025$ e $p=0,000$ respectivamente) e do que o grupo L ($p=0,000$). Em relação à avaliação histológica no terceiro dia pós-operatório, o grupo H apresentou mais Inflamação Leve que o grupo Q ($p=0,007$) e do que o grupo QB ($p=0,041$); o grupo QB apresentou mais Inflamação Moderada do que o grupo L ($p=0,007$) e os grupos Q e L apresentaram mais Inflamação Acentuada que o grupo H ($p=0,026$). O grupo QB apresentou mais granulação que os grupos Q e H ($p=0,007$). O grupo QB apresentou mais angiogênese que os grupos Q e L ($p=0,026$ e $p=0,001$ respectivamente); o grupo QB apresentou Angiogênese Moderada que os grupos Q, H e L ($p=0,026$). No oitavo dia pós-operatório, o grupo QB apresentou mais Angiogênese Moderada que o grupo Q ($p=0,026$). O grupo QB apresentou mais Depósito de Colágeno Jovem que o grupo Q ($p=0,026$) e que o grupo L ($p=0,000$), e o grupo H apresentou mais Depósito de Colágeno Jovem que o grupo L ($p=0,026$). **Conclusão:** A associação do extrato hidroalcoólico do barbatimão com a quitosana promoveu maiores taxas de cicatrização das feridas cutâneas complexas de ratos, tanto no terceiro quanto no oitavo dias de observação.

Unitermos: Cicatrização de feridas, Quitosana, *Stryphnodendron*, Ratos Wistar

ABSTRACT:

Introduction: A small tree called “barbatimão” has been traditionally used as an herbal medicine to heal wounds, especially in central region of Brazil, although their properties have not been studied in detail. Moreover, chitosan, a polysaccharide obtained by alcalin deacetylation of chitin may be used in preparation of one of the most promising wound dressings, which can stimulate wound-healing. In this context, anti-inflammatory and antimicrobial properties presents in the bark of “barbatimão”, associated with stability, biocompatibility and flexibility of the film of chitosan could increase the flow of healing cells and the gradient of interleukins, optimizing the healing of wounds. **Purposes:** To evaluate the healing of complex wounds in rats with the use of chitosan film associated with hydroalcoholic extract of “barbatimão”. **Methods:** Thirty- two Wistar female rats were submitted to a confection of dorsal skin defects with a punch of two centimeters in diameter. Subsequently, they were divided into four groups according to the type of treatment that was applied: 1) Group Q: use of chitosan film ; 2) Group QB: use of chitosan film associated with hydroalcoholic extract of barbatimão ; 3) Group L: use of latex strips, 4) group H: use of plates of hydrocolloid. Three days after surgery, the edges of the wounds were graphically represented, samples were collected for histological analyses and new wound dresses were applied, according to the group to which each animal belonged. These procedures were made again on the eighth postoperative day. The areas of the wounds were calculated immediately after their confection, at the third and at the eighth postoperative day. Healing rates were calculated and compared among the gorups. The histological analysis were made, observing the following criteria: inflammation, inflammatory infiltrate, granulation, angiogeneses, collagen deposition and gigantocelullar reaction. **Results:** Both at early and the late periods, group QB

showed higher rates of healing than group H ($p=0.002$ and $p=0.015$ respectively), than group Q ($p=0.025$ and $p=0.000$ respectively), and group L ($p=0.000$). Regarding to the histological evaluation in the third postoperative day, group H showed more Tenous Inflammatory response than group Q ($p=0.007$) and group QB ($p=0.041$); group QB had more Moderate Inflammation than group L ($p=0.007$) and groups L and Q showed more Severe Inflammation than group H ($p=0.026$). Besides of that, group QB had more granulation than group Q and group H ($p=0.007$). Angiogenesis were mainly present in group QB than in Q and L ($p=0.026$ and $p=0.001$ respectively). Also, group QB showed more Moderate Angiogenesis than the group H and the group L ($p=0.026$). On the eighth postoperative day, the group QB had more Moderate Angiogenesis that the group Q ($p=0.026$). The group QB had more Deposit of Young Collagen than group Q ($p=0.026$) and the group L ($p=0.000$), and the group H showed more deposit for Young Collagen than group L ($p=0.026$). **Conclusion:** The association of the hydroalcoholic extract of “barbatimão” with chitosan promoted higher rates of healing of rats complex wounds, both on the eighth day as the third observation.

Keywords: Wound healing, Chitosan, *Stryphnodendron*, Wistar rats.

1. INTRODUÇÃO:

As primeiras referências acerca do processo de cicatrização datam do século XVII a. C. com as descrições do Papiro de Smith. É compreensível que o tratamento de feridas não seja uma preocupação recente, acompanhando a evolução da humanidade desde seus primórdios. Com o advento da pólvora entre os séculos XIII e XIV e o surgimento de outros tipos de armamentos nos anos subsequentes, a necessidade de se tratar ferimentos cada vez mais complexos permitiu a compreensão de mecanismos celulares de reparo tecidual e a proposição de práticas clínicas mais racionais ^{1,2}.

O processo de reparo tecidual engloba uma série de reações celulares e bioquímicas, que resulta em um mecanismo complexo e caracterizado pela sobreposição de fases: a inflamação, a proliferação celular e a remodelação ^{3,4}.

A fase inflamatória é a primeira fase da cicatrização. É nessa etapa que ocorre uma vasoconstrição imediata seguida de vasodilatação, em resposta aos efeitos da cascata de coagulação e das vias do complemento. Para que essa resposta seja desencadeada ocorre, de uma maneira geral, uma prévia exposição do subendotélio, seguida de agregação plaquetária. A formação de um trombo rico em plaquetas tampona a lesão endotelial. Posteriormente, esse trombo é infiltrado pela fibrina (formada pela conversão da trombina, sob ação do fibrinogênio) e por eritrócitos, constituindo não somente uma barreira física para limitar a perda de células circulatórias, mas principalmente uma matriz provisória, que provém base para a iniciação do processo de deposição celular. Em função da ativação de C3 e de C5, há um recrutamento de neutrófilos e de monócitos para o local de reparo, os quais estimulam a liberação de histamina e de leucotrienos derivados dos mastócitos. Inicialmente, o infiltrado inflamatório é predominantemente às custas de neutrófilos, que constituem cerca de 50% das células, após 24 horas de ocorrido a lesão tecidual. Após dois até três dias decorridos da fase inflamatória, há o predomínio do

infiltrado mononuclear, os quais se diferenciam em macrófagos e atuam não somente na fagocitose, mas principalmente em secretar citocinas responsáveis por perpetuar as demais fases da cicatrização. A depleção de monócitos e de macrófagos pode ser, em maior ou menor proporção, responsável por um atraso no processo de reparo, resultando em uma proliferação de fibroblastos e em uma angiogênese pouco exuberantes⁴.

A fibroplasia, a granulação, a contração tecidual e a epitelização fazem parte do processo de proliferação celular. Durante a fibroplasia, ocorre a síntese e a deposição da matriz extracelular. Essa síntese é estimulada pelos fatores de crescimento liberados pelos macrófagos e pela própria matriz extracelular. Nas feridas limpas e não infectadas, são os fibroblastos que constituem a célula predominante na ferida, entre o terceiro e o quinto dias de cicatrização. Além disso, são os próprios fibroblastos os responsáveis pela síntese da matriz extracelular, regendo um complexo mecanismo de retroalimentação positiva. Inicialmente, a matriz extracelular é rica em fibronectina, glicosaminoglicana e ácido hialurônico que constituem um microambiente favorável para a migração celular. Após o afluxo de fibroblastos ocorre a síntese de hialuronidase, que atua na digestão da matriz provisória. Concomitantemente, o colágeno jovem é depositado sobre a rede de fibronectina e de glicosaminoglicana sulfatada, de uma maneira desorganizada, resultando na formação da cicatriz inicial. No mínimo 19 tipos de colágeno são descritos, sendo a maioria sintetizada pelos fibroblastos e uma pequena quantidade secretada pelos queratinócitos. A formação das fibras colágenas está intimamente relacionada ao amadurecimento fenotípico dos fibroblastos e é influenciada por alterações no microambiente de oxigênio. Se no início do processo a baixa tensão de oxigênio estimula a migração celular, a síntese de fatores de crescimento e a angiogênese, na fibroplasia, altas tensões são necessárias para a hidroxilação da prolina e da lisina do colágeno. Posteriormente, em função do seu amadurecimento fenotípico, os fibroblastos passam a

apresentar características funcionais semelhantes aos músculos lisos, participando do mecanismo de contração das feridas ³⁻⁵.

A fase de granulação é caracterizada pela formação de tecido rico em vasos neoformados, macrófagos e fibroblastos. São esses vasos neoformados que se tornam responsáveis pelo afluxo celular e de citocinas, além de prover o tecido de tensões adequadas de oxigênio ³⁻⁵.

A contração tecidual é característica das feridas de pele abertas, das secundárias a queimaduras profundas, das que sofreram deiscência ou daquelas tratadas com enxertia cutânea. Esse fenômeno é capaz de promover o fechamento da ferida, sem que haja a formação de novo tecido. Em função da presença de um pânículo carnoso, alguns mamíferos têm maior capacidade de realizar contração tecidual, tais como roedores, gatos, cachorros e coelhos. Esse plano, situado entre o tecido celular subcutâneo e a camada muscular do animal, é tipicamente miofascial, permitindo maior mobilidade da pele e sua conseqüente contração. O mecanismo celular responsável pela contração tecidual não é bem compreendido, mas parece estar relacionado com a presença de miofibroblastos ricos em α -actina e microfilamentos ⁴.

Finalmente, ocorre a epitelização, por meio da migração de queratinócitos sobre a matriz extracelular e da mitose de células epidérmicas a partir da camada basal. Esse processo de migração é estimulado pela presença de uma superfície úmida e oxigenada ³⁻⁵.

O processo de remodelação da ferida se caracteriza por etapas sucessivas de síntese, degradação e orientação das fibras colágenas. Se, inicialmente, as fibras de colágeno são dispostas de maneira aleatória, após a ação da colagenase, sua disposição obedece ao sentido do tecido conjuntivo adjacente, tornando-se mais resistentes em função do estabelecimento de ligações covalentes transversais. A partir daí, em condições

fisiológicas, essas fibras colágenas sofrem repetidos processos de síntese, lise, redirecionamento e de restabelecimento das ligações covalentes, resultando na formação de uma cicatriz cada vez mais regular ^{4,6}.

Classifica-se como complexa uma ferida de difícil resolução, aguda ou crônica, e que está associada a uma ou a mais das seguintes situações: perdas cutâneas extensas, comprometimento da viabilidade tecidual (isquemia ou necrose), infecções, associação com doenças sistêmicas que dificultem a cicatrização, como o diabetes, as vasculopatias, a radiodermite, dentre outras. Essas feridas apresentam as mesmas fases de cicatrização que as feridas não complexas. Entretanto, se diferenciam das demais por apresentarem maior duração de cada fase, especialmente na formação de tecido de granulação e na contração. No caso específico das grandes perdas cutâneas, o processo de reparo tecidual fica mais complexo, já que pelo fato de as bordas da ferida serem mais distantes, a migração celular, bem como o aporte de oxigênio e o afluxo de mediadores da cicatrização apresenta deficiência. Além disso, pode haver uma variável quantidade de bactéria, de tecido desvitalizado e de exsudato que podem transformar essa área de perda tecidual em uma ferida que não cicatriza espontaneamente. Uma alternativa para o tratamento desse tipo de ferida é enxertia cutânea ou a rotação de retalhos ^{4,7}. Só que existem condições para que os enxertos de pele sejam utilizados: a presença de um leito vascular adequado, capaz de lhes prover nutrientes por meio de embebição plasmática, até que uma nova rede vascular seja estabelecida, e a presença de áreas doadoras de pele ^{8,9}. Se a primeira condição encontra entrave nos casos de feridas complexas com mau aporte vascular e/ou com infecção, a segunda condição é ainda mais grave no caso das grandes perdas teciduais decorrentes de queimaduras extensas. Assim, há que se propor alternativas não somente para se otimizar o aspecto do leito de granulação, que poderá receber um enxerto cutâneo, mas principalmente, para promover o fechamento

espontâneo de feridas complexas, quando a rotação de retalhos não estiver indicada, seja pela dificuldade técnica ou por comorbidade relacionada à presença de alguma doença sistêmica ou de radiodermite.

Com a perspectiva de se otimizar o processo cicatricial, vários recursos terapêuticos já foram estudados e uma variedade de coberturas teciduais está disponível comercialmente, sendo que nenhum demonstrou superioridade em acelerar a cicatrização (Tab 01)^{4,10}. Além disso, os resultados obtidos ainda não são conclusivos ao se responder a real face do problema: a necessidade de uma substância eficaz, cujo custo-benefício seja superior às alternativas encontradas no mercado farmacêutico.

Quadro 01 - Classes de coberturas teciduais e de substitutos de pele disponíveis no mercado.

CLASSE	COMPOSIÇÃO	CARACTERÍSTICA E FUNÇÃO
Gaze estéril	Fibras de algodão	Permeável, retirada dolorosa, remoção das células neoformadas.
Cobertura de Rayon	Tela de acetato de celulose com vaselina ou solução salina a 0,9%	Queimaduras de profundidade parcial, áreas doadoras e receptoras de enxerto
Alginato de cálcio	Polímero derivado de algas marinhas impregnado com cálcio.	Absorção de exsudato, não aderente, requer cobertura secundária, o cálcio induz hemostasia, promove desbridamento autolítico.
Terapia por pressão negativa	Bomba à vácuo, esponja e filme plástico.	A esponja adquire o formato da ferida e o vácuo remove o exsudato e diminui a colonização bacteriana, promove granulação e proliferação celular.
Silicone	Placas de silicone	Promove aumento da temperatura da pele e cria um campo eletromagnético.
Filme transparente	Polímero de poliuretano semipermeável	Adesivo, permite certo grau de manutenção do vapor.
Hidrocolóide	Poliuretano semi-permeável (camada externa), celulose, gelatina e pectinas (camada interna)	Absorção o exsudato, faz autólise do tecido necrótico, alivia a dor, promove a formação de tecido de granulação.
Hidrogel	Álcool de polivinil, poliacrilamidas e polivinil.	Promove autólise do tecido necrótico, requer cobertura secundária, não aderente, não recomendável em caso de infecção.
Carvão ativado	Fibras de carvão ativado, podendo ser impregnadas com prata.	Adsorção de exsudato, diminuição de odor, a prata é bacteriostática.
Espuma	Poliuretano ou silicone entremeados com bolhas de ar (fase hidrofílica e fase hidrofóbica).	Feridas necróticas e exsudativas.
Matriz de colágeno	Colágeno bovino ou suíno com celulose oxidada.	Agrega sinalizadores, que coordenam a ativação de fatores de crescimento endógenos. Feridas crônicas e anérgicas (ex: diabéticos, úlceras venosas).
Matriz de celulose	Membrana de celulose produzida por <i>Acinetobacter xylinum</i> desidratada, acrescida de poros artificialmente.	Manutenção da umidade da ferida e ativação de fatores de crescimento. Área doadora de enxerto e feridas superficiais.
Pele alógena	Lâmina de pele humana acelular.	Substituto temporário da pele humana. Grandes superfícies de queimadura cutânea, feridas complexas com perdas teciduais extensas.

Fontes: 1-Lorenz HP, Longaker MT. Wound Healing: Repair Biology and Wound and Scar Treatment. In: Mathes, SJ. Plastic Surgery (Vol. I) General Principles. 2nd ed. Philadelphia: Saunders-Elsevier, 2006: 209-234. 2-Smaniotto PHS, Galli R, Carvalho VF, Ferreira MC. Tratamento clínico das feridas - curativos. Rev Med. 2010; 89(3/4):137-141.

Nesse contexto, a pesquisa de extratos vegetais, popularmente conhecidos como ervas medicinais, torna-se necessária, visto que tais recursos terapêuticos são frequentemente utilizados na prática popular e seus efeitos são pobremente conhecidos pela comunidade científica. Além disso, se por um lado, observa-se uma variedade de recursos fitoterápicos mal explorados, por outro pesquisas acerca de insumos naturais de origem animal também deveriam ser conduzidas. Assim, esse estudo tem por objetivo avaliar as propriedades cicatrizantes de dois recursos naturais diferentes: o barbatimão, obtido de uma espécie vegetal, e a quitosana, elaborada a partir de derivados do exoesqueleto de crustáceos.

O barbatimão, *Stryphnodendron adstringens*, é um arbusto comum no bioma do Cerrado brasileiro, apresentando tronco e ramos tortuosos, casca rugosa e descamante em árvores mais velhas. Seus ramos mais jovens são espessos, com folhas alternas e flores avermelhadas ou quase brancas. Possui metabólitos de grande importância farmacológica, como os taninos, os alcalóides, o ácido tânico estrifno, amidos, matérias resinosas e mucilaginosas, flavanóides e flabofenos ^{11,12} (Figs 01 e 02).



Figura 01 - Fotografia da árvore de *S. adstringens* em seu bioma natural. Fonte: Wikipedia. Disponível em <http://pt.wikipedia.org/wiki/Barbatim%C3%A3o>.



Figura 02 - Fotografia do caule do arbusto de *S. adstringens*, com casca rugosa e descamante. Fonte: Wikipedia. Disponível em <http://pt.wikipedia.org/wiki/Barbatim%C3%A3o>.

Sob a forma de chá e de infusão, preparados a partir do caule ou das folhas da árvore, o barbatimão tem sido popularmente utilizado para o tratamento de feridas, de diarreia, de afecções ginecológicas e infecções do trato urinário. Devido à riqueza de taninos e flavonóides, parece apresentar propriedades anti-inflamatórias, antibacterianas e antiulcerogênicas, além de acelerar a cicatrização de feridas ¹¹⁻¹⁴.

Por sua vez, a quitosana, um aminopolissacarídeo obtido a partir da desacetilação ácida da quitina, parece ser uma alternativa promissora para acelerar a proliferação celular tanto *in vitro*, como *in vivo*. Além disso, várias pesquisas têm avaliado a associação da quitosana, sob a forma de nanopartículas, de hidrogéis ou de filmes, com diversas

substâncias e até mesmo com fatores de crescimento, para estimular o processo de reparo tecidual¹⁵⁻²¹.

Nesse contexto, as propriedades anti-inflamatórias e antimicrobianas do barbatimão poderiam ser associadas às comprovadas estabilidade, biocompatibilidade e flexibilidade do filme de quitosana, com o objetivo de se promover a cicatrização de feridas cutâneas. O filme de quitosana, além de manter o extrato hidroalcoólico do barbatimão no leito cicatricial por mais tempo, poderia aumentar o gradiente de migração celular, a concentração de eicosanóides, de citocinas, de fatores de crescimento e de proteínas de adesão, estimulando a formação da matriz extracelular.

Para o uso tópico do barbatimão associado ao filme de quitosana, seria esperada uma manutenção do extrato hidroalcoólico por um período de tempo maior no leito cicatricial, não requerendo a troca diária da cobertura, além de reduzir e até mesmo anular seus possíveis efeitos colaterais sistêmicos, tais como hepatotoxicidade e risco de desenvolvimento de câncer esofágico²²⁻²⁴.

Dessa forma, parece ser provável que o extrato hidroalcoólico barbatimão incorporado ao filme de quitosana possa acelerar a cicatrização de feridas complexas de ratos.

2. OBJETIVO:

Avaliar a cicatrização de feridas cutâneas complexas de ratos, com o uso de filme de quitosana associado ao extrato hidroalcoólico de barbatimão.

3. MATERIAL E MÉTODO:

3.1 - Animais utilizados e cuidados dispensados:

Esse estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) – Protocolo número 337/2012.

Foram utilizados 32 ratos Wistar fêmeas, adultos, com peso entre 220 e 280 g, fornecidos pelo Biotério do Instituto de Ciência Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Todos os animais passaram por um período de observação de sete dias, sob temperatura, umidade e ciclo de luz controlados.

3.2 - Método:

Após a admissão no Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina da UFMG, os animais foram avaliados clinicamente, pesados, distribuídos aleatoriamente em quatro grupos e mantidos em gaiolas coletivas. A dieta oferecida foi a ração comercial padrão para ratos (Labina®, Purina, Contagem, MG) e água à vontade.

3.2.1 - Delineamento experimental:

Em todos os animais foi confeccionado um defeito cutâneo dorsal, por meio da ressecção de pele com uso de *punch* metálico de dois centímetros de diâmetro, seguida da aplicação da cobertura primária, que variou conforme o grupo a que pertencia cada animal. As coberturas utilizadas foram: o filme de quitosana, o filme de quitosana associado ao extrato hidroalcoólico de barbatimão, o hidrocolóide, ou uma tira de luva cirúrgica de látex.

