

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

NUBYA NASCIMENTO COSTA

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES POLIMÉRICOS
CONTENDO EXTRATO DE CASCAS DE FRUTOS DE *Punica granatum* PARA
USO COMO COBERTURA BIOATIVA NA FARMACOTERAPIA VETERINÁRIA**

ALEGRE-ES

2021

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES POLIMÉRICOS
CONTENDO EXTRATO DE CASCAS DE FRUTOS DE *Punica granatum* PARA
USO COMO COBERTURA BIOATIVA NA FARMACOTERAPIA VETERINÁRIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em Diagnóstico e Terapêutica das Enfermidades Clínico-cirúrgicas.

Orientador(a): Prof^a. Dr^a.: Janaína Cecília Oliveira Villanova

Co-orientador(a): Prof^a. Dr^a.: Juliana Alves Resende

ALEGRE-ES

2021

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

C837d Costa, Nubya Nascimento, 1992-
Desenvolvimento e caracterização de filmes poliméricos contendo extrato de cascas de frutos de *Punica granatum* para uso como cobertura bioativa na farmacoterapia veterinária / Nubya Nascimento Costa. - 2021.
84 f. : il.

Orientadora: Janaina Cecília Oliveira Villanova.

Coorientadora: Juliana Alves Resende.

Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias.

1. Cicatrização de ferimentos. 2. Curativos. 3. Compostos bioativos das plantas. 4. Farmacotécnica veterinária. 5. *Punica granatum*. 6. Filmes poliméricos. I. Villanova, Janaina Cecília Oliveira. II. Resende, Juliana Alves. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. IV. Título.


CDU: 619

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES POLIMÉRICOS
CONTENDO EXTRATO DE CASCAS DE FRUTOS DE *Punica granatum* PARA
USO COMO COBERTURA BIOATIVA NA FARMACOTERAPIA VETERINÁRIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em Diagnóstico e terapêutica das enfermidades clínico-cirúrgicas.

Aprovada em 24 de maio de 2021.

COMISSÃO EXAMINADORA



Prof^a. Dr^a. Janaina C. O. Villanova

Universidade Federal do Espírito Santo

Orientadora



Prof^a. Dr^a Juliana Alves Resende

Universidade Federal do Espírito Santo

Co-orientadora



Prof^a. Dr^a. Mariana D. C. Ignacchiti

Universidade Federal do Espírito Santo

Membro Externo



Prof^a. Dr^a. Lilian Gasparelli Carreira

Universidade Federal do Espírito Santo

Membro Externo

Dedico esse trabalho á um grande amigo e companheiro de laboratório, Sanderson. Você deixou uma imensa saudade e inúmeros ensinamentos, principalmente, o de que devemos viver ao máximo, sempre sorrindo. Que você continue brilhando, onde estiver.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, meu auxílio, por ter sido meu alicerce e não ter permitido desistir. Sem Ti, eu nada seria.

As minhas grandes incentivadoras, Lourdes (mãe), Rosa (madrinha) e Nayara (irmã), minha eterna gratidão por proporcionarem a oportunidade de seguir meus sonhos, sempre me apoiando em todas as decisões, por serem os melhores exemplos de como ser mulher e mãe que eu poderia ter, sem vocês nada disso seria possível.

Ao Murilo, meu filho, obrigada por todo companheirismo e por todo amor. Eu te amo imensamente.

Aos meus sobrinhos, Yago, Maria Eduarda, Ana Luiza, Heitor, Bernardo, Anna Luiza, Alice e Maria Clara, obrigada por ter feito meus dias mais leves e por tanto amor.

Aos meus anjos da guarda, que sempre me protegem Cid (pai) e José (padrinho) (*in memoriam*).

Às minhas irmãs de coração e alma, Polly e Lalá, obrigada por se doarem tanto para mim e pela nossa Família.

Aos meus amores, presentes de Alegre que eu levarei por toda a minha vida, obrigada por todos os momentos, dentro e fora do laboratório, sem vocês não teria a menor graça, o meu agradecimento principalmente à Sthefany, Geanne, Alice, Maria Paula, Carlos, Elder, Thais, Daiana, Iara.

À Janaina pela orientação, dedicação e confiança em mim, por toda paciência durante os anos, por todas as oportunidades e por nunca ter desistido de mim. Por isso serei eternamente grata.

À todos os professores com os quais obtive grandes ensinamentos, em especial professoras Juliana Alves e Juliana Severi, por todo auxílio e oportunidade de aprendizado, principalmente em como ter ética, profissionalismo e muito amor à profissão.

À Universidade Federal do Espírito Santo, ao curso de Farmácia, ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, por proporcionarem a ciência, sem ciência não há educação e não há vida.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - "Código de Financiamento 001".

Confie no Senhor e ele o ajudará; seja reto o seu caminho e espere no Senhor.

Eclesiástico, 2:6

RESUMO

COSTA, NUBYA NASCIMENTO. **DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES POLIMÉRICOS CONTENDO EXTRATO DE CASCAS DE FRUTOS DE *Punica granatum* PARA USO COMO COBERTURA BIOATIVA NA FARMACOTERAPIA VETERINÁRIA.** Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2021.

Assim como a busca por compostos bioativos provenientes de plantas medicinais para uso cicatrizante, o desenvolvimento de novas formas farmacêuticas para veicular os mesmos é uma demanda crescente na atualidade. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo, produzir filmes poliméricos baseados em blendas entre opoli(álcool vinílico) (PVA), amido de milho e o poli(ácido acrílico) (PAA), contendo extrato seco total das cascas de *Punica granatum* (romã) (ESTCR), com vistas ao uso como cobertura bioativa na farmacoterapia veterinária. O trabalho foi desenvolvido em duas etapas. Na primeira, após determinação da concentração inibitória mínima do ESTCR sobre cepas de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e um fungo e, definição da melhor concentração do extrato nas formulações, foram preparados filmes com diferentes proporções dos polímeros, que foram caracterizados por análises térmicas (DSC e TG/DTG) e tiveram as propriedades de barreira pesquisadas. Ainda, a biocompatibilidade e a capacidade cicatrizante foram preliminarmente avaliadas empregando técnicas *in vitro*. A partir da análise dos dados, foi eleita a melhor formulação, preparada a partir dos polímeros na razão 75:15:10 (PVA/amido/PAA) e na presença de 1,25% p/p do extrato. Na segunda etapa, a melhor formulação, foi submetida à ensaios complementares de caracterização físico-química por microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e difração de raios X (DRX); ensaios de tração, para pesquisa das propriedades mecânicas; e, a testes de disco-difusão, para avaliação da atividade antifúngica. Foram obtidos filmes lisos, transparentes, brilhantes, de cor amarelo-clara, sem a presença de domínios quando avaliados visualmente. As diferentes proporções dos polímeros nas blendas provocou alterações nas características estudadas dos filmes. A blenda PVA:S:PAA:PPE4 originou um filme liso, transparente, livre de domínio e sem separação de fases. Além

disso, o filme apresentou propriedades de barreira adequadas para o uso como cobertura bioativa. Quando submetido ao ensaio de atividade hemolítica *in vitro*, o filme se mostrou não hemolítico e biocompatível. Além da confirmação da atividade antibacteriana sobre as cepas pesquisadas, os filmes foram eficientes em promover a proliferação celular *in vitro*, em 48 h, sem citotoxicidade. Análises complementares no filme eleito (PVA:S:PAA:PPE4) comprovaram a existência de interações químicas entre os componentes do extrato e os polímeros, contribuindo para a formação de filmes íntegros, uniformes, resistentes ao manuseio e com propriedades mecânicas consideradas apropriadas para o uso como coberturas bioativas. Análises das fotomicrografias das superfícies fraturadas apontam a presença de descontinuidades na matriz, justificando a pequena redução observada nos parâmetros de resistência mecânica quando comparados aos valores para o filme sem extrato. A alteração na organização das cadeias poliméricas também foi confirmada por DRX. Finalmente, os filmes com extrato apresentaram atividade antifúngica sobre a cepa estudada *Candida albicans*. A análise conjunta de todos os resultados permite inferir que o filme PVA:S:PAA:PPE4, preparado a partir dos polímeros na proporção 75:15:10 (PVA:amido:PAA) contendo o ESTCR na concentração de 1,25% p/p é potencialmente útil para o uso como cobertura bioativa.

Palavras-chave: *Punica granatum*, filme polimérico, cobertura bioativa, biocompatibilidade, propriedades de barreira, atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

COSTA, NUBYA NASCIMENTO. DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF POLYMERIC FILMS CONTAINING *Punica granatum* PEELS EXTRACT FOR USE AS A BIOACTIVE WOUND DRESSING IN VETERINARY PHARMACOTHERAPY.

Dissertation. (Master's Degree in Veterinary Science) - Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2021.

ABSTRACT

As well as the search for bioactive compounds from medicinal plants with healing activity, the development of new pharmaceutical dosage forms to convey them is a growing demand. In this context, the present work aimed to produce polymeric films based on blends between poly(vinyl alcohol) (PVA), corn starch and poly (acrylic acid) (PAA), containing total dry extract of *Punica granatum* (pomegranate) peels (ESTCR), to use as bioactive wound dressing in veterinary pharmacotherapy. The work was carried out in two stages. In the first phase, the minimum inhibitory concentration of ESTCR on Gram-positive and Gram-negative bacteria strains and a fungus and, the best concentration of the extract in films prepared by solvent casting with different proportions of polymers were defined. The films were characterized by thermal analysis (DSC and TG/DTG) and their barrier properties were evaluated. Furthermore, biocompatibility and healing activity were preliminarily evaluated using *in vitro* techniques. From the data analysis, the best formulation was chosen, prepared from polymers in the 75:15:10 ratio (PVA/starch/PAA) and in the presence of 1.25% w/w of the extract. In the second phase, the best formulation was submitted to complementary tests of physicochemical characterization: scanning electron microscopy (SEM), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and X-ray diffraction (XRD); tensile tests to investigate mechanical properties; and, to disc diffusion tests, to evaluate the antifungal activity. Were obtained smooth, transparent, bright, light yellow films, without the presence of domains when evaluated visually. The different proportions of polymers in the formulations caused changes in the studied characteristics of the films. The PVA:S:PAA:PPE4 produced a smooth, transparent film, free of domination and without phase separation. Furthermore, the film showed barrier properties appropriate for use as a bioactive wound dressing. When submitted to the *in vitro* hemolytic activity

assay, the film proved to be non-hemolytic and biocompatible. In addition to the antibacterial activity on the strains studied, the films were efficient in promoting cell proliferation *in vitro*, within 48 h, without cytotoxicity. Complementary analysis in the chosen film (PVA:S:PAA:PPE4) proved the existence of interactions between the extract components and the polymers, contributing to the formation of uniform, handling-resistant films with mechanical properties necessary for use as bioactive covers. Analysis of the photomicrographs of the fractured surfaces point to the presence of discontinuities in the matrix, justifying the small reduction observed in the parameters of mechanical resistance when compared to the values for the film without extract. The change in the organization of polymer chains was also confirmed by XRD. Finally, films with extract showed antifungal activity on the studied *Candida albicans* strain. The analysis of all results allows us to infer that the film PVA:S:PAA:PPE4, prepared from polymers in the proportion 75:15:10 (PVA:starch:PAA) containing ESTCR at a concentration of 1.25% w/w is potentially useful for use as a bioactive cover.

Keywords: *Punica granatum*, polymeric film, bioactive wound dressing, biocompatibility, barrier properties, antimicrobial activity.

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	As camadas da pele	17
Figura 2	Fases da cicatrização de feridas em dias	20
Figura 3	Imagem representativa de um (A) fruto de romã e seus componentes anatômicos; (B) das sementes do fruto; (C) das cascas de romã secas ao sol; e, (D) do pó grosseiro das cascas	31
Capítulo 2		
Figura 1	Imagens representativas do filme puro (A) e do filme contendo o ESTCR a 1,25% p/p (B)	69
Figura 2	Espectros FTIR-ATR do ESTCR (a), do filme puro (b) e do filme contendo ESTCR (c)	70
Figura 3	Difratogramas obtidos para o filme puro (a) e com ESTCR (b) obtidos a 2θ , entre 2 e 50°	71
Figura 4	Fotomicrografias das seções transversais fraturadas dos filmes puros (direita) e contendo ESTCR (esquerda), com aumento de 500 X (barra de escala: 50 μm)	72
Figura 5	Teste de disco-difusão de filmes com ESTCR a 1,25% p/p (1, 2 e 3 - triplicata) e filmes puros (4, 5 e 6 - triplicata), frente a <i>C. albicans</i>	76

LISTA DE TABELAS

		Página
Tabela 1	Resistência a tração, alongamento e módulo de para os filmes (PVA:S:PAA) e (PVA:S:PAAE) 1,25% p/p	73
Tabela 2	Atividade antifungica do extrato de romã frente a <i>Candida albicans</i> (ATCC 24.433)	74

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANOVA	Técnica estatística para avaliar análises de variâncias
ATCC	Coleção de Culturas de Micro-organismos Norte Americana (do inglês, American Type Culture Colletion)
BHI	<i>Brain heart infusion</i>
XRD	Difração de raios X
ESTCR	Extrato seco total de casca de romã
FT-IR	Espectroscopia de absorção no Infravermelho com Transformada de Fourier
SEM	Microscopia eletrônica de varredura
MHA	Ágar Mueller-Hinton
PAA	Poli(ácido acrílico)
PVA	Poli(álcool vinílico)
UFC	Unidade formadora de colônias
UFC/MI	Unidade formadora de colônias por mililitro
RENISUS	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde
IFAs	Ingredientes Farmacologicamente ativos
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
TS	Resistência à tração
E	Módulo de elasticidade
%EB	Alongamento na ruptura

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 Pele e cicatrização de feridas em animais	17
2.2 Coberturas bioativas.	22
2.3 Compostos bioativos na cicatrização de feridas.....	26
2.3.1 <i>Punica granatum</i> L	30
3. OBJETIVOS	35
REFERÊNCIAS.....	36
CAPÍTULO 1	46
Polymeric films containing pomegranate peel extract based on PVA/starch/PAA blends for use as wound dressing: <i>In vitro</i> analysis and physicochemical evaluation	
CAPÍTULO 2	60
Filme polimérico contendo extrato de casca de romã: pesquisa da composição, organização cristalina, resistência mecânica e atividade antifúngica sobre <i>Candida albicans</i>	

1. INTRODUÇÃO

Úlceras ou feridas cutâneas são lesões caracterizadas pela descontinuidade da pele, podendo ser obtidas por processos físicos, mecânicos, químicos, microbiológicos ou patológicos. As feridas cutâneas crônicas são as causas mais frequentes na rotina da clínica veterinária, decorrentes principalmente de mordidas, acidentes automobilísticos e queimaduras que acometem em sua maioria os animais de companhia (CAPELLA, 2020; PAVLETIC, 2018). Podem ser classificadas considerando vários critérios, entre eles, se são internas (fechadas) ou externas (abertas), a extensão da área lesionada, a existência ou não de infecção, o tempo de curso da cicatrização e a origem da ferida (trauma, abrasão, avulsão, incisão, laceração, punção). Conhecer o tipo de lesão auxilia na escolha do melhor tratamento, bem como na decisão sobre a utilização de terapia medicamentosa local ou sistêmica (RODRIGUES, 2015; SANTOS, 2018).

Entre as intervenções disponíveis na medicina veterinária para o tratamento de lesões com maior tempo de evolução, extensão e comprometimento tecidual, o tratamento farmacológico é fundamentado no uso de antimicrobianos, anti-inflamatórios, enzimas debridantes, imunomoduladores e substâncias adsorvedoras de secreções, principalmente, incorporados em formas farmacêuticas convencionais, como pó, solução, suspensão, creme, loção, pomada e gel. Após aplicação do medicamento, as feridas devem ser recobertas e devem ser realizadas trocas dos curativos, durante as quais ocorre tanto remoção quanto reaplicação dos produtos, podendo causar dor e desconforto para os animais. Assim, a seleção da forma farmacêutica que promoverá maior conforto para o animal, com redução da dor e, facilidade de manejo para o tutor, deve ser considerada (CAMPBELL, 2006).

O desenvolvimento de alternativas farmacêuticas, capazes de favorecer o processo de cicatrização com a finalidade de diminuir o tempo do tratamento e visando o favorecimento do bem-estar animal, tem sido objeto de várias pesquisas (BATISTA, 2017; COSTA et al, 2020; DUTRA et al., 2017; SOUZA, 2020; OZAKI; DUARTE, 2006). Aliado ao desenvolvimento de novas formas farmacêuticas, a busca por compostos bioativos oriundos de plantas medicinais em substituição aos fármacos sintéticos vem crescendo na medicina humana, permitindo o uso também na terapêutica veterinária (NASCIMENTO, 2020).

Entre as plantas medicinais de interesse figura a romãzeira, cujo nome científico é *Punica granatum L.*, uma planta arbustiva, pertencente à família Punicaceae, que possui monografia incluída na Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse ao Sistema único de Saúde (RENISUS) (BRASIL, 2009). Há relatos do uso de óleos essenciais e extratos obtidos a partir de diferentes partes da romãzeira, incluindo a flor, folhas, cascas da árvore, cascas dos frutos e suas sementes visando diferentes ações farmacológicas, entre elas, a antimicrobiana e a cicatrizante (ARAÚJO et al., 2018; FAZIO; GONÇALVES; HOFFMANN, 2009; LIN; ZHONG; SANTIAGO, 2018; SOUSA et al., 2018).

Neste cenário, o objetivo do presente trabalho foi preparar filmes baseados em blendas entre os polímeros poli(álcool vinílico), amido de milho e poli(ácido acrílico), contendo extrato seco total da casca de romã, com vistas ao uso como cobertura bioativa para o tratamento de feridas em cães. Os filmes preparados pela técnica de moldagem e evaporação de solvente foram submetidos a ensaios de caracterização físico-química por microscopia eletrônica de varredura (SEM), espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR-ATR), análises térmicas (DSC e TG/DTG), difração de raios X (XRD) e ensaios de tração para avaliação das propriedades mecânicas. As propriedades de barreira dos filmes foram estudadas mediante avaliação do ângulo de contato, capacidade de inchamento, perda de massa e taxa de transmissão de vapor d'água. Nos filmes, foram pesquisadas, a biocompatibilidade e a atividade cicatrizante, empregando métodos *in vitro*. Por fim, a eficiência da inibição do crescimento de cepas de bactérias e um fungo foram avaliadas *in vitro*, empregando teste de disco-difusão.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Pele e cicatrização de feridas em cães

A pele é o órgão que recobre toda a superfície do corpo animal e representa de 10 a 20% do seu peso corporal sendo responsável por regular importantes funções do organismo tais como termorregulação, percepção sensorial, produção de vitamina D e função de barreira protetora, protegendo o corpo da invasão de microrganismos e da perda de água, evitando trocas entre o organismo e o meio externo (ALVES FILHO; CABREIRA; AMARAL, 2016; BERNARDO; SANTOS; SILVA, 2019; GOMES; OTHERO, 2016; KOZLOWSKA et al., 2020; LIN; ZHONG; SANTIAGO, 2018).

A pele é dividida em três partes: a epiderme, a derme e o tecido conjuntivo, como esquematizado na Figura 1.

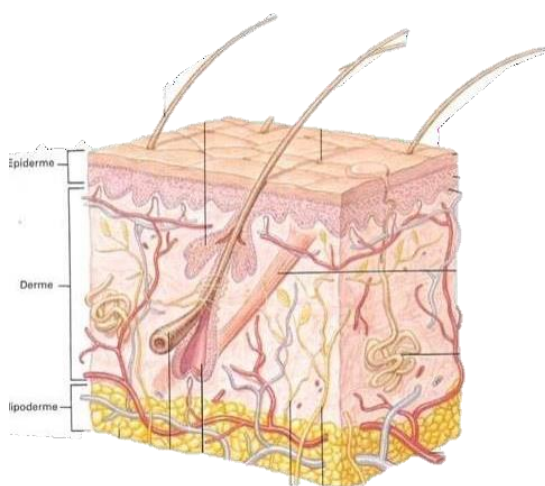


Figura 1. As camadas da pele (Adaptada de VAN DE GRAAFF, 2003).

A parte mais externa é denominada epiderme ou camada córnea, é constituída pelos epitélios, estratificado, pavimentoso e ceratinizado, subdividida em cinco camadas: basal ou germinativa, espinhosa, granulosa, lúcida e córnea (BLANES, 2004; SOUZA et al., 2009; VENTURA, 2018). A camada basal ou germinativa possui uma fileira única em forma cúbica ou cilíndrica, sendo a camada mais próxima da derme. É na camada basal que se encontra os corpos celulares dos melanócitos que são os responsáveis pela pigmentação e barreira protetora contra a radiação solar. A camada basal contém também as células de Merkel, que desempenham a função de

receptores sensoriais, influenciando no ciclo do pelo, na circulação sanguínea, na produção de suor e na proliferação dos queratinócitos (BLANES, 2004; KUHNEL, 2005; SOUZA et al., 2009). Logo acima do estrato basal, encontra-se os estratos intermediários: espinhoso e granuloso que dispõem de números de camadas que variam em relação a região do corpo. O estrato espinhoso possui formato pavimentoso e pontes intercelulares, que ligam as células. É nessa camada que estão presentes as células de Langerhans, que são importantes no sistema imunológico, participando da atividade fagocitária e do processo de apresentação de antígenos aos linfócitos T *helper*. O estrato granuloso, possui uma ou várias camadas de células rombóides ou pavimentosas que podem ser finas ou ausentes em partes do corpo que contém pelos. É no estrato granuloso que ocorre a desintegração do núcleo e dos organitos de queratinócitos decorrentes da produção final da queratina (BLANES, 2004; HARGIS E GINN, 2007; VENTURA, 2018).

Em cães e gatos, por exemplo, somente nas regiões mais espessas da pele, como suas extremidades e o plano nasal, é observada a presença do estrato lúcido, que é constituído por células translúcidas e anucleadas com formato pavimentoso (BLANES, 2004; BRAGULLA et al., 2004). O estrato córneo é a camada mais externa da pele, formada por células bem unidas, queratinizadas e anucleadas, de espessura fina variando de 3-35 μm em gatos e de 5-1.500 μm em cães, conforme as diferentes regiões do corpo. Os queratinócitos presentes na camada córnea produzem a queratina, proteínas fibrosas, que impermeabilizam a pele. Ainda na maioria dos animais, a epiderme é recoberta por uma cobertura impermeável, dita cutícula, que auxiliam na formação e na funcionalidade da pele como barreira e no equilíbrio hidroeletrólítico (BLANES, 2004; VENTURA, 2018).

A nutrição e a oxigenação da epiderme são realizadas pela derme, camada adjacente à epiderme, que representa a maior porcentagem da pele. A derme tem espessura larga, é dividida em superficial e profunda e é altamente vascularizada, fornecendo nutrientes para a epiderme. A derme possui componentes que conferem elasticidade e resistência como: fibras insolúveis, colágeno, elastina, fibras solúveis, proteoglicanos e ácido hialurônico. Vasos sanguíneos e linfáticos e, terminações nervosas, se encontram inseridas na derme (FOSSUM, 2015; IGNÁCIO, 2009; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; VENTURA, 2018). Na derme estão inseridas estruturas como as glândulas sudoríparas, produtoras do suor, e as glândulas sebáceas associadas aos folículos pilosos, responsáveis pela produção do sebo que

é excretado à superfície da pele, conferindo a formação do manto hidrolipídico, que hidrata e lubrifica a pele e os pelos. O manto é a primeira linha de defesa contra a proliferação microbiana (BLANES, 2004; VENTURA, 2018).

Por fim, a camada mais interna da pele é denominada tecido conectivo ou hipoderme, sendo constituída por tecido adiposo, que se localiza entre as camadas da derme, tecidos e órgão, ligando-os. Outra função é atuar como reservatório térmico e de energia, além de permitir a termogênese e o isolamento da pele (BLANES, 2004; SOUZA et al., 2009).

A integridade de uma ou mais camadas da pele pode ser interrompida por lesões ou feridas. Feridas se caracterizam pelo rompimento da estrutura da pele e variam conforme o tipo, extensão, profundidade e duração do curso da cicatrização. Também podem provocar a perda da função de barreira protetora da pele, levando ao desequilíbrio fisiológico que pode ter como desfecho final a morte do animal (SANTOS, 2018; SIMAS, 2010). As feridas mais recorrentes em clínica veterinária são aquelas provenientes de mordidas, lacerações, queimaduras e de processos cirúrgicos e infecciosos (ARAÚJO, 2018).

A classificação das feridas se dá pelo tempo de reparação, dividindo-as em crônicas e agudas; pelas estruturas que foram comprometidas, classificadas como superficial ou profunda; e pela presença de microrganismos, sendo classificadas como contaminada ou limpa. Nas feridas nas quais não há rápida reparação, ditas crônicas, observa-se um retardamento no processo normal de cicatrização, que deve durar de 3 a 21 dias. Feridas cujo decurso seja superior a 21 podem ser consideradas crônicas e de difícil tratamento (BLANES, 2004; EBERHARDT, 2015).

O processo de cicatrização de feridas pode ocorrer por primeira intenção, quando a lesão é superficial, não há perda de tecido e as extremidades da pele permanecem justapostas uma à outra. Já a cicatrização por segunda intenção ocorre em lesões mais profundas, nas quais houve perda tecidual e as extremidades da pele ficam afastadas umas das outras, sendo necessária formação de tecido de granulação até que a contração e re-epitelização aconteçam (BLANES, 2004; BOHLING et al., 2006).

As diversas etapas do processo de cicatrização de feridas, bem como o tempo no qual ocorrem podem ser vistos na Figura 2.

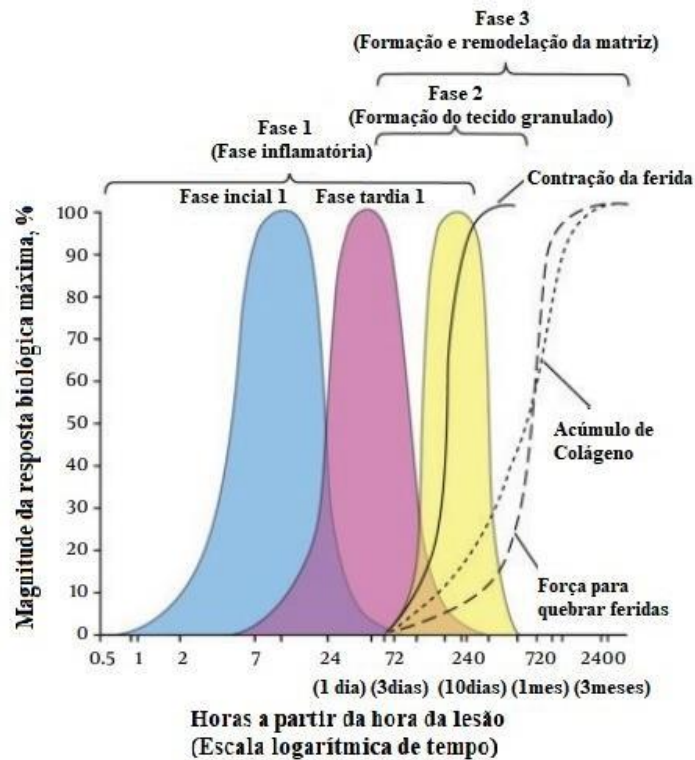


Figura 2. Fases da cicatrização de feridas em dias (Adaptado de: HASSANPOUR et al., 2019).

Após o aparecimento de uma lesão, ocorre o desencadeamento do processo de cicatrização, que se dá em três fases como visto na Figura 2. A primeira delas é a fase inflamatória, iniciada a partir do momento da ocorrência da lesão e perdurando de três a cinco dias. Nessa fase, de imediato, ocorre a vasoconstrição (5 a 10 min) que vai estabilizar a perda de fluidos, seguida pela vasodilatação, que permite a passagem de células e fluidos para o espaço extracelular. Entre os elementos dos fluidos se destacam o fibrinogênio e outros fatores coagulantes para a formação de fibrina. A agregação plaquetária e a coagulação sanguínea impedem o extravasamento sanguíneo e estabilizam as bordas das feridas. Nesta fase ocorre a síntese de fator do crescimento derivado de plaquetas e fator de crescimento transformador α e β , que irão sinalizar a formação de um novo tecido. Mediadores da secreção de leucócitos também são produzidos. Por fim, há a formação de uma matriz extracelular provisória, rica em células migratórias. Fibrina, fibronectina e vitronectina também estão presentes, além de serina, metaloproteinases e proteases. Estas últimas têm a função de degradar o tecido necrótico (PAVLETIC et al., 2018; BOHLING et al., 2006).

Após a fase inflamatória, inicia-se a etapa de formação de tecido granuloso, dando início ao reparo tecidual, chamada fase proliferativa. Esta é caracterizada pela presença de fibroblastos, acúmulo de colágeno e migração e formação de estruturas endoteliais novas, ocorrendo os processos de angiogênese, fibroplasia, epitelização e contração da ferida. A fase proliferativa ocorre entre o 5º e 20º dia após a lesão (ALBUQUERQUE-JÚNIOR et al., 2009). O tecido de granulação é macio e bem vascularizado, responsável por preencher o ferimento, sendo caracterizado pela presença de espaços vazios, com vasos exudativos e que sangram facilmente. Este tecido é responsável por fornecer uma barreira contra infecções. Nesta fase continua a proliferação e ocorre a maturação dos fibroblastos (SANTOS, 2018). A utilização de coberturas durante esta fase visa manter a superfície da ferida úmida e facilita a formação do tecido de granulação e a re-epitelização, favorecendo a contração da ferida (HOSGOOD, 2006).

A fase de maturação é a última fase do processo de cicatrização e nela ocorre a remodelação do colágeno, com a formação de fibras de colágeno mais espessas e substituição das fibras de colágeno tipo III pelo colágeno tipo I, que aumenta. Nesta etapa, o tecido ganha resistência. A deposição de colágeno está diretamente relacionada à resistência à tração exercida pela ferida (PAVLETIC et al., 2018; SANTOS, 2018).

Diferenças na anatomia cutânea de cães e gatos podem ser observadas microscopicamente, o que pode afetar a cicatrização. Enquanto a pele íntegra dos gatos possui menor perfusão e menor resistência à ruptura, na dos cães observa-se uma maior perfusão e maior resistência, o que pode estar relacionado à maior presença de colágenos nestes últimos (BOHLING et al., 2006). Ainda, na fase inflamatória, nota-se que as feridas em cães podem ser mais exudativas e edematosas do que em gatos, com formação de tecido de granulação mais pálido que nos cães. O tecido de granulação nos cães se forma em toda a área tecidual exposta, enquanto nos gatos, a partir das bordas da ferida. Portanto, a produção do tecido de granulação mais lentamente e em maior quantidade em gatos pode explicar o maior tempo para a cicatrização nestes últimos (PAVLETIC et al., 2018; BOHLING et al., 2006).

