

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
CICATRIZANTE DE MEMBRANAS DE GELATINA CONTENDO EXTRATO
AQUOSO DE *Punica granatum* Linn**

MARISMAR FERNANDES DO NASCIMENTO

ARACAJU
Março – 2013

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
CICATRIZANTE DE MEMBRANAS DE GELATINA CONTENDO EXTRATO
AQUOSO DE *Punica granatum* Linn**

MARISMAR FERNANDES DO NASCIMENTO

Dissertação de Mestrado submetida à banca
examinadora para a obtenção do título de Mestre
em Saúde e Ambiente.

Orientador (es)

Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Junior, D.Sc.

Juliana Cordeiro Cardoso, D.Sc.

Co-orientador

Luiz Pereira da Costa, D.Sc.

ARACAJU
Março – 2013

OS AUTORES PERMITEM A REPRODUÇÃO DE CÓPIAS OU PARTES DESTA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SOMENTE PARA PROPÓSITOS ACADÊMICOS E CIENTÍFICOS DESDE QUE A FONTE SEJA CITADA.

N244d Nascimento, Marismar Fernandes do

Desenvolvimento, caracterização e avaliação do potencial cicatrizante de membranas de gelatina contendo extrato aquoso de *Punica granatum* Linn. / Marismar Fernandes do Nascimento; orientadores: Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior, Juliana Cordeiro Cardoso, Co-orientador: Luiz Pereira da Costa. – Aracaju, 2013.

120p. : il
Inclui bibliografia.

Dissertação de Mestrado (Saúde e Ambiente). – Universidade Tiradentes, 2013

1. *Punica granatum* Linn. 2. Produtos naturais. 3. Membranas de gelatina. 4. Cicatrização. 5. Ferida em pele. I. Junior Albuquerque, Ricardo Luiz Cavalcante. (orient.) II. Cardoso, Juliana Cordeiro. (orient.) III. Costa, Luiz Pereira. (co-orient.) IV. Universidade Tiradentes. V. Título.

CDU: 504.4

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
CICATRIZANTE DE MEMBRANAS DE GELATINA CONTENDO EXTRATO
AQUOSO DE *Punica granatum* Linn**

MARISMAR FERNANDES DO NASCIMENTO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE DA UNIVERSIDADE TIRADENTES COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM SAÚDE E AMBIENTE.

Aprovada por:

Ricardo Luiz Cavalcanti Albuquerque Júnior, D.Sc.
Orientador

Juliana Cordeiro Cardoso, D.Sc.
Orientadora

Luiz Pereira da Costa, D.Sc.
Co-orientador

Margarete Zanardo Gomes, D.Sc.
Membro Titular do Programa de Saúde e Ambiente

Rute Cândida Pereira, D.Sc.
Membro Externo ao Programa de Saúde e Ambiente

ARACAJU

Março – 2013

Dedico este trabalho

Ao meu eterno e inseparável companheiro de todas as horas, **DEUS**, pela força e coragem sobrenatural que me concedestes para mais uma conquista!

Àqueles que unidos me concederam a vida e que me ensinaram a amar, a lutar pelos ideais e ter perseverança, meus maravilhosos pais, **Miguel e Maria Fernandes** serei eternamente grata por tudo. Meu amor por vocês é incondicional!

Aos meus filhos, **Bárbara e Pedro Henrique**, pelo zelo para comigo no dia a dia, por se alegrarem com minha vitória, pelos incentivos nos momentos de fraqueza e pela compreensão de tamanha ausência em muitos momentos (plena adolescência). Prometo amá-los eternamente, obrigada por existirem na minha vida.

AGRADECIMENTOS

Na sequência da vida:

Ao Todo Poderoso, **Deus**, razão da minha existência!

Aos **meus queridos pais**, por me concederem a vida e serem exemplos de zelo e amor. Meu pai, meu herói. Minha mãe minha maior educadora.

Aos **meus filhos**, que cuidaram (literalmente) de mim durante todo período do mestrado e asseguraram a minha permanência fora de casa! Vocês também fizeram mestrado comigo! Obrigada Bárbara, pelos incentivos, escutas e traduções dos textos. E a você Pedro, pelas massagens quando chegava exausta e por está sempre do meu lado me beijando mesmo com os meus abusos.

Aos meus **tios** Pedro (em memória) e Lenise pelo amor, apoio afetivo e financeiro nas fases que antecederam esse mestrado. Carregarei em mente suas lições para o resto da vida. Aos **primos** Márcia e Pedro Augusto pela convivência maravilhosa.

Aos demais integrantes da **família**: minha irmã **Sônia** e meu cunhado **Ivelto** pelo apoio emocional, pelo cuidado e carinho para comigo e meus filhos e pela estada em Aracaju durante todo esse período; aos meus sobrinhos Amanda e Lucas pelo carinho e companhia. **Mana e Ângelo**, pelo cuidado e atenção especial com papai e mamãe, muitas vezes me substituindo. Aos demais **irmãos** e cunhados (as), incluindo Socorro que cuidou dos meninos quando precisei me ausentar.

Ao meu **esposo**, amigo e companheiro, Fagno Almeida, qualquer afeto será pouco para agradecer pelo apoio nessa jornada.

Na jornada acadêmica:

AGRADECIMENTO ESPECIAL ao meu orientador, Prof. Dr. **Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior**, que me ensinou tudo o que eu achava que sabia sobre patologia, cicatrização, ferida e coberturas. Obrigada pelo encorajamento, pela força para conquistar esse título, pelos desafios, pelas orientações em horários excedentes, pela amizade. Você me ensinou MUITO e me fez acreditar que o mundo é interdisciplinar. Tê-lo como orientador é privilégio. Assistir suas aulas, sorte. Aprender um pouco do mundo da Patologia com você, oportunidade ímpar... Parabéns pela maneira como coordenou e conduziu o Programa de Mestrado em Saúde e Ambiente. Saiba que o admiro muito como docente/profissional. Obrigada por tudo!

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a **Juliana Cordeiro Cardoso**. Entendo sua dedicação e seu compromisso como incentivos para entrarmos no mundo da pesquisa. Você é abençoada como Ser que “pulveriza” serenidade e docilidade, que “planta” confiança e “colhe” sabedoria. Isso a transforma nessa criatura maravilhosa e encantadora. Obrigada pelo carinho atribuído nessa árdua caminhada e pelas nobres orientações e ensinamentos contínuos. O que seria de mim sem você para produzir extratos e membranas tão potentes?

Ao Prof. Dr. **Luiz Pereira da Costa** que me adotou na ausência de Ju tanto como orientador como na realização de análises físico-químicas (maravilhosas) me inteirando no mundo da Química Analítica. Aprendi com o seu perfeccionismo a ser mais crítica e criteriosa! Obrigada pela preciosa colaboração e disponibilidade, inclusive nos feriados e finais de semana.

À Prof.^a Dr.^a **Odelsia Leonor Sánchez de Alsino** pela atenção, o apoio e a participação na pesquisa. Foi muito importante sua colaboração na construção dos artigos, além das discussões do dia a dia sobre Química e as propriedades da *Punica*.

Aos demais **professores** do Programa do Mestrado em Saúde e Ambiente da Universidade Tiradentes, que contribuíram para minha formação, cada um com sua importância e competência. A vocês, muito obrigada! Prof.^a Dr.^a **Vânia Fonseca e**

Prof.^a Dr.^a **Cláudia Melo**, pelo encaminhamento ao mundo de pesquisa com suas brilhantes aulas. Prof.^a Dr.^a **Margarete Zanardo** pela colaboração contínua para melhoria desse trabalho. Prof. Dr. **Rubens**, obrigada especial pela ajuda na Estatística.

À Prof.^a Dr.^a **Elina Caramão, Cláudia Cardoso (UEMS) e Francine Padilha** pelas encantadoras análises cromatográficas, que contribuíram para o brilho dos nossos resultados.

À minha professora de graduação, mentora e amiga, Prof.^a Dr.^a **Rute Cândida Pereira**, você sempre será “modelo de sabedoria, ética, equilíbrio, competência e luta”. Obrigada pelos incentivos e ensinamentos contínuos desde os primeiros passos da vida acadêmica e por acreditar no meu potencial como profissional.

À Prof.^a Dr.^a **Maria das Neves (Nevinha)**, Ex-Diretora da Faculdade de Odontologia de Pernambuco, obrigada pelos incentivos e reconhecimento do meu trabalho na FOP. Você mora no meu coração!

À amiga e colega de trabalho, Prof.^a Dr.^a **Veridiana Câmara Furtado**, que sempre agrega valores importantes. Obrigada pelo incentivo para concorrer ao Mestrado de Saúde e Ambiente na UNIT e por dividir seus saberes como pesquisadora.

À Prof.^a Dr.^a **Sheyla Alves Rodrigues** pela colaboração etnofarmacológica, que me ajudou a desvendar alguns segredos científicos e pela companhia no ITP.

Às amigas contemporâneas de escola e universidade **Sayonara, Côca, Giuditte, Sandra Machado, Elba e Lúcia** que sempre estiveram dispostas a dividir alegrias e mostrar que tudo o que se faz com amor vale a pena. Como seria o mundo sem verdadeiros AMIGOS?... Moreira, quando tu dizias: “...amiga, conta o tempo de seis em seis meses que passa rápido”... Deu certo amiga! Obrigada pelo encorajamento.

Aos meus **colegas de mestrado**, pelo companheirismo, amizade, carinho e apoio. Em destaque, **Isana**, que cumpriu jornadas acadêmicas em domicílio comigo, jamais esquecerei... Obrigada pelo carinho, pela escuta nos momentos difíceis, pela atenção especial e apoio nos experimentos laboratoriais. Valeu amiga! **Nely**, que

sempre esteve ao meu lado nos momentos complicados. Obrigada amiga, pelos conselhos e pela força nos momentos de agonia! Continuaremos juntas no doutorado para ficarmos bem sabidas. **Ana Célia**, obrigada pelo apoio constante tanto na UNIT como em sua maravilhosa casa! **Andréia Poschi**, sua educação e sua paciência são suficientes para lhe classificar, obrigada pelo convívio e apoio em tudo. **Catharina**, obrigada pelo apoio nos experimentos laboratoriais e pelas inúmeras caronas quando não conhecia nada em Aracaju. **João Sigefredo**, obrigada pela inclusão do meu nome na sua lista de amigos. Você foi um dos frutos bons que colhi nesse caminho... Risadas e desabafos... Saudades!

Aos **funcionários** da **UNIT** e do **ITP** que nos serviram no dia a dia sem reclamações. Em especial, **Gladstone, Marcos e Max**, funcionários do biotério, que muito contribuíram para o sucesso dos nossos experimentos com os “ratinhos”, Obrigada pelo apoio!

Roneval, obrigada pela convivência no dia a dia e pela constante disposição em ajudar as pessoas. Fico grata pela ajuda nos ensaios laboratoriais.

À **Bernadeth Moda**, pela amizade, companhia e ajuda nos experimentos laboratoriais.

Aos graduandos, **Raquel, Tássia e Tâmara** (Biomedicina), **Danilo Baraúna e Felipinho**, **Genecy, Cleveilton** (Odontologia), **Wesleyan e Ricardo Guilherme** (Farmácia), **Leonardo Garcia e Éder** (Engenharia de Processo) e demais envolvidos nessa história.

À **Universidade de Pernambuco – UPE** pela concessão de licença das minhas atividades docentes.

À **Universidade Tiradentes - UNIT e Instituto de Tecnologia e Pesquisa – ITP** pelo acolhimento, receptividade e apoio nos experimentos laboratoriais. Parabéns pela infraestrutura oferecida aos seus alunos!

À **Universidade Federal de Sergipe** pelo apoio na realização de análises laboratoriais e auxílio na identificação botânica, através do registro e depósito da

exsicata no Herbário ASE (Prof.^a Dr.^a Ana Paula Prata, às funcionárias, em especial, Marta e Priscila e ao funcionário Eládio, obrigada pela atenção e acolhimento).

Ao órgão de fomento, **FAPITEC**, pelo auxílio financeiro (bolsa) que fundamentou a formação de mais uma mestre no nosso país.

A **todos** que estiveram comigo, através de telefonemas, mensagens, visitas, ou simplesmente em pensamento, obrigada!

E, **Àquele** que deu início, meio e fim a essa história maravilhosa, cheia de caminhos tortuosos, mas certos e cheios de graças. Obrigada **Pai Eterno!**

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
3. REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1 Pele	4
3.1.1 Epiderme	5
3.1.2 Derme	5
3.2 Feridas na pele	7
3.2.1 Fisiopatologia da ferida	8
3.2.2 Tipos de feridas	9
3.3 Inflamação	9
3.4 Cicatrização	10
3.4.1 Classificação quanto ao tipo de cicatrização	12
3.4.1.1 Primeira intenção	12
3.4.1.2 Segunda intenção	13
3.4.1.3 Terceira intenção	13
3.4.2 Classificação quanto às fases de cicatrização	13
3.4.2.1 Fase inflamatória ou exsudativa	14
3.4.2.2 Fase proliferativa ou de tecido de granulação	16
3.4.2.3 Fase de maturação ou remodelamento	18
3.5 Coberturas e curativos	19
3.6 Colágeno	22
3.7 Polímeros	25
3.8 Membranas poliméricas	26
3.9 Caracterizações de membranas poliméricas	28
3.9.1 Propriedades mecânicas	28
3.9.2 Permeabilidade ao vapor d'água	29
3.9.3 Índice de Intumescimento	30
3.9.4 Colorimetria	30
3.9.5 Morfologia microestrutural	31
3.9.6 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	32

3.10 Produtos naturais	32
3.11 <i>Punica granatum</i> Linn	34
3.12 Polifenóis	39
3.13 Antioxidantes	41
3.14 Taninos	42
3.15 Resíduos sólidos e subprodutos vegetais	45
3.16 Identificação de Espécimes Botânicos	47
4. MATERIAL E MÉTODOS	48
4.1 Submissão do projeto de pesquisa ao comitê de ética	51
4.2 Coleta da amostra	51
4.3 Identificação científica da amostra	51
4.4 Obtenção de extratos de <i>Punica granatum</i> Linn	52
4.5 Caracterizações dos extratos	53
4.5.1 Cromatografia líquida de alta eficiência com espectrofotometria de massa acoplada (HPLC-MS)	53
4.5.2 Determinação do rendimento dos extratos brutos	53
4.5.3 Determinação da capacidade antioxidante por DPPH	54
4.6 Desenvolvimento de Membranas Poliméricas	55
4.7 Caracterizações das membranas poliméricas	56
4.7.1 Propriedades mecânicas	56
4.7.2 Permeabilidade ao vapor d'Água	56
4.7.3 Índice de intumescimento	57
4.7.4 Colorimetria	57
4.7.5 Morfologia microestrutural	58
4.7.6 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	59
4.8 Ensaio Biológico de Cicatrização <i>in vivo</i>	59
4.8.1 Procedimento cirúrgico	59
4.8.2 Determinação do índice de retração clínica das feridas	60
4.8.3 Remoção dos espécimes	60
4.8.4 Procedimentos histológicos/ histoquímicos	61
4.8.5 Análise histomorfológica da reação inflamatória	61
4.8.6 Análise de deposição colagênica	62
4.9 Análise estatística	62

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
5.1 Caracterizações de extratos de <i>Punica granatum</i> Linn	63
5.1.1 Rendimento	63
5.1.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Espectrometria de	65
Massa Acoplada - HPLC-MS	
5.1.3 Determinação do Potencial Antioxidante pelo Método DPPH	66
5.2 Caracterizações de Membranas de gelatina	68
5.2.1 Propriedades Morfofuncionais	68
5.2.2 Colorimetria	69
5.2.3 Propriedades Mecânicas	70
5.2.4 Permeabilidade ao Vapor d'Água (PVA)	71
5.2.5 Índice de intumescimento	73
5.2.6 Morfologia Microestrutural	74
5.2.7 Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho com	77
transformada de Fourier (FTIR)	
5.3 Ensaio Biológico de Cicatrização	78
5.3.1 Índice de Retração da Ferida (IRF)	78
5.3.2 Análise semiquantitativa da intensidade da reação inflamatória	81
5.3.3 Análise Descritiva da Resposta Reparativa	83
5.3.4 Análise Descritiva da Deposição Colagênica	86
6. CONCLUSÕES	92
7. REFERÊNCIAS	93
ANEXOS	121

LISTA DE TABELAS

		Pg.
Tabela 1	Coberturas mais utilizadas em curativos nos serviços de saúde do Brasil, de acordo com o tipo de ferida e indicação clínica do Ministério de Saúde do Brasil, 2009.	21
Tabela 2	Representação esquemática da classe química e estrutura molecular dos compostos tânicos majoritários da casca do fruto de <i>Punica granatum</i> Linn. Modificado de Amakura <i>et al.</i> , 2000b.	40
Tabela 3	Registro científico do espécime vegetal estudado.	51
Tabela 4	Quantificação química por análise cromatográfica (HPLC) dos ácidos tânicos do extrato seco (mg/g) da casca do fruto de <i>Punica granatum</i> .	64
Tabela 5	Principais características morfológicas observadas nas membranas GEL e GELPG.	69
Tabela 6	Distribuição dos valores obtidos na análise colorimétrica em plano de fundo branco, expressando resultados da diferença de cor das membranas GEL e GELPG, onde a* (indicativo da cor verde) e b* (indicativo da cor amarela) e L (indicativo de luminosidade).	70
Tabela 7	Distribuição das propriedades mecânicas - tensão de ruptura (MPa), alongamento (%), módulo Young (MPa) e espessura (µm) das membranas de gelatina sem (GEL) e com extrato aquoso de <i>Punica granatum</i> Linn (GELPG).	71
Tabela 8	Análise semiquantitativa da intensidade da reação inflamatória nos grupos estudados ao longo do período experimental de 21 dias.	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura anatômica da pele, indicando principais elementos (IGNÁCIO, 2009).	7
Figura 2	Feridas e tipos de cicatrização. Modificado de MANDELBAUM <i>et al.</i> (2003).	12
Figura 3	Fase inflamatória do processo de cicatrização. Modificado de GANTWERKER e HOM, 2012.	14
Figura 4	Divisão e migração das células basais através da fase de granulação da ferida. Modificado de GANTWERKER e HOM, 2012.	16
Figura 5	Fase de maturação do processo cicatricial. Modificado de GANTWERKER e HOM, 2012.	18
Figura 6	Arranjo Estrutural do colágeno. Adaptado de SHOULDERS <i>et al.</i> , 2008.	24
Figura 7	Representação esquemática de um polímero condensado.	26
Figura 8	Cultivo de <i>Punica granatum</i> Linn. Projeto Irrigado Senador Nilo Coelho-Núcleo 4 (Petrolina-PE). Setembro de 2011.	35
Figura 9	Partes do fruto (romã) de <i>Punica granatum</i> e suas camadas etnobotânica. Flor vermelha- alaranjada (a), folhas pequenas, rijas, brilhantes (b), Flor evoluindo para originar um fruto esférico (c). As sementes (d) estão agrupadas em arilos (e) e o suco, de coloração vermelhada (f). As camadas, externa – epicarpo (g1), camada mediana – mesocarpo (g2) e camada mais externa – endocarpo (g3).	36
Figura 10	Estrutura molecular de taninos hidrolisáveis (NAKAMURA <i>et al.</i> , 2003).	42
Figura 11	Ligação depsídica formada entre o grupo fenólico superior e o grupo inferior de uma unidade de ácido gálico (HARVEY, 2001).	43
Figura 12	Estrutura molecular de taninos condensados (LEKHA e LONSANE, 1997).	44
Figura 13	Plantio / coleta da amostra (a), registro científico – Exsicata nº 20.881 (b), seleção dos frutos <i>in natura</i> da <i>Punica granatum</i> (romã) (c), despulpamento / cascas do fruto (d / e), moagem das cascas do fruto em moinho de facas (f), cascas pulverizadas (g), granulometria (h), maceração dinâmica a quente (i), evaporação do solvente em estufa de circulação e renovação de ar (j), extrato bruto seco em placa de petri (k), avaliação antioxidante pelo método de DPPH (l), espectrofotometria (m), HPLC-MS (n) e armazenamento do extrato bruto seco em vidro âmbar (o).	48
Figura 14	Amostra de extrato bruto seco aquoso da casca do fruto de <i>Punica granatum</i> (a), amostra (b) e embalagem de gelatina em pó (c) utilizada para desenvolver membranas, pesagem dos componentes filmógenos em balança analítica (d), plastificante – propilenoglicol (e), adição dos componentes ao ácido acético (f), dispersão filmógena em agitação magnética (g), secagem das membranas em capela de exaustão (h). Membranas de gelatina sem adição de	49

	extrato (i), membranas de gelatina com adição do extrato da casca do fruto de <i>Punica granatum</i> (j) produzidas por <i>casting</i> . Caracterizações das membranas: Análise de propriedades mecânicas (k), colorimetria (l), índice de intumescimento (m), permeabilidade ao vapor d'água (n), microscopia eletrônica de varredura (o), transformada da fração de Fourier de infravermelho (p).	
Figura 15	Avaliação da atividade cicatrizante das membranas produzidas. Ratos <i>Wistar</i> foram anestesiados (a) para realização de feridas em região dorsal, tricotomizada, com bisturi tipo <i>punch</i> de 8,0 mm de diâmetro (b), retirando as camadas da derme e epiderme completas (c), mantidas sem suturas (d) e medidas nas bordas internas com paquímetro digital (e). Em seguida foram aplicadas membranas GEL (f) e GELPG (g) nos respectivos grupos, e avaliado o índice de contração das feridas em 3, 7, 14 dias (i) e 21 dias. Exérese da área cicatricial (j), espécime cirúrgico (k), foram utilizados para macroscopia em cassete (l) e material emblocado em parafina (m). Secções histológicas montadas (m) e fotomicrografias do material corado em HE e em picrossírius (n) foram analisados em microscopia (o)	50
Figura 16	Fotografias do registro científico (Exsicata) da amostra de <i>Punica granatum</i> Linn estudada (Nascimento, M.F. 1. 08/09/2011).	52
Figura 17	Parâmetros de luminosidade e cromaticidade, de acordo com o Diagrama CIE Lab.	58
Figura 18	Rendimento (%) do extrato bruto aquoso a 100 °C (EAPG ₁₀₀), extrato bruto aquoso temperatura ambiente (EAPG ₂₅), extratos metanólico (EMPG ₂₅) e hidrometanólico (EHMPG ₂₅), a partir de pó da casca de <i>Punica granatum</i> , pelo método de extração de maceração dinâmica no período de 2 h.	63
Figura19	Cromatogramas (HPLC-MS) de identificação dos compostos tânicos majoritários, ácido gálico [1], punicalagina α , [2], punicalagina β [3] e ácido elágico [4] nos extrato aquoso (A), hidrometanólico (B) e metanólico (C) de <i>Punica granatum</i> Linn.	65
Figura 20	Atividade antioxidante pelo método DPPH de extrato aquoso de casca do fruto de <i>Punica granatum</i> em solução hidroalcoólica (30:70 v/v).	67
Figura 21	Membrana polimérica de gelatina (GEL), transparente e incolor (a) e membrana polimérica de gelatina contendo extrato aquoso de casca do fruto de <i>Punica granatum</i> Linn (GELPG), transparente e ligeiramente amarelada (b).	68
Figura 22	Fotomicrografias de secções transversais (5 kV, 1.000x, 10 μ m) indicando o aumento de espessura das membranas de gelatina (a) com a incorporação de extrato aquoso da casca do fruto de <i>Punica granatum</i> -GELPG (b).	71
Figura 23	Curva de permeabilidade ao vapor d'água das amostras (Membrana de gelatina com extrato- GELPG e membrana de gelatina sem extrato - GEL) em relação ao tempo de trinta e cinco horas.	72
Figura 24	Índice de intumescimento das membranas GELPG e GEL em meio neutro (pH 7,2), (24a) e Grau de intumescimento das membranas GELPG e GEL em meio ácido (pH 1,2), (24b).	74

Figura 25	Fotomicrografias eletrônicas de varredura (5 kV, 2.000x e 10.000x, 10 µm) de superfície: GEL - membranas de gelatina (a - 2.000x) e (b - 10.000x), e GELPG - membranas de gelatina contendo extrato aquoso de <i>Punica granatum</i> Linn (c - 2.000x) e (d - 10.000x).	75
Figura 26	Fotomicrografias eletrônicas de varredura (5 kV, 2.000x e 10.000x, 10 µm) de secção transversal: membranas de gelatina (a - 2.000x) e (b - 2.000x), e membranas de gelatina contendo extrato aquoso de <i>Punica granatum</i> Linn (c - 10.000x) e (d - 10.000x).	76
Figura 27	Espectros de Infravermelho da membrana de gelatina (linha vermelha) e da membrana de gelatina com extrato aquoso de <i>Punica granatum</i> (linha preta).	77
Figura 28	Índice percentual médio de retração da ferida ao longo dos 21 dias experimentais. Grupo controle (CTR), grupo tratado com membranas de gelatina (wGEL) e grupo tratado com membranas de gelatina contendo extrato aquoso de <i>Punica granatum</i> (GELPG).	78
Figura 29	Fotografias das feridas dérmicas demonstrando o índice de retração dos grupos CTR (Controle), wGEL (tratados com membranas de gelatina) e wGELPG (tratados com membranas de gelatina contendo extrato aquoso da casca do fruto de <i>Punica granatum</i>) nos tempos de 0, 3, 7, 14 e 21 dias da confecção da ferida.	80
Figura 30	Secções histológicas dos grupos (áreas feridas), ao longo do tempo de cicatrização no ensaio biológico. (a/b) Resposta inflamatória intensa e edema são observados em CTR e wGEL. (c) Formação do tecido de granulação imaturo em wGELPG em menos de três dias. (c/d) Formação de tecido de granulação bem vascularizado é observada em CTR e wGEL. (e) tecido fibroso no wGELPG em menos de sete dias. (f/g/h) cicatriz fibrosa primária vista em todos os grupos de 14 dias. (h) Início de formação de folículo piloso em wGELPG. (j/k/l) Formação de tecido conjuntivo denso fibroso é visto em todos os grupos. (l) Múltiplos folículos pilosos são observados em wGELPG (HE, 40/400 x ampliação).	84
Figura 31	Secções histológicas dos grupos (áreas feridas), ao longo do tempo de cicatrização no ensaio biológico. Em três dias, a deposição de gelatina tipo III, escassa, esverdeada é observada em CTR (a), wGEL (b) e wGELPG (c). Aos sete dias, fibras reticulares de gelatina do tipo III são evidenciadas nos CTR (d) e GEL (e) e, em paralelo colágeno do tipo I é visto em wGELPG (f). Aos 14 dias, fibras de gelatina tipo I, densamente dispostas paralelamente, são observadas no CTR (g) e wGEL(h), enquanto que em wGELPG (i), as fibras mostraram um ligeiro arranjo entrelaçado. Aos 21 dias, fibras de gelatina tipo I, entrelaçadas, são vistas em todos os grupos, mas foram menos compactados em CTR (j) e do wGEL (k) do que em wGELPG (l) (Sirius Red/luz polarizada, ampliação de 400x).	88

DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CICATRIZANTE DE MEMBRANAS DE GELATINA CONTENDO EXTRATO AQUOSO DE *Punica granatum* Linn.

MARISMAR FERNANDES DO NASCIMENTO

Punica granatum é uma espécie vegetal amplamente utilizada como fitoterápico no tratamento de lesões da pele. A incorporação de extratos vegetais com atividade biológica antioxidante em coberturas de feridas tem sido utilizada para melhorar o processo cicatricial. Portanto, os objetivos deste trabalho foram desenvolver membranas poliméricas de gelatina contendo extrato de *Punica granatum* Linn, caracterizar suas propriedades morfofuncionais e avaliar o efeito dessas membranas sobre a cicatrização de feridas dérmicas abertas em modelo murino experimental. Extrato aquoso, metanólico e hidrometanólico foram obtidos por maceração dinâmica, e caracterizados quanto ao rendimento, e seus compostos tânicos majoritários foram identificados por cromatografia líquida de alta eficiência com espectrometria de massa (CLAE-EM). Foram produzidas por *casting*, membranas de gelatina (GEL) pura e contendo extrato aquoso de *Punica granatum* (GELPG), e caracterizadas quanto às propriedades físico-químicas (apresentação macroscópica, tensão/deformação, permeabilidade ao vapor d'água, intumescimento, análise de microestruturas em microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier). Para o ensaio biológico de cicatrização, feridas foram induzidas na pele do dorso de ratos *Wistar* (n=60) distribuídos em três grupos (n=20): wGEL, cobertas com membranas de gelatina; wGELPG, cobertas com membranas de gelatina contendo extrato aquoso de *Punica granatum* a 1% e CTR, feridas sem coberturas. Cinco animais de cada grupo foram eutanasiados após 3, 7, 14 e 21 dias. As feridas foram analisadas macroscopicamente quanto ao índice de retração percentual das feridas (IRF) e histologicamente quanto à resposta inflamatória, reação de granulação e colagenização. O rendimento do EAPG foi de $58,34 \pm 1,71$ e sua atividade antioxidante foi considerada alta ($IC_{50}=1,715 \pm 0,24$ µg/mL). O ácido gálico, punicalagina α , punicalagina β e ácido elágico foram os compostos majoritários dos extratos. As membranas GELPG se mostraram levemente amareladas, mas contínuas e homogêneas, além de mais espessas ($p<0,001$), mas não houve alteração nas suas propriedades mecânicas quando comparadas a GEL. Além disso, GELPG se mostrou menos permeável ao vapor d'água e apresentou maiores índices de intumescimento ($p<0,05$). A análise em FTIR sugeriu a incorporação do EAPG nas membranas. As feridas cobertas com GELPG apresentaram IRFs significativamente maiores em 3 ($p<0,01$), 7 ($p<0,001$) e 14 dias ($p<0,001$), melhor reação de granulação, deposição e arranjo arquitetural das fibras de colágeno cicatriciais quando comparado a GEL. Concluiu-se que, neste estudo, o uso de membranas de gelatina contendo extrato aquoso da casca do fruto da *Punica granatum* promoveu melhorias substanciais do processo de cicatrização de feridas abertas em modelo murino, expressas por meio da aceleração da contração da ferida, modulação da magnitude da resposta inflamatória e aprimorando a colagenização durante a formação da cicatriz fibrosa.

Palavras-Chaves: *Punica granatum*, gelatina, membrana bioativa, cicatrização.

DEVELOPMENT, CHARACTERIZATION AND ASSESSMENT OF THE HEALING POTENTIAL OF *Punica granatum* Linn AQUEOUS EXTRACT–INCORPORATED GELLATIN-BASED MEMBRANES

MARISMAR FERNANDES DO NASCIMENTO

Punica granatum is a widely used phytotherapeutic in the treatment of skin lesions. The incorporation of vegetal-derived extracts with anti-oxidant activity into wound dressings has been applied to improve wound healing. Therefore, the purpose of this study was to develop and characterize the morphofunctional properties of gellatin-based membranes containing extract of *Punica granatum* Linn, as well as to assess their healing potential on non-sutured dermal wounds in rodent model. Aqueous, methanolic and hydromethanolic extracts were obtained by dynamic maceration, and characterized in terms of yield, tannin content, whose major compounds were identified by high performance liquid chromatography with mass spectrometry (HPLC-MS). Thus, the gelatin-based membranes (GEL) and AEPG-incorporated gelatin-based membranes (GELPG) were developed by casting process and further characterized according to the physical-chemical properties (macroscopic presentation, tension/deformation rates, water vapor transmission, swelling rates, analysis of microstructures by scanning electronic microscopy and infrared Fourier transform infrared spectroscopy). For the wound healing assay, wounds were performed in the back of Wistar rats (n=60), assigned into three groups (n=20): wGEL, dressed with collagen-based membranes; wGELPG, dressed with of 1% AEPG-incorporated gelatin-based membranes; and CTR, undressed wounds. The yield of the AEPG was 58.34 ± 1.71 and the anti-oxidant activity was regarded as high ($IC_{50}=1.715 \pm 0.24 \mu\text{g/mL}$). Gallic acid, ellagic acid, punicalagin α and punicalagin β were the major tannic compounds of the extracts. GELPG membranes were shown to be slightly yellowish, but continuous and homogeneous and thicker than GEL ($p<0.001$), but no significant difference was observed regarding the mechanical properties in comparison to GEL. Furthermore, GELPG showed lower rates of water vapor transmission, but higher swelling rates ($p<0.05$). FTIR analysis suggested the incorporation of the AEPG to the membranes. The wounds dressed with GELPG membranes showed significantly increased wound contraction rates at 3 ($p<0.01$), 7 ($p<0.001$) and 14 days ($p<0.001$), improved the granulation tissue, and provided better collagen deposition and arrangement during wound healing. In conclusion, this study suggests that the application of peel-derived AEPG-incorporated gelatin-based membranes promoted substantial improvement of wound healing in rodent model, expressed by acceleration of the wound contraction rates, modulation of the inflammatory response and better collagenization of the fibrous scar.

Key Words: *Punica granatum*, gelatin, bioactive membrane, healing.

INTRODUÇÃO

A pele exerce funções importantes para os seres vivos. Os traumas, intervenções cirúrgicas, queimaduras, ou ainda feridas decorrentes das deficiências metabólicas (diabetes) podem resultar na formação de lesões que interrompem a continuidade tecidual, expondo o tecido conjuntivo subjacente (NITZ *et al.*, 2006).

A terapia tópica é conduta indispensável no tratamento de feridas, fundamentada na escolha de coberturas locais que mantenha úmido e limpo o leito da ferida e sejam capazes de absorver o exsudato (CASABURI, 2009). Nesse sentido, tem-se intensificado a pesquisa de produtos naturais para auxiliar na cicatrização (COELHO, *et al.*, 2010).

Os substitutos dérmicos atuam na aceleração da angiogênese e promovem debridamento autolítico. O uso dessas coberturas bioativas ainda mantém as células viáveis e permitem que elas liberem fatores de crescimento estimulando sua proliferação (OLIVEIRA, 2010).

A gelatina é um hidrocoloide gerado a partir da degradação parcial do colágeno, formando uma proteína solúvel que vem ganhando atenção por possuir propriedades funcionais adequadas à produção dessas membranas (CORRÊA, 2011). Determinadas macromoléculas proteicas apresentam propriedades desejáveis na preparação de membranas com destaque da habilidade em formar fibras ou redes, boa elasticidade e plasticidade (CARDOSO, 2005).

Membranas poliméricas produzidas à base de gelatina têm sido utilizadas na reparação de traumas químicos e mecânicos de pele e mucosas (GIRARDI, 2005). A eficácia dessas membranas está associada a compostos com potencial cicatrizante, a exemplo do ácido úsnico (NUNES *et al.*, 2011), e a própolis verde e vermelha (ALBUQUERQUE-JÚNIOR *et al.*, 2009), que apresentaram resultados promissores na reparação tecidual e contração da ferida.

Polímeros naturais são as primeiras opções em veiculação de fármacos na linha de membranas. A *Punica granatum* é uma espécie vegetal amplamente estudada como fitoterápico que se destaca no processo de cicatrização de lesões na pele (DI STASI, 2007). Extratos de *Punica granatum* têm sido experimentados pelo seu potencial anti-inflamatório (LEE *et al.*, 2010; BAGRI, *et al.*, 2010), antioxidante (CELIK *et al.*, 2009; PRAKASH, *et al.*, 2011; WANG, *et al.* 2013) e

analgésico (SINGH *et al.*, 2010). Os frutos (romã) são ricos em elagitaninos, e estes apresentam potencial cicatrizante atribuído aos compostos polifenólicos (QU *et al.*, 2012).

A invenção de uma cobertura dérmica, obtida a partir de cascas do fruto de *Punica granatum* Linn, contribui para o aproveitamento de resíduos vegetais na bioprodução de fármacos inovadores na área de produtos naturais e saúde. Esse bioproduto possui competência química (boa solubilidade e polaridade), alto potencial antioxidante, anti-inflamatório e cicatrizante, além de ser biodegradável e apresentar compatibilidade com o uso epitelial, favorecendo a reabilitação tissular em menor intervalo de tempo. Outra característica bastante favorável é que o bioproduto é totalmente absorvido na área lesada não permitindo a geração de lixo biológico e, conseqüentemente contaminação ambiental.

Tais evidências justificam um estudo mais detalhado sobre os componentes bioativos do fruto desse espécime vegetal, visando colaborar para a construção de um consenso referente à terapia tópica das feridas e, de contribuir para a melhoria da qualidade de vida das pessoas portadoras de feridas.

Para tanto, o objetivo geral desse estudo foi desenvolver, caracterizar, e avaliar o potencial de membranas de gelatina contendo extrato de *Punica granatum* Linn sobre o processo de reparo cicatricial dérmica por segunda intenção *in vivo*.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Desenvolver, caracterizar, e avaliar o potencial de membranas de gelatina contendo extrato de *Punica granatum* Linn sobre o processo de reparo cicatricial por segunda intenção *in vivo*.

2.2 Específicos

- Obter extrato aquoso, metanólico e hidrometanólico da casca de frutos de *Punica granatum* Linn;
- Calcular rendimento dos extratos obtidos;
- Identificar compostos tânicos majoritários, cicatrizantes e anti-inflamatórias, nos extratos obtidos;
- Avaliar a atividade antioxidante do extrato de melhor rendimento;
- Desenvolver membranas de gelatina com e sem extrato de *Punica granatum*;
- Caracterizar as propriedades morfofuncionais e químicas das membranas produzidas;
- Avaliar o potencial cicatrizante de membranas de gelatina contendo extrato de *Punica granatum* em ensaios de cicatrização dérmica *in vivo*.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Pele

A estrutura da pele consiste em um órgão grande, que mede uma área entre 1,8m² e 2,0 mm de espessura, pesa cerca de 5,0 Kg, apesar de ser uma fina camada, exerce funções muito importantes no corpo, como termorregulação, proteção imunológica e sensitiva. Também atua como barreira de proteção impedindo a perda exacerbada de fluidos corporais e de eletrólitos (NEEL *et al.*, 2012).

A pele recobre toda superfície do corpo humano. Sua composição morfológica é organizada por duas camadas distintas. A camada epitelial de origem ectodérmica, caracterizada pelo tecido epitelial pavimentoso estratificado queratinizado, denominada epiderme, seguida da derme que é composta de tecido conjuntivo e a outra porção conjuntiva de origem mesodérmica, a derme. Abaixo da derme se encontra a hipoderme, que, apesar de ter a mesma origem da derme, não compõe as partes da pele, somente faz adesão com os órgãos subjacentes, sendo a camada responsável pela reserva energética, proteção contra choque mecânico e isolamento térmico (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

A pele atua como uma estrutura orgânica que oferece proteção mecânica às partes abaixo desse tecido e serve de barreira contra traumas externos e invasão de microrganismos patógenos, além de se destacar pela função da percepção. A especificidade do tecido tegumentar é demonstrada pelos estímulos táteis, pressóricos, vibratórios, dolorosos, térmicos e pela resposta galvânica da pele. A função secretora engloba as glândulas sudoríparas e sebáceas, importantes para a manutenção tissular (com preservação da camada córnea). (NEEL *et al.*, 2012).

Junqueira e Carneiro (2004) consideram a pele como o órgão que exerce funções importantes, a exemplo de proteção do organismo contra a perda de água por evaporação, proteção mecânica, colaboração na termorregulação, proteção imunológica, elasticidade, a depender de sua localização. Exerce ainda proteção contra os raios ultravioletas, formação de vitamina D₃.

Essa estrutura cutânea como matriz de colágeno constitui-se de camadas importantes, a epiderme – epitélio escamoso estratificado e a derme – camada composta de 80% de água, fibras de colágeno, elastina e fibrilas organizadas em rede, na qual estão presentes, fâneros cutâneos, rede vascular e receptores sensoriais, também agrega fibroblastos que desempenham papel vital na modelagem da matriz de colágeno fibrilar (NEEL *et al.*, 2012).

3.1.1 Epiderme

A epiderme é constituída por um epitélio estratificado pavimentoso queratinizado. A espessura da pele depende da sua região anatômica, como exemplo a planta do pé e a palma da mão a pele é espessa, onde estão presentes as camadas basal, espinhosa, granulosa, lúcida e córnea. Outras regiões apresentam a epiderme mais fina, chamada pele delgada, onde a camada córnea é mais reduzida e a camada lúcida não existe. Nessa camada estão presentes quatro tipos de células: Queratinócitos, Células de Merkel, Melanócitos, Células de *Langerhans* (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

A epiderme é composta, predominantemente de queratinócitos, que promovem a adesão célula-célula dando origem à camada córnea (mais externa), constituída de células eosinófilas anucleadas com grande quantidade de filamentos, principalmente a queratina, proteína responsável pela função de impermeabilização. O extrato ou camada basal é responsável pela reposição celular, promovendo a renovação da epiderme continuamente e, conseqüentemente, eliminação e substituição de células da camada córnea. Por fim, as camadas, espinhosa e granulosa também constituem a epiderme. O aporte de oxigênio e nutrientes dessa área chega por difusão, a partir de vasos sanguíneos da derme, já que essa camada não possui vasos (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004; ALBUQUERQUE-JÚNIOR, 2009; IGNÁCIO, 2009).

3.1.2 Derme

É o tecido conjuntivo sobre o qual se apoia a epiderme. O tecido conjuntivo é caracterizado pelos tipos de células e fibras que o compõe. Essas células podem

ser: fibroblastos responsáveis pela produção de fibras e de uma substância gelatinosa, a substância amorfa; fibrócitos, macrófagos, linfócitos, plasmócitos, mastócitos, células adiposas e melanócitos. Sua superfície externa é irregular. Essas irregularidades são denominadas papilas e aumentam a área de contato derme-epiderme, trazendo maior resistência à pele. A derme possui duas camadas: papilar, a mais superficial, e reticular, a mais profunda (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

A derme consiste numa camada de sustentação da epiderme, composta de tecido conjuntivo e, constituída de numerosos fibrócitos que sintetizam as proteínas das fibrilas do colágeno e da elastina, responsáveis pela sustentação tecidual. Nessa parte há acomodação dos vasos sanguíneos e linfáticos que nutrem a epiderme, além de agregar nervos e órgãos sensoriais como, órgão de Ruffini (sensíveis ao calor), corpúsculo de Vater-Pacini (sensíveis à pressão), corpúsculo de Meissner (detecção de pressões de intensidades variadas), célula de Merckel (sensíveis ao tato e à pressão) e folículo piloso, com terminações nervosas associadas; terminação nervosa livre, com dendritos livres sensíveis, visualizados na Fig. 1 (IGNÁCIO, 2009).

Na ocorrência de perda extensa, superior a 4,0 cm de diâmetro na área da derme e epiderme, a pele necessita de reconstrução cirúrgica, por enxerto, em que existe o risco potencial de rejeições e possíveis outras intercorrências. Isso reforça a teoria de que a pele não é apenas uma membrana permeável que recobre a superfície corporal, mas um órgão muito mais complexo (NEEL, *et al.*, 2012).

A ruptura da pele confina a barreira mecânica de proteção contra microrganismos patógenos exógenos e, ao evento de traumas ocorridos na pele provocando descontinuidade tecidual e desarranjo tegumentar em que altera a homeostase, denomina-se ferida (ALEMDAROGLU *et al.*, 2006; CARLUCCI *et al.*, 2007; ISERI *et al.*, 2008).