- 1) Grupo Q, (n=08): uso do filme de quitosana;
- 2) Grupo QB, (n=08): uso do filme de quitosana associado ao extrato de barbatimão;
- 3) Grupo H, (n=08): uso de cobertura de hidrocolóide;
- 4) Grupo L, (n=08): uso de tira de luva cirúrgica de látex.

3.2.2 - Coberturas utilizadas:

A) Grupo Q:

Foram utilizados filmes de quitosana monocamada (BRA 1C) confeccionados no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte), medindo 3,8 cm X 4,4 cm. Os filmes foram elaborados a partir da quitosana de média massa molar (Sigma-Aldrich, São Carlos, SP).

Os filmes brancos monocamada (BRA 1C) foram preparados pela adição de 2% p/v de quitosana a uma solução contendo ácido acético 1,5% p/v em água purificada. A dispersão foi agitada por 24 horas para a obtenção de um gel espesso, que foi espalhado sobre uma placa siliconada perfurada, passando por um período de secagem durante 24 horas, à temperatura ambiente, para a obtenção dos dispositivos.

B) Grupo QB:

Foram utilizados filmes de quitosana monocamada (BRA 1C) confeccionados no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte), medindo 3,8 cm X 4,4 cm. Os filmes foram elaborados a partir da quitosana de média massa molar (Sigma-Aldrich, São Carlos, SP).

Os filmes brancos monocamada (BRA 1C) foram preparados pela adição de 2% p/v de quitosana a uma solução contendo ácido acético 1,5% p/v em água purificada. A essa mistura, foi adicionado extrato hidroalcoólico de barbatimão na concentração de 0,05% p/p, fornecido pelo Laboratório de Fitoquímica e Farmacognosia (Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte), sob a coordenação da Prof^a. Dra. Rachel Oliveira Castilho. A dispersão foi agitada por 24 horas para a obtenção

de um gel espesso, que foi espalhado sobre uma placa siliconada perfurada, passando por um período de secagem durante 24 horas, à temperatura ambiente, para a obtenção dos dispositivos.

Os filmes de quitosana, associados ou não ao barbatimão, foram esterilizados em óxido de etileno.

C) Grupo H:

Foram utilizadas coberturas de hidrocolóide (Duoderm, BDM/Convatec, Marshfield, MA, EUA), medindo 3,8 cm X 4,4 cm. Esses dispositivos foram aplicados conforme a orientação do laboratório, retirando-se a superfície adesiva e o fixando sobre a ferida.

D) Grupo L:

Foram utilizadas tiras de luvas cirúrgicas estéreis (Lemgruber, Rio de Janeiro, RJ) medindo 3,8 X 4,4 cm. Essas medidas foram padronizadas em todos os grupos, em função da apresentação comercial das coberturas de hidrocolóide utilizadas. As tiras de luvas foram previamente lavadas com solução salina (SF 0,9%, Isofarma Industrial Farmacêutica, Fortaleza, CE), para a retirada do talco de amido de milho (de acordo com as informações do fabricante). Optou-se pela utilização de luvas como cobertura tecidual primária nesse grupo controle em função de sua textura semelhante ao curativo de hidrocolóide.

3.2.3 - Obtenção do Extrato Hidroalcoólico de Barbatimão:

A fração orgânica de Barbatimão utilizada na produção das nanopartículas foi obtida por meio da purificação de amostras de extrato etanólico seco da planta utilizando-se duas técnicas: extração em fase sólida (EFS) e partição líquido-líquido (PLL).

As folhas foram desidratadas a uma temperatura de 30° C e pulverizadas. O extrato aquoso foi obtido por meio de decocção de 250,0 g de extrato seco em 250 ml de água deionizada, em uma temperatura de 90° C, durante 10 minutos, e submetido à decantação. A partir daí, obtiveram-se duas fases: uma fase aquosa (extrato aquoso) e a outra, orgânica (extrato orgânico). Recolheram-se as fases aquosa (inferior) e orgânica (superior) em diferentes béqueres. Posteriormente, a fase aquosa foi vertida para o funil de separação, adicionando-se etanol a 50% (Neogen, Indaiatuba, SP). Novamente, duas fases foram separadas: uma aquosa, separada em um béquer, e outra orgânica, que foi reunida àquela que já havia sido separada. Secaram-se as fases em Rotavapor (Modelo 801, Fisatom Equipamentos Científicos Ltda, São Paulo, SP), não ultrapassando a temperatura de 40° C, para a obtenção do extrato liofilizado.

3.2.4 - Obtenção da Fração Purificada de Barbatimão:

A fração enriquecida foi obtida mediante fracionamento e purificação do extrato seco do barbatimão. Esse procedimento envolveu dissolução do extrato seco seguido de purificação em coluna de sílica e cromatografia de partição líquido-líquido, realizado no Laboratório de Fitoquímica da Faculdade de Farmácia (Universidade Federal de Minas Gerais), sob a coordenação da Prof^ª. Dra. Rachel Oliveira Castilho. A fração purificada foi cedida ao Prof. Dr. André Augusto Gomes Faraco (Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Faculdade de Farmácia, UFMG), quem a incorporou ao dispositivo

polimérico (filme de quitosana), mediante solubilização em álcool etílico P.A. (Merck, Rio de Janeiro, RJ), seguida de dispersão na solução polimérica. Após realização de secagem da dispersão, os filmes foram obtidos e cortados no dimensionamento adequado para aplicação nos animais testados.

3.2.5 - Confeção do defeito cutâneo dorsal:

Os animais foram anestesiados com a solução de 80mg/Kg de quetamina (Ketamina Agener® 10%, Agener União, Embu-Guaçu, SP) associada à 8mg/Kg de xilazina, (Xilasina 2%, Calmium®, Agener União, Embu-Guaçu, SP) pela via intramuscular no quarto traseiro esquerdo. Após antissepsia com digluconato de clorexidina 2,0% (Handex Degermante®, Laboratório Famacêutico Ltda, Brasília, DF) e álcool etílico a 70% (Miyako do Brasil Ind. Com. Ltda, Guarulhos, SP), foi realizada depilação com lâmina de barbear. Os defeitos cutâneos dorsais circulares foram confeccionados, utilizando-se *punch* de dois centímetros de diâmetro (Fig 03).



Figura 03 - Fotografia do *punch* metálico de dois centímetros de diâmetro utilizado para a confecção das feridas.

Os perímetros de circunferência dos defeitos criados foram tangenciais aos ângulos inferiores das escápulas (Fig 04). O procedimento foi realizado utilizando-se técnica asséptica, com autoclavagem do instrumental cirúrgico. Ao término da operação, foi administrado acetaminofenol em solução oral (Tylenol®, Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP) na dose de 2 mg/ml na água do bebedouro, durante 48 horas.

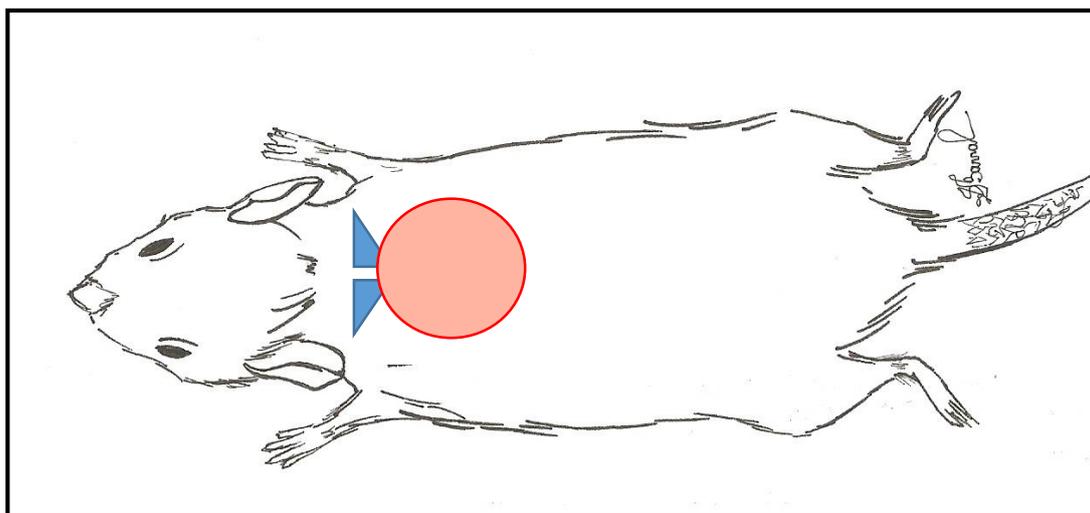


Figura 04 - Esquema gráfico representando a ferida cutânea posicionada no dorso do rato, de modo que o perímetro da circunferência tangenciasse os ângulos inferiores das escápulas do animal.

3.2.6 - Aplicação da cobertura primária e da cobertura secundária:

A cobertura primária (filme de quitosana, filme de quitosana associado ao barbatimão, hidrocolóide ou tiras de luvas cirúrgicas) foi colocada sobre o ferimento do dorso do animal, imediatamente após a sua confecção (Fig 05). Previamente à sua colocação sobre o leito da ferida, a cobertura primária foi hidratada em solução salina estéril (SF, 0,9% Isofarma Industrial Farmacêutica, Fortaleza, CE), durante 15 minutos. Sobre ela, foi sobreposta uma cobertura secundária de gaze estéril (América Medical LTDA, Curvelo, MG), que foi fixada à pele do animal por meio de curativo de Brown ou *tie over* modificado ⁹, utilizando-se sutura contínua do tipo chuleio com náilon monofilamentar 4.0 (Ethicon®, Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP, Brasil), com uma distância mínima de 0,5 cm dos pontos às bordas da ferida (Fig 06). Tanto a cobertura primária quanto a secundária permaneceram no leito da ferida até o terceiro dia pós-operatório, quando foram substituídas (Fig 07). No terceiro dia pós-operatório, foram coletadas amostras teciduais para análise microscópica, no hemisfério inferior da ferida, e uma nova cobertura primária foi colocada sobre o leito cicatricial de acordo com o grupo a que pertencia cada animal (Figs 08 e 09). A cobertura secundária (gaze estéril) foi fixada da mesma maneira como descrita anteriormente, utilizando-se o curativo de Brown. No oitavo dia pós-operatório, outra biopsia da ferida foi feita, dessa vez no hemisfério superior, e os animais foram posteriormente submetidos à eutanásia. Para a troca de curativo e coleta das biopsias de pele, os animais foram sedados com solução de quetamina na dose de 80 mg/Kg (Ketamina Agener®10%, Agener União, Embu-Guaçu, SP), associada a xilazina na dose de 8 mg/Kg (Xilasina 2%, Calmium®, Agener União, Embu-Guaçu, SP), através da via intramuscular no quarto traseiro direito.

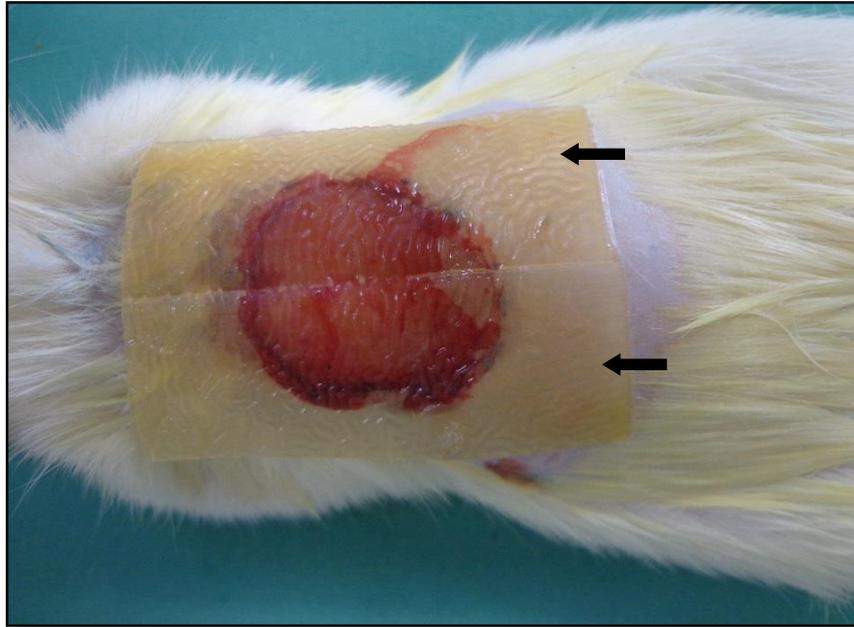


Figura 05 - Fotografia de rato em decúbito ventral, com as patas em extensão. Observar a cobertura de hidrocolóide (setas) posicionada sobre a ferida cutânea, imediatamente após a sua confecção.



Figura 06 - Fotografia de rato em decúbito ventral, com as patas em extensão. Observar a cobertura secundária (gaze estéril) posicionada sobre o dorso do animal e fixada com curativo de Brown ou “tie-over” modificado (setas).

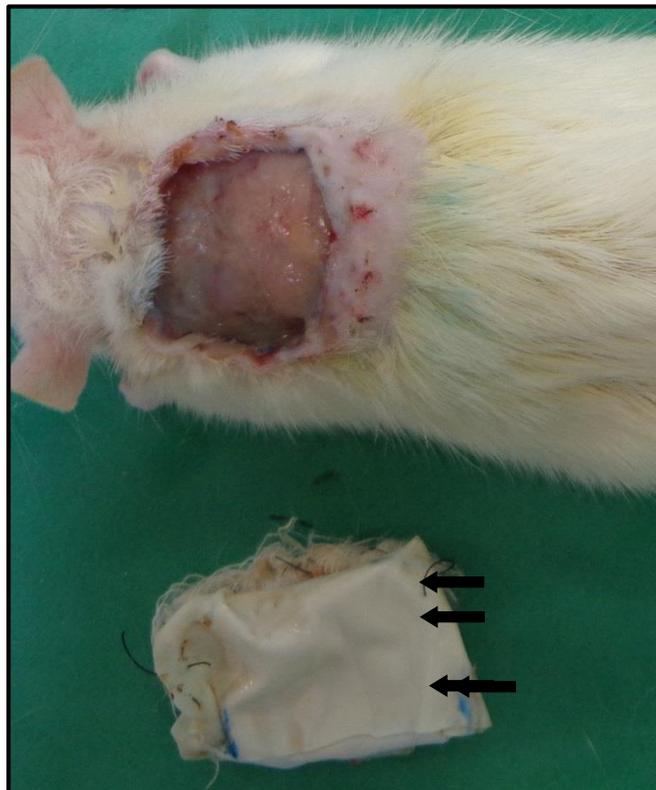


Figura 07 - Fotografia de rato em decúbito ventral, com as patas em extensão. Observar a cobertura de tira de luvas cirúrgica posicionada ao lado do animal (setas), no momento da sua retirada, terceiro dia pós-operatório.

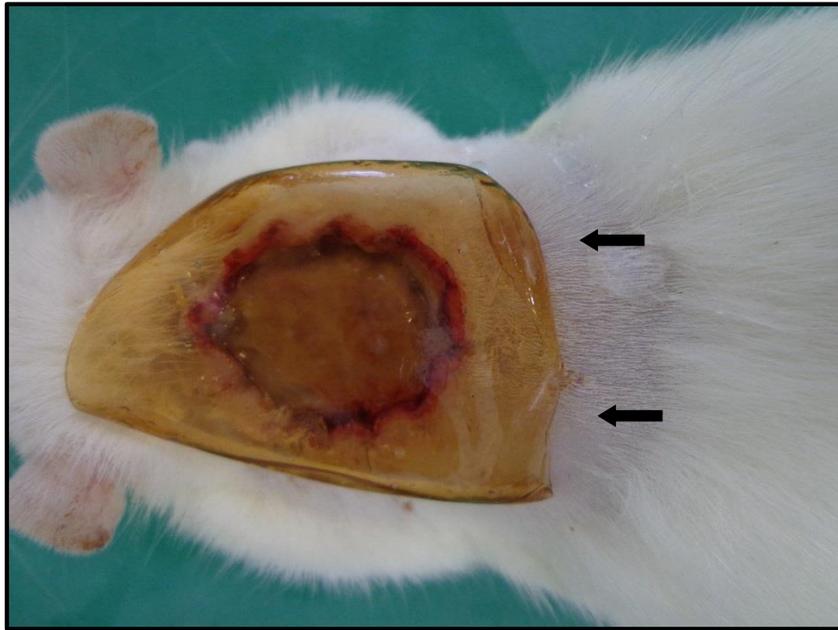


Figura 08 - Fotografia de rato em decúbito ventral, com as patas em extensão. Observar a cobertura de filme de quitosana/barbatimão posicionada sobre a ferida cutânea (setas), no terceiro dia pós-operatório (troca da cobertura).

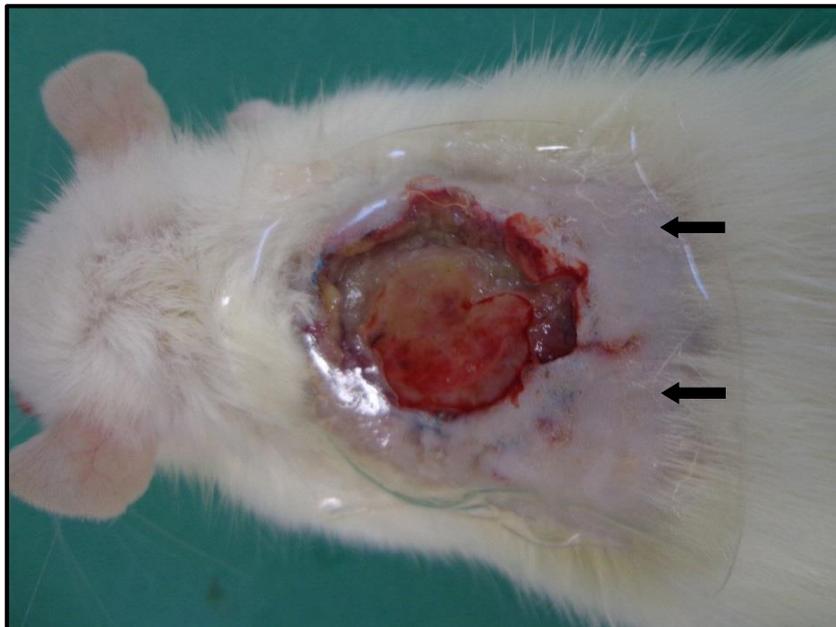


Figura 09 - Fotografia de rato em decúbito ventral, com as patas em extensão. Observar a cobertura de filme de quitosana posicionada sobre a ferida cutânea (setas), no terceiro dia pós-operatório (troca da cobertura).

3.2.7 - Coleta das amostras:

Em cada animal, foi traçada uma linha imaginária dividindo a ferida simetricamente em dois hemisférios: superior e inferior, utilizando-se o maior diâmetro cefalocaudal como referência (Fig 10).

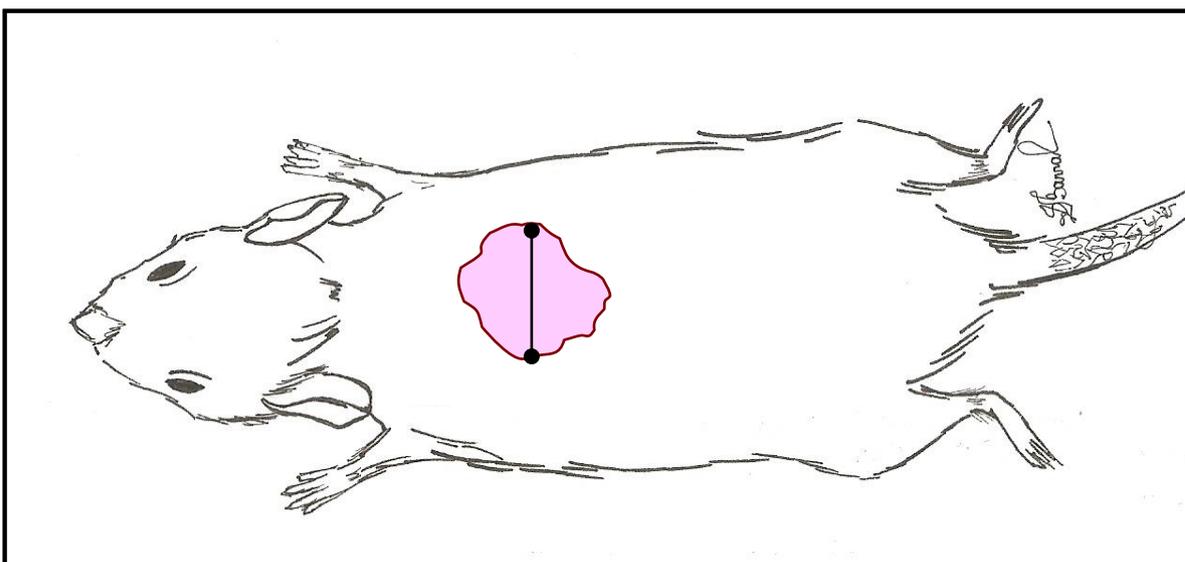


Figura 10 - Esquema gráfico representado a divisão da ferida cutânea em dois hemisférios: superior e inferior, a partir de uma linha imaginária. Como referência, tomou-se o maior diâmetro cefalocaudal.