Apesar da cicatrização tecidual ser um processo natural, alguns ferimentos mais graves requerem intervenção farmacológica levando em consideração o bem-estar animal, além da diminuição da incidência de infecções (SILVA, GUEDES,

HUPPES, 2017). O retardamento do processo de cicatrização pode ocorrer por fatores ambientais ao qual o animal está submetido, bem como a fatores internos, relacionados a falta de nutrição correta, a infecções previamente obtidas, uso de outros medicações, doenças pré-existentes, entre outros (MARTINS et al., 2011). Um dos fatores que determinam o agravamento das lesões é a proliferação de microrganismos, prejudicando o processo de cicatrização e retardando a regeneração tecidual e a recuperação do animal (RODRIGUES, 2015).

Embora na maioria das vezes não seja necessária uma intervenção veterinária especializada para a cicatrização de uma ferida, há casos nos quais pode ser necessária a utilização de curativos e terapia medicamentosa local ou sistêmica. O tratamento das lesões geralmente é baseado na aplicação de gaze estéril, que serve para recobrir o machucado, em conjunto com o uso de medicamentos tópicos (PAVLETIC, 2018; TILLMANN, 2009). Por vezes, os medicamentos são necessários para ajudar a reduzir o tempo do processo cicatricial, diminuir a probabilidade de infecções generalizadas, garantindo uma cicatrização eficaz e segura, além de proporcionar ao animal um tratamento eficiente (SILVA; GUEDES; HUPPES, 2017).

2.2 Coberturas bioativas

Estudos acerca da reparação tecidual e tratamento das feridas cutâneas possuem grande relevância na medicina veterinária, especialmente, em função da grande frequência de ocorrência e pela dificuldade no tratamento (AMARAL et al., 2016). Medicamentos apresentados como formas farmacêuticas convencionais utilizados no tratamento de feridas em cães, tais como soluções, suspensões, cremes, pomadas, géis ou pós, requerem aplicação e remoção diárias sobre a ferida, o que pode ser muito doloroso e desconfortável. Algumas vezes, em função da profundidade e extensão da área lesionada, pode ser requerida a sedação do animal e/ou internação durante o tratamento (ÁVILA FILHO et al., 2015; BALSÁ; CULP, 2015; PAVLETIC, 2018). Ainda do ponto de vista clínico, feridas expostas ao ar têm maior propensão à inflamação, são mais doloridas e pruriginosas, têm crostas mais espessas e têm maior tendência em deixar cicatrizes (PAPEN et al., 2003).

Com a finalidade agregar em um mesmo produto a capacidade de atuar como barreira protetora, modificar o microambiente da ferida e promover a liberação de fármacos no leito das feridas, muito tem sido pesquisado acerca do preparo e

utilização de coberturas (passivas, interativas ou bioativas) e substitutos de pele para tratar feridas em cães.

Coberturas passivas se caracterizam como curativos que somente recobrem o ferimento, impedindo a penetração de microrganismos e infecções. São de materiais inertes como tecido, algodão e gaze e não possuem nenhum tipo de interação com as feridas. As coberturas interativas são aquelas capazes de modificar a fisiologia no microambiente das feridas, mantendo-as úmidas e otimizando a cicatrização. Já as coberturas bioativas, também chamadas *wound dressings*, são aquelas que agem também como reservatório de fármacos com o objetivo de atuar como barreira, modificar a fisiologia e tratar as feridas e favorecer a regeneração tecidual. As duas últimas podem ser oclusivas ou semi-oclusivas (BOATENG; CATANZANO, 2015; SHARMA; DUA; MALIK, 2014).

Morgan et al. (1994) compararam os efeitos de curativos oclusivos de coberturas de hidrocolóide (HC) e hidrogel (HG) aos efeitos de um curativo semi-oclusivo de polietileno (PE), sobre a cicatrização de feridas cutâneas agudas em membros anteriores de 10 cães. Todos os tratamentos resultaram em um grau semelhante de cura nos dias 4 e 7 de pós-operatório. Não houve diferenças significativas no número de feridas com grau de cicatrização maior que 90% no dia 28 de pós-operatório entre o grupo tratado com curativo HG e o grupo tratado com o curativo de PE. As feridas tratadas com a cobertura HG tiveram a maior porcentagem média de contração e maior relação contração/reepitelização nos dias 21 e 28 de pós-operatório. O pior desempenho foi observado para a cobertura HC.

Coberturas bioativas ditas ideais devem, além de proteger fisicamente o local de aplicação, remover o excesso de secreções, mantendo a temperatura no leito da ferida; permitir trocas gasosas com o meio externo; manter umidade ideal na lesão e favorecer a proliferação celular. Além disso, devem ser de fácil aplicação e remoção, sem aderir aos novos tecidos depositados; apresentar boa flexibilidade e resistência ao manuseio; permitir a visualização e o acompanhamento do progresso de cicatrização, quando não forem destinados a trocas e não provocar nenhum tipo de reação alérgica e de toxicidade (JAYAKUMAR et al., 2011; SINGH; PAL, 2012).

Na atualidade, inúmeras técnicas estão disponíveis para a preparação de coberturas bioativas na forma de filmes poliméricos, tais como, a moldagem e evaporação do solvente (*solvent-casting*), extrusão à quente (*hot-melt extrusion*), eletrospinning (*eletrospinning*), formação de filme *in situ* e impressão 3D (*3D-printing*)

(DUTRA et al., 2017; REPKA; MCGINITY, 2001). Entre estes, o processo de moldagem e evaporação de solvente é o método mais simples, barato e de fácil reprodução, podendo ser realizado em grande ou pequena escala e, permitindo a obtenção de preparações estéreis quando realizado em ambiente asséptico e a partir de insumos estéreis. O método consiste no espalhamento manual ou automatizado da solução ou suspensão polimérica previamente preparada em moldes ou sobre uma superfície lisa, seguido de evaporação do solvente por secagem em estufa ou ao ar ambiente (COSTA et al., 2020; DUTRA et al., 2017).

Além das diferentes técnicas de obtenção, há um grande número de polímeros a partir dos quais os filmes para uso como coberturas interativas e bioativas podem ser preparados, havendo relatos na literatura acerca do uso destas coberturas para tratar feridas em cães.

Ueno et al. (1999) avaliaram a eficácia de filmes de quitosana na aceleração da cicatrização de feridas induzidas em cães. Os filmes foram aplicados por 15 dias e o processo de cicatrização da ferida foi avaliado histologicamente e imunohistoquimicamente. Os autores observaram que os filmes de quitosana promoveram aceleração da infiltração de células polimorfonucleares na fase inicial da cicatrização da ferida, seguida pela produção de colágeno pelos fibroblastos.

Coelho et al. (2002) utilizaram filmes obtidos a partir de um polissacarídeo extracelular proveniente da cana-de-açúcar, preparados por um processo biotecnológico, para tratar feridas de ocorrência natural em cães, no Hospital Veterinário, da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Os autores observaram aumento do tecido de granulação, controle da infecção e diminuição do tempo de cicatrização nos animais, sendo as coberturas interativas consideradas adequadas ao uso pretendido.

Chansiripornchai et al. (2004) preparam filmes a partir de géis de polissacarídeos extraído da casca do fruto do durião (*Durio zibethinus*) e avaliaram a atividade antibacteriana e eficácia no tratamento de feridas cirúrgicas de castração ou ovariectomia em cães e gatos. Os resultados revelaram que as feridas cicatrizaram completamente quando tratadas com filme do polissacarídeo e a velocidade de cicatrização foi semelhante ao tratamento convencional com iodopovidona.

Yang et al. (2011) preparam filmes baseados em ácido hialurônico tiolado e reticulado para tratar feridas em ratos, cães e cavalos, após observarem a proliferação

de queratinócitos promovidos pelo mesmo material *in vitro*. Os autores verificaram que os filmes reticulados aumentaram a taxa de cicatrização de feridas em ratos e resultaram em epiderme mais espessa. Embora feridas em membros anteriores de cavalos e cães tenham cicatrizado mais lentamente em comparação com os ratos, os filmes aumentaram a cicatrização das feridas em comparação com os controles não tratados, tanto em termos de fechamento da ferida quanto na qualidade do tecido.

Amaral et al. (2016) empregaram filmes de nanofibras de celulose como alternativa aos tratamentos convencionais, em feridas de dois cães, originadas de mordedura. Após debridamento e limpeza das feridas, as coberturas interativas foram aplicadas e recobertas com gaze. Os autores observaram que os filmes de nanofibras de celulose se mostraram como uma opção terapêutica viável e promissora, pois, promoveram rápida formação de tecido de granulação e rápida epitelização. A formação de tecido de granulação exuberante pode ser interrompida com a retirada do filme.

Entre os polímeros para os quais há relatos do preparo de *wound dressings* se destacam o poli(álcool vinílico) (PVA), o poli(ácido acrílico) (PAA) e o amido. O PVA é um polímero sintético, hidrofílico, atóxico, e que apresenta boa estabilidade química e capacidade de formação de filmes. Ainda, possui boa capacidade filmogênica, originando películas de elevada resistência mecânica e boas propriedades de barreira (FARIA et al., 2012). Devido a sua alta compatibilidade com diferentes tipos de amido, o uso da blenda PVA/amido é promissora para o preparo de cobertura bioativas, que devem ser atóxicas, não alergênicas e não aderentes, além de serem de fácil aplicação e remoção (MUPPALALENI; OMIDIAN, 2013). O poli(ácido acrílico) ou carbômero, é um material sintético, solúvel em água e em solventes polares, com boa capacidade espessante e biocompatibilidade. Sua capacidade mucoadesiva pode conferir aumento no tempo de contato das formulações com o local de aplicação (LIMA, 2006). Já o amido é um polímero atraente para aplicações em filmes como coberturas bioativas devido à sua ampla disponibilidade a partir de fontes naturais e, portanto, renováveis; seu baixo custo; elevada biocompatibilidade e biodegradabilidade; e, existência de relatos de capacidade de cicatrização de feridas (WHAGHMARE et al., 2018). Os três polímeros mencionados são de uso farmacêutico e possuem suas monografias inscritas no *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, sendo considerados seguro para o uso em medicamentos e cosméticos, nas corretas condições (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009).

Uma das vantagens para o preparo de sistemas ou misturas poliméricas, conhecidas como blendas, é a possibilidade de otimização das propriedades dos polímeros, que sozinhos, apresentam uma ou mais propriedades inadequadas para o uso como matrizes formadoras de filmes. Blendas podem favorecer a estabilização química das dispersões poliméricas, melhorar a capacidade filmogênica, o controle da resistência mecânica, a modulação da velocidade de dissolução e consequente liberação do fármaco e, a adequação da taxa de permeabilidade dos filmes aos gases, além de promover intumescimento e solubilidade controlados (ALVARADO et al., 2018; ÇAYKARA; DEMIRCI, 2006). Em blendas, a mistura de polímeros pode ocorrer pelo estabelecimento de ligações de hidrogênio e outros tipos de interações entre os grupos carboxílicos e hidroxilas dos polímeros (ZEPON et al., 2013).

2.3 Compostos bioativos na cicatrização de feridas

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), planta medicinal se refere a toda espécie vegetal que seja utilizada com finalidade terapêutica (BRASIL, 2014). O uso profilático ou terapêutico de plantas medicinais é amplamente difundido em todo o mundo e vêm ganhando maior notoriedade atualmente, uma vez que o uso dos produtos naturais pode causar menos danos tanto à saúde quanto ao meio ambiente, por serem oriundos de fontes renováveis e apresentarem, potencialmente, menor toxicidade (VEIGA-JÚNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

No Brasil, o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos do Ministério da Saúde, regulamentou em 2006, a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), que lista as espécies de plantas medicinais potencialmente úteis no sistema de atenção básica à saúde no Brasil, para as quais há estudos em andamento (BRASIL, 2009). O programa é parte essencial das políticas públicas de saúde no país, pois suas ações são voltadas para a garantia do acesso seguro e uso racional das plantas medicinais e de produtos originados destas, bem como o desenvolvimento de tecnologias e inovações relacionadas à produção de fitoterápicos e o fortalecimento das cadeias produtivas envolvidas neste processo. As ações do programa visam ainda estabelecer o uso sustentável da biodiversidade brasileira e o desenvolvimento econômico e social originado do uso das plantas medicinais (BRASIL, 2006).

A fitoterapia é uma prática amplamente difundida em todo o mundo, com grande notoriedade na atualidade, uma vez que compostos bioativos são oriundos de fontes renováveis e podem ser menos tóxicos ao organismo e ao meio-ambiente, consoante o tipo de solvente e processo de extração empregados para sua obtenção (VEIGA-JÚNIOR; PINTO; MACIEL, 2005). Os compostos bioativos naturais podem ser utilizados tanto como ingredientes farmacologicamente ativos (IFAs) bem como protótipos para a síntese de fármacos mediante síntese total ou modificação estrutural nos mesmos, quando isolados e purificados (SANGI, 2016). O Brasil é conhecido por sua ampla biodiversidade sendo considerado um país mega-biodiverso, tendo a química dos produtos naturais experimentado grande e rápido desenvolvimento durante o século 21 (BERLINCK et al., 2017).

Usualmente, óleos essenciais e extratos destas plantas são ricos em metabólitos secundários com ação antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, hemostática e debridante, principalmente, sendo estes os de maior interesse em processos de cicatrização (PATTANAYAK et al., 2021). Há relatos do uso de inúmeras plantas medicinais cultivadas no Brasil no tratamento de feridas tais como: chá verde, centella, alecrim, canela chinesa, erva de São João, açafraão, copaíba, hena, mangostim, taro, babosa, calêndula, *aloe*, *hamamelis*, mirra, rosa-rubra, melaleuca, camomila e romã (ARAUJO et al., 2018; FREITAS et al., 2014). Com base em uma revisão sistemática, Tresch et al. (2019), prospectaram potenciais plantas medicinais de interesse para tratar pioderma, dermatite atópica canina, otite externa, feridas e dermatofitose em cães. Com base nos achados, os autores concluíram que calêndula, erva de São João e camomila mostraram propriedades de cicatrização de feridas sendo consideradas candidatas promissoras para preencher a lacuna terapêutica em agentes de cicatrização de feridas caninas.

A papaína é uma enzima extraída do mamão (*Carica papaya*), que pode ser incluída em diferentes formas farmacêuticas, como pó, gel e creme, sendo utilizada no tratamento de lesões (SILVA et al., 2012). Estudos comprovam que a papaína atua na aceleração do crescimento tecidual, uma vez que tem ação debridante, o que pode acelerar a cicatrização. Dutra et al. (2017) prepararam filmes a partir da mistura entre o PVA e o alginato de cálcio (AlgCa) contendo papaína (2% p/p), composto bioativo utilizado com debridante tecidual, que favorece a cicatrização. A atividade enzimática dos filmes foi comprovada pelos autores indiretamente, utilizando método *in vitro*. Porsani et al. (2016) relatam três casos de cães atendidos no Hospital Veterinário da

Universidade Federal de Lavras (UFLA, Brasil) com feridas infectadas, necrosadas, de etiologia variada e consideradas extensas e graves. As lesões foram tratadas com gel-creme de papaína a 3 ou 5% p/p. O tratamento dos animais demonstrou efetividade na recuperação das feridas, com a formação de grande quantidade de tecido de granulação, em um menor tempo quando comparados a tratamentos convencionais.

Silva et al. (2014) avaliaram o uso da pomada Alantol[®], contendo alantoína a 3% p/p associada ao óxido de zinco, na cicatrização tecidual em equinos. A alantoína é um metabólito secundário presente no *Aloe vera*, capaz de estimular a reparação tecidual em feridas supurativas e persistentes. Segundo os autores, o emprego da pomada promoveu um período cicatricial reduzido em feridas cutâneas induzidas em equinos. Outro composto bioativo natural proveniente do *Aloe vera* é a acemanana (ACE), polissacarídeo ao qual são atribuídas excelentes propriedades imunomoduladoras. A ACE atua como fator de crescimento estimulador de macrófagos, modulando o aumento na secreção de IL-1 e TNF- α , o estímulo da angiogênese, a deposição de colágeno e a diferenciação dos queratinócitos. Autores relataram que géis contendo ACE apresentaram ação positiva sobre a contração e re-epitelização de feridas de pata em cães e estimulou a formação de tecido de granulação sobre o osso exposto (SWAIM; RIDELL; McGUIRE, 2013).

Popularmente conhecida com alteia, a *Althaea officinalis*, possui potencial cicatrizante, antimicrobiano e anti-inflamatório. Um estudo comparativo com a alteia na forma de pomada a 15% de extrato em comparação com o Eucerin[®] e grupos não tratados foi realizado e segundo os autores obtiveram resultados positivos, sobre a planta, confirmando que as atividades terapêuticas do extrato podem ser correlacionadas a componentes presentes na planta, como a pectina e compostos fenólicos (VALIZADEH et al. 2015).

A *Malva sylvestris L.*, conhecida como malva, é uma planta popular para tratamento de processos inflamatórios. Diferentes estudos apontam resultados positivos sobre a cicatrização para diferentes tipos de extratos obtidos da planta. Nasiri et al. (2015) testaram a ação cicatrizante de creme de malva a 10% p/p comparado ao tratamento com creme de sulfadiazina de prata (SSD) padrão 1% p/p em ratos com queimaduras de segundo grau induzidas. Os autores observaram a melhora no processo de cicatrização quando comparado ao creme SSD. Resultados parecidos foram encontrados por Pirbalouti et al. (2010) que avaliaram uma pomada

contendo extrato das flores de malva em éter dietílico, administrada em doses de 200 mg/kg/dia em ratos Wistar, com feridas e diabetes induzidas. Ao final do estudo, foi relatado que houve um aumento na aceleração do processo de cicatrização nos animais tratados com pomada de malva.

Feridas provenientes de acidentes automobilístico em um cachorro foram tratadas com a adição do extrato própolis a 11% colicado diretamente sobre a ferida previamente lavada com água e sabão neutro, a cada 12 horas, até completa cicatrização. A utilização do extrato de propólis se mostrou eficaz na cicatrização (MEDEIROS et al., 2019). Adesivos impressos desenvolvidos a partir de biotintas baseadas em pectina contendo complexos de inclusão de quitosana e própolis em ciclodextrinas foram avaliados *in vitro* quanto à citocompatibilidade, atividade antimicrobiana e propriedade de cicatrização. Os resultados obtidos revelaram que os adesivos bioimpressos demonstraram capacidade de cicatrização aumentada, especialmente, naqueles contendo própolis, que apresentaram também atividade antimicrobiana (ANDRIOTIS et al., 2020). Filmes de colágeno I contendo extrato seco hidroalcolólico de própolis vermelha 0,1% p/p, preparados por evaporação de solvente, foram utilizados no tratamento de feridas cirúrgicas de segunda intenção em dorso de ratos. Resultados obtidos sugerem que o uso dos filmes como coberturas bioativas favoreceu a formação cicatricial e a incorporação do extrato de própolis vermelho acelerou a resposta imunológica, exercendo papel sobre a re-epitelização da superfície das feridas em relação a utilização de membranas de colágeno puro (BARRETO, 2008).

Extrato etanólicos de partes aéreas de espécies de sálvia foram incorporados em pomadas, que tiveram a ação cicatrizante avaliada *in vivo*, em feridas induzidas em ratos diabéticos. Para tal foram utilizadas duas concentrações (0,5% e 1% p/p) dos extratos. O creme Fito[®] foi utilizado como controle positivo. Os autores relataram que os extratos de todas as plantas apresentaram efeito cicatrizante de feridas, sendo a espécie *Salvia kronenburgii* Rech considerada mais eficaz que a *Salvia euphratica* Montbret (GUZEL et al., 2019).

Fibras poliméricas de PVA contendo extrato seco de casca de bétula nas concentrações 0,5 e 5% p/p foram preparados por eletrofiação e estudados para aplicação no tratamento de feridas. Os autores observaram aceleração no processo de cicatrização e aumento significativo no tempo de fechamento e re-epitelização das

feridas, permitindo a diminuição da troca de curativos devido a longa liberação do extrato no leito da ferida (MWIIRI; BRANDNER; DANIELS, 2020).

2.3.1 *Punica granatum* L.

Uma planta para a qual há inúmeros relatos de atividade cicatrizante e antimicrobiana é a *Punica granatum* L (Figura 3). Popularmente conhecida como romãzeira, a *P. granatum* é uma pequena árvore arbustiva, pertencente à família Punicaceae, que pode medir entre 3 a 5 metros de altura (TELES; COSTA, 2014). A romãzeira é cultivada em diferentes partes do Brasil e do mundo, é uma espécie originária do mediterrâneo Asiático. Os frutos da romãzeira são arredondados, de coloração amarelo-acastanhada, com cascas duras, que se racham expondo suas sementes quando maduros (LORENZI; MATOS, 2008; PAGNOCCA, 2017).



Figura 3: Imagem representativa de um (A) fruto de romã e seus componentes anatômicos; (B) das sementes do fruto; (C) das cascas de romã secas ao sol; e, (D) do pó grosseiro das cascas (Fonte: ISMAIL; SESTILI; AKHTR, 2012. Reprodução autorizada pelo autor).

A utilização de chás, extratos e óleo essenciais provenientes de diferentes partes da romã e da romãzeira na prevenção e tratamento de diferentes enfermidades é alvo de estudos há muitos anos. O fruto da romã vem sendo usado para tratar infecções bacterianas, fúngicas e parasitárias, inflamações, distúrbios da pele,

infecções gastrointestinais e intoxicação alimentar, bem como doenças periodontal, aterosclerose ou arteriosclerose, além de possuir ação anti-inflamatória, imunomoduladora, antioxidante e anti-artrítica. Inúmeros estudos comprovam suas ações, utilizando extratos de diferentes partes da planta (DOS SANTOS, et al., 2019; LANGLEY, 2000; NAVARRO, 1996; SOUZA et al., 2019; WANG et al., 2010).

Cerda et al. (2003) realizaram um estudo preliminar no qual ratos foram tratados com dieta alimentar a base da mistura de ração e extrato de romã, obtidos nas concentrações: 0,5, 2, 5, 10, 20 e 40% durante 7 dias e relatam a ausência de toxicidade em todas as concentrações testadas.

Os compostos bioativos presentes nas folhas, caule, pericarpo, cascas do fruto e nas sementes das romãs são responsáveis pelas atividades antioxidante, antibacteriana, antifúngica, anticonvulsivante, anti-inflamatória, imunomoduladora, cardioprotetora, antimutagênico, antiespasmódico, antidiabética e outras (BATISTA, et al., 2020; DOS SANTOS et al., 2019). Tais indicações são justificadas devido à presença de compostos orgânicos provenientes do metabolismo primário e secundário da planta (DOS SANTOS, et al., 2019; SOUZA et al., 2019; WANG et al., 2010).

Segundo Anibal (2010) aproximadamente 20% da composição da casca da romã é constituída de punicalagina, alcalóides e taninos. Além disto, são ricas em compostos fenólicos, sendo fontes importantes de taninos hidrolisáveis, elagitaninos e ácido elágico e ainda de antocianinas e flavonoides, metabólitos relacionados à inúmeras atividades farmacológicas, sendo a antimicrobiana e a antioxidante aquelas de maior interesse. Estudos também comprovam que os compostos fenólicos em altas doses confere potencial para ação antifúngica (FLECK et al., 2016; HAYOUNI et al., 2011; MACHADO et al., 2003; WANG et al., 2010). A composição e concentração dos componentes do fruto estão relacionadas, entre outros fatores, ao processo de extração utilizado (SEERAM; LEE; HEBER, 2004). Há um grande número de trabalhos que tratam do preparo de formulações tópicas contendo diferentes extratos de romã com finalidade cicatrizante e antimicrobiana.

A aplicação de um gel de carbômero 934 contendo 10% p/p de extrato metanólico do pericarpo da romã foi avaliada por Murthy et al. (2004). A atividade cicatrizante foi avaliada mediante medida da contração das feridas e pela estimativa do conteúdo de colágeno, em termos de conteúdo de hidroxiprolina. Os autores

observaram que houve aceleração da reparação tecidual em cerca de 7 dias, quando comparados aos animais do grupo controle.

O sucesso da administração de uma pomada oleosa, preparada a partir de parafina e contendo extrato metanólico do pericarpo da romã a 5% p/p, na cicatrização de feridas em porquinhos da Índia, foi determinada mediante avaliação da contração da ferida e avaliação do período de epitelização. Os autores observaram, que ocorreu cicatrização completa das lesões no 20º dia do tratamento, sugerindo a ocorrência de cicatrização total das lesões (HAYOUNI et al., 2011).

Yan et al. (2013) investigaram o efeito de um gel de carbômero 940 contendo 30% p/p de extrato etanólico de cascas de romã sobre a cicatrização de feridas induzidas em ratos diabéticos e observaram a ocorrência do fechamento da ferida nos animais do grupo tratado. O exame histológico mostrou a ocorrência de aumento da infiltração de fibroblastos, produção de colágeno, vascularização e re-epitelização na área da ferida.

Araújo et al. (2018) avaliaram a eficácia do chá das cascas e do suco da polpa da romã, administrados topicamente e por gavagem, na proteção da mucosa oral e na cicatrização de feridas induzidas em ratos. Para tal os autores administraram em um grupo de animais, o chá de romã (1 g/kg) por gotejamento no local da queimadura, 2 vezes ao dia. Animais de outro grupo receberam o suco de romã (300 mg/kg), por gavagem. As análises clínicas demonstram que o uso do chá de romã obteve melhor percentual de contração da ferida em relação aos outros tratamentos.

Ali et al. (2019) prepararam filmes à base de amido contendo extrato seco de cascas de romã em diferentes concentrações, para uso como embalagem bioativa. Os autores observaram que o aumento na concentração do extrato aumentou a inibição do crescimento das bactérias pesquisadas. Também foi observado a existência de compatibilidade entre o extrato e a matriz de amido, levando a uma melhora nas propriedades mecânicas dos filmes de amido, que passaram a apresentar maior rigidez e resistência à tração e ao impacto.

Apesar de existirem inúmeros relatos na literatura acerca da presença e uso de formas farmacêuticas convencionais contendo extrato de cascas de romã, há poucos trabalhos sobre o preparo e avaliação de coberturas bioativas baseadas em polímeros contendo extrato de romã.

Filmes preparados a partir de uma blenda polimérica entre amido, colágeno e quitosana e impregnados com extrato aquoso do pericarpo de romã, foram eficientes

na promoção da proliferação de células epiteliais em modelos animais, sem ocorrer formação de tecido cicatricial em excesso. Ainda, os filmes apresentaram ação antimicrobiana sobre *Pseudomonas aeruginosa* (AMAL et al., 2015).

Hassanpour et al. (2019) prepararam filmes contendo punicalagina, metabólito secundário da romã, e reportaram que os filmes tiveram capacidade anti-inflamatória significativa sobre feridas induzidas em ratos. No entanto, uma desvantagem do uso da punicalagina é a necessidade de purificação do extrato bruto de romã. Processos de fracionamento requerem o uso de solventes orgânicos, são caros, demorados e promovem grande redução no rendimento do processo de extração.

Em um trabalho recente Aboud Zekrya, Abdellatif e Azzazy (2020) relataram o preparo de filmes eletrofiados baseados em matriz de PVA contendo extrato metanólico de casca de romã 1, 2 e 2,5% p/p, associado ao mel. A citotoxicidade, a atividade antimicrobiana e a eficácia cicatrizante dos filmes foram pesquisadas. Os autores observaram que os filmes se mostraram atóxicos, com atividade antimicrobiana sobre cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e que induziram o aumento nas porcentagens de fechamento de feridas induzidas em ratos, em comparação aos grupos controle. Quando o veneno de abelha a 0,01% p/p foi incorporado nos filmes, a atividade antibacteriana contra *S. aureus* e os padrões histológicos das lesões apresentaram melhora.

Nascimento et al. (2020) prepararam filmes de gelatina e propilenoglicol contendo extrato aquoso de cascas de romã a 0,5 e 1% p/p e, avaliaram o processo cicatricial empregando modelo animal. Os autores observaram que os filmes promoveram importantes alterações histológicas na dinâmica cicatricial, com modulação da resposta inflamatória, estímulo da contração das feridas e aumento da deposição de colágeno, sugerindo a existência de um potencial promissor para uso dos filmes como coberturas bioativas.

Nos últimos três anos, o Grupo de Pesquisa em Saúde Humana e Animal vem se dedicando ao desenvolvimento de produtos farmacêuticos diversos contendo o extrato seco total de casca de romã. Bolzan et al. (2020), avaliaram a atividade antimicrobiana de diferentes extratos vegetais sobre a microbiota oral natural de cães labradores empregando método *in vitro*, incluindo o do presente estudo, e concluíram que o extrato das cascas de romã apresentou atividade promissora na inibição do crescimento microbiano. A partir destes resultados, Silva et al. (2020), prepararam uma orabase contendo o mesmo extrato para uso como adjuvante na higienização

bucal de cães, obtendo sucesso na inibição do crescimento da microbiota oral natural do mesmo grupo de cães utilizado por Bolzan et al. Batista et al. (2020), desenvolveram um filme eletrofiado a partir do poli(álcool vinílico) (PVA) e do alginato de sódio (AlgNa) contendo o ESTCR a 1,25% p/p para uso como potencial cobertura bioativa. Segundo os autores, o filme apresentou atividade antimicrobiana sobre cepas de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, podendo ser útil no tratamento de feridas em humanos e animais. Uma vez que os filmes poliméricos se constituem como uma nova plataforma de liberação de ingredientes farmacêuticos ativos e que seu uso vem ganhando atenção na atualidade no preparo de *wound dressings*, justifica-se o interesse em preparar tais sistemas para uso na farmacoterapia veterinária, visando contribuir para o manejo de feridas em cães.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo principal

Produzir filmes poliméricos baseados em blendas entre o poli(álcool vinílico) (PVA), amido de milho e o poli(ácido acrílico) (PAA), contendo extrato seco total das cascas de *Punica granatum* (romã) (ESTCR), com vistas ao uso como cobertura bioativa na farmacoterapia veterinária.