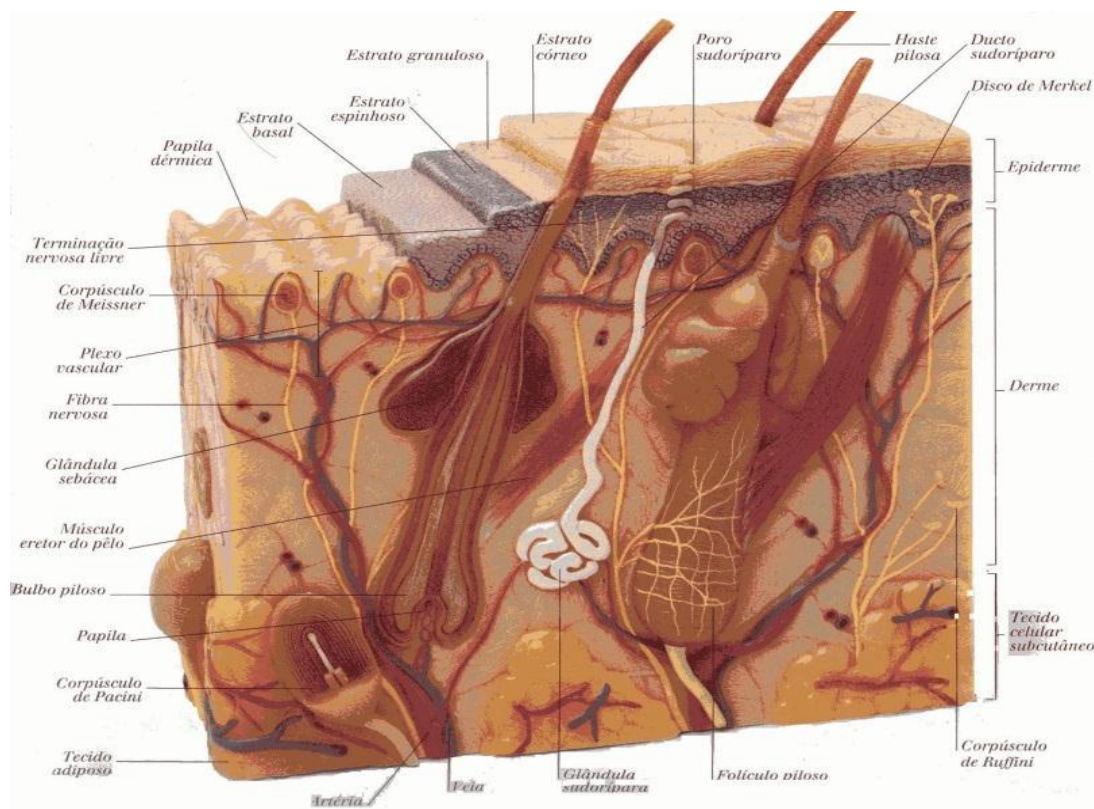


Figura 1: Estrutura anômica da pele, indicando principais elementos (IGNÁCIO, 2009).

3.2 Feridas na pele

As feridas são definidas como qualquer lesão que infere a descontinuidade cutânea causada por cirurgias, traumas, isquemia, queimaduras, pressão continuada por longa permanência de tempo ou qualquer outro tipo de agressão externa que altere as condições morfofuncionais da pele (BLANES, 2004; ARAÚJO, 2010).

Essas lesões propiciam ao ambiente da ferida, condições adequadas à proliferação de microrganismos permitida pelo potente meio de cultura ali existente, entendido pela presença de exsudato rico em nutriente e temperatura local apropriada (MIYAZAKI *et al.*, 2012).

Tão logo ocorre a descontinuidade da pele, inicia-se o processo de cicatrização que perpassa desde a ocorrência da lesão até sua remodelação tardia, considerado como um processo complexo de reabilitação, induzida por agressão

local que abrange modificações entre as células e os componentes da matriz extracelular (MUZZARELLI, 2009).

3.2.1 Fisiopatologia da ferida

O pH é um fator importante que ajuda a controlar o microambiente das feridas crônicas. As feridas agudas cicatrizam em meio ácido, como uma resposta fisiológica temporária, resultante de fatores diversos: 1) produção de ácido láctico; 2) aumento da exigência de O_2 e diminuição da perfusão tecidual, com aumento local de pCO_2 . As lesões que apresentam pH mais alcalino apresentam períodos de cicatrização mais demorada, demonstrando que o pH das feridas crônicas encontra-se entre 7.15 e 8.9 (MENOITA *et al.*, 2012).

Imediatamente após a instalação do ferimento, o processo de proteção é iniciado com a chegada do sangue preenchendo a área lesada. Consequentemente ocorre a coagulação, desidratação e formação de crosta. Os coágulos formados liberam mediadores químicos produzindo uma reação inflamatória aguda. Logo surgem os neutrófilos, seguido de macrófagos e linfócitos, que invadem a área lesada, respectivamente (NITZ *et al.*, 2006).

O processo prossegue com o aumento da permeabilidade que é favorecida pela neoformação de capilares, apresentando o aspecto edemaciado. A partir daí, fibroblastos, capilares e células inflamatórias residuais, passam a constituir o tecido de granulação. Os miofibroblastos migram para a lesão em busca de promover a retração da ferida, através de sua capacidade contrátil. O aumento da densidade de fibras colágenas e suas retrações promovem a redução do diâmetro dos capilares, o endotélio desses vasos prolifera para a luz causando sua obstrução e, consequentemente, ocorre diminuição do fluxo sanguíneo, assim determinando uma redução dos constituintes do tecido de granulação. Arteríolas e vênulas surgem na área lesada por diferenciação de células mesenquimais em células musculares que envolvem os capilares, passando a constituir a parede desses novos vasos. Estas alterações fazem com que o tecido de granulação mude sua estrutura, constituindo um tecido conjuntivo típico (NITZ *et al.*, 2006; LAMANO, 2008).

3.2.2 Tipos de feridas

As feridas são diferenciadas em agudas, injúrias causadas por corte ou ressecção cirúrgica que completam o processo cicatricial dentro do tempo esperado. Contrastando com as feridas crônicas, que são injúrias dos tecidos em que a cicatrização ocorre lentamente (ARAÚJO, 2010).

Quando a ferida envolve a derme incompleta e ocorre depois de repetidos procedimentos de agressão à pele, esta é considerada ferida de espessura parcial; por outro lado, quando acomete a derme completa ou é estendida no tecido celular subcutâneo necessitando da formação de um novo tecido, é classificada em ferida de espessura total (MADELBAUM, *et al.*, 2003).

3.3 Inflamação

O sistema imunológico é constituído por um conjunto de células e moléculas, que buscam a manutenção da homeostase no combate às agressões orgânicas. A imunidade caracteriza-se pelo acelerado retorno à agressão, independente de qualquer estímulo recebido previamente, sendo a primeira linha de defesa do organismo (CRUVINEL *et al.*, 2010).

A imunidade inata atua em conjunto com a imunidade adaptativa e seus mecanismos envolvem barreiras físicas, químicas e biológicas, componentes celulares e moléculas solúveis. A defesa elementar do organismo frente a um agravo tecidual envolve outras etapas secretamente integradas e constituídas pelos diferentes componentes desse sistema. A resposta inflamatória é considerada favorável ao organismo, resultando na expulsão de microrganismos por fagocitose, diluição ou neutralização de substâncias importunas ou tóxicas pelo extravasamento local de fluidos ricos em proteínas, e limitação da lesão inicial pela deposição de fibrina (CRUVINEL *et al.*, 2010).

A inflamação é um processo que provoca modificações do sistema vascular, componentes líquidos e celulares, visando destruir, diluir ou isolar o agente lesivo e caracteriza-se pelos sinais e sintomas de dor, calor e rubor (MELO *et al.*, 2011; TAKEUCH e AKIRA, 2010).

Dentre os agentes causadores da inflamação, destacam-se os agentes biológicos, químicos, imunes e físicos (incisões, traumatismos, fraturas), sendo chamados de agentes inflamatórios ou flogógeno. Esse processo, clinicopatologicamente, divide-se em inflamação aguda e crônica. A aguda é aquela que tem duração rápida e apresenta alterações vasculares como exsudação plasmática e neutrófila (MELO *et al.*, 2011).

Essas alterações são desencadeadas pelos diferentes mediadores químicos que se originam do plasma ou de células locais, que agem juntos ou em sequência, modificando a resposta inflamatória inicial influenciando sua evolução, devido regular as subseqüentes respostas vasculares e celulares. Cessado esse processo agudo, a liberação de mediadores é reduzida, a microcirculação recupera o equilíbrio hemodinâmico e há o retorno das células e líquidos extravasados à circulação, geralmente pelos vasos linfáticos. A inflamação crônica tem uma permanência mais longa e está associada à presença de outras células como linfócitos e macrófagos, além da proliferação de vasos sanguíneos e necrose tecidual (MELO *et al.*, 2011).

Lawrence *et al.* (2010) consideram a inflamação uma resposta primária à infecção ou lesões que removem o agente causador, consequentemente conduz a reparação tecidual, regulação da permeabilidade vascular ocorrendo o recrutamento de leucócitos sanguíneos. O organismo reage através do processo inflamatório a todos os tipos de lesão, abrangendo respostas vasculares, humorais, neuro hormonal e celular, no local da perda tecidual que se inicia logo após a inflamação e é caracterizada pela formação de gelatina, responsável pela força e integridade dos tecidos. Assim, a força e a integridade do tecido de reparação residem no tipo de fibra colágena sintetizada e na quantidade de ligações cruzadas (MAIA *et al.*, 2008).

3.4 Cicatrização

A maioria das lesões do organismo é reparada pela regeneração das células parenquimatosas, seguida da cicatrização do tecido conjuntivo. Quando ocorrem feridas parciais da espessura da pele, forma-se um coágulo, secando em seguida com a finalidade de proteger a lesão. Inicia-se o processo de migração celular, sendo este o primeiro evento responsável pelo reparo tecidual. (ALBUQUERQUE-

JÚNIOR *et al.*, 2009). Ignacio (2009) avigora que o processo cicatricial advém de inflamação, seguido por constituição de tecido de granulação e remodelação tecidual.

O processo biológico da cicatrização envolve diferentes tipos de células, matriz extracelular, proteínas e seus receptores, mediado por citocinas e fatores de crescimento. O recrutamento, a ativação, a migração e a diferenciação de células no leito da ferida são afetadas devido à liberação de vários fatores de crescimento que ocorrem na ferida, como fator de crescimento derivado plaqueta-PDGF que induz a proliferação de fibroblastos com consequente produção da matriz extracelular durante a contração da ferida e reorganização da matriz; fator de crescimento epidérmico-EGF, fator de crescimento básico de fibroblastos-FGF, fator de crescimento transformante beta-TGF- β 1, principal responsável pelo estímulo inicial da migração das células epiteliais; o fator de crescimento transformante alfa-TGF- α (SANTORO e GAUDINO, 2005; ARAÚJO, 2010).

A fibrose ocorre subsequentemente à formação de tecido de granulação, sendo destaque na redução do tamanho da lesão. Regeneração epidérmica e dérmica (contração da lesão) podem usualmente fechar a ferida suavemente. Fibroblastos ricos em actina, em tecidos de granulação, conhecidos como miofibroblastos, são os responsáveis pela contração da ferida. A cicatrização de feridas é considerada a reparação tecidual do organismo humano que envolve uma sequência de fatores de crescimentos peptídicos determinados por plaquetas, macrófagos, células epidérmicas e dérmicas importantes nessa reconstrução dos tecidos (ULUBAYRAM *et al.*, 2001; KAWAIA *et al.*, 2005; IGNACIO, 2009).

Sehn *et al.* (2009) afirmam que a cicatrização é caracterizada pelo tipo de célula e, respectiva fase que predomina a lesão, enfatizando ainda que essa etapa contempla uma sequência dividida em fases distintas, e segue eventos sequenciados e simultâneos, que envolvem a inflamação, reepitelização, reconstrução dérmica, contração e remodelação do tecido lesado.

Ignacio (2009) enfatiza a variedade de fatores sistêmicos e locais que podem interferir no processo de cicatrização, interrompendo o processo de inflamação e ocasionando falhas na produção e interligação do colágeno. Considerando assim, três fases interligadas no processo de cicatrização, a fase inflamatória, fase proliferativa e fase de maturação. Samy *et al.* (2012) evidencia que esse processo

inicia pela recuperação ou reparação celular, buscando a revitalização do tecido, neoformação vascular, epitelização, contração e remodelamento histológico.

3.4.1 Classificação quanto ao tipo de cicatrização

Segundo Mandelbaum *et al.* (2003), o fechamento das feridas ocorre de maneiras distintas, a depender das características e origem da lesão, classifica-se o tipo de fechamento em primeira, segunda ou terceira intenção (Fig. 2).

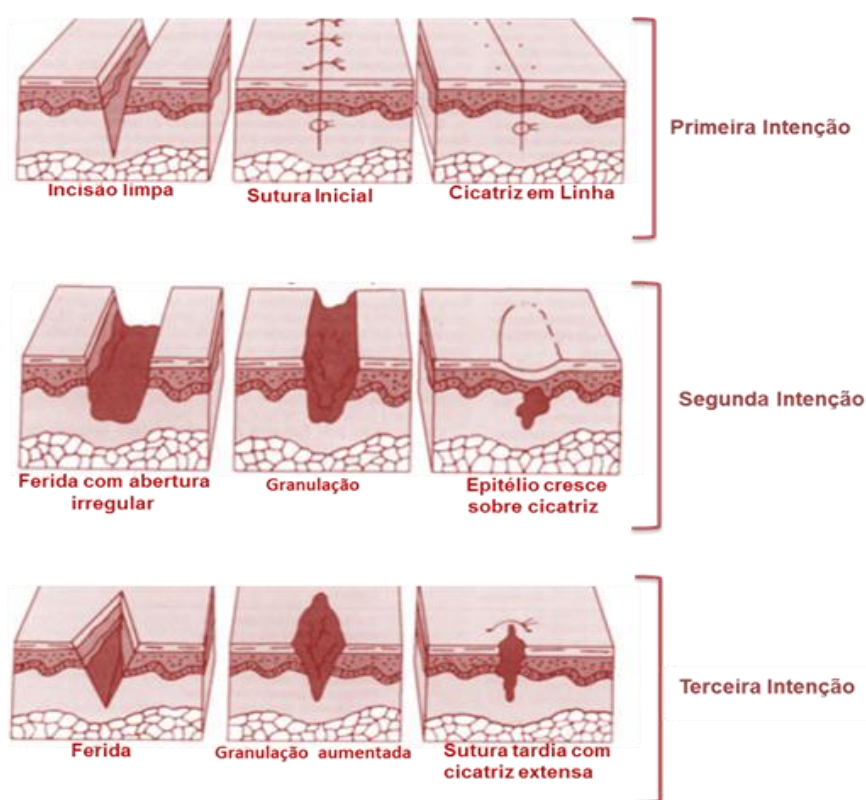


Figura 2: Feridas e tipos de cicatrização. Modificado de MANDELBAUM *et al.* (2003).

3.4.1.1 Primeira intenção

Processo em que ocorre a união primária das bordas da ferida com possível aproximação dos bordos da lesão por suturas, ocorrendo perda tecidual mínima, redução do potencial de infecção e do edema intersticial. Nessa etapa, o tecido de granulação não é visualizado (IGNACIO, 2009).

3.4.1.2 Segunda intenção

A cicatrização por segunda intenção ocorre quando as bordas da ferida não estão apostas, como nas queimaduras ou em ferimentos profundos que são deixados abertos para formação de tecido de granulação. Neste caso, o tecido de granulação preenche a ferida e esta se contrai e reepiteliza (AMORIN, 2005). Para Martins *et al.* (2006), na cicatrização por segunda intenção após a lesão, são identificadas três fases consecutivas: a primeira fase exsudativa ou inflamatória; a segunda, fase proliferativa ou fibroblástica; e terceira, fase, denominada como fase de maturação ou remodelação.

3.4.1.3 Terceira intenção

A terceira intenção ocorre quando há fatores que retardam a cicatrização da lesão, inicialmente submetida a fechamento por sutura secundária. Isto ocorre quando a incisão é deixada aberta para drenagem de exsudato e só então é fechada ou simplesmente, quando a ferida aberta é fechada secundariamente dias após a lesão, cicatrizando por primeira intenção tardia. Geralmente estas feridas são mantidas abertas para a resolução de edema e infecção (AMORIN, 2005; DANTAS e JORGE, 2005).

3.4.2 Classificação quanto às fases de cicatrização

São três as fases cicatriciais, (1) Fase inflamatória ou exsudativa, (2) Fase proliferativa ou de tecido de granulação (3) remodelação.

Estas fases não são mutuamente excludentes, mas sobrepostas no tempo (BALBINO *et al.*, 2005; GANTWERKER e HOM, 2012).

3.4.2.1 Fase inflamatória ou exsudativa

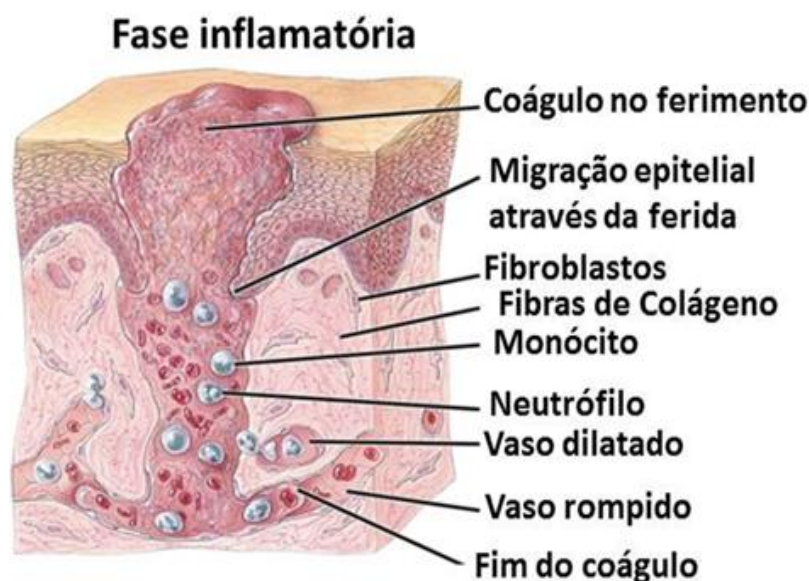


Figura 3: Fase inflamatória do processo de cicatrização. Modificado de GANTWERKER e HOM, 2012.

A primeira fase, inflamatória ou exsudativa, inicia-se após a ocorrência do ferimento, com o extravasamento sanguíneo que preenche a área lesada com plasma e elementos celulares, principalmente plaquetas, conforme Fig. 3. A agregação plaquetária e a coagulação sanguínea geram um tampão rico em fibrina, que, além de restabelecer a hemostasia e formar uma barreira contra a invasão de microrganismos, organiza matriz provisória necessária para a migração celular (MENDONÇA e NETTO, 2009).

Existem células específicas no organismo que desempenham função importante na defesa contra agentes agressores. A maioria chega ao local da injúria pela corrente sanguínea, como acontecem com os polimorfonucleares (neutrófilos e eosinófilos), os monócitos e os linfócitos. Outras constituem aquartelamentos locais de defesa, como os histiócitos (macrófagos móveis) e os linfócitos e plasmócitos dos folículos linfoides, disponíveis imediatamente após a injúria. Algumas dessas células exercem o papel de defesa preparando substâncias específicas (anticorpos e linfocinas) que neutralizam ou destroem o agente agressor - linfócitos e plasmócitos da defesa imunológica. Já os macrófagos e leucócitos

polimorfonucleares granulócitos (neutrófilos e eosinófilos) fagocitam e digerem, no seu interior, o agente agressor (LAMANO, 2008).

A resposta inflamatória ocorre a partir da migração sequencial de células de defesa para a ferida, facilitada por mediadores bioquímicos que aumentam a permeabilidade vascular, favorecendo a exsudação plasmática e a passagem desses elementos celulares para a área lesada (MONACO e LAWRENCE, 2003). Os mediadores bioquímicos de ação curta são a histamina e serotonina e as mais duradouras são a leucotaxina, bradicinina e prostaglandina. A prostaglandina é um dos mediadores mais importantes no processo de cicatrização, pois além de favorecer a exsudação vascular, estimula a mitose celular e a quimiotaxia de leucócitos (TAZIMA *et al*, 2008).

A fase aguda da reação inflamatória desencadeada no início do reparo tem longevidade variável, durando de cinco a sete dias, quando ocorre a cronificação do processo necessária à instalação da reação de granulação característica da segunda fase do processo cicatricial. Essa fase é marcada pelos sinais de dor, calor, rubor e edema. Nessa fase há liberação de mediadores químicos provocando a vasodilatação e o aumento da permeabilidade dos vasos favorecendo a quimiotaxia que combatem os agentes invasores e os macrófagos, que irão promover a fagocitose. (ALBUQUERQUE-JÚNIOR *et al.*, 2009).

A alteração no perfil de infiltração leucocitária é determinada pela redução nos sinais quimiotáticos com diminuição gradativa no influxo de neutrófilos e substituição destes leucócitos por linfócitos e macrófagos (NUNES *et al.*, 2011). A relevância deste processo se pauta na capacidade destas células de secretar grande quantidade de fatores de crescimento responsáveis por uma cadeia de eventos proliferativos indispensáveis à formação do tecido cicatricial (DIEGELMANN e EVANS, 2004).

3.4.2.2 Fase proliferativa ou de tecido de granulação

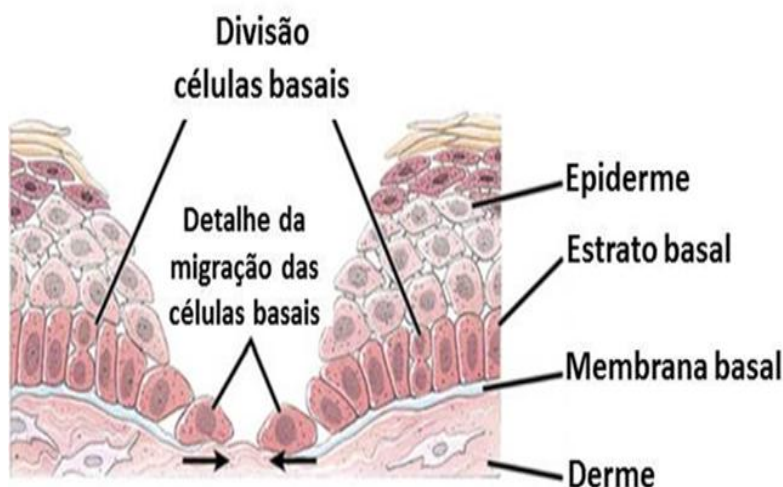


Figura 4: Divisão e migração das células basais através da fase de granulação da ferida. Modificado de GANTWERKER e HOM, 2012.

A segunda fase (Fig. 4) compreende três fenômenos biológicos distintos, mas intensamente interligados: angiogênese, fibroplasia e reepitelização da área lesada. Nessa fase acontece o preenchimento da lesão entre sete e vinte e um dias (IGNACIO, 2009).

A angiogênese e fibroplasia compõem a reação de granulação responsável pela ocupação do tecido lesionado, instalando-se cerca de quatro dias após a lesão. Os fibroblastos produzem a nova matriz extracelular necessária ao crescimento celular, enquanto os novos vasos sanguíneos carregam oxigênio e nutrientes necessários ao metabolismo celular local (MENDONÇA e NETTO, 2009). Badylak *et al.* (1999) considera o crescimento de novos vasos sanguíneos um processo necessário para que ocorra a nutrição das células que irão suprir o tecido-suporte, de forma que os produtos da degradação destas células sejam eliminados e as células de defesa tenham acesso ao local, evitando a contaminação por agentes infecciosos, a esse processo denomina-se angiogênese.

Haverá, portanto, o reparo do tecido conjuntivo com a formação de tecido de granulação e do epitélio lesado, através do aprisionamento dos fibroblastos na rede de fibrina recém-formada que se multiplicam e passam a produzir fibras colágenas, promovendo uma intensa proliferação vascular local. Esse tecido formado por fibras

colágenas, fibroblastos e vasos sanguíneos é denominado tecido de granulação (DIEGELMANN e EVANS, 2004).

A reepitelização, por sua vez, se inicia com a movimentação das células epiteliais oriundas tanto da margem epitelial remanescente como de apêndices epidérmicos marginais (PATEL *et al.*, 2005). Fibroblastos ativos são capazes de estimular a proliferação de queratinócitos (células epiteliais) *in vitro* em matrizes de colágeno sugerindo uma íntima relação entre a fibroplasia e o processo de reepitelização na superfície da ferida (VOROTELYAK *et al.*, 2002).

Um fenômeno de extrema importância que ocorre durante o processo cicatricial está representado pela contração da ferida caracterizado pelo tracionamento das bordas da ferida em direção ao centro, a fim de reduzir as dimensões da área lesada e minimizar a formação de tecido cicatricial fibrótico (DESMOULIÈRE *et al.*, 2005). Ignacio (2009) cita os miofibroblastos como tipo singular de fibroblastos que compartilha características fenotípicas com células musculares lisas e ocasionam tensões que potencializam a retração da ferida.

No início do processo de cicatrização de uma ferida plana, sua área torna-se progressivamente menor, devido ao movimento centrípeto de suas bordas, sobretudo em resposta à ação de miofibroblastos presentes no tecido de granulação. A contração tecidual pode perdurar por meses, sendo muitas vezes incompleto. A mediação dos macrófagos planeia a produção inicial de fatores de angiogênese que estimulam a migração de células endoteliais das bordas para o leito da ferida, dando origem à nova vascularização que só ocorre em meio úmido (IGNACIO, 2009).

A fase proliferativa caracteriza-se pela formação de tecido de granulação, que consiste de uma densa população de macrófagos, fibroblastos, nervos, vasos embebidos em uma matriz frouxa de colágeno, fibronectina e ácido hialurônico. Nessa etapa ocorre a neo-angiogênese, produção de colágeno jovem pelos fibroblastos e intensa migração celular, principalmente de queratinócitos promovendo a epitelização. E, por fim, a fase de cicatrização propriamente dita que têm formas distintas de fechamento (CUNHA, 2006).

3.4.2.3 Fase de maturação ou remodelamento

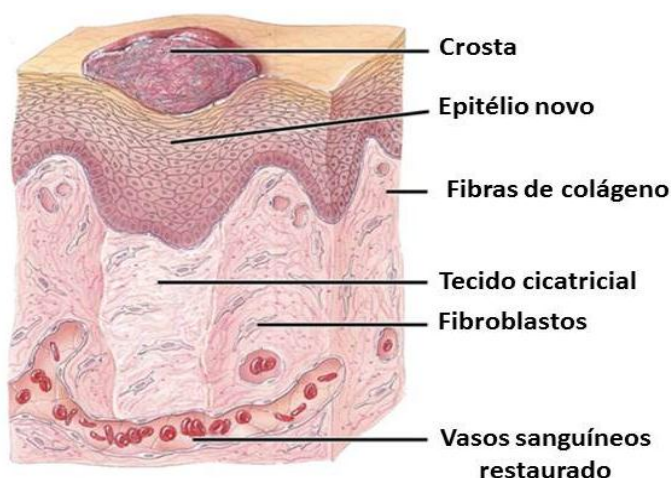


Figura 5: Fase de maturação do processo cicatricial. Modificado de GANTWERKER e HOM, 2012.

Na terceira e última fase da cicatrização, remodelagem ou maturação (Fig. 5), ocorre uma tentativa de recuperação da estrutura tecidual normal. Esta fase é marcada pela secreção de enzimas com atividade colagenolítica (metaloproteinases ou collagenases) por fibroblastos que clivam as moléculas de colágeno tipo I em sítios específicos, cujos produtos de clivagem sofrem posterior desnaturação, digestão por outras proteinases (gelatinases) e fagocitose pelos próprios fibroblastos circunvizinhos (DIEGELMANN e EVANS, 2004).

Subsequentemente acontece a fibroplasia e a formação da matriz extracelular, fatores fundamentais no processo de formação do tecido de granulação (IGNACIO, 2009), incluindo novas cadeias de colágeno que são depositadas de maneira a promover melhor entrelaçamento arquitetural das fibras, de maneira semelhante àquela observada na derme normal (NUNES *et al.*, 2011).

A formação do tecido de granulação depende dos fibroblastos que são indispensáveis à formação da matriz. Além de produzirem colágeno, produzem também elastina, fibronectina, glicosamina e proteases, que são responsáveis pelo debridamento e remodelamento fisiológico, dentre outros componentes (IGNACIO, 2009; GANTWERKER e HOM, 2012).

3.5 Coberturas e Curativos

As feridas podem ser ou não cobertas, considerando que o curativo é um meio terapêutico, que através de técnica asséptica previne a contaminação e elimina fatores deletérios que possa retardar o processo de cicatrização, (CUNHA, 2006).

Considerado ainda como a interação de procedimentos técnicos que envolvem da antisepsia à cobertura, com intuito de favorecer o processo de cicatrização livre de contaminação por microrganismos patógenos e alívio da dor. Os diferentes materiais utilizados para cobrir feridas têm características peculiares a cada tipo, e variam desde sintéticos aos naturais (ULUBAYRAM, *et al.* 2001; IGNACIO 2009).

A incidência elevada de feridas com perda de substância e/ou tecidos profundos, tem determinado a busca de novos bioprodutos capazes de acelerar os mecanismos de proliferação celular, buscando propiciar melhores condições para a recuperação da pele (GOMES *et al.*, 2008). Os tratamentos disponíveis às lesões abertas buscam recursos que proporcionem uma aceleração no processo de cicatrização de forma a restaurar a integridade do tecido lesionado mais próximo do fisiológico (MENDONÇA, 2009).

A medicina regenerativa e Engenharia de Tecidos tem ampliado a ação de alguns biomateriais no provimento de sinais biológicos capazes de nortear a função celular, através da introdução de fatores de crescimento e liberação controlada de fármacos. A pesquisa na engenharia de tecidos se restringia ao desenvolvimento de elementos estruturais de arquitetura definida e outros que visavam gerar suporte ao metabolismo celular (SANTOS *et al.*, 2012).

A Biotecnologia e a Engenharia de Tecidos buscam compreender a morfofuncionalidade perdida pela pele lesada, visando encontrar substitutos na forma de coberturas. Esses substitutos são classificados, a partir do ponto de vista estrutural e funcional em: a) temporário ou permanente; b) bio sintético, sintético ou biológico e c) epidérmico, dérmico ou composto (NEEL *et al.*, 2012).

A seleção do biomaterial varia do tipo e condição da ferida atentando-se, portanto, aos requisitos de biocompatibilidade adequada e disposição de

microestrutura porosa apropriada permitindo a infiltração celular, proliferação e diferenciação (XINGANG *et al.*, 2012, NELL, *et al.*, 2012).

Existe uma grande variedade de coberturas comercializada, que têm como finalidade proteger as feridas contra microrganismos e ressecamento durante a cicatrização, além de manter as células viáveis e permitir que elas liberem fatores de crescimento estimulando sua proliferação (SANTANA *et al.*, 2012).

Para o Ministério da Saúde, a seleção de escolha da cobertura ideal para realização do curativo deve estar pautada em critérios norteadores para garantia de expansão do fármaco, de modo a considerar que deve possuir capacidade além da proteção contra traumas externos, incluindo os fatores de capacidade de repor células do tecido lesado, serem biodegradáveis, absorvíveis, eliminarem tecido não viável, através de debridamento, diminuir risco de infecções, serem práticas para o paciente e família, terem boa relação custo/benefício, estarem sempre disponível (BRASIL, 2009).

Pesquisas conduzem investigações científicas na busca de melhores resultados de elementos que operem na dinâmica da reparação tecidual, principalmente relacionado à promoção da bioestimulação celular o que poderia resultar em aceleração no processo de cicatrização, sem causar efeitos danosos às células, tecidos ou órgãos (BARRETO, 2008). Os biomateriais vão além de uma simples cobertura de proteção, atentando ainda para a regeneração tecidual e sua morfofuncionalidade (NEEL *et al.*, 2012).

O processo cicatricial de feridas dérmicas com agentes macromoleculares, como polímeros naturais está como escolhida entre as opções preferidas como substitutos dérmicos, devido seus benefícios, como biocompatibilidade, atoxicidade, facilidade ao manuseio e segurança na aplicação. Membranas poliméricas auxiliam no processo de proteção contra traumas externos e microrganismos, favorecendo condições ideais para a cura da ferida (MELO *et al.*, 2012).

A tabela 1 representa esquematicamente dados das coberturas com suas indicações e mecanismos de ação, comumente utilizadas nos serviços de saúde (BRASIL, 2009).

Tabela 1: Coberturas mais utilizadas em curativos nos serviços de saúde do Brasil, de acordo com o tipo de ferida e indicação clínica do Ministério de Saúde do Brasil, 2009.

COBERTURA	INDICAÇÃO	MECANISMO DE AÇÃO
Ácidos graxos essenciais (AGE)	Prevenção de úlceras de pressão e tratamento de feridas abertas.	Os AGEs promovem quimiotaxia (atração de leucócitos) e angiogênese (formação de novos vasos sanguíneos) mantêm o meio úmido e aceleram o processo de granulação tecidual. A aplicação tópica em pele íntegra tem grande absorção: forma uma película protetora, previne escoriações – devido à alta capacidade de hidratação – e proporciona nutrição celular local.
Hidrocolóide	Prevenção e tratamento de feridas abertas não infectadas.	As partículas de celulose expandem-se ao absorver líquidos e criam um ambiente úmido, que permite às células do microambiente da UP fornecer um debridamento autolítico. Esta condição estimula o crescimento de novos vasos, tecido de granulação e protege as terminações nervosas. Ele mantém o ambiente úmido, enquanto protege as células de traumas, da contaminação bacteriana, e mantém também o isolamento térmico.
Alginato de cálcio	Tratamento de feridas abertas, hemorrágicas, exsudativa, com ou sem infecção.	Têm propriedade desbridante. Antes do uso, em seco, e quando as fibras de alginato entram em contato com o meio líquido, realizam uma troca iônica entre os íons cálcio do curativo e os íons de sódio da úlcera, transformando as fibras de alginato em um gel suave, fibrinoso, não aderente, que mantém o meio úmido ideal para a cicatrização.
Carvão ativado	Tratamento de feridas infectadas exsudativa, com ou sem odor.	Possui um alto grau de absorção e eliminação de odor das úlceras. O tecido de carvão ativado remove e retém as moléculas do exsudato e as bactérias, exercendo o efeito de limpeza. A prata exerce função bactericida, complementando a ação do carvão, o que estimula a granulação e aumenta a velocidade da cicatrização.
Sulfadiazina de prata	Queimaduras, prevenção e tratamento de feridas infectadas.	O íon prata causa precipitação de proteínas, age diretamente na membrana citoplasmática da célula bacteriana e tem ação bacteriostática residual pela liberação desse íon.

Diferentes biomateriais têm sido utilizados como suporte no reparo de tecidos, sendo cada tipo selecionado para o uso mais adequado, conforme suas características e propriedades. Membranas têm sido aplicadas na substituição de tecido (IONESCU e CHIRITA, 2008, ALBUQUERQUE JÚNIOR *et al.*, 2009).

Na atuação junto às lesões cutâneas, os biomateriais absorvíveis e biodegradáveis à base de colágeno possibilitam a nutrição das células que preenchem o tecido afetado e o acesso das células de defesa ao local e promovem a maturação da ferida por fornecerem um apoio para uma transição mais rápida à produção do colágeno maduro e seu alinhamento. Esses produtos são resistentes à degradação e funcionam como suporte para a adesão, migração e proliferação celular, fatores benéficos à cicatrização de feridas (GIRARDI, 2005, PARENTEAU-BAREIL *et al.*, 2011).

Desta forma, estudos têm se concentrado em promover a incorporação de compostos bioativos, a exemplo do ácido úsnico, ou extratos de produtos naturais, como da própolis vermelha, em membranas de gelatina no intuito de promover a liberação controlada do produto incorporado diretamente no tecido danificado por queimaduras, demonstrando resultados promissores em ensaios experimentais de cicatrização (ALBUQUERQUE-JÚNIOR *et al.*, 2009; NUNES *et al.*, 2011).

3.6 Colágeno

Os colágenos são proteínas que fazem parte de uma rede de macromoléculas (colágenos, elastina, glicoproteínas e proteoglicanas) secretadas pela Matriz Extracelular – MEC, e totalizam perto de 25% da massa proteica total do organismo. Exercem ainda função importante na arquitetura tecidual, além de atuar na resistência dos tecidos e em diversas variedades interativas célula – célula e célula – matriz (ROCHA *et al.*, 2006). Ainda considerados como uma cadeia organizada de aminoácidos que constroem uma fibra resistente que constitui a estrutura do corpo (OHGUCHI *et al.*, 2006; OHARA *et al.*, 2007).

Neel *et al* (2012) consideram os colágenos como a principal proteína na constituição do tecido conjuntivo, e acrescentam que, além de preencher as lacunas dos tecidos parenquimatosos, produz fibras colágenas, elásticas e reticulares e são responsáveis pela organização estrutural dos tecidos permitindo que cada um

desempenhe sua função pretendida, através da flexibilidade da matriz. Destacam dentre as funções do colágeno para o corpo, sua propriedade mecânica como a mais importante para a morfogênese e reparação.

Os colágenos são abundantes proteínas no corpo, constituindo 30% de massa proteica. As superfamílias dos colágenos podem ser subdividas com base na forma de associação ou outras características sendo numeradas de I a XXVII de acordo com sua ordem de descobrimento. Alguns colágenos são restritos em determinados tipos de tecido: por exemplo, tipo II, X e XI são exclusivamente encontrados nas cartilagens; a família do tipo IV nas membranas basais; e tipo XVII nos hemidesmossomas da pele. Por outro lado, alguns tipos de colágenos são encontrados na maioria das MEC. As fibrilas do colágeno frequentemente consistem de mais que um tipo de colágeno (MYLLYHARJU e KIVIRIKKO, 2004).

Esses colágenos são qualificados em dois tipos fundamentais, aqueles que formam fibrilas e os que não formam fibrilas. Ressalvando que, as fibrilas colagenosas da derme são híbridas dos colágenos, tipo I e II. E que o colágeno do tipo I é o mais abundante, incidindo em um grande número de tecidos, garantindo a alta resistência à tensão da pele, de tendões e ligamentos (ROCHA *et al.*, 2006).

A manutenção da estrutura física do corpo é considerada uma das funções mais importantes do colágeno, o que é permitido a partir da capacidade de resistência mecânica imposta pela sua organização macromolecular, que finda na constituição de fibras, em especial o colágeno tipo I. Dado o destino dessas moléculas para o MEC, fragmentos terminais são clivados, através de enzimas (colagenases) ocorrendo formação de moléculas de colágeno, que sofrem polimerização para formar fibrilas e estas, se agregam para constituir as fibras colágenas (GOISSIS, 2008).

São mais de 27 tipos de colágenos encontrados na natureza, portanto o colágeno tipo I tem destaque por manter a integridade da maioria dos tecidos, devido suas propriedades mecânicas. Possuem outras funções importantes, como a adesão celular, quimiotaxia e migração e a relação dinâmica entre as células, e o colágeno regula a remodelagem do tecido durante o crescimento, diferenciação, morfogêneses e cicatrização bem como estão envolvidos em várias patologias (GOISSIS, 2008; HEINO *et al.*, 2009).

A taxa de síntese colágena declina por volta de quatro semanas e se equilibra com a taxa de destruição e, então, se inicia a fase de maturação do colágeno que continua por meses, ou mesmo anos. Essa síntese é dependente da oxigenação das células, da hidroxilação da prolina e lisina, reação essa mediada por uma enzima produzida pelo próprio fibroblasto, em presença de coenzimas (vitaminas A, C e E), ferro, testosterona, tiroxina, proteínas e zinco. Essa proteína (Fig. 6) possui alto peso molecular e possui composição de glicina, prolina, hidroxiprolina, lisina e hidroxilisina, que se organizam em cadeias longas de três feixes polipeptídicos em forma de hélice, responsáveis pela força da cicatriz (TAZIMA, *et al.*, 2008).

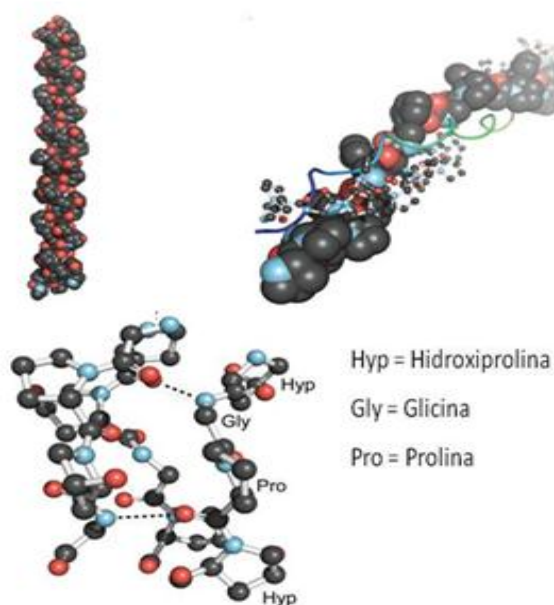


Figura 6: Arranjo Estrutural do colágeno. Adaptado de SHOULDERS *et al.*, 2008.

Tazima (2008) descreve o colágeno como material responsável pela sustentação e pela força tensil da cicatriz, produzido e degradado continuamente pelos fibroblastos. Inicialmente, a síntese de colágeno novo é a principal responsável pela força da cicatriz, sendo substituída ao longo de semanas, pela formação de ligações cruzadas entre os feixes de colágeno.

Alguns estudos têm demonstrado a incorporação de compostos bioativos (fármacos sintéticos ou produtos naturais) em biomateriais implantáveis. O colágeno I tem evidência no auxílio como veiculador de substâncias ativas nesse processo, devido os benefícios relacionados à liberação controlada do produto diretamente no

tecido danificado. Além de o sistema de liberação controlada permitir a manutenção de níveis constantes da droga no organismo, caracterizando eficácia maior na utilização do agente e aplicação diretamente no local de ação, o que concentra muito as dosagens liberadas e minimiza ou evita efeitos colaterais sistêmicos, diminui a frequência de administração do agente ativo, havendo um prognóstico mais promissor (LEE, SINGLA e LEE, 2001).

As fontes naturais mais comuns para extração dos colágenos são a pele de bovino, os tendões, pele de suínos e rabo de ratos. A obtenção do colágeno hidrolisado (gelatina) ocorre principalmente a partir das cartilagens, ossos e pele de bovinos, suínos e peixes. A extração de colágeno da pele de bovinos é realizada a partir de partes da derme e tecido subcutâneo gerando as fibras e o pó de colágeno, que após a hidrólise gera a gelatina (NEEL, *et al.*, 2012; GOMÉZ-GUILLÉN *et al.*, 2011).

Oesser e Seifert (2003) exibem que o processo de transformação química acontece a partir da hidrólise da molécula de gelatina de aproximadamente 450 KDa que é fragmentada em pequenos peptídeos de peso molecular bastante inferior ao inicial, estimado em 2 a 5 KDa. Os aminoácidos não sofrem alteração, sendo esses os mesmos (20) encontrados tanto no colágeno quanto no colágeno hidrolisado.

3.7 Polímeros

Para Cardoso (2005), polímeros são substâncias de alto peso molecular com unidades monoméricas repetidas. Podem apresentar cadeias lineares ou ramificadas que podem estar unidas por reticulação. Uma extensa reticulação pode levar a uma rede polimérica tridimensional e frequentemente insolúvel. As propriedades e reatividade do polímero estão relacionadas ao modo em que estes monômeros se arranjam no espaço. São amplamente utilizados em formulações farmacêuticas como agentes suspensores, emulsificantes, adesivos, materiais de revestimento como barreira em sistemas de liberação de fármacos (SLF), membranas e embalagens de alimentos.

Para a utilização eficaz e segura de polímeros faz-se necessário estudar suas propriedades físicas, químicas, além de sua toxicidade. Para o desenvolvimento de membranas biodegradáveis exige-se a adição de solvente

orgânico que agrava o risco potencial de efeitos deletérios, partindo do princípio que isso gera também maior risco laboral e ambiental. O interesse pelos polímeros hidrofílicos naturais ou biopolímeros tem sido alvo de estudo e interesse dos pesquisadores, no intuito de desenvolver dispersões coloidais aquosas para aplicação destas proteínas em membranas que favorecem o efeito benéfico e afastam os efeitos deletérios (CARDOSO, 2005).

As proteínas ou polipeptídeos são tipos de polímeros naturais formados a partir da união de aminoácidos (monômeros). Estão presentes em todas as células vivas, enzimas, fibras musculares, cabelo e pele. Considerados polímeros de condensação, devido à interação que ocorre entre o grupo ácido (COOH) e o grupo básico (NH₂) esquematizado na Fig. 7 (ROMAN, 2010).

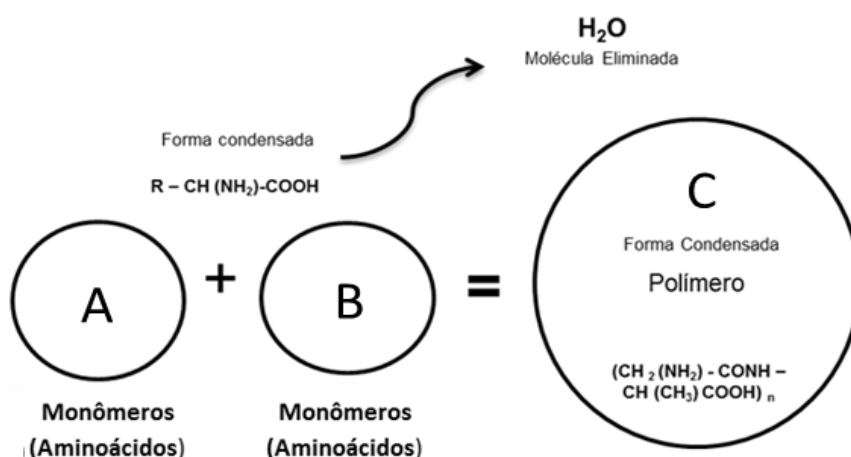


Figura 7: Representação esquemática de um polímero condensado.

A diversidade estrutural dos compostos fenólicos se deve à grande variedade de combinações que acontece na natureza e os compostos resultantes, denominados polifenóis (GOMES, 2011).

3.8 Biomateriais e membranas poliméricas

Os biomateriais utilizados na medicina regenerativa são escolhidos a depender da área a ser tratada, embora todos sejam planejados para auxiliar a função de matriz extracelular (MEC) no suporte de fixação celular, proliferação e diferenciação. Neste sentido, componentes ou produtos da MEC, dentre eles, as

proteínas, glicoproteínas, glicoaminoglicanos, ou de matriz intacta têm sido explorados como materiais de suporte. Simultaneamente, surgem preocupações com a biocompatibilidade, por isso biomateriais de origem natural estão em evidência (NEEL *et al.*, 2012).

Biomateriais veiculados sob a forma de membranas bioativas têm sido amplamente empregados na área de saúde com intuito de estimular a cicatrização de feridas dérmicas e mucosas. Essas membranas podem ser absorvíveis ou não, e fatores como sua constituição, morfologia, textura da superfície, tamanho das porosidades e duração da integridade funcional podem influenciar no êxito da sua utilização no processo cicatricial (YAMATOOGI *et al.*, 2005).

Esses têm sido utilizados como suporte no reparo tissular, especialmente devido à capacidade de interagir com células e/ou outras macromoléculas presentes na área lesada, modulando sua atividade biológica (WELLER e SUSSMAN, 2006).

Agentes macromoleculares são excelentes opções para veiculação sob a forma de membranas a ser utilizada como substitutos dérmicos, pela biocompatibilidade, atoxicidade, fácil manuseio quando da aplicação sobre a derme (SEZER *et al.*, 2007).

Algumas macromoléculas proteicas apresentam propriedades desejáveis na preparação de biomateriais, como a habilidade em formar fibras ou redes, elasticidade e plasticidade. Dentre elas, o colágeno vem sendo bastante utilizado na área de saúde, devido à variedade de vantagens de biocompatibilidade (CARDOSO, 2005).

As membranas bioativas absorvíveis e degradáveis servem de suporte para o crescimento de novos vasos sanguíneos e possibilitam a nutrição das células que preenchem o tecido lesado e o acesso das células de defesa ao local, permitindo assim a adesão, migração e proliferação celular (SANTANA *et al.*, 2012).

Membranas produzidas à base de colágeno são comumente utilizadas na reparação de traumas químicos e mecânicos de pele, posto que funcionem como um substrato para a hemostasia e a quimiotaxia para elementos celulares envolvidos na cicatrização, como os granulócitos, macrófagos e fibroblastos, e promovem a maturação da ferida por fornecerem um suporte para uma transição mais rápida à produção do colágeno maduro e seu alinhamento (GIRARDI, 2005). Também são concebidos como sistema de liberação em níveis de concentração

controlada de fármacos nos tecidos, atingindo o efeito terapêutico desejado evitando possíveis reações tóxicas inerentes ao composto ou concentração plasmática (LEE e ROBISON, 2004).

3.9 Caracterizações de membranas poliméricas

3.9.1 Propriedades mecânicas

Consideradas como um dos parâmetros mais importantes na análise de membranas, as propriedades mecânicas influenciam diretamente na sua utilidade, isso porque estas propriedades definem o comportamento das membranas relacionado às influências mecânicas externas. A identificação quanto à adequação de uso de uma membrana é determinada pelas características de flexibilidade, resistência à tração e alongamento adequados, (LIEBERMAN e GILBERT, 2007).

A máxima tensão suportada pela membrana até a sua ruptura (resistência à tração), a medida de maleabilidade, considerada a habilidade da membrana em deformar antes de ocorrer sua ruptura (elongação), a relação entre a resistência à tração e a porcentagem de alongamento, indicando o grau de rigidez (módulo de elasticidade ou módulo de Young) são propriedades mecânicas estudadas em membranas poliméricas. Os estudos das propriedades mecânicas estão centrados, basicamente, nos resultados das curvas tensão-deformação (SCARMÍNIO, 1989).

A resistência à tração é considerada a força máxima que uma membrana pode suportar até o momento de sua ruptura; a elongação, o grau de maleabilidade da membrana, caracterizado como capacidade que a membrana tem em se deformar antes de se romper; o módulo de Young ou módulo de elasticidade, a relação entre a resistência à tração e a porcentagem de alongamento que indica o grau de rigidez da membrana e força resultante é a força de tração que promove o início da deformação não elástica da membrana (RIGO, 2006; SARKER *et al.* 2011).

A espessura de uma membrana filmógena corresponde à distância perpendicular entre as suas superfícies e a gramatura como peso de uma determinada área, estando ambas diretamente relacionadas à resistência mecânica (OLIVEIRA *et al.*, 1996). Em membranas que possuem características morfológicas iguais, a relação da espessura e resistência ao fluxo interfere no processo de

permeação. Quanto mais espessa a membrana, maior a resistência ao fluxo e menor a taxa de permeação (TRINDADE, 2010). Essa propriedade designa parâmetros de uniformidade para validação do material durante a secagem de membranas poliméricas produzidas pelo método *casting*, que quando colocadas em superfície irregular pode gerar um mesmo produto com áreas mais, ou menos espessas e, conseqüentemente, respostas mecânicas díspares (SOBRAL *et al.*, 2002).

As propriedades mecânicas podem ser diretamente afetadas por vários fatores, como a natureza do material filmógeno e a coesão da estrutura da matriz polimérica, que está relacionada com a distribuição e concentração inter e intramolecular na estrutura filmogênica (CUQ *et al.*, 1997). A estrutura, a composição química do produto, a presença de aditivos, o tipo de solvente e as condições do ambiente para formação da membrana também determinam o poder de coesão da membrana. O grau de coesão influencia nas propriedades mecânicas e de barreira das membranas, sendo que quanto maior a coesão estrutural, menor será a flexibilidade, a porosidade e a permeabilidade (RIGO, 2006).

A influência da adição de plastificantes sobre as características mecânicas tem sido notificada podendo, a fragilidade de uma membrana está relacionada ao quantitativo de moléculas plastificantes, que quando em excesso agem afastando as cadeias poliméricas, favorecendo a diminuição de interações importantes para manter a estrutura filmógena (SCARMÍNIO, 1989).

3.9.2 Permeabilidade ao vapor d'água

Considera-se permeabilidade como a característica de barreira que possui uma membrana polimérica avaliada pelo processo de passagem de um material permeante de um lado para o outro da membrana quando ambos são expostos a diferentes concentrações desse permeante em um determinado período de tempo. A espessura e a área são também necessárias (CORRÊA, 2011). Outros aspectos também poderão influenciar na permeabilidade ao vapor de água, tais como, a natureza do material permeante, o tipo de concentração do plastificante, a polaridade e as interações entre as cadeias poliméricas, o tamanho e forma das moléculas que se difundem na membrana (RIGO, 2006; CORRÊA, 2011).

Altas concentrações de compósito poderão dificultar o percurso que as moléculas de água (penetrantes) deverão percorrer para atravessar a membrana, de maneira que esse /caminho longo e tortuoso ocasiona a redução da permeabilidade (SINHA e OKAMOTO 2003).

Quanto menor a permeabilidade ao vapor de água apresentada por uma membrana utilizada como cobertura em ferimentos maior a vantagem no processo de cicatrização, isso porque inclui a prevenção da desidratação do tecido que leva à morte celular; aumenta a aceleração da angiogênese; há uma estimulação da epitelização, seguida de aceleração da formação do tecido de granulação (FRANCO e GONÇALVES, 2008).

3.9.3 Índice de intumescimento

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

O baixo índice de intumescimento de membranas bioativas promove a umidade em longo prazo e diminui o risco de ruptura dessas membranas. Quando utilizadas como coberturas de feridas, considera-se essa condição favorável ao microambiente da ferida (ASSIS e ALBERTINI, 2009).

3.9.4 Colorimetria

FRANCIS, CLYDESDALE, (1975) consideram o comprimento de onda visível a olho nu, a faixa de 390 s 750 nm, que corresponde a uma pequena parte do espectro eletromagnético inteiro. As cores contidas dentro da faixa visível do espectro podem ser descritas objetivamente pelo comprimento de onda. Assim o vermelho tem um comprimento de onda ao redor de 680 nm, o amarelo ao redor de

575 nm, o verde ao redor de 520 nm e o violeta ao redor de 450 nm, o conjunto de todas corresponde à luz branca, ou seja, ela é composta por todas as cores do espectro visível (FERREIRA, 1991; HENRIQUE, *et al.*, 2007).

A *Commission Internationale de l'Éclairage* (CIE) padronizou três fontes de luminosidade, A (luz de tungstênio, lâmpada incandescente – 2854 K), B (luz do sol – 4870 K) e C (luz do dia – 6770 K), em 1931. Em 1976 foi desenvolvida a série de iluminantes D, que incluíam no espectro, pequena porção da luz na faixa do ultravioleta, constando dos iluminantes D55 (5500 K), D65 (6500 K) relativos à luz do dia e D75 (7500 K) (FERREIRA, 1991; HENRIQUE, *et al.*, 2007).

Cores de filmes foram medidas pelos padrões CIE C Lab: L* (0 =preto e 100 =branco); -a* (verde), +a* (vermelho); -b* (azul), + b* (amarelo) (GHORPADE *et al.* 1995). A cor onde não há luminosidade é chamada Croma. Quando a luz incide no objeto e o atravessa com o mínimo de absorção e reflexão, o objeto é considerado transparente. Ao contrário da transparência, é considerada opacidade quando o objeto absorve ou reflete toda luz nele incidente, sem que ocorra a transmissão de luz. A cor das amostras transparentes é avaliada pela transmissão da luz, fazendo a leitura da luz transmitida (FERREIRA, 1991; HENRIQUE, *et al.*, 2007).

3.9.5 Morfologia microestrutural

A morfologia microestrutural pode ser observada pela análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) que possibilita determinar, através de registro da imagem microscópica, a espessura da membrana, bem como a visualização da isotropia ou anisotropia (morfologia). Além disso, permite visualização da porosidade superficial em função da distribuição dos diâmetros dos poros na superfície (TRINDADE, 2010).

A incorporação de componentes ativos na matriz polimérica é influenciada por fatores variados, tais como, tamanho e tipo da molécula, além da interação com a macromolécula. Os resultados esperados sofrem influência dos compostos incorporados que aumenta a concentração do bioativo, consequentemente aumenta sua porosidade (ALTIOK *et al.*, 2010).

3.9.6 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A FTIR é um método padrão na Química Analítica utilizada para caracterização das estruturas poliméricas, através de informações sobre vibrações das moléculas presentes no material (ALBUQUERQUE, 2008). Na análise, bandas são geradas pela absorção da radiação e sua conversão em movimentos específicos das ligações químicas. O modo de reflectância total atenuado tem sido utilizado em larga escala na análise de biomateriais. A profundidade de penetração da radiação ideal para gerar informações a partir de uma grande região na amostra é de 1 a 5 μm (RATNER, 2004).

Esses métodos analíticos têm sido amplamente utilizados para Investigações do potencial de plantas medicinais e de fitoterápicos, refletindo a inovações em relação às espécies vegetais de uso terapêutico que estão sendo gradativamente substituídas por medicamentos sintéticos com interesse de retorno aumentado, pelos pesquisadores, sociedade e profissionais, reproduzindo o panorama atual de valorização da biodiversidade, da saúde, do ambiente, dos produtos naturais e dos conhecimentos tradicionais (TOMAZZONI *et al.*, 2006).

3.10 Produtos naturais

A sustentabilidade de um país depende de um consistente plano político, que abrange os aspectos de educação, ciência, tecnologia e inovação, amparada pela preservação da biodiversidade, através da utilização racional de fontes naturais, de modo a atender às necessidades básicas dos seres vivos, além do avanço social e econômico, num cenário que assegura o equilíbrio ordenado do meio ambiente e seres vivos. A biodiversidade das florestas tropicais serve como foco para a descoberta de plantas medicinais promissoras para a cura de doenças e agravos à saúde. A interação entre plantas tropicais e seus predadores naturais pode ser usada como suporte para a descoberta de substâncias ativas e, conseqüentemente como forma de orientar as investigações farmacológicas (BRAZ-FILHO, 2010).

Plantas medicinais são espécies vegetais usadas com a finalidade de prevenir, aliviar ou tratar sintomas de doenças. O uso descomedido desses

espécimes vegetais, cultivadas e consumidas pela população brasileira, poderá ser controlado e transformado em uso sustentável passando a ser uma opção que agregará valores às matérias primas disponíveis nas regiões brasileiras melhorando a saúde das pessoas, contribuindo na renda das comunidades rurais, favorecendo a conservação das espécies nativas e, aumentando a oferta no mercado (PINTO, 2008).

A valorização da utilização das plantas medicinais tem sido estimulada e regulamentada pela Organização Mundial da Saúde- OMS. O Ministério da Saúde também tem incentivado o uso de terapias complementares, tendo sido implantado, em 2006, a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS), inserindo as plantas medicinais através da fitoterapia (BRASIL, 2003).

No sentido de inclusão social, a OMS recomenda aos órgãos responsáveis pela saúde pública que atentem para realização de levantamentos de plantas medicinais regionais e caracterização etnobotânica; estímulo e recomendação da utilização de plantas com comprovação científica de sua eficácia, segurança terapêutica; a implantação de programas de cultivos de espécimes vegetais e utilização de preparações seguras e eficazes; o combate do uso descomedido de produtos e/ou plantas medicinais, denominado como Medicina Popular (LORENZI e MATOS, 2008; DEGÁSPARI, *et al.*, 2011).

A dinâmica ambiental que envolve as interações planta-planta, planta-animal e animal-animal, depende da convivência controlada pelo quimismo de diversos organismos vivos. A química de produtos naturais (QPN) de vegetais, fitoquímica, se dedica principalmente à caracterização estrutural, avaliação de propriedades e investigações biossintéticas de substâncias naturais produzidas pelo metabolismo secundário de organismos vivos. As plantas superiores constituem uma das fontes mais importantes de novas substâncias utilizadas diretamente como agentes medicinais (BRAZ-FILHO, 2010).

Partindo do princípio que esse conteúdo pode ser modificado pelos fatores de sazonalidade, ritmo circadiano e desenvolvimento que podem modificar o ciclo natural de composição química, envolvendo a temperatura (faixa de variações anuais, mensais e diárias), disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta (intensidade e quantidade de incidência luminosa), nutrientes, altitude, poluição atmosférica

(consequências de níveis elevados de O₃ ou de CO₂) no metabolismo de derivados fenólicos, além da idade da planta e seu processo de desenvolvimento, Gobbo-Neto e Lopes, 2007 sugerem o controle analítico de qualidade para garantir constância na composição de metabólitos secundários nos preparados fitoterápicos. Os metabólitos secundários concebem uma interconexão química entre os vegetais e o ambiente (GOBBO-NETO e LOPES, 2007).

Apesar de o Brasil valer-se de um vasto acervo natural de vegetais nos ambientes aquáticos e terrestres e de relativa facilidade para coleta, condição ambiental favorável para desenvolvimento sustentável, biodiversidade estrutural de substâncias orgânicas naturais e a possibilidade de avanços para descoberta de princípios ativos entre tais constituintes químicos permitem diagnosticar e destacar as plantas como a principal fonte renovável para o surgimento e desenvolvimento de novos fármacos, o país não dispõe de estudos pautados nessa linha de pesquisa na mesma proporção da diversidade etnobotânica existente (BRAZ-FILHO, 2010).

Na biodiversidade da flora brasileira, a *Punica granatum* Linn destaca-se pelas diversificadas ações biológicas. Embora não seja considerada uma espécie vegetal nativa do Brasil, apresenta larga distribuição por todo o país, principalmente, no Nordeste brasileiro (MIGUEL *et al.*, 2010).

No tratamento de feridas, tem-se intensificado a pesquisa de produtos naturais para auxiliar na cicatrização, como no caso da *Punica granatum* Linn (romãzeira). Desta forma, a propriedade farmacodinâmica anti-inflamatória e imuno-reguladora dos produtos naturais têm sido avaliadas em diferentes tecidos humanos, com o intuito de auxiliar no processo de reparação (WERKMAN *et al.*, 2008).

3.11 *Punica granatum* Linn

A *Punica granatum* Linn tem destaque entre as diversas plantas medicinais com potencial biológico (MIGUEL *et al.*, 2010). Sua nomenclatura varia de acordo com o país, no Brasil a *Punica granatum* é popularmente conhecida como romãzeira, e seu fruto, romã (CURRO *et al.*, 2010). Na França, romã denomina-se *grenade*; na Espanha, *granada*; na Itália, *melograna*; no Japão, *zakuro* - ざくろ; na África, *granaatjie*; em latim *malogranatum* e em inglês, *pomegranate*.



Figura 8: Cultivo de *Punica granatum* Linn. Projeto Irrigado Senador Nilo Coelho-Núcleo 4 (Petrolina-PE). Setembro de 2011.

Arbusto grande que mede de dois a quatro metros de altura, lenhoso, ramificado, nativo da Ásia Central e cultivado mundialmente, em outras regiões, como Oriente Médio, Mediterrânea da Ásia, Américas do Norte, Sul e Central, África e Europa (HASNAOUI *et al.*, 2012). *Punica*, tradicionalmente da família *Punicaceae*, uma família de duas espécies, *Punica granatum* e *Punica protopunica*. A *Punica granatum* é uma planta cultivável em clima tropical e semitropical (LORENZI e SOUZA, 2001; LEE *et al.*, 2010).

A planta (Fig. 8) apresenta folhas relativamente pequenas, rijas, brilhantes e membranáceas, que medem em torno de 4 a 8 centímetros de comprimento. As flores, vermelhas- alaranjadas, são compostas comumente de 5 a 7 sépalas que se mantêm no ápice do fruto dispostas nas extremidades dos ramos, 5 a 7 pétalas e estames. A flor evolui originando frutos esféricos que medem de 6 a 12 cm de diâmetro (CURRO *et al.*, 2010). As sementes são angulosas e muito numerosas. E o suco doce, ligeiramente ácido, representados na Fig. 9 (GOMES, 2007).



Figura 9: Partes do fruto (romã) de *Punica granatum* e suas camadas etnobotânica. Flor vermelha-alaranjada (a), folhas pequenas, rijas, brilhantes (b), Flor evoluindo para originar um fruto esférico (c). As sementes (d) estão agrupadas em arilos (e) e o suco, de coloração vermelha (f). As camadas, externa – epicarpo (g1), camada mediana – mesocarpo (g2) e camada mais externa – endocarpo (g3).

Baseado na etnobotânica considera-se pericarpo, o fruto na sua totalidade, o epicarpo é a parte mais externa, uma casca de coloração amarela ou vermelha, com aspecto de couro. O mesocarpo é a entrecasca, de coloração esbranquiçada que agrega os arilos polposos (sementes em camadas). E o endocarpo é a parte que envolve as sementes, película que acomoda o suco (GOMES, 2007).

A árvore da *Punica granatum*, possui uma extensa narrativa ethnomedical e apresenta um amplo potencial fitoquímico de valor medicinal, sendo dividida em partes para estudo das atividades farmacológicas: raiz, caule, folhas, flores, frutos (casca, suco e semente), que são bastante estudados pelas suas propriedades medicinais, apesar dos estudos etnobotânicos, toxológicos e de farmagnosia, ainda não parecerem suficientes para comprovar as atividades e propriedades químicas dos seus compostos (MACHADO *et al.*, 2003).

A composição química de uma planta modifica a depender das diversas variáveis como situações sazonais, cultivo, tipo de região, situação climática e a prática de cultivo (ZHANG *et al.*, 2010). Estudo a partir da análise genética de plantas da *Punica* cultivadas em várias regiões geográficas diferentes demonstrou

uma diversidade genética e diferenças significativas entre os grupos (NOROUZI, *et al.*, 2012).

Santos *et al.*, (2011), demonstram em estudo físico-químico da *Punica granatum* Linn que seus frutos são ricos em fibras, carboidratos e gordura. Os mesmos autores discorrem a importância do alto teor de gorduras encontrado na polpa (inclui sementes) do fruto, para escala industrial, além de ratificar que os carboidratos estão presentes na análise, apesar de não demonstrarem predominância dos açúcares, como a glicose e sacarose (não detectada). A umidade da romã (73,93/100g) foi outra variável importante referida pelos autores caracterizando boa fluidez que facilita os processos industriais de extração. A *Punica granatum* é um potente antioxidante, considerado igual ao chá verde e superior ao vinho tinto (PRAKASH *et al.*, 2011).

Os frutos da romã são fonte de carboidratos, minerais, fibras brutas e composição ativa, biologicamente variada, de vitamina C e compostos fenólicos, punicalagina, ácido elágico e taninos, que são conhecidos por agir como antioxidantes naturais (ZAOUAY *et al.*, 2012).

Santana *et al.*, (2011) descrevem que a casca do fruto de *Punica granatum* Linn contém, aproximadamente, 20% de taninos, incluindo punicalina, punicalagina (elagitanino) como principal substância responsável pela atividade antibacteriana da *Punica granatum*, granatinas A e B (responsáveis pela atividade antimicrobiana), galagildilactona, casuarinina, pedunculagina, telimagrandina I e corilagina. Machado *et al.* (2003) registram a presença de 28% de taninos gálicos na casca do fruto e do caule, além de menor concentração nas folhas e 7% de óleo essencial com destaque do ácido punílico.

Atividades medicinais da *Punica granatum* incluem potentes fontes antioxidantes em pesquisa com extrato de romã e vitamina C que demonstrou possível eficácia em doenças neurológicas (KUMAR *et al.*, 2011), além da comprovação do efeito protetor do extrato de romã sobre o estresse oxidativo, testados em embriões de galinhas (KISHORE *et al.*, 2009); os componentes bioativos e as ações farmacológicas da *Punica granatum* indicam uma gama de aplicações clínicas para o tratamento e prevenção de algumas doenças (LANSKY e NEWMAN, 2007).

Extratos das diversas partes de *Punica granatum* tem sido extensivamente experimentados pelo seu uso potencial na regeneração dos tecidos renais e diminuição da urolitíase (BALLABH et al., 2008; RATHOD et al., 2012), ação antiobesidade (AL-MUAMMAR e KHAN, 2012), na melhoria da memória (ADIGA et al., 2010), retardamento das complicações diabéticas e correções metabólicas (PATEL, et al., 2012), bem como prevenção das alterações degenerativas induzidas pelo diabetes (MOHAN et al., 2010; hepatoproteção (CELIK et al., 2009), antioxidante (AJAIKUMAR et al., 2005; CELIK et al., 2009; HAYOUNI et al., 2011; SAAD et al., 2012; AQIL et al., 2012; WANG et al., 2013), anti-inflamatório (LEE et al.; BAGRI, et al., 2010), e analgésica (SINGH et al., 2010). Além disso, testes preliminares de toxicidade realizado em roedores têm demonstrado que a romã apresenta baixa toxicidade em altas doses (MENEZES et al., 2008).

A importância na amplitude de ações biológicas comprovadas a partir da *Punica granatum* é agregada em estudos como, ação protetora contra as ateroscleroses e disfunções tireoidianas (SINGH et al., 2007), ação antitumoral (AFAQ et al., 2003), efeito hipoglicemiante com regeneração das células β (KHALI, 2004).

Segundo Adiga et al. (2010), a utilização de extratos aquosos de *Punica granatum* L., administrados oralmente na dose de 100 mg/Kg, promoveram aceleração da reação de granulação, aumento significativo na resistência mecânica do tecido cicatricial, epitelização, contração da ferida e no teor de hidroxiprolina do colágeno em feridas dérmicas abertas em modelo roedor, sugerindo um efeito cicatrizante potente do extrato da *Punica granatum* nessa dosagem em feridas abertas. Em estudo com a utilização de extrato etanólico de *Punica granatum* e *Achillea kallelenses* em feridas, observou-se destaque da eficácia do potencial cicatrizante da *Punica granatum* (PIRBALOUTI, et al., 2010).

Ensaio *in vitro* têm demonstrado que extratos desta planta apresentam atividades ação gastroprotetora (AJAIKUMAR et al., 2005; GILL et al., 2011). ALAM et al. (2010) mostraram redução de lesões ulcerativas de mucosa gástrica em ratos tratados com extratos de *Punica granatum* nas doses de 490 e 980 mg/Kg.

A *Punica granatum* Linn contém diferentes compostos químicos biologicamente ativos, a exemplo de polifenóis, carboidratos, ácidos graxos

conjugados e não conjugados, compostos aromáticos, aminoácidos, tocoferóis, esteróis, terpenóides, taninos, flavonóides e alcalóides (PRAKASH *et al.*, 2011).

Jardini e Mancini Filho, 2007 destacam a *Punica granatum* L. como vegetal que apresenta em sua composição compostos fenólicos como, antocianinas, quercetina e ácidos fenólicos. Tem sido demonstrado que esse espécime vegetal possui níveis elevados de polifenóis. Seus frutos são ricos em elagitaninos, dos quais se destacam a punicalagina α e β , ácido gálico e ácido elágico, favoráveis à saúde humana (QU *et al.*, 2012).

3.12 Polifenóis

Os polifenóis envolvem o maior grupo dentre os compostos bioativos no reino vegetal e são subdivididos em classes, conforme sua estrutura química (FALLER e FIALHO, 2009). A diversidade estrutural dos compostos fenólicos se deve à grande variedade de combinações que acontece na natureza, os compostos resultantes são denominados polifenóis (GOMES, 2011).

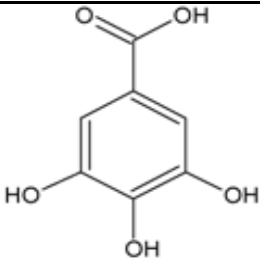
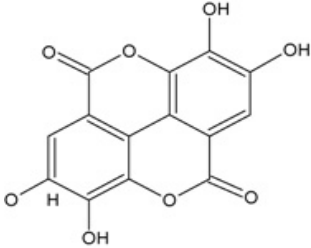
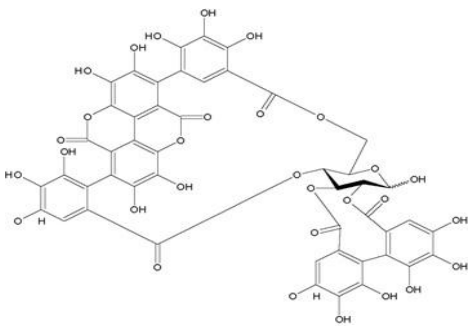
Para que uma substância polifenólica seja classificada como antioxidante, duas condições básicas a definem, primeiramente, quando se encontra presente em baixa concentração relativa ao substrato a ser oxidado e que este possa retardar ou prevenir a oxidação, enquanto a segunda se caracteriza pela situação em que os radicais formados após a reação sejam estáveis. Esses autores destacam os flavonoides, os ácidos fenólicos, os tocoferóis e os taninos como os mais comuns antioxidantes fenólicos de fonte natural (KAUR, *et al.* 2006; KAPOOR, *et al.* 2005).

Os flavonoides agem como antioxidantes inibindo a ação dos radicais livres, nos compartimentos celulares lipofílicos e hidrofílicos. Esses possuem capacidade de doar átomos de hidrogênio e, inibir as reações em cadeia provocadas pelos radicais livres (ARORA *et al.*, 1998).

Tem sido demonstrado que a *Punica granatum* (romã) contém níveis elevados de polifenóis. Seus frutos são ricos em elagitaninos, importantes para a saúde, potencial atribuído aos compostos polifenólicos. Dentre esses, destacam-se a punicalagina A e B, ácido gálico e ácido elágico (QU *et al.*, 2012). Lansky e Neuman, (2007) apresentam uma seleção dos componentes da *Punica granatum*,

demonstrados na tabela 2 que apresenta quatro compostos majoritários em evidência neste estudo, os ácidos gálico e elágicos e, as punicalaginas A e B.

Tabela 2: Representação esquemática da classe química e estrutura molecular dos compostos tânico majoritários da casca do fruto de *Punica granatum* Linn. Modificado de Amakura *et al.*, 2000b.

Classe química	Componente	Estrutura molecular
Ácido hidroxibenzóico	Ácido Gálico	
Ácido hidroxibenzóico	Ácido Elágico	
Elagitaninos	Punicalagina	

O ácido gálico, classificado quimicamente como ácido hidrobenczóico, é encontrado em intensidade no suco, folhas e flores da *Punica granatum* (LANSKY E NEUMAN, 2007), considerando que suas propriedades medicinais envolvem ação antiproliferativa, anticitotóxica, antifúngica. O ácido elágico, também classificado como ácido hidrobenczóico, é encontrado em intensidade no suco, nas folhas e

sementes desta planta. Foi demonstrado que possuem propriedades antioxidantes, antitumoral e antiaterosclerótico (QU *et al.*, 2012).

As punicalaginas são elagitaninos, tipos de compostos fenólicos, encontradas de formas diferentes na *Punica granatum*. Essa macromolécula é encontrada em larga escala nesse espécime vegetal e é solúvel em água. Possui estrutura molecular correspondente a $C_{48}H_{28}O_{30}$ e massa molar 1084,71 g/mol. (TANAKA, 1978; GIL *et al.* 2000). Destacadas por possuir ação anti-inflamatória e propriedades anti-genotóxicos (QU *et al.*, 2012).

3.13 Antioxidantes

De acordo com princípios da Química, os antioxidantes são compostos aromáticos que contêm no mínimo uma hidroxila. São classificados como sintéticos ou naturais (fenólicos e terpenos). Atuam protegendo o organismo em diferentes níveis, como: a prevenção da sua formação, principalmente pela inibição das reações em cadeia com o ferro e o cobre; sequestrar radicais livres gerados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, impedindo o ataque sobre os lipídeos evitando a formação de lesões e perda da integridade celular. Outro mecanismo de proteção é o reparo das lesões causadas pelos radicais. Esse processo diz respeito com a remoção de danos da molécula de DNA e a reconstituição das membranas celulares danificadas (BIANCH e ANTUNES, 1999).

Os radicais livres podem ser gerados tanto no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana e o seu alvo na célula (proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA) está relacionado com o seu ambiente de formação (ANDERSON, 1996; YU e ANDERSON, 1997; BIANCH e ANTUNES, 1999) e são considerados átomos quimicamente ativos ou moléculas que apresentam número ímpar de elétrons na sua órbita externa, por isso são altamente instáveis. O comportamento desses radicais implica num percurso no corpo, em busca de se apropriar ou doar elétrons, assim prejudicando as células, proteínas e material genético (DNA). O desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes resulta em danos celulares provocados pelos radicais livres e é conhecido como estresse oxidativo (SIES, 1993).

O estresse oxidativo ocorre quando a produção de radicais livres está além da capacidade protetora das defesas antioxidantes, e grande quantidade de radicais

livres pode provocar danos e morte celular, além de doenças cardiovasculares, Doença de Alzheimer, catarata, dentre outras (ANDERSON, 1996; BIANCHI e ANTUNES, 1999).

3.14 Taninos

Mello e Santos, (2001) classificam quimicamente os taninos a partir de sua arquitetura estrutural e os divide em dois grandes grupos, os taninos hidrolisáveis e taninos condensados. Podem ser encontrados abundantemente em várias partes das árvores como: raízes, galhos, folhas, flores, frutos e sementes. Ele constitui-se de carboidrato simples, goma hidroxicoloidais, fenóis e aminoácidos e, está sendo bastante estudado, onde mostra suas utilizações e complexidade pelos seus inúmeros polímeros, constituídos das variadas estruturas vegetais existentes na biodiversidade da flora brasileira.

Khanbabaee e Ree (2001) classificam os taninos em condensados e hidrolisáveis com a formação de dímeros, trímeros e constituindo ligações C-O devido sua estrutura nuclear de glicose e ácido gálico. Também caracterizam os taninos hidrolisáveis (Fig. 10) pela presença de um grupo poliol central (β -D- glicose, ácido quínico ou outros fenóis); e hidroxilas esterificadas pelo ácido gálico (parte fenólica) na sua composição química.

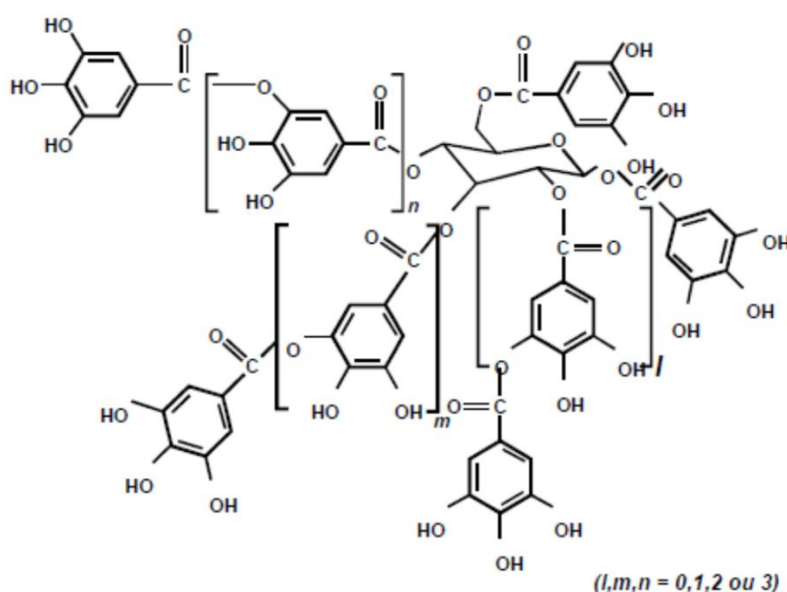


Figura 10: Estrutura molecular de taninos hidrolisáveis (NAKAMURA *et al.*, 2003)

Os taninos hidrolisáveis são classificados em galotaninos e elagitaninos. Os primeiros são compostos por unidades de ácido gálico unidas por ligações depsídicas (Fig. 11) entre elas, e são extremamente raros na dieta humana (CASTEJON, 2011).

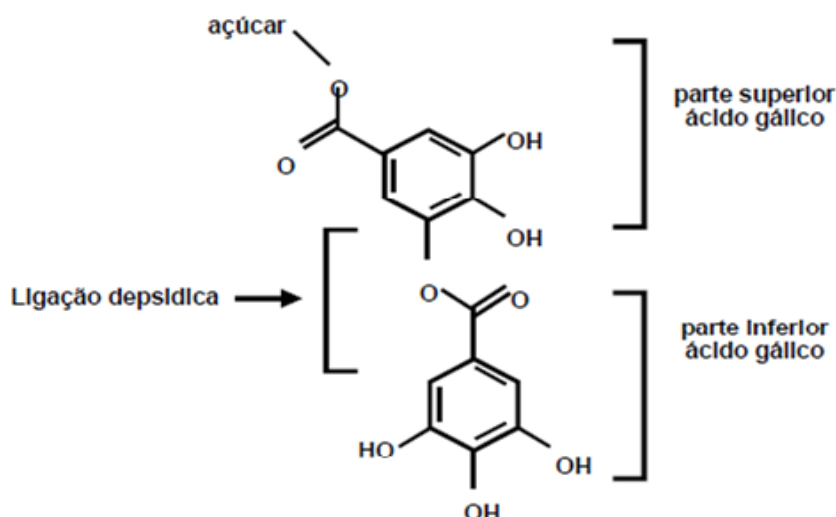


Figura 11: Ligação depsídica formada entre o grupo fenólico superior e o grupo inferior de uma unidade de ácido gálico (HARVEY, 2001).

Os elagitaninos são moléculas que possuem um ou dois resíduos de hez-hidroxidifenoila de configuração R ou S, obtidos pelo acoplamento oxidativo C-C entre dois resíduos de ácido gálico adjacentes. Depois que ocorre a hidrólise ácida das ligações ésteres, advém à liberação do ácido difênico, que se rearranja espontaneamente para o ácido elágico. São elagitaninos isolados os monômeros, dímeros, trímeros e tetrâmeros (CASTEJON, 2011).

Os taninos condensados ou proantocianidinas estão difundidos por diferentes famílias do reino vegetal, em geral, em plantas lenhosas. São polímeros de flavan-3-ol e/ou flavan-3,4-diol (Fig. 12), produtos do metabolismo do fenilpropanol. As moléculas têm grande mutação estrutural, provocada por padrões de substituições entre unidades flavânicas, variedade de posições das ligações e a estereoquímica. (CASTEJON, 2011). Taninos condensados de estrutura flavonóidica, através da sua condensação formam proantocianidinas (polímeros do tanino), que são classificados como aqueles que fornecem características de adstringência e precipitação de proteínas pela polimeria de iguais números atômicos, número de massa e, leis de

desintegração diferente dos corpos formados pela reunião de muitas moléculas numa só transformação de um corpo químico em polímero (KHANBABAEE e REE, 2001).

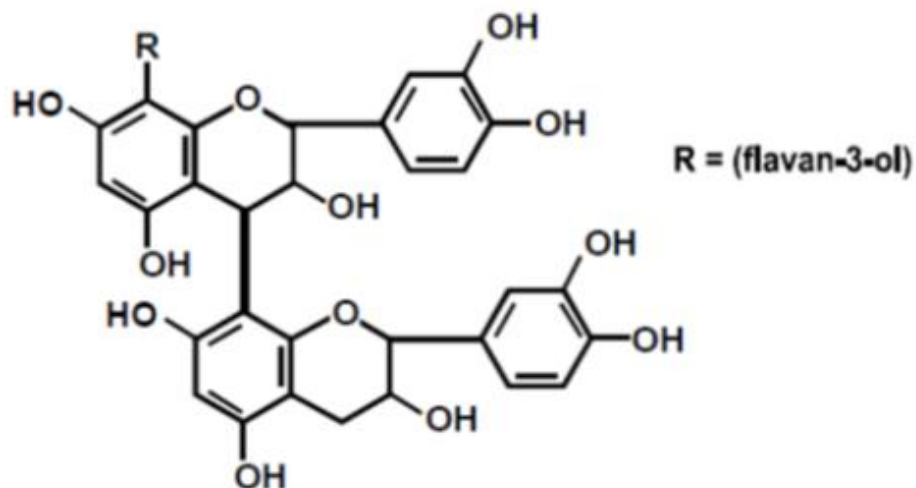


Figura 12: Estrutura molecular de taninos condensados (LEKHA e LONSANE, 1997).

A complexação taninos-proteínas pode ocorrer de duas formas, reversíveis, que ocorrem por pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas, enquanto que os irreversíveis ocorrem em condições oxidativas via ligações covalentes. Essa condição varia com a estrutura química, peso molecular e a flexibilidade da molécula. Quando o peso molecular é muito alto, a molécula pode não se inserir entre os espaços interfibrilares das proteínas ou macromoléculas; quando muito baixo, a molécula fenólica não forma número suficiente de ligações que mantenha a estabilidade. Os taninos complexos são encontrados tanto nos hidrolisáveis, que são ésteres do ácido gálico (tanino de fácil decomposição) como nos condensados e seus dímeros (ácido digálico ou hexaidroxidifênico e elágico) que são encontrados nos pequenos vegetais (KHANBABAEE e REE, 2001).

Atividades bactericidas e fungicidas ocorrem por três características gerais comuns aos dois grupos de taninos: complexação com íons metálicos; atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres; habilidade de complexar com outras moléculas, principalmente proteínas e polissacarídeos. Dentre as atividades fisiológicas dos taninos, destacam-se a estimulação das células fagocíticas e a ação tumoral, e atividades anti-infectivas. As atividades biológicas dos taninos têm sido investigadas, através de estudos que demonstram dentre várias ações, importante

atuação na reparação de tecidos, regulação enzimática e proteica (HAYOUNI *et al.*, 2011).

Os taninos vegetais são classificados em dois grupos, as proantocianidinas (taninos condensados), que são aqueles que fornecem características, como adstringência e precipitação de proteínas e os taninos hidrolisáveis, que são ésteres do ácido gálico e seus dímeros (ácido digálico ou hexaidroxidifênico e elágico) com monossacarídeos (HASLAM, 1989).

Em processos de cura de feridas, queimaduras e inflamações, os taninos auxiliam formando uma camada protetora (complexo tanino-proteína e/ou polissacarídeo) sobre tecidos epiteliais lesionados, permitindo que, logo abaixo dessa camada, o processo de reparação tecidual ocorra naturalmente (MELLO *et al.*, 2001).

A importância dos organismos vegetais como fontes produtivas de substâncias com atividades biológicas reativaram interesses sociais e econômicos, superando obstáculos na construção de cenário crescente, estimulando, inclusive, a percepção das lideranças industriais empenhadas na fabricação de produtos sintéticos, a partir de estudos científicos (BRAZ-FILHO, 2010).

Holetz *et al.*, (2002) isolaram no pericarpo de *Punica granatum*, punicalagina, granatinas e punicalina, considerado fruto rico em taninos. A casca do fruto contém alto teor de taninos e alcaloides. A *Punica granatum* (romãzeira) é rica em taninos (SAAD *et al.*, 2012; AL-ZOREKY e AL- MUAMMAR 2009), e sua produção e consumo têm aumentado, devido suas propriedades medicinais. Essa planta é bastante estudada no sentido de ser inserida no mercado de consumo como fruta e no reaproveitamento das partes não comestíveis para elaboração de ingredientes antioxidantes evitando com isso geração excessiva de lixo orgânico (EMBRAPA, 2011).

3.15 Resíduos sólidos e subprodutos vegetais

Partindo do princípio que os valores sociais estão tendenciosos à massificação de que “ter é ser”, retratando uma população que busca, através da satisfação material, “ser feliz”, percebe-se um consumo desenfreado, tanto das classes sociais mais abastadas, como das classes economicamente menos

favorecidas. Em virtude disso, transforma-se o espaço social em um “galpão de lixo” (FIORILLO, 2009).

Lima (2012) entende que para haver equilíbrio da relação homem x meio ambiente e consumo x produção são necessários utilizar a educação ambiental como instrumento básico de efetiva aplicabilidade, para que haja mudança socioambiental, considerando a maior problemática nesse contexto, os vários tipos de lixo e o cumprimento da Política Nacional de Resíduos Sólidos (PNRS). Já que, o Decreto Nº 7.404, de 23/12/2010 regulamenta a Lei nº 12.305, de 02 de agosto de 2010 e institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos, que surgiu com o desígnio de amparar a população na gestão e gerenciamento da produção dos resíduos sólidos, pautada no consumo da sociedade (MONTEIRO, 2013).

Nessa Lei (12.305/10) estão definidas as responsabilidades dos geradores e do poder público. A aplicabilidade da norma deverá ser para os responsáveis diretos ou indiretos, pela geração dos resíduos e para aqueles que desenvolvam atitudes ligadas ao processo. Além de estruturar a logística reversa, que consiste em um instrumento de desenvolvimento econômico e social, considerada um conjunto de ações, procedimentos e meios destinados a viabilizar a coleta e a restituição dos resíduos sólidos ao setor empresarial, para reaproveitamento, em seu ciclo ou em outros ciclos produtivos, ou outra destinação final ambientalmente adequada (BRASIL, 2010).

Ações básicas de preservação ambiental têm sido observadas na humanidade e, interpretadas como resultado de uma evolução e compreensão sobre os danos causados em consequências de atividades domésticas e industriais. É de grande valia, na formação de Recursos Humanos relacionado à educação ambiental, estimular o reaproveitamento do resíduo, através da reciclagem, recuperação ou reutilização (ARNOLD e BENDASSOLLI, 2005).

Entende-se reciclar como o ato de refazer o ciclo por completo, voltar à origem, ou seja, é quando determinado material retorna como matéria-prima ao seu processo produtivo. Recuperar é extrair do resíduo um componente energético de interesse, quer por questões ambientais, financeiras ou ambas concomitantemente. E a reutilização ou reuso é quando um resíduo é utilizado, tal qual foi gerado, em um determinado processo, dentro ou fora da unidade geradora (ARNOLD e BENDASSOLLI, 2005).

O termo “resíduos sólidos” pode ser conceituado como: ...“material, substância, objeto ou bem descartado resultante de atividades humanas em sociedade... A condição de destinação final se procede, se propõe proceder ou se está obrigado a proceder, nos estados sólido ou semissólido, gasoso e líquido cujas particularidades exigem para isso soluções técnicas viáveis... (BRASIL, 2010)”.

3.16 Identificação de espécimes botânicos

Baseado no *Index Herbariorum* percebe-se, que em contraste com o aporte de reserva natural que o Brasil abriga, considerado a maior biodiversidade do planeta, a catalogação está aquém de explorar sua flora nativa, onde existem apenas 3.200.000 amostras desidratadas de plantas, quando comparado aos Estados Unidos que possuem 60.500.000, a França, 20.200.000 e a Inglaterra com 15.7000.000 amostras arquivadas. Entende-se que para conferir as potencialidades e propriedades da biodiversidade vegetal é indispensável inicialmente conhecê-la botanicamente. Conhecer a família e o gênero a que pertence o vegetal, desidratar, conservar e armazenar amostras são funções dos herbários que originam as exsicatas com a aplicação de técnicas específicas (MARTINS-DA SILVA, s/d).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

A Fig. 13 representa o registro científico da planta, preparo e caracterização dos extratos produzidos a partir da casca do fruto de *Punica granatum* Linn; a Fig. 14 representa o desenvolvimento e caracterização físico-química de membranas de gelatina sem extrato e com a adição de extrato aquoso de *Punica granatum* Linn e a Fig. 15, a avaliação do potencial cicatrizante *in vivo* das membranas produzidas nesse estudo.

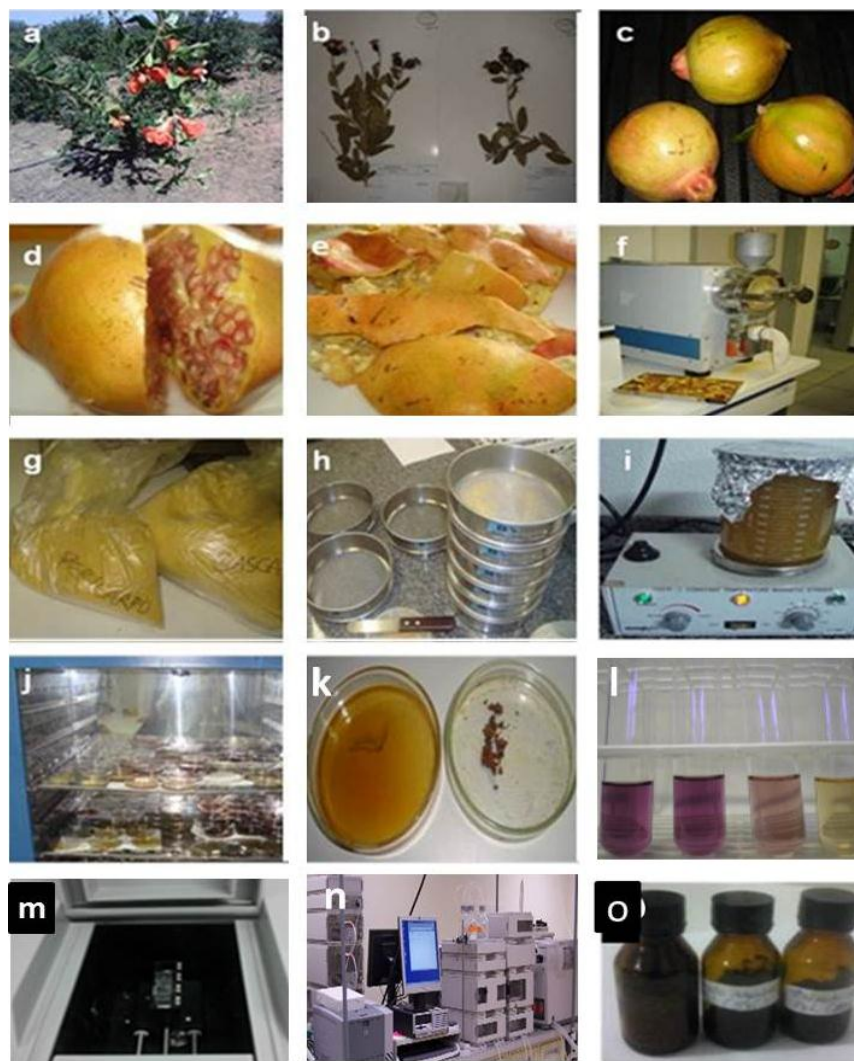


Figura 13: Plantio / coleta da amostra (a), registro científico – Exsicata nº 20.881 (b), seleção dos frutos *in natura* da *Punica granatum* (romã) (c), despulpamento / cascas do fruto (d / e), moagem das cascas do fruto em moinho de facas (f), cascas pulverizadas (g), granulometria (h), maceração dinâmica a quente (i), evaporação do solvente em estufa de circulação e renovação de ar (j), extrato bruto seco em placa de petri (k), avaliação antioxidante pelo método de DPPH (l), espectrofotometria (m), HPLC-MS (n) e armazenamento do extrato bruto seco em vidro âmbar (o).

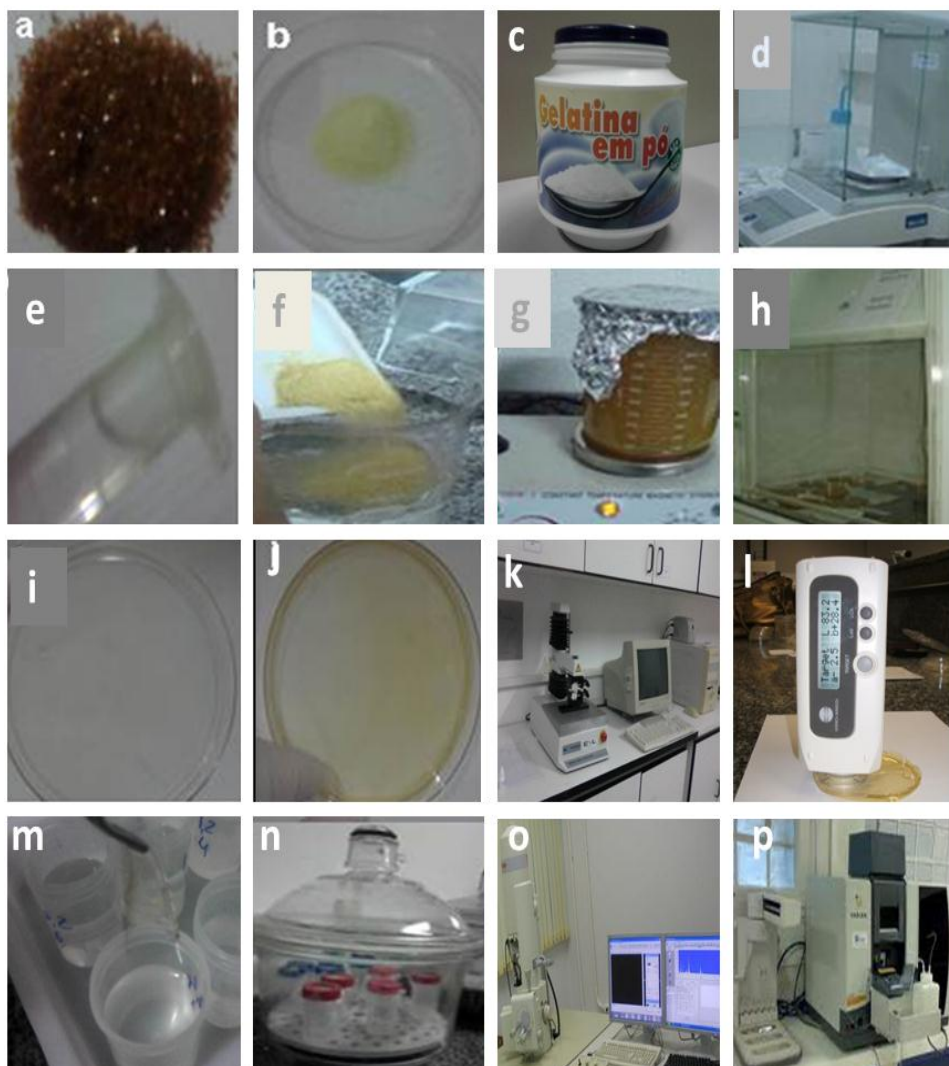


Figura 14: Amostra de extrato bruto seco aquoso da casca do fruto de *Punica granatum* (a), amostra (b) e embalagem de gelatina em pó (c) utilizada para desenvolver membranas, pesagem dos componentes filmógenos em balança analítica (d), plastificante – propilenoglicol (e), adição dos componentes ao ácido acético (f), dispersão filmógena em agitação magnética (g), secagem das membranas em capela de exaustão (h). Membranas de gelatina sem adição de extrato (i), membranas de gelatina com adição do extrato da casca do fruto de *Punica granatum* (j) produzidas por *casting*. Caracterizações das membranas: Análise de propriedades mecânicas (k), colorimetria (l), índice de intumescimento (m), permeabilidade ao vapor d'água (n), microscopia eletrônica de varredura (o), transformada da fração de Fourier de infravermelho (p).

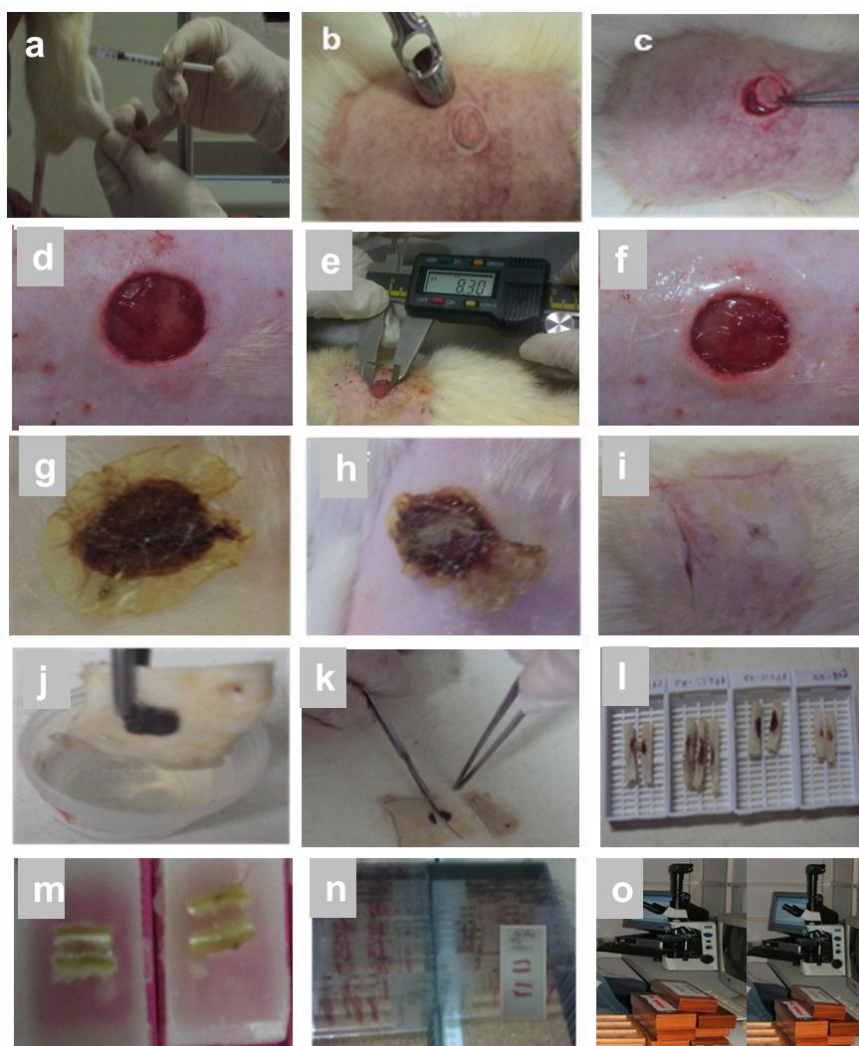


Figura 15: Avaliação da atividade cicatrizante das membranas produzidas. Ratos *Wistar* foram anestesiados (a) para realização de feridas em região dorsal, tricotomizada, com bisturi tipo *punch* de 8,0 mm de diâmetro (b), retirando as camadas da derme e epiderme completas (c), mantidas sem suturas (d) e medidas nas bordas internas com paquímetro digital (e). Em seguida foram aplicadas membranas GEL (f) e GELPG (g) nos respectivos grupos, e avaliado o índice de contração das feridas em 3, 7, 14 dias (i) e 21 dias. Exérese da área cicatricial (j), espécime cirúrgico (k), foram utilizados para macroscopia em cassete (l) e material embocado em parafina (m). Seções histológicas montadas (m) e fotomicrografias do material corado em HE e em picrossírius (n) foram analisados em microscopia (o)

4.1 Submissão do projeto de pesquisa ao Comitê de Ética e Pesquisa no Uso de Animais - CEUA

O projeto de pesquisa obedeceu às normas do Colégio Brasileiro de Experimento Animal – COBEA e foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA em junho de 2011, conforme aprovação, registro nº 030811 todos os procedimentos foram desenvolvidos com base nas normas do COBEA.

4.2 Coleta da amostra

No que concerne à amostra de *Punica granatum* Linn utilizada nesta pesquisa foi coletada no dia seis de setembro de 2011, Projeto Irrigado Senador Nilo Coelho, proveniente do Núcleo Irrigado: N9, situado na zona rural do município de Petrolina localizado na mesorregião do São Francisco, no semiárido de Pernambuco, Brasil.

4.3 Identificação científica da amostra

A tabela 3 mostra a identificação científica desse espécime vegetal foi realizada no Herbário ASE da Universidade Federal de Sergipe (UFS), local destinado à realização do *voucher* (nº 20.881) e depósito da exsicata, para fins de comprovação científica da planta (Fig. 16) em estudo.

Tabela 3: Registro científico do espécime vegetal estudado.

HERBÁRIO ASE		ASE nº
Universidade Federal de Sergipe CCBS/DBI		20.881
Brasil, Pernambuco		
<i>Punica granatum</i> L.	<i>Lythracea</i>	
<i>Romã (Português)</i>		
Nascimento, M.F. 1.	08/09/2011	



Figura 16: Fotografias do registro científico (Exsicata) nº 20.881, da amostra de *Punica granatum* Linn estudada (Nascimento, M.F. 1. 08/09/2011).

4.4 Obtenção de extratos de *Punica granatum* Linn

Paralelamente foram colhidos frutos, selecionados pelo padrão de semelhança de peso (média 250 g), condição de maturidade (maduros), aspecto de preservação do fruto (livres de manchas escuras, fungos ou fraturas), origem (mesmo plantio e mesma safra) para posteriores análises e aplicações científicas.

Foram obtidos quatro tipos de extratos de *Punica granatum* Linn pelo método de maceração dinâmica a quente e a frio (extrato aquoso) e, a frio (extrato hidrometanólico e metanólico) por um período de agitação de duas horas. A temperatura adotada para preparo do extrato aquoso foi de 100 °C (EAPG₁₀₀) e temperatura ambiente (EAPG₂₅), enquanto os demais extratos foram processados em temperatura ambiente (EHMPG₂₅ e EMPG₂₅). Considerar a concentração 1:100 (m/v) para os extratos aquosos 1:10 (m/v) para extratos hidrometanólico e metanólico.

O processo iniciou com a higienização dos frutos com água corrente e sabão, despulpamento dos frutos, secagem em estufa de circulação de ar a 55 °C, fragmentação das cascas em pedaços pequenos para processamento em moinho de facas e em seguida, armazenamento desse pó em recipiente de vidro âmbar.

Para a obtenção dos extratos secos brutos foram pesados 5 g do pó e adicionados à água destilada, processados nas respectivas concentrações e temperaturas supracitadas, esquematizado na Fig. 13.

4.5 Caracterizações dos Extratos

4.5.1 Cromatografia líquida de alta eficiência com espectrometria de massa acoplada - CLAE-MS

Amostras dos extratos sólidos (EAPG, EMPG e EHMPG) da casca do fruto de *Punica granatum* Linn foram solubilizadas em uma mistura de água: metanol (50%) e filtrados em ultrafiltro de 0,45 µm. Soluções de 1 mg/mL de cada um dos extratos foram analisados por HPLC-MS. Essa análise foi realizada utilizando um equipamento Shimadzu, modelo LC-6AD, com detector de díodo SPD-M20A, coluna de fase reversa C-18 (25 cm x 4,6 mm x 5 mm). Fase móvel: 0,1% (v/v) de H₃PO₄ em água (A) e 0,1% (v/v) de H₃PO₄ em acetonitrila (B). B: 1,5% (5 min), 5-8% (5-10 min), 8% (10-16 min), B 8-25% (16-22 min), 25-90% (22 - 27 min) 90% - 1% (27-33 min). Fluxo 1 mL/min volume injetado de 10 µL. Os ácidos foram analisados utilizando o equipamento da Shimadzu modelo LC-6AD, modelo UV-Vis detector SPD-20A, coluna de fase reversa C-18 Phenomenex Gemini (15 cm x 4,6 mm x 5 mm). Fase móvel: 0,1% (v/v) de H₃PO₄ em água (95%) e de água de 0,1% (v/v) de H₃PO₄ em acetonitrila (5%). Fluxo 1 mL/min e volume injetado de 10 µL. Os extratos também foram fracionados utilizando diclorometano e as subfrações foram analisadas por GC-MS. Nenhum dos compostos voláteis ou facilmente volatilizáveis foi detectado nas amostras.

4.5.2 Determinação do rendimento dos extratos

O procedimento de cálculo do rendimento ocorreu a partir da pesagem das placas de petri de vidro vazias, seguidas da pesagem após evaporação do solvente quantificando com isso, a massa seca do extrato bruto obtido. A determinação do percentual de rendimento (%) de cada extrato bruto seco foi realizada utilizando a equação 1:

$$\% R = m_{es} / m_{pc} \times 100 \quad (1)$$

Onde,

$\% R$ = Percentual de rendimento

m_{es} = Massa do extrato sólido

m_{pc} = Massa do pó da casca do fruto (base seca)

4.5.3 Determinação da capacidade antioxidante por DPPH

A atividade antioxidante do extrato sólido, obtido por extração aquosa foi avaliada pelo método de DPPH (1.1-diphenyl-2-picrylhydrazyl). Soluções hidroetanólicas com concentrações entre 1 µg/mL e 6 µg/mL foram preparadas a partir de uma solução de base obtida com 0,005 g de extrato sólido em etanol/água 70:30 solvente (v/v). Para cada concentração, alíquotas de 3 mL foram misturadas com 750 µL de 400 mM de solução de DPPH. A mistura foi homogeneizada e mantida em repouso durante 15 min à temperatura ambiente sem incidência de luz. Após o período de repouso, a leitura foi realizada num espectrofotômetro a um comprimento de onda de 517 nm, utilizando os respectivos solventes para redefinir o equipamento. O experimento foi realizado em triplicata.

A porcentagem de inibição de radicais livres da amostra testada sobre os radicais DPPH foi calculada, convertendo em porcentagem de atividade antioxidante utilizando a equação 2 (SOUZA *et al.*, 2007).

$$\% I = (AC - AA) / AC \times 100 \quad (2)$$

Em que:

$\% I$: porcentagem de inibição do radical livre DPPH pela amostra em relação ao controle;

AC: absorbância determinada no controle;

AA: absorbância determinada na amostra na respectiva concentração.

A absorbância da amostra foi calculada a partir da diferença de absorbância da solução da amostra em teste com o seu branco.

O valor de IC_{50} foi definido como a concentração final, expressa em $\mu\text{g/mL}$ de suspensão dos sólidos presentes na cubeta, necessária para diminuir a concentração inicial de DPPH em 50%. A equação abaixo (3) se ajusta aos dados experimentais com $R^2 = 0.924$.

$$\% I = 34.62 \ln (c) + 31.31 \quad (3)$$

Na qual,

%I: Índice de concentração de DPPH em 50%

4.6 Desenvolvimento de membranas poliméricas

Para a obtenção das membranas bioativas de gelatina com e sem a adição de extrato aquoso de *Punica granatum*, o colágeno hidrolisado (gelatina em pó), marca NP – Comércio de Produtos Alimentícios Ltda., composição: colágeno puro, fabricação: dezembro de 2011, lote: LST – 9766, (re) disperso em ácido acético 0,5 mol/L. O extrato aquoso bruto de *Punica granatum* Linn foi solubilizado em propilenoglicol, o qual serviu como co-solvente e plastificante. O propilenoglicol foi adicionado à dispersão como agente plastificante na concentração de 20% em relação à massa polimérica.

Foram produzidos extratos a 0,5% e 1% em relação à massa polimérica seca e, realizados teste piloto em modelo murino, para avaliar toxicidade dérmica. As membranas utilizadas no estudo foram aquelas produzidas com extratos a 1%, pelo método *casting process* que consiste em verter a dispersão filmogênica em placas de polipropileno para permitir a evaporação do solvente em capela de exaustão e maior integridade da membrana na soltura da placa.

Membranas de gelatina com e sem extrato de *Punica granatum* Linn foram produzidas para posterior utilização em ensaios experimentais.

4.7 Caracterizações das membranas poliméricas produzidas

4.7.1 Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas tensão/deformação foram determinadas com o uso de um texturômetro, no modo tração (TA-TX2, *Stable Micro Systems, England*). As amostras foram cortadas em forma retangular (30 x 10 mm), sendo utilizados 10 corpos de prova para cada amostra.

A espessura das amostras foi determinada no ponto central com o uso de um micrômetro digital (Micrômetro externo digital, *Pantec*, precisão $\pm 0,001$ mm). O módulo de Young ou de elasticidade (E) foi calculado a partir da região linear da curva de tensão x deformação, entre 0,00 e 1,00% de alongamento. A resistência (tensão de ruptura e alongamento) do material foi calculada através da área abaixo da curva de tensão x deformação. A separação das garras foi de 20 mm e a velocidade dos testes de 1 mm/s.

4.7.2 Permeabilidade ao vapor d'água

A Permeabilidade das membranas foi analisada pelo método gravimétrico. Cinco recipientes contendo solução saturada de brometo de potássio (KBr) foram selados com as membranas em estudo. Essa solução gera um ambiente com umidade relativa de 84%. Em seguida foram pesados em balança de precisão eletrônica e colocados em dessecador contendo sílica. A perda de massa referente à permeação do vapor d'água através da membrana foi determinada por pesagens sucessivas e intermitentes em tempos planejados durante um período de 48 h. A permeabilidade foi calculada utilizando a equação 4:

$$WVP = (w.e) / (t. A. \Delta PV) \quad (4)$$

Na qual,

WVP: permeabilidade de vapor de água,

W: massa perdida,

e: espessura da membrana,

t: tempo,

A: área da membrana e

ΔPV : diferença entre a pressão de vapor de água dentro e fora do recipiente.

Altas concentrações de extrato etanólico de própolis alteraram a interação da água com a matriz polimérica à base de gelatina BODINI (2011) e de hidroxipropilmetilcelulose promoveram redução da permeabilidade ao vapor de água (PASTOR *et al.*, 2010).

4.7.3 Índice de intumescimento

A razão de intumescimento das membranas foi calculada utilizando-se meios ácido (pH 1,2) e básico (pH 7,2), através da imersão de corpo de provas medindo 2,0x 3,0 cm das membranas estudadas, em triplicata. Antecedendo o experimento, as amostras foram pesadas em balança de precisão analítica (*Shimadzu* AY 220, precisão 0,0001 g), sendo continuamente pesadas em escala de tempo (h) intercalado e periódico. As pesagens das membranas imersas foram realizadas após a remoção do excesso de solução aprisionada na malha com o uso de papel filtro e o manuseio dessas foi conduzido com o auxílio de pinças de dissecação sem dente. O cálculo da razão de intumescimento foi realizado utilizando a equação 5:

$$\% I = Ma \times 100 / Ms \quad (5),$$

Onde,

%: porcentagem de intumescimento,

Ma: massa de água absorvida, e

Ms: massa da membrana seca.

4.7.4 Colorimetria

Os valores de coloração das membranas foram medidos com aparelho portátil (CR-30, Minolta Chroma Meter, Minolta Câmera Co. Osaka, Japão) na Universidade Federal de Sergipe. Amostras das membranas (GEL e GELPG) foram

analisadas em três pontos distintos (triplicata), dois periféricos e um central, sobre placa branca padrão (placa de calibração CR-A43) e a escala CIE-Lab e luz do dia (D65) foram usadas para medir a cor das membranas. A Fig. 17 apresenta os parâmetros onde, L^* indica a luminosidade/claridade onde seus valores, varia de 0 (preto) a 100 (branco), e a^* e b^* são as coordenadas de cromaticidade, a^* , varia do verde (-) ao vermelho (+) e b^* , varia do azul (-) ao amarelo (+), método utilizado por Sobral, et al. (2002). A diferença da cor total (ΔE) foi calculada através da equação 6:

$$\Delta E = (\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2) \quad (6)$$

onde:

ΔL : $L_{\text{padrão}} - L_{\text{amostra}}$;

Δa : $a_{\text{padrão}} - a_{\text{amostra}}$;

Δb : $b_{\text{padrão}} - b_{\text{amostra}}$

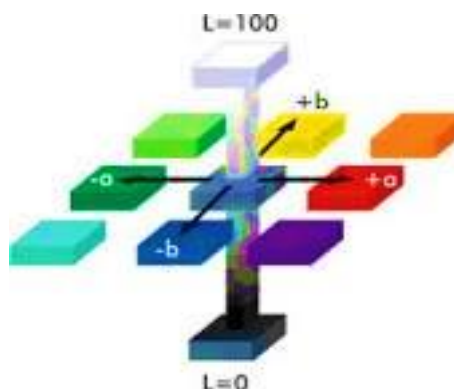


Figura 17. Parâmetros de luminosidade e cromaticidade, de acordo com o Diagrama CIE Lab

4.7.5 Morfologia microestrutural

Foram obtidas micrografias das amostras das membranas de gelatina com e sem adição de extrato de *Punica granatum* L.. As medidas foram feitas em um microscópio eletrônico de varredura JEOL-JSM, modelo 6360-LV, com aceleração do feixe de 5 kV. As amostras foram previamente fixadas em fita de carbono e metalizadas com ≈ 8 nm de ouro, em aparelho *Baltec Med 020 Coating System* e analisadas em sua superfície e transversalmente após fratura do membrana (feita em nitrogênio líquido). Essas análises foram realizadas na Universidade Federal de Sergipe - UFS.

4.7.6 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os dados de absorção de infravermelho das membranas com e sem extrato de *Punica granatum* Linn foram obtidos por espectroscopia de absorção na região de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), usando espectrômetro modelo *Spectrum BX*, da *Perkin Elmer*, acoplado à técnica de análise de superfície, reflexão total atenuada (ATR) que funciona no modo de refletância difusa (DRS), no intervalo de 400 a 4000 cm^{-1} , com resolução de 4,0 cm^{-1} . As análises de FTIR das membranas foram realizadas na Universidade Federal de Sergipe-UFS.

4.8 Ensaio biológico de cicatrização *in vivo*

4.8.1 Procedimento cirúrgico

Para o procedimento cirúrgico foi utilizado um total de 60 ratos machos *Wistar* (250 g $\pm$ 50 g), subdivididos em três grupos de 20 animais, mantidos em gaiolas com cama de maravalha, trocadas diariamente, mantidos à temperatura controlada de 22 °C, em regime de luz com ciclo claro-escuro de 12 h, recebendo água *ad libitum* e dieta padrão Labina® (Purina, São Paulo, Brasil).

O emprego de rato *Wistar* neste estudo deveu-se ao fato de que a completa reparação na sua derme acontece em um intervalo de tempo similar àquele dos humanos (ROCHA *et al.*, 2006). Assim como a arquitetura estrutural da pele do rato é em muitos aspectos similar à pele dos humanos, composta também pelas três camadas, a epiderme, derme e tecido subcutâneo.

A confecção das feridas foi realizada sob anestesia geral, com injeção intraperitoneal de 0,1 mL/100 g de peso de uma solução composta por 1 mL de ketamina (50 mg) e 1 mL de xilazina (20 mg). O dorso dos animais foi tricotomizado e a antisepsia efetuada com iodopovidona tópica a 1%.

Foram realizadas feridas cirúrgicas circulares medindo 8,0 mm de diâmetro, padronizadas com bisturi do tipo *punch*, inoxidável, e mantidas sem suturas (abertas). Cada membrana de gelatina contendo extrato aquoso da casca do fruto de *Punica granatum* utilizada para cobrir as feridas possuía 0,106 mg de

concentração do extrato aquoso e, as membranas com e sem extrato mediam 1,5 cm de diâmetro e foram fixadas à pele com soro fisiológico a 0,9%.

No pós-operatório imediato, os animais receberam a dose de 10 mg/kg de diclofenaco de potássio, por via intramuscular, como dose profilática da sintomatologia pós-operatória.

4.8.2 Determinação do índice de retração clínica das feridas

As feridas foram mensuradas nos dias 0 (imediatamente após a cirurgia), 3, 7, 14 e 21 dias de pós-operatório (imediatamente após a eutanásia), com o auxílio de paquímetro digital. A partir das medidas das bordas da ferida, padronizada na face lateral direita e borda inferior, obtendo o valor de sua área, sendo avaliada a porcentagem de contração da ferida, através da equação 7 (TEO e NAYLOR, 1995).

$$Ai - Af / Ai \times 100 \quad (7)$$

Onde,

Ai – Área inicial da ferida

Af – Área final da ferida

4.8.3 Remoção dos espécimes

Os animais foram subdivididos em três grupos (n=20): **CTR** – feridas sem coberturas; **wGEL** – feridas cobertas com membrana de gelatina; **wGELPG** – feridas cobertas com membrana de gelatina contendo extrato aquoso de *Punica granatum* Linn. Após 3, 7, 14 e 21 dias a partir dos procedimentos cirúrgicos, cinco animais de cada grupo foram eutanasiados em câmara de dióxido de carbono (modelo CGSCO2G – Beiramar), onde receberam um fluxo de ar contendo 100% de CO₂, durante 10 min.

Os espécimes removidos foram acondicionados em solução de formalina (10%, pH 7,4) e fixados por 48 h. Antes do experimento foi realizado teste piloto com membranas de diferentes concentrações do extrato aquoso de *Punica granatum* no intuito de observar o surgimento de sinais de toxicidade tópica.

4.8.4 Procedimentos histológicos / histoquímicos

Decorrido o período de 48 h para a fixação, as peças foram seccionadas transversalmente, desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina sob a forma de blocos. Os blocos foram montados no micrótomo e obtidos cortes com 5 µm de espessura e, a seguir, submetidas à coloração Hematoxilina/Eosina (HE) e picrossírius red.

4.8.5 Análise histomorfológica da reação inflamatória (secções coradas em HE)

Para avaliação das características histomorfológicas associadas ao processo inflamatório/reparativo, foram analisadas as secções histológicas coradas em HE, observando-se os seguintes critérios: intensidade e tipo do infiltrado inflamatório. A tipagem da reação inflamatória foi determinada considerando-se a análise semiquantitativa das diferentes células inflamatórias individualmente, a saber: neutrófilos, eosinófilos, linfócitos, plasmócitos e macrófagos, identificadas pela sua morfologia específica. Desta forma, esta análise obedeceu aos seguintes critérios:

- (0) Ausente:** quando não forem identificadas células inflamatórias;
- (1) Escassa:** quando o fenótipo celular estudado corresponder a menos de 10% do total de células inflamatórias sediadas na área da ferida cirúrgica;
- (2) Moderada:** quando o fenótipo celular estudado corresponder a mais de 10 e menos de 50% do total de células inflamatórias sediadas na área da ferida cirúrgica;
- (3) Severa:** quando o fenótipo celular estudado corresponder a mais de 50% do total de células inflamatórias sediadas na área da ferida cirúrgica.

A reação inflamatória após a semi-quantificação foi categorizada de acordo com a classificação:

- a) Inflamação Aguda:** quando predominaram leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos e/ou eosinófilos);

- b) Inflamação Subaguda:** quando houver equilíbrio entre leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos e eosinófilos) e mononucleares (linfócitos, plasmócitos e macrófagos) neutrófilos/eosinófilos e linfócitos/plasmócitos;
- c) Inflamação Crônica Inespecífica:** quando predominarem linfócitos e/ou plasmócitos;
- d) Inflamação Crônica Granulomatosa:** quando predominarem macrófagos e/ou gigantócitos (células gigantes multinucleadas).

4.8.6 Análise da deposição colagênica (secções coradas em Picrossírius)

Foi realizada a análise descritiva dos três grupos, detendo-se na identificação do colágeno, classificação em tipo I ou III de acordo com a birrefringência apresentada, observação do aspecto morfológico das fibras (estiradas ou onduladas, delgadas ou espessas, curtas ou longas) e disposição dos feixes (entrelaçados ou paralelos), tanto na porção superficial quanto profunda da ferida.

4.9 Análise estatística

Para as análises físico-químicas compostas por dois grupos foi aplicado o teste *t* e para mais de dois grupos, o teste de variância (ANOVA), com extensão *Post-hoc* de *Tukey*. Para as análises biológicas de cicatrização foram aplicados os testes de *Shapiro-Wilk* para verificação de normalidade dos dados. Os dados com distribuição normal foram analisados pelo teste de variância (ANOVA) com extensão *Post-hoc* de *Tukey*. Os dados que não atenderam ao pressuposto de normalidade foram analisados pelo teste *Kruskal-Wallis*, com extensão *post-hoc* de *Dunnet*. Foi utilizado o nível de significância de 5% para todas as análises, de modo que as diferenças observadas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterizações de extratos de *Punica granatum* Linn

5.1.1 Rendimento

Após produção de quatro extratos, aquosos (EAPG₁₀₀ e EAPG₂₅) hidrometanólico (EHMPG₂₅) e metanólico (EMPG₂₅) produzidos a partir da casca do fruto da *Punica granatum* Linn foi calculado o rendimento em percentual dos extratos brutos, onde ficou demonstrado nesse estudo, que a produção de extrato aquoso seco foi maior em extração a 100 °C (EAPG₁₀₀) contrastando com o menor rendimento do mesmo extrato à temperatura ambiente (EAPG₂₅), quando comparados aos extratos hidrometanólico (EHMPG₂₅) e metanólico (EMPG₂₅)- (Fig. 18).

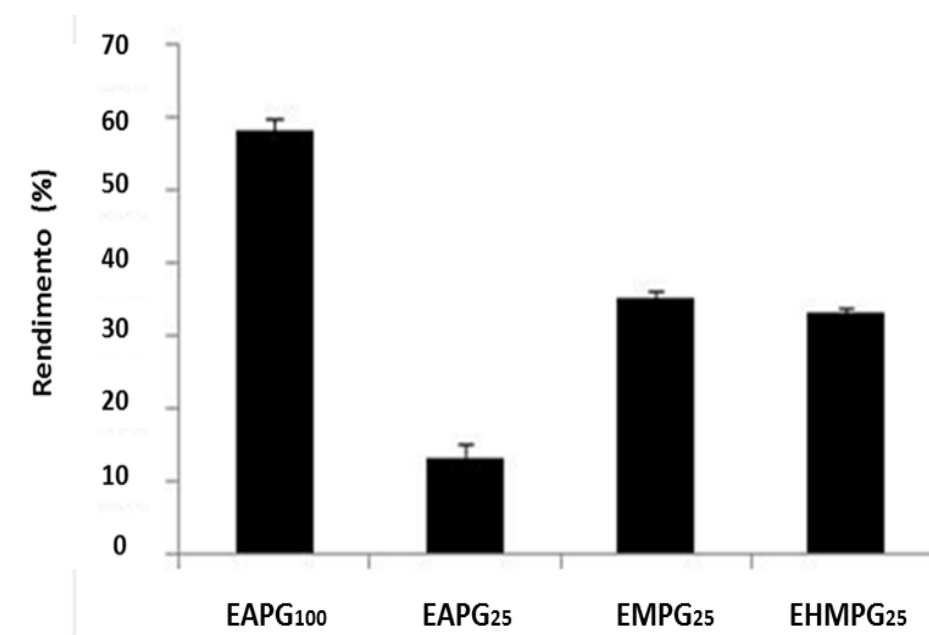


Figura 18: Rendimento (%) do extrato bruto aquoso a 100 °C (EAPG₁₀₀), extrato bruto aquoso temperatura ambiente (EAPG₂₅), extratos metanólico (EMPG₂₅) e hidrometanólico (EHMPG₂₅), a partir de pó da casca de *Punica granatum*, pelo método de extração de maceração dinâmica no período de 2 h.

Pressupõe que o resultado obtido em relação ao rendimento da extração foi influenciado pela temperatura. Assim, o efeito favorável da temperatura sobre o

rendimento da extração pode ser explicado pelo aumento da condição de solubilidade de equilíbrio, bem como maiores taxas de transferência de massa por difusão do solvente e soluto, a partir da partícula sólida no meio líquido. Estes efeitos podem compensar a influência da alta temperatura de extração de evitar a degradação térmica dos fenóis. Quando comparado extrações à mesma temperatura, o metanol parece ser um melhor solvente que não seja água, provavelmente devido à afinidade com a estrutura orgânica dos compostos químicos estudados.

QU *et al.* (2010) avaliaram rendimento do extrato aquoso da casca do fruto de *Punica granatum*, em concentração de 1:50 (v/v) com exposição à temperatura ambiente (25 °C) por 2 h. Obtiveram um rendimento do extrato bruto de 11,5% .

Nesse estudo, também foram quantificados no extrato seco, os ácidos gálico e elágico. Os melhores rendimentos destes compostos foram 54,09 mg/g para o ácido elágico observado em HMEPG obtido à temperatura ambiente e 32,24 mg/g para o ácido gálico no AEPG a 100°C (Tab. 4). Estes compostos são classificados como taninos de elevada polaridade, o que promove a sua fácil extração com solventes polares.

Wang *et al.* (2013) divulgaram que a melhor condição de extração utilizando folhas de romã foi à temperatura de 80 °C, 61% de etanol como solvente e exposição do produto a 60 min, com isso, alcançaram um rendimento de extrato bruto de 42,8%. Este valor é similar aos resultados obtidos nesse estudo.

Tabela 4: Quantificação química por análise cromatográfica (HPLC) dos ácidos tânico do extrato seco (mg/g) da casca do fruto de *Punica granatum*.

Extratos	Compostos tânico do extrato bruto da casca do fruto de <i>Punica granatum</i> Linn (mg/g)	
	Ácido Gálico	Ácido Elágico
EAPG₁₀₀	32,24	41,67
EMPG₂₅	27,13	42,78
EHMPG₂₅	26,78	54,09

EAPG₁₀₀ – Extrato aquoso de *Punica granatum* Linn, obtido por maceração dinâmica a 100°C; EHMPG₂₅ – Extrato hidrometanólico de *Punica granatum* Linn, obtido por maceração dinâmica à temperatura ambiente e EMPG₂₅ – Extrato metanólico de *Punica granatum* Linn, obtido por maceração dinâmica à temperatura ambiente.

5.1.2 Cromatografia líquida de alta eficiência com espectrometria de massa acoplada (CLAE-MS)

Na análise cromatográfica do extrato aquoso – EAPG₁₀₀ (Fig. 19A), hidrometanólico (EHMPG) da casca do fruto de *Punica granatum* Linn, (Fig. 19B) e metanólico (EMPG) (Fig. 19C) foram identificados e isolados os mesmos compostos tânicos majoritários, em conformidade com os picos presentes nos cromatogramas da Fig. 19: ácido gálico [1], punicalagina α [2], punicalagina β [3] e ácido elágico [4].

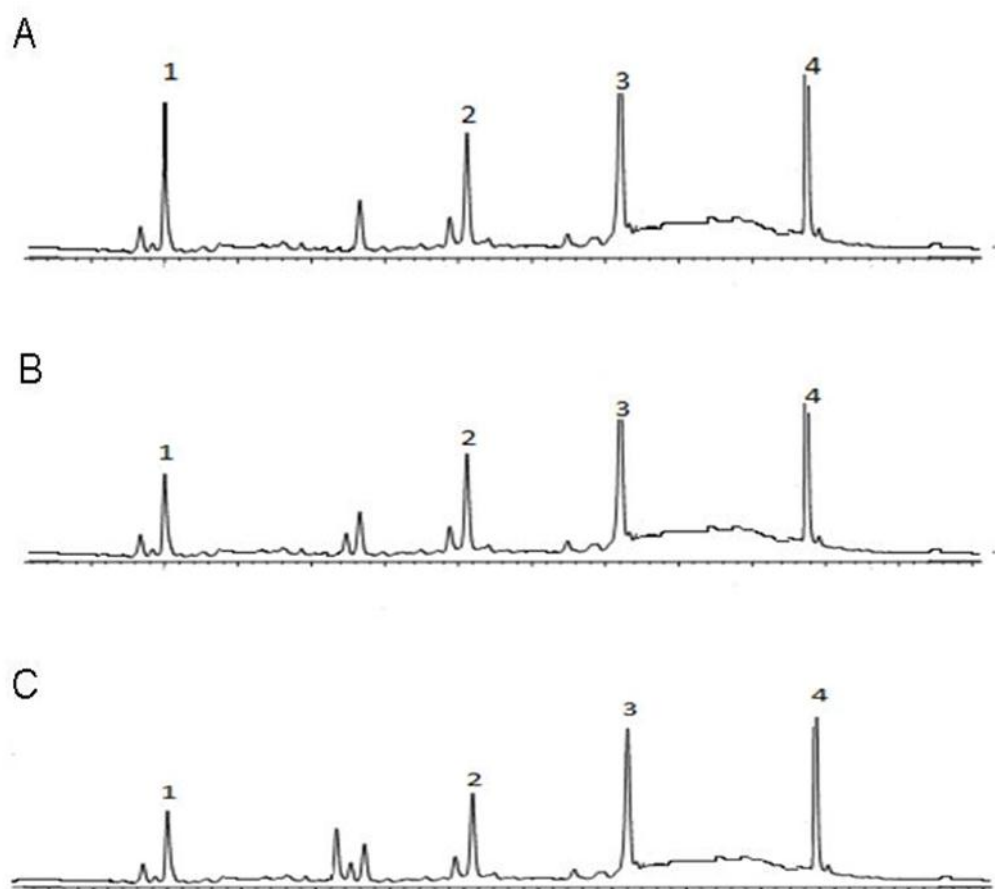


Figura 19: Cromatogramas (HPLC-MS) de identificação dos compostos tânicos majoritários, ácido gálico [1], punicalagina α , [2], punicalagina β [3] e ácido elágico [4] nos extrato aquoso (A), hidrometanólico (B) e metanólico (C) de *Punica granatum* Linn.

Na identificação das substâncias fenólicas, isoladas por cromatografia líquida de alta eficiência com espectrometria de massa (HPLC-MS), o ácido gálico foi encontrado em maior concentração no EAPG, no menor tempo de arraste (5,03 min), o ácido elágico foi encontrado em maior concentração no EHMPG, no maior

tempo de arraste (26,84 min) quando comparadas com as punicalaginas (não foram quantificadas) que tiveram seus tempos de retenção de 15,69 min para punicalagina α e 21,31 min para punicalagina β .

Romani *et al.* (2012) analisaram e caracterizaram amostras de extratos de casca do fruto e de sementes de *Punica Granatum* pelo método de HPLC-MS para avaliação de polifenóis, com diferentes subclasses de taninos, o que conferiram muitas variedades desse grupo químico, dentre os taninos caracterizados foram qualificados e quantificados os mesmos componentes majoritários desse estudo (Fig. 19), ácido gálico, ácido elágico e punicalagina α e β . A cromatografia é considerada uma das técnicas de maior eficiência de maximização do rendimento dos fenóis totais, tanto das atividades biomoleculares como dos compostos (punicalaginas e ácido elágico).

5.1.3 Determinação do potencial antioxidante pelo método DPPH

Após análise em diferentes concentrações da solução etanólica de extrato aquoso de *Punica granatum* (EAPG₁₀₀), verificou-se o valor do IC₅₀ de 1,715 $\mu\text{g/mL}$ ($\pm 0,24 \mu\text{g/mL}$), o qual foi calculado pela equação (3). Considera-se que o extrato aquoso da casca do fruto (romã) da *Punica granatum* possui baixo valor de IC₅₀ e alto potencial antioxidante (Fig. 20), considerado como um extrato de alta atividade antioxidante.

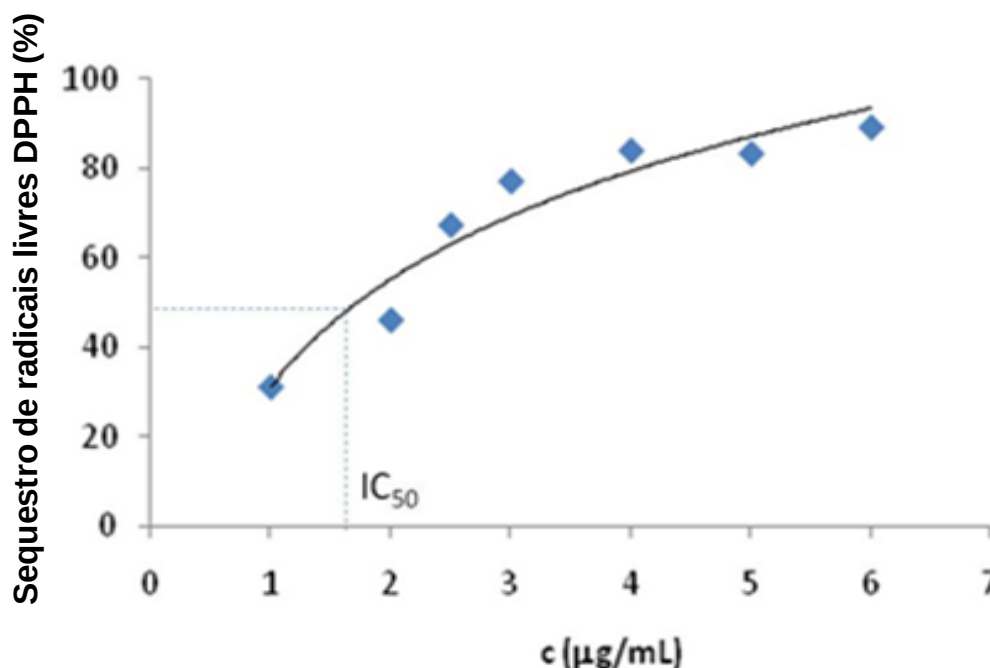


Figura 20: Atividade antioxidante pelo método DPPH de extrato aquoso de casca do fruto de *Punica granatum* em solução hidroalcoólica (30:70 v/v).

O extrato aquoso de *Punica granatum* apresenta atividade antioxidante, em concentrações muito baixas. QU *et al.* (2010) avaliaram pelo método de DPPH, o potencial antioxidante do extrato aquoso da casca do fruto de *Punica granatum* e verificaram o valor de IC₅₀ 6,2 µg/mL.

Wang *et al.* (2013) encontraram valores elevados, superiores a 40%, da atividade antioxidante por DPPH (sequestro de radical) de extratos de folhas de romã, no intervalo de concentração de 0,2-0,33 µg/mL. Estes valores são 200 vezes maiores do que o encontrado no presente trabalho realizado com extratos aquosos de cascas de romã e, aponta para o melhor potencial antioxidante, quando comparado com as folhas desse fruto.

Aqil *et al.* (2012), trabalhando com extrato aquoso de casca de romã, encontraram IC₅₀ de ~17 µg/mL, ainda maior do que o valor encontrado (1,715 ± 0.24 µg/ml) no presente trabalho, com a temperatura de extração de 100 °C. Este valor ratifica o potencial antioxidante de produtos naturais. Assim, Oliveira *et al.* 2009 afirmam que a relação entre o potencial antioxidante de uma substância e o valor de IC₅₀ é inversamente proporcional, que quanto maior o potencial antioxidante da substância, menor o IC₅₀.

Em avaliação da capacidade antioxidante dos resíduos de cascas de *Punica granatum* (romã) foi demonstrado que esses poderiam ser aproveitados, devido ao alto potencial antioxidante (OKONOGI *et al.*, 2009).

5.2 Caracterizações de membranas de gelatina

5.2.1 Propriedades morfofuncionais

Os resultados da análise macroscópica indicam que as composições filmógenas para membrana de gelatina (GEL) Fig. 21a e membrana de gelatina contendo extrato aquoso de *Punica granatum* Linn (GELPG) Fig. 21b produziram membranas poliméricas consideradas de boa qualidade, uma vez que não apresentaram fissuras, fraturas ou heterogeneidade dos compostos. O aspecto visual demonstra transparência, homogeneidade, flexibilidade e boa continuidade, consideradas compatíveis ao uso seguro em ensaios experimentais (Tabela 5).

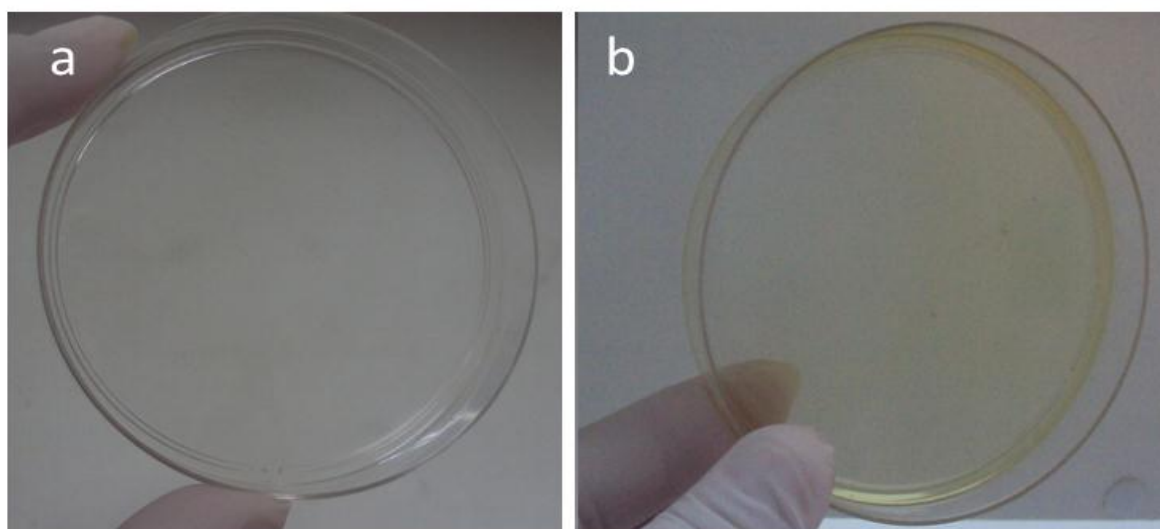


Figura 21: Membrana polimérica de gelatina (GEL), transparente e incolor (a) e membrana polimérica de gelatina contendo extrato aquoso de casca do fruto de *Punica granatum* Linn (GELPG), transparente e ligeiramente amarelada (b).

Sugere-se que essas características macroscópicas estejam vinculadas à composição química e ao processo de secagem. É enfático que, em capela de exaustão, a evaporação do solvente das dispersões é mais lenta, no entanto gera membranas mais flexíveis, menos quebradiças, quando comparadas àquelas evaporadas em temperaturas acima de 37 °C (estufa de circulação).

Tabela 5: Principais características morfológicas observadas nas membranas GEL e GELPG.

Variáveis	GEL	GELPG
Integridade	2	2
Homogeneidade	2	2
Uniformidade	2	2
Transparência	2	2
Opacidade	0	0

Legenda: Nenhuma alteração (0); Levemente presente (1); Fortemente presente (2).

O equilíbrio das características de matrizes poliméricas é importante para o manuseio, transporte e o armazenamento de coberturas para feridas, sem que haja sua deformação ou ruptura, garantindo seu caráter protetor. Medidas são adquiridas em testes dessas propriedades assegurando informações sobre as forças intermoleculares envolvidas na estabilização das matrizes poliméricas (ROBERTSON *et al.*, 1993). Necessitam, portanto serem avaliadas e classificadas pelas suas propriedades óticas, magnéticas, elétricas, estruturais e mecânicas que não se desligam entre si antes de utilizadas.

5.2.2 Colorimetria

Na leitura da análise colorimétrica no plano de fundo padrão (branco), para os valores da análise de luminosidade (L^*) e escala de coloração verde/vermelho (a^*), as membranas indicam não haver diferença significativa ($p < 0,05$) entre as duas membranas. Enquanto para os valores da escala de coloração azul/amarelo (b^*), percebe-se diferença significativa ($p < 0,05$), conforme distribuição na tabela 6. Os resultados obtidos para os parâmetros de cor, considerando o diagrama *CIE Lab* (Fig.17) corroboram o observado macroscopicamente em relação à coloração das membranas produzidas onde, as membranas GEL apresentaram-se translúcidas sem evidência de cor (Fig. 21a), enquanto GELPG demonstrou além da transparência, a coloração amarelada, efeito esperado pela coloração do pó da casca do fruto e dos extratos (Fig. 21b).

Tabela 6: Distribuição dos valores obtidos na análise colorimétrica em plano de fundo branco, expressando resultados da diferença de cor das membranas GEL e GELPG, onde a* (indicativo da cor verde) e b* (indicativo da cor amarela) e L (indicativo de luminosidade).

Membranas	a* (p=0,2784)	b* (**p=0,0003)	L* (p=0,059)
GEL	2,2 ± 0,17	0,80 ± 0,85	87,40 ± 1,0
GELPG	2,3 ± 0,41	23,66 ± 4,09	83,76 ± 0,60

Padrões para plano de fundo branco (a=6,1; b=13,1 e L=74,7).

Resultados similares foram notados em membranas à base de proteína de soja que obtiveram extrato de semente de uva na sua composição e, membranas poliméricas à base de gelatina e própolis, cuja cor variou em relação ao padrão influenciado pelos parâmetros L*, a* e b* pela presença de compostos fenólicos que contribuíram com cores avermelhadas ou amareladas (SIVAROOBAN *et al.*, 2008; BODINI, 2011).

5.2.3 Propriedades mecânicas

A incorporação de extrato aquoso de *Punica granatum* na composição das membranas de gelatina não alterou suas propriedades de força máxima impressa no momento da ruptura, assim como da habilidade de dilatar o estado natural do produto, determinado pelas deformações, nem tampouco sua condição de elasticidade, não havendo assim diferença significativa ($p > 0,05$) para nenhuma das propriedades mecânicas mencionadas tanto para as membranas de gelatina sem extrato (GEL) como para membranas de gelatina com extrato aquoso de *Punica granatum* Linn (GELPG).

Os dados obtidos indicam uma diferença significativa (**p=0,000227) entre as espessuras da membrana de gelatina (GEL), Fig. 22a, e após a inclusão do extrato aquoso de *Punica granatum* (GELPG), 22b, legitimado pelas medidas expressas nas fotomicrografias eletrônica de varredura que apresentam um aumento de 84,63% na espessura (μm) da membrana de gelatina após a adição do referido extrato apresentados na Tabela 7.

Tabela 7: Distribuição das propriedades mecânicas - tensão de ruptura (MPa), alongamento (%), módulo Young (MPa) e espessura (μm) das membranas de gelatina sem (GEL) e com extrato aquoso de *Punica granatum* Linn (GELPG).

Membrana	Tensão (MPa)	Alongamento (%)	Módulo de Young (MPa)	Espessura (μm)
GEL	43,33 $\pm$ 9,09	7,125 $\pm$ 2,35	633,34 $\pm$ 128,50	24,30 $\pm$ 0,003
GELPG	54,63 $\pm$ 7,34	8,71 $\pm$ 2,42	639,33 $\pm$ 81,97	45,55 $\pm$ 0,003
Valor de p	0,160440	0,509062	0,301701	0,000227*

*Diferença significativa.

A espessura é um parâmetro que influencia as propriedades das membranas, sendo importante na avaliação da homogeneidade, uniformidade dos materiais, bem como validação das comparações entre as propriedades da sua composição (RIGO, 2006; HENRIQUE; CEREDA; SARMENTO, 2008).

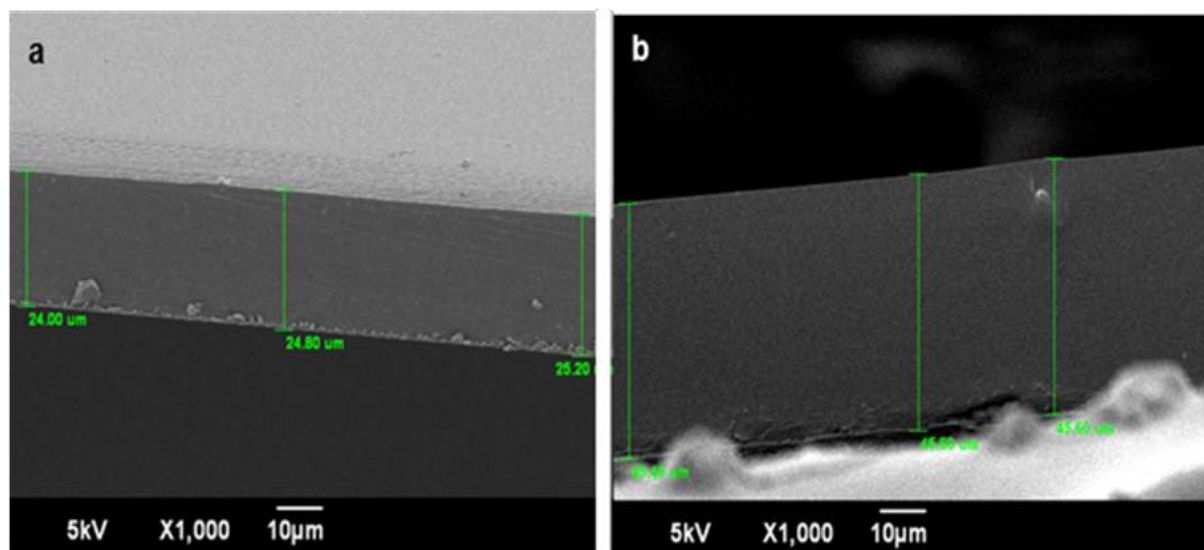


Figura 22: Fotomicrografias de secções transversais (5 kV, 1.000x, 10 μm) indicando o aumento de espessura das membranas de gelatina (a) com a incorporação de extrato aquoso da casca do fruto de *Punica granatum*-GELPG (b).

5.2.4 Permeabilidade ao vapor d'água (PVA)

As membranas em estudo indicam que a incorporação de extrato aquoso da casca do fruto de *Punica granatum* L. na membrana de gelatina, diminuiu sua

permeabilidade ao vapor d'água, fato que pode estar relacionado ao aumento de espessura, bem como da inserção dos compostos ativos, presentes nesse extrato, que poderá estar ocupando espaços intersticiais intercatenários, criando uma barreira natural, mesmo que não estejam ocorrendo interações químicas efetivas, tal evento pode ocorrer apenas pelo aprisionamento na malha polimérica, o que permite dificultar as interações das moléculas polares (como o vapor d'água) com a matriz polimérica.

Os resultados apresentados na Fig. 23 sugerem que houve diferença estatística considerável ($p < 0,05$) entre as membranas estudadas (GELPG e GEL) em relação à permeabilidade ao vapor d'água, em 35 horas de experimento.

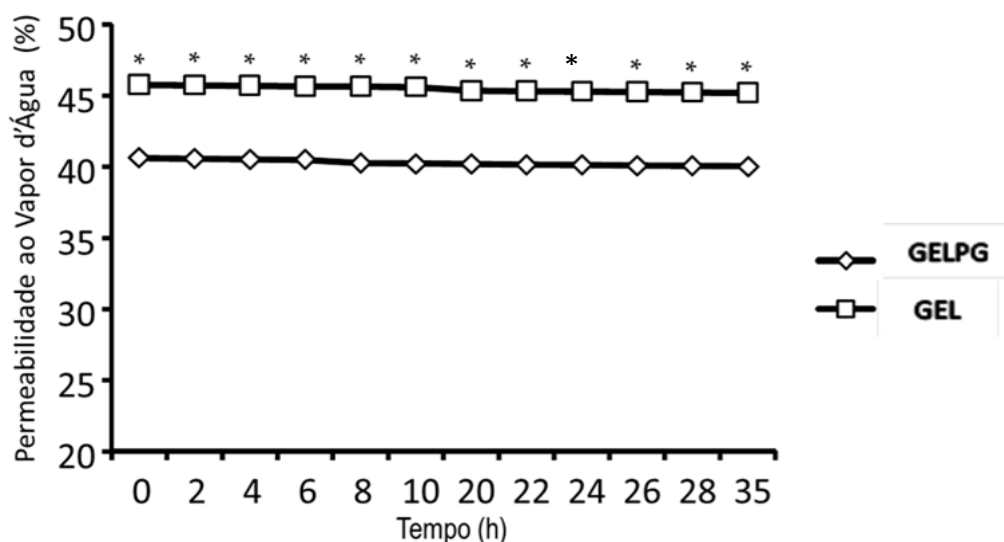


Figura 23: Curva de permeabilidade ao vapor d'água das amostras (Membrana de gelatina com extrato- GELPG e membrana de gelatina sem extrato - GEL) em relação ao tempo de trinta e cinco horas.

MCHUGH e KROCHTA (1994) demonstram que membranas com baixa permeabilidade são obtidas a partir de matrizes poliméricas formadas por cadeias lineares simples e que a presença de cadeias laterais na matriz compreende um aumento nos espaços livres facilitando a difusão do permeante. Os mesmos autores consideram a estrutura molecular das matrizes poliméricas como um parâmetro de grande influência nas propriedades de barreira de uma membrana.

Para Dias, *et al.* (2010), o plastificante utilizado na formulação influencia na permeabilidade ao vapor d'água das membranas polimérica, a exemplo de membranas com sorbitol, que são menos permeáveis ao vapor d'água e menos rígidas. Membranas compostas com glicerol têm maior plasticidade e menor propriedade de barreira ao vapor d'água.

Plastificantes são compostos que, quando adicionados a outros materiais podem modificar algumas de suas próprias propriedades, físicas e mecânicas (GUILBERT e BIQUET, 1995; RIGO, 2006). Eles ainda minimizam forças de ligações entre as moléculas em sistema de baixa umidade, aumentando a flexibilidade da membrana (VEIGA-SANTOS *et al.*, 2005).

5.2.5 Índice de intumescimento

O comportamento de intumescimento das membranas produzidas foi semelhante, e sofreu influência do meio sobre o grau de hidratação das membranas. As membranas GEL e GELPG iniciaram o intumescimento tão logo, após à imersão com ganho de massa rápido (~250% e 400%, respectivamente, em meio neutro) e (~1500 e 1300%, em meio ácido, respectivamente), visualizados na Fig. 24. Em meio neutro (pH 7,2), essas membranas mantiveram intumescimento ascendente, havendo ganho de massa gradativo e controlado em relação à massa inicial durante todo ensaio (Fig. 24a). Já no meio ácido (pH 1,2), a membrana GEL apresenta uma curva que indica ganho e perda de massa rápido, consequentemente, houve uma diminuição do intumescimento, contrário ao comportamento da membrana GELPG que apresentou ganho de massa rápido e, manteve constante seu grau de intumescimento (Fig. 24b).

Nesse estudo, os resultados sugerem (Fig. 24) que a adição do extrato da *Punica granatum* na membrana de gelatina (GELPG), a tornou com maior capacidade de intumescimento, provavelmente pela presença de grupos hidrofílicos adicionais ao colágeno hidrolisado - gelatina, indicando a incorporação do extrato utilizado. Essa condição também é sugestiva de ocorrer aumento de área ativa disponível na malha polimérica, facilitando a absorção da água pelos grupos químicos hidrofílicos.

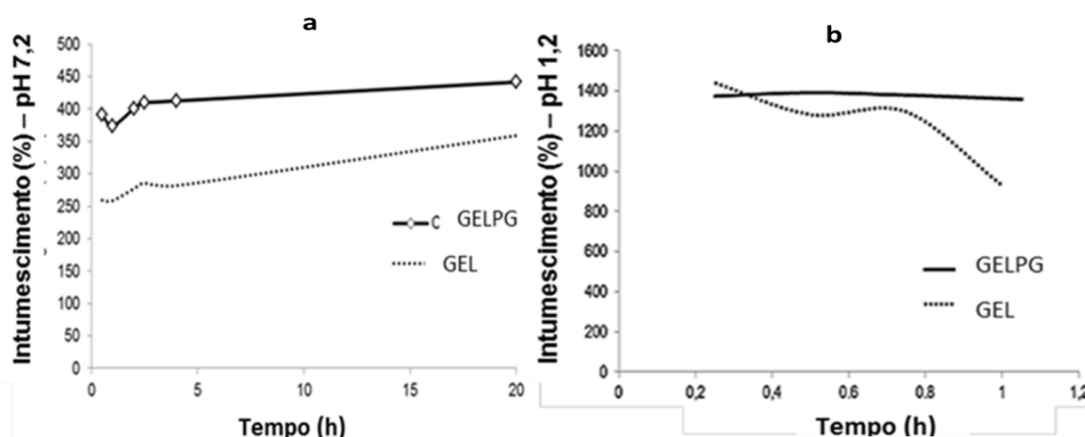


Figura 24: Índice de intumescimento das membranas GELPG e GEL em meio neutro (pH 7,2), (24a) e Grau de intumescimento das membranas GELPG e GEL em meio ácido (pH 1,2), (24b).

Amostras de membranas contendo goma arábica apresentaram aumento adicional na hidratação quando imersas em meio de pH próximo ao neutro (GABAS, CAVALCANTI, 2003) havendo influência do meio de membranas contendo Eudragit RS30D® (TEC 20%) e Goma arábica, que foram preparadas pelo mesmo método aplicado nesse estudo, *casting process*, processo comumente utilizado para polímeros termorrígidos e termoplásticos.

5.2.6 Morfologia microestrutural

A morfologia microestrutural das membranas antes e após a incorporação do EAPG foi estudada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). A análise de superfície da membrana GEL (Fig. 25a e 25b) revelou a presença de poros e aspecto estrutural homogêneo, menos evidente em GELPG (Fig. 25c e 25d) que apresenta discreta heterogeneidade, com pequenos agregados distribuídos na superfície.

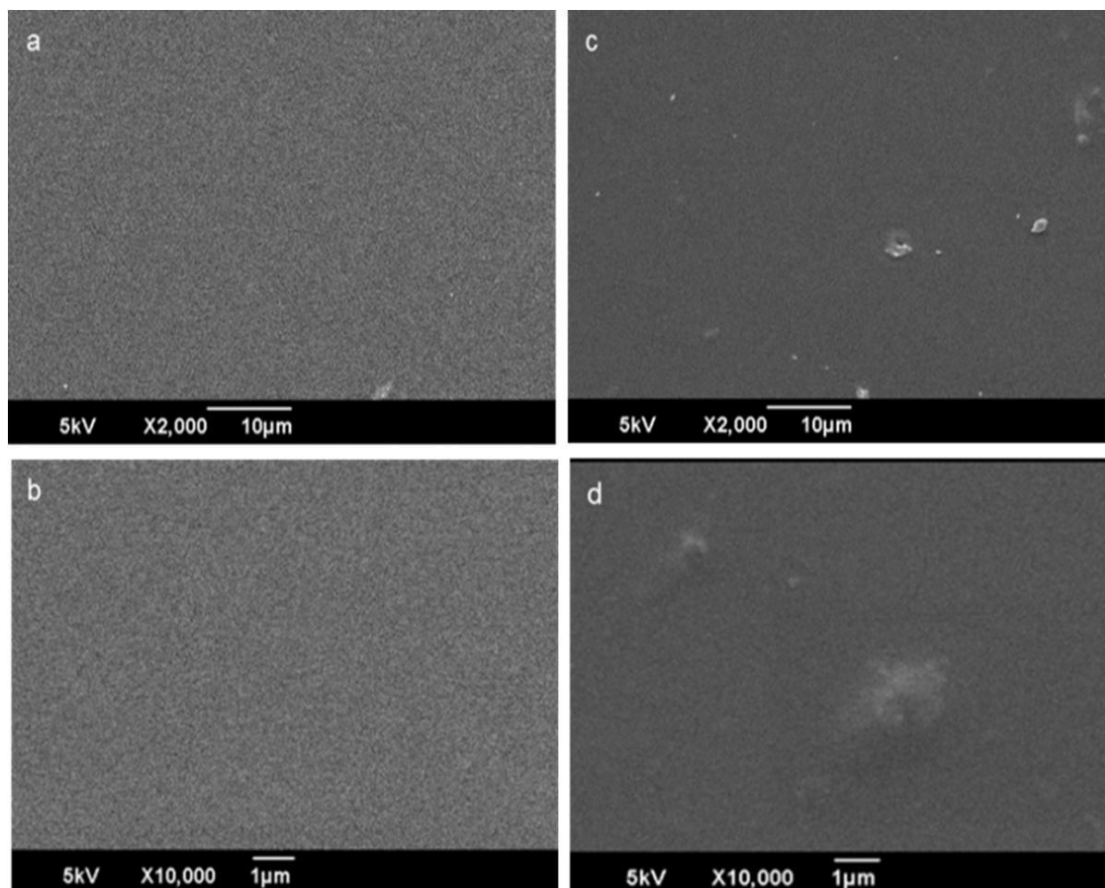


Figura 25: Fotomicrografias eletrônicas de varredura (5 kV, 2.000x e 10.000x, 10 µm) de superfície: GEL - membranas de gelatina (a - 2.000x) e (b - 10.000x), e GELPG - membranas de gelatina contendo extrato aquoso de *Punica granatum* Linn (c - 2.000x) e (d - 10.000x).

A partir das imagens da secção transversal (Fig. 26), observou-se uma estrutura compacta nas duas membranas estudadas (GEL e GELPG). Evidenciou-se uma diferença entre as amostras, onde as membranas de gelatina contendo extrato de *Punica granatum* (GELPG), representadas pela Fig. 26b e Fig. 26d, demonstram a formação de rugosidade, que pode estar relacionado à incorporação do extrato aquoso de *Punica granatum* Linn, quando comparadas às membrana de gelatina sem extrato (GEL), Fig. 26a e Fig. 26c.

Outras observações que apontam para a incorporação do extrato estão relacionadas à maior espessura da membrana após incorporação do extrato e formação de proeminências semelhantes a grânulos (Fig. 26b), não visualizadas na membrana de gelatina (Fig. 26a). Em maior ampliação, foi possível perceber que, nas áreas relativas às proeminências supracitadas houve extensa formação de rugosidades e reentrâncias morfológicas das membranas compostas de gelatina e

extrato (GELPG), Fig. 26d, não notadas nas membranas sem extrato (GEL), Fig. 26c. Assim, sugere-se que houve modificação na malha polimérica das membranas devido à incorporação do extrato aquoso da casca do fruto de *Punica granatum*.

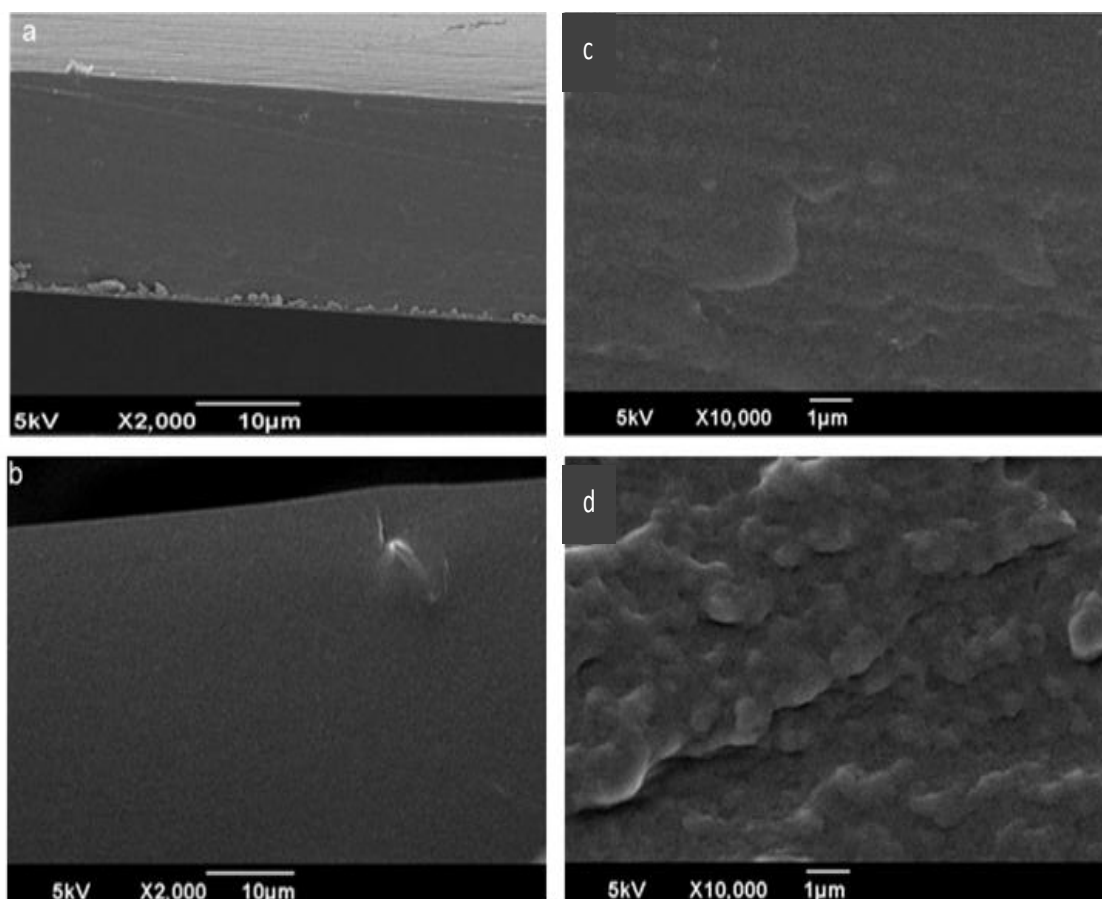


Figura 26: Fotomicrografias eletrônicas de varredura (5 kV, 2.000x e 10.000x, 10 µm) de secção transversal: membranas de gelatina (a - 2.000x) e (b - 2.000x), e membranas de gelatina contendo extrato aquoso de *Punica granatum* Linn (c – 10.000x) e (d - 10.000x).

Corrêa (2011), Nunes *et al.* (2011) e Riella *et al.* (2012) analisaram as alterações morfoestruturais sofridas por membranas de colágeno após a incorporação de extrato hidroalcoólico de própolis vermelha, ácido úsnico e timol, respectivamente, utilizando a MEV, e associaram a identificação de diferenças texturais no material com a incorporação dos compostos químicos.

5.2.7 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

No espectro correspondente à membrana de gelatina (GEL) percebeu-se uma banda larga entre 3000 e 3600 cm^{-1} , com maior intensidade centrada em 3345 cm^{-1} , correspondente aos estiramentos de grupos hidroxilas (-OH); estas poderiam também estar associadas à presença de estiramentos dos grupos (-NH) livres, devido à presença de interações de hidrogênio, característica de aminas, bem como a presença de água adsorvida fisicamente pelas membranas. Estes dados são corroborados pela banda de vibração antissimétrica do grupo (-OH), em 1625 cm^{-1} (Fig. 27).

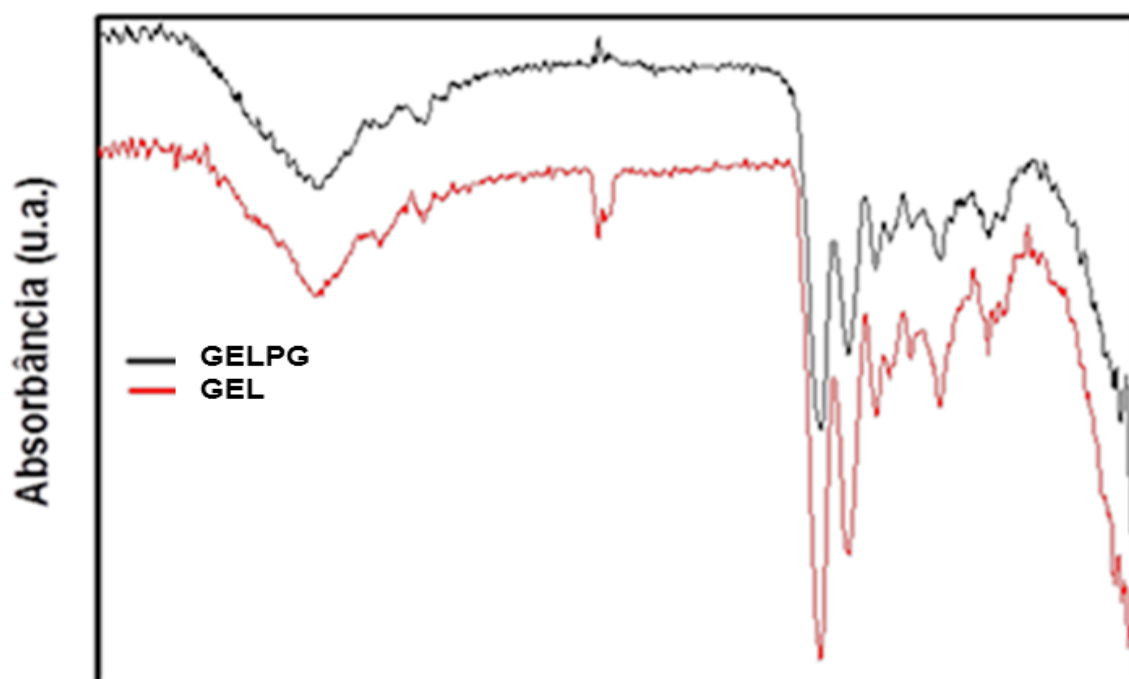


Figura 27: Espectros de Infravermelho da membrana de gelatina (linha vermelha) e da membrana de gelatina com extrato aquoso de *Punica granatum* (linha preta).

Após a inserção do extrato aquoso de *Punica granatum* L. nas membranas de gelatina, não foram observadas variações nas bandas atribuídas às membranas GEL, apenas uma redução da intensidade dos modos vibracionais característicos, que poderia estar relacionada a uma redução da atividade vibracional de determinados grupos funcionais -NH e -OH (RANA *et al.*, 2007), resultantes da interação,

provavelmente interações de hidrogênio, com os componentes químicos do EAPG. Alguns modos vibracionais sofreram discreto deslocamento (1074 e 1234 cm^{-1}), que podem estar relacionados às perturbações do sistema formado (GELPG).

5.3 Ensaios biológicos de cicatrização

5.3.1 Índice de retração da ferida (IRF)

Conforme pode ser observado nas Fig. 28 e 29, o IRF foi significativamente maior em wGELPG do que em wGEL ($p<0,01$) e CTR ($p<0,01$) em três e sete dias ($p<0,01$ e $0,001$, respectivamente). Em 14 dias, tanto wGELPG quanto wGEL exibiu IRFs significativamente superiores a CTR ($p<0,01$ e $0,05$, respectivamente). Em 21 dias, todos os animais exibiam fechamento completo das feridas.

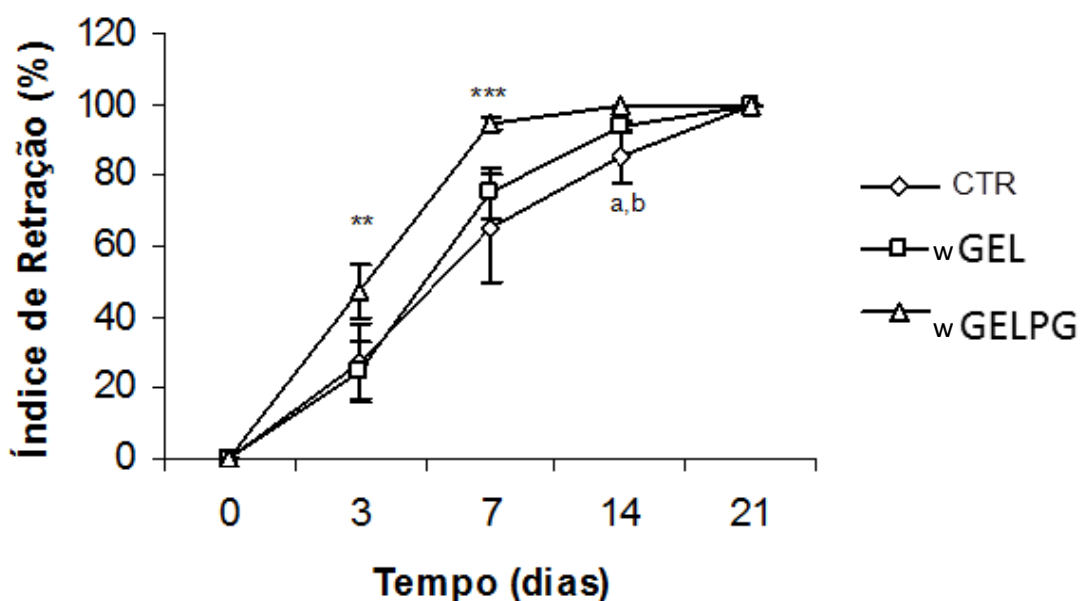


Figura 28: Índice percentual médio de retração da ferida ao longo dos 21 dias experimentais. Grupo controle (CTR), grupo tratado com membranas de gelatina (wGEL) e grupo tratado com membranas de gelatina contendo extrato aquoso de *Punica granatum* (GELPG).

** Diferença significativa entre wGELPGL e os demais grupos ($p<0,01$)

*** Diferença significativa entre wGELPGL e os demais grupos ($p<0,001$)

a - Diferença significativa entre CTR e wGEL ($p<0,05$)

b - Diferença significativa entre CTR e wGELPGL ($p<0,001$).

As bordas de uma ferida sofrem retração centrífuga promovida pela tensão elástica da pele circunvizinha à lesão, pela perda de aderência à fáscia profunda, além da mobilidade da pele, com isso a medida da área inicial da ferida em relação à área do molde original aumenta (CROSS *et al.*, 1995; TEO e NAYLOR, 1995).

A determinação da retração clínica das feridas (Fig. 28) demonstra a evolução do processo de cicatrização das lesões dos animais em estudo (CTR, wGEL e wGELPG), no respectivo tempo (dias) de retirada do espécime.

Nos três primeiros dias do surgimento de uma lesão, ocorre o processo inflamatório agudo. Em seguida ocorre uma diminuição contínua da área da ferida, que progressivamente declina em direção ao 10º ou 12º dia. Após este período, aproxima-se a fase final de cicatrização, o que torna difícil a mensuração acurada da área da ferida que evolui para o fechamento total (CROSS *et al.*, 1995).

Esse processo pode ser acelerado quando as feridas recebem coberturas bioativas que estimulam a contração e, conseqüentemente as demais fases da cicatrização. O uso de membranas de colágeno produzidas à base de produtos naturais como sistema de controle de liberação de fármacos (ALBUQUERQUE-JÚNIOR *et al.*, 2009) e compostos químicos isolados, a exemplo de timol (RIELLA *et al.*, 2012), ácido úsnico (NUNES *et al.*, 2011), Mangaba (COSTA, *et al.*, 2012) está bem estabelecida, mas nenhum estudo utilizando membranas de colágeno contendo extrato obtido a partir da planta de *Punica granatum* foi relatado anteriormente.

Sabe-se que diferentes extratos de *Punica granatum* veiculados por outros meios são capazes de melhorar a cicatrização de feridas (HAYOUNI *et al.*, 2011). A aplicação tópica do extrato aquoso de *Punica granatum* Linn se mostrou efetiva em acelerar os fenômenos biológicos de contração da ferida e reepitelização durante o processo de cicatrização de queimaduras dérmicas efetuadas em dorso de ratos (RAJPUT *et al.*, 2011).

A introdução do extrato aquoso de casca do fruto de *Punica granatum* Linn nas membranas de gelatina (GELPG) aplicadas como coberturas em lesões dérmicas contribuiu, de maneira eficaz, na aceleração do processo de retração de feridas dérmicas nesse estudo (Fig. 29) e pareceram aumentar significativamente as taxas de contração da ferida sobre todo o tempo de curso da experiência.



Figura 29: Fotografias das feridas dérmicas demonstrando o índice de retração dos grupos CTR (Controle), wGEL (tratados com membranas de gelatina) e wGELPG (tratados com membranas de gelatina contendo extrato aquoso da casca do fruto de *Punica granatum*) nos tempos de 0, 3, 7, 14 e 21 dias da confecção da ferida.

Apoiando os dados obtidos, outras plantas ricas em compostos antioxidantes, tais como ácidos gálico e elágico, têm sido indicadas para melhorar a contração de feridas (ESTAKHR e JAVDAN, 2011; SHIBAN *et al*, 2012).

Em ensaios biológicos, as taxas de contração das feridas representam um dos parâmetros mais importantes para avaliar a evolução e sucesso da reparação da ferida (NUNES *et al*, 2011; RIELLA *et al*, 2012). No entanto, o preciso mecanismo subjacente aos efeitos do EAPG nas taxas de contração da ferida não foi elucidado. Contração da ferida tem sido associada com a atividade de miofibroblastos, que são fibroblastos que adquiriram um fenótipo contrátil induzida por fator de crescimento de transformação beta (TGF- β).

Assim, as taxas de aumento de contração das feridas observadas em wGELPG sobre o curso temporal da experiência sugerem um papel estimulador possível desempenhado pelo EAPG na diferenciação de miofibroblastos. Embora os estudos *in vitro* tenham demonstrado que o ácido elágico inibe expressão de SMA- α e a transdiferenciação para miofibroblastos como células (SUZUKI *et al.*, 2009).

Existem poucas informações sobre o papel desempenhado por outros compostos importantes do extrato aquoso de *Punica granatum*, além do ácido gálico, ácido elágico, punicalagina α e punicalagina β sobre a síntese de TGF- β e diferenciação miofibroblástica. Assim, outras investigações continuam a ser necessárias a fim de esclarecer o papel isolado desempenhado pelos compostos químicos majoritários do EAPG na melhoria das taxas de contração da ferida.

5.3.2 Análise semiquantitativa da intensidade da reação inflamatória

Na análise semiquantitativa desse estudo, em 3 dias todos os grupos (CTR, wGEL e wGELPG) apresentaram resposta inflamatória aguda e severa. Em 7 dias observa-se uma resposta subaguda em todos os grupos com evidencia de wGELPG. Com 14 e 21 dias todos os espécimes apresentaram um infiltrado predominantemente crônico. O grupo wGELPG destaca-se pela ausência de infiltrado inflamatório. Os dados relativos à semiquantificação da intensidade do infiltrado inflamatório nos grupos estudados estão distribuídos na tabela 8.

Tabela 8: Análise semiquantitativa da intensidade da reação inflamatória nos grupos estudados ao longo do período experimental de 21 dias.

Grupos	Período experimental (dias)			
	3	7	14	21
CTR	3,00 $\pm$ 0,00	2,83 $\pm$ 0,38	1,33 $\pm$ 0,76	1,00 $\pm$ 0,41
wGEL	2,60 $\pm$ 0,50*	2,79 $\pm$ 0,41	1,38 $\pm$ 0,50	0,83 $\pm$ 0,48
wGELPG	2,40 $\pm$ 0,50***	2,50 $\pm$ 0,51*	1,06 $\pm$ 0,56**	0,29 $\pm$ 0,46***

Significativamente diferente de CTR: *p<0.05; ** p<0.01); *** 0.001.

O início da reação inflamatória ocorre inespecificamente como resposta a uma ampla variedade de agentes lesivos. A fase inflamatória aguda, habitualmente, é de curta duração. Quando os agentes de defesa são eficientes e eliminam rapidamente o agente agressor, a cura se processa de maneira completa e usualmente sem sequelas (LAMANO, 2008).

LAMANO (2008) acrescenta que a restauração tecidual que aproxima da normalidade se processa com a neutralização dos mediadores químicos, a

drenagem do líquido de edema, a remoção dos resíduos por células fagocitárias e a regeneração do parênquima danificado. Quando a lesão tecidual é grave, ou quando não há a remoção adequada do exsudato fibrinoso, forma-se no local um tecido cicatricial fibroso que substituirá o parênquima especializado, ou ainda quando o agente agressor não é eliminado na fase aguda da inflamação, persistindo nos tecidos, tanto ele como os produtos da lesão tecidual serão reconhecidos como corpos estranhos e desencadeiam a inflamação crônica.

Neste estudo, a incorporação de extrato aquoso de *Punica granatum* nas membranas de gelatina promoveu as principais alterações histológicas na dinâmica da cicatrização de feridas, representadas por uma menor intensidade da resposta inflamatória, particularmente o conteúdo de neutrófilos, a melhoria no tecido de granulação e melhoria da colagenização. Uma vez que, o extrato apresenta alto potencial antioxidante, pressupõe-se que há uma relação entre a melhoria dos aspectos histológicos na cicatrização de ferida e a redução do estresse oxidativo nos tecidos lesionados.

Na verdade, radicais livres de oxigênio derivados dos neutrófilos ativados devem induzir estresse oxidativo relacionado com o dano tecidual e atraso da cicatrização de feridas (SCHÄFER e WERNER, 2008). Por outro lado, tem sido relatado, que o ácido gálico, um dos compostos mais importantes do extrato aquoso de *Punica granatum* (EAPG), aumenta os níveis locais de prostaglandinas (PGs) durante a resposta inflamatória aguda rica em neutrófilos (GRYGLEWSKI *et al.*, 1987). Além disso, o ácido elágico foi relatado por reduzir o estresse oxidativo induzido por outros tipos de lesões dérmicas, tais como as radiações UVA (HSEU *et al.*, 2012) e isoproterenol (KANNAN e QUINE, 2011).

Com isso, é possível sugerir que o estresse oxidativo foi mitigado nas feridas cobertas com membranas de gelatina contendo extrato aquoso da casca do fruto de *Punica granatum* (GELPG).

Evidenciou-se nesse estudo que o teor de neutrófilos foi reduzido no primeiro tempo da experiência (fase inflamatória). Tais descobertas podem também estar relacionadas com os efeitos biológicos promovidos pelos compostos químicos do EAPG. Neste sentido, reduções significativas da atividade da mieloperoxidase (MPO), um marcador bem estabelecido de infiltração de neutrófilos, foram recentemente relatadas em tecidos gastrointestinais danificados, em resposta ao

tratamento com o ácido elágico (EL-BOGHDADY, 2011) e ácido gálico (CHATTERJEE *et al.*, 2012). Por conseguinte, o controle do teor de neutrófilos na fase inflamatória, e consequente minimização do estresse oxidativo, pelo elevado teor de ácido elágico e gálico presentes no EAPG pode ser um instrumento para o tratamento de feridas dérmicas, observada neste estudo.

Nesse estudo foi demonstrado que a resposta inflamatória observada nos cortes histológicos das feridas cobertas com wGELPG foi significativamente reduzida. Estes dados são o resultado provável dos efeitos anti-inflamatórios exercidos pelo EAPG derivado da casca do fruto da *Punica granatum* L. (LEE *et al.*, 2010; KUMAR *et al.*, 2011). Além disso, estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram uma alta atividade anti-inflamatória exercida pelos principais compostos químicos do extrato, como o ácido elágico (CORBETT *et al.*, 2010), ácido gálico (DENG e FANG, 2012) e punicalagina (LIN *et al.*, 1999).

5.3.3 Análise descritiva da resposta reparativa

Com base em parâmetros histológicos, o desenvolvimento de tecido de granulação foi melhorado com o uso de membranas de gelatina contendo EAPG incorporado. Além disso, estas membranas também induziram um arranjo mais regular e denso das fibras de colágeno, ao longo do tempo da experiência, o que sugere que este extrato também pode favorecer a proliferação de fibroblastos e a deposição de colágeno.

Em consonância com os resultados obtidos nessa pesquisa, o tratamento tópico com extrato aquoso de casca de *Punica granatum* foi previamente demonstrado, onde houve um aumento significativo de tecido de granulação, através do surgimento de crosta e da força de ruptura, bem como dos níveis de teor de hidroxiprolina, indicando taxas de aumento e estabilização das fibras de colágeno (ADIGA *et al.*, 2010). Além disso, dados histológicos semelhantes foram demonstrados utilizando extratos diferentes de *Punica granatum*, como etanólico (PIRBALOUTI *et al.*, 2010) e o extrato hidroalcoólico (HAYOUNI *et al.*, 2011).

A Fig. 30 apresenta os resultados da análise descritiva da resposta inflamatória desse estudo, onde estão representados o grupo controle (CTR), grupo com feridas tratadas com membranas de gelatina (wGEL) e grupo com feridas

tratadas com membranas de gelatina contendo extrato aquoso de *Punica granatum* (wGELPG) em escala horizontal e, em escala vertical, os tempos de cicatrização das lesões (3, 7, 14 e 21 dias), a partir da confecção da ferida cirúrgica.

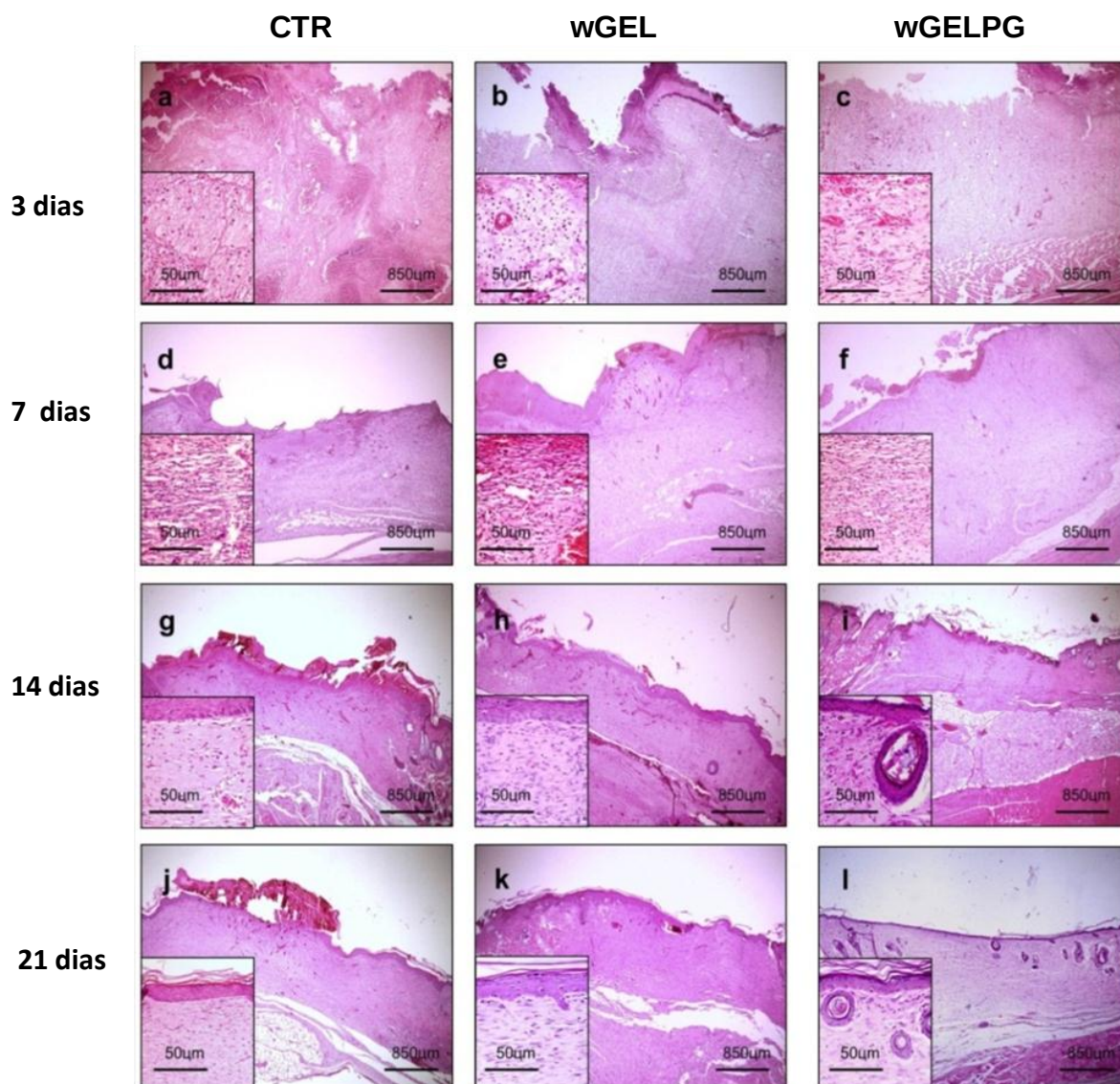


Figura 30: Secções histológicas dos grupos (áreas feridas), ao longo do tempo de cicatrização no ensaio biológico. (a/b) Resposta inflamatória intensa e edema são observados em CTR e wGEL. (c) Formação do tecido de granulação imaturo em wGELPG em menos de três dias. (c/d) Formação de tecido de granulação bem vascularizado é observada em CTR e wGEL. (e) tecido fibroso no wGELPG em menos de sete dias. (f/g/h) cicatriz fibrosa primária vista em todos os grupos de 14 dias. (h) Início de formação de folículo piloso em wGELPG. (j/k/l) Formação de tecido conjuntivo denso fibroso é visto em todos os grupos. (l) Múltiplos folículos pilosos são observados em wGELPG (HE, 40/400 x ampliação).

Em três dias, todos os grupos apresentam intensa infiltração inflamatória, com predomínio de neutrófilos e ocasionais macrófagos. CTR e wGEL exibiram pronunciado edema intersticial e escassa vascularização, constituída de vênulas periféricas apresentando marcante hiperemia passiva em toda extensão da ferida. Em wGELPG, contudo, observou-se intensa reação de granulação, representada por proliferação fibroblástica, neoformação vâsculo-capilar e discreta deposição de estruturas fibrilares eosinofílicas interpretadas como colágeno imaturo na profundidade da ferida.

Em sete dias, apesar de todos os grupos apresentarem reação de granulação preenchendo toda a área da ferida, esta era marcadamente mais celular (fibroblástica), menos vascular e mais colagenizada em wGELPG que os demais grupos. Em 14 dias, observou-se formação de cicatriz colagênica primária em todos os grupos, embora estes tenham exibido reação inflamatória residual. Por outro lado, wGELPG exibiu formação de brotamentos de estruturas derivadas da epiderme compatíveis com rudimentos de anexos cutâneos (folículos pilosos e glândulas sebáceas). Em 21 dias, apenas em wGELPG evidenciou-se maturação epidérmica avançada, com ortoqueratinização abundante, camada granulosa espessa e bem marcada e formação frequente de anexos cutâneos, em contraposição ao epitélio escamoso atrófico e hipoqueratinizado visto nos demais grupos.

A *Punica granatum* também tem sido aplicada topicamente na forma de extrato etanólico em feridas dérmicas, que demonstrou aceleração do processo cicatricial por segunda intenção em modelo roedor, modulando o processo inflamatório, de reepitelização e colagenização da ferida (PIRBALOUTI *et al.*, 2010).

O processo de reparo compreende uma série de fenômenos bioquímicos, hormonais e celulares que culminam com o preenchimento da área lesada por fibrose. Aproximadamente 24 h após o início da injúria surgem células leucocitárias importantes no processo inicial de reparo (DANTAS *et al.*, 2007).

Assim, no terceiro dia, pode-se observar a invasão do tecido de granulação no espaço tecidual. Próximo ao quinto dia do processo observa-se tecido de granulação vascular. A resposta inflamatória aguda nas margens da ferida começa a ceder com redução do edema e do rubor nos tecidos afetados e deposição progressiva de colágeno. No sétimo dia após a ocorrência da lesão, observa-se

10% da resistência tensional da pele normal. Em torno do décimo dia observa-se a proliferação de fibroblastos e deposição de colágeno no tecido de granulação, iniciando a epitelização (STEVENS e LOWE, 2002).

No décimo quarto dia do processo de cicatrização já existe alterações histomorfológicas suficientes para serem observadas, avaliadas e quantificadas para categorizar o processo de reparo (ALBUQUERQUE-JÚNIOR, *et al.*, 2009).

O reparo tissular envolve a interação entre células estromais e circulatórias, ativadas por mediadores químicos diversificados, fragmentos de células e matriz extracelular, microrganismos e alterações físico-químicas no ambiente da ferida e áreas adjacentes (BALBINO *et al.*, 2005).

5.3.4 Análise descritiva da deposição colagênica

A análise descritiva da deposição colagênica, Fig. 31, apresenta os resultados do grupo controle (CTR), grupo de feridas cobertas com membranas de gelatina (wGEL) e grupo de feridas cobertas com membranas de gelatina com extrato aquoso de *Punica granatum* (wGELPG) em escala horizontal e, em escala vertical, os tempos de cicatrização das feridas (3, 7, 14 e 21 dias), a partir da confecção da ferida cirúrgica.

Em três dias (Fig. 31 a/b/c), foi observada uma escassa e delicada rede de fibrilas com birrefringência esverdeada, compatível com colágeno tipo III, em todos os grupos analisados. Em wGEL e wGELPG, algumas secções histológicas mostraram a presença de uma delgada camada de fibras paralelamente dispostas, com birrefringência dourada (colágeno I) na superfície da ferida, interpretada como remanescentes das biomembranas. Também deve ser destacado que o grupo wGELPG pareceu exibir espaços interfibrilares menos conspícuos e menores que os demais grupos, sugerindo maior adensamento da malha de colágeno III.

Em sete dias (Fig. 31 e/f), o padrão morfológico de organização arquitetural do colágeno depositado ainda se mostrou predominantemente reticular (em malha), embora uma marcante redução dos espaços interfibrilares e aumento na espessura das fibrilas tenham sido observados em todos os grupos. Também foi evidenciado um processo de substituição parcial das fibrilas delicadas de colágeno III por fibras mais espessas de colágeno I. De especial interesse foi a identificação de uma

disposição claramente mais densa deste componente fibroso em wGELPG em relação aos demais grupos.

Em catorze dias (Fig. 31 h/i), apenas CTR manteve uma estrutura morfológica desorganizada e ainda levemente reticular, enquanto que wGEL e wGELPG exibiram feixes de colágeno tipo I mais espessos e paralelamente distribuídos, em relação à superfície da ferida. Em wGELPG, contudo, a densidade de deposição fibrosa se apresentou menos expressiva, e mostrou maior espaçamento entre os feixes fibrosos.

Em 21 dias (Fig. 31 j/k/l), todos os grupos exibiram franca deposição de feixes espessos e grosseiros de fibras colágenas, dispostos entrelaçadamente, em toda a extensão da área cicatricial. Vale ser ressaltado que em wGELPG, a despeito da semelhança na organização arquitetural dos feixes fibrosos, a densidade de deposição fibrosa pareceu menos expressiva que em CTR e wGEL.

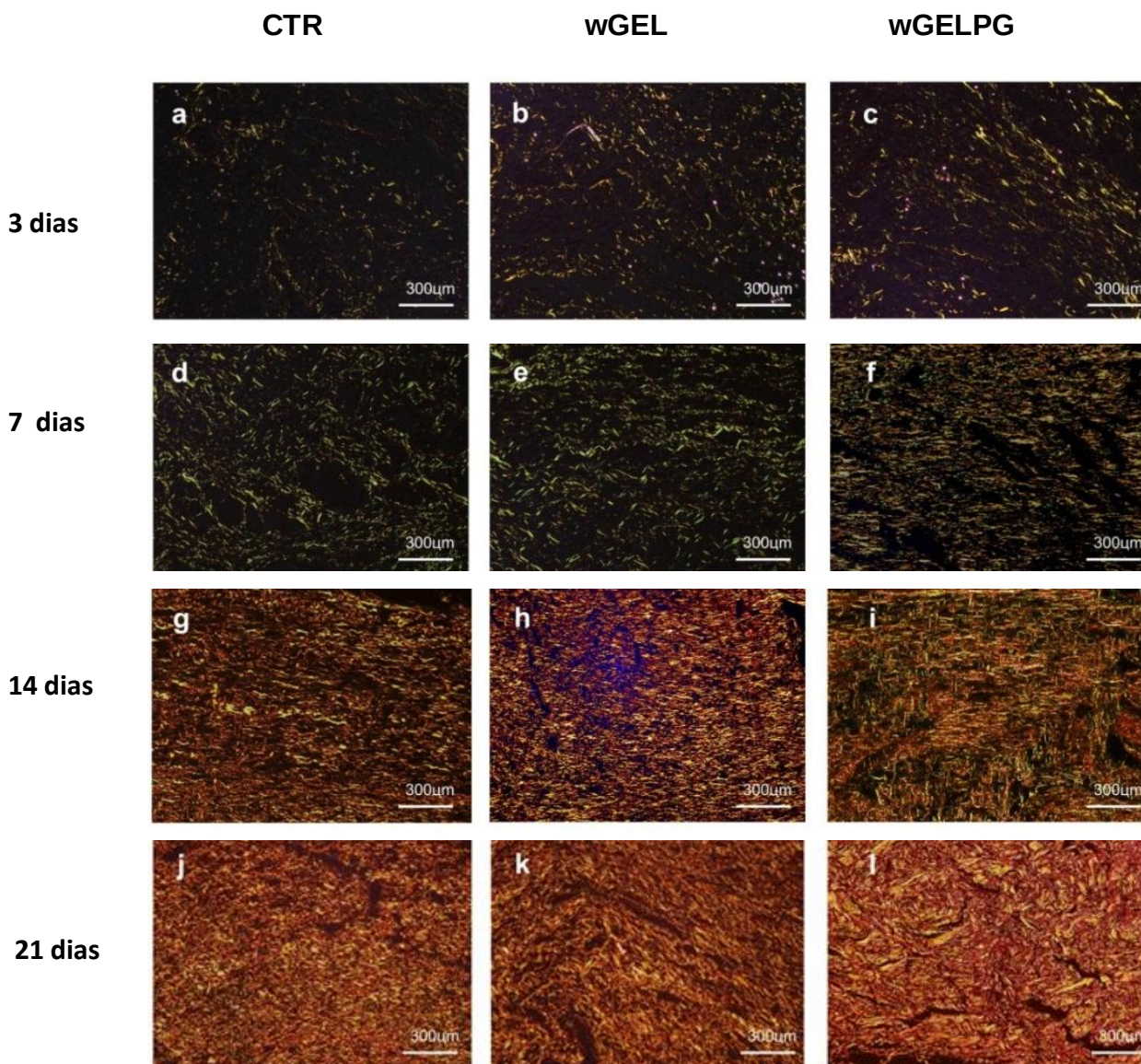


Figura 31: Secções histológicas dos grupos (áreas feridas), ao longo do tempo de cicatrização no ensaio biológico. Em três dias, a deposição de gelatina tipo III, escassa, esverdeada é observada em CTR (a), wGEL (b) e wGELPG (c). Aos sete dias, fibras reticulares de gelatina do tipo III são evidenciadas nos CTR (d) e GEL (e) e, em paralelo colágeno do tipo I é visto em wGELPG (f). Aos 14 dias, fibras de gelatina tipo I, densamente dispostas paralelamente, são observadas no CTR (g) e wGEL(h), enquanto que em wGELPG (i), as fibras mostraram um ligeiro arranjo entrelaçado. Aos 21 dias, fibras de gelatina tipo I, entrelaçadas, são vistas em todos os grupos, mas foram menos compactados em CTR (j) e do wGEL (k) do que em wGELPG (l) (Sirius Red/luz polarizada, ampliação de 400x).

O estímulo à atividade fibroblástica poderia determinar um aumento da deposição de fibras no início do reparo e aceleração da remodelação no final, justificando o motivo de menor densidade nessa etapa. Assim a indução de uma

remodelação mais precoce levaria à maior degradação de fibras e formação de um colágeno funcional mais organizado e menos denso, minimizando esse risco de cicatriz hipertrófica. A análise morfológica em HE parece suportar esta teoria, já que a reação de granulação se mostrou mais fibroblástica em wGELPG.

Os fibroblastos são indispensáveis para ocorrer a re-epitelização. Eles proliferam e migram para o local da ferida e auxiliam na formação de tecido de granulação vascular, resistente, que protege a ferida sintetizando nova matriz extracelular. Queratinócitos migram para haver a remodelação. Essa migração de fibroblastos gera uma tensão na ferida e, se diferenciam em miofibroblastos, auxiliando na contração da ferida. O desenvolvimento de tecido de granulação exarcebado pode impedir ou retardar o processo de epitelização e contração da ferida, conseqüentemente atrasando a cicatrização de feridas e desenvolvendo as cicatrizes hipertróficas (ROSE, 2012).

Kawamoto *et al.* (2007) discorre que no leito de uma ferida, a organização de fibras de colágeno é componente fundamental no processo de contração e reparo da ferida, determinando em última instância a qualidade final da cicatriz.

Hayouni *et al.* (2011), em estudo experimental *in vivo* notaram que em 4 dias houve um aumento do infiltrado celular em animais tratados topicamente com extrato de *Punica granatum*, período em que não foi observado regeneração epidérmica. Os autores relatam que no 12º dia houve uma organização tecidual avançada, em que se observou tecido de granulação e epitelização em curso nos grupos tratados com pomada de *Punica granatum*, quando comparados com o controle. Em exame histológico, a regeneração do tecido foi mais rápida na pele da ferida tratada com pomada ou extrato, sem aparência evidente de qualquer edema, congestão tecidual ou sinais inflamatórios. Aos 20 dias, os grupos experimentais apresentavam-se com feridas de espessuras completas, caracterizando regeneração epidérmica que cobriu completamente a área da ferida. A epiderme era grossa e desorganizada, quando comparada com a pele normal adjacente. A camada de queratina era grossa. Adicionalmente, a derme foi celularizada com fibroblastos que estabeleceram as fibras de gelatina desorganizadas e mal orientadas. Havendo a presença de vasos sanguíneos e presença dispersa de células inflamatórias, consistindo de mais macrófagos do que neutrófilos.

Considerando a relevância do tecido de granulação e do padrão de colagenização para o sucesso da cicatrização de feridas em modelos experimentais (DIEGELMANN e EVANS, 2004), é possível sugerir que o EAGP favoreceu o desenvolvimento destes eventos-chaves da reparação cicatricial. Não obstante, como se apresentou provas de que o EAPG pode afetar a dinâmica fibroblástica é importante salientar que nenhum sinal clínico ou morfológico da superprodução de colágeno foi observado, o que resultaria na formação de cicatriz hipertrófica, quer por análise macroscópica ou microscópica.

Esta característica parece ser positiva para o processo de cicatrização, uma vez que, a estimulação em longo prazo das células fibroblásticas pode levar à formação de cicatriz hipertrófica (RIELLA *et al.*, 2012).

A reepitelização precoce da superfície de feridas e o desenvolvimento de apêndices cutâneos foram observados nas feridas cobertas com membranas contendo EAPG. Estas descobertas sugerem que os compostos químicos possuem um papel importante na proliferação de queratinócitos, bem como a diferenciação de tais células epidérmicas em apêndices cutâneos. Apoiando nossos resultados, ácidos tânico foram anteriormente testados na indução da proliferação de queratinócitos *in vitro* (FELICIANI *et al.*, 2007).

Portanto, é possível sugerir que as membranas GELPG melhoraram a maturação e diferenciação de queratinócitos, acelerando a recuperação do tecido epidérmico e restauração dos apêndices cutâneos. Além disso, Já foi demonstrado que o aumento regular da atividade da heme-oxigenase 1 (HO-1), uma enzima cuja alta atividade está estreitamente relacionada com o efeito antioxidante de diferentes compostos químicos, é capaz de induzir a proliferação de queratinócitos (CLARK *et al.*, 1997). Assim, a melhoria da epitelização precoce e da formação de apêndices cutâneos, também podem estar relacionadas com os efeitos antioxidantes do EAPG.

Deste modo, os efeitos terapêuticos da casca do fruto de *Punica granatum* Linn (romã) em práticas de medicina popular podem estar relacionados com a presença de taninos, como o ácido gálico, ácido elágico e punicalaginas α e β , componentes majoritários encontrados no extrato aquoso.

Com isso, sugere-se que, a incorporação de extrato aquoso em membranas de gelatina pode ser um tratamento promissor para minimizar o período de cicatrização de feridas dérmicas, sendo necessários novos estudos com a incorporação desses compostos tânicos isolados em membranas de gelatina para posterior avaliação *in vivo*.

6 CONCLUSÕES

Com base na avaliação dos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- Por meio do processo de extração houve rendimento satisfatório dos três extratos obtidos, sendo o extrato aquoso aquele que apresentou maior rendimento em percentual.
- Os componentes majoritários encontrados no extrato aquoso da casca do fruto de *Punica granatum* Linn foram ácido gálico, punicalagina α , punicalagina β e ácido elágico.
- O extrato de melhor rendimento (aquoso) da casca do fruto de *Punica granatum* Linn exibiu elevada atividade antioxidante.
- As membranas de gelatina contendo extrato aquoso da casca do fruto de *Punica granatum* aceleraram o processo de reparo cicatricial de feridas abertas por segunda intenção em modelo murino, expressas pela modulação da resposta inflamatória, pela estimulação da contração da ferida, e pelo aprimoramento da deposição de colágeno durante a formação da cicatriz fibrosa.

7 REFERÊNCIAS

1. ADIGA, S.; TRIVEDI, P.; RAVICHANDRA, V.; DEB, D.; MEHTA, F. Effect of *Punica granatum* peel extract on learning and memory in rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**. v. 3, n. 9, p. 687-690, 2010.
2. AFAQ, F. et al. Novel agents and targets for skin cancer chemoprevention: studies with pomegranate fruit extract. **Journal of Investigative Dermatology**, v.121, n.1, p.140, 2003.
3. AJAIKUMAR, K.; ASHEEF, M.; BABU, B.; PADIKKALA, J. The inhibition of gastric mucosal injury by *Punica granatum*, L. (pomegranate) methanolic extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, n. 1-2, p. 171-176, 2005.
4. ALAM, M.S. et al. Protective effects of *Punica granatum* in experimentally-induced gastric ulcers. **Toxology Mechanisms and Methods**, v.20, n.9, p.572-578, nov, 2010.
5. ALBUQUERQUE JUNIOR, R.L.C.; BARRETO, A.L.S.; PIRES, J.A.; REIS, F.P.; LIMA, S. O.; RIBEIRO, M.A.G.; CARDOSO, J.C. Effect of bovine type-I collagen-based films containing red propolis on dermal wound healing in rodent model. **International Journal of Morphology**. v. 27, n. 4, p. 1105-1110, 2009.
6. ALBUQUERQUE, C.A. **Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de sistemas nanoscópicos bioativos**. Dissertação de mestrado em Ciências em materiais para engenharia. UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBA-Minas Gerais. 2008.
7. ALEMDAROĞLU, C.; DEĞİM, Z.; ÇELEBI, N.; ZOR, F.; ÖZTÜRK, S.; ERDOĞAN, D. An investigation on burn wound healing in rats with chitosan

- gel formulation containing epidermal growth factor. **Burns**. v. 32, n. 3, p. 319-327, 2006.
8. AL-MUAMMAR, M. N.; KHAN F. Obesity: The preventive role of the pomegranate (*Punica granatum*). **Nutrition**. v. 28, n. 6, p. 595–604, 2012.
 9. ALTIOK, E.; TIHMINLIOGLU, F. Physical, antibacterial and antioxidant properties of chitosan films incorporated with thyme oil for potential wound healing applications. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**. v. 21, n. 7, p. 2227-2236, 2010.
 10. AL-ZORECKY, N. S.; AL-MUAMMAR, KHAN. Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels. **International Journal of Food Microbiology**. v. 134, n. 3, p. 244-248. 2009.
 11. AMAKURA, Y., OKADA, M., TSUJI, S., TONOGAI, Y. High-performance liquid chromatographic determination with photodiode array detection of ellagic acid in fresh and processed fruits. **Journal of Chromatography A**. v. 896, 87–93. 2000b.
 12. AMORIN, P. C. **A Técnica de diafribólise percutânea no tratamento de aderências e cicatrizes**. Monografia. Bacharelado em Fisioterapia – Graduação – Universidade Severino Sombra, Vassouras/RJ. 2005.
 13. ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutation Research**, Amsterdam, v.350, n.1, p.103-108, 1996.
 14. AQIL F.; MUNAGALA, R.; VADHANAM, M.V.; KAUSAR, H.; JEYAPRAKASH JEYABALAN, J.; SCHULTZ, D. J.; GUPTA, R. C. Anti-proliferative activity and protection against oxidative DNA damage by punicalagin isolated from pomegranate husk. **Food Research International**. v. 49, n. 1, p. 345-353, 2012.

15. ARAUJO, A. K.L. **Aspectos morfológicos do processo de cicatrização induzido por *Ouratea sp.*** Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – Mestrado – Universidade Estadual da Ceará, Fortaleza/CE, 2010.
16. ARNOLD, G. T.; BENDASSOLLI, J. A. Implantação de um programa de gerenciamento de resíduos químicos e águas servidas nos laboratórios de ensino e pesquisa no CENA/USP. **Química Nova**, Vol. 28, No. 4, 732-738, 2005.
17. ARORA, A., MURALEEDHARAN, G.N., STRASBURG, G.M. Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v.24,n.9, p.1355-1363, 1998.
18. ASSIS, O. B. G. & ALBERTINI, L. L. Water Sorption of Chitosan films: Preliminary Study for Protective Coatings on Sliced FruitsII, in: **Proceedings of the 4th ISNAPOL (Natural Polymers and Composites IV)**. p 390, 2009.
19. ASSIS, O. B. G. Alteração do caráter hidrofílico de filmes de quitosana por tratamento de plasma de HMDS. **Química Nova**. v. 33, n. 3, p. 603-606, 2010.
20. BADYLAK, S.; LIANG, A.; RECORD, R.; TULLIUS, R.; HODDE, J. Endothelial cell adherence to small intestinal submucosa: an acellular bioscaffold. **Biomaterials**. v. 20, n. 23-24, p. 2257-2263, 1999.
21. BAGRI, P.; ALI, M.; AERI, V.; SULTANA, S.; BHOWMIK, M. Evalution of anti-inflammatory and analgesic activity of *Punica granatum* Linn. **International Journal of Drug Development & Research**. v. 2, n. 4, p. 698-702. 2010.

22. BALBINO, C.A.; PEREIRA, L.M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 41, n. 3, p. 27-51, 2005.
23. BALLABH, B. *et al.* Traditional medicinal plants of cold desert Ladakh-used against kidney and urinary disorders. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 118, n.2, p.331-339, jul, 2008.
24. BARRETO A. L. S. **Estudo histomorfológico do efeito de membranas de colágeno contendo própolis vermelha sobre o processo de reparo cicatricial por segunda intenção em ratos**. Dissertação de Mestrado – Universidade Tiradentes, Aracaju/SE. 2008.
25. BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L.M.G. Free radicals and the main dietary antioxidants. *Rev. Nutr.*, Campinas, 12(2): 123-130, 1999.
26. BLANES, L., **Tratamento de feridas e cirurgia vascular: guia ilustrado**. São Paulo: BAPTISTA-SILVA, J. C. C. editor [online]; 2004. Disponível em: <<http://www.baptista.com>>. Acesso em 15 de out de 2012.
27. BODINI, R. B. **Desenvolvimento de materiais poliméricos bioativos à base de gelatina e própolis**. Dissertação. Universidade de São Paulo. 2011.
28. BRASIL. Resolução Específica RE n. 899, de 29 de maio de 2003. Dispõe sobre o Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União. Brasília, 02 de junho de 2003j**. [citado em 5 jul 2010]. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm, Acesso em 18 de outubro de 2012.
29. BRASIL. Lei n. 12.305, de 2 de agosto de 2010. Institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos; altera a Lei n. 9.605, de 12 de fevereiro de 1998; e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**.

Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2010/lei/l12305.htm>. Acesso em 12 de setembro de 2012.

30. BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer (INCA). **Tratamento e controle de Feridas tumorais e úlceras por Pressão no câncer avançado**. 2009.
31. BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**. v.33, n.1, p.229-239, 2010.
32. CARDOSO, J. C. **Desenvolvimento de gel a partir de colágeno modificado para liberação prolongada de fármacos**, Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Ribeirão Preto, Brasil, 2005.
33. CARLUCCI, V. D. S.; ROSSI, L. A.; FICHER, A. M. F. T.; FERREIRA, E.; CARVALHO, E. C. A experiência da queimadura na perspectiva do paciente. **Revista Escola Enfermagem – USP**, v. 41, n. 1, p. 21-8, 2007.
34. CASABURI, P. R. **Elaboração e avaliação do conteúdo educacional para educação a distância sobre úlceras por pressão**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de São Carlos, 2009.
35. CASTEJON, F. V. **Seminários aplicados: Taninos e Saponinas**. Universidade Federal de Minas Gerais. Goiânia. 2011.
36. CELIK, I.; TEMUR, A.; ISIK, I. Hepatoprotective role and antioxidant capacity of pomegranate (*Punica granatum*) flowers infusion against trichloroacetic acid-exposed in rats. **Food and Chemical Toxicology**. v. 47, n. 1, p. 145-149, 2009.
37. CHATTERJEE, A., CHATTERJEE, S., BISWAS, A., BHATTACHARYA, S., CHATTOPADHYAY, S., BANDYOPADHYAY, S.K. Gallic Acid Enriched

- Fraction of *Phyllanthus emblica* Potentiates Indomethacin-Induced Gastric Ulcer Healing via e-NOS-Dependent Pathway. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Article ID 487380, 1-13. 2012.
38. CLARK, J.E., GREEN, C.J., MOTTERLIN, R. Involvement of the Heme Oxygenase–Carbon Monoxide Pathway in Keratinocyte Proliferation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 251, 215-220. 1997.
39. CORBETT, S., DANIEL, J., DRAYTON, R., FIELD, M., STEINHARDT, R., GARRETT, N. Evaluation of the anti-inflammatory effects of ellagic acid. **Journal of Perianesthesia Nursing**. 25, 214-220. 2010.
40. COELHO, J. M.; ANTONIOLLI, A. B.; NUNES E SILVA, D.; CARVALHO, T. M. M. B.; PONTES, E. R. J. C.; ODASHIRO, A. N. Effects of silver sulfadiazine, ipê roxo (*Tabebuia avellanedae*) extract and barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) extract on cutaneous wound healing in rats. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**. v. 37, n. 1, p. 45-51, 2010.
41. CORRÊA, S. J. P. **Utilização de membranas a base de pectina contendo extrato de própolis vermelha para recobrimento de sementes de girassol**. Dissertação de Mestrado. Universidade Tiradentes. Aracaju-Sergipe: 2011.
42. CROSS, D. A.; ALESSI, D. R.; COHEN, P.; ANDJELKOVICH, M.; HEMMINGS, B. A. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. **Nature**. v. 378, n. 6559, p. 785-789, 1995.
43. CRUVINEL, W. M.; MESQUITA JÚNIOR, D.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S.; SILVA, N. P.; ANDRADE, L. E. C. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**. v.50, n. 4, p. 434-447, 2010.

44. CUNHA, N. A. Sistematização da assistência de enfermagem no tratamento de feridas crônicas. Disponível em: <http://www.abenpe.com.br/diversos/sae_tfc.pdf> Acesso em 10 de outubro de 2012. Olinda /PE, 2006.
45. CUQ, B.; GONTARD, N.; GUILBERT, S. Thermal properties of fish myofibrillar protein-based films as affected by moisture content. **Polymer**. v. 38, nº 10, p. 2399-2405, 1997.
46. CURRÒ, S.; CARUSO, M.; DISTEFANO, G.; GENTILE, A.; LA MALFA, S. New microsatellite loci for pomegranate, *Punica granatum* (Lythraceae). **American Journal of Botany**. v. 97, n. 7, p. 58-60, 2010.
47. DANTAS FILHO, A. M.; AGUIAR, J. L. A.; ROCHA, L. R. M.; AZEVEDO, I. M.; RAMALHO, E.; MEDEIROS, A. C. Effects of the basic fibroblast growth factor and its anti-factor in the healing and collagen maturation of infected skin wound. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v.22, n. 1, p. 64-71, 2007.
48. DANTAS, S. R. P. E.; JORGE, S. A. **Feridas e Estomas**. 1ed. São Paulo. 2005.
49. DEGÁSPARI, C.H.; DUTRA, A. P. C. Propriedades Fitoterápicas da Romã (*Punica granatum* L.). **Visão Acadêmica**, Curitiba, v.12, n.1, 2011.
50. DESMOULIERE, A.; CHAPONNIER, C.; GABBIANI, G. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. **Wound Repair and Regeneration**. v. 13, n. 1, p. 7-1, 2005.
51. DI STASI, L. C. **Plantas Medicinais Arte e Ciências. Um Guia de Estudo Interdisciplinar**. São Paulo: Editora. Universidade Estadual Paulista, p. 129-156. 2007.

52. DIAS, A. B.; MÜLLER, C. M. O.; LAROTONDA, F. D. S.; LAURINDO, J. B. Biodegradable films based on rice starch and rice flour. **Journal of Cereal Science**. v. 51, n. 2, p. 213–219, 2010.
53. DENG, H., FANG, Y. Anti-inflammatory gallic Acid and wedelolactone are G protein-coupled receptor-35 agonists. **Pharmacology**. 89, 211-219. 2012.
54. DIEGELMANN, R. F.; EVANS, C. M. Wound healing an overview of acute, fibrotic and delayed healing. **Frontiers in Bioscience**. v. 9, n. 1, p. 283-89, 2004.
55. EL-BOGHDADY, N.A. Protective effect of ellagic acid and pumpkin seed oil against methotrexate-induced small intestine damage in rats. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**. V. 48, 380-387. 2011.
56. EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Romã será alvo de pesquisa para produção de ingredientes antioxidantes**. 2011. Disponível em: <<http://www.embrapa.br/imprensa/imprensa/noticias>>. Acesso em 12 de novembro de 2012.
57. ESTAKHR, J., JAVDAN, A. Evaluation of Wound Healing Activity of *Salvia Hypoleuca* Extract on Rats. **Pharmacology**. 3, 622-625. 2011.
58. FELICIANI, C., RUOCCO, E., ZAMPETTI, A., TOTO, P., AMERIO, P., TULLI, A., AMERIO, P., RUOCCO, V. Tannic acid induces in vitro acantholysis of keratinocytes via IL-1alpha and TNF-alpha. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**. 20, 289-299. 2007.
59. FALLER A. L. K.; FIALHO E. Disponibilidade de polifenóis em frutas e hortaliças consumidas no Brasil. **Revista de Saúde Pública da USP**. v. 43, n. 2, p. 211-218 2009.

60. FERREIRA, V. L. P. Colorimetria em alimentos. **Instituto de Tecnologia de Alimentos. Campinas.** 43 p. 1991.
61. FIORILLO, CELSO A. P. **Curso de Direito Ambiental Brasileiro.** 10 ed. São Paulo. Saraiva, 2009.
62. FRANCIS, J. F. AND F. M. CLYDESDALE. Food colorimetry: Theory and application. **The AUI Publishing Co. Inc.,** 477 p. 1975.
63. FRANCO, D.; GONCALVES, L. F. Feridas cutâneas: a escolha do curativo adequado. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões.** v. 35, n. 3, p. 203-206, 2008.
64. GABAS, V. G. S.; CAVALCANTI, O. A. Influência da adição da goma arábica em membranas isoladas de polímero acrílico. Estudo das propriedades de intumescimento e de permeabilidade. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.** v. 39, n. 4, p. 442-448, 2003.
65. GANTWERKER, E. A.; HOM. D. B. Skin: Histology and Physiology of Wound Healing. **Clinics in Plastic Surgery.** v. 39, n. 1, p. 85-97, 2012.
66. GHORPADE, V. M., A. GENNADIOS, M. A. HANNA AND C. L. WELLER. Soy protein isolate (poly (ethyleneoxide)) films. **Cereal Chemistry,** 72(6):559-563. 1995.
67. GIL, M. I.; TOMAS-BARBERAN, F. A.; HESSPIERCE, B.; HOLCROFT, D. M., KADER, A. A. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with Agric. Food Chem. 48, 4581–4589. phenolic. composition and processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** v. 48, n. 10, p. 4581–4589, 2000.

68. GILL, N. S.; DHAWAN, S.; JAIN, S.; ARORA, R.; BALI, M. Antioxidant and Anti Ulcerogenic Activity of Wild *Punica granatum* Ethanolic Seed Extract. **Journal of Medicinal Plants Research**. v. 6, n. 7, p. 47, 2012.
69. GIRARDI, R. C. G. **Comportamento de matrizes de colágeno utilizadas no tratamento de feridas planas induzidas em pele de rato**. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo - Universidade de São Carlos, São Paulo, Brasil, 2005.
70. GOBBO-NETO, L.; LOPES N. P. Plantas Medicinais: Fatores de Influência no Conteúdo de Metabólitos Secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.
71. GOISSIS, A. P. A. **Análise Estrutural do Colágeno tipo I. correlação estrutural: atividade biológica**. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo-USP. São Carlos. 2008.
72. GOMES, E. M. R. **Atividade antioxidante e polifenóis totais do fruto de cagaita (*Eugenia dysenterica* DC) com e sem casca**. Dissertação, UFRJ, Rio de Janeiro. 2011.
73. GOMES, I. A. S.; OLIVEIRA, L. M.; IGNACIO, C.; FONSECA, C. B.; ANDRADE, H. A. Preparação de polímeros com propriedade de resposta a estímulo externo a base poli N isopropilacrilamida para aplicações em Engenharia de tecidos. In: **IX semana de iniciação científica, Unileste** - Minas Gerais. 2008.
74. GOMES, P. **Fruticultura Brasileira**. Editora Nobel, 13^a Ed, 446p. 2007.
75. GÓMEZ-GUILLÉN M. C.; GIMÉNEZ B.; LÓPEZ-CABALLERO M. E.; MONTERO M. P. Gelatin from alternative sources: A review. **Food Hydrocolloids**. v. 25, n. 1, p. 1813-1827, 2011.

76. GRYGLEWSKI, R.J., SZCZEKLIK, A., WANDZILAK, M. The effect of six prostaglandins, prostacyclin and iloprost on generation of superoxide anions by human polymorphonuclear leukocytes stimulated by zymosan or formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. **Biochemistry Pharmacology**. 36, 4209–4213, 1987.
77. GUILBERT, S.; BIQUET, B. Películas y envolturas comestibles. In: BUREAU, G. y MULTON, J. L. **Embalaje de los alimentos de gran consume**. Zaragoza (españa): ed. Acríbia s. a., cap.22, p. 331-371,1995.
78. HARVEY, M. I. Analysis of hydrolysable tannins. **Animal Feed Science and Technology**. v.91, p.3-20, 2001.
79. HASLAM, E.; LILLEY, T. H.; CAI, Y.; MARTIN, R.; MAGNOLATO, D. Traditional herbal medicines--the role of polyphenols. **Planta Medica**. v. 55, n. 1, p. 1-8, 1989.
80. HASNAOUI, N.; BUONAMICI, A.; SEBASTIANI, F.; MARS, M.; ZHANG, D.; VENDRAMIN, G. G. Molecular genetic diversity of *Punica granatum* L. (pomegranate) as revealed by microsatellite DNA markers (SSR). **Gene**. v. 493, n. 1, p. 105–112, 2012.
81. HAYOUNI, E. A.; MILED K.; BOUBAKER, S.; BELLASFAR, Z; ABEDRABBA M, IWASKI H, OKU H, MATSUI T, LIMAM F, HAMDY M. Hydroalcoholic extract based-ointment from *Punica granatum* L. peels with enhanced in vivo healing potential on dermal wounds. **Phytomedicine**. v. 18, n. 11, p. 976-984, 2011.
82. HEINO, M.; HUHTALA, J.; KAPYLA, J.; JOHNSON, M. S. A evolução dos sistemas de adesão a base de colágeno. **International Journal of Cell Biology and Biochemistry**. v.41, n. 1, p.341-348, 2009.

83. HENRIQUE, C.M.; CEREDA, M.P.; DUPUY, Y.N. Color, transparency and infra-red analysis of modified cassava starch films. **Agronomía Tropical**. 57(1): 25-30. 2007.
84. HENRIQUE, C. M.; CEREDA, M. P.; SARMENTO S. B. S. Características físicas de filmes biodegradáveis produzidos a partir de amidos modificados de mandioca. **Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 231-240, 2008.
85. HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS-FILHO, B. P. Screening of some plants used in the brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 97, n. 7, p.1027-1031, 2002.
86. HSEU, Y.C., CHOU, C.W., SENTHIL KUMAR, K.J., FU, K.T., WANG, H.M., HSU, L.S., KUO, Y.H., WU, C.R., CHEN, S.C., YANG, H.L.. Ellagic acid protects human keratinocyte (HaCaT) cells against UVA-induced oxidative stress and apoptosis through the upregulation of the HO-1 and Nrf-2 antioxidant genes. **Food and Chemical Toxicology**. 50, 1245-1255. 2012.
87. IGNACIO, C. **Desenvolvimento de curativos para cicatrização de feridas por segunda intenção baseados em biomateriais capazes de promoverem resposta celular controlada via estímulo externo**. [Tese de Doutorado]. Universidade Federal de Minas Gerais- Belo Horizonte. 2009.
88. IONESCU, C.; CHIRITA, M. Stress-strain properties of natural and biomimetically formed collagen constructs. **Technology and Health Care**. v. 16, n. 6, p. 437-444, 2008.
89. ISERI, S. O.; GEDIK, I. E.; ERZIK, C.; USLU, B.; ARBAK, S.; GEDIK, N.; YEGEN. B. C. Oxytocin ameliorates skin damage and oxidant gastric injury in rats with thermal trauma. **Burns**, v. 34, n. 3, p. 361-369, 2008.

90. ISMAIL, T.; SESTILI,P.; AKHTAR,S. Pomegranate peel and fruit extracts:Are view of potential anti-inflammatory and anti-infective effects. **Journal of Ethnopharmacology**. 2012.
91. JARDINI, F. A.; MANCINI FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidante em diferentes extratos da polpa e sementes da romã (*Punica granatum*, L.). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 43, n. 1, p. 137-147, 2007.
92. JUNQUEIRA, L.C. & Carneiro, J. **Histologia Básica**. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
93. KANNAN, M.M., QUINE, S.D., 2011. Ellagic acid ameliorates isoproterenol induced oxidative stress: Evidence from electrocardiological, biochemical and histological study. **European Journal of Pharmacology**. 659, 45-52.
94. KAPOOR, M., CLARKSON, A.N., SUTHERLAND, B.A., APPLETON, I., The role of antioxidants in models of inflammation: emphasis on L-arginine and arachidonic acid metabolism. **Inflammopharmacology**. v. 12, n. 5-6, p. 505–519, 2005.
95. KAUR, G., JABBAR, Z., ATHAR, M., ALAM, M.S. *Punica granatum* (pomegranate) flower extract possesses potent antioxidant activity and abrogates Fe-NTA induced hepatotoxicity in mice. **Food and Chemical Toxicology**. v. 44, n. 7, p. 984-993, 2006.
96. KAWAIA, K.; SUZUKIB, S.; TABATAC, Y.; NISHIMURA. Y. Accelerated wound healing through the incorporation of basic fibroblast growth factor impregnated gelatin microspheres into artificial dermis using a pressure-induced decubitus ulcer model in genetically diabetic mice, **British Journal of Plastic Surgery**, v.58, p.1115-1123, 2005.

97. KAMAMOTO, F. **Contração de feridas: revisão bibliográfica e estudo da contração geradaa por fibroblastos normais e de queloides** [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo, 124p., 2007,
98. KHALI, E.A.M. Antidiabetic effect of an aqueous extract of Pomegranate (*Punica granatum* L.) peels in normal and alloxan diabetic rats. **Journal of Hospital Medicine**. vol., 16 : 92 – 99. 2004.
99. KHANBABAEE, K.; VAN REE, T. Tannins: Classification and Definition. **Natural Product Reports**. v.18, n.6, p.641-649, 2001.
100. KISHORE, R. K.; SUDHAKAR, D.; PARTHASARATHY, P.R. Embryo protective effect of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit extract in adriamycin-induced oxidative stress.
101. KUMAR, G.J., KUMAR, S.S., VIMLESH, M., KANIKA, P. Evaluation of anti-nociceptive and anti-inflammatory activity of *Punica granatum* seed extract. **International Research Journal of Pharmacy**. 2, 235-237. 2011.
102. LAMANO. T. L.C. Patologia Geral. Inflamação. Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2008. LANSKY, E. P., NEWMAN R. A. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer Review. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 109, n. 2, p. 177–206, 2007.
103. LANSKY, E. P.; NEWMAN, R. A. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, p. 177-206, 2007.
104. LAWRENCE, T.; WILLOUGHBY, D. A.; GILROY, D. W. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. **Nature Reviews Immunology**. v. 2, p. 787-795, 2010.

105. LEE, C. H., SINGLA, A., LEE, Y. Biomedical application of collagen. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 221, n. 1-2, p. 21-22, 2001.
106. LEE, T. W. Y.; ROBINSON, J. R. **Remington's Pharmaceutical Sciences**, 20 ed., Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 933-960, 2004.
107. LEE, Y. J.; HWANG, S. M.; YOON, J. J.; LEE, S. M.; KYUNG, E. H.; KIM, J. S.; KANG, D. G.; LEE, H. S. Inhibitory Effect of Thuja orientalis on TNF- α -induced Vascular Inflammation. **Phytotherapy Research**. v. 24, n. 10, p. 1489–1495, 2010.
108. LIMA, V. P. Política Nacional de Resíduos Sólidos: uma Mudança de Paradigma. **Revista Síntese**. São Paulo. Ed. Síntese. 2012.
109. LIN, C.C., HSU, Y.F., LIN, T.C Effects of punicalagin and punicalin on carrageenan-induced inflammation in rats. **The American Journal of Chinese Medicine**. 27, 371-376. 1999.
110. LEKHA, P. K.; LONSANE, B. K. Production and application of tannin acyl hidrolase: state of the art. **Advances in Applied Biochemistry and Microbiology**. v. 44, p. 215-260, 1997.
111. LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas**, 2 ed., p. 350-351. São Paulo, 2008
112. MCHUGH, T. H., & KROCHTA, J. M. Sorbitol- vs. glycerol-plasticized whey protein edible films: Integrated oxygen permeability and tensile property evaluation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 42,841–845. 1994.
113. LIEBERMAN, E. R.; GILBERT, S. G. Gas permeation of collagen films as affected by cross-linkage, moisture, and plasticizer content. **Journal of Polymer Science: Polymer Symposia**. v. 41, n. 1, p. 33-43, 2007.

114. LORENZI, H.; SOUZA, H. M. **Plantas ornamentais no Brasil – arbustivas, herbáceas e trepadeiras**. 3.ed. Nova Odessa: Plantarum, 1088p. 2001.
115. MACHADO, T.B. *et al.* *in vitro* activity of Brazilian medicinal plants, naturally occurring naphthoquinones and their analogues, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 21, n. 3, p. 279-284, 2003.
116. MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M.H.S. Cicatrization: current concepts and auxiliary resources - Part II. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v.78, n. 5, p.525-542, 2003.
117. MARTINS, N.L.P.; MALAFAIA, O.; RIBAS-FILHO, J.M.; HEIBEL, M.; BALDEZ, R.N.; VASCONCELOS, P.R.L.; MOREIRA, H.; MAZZA, M.; NASSIF, P.A.N.; WALLBACH, Z.T. Análise comparativa da cicatrização da pele com o uso intraperitoneal de extrato aquoso de *Orbignya phalerata* (BABAÇU). Estudo controlado em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**. 21(3): 66-75, 2006.
118. MCHUGH, T. H., & KROCHTA, J. M. Sorbitol- vs. glycerol-plasticized whey protein edible films: Integrated oxygen permeability and tensile property evaluation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 42,841–845. 1994.
119. MELLO, J. C.P.; SANTOS, S. C. **Taninos**. In: SIMÕES, C.M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 3 ed. Porto Alegre: Ed.UFRGS/Ed.UFSC, 2001.
120. MENDONÇA, R. J., COUTINHO-NETTO, J. Cellular aspects of wound healing. **Anais da Academia Brasileira de Dermatologia**, v.84, n.3, p.257-62, 2009.
121. MENOITA, E., SANTOS, V., GOMES, C., SANTOS, A. Role of Biofilms in Chronic Wounds. **Journal of Aging & Innovation**, 1 (2): 33-42.2012.

122. MAIA FILHO, E. M.; MAIA, C. C. R.; BASTOS, A. C. S. C.; NOVAIS, T. M. G. Efeito antimicrobiano in vitro de diferentes medicações endodônticas e própolis sobre *Enterococcus faecalis*. **Revista Gaúcha de Odontologia**. v. 56, n.1, p. 21-25, 2008.
123. MARTINS-DA-SILVA, R.C.V. Identificação de Espécimes Botânicos. **EMBRAPA Amazônia Oriental**. C.P.: 48. Belém-PA (s/d).
124. MELO, M. G. D.; ARAUJO, A. A. S.; SERAFINI, M. R.; CARVALHO, L. F.; BEZERRA, M. S.; RAMOS, C. S.; BONJARDIM, L. R.; ALBUQUERQUE-JUNIOR, R. L. C.; LIMA, J. T.; SIQUEIRA, R. S.; FORTES, V. S.; FONSECA, M. J. V.; QUINTANS-JUNIOR, L. J. Anti-inflammatory and toxicity studies of atranorin extracted from *Cladonia kalbii* Ahti in rodents. **Brazilian Journal Pharmacology**. v. 47, n. 4, p. 871-872, 2011.
125. MELO, S. P.; ALBUQUERQUE-JR, R. L. C.; PADILHA, F. F.; SANTANA, R. F.; BATISTA, C. M.; PINHEIRO, M. S.; LIMA, A. S.; NUNES, P. S.; COSTA, L. P.; ARAUJO, A. A. S.; CARDOSO, J. C. Thermal characterization of mangaba-based films. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. v. 111, n. 3, p. 2097-2102, 2012.
126. MENDONÇA, R. J.; NETTO, J. C. Aspectos celulares da cicatrização. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v. 84, n. 3, p. 257-262, 2009.
127. MENEZES, H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **Arquivos do Instituto Biológico**. v. 72, n. 3, p. 405-411, 2008.
128. MIGUEL, M. G.; NEVES, M. A.; ANTUNES, M. D. Pomegranate (*Punica granatum* L.): A medicinal plant with myriad biological properties - A short review. **Journal of Medicinal Plants Research**. v. 4, n. 25, p. 2836-2847, 2010.

129. MIYAZAKI, H.; KINOSHITA, M.; SAITO, A.; FUJIE, T.; KABATA, K.; HARA, E.; ONO, S.; TAKEOKA, S.; SAITOH, D. An ultrathin poly (L-lactic acid) nanosheet as a burn wound dressing for protection against bacterial infection. **Wound Repair and Regeneration**, v. 20, p. 573–579, 2012.
130. MOHAN, M.; WAGHULDER, H; KASTURE, S. Effect of pomegranate juice on Angiotensin II-induced hypertension in diabetic Wistar rats. **Phytotherapy Research**, v. 24, supl. 2, p. 196-203, jun, 2010.
131. MONACO, J.L.; LAWRENCE, W.T. Acute wound Ealing An overview. **Clinics in Plastic Surgery**. v. 30, p. 1-12, 2003.
132. MONTEIRO, T. C.; SILVA, M. B. O.; DIFANTE, J. A Lei da Nova Política Nacional dos Resíduos Sólidos face ao sistema de coleta seletiva do Município de Santa Maria. **Revista Eletrônica do Curso de Direito – UFSM**. v. 8. 2013.
133. MUZZARELLI, R. A. A. Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone. **Carbohydrate Polymers**. v. 76, p. 167-182, 2009.
134. MYLLYHARJU J.; KIVIRIKKO K. I. Colagenos, que altera as enzimas e as suas mutações nos seres humanos, moscas e vermes. **Tendências Genéticas**. v 20, p.33–43, 2004.
135. NAKAMURA, Y.; TSUJI, S.; TONOGAI, Y. Method for analysis of tannic acid and its metabolites in biological samples: Application to tannic acid metabolism in the rat. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.51, n.1, p.331-339, 2003.
136. NEEL, E. A. A.; BOZEC, L.; KNOWLES, L. C.; SYED, O., MUDERA, V.; DAY, R.; HYUN, J. K. Collagen - Emerging collagen based therapies hit the patient. **Advanced Drug Delivery Reviews**. Article in press, 2012.

137. NITZ, A.; BINS. C. J.; D'ACAMPORA, A. J.; TAMES, D. R.; CORRÊA, B. P. Estudo morfométrico no processo de cicatrização de feridas cutâneas em ratos, usando: *Coronopu didymus* e *Calendula officinali*. **Arquivos Catarinenses de Medicina**. v. 35, n. 4, p. 74-79, 2006.
138. NOROUZI, M.; TALEBI, M.; SAYED-TABATABAEI, B-E.; Chloroplast microsatellite diversity and population genetic structure of Iranian pomegranate (*Punica granatum* L.) genotypes. **Scientia Horticulturae**. v. 137, p. 114 –120, 2012.
139. NUNES, P. S.; ALBUQUERQUE-JR, R. L. C.; CAVALCANTE, D. R.; DANTAS, M. D.; CARDOSO, J. C.; BEZERRA, M. S.; SOUZA, J. C.; SERAFINI, M. R.; QUITANS-JR, L. J.; BONJARDIM, L. R.; ARAÚJO, A. A.; Collagen-based films containing liposome-loaded usnic acid as dressing for dermal burn healing. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. p. 1-9, 2011.
140. OESSER, S.; SEIFERT, J. Stimulation of type II collagen biosynthesis and secretion in bovine chondrocytes cultured with degraded collagen. **Cell and Tissue Research**. v. 311, n. 3, p. 393-399, 2003.
141. OHARA, H.; MATSUMOTO, H.; ITO, K.; IWAI, K.; SATO, K. Comparision of quantity and structures of hydroxyproline containing peptides in human blood after oral ingestion of gelatin hydrolysates from different sources. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 55, n. 4, p. 1532-1535, 2007.
142. OHGUCHI, K.; BANNO, Y.; AKAO, Y.; NOZAWA, Y. Involvement of phospholipase D1 in collagen type I production of human dermal fibroblasts. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 348, n. 4, p. 1398-1402, 2006.
143. OKONOGI, S.; DURANGRAT, C.; ANUCHPREEDA, A.; TACHAKITTIORUNGROD, S.; CHOWWANAPOON- POHN, S. Comparison

- of antioxidant capacities and cytotoxicities of certain fruit peels. **Food Chemistry**. v. 103, n. 3, p. 839–846, 2009.
144. OLIVEIRA, L. M.; ALVES, R. M. V.; SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; PADULA, M.; GARCIA, E. E. C.; COLTRO, L. **Ensaios para avaliação de embalagens plásticas flexíveis**. Centro de tecnologia de embalagem–CETEA. 219p.1996.
145. OLIVEIRA, C. S.; GARDEN, L.; RIBEIRO, M. C. O. **Utilização de filmes comestíveis em alimentos**. Série em Ciência e Tecnologia de Alimentos: Desenvolvimento em Tecnologia de Alimentos. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, UTFPR, Ponta Grossa, Brasil, 2007.
146. OLIVEIRA, N. L. **Efeito de extratos de própolis brasileira sobre a cicatrização de queimaduras dérmicas profundas**. Dissertação de Mestrado. Universidade Tiradentes. Aracaju SE. 2010.
147. PARENTEAU-BAREIL, R.; GAUVIN, R.; CLICHE, S.; GARIÉPY, C.; GERMAIN, L.; BERTHOD, F. Comparative study of bovine, porcine and avian collagens for the production of a tissue engineered dermis. **Acta Biomaterialia**. v. 7, p. 3757–3765, 2011.
148. PASTOR C.; SÁNCHEZ-GONZÁLEZ L.; CHÁFER M.; CHIRALT M.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ S. Physical and antifungal properties of hydroxypropylmethylcellulose based films containing propolis as affected by moisture content. **Carbohydrate Polymers**, 82, 1174–1183. 2010.
149. PATEL, D. K.; PRASAD, S. K.; KUMAR, R.; HEMALATHA, S. An overview on antidiabetic medicinal plants having insulin mimetic property. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**. v. 2, n. 4, p. 320-330, 2012.
150. PATEL, G. K.; WILSON, C. H.; HARDING, K. G.; FINLAY, A. Y.; BOWDEN, P. E. Numerous Keratinocyte subtypes Involved in Wound Re-epithelialization. **Journal of Investigative Dermatology**. v. 126, p. 497-502, 2005.

151. PINTO, L. N. **Plantas medicinais utilizadas em comunidades do município de Igarapé-Miri, Pará: etnofarmácia do município de Igarapé-Miri – Pa.** Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Pará, Belém, 2008.
152. PIRBALOUTI, A. G.; KOOHPAYEH, A.; KARIMI, I. The wound healing activity of flower extracts of *Punica granatum* and *Achillea kellalensis* in Wistar rats. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research.** v. 67, n. 1, p. 107-110, 2010.
153. PRAKASH, C.; SAI, V.; PRAKASH, I. Bioactive Chemical Constituents from Pomegranate (*Punica granatum*) Juice, Seed and Peel-A Review. **International Journal of Research in Chemistry and Environment.** v. 1, n. 1, p. 1-18, 2011.
154. QU, W.; BREKSA, A. P.; PAN, Z.; MA, H. Quantitative determination of major polyphenol constituents in pomegranate products. **Food Chemistry.** v. 132, n. 3, p. 1585-1591, 2012.
155. Qu, W.; Zhongli, P.; Haile, M. "Extraction modeling and activities of antioxidants from Pomegranate marc", **Journal of Food Engineering.** v. 99, p. 16–23, 2010.
156. RAJPUT, R.; SAGAR, V. S.; ADIGA, S.; RAMYASUDHA. Effect of *Punica granatum* peel extract on burn wound healing in albino wistar rats. **International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology.** v. 2, n. 1, p. 353-357, 2011.
157. RANA, V.; TIWARYA, A.K., JAINA, s. et al., Chitosan-chondroitin composite films: comparison with in vitro skin permeation data of hydrophilic and lipophilic drugs, **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v.6, n.4, pp- 231-242.2007.

158. RATHOD, N. R.; BISWAS, D.; CHITMEB, H. R.; RATNA, S.; MUCHANDI, I. S.; CHANDRA, R. Anti-urolithiatic effects of *Punica granatum* in male rats. **Journal of Ethnopharmacology**. v.140, n. 2, p. 234– 238, 2012.
159. RATNER, B.D. Surface properties and surface characterization of materials, In: Raner B. D. Hoffman A.S., Schoen F.J. Lemons L. E (eds). Biomaterials science: An introduction to marials in medicine. San Diego, **Elsevier**. 2ª ed., 1.4. 2004.
160. RIELLA, K. R.; MARINHO, R. R.; ARAUJO, A. A.; COSTA, L. P.; FIGUEIREDO, R. T.; ALBUQUERQUE JUNIOR, R. L. C.; CARDOSO, J. C.; THOMAZZI, S. M. Development and characterization of collagen based films containing thymol. In: **III Brazilian Congress and III Pan-American Congress on Thermal Analysis and Calorimetry**, 2012.
161. RIGO, L. N. **Desenvolvimento e caracterização de membranas comestíveis**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguaia das Missões, Erechim, 2006.
162. ROBERTSON, G. P. Optical and mechanical properties of thermoplastic polymers. In Food Packaging: Principles and Prattice. **New York: Marcel Dekker**, p.63-107, 1993.
163. ROCHA, J. A. M.; OLIVEIRA, R. G.; FARIAS, R. E.; ANDRADE, L. C. R.; AERESTRUP, F. M. Modulação da proliferação fibroblástica e da resposta inflamatória pela terapia de laser de baixa intensidade no processo de reparo tecidual. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v. 81, n. 2, p. 150-156, 2006.
164. ROMAN, J. A. **Bioquímica. Biomoléculas: Carboidratos, Lipídeos e Proteínas**. Universidade Federal Tecnológica do Paraná – UFTPR, 2010. Disponível em: <<http://www.trabalhosfeitos.com/ensaios/Bioquimica-Clinica/443630.html>>. Consultado em 22 de novembro de 2012.

165. ROMANI, A.; CAMPO, M.; PINELLI, P. HPLC/DAD/ESI-MS analyses and anti-radical activity of hydrolyzable tannins from different vegetal species. **Food Chemistry**. v. 130, n. 1, p. 214–221. 2012.
166. ROSE, M. T. Effect of growth factors on the migration of equine oral and limb fibroblasts using an in vitro scratch assay. **The Veterinary Journal**. v. 193, p. 539–544, 2012.
167. SAAD, H.; CHARRIER-EL, B. F.; PIZZI, A.; RODE, K.; CHARRIER, B.; AYED, N. Characterization of pomegranate peels tannin extractives. **Industrial Crops and Products**. v. 40, p. 239– 246, 2012.
168. SCHÄFER, M., WERNER, S. Oxidative stress in normal and impaired wound repair. **Pharmacological Research**. 58, 165-171. 2008
169. SAMY, W., ELGINDY, N., EL-GOWELLI, H.M. Biopolymeric nifedipine powder for acceleration of wound healing. **International Journal of Pharmaceutics**. 422, 323– 331, 2012.
170. SANTANA, W. A. **Desenvolvimento, caracterização e avaliação do potencial cicatrizante de membranas preparadas com muco de achatina fulica associados ou não a laserterapia**. Dissertação de Mestrado. Universidade Tiradentes- UNIT. Aracaju, Sergipe, 2011.
171. SANTANA, W. A.; MELO, C. M.; CARDOSO, J. C.; PEREIRA-FILHO, R. N.; RABELO, A. S.; REIS, F. P.; ALBUQUERQUE-JUNIOR, R. L. C. Assessment of Antimicrobial Activity and Healing Potential of Mucous Secretion of Achatina fulica. **International Journal of Morphology**. v. 30, n. 2, p. 365-373, 2012.
172. SANTORO, M.M.; GAUDINO, G. Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. **Experimental Cellular Research**, v.304, p.274-86, 2005.

173. SANTOS, E. H. B.; BATISTA, F. P. R.; PEREIRA, L. M.; CAMPOS, L. M. A.; CASTRO, M. S.; AZEVÊDO L. C. **Composição físico-química dos frutos da romã (*Punica granatum* L.).** 2011. Disponível em: <<http://connepi.ifal.edu.br/>>. Acesso em: 12 de novembro de 2011.
174. SANTOS, V. E.; GOMES, M. E.; MANO, J. F.; REIS, R. L. Chitosan–chondroitin sulphate nanoparticles for controlled delivery of platelet lysates in bone regenerative medicine. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine.** v. 6, Suppl 3, p. 47-59, 2012.
175. SARKER, B; DEY, K; KHAN, R. A. Effect of Incorporation of Polypropylene on the Physico-Mechanical and Thermo-Mechanical Properties of Gelatin Fiber Based Linear Low Density Polyethylene Bio-foamed Composite. **Journal of Thermoplastic Composite Materials.** v. 24, n. 5, p. 679-694, 2011.
176. SCARMINIO, I. S. **Desenvolvimento de um sistema Quimiométrico para microcomputadores e algumas aplicações.** Campinas. [Tese de doutorado]. Instituto de Química, universidade de Campinas, 1989.
177. SEHN, E.; HERNANDES, L.; FRANCO, S. L.; GONÇALVES, C. C. M.; BAESSO, M. L. Dynamics of reepithelialisation and penetration rate of a bee propolis formulation uring cutaneous wounds healing. **Analytica Chimica Acta**, v. 635, p. 115-120, 2009.
178. SEZER, A. D.; HATİPOĞLU, F.; CEVHER, E.; OGURTAN, Z.; BAS, A. L.; AKBUGA, J. Chitosan film contraining fucoidan as a wound dressing for dermal burn healing:preparation and in vitro/in vivo evolution. **AAPS PharmSciTech**, v. 8, n.2, 2007.
179. SHIBAN, M.S., AL-OTAIBI, M.M., AL-ZOREKY, N.S. Antioxidant Activity of Pomegranate (*Punica granatum* L.) Fruit Peels. **Food and Nutrition Sciences.** 3, 991-996. 2012.

180. SHOULDERS, M.D., GUZEI IA, RAINES RT. 4-Chloroprolines: synthesis, conformational analysis, and effect on the collagen triple helix. **Biopolymers**. 89:443–454. 2008.
181. SINGH N. V.; Singh S. K.; Patel V. B. In vitro axillary shoot proliferation and cloned propagation of 'G-137' pomegranate (*Punica granatum*). **The Indian Journal of Agricultural Sciences**. v. 77, n. 8, p. 505-508, 2007.
182. SINGH, A. K; LOHANI, M.; SINGH U. P. Analgesic Activity of Methanolic Extract of *Aegiceras corniculatam* Linn. **International Journal of PharmTech Research**. v. 2, n. 2, p. 1058-1060, 2010.
183. SINHA RAY, S.; OKAMOTO, M.. Polymer/layered silicate nanocomposites: a review from preparation to processing. **Progress in Polymer Science**, v. 28, n. 11, p. 1539–1641, 2003.
184. SIES, H. Strategies of antioxidant defence. Review. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v.215, n.2, p.213-219, 1993.
185. SIVAROOBAN, T., HETTIARACHCHY, N. S.; JOHNSON, M. G. Physical and antimicrobial properties of grape seed extract, nisin, and EDTA incorporated soy protein edible films. **Food Research International**. v. 41, n. 8, p. 781–785. 2008.
186. SOBRAL, P. J. A.; MONTERREY-QUINTERO, E. S.; HABITANTE, A. M. Q. B. Glass transition of Nile tilapia myofibrillar protein films plasticized by glycerin and water. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. v. 67, n. 2, p.499-504, 2002.
187. SOUZA, C. O.; DIAS,D. M.; BARBOSA, C.C.S.; RODRIGUES, S. N.; YOSHIDA, P. S., Antimicrobial resistance profile of pseudomonas aeruginosa isolated in feces of patients infected with human immunodeficiency virus. **Caderno Saúde Coletivo**, Rio de Janeiro, 15 (3): 379–392, 2007.
188. STEVENS, A.; LOWE, J. **Patologia**. São Paulo: Manole, p. 72, 2002

189. SUZUKI, N., MASAMUNE, A., KIKUTA, K., WATANABE, T., SATOH, K., SHIMOSEGAWA, T. Ellagic acid inhibits pancreatic fibrosis in male Wistar Bonn/Kobori rats. **Digestive Diseases and Sciences**. 54, 802-810. 2009.
190. TAKEUCHI, O.; AKIRA S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation **Cell**. v. 140, n. 6, p. 805–820, 2010.
191. TANAKA, T. Polymers hydrogels poly-n-siopropylacrylamide, **Physical Review Letters**. v.40, p. 820-32, 1978.
192. TAZIMA, M. F. G. S.; VICENTE, Y. A. M. V. A.; MORIYA, T. Biologia da Ferida e Cicatrização. **Simpósio fundamentos em clínica cirúrgica - 1ª Parte, Capítulo II, Medicina (Ribeirão Preto)**. v. 4, n. 3, 259-264, 2008.
193. TEO, T. C.; NAYLOR, I. L. Modifications to the rate of wound contraction by allopurinol. **British Journal of Plastic Surgery**, v.48, n. 4, p. 198-202, 1995.
194. TOMAZZONI, M. I.; NEGRELLE, R. R. B.; CENTA, M. L. Fitoterapia popular: A busca instrumental enquanto prática terapêutica. **Texto & Contexto Enfermagem**, v. 15, n. 1, p. 115-121, 2006.
195. TRINDADE, R. S. **Caracterização de membranas poliméricas aplicadas ao processo de microfiltração**. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Escola de Engenharia. Porto Alegre - RS. 2010.
196. ULUBAYRAM, K.; CAKAR, A. N.; KORKUSUZ, P.; ERTAN, C.; HASIRCI, N. EGF containing gelatin-based wound dressings. **Biomateriais**, v. 22, p.1345-1356, 2001.
197. VEIGA-SANTOS, P.; OLIVEIRA, L.M; CEREDA, M. P.; ALVES, A. J.; SCAMPARINI, A. R. P. Mechanical properties hydrophilicity and water activity of starch–gum films: effects of additives and deacetylated xanthan gum. **Food Hydrocolloids**. v.19, p. 341-349. 2005.

198. VOROTELYAK, E. A.; SHIKHVERDIEVA, A. S.; VASILIEV, A. V.; TERSKIKH, V. V. Fibroblasts Stimulate Epithelization of Collagen gel. **Biology Bulletin.** v. 29, n. 4. p. 343-347, 2002.
199. WANG, C.; SHI, L.; FAN, L.; DING Y.; ZHAO, S.; LIU, Y; MA, C. Optimization of extraction and enrichment of phenolics from pomegranate (*Punica granatum* L.) leaves. **Industrial Crops and Products.** v. 42, p. 587– 594, 2013.
200. WELLER, C., SUSSMAN, G. Wound Dressings Update. **Journal of Pharmacy Practice and Research.** v. 36, n. 4, p. 318-324, 2006.
201. WERKMAN, C.; GRANATO, D. C.; KERBAUY, W. D.; SAMPAIO, F. C.; BRANDÃO, A. A. H.; RODE, S. M. Aplicações terapêuticas da *Punica granatum* L. (romã). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais.** v.10, n.3, p.104-111, 2008.
202. XINGANG, W.; QIYIN, L.; XINLE, H.; LI, M.; CHUANGANG, Y.; YURONG, Z.; HUAFENG, S.; CHUNMAO, S.; CHANGYOU, G. Fabrication and characterization of poly(L-lactide-co-glycolide) knitted mesh-reinforced collagen–chitosan hybrid scaffolds for dermal tissue engineering. **Journal of the mechanical behavior of biomedical materials.** v. 8, p. 201-215, 2012.
203. YAMATOOGI, R. S.; RAHAL, S. C.; GRANJEIRO, J. M.; TAGA, R.; CESTARI, T. M.; LIMA, A. F. M. Histologia da associação de membranas biológicas de origem bovina implantadas no tecido subcutâneo de ratos. **Ciência Rural.** v. 35, n. 4, p. 837-842, 2005.
204. YU, T-W., ANDERSON, D. Reactive oxygen species--induced DNA damage and its modification: a chemical investigation. **Mutation Research.** Amsterdam, v.379, n.2, p.201-210, 1997.

205. ZAOUAY, F.; MENA, P.; VIGUERA, C. G.; MARS, M. Antioxidant activity and physicochemical properties of Tunisian grown pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars. **Industrial Crops and Products**. v. 40, p. 81– 89, 2012.
206. ZHANG Y.; HE H.; GAO W. J.; LU S. Y.; LIU Y.; GU H. Y. Rapid adhesion and proliferation of keratinocytes on the gold colloid/chitosan film scaffold. **Materials Science and Engineering: C**. v. 29, p. 908–912, 2010.

ANEXOS

A – Parecer consubstanciado de projeto de pesquisa

B – Artigo enviado para publicação

C – Normas do Periódico

Parecer Consubstanciado de Projeto de Pesquisa

Título do Projeto: Desenvolvimento, caracterização e avaliação do potencial cicatrizante de filmes de colágeno contendo extrato hidroalcóólico de Punica granatum Linn em roedores

Pesquisador Responsável Marismar Fernandes do Nascimento

Data da Versão 18/10/2011

Cadastro 030811

Data do Parecer 21/10/2011

Grupo e Área Temática III - Projeto fora das áreas temáticas especiais

Objetivos do Projeto

Geral

- Desenvolver, caracterizar e avaliar o potencial de filmes de colágeno contendo extrato hidroalcóólico de Punica granatum Linn sobre o processo de reparo cicatricial por segunda intenção em roedores.

Específicos

- Obter extrato hidroalcóólico de Punica granatum Linn;
- Caracterizar o extrato hidroalcóólico de Punica granatum Linn;
- Desenvolver filmes de colágeno contendo extrato hidroalcóólico de Punica granatum L.
- Caracterizar físico-química e termicamente filmes desenvolvidos a partir de colágeno e Punica granatum L.;
- Avaliar o processo de reparo cicatricial por segunda intenção de feridas tratadas com filmes de colágeno contendo extrato hidroalcóólico de Punica granatum L. em modelo experimental.

Sumário do Projeto

Há uma diversidade de produtos disponíveis para o tratamento de feridas, apresentados nas formas de enxertos, soluções, óleos, géis, curativos interativos e filmes bioativos. O colágeno por representar um importante constituinte proteico da pele tem sido um dos materiais bastante estudado no sentido de auxiliar no processo cicatricial quando associado às plantas com a finalidade terapêutica. A Punica granatum L. (romã), dentre as diversas atividades biológicas, apresenta propriedade biológica cicatrizante, promissora no tratamento de feridas. Nesta perspectiva, o objetivo dessa pesquisa é desenvolver, caracterizar físico-quimicamente e avaliar o potencial de filmes de colágeno contendo extrato hidroalcóólico de Punica granatum Linn sobre o processo cicatricial por segunda intenção em modelo animal. Será realizada a obtenção do extrato de Punica granatum L. pelo método de maceração, considerado por Adelman (2005) o melhor método de extração para aquisição dos compostos biologicamente ativos. Será utilizado o álcool etílico 70% como solvente. A extração do colágeno será realizada a partir de tendão bovino, segundo o método descrito por ALBUQUERQUE-JÚNIOR et al (2009) e, por fim, o desenvolvimento dos filmes pelo método casting process. Para a caracterização físico-química dos filmes será utilizada a análise térmica diferencial (DTA); termogravimetria (TG/DTG); microscopia eletrônica de varredura (MEV); avaliação do potencial antioxidante dos filmes pelo modelo de sequestro do radical estável 1,1-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) na presença de antioxidantes descrito por SOUZA, et al., (2007), além do uso do texturômetro para determinar as propriedades mecânicas dos filmes. Na etapa final será feito o ensaio biológico com 75 ratos Wistar, machos, divididos em três grupos (n=25). Os animais serão subdivididos em três grupos distintos: feridas sem coberturas - grupo controle (CTR); feridas cobertas com membrana de colágeno (COL); feridas cobertas com membrana de colágeno contendo extrato hidroalcóólico de Punica granatum L. (PGL). Após 3, 7, 14, 21 e 30 dias a partir dos procedimentos cirúrgicos, cinco animais de cada grupo serão eutanasiados em câmara de dióxido de carbono (modelo CGSCO2G –Beiramar), onde receberão um fluxo de ar contendo 100% de CO₂, durante 10 minutos. Constatada a morte dos animais, será realizada a remoção dos espécimes equivalentes à área cicatricial com margens de 3,0 cm. Os espécimes removidos serão acondicionados em frascos plásticos contendo solução de formol (10%, pH 7,4) e fixados por 48 h. A partir daí, será determinado o índice de retração clínica das feridas com o auxílio do paquímetro digital e a avaliação da ferida pelo cálculo da diferença entre a área inicial e final. Serão realizados ainda, os procedimentos

percentual de epitelização da superfície da ferida, análise quantitativa da população de mastócitos, análise de deposição colagênica, procedimentos histológicos e imunohistoquímicos, análise quantitativa da microvasculatura e miofibroblastos e, por fim, a análise estatística que será aplicado o teste de Shapiro-Wilk para verificação de normalidade dos dados. Os dados com distribuição normal serão analisados pelo teste de ANOVA com extensão Post-hoc de Tukey. Os dados que não atenderem ao pressuposto de normalidade serão analisados pelo teste Kruskal-Wallis, com extensão post-hoc de Dunn. Será utilizado o nível de significância de 5%, de modo que as diferenças observadas serão consideradas significativas quando $p < 0,05$. Esse trabalho visa contemplar resultados inovadores nas Ciências da Saúde e Tecnologia contribuindo para a melhoria do processo de reparo cicatricial de feridas, através da utilização de produtos naturais, de baixo custo e, consequentemente, de maior acessibilidade da população. Tem ainda o propósito de consolidar parcerias com instituições de pesquisas, contribuir para o avanço científico e tecnológico, oferecer embasamento para novas pesquisas com grupos interdisciplinares (docentes e discentes), depósito de patente e publicação de artigos científicos em periódicos com fator de impacto relevante.

Itens Metodológicos e Éticos	
Título	Adequado
Autores	Adequados
Local de Origem na Instituição	Adequado
Projeto elaborado por patrocinador	Não
Aprovação no país de origem	Não necessita
Local de Realização	Própria instituição
Outras instituições envolvidas	Não
Condições para realização	Adequadas

Comentários sobre os itens de Identificação

Introdução	Adequada
------------	----------

Comentários sobre a Introdução

Objetivos	Adequados
-----------	-----------

Comentários sobre os Objetivos

Pacientes e Métodos	
Delineamento	Adequado
Tamanho de amostra	Total 75 Local ITP
Cálculo do tamanho da amostra	Adequado
Participantes pertencentes a grupos especiais	Não
Seleção equitativa dos indivíduos participantes	Adequada
Crêterios de inclusão e exclusão	Ausentes
Relação risco- benefício	Adequada
Uso de placebo	Não utiliza
Período de suspensão de uso de drogas (wash out)	Não utiliza
Monitoramento da segurança e dados	Adequado
Avaliação dos dados	Adequada - quantitativa
Privacidade e confidencialidade	Adequada
Termo de Consentimento	Não necessário
Adequação às Normas e Diretrizes	Sim

Comentários sobre os itens de Pacientes e Métodos

Cronograma	Adequado
Data de início prevista	mês 1
Data de término prevista	mês 18
Orçamento	Adequado
Fonte de financiamento externa	Agência de fomento

Comentários sobre o Cronograma e o Orçamento

Referências Bibliográficas	Adequadas
----------------------------	-----------

Comentários sobre as Referências Bibliográficas

Recomendação

Aprovar

Comentários Gerais sobre o Projeto

Todos os dados apresentados permitem cabal avaliação do projeto, o qual é relevante cientificamente.

Antioxidant and wound healing activities of the aqueous extract of *Punica granatum* Linn in rodent model

Marismar Fernandes do Nascimento^{a,1}, Juliana Cordeiro Cardoso^a, Margarete Zanardo Gomes^a, Isana Carla Leal Souza^a, José Cleveilton Dos Santos^a, Clauberto Rodrigues de Oliveira^b, Luiz Pereira da Costa^b, Francine Ferreira Padilha^b, Odelsia Leonor Sánchez de Alsina^c, Cláudia Andrea Cardoso^d, Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque-Júnior^a.

^a Post-Graduation Program in Health and Environment, Laboratory of Morphology and Structural Biology, University Tiradentes, Aracaju/SE, Brazil.

^b Post-Graduation Program in Industrial Biotechnology. Laboratory of Biomaterials. University Tiradentes, Aracaju/SE, Brazil.

^c Post-Graduation Program in Process Engineering. Laboratory of Bioprocess Engineering. University Tiradentes, Aracaju/SE, Brazil.

^d Laboratory of Chemistry. State University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Brazil.

Abstract

Ethno pharmacological relevance: *Punica granatum* Linn (Punicaceae) has been used in medicine folk as a medicinal plant. Peel-derived extract of *Punica granatum* (AEPG) has been used to chronic wounds and ulcers due to its antibacterial, antifungal and anti-inflammatory activities. The goal of the study was to assess the antioxidant activity and the major compounds of the AEPG, as well as to evaluate the wound healing effect of the extract incorporated into gelatin-based dressing membranes in rodents. **Material and Methods:** The antioxidant activity of the AEPG was estimated by the DPPH radical scavenging assay and the major compounds were identified by high performance liquid chromatography mass spectrometry (HPLC-MS). Subsequently, the AEPG was vehiculated into gelatin-based dressing membranes and a biological wound healing assay was conducted. The wound contraction rates and histological analysis were performed at 3, 7, 14 and 21 days, split into three groups: undressed wounds (CTR), wounds dressed with gelatin-based membranes (GEL), and dressed with AEPG-incorporated gelatin-based membranes (GELPG). **Results:** Gallic acid, ellagic acid and punicalagin α and β were the major compounds identified in the AEPG. The peel extract were exhibit high antioxidant activity, with IC₅₀ value of 1.715 ± 0.24 μ g/mL. The GELPG group showed significantly increased wound contraction rates at 3 (p<0.01), 7 (p<0.001) and 14 days (p<0.001), improved the granulation tissue, and provided better collagen deposition and arrangement during wound healing compared to GEL and CTR. **Conclusions:** This study suggests that the aqueous extract of *Punica granatum* peel is a promising natural product to be used in treatment of chronic wounds. The pharmacological actions of *Punica granatum* in popular medicine practices may be related to the antioxidant effects of the aqueous extract.

¹ Corresponding author: Adelia Franco Avenue, number 2403, Block B, Apartment 301, Grageru, Aracaju/SE, Brazil. Zip code: 49048-010.
Tel: (87) 9620-1122. E-mail address: maris.mar@bol.com.br

Keywords: Antioxidant; Skin; Wound healing;

1. Introduction

The medicinal plants have been extensively utilized throughout the world as traditional systems of medicine derived from the folk knowledge (Phillipson, 2001; Mazid et al., 2012).

In developed countries, 25% of the medicinal drugs are based on plants and their derivatives, and the use of medicinal plants is well known among indigenous people and rural populations in many developing countries (Soni et al., 2012). It has also been reported that more than 80% of the world's population uses the traditional medicines for various skin diseases, as well as that approximately one-third of all traditional medicines in use are for the treatment of wounds and skin disorders, compared to only 1-3 % of modern drugs (Pirbalouti et al., 2010).

The medicinal value of these plants, such as the cutaneous cicatrizing effects, lies in some chemical substances that produce a definite physiological action on the human body, such as alkaloids, tannins, flavonoids, and phenolic compounds (Dhandapani, Sabna, 2008). Plant phytochemicals, and particularly phenolic compounds have been associated with health benefits as a result of various physiological properties, such as anti-allergenic, anti-inflammatory, anti-microbial, antioxidant, anti-thrombotic, cardio-protective and vasodilatory effects (Balasundram et al., 2006; Reddy et al., 2007).

The pomegranate plant (*Punica granatum* L., Punicaceae family) is a shrub and its fruit is a rich source of bioactive phytochemicals, such as tannins and other phenolics (Shiban et al., 2012). Since ancient civilizations, various parts of pomegranate, including fruit peels, have been extensively used in folk medicine to treat a wide range of health disorders, as stomachic, inflammation, fever, bronchitis, diarrhea, dysentery, vaginitis, urinary tract infection, and, among others, malaria have been treated using (Reddy et al., 2007; Madrigal-Carballo et al., 2009).

The fruit peel of *Punica granatum* exerts diverse pharmacological functions such as antibacterial, antiinflammatory (Julie-Jurenka, 2008) and, particularly, antioxidant activities (Shiban et al., 2012). It has been reported that *Punica granatum* extracts are able to reduce the oxidative stress in dermal tissues (Zaid et al., 2007; Afaq et al., 2009), and protects the skin against UVB irradiation-induced photoaging

damage (Park et al., 2010). Regarding wound healing, pomegranate peel aqueous extract has shown potent dermal effect on cultures of human skin cells, stimulating dermal fibroblast proliferation and collagen synthesis while inhibiting major collagen degrading enzyme (Aslam et al., 2006). Furthermore, topical application of aqueous extract of peel has shown beneficial healing effect in rat excision wound model (Murthy et al., 2004; Adiga et al., 2010).

The presence of high content of phenolic compounds (approximately 44%), along with other chemical constituents has been associated to the dermatological benefits and wound healing activities of the pomegranate fruit peel extracts. In addition, high performance liquid chromatography analysis of the extracts has demonstrated the presence of gallic acid as one of the major compounds likely responsible for the wound healing improvement (Murthy *apud* Soni et al., 2012).

As the antioxidant activity of herbal-derived products has been associated to their successful use as cicatrizing natural medicines (Fitzmaurice et al., 2011), the goal of this paper was to assess the antioxidant activity and wound healing effects of the aqueous extract of *Punica granatum* fruit peel, vehiculated into gelatin-based wound dressing membranes, in rodent model.

2. Material and Methods

2.1. Sample conditioning

Pomegranate (*P. granatum* L.) fruits were collected during harvest in September 2011 in Petrolina, PE, Brazil. The Exsiccate (number 20881) was deposited in ASE - Herbarium of the Federal University of Sergipe. The fruits were washed with tap water and then, pulping. The peel were dried in stove at 55 °C and crushed in knives mill. The powder, MESH 32, was stored in amber flask.

2.2. Optimization of extraction conditions

Extraction by dynamic maceration in magnetic stirrer was conducted with different solvents and solid/liquid ratios: water 1:100 (m/v); methanol 1:10 (m/v); methanol/water (1:1, v/v) 1:10 (m/v). The aqueous extracts (AEPG100 and AEPG25) were obtained at 100°C and 25°C where as the methanolic (MEPG) and hydromethanolic (HMEPG) extracts were obtained at 25°C. All the extraction

experiments were performed during two hours. The resulting suspension was filtered and the solvent evaporation was evaporated in circulating air stove at 50°C. After solvent evaporation, the crude solid extracts were weighted and stored in amber flask. The yield in dry extract was calculated by the equation (1)

$$\% Y = m_{se} / m_{pp} \times 100 \quad (1)$$

Where,

Y: dry solid extract yield

m_{se} : solid extract mass

m_{pp} : peel powder mass (dry basis)

2.3. HPLC- MS analysis

Samples of the solids extracts (AEPG100, MEPG e HMEPG) of *Punica granatum* Linn fruit, peels were solubilized in a mixture of water: methanol (50%) and filtered in 0.45 µm ultra filters. Solutions of 1 mg/mL of each of the extracts were analyzed by HPLC-MS. The analysis by high efficiency liquid chromatography (HPLC-MS) was conducted using Shimadzu model LC-6AD, with diode array detector SPD-M20A, column reverse phase C-18 (25 cm x 4.6 mm x 5 mm). Mobile phase: 0.1% (v/v) H₃PO₄ in water (A) and 0.1% (v/v) H₃PO₄ in acetonitrile (B). B: 1.5% (5 min), 5-8% (5-10 min), 8% (10-16 min), 8-25% B (16-22 min), 25-90% (22 - 27 min) 90% -1% (27-33 min). Flow 1 mL/min Injected volume 10 µL. The acids were analyzed using the equipment from Shimadzu Model LC-6AD, UV-Vis detector Model SPD-20A, reverse phase column C-18 Phenomenex Gemini (15 cm x 4.6 mm x 5 mm). Mobile phase: 0.1% (v/v) H₃PO₄ in water (95%) and water 0.1% (v/v) H₃PO₄ in acetonitrile (5%). Flow 1 mL/min and injected volume 10 µL. The extracts also were fractionated using dichloromethane and the sub-fractions analyzed by GC-MS. No volatile compounds or easily volatilizable were detected in the samples.

2.4. Scavenge free radicals by DPPH

The radical scavenging activity of the AEPG100 was assessed by DPPH method hydroethanolic solutions with concentrations between 0.1 mg/mL and 15mg/mL were prepared from a base solution obtained with 0.005g of solid extract in

ethanol/water solvent 70:30 (v/v). For each concentration, 3mL aliquots were mixed with 750 μ L of 400 mM DPPH solution. The mixture was homogenized and left to stand for 15 minutes at room temperature without incidence of light. After this period, the measurements were performed on a spectrophotometer at a wavelength of 517 nm using respective solvents to reset the equipment. The experiment was performed in triplicate. The % inhibition of free radical was calculated using the equation (2).

$$\% I = (AC - AA) / AC \times 100 \quad (2)$$

In which:

% I is the percentage inhibition of free radical DPPH of the sample compared to control;

AC is the absorbance of the control (DPPH solution);

AA is the absorbance of sample.

The IC₅₀ value (concentration of the extract that produces 50% scavenging) was calculated from the graph – plotted %I against concentration expressed in μ g/mL.

2.5. Preparation of membranes loaded with AEPPG100

The membranes were prepared by dispersing gelatin powder in acetic acid 0.5 mol.L⁻¹. The final polymer concentration was 1%, in a vessel equipped with a mechanical stirrer, with heating to 25 °C for 24 h. The AEPPG100 was previously solubilized in propylene glycol (plasticizer) and added to the dispersion of gelatin. The concentration of plasticizer and AEPPG100 were 20% and 5% respectively related on the mass of the dry polymer. The membranes were produced by casting process, the dispersion being poured into a polypropylene plate to allow solvent evaporation at room temperature. The membranes were produced with and without AEPPG100.

2.6. Wound healing assay

2.6.1. Animals.

The animals used in this study were adult male *Rattus norvegicus albinus*, Wistar lineage, weighing 250-300 g. The rats were housed in clear plastic cages with solid floors and loose hardwood chip bedding, and supplied with food and water ad libitum in a temperature and humidity-controlled environment. Experimental protocols and procedures were approved by the University Tiradentes Animal Care and Use Committee (CEUA nº 030811).

2.6.2. Surgical Procedures and Groups.

Sixty rats were anesthetized with intraperitoneal ketamine-xylazine (100 mg/kg - 5mg/kg) and standard-sized round-shaped surgical wounds were performed in the back of the animals, using metallic punch of 8.0 mm. Animals were handled in accordance to the principles of aseptic chain in order to avoid bacterial contamination. Subsequently, rats were randomly assigned into three groups of 20 animals each: CTR, undressed wounds; GEL, wounds dressed with gelatin-based films; GELPG – wounds dressed gelatin-based films containing AEPG100. After 3, 7, 14 and 21 days, five animals of each group were euthanized in CO₂ chamber, and the healing/scar area was surgically removed, formalin-fixed and paraffin-embedded.

2.6.3. Assessment of the wound contraction rates.

For the macroscopic analysis and assessment of the wound contraction rates, after 3, 7, 14, and 21 day, the craniocaudal and laterolateral measures of each wound were assessed by a digital caliper (precision 0.01 mm), prior to the excision of the wounds, and the final wound areas were obtained through the equation (3).

$$A = \pi \times R \times r \quad (3)$$

Where:

R represents the radius of craniocaudal axis;

r corresponds to the radius of laterolateral axis of the wounds.

Furthermore, the clinical features of the wounds were monitored regarding to the presence of crust, secretion, necrosis, and hypertrophic scars.

2.6.4. Histological procedures and morphological analysis.

Serial 5 μm thick sections were obtained from the paraffin-embedded samples and stained in hematoxylin-eosin. The intensity of the inflammatory response was assessed as follows: 0 — absence of inflammatory infiltrate; 1— inflammatory cells representing 10% of the cell population; 2 — inflammatory cells representing between 10% and 50% of the cell population; and 3 — inflammatory cells representing more than 50% of the cell population. The inflammatory profile was classified as acute (predominance of polymorphonuclear cells) and chronic (predominance of mononuclear cells). For the assessment of the collagen deposition, histological sections stained in Sirius Red and analyzed under polarized light were used to the descriptive analysis. Collagen fibers were analyzed according their birefringence pattern (greenish/ yellow-greenish or orange, orange-reddish), morphological appearance (wavy or stretched, thin or thick, short or long), and architectural arrangement (reticular, parallel or interlaced). All readings were performed by investigators blinded to treatments (six histological sections / animal).

2.6.5. Statistical analysis.

The data concerning the wound contraction rates were analyzed using ANOVA followed by Tukey's test, whereas the analysis of the inflammatory infiltrate was carried out by Kruskal–Wallis test, followed by Dunn's test. P values less than 0.05 were considered significant.

3. Results

3.1. Characterization of *Punica granatum* Linn extracts

As demonstrated in Figure 1, the yield in dry extract of the aqueous extract (AEPG100) was significantly higher than those obtained for AEPG25. Otherwise the hydromethanolic (HMEPG) and methanolic extracts (MEPG) shown both yield results in the same order but higher than the aqueous extract AEPG25.

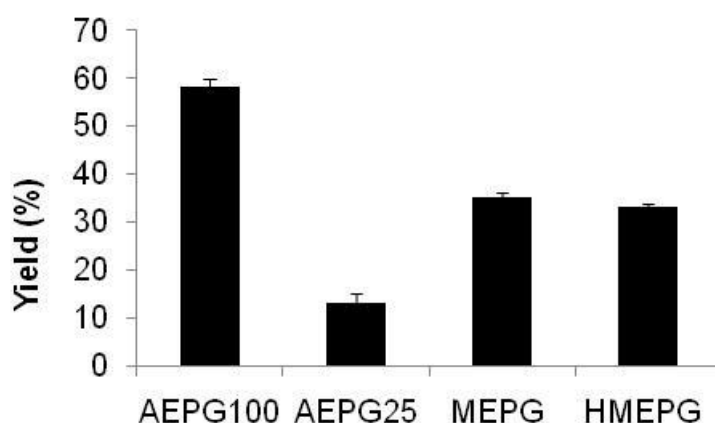


Figure 1. Yield (%) of *Punica granatum* peel extractions after 2 hours of maceration. AEPG100 and AEPG25 – aqueous extract obtained at 100 and 25°C respectively; MEPG – methanolic extract; HMEPG – hydromethanolic extract.

The major chemical compounds identified in all the dry extracts were punicalagin α and β , ellagic acid and gallic acid. The last two compounds were quantified (Table 1) and the ellagic acid was shown to be in higher concentration than gallic acid in the dry extract.

Table 1
Chemical quantification of tannic acids in *Punica granatum* peels extracts.

Extract	Tannic compounds in dry extract (mg/g)	
	Gallic Acid	Ellagic Acid
AEPG100	32.24	41.67
MEPG	27.13	42.78
HMEPG	26.78	54.09

AEPG100 – aqueous extract obtained at 100°C; HMEPG – hydromethanolic extract; MEPG – methanolic extract of *Punica granatum* Linn.

The analysis in HPLC-MS revealed that the major chemical compounds (punicalagin α and β , ellagic acid and gallic acid) were identified in the three extract samples (Fig. 2).

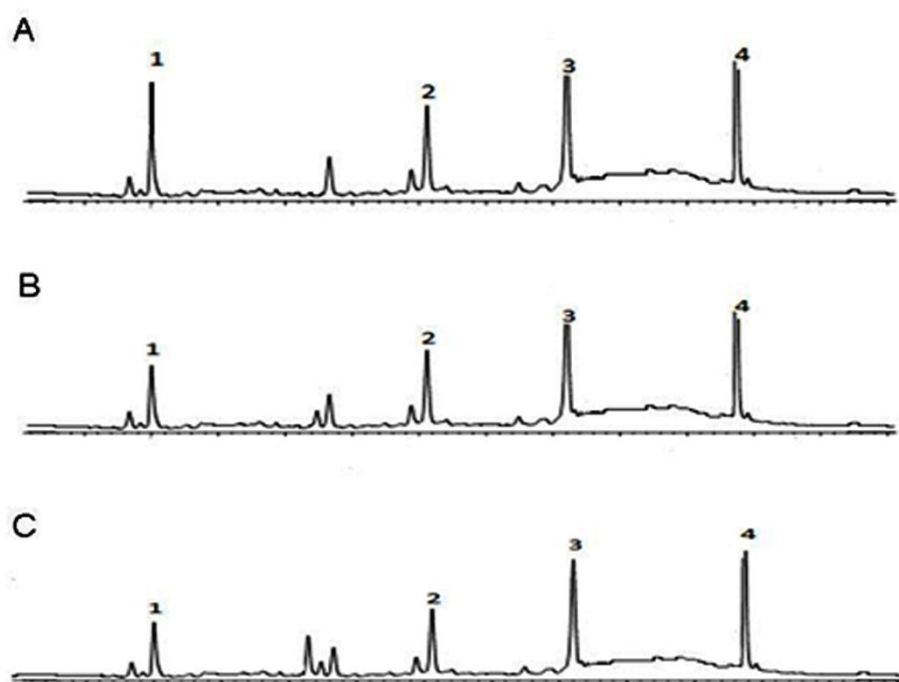


Figure 2. Chromatography and mass spectrum of the tannic major compounds identified in the aqueous extract (A), hydromethanolic extract (B) and methanolic extract (C). The peaks represent gallic acid [1], punicalagin α , [2], punicalagin β [3], and ellagic acid [4] at 260 nm.

Figure 3 shows the DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging activity of the AEPG100

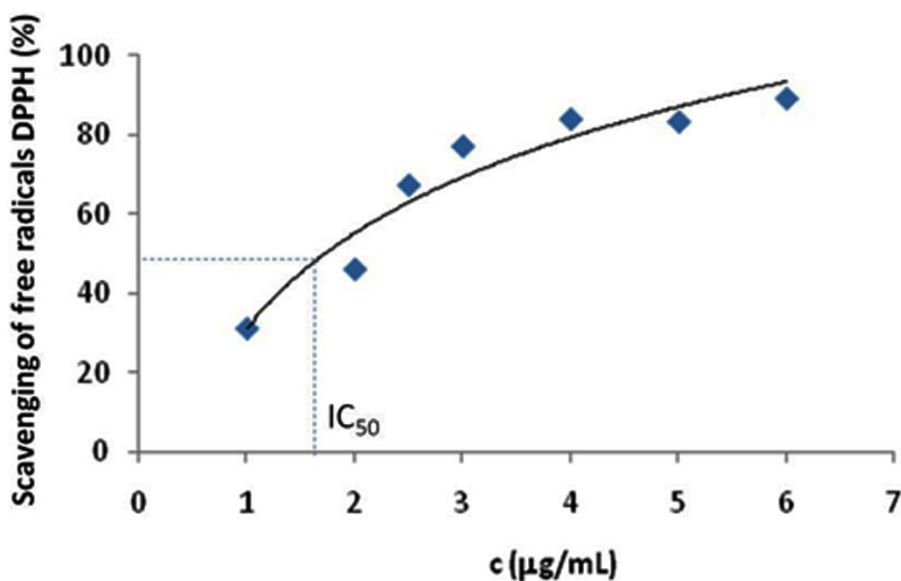


Figure 3. DPPH radical scavenging activity of AEPG100.

Equation (4) fits the experimental data with $R^2 = 0.924$

$$\%I = 34.62 \ln(c) + 31.31 \quad (4)$$

In which

%I: percentage inhibition of free radical DDPH of the sample compared to control;

c: concentration of AEPG100 ($\mu\text{g/mL}$).

The IC50 value calculated from equation (4) was $1.715 \pm 0.24 \mu\text{g/mL}$.

3.2. Assessment of the wound contraction rates (WCR)

Figure 4 presents the macroscopic aspects of the wounds over the time course of the experiment, showing no sign of abscess formation either in the early phases (3 and 7 days) or hypertrophic scars in the final ones (14 and 21 days).



Figure 4. Macroscopic features of the wounds of the different groups over the time-course of the experiment, showing no abscess or hypertrophic/atrophic scar formation. Note the retraction of the wound areas over the time.

As demonstrated in Figure 5, the WCR observed in GELPG was significantly increased compared with CTR and GEL at three ($p < 0.01$ and 0.001), seven ($p < 0.001$ and 0.01) and 14 days ($p < 0.001$ and 0.001). Only at 14 days, GEL presented WCR higher than CTR ($p < 0.05$). At 21 days, all the groups showed full contraction of the wounds.

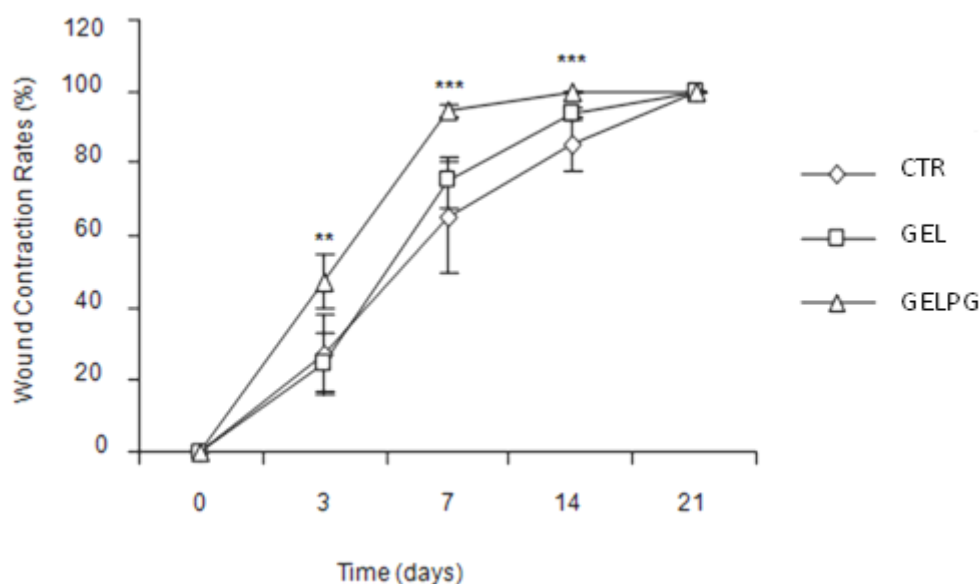


Figure 5. Evolution of the wound contraction rates in the different experimental groups over the time course of the study. ** GELPG is significantly different from CTR ($p < 0.01$); *** GELPG is significantly different from CTR ($p < 0.001$).

3.3. Morphological analysis of the wound healing process.

At three days, an intense inflammatory response composed of neutrophils, macrophages and lymphocytes, as well as marked interstitial edema, were observed in the three groups (Figure 6a/b). However, in GELPG, there was earlier formation of immature granulation tissue, composed of small irregular slit-shaped vessels, in the bottom of the wounds (Figure 6c). At seven days, there was reduction of the inflammatory response and formation of granulation tissue in CTR and GEL (Figure 6d/e), whereas in GELPG, a more collagenized and less vascularized fibrous connective tissue was observed (Figure 6f). At 14 days, a fibrous primary scar was observed in all of the groups (Figure 6g/h), but only GELPG exhibited the formation of epithelial buddings consistent with rudimentary skin appendages (Figure 6i). At 21 days, all of the groups presented a densely fibrous and hypovascularized connective tissue (Figure 6j/k/l). Moreover, GELPG exhibited advanced epidermal maturation, with abundant orthokeratinization, thick granular layer and frequent formation of skin appendages (Figure 6l).

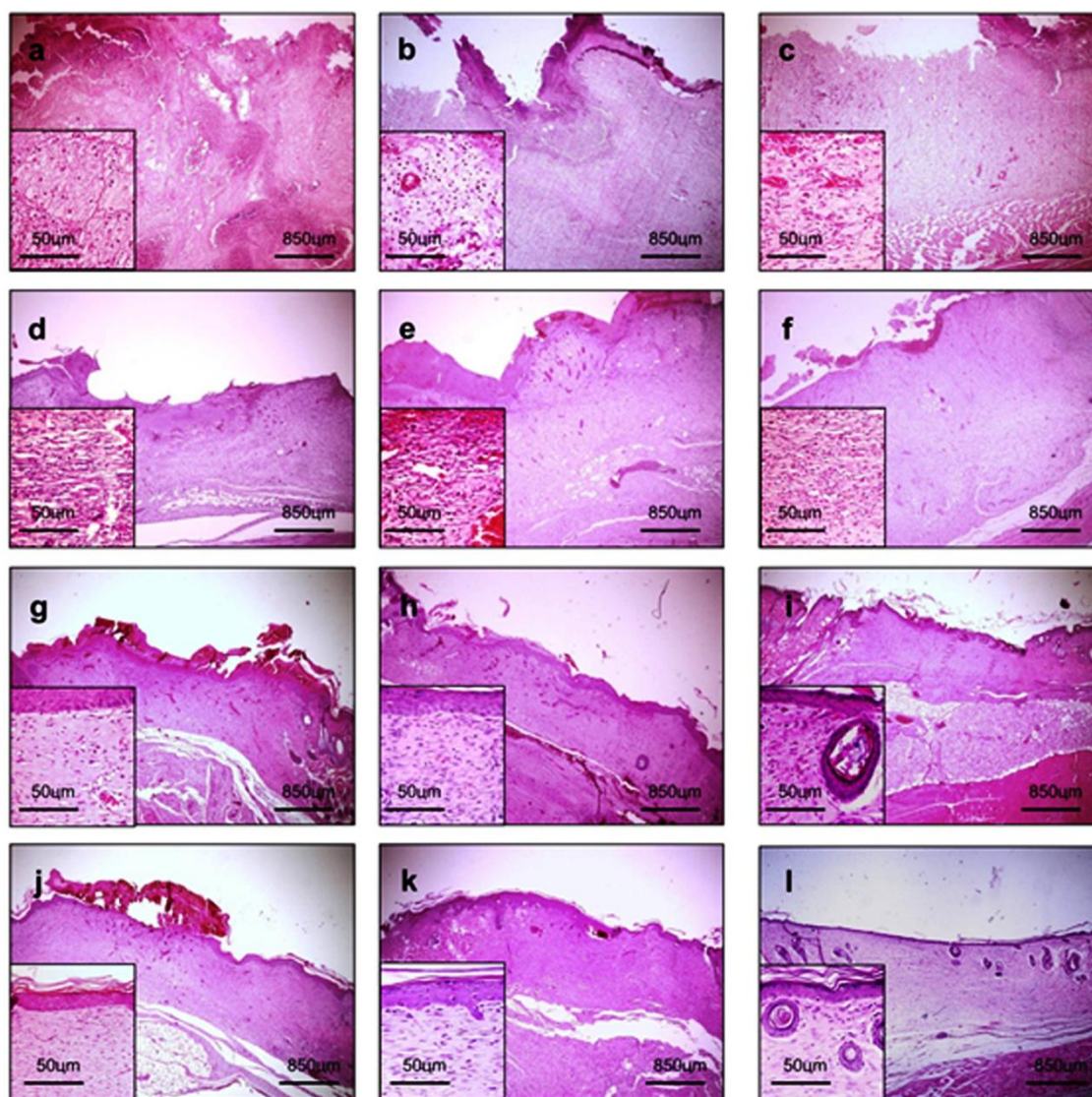


Figure 6. Histological sections of the groups (wounded areas) over the time course of the wound healing biological assay. (a/b) Intense inflammatory response and edema is observed in CTR and GEL, and (c) immature granulation tissue in GELPG at three days. (c/d) Well vascularized granulation tissue observed in CTR and GEL, and (e) fibrous connective tissue in GELPG at seven days. (f/g/h) Primary fibrous scar seen in all the groups at 14 days. (h) Earlier formation of hairy follicle in GELPG. (j/k/l) Dense fibrous connective tissue is seen in all the groups. (l) Multiples hairy follicles observed in GELPG (HE, 40/400 x magnification).

3.4 Assessment of the histological severity of the inflammatory response.

As demonstrated in Table 2, the application of the gelatin-based membranes loaded with AEPG100 as wound dressing significantly reduced the inflammatory response at three ($p < 0.001$), seven ($p < 0.05$), 14 ($p < 0.01$) and 21 days ($p < 0.001$) of

the healing process. In addition, the extract-free gelatin-based membranes promoted significantly decrease in the inflammatory content only at three days ($p < 0.05$).

Table 2.

Assessment of the severity of the inflammatory response in the experimental groups over the time course of the experiment.

Groups	Experimental Period (days)			
	3	7	14	21
CTR	3.00 ± 0.00	2.83 ± 0.38	1.33 ± 0.76	1.00 ± 0.41
GEL	$2.60 \pm 0.50^*$	2.79 ± 0.41	1.38 ± 0.50	0.83 ± 0.48
GELPG	$2.40 \pm 0.50^{***}$	$2.50 \pm 0.51^*$	$1.06 \pm 0.56^{**}$	$0.29 \pm 0.46^{***}$

* Significantly different from CTR ($p < 0.05$); ** Significantly different from CTR ($p < 0.01$); *** Significantly different from CTR (0.001).

3.5. Morphological analysis of the collagenization.

At three days, all the groups presented scanty deposition of thin delicate reticular-arranged collagen fibrils with greenish birefringence, consistent with type III collagen. After seven days, although all the groups presented marked increase in the collagen content, the fibrils were still reticular-arranged in CTR and GEL but disposed in parallel arrangement in GELPG; moreover, the fibrils with greenish birefringence were predominant in CTR and GEL, whereas in GELPG it was possible to identify the presence of yellow and orange fibrils, compatible with type I collagen. After 14 days, there was full replacement of the thin delicate type III for gross thicker type I collagen in the three groups, which sustained the parallel arrangement in CTR and GEL in opposition to the slightly interlaced disposition observed in GELPG. Finally, at day 21, all the groups exhibited a dense interlaced network of gross type I collagen. Nevertheless, the fibers appeared to be thicker and grosser in GELPG, resembling the normal dermal collagen appearance (figure 7).

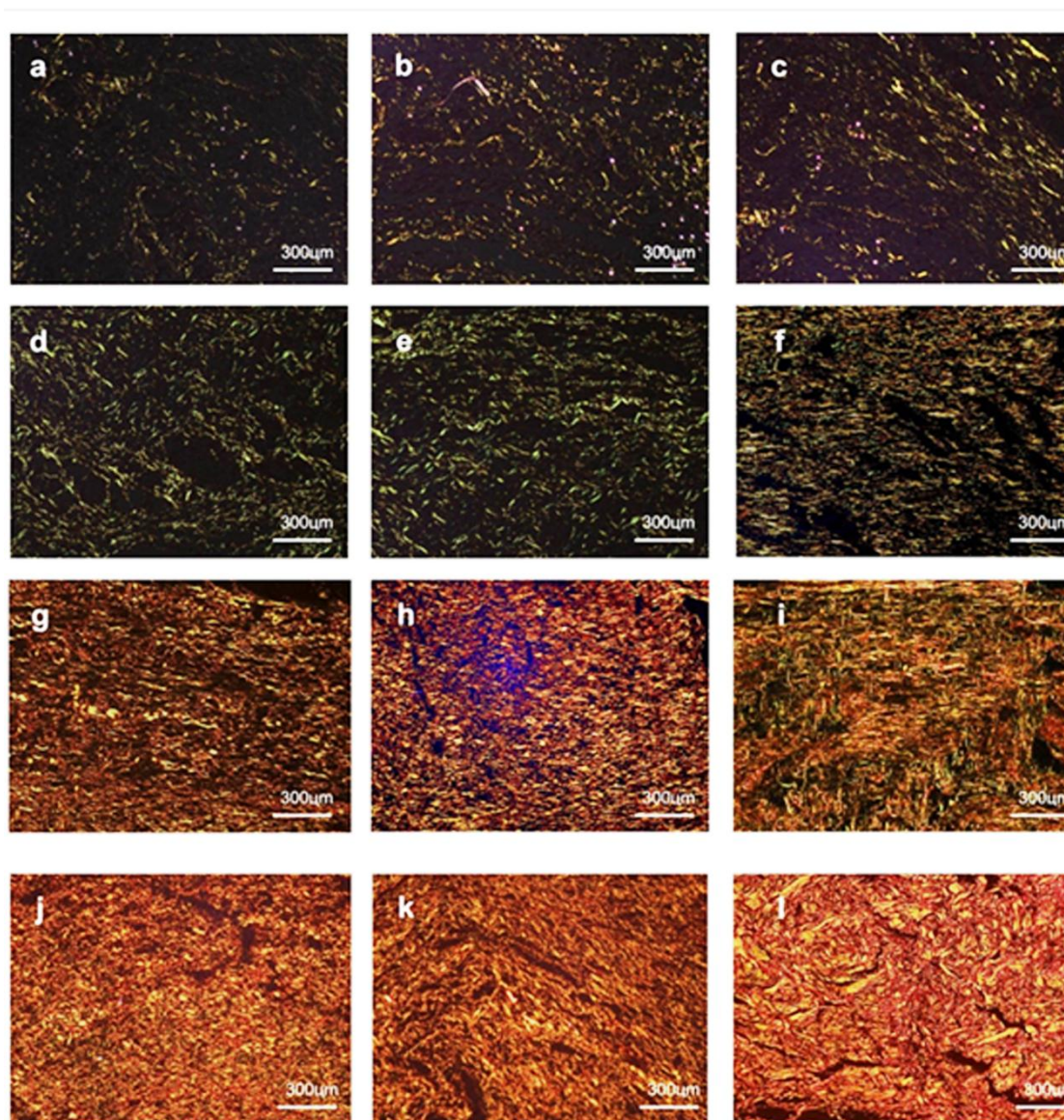


Figure 7. Histological sections of the groups (wounded areas) over the time course of the wound healing biological assay. At three days, scanty deposition of greenish type III collagen observed in CTR (a), GEL (b) and GELPG (c). At seven days, reticular type III collagen are evidenced in CTR (d) and GEL (e), and parallel type I collagen is seen in GELPG (f). At 14 days, densely disposed parallel type I collagen is observed in CTR (g) and GEL (h), whereas in GELPG (i), the fibers showed a slight interlaced disposition. At 21 days, gross interlaced type I collagen fibers are seen in all the groups, but they were less compacted in CTR (j) and GEL (k) than in GELPG (l) (Sirius Red/polarized light, 400 x magnifications).

4. Discussion

The major chemical compounds obtained by HPLC-MS were gallic acid, ellagic acid, punicalagin α and punicalagin β . The identification of the same chemical

constituents of the aqueous extract *Punica granatum* were recently reported (Romani et al., 2012).

In this study, the highest yield was obtained with aqueous extraction at high temperature (Figure 1), whereas the aqueous extract at 25°C presented the lowest one. It is clear that the extraction yield has been affected by the extraction temperature. The favorable effect of temperature on the extraction yield may be explained by the increase in solubility and equilibrium conditions as well as higher mass transfer rates by the diffusion of solvent and solutes from the solid particle into the liquid media. These effects could compensate the influence of high extractive temperature avoiding the thermal degradation of phenols. When compared extractions at the same temperature, the methanol appears to be a better solvent than water, probably due to the affinity with the organic structure of the studied chemical compounds.

Gallic acid and ellagic acid were quantified in the dry extract. These compounds are classified as tannins of high polarity, which promoted their easier extraction with polar solvents. The best yields of these compounds were 54.09 mg/g for ellagic acid observed in HME obtained at 25°C and 32.24 mg/g for gallic acid in the AEPG100. Wang et al. (2013) extracting from pomegranate leaves found that the optimum extraction condition was 80 °C, 61% ethanol and 60 min, obtaining crude extract yield 42.8%. This value is similar to the present work results.

We found that AEPG100 presented high antioxidant activity at very low concentrations. Wang et al. (2013) found high values, above 40%, DPPH radical scavenging activity of pomegranate leaves extracts in the concentration range 0.2-0.33 mg/mL. These values are two hundred times greater than those found in the present work with pomegranate peels aqueous extracts, and points to the better antioxidant potential of pomegranate peel when compared with the pomegranate leaves. Aqil et al. (2012), working with aqueous extract of pomegranate peels, found IC_{50} in turn of 17 $\mu\text{g/mL}$, still greater than the 1.715 $\mu\text{g/mL}$ found in the present work with extraction temperature of 100°C. This value ratifies the high antioxidant potential of this natural product.

Previous studies have demonstrated that different extracts of *Punica granatum* are able to improve wound healing (Hayouni et al., 2011; Rajput et al., 2011). As in this study AEPG100 was shown to present the highest yield, we

evaluated the healing effects of this extract incorporated into gelatin-based membranes applied as wound dressings. The use of protein-based membranes as controlled systems to deliver natural products (Albuquerque-Júnior et al., 2009) and isolated chemical compounds (Riella et al., 2012) is well established, but no study using *Punica granatum* extract has been previously reported.

We found that the application of AEPG-incorporated gelatin-based wound dressing significantly increased the wound contraction rates over all the time course of the experiment. Supporting our data, other plant extracts rich in antioxidant compounds, such as gallic and ellagic acids, has been proved to improve wound contraction (Estakhr, Javdan, 2011; Shiban et al., 2012). It has been proposed that, in wound healing assays, the wound contraction rates represent one of the most valuable parameters to evaluate the evolution and success of the wound repair (Nunes et al., 2011; Riella et al., 2012). However, the precise mechanism underlying the effects of the AEPG100 in the wound contraction rates has not been elucidated. Wound contraction has been associated to the activity of myofibroblast, which are fibroblasts that acquired a contractile phenotype induced by transforming growth factor beta (TGF- β). Thus, the increased wound contraction rates observed in GELPG over the time-course of the experiment suggest a possible stimulatory role played by AEPG100 on the myofibroblast differentiation. Although studies *in vitro* have demonstrated that ellagic acid inhibits α -SMA expression and trans-differentiation to myofibroblast like cells (Suzuki *et al.*, 2009), there are very few information about the role played by the other major compounds of the AEPG (gallic acid, punicalagina α and punicalagina β) on the TGF- β synthesis and myofibroblasts differentiation. Therefore, further investigations are still necessary in order to clarify the role played by the major chemical compounds of the AEPG on the wound contraction rates improvement.

In this study, the incorporation of aqueous extract of *Punica granatum* into the gelatin based dressing membranes promoted major histological changes in the dynamics of wound healing, represented by lower intensity of the inflammatory response, particularly the neutrophils content, improvement in the granulation tissue and better collagenization. Since the extract presented high antioxidant properties, it is possible to suppose a relationship between the improved wound healing histological features and the reduction of the oxidative stress in the injured tissues.

In fact, oxygen-free radicals derived from the activated neutrophils are supposed to induce oxidative-stress-related tissue damage and delay wound healing (Schäfer, Werner, 2008). On the other hand, it has been previously reported that gallic acid, one of the major compounds of the AEPG, augments local levels of prostaglandins (PGs) during acute neutrophils-rich inflammatory response, and such enhancement is known to inhibit neutrophils-mediated free radical generation (Gryglewski et al., 1987). Furthermore, ellagic acid has been reported to reduce the oxidative stress induced by other types of dermal injuries, such as UVA radiation (Hseu et al., 2012) and isoproterenol (Kannan, Quine, 2011). Therefore, it is possible to suggest that oxidative stress was assuaged in the wounds dressed with AEPG-incorporated gelatin-based membranes.

We also found that neutrophils content was reduced at the first time of the experiment (inflammatory phase). Such findings might be also related to the biological effects promoted by the chemical compounds of the AEPG. In this sense, significant decreases of the myeloperoxidase (MPO) activity, a well-established marker of neutrophils infiltration, has been recently reported in gastrointestinal damaged tissues in response to the treatment with both ellagic (El-Boghdady, 2011) and gallic acid (Chatterjee et al., 2012). Therefore, the control of the neutrophils content in the inflammatory phase, and consequent minimization of the oxidative stress, by the high content of ellagic and gallic acid present in the AEPG might be instrumental in the wound healing improvement observed in this study.

We demonstrated that the inflammatory response observed in the histological sections of the wounds dressed with AEPG-incorporated membranes was significantly reduced. These data are likely result of the anti-inflammatory effects exerted by the peel-derived AEPG (Lee et al., 2010; Kumar et al., 2011). Furthermore, *in vitro* and *in vivo* studies have demonstrated a potent anti-inflammatory activity exerted by the major chemical compounds of the extract, such as ellagic acid (Corbett et al., 2010), gallic acid (Deng et al., 2012) and punicalagin (Lin et al., 1999).

Based on histological parameters, the granulation tissue development was improved by the use of AEPG-incorporated membranes. Moreover, these membranes also induced a more regular and dense collagen arrangement of the collagen fibers over the time course of the experiment, suggesting that this extract

might also favored fibroblastic proliferation and collagen deposition. Supporting our findings, the topical treatment with aqueous extract of *Punica granatum* peel have been previously demonstrated to promote significant increase in the dry granulation tissue weight and granulation tissue breaking strength, as well as in the levels of hydroxyproline content, suggesting increased collagenization rates and stabilization of the collagen fibers (Adiga et al., 2010). In addition, similar histological data have been demonstrated using different extracts of *Punica granatum*, such as ethanolic (Pirbalouti et al., 2010) and hydroalcoholic extracts (Hayouni et al., 2011). Considering the relevance of the granulation tissue and collagenization pattern for the success of wound healing in experimental models (Diegelmann, Evans, 2004), it is possible to suggest that the AEPG favored the development of these key events of the wound healing repair. Notwithstanding, as we provided evidence that the AEPG may affect the fibroblastic dynamics, it is important to highlight that no gross or morphological sign of collagen overproduction, resulting in hypertrophic scar formation was observed in this study, either on macroscopic or microscopic analysis. This characteristic seems to be positive for the healing process, since a long-term stimulation of fibroblast might lead to unsightly scar formation (Riella et al., 2012).

Earlier reepithelization of the wound surfaces and development of cutaneous appendages were observed in the wounds dressed with AEPG-incorporated membranes. These findings are suggestive that the chemical compounds play an important role in the proliferation of keratinocytes, as well as the differentiation of such epidermal cells into cutaneous appendages. Supporting our findings, tannic acids has been previously proved to induce keratinocytes proliferation *in vitro* (Feliciani et al., 2007). Therefore, it is possible to suggest that the GELPG membranes improved keratinocytes maturation and differentiation, accelerating the recovery of the epidermal tissue and restoration of the cutaneous appendages. In addition, It has been already established that the increased activity of the heme-oxygenase 1 (HO-1), an enzyme whose up-regulated activity is closely related to the antioxidant effects of different chemical compounds, is able to induce keratinocytes proliferation (Clark et al., 1997). Thus, we hypothesize that the improvement in the epithelization and earlier reconstitution of the cutaneous appendages may also be related to the antioxidant effects of the AEPG incorporated into the dressing membranes.

5. Conclusion

In conclusion, we demonstrated that the aqueous extract of *Punica granatum* Linn exhibits potent antioxidant effects and the incorporation of this natural product into gelatin-based dressing films was successful in improving wound healing. Thereby, the healing effects of the peel of *Punica granatum* Linn in popular medicine practices may be related to the presence of gallic acid, ellagic acid and punicalagin as major components in the aqueous extract. Therefore, we suggest that dressing membranes containing this extract is a promising natural product to be used in the treatment of chronic wounds.

Acknowledgements

The authors than the Foundation for Research and Technological Innovation Support from Sergipe/Brazil (FAPITEC/SE) for the financial support.

References

1. Adiga, S., Tomar, P., Rajput, R.R., 2010. Effect Of *Punica Granatum* Peel Aqueous Extract On Normal And Dexamethasone Suppressed Wound Healing In Wistar Rats. *Int J Pharm Sci Rev Res.* 5, 34-37.
2. Afaq, F., Zaid, M.A., Khan, N., Dreher, M., Mukhtar, H., 2009. Protective effect of pomegranate-derived products on UVB-mediated damage in human reconstituted skin. *Exp Dermatol.* 18, 553-561.
3. Albuquerque Junior, R.L.C., Barreto, A.L.S., Pires, J.A., Reis, F.P., Lima, S. O., Ribeiro, M.A.G., Cardoso, J.C., 2009. Effect of bovine type-I collagen-based films containing red propolis on dermal wound healing in rodent model. *International Journal of Morphology.* 27, 1105-1110.
4. Aqil, F., Munagala, R., Vadhanam, M.V., Kausar, H., Jeyabalan, J., Schultz, D.J., Gupta, R.C., 2012. Anti-proliferative activity and protection against oxidative DNA damage by punicalagin isolated from pomegranate husk. *Food Research International.* 49, 345-353.

5. Aslam, M.N., Lansky, E.P., Varani, J., 2006. Pomegranate as a cosmeceutical source: pomegranate fractions promote proliferation and procollagen synthesis and inhibit matrix metalloproteinase-1 production in human skin cells. *J Ethnopharmacol.* 103, 311-318.
6. Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S., 2006. Phenolic Compounds in Plants and Agri-Industrial By-Products: Antioxidant Activity, Occurrence, and Potential Uses. *Food Chemistry.* 99, 191-203.
7. Chatterjee, A., Chatterjee, S., Biswas, A., Bhattacharya, S., Chattopadhyay, S., Bandyopadhyay, S.K., 2012. Gallic Acid Enriched Fraction of *Phyllanthus emblica* Potentiates Indomethacin-Induced Gastric Ulcer Healing via e-NOS-Dependent Pathway. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012, Article ID 487380, 1-13.
8. Clark, J.E., Green, C.J., Motterlin, R., 1997. Involvement of the Heme Oxygenase–Carbon Monoxide Pathway in Keratinocyte Proliferation. *Biochem Biophys Res Commun.* 251, 215-220.
9. Corbett, S., Daniel, J., Drayton, R., Field, M., Steinhardt, R., Garrett, N., 2010. Evaluation of the anti-inflammatory effects of ellagic acid. *J Perianesth Nurs.* 25, 214-220.
10. Deng, H., Fang, Y., 2012. Anti-inflammatory gallic Acid and wedelolactone are G protein-coupled receptor-35 agonists. *Pharmacology.* 89, 211-219.
11. Dhandapani, R., Sabna, B., 2008. Phytochemical constituents of some Indian medicinal plants. *Anc Sci Life.* 27, 1–8.
12. Diegelmann, R.F., Evans, C.M., 2004. Wound healing an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Frontiers in Bioscience.* 9, 283-89.
13. El-Boghdady, N.A., 2011. Protective effect of ellagic acid and pumpkin seed oil against methotrexate-induced small intestine damage in rats. *Indian J Biochem Biophys.* 48, 380-387.
14. Estakhr, J., Javdan, A., 2011. Evaluation of Wound Healing Activity of *Salvia Hypoleuca* Extract on Rats. *Pharmacologyonline* 3, 622-625.
15. Feliciani, C., Ruocco, E., Zampetti, A., Toto, P., Amerio, P., Tulli, A., Amerio, P., Ruocco, V., 2007. Tannic acid induces in vitro acantholysis of keratinocytes via IL-1 α and TNF- α . *Int J Immunopathol Pharmacol.* 20, 289-299.

16. Fitzmaurice, S.D., Sivamani, R.K., Isseroff, R.R., 2011. Antioxidant therapies for wound healing: a clinical guide to currently commercially available products. *Skin Pharmacol Physiol.* 24, 113-126.
17. Hayouni, E.A., Miled, K., Boubaker, S., Bellasfar, Z., Abedrabba, M., Iwaski, H., Oku, H., Matsui, T., Limam, F., Hamdi, M., 2011. Hydroalcoholic extract based-ointment from *Punica granatum* L. peels with enhanced in vivo healing potential on dermal wounds. *Phytomedicine.* 18, 976-984.
18. Hseu, Y.C., Chou, C.W., Senthil Kumar, K.J., Fu, K.T., Wang, H.M., Hsu, L.S., Kuo, Y.H., Wu, C.R., Chen, S.C., Yang, H.L., 2012. Ellagic acid protects human keratinocyte (HaCaT) cells against UVA-induced oxidative stress and apoptosis through the upregulation of the HO-1 and Nrf-2 antioxidant genes. *Food Chem Toxicol.* 50, 1245-1255.
19. Julie-Jurenka, M.T., 2008. Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum* L.): a review. *Alternative Medicine review.* 13, 128-144.
20. Kannan, M.M., Quine, S.D., 2011. Ellagic acid ameliorates isoproterenol induced oxidative stress: Evidence from electrocardiological, biochemical and histological study. *Eur J Pharmacol.* 659, 45-52.
21. Kumar, G.J., Kumar, S.S., Vimlesh, M., Kanika, P., 2011. Evaluation of anti-nociceptive and anti-inflammatory activity of *Punica granatum* seed extract. *International Research Journal of Pharmacy.* 2, 235-237.
22. Lee, Y.J., Hwang, S.M., Yoon, J.J., Lee, S.M., Kyung, E.H., Kim, J.S., Kang, D.G., Lee, H.S., 2010. Inhibitory Effect of *Thuja orientalis* on TNF- α - induced Vascular Inflammation. *Phytotherapy Research.* 24, 1489–1495.
23. Lin, C.C., Hsu, Y.F., Lin, T.C., 1999. Effects of punicalagin and punicalin on carrageenan-induced inflammation in rats. *Am J Chin Med.* 27, 371-376.
24. Madrigal-Carballo, S., Rodriguez, G., Krueger, C., Dreher, M., Reed, J., 2009. Pomegranate (*Punica granatum*) Supplements: Authenticity, Antioxidant and Polyphenols Composition. *J Funct Foods.* 1, 324-329.
25. Mazid, M., Khan, T.A., Mohammad, F., 2012. Medicinal Plants of Rural India: A Review of Use by Indian Folks. *Indo Glob J Pharm Sci.* 2, 286-304.
26. Murthy, K.N., Reddy, V.K., Veigas, J.M., Murthy, U.D., 2004. Study on wound healing activity of *Punica granatum* peel. *J Med Food.* 7, 256-259.

27. Nunes, P.S., Albuquerque-Jr, R.L.C., Cavalcante, D.R., Dantas, M.D., Cardoso, J.C.; Bezerra, M.S., Souza, J.C., Serafini, M.R., Quitans-Jr, L.J., Bonjardim, L.R., Araújo, A.A., 2011. Collagen-based films containing liposome-loaded usnic acid as dressing for dermal burn healing. *J Biomed Biotechnol.* 2011, 1-9.
28. Park, H.M., Moon, E., Kim, A.J., Kim, M.H., Lee, S., Lee, J.B., Park, Y.K., Jung, H.S., Kim, Y.B., Kim, S.Y., 2010. Extract of *Punica granatum* inhibits skin photoaging induced by UVB irradiation. *Int J Dermatol.* 49, 276-282.
29. Phillipson, J.D., 2001. Phytochemistry and medicinal plants. *Phytochemistry.* 56, 237-243.
30. Pirbalouti, A.G., Yeh, A.K., Karimi, I., 2010. The wound healing activity of flower extracts of *Punica granatum* and *Achillea kellalensis* in wistar rats. *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research.* 67, 107-110.
31. Priyadarsini, K.I., Khopde, S.M., Kumar, S.S., Mohan, H., 2002. Free radical studies of ellagic acid, a natural phenolic antioxidant. *J Agric Food Chem.* 50, 2200–2206.
32. Gryglewski, R.J., Szczeklik, A., Wandzilak, M., 1987. The effect of six prostaglandins, prostacyclin and iloprost on generation of superoxide anions by human polymorphonuclear leukocytes stimulated by zymosan or formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. *Biochemistry Pharmacology.* 36, 4209–4213.
33. Rajput, R., Sagar, V.S., Adiga, S., Ramyasudha, 2011. Effect of *Punica granatum* peel extract on burn wound healing in albino wistar rats. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology.* 2, 353-357.
34. Reddy, M., Gupta, S., Jacob, M., Khan, S., Ferreira, D., 2007. Antioxidant, Antimalarial and Antimicrobial Activities of Tannin-Rich Fractions, Ellagitannins and Phenolic Acids from *Punica granatum* L. *Planta Medica.* 73, 461-467.
35. Riella, K.R., Marinho, R.R., Santos, J.S., Pereira-Filho, R.N., Cardoso, J.C., Albuquerque-Junior, R.L.C., Thomazzi, S.M., 2012. Anti-inflammatory and cicatrizing activities of thymol, a monoterpene of the essential oil from *Lippia gracilis*, in rodents. *J Ethnopharmacol.* 143, 656-663.
36. Romani, A., Campo, M., Pinelli, P., 2012. HPLC/DAD/ESI-MS analyses and anti-radical activity of hydrolysable tannins from different vegetal species. *Food Chemistry.* 130, 214–221.

37. Schäfer, M., Werner, S., 2008. Oxidative stress in normal and impaired wound repair. *Pharmacol Res.* 58, 165-171.
38. Shibani, M.S., Al-Otaibi, M.M., Al-Zoreky, N.S., 2012. Antioxidant Activity of Pomegranate (*Punica granatum* L.) Fruit Peels. *Food and Nutrition Sciences.* 3, 991-996.
39. Soni, K., Singhai, A.K., 2012. A recent update of botanicals for wound healing activity. *Int Res J Pharm.* 3, 1-7.
40. Suzuki, N., Masamune, A., Kikuta, K., Watanabe, T., Satoh, K., Shimosegawa, T., 2009. Ellagic acid inhibits pancreatic fibrosis in male Wistar Bonn/Kobori rats. *Dig Dis Sci.* 54, 802-810.
41. Wang, C., Shi, L., Fan, L., Ding, Y., Zhao, S., Liu, Y., Ma, C., 2013. Optimization of extraction and enrichment of phenolics from pomegranate (*Punica granatum* L.) leaves. *Industrial Crops and Products.* 42, 587– 594.
42. Zaid, M.A., Afaq, F., Syed, D.N., Dreher, M., Mukhtar, H., 2007. Inhibition of UVB-mediated oxidative stress and markers of photoaging in immortalized HaCaT keratinocytes by pomegranate polyphenol extract POMx. *Photochem Photobiol.* 83, 882-888.