No terceiro dia pós-operatório, foi coletada uma amostra de 0,5 cm X 0,5 cm, localizada na extremidade caudal do hemisfério inferior, margeando a borda da ferida, tomando como referência o maior diâmetro céfalo-caudal. No oitavo dia pós-operatório a amostra tecidual de 0,5 cm X 0,5 cm foi coletada margeando a borda superior da ferida, também com referência no maior diâmetro céfalo-caudal (Fig. 11).

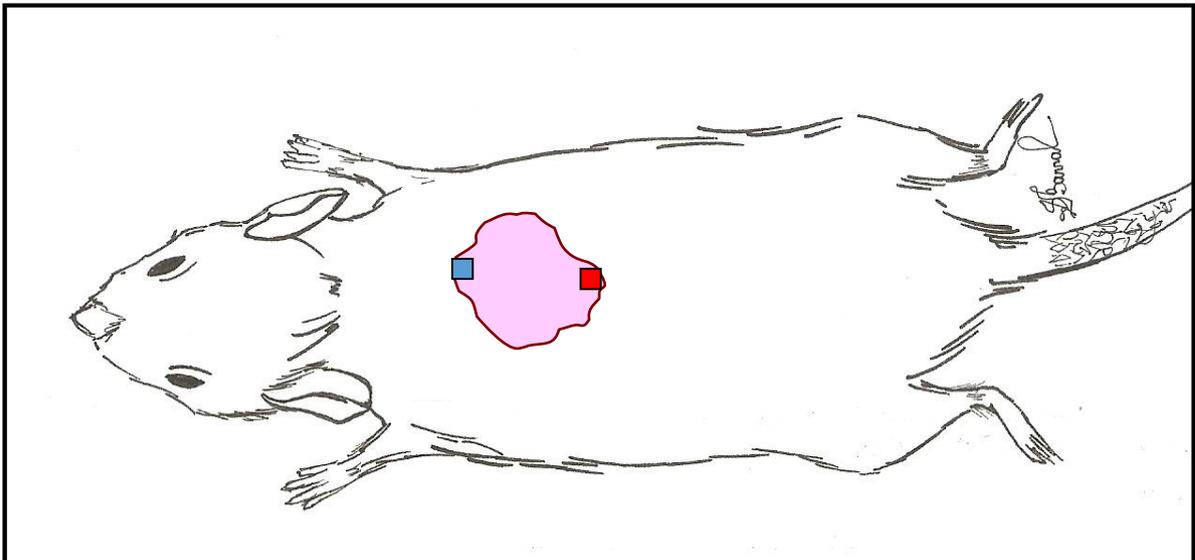


Figura 11 - Esquema gráfico representado a ferida cutânea no dorso do rato no momento da biopsia. Uma linha imaginária traçada no maior diâmetro cefalocaudal determinou o local de retirada das biopsias. Em vermelho está representado o fragmento tecidual ressecado no terceiro dia pós-operatório e em azul, aquele retirado no oitavo dia pós-operatório.

A biopsia do leito da ferida foi realizada utilizando-se técnica asséptica, com autoclavagem do instrumental cirúrgico. Ao término da operação, foi administrado acetaminofenol em solução oral (Tylenol®, Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP) na dose de 2 mg/ml na água do bebedouro, durante 48 horas.

As amostras de tecido foram embebidas em formol tamponado neutro a 10% (Amphora, Belo Horizonte, MG), submetidas a desidratação com álcool, diafanização em xilol e inclusão em parafina. Os blocos de parafina foram cortados em micrótomos com espessura variando de 4 a 6 micrômetros e as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina.

3.2.8 - Eutanásia:

No oitavo dia de observação, os animais foram submetidos à eutanásia, por superdosagem anestésica de pentobarbital sódico na dose de 150mg/Kg, administrado pela via intraperitoneal (Thiopentax, Cristália, Itapira, SP), seguindo as recomendações da Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFMG²⁵.

3.2.9 - Documentação fotográfica:

As feridas foram fotografadas no terceiro e no oitavo dia pós-operatório. Os animais foram colocados individualmente em decúbito ventral sobre um suporte de cor verde. Foi utilizada câmera digital com resolução de 14,1 Mega Pixels (Cyber-shot® DSC-W350, Sony Brasil Ltda, Manaus, AM) posicionada por meio de tripé sobre cada animal, a uma distância de 17 cm do suporte. A câmera foi posicionada de maneira a capturar as imagens dos animais a partir do tronco, excluindo-se a região dos olhos dos animais. O modo de ajuste automático sem iluminador foi utilizado associado com a função Macro em todos os animais.

3.2.10 - Representação gráfica:

Imediatamente após a confecção do defeito de pele, no terceiro e no oitavo dia pós-operatório, as bordas dos leitos das feridas cutâneas foram delineadas, utilizando-se lâminas transparentes de acetato e caneta marcadora permanente. Os desenhos foram feitos por avaliador que desconhecia a que grupo pertencia cada animal.

3.2.11 - Avaliação macroscópica:

As figuras foram colocadas sobre papel milimetrado e digitalizadas (Multifuncional Hewlett-Packard Brasil, Deskjet F4180, São Paulo, SP), com a resolução de 600 ppi. O documento digital foi analisado com o auxílio do programa AutoCAD Release (Versão 18.0, 2009) de maneira a se plotar os perímetros das imagens obtidas e, a partir daí, se calcular as respectivas áreas, com até quatro casas decimais de aproximação (Fig 12).

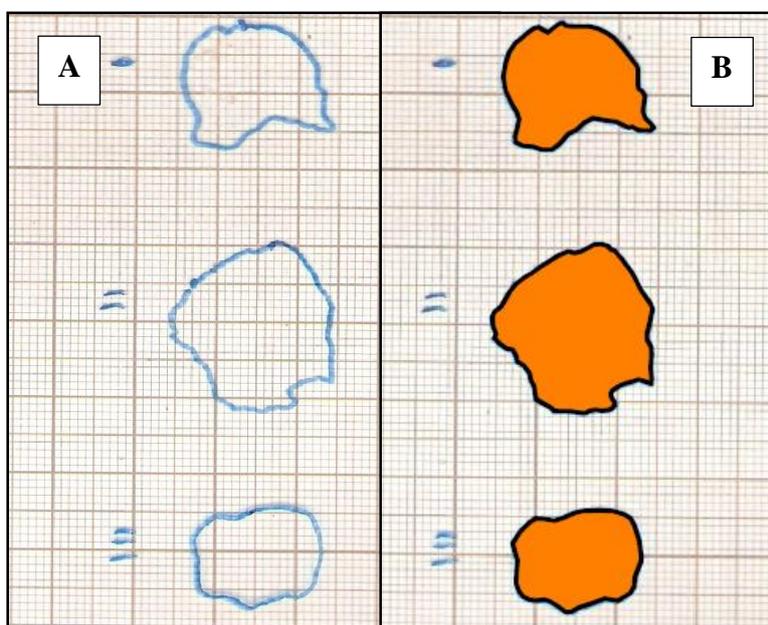


Figura 12 – (A) Imagem digitalizada da lâmina de retroprojeter: em azul, as bordas das feridas delineadas com caneta marcadora permanente. (B) Imagem reproduzida do programa AutoCAD Release: em preto, a plotagem dos perímetros; em alaranjado, as áreas preenchidas para o cálculo com até quatro casas decimais de aproximação.

Para o cálculo das áreas, figuras planas foram delineadas a partir do traçado de segmentos de reta suficientemente curtos para se acompanhar a irregularidade dos contornos das feridas. Dessa forma, a figura irregular foi convertida em um polígono fechado e determinado o seu perímetro, desprezando-se a espessura do seu contorno. Ademais, cada um de seus vértices foi determinado por coordenadas precisas. A área então foi precisada por meio do cálculo de matrizes, utilizando-se tais coordenadas.

Essa etapa do estudo foi conduzida por pesquisador que desconhecia a que grupo pertencia as representações gráficas das feridas cutâneas.

3.2.12 - Cálculo das taxas de cicatrização:

As taxas de cicatrização foram calculadas utilizando-se o índice de cicatrização, representado na fórmula a seguir:

$$TC = \frac{100 \times (A_i - A_f)}{A_i}$$

Na qual TC é a taxa de cicatrização, Af é a área final da ferida e Ai é a área inicial da ferida. Considerou-se como Ai, a área inicial da ferida imediatamente após a sua confecção e como Af, a área final da ferida, calculada no terceiro ou no oitavo dia pós-operatório.

Essa equação infere que quanto maior a diferença entre da área inicial e a área final da ferida, maior é a cicatrização obtida. A divisão dessa diferença pelo valor da área inicial da ferida e a sua multiplicação por 100 foi utilizada para se obter um dado percentual.

Foram denominadas Taxas de Cicatrização Precoces (TCP) aquelas observadas no terceiro dia pós-operatório e Taxas de Cicatrização Tardia (TCT) aquelas correspondentes ao oitavo dia pós-operatório.

Calcularam-se também as diferenças entre as taxas de cicatrização tardias e as taxas de cicatrização precoces.

3.2.13 - Avaliação microscópica morfológica:

As lâminas foram avaliadas por meio de microscopia óptica com um aumento de 200 X, por um médico patologista que desconhecia a que grupo pertencia cada amostra. Foram avaliados dez campos consecutivos por lâmina. As amostras foram classificadas de maneira semelhante àquela utilizada por Vizzotto e cols²⁶, nos seguintes critérios (Figs 13 – 25):

- I) Inflamação:
 - 1- Ausente;
 - 2- Leve;
 - 3- Moderada;
 - 4- Acentuada.

- II) Infiltrado Inflamatório:
 - 1- Ausente;
 - 2- Mononuclear;
 - 3- Polimorfonuclear;
 - 4- Misto.

III) Granulação:

- 1- Ausente;
- 2- Leve;
- 3- Moderada;
- 4- Acentuada.

IV) Angiogênese:

- 1- Ausente;
- 2- Leve;
- 3- Moderada;
- 4- Acentuada.

V) Deposição de Colágeno Jovem:

- 1- Ausente;
- 2- Leve;
- 3- Moderada;
- 4- Acentuada.

VI) Reação Gigantocelular:

- 1- Ausente;
- 2- Leve;
- 3- Moderada;
- 4- Acentuada.

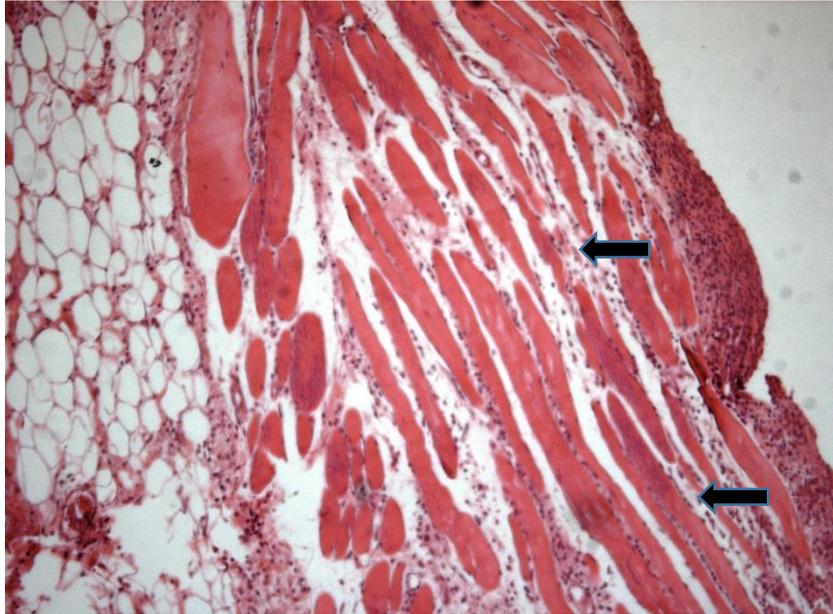


Figura 13 - Fotomicrografia de corte histológico da borda cutânea de rato, corado com hematoxilina e eosina, analisado com microscopia óptica no aumento de 200X. Observar infiltrado inflamatório classificado como Leve (setas).

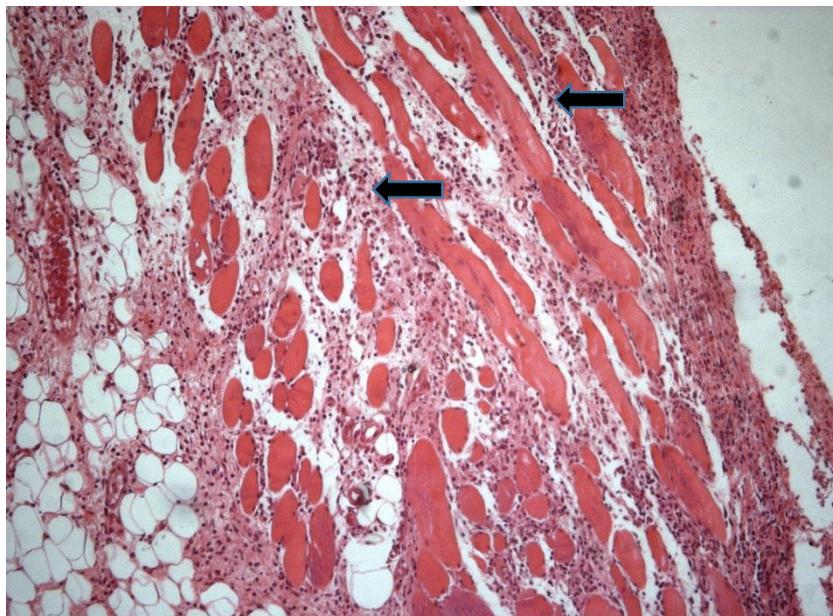


Figura 14 - Fotomicrografia de corte histológico da borda cutânea de rato, corado com hematoxilina e eosina, analisado com microscopia óptica no aumento de 200X. Observar infiltrado inflamatório classificado como Moderado (setas).

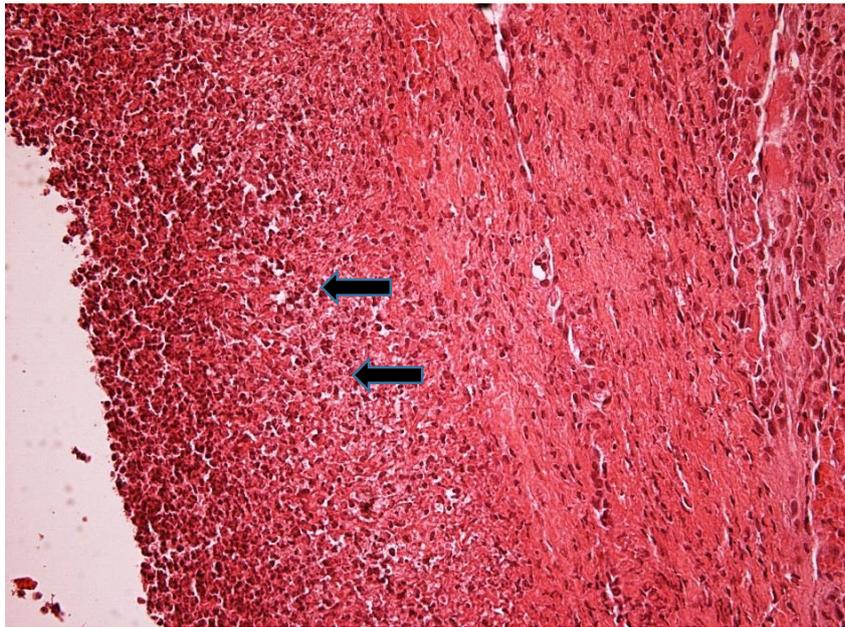


Figura 15 - Fotomicrografia de corte histológico da borda cutânea de rato, corado com hematoxilina e eosina, analisado com microscopia óptica no aumento de 200X. Observar infiltrado inflamatório classificado como Acentuado (setas).

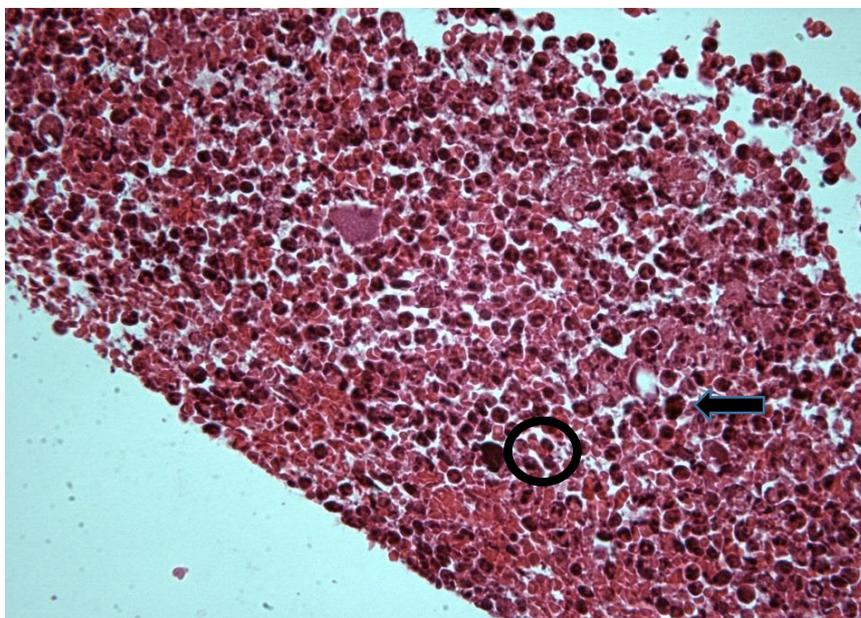


Figura 16 - Fotomicrografia de corte histológico da borda cutânea de rato, corado com hematoxilina e eosina, analisado com microscopia óptica no aumento de 400X. Observar infiltrado inflamatório do tipo misto, com a presença de célula polimorfonuclear (seta) e de célula mononuclear (círculo).

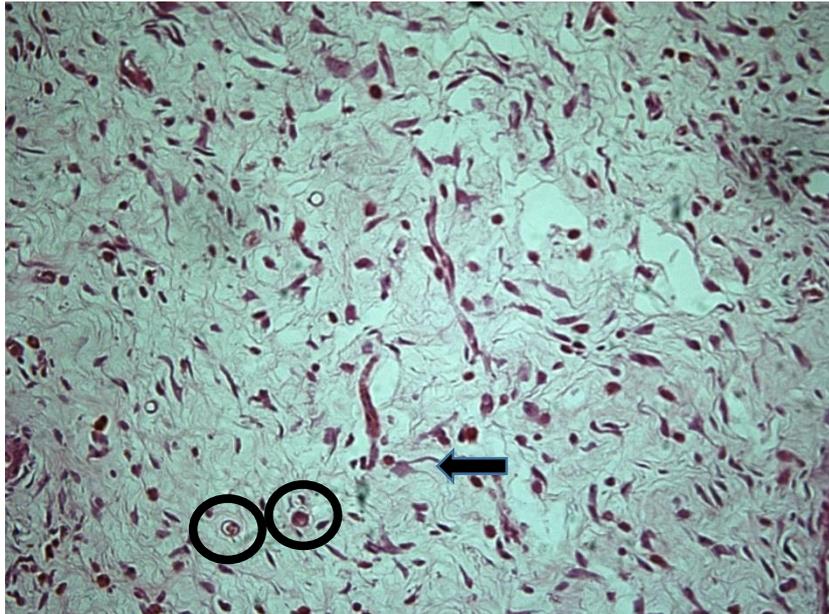


Figura 17 - Fotomicrografia de corte histológico da borda cutânea de rato, corado com hematoxilina e eosina, analisado com microscopia óptica no aumento de 200X. Observar o tecido de granulação classificado como Leve, com a presença de fibroblastos (seta) e de vasos neoformados (círculos).