3.2 Objetivos secundários

- Definir a concentração inibitória mínima do extrato seco total de cascas de romã (ESTCR) sobre cepas de bactérias e fungos;
- Avaliar a citotoxicidade e a indução da proliferação do ESTCR sobre linhagem de fibroblastos *in vitro*;
- Preparar filmes com diferentes proporções de polímeros e concentrações do ESTCR;
- Escolher a melhor concentração do extrato em formulações de filmes poliméricos a partir da atividade antimicrobiana;
- Realizar a caracterização físico-química dos filmes poliméricos;
- Pesquisar as propriedades de barreira dos filmes poliméricas;
- Estudar, preliminarmente, a biocompatibilidade e a atividade cicatrizante dos filmes utilizando métodos *in vitro*;
- Eleger a melhor formulação;
- Analisar a composição e a organização das cadeias poliméricas no filme eleito;
- Pesquisar a resistência mecânica no filme eleito;
- Estudar a atividade antifúngica no filme eleito.

REFERÊNCIAS

- ABOU ZEKRY, S.S, ABDELLATIF, A. AZZAZY, H.M. Fabrication of pomegranate/honey nanofibers for use as antibacterial wound dressings. **Wound Medicine**, v.28, p.100181, 2020. doi:10.1016/j.wndm.2020.100181.
- ALBUQUERQUE-JÚNIOR, 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, 2009.
- ALI, U.; REHMAN, K.U.; MALIK, M.Y. The influence of MHD and heat generation/absorption in a Newtonian flow field manifested with a Cattaneo-Christov heat flux model. **Physica Scripta**, v.94, n.8, 2019. doi:10.1088/1402-4896/ab11ff
- ALVARADO, N.; URDANETA, J.; FIGUEROA, J.R.R.; DICASTILLO, C.L.; SCHMIDT, M.; GALOTTO, M.J.; GUARDA, A. Improvement of physicochemical properties of starch films by blending it with poly(n-vinyl-2-pyrrolidone). **Journal of Food Science & Nutrition**, v.4, n.3, 2018. doi: 10.24966/FSN-1076/100036
- ALVES FILHO, J.A.G.; CABRERA, R.R.; DO AMARAL, V. Análise da atividade cicatrizante do complexo homeopático M8 em feridas induzidas em ratos. **Revista Uningá**, v.48, n.1, p.32-40, 2016.
- AMAL, B.; VEENA, B.; JAYACHANDRAN, V.P.; SHILPA, J. Preparation and characterisation of Punica granatum pericarp aqueous extract loaded chitosan- collagen-starch membrane: role in wound healing process. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.26, n.5, p.181-190, 2015. doi: 10.1007/s10856-015-5515-2
- AMARAL, L.G.; REIS, E.C.C.; FERNANDES, N.A.; BORGES, A.P.B.; VALENTE, F.L.; SEPULVEDA, R.V. Biodegradable polymer nanofiber membrane for the repair of cutaneous wounds in dogs-two case reports. **Semina: Ciências Agrárias**, v.37, n.6, p.4171-4178, 2016. doi: 10.5433/1679-0359.2016v37n6p4171
- ANDRIOTIS, E.G.; ELEFThERIADIS, G.K.; KARAVASILI, C.; FATOUROS, D.G. Development of bioactive patches based on pectin for the treatment of ulcers and wounds using 3D-bioprinting technology. **Pharmaceutics**, v.12, n.1, 2020. doi: 10.3390/pharmaceutics12010056
- ANIBAL, P.C. Estudo da composição química e ação inibitória dos extratos obtidos de Punica granatum L.(romã) sobre Candida spp. Orientador: José Francisco Hofling. Tese (Doutorado em Biologia Buco-Dental), Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Piracicaba, 2010.

ARAÚJO, J.E.S.; OLIVEIRA, E.F.; CARLAN, L.M.; MARTINS, F.B.; MORAES, M.D.L.S.A. Avaliação do efeito protetor e curativo da *Punica granatum* Lin. no processo de cicatrização tecidual em queimaduras induzidas em mucosas deratos. **Odonto**, v.26, n.51, p.33-43, 2018. doi: 10.15603/21761000/odonto.v26n51p33-43.

ÁVILA FILHO, S.H.; LAMARO, L.; QUEIROZ, P.J.; FERREIRA, K.; SILVA, L.A. Aspectos gerais dos fios de sutura utilizados ou com potencial aplicabilidade na medicina veterinária. **Enciclopédia Biosfera**, v.11, n.22, p.319-350, 2015. doi:10.18677/Enciclopedia_Biosfera_2015_088

BALSA, I.M.; CULP, W.T. Wound care. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v.45, n.5, p.1049-1065, 2015. doi:10.1016/j.cvsm.2015.04.009

BARRETO, A.L.S. Estudo histomorfológico do efeito de membranas de colágenocontendo própolis vermelha sobre o processo de reparo cicatricial por segunda intenção em ratos. Orientador: Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Junior. 2008. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) Universidade Tiradentes, Aracaju, SE, Brasil, 2008.

BATISTA, F. TP.; LACERDA, G.D.; SILVA, J.R.S.; RODRIGUES, L.P.T.; FEITOSA, T.P.; MUSTAFA, V.S. O Uso de plantas medicinais na medicina veterinária - riscos e benefícios. **REVET-Revista Científica do Curso de Medicina Veterinária Faciplac**, v.41, n.25, p.1262-2274, 2017.

BATISTA, S.V.; SILVA, T.M.; SALOMAO, S.B.; BASTOS, K.A.; SOUZA, S.O.L.; COTRIM, M.A.P.; OREFICE, R.L.; ANDRADE, S.F.; CARETA, F.P.; SEVERI, J.A.; RESENDE, J.A.; VILLANOVA, J.C.O. In vitro activity of pomegranate peel extract alone and in electrospun poly(vinyl alcohol)/sodium alginate matrix. **Biomedical and biopharmaceutical research**, v.17, n.2, p.294-312, 2020. doi: 10.19277/bbr.17.2.239

BERLINCK, R.G.S.; BORGES, W.S.; SCOTTI, M.T.; VIEIRA, P.C. A química de produtos naturais do brasil do século XXI. **Química Nova**, v.40, n.6, p.706-710, 2017. doi: 10.21577/0100-4042.20170070.

BERNARDO, A.F.C.; SANTOS, K.; SILVA, D.P. Pele: alterações anatômicas e fisiológicas do nascimento à maturidade. **Revista Saúde em Foco**, v.1, n.11, p.1221-33, 2019.

BLANES, L. Tratamento de feridas. **Cirurgia vascular: guia ilustrado**. São Paulo, 2004.

BOATENG, J.S.; CATANZANO, O. Advanced therapeutic dressings for effective wound healing - a review. **Journal of Pharmaceutical Science**, v.104, n.11, p.3653-3680, 2015. doi:10.1002/jps.24610.

BOHLING, M.W.; HENDERSON, R.A.; SWAIM, S.F.; KINCAID, S.A.; WRIGHT, J.C. Comparison of the role of the subcutaneous tissues in cutaneous wound healing in

the dog and cat. **Veterinary Surgery**, v. 35, n.1, p.3-14, 2006. doi:10.1111/j.1532-950X.2005.00105.x

BOLZAN, T.C., SEVERI, J.A., VILLANOVA, J.C.O., DONATELE, D.M., MADUREIRA, A.P., ZANINI, M.S. Prospecting plant extracts as na adjuncts to oralhygiene in labrador retriever dogs, **PUBVET**, v.14, n.12, p.141, 2020. doi: 10.31533/pubvet.v14n12a717.1-8.

BRAGULLA, H.; BUDRAS, K.D.; MULLING, C.; REESE, S.; KONIG, H.E. Tegumento comum, p.325-380. In: König H.E. & Liebick H.G. (Ed.), **Anatomia dos Animais Domésticos: texto e atlas colorido**. Vol.2. Artmed, Porto Alegre. 399p.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução - RDC n.26, de 13 de maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF. Seção 1, p.52, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Política Nacional de Plantas Mediciniais eFitoterápicos. Brasília, DF, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse SUS. Portal Saúde, 2009.

CAMPBELL, B. G. Dressings, bandages, and splints for wound management in dogs and cats. **Veterinary Clinics Small Animal Practice**. v.36, n.4, p.759-791, 2006. doi:10.1016/j.cvsm.2006.03.002

CAPELLA, S.O.; JUNIOR, A.G.A.; KRUG, F.D.M.; SILVA, E.C.; PIÑEIRO, M.B.C.; NOBRE, M.O. Lesões cutâneas traumática em pequenos animais: características e tratamentos. **Brazilian Applied Science Review**, v.4, n.2, p.459-467, 2020. doi: 10.34115/basrv4n2-005

ÇAYKARA, T.; DEMIRCI, S. Preparation and characterization of blend films of poly(vinylalcohol) and sodium alginate. **Journal of Macromolecular Science, Part A. Pure and Applied Chemistry**, v.43, n.7, p.1113-1121, 2006. doi: 10.1080/10601320600740389

CERDA, B.; CERON, J.J.; TOMÁS-BARBERAN, F.A.; ESPIN, J.C. Repeated oral administration of high doses of the pomegranate ellagitannin punicalagin to rats for37 days is not toxic. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, n.11, p.3493-501, 2003. doi:10.1021/jf020842c.

CHANSIRIPORNCHAI, P.; RANGSIPIPAT, A.; PONGSAMART, S. The Treatment of Surgical Wounds in Dogs and Cats Using A Film Dressing of Polysaccharide, Extracted From The Fruit Hull of Durian (Durio Zibethinus L.). **Thai Journal of Pharmacology**. v.26, n.1, p. 65, 2004.

COELHO, M.C.O.C.; CARRAZONI, P.G.; MONTEIRO, V.L.D.C.; MELO, F.D.A.D.; MOTA, R.A.; TENÓRIO-FILHO, F. Biopolímero produzido a partir da cana-de-açúcar para cicatrização cutânea. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v.17, p.11-13, 2002. doi: 10.1590/S0102-86502002000700003.

COSTA N.N.; LOPES, L.F.; FERREIRA, D.F.; PRADO, E.M.L.; SEVERI, J.A.; RESENDE, J.A.; CARETA, F.P.; FERREIRA, M.C.P.; CARREIRA, L.G.; SOUZA, S.O.L.; COTRIM, M.A.P.; BOEING, T.; ANDRADE, S.F.; ORÉFICE, R.L.; VILLANOVA, J.C.O. Polymeric films containing pomegranate peel extract based on PVA/starch/ PAA blends for use as wound dressing: *In vitro* analysis and physicochemical evaluation. **Materials Science and Engineering: C**. v.109, p.110643-11702, 2020. doi: 10.1016/j.mesc.2020.110643.

DOS SANTOS, E.P.; RODRIGUES, F.S., DE SOUSA SANTOS, I.C.R.; DE SÁ SILVA, K.C.; COUTINHO, G.S.L.; FIRMO, W.D.C.A.; PINHEIRO, A.J.M.C.R. Punica Grantum L. (Romã) e atividade antimicrobiana contra o biofilme dental: uma Revisão bibliográfica. **Ensaio e Ciência C Biológicas Agrárias e da Saúde**, v.23, n.2, p.88-93, 2019. doi: 10.17921/1415-6938.2019v23n2p88-93.

DUTRA, J.A.; CARVALHO, S.G.; ZAMPIROLI, A.C.; DALTOÉ, R.D.; TEIXEIRA, R.M.; CARETA, F.P.; COTRIM, M.A.; ORÉFICE, R.L.; VILLANOVA, J.C. Papain wound dressings obtained from poly(vinyl alcohol)/calcium alginate blends as new pharmaceutical dosage form: Preparation and preliminary evaluation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.113, p.11-23, 2017. doi: 10.1016/j.ejpb.2016.12.001.

EBERHARDT, T.D.; DIAS, C.F.C.; DA FONSECA, G.G.P.; KESSLER, M.; DE AVILA SOARES, R.S.; DE LIMA, S.B.S. Cicatrização de feridas: análise das tendências em teses e dissertações. **Revista de Enfermagem da UFSM**, v.5, n.2, p.387-395, 2015. doi:10.5902/2179769215259.

FARIA, F.O., VERCELHEZE, A.E.S., MALI, S. Propriedades físicas de filmes biodegradáveis à base de amido de mandioca, álcool polivinílico e montmorilonita. *Química Nova*, v.35, n.3, p. 487-492, 2012. doi:10.1590/S0100-40422012000300009.

FAZIO, M.L.S.; GONÇALVES, T.M.V.; HOFFMANN, F.L. Determinação da atividade antibacteriana de romã (*Punica granatum* L). **Higiene Alimentar**, v.23, n.168-169, p.54-56, 2009.

FLECK, A.; CABRAL, P.F.G.; VIEIRA, F.F.M.; PINHEIRO, D.A.; PEREIRA, C.R.; SANTOS, W.C.; MACHADO, T.B. Punica granatum L. hydrogel for wound care treatment from case study to phytomedicine standardization. **Molecules**, v.21, n.8, p.1059, 2016 doi: 10.3390/molecules21081059.

FOSSUM, T.W. Cirurgia de pequenos animais. **Elsevier Brasil**, 3ª edição, 2015.

FREITAS, V.S.; RODRIGUES, R.A.F.; GASPI, F.O.G. Propriedades farmacológicas da Aloe vera (L.) Burm. f. **Revista brasileira de plantas medicinais**, v.16, n.2, p.299-307, 2014. doi:10.1590/s1516-05722014000200020.

GOMES, A. L. Z.; OTHERO, M. B. Cuidados paliativos. **Estudos avançados**, v.30,n.88, p.155-166, 2016. doi:10.1590/s0103-40142016.30880011.1

GÜZEL, S.; ÖZAY, Y.; KUMAŞ, M.; UZUN, C.; ÖZKORKMAZ, E. G.; YILDIRIM, Z.; ULGER, M.; GULER, G.; ÇELIK, A.; ÇAMLICA, Y.; KAHRAMAN, A. Wound healing properties, antimicrobial and antioxidant activities of *Salvia kronenburgii* Rech. f. and *Salvia euphratica* Montbret, Aucher & Rech. f. var. *euphratica* on excision and incision wound models in diabetic rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.111, p.1260-1276, 2019. doi:10.1016/j.biopha.2019.01.038.

HARGIS A.M.; GINN P.E. 2007. The integument, p.1107-1261. In: McGavin M.D. & Zachary J.F. (Ed.), **Pathologic Basis of Veterinary Disease**. 4th ed. Mosby Elsevier, St Louis. 1476p.

HASSANPOUR, I.; TABATABAEI, N.A.; AMINLARI, M.; NAZIFI, S. Effect of punicalagin nanofibrous-dressing on tissue total antioxidant capacity index through wound healing in adult Wistar rats. **Zahedan Journal of Research in Medical Sciences**. v.21, n.2, 2019. doi:10.5812/zjrms.83932.

HAYOUNI, E.A.; MILED, K.; BOUNAKER, S.; BELLASFAR, Z.; ABEDRABBA, M.; WASKI, 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. doi:10.1016/j.phymed.2011.02.011.

HOSGOOD, G. stages of wound healing and their clinical relevance. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 36, n.4, p.667-685, 2006.

IGNÁCIO, C. Desenvolvimento de curativos para cicatrização de feridas por segunda intenção baseados em biomateriais capazes de promoverem resposta celular controlada via estímulo externo. Orientador: Rodrigo Lambert Oréfice. 2009. Dissertação (Doutorado em Engenharia Metalúrgica e de Minas). Programa de Pós-graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2009

ISMAIL, T.; SESTILI, P.; AKHTAR, S. Pomegranate peel and fruit extracts: a review of potential anti-inflammatory and anti-infective effects. **Journal of ethnopharmacology**, v.143, n.2, p.397-405, 2012. doi:10.1016/j.jep.2012.07.004.

JAYAKUMAR, R.; PRABAHARAN, M.; SUDHEESH-KUMAR, P.T.; NAIR, S.V.; TAMURA, H. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing application.

Biotechnology Advances, v.29, n.3, p.322-337, 2011. doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.01.005.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**, 10ª edição. Rio de Janeiro, 2004.

KOZLOWSKA, J.; TYLKOWSKI, B.; STACHOWIAK, N.; PRUS-WALENDZIAK, W. Controlling the Skin Barrier Quality through the Application of Polymeric Films Containing Microspheres with Encapsulated Plant Extract. **Processes**, v.8, n.5, p.530, 2020. doi: 10.3390/pr8050530.

KÜHNEL W. Citologia, **Histologia e Anatomia Microscópica**: texto e atlas. 11ª ed. Artmed, Porto Alegre. p.535, 2005.

LANGLEY, P. Why a pomegranate? **British of Medicine Journal**, v.321, n.4, p.1153-4, 2000. doi:10.1136/bmj.321.7269.1153

LIMA, M.D.S.P.D. Preparo e caracterização de membranas de quitosana modificadas com poli (ácido acrílico). Orientador: Márcia Rodrigues Pereira. 2006. Dissertação (Mestrado em Química) Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. 2006.

LIN, T. K.; ZHONG, L.; SANTIAGO, J.L. Anti-inflammatory and skin barrier repair effects of topical application of some plant oils. **International Journal of Molecular Sciences**, v.19, n.1, p.70, 2018. doi: 10.3390/ijms19010070.

LORENZI, H., MATOS, F.J.D.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2ª edição. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 544, 2008.

MACHADO, T.B. Análise fitoquímica e investigação da atividade antibacteriana de plantas medicinais utilizadas popularmente contra infecções. Rio de Janeiro, 2003. 148 f. Tese (Doutorado em Química de Produtos Naturais) - Núcleo de pesquisas de Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003.

MARTINS, M.; MAIA FILHO, A. L.; COSTA, C. L.; COELHO, N. P.; COSTA, M. S.; CARVALHO, R. A. Anti-inflammatory action of the Ovis aries lipidic fraction associated to therapeutic ultrasound in an experimental model of tendinitis in rats (*Rattus norvegicus*). **Brazilian Journal of Physical Therapy**, v.15, n.4, p.297-302, 2011. doi:10.1590/S1413-35552011000400007.

MEDEIROS, H. H.; FACHINI, V.; PUPIN, M. A. F.; DANEZE, E. R.; DE PAULA, C. J.S. Uso de solução de extrato de própolis como antimicrobiano e cicatrizante em feridas cutâneas causadas por acidentes automobilístico em cão. **Archives of Veterinary Science**, v.24, n.2, p.01-10, 2019. doi:10.5380/avs.v24i2.53295.

MORGAN, P.W.; BINNINGTON, A.G.; MILLER, C.W.; SMITH, D.A.; VALLIANT, A.; PRESCOTT, J.F.; The effect of occlusive and semi-occlusive dressings on the healing of acute full-thickness skin wounds on the forelimbs of dogs. **Veterinary Surgery**. v.23, n.6, p.494-502, 1994. doi:10.1111/j.1532-950X.1994.tb00511.x

MUPPALALENI, S.; OMIDIAN, H.; Polyvinyl Alcohol in Medicine and Pharmacy: A Perspective. **Journal of Developing Drugs**. v.2, n.3, p.1-5, 2013. doi:10.4172-2329-6631.1000112

MURTHY, K.N; VITTAL, R. K.; VEIGAS, J. M; MURTHY, U. D. Study on wound activity of Punica granatum peel. **Journal of Medicinal Food**. v.7, n.2, p.256- 9. 2004. doi:10.1089/1096620041224111.

MWIIRI, F. K.; BRANDNER, J. M.; DANIELS, R. Electrospun Bioactive Wound Dressing Containing Colloidal Dispersions of Birch Bark Dry Extract. **Pharmaceutics**, v.12, n.8, p.770, 2020.doi:10.3390/pharmaceutics12100991.

NASCIMENTO, M.F.; CARDOSO, J.C.; SANTOS, T.S.; TAVARES, L.A.; PASHIROVA, T.N.; SEVERINO, P.; SOUTO, E.B.; ALBUQUERQUE-JUNIOR, R.L. Development and Characterization of Biointeractive Gelatin Wound Dressing Based on Extract of Punica granatum Linn. **Pharmaceutics**, v. 12, n.12, p.1204, 2020. doi:10.3390/pharmaceutics12121204

NASIRI, E.; HOSSEINIMEHR, S. J.; AZADBAKHT, M.; AKBARI, J.; ENAYATI-FARD, R.; AZIZI, S. Effect of Malva sylvestris cream on burn injury and wounds in rats. **Avicenna journal of phytomedicine**, v.5, n.4, p.341, 2015.

NAVARRO, V.; VILLARREAL, M. L.; ROJAS, G.; LOZOYA, X. Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases. **Journal of Ethnopharmacology** v.53, p.143-147. 1996. doi: 10.1016/0378/8741(96)01429-8.

OZAKI, A. T.; DUARTE, P.C. Fitoterápicos utilizados na medicina veterinária, em cães e gatos. Revista Pharmacia Brasileira. **Infarma**, v.18, n.11-12, p.17-25, 2006.

PAGNOCCA, T. S. Uso de plantas terapêuticas em religiões afro-brasileiras na ilha de Santa Catarina. Orientadora: Prof. Dra. Natalia Hanazaki 2017. 107 f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos, Algas e Plantas) - Programa de Pós-graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

PAPEN J. **Moist wound healing**. In: Proceedings of the Society of Veterinary Soft Tissue Surgery. Breckenridge (CO): Society of Veterinary Soft Tissue Surgery; 2003.p. 1-13.

PATTANAYAK, S.; DUTTA, M. K.; DEBNATH, P. K.; BANDYOPADHYAY, S. K.; SAHA, B.; MAITY, D. A study on ethno-medicinal use of some commonly available plants for wound healing and related activities in three southern districts of West Bengal, India. **Exploratory Animal and Medical Research**, v.2, n.2, p.97-110, 2012.

PAVLETIC, M. M. **Atlas of Small Animal Wound Management and Reconstructive Surgery**. 4^a ed. New Jersey: Hoboken, 2018. P. 866.

PIRBALOUTI, A.G.; AZIZI, S.; KOOHPAYEH, A.; HAMED, B. Wound healing activity of *Malva sylvestris* and *Punica granatum* in alloxan-induced diabetic rats. **Acta Polonae Pharmaceutic.** v.67, n.5, p.511-516, 2010.

PORSANI, M.Y.H.; CARVALHO, L.A.R.; PEREIRA, C.S.; PALUDETTI, M.; ZANGERONIMO, M.G.; PEREIRA, L.J. The use of papain gel cream and sunflower oil in promoting healing in a wound in dogs: three case reports. *Veterinary Medicine.* v.68, n. 5, p. 1201-1206, 2016. doi:10.1590/1678-4162-8561.

REPKA, M.A.; MCGINITY, J.W. Bioadhesive properties of hydroxypropylcellulose topical films produced by hot-melt extrusion. **Journal of Controlled Release**, v.70,n.3, p.341-351, 2001. doi: 10.1016/S0168-3659(00)00365-5

RODRIGUES, D. F. Extrato de barbatimão e células mononucleares autólogas no tratamento de feridas excisionais de coelhos. Orientador: Luiz Antônio Franco da Silva. 2015. 86 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Goiás - Escola de Veterinária e Zootecnia, Goiânia, 2015.

ROWE, R.C.; SHESKEY, P.; QUINN, M. **Handbook of pharmaceutical excipients.** Livros Digitales-Pharmaceutical Press, 2009.

SANGI, D.P. Estratégias de síntese na descoberta de fármacos: O emprego da síntese orientada pela diversidade estrutural. **Química Nova**, v.39, n.8, p.995-1006,2016. doi: 10.5935/0100-4042.20160089.

SANTOS, M.P.; SOUZA, M.C.; SUMERE, B.R.; DA SILVA, L.C.; CUNHA D.T.; BEZERRA, R.M.N.; ROSTAGNO, M.A. Extraction of bioactive compounds from pomegranate peel (*Punica granatum* L.) with pressurized liquids assisted by ultrasound combined with an expansion gas. **Ultrasonics sonochemistry**, v.54, p.11-17, 2019.

SEERAM, N.P.; LEE, R.; HEBER, D. bioavailability of ellagic acid in human plasma after consumption of ellagitannins from pomegranate (*Punica granatum* L.) juice. **Clinica Chimica Acta**, v.348, n.1-2, p.63-68, 2004. doi: 10.1016/j.cccn.2004.04.029.

SHARMA, S.; DUA, A.; MALIK, A. Third generation materials for wound dressings. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v.5, n.6, p.2113-2124, 2014. doi: 10.13040/IJPSR.0975-8232.5(6).2113-24.

SILVA, B.T.; DOS ANJOS, C.; FONTES, S.M.; MATSUMOTO, L.S.; PEIXOTO, E.C.T.M.; SILVA, L.P.; SILVA, R.M.G. Atividade antimicrobiana in vitro de extrato de *Punica granatum* L. sobre *Staphylococcus aureus* isolado em leite bovino. **Bioscience Journal**, v.29, n.4, p.974-984, 2014.

SILVA, T.M.; BOLZAN, T.C.A.; ZANINI, M.S.; ALENCAR, T.; RODRIGUES, W. D.; BASTOS, K. A.; SEVERI, J.A.; RESENDE, J.A.; VILLANOVA, J. C. Development and Evaluation of a Novel Oral Mucoadhesive Ointment Containing Pomegranate Peel Extract as an Adjuvant for Oral Hygiene of Dogs. **Journal of Veterinary Dentistry**, v.37, n.3, p.133-140, 2020. doi:10.1177/0898756420973470.

SILVA, V.E.G., GUEDES, E.O.D.S., HUPPES, R.R. Tratamento de feridas em cães domésticos comparação entre laser e película de hidrocoloide. In: **Anais X Encontro Internacional de Produção Científica**, Centro Universitário de Maringá, Maringá, PR, Brasil, 2017.

SIMAS, S.M. O tratamento de feridas cutâneas em cães e gatos

SINGH, B., PAL, L. Sterculia crosslinked PVA and PVA-poly(AAm) hydrogel wound dressings for slow drug delivery: mechanical, mucoadhesive, biocompatible and permeability properties. **Journal of Mechanical Behavior: Biomedicine Materials**, v.9, p.9-21, 2012. doi: 10.1016/j.jmbbm.2012.01.021.

SOUSA, N.C.F., GONZAGA, L.F., RODRIGUES, J.F.S., FERNANDES, E.S. Propriedades farmacológicas de *Punica granatum L* (romã): uma revisão deliteratura. **Revista Ceuma Perspectivas**, v.31, n.1, p.57-67, 2018. doi:10.24863/rccp.v31i1.181.

SOUZA, T.M.; FIGHERA, R.A.; KOMMERS, G.D.; BARROS, C.S. Aspectos histológicos da pele de cães e gatos como ferramenta para dermatopatologia. **Pesquisa Veterinária brasileira**, v.29, n.2, p.177-190, 2009. Doi:10.1590/S0100-736X2009000200017.

SOUZA, I.C.L. Desenvolvimento de membranas bioativas de colágeno quimicamente modificado contendo própolis vermelha para aplicação em cicatrização de feridas abertas. Orientador: Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Junior. Dissertação (Mestrado em Saúde e Meio Ambiente) - Programa de Pós-graduação em Saúde e Ambiente, Universidade Tiradentes, Aracaju, 2020.

TELES DG, COSTA MM. Estudo da ação antimicrobiana conjunta de extratos aquosos de tansagem (*Plantago major L.*, Plantaginaceae) e romã (*Punica granatum L.*, Punicaceae) e interferência dos mesmos na ação da amoxicilina in vitro. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.16, n.2, p.323-328, 2004. doi:10.1590/1983-084x/11_123.

TILLMANN, M.T.; BERGAMANN, L.K.; SILVA, J.S. Eficácia do *Triticum vulgare* e dasolução de polivinilpirrolidona-iodo na cicatrização de incisões cirúrgicas. **Revista Vet News**, v.16, n.96, 2009.

TRESCH, M.; MEVISSSEN, M.; AYRLE, H.; MELZIG, M.; ROOSJE, P.; WALKENHORST, M. Medicinal plants as therapeutic options for topical treatment in canine dermatology? A systematic review. **BMC Veterinary Research**. v.15, n.1, p.1-19, 2019. doi:10.1186/s12917-019-1854-4

UENO, H.; YAMADA, H.; TANAKA, I.; KABA, N.; MATSUURA, M.; OKUMURA, M.; TSUYOSHI, K.; TORU, F. Accelerating effects of chitosan for healing at early phase of experimental open wound in dogs. **Biomaterials**, v.20, n.15, p.1407-1414, 1999. doi:10.1016/S0142-9612(99)00046-00.

VALIZADEH, R.; HEMMATI, A.A; HOUSHMAND, G.; BAYAT, S.; BAHADORAM, M. Wound healing potential of *Althaea officinalis* flower mucilage in rabbit full thickness wounds. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v.5, n.11, p.937-943, 2015. doi: 10.1016/j.apjtb.2015.07.018.

VAN DE GRAAFF, K. M. **Anatomia Humana**. Barueri: Manole, 2003

VEIGA-JÚNIOR, V.F., PINTO, A.C., MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v.28, n.3, p.519-528, 2005. doi:10.1590/s0100-40422005000300026.

VENTURA, A.C.N. Diagnóstico de alergia no cão - O papel da barreira cutânea. Orientador: Luís Miguel Lourenço Martins. 2018. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade de Évora, Portugal, pp. 88-89.

WANG, R., DING, Y., LIU, R., XIANG, L., DU, L. Pomegranate: Constituents, Bioactivities and Pharmacokinetics, **Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology**, v.4, n.2, p.77-87, 2010.

WHAGHMARE, V.S.; WADKE, P.R.; DYAWANAPPELLY, S.; DESHPANDE, A.; JAIN, R.; DANDEKAR, P. Starch based nanofibrous scaffolds for wound healing applications. **Bioactive materials**, v.3, n.3, p.255-266, 2018. doi: 10.1016/j.bioactmat.2017.11.006.

YAN, M.; WANG, D.; KORDHIN, G.V., BENEDETTI, M.F. Quantifying metal ions binding onto dissolved organic matter using log-transformed absorbance spectra. **Water Research**, v.47, n.7, p.2603-2611, 2013. doi: 10.1016/j.watres.2013.02.044.

YANG, G.; PRESTWICH, G.D.; MANN, B.K. Thiolated carboxymethyl-hyaluronic-acid-based biomaterials enhance wound healing in rats, dogs, and horses. **International Scholarly Research Notices**, v.2011, 2011.

ZEPON, K.M.; KANIS, L.A.; SOLDI, V.; SALMORIA, G.V. Influência do pH nas propriedades físico-químicas, térmicas e mecânicas de filmes de poli (vinil álcool)/poli (ácido acrílico)/aciclovir. **Química Nova**, v.36, n.2, p. 215-219, 2013. doi:10.1590/S0100-40422013000200003

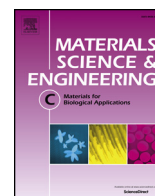
CAPÍTULO 1

Polymeric films containing pomegranate peel extract based on PVA/starch/PAA blends for use as wound dressing: *in vitro* analysis and physicochemical evaluation

Costa, N. N., Faria Lopes, L., Ferreira, D. F., Prado, E. M. L., Severi, J. A., Resende, J. A., Careta, F. P., Ferreira, M. C. P., Carreira, L. G., Souza, S. O. L., Cotrim, M. A. P., Boeing, T., Andrade, S. F. Oréfice, R. L., Villanova, J. C. O.

Artigo publicado no periódico “Materials Science and Engineering: C” em 2020. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110643>

¹Parte da dissertação de mestrado em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, do primeiro autor.



Polymeric films containing pomegranate peel extract based on PVA/starch/PAA blends for use as wound dressing: *In vitro* analysis and physicochemical evaluation

Nubya Nascimento Costa^a, Lohanna de Faria Lopes^b, Daiana Freitas Ferreira^b,
 Elisabeth Maria López de Prado^b, Juliana Aparecida Severi^{a,b}, Juliana Alves Resende^a,
 Francisco de Paula Careta^{a,b}, Maria Carolina Pimentel Ferreira^c, Lilian Gasparelli Carreira^c,
 Sarah Oliveira Lamas de Souza^d, Monique Alvarenga Pinto Cotrim^d, Thaise Boeing^e,
 Sérgio Faloni de Andrade^e, Rodrigo Lambert Oréfice^d, Janaina Cecília Oliveira Villanova^{a,b,*}

^a Programa de pós-graduação em Ciências Veterinárias, Departamento de Ciências Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo - UFES, 29.500-000, Alegre, ES, Brazil

^b Laboratório de Produção Farmacêutica, Departamento de Farmácia e Nutrição, Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo - UFES, 29.500-000 Alegre, ES, Brazil

^c Departamento de Engenharia Rural, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo - UFES, 29.500-000 Alegre, ES, Brazil

^d Laboratório de Engenharia de Polímeros e Compósitos - LEPCom, Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, 31.270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

^e Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas - NIQFAR, Universidade do Vale do Itajaí - UNIVALI, 88.302-202 Itajaí, SC, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Medicinal plants
Punica granatum
 Wound healing
 Antimicrobial activity
 Scratch assay
 Bioactive wound dressings

ABSTRACT

Chronic wounds constitute a serious public health problem, and developing pharmaceutical dosage forms to ensure patient comfort and safety, as well as optimizing treatment effectiveness, are of great interest in the pharmaceutical, medical and biomaterial fields. In this work, the preparation of films based on blends of poly (vinyl alcohol), starch and poly(acrylic acid), polymers widely used as pharmaceutical excipients, and pomegranate peel extract (PPE), a bioactive compound with antimicrobial and healing activities relevant to the use as a bioactive wound dressing, was proposed. Initially, the minimum inhibitory concentration (MIC) of the PPE was investigated by an *in vitro* method. Then, the best concentration of the PPE to be used to prepare the films was researched using an antimicrobial susceptibility test with the disc diffusion method. The microbiological assay was performed in films prepared by the solvent casting method in the presence of two concentrations of PPE: 1.25% w/v and 2.5% w/v. Films containing the lower PPE concentration showed antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*, with a difference that was not considered statistically significant when compared to the higher concentration of the extract. Therefore, the films prepared with the lower proportion of PPE (1.25% w/v) were considered for the other studies. The miscibility and stability of the extract in the films were investigated by thermal analysis. Parameters that determine the barrier properties of the films were also investigated by complementary techniques. Finally, *in vitro* biological tests were performed for safety evaluation and activity research. Analysis of the results showed that the incorporation of the higher proportion of starch in the blend (15% v/v) (PVA:S:PAA:PPE4) yielded smooth, transparent, and domain-free films without phase separation. Additionally, the PVA:S:PAA:PPE4 film presented barrier properties suitable for use as a cover. These films, when subjected to the *in vitro* hemolytic activity assay, were nonhemolytic and biocompatible. No toxicity from the extract was observed at the concentrations studied. The results of the wound healing *in vitro* test showed that films containing 1.25% PPE are efficient in reducing the scratch open area, provoking almost total closure of the scratches within 48 h without cytotoxicity.

* Corresponding author at: Laboratório de Produção Farmacêutica, Departamento de Farmácia e Nutrição, Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo - UFES, 29.500-000 Alegre, ES, Brazil.

E-mail address: pharmacotecnica@yahoo.com.br (J.C.O. Villanova).

<https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110643>

Received 17 January 2019; Received in revised form 7 October 2019; Accepted 3 January 2020

Available online 07 January 2020

0928-4931/ © 2020 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Wounds or ulcers are known as interruptions in the continuity of cutaneous-mucosal tissue, leading to structural and physiological changes that present with variable extension and depth. Chronic ulcers present a long healing time, with no tissue repair and no functional integrity after a treatment period of 12 weeks [1–3]. Immobility, physical limitations, constant pain and psychological damage are the main consequences of chronic wounds that may also negatively affect morbidity and mortality rates, causing temporary or permanent incapacitation of patients [4,5]. Thus, chronic ulcers constitute a serious public health problem in Brazil and worldwide, affecting a large number of patients, contributing to public health costs and interfering with the quality of life of this population [6].

The period of time involved in the treatment of chronic ulcers varies, and the type of dressing used in the treatment interferes with the healing process. In conventional treatments, the steps of removing covers, wound cleaning, administration of medicines and replacement of a new cover on the wound should be performed more than once a day, causing great pain and discomfort to the patient, in addition to delaying tissue reconstitution. Alternatively, polymer-based wound dressings can be considered a good choice for the treatment of chronic ulcers [3,7]. The advancement in the development of polymeric materials, as well as their use in the preparation of covers, has brought numerous benefits to the abovementioned pharmacotherapy since it allows for the preparation of a variety of types of dressings, including those that act as a drug release system and barrier for physical protection of the wounds. These dressings, named bioactive wound dressings, favor a decreased number of daily exchanges and enhance the comfort and the patient's quality of life during treatment [8–10]. Bioactive wound dressings can be prepared in the form of films, foams, hydrogels or hydrocolloids as a substitution for conventional pharmaceutical dosage forms, which are ointments, creams, gels, solutions, suspensions and powders [11]. The ideal bioactive wound dressings should protect the site of application, maintain a humid environment at the interface of the lesion, allow gas exchange with the environment, remove excess exudates and act as a physical barrier against microorganisms into the lesion. Such wound dressings should be prepared from nontoxic, nonallergenic and nonadherent materials. From a mechanical point of view, they must have good resistance and flexibility, allowing easy application and removal [12–15].

Currently, great attention has been given to the use of medicinal plants in pharmacotherapy instead of the use of synthetic drugs [16,17]. Different extracts obtained from the peels and fruits of the *Punica granatum* L. trees (pomegranate) are rich in phenolic compounds (especially ellagic acid and punicalagins), an important source of hydrolyzable tannins and ellagitannins, in addition to anthocyanins and flavonoids, which are metabolites related to numerous pharmacological activities, with their antimicrobial and healing properties displaying the greatest interest [3,18–25].

In this context, the present work proposed to develop a new pharmaceutical dosage form to use in the treatment of wounds: films for use as a bioactive wound dressing containing PPE that could be used to avoid microbial proliferation in the lesion and favor re-epithelialization. The first stage of this work consisted of researching the minimum inhibitory concentration of PPE by performing *in vitro* studies. In the second stage, the more suitable proportion of PPE in the films was evaluated employing a disc diffusion *in vitro* method. Then, films containing the better concentration of PPE (1.25 w/v) were submitted to thermal analysis and other techniques to determine its barrier properties and the best film formulation. The parameters evaluated were thickness, wettability, swelling index, mass loss and water vapor permeability rate. Finally, the preliminary biocompatibility, cytotoxicity and healing capacity were determined for this film using *in vitro* procedures [27,28]. The films were prepared by the solvent casting method, following the procedure described by Dutra and coworkers

(2017) [9] to obtain wound dressings containing papain. Blends containing different proportions of poly(vinyl alcohol), starch and poly(acrylic acid), polymers that are widely used in the pharmaceutical area, were used because they are generally recognized as safe (GRAS) and have their monographs included in the Handbook of Pharmaceutical Excipients. In all formulations, glycerin was used as a plasticizer to improve the flexibility and extensibility of the films [26]. Associations between natural and synthetic polymers have been employed in the preparation of bioactive dressings because their combination adds many requirements to make the films ideal for their intended use [8,12].

2. Methods

2.1. Materials

Poly(vinyl alcohol) with an average molecular weight of 85,000–124,000 g mol⁻¹ and a high hydrolysis degree (+99%); and high-purity potato starch and poly(acrylic acid) with a viscosity of 350–700 cP (25 °C), were obtained from Sigma-Aldrich (USA) and used without further purification. All other reagents used were of the highest purity and were purchased from Sigma-Aldrich (USA), HiMedia Laboratories (India) or Synth (Brazil). The hydroalcoholic extracts of pomegranate peels (PPE) were prepared by percolation, followed by rotary evaporation and freeze-drying, and were characterized and provided by the Laboratory of Pharmaceutical Production of UFES.

2.2. Pomegranate peel extract (PPE) analysis

The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by the microdilution method on 96-well polystyrene plates read on an Elisa reader with a 600 nm filter (Thermo Electron, model Multiskan Sky, USA). *Staphylococcus aureus* (ATCC 25.923) and *Escherichia coli* (ATCC 25.922) were employed and prepared in specific medium and standardized to a concentration of 1.5 × 10⁷ CFU/mL. Solutions of extracts at concentrations of 100, 75, 50, 25, 10, 5, 2.5 and 1.25 mg/mL were prepared in 5% dimethyl sulfoxide (DMSO) and sterile Mueller-Hinton broth. A negative control was performed with the DMSO diluent, chlorhexidine 0.12% and bacterial growth and culture medium. Plates were incubated at 35 °C for 24 h, and the MIC was defined as the lowest extract concentration capable of inhibiting microbial growth. The tests were performed in triplicate in the same microplate and in two different microplates.

2.3. Preparation of the polymeric dispersions and blends

PVA solutions at 5.0% (w/v) were prepared in purified water with heating between 100 and 120 °C and mechanical stirring (Fisatom, model 713D, Brazil) at 350 rpm. The 4.0% (w/v) starch dispersion was prepared at high temperature under mechanical stirring. The PAA gel was obtained by dispersing the polymer in water at a concentration of 2.5% (w/v), followed by alkalization to pH 6.5, employing sodium hydroxide (0.1 M). In all polymer dispersions, glycerin (2.5% w/v) was added as a plasticizer subsequent to cooling of the samples.

The blends were prepared by mixing different proportions of the polymer dispersions (% v/v) under magnetic stirring (Fisatom, model 752A, Brazil) for 30 min. The incorporation of PPE (1.25% and 2.25% w/v) was performed directly in the blends by mechanical stirring for another 30 min. The qualitative and quantitative compositions of the blends are given in Table 1.

2.4. Obtention and visual analysis of the films

The films were prepared by the solvent casting technique in which the polymer dispersion is deposited in a mold and the solvent is evaporated. A total of 10.0 mL of each blend was deposited in standardized

Table 1
Proportion of each component in the polymeric blends.

	PVA (5.0% w/v)	Starch (4.0% w/v)	PAA (2,5% w/v)	PPE
	% v/v			% w/v
PVA:S:PAA1	75.0	15.0	10.0	–
PVA:S:PAA2	80.0	10.0	10.0	–
PVA:S:PAA3	85.0	5.0	10.0	–
PVA:S:PAA4	75.0	15.0	10.0	1.25
PVA:S:PAA5	80.0	10.0	10.0	1.25
PVA:S:PAA6	85.0	5.0	10.0	1.25
PVA:S:PAA7	75.0	15.0	10.0	2.5
PVA:S:PAA8	80.0	10.0	10.0	2.5
PVA:S:PAA9	85.0	5.0	10.0	2.5

diameter (6.5 cm) Teflon plates, which were exposed to ambient air for 72 h until the solvent was completely evaporated. After drying, the films were visually evaluated by observing the aspects (domain formation and continuity), ease of removal of the molds (maintenance of integrity), color and opacity.

2.5. Determination of the optimal extract concentration in the films

To select the best proportion of PPE to be incorporated in the films, the prepared films were initially submitted to an *in vitro* assay to determine the antimicrobial susceptibility by the *in vitro* disc diffusion method, using lineages of *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12.228), methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) (ATCC 33.591) and *Escherichia coli* (ATCC 25.922). For this experiment, the microorganisms were previously cultured in BHI broth at 35.5 °C for 24 h, and the concentration of the bacterial suspension was adjusted to 0.5 McFarland scale (1.5×10^8 CFU/mL) using sterile saline solution (0.85% NaCl). Freshly prepared Mueller-Hinton agar medium (MHA) was transferred to the plates, and with the help of a swab, lines were sown by the sowing technique. Then, film disks (6 mm) containing PPE at 0.125, 0.25, 1.25 and 2.5% w/v and films without extract (negative control) were placed on the surface of the plates. Discs containing ampicillin (positive control) were used as the standard for comparison. The plates were incubated at 37 °C for 24 h. The diameter of the zone of inhibition was measured in millimeters (mm). The tests were performed in triplicate. The results were expressed as the average \pm standard deviation (SD). Differences between the diameters of the inhibition zones were compared by employing analysis of variance (ANOVA) and compared by Tukey's test. A value of $p < .05$ was considered statistically significant.

2.6. Miscibility and stability of the PPE in films

The miscibility of the blends, as well as the stability of the extract in the films prepared with 1.25% w/v of the extract, were investigated using thermal analysis. DSC measurements were performed with Exstar equipment (model DSC7020, Japan) in aluminum pans under a N₂ atmosphere with a flow rate of 50 mL/min and a heating rate of 10 °C/min. Initially, the sample was heated from 25 and 200 °C, followed by cooling to 0 °C and reheating to 200 °C. TG/DTG thermograms were obtained with an Exstar thermobalance (model 7200, Japan), between 25 and 800 °C, under an inert N₂ atmosphere and a heating rate of 10 °C/min.

2.7. Study of films barrier properties

The films containing 1.25% w/v PPE were subjected to various techniques to evaluate their barrier properties. First, thickness was evaluated using a digital micrometer (Mitutoyo, model 293–230, Brazil). The results were based on 5 measurements, considering 2 randomly selected central points and 3 peripheral points from each

film. Measurements were performed in triplicate, and the results are expressed as the average \pm standard deviation (SD). Then, the swelling index was determined according to a methodology adapted from Xie et al. [30]. Films with and without extract, with dimensions of 2.0 \times 2.0 cm, were initially dried in an oven at 105 °C for mass normalization, and after registering the initial mass, they were placed in a beaker containing 50.0 mL of PBS buffer solution at room temperature. After 60 min, the films were collected with tweezers, the excess water was removed using absorbent paper, and the films were weighed again. The swelling index (Q%) represents the increase in mass of the films and was calculated according to Eq. (1), where *ms* is the weight of the swollen film and *md* is the mass of the dry film. Then, the solubility was determined employing a procedure similar to that described by por Flores et al. [31]: films with and without extract (2.0 \times 2.0 cm) were dried in an oven at 105 °C for weighed mass normalization, and after registration of the initial mass, the films were placed in Erlenmeyer flasks containing 50.0 mL of PBS buffer solution. The vials were kept with stirring in a reciprocating bath (Marconi, model MA93, Brazil) at room temperature for 48 h. The solubility index represents the amount of mass lost (ML%) by each film and was calculated according to Eq. (2), where *mf* is the final weight of the film and *mi* is the initial mass of the film. Each measurement was performed in triplicate for both the swelling and solubility tests, and the results are expressed as the average \pm standard deviation (SD).

$$Q\% = \frac{ms - md}{md} \times 100 \quad (1)$$

$$ML\% = \frac{mf - mi}{mf} \times 100 \quad (2)$$

The wettability of the dressings was evaluated by measuring the contact angle (ϕ) formed between the PBS buffer solution and the dressing using the sessile drop method in a GBX instrument (Digidrop-DI, Ireland) goniometer at 25 \pm 2 °C. Five microliters of each solution was deposited onto the surface of each dressing with dimensions of 2.0 cm \times 2.0 cm using a microsyringe. The results represent the average angle between the tangent line and the surface of the films, referring to the right and left sides of the deposited droplets. Three consecutive measurements were performed at room temperature using the Surface Energy mode of the software. The work parameters of adhesion and spreadability were calculated directly. Finally, the permeability to water vapor was determined by measuring the water vapor transmission rate (WVTR) and the permeability coefficient (PC) through the films using the E96/E96M-05 (2005) method [32]. One sample of each film was firmly attached to the top of a glass vial containing 18.0 g of calcium chloride (CaCl₂) as a desiccant. A glass vial was then placed in a climatic chamber (Shel Lab, model HC9R2, USA) at 25 °C and 35% relative humidity (RH) for 24 h. Changes in the CaCl₂ weight were registered at regular time intervals and plotted as a function of time. The data were analyzed by linear regression, which provided the linear correlation coefficient (R²) and the equation of a line ($y = ax + b$). The water vapor transmission rate (WVTR) was determined according to Eq. (3), and it is given as the relationship between the film water mass gain as a function of time, where Δm is the mass variation (g), Δt is the variation in time (days), and *A* is the sample area (m²). The tests were performed in triplicate, and the results are expressed as the average.

$$WVTR = \frac{\Delta m}{\Delta t} \times \frac{1}{A} \quad (3)$$

2.8. Study of the biological *in vitro* properties

The film prepared with 15% v/v starch, which presented adequate barrier properties for its intended use, was submitted to *in vitro* studies for the preliminary evaluation of biocompatibility, cytotoxicity and

healing activity.

The hemolytic activity of the samples was determined according to the methodology proposed by Kamoun et al. [29], with modifications. Films with dimensions of 1.0×1.0 cm were inserted into polypropylene tubes containing human blood, and 0.125 mL of ACD (acid/citrate/dextrose) solution was added. The systems were left undisturbed for 1 h, and then, 1.0 mL of PBS buffer solution was added to the tubes containing the samples. After 20 min, the samples were centrifuged (Centrilab, model 80-2B, Brazil) at 8000 rpm for 10 min. The supernatant was transferred to a 96-well plate, and the absorbance was measured in a UV-VIS spectrometer (Hettich, model Mikro 200) at 540 nm. As a negative control, PBS buffer was employed, and as a positive control, distilled water was used. The test was performed in triplicate for the films with and without pomegranate extract. The degree of hemolysis was calculated based on Eq. (4), in which A_S is the absorbance of the film, A_{C-} is the absorbance of the negative control, and A_{C+} is the absorbance of the positive control. The results are expressed as the average \pm standard deviation (SD).

$$\text{Hemolysis (\%)} = \frac{(A_S - A_{C-})}{(A_{C+} - A_{C-})} \times 100 \quad (4)$$

With the aim of performing an *in vitro* healing assay (scratch assay), L929 cells (murine fibroblast NCTC clone 929) were acquired from the Rio de Janeiro cell bank and cultivated for cell viability assessment. Cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) in an incubator with 5% CO₂ saturation and an atmosphere of 37 °C. To verify cell viability, when the cells reached 90% confluency in culture bottles, they were seeded at 5×10^4 /well in 96-well plates. Then, the cells were incubated with DMEM plus 0.1% DMSO (basal group), 10% DMSO or pomegranate peel extract (1–100 µg/mL). Furthermore, 10 µL of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, 5 mg/mL) was added after 21 h to each well, and 3 h later, 250 µL of each supernatant was removed and replaced with 100 µL of DMSO. The absorbance was measured at 570 nm, and cell viability was determined, considering the media of the basal group as 100%.

The proliferative ability of the fibroblasts exposed to films containing pomegranate peel extract was assessed using the scratch wound assay, which measures the expansion of a cell population on a surface as previously described by Balekar et al. with few modifications [33]. After culture, 5×10^5 cells/well were seeded in 24-well plates and cultured in DMEM/10% FBS overnight. When confluency was verified, the plate was removed, and artificial wounds were created in the monolayers by making a linear scratch in the center of each well using the tip of a sterile 200 µL plastic pipette tip. Cellular debris created from the scratch was removed by gently washing the wells with phosphate-buffered saline (PBS). The scratches were then divided into groups and treated with films containing a low (0.125% w/v) or high (1.25% w/v) concentration of PPE or film without PPE. DMEM/10% FBS was used as a basal control. The films were cut into circular shapes of the same size as the plate wells and placed over the cell culture, simulating the use recommendation. The plates were then incubated at 37 °C in a humidified incubator with a 5% CO₂ atmosphere. The plates were evaluated after 24 and 48 h of incubation to assess the closure of the scratched area. Micrographs were used to record the wound closure activity, which was captured under an inverted microscope (Olympus, CK40, Japan) with magnification of 100 \times , and analyzed by ImageJ software. All experiments were performed in triplicate.

3. Results and discussion

3.1. Minimal inhibitory concentration (MIC) determination

In microbiology, the minimum inhibitory concentration (MIC) is the lowest concentration of a drug that prevents visible growth of a bacterium. The growth of the *Escherichia coli* isolate was inhibited by a

concentration of 2.5% w/v PPE, while *Staphylococcus aureus* showed no growth at the lowest concentration tested (0.125% w/v) [40]. Both the microorganism strains used in the PPE MIC assay were sensitive to chlorhexidine 0.12%, showing that the strains were viable and sensible. The results obtained are in accordance with literature data that show that extracts of pomegranate peels have a significant inhibitory effect on gram-positive and gram-negative bacteria, such as *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Proteus vulgaris*, and *Salmonella typhi*, among others [40–42]. According to Machado and coworkers (2002) [41], the extract of pomegranate peels prepared in ethyl acetate was effectively inhibited *Staphylococcus aureus* at a concentration of 0.25% w/v. Abdollahzadeh and coworkers [40] found that strains of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* were sensitive to the pomegranate methanolic extract at concentrations of 4.0, 8.0 and 12.0 mg/mL. Among bacterial and fungal cultures selected by Dahham, Tabhassum and Khan [42], the highest antimicrobial activity for the pomegranate methanolic extract was observed against *Staphylococcus aureus*, with inhibition halos of 10.0 to 25.0 mm. The authors attributed this efficacy to the presence of water-soluble polyphenolic compounds, anthocyanins and hydrolysable tannins in the extract because these compounds are capable of degrading the cell wall, breaking the cytoplasmic membrane, damaging the microorganism membrane proteins and interfering with enzymes integrated in the membrane, causing cell death. According to the literature, the MIC values of pomegranate extracts determined in different studies vary significantly due to the different extraction methods, the part of the fruit used and variations in the seasons and regions of growth.

3.2. Film preparation and preliminary evaluation

Polymers from renewable natural sources have been chosen for development of materials for use in several areas, especially because of their low cost and high availability. In the pharmaceutical area, the biodegradable characteristics of polymers also arouse interest. However, films based on pure starch present poor properties in relation to the formation of moisture barriers and rapid dissolution [34]. Such properties can be manipulated by the formation of blends. PVA is a versatile polymer, and its main characteristics that can be exploited in its use as a pharmaceutical excipient are its good chemical and biological compatibility, adequate mechanical strength, excellent ability to form films, control of swelling capacity and the solubility capacity of the obtained membranes. Many studies report the use of PVA in drug delivery systems administered by different routes, such as oral, buccal, topical, transdermal, ophthalmic, intramuscular, intravaginal and pulmonary routes [35]. Starch, although inexpensive and biodegradable, has a low capacity to form films and presents rapid dissolution in water, was chosen to be blended with PVA. PAA was incorporated to improve the swelling and adhesion capacity of the films since there are numerous reports in the literature about its use as a mucoadhesive polymer [36,37].

The method proposed for the preparation of the films was based on molding and evaporation of the solvent since this technique is simple and fast, enabling large-scale reproduction and providing an aseptic environment, resulting in sterile films [9]. Visual analysis of the formed films (Fig. 1) revealed that they were transparent, bright, and free of domains, a characteristic present in systems where no phase separation occurs. The films were easily removed from the molds and remained intact. The addition of extract at concentrations of 1.25 and 2.5% w/v produced light yellow films, the characteristic color of the extract.

3.3. Determination of the best pomegranate peel extract concentration in the films

The composition of the skin microbiome shifts markedly during pathogenic processes, and recent studies have shown that gram-positive

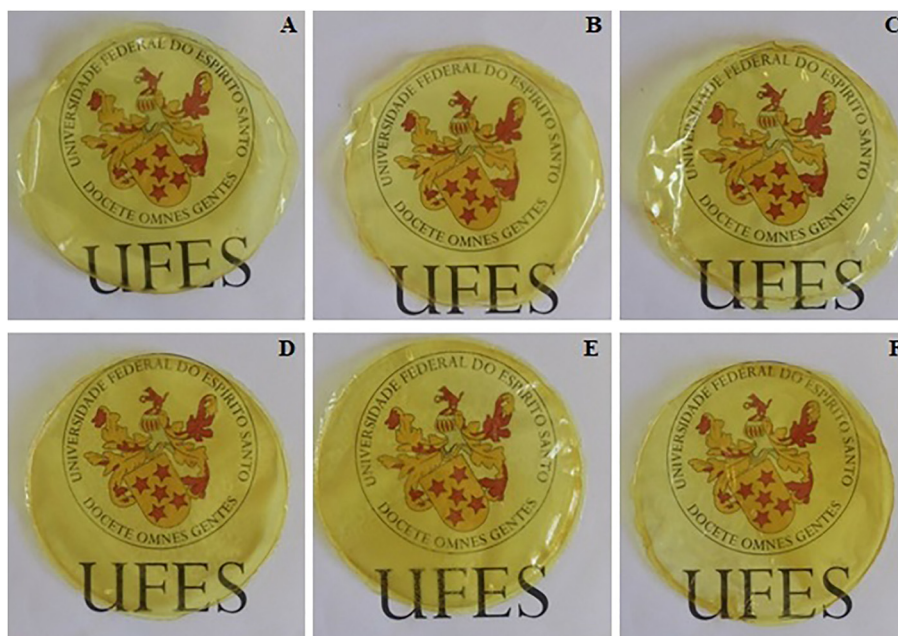


Fig. 1. Representative images of the films prepared from the PVA:S:PAA blends containing 1.25% w/v extract (A, B and C) and 2.5% w/v extract (D, E and F).

Table 2

Measurement of the inhibition halos (mm) of the films in the *in vitro* disc diffusion test.

Films	Inhibition halos (mm)	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
PVA:S:PAA1	0.00 (± 0.00)	0.00 (± 0.00)
PVA:S:PAA2	0.00 (± 0.00)	0.00 (± 0.00)
PVA:S:PAA3	0.00 (± 0.00)	0.00 (± 0.00)
PVA:S:PAA:PPE4	20.00 (± 0.00)	23.00 (± 0.00)
PVA:S:PAA:PPE5	19.67 (± 0.45)	21.67 (± 0.45)
PVA:S:PAA:PPE6	18.33 (± 0.89)	23.33 (± 1.78)
PVA:S:PAA:PPE7	20.00 (± 0.00)	23.67 (± 0.45)
PVA:S:PAA:PPE8	20.00 (± 0.00)	23.67 (± 0.45)
PVA:S:PAA:PPE9	19.00 (± 0.00)	23.50 (± 0.50)

cocci are important etiological agents of these diseases [43]. In terms of cost and prevalence, one of the most important pathogens is *Staphylococcus aureus*, which can cause a wide spectrum of infections and frequently develops resistance to antibiotics. Additionally, although *S. epidermidis* is generally beneficial to the host, it is also a leading cause of death and nosocomial infections in premature infants [44]. Based on this, the disc diffusion method was performed to define the most appropriate concentration of the extract in the films (1.25% w/v and 2.5% w/v). Three strains were used: *Staphylococcus epidermidis*, MRSA (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) and *Escherichia coli*. The values found from the determination of the inhibition halo measurements are given in Table 2. Fig. 2 shows representative images of the assay for the investigated strains.

In this test, the inhibition zones observed for ampicillin were in agreement with the recommended standard for the test (CLSI, 2015) [39], and the inhibition zones were 10.0 mm for the methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) strain and 29.0 mm for *S. epidermidis*. For both lineages, growth inhibition was observed in the presence of the films containing the extract at the two investigated concentrations. According to ANOVA, no significant difference was observed between the value of the inhibition zone and the concentration of the extract (*S. aureus* - 1.25% w/v and 2.5% w/v, $p = .384$; *S. epidermidis* - 1.25% w/v and 2.5% w/v, $p = .107$), suggesting that even when the extract concentration increased 2-fold, there was no improvement in antimicrobial

activity. The results obtained in the present work are similar to those found in the literature.

Nema and coworkers [20] prepared ointments containing a methanolic pomegranate extract at concentrations of 10.0% and 15.0% and found that the formulations had superior capacity to that of a nitrofurazone ointment in promoting the contraction of wounds in rats. Hayouni and coworkers [21] demonstrated that ointments containing the ethanolic extract of pomegranate peels at 5.0 wt% had satisfactory effects on wound contraction, re-epithelization time, and biochemical and histopathological characteristics of induced wounds in pigs. Fleck et al. [22] prepared hydrogels containing a 2.0% ethanolic extract of pomegranate and achieved complete closure of wounds that did not respond to other treatments within a period of 6 weeks. Nasiri and coworkers [23] compared the ability of creams containing 1.0% silver sulfadiazine to that of creams containing 5.0% and 10.0% pomegranate flower extract and observed that the decrease in lesion size after 15 days was greater with the use of the cream containing the extract, presenting complete closure of the lesion after 25 days. Zam and coworkers [24] prepared an aqueous extract in which the wound covering gauze had been soaked into a dispersion of starch gum containing solely pomegranate peels or peels in association with honey. The susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* strains was evaluated, and both strains were sensitive to the presence of the pomegranate extract and its association with honey [25].

Since there was no significant change in the antimicrobial activity between the studied concentrations, the films prepared in the presence of 1.25% w/v extract were selected for the next studies.

3.4. Thermal analysis on films containing 1.25% w/v PPE

To evaluate the stability and miscibility of the extract and polymers in the blends, films containing 1.25% w/v extract were analyzed by differential scanning calorimetry and thermogravimetry. All the transitions observed in the DSC curves obtained in the present work occurred at temperatures lower than those reported in the literature for films prepared from pure PVA with an equivalent molar mass and can be seen in Table 3.