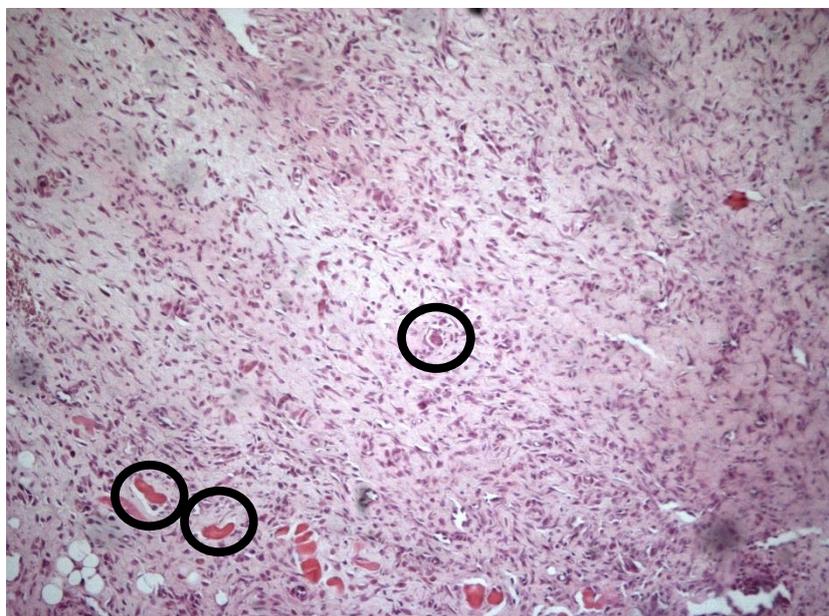


Figura 18 - Fotomicrografia de corte histológico da borda cutânea de rato, corado com hematoxilina e eosina, analisado com microscopia óptica no aumento de 200X. Observar o tecido de granulação classificado como Moderado, com a presença de vasos neoformados (círculos).

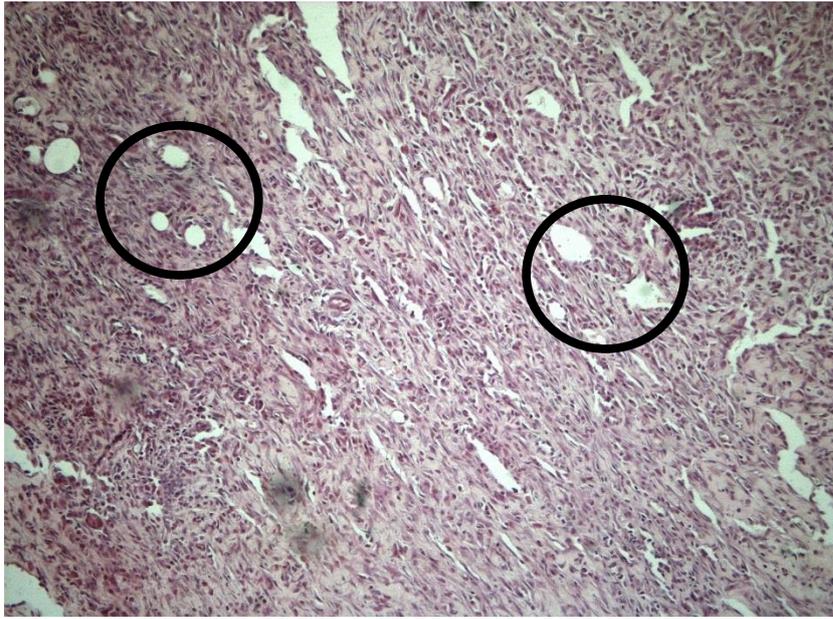


Figura 19 - Fotomicrografia de corte histológico da borda cutânea de rato, corado com hematoxilina e eosina, analisado com microscopia óptica no aumento de 200X. Observar o tecido de granulação classificado como Acentuado, com a presença de vários vasos neoformados (círculos).

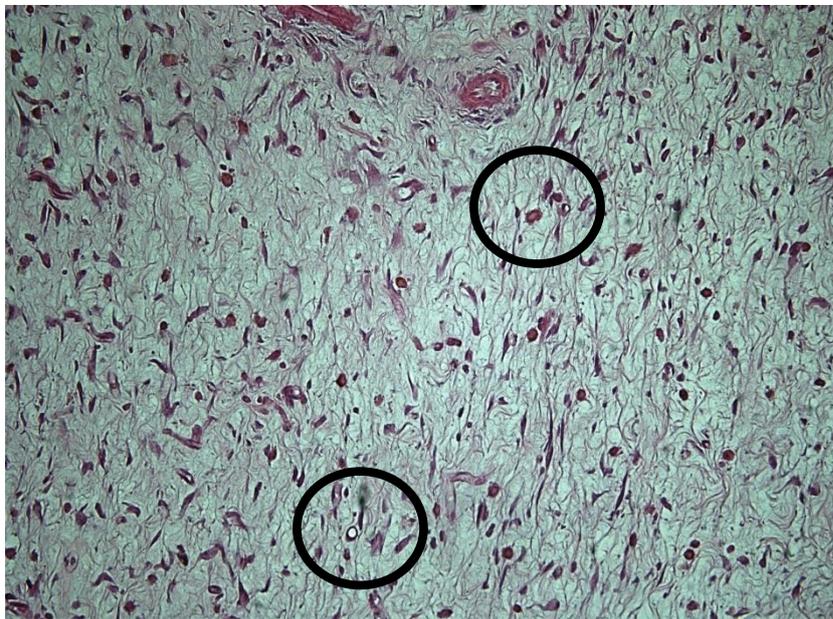


Figura 20 - Fotomicrografia de corte histológico da borda cutânea de rato, corado com hematoxilina e eosina, analisado com microscopia óptica no aumento de 200X e classificado como Angiogênese do tipo Leve, com a presença de poucos vasos por campo (círculos).

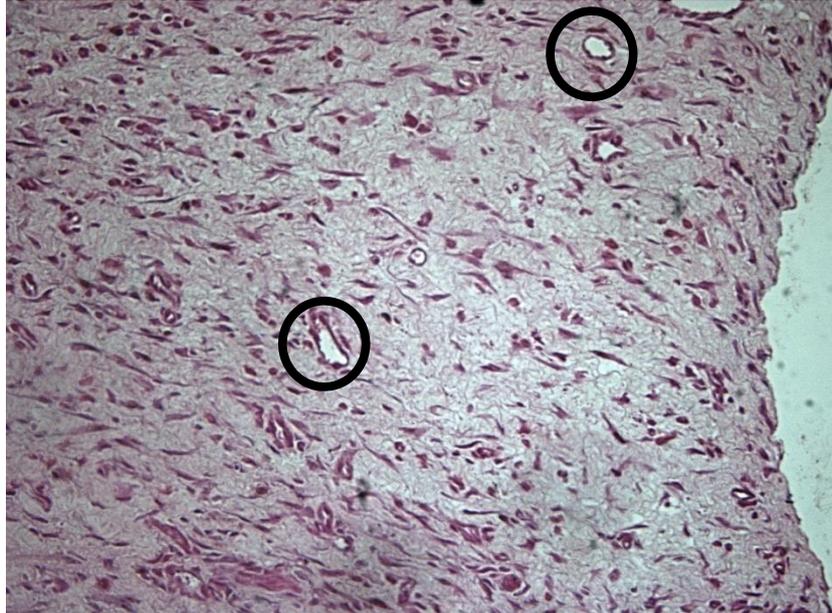


Figura 21 - Fotomicrografia de corte histológico da borda cutânea de rato, corado com hematoxilina e eosina, analisado com microscopia óptica no aumento de 200X e classificado como Angiogênese do tipo Moderada, com a presença de alguns vasos por campo (círculos).

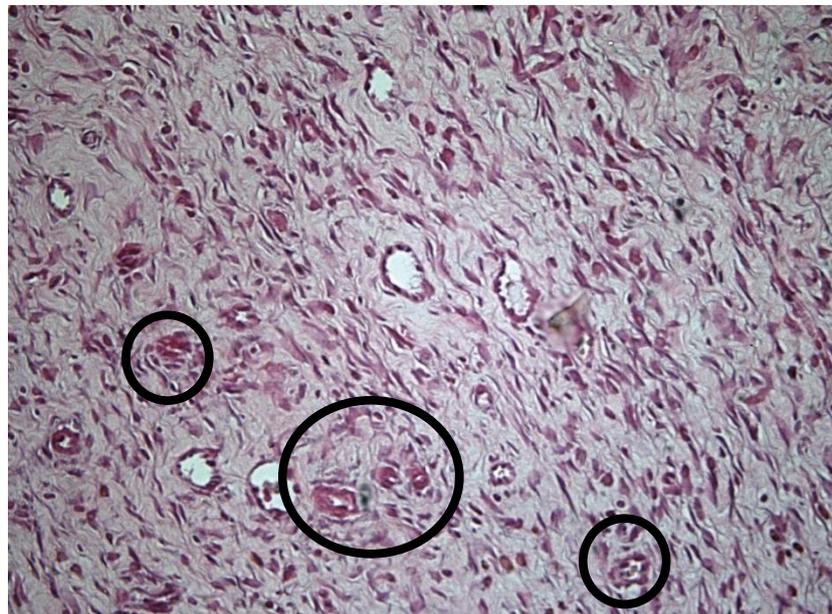


Figura 22 - Fotomicrografia de corte histológico da borda cutânea de rato, corado com hematoxilina e eosina, analisado com microscopia óptica no aumento de 200X e classificado como Angiogênese do tipo Acentuada, com a presença de muitos vasos por campo (círculos).

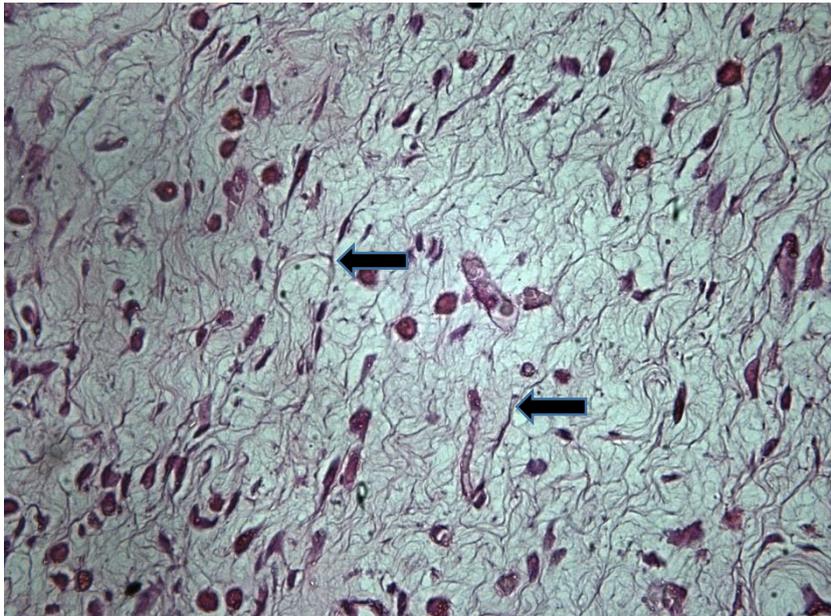


Figura 23 - Fotomicrografia de corte histológico da borda cutânea de rato, corado com hematoxilina e eosina, analisado com microscopia óptica no aumento de 200X e classificado como Deposição de Colágeno do tipo Leve, com a presença de poucas fibras colágenas por campo (setas).

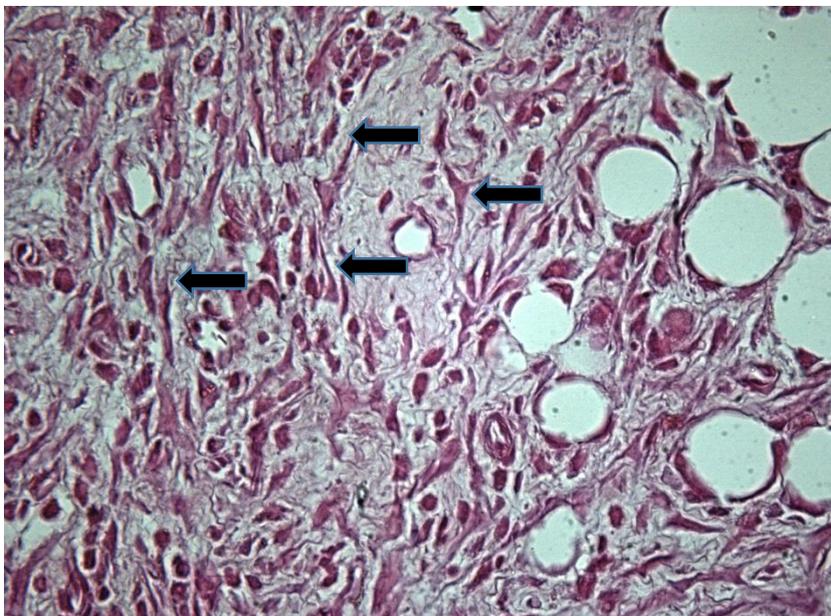


Figura 24 - Fotomicrografia de corte histológico da borda cutânea de rato, corado com hematoxilina e eosina, analisado com microscopia óptica no aumento de 200X e classificado como Deposição de Colágeno do tipo Moderada, com a presença de algumas fibras colágenas por campo (setas).

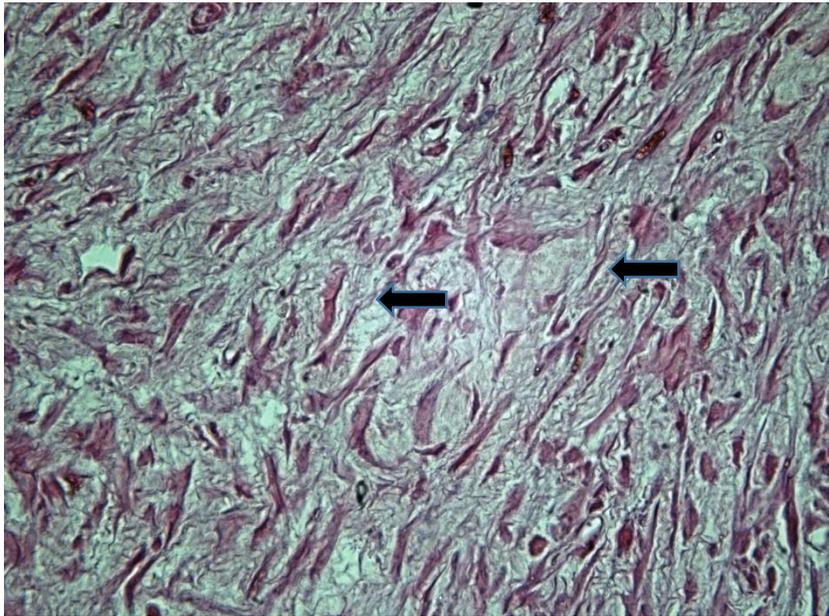


Figura 25 - Fotomicrografia de corte histológico da borda cutânea de rato, corado com hematoxilina e eosina, analisado com microscopia óptica no aumento de 200X e classificado como Deposição de Colágeno do tipo Acentuada, com a presença de várias fibras colágenas por campo (setas).

3.2.14 - Análise Estatística:

A análise estatística foi feita com o auxílio do Núcleo de Apoio à Estatística da Faculdade de Medicina (UFMG), utilizando-se o programa SPSS, versão 13.0.

A) Análise das taxas de cicatrização e das diferenças entre as taxas de cicatrização tardia e precoce:

Os testes de normalidade, Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk foram utilizados para se verificar o modo de distribuição das amostras. Para avaliar as taxas de Cicatrização Precoce, foi utilizada a Análise de Variância Simples (ANOVA), e posteriormente o Teste T de Student, comparando-se os grupos dois a dois. Considerou-se como significativo o valor de $p < 0,05$.

Para a avaliação da Taxa de Cicatrização Tardia foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, e o agrupamento dois a dois, com o teste de Mann-Whitney, considerando como significativo o valor de $p < 0,05$.

Para a avaliação da diferença entre a Taxa de Cicatrização Tardia e a Taxa de Cicatrização Precoce, foi utilizada a Análise de Variância Simples (ANOVA), e posteriormente o Teste T de Student, comparando-se os grupos dois a dois. Considerou-se como significativo o valor de $p < 0,05$.

B) Análise dos dados coletados a partir da avaliação microscópica morfológica:

Os critérios Inflamação, Infiltrado Inflamatório, Granulação, Angiogênese, Deposição de Colágeno Jovem, e Reação Gigantocelular foram analisados para cada uma das gradações (ausente, leve, moderado, acentuado) ou para as especificações: ausente, mononuclear, polimorfonuclear ou misto quando o infiltrado inflamatório foi avaliado. Foi utilizado o teste do Qui-quadrado, considerando significativo $p < 0,05$.

4. RESULTADOS:

4.1 – Avaliação macroscópica:

As médias, medianas e desvios-padrão das porcentagens de cicatrização precoce e tardia de cada grupo estão descritos na Tabela 01 (Apêndice). Os valores negativos indicam que houve aumento das áreas das feridas.

4.1.1- Avaliação das Taxas de Cicatrização Precoce:

O grupo QB apresentou maiores taxas de cicatrização precoce do que o grupo H ($p=0,002$), do que o grupo Q ($p=0,025$) e do que o grupo L ($p=0,000$).

Ao se comparar os grupos Q e L, observou-se que o grupo Q apresentou maiores taxas de cicatrização precoce do que o grupo L ($p=0,008$).

Não foi observada diferença significativa ao se comparar os grupos H com o grupo Q, nem o grupo H com o grupo L (Graf 01 e Tab 01).

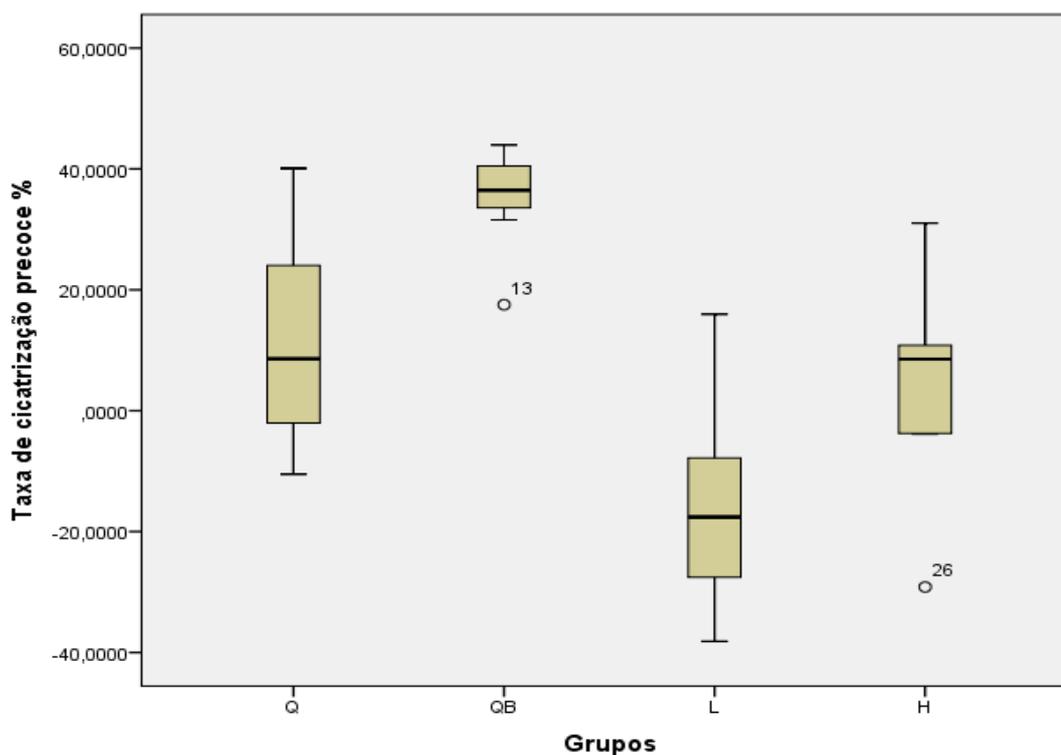


Gráfico 01 - Comparação das Taxas de Cicatrização Precoce (em valores percentuais) entre os grupos Q, QB, L e H.

4.1.2- Avaliação das Taxas de Cicatrização Tardia:

O grupo QB apresentou maiores taxas de cicatrização tardia do que o grupo H ($p=0,015$), do que o grupo Q ($p=0,000$) e do que o grupo L ($p=0,000$).

Comparando-se as taxas de cicatrização tardia entre os grupos H e Q observou-se que houve maior fechamento da ferida no grupo H ($p=0,010$). O grupo H também apresentou maiores taxas de cicatrização tardia do que o grupo L ($p=0,000$).

Por outro lado, ao se comparar os grupos Q e L, observaram-se maiores taxas de cicatrização tardia no grupo Q ($p=0,002$), Graf 02 e Tab 02.

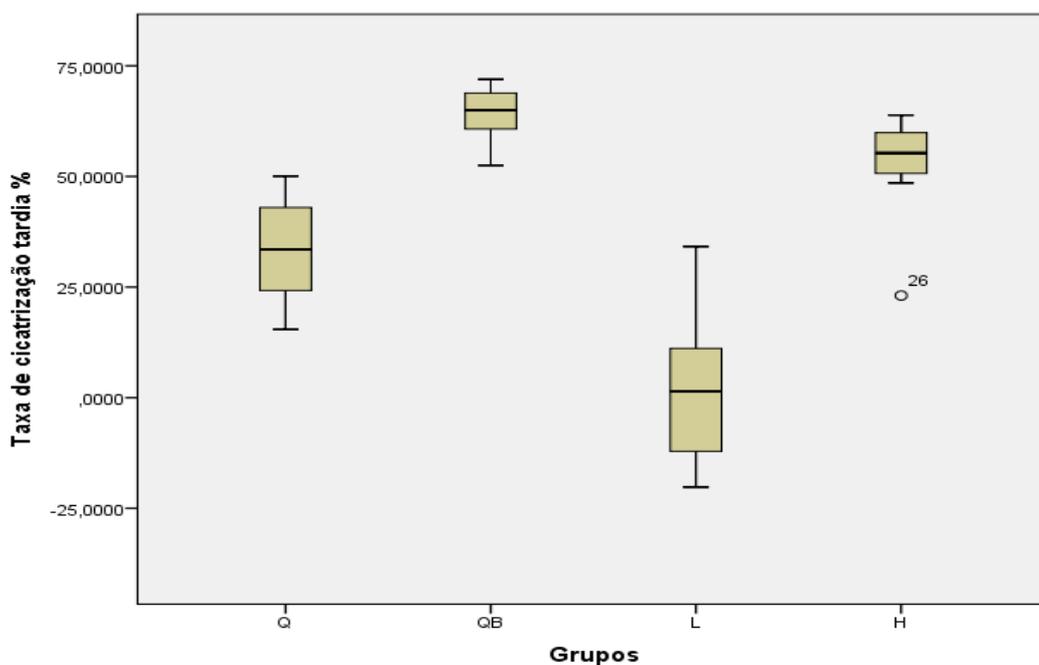


Gráfico 02 - Comparação das Taxas de Cicatrização Tardia (em valores percentuais) entre os grupos Q, QB, L e H.

4.1.3- Avaliação da diferença entre a taxa de cicatrização tardia e a taxa de cicatrização precoce:

As médias, medianas, valores mínimos, valores máximos e desvios-padrão das diferenças entre a taxas de cicatrização tardia e precoce, para cada grupo, estão descritos na Tabela 02 (Apêndice).

O grupo H apresentou maior diferença entre a taxa de cicatrização tardia e a precoce, quando comparado ao grupo Q, ao grupo QB e ao grupo L, separadamente ($p=0,000$; $p=0,002$ e $p=0,000$ respectivamente), Graf 03.

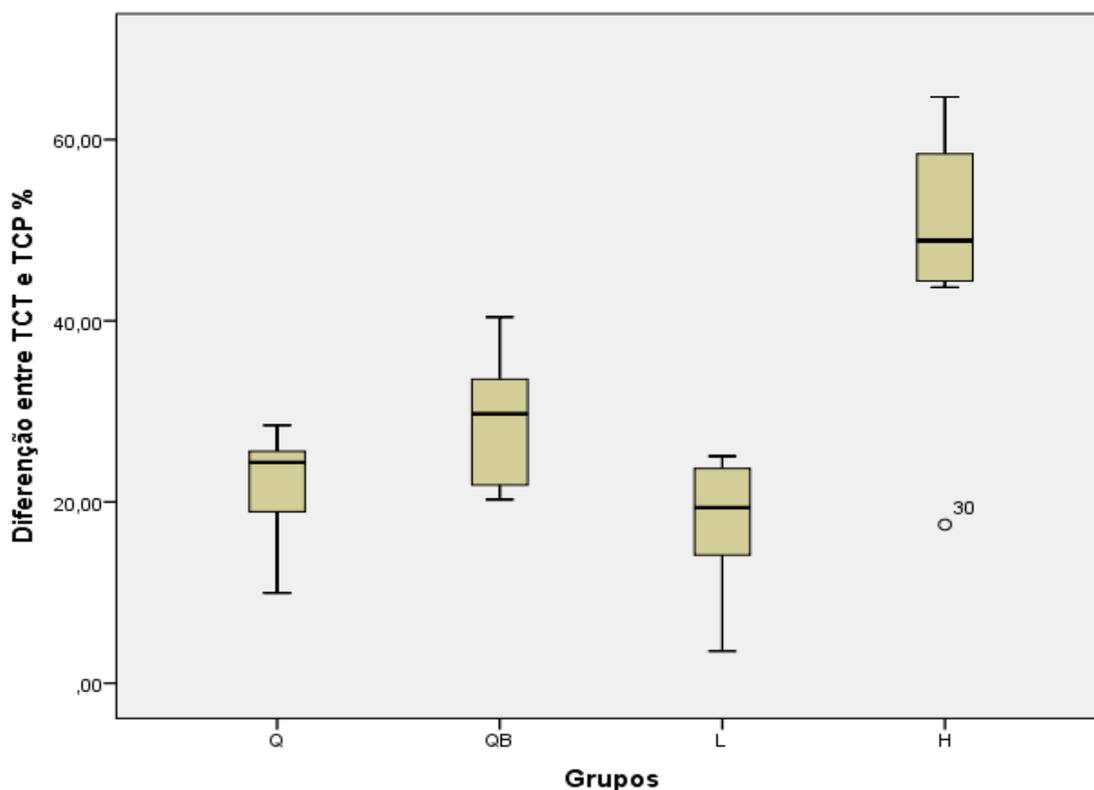


Gráfico 03 - Comparação das Médias e das Medianas das diferenças entre as Taxas de Cicatrização Tardia (TCT) e Taxas de Cicatrização Precoce (TCP), em valores percentuais, entre os grupos Q, QB, L e H.

4.2- Avaliação histológica:

4.2.1- Avaliação da Cicatrização Precoce:

No terceiro dia pós-operatório, ao se comparar os critérios Inflamação, Infiltrado Inflamatório, Granulação, Angiogênese, Deposição de Colágeno Jovem e Reação Gigantocelular entre os grupos, observou-se que eles apresentaram diferença significativa para os quesitos: Inflamação, Infiltrado Inflamatório, Granulação e Angiogênese, conforme os gráficos 04, 05, 06, 07.

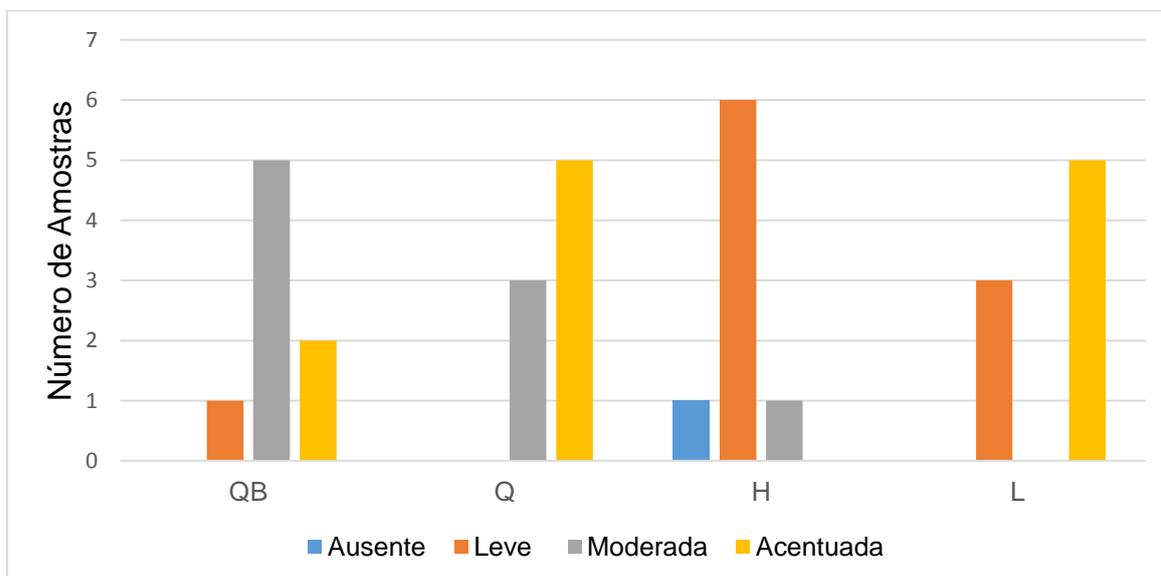


Gráfico 04 - Presença de inflamação e sua classificação em leve, moderada ou acentuada, para os grupos QB, Q, H e L ($p=0,001$) no terceiro dia pós-operatório.

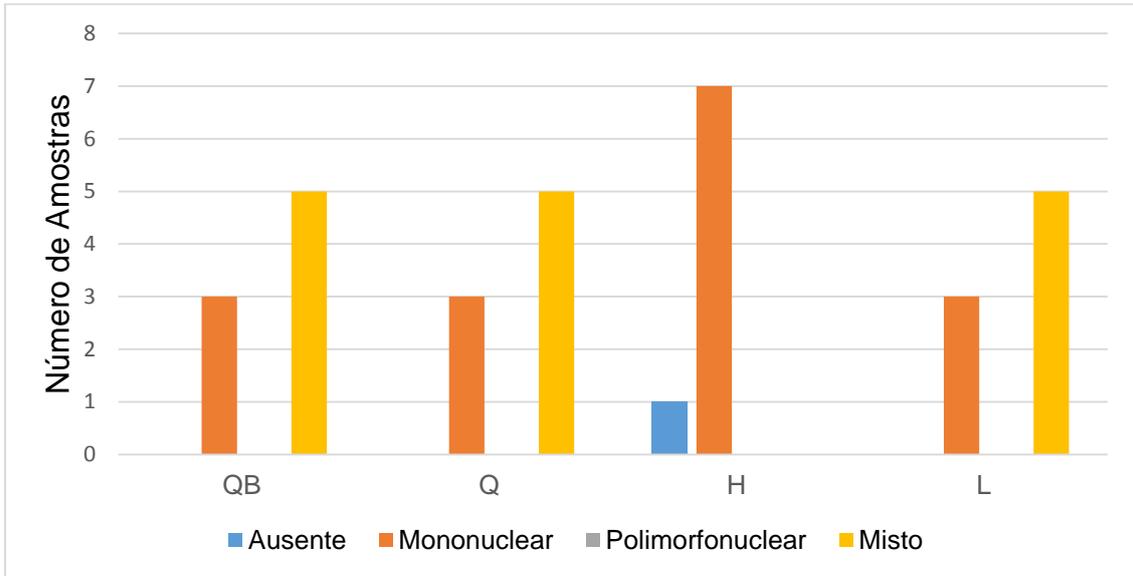


Gráfico 05 - Tipo predominante de infiltrado inflamatório ou a sua ausência, para os grupos QB, Q, H e L ($p=0,031$) no terceiro dia pós-operatório.

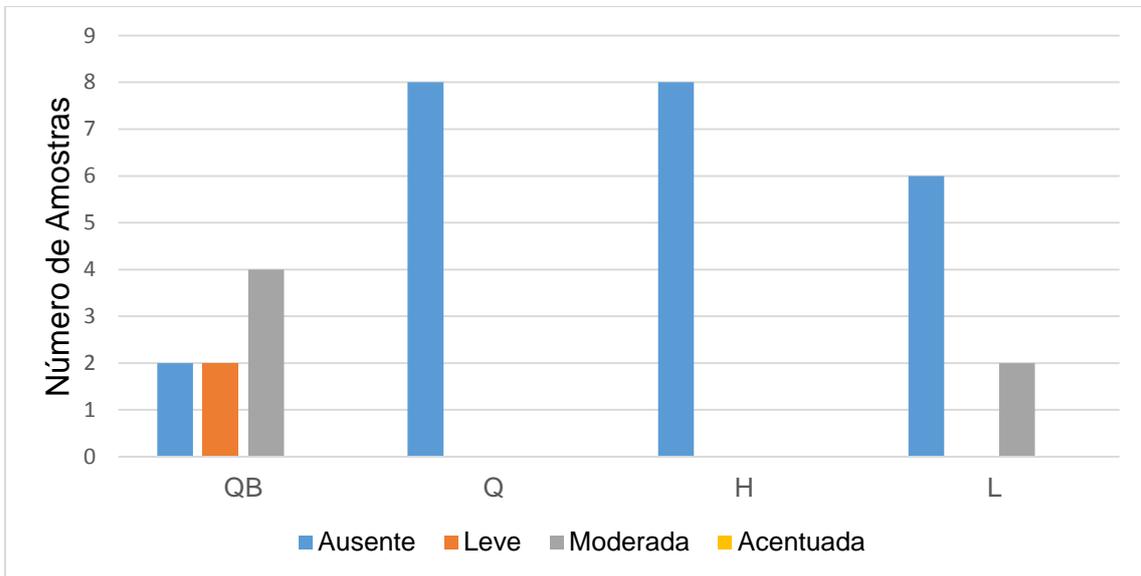


Gráfico 06 - Presença de tecido de granulação e sua classificação em ausente, leve, moderada ou acentuada para os grupos QB, Q, H e L ($p=0,002$) no terceiro dia pós-operatório.

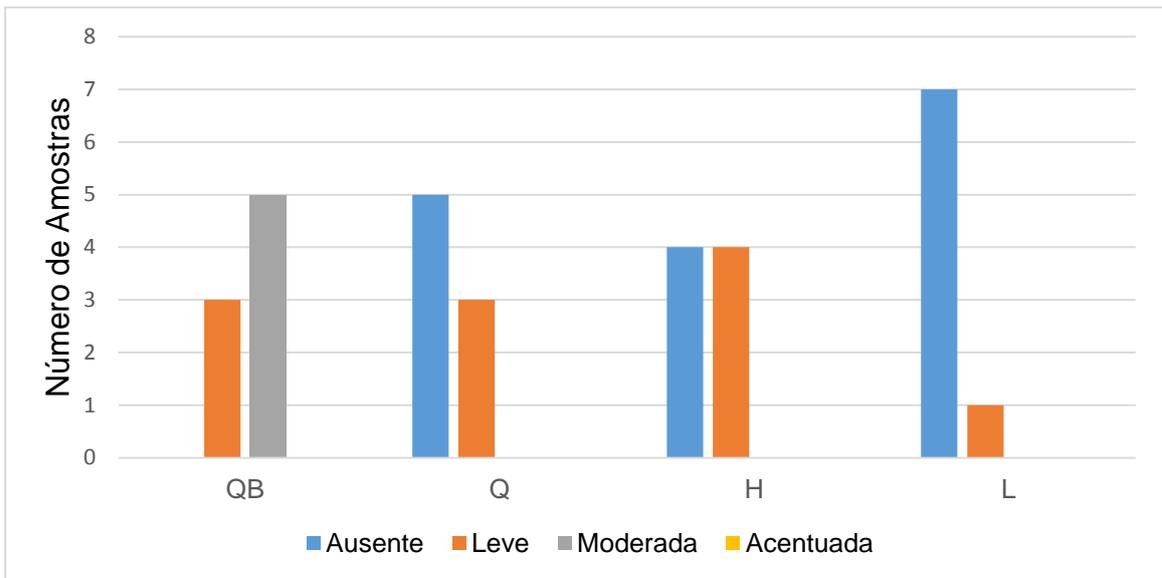


Gráfico 07 - Presença de angiogênese e sua classificação em ausente, leve, moderada ou acentuada para os grupos QB, Q, H e L ($p=0,001$) no terceiro dia pós-operatório

A) Inflamação:

No terceiro dia pós-operatório, todas as amostras dos grupos Q, QB e L apresentaram algum grau de inflamação, diferentemente do grupo H, que apresentou uma amostra com inflamação ausente.

O grupo H apresentou mais Inflamação Leve que o grupo Q ($p=0,007$) e do que o grupo QB ($p=0,041$) quando agrupados dois a dois (Graf 08).

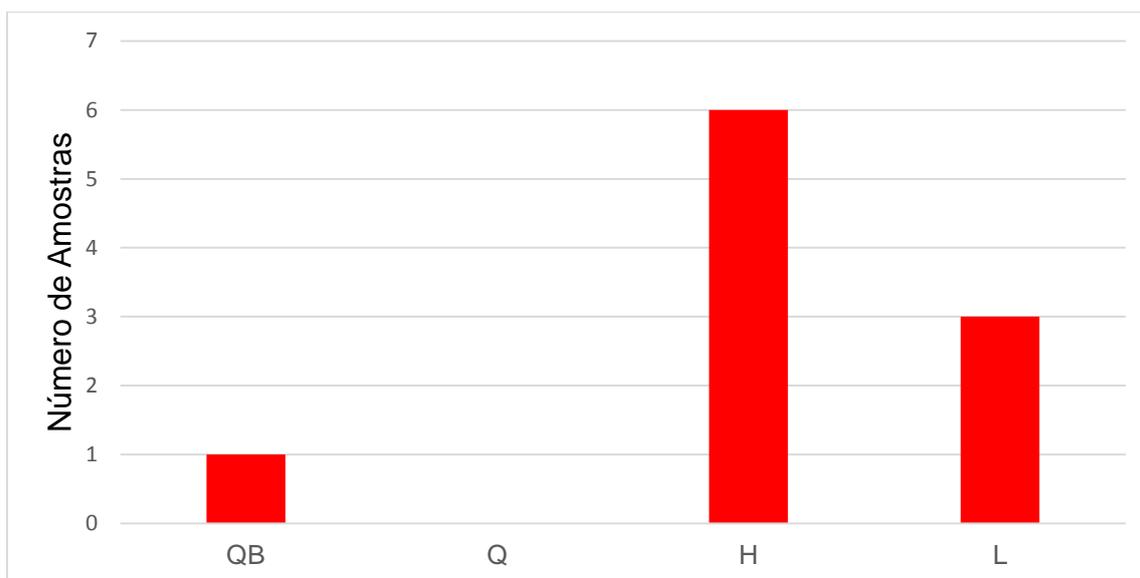


Gráfico 08 - Presença de Inflamação Leve no terceiro dia pós-operatório, comparando-se os grupos QB, Q, H e L dois a dois; $p=0,007$ quando comparados os grupos H e Q, $p=0,041$ quando comparados os grupos H e QB.

Quando avaliado o critério Inflamação Moderada, observou-se diferença somente entre os grupos QB e L ($p=0,026$), Graf 09.

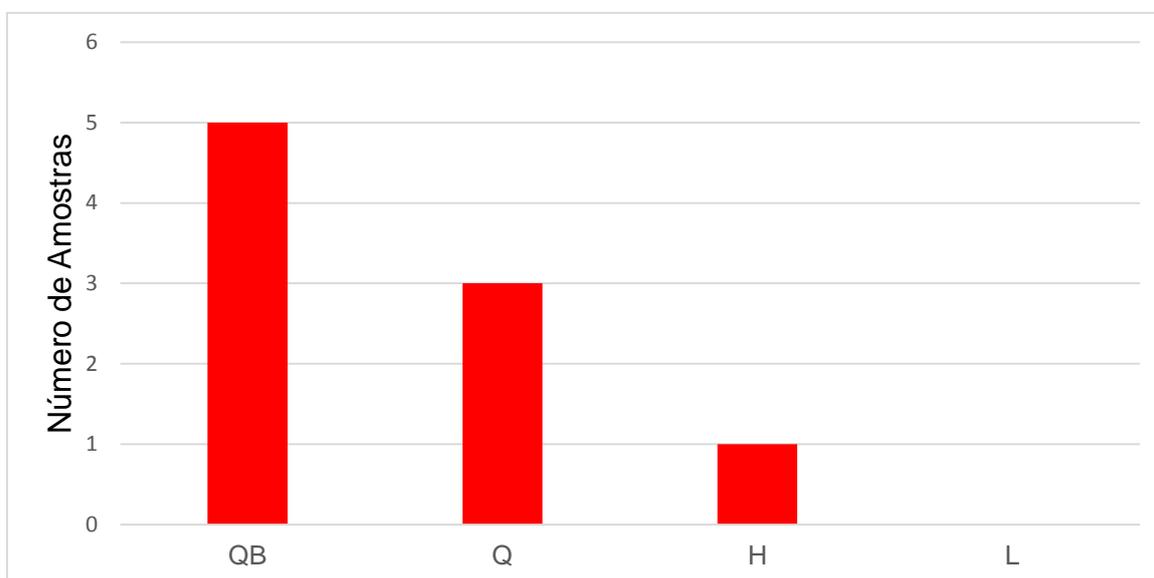


Gráfico 09 - Presença de Inflamação Moderada no terceiro dia pós-operatório, comparando-se os grupos QB, Q, H e L dois a dois. O grupo QB apresentou mais Inflamação Moderada que o grupo L ($p=0,007$).

Quando comparados separadamente com o grupo H, os grupos Q e L apresentaram mais Inflamação Acentuada ($p=0,026$), Graf 10.