It can be observed that the values found for T_c (the crystallization temperature during cooling) in the samples studied were lower than 186 °C (the T_c value reported for PVA). Jose, Shehzad and Al-Harti,

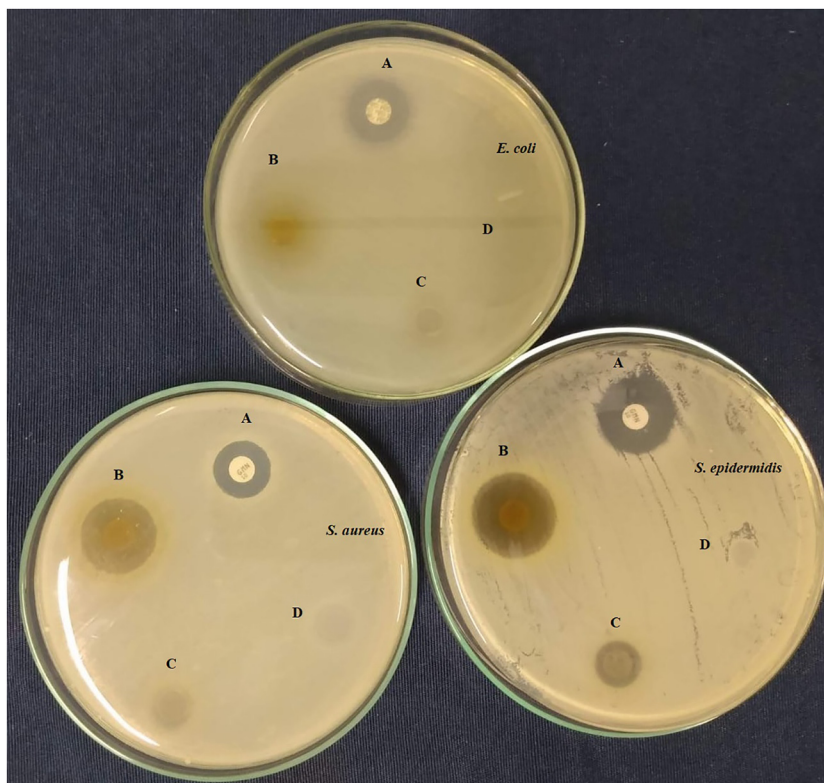


Fig. 2. Representative images of the disc diffusion test using *E. coli*, *S. aureus* and *S. epidermidis* strains: positive control – ampicillin (A); film containing PPE at 1.25% w/v (B); film containing PPE at 0.25% w/v (C); and film without PPE (D).

prepared films from PVA/PAA blends in the proportions of 90:10 and 70:30 and found T_c values of 152.1 and 86.0, respectively [45]. The addition of PAA, as well as glycerin, to PVA films causes a reduction in PVA crystallinity and contributes to the formation of less perfect crystals, which implies a reduction in the T_c values, as observed in the present work [45–47]. It was also noted that the addition of the extract to the blends caused a greater decrease in the T_c values, except for in the samples containing 80% v/v PVA (PVA:S:PAA5). However, the values of T_m were reduced in the films obtained from the blends compared to the observed T_m values for pure PVA (220 °C). The addition of the extract promoted a greater reduction in this value, suggesting the existence of an affinity between the extract components and the polymers. Regarding the glass transition, a single T_g value (in the first heating scan) was found in all investigated samples, which was lower than those reported for pure PVA ($T_g = 75$ °C) and PAA ($T_g = 113$ °C). In the second heating scan, the glass transition completely vanished, except for in the sample containing the higher proportion of PVA in the absence of extract (PVA:S:PAA3). This behavior can be related to the change in the mobility of the polymer chains caused by the existence of strong interactions between the polymers [45]. The results obtained are in accordance with the literature and indicate the existence of a certain

degree of miscibility between the polymers in the blends. On the other hand, it is possible to emphasize that the pomegranate extract can be seen as a complex matrix formed by phenolic compounds, especially punicalagin, ellagic acid, and anthocyanins, that contain several conjugated benzene rings in their structures, and are able to interact with the –OH groups in the starch and the PVA and with the –COOH groups in the carbomer [17,25]. The presence of the extract in the blends can interfere with the organization of the polymer chains, altering the behavior of the studied transitions, especially reducing the crystallization and melting temperatures. Furthermore, the addition of the extracts may favor the appearance of different crystalline morphologies; for example, causing the appearance of a second T_c and a second T_g in some samples. Oliveira et al. prepared PVA wound dressings containing propolis and observed the occurrence of changes in the crystallization in the PVA hydrogels due to the presence of the extract [48]. The DSC curves obtained for the pure films and the films containing extracts are given in Figs. 3 and 4, respectively.

Analysis of the thermograms of the raw materials (Fig. 5) indicates the presence of events associated with water loss at temperatures between 20 and 120 °C since all of the raw materials are highly hydrophilic and tend to adsorb moisture from the environment, which is

Table 3

Thermal events obtained from the DSC curves of the heating and cooling of the samples under a N_2 atmosphere (flow rate of 50 mL/min, heating rate of 10 °C/min).

Films	First heating			Cooling		Second heating		
	T_g (°C)	T_m (°C)	ΔH_m (mJ/mg)	T_c (°C)	ΔH_c (mJ/mg)	T_g (°C)	T_m (°C)	ΔH_m (mJ/mg)
PVA:S:PAA1	59.0	184.0	–	157.5; 163.0	–20.5	–	182.8	20.3
PVA:S:PAA2	55.4	178.9	–	153.0; 163.0	–20.7	62.0	186.2	20.2
PVA:S:PAA3	66.2	177.0	32.0	152.0	–16.7	60.0; 126.0	191.0	14.7
PVA:S:PAA:PPE4	–	170.0	–	125.8; 150.0	–9.8	–	173.7	7.9
PVA:S:PAA:PPE5	54.0	190.7	21.0	152.0	–15.0	–	188.0	19.1
PVA:S:PAA:PPE6	60.8	174.0	–	125.9; 147.6	–8.7	–	172.4	8.4

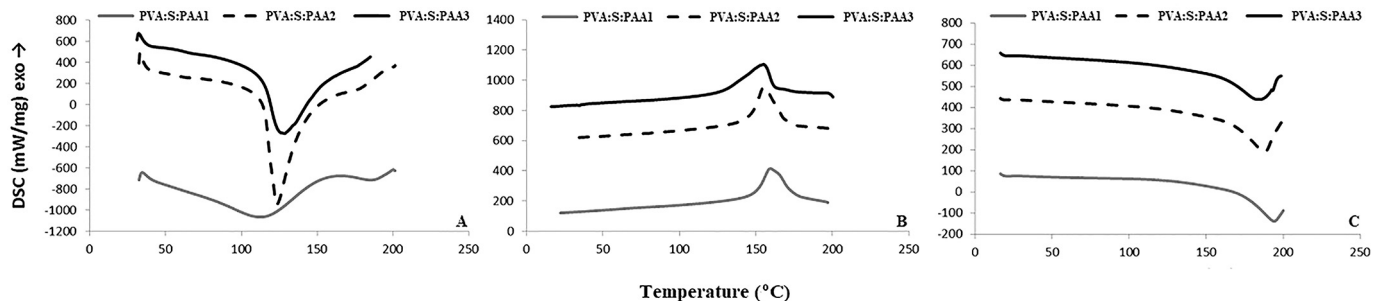


Fig. 3. DSC curves for the first heating scan (A), cooling (B) and second heating scan (C) for the films without extract under a N₂ atmosphere (flow rate 50 mL/min, heating rate 10 °C/min).

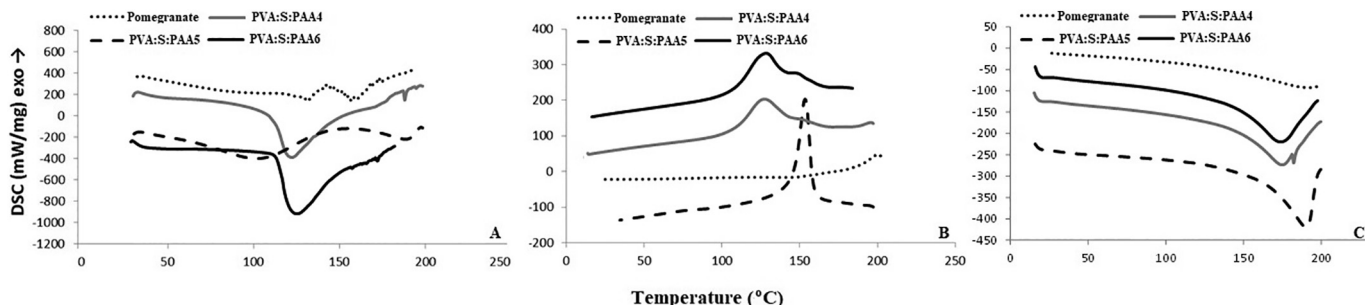


Fig. 4. DSC curves for the first heating scan (A), cooling (B) and second heating scan (C) for the films with PPE under a N₂ atmosphere (flow rate 50 mL/min, heating rate 10 °C/min).

consistent with the literature.

The DTG curve of corn starch presents a thermal degradation event at a maximum temperature close to 316 °C, which is associated with breaking of the starch structure with CO and CO₂ elimination, and the formation of carbonaceous residues, with a mass loss of approximately 69% [49]. In the case of PVA, in addition to water loss, two other thermal degradation events can be observed. The first occurred between 190 and 300 °C (T_{peak} near at 262.5 °C) and corresponded to the elimination of low molar mass carbon-based molecules due to breakage of the polymer carbon-carbon backbone together with the elimination

of hydroxyl groups from dehydration reactions. The second thermal degradation event appeared at higher temperatures (T_{peak} near 444.4 °C) and can be attributed to the thermal decomposition of high molar mass polyenes derived from the first stage of thermal degradation. Two decomposition processes have been reported for PVA in the literature [50,51]: the first near 270 °C and the second in the range of 430 to 565 °C, accompanied by mass losses of 42% and 90%, respectively. The mass losses observed in the present experiment were 64% and 17.4%, respectively. Similar behavior was observed for PAA: at the maximum temperature of 297.4 °C, a mass loss of 23.6% was found, and

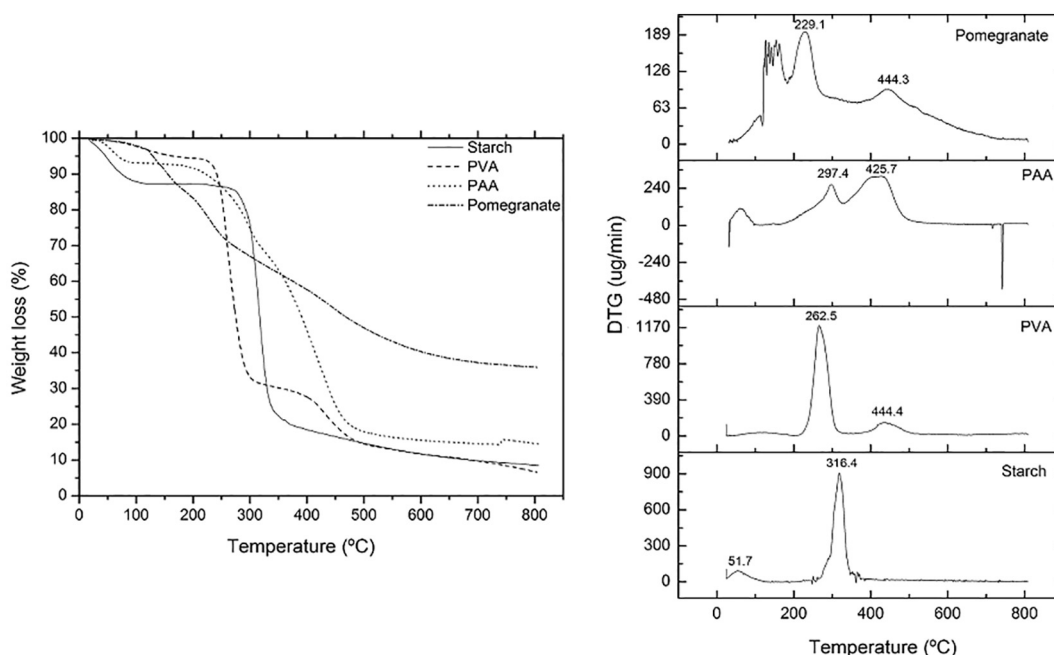


Fig. 5. TG/DTG thermograms for the pure materials obtained in a N₂ atmosphere between 25 and 800 °C (heating rate: 10 °C/min).

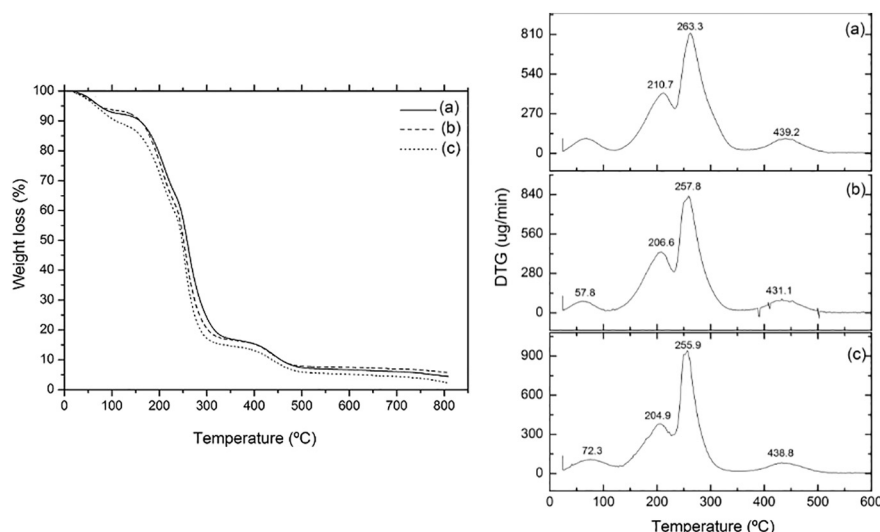


Fig. 6. TG/DTG thermograms for the films without extract obtained in a N_2 atmosphere between 25 and 800 °C (heating rate: 10 °C/min).

at 425.7 °C, a loss of 52% was observed. For PAA, in addition to water loss, two other events have been reported between 150 and 415 °C (related to the elimination of acrylic acid moieties) and between 415 and 558 °C (due to the degradation of the main carbon-carbon backbone), with mass losses of approximately 12% and 28%, respectively [45].

Numerous events were observed in the thermograms of the pure extract with peak temperatures between 100 and 200 °C, associated with the loss of approximately 12% of the mass in water and in the low molar mass components of the extract. Other losses were identified at temperatures of approximately 229 °C (approximately 15% mass loss) and 444 °C (24.2%), which were probably related to the loss of organic material and thermal decomposition of the components of the extract. No data were found in the literature on the thermal decomposition of hydroalcoholic extracts of pomegranate peels. The thermograms of the pure films and films containing the extract are given in Figs. 6 and 7, respectively.

Four thermal events related to the loss of mass can be observed in the thermograms of all the films, in contrast to those observed for the pure raw materials. In addition to the first event related to water loss at temperatures between 50 and 120 °C, 3 other thermal events were observed in all films: 25.9% (T_{peak} at approximately 211 °C), 47.7%

(T_{peak} at approximately 263 °C) and 9.3% (T_{peak} at approximately 439 °C) for films containing 75% v/v PVA (PVA:S:PAA1); 23% (T_{peak} at 206 °C), 54.6% (T_{peak} at 258 °C) and 8.7% (T_{peak} at 431 °C) for films containing 80% v/v PVA (PVA:S:PAA2); and 28.1% (T_{peak} at approximately 205 °C), 45% (T_{peak} at approximately 256 °C) and 9% (T_{peak} at approximately 439 °C) for the films containing 85% v/v PVA (PVA:S:PAA3). The thermal degradation event at approximately 205 °C for each film can be associated with the thermal decomposition of glycerin. The event at approximately 260 °C is due to the thermal degradation of the PVA backbone, and the thermal degradation event at approximately 430 °C can be associated with the elimination of high molar mass carbon-based molecules that remained after the degradation of the polymers in the second stage. For the films prepared from blends loaded with extract (Fig. 6), the following mass losses were observed: 20% (T_{peak} at approximately 199 °C), 38.1% (T_{peak} at approximately 329.4 °C) and 17.7% (T_{peak} at approximately 427.5 °C) for films containing 75% v/v PVA (PVA:S:PAA:PPE4); 37.4% (T_{peak} at approximately 213 °C), 32.7% (T_{peak} at approximately 342 °C) and 37% (T_{peak} at approximately 428 °C) for films containing 80% v/v PVA (PVA:S:PAA:PPE5); and 24.1% (T_{peak} at approximately 206.7 °C), 33.5% (T_{peak} at approximately 342 °C) and 17.7% (T_{peak} at approximately 429 °C) for films containing 85% v/v PVA (PVA:S:PAA:PPE6).

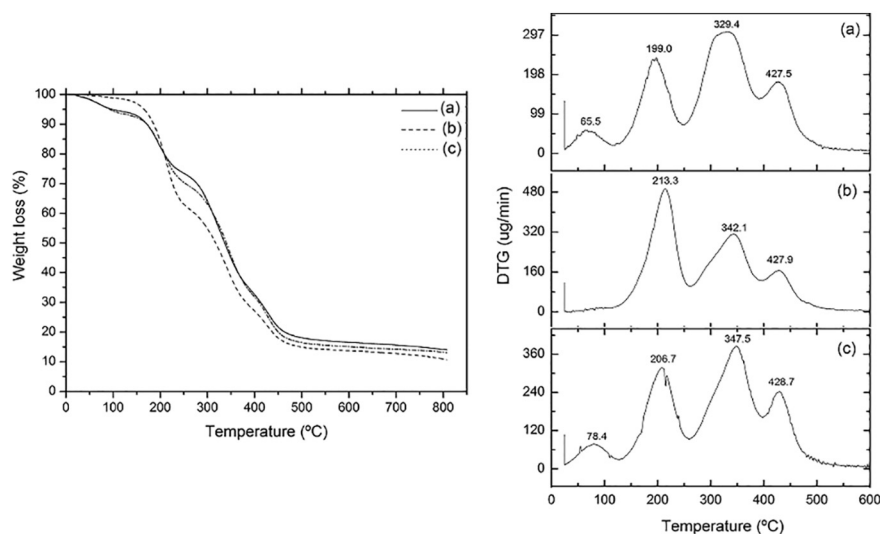


Fig. 7. TG/DTG thermograms for films containing PPE obtained in a N_2 atmosphere between 25 and 800 °C (heating rate: 10 °C/min).

The wide thermal degradation event centered at approximately 210 °C can be related to a combination of the degradation of glycerin and the extract. The thermal degradation event from 250 °C to 400 °C comprises the decomposition of the backbone of the polymers and the components of the extract, while the thermal degradation event centered at 430 °C can be related to high molar mass residue from the thermal degradation of both the polymers and the extract.

From analysis of the data, it is possible to observe that changes occurred in the thermograms of the films prepared in the presence of extract, with polymer thermal decomposition temperature shifts to higher values (between 300 and 350 °C), along with broader peaks and a reduction in mass loss during this stage. The inclusion of extract in the blends may have favored the interactions between the polymers, anchoring the polymer chains through the aromatic groups and providing greater stability for the films, which began to undergo degradation at higher temperatures. These observations corroborate the results found from the DSC curves. The evaluation of the results found from the thermal analysis allows one to conclude that the formed blends were miscible and that the addition of the extract favored blend stability. Visual analysis of the films (Fig. 1) showed the absence of phase separation and domain formation in all samples, as well as the maintenance of integrity and continuity, which contributes to the manipulation and functionality as a barrier.

3.5. Study of barrier properties of films containing 1.25% w/v of PPE

Commercially available wound dressings are prepared from film-forming polymers, hydrocolloid-forming polymers or hydrogel-forming agents. According to the type of polymer used, thin or thick films can be obtained with varying degrees of the absorption of exudates, transparency or opacity, adhesive or nonadhesive capacity and semipermeable or permeable properties [11]. An important parameter to be considered for the success of the use of polymeric films in the preparation of bioactive wound dressings is their behavior against exudates since this will determine the success of the adhesion of the dressing as well as the residence time of the material at the application site, re-epithelialization, mechanical resistance and the release of the drug contained therein [14]. In this sense, the functionality of the wound dressings is governed by its hydrophilicity, degree of swelling, solubilization, thickness and water vapor permeability [49,51–53]. The values obtained from the film surface wettability test with PBS are given in Table 4.

Hydrophilicity is an important factor for surface interactions, including those that occur with biological components. Due to their nature, hydrophilic films have emerged as good candidates for the development of bioactive wound dressings [52,55,56]. To determine the degree of hydrophilicity of a given surface, the contact angle (ϕ) between water or buffer solutions and a material is most often measured. Spreadability (S) and adhesion work (W) are also parameters that indicate the affinity of films for liquids: larger adhesion works and, consequently, greater spreadability are seen on more hydrophilic

Table 4

Angle of contact, adhesion work and spreadability of the PBS solution on films prepared from pure blends and blends containing 1.25% w/v pomegranate peel extract.

Sample	θ (degrees) (10 s)	Adhesion work (mN/M)	Spreadability (mN/m)
PVA:S:PAA1	76.35 (\pm 0.63)	89.99 (\pm 0.78)	-55.60 (\pm 0.78)
PVA:S:PAA2	80.23 (\pm 7.92)	85.10 (\pm 9.85)	-60.50 (\pm 9.85)
PVA:S:PAA3	88.91 (\pm 17.05)	73.02 (\pm 20.50)	-72.53 (\pm 20.50)
PVA:S:PAA:PPE4	24.22 (\pm 4.19)	139.01 (\pm 2.24)	-6.60 (\pm 2.24)
PVA:S:PAA:PPE5	42.06 (\pm 3.88)	126.33 (\pm 3.79)	-19.26 (\pm 3.79)
PVA:S:PAA:PPE6	40.33 (\pm 5.02)	128.18 (\pm 4.16)	-17.41 (\pm 4.16)

surfaces. When the liquid is water, the wettability is characterized as hydrophilicity [57]. According to the literature, epithelial cells are more prone to adhesion and proliferation phenomena in the presence of moderately hydrophilic substrates whose contact angle is between 30° and 90° than in hydrophobic ($\phi \geq 90^\circ$) or very hydrophilic substrates ($\phi < 30^\circ$) [54,55,58,59].

Analysis of the results indicated that all films were moderately hydrophilic and that only the film containing the highest proportion of starch (15% v/v) in the presence of extract (PVA:S:PAA:PPE4) was totally wetted by buffer. In the films prepared from blends with lower starch proportions, the higher ϕ and lower hydrophilicity can be justified by the presence of fewer free OH groups on the surface, reducing the formation of hydrogen bonds. The addition of the PPE promoted a reduction in the ϕ value and an increase in hydrophilicity, probably due to the modifications in the organization of the polymer chains and the presence of free hydrophilic groups, as reported by Lin et al. [60], who prepared PVA films at 10.0% w/v *Bletilla striata* extract (5.0% w/v).

It was observed that films with pomegranate peel extract showed higher thickness compared to films without extract (Table 5). The data obtained from the thermal analysis of the present work indicated the existence of strong interactions between the polymers and the components of the extract, and the incorporation of the extract also promoted an increase in the thickness of the films, probably due to the large volume of functional groups that compose the extract. Gaikwad, Lee and Lee [61] suggested that the compaction and ordering in the PVA films were altered by the addition of apple bagasse, which increased the thickness of the obtained edible films. Thickness is considered a determinant parameter in the functionality of a barrier and can influence the results of swelling, solubility and water vapor permeability tests [49,61–63].

The ability of dressings to absorb exudates is another important parameter to be studied since the rehydration of the necrotic tissues in the wound and the debridement of necrotic tissue with spontaneous re-epithelialization are favored by the promotion of fibroblast proliferation and the migration of keratinocytes as a result of fluid sorption [58–60]. The values obtained from the swelling and solubility tests are given in Table 5. As seen from the hydrophilicity analysis, the presence of higher amounts of starch in the same samples produced films that were more wettable than the others. After 1 h of immersion in PBS solution, the PVA:S:PAA1 and PVA:S:PAA:PPE4 films presented the highest values of %Q (approximately 115.5% and 126%, respectively). The presence of a greater number of -OH groups on the surface of the films from the starch and their availability to make hydrogen bonds with water appears to positively affect both the hydrophilicity and swelling. Trinath and coworkers, when preparing films from PVA/starch blends, obtained maximum swelling values from samples prepared with 30% of the natural polymer. According to the authors, the lowest observed values of %Q were observed in the films containing the drug, which can be explained by the interference between the polymers from the drug, leading to the formation of networks less expandable and with a lower capacity to capture the solvent [62]. Similar results were observed in the present work for the films containing extract and a lower content of starch, because the lowest values of %Q were observed for the PVA:S:PAA5 and PVA:S:PAA6 films.

In the solubility evaluation, the highest values of mass loss after 48 h of contact with PBS buffer at 35 °C were obtained for the films containing the extract, with a %ML variation between 38.0 and 43.0%. Despite promoting a greater interaction between the polymer chains, addition of the extract can also contribute to an increase in the surface hydrophilicity of the films, favoring contact with aqueous medium; since the films are water soluble, dissociation from the polymer chains with a loss of mass may have been favored after a long contact time (48 h) with the dissolution medium. Control of the hydrophilicity and the dissolution rate of the films are the main factors involved in the preparation of blends between PVA and natural polymers such as starch [63][64]. However, it should be noted that all investigated films

Table 5

Swelling index (Q%), solubility (ML%), thickness, slope of the linear regression line of the sample weight vs time graph and rate of water vapor transmission (WVTR).

Sample	Thickness (mm)	Q (%) (60 min)	ML (%) (48 h)	Slope ($\Delta m/t$) (g/h)	WVTR ($\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$)
PVA:S:PAA1	0.0674 (± 0.0059)	115.90 (± 30.00)	-25.20 (± 3.91)	0.0328	1601.83 (± 450.76)
PVA:S:PAA2	0.0688 (± 0.0007)	97.76 (± 26.17)	-28.10 (± 9.80)	0.0309	1509.16 (± 79.21)
PVA:S:PAA3	0.0620 (± 0.0084)	91.24 (± 41.25)	-29.98 (± 6.77)	0.0317	1549.90 (± 103.10)
PVA:S:PAA:PPE4	0.0990 (± 0.0187)	125.48 (± 45.70)	-38.24 (± 3.42)	0.0314	1535.64 (± 178.58)
PVA:S:PAA:PPE5	0.0918 (± 0.0162)	76.71 (± 90.38)	-42.81 (± 3.06)	0.0290	1415.48 (± 53.96)
PVA:S:PAA:PPE6	0.0896 (± 0.0105)	73.60 (± 41.58)	-38.58 (± 2.34)	0.0293	1431.77 (± 31.68)

remained intact during the swelling and solubility tests, which are characteristics that are required for use as dressings. It is important to state that in the solubility evaluation, unlike the conditions used to perform the swelling test, the films remained in contact with the medium for an extended period of time.

Regarding hydration of the wound, both the retention and excessive loss of fluid can result in poor tissue healing. Therefore, a delicate moisture balance is required. Therefore, the production of a semi-permeable dressing is highly desirable [27,28,65–67]. Visscher et al. [69] reported the observed effects of semipermeable films on the rate of water vapor transmission in human skin after the induction of standardized wounds. Wounds treated with semipermeable films presented faster healing than wounds under complete occlusion. Bioactive wound dressings should control the loss of water from the wound site by evaporation at an ideal rate [70,71]. Thus, knowledge of the water vapor transmission rate (WVTR) is an essential step in the development of bioactive films for use as wound dressings. Among the various available methods for the measurement of water vapor transmission, gravimetric methods are the most commonly used due to their simplicity. For this technique, the mass gain of a desiccant agent is determined after permeation of the water vapor through the film under investigation [27]. Films with greater wettability and swelling capacity are expected to capture a higher water vapor content, transferring it to the medium and saturating it [52,68,69].

Several authors have studied the permeability of both normal skin and skin with lesions and burns to water. For normal skin, the evaporative water loss is approximately $204.0 \pm 12.0 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$ at room temperature. For first and second degree burns, these values are approximately 278.4 ± 26.4 and $4274.4 \pm 132.0 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$, respectively. WVTR data for commercialized dressings are also available, with values ranging from 139.0 to $10,973.0 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$ [68,70,71]. In the present work, permeability values between 1415 and $1602 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$ were obtained, with the lowest rates found for the thicker films, which was expected. The reduction in WVTR values for the PPE-containing films was small compared to the WVTR values for films without extract. However, the results were consistent with the literature and what was expected for films intended for use as coverings. Similar results were observed by Hu et al. [52] and Galdeano et al. [65], who obtained WVTR values that increased according to the thickness of the evaluated film. For Yannas and Burke, an adequate WVTR value for a wound dressing is approximately $1200 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$ [72].

Based on our results, the WVTR values obtained were higher than the WVTR values attributed to normal skin as well as the WVTR values of commercial wound dressings such as Tegaderm® ($491 \pm 44 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$), Bioclusive® ($394 \pm 12 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$) and OpSite® ($792 \pm \text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$) [10]. According to Fick's law, permeability is inversely proportional to film thickness. However, deviations in the law occur because of several factors, such as the thickness and porosity of the layer under study, the orientation of the polymer chains and the hydrophilicity, in addition to the type and conditions of the tests (temperature, pressure, relative humidity and air velocity) [70,71].

As can be observed in Fig. 8, the films without PPE showed an increase in the amount of water vapor captured by the adsorbent in the first 12 h of the test, with the highest value obtained for the

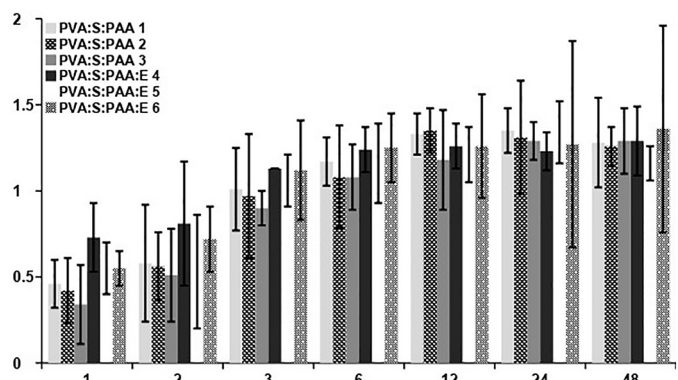


Fig. 8. Capture of water vapor (in %) by the adsorbent after 48 h in a climatic chamber with a RH of 35% and a temperature of 25 °C.

PVA:S:PAA2 film, which may be due to the greater thickness of the film. For the films containing the extract, the highest WVTR value was observed for the film PVA:S:PAA:4, which may be due to the higher hydrophilicity, thickness and swelling capacity observed, and probably due to the higher content of starch in the blend (15% v/v). These findings are in agreement with the highest values of WVTR found for the films containing the extract (Table 4).

3.6. Film biocompatibility, cytotoxicity and in vitro healing activity

Hemolysis tests are used to preliminarily evaluate the biocompatibility of the obtained films. According to Pal, Bhantia and Majundhar [38], materials whose hemolysis degree is $< 5.0\%$ can be considered highly blood-compatible, which is indicative of biocompatibility. The authors prepared films consisting of PVA and gelatin and obtained a hemolysis degree below 5.05. In the present work, the hemolysis indexes of the films containing 15% v/v pure starch (PVA:S:PAA1) and that in the presence of 1.25% w/v PPE (PVA:S:PAA:PPE4) were calculated, and the values found were $1.9\% (\pm 1.61\%)$ and $3.0\% (\pm 0.6\%)$, respectively. The addition of extract in the films caused an increase in the hemolysis index value, although both films can be considered non-hemolytic.

Furthermore, the exposure of L929 cells to the pure pomegranate peel extract caused no toxicity. At low concentrations (1, 3 and $10 \mu\text{g}/\text{mL}$), the cell viabilities were 93.46%, 95.27% and 96.35%, respectively. Higher concentrations (30 and $100 \mu\text{g}/\text{mL}$) stimulated cell proliferation, increasing the viability to 109.59% and 139.10%, respectively. In contrast, DMSO reduced the cell viability to 36.77% (Fig. 9). The L929 cell line is a mouse fibroblast cell line, which is recommended by ISO 10993-5 for cytotoxicity tests [73]. In accordance with Panichayupakaranan et al. [74], a cell viability value above 80% in the MTT assay is related to the absence of cytotoxicity. These results corroborate the hypothesis that PPE could be useful for wound healing. This hypothesis was then evaluated in this work using films containing PPE extract.

In the wound healing process, cell migration provokes wound contraction, and this step is very important to trigger the later curing

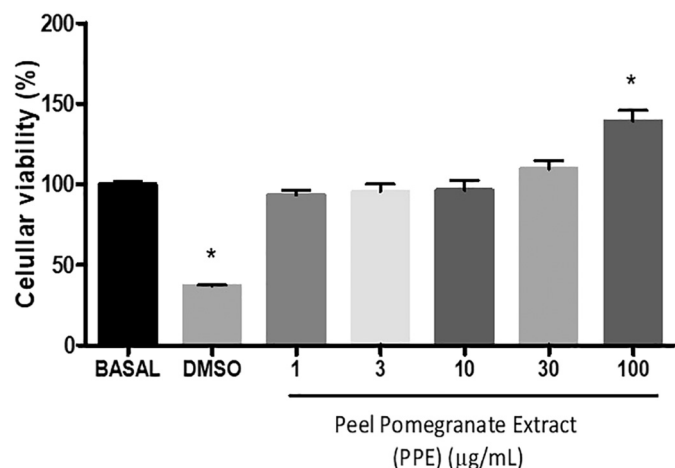


Fig. 9. Effects of pomegranate peel extract on L929 cell viability. The results are expressed as the mean ± S.E.M. from triplicate experiments. Statistical comparison was performed using analysis of variance (one-way ANOVA) followed by Dunnett's test. * $p < .05$ compared to the basal group.

stages; thus, cell migration is a key event in this process. Therefore, investigating dermal fibroblast migration after exposure to the drug formulations is an important step in developing new therapies for wound healing [75]. The scratch assay is an easy, low-cost and well-developed method to measure cell migration *in vitro* [76]. The assay consists of a cell monolayer developed in a cell culture plate that uses mechanical friction and subsequent exposition to test a drug formulation. This test presents the advantages of avoiding animal trials and simultaneously obtaining reliable results; therefore, its use as an alternative method for evaluating the wound healing potential of new formulations is increasing [34,75,76].

The scratch assay method using the L929 dermal fibroblast cell line has been used to evaluate the *in vitro* wound closure effects. In this

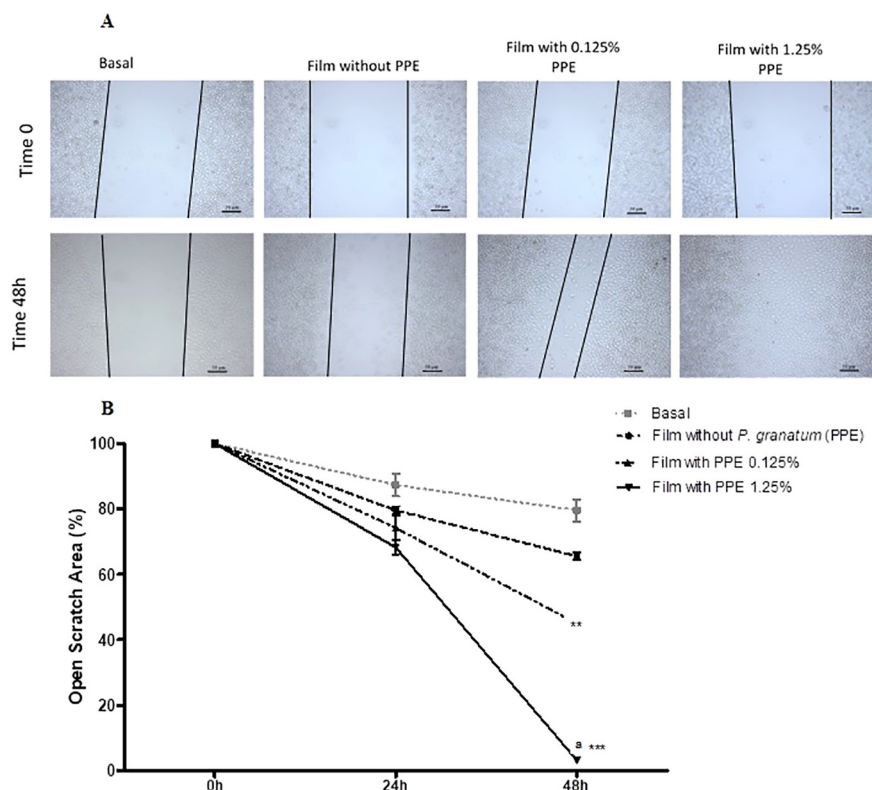


Fig. 10. Effects of the film with or without pomegranate peel extract on cell migration in the *in vitro* scratch assay. Basal has no treatment. The results represent the mean ± S.E.M. in triplicate experiments. Statistical comparison was performed using analysis of variance (two-way ANOVA) followed by Bonferroni's test. *** $p < .001$ and ** $p < .01$ compared to basal; a $p < .001$ compared to the film without PPE. Panel A: Images captured at 100× magnification at 0 and 48 h after incubation with different treatments. Panel B: Graphic representation of the rate of migration by quantifying the total distance that the cells moved from the edge of the scratch toward the center.

study, the treatment of scratches to L929 cell monolayers with films containing PPE extract at concentrations of 0.125% and 1.25% reduced the scratch open area by 51.07% and 96.87%, respectively, after 48 h. The results were significant compared to the scratches treated with films without PPE and the basal control. Notably, there was a significant difference between the films containing lower and higher PPE concentrations (Fig. 10). According to the literature, the greater total phenolic, flavonoid and anthocyanin contents in pomegranate peel extract are responsible for the observed antioxidant activity, helping in the wound healing process [18,20–25].

4. Conclusions

Interest in the preparation of new pharmaceutical dosage forms, including temporary bioactive wound dressings containing natural compounds, has been gaining prominence. By employing the solvent casting method, it was possible to prepare PVA/starch/PAA films containing 1.25% w/v pomegranate peel extract that showed nonhemolytic activity and antimicrobial activity against *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*, with zones of inhibition > 18 mm. The addition of extract apparently favored interactions between the polymer chains, contributing to the miscibility and the stability of the system and allowing for the production of films without phase separation that were free of segregated domains with continuity and integrity. Analysis of the results showed that incorporation of a higher proportion of starch in the blend (15% v/v) yielded smooth, transparent, and domain-free films without phase separation. This film was hydrophilic, with high thickness and a swelling capacity and water vapor transmission rate considered suitable for the intended use. No toxicity was observed from the extract at the concentrations studied. *In vitro* wound healing tests showed that films containing 1.25% w/v PPE were efficient in reducing the scratch open area, with this effect more pronounced in films containing higher concentrations of the extract, which were able to provoke almost complete closing of the scratches in 48 h. These results suggest that this system offers an alternative material with potential

applications as temporary bioactive dressings for wound healing treatment.

Funding

This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) (Brazil) (Project #201/2019), by the Fundo de Amparo à Pesquisa da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) (Brazil) (FAP/UFES/2015), and by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (Brazil) (financing modality 001).

Declaration of competing interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

The authors acknowledge the Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) (Project 201/2019), the Fundo de Amparo à Pesquisa da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) (FAP/UFES/2015), and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (financing modality 001).

References

- [1] T.J. Shaw, Wound repair at a glance, *J. Cell Sci.* 122 (2009) 3209–3213, <https://doi.org/10.1242/jcs.031187>.
- [2] C. Martin, W.L. Low, M.C. Amin, I. Radecka, P. Raj, K. Kenward, Current trends in the development of wound dressings, biomaterials and devices, *Pharm. Pat. Anal.* 2 (3) (2013) 341–359, <https://doi.org/10.4155/ppa.13.18>.
- [3] G. Han, Chronic wound healing: a review of current management and treatments, *Adv. Ther.* 34 (3) (2017) 599–610, <https://doi.org/10.1007/s12325-017-0478-y>.
- [4] L.P.F. Abbade, S. Lastória, Venous ulcer: epidemiology, physiopathology, diagnosis and treatment, *Int. J. Dermatol.* 44 (2005) 449–456, <https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2004.02456.x>.
- [5] A. Cristina, D.O. Gonzalez, Wound healing - a literature review, *An. Bras. Dermatol.* 91 (2016) 614–620, <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20164741>.
- [6] J. Boateng, O. Catanzano, Advanced therapeutic dressings for effective wound healing - a review, *J. Pharm. Sci.* 104 (2015) 3653–3680, <https://doi.org/10.1002/jps.24610>.
- [7] B.S. Nayak, R. Ramdeen, A. Adogwa, A. Ramsabhadra, J.R. Marshall, Wound-healing potential of an ethanol extract of *Carica papaya* (Caricaceae) seeds, *Int. Wound J.* 9 (6) (2012) 650–655, <https://doi.org/10.1111/j.1742-481x.2011.00933.x>.
- [8] J.S. Boateng, K.H. Matthews, H.N.E. Stevens, G.M. Eccleston, Wound healing dressings and drug delivery systems: a review, *J. Pharm. Sci.* 97 (2008) 2892–2923, <https://doi.org/10.1002/jps.21210>.
- [9] J.A.P. Dutra, S.G. Carvalho, A.C.D. Zampiroli, R.D. Daltoé, R.M. Teixeira, F.P. Careta, M.A.P. Cotrim, R.L. Oréfice, J.C.O. Villanova, Papain wound dressings obtained from poly(vinyl alcohol)/calcium alginate blends as new pharmaceutical dosage form: preparation and preliminary evaluation, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 113 (2016) 11–23, <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.12.001>.
- [10] S.O.L. Souza, M.A.P. Cotrim, R.L. Oréfice, S.G. Carvalho, J.A.P. Dutra, F.P. Careta, J.C.O. Villanova, Electrospun poly(ϵ -caprolactone) matrices containing silver sulfadiazine complexed with β -cyclodextrin as a new pharmaceutical dosage form to wound healing: preliminary physicochemical and biological evaluation, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 29 (5) (2018) 1–17, <https://doi.org/10.1007/s10856-018-6079-8>.
- [11] E.A. Kamoun, E.S. Kenawy, X. Chen, A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings, *J. Adv. Res.* 8 (2017) 217–233, <https://doi.org/10.1016/j.jare.2017.01.005>.
- [12] L.J. Gould, Topical collagen-based biomaterials for chronic wounds: rationale and clinical application, *Wound Care* 5 (1) (2016) 19–31, <https://doi.org/10.1089/wound.2014.0595>.
- [13] C. Ibarra, C. Velasquillo, Fabrication and *in vitro* behavior of dual-function chitosan/silver nanocomposites for potential wound dressing applications, *Mater. Sci. Eng. C* 94 (2018) 750–765, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.10.012>.
- [14] R. Jayakumar, M. Prabaharan, P.T.S. Kumar, S.V. Nair, H. Tamura, Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications, *Biotechnol. Adv.* 29 (2011) 322–337, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.01.005>.
- [15] B. Singh, L. Pal, Sterculia crosslinked PVA and PVA-poly(AAm) hydrogel wound dressings for slow drug delivery: mechanical, mucoadhesive, biocompatible and permeability properties, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 9 (2012) 9–21, <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2012.01.021>.
- [16] I. Liakos, L. Rizzello, H. Hajiali, V. Brunetti, R. Carzino, P.P. Pompa, Fibrous wound dressings encapsulating essential oils as natural antimicrobial agents, *J. Mater. Chem. B Mater. Biol. Med.* 3 (2015) 1583–1589, <https://doi.org/10.1039/C4TB01974A>.
- [17] S. Güneş, F. Tihminlioğlu, *Hypericum perforatum* incorporated chitosan films as potential bioactive wound dressing material, *Int. J. Biol. Macromol.* 102 (2017) 933–943, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.080>.
- [18] D. Wang, C. Özen, I.M. Abu-reidah, S. Chigurupati, Vasculoprotective effects of pomegranate (*Punica granatum* L.), *Front. Pharmacol.* 9 (2018) 1–15, <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00544>.
- [19] K. Singh, A.S. Jaggi, N. Singh, Exploring the ameliorative potential of *Punica granatum* in dextran sulfate sodium induced ulcerative colitis in mice, *Phyther. Res.* 1574 (2009) 1565–1574, <https://doi.org/10.1002/ptr>.
- [20] K.N.C. Murthy, V.K. Reddy, J.M. Veigas, U.D. Murthy, Study on wound healing activity of *Punica granatum* peel, *J. Med. Food* 7 (2) (2004) 256–259, <https://doi.org/10.1089/1096620041224111>.
- [21] E.A. Hayoui, K. Miled, S. Boubaker, Z. Bellasfar, M. Abedrabba, H. Iwaski, H. Oku, T. Matsui, Phytomedicine hydroalcoholic extract based-ointment from *Punica granatum* L. peels with enhanced *in vivo* healing potential on dermal wounds, *Eur. J. Integr. Med.* 18 (2011) 976–984, <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.02.011>.
- [22] A. Fleck, P.F.G. Cabral, F.F.M. Vieira, D.A. Pinheiro, C.R. Pereira, W.C. Santos, T.B. Machado, *Punica granatum* L. hydrogel for wound care treatment: from case study to phytomedicine standardization, *Molecules* 21 (8) (2016) 1059, <https://doi.org/10.3390/molecules21081059>.
- [23] E. Nasiri, S.J. Hosseinimehr, J. Akbari, M. Azadbakht, S. Azizi, The effects of *Punica granatum* flower extract on skin injuries induced by burn in rats, *Adv. Pharmacol. Sci.* 6 (2017) 1–8, <https://doi.org/10.1155/2017/3059745>.
- [24] W. Zam, R. Harfouch, Y. Ali, R. Atfah, A. Mousa, Natural extracts and honey based impregnated gauze wound dressing preparation and *in vitro* antibacterial efficacy, *Res. J. Pharmacogn. Phytochem.* 10 (1) (2018) 1–7, <https://doi.org/10.5958/0975-4385.2018.00001.8>.
- [25] M. Nadeem, E. Philip, J. Varani, 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 (2006) 311–318, <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.07.027>.
- [26] P. Taylor, H. Ismail, N.F. Zaaba, Effect of additives on properties of polyvinyl alcohol (PVA)/tapioca starch biodegradable films, *Polym. Plast. Technol. Eng.* 50 (2014) 1214–1219, <https://doi.org/10.1080/03602559.2011.566241>.
- [27] D. Mccoll, B. Cartledge, P. Connolly, Real-time monitoring of moisture levels in wound dressings *in vitro*: an experimental study, *Int. J. Sugery.* 5 (2007) 316–322, <https://doi.org/10.1016/j.ijssu.2007.02.008>.
- [28] R. Xu, H. Xia, W. He, Z. Li, J. Zhao, B. Liu, Y. Wang, Controlled water vapor transmission rate promotes wound-healing via wound re-epithelialization and contraction enhancement, *Sci. Rep.* 18 (6) (2016) 1–12, <https://doi.org/10.1038/srep24596>.
- [29] E.A. Kamoun, E.S. Kenawy, T.M. Tamer, M.A. El-Meligy, M.S. Mohy, Poly(vinyl alcohol)-alginate physically crosslinked hydrogel membranes for wound dressing applications: characterization and bio-evaluation, *Arab. J. Chem.* 8 (1) (2015) 38–47, <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.12.003>.
- [30] L. Xie, M. Jiang, X. Dong, X. Bai, J. Tong, J. Zhou, Controlled mechanical and swelling properties of poly(vinyl alcohol)/sodium alginate blend hydrogels prepared by freeze - thaw followed by Ca²⁺ crosslinking, *J. Appl. Polym. Sci.* 124 (2011) 823–831, <https://doi.org/10.1002/app>.
- [31] S. Karina, D. Costa, F. Yamashita, L. Noemi, M. Victoria, Mixture design for evaluation of potassium sorbate and xanthan gum effect on properties of tapioca starch films obtained by extrusion, *Mater. Sci. Eng. C* 30 (2010) 196–202, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2009.10.001>.
- [32] ASTM, American Society for Testing and Materials. Standard Test Method for Water Vapor Transmission of Materials. ASTM E 96–05, ASTM, Philadelphia, 2005 (8p).
- [33] N. Balekar, N.G. Katkam, T. Nakpheng, K. Jehtae, T. Srichana, Evaluation of the wound healing potential of *Wedelia trilobata* (L.) leaves, *J. Ethnopharmacol.* 141 (2012) 817–824, <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.03.019>.
- [34] D. Manoel, S.B.S. Sarmiento, C.I.G.L. Sarantópoulos, S.S. Zocchi, Barrier properties of films of pea starch associated with xanthan gum and glycerol, *Polímeros* 21 (2011) 67–72, <https://doi.org/10.1590/S0104-14282011005000011>.
- [35] C.C. Demerlis, D.R. Schoneker, Review of the oral toxicity of polyvinyl alcohol (PVA), *Food Chem. Toxicol.* 41 (2002) 319–326, [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(02\)00258-2](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(02)00258-2).
- [36] Y. Nho, J. Park, Y. Lim, Preparation of poly(acrylic acid) hydrogel by radiation crosslinking and its application for mucoadhesives, *Polymers* 6 (2014) 890–898, <https://doi.org/10.3390/polym6030890>.
- [37] J. Tavakoli, S. Mirzaei, Y. Tang, Cost-effective double-layer hydrogel composites, *Polymers* 10 (2018) 1–15, <https://doi.org/10.3390/polym10030305>.
- [38] K. Pal, A.K. Banthia, D.K. Majumdar, Polymeric hydrogels: characterization and biomedical applications, *Des. Monomers Polym.* 12 (2013) 197–220, <https://doi.org/10.1163/156855509X436030>.
- [39] CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: 25th Informational Supplement, (M100-S25), (2015).
- [40] S. Abdollahzadeh, R.Y. Mashouf, H. Mortazavi, M.H. Moghaddam, Antibacterial and antifungal activities of *Punica granatum* peel extracts against oral pathogens, *J. Dent.* 8 (2011) 1–6.
- [41] T.D.B. Machado, I.C.R. Leal, A.C.F. Amaral, K.R.N. Santos, M.G. Silva, R.M. Kuster, Antimicrobial ellagitannin of *Punica granatum* fruits, *J. Braz. Chem. Soc.* 13 (2002) 606–610, <https://doi.org/10.1590/S0103-50532002000500010>.
- [42] S.S. Dahham, M.N. Ali, H. Tabassum, M. Khan, Studies on antibacterial and antifungal activity of pomegranate (*Punica granatum* L.), *Am. J. Agric. Environ. Sci* 9 (3) (2010) 273–281.
- [43] A. Byrd, Y. Belkaid, J.A. Segre, The human skin microbiome, *Nat. Rev. Microb.* 16 (3) (2018) 143–155, <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.157>.
- [44] Y.E. Chen, M.A. Fischbach, Y. Belkaid, Skin microbiota-host interactions, *Nat* 553

- (7689) (2018) 427–436, <https://doi.org/10.1038/nature25177>.
- [45] J. Jose, F. Shehzad, M.A. Al-Harhi, Preparation method and physical, mechanical, thermal characterization of poly(vinyl alcohol)/poly(acrylic acid) blends, *Polym. Bull.* 71 (2014) 2787–2802, <https://doi.org/10.1007/s00289-014-1221-3>.
- [46] Q. Chen, H. Kurosu, L. Ma, M. Matsuo, Elongation-induced phase separation of poly(vinyl alcohol)/poly(acrylic acid) blends as studied by ¹³C CP/MAS NMR and wide-angle X-ray diffraction, *Polymer* 43 (2002) 1203–1206, [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(01\)00690-5](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(01)00690-5).
- [47] B. Singh, A. Dhiman, Design of acacia gum-carbopol-cross-linked-polyvinylimidazole hydrogel wound dressings for antibiotic/anesthetic drug delivery, *Ind. Eng. Chem. Res.* 55 (34) (2016) 9176–9188, <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.6b01963>.
- [48] R.N. Oliveira, G.B. McGuinness, M.E.T. Ramos, C.E. Kajiyama, R.M.S.M. Thir, Properties of PVA hydrogel wound-care dressings containing UK propolis, *Macromol. Symp.* 368 (2016) 122–127, <https://doi.org/10.1002/masy.201500149>.
- [49] M. Zhang, Z. Cheng, T. Zhao, M. Liu, M. Hu, J. Li, Synthesis, characterization and swelling behaviors of salt-sensitivity maize bran-poly(acrylic acid) superabsorbent hydrogel, *J. Agric. Food Chem.* 62 (35) (2014) 8867–8874, <https://doi.org/10.1021/jf5021279>.
- [50] M.T. Amāsan, V. Simon, Thermal and structural characterization of polyvinyl alcohol-kaolinite nanocomposites, *Dig. J. Nanomater. Biostructures.* 6 (2011) 1311–1316, <https://doi.org/10.1002/app.29673>.
- [51] S.N. Cassu, Poly(vinyl alcohol) and poly(vinyl pyrrolidone) blends: miscibility, microheterogeneity and free volume change, *Polymer* 38 (1997) 3907–3911, [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(96\)00959-7](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(96)00959-7).
- [52] Y. Hu, V. Topolkarava, A. Hiltner, E. Baer, Measurement of water vapor transmission rate in highly permeable films, *J. Appl. Polym. Sci.* 81 (2001) 1624–1633, <https://doi.org/10.1002/app.1593>.
- [53] M. Madaghiele, C. Demitri, A. Sannino, L. Ambrosio, Polymeric hydrogels for burn wound care: advanced skin wound dressings and regenerative templates, *Burn. Trauma.* 2 (2014) 153–161, <https://doi.org/10.4103/2321-3868.143616>.
- [54] S.P. Miguel, M.P. Ribeiro, P. Coutinho, L.J. Correia, Electrospun polycaprolactone/*Aloe Vera*-chitosan nanofibrous asymmetric membranes aimed for wound healing applications, *Polymers* 9 (2017) 183, <https://doi.org/10.3390/polym9050183>.
- [55] G. Khang, S. Jin, J. Ho, Y. Sik, H. Bang, Interaction of fibroblast cells on poly(lactide-co-glycolide) surface with wettability chemogradient, *Biomed. Mater. Eng.* 9 (1999) 179–187.
- [56] P. Zahedi, I. Rezaeian, S. Ranaei-siadat, A review on wound dressings with an emphasis on electrospun nanofibrous polymeric bandages, *Polym. Adv. Technol.* 21 (2010) 77–95, <https://doi.org/10.1002/pat.1625>.
- [57] D. Quéré, Wetting and roughness, *Annu. Rev. Mater. Res.* 38 (2008) 71–99, <https://doi.org/10.1146/annurev.matsci.38.060407.13>.
- [58] K.L. Menzies, L. Jones, The impact of contact angle on the biocompatibility of biomaterials, *Optom. Vis. Sci.* 87 (2010) 387–399, <https://doi.org/10.1097/oxp.0b013e3181da863e>.
- [59] S.G. Kumbar, S.P. Nukavarapu, R. James, L.S. Nair, C.T. Laurencin, Biomaterials electrospun poly(lactic acid-co-glycolic acid) scaffolds for skin tissue engineering, *Biomaterials* 29 (2008) 4100–4107, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.06.028>.
- [60] J. Lin, C. Lu, J. Hu, Y. Chen, C. Huang, C. Lou, Property evaluation of *Bletilla striata*/polyvinyl alcohol nano fibers and composite dressings, *J. Nanomater.* ID 519516 (2012), <https://doi.org/10.1155/2012/519516>.
- [61] K.K. Gaikwad, J.Y. Lee, Y.S. Lee, Development of polyvinyl alcohol and apple pome bio-composite film with antioxidant properties for active food packaging application, *J. Food Sci. Technol.* 53 (2016) 1608–1619, <https://doi.org/10.1007/s13197-015-2104-9>.
- [62] K. Trinath, K. Sandeepkumar, N. Devarakonda, V. Karthik, Development and characterization of biodegradable blending starch/PVA films theoretical and experimental comparison, *Mater. Sci. Eng.* 402 (2018) 1–12, <https://doi.org/10.1088/1757-899X/402/1/012129>.
- [63] H. Tian, J. Yan, A.V. Rajulu, A. Xiang, X. Luo, Fabrication and properties of polyvinyl alcohol/starch blend films: effect of composition and humidity, *Int. J. Biol. Macromol.* 96 (2017) 518–523, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.12.067>.
- [64] J. Zanela, A.P. Bilck, M. Casagrande, M. Victória, E. Grossmann, F. Yamashita, Polyvinyl alcohol (PVA) molecular weight and extrusion temperature in starch/PVA biodegradable sheets, *Polímeros* 5169 (2018) 256–265, <https://doi.org/10.1590/0104-1428.03417>.
- [65] M.C. Galdeano, A.E. Wilhelm, M. Victória, Influence of thickness on properties of plasticized oat starch films, *Braz. Arch. Biol. Technol.* 56 (2013) 637–644, <https://doi.org/10.1590/S1516-89132013000400014>.
- [66] M.G. Farias, F.M. Fakhouri, C.W.P. Carvalho, J.L.R. Ascheri, Physicochemical characterization of edible starch films with Barbados cherry (*Malpighia emarginata* D.C.), *Quim Nova* 35 (3) (2012) 546–552, <https://doi.org/10.1590/S0100-40422012000300020>.
- [67] P. Pickavance, S. Rimmer, S. Macneil, Development of a calcium-chelating hydrogel for treatment of superficial burns and scalds, *Regen. Med.* 5 (2010) 55–64, <https://doi.org/10.2217/rme.09.67>.
- [68] M.S. Granick, A. Sood, N.L. Tomaselli, Wound dressings and comparative effectiveness data, *Wound Heal. Soc.* 3 (2014) 511–529, <https://doi.org/10.1089/wound.2012.0401>.
- [69] M. Visscher, S.B. Hoath, E. Conroy, R.R. Wickett, Effect of semipermeable membranes on skin barrier repair following tape stripping, *Arch. Dermatol. Res.* 293 (2001) 491–499, <https://doi.org/10.1007/PL00007463>.
- [70] L.J. Borda, F.E. Macquhae, R.S. Kirsner, Wound dressings: a comprehensive review, *Curr. Dermatol. Rep.* 5 (4) (2016) 287–297, <https://doi.org/10.1007/s13671-016-0162-5>.
- [71] S. Hasatsri, A. Pitiratanaworanat, S. Swangwit, C. Boochakul, C. Tragoonsupachai, 2018. Comparison of the morphological and physical properties of different absorbent wound dressings, *Dermatol. Res. Pract. ID* 9367034. doi:<https://doi.org/10.1155/2018/9367034>.
- [72] I.V. Yannas, J.F. Burke, Design of an artificial skin basic design principles, *J. Biomed. Mater. Res.* 4 (1) (1980) 65–81, <https://doi.org/10.1002/jbm.820140108>.
- [73] R. Wallin, E. Arscott, A practical guide to ISO 10993-5: cytotoxicity, *Med. Device Diagn. Ind.* 20(4) (4998) 96–97.
- [74] P. Panichayupakaranan, S. Tewrakul, S. Yuenyongsawad, Antibacterial anti-inflammatory and antiallergic activities of standardized pomegranate rind extract, *Food Chem.* 123 (2) (2010) 400–403, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.04.054>.
- [75] X. Zhang, X. Kang, L. Jin, J. Bai, W. Liu, Z. Wang, Stimulation of wound healing using bioinspired hydrogels with basic fibroblast growth factor (bFGF), *Int. J. Nanomedicine* 13 (2018) 3897–3906, <https://doi.org/10.2147/IJN.S168998>.
- [76] C.C. Liang, A.Y. Park, J.L. Guan, *In vitro* scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration, *Nat. Protoc.* 2 (2) (2007) 329–333, <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.30>.

CAPÍTULO 2

Filme polimérico contendo extrato de casca de romã: pesquisa da composição, organização cristalina, resistência mecânica e atividade antifúngica sobre *Candida albicans*

Artigo a ser submetido para publicação no periódico Brazilian Journal of Pharmaceutical Science

¹Parte da dissertação de mestrado em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, do primeiro autor.

1 **Filme polimérico contendo extrato de casca de romã: pesquisa da composição,**
2 **organização cristalina, resistência mecânica e atividade antifúngica sobre**
3 ***Candida albicans***

4

5 Nubya Nascimento Costa¹, Geanne Aparecida de Paula², Thais Martins da Silva¹,
6 Sthefany Brito Salomão², Kamila Arêas Bastos², Juliana Aparecida Severi², Mariana
7 Drummond Costa Ignacchiti², Lílian Gasparelli Carreira³, Rodrigo Lambert Oréfica⁴,
8 Juliana Alves Resende^{1,2}, Janaina Cecília Oliveira Villanova^{1,2*}

9

10 ¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), Centro de Ciências
11 Agrárias e de Engenharia - CCAE, Universidade Federal do Espírito Santo - UFES,
12 29.500-000, Alegre, ES, Brazil

13 ²Laboratório de Produção Farmacêutica (LPF), Centro de Ciências Exatas, Naturais e
14 da Saúde - CCENS, Universidade Federal do Espírito Santo - UFES, 29.500-000,
15 Alegre, ES, Brazil

16 ³Departamento de Engenharia Rural, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias,
17 Universidade Federal do Espírito Santo - UFES, 29.500-000, Alegre, ES, Brazil

18 ⁴Laboratório de Engenharia de Polímeros e Compósitos (LEPCom), Escola de
19 Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, 31270-901

20

21 **Autor correspondente**

22 Prof. Dra. Janaina C. O. Villanova. ORCID iD: 0000-0001-6166-1724

23 Endereço: Universidade Federal do Espírito Santo - UFES. Avenida Alto Universitário,
24 sem número, Guararema - CEP: 29.500-000, Alegre - Espírito Santo (ES), Brasil.

25 Tel: +55-28-35528739/+55-28-981147580. E-mail: pharmacotecnica@yahoo.com.br

26

27 **Conflito de interesses**

28 Os autores declaram não haver potenciais conflitos de interesses.

29

30 **Agradecimentos**

31 Os autores agradecem ao laboratório LUCCAR (Laboratório de Ultraestrutura Celular
32 Carlos Alberto Redins da UFES - edital MCT/FINEP/CT-INFRA-PROINFA 01/2006)
33 pelas análises de MEV.

34

35 **Financiamento**

36 Este trabalho recebeu apoio financeiro da FAPES (Fundação de Amparo à Pesquisa
37 e Inovação do Espírito Santo, Brazil) sob o termo de outorga 201/2019; pela CAPES
38 (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil) sob o código
39 de financiamento 001; e pelo CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento
40 Científico e Tecnológico - Brazil) com a concessão de bolsas de Iniciação Científica e
41 Inovação Tecnológica.

42

43 **Resumo**

44 Filmes poliméricos contendo extrato de romã podem atuar como coberturas bioativas
45 para o tratamento de feridas. O presente trabalho teve como objetivo pesquisar a
46 composição, a resistência mecânica e a atividade antifúngica *in vitro* de um filme
47 polimérico preparado a partir da blenda poli(álcool vinílico), amido de milho e
48 poli(ácido acrílico) na razão 75:15:10 (PVA/amido/PAA), contendo 1,25% p/p de
49 extrato seco bruto total das cascas de romã. A microestrutura do filme foi avaliada
50 empregando a técnica de microscopia eletrônica de varredura (SEM). A composição,
51 foi estudada por FTIR, enquanto a técnica de difração de raios X (DRX) foi utilizada
52 para pesquisar a organização cristalina. Já a resistência mecânica do filme foi avaliada
53 por ensaios de tração. Por fim, a existência de atividade antifúngica foi pesquisada
54 por método de disco-difusão sobre cepa de *Candida albicans* (ATCC 24.433), após
55 confirmação da concentração inibitória mínima sobre a mesma linhagem do fungo. A
56 incorporação de 1,25% p/p do extrato no filme PVA/amido/PAA originou filmes lisos,
57 transparentes, brilhantes e de coloração amarelo-clara. A análise microestrutural por
58 SEM mostrou a presença de descontinuidade no filme com extrato, o que pode
59 explicar a redução nos parâmetros de resistência mecânica do mesmo quando
60 comparado ao filme sem extrato. Contudo, cabe destacar que o mesmo se mostrou
61 flexível, maleável e resistente ao manuseio, o que é desejável para o uso como
62 cobertura bioativa. Os espectros FTIR indicaram a ocorrência de interações
63 intermoleculares entre o extrato e os polímeros, sem, contudo, haver
64 comprometimento da estabilidade e da funcionalidade do produto. O perfil
65 difratométrico do filme com extrato também se mostrou alterado quando comparado
66 ao do filme puro. Finalmente, o filme com extrato apresentou atividade antifúngica
67 sobre cepas de *Candida albicans*, sugerindo que o mesmo é potencialmente útil para
68 o uso como cobertura bioativa, corroborando achados anteriores.

69 **Palavras-chave:** *Punica granatum*, filme polimérico, atividade antifúngica, *Candida*
70 *albicans*.

71

72 **1. INTRODUÇÃO**

73

74 Feridas cutâneas são caracterizadas como interrupções da pele provenientes de
75 causas variadas, tais como traumas físicos, mecânicos, químicos ou biológicos,
76 podendo abranger, por vezes, além da pele, o tecido subcutâneo, músculos, tendões
77 e ossos (1,2). O tratamento de lesões, especialmente daquelas consideradas
78 crônicas, é demorado, caro e doloroso, requerendo por vezes o uso de medicamentos
79 que precisam ser aplicados e removidos diariamente, seguido da colocação de
80 coberturas físicas sobre as áreas lesionadas (3). Intervenções cirúrgicas podem ser
81 necessárias para completa regeneração tecidual (3). Usualmente, as lesões cutâneas
82 são recobertas com gaze, a fim de impedir a ocorrência de contaminação microbiana
83 (4,5).

84

85 Na atualidade, alternativas terapêuticas para o tratamento das lesões cutâneas vêm
86 sendo pesquisadas e, uma tendência, é o uso de coberturas bioativas (6-9). Uma
87 cobertura é definida como um material ou dispositivo que tem a finalidade de proteger
88 o leito de feridas; adsorver e drenar secreções exsudativas; e, controlar a troca de
89 umidade com o microambiente, permitindo que as feridas se mantenham úmidas,
90 mas, sem maceração por excesso de fluidos (10). As coberturas ditas bioativas, além
91 de desempenhar tais funções, atuam como sistemas de liberação de fármacos,
92 otimizando a cicatrização e favorecendo a regeneração tecidual (11,12).

93

94 Outra tendência na atualidade é a busca por compostos bioativos para a substituição
95 do uso de fármacos sintéticos na farmacoterapia, inclusive para o tratamento de
96 feridas. Plantas medicinais ricas em metabólitos primários e secundários com ação
97 antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, hemostática e debridante,
98 principalmente, são as mais interessantes para o uso em processos de regeneração
99 tecidual (13,14). Entre as plantas medicinais de interesse como cicatrizante, a
100 romãzeira merece destaque. Conhecida como *Punica granatum* Linn, a romãzeira, é
101 uma planta arbustiva, pertencente à família Punicaceae, sendo sua monografia
102 incluída na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema único de

103 Saúde do Brasil (RENISUS) (15). Diferentes tipos de extratos obtidos a partir das
104 cascas da romãzeira são ricos em compostos fenólicos, fontes importantes de taninos
105 hidrolisáveis, elagitaninos e ácido elágico, além de antocianinas e flavonoides,
106 metabólitos relacionados à inúmeras atividades farmacológicas, sendo a
107 antimicrobiana e a cicatrizante as de maior interesse (15-21).

108

109 Há uma escassez na literatura acerca do preparo e caracterização de filmes
110 poliméricos para uso como coberturas bioativas baseados em extratos de romã. Amal
111 et al. (22) relatam que filmes poliméricos preparados a partir de uma blenda entre
112 amido, colágeno e quitosana, nos quais foi incorporado extrato aquoso do pericarpo
113 de romã por impregnação, foram eficientes na promoção da proliferação de células
114 epiteliais em modelos animais, sem ocorrer formação de tecido cicatricial em excesso.
115 Ainda, os filmes apresentaram ação antimicrobiana sobre *Pseudomonas aeruginosa*.
116 Hassanpour et al. (23) prepararam filmes contendo punicalagina - metabólito
117 secundário do romã e, reportaram que os filmes tiveram capacidade anti-inflamatória
118 significativa sobre feridas induzidas em ratos. Em um trabalho recente Zekrya,
119 Abdellatif e Azzazy (24) relataram o preparo de filmes eletrofiados baseados em matriz
120 de PVA contendo extrato metanólico de casca de romã 1, 2 e 2,5% p/p, associado ao
121 mel. Os autores observaram que os filmes se mostraram atóxicos, com atividade
122 antimicrobiana sobre cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e, que
123 induziram o aumento nas porcentagens de fechamento de feridas induzidas em ratos.
124 Nascimento et al. (25) prepararam filmes de gelatina e propilenoglicol contendo extrato
125 aquoso de cascas de romã a 0,5 e 1% p/p e, avaliaram o processo cicatricial
126 empregando modelo animal. Os autores observaram que os filmes promoveram
127 importantes alterações histológicas na dinâmica cicatricial, com modulação da
128 resposta inflamatória, estímulo da contração das feridas e aumento da deposição de
129 colágeno, sugerindo a existência de um potencial promissor para uso dos filmes como
130 coberturas bioativas. Batista et al. (26), obtiveram um filme preparado a partir da
131 blenda PVA/alginato de sódio por eletrofiação, contendo o extrato etanólico total de
132 cascas de romã a 1,25% p/p para uso como potencial cobertura bioativa. Segundo os
133 autores, o filme apresentou atividade antimicrobiana sobre cepas de *Staphylococcus*
134 *aureus*, *Staphylococcus epidermidis epidermidis* e *Candida albicans*, podendo ser útil
135 no tratamento de feridas, por evitar a contaminação microbiana no leito das feridas.
136 Costa et al. (7) observaram que o filme contendo os polímeros na proporção 75:10:15

137 (PVA/amido/PAA) acrescido de 1,25 % p/p de extrato seco bruto de casca de romã
138 apresentou propriedades de barreira adequadas ao uso pretendido; se mostrou não
139 citotóxico sobre a linhagem de fibroblastos; mostrou atividade antimicrobiana sobre as
140 cepas de Gram-positivas pesquisadas; foi biocompatível; e, modulou positivamente a
141 proliferação celular *in vitro*.

142

143 Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a composição, a
144 estabilidade, a resistência mecânica e a atividade antifúngica do filme baseado na
145 blenda polimérica de poli(ácido vinílico), amido e poli(ácido acrílico) na proporção
146 75:15:10, contendo 1,25 % p/p de extrato seco total da casca de romã, preparado por
147 Costa et. al (7), a fim de confirmar a viabilidade do seu uso como cobertura bioativa.

148

149 **2. Material e Métodos**

150

151 *Materiais*

152 Poli(álcool vinílico) (PVA; massa molar média 85.000 - 124.000 g.mol⁻¹; grau de
153 hidrólise de +99%); amido de milho (alta purificação); poli(ácido acrílico) (PAA)
154 (viscosidade 350 a 700 cP; 25° C), foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich (USA)
155 e foram utilizados sem purificação prévia. O extrato seco total de cascas de romã
156 (ESTCR) obtido em etanol e seco por liofilização foi preparado no Laboratório de
157 Produção Farmacêutica da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), campus
158 de Alegre (Brasil), mediante confirmação de identidade depósito de espécime no
159 Herbário da UFES (VIES34873), localizado em Jerônimo Monteiro (Espírito Santo,
160 Alegre, Brasil).

161

162 *Preparo do filme pelo método de moldagem e evaporação de solvente*

163 Uma solução de PVA a 5% p/p foi preparada em água purificada sob aquecimento a
164 100° C e agitação mecânica (500 a 750 rpm). A dispersão de amido a 4% p/p foi
165 preparada por gelatinização do amido, com agitação mecânica lenta (300 a 450 rpm),
166 a 85° C. Em ambos os procedimentos foi empregado agitador mecânico FISATOM,
167 (modelo 713D, Brasil). O gel de PAA foi obtido mediante dispersão do polímero em
168 água (2,5% p/p), seguido de alcalinização com hidróxido de sódio (0,1 M) até pH 6,5.
169 Em seguida, a blenda polimérica contendo os polímeros nas concentrações de
170 75:15:10% v/v (PVA:S:PAA) foi preparada por agitação mecânica (agitador mecânico

171 FISATOM, modelo 752A, Brasil), durante 45 min e sob aquecimento (40° C). Glicerina
172 a 2,5% p/p foi adicionada na blenda. No filme com ESTCR a 1,25% p/p, o extrato foi
173 incorporado diretamente na blenda, mediante agitação magnética por mais 60 min, a
174 35° C (agitador magnética FISATOM, modelo 752A, Brasil). 10 mL das blendas (com
175 e sem extrato) foram colocadas em placas de petri (6,5 cm de diâmetro), que foram
176 deixadas expostas para evaporação do solvente, durante 72 h, em temperatura
177 ambiente.

178

179 *Microscopia eletrônica de varredura (SEM)*

180 Foram obtidas fotomicrografias de seções transversais de filmes fraturados por
181 microscopia eletrônica de varredura (JEOL, modelo JSM-6010LV, USA). O material
182 foi metalizado com ouro (20 mPA, 120 s) em metalizador DESK V (modelo Denton
183 Vacuum). As imagens foram obtidas com tensão de excitação de 20 keV, com
184 ampliação de 500 vezes.

185

186 *Análise da composição por FTIR-ATR*

187 A composição do extrato seco de *P. granatum* L. e dos filmes (puro e com ESTCR) foi
188 investigada por espectrofotometria na região do infravermelho por transformada de
189 Fourier (FTIR), empregando espectrômetro *Bruker* (modelo Tensor 127, USA), em
190 modo de reflexão total atenuada (ATR). Os espectros foram obtidos no modo de
191 transmitância, na região de 4.000 a 500 cm⁻¹ e com resolução espectral de 4 cm⁻¹.

192

193 *Pesquisa da cristalinidade por difração de raios X (DRX)*

194 Difrátogramas de raios X dos filmes (puro e com ESTCR) foram obtidos em
195 difratômetro SHIMADZU (modelo XRD - 6000, Japão), empregando radiação Cu-K α
196 ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$), na faixa de 2 $^{\circ}$ a 50 $^{\circ}$. As análises foram feitas em amostras do filme
197 contendo extrato e nas amostras do filme sem extrato nas mesmas concentrações.

198

199 *Ensaio mecânicos*

200 Para avaliação da resistência mecânica dos filmes foi realizado ensaio de tração em
201 5 amostras de cada filme, sendo avaliados os parâmetros: tensão na deformação (σ),
202 módulo de elasticidade (E) e percentual de alongamento. As propriedades mecânicas
203 foram determinadas a partir de curvas tensão-deformação obtidas em máquina
204 universal EMIC (modelo DL-3000, Brasil) no modo tração, com célula de força com

205 capacidade de 20N (Trd 17) e deformação de 10 mm/min (extensômetro Trd15),
206 segundo normas ASTM D638. Foram ensaiados cinco (05) corpos de prova de cada
207 amostra e os resultados são expressos como a média e desvio padrão.

208

209 *Pesquisa da atividade e determinação da CIM do extrato para fungo*

210 A atividade do ESTCR frente ao fungo foi pesquisada pelo método de disco-difusão
211 conforme recomendado pelo protocolo CLSI (2019), com modificações, utilizando
212 microrganismos da cepa de *C. albicans* (ATCC 24.433) reativados em Sabouraud-
213 Dextrose, a 37° C, por 24 h e transferidos para o meio de cultura BHI, com incubação
214 a 35° C ($\pm 2^\circ$ C) por 24 h. A suspensão fúngica foi semeada em placa de Petri
215 previamente preparadas com MHB com auxílio de um swab. Discos estéreis (6 mm
216 de diâmetro) impregnados com 5 μ L das concentrações estudadas do extrato (0,25;
217 1,25; 5 e 10 mg.mL⁻¹) foram colocados sobre a placa. Como controle positivo foi
218 utilizada anfotericina B (20 μ g). As placas foram incubadas a 35° C ($\pm 2^\circ$ C) por 24 h
219 e 48 h. As zonas de inibição foram medidas em milímetros e os resultados em triplicata
220 expressos como a média e desvio padrão.

221

222 Após confirmação da atividade antifúngica para a cepa desafiada, foi realizado o
223 estudo para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) empregando
224 método de microdiluição em placa, conforme protocolo CLSI (2008) modificado. Os
225 microrganismos foram reativados em caldo Sabouraud-Dextrose (CSD) a 2% p/v, a
226 37° C, por 24 h. Diferentes concentrações do extrato (0,0625; 0,125; 0,25; 0,5; 1,25
227 2,5; 5; e 10 mg/mL) foram preparadas em caldo MHA acrescido de 5% p/v de DMSO.
228 Em cada poço, o volume final da mistura contendo o inóculo padronizado a 10⁴
229 UFC/mL e o meio de cultura, foi de 200 μ L. As microplacas foram incubadas a 35° C
230 ($\pm 2^\circ$ C) por 24 h a 48 h. Decorrido este período, foi realizada a inspeção visual do
231 crescimento fúngico. A CIM foi considerada a menor concentração de extrato capaz
232 de inibir completamente o crescimento fúngico, indicada pela ausência de precipitado
233 ou turvação no meio após o período de incubação. Diferentes controles foram
234 inseridos nas microplacas, a saber: meio de cultura sem inóculo fúngico - controle de
235 esterilidade; meio de cultura acrescido de inóculo fúngico - controle de crescimento
236 da linhagem padrão; meio de cultura acrescido de dimetilsulfóxido (DMSO) e inóculo
237 fúngico - controle da ausência de atividade antifúngica para o DMSO; e, meio de

238 cultura acrescido de inóculo fúngico e anfotericina B (20 µg.poço⁻¹) - controle positivo.
239 O teste foi realizado em triplicata e o resultado dado em mg/mL.

240

241 No intuito de avaliar o mecanismo de ação da atividade do extrato sobre a inibição do
242 crescimento da cepa de *C. albicans* classificando-o como ação fungistática ou
243 fungicida, foi realizado o plaqueamento das misturas contendo o extrato e o controle
244 positivo dos poços da placa utilizada para determinação da CIM, em placas de petri
245 contendo 25 mL de ágar Saboraud. As placas foram incubadas 35° C (± 2° C) por 24
246 h. Foi observada a presença ou a ausência o crescimento de colônias nas placas,
247 sendo possível classificar a atividade como fungistática ou fungicida, respectivamente.

248

249 *Avaliação da atividade antifúngica do filme*

250 A atividade antifúngica *in vitro* do filme contendo o ESTCR foi investigada através de
251 modificações do método de disco-difusão recomendado pelo (CLSI, 2009), utilizando
252 cepa de *C. albicans* (ATCC 24.433). Inicialmente, os microrganismos foram cultivados
253 em caldo BHI (35° C; 24 h). A concentração da suspensão fúngica foi ajustada para
254 $1,5 \times 10^6$ UFC/mL seguindo a escala McFarland, empregando solução salina estéril
255 (0,85% de NaCl). O teste foi realizado em placas contendo MHA suplementada com
256 dextrose e azul de metileno previamente preparadas. Com auxílio de um swab estéril,
257 alíquotas da linhagem de *C. albicans* foram semeadas nas placas. Para avaliação,
258 amostras dos filmes previamente cortados em discos (6 mm de diâmetro), foram
259 colocados sobre a placa, que foram incubadas a 37° C por 24 a 48 h. As zonas de
260 inibição formadas foram medidas em milímetros (mm). Filmes sem a incorporação de
261 extrato foram utilizados como controle negativo e, como controle positivo foram
262 empregados discos de anfotericina B (20 µg.mL⁻¹).

263

264 *Análise estatística*

265 Para a análise estatística empregou-se a média de três repetições ± desvio padrão. A
266 comparação entre resultados, quando ocorreu, foi realizada empregando teste de
267 hipótese (teste T), utilizando Excel. Foi considerada significância estatística de
268 $p < 0,05$.

269

270 **3. Resultados e Discussão**

271

272 *Caracterização físico-química e resistência mecânica*

273 A análise visual do filme com extrato de romã permitiu a observação de filmes lisos,
274 brilhantes, isento de bolhas, contínuo, sem separação de fases e de cor amarela,
275 característica do extrato de romã (Figura 1). Os filmes resistiram ao manuseio durante
276 a remoção dos moldes e realização dos ensaios.

277

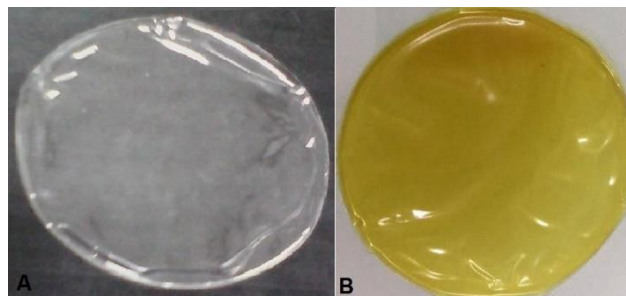
278

279

280

281

282



283 **Figura 1.** Imagens representativas do filme puro (A) e do filme contendo o ESTCR a
284 1,25% p/p (B).

285

286 O ensaio de espectroscopia na região do infravermelho (FTIR-ATR) é capaz de
287 fornecer informações essenciais acerca da composição química dos filmes, da
288 miscibilidade ou compatibilidade entre os componentes, bem como das alterações
289 promovidas pela incorporação do ESTCR na blenda, mediante comparação entre os
290 espectros do filme puro e contendo o extrato (27,28).

291

292 O espectro do ESTCR apresentou banda larga na região entre 3600 e 3200 cm^{-1}
293 característica da vibração axial de -OH (região I), bandas em 1700 a 1610 cm^{-1} típicas
294 de vibração de deformação axial de C=O e de amida I (região II) e bandas entre 1000
295 e 1200 cm^{-1} , características de vibração de deformação angular de ligação glicosídica
296 -C-O-C e vibração de deformação angular -C-O (região III). Tais achados estão em
297 conformidade com aqueles observados por He et al. (29) que estudaram extratos
298 aquoso das cascas de romã e obtiveram espectros semelhantes. Os espectros do
299 ESTCR puro, do filme sem extrato e do filme com extrato são apresentados na Figura
300 2.

301

302 As principais alterações no espectro dos filmes quando comparados entre si e com o
303 extrato é a ausência das bandas acopladas nas regiões de 1700 e 1610 cm^{-1} (região
304 II) e da banda próxima a 1200 e 1000 cm^{-1} (região III). Tais achados indicam a
305 ocorrência de interações químicas entre os componentes do extrato e os polímeros.

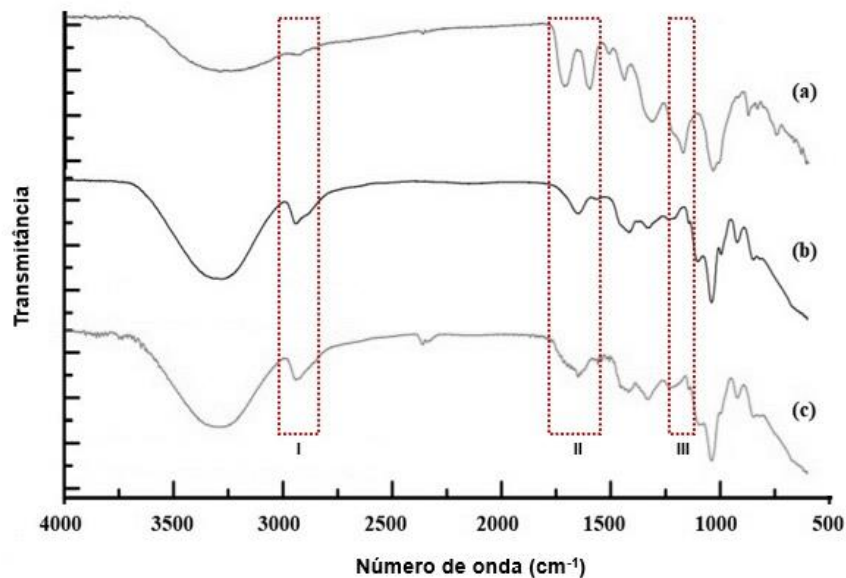


Figura 2. Espectros FTIR-ATR do ESTCR (a), do filme puro (b) e do filme contendo ESTCR (c).

Nascimento et al. (25) analisaram espectros FTIR de filmes de gelatina e extrato de casca de romã e observaram alterações, com atenuação e deslocamento de bandas, sugerindo incremento nas ligações de hidrogênio e confirmando a existência de interações intermoleculares entre a gelatina e os compostos químicos do extrato. He et al. (29) prepararam filmes eletrofiados de PVA contendo extrato de casca de romã e desidroacetato de sódio para uso como embalagem ativa e observaram que, em todos os espectros dos filmes PVA com extrato, ocorreu deslocamento dos picos de vibração da hidroxila, que foi atribuído à formação de ligações de hidrogênio entre o extrato e o PVA. Segundo os autores, os resultados do FTIR indicaram que a incorporação do extrato alterou o perfil de interações intermoleculares na matriz do filme, levando à formação de uma matriz mais compacta e sugerindo o envolvimento não somente de interações físicas, mas, também químicas (31,32). Fleck et al. (33) prepararam hidrogéis de PAA contendo 2% p/p de extrato de pericarpo de romã e relataram a existência de interações entre os compostos fenólicos do extrato e o polímero. No entanto, os autores relataram que o hidrogel preparado permaneceu estável. Outros autores confirmaram também a existência de alterações em espectros de filmes originados de blendas PVA/PAA e amido/PVA, indicativas da ocorrência de

339 interações entre os polímeros, correlacionadas à compatibilidade dos componentes e
 340 integridades dos filmes formados (34,35).

341

342 A técnica de difração de raios X foi utilizada para analisar o grau de cristalinidade nos
 343 filmes e avaliar a interferência ou não da incorporação do ESTCR na organização das
 344 cadeias poliméricas, o que pode interferir nas propriedades de barreira e no perfil de
 345 liberação do ingrediente ativo (27). Os padrões de DRX registrados para as amostras
 346 são apresentados na Figura 3.

347

348

349

350

351

352

353

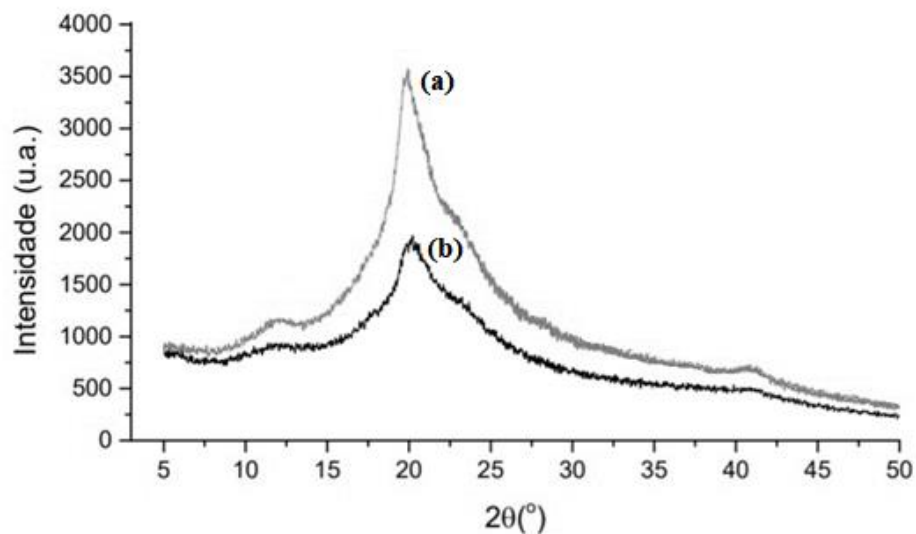
354

355

356

357

358



359 **Figura 3.** Difratogramas do filme puro (a) e com ESTCR (b) obtidos a 2θ , entre 2 e
 360 50° .

361

362 Os padrões de DRX registrados para as amostras (Figura 3) corroboram os resultados
 363 obtidos a partir da análise dos espectros FTIR. A análise do perfil difratométrico do
 364 filme puro mostra a existência de um pico intenso a $19,8^\circ$, característico do PVA. Dois
 365 outros picos fracos, próximos a $12,5^\circ$ e $41,5^\circ$ também podem ser notados. Pode-se
 366 observar que a incorporação do ESTCR levou à redução na intensidade dos sinais, o
 367 que pode estar relacionado à redução da estrutura cristalina das cadeias poliméricas
 368 devido à existência de interações com os polímeros (18). Regiões típicas de estruturas
 369 amorfas podem ser vistas em ambos os difratogramas, indicando que houve
 370 amorfização da estrutura do PVA na mistura. Picos próximos de $2\theta = 15,3^\circ$; $17,3^\circ$;
 371 $18,3^\circ$, $22,0^\circ$ e $23,5^\circ$ são característicos dos diferentes tipos de amido. A ausência dos
 372 mesmos no difratograma dos filmes indica que o amido sofreu gelatinização durante

373 o processamento, com conseqüente desestruturação das suas regiões cristalinas, o
374 que está em conformidade com a literatura (28,35,36).

375

376 Na análise das fotomicrografias das seções transversais dos filmes obtidas por SEM
377 (Figura 4) é possível observar a existência de uma matriz contínua, compacta, de
378 aspecto uniforme e com pequenos poros para o filme puro, enquanto para o filme
379 contendo extrato, nota-se a existência de uma matriz compacta, porém, irregular, com
380 regiões com poros grandes e com descontinuidade.

381

382

383

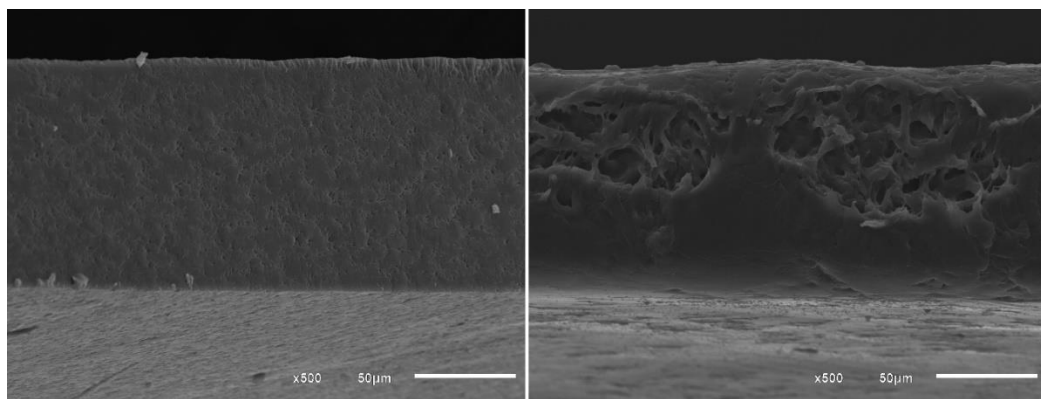
384

385

386

387

388



389 **Figura 4.** Fotomicrografias das seções transversais fraturadas dos filmes puros
390 (esquerda) e contendo ESTCR (direita). Aumento de 500 X (barra de escala: 50 μm).

391

392 Resultados semelhantes foram encontrados na literatura. Filmes de gelatina e filmes
393 de blendas entre quitosana, colágeno e amido, aos quais extratos aquosos de casca
394 de romã foram incorporados, apresentaram microestrutura com regiões não uniforme
395 e com presença de poros, como as observadas no presente trabalho (33,37).

396

397 Finalmente, as propriedades mecânicas dos filmes puro e com extrato foram
398 pesquisadas mediante a realização de ensaio de tração, sendo medidos os
399 parâmetros resistência a tração (TS), módulo de elasticidade (E) e alongamento na
400 ruptura (%EB). A medida de tais parâmetros fornece informações sobre a fragilidade,
401 e a flexibilidade dos filmes, propriedades relacionadas ao manuseio e que contribuem
402 para assegurar a funcionalidade dos filmes como coberturas bioativas (13). Os
403 resultados obtidos são dados na Tabela 1.

404

405 O filme apresentou uma diminuição de cerca de 8% na resistência à tração do filme
406 com extrato quando comparada ao valor observado para o filme puro e, de cerca de

407 14% nos valores do alongamento. De acordo com análise estatística apresentada,
 408 apenas o parâmetro elasticidade teve diferença significativa após a incorporação do
 409 ESTCR nas blendas, provocando uma redução de 25% nos valores de módulo de
 410 elasticidade. As reduções nos valores podem ser justificadas pela presença de regiões
 411 descontínuas observadas na microestrutura dos filmes com extrato, bem como pela
 412 alteração na organização cristalina das cadeias poliméricas como observado por
 413 DRX. No entanto, cabe destacar, que ambos os filmes permaneceram íntegros, sem
 414 quebrar ou rasgar durante seu preparo, manuseio e durante a realização de todos os
 415 testes, o que é desejável.

416

417 **Tabela 1.** Resistência a tração, alongamento e módulo de para os filmes (PVA:S:PAA)
 418 e (PVA:S:PAAE) 1,25% p/p

419

Amostras	Resistência a tração (MPa)	Alongamento de ruptura (%)	Elasticidade (MPa)
PVA:S:PAA	37,65 ± 22,39 ^a	122,9 ± 75,76 ^a	387,0 ± 117,3 ^a
PVA:S:PAAE	34,79 ± 9,214 ^a	105,5 ± 18,63 ^a	273,0 ± 116,0 ^b

420 ^{a,b}Letras diferentes mostram diferença estatística ($p < 0,05$).

421

422 A boa resistência mecânica pode ser devida à existência de interações químicas entre
 423 os compostos bioativos presentes no extrato e as cadeias poliméricas, como
 424 comprovado por FTIR. Amal et al. (22) prepararam filmes de quitosana, colágeno e
 425 amido para incorporação de extrato aquoso de casca de romã e concluíram que os
 426 mesmos apresentaram boa resistência à tração ($45,36 \pm 0,64$ Mpa), o que é
 427 necessário para uso como cobertura. Os autores observaram a presença de poro nos
 428 filmes, semelhante ao encontrado no presente trabalho. Filmes poliméricos de PVA e
 429 alginato de cálcio contendo papaína a 2% p/p foram preparados pelo método de
 430 moldagem e evaporação do solvente e os autores observaram que os filmes contendo
 431 o composto bioativo tiveram redução nos parâmetros de resistência mecânica quando
 432 comparados ao filme puro. No entanto, a redução contribuiu para maciez e
 433 flexibilidade do filme, o que melhora a adequação ao uso (13). Kanatt, Chawla e
 434 Sharma (38) prepararam filmes de quitosana e PVA contendo extrato aquoso de
 435 hortelã e extrato de casca de romã para utilização como embalagens de alimentos e,
 436 segundo os autores, ocorreu uma melhora na resistência à tração dos após a adição

437 do extrato, devido a formação de ligações de hidrogênio dos grupos OH presentes
 438 nos compostos fenólicos dos extratos e a quitosana. Mohseni et al. (39) relataram que
 439 a adição de extrato aquoso de semente de romã em filmes de amido e alginato
 440 provocou um incremento nas propriedades mecânicas dos filmes, o que foi atribuído
 441 às interações existentes entre os polímeros e os componentes do extrato.

442

443 *Determinação da CIM e pesquisa da atividade antifúngica*

444 Devido ao grande número de relatos de casos de resistência microbiana frente a
 445 fármacos sintéticos disponíveis comercialmente, vêm sendo estudadas alternativas
 446 farmacoterapêuticas para substituí-los e, entre estas, plantas medicinais e seus
 447 fitoconstituintes se destacam (39). Dados disponíveis na literatura mostram que
 448 diversos extratos preparados a partir de cascas de romã têm efeito inibitório
 449 significativo sobre bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos (40-47).

450

451 O teste de disco-difusão foi realizado para avaliar a existência de atividade
 452 antimicrobiana do extrato produzido. Os valores das zonas de inibição encontrados
 453 são dados na Tabela 2. Os dados são apresentados como média e desvio padrão e o
 454 ensaio foi realizado em triplicata.

455

456 **Tabela 2.** Atividade antifúngica do extrato de romã frente a *Candida albicans* (ATCC
 457 24.433)

458

<i>Candida</i>	Diâmetro dos halos de inibição			
	0,25 mg.mL ⁻¹	1,25 mg.mL ⁻¹	5 mg.mL ⁻¹	10 mg.mL ⁻¹
<i>albicans</i>	0 (± 0,00)	0 (± 0,00)	10,18 (± 0,04) ^a	10,15 (± 0,07) ^a

459 ^{a,b}Letras diferentes mostram diferença estatística (p < 0,05).

460

461 Neste teste, foi observado a formação de zonas de inibição (20 mm ± 0,5 mm) para o
 462 controle positivo (anfotericina B), de acordo com o CLSI (2008), indicando a
 463 adequação do teste ao protocolo e a sensibilidade do microrganismo em teste. Para
 464 o ESTCR puro, houve a inibição do crescimento do fungo para as concentrações de
 465 5 e 10 mg.mL⁻¹, não havendo diferença significativa entre ambas. Nas menores
 466 concentrações do extrato não houve inibição do crescimento.

467

468 Confirmada a existência de atividade antimicrobiana, foi realizado ensaio de
469 suscetibilidade pelo método de microdiluição em placa para determinação da CIM
470 frente ao fungo. Foi realizada uma modificação na técnica. Na mesma microplaca
471 anteriormente utilizada, para realização da leitura foi realizado teste para pesquisa da
472 viabilidade celular pela adição do reagente *brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-*
473 *difenil tetrazolium]* (MTT). A reação com o MTT evidenciou a existência de viabilidade
474 celular nos poços contendo os controles negativos, indicando crescimento fúngico.
475 Não foi observada viabilidade celular nos poços contendo o controle positivo
476 (anfotericina B). Para os poços contendo o ESTCR nas menores concentrações
477 estudadas (0,0625 a 2,5 mg.mL⁻¹), a viabilidade celular foi confirmada, indicando que
478 estas concentrações não inibem o crescimento do fungo. Por outro lado, para as
479 concentrações de 5 e 10 mg.mL⁻¹, a viabilidade celular não foi confirmada, sugerindo a
480 inibição do crescimento. Finalmente, para determinação da concentração mínima
481 fungistática e da concentração mínima fungicida, o conteúdo dos poços contendo 5
482 e 10 mg.mL⁻¹ do EBSCR foi semeado em placas contendo meio ágar BHI, que foram
483 incubadas a 36° C, por 24 h. Decorrido o período de incubação, observou-se o
484 crescimento de < 100 UFCs na placa oriunda do poço contendo o extrato a 5 mg.mL⁻¹
485 e a ausência de UFC na placa oriunda do poço contendo o extrato a 10 mg.mL⁻¹.

486

487 Em um trabalho anterior, os valores das CIM encontrados para o ESTCR foram
488 determinados, sendo de 1,25 mg.mL⁻¹ e 25 mg.mL⁻¹ para *S. aureus* e *E. coli*,
489 respectivamente (7). Complementarmente, no presente trabalho, determinou-se que
490 o extrato, na concentração de 5 mg.mL⁻¹, apresenta ação fungistática e, a 10 mg.mL⁻¹
491 possui atividade fungicida. Estes achados corroboram outros dados disponíveis na
492 literatura, que mostram a existência de atividade antifúngica para diferentes tipos de
493 extratos de romã sobre cepas de fungos (42,48-51). Oliveira (52) realizou a
494 quantificação de polifenóis em extratos metanólico e etanólico de romã e investigou o
495 potencial antifúngico contra *Candida albicans*. A cepa testada apresentou resistência
496 ao extrato metanólico mas se mostrou sensível ao extrato etanólico, com halo de
497 inibição de 10 mm, próximo ao encontrado no presente estudo para a concentrações
498 de 5 e 10 mg.mL⁻¹. Em outro estudo realizado por De Almeida et al. (53) foi pesquisado
499 o efeito antifúngico de tinturas de romã sobre cepas de *Candida albicans* (ATCC
500 76.618), *Candida krusei* (ATCC 6.538) e *Candida tropicalis* (ATCC 13.803). Os
501 autores observaram que os valores da CIM para as cepas de *Candida albicans*,

502 *Candida krusei* e *Candida tropicalis* foram 9,37, 9,37 e 18,75 mg.mL⁻¹,
 503 respectivamente. Serquén, Moreno-Mantilla e Iglesias-Osores (54) determinaram a
 504 suscetibilidade de diferentes cepas de *Candida albicans* frente à diferentes
 505 concentrações de um extrato etanólico da casca da romã e relataram que os valores
 506 de CIM encontrados variaram de 1,56 mg.mL⁻¹ a 6,25 mg.mL⁻¹, resultados que os
 507 autores atribuíram à resistência das diferentes cepas.

508

509 Finalmente, a susceptibilidade do fungo *C. albicans* frente a amostras dos filmes sem
 510 e com ESTCR a 1,25% p/p foi pesquisada pelo método de disco-difusão (Figura 5). A
 511 ausência de halo de inibição para o controle negativo (filme puro) e a formação de
 512 zona de inibição (20 mm ± 0,5) para a anfotericina B, utilizada como controle positivo,
 513 demonstram a adequação do teste. Pode-se observar na Figura 5 a existência de
 514 zonas de inibição para amostras dos filmes contendo extrato (1, 2 e 3) e para o
 515 controle positivo (anfotericina B). Para os filmes sem extrato (4, 5 e 6), não há
 516 formação de zona de inibição. O diâmetro médio das zonas de inibição para amostras
 517 do filme com ESTCR foi de 18,67 mm (± 1,53 mm).

518

519

520

521

522

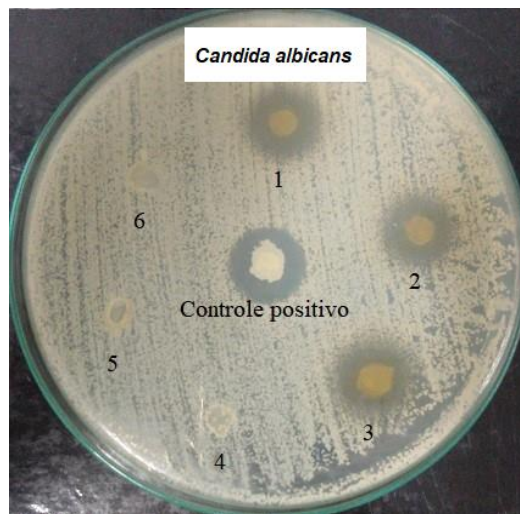
523

524

525

526

527



528 **Figura 5.** Teste de disco-difusão de filmes com ESTCR a 1,25% p/p (1, 2 e 3 -
 529 triplicata) e filmes puros (4, 5 e 6 - triplicata), frente a *C. albicans*.

530

531 Resultados semelhantes foram apresentados por Batista et al. (26) ao analisarem a
 532 atividade antifúngica de filmes contendo o mesmo extrato a 1,25% p/p, preparados
 533 pelo método de eletrofiação. Outros autores avaliaram a existência de atividade
 534 antifúngica de preparações baseadas em extratos de romã sobre diferentes cepas de
 535 *Candida* e outros fungos, com resultados positivos (55-57). Segundo Palchykov et al.

536 (58), o extrato etanólico da casca de romã foi mais eficiente que a anfotericina B em
537 inibir o crescimento de cepas multirresistentes de *Candida albicans*. Kumar et al. (59)
538 relataram que o extrato da casca de romã teve eficácia antifúngica quase igual a do
539 clotrimazol no tratamento contra a candidíase oral. Bassiri-Jahromi et al. (60)
540 prepararam um extrato metanólico de cascas de romã e realizaram testes em
541 diferentes concentrações do extrato no tratamento de candidíase oral e obtiveram uma
542 melhora após poucos dias de tratamento.

543

544 De acordo com diversos autores, a ação antimicrobiana dos extratos de romã pode
545 ser atribuída à presença de taninos, metabólitos secundários capazes de se
546 complexarem com proteínas e inativarem enzimas dos microrganismos, levando à
547 morte celular. A presença de antocioninas, e polifenóis, também podem promover a
548 morte celular em função do rompimento da membrana citoplasmática do
549 microrganismo (19,26,55-57). Portanto, os dados encontrados no presente trabalho
550 corroboram outros encontrados na literatura.

551

552 **4. Conclusões**

553

554 A incorporação de 1,25% p/p de extrato seco total de casca de romã na blenda
555 PVA/amido/PAA (75:15:10) originou filmes lisos, transparentes, brilhante, de
556 coloração amarelo-clara e resistentes ao manuseio. Os espectros FTIR comprovaram
557 a existência de interações químicas entre os componentes do extrato e os polímeros,
558 contribuindo para a formação de filmes íntegros, uniformes e com propriedades
559 mecânicas consideradas apropriadas para o uso como coberturas bioativas. Não foi
560 observada incompatibilidade ou instabilidades na formulação. Análises das
561 fotomicrografias das superfícies fraturadas dos filmes apontam a presença de
562 descontinuidades na matriz, justificando a redução observada nos parâmetros de
563 resistência mecânica quando comparados aos valores para o filme puro. A alteração
564 na organização das cadeias poliméricas também foi confirmada por DRX. Finalmente,
565 os filmes com extrato apresentaram atividade antifúngica sobre a cepa estudada de
566 *Candida albicans*. Tais achados sugerem que o filme é potencialmente útil para a
567 finalidade pretendida.

568

569 **Contribuições dos autores:** NNC, GAP, TMS, SBS e KAB, realizaram todos os
570 ensaios. JAS preparou e caracterizou o extrato. NNC redigiu a primeira versão do
571 manuscrito. MCDI, LGC, JAR, RLO e JCOV interpretaram os resultados e corrigiram
572 o manuscrito.

573

574 **Referências**

- 575 1. Bernardo AFC, Santos K, Silva DP. Pele: alterações anatômicas e fisiológicas do
576 nascimento à maturidade. *Revista Saúde em Foco*, 2019, 1(11):1221-1233.
- 577 2. Capella SO, Junior AGA, Krug FDM, Silva EC, Pineiro MBC, Nobre MO. Lesões
578 cutâneas traumática em pequenos animais: características e
579 tratamentos. *Brazilian Applied Science Review*, 2020, 4(2):459-467.
- 580 3. Smaniotto PHS, Ferreira MC, Isaac C, Galli R. Sistematização de curativos para
581 o tratamento clínico das feridas. *Revista Brasileira de Cirurgia Plástica*, 2012,
582 27(4):623-626.
- 583 4. Franco D, Gonçalves LF. Feridas cutâneas: a escolha do curativo adequado.
584 *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, 2008, 34(3):203-206.
- 585 5. Silva VEG, Guedes EODS, Huppes RR. Tratamento de feridas em cães
586 domésticos comparação entre laser e película de hidrocóide, 2017.
- 587 6. Alves MCMA. Efeito cicatrizante de membranas contendo extratos de
588 *Stryphnodedron adstringens* e *Abarema cochilacarpos* em feridas abertas em
589 modelo animal. Tese (Doutorado em Saúde e Ambiente) - Programa de Pós-
590 graduação em saúde e ambiente, Universidade Tiradentes, Aracaju, SE, 2018.
- 591 7. Costa NN, Lopes LF, Ferreira DF, Prado EML, Severi JA, Resende JA, Careta
592 FP, Ferreira MCP, Carreira LG, Souza SOL, Cotrim MAP, Boeing T, Andrade SF,
593 Oréfice RL, Villanova JCO. Polymeric films containing pomegranate peel extract
594 based on PVA/starch/ PAA blends for use as wound dressing: In vitro analysis
595 and physicochemical evaluation. *Materials Science and Engineering: C*, 2020,
596 109:110643-11702.
- 597 8. Sampaio WC, DE Carvalho LAN, Carneiro MLB. Avanços no desenvolvimento de
598 biomateriais visando tratamento de feridas crônicas. *Hergonomia: Revista de*
599 *Ciências Sociais*, 2018, 25:35-35.
- 600 9. Souza SOL, Cotrim MAP, Oréfice RL, Carvalho SG, Dutra JAP, Careta FP,
601 Resende JA, Villanova JCO. Electrospun poly(ϵ -caprolactone) matrices
602 containing silver sulfadiazine complexed with β -cyclodextrin as a new

- 603 pharmaceutical dosage form to wound healing: Preliminary physicochemical and
604 biological evaluation. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2018,
605 29(67):1-17.
- 606 10. Ferreira MC, Tuma Júnior P, Carvalho VF, Kamamoto F. Feridas
607 complexas. *Clinics*, 2006, 61(6):571-578.
- 608 11. Boateng JS, Catanzano O. Advanced therapeutic dressings for effective wound
609 healing - a review. *Journal of Pharmaceutical Science*, 2015, 104(11):3653-3680.
- 610 12. Sharma S, Dua A, Malik A. Third generation materials for wound dressings.
611 *International Journal of Pharmaceutical Sciencesmacy and Research*, 2014,
612 5(6):2113-2124.
- 613 13. Dutra JA, Carvalho SG, Zampirolli AC, Daltoé RD, Teixeira RM, Careta FP,
614 Cotrim MA, Oréface RL, Villanova JC. Papain wound dressings obtained from
615 poly(vinyl alcohol)/calcium alginate blends as new pharmaceutical dosage form:
616 Preparation and preliminary evaluation. *European Journal of Pharmaceutics and*
617 *Biopharmaceutics*, 2017,113:11-23.
- 618 14. Repka MA, Mcginity JW. Bioadhesive properties of hydroxypropylcellulose topical
619 films produced by hot-melt eztrusion. *Journal of Controlled Release*, 2001,
620 70(3):341-351.
- 621 15. Brasil. Ministério da Saúde. *Relação Nacional de Plantas Medicinais de*
622 *Interesse ao SUS*. Portal Saúde, 2009
- 623 16. Wang XK, Zhu XT, Xue DY, Wu. Hydrogel sheets of chitosan, honey and gelatin
624 as burn wound dressings, *Carbohydrate Polymers*, 2019, 88:75-83.
- 625 17. Alvarado N, Urdaneta J, Figueroa JRR, Dicastillo CL, Schmidt M, Galotto MJ,
626 Guarda A. Improvement of physicochemical properties of starch films by blending
627 it with poly(n-vinyl-2-pyrrolidone). *Jornal of Food Science & Nutrition*, 2018,
628 4(0):1-36.
- 629 18. Çaykara T, Demirci S. Preparation and characterization of blend films of
630 poly(vinylalcohol) and sodium alginate. *Journal of Macromolecular Science, Part*
631 *A. Pure and Applied Chemistry*, 2006, 43(7):1113-1121.
- 632 19. Pattanayak S, Dutta MK, Debnath PK, Bandyopadhyay SK, Saha B, Maity, D. a
633 study on ethno-medicinal use of some commonly available plants for wound
634 healing and related activities in three southern districts of West Bengal, India.
635 *Exploratory Animal and Medical Research*, 2012, 2(2):97-110.

- 636 20. Machado T.B. Análise fitoquímica e investigação da atividade antibacteriana de
637 plantas medicinais utilizadas popularmente contra infecções. Tese (Doutorado
638 em Química de Produtos Naturais) - Núcleo de pesquisas de Produtos Naturais,
639 Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003.
- 640 21. Veluri R, Weir TL, Bais HP, Stermitz FR, Vivanco JM. Phytotoxic and
641 antimicrobial activities of catechin derivatives. *Journal of Agricultural and Food*
642 *Chemistry*, 2004, 52(5):1077-1082.
- 643 22. Amal B, Veena B, Jayachandran VP, Shilpa J. Preparation and characterisation
644 of *Punica granatum* pericarp aqueous extract loaded chitosan-collagen-starch
645 membrane: role in wound healing process. *Journal of Materials Science:*
646 *Materials in Medicine*, 2015, 26(5):181-190
- 647 23. Hassanpour N, Greiner R. Learning disentangled representations for
648 counterfactual regression. In *International Conference on Learning*
649 *Representations*, 2019.
- 650 24. Zekry ASS, Abdellatif A, Azzazy HM. Fabrication of pomegranate/honey
651 nanofibers for use as antibacterial wound dressings. *Wound Medicine*, 2020
652 28:100181.
- 653 25. Nascimento MF, Cardoso JC, Santos TS, Tavares LA, Pashirova TN, Severino
654 P, Souto EB, Albuquerque-Junior RL. Development and characterization of
655 biointeractive gelatin wound dressing based on extract of *Punica granatum*
656 Linn. *Pharmaceutics*, 2020, 12(12):1204, 2020.
- 657 26. Batista SV, Silva TM, Salomao SB, Bastos KA, Souza SOL, Cotrim MAP,
658 Orefice, RL, Andrade, SF, Careta FP, Severi JA, Resende JA, Villanova JCO. In
659 vitro activity of pomegranate peel extract alone and in electrospun poly(vinyl
660 alcohol)/sodium alginate matrix. *Blomedical and Biopharmaceutical Research*,
661 2020, 17(2):294-312.
- 662 27. Kuete V, Tangmouo JG, Beng VP, Ngounou FN, Lontsi D. Antimicrobial activity
663 of the methanolic extract from the stem bark of *Tridesmostemon*
664 *mphalocarpoides* (Sapotaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 2006, 104(1-
665 2):5-11.
- 666 28. Wang R, Ding Y, Liu R, Xiang L, Du L. Pomegranate: constituents, bioactivities
667 and pharmacokinetics. *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology*,
668 2010, 4(2):77-87.

- 669 29. He L, Lan W, Ahmed S, Qin W, Liu Y. Electrospun polyvinyl alcohol film
670 containing pomegranate peel extract and sodium dehydroacetate for use as food
671 packaging. *Food Packaging and shelf Life*, 22:100390, 2019.
- 672 30. Hayouni EA, Miled K, Bounaker S, Bellasfar Z, Abedrabba M, Iwaski H, Oku H,
673 Matsui T, Limam F, Hamdi M. Hydroalcoholic extract based-ointment from
674 *Punica granatum* L. peels with enhanced in vivo healing potential on dermal
675 wounds. *Phytomedicine*, 2011, 18(11):976-984.
- 676 31. Vilela C, Pinto RJB. Coelho J, Domingues MRM, Daina S, Sadocco P, Santos
677 SAO, Freire, CSR. Bioactive chitosan/ellagic acid films with UV-light protection
678 for active food packaging. *Food Hydrocolloids*, 2017, 73:120-128.
- 679 32. Chenwei C, Zhipeng T, Yarui M, Weiqiang Q, Fuxin Y, Jun M, Jing X.
680 Physicochemical, microstructural, antioxidant and antimicrobial properties of
681 active packaging films based on poly(vinyl alcohol)/clay nanocomposite
682 incorporated with tea polyphenols. *Progress in Organic Coatings*. 2018, 123:176-
683 184.
- 684 33. Fleck A, Cabral PFG, Vieira FFM, Pinheiro DA, Pereira CR, Santos WC,
685 Machado TB. *Punica granatum* L. hydrogel for wound care treatment from case
686 study to phytomedicine standardization, *Molecules*, 2016, 21(8):1059.
- 687 34. Jose J, Shehzad F, Al-Harathi MA. Preparation method and physical, mechanical,
688 thermal characterization of poly (vinyl alcohol)/poly (acrylic acid) blends. *Polymer*
689 *Bulletin*, 2014, 71(11):2787-2802.
- 690 35. Tian H, Yan J, Rajulu AV, Xiang A, Luo X. Fabrication and properties of polyvinyl
691 alcohol/starch blend films: Effect of composition and humidity. *International*
692 *Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 96:518-523
- 693 36. Manavi-Tehrani I, Rabiee M, Parviz M, Tahiri MR, Fahimi Z. Preparativon,
694 characterization and controller release investigation of biocompatible pH-
695 sensitive PVA/PAA hydrogels. *Macromolecular Symposia*, 2010, 296(1):457-465.
- 696 37. Faria FO, Vercelheze AES, Mali S. Propriedades físicas de filmes
697 biodegradáveis à base de amido de mandioca, álcool polivinílico e
698 montmorilonita. *Química Nova*, 2012, 35(3):487-492.
- 699 38. Kanatt SR, Rao MS, Chawla SP, Sharma A. Active chitosan–polyvinyl alcohol
700 films with natural extracts. *Food Hydrocolloids*, 2012, 29(2):290-297.
- 701 39. Mohseni MS, Khalilzadeh MA, Mohseni M, Hargalani FZ, Getso MI, Raissi V,
702 Raiesi O. Green synthesis of Ag nanoparticles from pomegranate seeds extract

- 703 and synthesis of Ag-starch nanocomposite and characterization of mechanical
704 properties of the films. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*,
705 2020, 25:101569.
- 706 40. Antunes RMP, Lima EO, Pereira MS, Camara CA, Arruda TA, Catão RMR, Silva
707 TMS. Atividade antimicrobiana "in vitro" e determinação da concentração
708 inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e
709 fungos leveduriformes. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2006, 16(4):517-
710 524.
- 711 41. Al-Zoreky NS. Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit
712 peels. *International journal of food microbiology*, 2009, 134(3), 244-248.
- 713 42. Bernardo THL, Sales SVRC, Alvino V, Silva Araujo MG, Evangelista PSRF, MV
714 Araújo-Júnior. Antimicrobial analysis of an antiseptic made from ethanol crude
715 extracts of *P. granatum* and *E. uniflora* in wistar rats against *Staphylococcus*
716 *aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *The Scientific World Journal*, 2015,
717 2015:751791.
- 718 43. Dahham SS, Ali MN, Tabassum H, Khan M. Studies on antibacterial and
719 antifungal activity of pomegranate (*Punica granatum* L.). *American-Eurasian*
720 *Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, 2010, 9(3):273-281.
- 721 44. Santos MGC, Pereira JV, de Medeiros Nóbrega DR. Potencial antifúngico da
722 *Punica granatum* Linn na odontologia. *Revista Brasileira de Pesquisa em Saúde*,
723 2014, 16(1): 112-117.
- 724 45. Machado, TB. Análise fitoquímica e investigação da atividade antibacteriana de
725 plantas medicinais utilizadas popularmente contra infecções. Tese (Doutorado
726 em Química de Produtos Naturais) - Núcleo de pesquisas de Produtos Naturais,
727 Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003.
- 728 46. Pagliarulo C, De Vito V, Picariello G, Colicchio R, Pastore G, Salvatore P, Volpe
729 MG. Inhibitory effect of pomegranate (*Punica granatum* L.) polyphenol extracts
730 on the bacterial growth and survival of clinical isolates of pathogenic
731 *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Food Chemistry*, 2016, 190:824-
732 831.
- 733 47. Pereira JV, Pereira MSV, Sampaio FC, Sampaio MCC, Alves PM, Araújo CR,
734 Higino JS. Efeito antibacteriano e antiaderente in vitro do extrato da *Punica*
735 *granatum* Linn. sobre microrganismos do biofilme dental. *Revista Brasileira de*
736 *Farmacognosia*, 2006, 16(1):88-93.

- 737 48. Prashanth D, Asha MK, Amit A. Antibacterial activity of *Punica*
738 *granatum*. Fitoterapia, 2001, 72(2):171-173.
- 739 49. Barbosa CS, Alves ÉF, Fortuna JL, Macena WG. Atividade antifúngica preliminar
740 dos extratos de *Punica granatum* (linnaeus) e *Psidium guajava* (linnaeus) sobre
741 *Candida albicans*. Revista de Saúde e Biologia, 2016, 11(1):66-73.
- 742 50. Anibal PC, Peixoto ITA, Foglio MA, Höfling JF. Antifungal activity of the ethanolic
743 extracts of *Punica granatum* L. and evaluation of the morphological and structural
744 modifications of its compounds upon the cells of *Candida* spp. Brazilian Journal
745 of Microbiology, 2013, 44(3):839-848.
- 746 51. Mansourian A, Boojarpour N, Ashnagar S, Beitollahi JM, Shamshiri AR. The
747 comparative study of antifungal activity of *Syzygium aromaticum*, *Punica*
748 *granatum* and nystatin on *Candida albicans*: an in vitro study. Journal de
749 Mycologie Medicale, 2014, 24(4):e163-e168.
- 750 52. Oliveira LMLD. *Punica granatum*: quantificação de polifenóis de extratos e
751 potencial antifungico contra *Candida albicans*. Orientador Débora Barros
752 Barbosa. 2016. Tese (Doutorado em Ciência Odontológica) Faculdade de
753 Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita.
- 754 53. Almeida LDFD, Cavalcanti BYW, Júnior BRL, de Oliveira Lima E, de Castro RD.
755 Efeito antifúngico de tinturas de própolis e romã sobre espécies de
756 *Candida*. Revista Cubana de Estomatología, 2012, 49(2):99-106.
- 757 54. Serquén LM, Mantilla MCM, Osoreo SAI. Susceptibilidad de *Candida albicans* a
758 extracto etanólico de cáscara de *Punica granatum*. Medicina Naturista, 2020,
759 14(1):59-64.
- 760 55. Lee KY, Mooney DJ. Alginate: properties and biomedical applications. Progress
761 in Polymer Science, 2012, 37(1):106-126.
- 762 56. Trindade S, Sousa A, Gordo I. Antibiotic resistance and stress in the light of
763 Fisher's model. International Journal of Organic Evolution, 2012, 66(12):3815-
764 3824.
- 765 57. Nascimento Júnior BJ, Santos AMT, Souza AT, Santos EO, Xavier MR, Mendes
766 RL, Amorim ELC. Estudo da ação da romã (*Punica granatum* L.) na cicatrização
767 de úlceras induzidas por queimadura em dorso de língua de ratos Wistar (*Rattus*
768 *norvegicus*). Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, 2016, 18(2):423-432.
- 769 58. Palchykov VA, Zazharskyi VV, Brygadyrenko VV, Davydenko PO, Kulishenko
770 OM, Borovik IV, Boyko OO. Bactericidal, protistocidal, nematocidal properties

- 771 and chemical composition of ethanol extract of *Punica granatum*
772 peel. *Biosystems Diversity*, 2019, 27(3):300-306.
- 773 59. Kumar KP, Samlin SS, Siva B, Sudharshan R, Vignesswary A, Divya K. *Punica*
774 *granatum* as a salutiferous superfruit in the treatment of oral candidiasis: an in
775 vitro study. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 2020, 24(1):188.
- 776 60. Bassiri-Jahromi S. In vivo comparative evaluation of the pomegranate (*Punica*
777 *granatum*) peel extract as an alternative agent to nystatin against oral
778 candidiasis. *Iranian Journal of Medical Sciences*, 2018, 43(3):296, 2018.
779