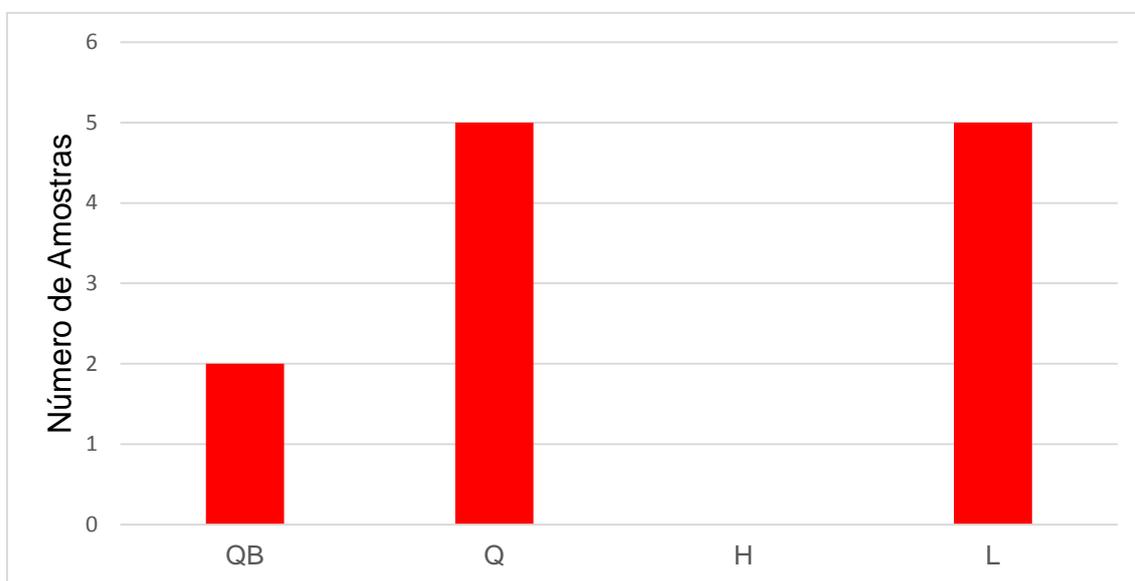


Gráfico 10 - Presença de Inflamação Acentuada no terceiro dia pós-operatório, comparando-se os grupos QB, Q, H e L dois a dois. Os grupos Q e L apresentaram mais Inflamação Acentuada que o grupo H ($P=0,026$).

B) Infiltrado Inflamatório:

Ao terceiro dia pós-operatório, as amostras de pele dos grupos Q, QB e L apresentaram predomínio do infiltrado inflamatório do tipo misto (mononuclear e polimorfonuclear), quando comparado dois a dois com o grupo H, $p=0,026$. Não foi observada diferença significativa quando os grupos Q, QB e L foram comparados entre si (Graf 11).

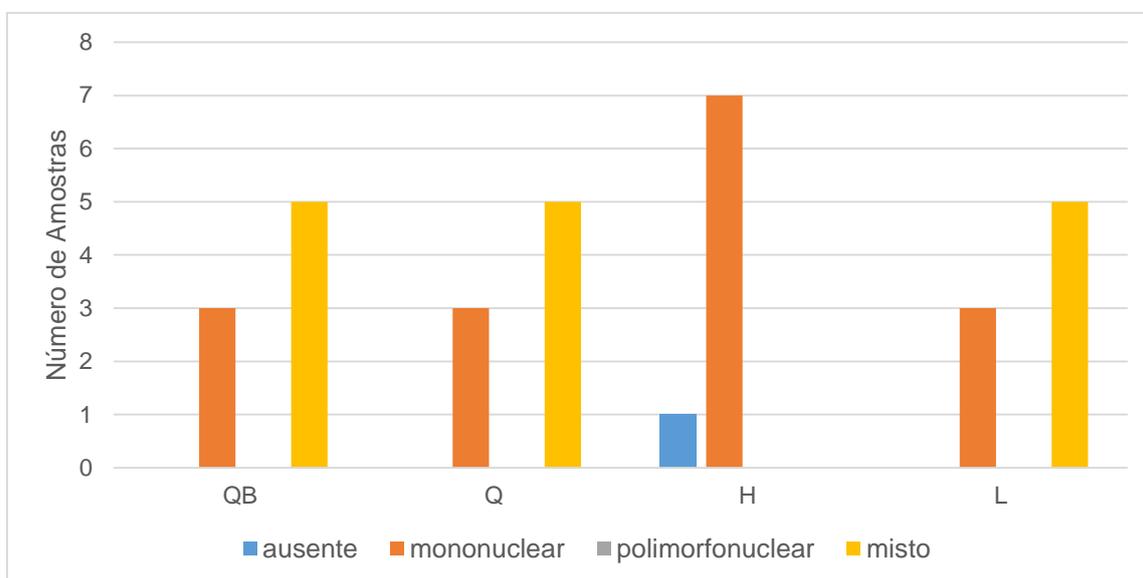


Gráfico 11 - Tipo de infiltrado inflamatório observado nas amostras teciduais dos grupos QB, Q, H e L, no terceiro dia pós-operatório. Os grupos QB, Q e L apresentaram predomínio do tipo misto quando comparadas individualmente com o grupo H ($p=0,026$).

C) Granulação:

Os grupos Q e H não apresentaram granulação no terceiro dia de pós-operatório. O grupo QB apresentou mais granulação do que os grupos Q e H, separadamente ($p=0,007$). Não existiu diferença significativa entre os grupos QB e L (Graf 12).



Gráfico 12 - Presença de granulação observada no terceiro dia pós-operatório, comparando-se os grupos QB, Q, H e L dois a dois, $p=0,007$ quando comparados os grupos QB e Q ou quando comparados os grupos QB e H.

D) Angiogênese:

No terceiro dia pós-operatório, a angiogênese esteve presente em 8 amostras do grupo QB, em 3 amostras do grupo Q, em 4 amostras do grupo H e em 1 amostra do grupo L ($p=0,001$), Graf 13.

Comparando-se os grupos dois a dois, observou-se que a angiogênese esteve presente em mais amostras do grupo QB, quando comparado aos grupos Q e L ($p=0,026$ e $p=0,001$ respectivamente).

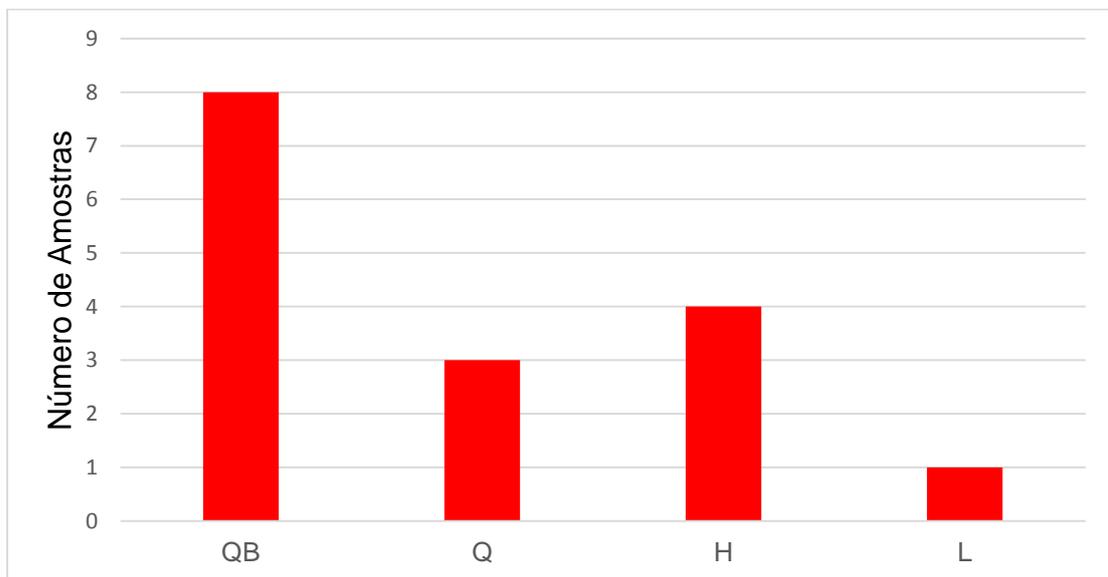


Gráfico 13 - Presença de angiogênese observada no terceiro dia pós-operatório, comparando-se os grupos QB, Q, H e L dois a dois; $p=0,026$ quando comparados os grupos QB e Q e $p=0,001$ quando comparados os grupos QB e L.

Além disso, o grupo QB apresentou mais Angiogênese Moderada que o grupo Q ($p=0,026$), do que o grupo H ($p=0,026$) e do que o grupo L ($p=0,026$), Graf 14.

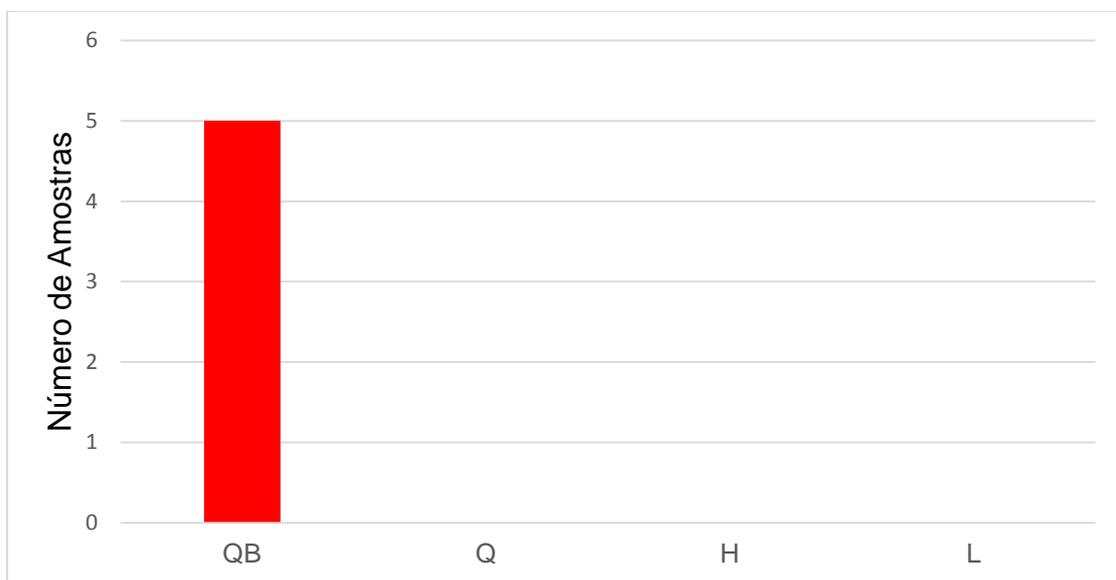


Gráfico 14 - Presença de Angiogênese Moderada observada no terceiro dia pós-operatório, comparando-se os grupos QB, Q, H e L dois a dois, $p=0,026$.

4.2.2- Avaliação da Cicatrização Tardia:

Ao se avaliar histologicamente a cicatrização no oitavo dia pós-operatório, observou-se que os grupos QB, Q, H e L apresentaram diferenças quanto a Angiogênese ($p=0,004$) e quanto a Deposição de Colágeno Jovem ($p=0,000$), Graf 15 e 16.

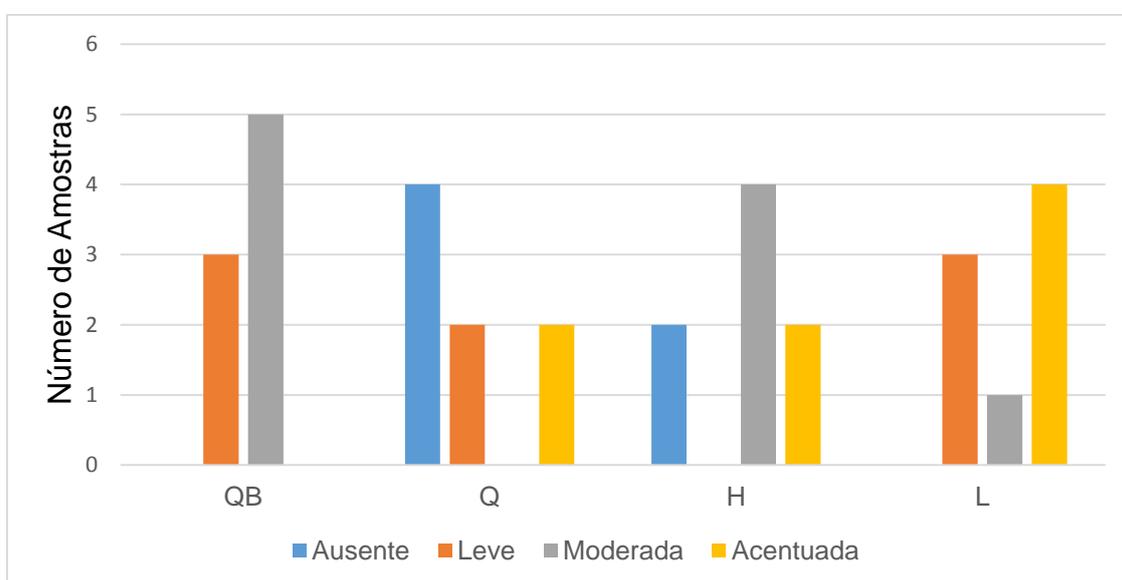


Gráfico 15 - Presença de angiogênese e sua classificação em ausente, leve, moderada ou acentuada para os grupos QB, Q, H e L ($p=0,004$) no oitavo dia pós-operatório.

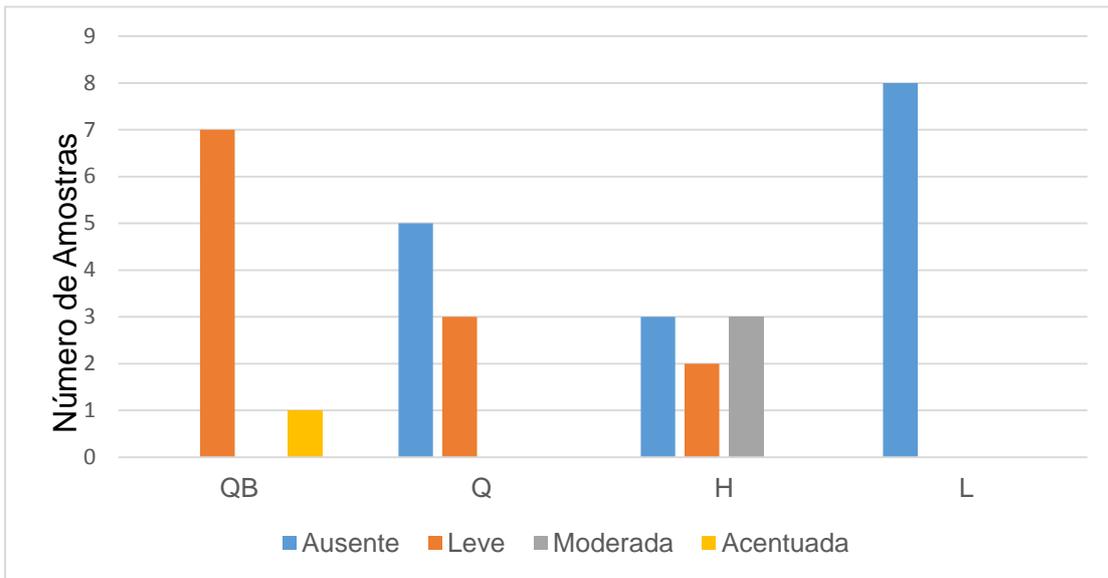


Gráfico 16 - Avaliação da presença de Deposição de Colágeno Jovem e sua classificação em ausente, leve, moderada ou acentuada para os grupos QB, Q, H e L ($p=0,000$) no oitavo dia pós-operatório.

A) Angiogênese:

O grupo QB apresentou mais Angiogênese Moderada que o grupo Q, $p=0,026$.

Não houve diferença entre os demais grupos, quando avaliados os demais critérios (Graf 17).

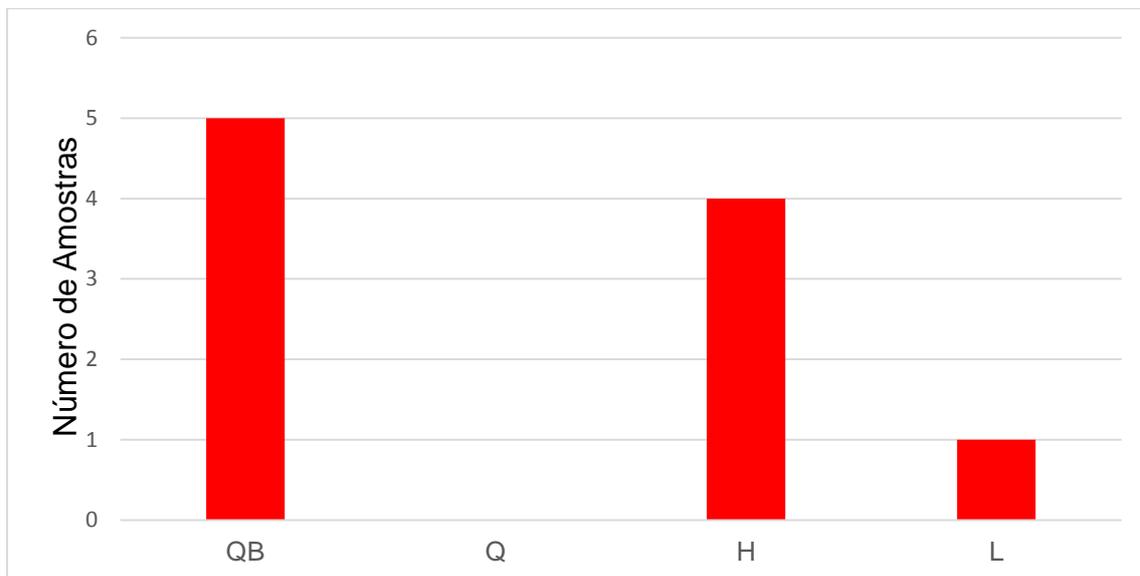


Gráfico 17 - Presença de Angiogênese Moderada observada no oitavo dia pós-operatório; $p=0,026$ comparando os grupos QB e Q.

B) Deposição de Colágeno:

No oitavo dia pós-operatório, não foi observada deposição de colágeno em nenhuma das amostras do grupo L. No grupo QB ela esteve presente em todos os indivíduos, em variados graus (Graf 18).

Comparando-se os grupos dois a dois, observou-se que a presença de colágeno jovem foi mais frequente nas amostras do grupo QB quando comparado separadamente com os grupos Q e L ($p=0,026$ e $p=0,000$ respectivamente). O grupo H apresentou mais Deposição de Colágeno Jovem que o grupo L ($p=0,026$), Graf 18.

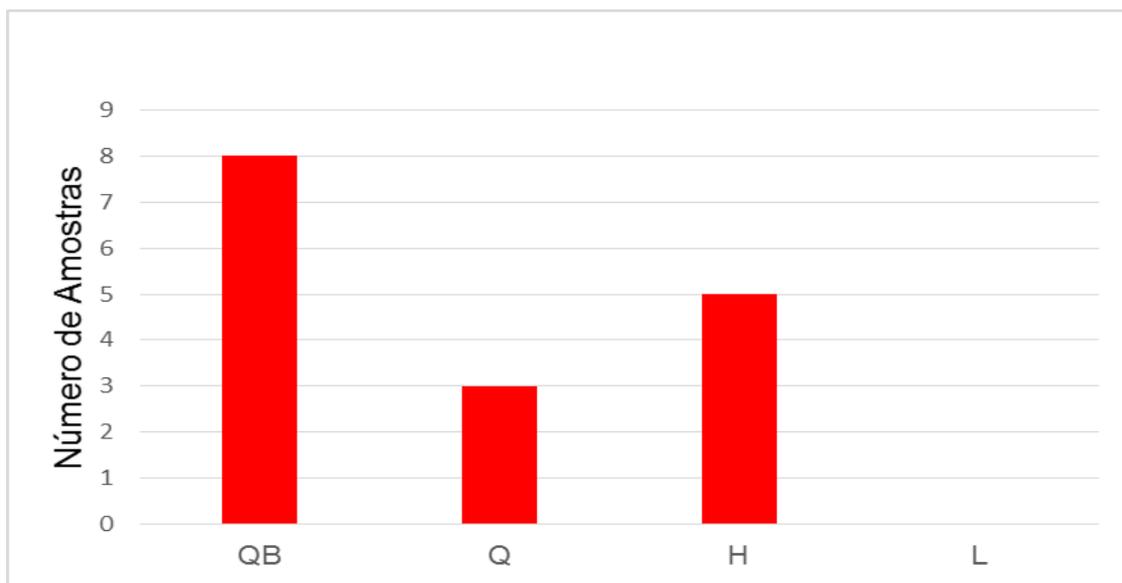


Gráfico 18 - Presença de Colágeno Jovem observada no oitavo dia pós-operatório; $p=0,026$ comparando os grupos QB e Q, $p=0,000$ comparando QB e L e $p=0,026$ comparando H e L.

O Grupo QB apresentou mais amostras com deposição de colágeno jovem classificada como Leve do que o Grupo L ($p=0,001$) e do que o Grupo H ($p=0,041$), não ocorrendo diferença entre os demais grupos (Graf 19).

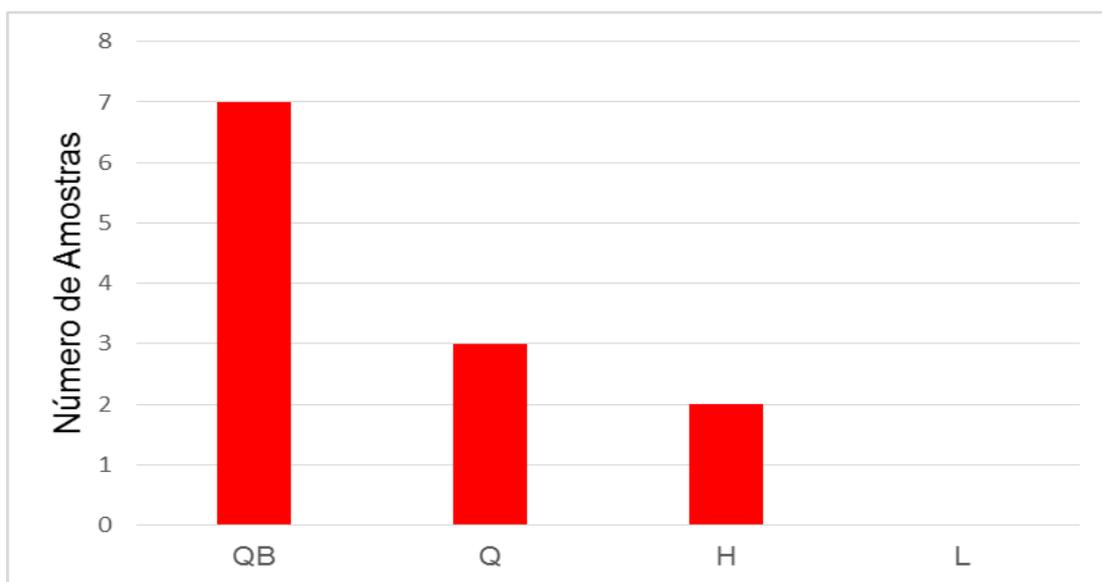


Gráfico 19 - Deposição de Colágeno Jovem classificada como Leve observada no oitavo dia pós-operatório; $p=0,001$ comparando os grupos QB e L e $p=0,041$ comparando QB e H.

5. DISCUSSÃO:

Os mecanismos envolvidos no reparo tecidual, bem como a utilização de insumos terapêuticos que promovam cicatrização de feridas são temas que ainda despertam discussões. Vários recursos vêm sendo testados, incluindo os fármacos, os medicamentos naturais ou fitoterápicos, os fatores de crescimento e a cola de fibrina, as coberturas teciduais, além de mais recentemente, as células mesenquimais ²⁷⁻³².

As pesquisas acerca do uso de substâncias que estimulem a cicatrização cutânea devem ser inicialmente realizadas em modelos experimentais, não somente para se demonstrar a sua aplicabilidade, como também para se avaliar uma provável toxicidade do tratamento proposto, bem como a dosagem necessária para se promover o efeito desejado. Em linhas gerais, o modelo experimental deve apresentar precisão adequada, comprovada por meio de estudos prévios, além de demonstrar suas reais limitações em relação à realidade que representam ³³⁻³⁷. Isso porque, apesar da sua aparente simplicidade estrutural, quando inspecionada sem o uso de instrumentos, a pele humana é um complexo órgão, dotado de grande imunogenicidade e de uma riqueza estrutural. Dada essa complexidade anatômica e funcional, nem todas as suas características podem ser totalmente reprodutíveis por meio de modelos experimentais ³⁸.

Apesar de a pele suína apresentar semelhança estrutural com a pele humana, além de ter uma resposta à penetração de fármacos e um metabolismo bastante similares, tratam-se de animais não adaptados a espaços físicos pequenos, com grande consumo de alimentos e nos quais certamente seria necessário confeccionar feridas de maiores extensões para serem representativas em relação à sua superfície corporal. Por outro lado, os mini-porcos, embora apresentem pigmentação, morfologia e fisiologia cutânea

semelhantes aos humanos, são animais de elevado custo e também exigem espaços físicos maiores, quando comparados aos modelos murinos ^{39, 40}.

Para o presente estudo, não foi utilizado como modelo experimental o coelho New Zeland, uma vez que seriam necessárias feridas de dimensões maiores, para serem representativas em relação à superfície corporal do animal. Além disso, esse modelo não apresenta atributos superiores ao murino no que tange ao estudo da cicatrização cutânea e exige espaços físicos maiores.

Nesse contexto, optou-se pelo uso do modelo de cicatrização cutânea em ratos Wistar, que foram utilizados em função da facilidade de manuseio, da sua adaptação a espaços físicos menores e dos baixos custos. Além disso, trata-se de um modelo experimental cujas precisão e limitações já foram comprovadas em estudos anteriores ⁴¹⁻⁴³.

O uso de fitoterápicos para a cicatrização não é uma prática recente, está atrelada ao desenvolvimento da humanidade e é popularmente comum. De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), grande parte da população dos países em desenvolvimento depende da medicina alternativa para sua atenção primária, sendo que 80% utilizam práticas populares nos seus cuidados básicos de saúde e 85% desses indivíduos recorrem aos fitoterápicos. Nesse contexto, a partir de 1991, uma das diretrizes da OMS foi de promover, entre os Estados-Membros, uma política de valorização dos remédios ditos “naturais” com eficácia científica demonstrada. Assim, em âmbito nacional, um dos objetivos da Política Nacional de Plantas Medicinais e de Fitoterápicos é estimular práticas populares com o uso de plantas medicinais e de remédios caseiros ⁴⁴⁻⁴⁶.

Por outro lado, apesar de popularmente aceito, o uso de vários fitoterápicos ainda não apresenta eficácia e reprodutibilidade comprovadamente aceitas. Ademais, os efeitos

adversos sistêmicos podem suplantar as suas propriedades terapêuticas, dependendo da dosagem e da via de administração. Nesse sentido, é perceptível a necessidade de estudos que verifiquem a eficiência de tais insumos naturais, e mais, que estabeleçam critérios cientificamente aceitos para o seu emprego, além de definir vias de administração que anulem seus efeitos sistêmicos indesejados ⁴⁴.

O barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) é uma planta rotineiramente empregada na prática popular para o tratamento de afecções do trato gênito-urinário, diarreias, amigdalites, feridas e até mesmo conjutivites. Habitualmente, esse fitoterápico é empregado na prática popular sob a forma de chás e de infusões, sendo também conhecido como abaramotemo, barba-de-timão, casca-da-virgindade e charãozinho-roxo, dependendo da região do Brasil. É rico em taninos e flavanóides, aos quais são atribuídas as suas propriedades cicatrizantes, anti-ulcerantes e antimicrobianas ^{11-14, 47}.

Foi observado em estudo com ratos que a solução de barbatimão a 1% apresentou uma ação antiedematosa superior à clorexidina a 0,12% ⁴⁸. Além disso, um trabalho acerca da atividade tripanocida da planta demonstrou uma redução significativa da parasitemia por *Trypanosoma cruzi* em camundongos infectados ⁴⁹. Vários trabalhos já foram conduzidos, para se avaliar a atividade antimicrobiana do extrato de barbatimão, demonstrando a sensibilidade do *Staphylococcus aureus*, da *Candida albicans*, da *Escherichia coli*, do *Enterococcus faecalis*, do *Streptococcus mitis* e do *Lactobacillus casei* a essa substância, sendo os dois últimos os principais agentes causadores da cárie dental. Uma explicação provável para o efeito antimicrobiano é que o alto teor de taninos presentes no extrato de barbatimão tenha a capacidade de inibir as adesinas e enzimas bacterianas, além de formar complexos com polissacarídeos e proteínas ⁵⁰⁻⁵³.

Dado ao seu alto teor de substâncias pró-cicatrizantes e a sua comprovada atividade contra bactérias, protozoários e fungos, esse estudo avaliou associação do barbatimão com o filme de quitosana na cicatrização de feridas induzidas em ratos.

Outros estudos já haviam relatado a atividade cicatrizante induzida pelo barbatimão. Minatel e cols (2010) realizaram um estudo clínico com a pomada contendo barbatimão, relatando a cicatrização completa de todas as feridas nas quais esse fármaco foi utilizado. Entretanto, eles não delimitaram grupos controles, além de avaliarem feridas em diferentes sítios e com tamanhos diversos, não sendo possíveis maiores inferências a respeito do assunto ⁵⁴.

Coelho e cols (2010) avaliaram o uso de extrato de barbatimão na cicatrização de feridas cutâneas de ratos em um período de sete, quatorze e trinta dias. Para tal, confeccionaram feridas cutâneas nas patas traseiras dos animais, após ligadura da veia femoral, utilizando um *punch* de 1,5 cm de diâmetro. Apesar de terem constatado superioridade do barbatimão em relação ao controle (solução salina 0,9%), esses autores não fizeram aferições nas feridas operatórias imediatamente após a sua confecção, não tomando o cuidado para o fato de que o rato, em função da presença de uma camada da pele denominada *panículo carnososo*, apresenta uma elevada taxa de contração cutânea inicial e uma grande mobilidade cutânea em relação às camadas musculares, o que dificulta a padronização dos tamanhos iniciais das feridas confeccionadas. Além disso, só obtiveram diferenças significativas das taxas de cicatrização entre os grupos a partir de 14 dias. Isso leva a acreditar que a associação com a quitosana possa ter otimizado o efeito do extrato hidroalcoólico do barbatimão, já que o presente estudo observou maiores taxas de cicatrização já a partir do terceiro dia pós-operatório. Uma contribuição significativa do estudo de Coelho e cols (2010) foi demonstrar que o barbatimão esteve associado a maiores taxas de neoformação vascular a partir do sétimo dia pós-operatório,

o que o presente estudo observou já no terceiro dia pós-operatório. Além disso, o estudo prévio não avaliou a formação de colágeno, que desempenha um papel essencial no fechamento de feridas⁴³.

A importância da quitosana para o presente estudo está associada não somente ao fato de que não foi necessária a troca dos curativos diariamente, mas principalmente ao seu papel como armazenador da substância ativa no leito cicatricial. Além disso, esse dispositivo também parece ter atuado como carreador de células e de mediadores intervenientes no processo de reparo tecidual, sendo coadjuvante à função da matriz extracelular. Não obstante, a quitosana apresenta propriedades hemostáticas, assim como alguns insumos farmacêuticos a base de gelatina, o cianoacrilato e a cola de fibrina, sendo superior aos demais por não apresentar risco de contaminação biológica como os derivados do sangue, citotoxicidade e nem mesmo irritação local aos tecidos, como o cianoacrilato⁵⁵⁻⁵⁷. Além de apresentar atividades antimicrobianas, estabilidade durante um grande período de tempo, ser biodegradável e se incorporar ao leito tecidual, a quitosana é relativamente barata. Ela também apresenta bioestabilidade comprovada por meio de estudos prévios, permitindo a difusão celular em estudos *in vitro* e não causando imunogenicidade em estudos *in vivo*^{15, 18, 20}. O presente estudo contribui para demonstrar que ela pode ser aplicada também sob a forma de filme, como um “carreador” para o extrato hidroalcoólico do barbatimão, apresentando biocompatibilidade com o fitoterápico e promovendo, dessa forma, maior fechamento das feridas nas quais essa associação foi utilizada.

Hernandes e cols (2010) não demonstraram diferença na taxa de cicatrização entre as feridas tratadas com pomada de barbatimão a 1% e aquelas nas quais foi utilizado somente o veículo (controle), embora tenham observado maiores índices de proliferação das células epidérmicas e mais células em metáfase nas feridas tratadas com o extrato do

barbatimão. Esses autores concluíram que o uso do barbatimão esteve associado a maior índice mitótico no quarto, sétimo e décimo dias pós-operatórios, embora não tenha promovido migração celular a ponto de determinar melhor fechamento das feridas nas quais foi utilizado⁴¹.

É definido que o fenômeno de migração celular está atrelado inicialmente à formação de uma matriz extracelular rica em fibronectina, cuja função é a fixação dos fibroblastos, e em ácido hialurônico, que aumenta a resistência do tecido à compressão, em função de sua forte ligação com a água. Entretanto, à medida que a maturação cicatricial ocorre, há diminuição na síntese de ácido hialurônico e aumento da concentração de ácido hialurônico e de glicosaminoglicanas sulfatadas, constituindo um microambiente favorável para a fixação celular e, conseqüentemente, a sua diferenciação para fenótipos mais maduros. Associadamente, ocorre aumento da síntese de colágeno, que substitui a proteoglicana e a fibronectina, até se tornar o principal componente da matriz extracelular^{4, 6, 58}. De fato, o que observamos é que nos cortes histológicos do oitavo dia pós-operatório, o extrato hidroalcoólico do barbatimão associado ao filme de quitosana foi capaz de estimular formação de colágeno jovem em todos os indivíduos, mesmo que em diferentes proporções, o que não foi observado nos grupos-controle. Esse estímulo pode ter sido auxiliado pelo uso do dispositivo de quitosana, que poderia funcionar como uma rede para a migração de células e de substâncias pró-cicatrizantes, atraídas em função da riqueza de taninos do barbatimão. O fato é que, ao se comparar a presença de colágeno jovem entre as amostras, observou-se que a Deposição de Colágeno Jovem esteve presente em mais amostras do grupo QB quando comparado separadamente com os grupos Q e L. Isso poderia ser atribuído às propriedades anti-oxidantes do barbatimão, que estimulariam a síntese de colágeno. Também há de inferir sobre a importância do filme de quitosana, que pode ter atuado sinergicamente com o extrato de

barbatimão, de maneira semelhante à matriz extracelular, permitindo a migração de fibroblastos e a deposição de colágeno.

No terceiro dia pós-operatório, não houve diferença das amostras quanto à formação de colágeno. De fato, essa observação não era esperada, já que se trata de um evento mais tardio no processo de reparo tecidual^{4, 6, 58, 59}. No entanto, ele só foi incluído para estudo, uma vez que o rato apresenta aparentemente uma cicatrização mais rápida do que a espécie humana, dada a presença do panículo carnosos, que comprovadamente promove maior contração tecidual, não se sabe se às custas de fibras colágenas residentes ou neoformadas.

É claro que o processo de cicatrização constitui uma interseção de fases que não são estanques, mas se sobrepõem dinamicamente no decurso do reparo tecidual^{3, 5}. Assim, seria muito limitante se avaliar a eficácia de um determinado insumo terapêutico, tomando-se por base somente a sua capacidade ou não de se promover a formação de fibras colágenas. Dessa forma, outros aspectos histológicos da cicatrização foram avaliados. Ao se considerar a presença de vasos neoformados, no terceiro dia de observação, percebeu-se que o grupo QB apresentou um grau variado de angiogênese em todos os indivíduos, o que foi significativo, quando se comparou aquele grupo com os grupos Q e L separadamente. Isso talvez possa sinalizar o porquê que o grupo QB tenha apresentado maior taxa de cicatrização da ferida do que os grupos Q e L, tanto no terceiro dia pós-operatório, quanto no oitavo dia pós-operatório. Embora o grupo QB não tenha apresentado diferença com o grupo H, quanto à presença ou não de angiogênese, o grupo QB apresentou significativamente mais Angiogênese Moderada que o grupo H, que o grupo Q e que o grupo L, no terceiro dia pós-operatório, o que pode justificar a sua maior taxa de cicatrização. Esse processo de neoformação vascular, no entanto, perpetuou de maneira desigual entre os grupos, de modo que no oitavo dia pós-operatório, só foi

possível se constatar diferença significativa quando foram comparados os grupos QB e Q, observando-se que o grupo QB manteve proporções mais regulares de neoformação vascular, apresentando mais Angiogênese Moderada. Provavelmente, essa dificuldade em se estabelecer outras correlações entre os resultados obtidos pela análise macroscópica e aqueles observados microscopicamente poderia estar associada ao número de animais por grupo (n=8) e/ou à quantidade de gradações por variável histológica analisada (Ausente, Leve, Moderada, Acentuada). Mesmo assim esse critério foi utilizado uma vez que, quando presentes, as diferenças observadas auxiliaram na compreensão dos mecanismos que resultaram nas diferentes taxas de cicatrização entre os grupos.

No terceiro dia após indução de feridas cutâneas, observou-se a sinalização do início da fase proliferativa da cicatrização, com predomínio da angiogênese e da formação de tecido de granulação. Esse tecido esteve significativamente mais presente, em variados graus, no grupo QB, quando comparado ao grupo Q e H, separadamente. Além disso, houve uma tendência do grupo QB em apresentar mais Granulação Moderada do que os Grupos Q e H, separadamente. Esses dados também poderiam ajudar a explicar as maiores taxas de cicatrização encontradas no grupo QB, já a partir do terceiro dia pós-operatório.

Quando a variável Inflamação foi comparada entre os grupos, observou-se no terceiro dia após a indução das feridas, que o filme de quitosana associado ao extrato hidroalcoólico de barbatimão, induziu significativamente mais Inflamação Moderada que o controle com luvas cirúrgicas. Por outro lado, o hidrocolóide esteve mais associado a um infiltrado inflamatório leve, quando comparado ao grupo QB ou ao grupo Q. As amostras do grupo L e aquelas do grupo Q apresentaram significativamente mais um infiltrado inflamatório acentuado, quando comparadas as do grupo H. Talvez um padrão inflamatório do tipo leve ou moderado possa ter sido o gatilho responsável para o desencadeamento da cascata de reparo tecidual, que culminou com maiores taxas de

cicatrização do grupo QB, preponderantemente, e do grupo H, quando comparado ao grupo Q, no oitavo dia após indução da ferida. Isso porque um excessivo estímulo inflamatório pode dificultar a cicatrização, em função da elevada produção de proteases e de substâncias óxido-redutoras ^{4, 7, 60}. Assim, seria essa mais uma característica positiva do extrato hidroalcoólico do barbatimão: a sua riqueza em antioxidantes e a sua capacidade de formar ligações estáveis com proteases, que são responsáveis pelas suas propriedades anti-inflamatória ^{12, 61}.

Finalmente, o tipo de infiltrado inflamatório parece não ter influenciado na resposta cicatricial. O que foi observado de fato, é que o tipo de infiltrado teve significado mais ao se considerar que essa diferença foi observada nas etapas iniciais da cicatrização. O predomínio de infiltrado inflamatório significativamente do tipo misto nas amostras dos grupos Q, QB e L, em detrimento à tendência de o grupo H ter sido mais associado ao infiltrado do tipo mononuclear pode ter sido em função da população de células mononucleares já existentes na ferida operatória.

Há de se ressaltar também uma possível relação entre as características histológicas observadas inicialmente no grupo H com o fato de essas feridas terem apresentado uma maior diferença entre as taxas de cicatrização tardia e as taxas de cicatrização precoce. De fato, o que se pôde observar é que o grupo QB apresentou mais angiogênese moderada e mais granulação em variados graus, no terceiro dia pós-operatório, que o grupo H e essa diferença não perpetuou com o evoluir da cicatrização. Nesse aspecto, o que talvez possa ter ocorrido é que o hidrocolóide não tenha sido capaz de ativar o gatilho para promover a neoformação vascular e granulação tão precocemente quanto a associação do barbatimão com a quitosana e que esse novo dispositivo testado tenha sido capaz de manter mecanismos de reparo mais uniformes, promovendo maiores taxas de cicatrização precoce e tardia que o hidrocolóide.

Nesse contexto, apesar de a avaliação microscópica não ter respondido conclusivamente o porquê que os grupos apresentaram diferenças nas taxas de cicatrização, ela norteou um raciocínio indutivo capaz de apontar diferenças entre os grupos. O grupo QB apresentou maiores taxas de fechamento tardio que os grupos Q e H. Por outro lado, por meio da análise histológica ao oitavo dia, observou-se que o mesmo grupo apresentou maior depósito de colágeno jovem que o grupo Q, mas não que o grupo H. Esse aspecto poderia sinalizar que o fechamento da ferida obtido no grupo QB teria sido feito não somente às custas de contração tecidual, promovida pelas fibras colágenas, mas também por epitelização, o que poderá ser verificado por estudos futuros. O que se sabe é que o processo de cicatrização é dinâmico e a resposta a determinados estímulos não é feita exclusivamente pelo seu somatório, podendo ocorrer amplificação do gatilho inicial. Além disso, o mecanismo de reparo tecidual envolve a participação de elementos não puramente mecânicos ou celulares, mas principalmente bioquímicos. Dessa forma, há que se considerar que apesar de a supremacia da associação quitosana-barbatimão em relação aos controles ser incontestável, novos estudos serão necessários para avaliar a sua reprodutibilidade clínica na cicatrização de pele humana. Além disso, já se iniciou o processo de aperfeiçoamento do dispositivo desenvolvido no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia (Universidade Federal de Minas Gerais), para facilitar a sua aplicação sobre o leito cicatricial, sem que haja a necessidade de fixação por meio de sutura.

6. CONCLUSÃO:

A associação do extrato hidroalcoólico do barbatimão com a quitosana promoveu maiores taxas de cicatrização das feridas cutâneas complexas de ratos, tanto no terceiro quanto no oitavo dias de observação.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS:

A utilização de uma estrutura capaz de manter um medicamento em um determinado sítio de ação por um período prolongado não é recente. Ainda mais, se for considerada a relevância que se tem a angiogênese terapêutica, não somente para o tratamento de feridas, como também, para o resgate de áreas de isquemia miocárdica e para a reperfusão de retalhos isquêmicos. Além disso, o uso local de fármacos quimioterápicos tem seu benefício reconhecido, não somente por atuar diretamente no local do tumor, potencializando a sua ação, mas principalmente por diminuir as chances de efeitos sistêmicos indesejáveis. Nesse contexto, o filme de quitosana pode se tornar uma alternativa economicamente viável e bastante eficaz, podendo-se estender a sua aplicação para outras finalidades.

Os resultados desse estudo também podem ser úteis para novas pesquisas clínicas a respeito do uso do extrato do barbatimão, com a finalidade de estimular a cicatrização tecidual. Em função de suas propriedades antimicrobianas, o barbatimão poderia ser utilizado para o tratamento de feridas infectadas, como as úlceras de decúbito e as fasciítes necrotizantes. Além disso, seu uso associado ao filme de quitosana, nessas feridas, poderá ser promissor, em função da sua grande capacidade de adsorção.

O aperfeiçoamento do dispositivo de quitosana-barbatimão poderá cobrir uma lacuna que existe para o tratamento das feridas cutâneas simples e também das complexas, como as úlceras de pressão, as úlceras vasculares, as feridas infectadas e até mesmo servir para o tratamento de grandes superfícies de queimadura. O que se tem hoje é que a maioria das coberturas teciduais disponíveis no mercado (hidrocolóides, hidrogéis e alginatos) atua mais por mecanismos de adsorção do excesso de exsudato, mantendo as trocas gasosas no sítio da ferida. Nenhum deles, no entanto, é capaz de estimular diretamente a

replicação celular. Por sua vez, os substitutos de pele disponíveis para as grandes perdas teciduais, são obtidos a partir de derivados de animais, como o colágeno, ou de membranas acelulares também de origem animal ou humana, além das culturas celulares, que podem ou não ser enriquecidas com fatores de crescimento. O problema é que esses recursos apresentam um potencial de imunogenicidade e de contaminação bacteriana ou por vírus, que apesar de controlados, não podem ser eliminados por completo.

Dessa forma, parece promissora a formulação de uma cobertura biologicamente estável, capaz de se integrar ao leito cicatricial e mais: contendo uma gama de taninos cujas propriedades antioxidantes, antimicrobianas e cicatrizantes podem representar uma alternativa não somente para o tratamento de feridas, mas também para intervir em quaisquer condições que demandem um estímulo para a angiogênese local.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Buzzi A. El tratamiento de las heridas a través de la historia. Rev Asoc Méd Argent 2006; 119 (1): 16-22.
2. Morain WD. Historical Perspectives. In: Mathes SJ. Plastic Surgery, 2nd edition Saunders Elsevier, Philadelphia 2006; Vol 1:27-34.
3. Araujo ID, Barbuto RC. Fisiologia da Cicatrização. In: Petroianu A. Clínica Cirúrgica, Rio de Janeiro, 2001:71-79.
4. Lorenz HP, Longaker MT. Wound Healing: Repair Biology and Wound and Scar Treatment. In: Mathes, SJ. Plastic Surgery (Vol. I) General Principles. 2nd ed. Philadelphia: Saunders-Elsevier, 2006: 209-234.
5. Mauad-Júnior RJ. Cicatrização de Feridas. In: Carreirão S, Cardim V, Goldenberg D. Cirurgia Plástica. São Paulo: Atheneu, 2005: 139-142.
6. Hinz B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. J Invest Dermatol 2007; 127(3): 526-537.
7. Ferreira MC, Tuma Jr P, Carvalho VF, Kamamoto F. Complex wounds. Clinics 2006; 61(6):571-578.
8. Baldi MS, Amaral AB. Enxertos de Pele. In: Mélega JM. Cirurgia Plástica Fundamentos e Arte – Princípios Gerais (Ed). Rio de Janeiro: Medsi, 2002: 45-56.
9. Paletta CE, Pokorny JJ. Skin Grafts. In: Mathes, SJ. Plastic Surgery (Vol. I) General Principles. 2nd ed. Philadelphia: Saunders-Elsevier, 2006: 293-316.
10. Smaniotto PHS, Galli R, Carvalho VF, Ferreira MC. Tratamento clínico das feridas – curativos. Rev Med SP 2010;89(3/4): 137-141.

11. Hirschmann GS, Arias AR. A survey of medicinal plants of Minas Gerais, Brazil. *J Ethnopharmacol* 1990; 29:159-172.
12. Macedo FM, Martins GT, Rodrigues CG, Oliveira DA de. Triagem Fitoquímica do Barbatimão *Stryphnodendron adstringens* (Mart) Coville. *Rev Bras Bioc* 2007; 5(2):1166-1168.
13. Oliveira DR, Brito Júnior FE, Sampaio LA, Torres JC, Ramos AGB, Nunes AA. Uso etnofarmacológico de plantas medicinais em infecções genitourinárias por moradoras da Chapada do Araripe, Crato, Ceará – Brasil. *Rev Bras Promoç Saúde, Fortaleza* 2012; 25(3): 278-286.
14. Santos PV, Sebastiani R. Plantas Medicinais utilizadas por uma comunidade universitária no Município de São Paulo, SP. *J Health Sci Inst* 2011; 29(1):11-15.
15. Costa DFG, Franca JR, Ribeiro TG, Faraco AAG, Kaplan MAC, Castilho RO. Development and characterization of polymeric nanoparticles as Barbatimão (*Stryphnodendron obovatum*) standardized fraction carrier. *Adv Biosci Biotechnol* 2013; 4:89-92.
16. Cui F, Li G, Huang J, Zhang J, Lu M, Lu W, Huan J, Huang Q. Development of chitosan-collagen hydrogel incorporated with lysostaphin (CCHL) burn dressing with anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and promotion wound healing properties. *Drug Deliv* 2011; 18(3):173-180.
17. Dantas MD, Cavalcante DR, Araújo FE, Barretto SR, Aciole GT, Pinheiro AL, Ribeiro MA, Lima-Verde IB, Melo CM, Cardoso JC, Albuquerque Júnior RL. Improvement of dermal burn healing by combining sodium alginate/chitosan-based films and low level laser therapy. *J Photochem Photobiol B.* 2011; 105(1):51-59.

18. Hong JP, Kim YW, Lee SK, Kim SH, Min KH. The effect of continuous release of recombinant human epidermal growth factor (rh-EGF) in chitosan film on full thickness excisional porcine wounds. *Ann Plast Surg.* 2008; 61(4):457-462
19. Kim JH, Bae JH, Lim KT, Choung PH, Park JS, Choi SJ, Im AL, Lee ET, Choung YH, Chung JH. Development of water-insoluble chitosan patch scaffold to repair traumatic tympanic membrane perforations. *J Biomed Mater Res* 2009; 90(2):446-545.
20. Tchemtchoua VT, Atanasova G, Agil A, Filée P, Garbacki N, Vanhootehem O, Deroanne C, Noel A, Jerome C, Nusgens B, Poumay Y, Colige A. Development of chitosan nanofibrillar scaffold for skin repair and regeneration. *Biomacromolecules* 2011; 12(9): 3194-3204.
21. Zhao J, Shen G, Liu C, Wang S, Zhang W, Zhang X, Zhang X, Ye D, Wei J, Zhang Z, Jiang X. Enhanced healing of rat calvarial defects with sulfated chitosan-coated calcium-deficient hydroxyapatite/bone morphogenetic protein 2 scaffolds. *Tissue Eng Part A* 2012; 18(1/2):185-197.
22. Rebecca MA, Ishii-Iwamoto EL, Grespan R, Cuman R, Caparroz-Assef SM, Mello JC, Bersani-Amado CA. Toxicological studies on *Stryphnodendron adstringens*. *J Ethnopharmacol* 2002; 83(1/2):101-104.
23. Rodrigues HG, Meireles CG, Lima JTS, Toledo GP, Cardoso JL, Gomes, SL. Efeito embriotóxico, teratogênico e abortivo de plantas medicinais. *Rev Bras Plantas Med* 2011; 13(3): 359-366.
24. Vilar JB, D'Oliveira MIP, Santos SC, Chen LC. Cytotoxic and genotoxic investigation on barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart) Coville, 1990] extract. *Braz J Pharma Sci* 2010; 46(4): 687:694.

25. Oliveira HP, Alves GES, Rezende CMF. Eutanásia em medicina veterinária. Disponível em URL: <http://www.ufmg.br/coep/eutanasia.pdf>. (Acesso em 26/10/2013).
26. Vizzotto Junior AO; Noronha L de, Scheffel DLH, Campos ACL. Influência da cisplatina administrada no pré e no pós-operatório sobre a cicatrização de anastomoses colônicas em ratos. *J Bras Patol Med Lab* 2003; 39(2):143-149.
27. Barral SM, Araujo ID, Vidigal PVT, Mayrink CAC, Araujo AD, Costa PR. Os efeitos do sildenafil na viabilidade de retalhos cutâneos randômicos. *Acta Cir Bras* [serial online] 2011; 26(4): 314-319. Disponível em URL: <http://www.scielo.br/acb>. Acesso em 25/10/2013.
28. Kim TK, Oh EJ, Chung JY, Park JW, Cho BC, Chung HY. The effects of botulinum toxin A on the survival of a random cutaneous flap. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2009; 62(7): 906-13.
29. Jull AB, Rodgers A, Walker N. Honey as a topical treatment for wounds. *Cochrane Database Syst Rev* [serial on line] 2010; In: The Cochrane Library, Issue 9, CD005083. Disponível em URL: <http://cochrane.bvsalud.org/cochrane>. Review. Acesso em 20/09/2013.
30. Flemming K, Cullum NA. Laser therapy for venous leg ulcers. *Cochrane Database Syst Rev* [serial on line] 2010; In: The Cochrane Library, Issue 9, CD001182. Disponível em URL: <http://cochrane.bvsalud.org/cochrane>. Review. Acesso em 20/09/2013.
31. Dumville JC, O'Meara S, Deshpande S, Speak. Hydrogel dressings for healing diabetic foot ulcers. *Cochrane Database Syst Rev* [serial on line] 2011; In: The

Cochrane Library, Sep 7(9), CD009101. Disponível em URL: <http://cochrane.bvsalud.org/cochrane>. Review. Acesso em 20/09/2013.

32. Huang S, Lu G, Wu Y, Jirigala E, Xu Y, Ma K, Fu X. Mesenchymal stem cells delivered in a microsphere-based engineered skin contribute to cutaneous wound healing and sweat gland repair. *J Dermatol Sci* 2012; 66(1): 29-36.

33. Cohen IK, Mast BA. Models of wound healing. *J Trauma* 1990; 30 (suppl.12): S149-155.

34. Damy SB; Camargo RS; Chammas R; Figueiredo LF. Fundamental aspects on animal research as applied to experimental surgery. *Rev Assoc Med Bras* 2010; 56(1): 103-111.

35. Dorsett-Martin WA. Rat models of skin wound healing: a review. *Wound Rep Reg* 2004; 12(6): 591-599.

36. Ferreira LM, Ferreira LRK. Experimental model: historic and conceptual revision. *Acta Cir Bras* 2003; 18:1-3.

37. Ferreira LM, Hochman B, Barbosa MVJ. Modelos experimentais em pesquisa. *Acta Cir Bras* 2005; 20(suppl.2):28-34.

38. Ramos ML, Gragnani A, Ferreira LM. Is there an ideal animal model to study hypertrophic scarring? *J Burn Care Res* 2008; 29(2):363-368.

39. Becker ST, Rennekampff HO, Alkatout I, Wiltfang J, Terheyden H. Comparison of vacuum and conventional wound dressings for full thickness skin grafts in the minipig model. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2010; 39(7):699-704.

40. Barteck MJ, La Budde JA, Maibach HI. Skin permeability in vivo: comparison in rat, rabbit, pig and man. *J Invest Dermatol* 1972; 58:114-123.

41. Hernandez L, Pereira LM da S, Palazzo F, Mello JCP. Wound-healing evaluation of ointment from *Stryphnodendron polyphyllum* (barbatimão) in rat skin. *Braz J Pharma Sci* 2010; 46(3): 431-436.
42. Lopes GC, Sanches AC, Nakamura CV, Dias Filho BP, Hernandez L, de Mello JC. Influence of extracts of *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. and *Stryphnodendron obovatum* Benth. on the cicatrization of cutaneous wounds in rats. *J Ethnopharmacol* 2005; 99(2):265-72.
43. Coelho JM, Antonioli AB, Silva DN, Carvalho TMMB, Pontes ERJC, Odashiro AN. O efeito da sulfadiazina de prata, extrato de ipê-roxo e extrato de barbatimão na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. *Rev Col Bras Cir* 2010; 37(1): 45-51.
44. Balbino EE, Dias MF. Farmacovigilância: um passo em direção ao uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos. *Rev Bras Farmacog* 2010; 20(6):992-1000.
45. Ministério da Saúde 2006. Portaria no. 971, de 3 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no SUS. Diário Oficial da União.
46. World Health Organization 2004. WHO Guidelines on safety monitoring of herbal medicines in pharmacovigilance systems. Geneva.
47. Nunes GP, Silva MF, Resende UM, Siqueira JM. Plantas medicinais comercializadas por raizeiros no Centro de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. *Rev Bras Farmacogn* 2003; 13:83-92.
48. Coutinho H, Pinto DS, Ribeiro JEG, Friedman, H. Ação antiedematosa do *Stryphnodendron barbadetiman* (Barbatimão) a 1 por cento em comparação com a clorhexidina a 0,12 por cento. *Rev. Odonto Ciênc* 2004; 19(45):201-206.

49. Herzog-Soares JD, Isac E, Castro AM, Bezerra JCB. Bioatividade de *Stryphnodendron adstringens*, *S. Polyphyllum*, *Caryocar brasiliense*, plantas do cerrado brasileiro, sobre *Trypanosoma cruzi* "in vivo". *Biosci J* 2006; 22(3): 113-118.
50. Ferreira SB, Palmeira JD, Souza JH, Almeida JM, Figueiredo MCP, Pequeno AS, Arruda TA, Antunes RMP, Catão RMR. Avaliação da atividade antimicrobiana in vitro do extrato hidroalcolóico de *Stryphnodendron adstringens* (Mart) Coville sobre isolados ambulatoriais de *Staphylococcus aureus*. *Rev Bras Anal Clin* 2010; 42(1):27-31.
51. Ishida K, Mello JCP, Cortez DAG, Dias Filho BP, Ueda-Nakamura T, Nakamura CV. Influence of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on growth and virulence factors of *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58:942-949.
52. Pinho L, Souza PNS, Macedo Sobrinho E, Almeida AC, Martins ER. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcolóicos das folhas de alecrim-pimenta, aroeira, barbatimão, erva baleeira e do farelo da casca de pequi. *Ciênc Rural* 2012; 42(2): 326-331.
53. Soares SP, Vinholis AHC, Casemiro LA, Silva MLA, Cunha WR, Martins CHG. Atividade antibacteriana do extrato bruto de *Stryphnodendron adstringens* sobre microorganismos da cárie dental. *Rev Odonto Ciênc* 2008; 23(2):141-144.
54. Minatel DG, Pereira AMS, Chiaratti TM, Pasqualin L, Oliveira JCN, Couto LB, Lia RCC, Cintra JM, Bezzon MFA, Franca SC. Estudo clínico para validação da eficácia de pomada contendo barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville) na cicatrização de úlceras de decúbito. *RBM* 2010; 67(7): 250-256.
55. Paulmier P. The main problem with biological products of animal origin. *Biologicals*. 2000; 28(1):55.

56. Spotnitz WD, Burks S. State-of-the-art review: Hemostats, sealants, and adhesives II: Update as well as how and when to use the components of the surgical toolbox. *Clin Appl Thromb Hemost* 2010;16(5):497-514.
57. Leggat PA, Smith DR, Kedjarune U. Surgical applications of cyanoacrylate adhesives: a review of toxicity. *ANZ J Surg.* 2007; 77(4):209-213.
58. Bainbridge P. Wound healing and the role of fibroblasts. *J Wound Care.* 2013; 22(8): 407-8, 410-412.
59. Calabrese EJ. Historical foundations of wound healing and its potential for acceleration: dose-response considerations. *Wound Repair Regen.* 2013; 21(2):180-193.
60. Soneja A, Drews M, Malinski T. Role of nitric oxide, nitroxidative and oxidative stress in wound healing. *Pharmacol Rep* 2005; 57 (Suppl):108-119.
61. Korkina L, De Luca C, Pastore S. Plant polyphenols and human skin: friends or foes. *Ann N Y Acad Sci* 2012; 1259:77-86.

9. APÊNDICE:

Tabela 01 - Médias, medianas, valores mínimos, valores máximos e desvios-padrão das taxas de cicatrização precoce e tardia em valores percentuais, para os grupos Q, QB, H e L:

GRUPO		MÉDIA ± dp	MEDIANA (MIN/MAX)	P
Q	TCP	11,34 ± 17,17	8,58 (-10,50 / 30,09)	p = 0,008 (a) p = 0,025 (e)
	TCT	33,36 ± 12,20	33,51 (15,43 / 50,05)	p = 0,002 (b) p = 0,000 (h) p = 0,010 (c)
QB	TCP	35,32 ± 8,16	36,48 (17,52 / 43,97)	p = 0,002 (d) p = 0,025 (e) p = 0,000 (f)
	TCT	64,19 ± 6,24	64,98 (52,48 / 71,95)	p = 0,015 (g) p = 0,000 (h) p = 0,000 (i)
H	TCP	4,13 ± 17,27	8,53 (-19,15 / 31,02)	p = 0,002 (d)
	TCT	52,32 ± 12,74	55,26 (23,08 / 63,84)	p = 0,010 (c) p = 0,015 (g) p = 0,000 (j)
L	TCP	-16,01 ± 16,78	-17,59 (-38, 14 / 15,98)	p = 0,008 (a) p = 0,000 (f)
	TCT	1,86 ± 17,64	1,43 (-20,15 / 24,17)	p = 0,002 (b) p = 0,000 (i) p = 0,000 (j)

dp: desvio padrão; MIN-MAX: valores mínimos e máximos; TCP: Taxa de Cicatrização Precoce; TCT: Taxa de Cicatrização Tardia; (a) Comparação da TCP entre os grupos Q e L; (b) Comparação da TCT entre os grupos Q e L; (c) Comparação da TCT entre os grupos Q e H; (d) Comparação da TCP entre os grupos QB e H; (e) Comparação da TCP entre os grupos QB e Q; (f) Comparação da TCP entre os grupos QB e L; (g) Comparação da TCT entre os grupos QB e H; (h) Comparação da TCT entre os grupos QB e Q; (i) Comparação da TCT entre os grupos QB e L; (j) Comparação da TCT entre H e L.

Tabela 02 - Médias, medianas e desvios-padrão das diferenças entre as taxas de cicatrização tardia e precoce, em valores percentuais, para os grupos Q, QB, H e L:

GRUPO	MÉDIA ± dp	MEDIANA	P
Q	22,02 ± 5,89	24,36 (9,96 / 28,47)	(a) 0,000
QB	28,86 ± 7,17	29,73 (20,27 / 40,40)	(b) 0,002
H	48,19 ± 14,70	48,84 (3,54 / 25,05)	(a) 0,000 (b) 0,002 (c) 0,000
L	17,87 ± 7,37	19,37 (17,50 / 64,70)	(c) 0,000

dp: desvio padrão; MIN-MAX: valores mínimos e máximos; (a) valor de p quando comparados os grupos Q e H; (b) valor de p quando comparados os grupos QB e H; (c) valor de p quando comparados os grupos H e L.

10. ANEXO: