

**UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE**

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CICATRIZANTE DE
FILMES PREPARADOS COM MUCO DE *Achatina fulica*
ASSOCIADOS OU NÃO A LASERTERAPIA**

WAGNO ALCÂNTARA DE SANTANA

ARACAJU

JULHO-2011

**UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE**

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CICATRIZANTE DE
FILMES PREPARADOS COM MUCO DE *Achatina fulica*
ASSOCIADOS OU NÃO A LASERTERAPIA**

WAGNO ALCÂNTARA DE SANTANA

**Orientador: Profa. Cláudia Moura de Melo, D.Sc
Prof. Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior, D.Sc**

ARACAJU

JULHO-2011

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CICATRIZANTE DE
FILMES PREPARADOS COM MUCO DE *Achatina fulica*
ASSOCIADOS OU NÃO A LASERTERAPIA

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

APROVADA POR:

Dra. Cláudia Moura de Melo
(Orientadora)

Dr. Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior
(Orientador)

Dra. Maria Amália Gonzaga Ribeiro

Dra. Juliana Cordeiro Cardoso

ARACAJU
JULHO-2011

S232d

Santana, Wagno Alcântara de

Desenvolvimento, caracterização e avaliação do potencial cicatrizante de filmes preparados com muco de achatina fulica associados ou não a laserterapia. / Wagno Alcântara de Santana; orientadores Cláudia Moura de Melo e Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior. – Aracaju, 2011. xv, 117 p. : il.

Inclui bibliografias

Dissertação Submetida ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Saúde e Ambiente) – Universidade Tiradentes, 2011

1. Achatina fulica 2. Fitoterapico. 3. Muco (secreção glicoprotéica). 4. Filmes de biopolimeros. 5. Caracterização. 6. Laser. I. Melo, Cláudia Moura de. (orient.) II. Albuquerque Júnior, Ricardo Luiz Cavalcanti de (orient.). III. Título.

CDU:

DEDICATÓRIA

Dedico o título obtido com este trabalho ao ser maior, **DEUS!**

Om Mani Padme Hum

AO LEITOR

“ PIPOCAS DA VIDA ”

“ Milho de pipoca que não passa pelo fogo continua a ser milho para sempre. Assim acontece com a gente. As grandes transformações acontecem quando passamos pelo fogo.

Quem não passa pelo fogo, fica do mesmo jeito a vida inteira. São pessoas de uma mesmice e uma dureza assombrosa. Só que elas não percebem e acham que seu jeito de ser é o melhor jeito de ser.

Mas, de repente, vem o fogo. O fogo é quando a vida nos lança numa situação que nunca imaginamos: a dor.

Pode ser fogo de fora: perder um amor, perder um filho, o pai, a mãe, perder o emprego ou ficar pobre. Pode ser fogo de dentro: pânico, medo, ansiedade, depressão ou sofrimento, cujas causas ignoramos. Há sempre o recurso do remédio: apagar o fogo!

Sem fogo o sofrimento diminui. Com isso, a possibilidade da grande transformação também. Imagino que a pobre pipoca, fechada dentro da panela, lá dentro cada vez mais quente, pensa que sua hora chegou: vai morrer. Dentro de sua casca dura, fechada em si mesma, ela não pode imaginar um destino diferente para si. Não pode imaginar a transformação que está sendo preparada para ela. A pipoca não imagina aquilo de que ela é capaz. Aí, sem aviso prévio, pelo poder do fogo a grande transformação acontece: BUM!

E ela aparece como uma outra coisa completamente diferente, algo que ela mesma nunca havia sonhado. Bom, mas ainda temos o piruá, que é o milho de pipoca que se recusa a estourar. São como aquelas pessoas que, por mais que o fogo esquente, se recusam a mudar. Elas acham que não pode existir coisa mais maravilhosa do que o jeito delas serem.

A presunção e o medo são a dura casca do milho que não estoura. No entanto, o destino delas é triste, já que ficarão duras a vida inteira. Não vão se transformar na flor branca, macia e nutritiva. Não vão dar alegria para ninguém. ”

Rubem Alves

AGRADECIMENTOS

Ao responsável por todo esse acontecimento: **meu** companheiro **DOUTOR JOSÉ ADOLFO NOVATO DA SILVA**, que acompanhou meu desenvolvimento neste decanato, que me acolheu no seu coração, que aqueceu meu espírito nos momentos mais difíceis e que sempre me encorajou, fazendo-me lembrar as lutas travadas e vencidas por mim. Gratidão ainda é muito pouco para demonstrar o sentimento que tenho por tudo que sou. **AMO-TE UM TANTÃO ASSIM...**

Aos Deuses de minha vida: minha mãe **MARIA DE LOURDES ALCÂNTARA DE SANTANA** e meu pai **FRANCISCO CARDOSO DE SANTANA**, que sempre acreditaram em mim e me ensinaram que mais valioso que qualquer título é o caráter do homem. Obrigado também por terem me ensinado a não me envaidecer com o sorriso e o elogio mentirosos. **AMO VOCÊS!**

Aos meus irmãos **WÂNIA ALCÂNTARA DE SANTANA** e **WALNÊR ALCÂNTARA DE SANTANA** e aos meus lindos **SOBRINHOS**: essa conquista também é de vocês. Sintam-se abraçados em meu coração. **ADOOOOOORO VOCÊS!**

A minha filha **SOPHIE DI SAZANELO PONSARDIN ROMANOV** que esteve presente durante toda a execução deste trabalho e me fez relaxar sempre que pedia carinho para compensar o tempo em que a privei de minha companhia. Obrigado por você existir em minha vida! **TE AMO SER DE LUZ.**

A minha analista **DOUTORA SIMONE DE SENNA G. VALENÇA** que tem me ensinado a prática do autoconhecimento e do respeito aos meus desejos. Você é também muito responsável pelos vôos ousados que tenho planado.

Aos melhores, aos números 1 em minha vida. A minha Orientadora **DOUTORA CLÁUDIA MOURA DE MELO**, mulher Arcanjo, minha amiga, minha mãe e minha irmã que sempre me acolheu em suas asas com apenas um olhar, com dedicação, amor e abdicação dos próprios interesses pessoais. A ela, agradeço a confiança de seu nome, creditando em mim a possibilidade do erro ou do sucesso, sem me conhecer. Não seria diferente com esse trabalho, fruto de nosso esforço, sonho, medo, dor e, sem dúvida, muitas alegrias. Tudo que sou e que ainda serei devo e dedico a você! A meu segundo e também primeiro Orientador **DOUTOR RICARDO LUIZ CAVALCANTI DE ALBUQUERQUE JUNIOR**, A ele, agradeço o fôlego de meus experimentos, sem seu apoio nada seria tão bem executado. Na minha vida ele cravou a responsabilidade com o resultado científico, ensinou-me a pensar como cientista e, entre uma xícara e outra de café, seu lado pai me tornou um ser humano melhor, fazendo emergir não só as questões científicas, mas também a questão dos sentimentos, sensibilidades e relacionamentos pessoais na fase de construção da pesquisa. A **DOUTORA JULIANA CORDEIRO CARDOSO**, também mãe e Orientadora de coração, sempre de sorriso largo e braços abertos, agradecendo por lhe dar mais trabalhos. Quando crescer, quero ser igualzinho a você. Nesta parceria, tive certeza de que também existem outros anjos vestidos de Co-orientadores.

Aos exemplos de Pesquisadores **DOUTORA VERÔNICA SIERPE**, **DOUTORA FABIANA ONOFRE** e **DOUTOR FRANCISCO PRADO REIS**, modelos de profissionais dos quais certamente adotarei o estilo singular de contribuição científica.

Aos funcionários e amigos **ROSI NELY PEREIRA**, **JOILMA NASCIMENTO**, **FABIANA NEVES**, **DARCY GONZAGA**, **GLADSTON SANTOS**, **JOÃO BATISTA**, **THAISE MENESES**, **ANA MARGARETH**, **BARBÁRA LEITE**, que me ensinaram que fundamental é ser feliz, mesmo tendo de escalar o Everest todos os dias.

A **TODOS** meus amigos: em mim ficou um pouco da essência de cada um de vocês!

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
CICATRIZANTE DE FILMES PREPARADOS COM MUÇO DE *Achatina fulica*
ASSOCIADOS OU NÃO A LASERTERAPIA**

WAGNO ALCÂNTARA DE SANTANA

RESUMO

A secreção glicoprotéica de *Achatina fulica* apresenta atividades biológicas relacionadas a propriedades antibacterianas contra microrganismos gram positivos e gram negativos, fungicida, e cicatrizante do muco secretado. Com o objetivo de desenvolver, caracterizar e avaliar o potencial biológico de filmes preparados a partir da secreção mucosa de *Achatina fulica*, os moluscos foram submetidos a massagem da glândula podal e o muco assim obtido permitiu a elaboração de filmes segundo a técnica *casting*. Os animais utilizados nos ensaios biológicos para avaliação do potencial cicatrizante, *Rattus norvegicus albinus*, linhagem *Wistar* machos (250-300g), foram distribuídos nos seguintes grupos experimentais: GC - grupo controle sem membrana; GCO – grupo tratado com membrana à base de colágeno; LSG – grupos tratados com membranas obtidas a partir do muco de *A. fulica* alimentadas com *Lactuca sativa*; LT – grupos tratados com laser; ACHLT – grupos tratados com membranas e laser obtidas a partir do muco de *A. fulica* alimentadas com *L. sativa*. Inicialmente, os animais foram anestesiados e feridas foram realizadas no seu dorso e o tratamento com associação membranas-irradiação transcutânea diária teve duração de 7 dias. A área da ferida foi removida cirurgicamente, sendo o material biológico submetido a processamento histológico e coloração com hematoxilina-eosina (HE) para a análise da reação inflamatória, e com picrossírius red e análise sob luz polarizada, para o estudo da deposição de fibras colágenas. A eutanásia dos animais foi realizada aos 3, 7, 14 e 21 dias. A atividade antimicrobiana foi realizada pela técnica de difusão em poços com as cepas *Candida albicans* ATCC 10231, *Escherichia coli* ATCC 15878, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 1024, *Staphylococcus aureus* ATCC 9080, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 19606, *Fusarium* ATCC 9605, ATCC 5487 *Salmonella*. Utilizou-se como controles positivos, metronidazol 5mg/ mL (bactérias) e miconazol 0,25mg/mL (fungos), e como negativo foi utilizada água

destilada. Visando caracterizar o muco e os respectivos filmes de *Achatina fulica* alimentadas com plantas medicinais foram formados grupos de trinta moluscos e oferecida *ad libitum* uma dieta com *Lactuca sativa* (alface), *Symphytum officinale* L (confrei) e *Punica granatum* (romã). Foram realizadas análises de determinação de proteína, determinação do pH, composição química e eletroforese em gel de poliacrilamida. Os filmes foram elaborados segundo a técnica *casting* e submetidos a avaliação macroscópica, análise colorimétrica, microscopia eletrônica de varredura, grau de intumescimento e transmissão de vapor de água. O muco apresentou índice de 90% de proteínas, com pH neutro, constituído de umidade acima de 98%, cinzas entre 0,42% a 0,78% e lipídeos entre 0,05% a 0,1%. A eletroforese em gel de poliacrilamida demonstrou que a fração protéica do muco apresenta massa molar próximas aos padrões albumina bovina (66 kDa), ovalbumina (45 kDa), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (36 kDa), anidrase carbônica (29 kDa). A forma macroscópica do filme apresentou características de manipulação satisfatória ao emprego dos mesmos como curativos. O ensaio de colorimetria revelou diferença estatística ($p < 0,001$) de cor entre os filmes oriundos de fontes alimentares diferentes. A avaliação microscópica revelou formação de formas diferenciadas na superfície do filme, com poros transversais em toda a sua extensão. O maior índice de intumescimento (347%) foi observado quando comparado aos filmes avaliados em água destilada 220% em relação à massa inicial. A permeabilidade dos filmes PGG foi maior ($p < 0,05$) que às encontradas nos demais grupos. Este estudo sugere que a secreção de muco de *Achatina fulica* apresenta propriedades antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. O uso de filmes a partir da secreção glicoprotéica de *Achatina fulica* melhora a cicatrização de feridas no modelo murino. Outrossim, quando os filmes são associados a fototerapia a laser de baixa potência, esta é capaz acelerar a fase de remodelação da lesão, proporcionando melhor arranjo arquitetônico das fibras de colágeno. Nos ensaios de caracterização observou-se que a alimentação dos moluscos com dieta diferenciada pode gerar mucos com diferentes características de permeabilidade e coloração.

Palavras-chave: *Achatina fulica*, muco, filmes, caracterização, laser, cicatrização.

DEVELOPMENT, CHARACTERIZATION AND EVALUATION OF THE HEALING POTENTIAL OF FILMS PREPARED WITH THE MUCUS *Achatina fulica* WITH OR WITHOUT LASER

WAGNO ALCÂNTARA DE SANTANA

ABSTRACT

The secretion of glycoprotein *Achatina fulica* has biological activities related to antibacterial properties against gram positive and gram negative, fungicide, and healing of mucus secreted. In order to develop, characterize and assess the biological potential of films prepared from the mucous secretion of *Achatina fulica* snails underwent massage foot and mucus gland thus obtained allowed the preparation of films according to the casting technique. The animals used in biological assays for assessing the potential healing, *Rattus norvegicus Albinus Wistar* (250-300g) were divided into the following groups: CG - control group without membrane; GCO - group treated with collagen-based membrane; LSG - groups treated with membranes obtained from the mucus of *A. fulica* fed with *Lactuca sativa*; LT - groups treated with laser; ACHLT - groups treated with laser and membranes obtained from the mucus of *A. fulica* fed *L. sativa*. Initially, the animals were anesthetized and wounded were carried on your back and the membranes treated with the combination daily transcutaneous irradiation lasted 7 days. The wound area was surgically removed, the biological material being subjected to histological processing and staining with hematoxylin-eosin (HE) for the analysis of the inflammatory reaction, and with picrosirius red under polarized light and analysis for the study of collagen deposition. Euthanasia of animals was performed 3, 7, 14 and 21 days. Antimicrobial activity was carried out by the technique of diffusion wells with *Candida albicans* strains ATCC 10231, *Escherichia coli* ATCC 15878, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 1024, *Staphylococcus aureus* ATCC 9080, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 19606, *Fusarium* ATCC 9605, *Salmonella sp.* ATCC 5487. Was used as positive controls, metronidazole 5 mg / ml (bacteria) and miconazole 0.25 mg / mL (fungus) was used as negative and distilled water. In order to characterize the films and their mucus of *Achatina fulica* fed on medicinal plants have been formed thirty snails and offered *ad libitum* a diet with *Lactuca sativa* (lettuce), *Symphytum officinale* L (comfrey) and *Punica granatum* (Pomegranate). Analysis were performed to determine protein, determination of pH, chemical

composition and polyacrylamide gel electrophoresis. The films were prepared according to the casting technique and subjected to macroscopic, colorimetric analysis, scanning electron microscopy, swelling degree and transmission of water vapor. The mucus showed a rate of 90% protein, pH-neutral, consisting of over 98%, ash from 0.42% to 0.78% and lipids from 0.05% to 0.1%. The polyacrylamide gel electrophoresis showed that the protein fraction of mucus has molar mass close to the standards bovine serum albumin (66 kDa), ovalbumin (45 kDa), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (36 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa). The macroscopic form of the film showed satisfactory handling characteristics of the same employment as dressings. The colorimetric test revealed a statistical difference ($p < 0.001$) in color between the films from different food sources. Microscopic examination revealed the formation of different forms on the surface of the film, with pore cross-cutting in its entirety. The highest rate of swelling (347%) was observed when compared to the films in distilled water measured 220% compared to the initial mass. The permeability of the films PGG was higher ($p < 0.05$) than those found in other groups. This study suggests that the secretion of mucus of *Achatina fulica* has antibacterial properties against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. The use of films from the glycoprotein secretion of *Achatina fulica* improves wound healing in mice. Likewise, when the films are associated with phototherapy low power laser, this can accelerate the remodeling phase of the lesion, providing better architectural arrangement of collagen fibers. In the characterization tests showed that the feeding of the shellfish diet can generate differentiated mucus with different permeability characteristics and coloring.

Keywords: *Achatina fulica*, mucus, films, characterization, laser, healing.

SIGLAS

Siglas	Descrição
ACF	Grupos tratados com membranas obtidas a partir do muco de <i>Achatina fulica</i> alimentada com <i>Lactuca sativa</i> - Alface
a^*	Parâmetro de coloração do verde (-) ao vermelho (+)
ACH	Grupo com filme do mucode <i>Achatina fulica</i>
ACHLT	Grupo com filme do mucode <i>Achatina fulica</i> e tratamento com laser
ATCC	Numeração que registra a bactéria internacionalmente
b^*	Parâmetro de coloração do azul (-) ao amarelo (+)
BHI	Caldo de enriquecimento para bactérias
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CTR	Grupo controle sem membrana
FTIR	Espectrofotometria por Infravermelho com transformada de Fourier
GC	Grupo controle sem membrana
GCO	Grupo tratado com membrana à base de colágeno
HE	Hematoxilina-eosina
kDa	Kilodaltons
L^*	Luminosidade
LSG	Grupos <i>Lactuca sativa</i> - Alface
LT	Grupo com tratamento com laser
OMS	Organização Mundial da Saúde
PD	Padrão
PEG 400	Polietilenoglicol 400
PGG	Grupo <i>Punica granatum</i> – Romã
PM	Peso molecular
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
SOG	Grupo <i>Symphytum officinale</i> L. – Confrei
SUS	Sistema Único de Saúde
UFC	Unidade Formadora de Colônias
WVTP	Do Inglês: Water vapor transmission (Transmissão de vapor d'água)
ΔE	Diferença total de cores,

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO	15
2.0 OBJETIVO	17
2.1 Objetivo geral	17
2.2 Objetivos específicos	17
3.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1 Produtos naturais e saúde	18
3.1.1 Plantas medicinais	19
3.1.2 <i>Symphytum officinale</i> – Confrei	21
3.1.3 <i>Punica granatum</i> – Romã	22
3.2. <i>Achatina fulica</i>	23
3.2.1 Muco (Secreção glicoprotéica)	23
3.3. Filmes de biopolímeros	25
3.4 Processo cicatricial	26
3.5 Associação de recursos terapêuticos com laser	30
3.6 Colágeno	31
4.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
5.0 RESULTADOS	42
5.1 Manuscrito I: Caracterização físico-química de filmes formulados a partir do muco de <i>Achatina fulica</i> alimentados com plantas medicinais	42
5.2 Manuscrito II: Assessment of antimicrobial activity and healing potential of mucous secretion of <i>Achatina fulica</i>	61
5.3 Manuscrito III: Effect of combined application of dressing films based on mucous secretion of <i>Achatina fulica</i> and low level laser therapy on wound	84
6.0 CONSIDERAÇÕES GERAIS	109
7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111

FIGURAS

Manuscrito I

Figura 1	Índice de intumescimento dos filmes de <i>A. fulica</i> alimentados com <i>Lactuca sativa</i> (LSG) <i>Symphytum officinale</i> L. (SOG) e <i>Punica granatum</i> (PGG)	50
Figura 2	Filmes de polímeros produzidos a partir do muco de <i>A. fulica</i> alimentados com diferentes plantas medicinais	51
Figura 3	Fotomicrografia dos filmes de <i>A. fulica</i> alimentados com <i>Lactuca sativa</i> (LSG) <i>Symphytum officinale</i> L. (SOG) e <i>Punica granatum</i> (PGG)	53
Figura 4	Índice de intumescimento dos filmes de <i>A. fulica</i> alimentados com <i>Lactuca sativa</i> (LSG) <i>Symphytum officinale</i> L. (SOG) e <i>Punica granatum</i> (PGG)	55

Manuscrito II

Figure 1	Histological sections stained in HE. Presence of inflammatory infiltrate rich in polymorphonuclear neutrophils in CTR(a), COL (b) and ACF (d). Intense subacute inflammatory response in CTR (d), and granulation tissue well-developed seen in COL (e) and ACF (f) after 7 days. Residual granulation tissue seen in CTR (g) whereas collagen scar formation was observed in Col (h) and ACF (i) after 14 days. Advanced epithelization is also evidenced in all groups. In 21 days, there was lack of inflammatory response in all groups but the neof ormation of cutaneous appendages was rudimentary in CTR (g) but quite advanced in COL (h) and ACF (i).	82
Figure 2	Histological sections observed under polarized light of the groups in 3 (a), 7 (b), 14 (c) and 21 (d) days. Type III collagen is seen as greenish and yellow-greenish fibers, whereas type I	83

collagen is represented by orangish and reddish fibers. Vertically, the experimental groups CTR (1), COL (2), ACF (3). ACF showed earlier replacement of type III for type I collagen in 7 days (b3), denser compactation of parallel-arranged collagen fibers in 14 days (c3), interlaced disposition of the fibers in 21 days (d3) resembling the normal dermis (sirius red/polarization, 100x).

Manuscrito III

- Figure 1 Histological sections showing evolution of the healing process in the experimental groups over the time. In 3 days, acute inflammatory response (predominance of neutrophils) is observed in all groups. In 7 days, the granulation tissue is more vascular in CTR and ACH and more fibroblastic in LT and ACHLT. In 14 days, CTR showed distinguishable residual granulation tissue, in opposition to ACH, Lt and ACHLT. In 21 days, the inflammatory or vascular content are inconspicuous in all groups, but the cicatricial scar is composed of denser and grosser interlaced fibers in LT and ACHLT (HE, 200x). 105
- Figure 2 Assessment of the epithelization rates in the experimental groups over the experimental time. (*) Significantly different from CTR and ACH ($p < 0.05$). 106
- Figure 3 Histological sections showing the evolution of the collagenization in the experimental groups over the time. In 3 days, predominance of reticular-arranged thin delicate fibrils of type III collagen is seen in all groups. In 7 days, partial replacement of type III for type I collagen is observed in the treated groups. In 14 days, the type I collagen fibers are predominantly parallel-arranged and more compacted disposed in LT and ACHLT. In 21 days, the densest organization of type I collagen is evidenced in the groups; 107

the highest density of collagen deposition is seen in LT, whereas in ACHLT, the interlaced fibers are less compacted and composed of both types of collagen (Sirius Red/Polarization, 200x).

Figure 4 Assessment of the collagen deposition rates in the experimental groups over the time. (*) Significantly different from CTR ($p < 0.05$); (**) significantly different from CTR ($p < 0.01$) and ACH ($P < 0.05$); (***) significantly different from CTR, ACH and LT ($p < 0.05$). 108

TABELAS

Manuscrito I

Tabela 1	Concentração de proteína do muco de <i>A. fulica</i> alimentados com diferentes plantas medicinais	49
Tabela 2	Composição química do muco produzido pelo caramujo <i>A. fulica</i> alimentados com plantas medicinais	49
Tabela 3	Determinação de pH do muco de <i>A. fulica</i>	50
Tabela 4	Avaliação macroscópica dos filmes	51
Tabela 5	Leitura colorimétrica do filmes de <i>A. fulica</i> com diferentes alimentações	52
Tabela 6	Determinação da Transmissão de vapor d'água (WVTP) dos filmes de <i>A. fulica</i>	56

Manuscrito II

Table I	Antimicrobial activity of mucus of <i>Achatina fulica</i>	79
Table II	Assessment of the intensity of the inflammatory infiltrate in CTR (control group), COL (collagen-based group) and ACF (<i>Achatina fulica</i> group) during the time course of the experiment.	80
Table III	Assessment of the percentage of collagen deposition (COD) in the tested groups during the time course of the experiment.	81

Manuscrito III

Table I	Assessment of the intensity of the inflammatory response in the experimental groups, in 3, 7, 14 and 21 days after the surgical procedures.	104
---------	---	-----

1. INTRODUÇÃO

A zooterapia configura-se no uso de medicamentos elaborados a partir de partes do corpo de animais, de produtos de seu metabolismo, como secreções corporais e excrementos, ou de materiais construídos por eles, como ninhos e casulos (COSTA NETO, 2000). Entre os moluscos, os gastrópodos são os animais de maior relevância neste sentido, uma vez que neste grupo observa-se potencial terapêutico em práticas zooterápicas (LORENZI, 2008). No Nordeste brasileiro, os moluscos autóctones *Pomacea* sp. (aruá) já vêm sendo utilizados pela população no tratamento de luxação dos pés, desenteria, hemorróidas e doenças respiratórias (NOMURA, 1996; COSTA NETO, 2000).

O gastrópoda *Achatina fulica*, originário de ecossistemas africanos, foi introduzido no Brasil como substituto comercial do escargot *Helix* sp. Contudo, a não aceitabilidade destes na gastronomia brasileira desencadeou o descarte desses moluscos no ambiente, tornando-o uma praga agrícola devido a ausência de predador natural, e problema de saúde pública relacionado à transmissão de *Angiostrongylus* sp (SOUZA, 2006). Por outro lado, estudos científicos têm relatado potencial atividade bactericida, fungicida, anti-tumoral e cicatrizante que o muco apresenta com aplicação na área de saúde, com a intensificação destes efeitos a partir da adição de plantas medicinais na sua dieta (MARTINS et al, 2003), o que possibilitou avaliar um possível efeito sinérgico muco-plantas medicinais em lesões cirurgicamente induzidas em animais de laboratório (LORENZI; MARTINS, 2008; SÍRIO, 2008).

A secreção cutânea (muco) liberada pelos moluscos é composta por uma mistura de elevado conteúdo protéico, proveniente de várias glândulas e exsudato geral de células epiteliais (SIMKISS; WILBUR, 1977; LORENZI et al, 2008), o que possibilita gerar formulações farmacêuticas na forma de filmes. Para tal, necessita-se desenvolver estudos aprofundados sobre as características biológicas/adaptativas de *Achatina fulica* relacionadas à obtenção de nutrientes por via alimentar e sua incorporação/elaboração em processos fisiológicos, incluindo-se as secreções glandulares, que possam respaldar o desenvolvimento de biofármacos e sua utilização na zooterapia (KUBOTA, 2003).

A incorporação de polímeros bioativos (fármacos sintéticos ou produtos naturais) em materiais implantáveis para utilização no reparo de lesões

teciduais, incluindo-se formulações em filmes, apresenta vantagens relacionadas à aceleração do processo de granulação e epitelização, além da liberação controlada do produto diretamente no tecido lesionado (SRIVASTAVA et al., 1990; HELARY et al., 2006; ALVES et al., 2008). O uso da malacofauna na produção destes filmes pode, portanto, ampliar o elenco de potenciais produtos terapêuticos de origem natural (AOAGI et al., 2007), embasado pelas atividades biológicas detectadas no muco deste animais. Neste contexto, ainda, uma vez que a laserterapia de baixa potência tem a capacidade de promover alterações físico-biológicas que podem ajudar na resolução do processo inflamatório, atuando na reepitelização, aceleração das mitoses e estímulo à produção de adenosina trifosfato e, em consonância com a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) do SUS, a avaliação conjunta de diferentes estratégias terapêuticas para o cuidado em saúde torna-se relevante.

Em vista dos pressupostos acima, o presente estudo foi organizado em três etapas que concernem: 1. Desenvolvimento de filmes e caracterização físico-química do muco/filme oriundo de *Achatina fulica* alimentadas com plantas medicinais; 2. Avaliação de atividade antimicrobiana do muco de *Achatina fulica* e; 3. Avaliação da atividade cicatricial em feridas de segunda intenção (modelo murino) com/sem o uso da laserterapia.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver, caracterizar e avaliar o potencial cicatrizante de filmes preparados a partir da secreção mucosa de *Achatina fulica*.

2.2 Objetivos específicos

- caracterizar físico-quimicamente o muco de *Achatina fulica*;
- avaliar a atividade antimicrobiana do muco de *Achatina fulica*.
- desenvolver membranas a partir do muco de *Achatina fulica*, alimentadas com diferentes plantas medicinais;
 - caracterizar os filmes desenvolvidos a partir do muco de *Achatina fulica* alimentadas com diferentes plantas medicinais;
 - avaliar a atividade cicatricial do muco, na forma de filme, de *Achatina fulica* em feridas de segunda intenção com e sem o uso da laserterapia.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Produtos naturais e saúde

Os produtos naturais exercem importante papel na medicina moderna, uma vez que são fontes de princípios ativos que muitas vezes são de difícil produção sintética além de fontes de compostos básicos que, com pequenas modificações, torna-se de grande interesse comercial. Compostos naturais de origem vegetal ou animal também podem servir de modelos para medicamentos sintéticos que tenham atividade biológica similar à do composto natural (ROBBERS et al. 2007). A falta de acesso à medicina convencional e aos medicamentos industrializados leva grande parte da população mundial a utilizar compostos de origem natural, seja para prevenção ou para o tratamento de enfermidades (AKERELE, 2003).

Países desenvolvidos, como França e Alemanha, reconhecem oficialmente a utilização de produtos naturais de origem vegetal e animal para fins terapêuticos e possuem farmacopéias especializadas no assunto (CALIXTO, 2000). No Brasil, a recente aprovação da Política Pública de Plantas Medicinais e Fitoterápicos visa garantir o acesso seguro e o uso correto de plantas medicinais e fitoterápicos mediante o uso sustentável da biodiversidade e o desenvolvimento da indústria nacional, e estabelece diretrizes para ações direcionadas à melhoria da qualidade de vida da população e do complexo produtivo na área da saúde (BRASIL, 2006). As diretrizes estabelecidas por esta nova política prevêm para as universidades a atribuição de promover pesquisa e desenvolver técnicas e inovações em produtos naturais e de origem vegetal e animal a partir de modelos e experiências existentes no Brasil e em outros países (ELISABETSKY et al. 2004).

A Política Pública de Plantas Medicinais e Fitoterápicos está em consonância com a Organização Mundial da Saúde (OMS) que sempre preconizou o uso de terapias alternativas, integrando a medicina ocidental com a popular tradicional. Essa entidade, durante a conferência de Alma-Ata, recomendou formalmente que os recursos de medicina tradicional e popular fossem utilizados pelos sistemas nacionais de saúde, recrutando os praticantes dessa medicina como aliados na organização e implementação de medidas para melhorar a saúde humana (BRASIL, 2001).

O desenvolvimento da ciência de polímeros naturais tem contribuído para propósitos médicos e farmacêuticos e suas aplicações têm crescido

rapidamente. Dentre estes os biopolímeros de origem animal destacam-se por se apresentarem como um material biodegradável e atóxico sendo utilizada na indústria de cosméticos, de alimentos, na agricultura, como fibra têxtil e no tratamento de água. Quando são aplicados na área de reabilitação dérmica (cicatrização), esse polímero é um biomaterial que favorece a reconstituição fisiológica da pele (KIM et al, 2005). Diversos biomateriais estão sendo utilizados no processo de reparo tecidual, os quais podem ser processados em inúmeras formas, tais como folhas, esponjas, dispersões, géis, filmes, soluções injetáveis, sendo cada tipo adequado de acordo com suas propriedades e características (AOYAGI et al, 2007). Nos produtos para a pele, os polímeros encontram diversas aplicações, principalmente devido a sua capacidade de formar camadas protetoras transparentes que apresentam a propriedade de reter a umidade, sem causar reações alérgicas.

3.1.1 Plantas medicinais

As plantas são, tradicionalmente, a principal estratégia do homem no tratamento de doenças. Somente recentemente, com a evolução da química e de tecnologia modernas, o homem conseguiu diminuir sua dependência do reino vegetal como fonte de cura de suas enfermidades, tendo por outro lado, ampliado o conhecimento sobre as propriedades vegetais bem como, sintetizar moléculas ativas. Entretanto, o reino vegetal, continua sendo inegavelmente uma importante fonte de princípios ativos para a busca de novos medicamentos (SCHEFFLER, 2008). Para Matos e Lorenzi (2002), a tendência de maior preocupação com a biodiversidade e as idéias de desenvolvimento sustentável contribuíram para o estudo das plantas medicinais brasileiras, despertando o interesse pela fitoterapia.

O estudo das plantas medicinais vem sendo caracterizado por diversos pesquisadores (CAMARGO, 2003; SCHENKEL, 2003; SIANI, 2003; MIQUEL, 2004) como de caráter multidisciplinar, interdisciplinar ou até mesmo transdisciplinar. Esta pluralidade, idealmente, deveria ter como resultante um entendimento integrado sobre todas as dimensões que envolvem a fitoterapia: cosmológicas/antropológicas, botânicas, agronômicas, bioquímicas, farmacológicas, toxicológicas, farmacotécnicas, clínicas (SIANI, 2003). A etnobotânica ou a etnofarmacologia é o ponto de partida estratégica para tornar o desenvolvimento de medicamentos e fármacos bioativos fitoterápicos mais assertivo.

Em 1978, avaliou-se que 80% da população dos países em desenvolvimento dependiam de plantas medicinais para suas necessidades básicas de saúde, envolvendo o uso de extratos destas (BANNERMAN; CHEM, 2009). Este cenário reflete que 3,5 a 4 bilhões de pessoas desenvolvem atividades relacionadas a plantas medicinais. Com base nesta realidade, a OMS (2004) conclamou os países membros a pesquisarem e utilizarem plantas medicinais, como forma de tratamento, contribuindo para a qualidade de vida e conseqüentemente a saúde das populações.

A pesar da grande biodiversidade brasileira, são enormes os investimentos com importação de matéria-prima de 90% dos medicamentos sintéticos consumidos pela população (CALIXTO, 2009). Com este potencial, Salles et al (2008) constataram que pouco se produziu, em relação a utilização destes recursos naturais no Brasil. Por outro lado, vêm sendo promovida a implantação da fitoterapia e seus derivados nos serviços de saúde públicos, enquanto que em muitos centros vêm se desenvolvendo pesquisa sobre as propriedades farmacológicas de plantas medicinais, chegando a resultados bastante promissores (SACRAMENTO, 2010).

Apesar de grande resistência, em maio de 2006, com a publicação da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS – PNPIC-SUS, o Ministério da Saúde avançou na questão da expansão da pluralidade do cuidado na saúde brasileira. O processo de legitimação e institucionalização das práticas complementares no Brasil iniciaram-se no início da década de 80, principalmente, após a descentralização, participação popular e crescimento da autonomia municipal, promovidos pelo SUS. Em 1985 foi celebrado o primeiro ato de institucionalização da Homeopatia na rede pública de saúde e desta data até a publicação da PNPIC muitos atos foram registrados. No entanto, um marco histórico desse processo foi a oferta de práticas complementares no SUS e a criação de grupos de trabalho multiinstitucionais, para tratar da Homeopatia e Fitoterapia (BRASIL, 2006).

Os princípios que regulamentam o uso de recursos naturais determinam que a taxa de extração de um recurso renovável não deve exceder a sua taxa de renovação, devendo existir maior apoio para estudos laboratoriais com finalidade de aumentar determinados compostos sintéticos e, conseqüentemente, diminuir a exploração dos recursos naturais, ao invés de coletar populações inteiras de espécies na natureza, levando-as à exaustão (DIAS, 2003). Os vegetais têm sido amplamente empregados na assistência à saúde devido às suas propriedades medicinais, tais como antibacteriana,

antifúngica e atividades imunomodulatórias (BALBINO, 2005). Estudos têm mostrado que plantas como *Symphytum officinale* L. (Confrey) (BARNA et al, 2007) e *Punica granatum* (romã) (GRACIOUS et al, 2001; CHINDAMBRA et al, 2004) têm sido utilizadas com sucesso em processos biológicos a fim de proporcionar melhorias na cicatrização de feridas.

3.1.2 *Symphytum officinale* L – Confrei

Dentre as substâncias naturais mais amplamente utilizadas para cicatrização de feridas cutâneas, destaca-se o confrei (*Symphytum officinale*), vegetal nativo da Europa e Ásia, embora seja comum em várias partes do mundo. Na medicina popular empregam-se preparações utilizando raízes e folhas que, apresentam ação cicatrizante, antiinflamatória, anti-reumática e antiulcerogênica. O sumo das folhas do confrei é indicado na cicatrização de feridas e a tintura destas pode ser manipulada em formulações farmacêuticas de pomadas, usando vaselina, lanolina, ou qualquer outra substância gordurosa para maior eficácia na absorção dos princípios ativos (SALLES et al, 2008).

Em sua composição encontram-se alcalóides (núcleo pirrolizidina), orgânicos, alantoína, saponinas triterpênicas, mucilagem e tanino. A alantoína é responsável pelo efeito cicatrizante e adstringente, pois estimula a formação do tecido de granulação, enquanto a mucilagem contribui para o efeito emoliente. A experiência clínica demonstra que o uso do extrato de confrei provoca aumento da temperatura e da circulação sanguínea local, diminuição da dor com início de ação rápido e efeito prolongado, e pronto regresso do processo inflamatório. Estes elementos em conjunto conferem ao confrei propriedades curativas como emoliente, calmante e na consolidação de fraturas ósseas (SOUZA, 2001; VANNIER, 2002; THOMSOM, 2003). As atividades biológicas da alantoína foram comprovadas através de ensaios clínicos e verificou-se que esta substância atua como cicatrizante, anti-irritante, hidratante e removedora de tecidos necrosados (THOMSON, 2003; SAITO, 2005; POZETTI, 2009). Devido à presença de alcalóides pirrolizidínicos, que são altamente hepatotóxicos, a literatura homeopática, mesmo a mais atual, registra patogenesia restrita deste medicamento, como específico para casos de traumatologia óssea, retardo na consolidação de fraturas e dores periosteas, sendo considerado medicamento de ação limitada (POZETTI, 2009).

3.1.3 *Punica granatum* - Romã

A *Punica granatum* L., erva da família Punicaceae, é popularmente conhecida no Brasil como “romã”. Esta erva é oriunda da região do Mediterrâneo e apresenta folhas simples e flores isoladas, de corola vermelha alaranjada e cálices esverdeados, duros e coriáceos. Seu fruto é redondo, de casca coriácea, amarela ou avermelhada contendo inúmeras sementes envolvidas por um arilo polposo, róseo-avermelhado (KAUSSHI et al, 2008).

As propriedades farmacológicas da *Punica granatum* L. têm sido descritas extensivamente e resultam na sua indicação para usos diversos, incluindo-se a imunomodulação, infecção bacteriana, infecção fúngica, infecção parasitária e doença periodontal (LONGTIN, 2003). Testes preliminares de toxicidade realizado em roedores têm demonstrado que a romã apresenta baixa toxicidade mesmo em altas dosagens (VIDAL et al, 2003). No Brasil, as folhas, cascas de caule e frutos da romã são usadas no tratamento de infecções de garganta, rouquidão e febre, como anti-séptico e antiviral em processos inflamatórios da mucosa oral e contra herpes genital. O suco especificamente se apresenta benéfico no tratamento da lepra, enquanto a casca do caule também é usada como vermífugo (MATOS, 2010).

Dentre os constituintes presentes no fruto da *Punica granatum* L. estão os alcalóides (peletierina, metilpeletierina, pseudopeletierina e isopeletierina), manita, vários fenóis, ácido elágico e ácido gálico. A casca da romã contém, aproximadamente, 20% de taninos, incluindo punicalina, punicalagina, granatinas A e B, galagildilactona, casuarinina, pedunculagina, telimagrandina I e corilagina (FETROW et al, 2000). Foram isolados de *P. granatum*, dois novos ácidos elágicos ramnosídeos, ácido metilelágico-3-O ramnopiranosídeo 4-O-aL e ácido dimetilelágico 3,4'-O ramnopiranosídeo 4 -O-AI (EL-TOUMY et al, 2003).

O potencial antimicrobiano do extrato etanólico de *P. granatum* foi avaliado *in vitro* frente a amostras humanas de *Staphylococcus aureus* de origem humana. Avaliou-se, ainda, o perfil de sensibilidade dessas cepas, diante dos antimicrobianos usados rotineiramente na clínica médica, como também a detecção da produção de alguns fatores de virulência (coagulase, hemolisina e lipase). Foram ainda avaliadas as propriedades antimicrobianas de várias plantas comumente usadas pela população de Porto Rico contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (MELÉNDEZ et al, 2006). Os resultados deste estudo mostraram que os extratos metanólicos de *Citrus*

aurantifolia (Rutaceae), *Citrus aurantium* (Rutaceae), *Punica granatum* (Punicaceae), *Phyllanthus acidus* (Euphorbiaceae) e *Tamarindus indica* (Caesalpinaceae) possuem elevada atividade antibacteriana *in vitro* frente as bactérias testadas.

3.2 *Achatina fulica*

Achatina fulica é uma espécie de molusco introduzida no Brasil, com a finalidade de comercialização em substituição ao escargot (*Helix aspersa*), por obter valor comercial mais convidativo. Esse molusco, que apresenta potencial papel de agente transmissor de *Angiostrongylus sp.*, provoca grandes prejuízos à saúde pública e agricultura (FISCHER et al, 2006). O nematódeo *Angiostrongylus costaricensis* provoca um quadro de meningite eosinofílica denominada angiostrongilíase meningoencefálica, enquanto *Angiostrongylus cantonensis* que é responsável pela angiostrongilíase abdominal. Esta forma patogênica pode evoluir até o óbito do paciente em função de perfuração intestinal, peritinite e hemorragia intestinal (TELES et al, 2007).

A. fulica possui elevado potencial reprodutivo, podendo realizar uma postura anual de até 1600 ovos, e hábito generalista, alimentando-se de frutas, verduras, hortaliças, papelão, plástico e tinta de parede (CASSO-LOPES, 2007). Uma vez que este molusco não possui predador natural, teve sua proliferação favorecida, estando atualmente configurado na lista das 100 principais espécies invasoras do mundo (REIBMAN, 2010). Esta elevada densidade populacional tem despertado a atenção das autoridades brasileiras que vêem nesta espécie exótica um potencial competidor dos moluscos nativos, uma praga na agricultura e um possível hospedeiro intermediário de nematódeos (FISCHER, 2006). A infecção humana por *Angiostrongylus sp.* ocorre pela ingestão acidental de verduras, hortaliças e, provavelmente, de água contaminada com larvas dos parasitas que se encontram no muco que o molusco libera ao se deslocar (PAIVA, 2006).

3.2.1 Muco (secreção glicoprotéica)

O muco liberado pelos moluscos é um fluido resultante da mistura da secreção de várias glândulas, sendo certo que suas principais funções são agir como veículo de transporte de partículas da superfície ciliada; secretar produtos; transferir água e eletrólitos através da epiderme e auxiliar na locomoção. Alterações da pressão sanguínea permitem a liberação de muco na

locomoção ou nas fibras musculares controladas nervosa ou endocrinamente e dispostas ao redor das glândulas que levam à liberação do muco quando contraem (CAMPION, 1961).

Nos moluscos terrestres pulmonados, a liberação do muco ocorre por secreção apócrina, sendo esta composta por uma mistura de materiais provenientes de várias glândulas cutâneas (FRETER, 2007). A principal função biológica natural do muco cutâneo dos escargots é a da proteção, porém a sua viscosidade auxilia em diversas funções, tais como locomoção, captura de alimentos, reprodução e proteção a desidratação ao prevenir a evaporação da umidade (IGUCHI et al, 2001).

A secreção glicoprotéica (muco) de *A. fulica* apresenta, por outro lado, alguns efeitos biológicos, tais como, propriedades antibacterianas contra microrganismos gram positivos e gram negativos (IGUCHI et al, 2001; KUBOTA et al, 2003; FUCHINO et al, 2004) envolvidos na dinâmica do processo de cicatrização. Além disso, este muco foi testado em feridas cirúrgicas de animais de experimentação e apresentou comprovada eficiência na melhoria da absorção cutânea durante o processo de reparo cicatricial (MARTINS et al, 2003; SIRIO, 2008).

Kubota et al (2003) descreveram também a presença de uma proteína ou um polipeptídeo, sendo mais provavelmente a mucina, com poder antimicrobiano para bactérias gram-positivas (*Bacilos subtilis* e *Staphilococcus aureus*) e gram negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*), ocorrendo no muco dos escargots e inibindo o crescimento bacteriano quando em presença desta. Otsuka-Fuchino et al (2007) purificaram a glicoproteína “achatin” do escargot gigante africano, a qual tem alto peso molecular e relatam que esta proteína destrói a superfície do *Staphilococcus aureus*, não causando nem deslocamento, nem destruição de células eucarióticas. O poder antimicrobiano de determinadas substâncias pode auxiliar nos processos de reparação de feridas de origens diversas, pois quanto menor a infecção, mais rápida será a cicatrização.

Mais recentemente tem sido proposto que o tipo de fonte alimentar vegetal dos moluscos pode influenciar a composição do muco, integrando os metabólitos secundários das plantas após a digestão (LORENZI; MARTINS, 2008; SÍRIO, 2008).

Em um estudo realizado por Mitra, Sarkar e Allen (1988), purificou-se a aglutinina (PM=70.000) presente no muco de moluscos *Achatina sp* por afinidade cromatográfica, a qual é incapaz de aglutinar eritrócitos humanos. Os

aminoácidos predominantes no muco foram o ácido aspártico e o ácido glutâmico (ou amidas) e serinas. Com relação ao conteúdo de carboidratos (10%), o açúcar mais abundante é o N-acetilglucosamina.

Estes animais são claramente resistentes às infecções por microrganismos, o que indica a existência de um fator antibacteriano presente no muco. Kubota et al (1985) descreveram a presença de uma proteína ou um polipeptídeo, sendo mais provavelmente a mucina, com poder antimicrobiano para bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermides*) encontrado no muco dos escargots e inibindo os crescimentos bacterianos quando em presença deste. A atividade antibacteriana também foi relatada para bactérias gram-negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*) relativas às frações solúveis em água e mucina (IGUCHI et al, 2001). A ação do “Achacin” assemelha-se àquela de antibióticos pertencentes ao grupo dos beta-lactâmicos, que inibem a síntese de peptidoglicano na superfície celular, assim como ocorre na utilização das penicilinas (OTSUKA-FUCHINO et al, 1992). Ademais, a grande atividade inibitória de crescimento tanto para bactérias gram-positivas quanto bactérias gram-negativas sugere que a célula bacteriana seja atacada por um fator antibacteriano extra-parede celular (KUBOTA et al, 1985).

O muco de *Achatina fulica* apresentou efeitos reparadores em lesão tecidual, sob a formulação pura e de pomada, em lesões geradas por instrumentos cortantes na pele do dorso de coelhos (MARTINS, 2003). Comprovou-se que a ação antibacteriana estava relacionada com a presença do polipeptídeo mucina, sendo que quanto menor a infecção mais rápida será a cicatrização (KUBOTA et al, 1985; LORENZI 2007; SÍRIO et al, 2008).

3.3 Filme de biopolímeros

Polímero é uma substância que é formada por cadeias moleculares longas, criadas a partir da repetição de uma molécula menor básica, chamada mero. Os polímeros, podem apresentar carga global positiva ou negativa em pH biológico. As cargas positivas interagem preferencialmente com tecidos negativamente carregados, tais como pele e cabelo, fazendo com que esta capacidade bioadesiva seja o principal fator determinante para o seu uso em curativos. A produção de blendas é uma forma de obter novos materiais poliméricos sem haver a necessidade de investir no desenvolvimento de novos monômeros ou de novos processos de polimerização (SPADARO et al, 1996).

O uso de bandagens constituídas por biopolímeros naturais tem sido muito difundido na área de saúde por apresentarem capacidade de interagir com as células do tecido lesado, e não somente encobrir a ferida como a maioria das faixas, enviando-lhes sinais que controlam as suas atividades funcionais permitindo a regeneração tecidual. Desta forma, o desenvolvimento de filmes bioativos tende a imitar o ambiente celular proporcionando uma melhor recuperação (KAOS, 2003). Neste contexto biotecnológico, pode-se citar a quitosana (ALBUQUERQUE JUNIOR et al, 2008), biopolímero da cana-de-açúcar (MAYER et al, 2011) e colágeno (NUNES et al, 2011). Os filmes bioativos que são absorvidos e degradados possuem a habilidade de servir de suporte para o crescimento de novos vasos sanguíneos, e possibilitam a nutrição das células que preenchem o tecido afetado e o acesso das células de defesa ao local, ou seja, permitem adesão, migração e proliferação celular (GIRARDI, 2005).

A fabricação do filme pode ser feita através de processos biotecnológicos, na qual depois de purificada dá origem a uma película extremamente fina, porosa e resistente, que em seguida é perfurada artificialmente, adequada para tratar qualquer tipo de lesão da pele, sendo elas feridas, cortes, queimaduras, escoriações ou qualquer outro ferimento. Estes polissacarídeos além de apresentar baixo custo, não causam dor ou reações adversas e apresenta melhor regeneração dos tecidos da pele, pois sua característica porosa permite a manutenção do líquido orgânico da lesão e as trocas gasosas (DINIZ, 2006; NUNES et al, 2011). Apesar de proteínas de origem vegetal ser mais amplamente estudada (AYDT, 1991; GENNADIOS, 1993; GENNADIOS, 1994; GHORPADE, 1995; GNANASAMBANDAM, 1997; BRANDENBURG, 2003), provavelmente devido à sua abundância e baixo custo nos países desenvolvidos, as animais produzem moléculas que podem formar filmes bioativos (NOLES et al, 2010).

O potencial de cicatrização observado no muco de moluscos (LORENZI; MARTINS, 2008) e a capacidade destes em incorporar propriedades de plantas com ações terapêuticas através da alimentação, possibilita a produção de novas formulações farmacêuticas, dentre elas o filme bioativo (DINIZ, 2006).

3.4 Processo cicatricial

A cicatrização é um processo orgânico de restauração da lesão induzida por agressão local que envolve complexas alterações entre as células e os

componentes da matriz extracelular. O processo cicatricial ocorre de duas formas: cicatrização por primeira intenção, que se caracteriza com uma ferida fechada não infectada, em que há aproximação das bordas da ferida, evoluindo para a produção de uma cicatriz, ou cicatrização por segunda intenção, que é uma ferida aberta não infectada, preenchida, inicialmente, por tecido de granulação, que contrai para formar uma cicatriz (BRASILEIRO FILHO, 2000). Em vista disso, vários estudos sobre fármacos que acelerem o processo cicatricial têm sido desenvolvidos (ARAÚJO et al, 1998; MUZZARELLI, 2008).

O fenômeno cicatricial envolve uma série de processos que visa à recuperação de elementos estruturais celulares e compreende basicamente a eliminação dos tecidos desvitalizados, a regeneração do tecido vascular e conjuntivo, a epitelização e a retração (BALBINO et al, 2005; BLANES, 2004; CORSI, 1995; FERNANDES, 2004). Sehn et al (2009) afirmam que a cicatrização pode ser dividida em fases distintas, caracterizadas pelo tipo de célula predominante e segue uma sequência harmoniosa de eventos que ocorrem simultaneamente: inflamação, repitelização, reconstrução dérmica, contração e remodelação.

A resposta inflamatória está estreitamente ligada ao processo de reparação tecidual e atua na destruição, diluição ou encerramento do agente agressor, pondo em movimento uma série de eventos que, tanto quanto possível, promovem a cicatrização e reconstituem o tecido danificado. Contudo, a inflamação e a reparação, quando não bem-coordenadas, são potencialmente lesivas (CLARK, 1996; NETTO et al, 2007).

Quando a pele é traumatizada desencadeia-se um mecanismo de defesa natural chamado de inflamação aguda e inúmeras interações ocorrem entre as macromoléculas do sistema imune. Esses mediadores não agem apenas no local da lesão, mas também sistemicamente, por ativação da via inflamatória e do sistema imune, envolvido e modulado por citocinas induzidas logo após a lesão, por fatores de crescimento e por outras células endoteliais vasculares (DOKUMCU et al, 2008).

Em determinadas circunstâncias, como um efeito em cadeia, a resposta inflamatória torna-se generalizada, uma vez que o excesso de citocinas, a ativação de leucócitos e células endoteliais leva à produção excessiva de substâncias inflamatórias, podendo levar a apoptose. Os papéis do fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina-1 β (IL-1 β) e interleucina-6 (IL-6) também são importantes na resposta inflamatória. Estas três citocinas são originárias, principalmente, da ativação dos macrófagos e são descritas como

indicadores da gravidade da lesão, bem como da infecção (DOKUMCU et al, 2008 ; SUMER et al, 2008).

Após a lesão, três fases interdependentes e sobrepostas são identificadas a fim de reparar o processo cicatricial: fase inflamatória ou exsudativa, fase proliferativa ou fiblobástica, e a fase cicatricial ou de contração (KAGAWA et al, 2009).

A fase inflamatória tem início imediatamente após a lesão ou trauma, em que ocorre a vasoconstricção reflexa, mantida posteriormente por substâncias vasoativas (histamina e bradicinina) seguida de uma vasodilatação, com extravasamento de plasma, eritrócitos e leucócitos para este local que apresentará manifestações clínicas de dor, rubor, calor e tumor (CORSI, 1995; MANDELAUBAN et al, 2003). Os neutrófilos são as primeiras células de defesa a migrarem para o local da lesão. Eles realizam a fagocitose, a lise do tecido desvitalizado e destroem as bactérias, atuando, então, no controle do processo infeccioso. Sua atividade é evidenciada por anticorpos presentes na ferida em virtude das alterações vasculares. Devido a vida curta dos neutrófilos, estes são gradativamente substituídos por outras células do sistema de defesa, caracterizando a fase crônica do processo. A inflamação crônica é considerada de duração prolongada (semanas ou meses), e, tem como uma das principais características, a lesão tecidual continuada, com infiltração de macrófagos que dão continuidade a fagocitose iniciada pelos neutrófilos. Os macrófagos controlam a formação do tecido de granulação, uma vez que influenciam a angiogênese e estimulam a proliferação de células mesenquimais, além da migração e proliferação dos fibroblastos (MANDELAUBAN et al, 2003). Além dos macrófagos, outras células inflamatórias encontram-se presentes na fase crônica do processo cicatricial tais como: linfócitos, plasmócitos, eosinófilos, em resposta aos antígenos invasores (CORSI et al, 1995).

A fase proliferativa se caracteriza pelo intenso aumento de fibroblastos e neoformação vasculo-capilar, que se inicia por volta do quinto ao décimo quarto dia após a lesão. Nessa fase, as células endoteliais se multiplicam, formando cordões sólidos que entremeiam os fibroblastos. Posteriormente, esses cordões se canalizam, resultando em tecido de granulação, com aspecto granuloso, avermelhado e pouco resistente (KUMAR et al, 2005; ALBUQUERQUE JUNIOR et al, 2008).

A eliminação dos tecidos desvitalizados apresenta maior importância nas lesões térmicas profundas, já que há acúmulo local de glóbulos brancos que, lentamente, vão promovendo a lise das fibras colágenas por meio da liberação

de substâncias enzimáticas, fagocitando detritos celulares e produzindo espécies reativas de oxigênio, evitando a contaminação por microrganismos (DIEGELMANN; EVANS, 2004; FERNANDES, 2004; MORIMOTO et al, 2005).

As células inflamatórias são responsáveis pela produção de diversos fatores de crescimento e citocinas que, associadas à baixa concentração de oxigênio, iniciam o processo de reparo tecidual, atraindo fibroblastos e queratinócitos de áreas adjacentes à lesão. À medida que a concentração local dos fatores de crescimento e citocinas se elevam, os processos de regeneração vascular e fibroplasia se intensificam através da angiogênese, migração e proliferação fibroblástica, formando um tecido rico em elementos vasculares e celulares, denominado tecido de granulação que, aos poucos, vai se alastrando e preenchendo o vazio resultante dos tecidos eliminados (McDOUGALL et al, 2006; NARINE et al, 2006; CARLUCCI et al, 2007; TENIUS et al, 2007).

Na dinâmica cicatricial, a síntese de colágeno inicia-se ao terceiro dia, atinge seu pico máximo em três a seis semanas e entra na fase de remodelação, em que o colágeno tipo III é o primeiro a ser sintetizado e, à medida que ocorre maturação do tecido ele é gradativamente substituído pelo colágeno tipo I (CARNEIRO et al, 2005; ALBUQUERQUE JUNIOR et al, 2008). Nessa fase, ocorre formação do epitélio e contração da ferida em virtude da proliferação celular (HUPP, 1996; MUZZARELLI, 2008). Além da migração e proliferação de queratinócitos a partir da margem da ferida para o centro da lesão, a presença de restos de folículos pilosos, de glândulas sebáceas ou sudoríparas remanescentes contribuem para o crescimento dos núcleos epiteliais, ou seja, quanto mais abundantes os restos de anexos de pele, mais confluentes serão as ilhotas germinativas do epitélio, e a cobertura mais rápida da área lesionada (DEMLING; WAY, 1993; DIELGEMANN; EVANS, 2004; DINO et al, 2001; GUIRRO, 2002; ROCHA et al, 2006).

É importante ressaltar que, nessa fase, a proliferação de uma célula mesenquimal especializada no tecido de granulação adquire características de células musculares lisas, denominadas miofibroblastos, com grande capacidade contrátil. Elas promovem a contração central das bordas da ferida aberta, garantindo aumento da força tênsil da cicatriz. Estas células são expressas em condições patológicas como resposta a uma injúria no tecido, e à medida que se formam novas camadas de reação de granulação, as mais profundamente situadas, as mais antigas, vão perdendo sua riqueza em vasos, e os fibroblastos e feixes de colágeno passam a predominar (HUPP, 1996; MUZZARELLI, 2008).

3.5 Associação de recursos terapêuticos com laser

A utilização do laser como recurso terapêutico pode acelerar a cicatrização da ferida, e minimizar os prejuízos secundários a sua presença (DEMIR; BALAY; KIRNAP, 2004). A radiação laser apresenta efeitos primários que atuam a nível celular promovendo aumento do metabolismo, podendo aumentar a proliferação, maturação e locomoção de fibroblastos e linfócitos, intensificar a reabsorção de fibrina, aumentar a quantidade de tecido de granulação e diminuir a liberação de mediadores inflamatórios, acelerando assim o processo de cicatrização (SILVA; HAIDAR; MUSSKOPF, 1998; BOURGUIGNON-FILHO et al, 2005).

O laser é um instrumento foto estimulante, ou seja, de princípio determinado por produção de energia e, que segundo Lima et al (2004), emite uma radiação eletromagnética não-ionizante que difere das demais fontes luminosas. Para Bagnato (2005), “o princípio básico de funcionamento do laser está baseado nas leis fundamentais da interação da radiação luminosa com a matéria”. O Power laser emite radiações de “alta potência”, sendo assim utilizados em procedimentos industriais e cirúrgicos, por seu potencial destrutivo. O Mid laser emite radiações de “média potência”, apresentando efeito não-destrutivo semelhante ao do Soft laser, com a diferença que o último emite radiações de “baixa potência”.

A partir dessa classificação utilizam-se os lasers dos tipos Mid e Soft para fins terapêuticos, devido a sua característica não destrutiva. Os lasers terapêuticos podem ainda apresentar características diferentes de acordo com seu comprimento de onda (SIQUEIRA; BERTOLINI, 2004), sendo utilizado para acelerar o processo cicatricial, em associação ao tratamento convencional de feridas. Segundo Garcia e Okamoto (2004), o laser estimula as membranas celulares e mitocôndrias, induzindo uma biomodulação celular, sendo indicado, desta forma, em quadros patológicos para acelerar o processo de reparo tecidual, e diminuir quadros edematosos e álgicos, agudos ou crônicos. Bagnato (2005) e Correa; Bertolini (2003) assinalam que o laser, quando absorvido pelos tecidos, causa efeitos primários e secundários. Os efeitos primários são bioquímicos e consistem na liberação de substâncias préformadas (histamina, serotonina, bradicinina) que estimulam a produção de ATP e inibem a produção de prostaglandinas; bioelétrico, que compreende a melhora do funcionamento da Bomba Sódio e Potássio (responsável pela manutenção do potencial de membrana celular) pelo aumento da produção de

ATP; e bioenergético, que é a normalização energética do bioplasma. Os efeitos secundários decorrentes consistem primeiramente na circulação local através do efeito bioquímico de liberação de histamina, e aumento do trofismo celular, devido ao efeito bioelétrico de aumento da produção de ATP, velocidade mitótica e de reparo tecidual. O laser apresenta, a partir destes efeitos, atividade terapêutica como analgésico, antiinflamatório, antiedematoso e cicatrizante (BERTOLINI, 2003; MELO et al, 2011).

3.6 Colágeno

O colágeno representa cerca de 30% da proteína existente no organismo de vertebrados e está presente em tecidos que possuem função mecânica. A matriz extracelular constitui a maior classe de proteínas fibrosas insolúveis nos tecidos conjuntivos. Os componentes da matriz extracelular estão organizados em um complexo esquema hierárquico, sendo composta por componentes fibrilares (colágenos fibrilares e fibras elásticas), não fibrilares (proteoglicanas e glicoproteínas não colagênicas) e as microfibrilas (colágeno tipo IV e microproteínas associadas à elastina) (FORTI et al, 2006; FREITAS et al, 2002; HAGA et al, 2005; NIMNI et al, 1987).

O maior componente da matriz é o colágeno, que existe em uma variedade de 24 tipos com características próprias (CARVALHO, 2001). Cada tecido possui uma organização específica das fibras colágenas, podendo variar de um arranjo relativamente aleatório das fibras no tecido conjuntivo frouxo a um arranjo muito organizado e paralelo nos tecidos conjuntivos regulares densos, sendo esses componentes encontrados também em pele, ligamento e ossos (WHITING, 2001). Segundo Nunes (2010), o colágeno é classificado pela sua organização molecular como tipos I, II e III. O tipo I é o mais abundante na matrix extracelular de tendões, sendo também encontrado na pele, ossos e ligamentos; locais em que forças extremas são transmitidas, predominantemente, em animais de grande porte. O tipo II é encontrado, principalmente, em cartilagens e humor vítreo, e o tipo III é mais abundante no tecido conjuntivo frouxo, na derme, nas paredes dos vasos sanguíneos e trato gastrintestinal. O colágeno ainda é classificado em tipo IV, encontrado na membrana basal (VIEIRA, 2007; ALBUQUERQUE-JUNIOR et al, 2009).

O processo de formação do colágeno se dá no retículo endoplasmático dos ribossomos, por meio de uma sequência-sinal de caráter hidrofóbico que irá, posteriormente, determinar o processo de síntese do colágeno. Durante todo o

processo, vários eventos acontecem, desde a hidroxilação em resíduos de lisina e prolina até as reações de glicosilação sobre os resíduos de hidroxilisina (CARVALHO, 2001). A hidroxilação da prolina é necessária para estabilidade da estrutura helicoidal da molécula. As hidroxilações da lisina, por sua vez, são importantes tanto para glicosilgalactosildroxilisina, como para a formação do derivado aldeído hidroxilisina que, juntamente com a lisina, participam do processo de formação de ligações cruzadas inter e intramoleculares. Essas ligações contribuem para aumentar a capacidade das fibras de colágeno de resistir às forças de tensão. Estas hidroxilações da prolina e da lisina são realizadas por duas enzimas, a prolil-hidroxilase e a lisilhidroxilase. A atividade de ambas depende da presença de oxigênio, α -cetoglutamato e de cofatores, como ácido ascórbico e íon ferroso. Uma dieta deficiente em ácido ascórbico resulta em fragilidade vascular, hemorragias freqüentes e enfraquecimento devido à diminuição da quantidade de ligações cruzadas intra e intermoleculares (CARVALHO, 2001).

A unidade fundamental do colágeno é a molécula de tropocolágeno, constituída em três cadeias polipeptídicas espiraladas de aproximadamente, mil aminoácidos que correspondem a uma tripla hélice. As extremidades geralmente não estão em conformação helicoidal, favorecendo a ocorrência de ligações cruzadas que aumentam a estabilidade das fibras colágenas, mas que em excesso pode tornar o colágeno rígido. A hidroxilação dos resíduos de prolina e de lisina constitui um evento de fundamental importância para a formação do colágeno (WHITING; ZERNICKE, 2001).

4.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akerele, O. (2003) Summary of WHO guidelines for the assessment of herbal medicines. HerbalGram. V 28: p13-20.

Albuquerque Junior, R. L. C. ; Oliveira, V. G. M. ; Ribeiro, M. A. G. ; Barreto, A.L.S. (2009). Morphological analysis of second intention wound healing in rats submitted to 16J/cm 660nm Laser irradiation. Indian Journal of Dental Research, v. 20, p. 279-286.

Aoyagi, S.; Onishi, H.; Machida, Y. (2007) Novel chitosan wound dressing loaded with minocycline for the treatment of severe burn wounds. International Journal of Pharmaceutics, v. 330, n. 1, p. 138-145.

Araújo, C. F. R., Souza, F. Z. A., Greca, F. H., Guerreiro, M. H. C. P. M, Leite, A. L., Mansur, A. E. C., Kantor, D. C., Nassif, A. E. (1998) Efeito do agarol e do

trigliceril sobre a cicatrização da pele. Estudo experimental em ratos. *Acta Cirurgica Brasileira*, v. 13, n. 4, p. 232-237.

Aydt, T. P.; Weller, C. L.; Testin, R. F. (1991) Mechanical and barrier properties of edible corn and wheat protein films. *Transactions of the ASAE*, v. 34, n. 1, p. 207-211.

Balbino C.A, Rossi, L. A., Ficher, A. M. F. T (2005). Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Rev Bras Cienc Farmac*; v.41 n.1 p. 27-51.

Bannerman, B.; Chen, W.C. (2009). *Tradicional medicine and health care coverage*. Genebra: World Health Organization 122pp.

Barna M, Weller, C. L.; (2007). Wound healing effects of a *Symphytum* herb extract cream (*Symphytum x Uplandicum* NYMAN): results of a randomized, controlled double-blind study. *Wien Med Wochenschr*. v.157 n.22 p.569-574.

Blanes, L., Baptista-Silva, J. C. C. (2004) *Tratamento de feridas e cirurgia vascular: guia ilustrado*. São Paulo.228pp.

Brandenburg, A. H.; Weller, C. L.; Testin, R. F (2003). Edible films and coatings from soy protein. *Journal of Food Science*, v. 58, n. 5, p. 1086-1089.

Brasil, Ministério da Saúde (2001). Secretaria de Políticas Públicas de Saúde. Projeto Promoção da Saúde. Declaração de Alma Ata. Conferência Internacional sobre cuidados primários de saúde, 6-12 de setembro de 1978; Alma-Ata; USSR.

Brasil. (2006) Portaria do MS n.º 971, de 3 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/PNPIC.pdf>

Brasileiro-Filho, G.(2000) *Bogliolo Patologia*. 6 ed. Rio de Janeiro. 1229pp.

Calixto JB. (2000) Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guideline for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*.; v 33: p179-189.

Calixto, V.P (2009). Plantas medicinais: remédios populares ou medicamentos fitoterápicos? In: *I Jornada*. *Revista Saúde*: v. 10, n. 33, p. 1-3,.

Camargo, M.T.L.A (2003) . *Medicina popular. Aspectos Metodológicos para pesquisa*. São Paulo: Manual Almed, n 1 v1 .150pp.

Carlucci, V. D. S., Rossi, L. A., Ficher, A. M. F. T., Ferreira, E., Carvalho, E. C. (2007) A experiência da queimadura na perspectiva do paciente. *Revista Escola Enfermagem–USP*, v. 41, n. 1, p. 21-8.

Carneiro, C. G., Sennes, L. U., Saldiva, P. H. N., Tsuji, D. H., Ximenes, J. A. F. (2005) Avaliação da deposição de colágeno após implante de fásia lata de

gordura na prega vocal de coelho: estudo histomorfoplógico. Revista Brasileira de Otorrinolaringologia. v. 72, n. 2, p. 198-802.

Carriconde, C. (1997) *Confrei. Symphytum officinale* L. De Volta às Raízes, v.12, n 63, p1- 6.

Carriococonde C. (2002). Medicinal traditions in Brazil. Honey Bee, Plants medicinal v. 11, n.2 63, p.2-4.

Casso-Lopes, B.P. (2007). Los animales usados en la medicina popular mexicana. Imprenta Universitária, Ciudad de México, México, 126 pp.

Castilho A.R., Murata R.M.; Pardi, V. (2006) Produtos naturais em odontologia. Revista Saúde: v. 2, n. 3, p. 1-8.

Catão, R.M.R. Antunes, R.M.P. Arruda, T.A. Pereira, M.S.V. Higino, J.S. Alves, J.A. Passos, M.G.V.M. Santos, V.L. (2006) Atividade antimicrobiana "in vitro" do extrato etanólico de *Punica granatum* linn. (romã) sobre isolados ambulatoriais de *Staphylococcus aureus*. RBAC v. 1, n. 6, p. 111-114.

Carvalho, H.F.; Recco-Pimentel, S.M. (2001) Atividades das células inflamatórias. São Paulo: Manole. 878pp.

Clark, R.A.F. (1996) Wound repair: overview and general considerations. In: molecular and cellular biology of wound repair. New York: Plenum Press. v.330, n. 1, p. 138-145.

Chien, Y.W. (1987) Advances in transdermal systemic medication. In: CHEIN, Y.W. Transdermal controlled systemic medications. New York: Marcel Dekker, v. 3, n. 4, p. 83-91.

Chidambara, M. Rossi, L. A., Ficher, A. M. F. T . (2004): Study on wound healing activity of *Punica granatum* peel .J. Med.; v. 7, n. 6, p.6-8.

Corsi, E. C. C., Corsil, P. R. (1995) Fatores que prejudicam a cicatrização das feridas: revisão da literatura. Revista Brasileira de Cirurgia, v. 85, n. 2, p. 47-53.

Demling, R. H, Way, L. W. (1993) Queimaduras e outras lesões térmicas. In: Way LW, editor, Cirurgia: diagnóstico e tratamento. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap.7 p170-80.

Dias, R. Desenvolvimento sustentável e Meio Ambiente. São Paulo: Atlas, 2003.

Diegelmann, R. F., Evans, C. M. (2004) Wound healing an overview of acute, fibrotic and delayed healing. Frontiers in Bioscience. v. 9, n. 2, p. 283-89.

Diniz, G (2006) Quase uma nova pele. Rev. Ciência Hoje, Paraná. v. 8, n. 7, p. 1-3.

Dino, R.G.; Serra, M.C.; Macieira, L. (2001) Queimaduras no Brasil. In: Conduas atuais em queimaduras. Revinter. v. 2, n. 9, p. 5-8.

- Elisabetsky E, Souza GC. (2004) Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre: Ed. da Universidade /UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC. p. 107-122.
- Elliot, J. T., Tona, A., Woodward, J. T., Jones, P. L., Plant, A. L.(2003) Thin Films of Collagen Affect Smooth Muscle Cell Morphology. Langmuir, v. 19, n. 5, p. 1506-1514.
- El-Toumy, S. A. Rauwald, H. W. (2003) Two new ellagic acid rhamnosides from *Punica granatum* heartwood. *Planta Med* v. 12, n. 63, p. 1-3, 6-8.
- Fernandes, N. C. (2004) Melhoria do cuidado ao paciente queimado: orientações para a elaboração de um instrumento de avaliação. Dissertação (Mestrado) Escola Nacional de Saúde Pública da Fundação Oswaldo Cruz, São Paulo 273pp.
- Fetrow, C. W. Avila, J. R. (2000) Manual de medicina alternativa para o profissional. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan S. A. Cap. 12, p. 112-138.
- Fischer, M.L. Rossi, L.A., Ficher, A.M.F.T (2006). O caramujo exótico invasor na vegetação nativa em Morretes, PR: diagnóstico da população de *Achatina fulica* Bowdich, 1822 em um fragmento de Floresta Ombrófila Densa aluvial. *Biota Neotropica*, São Paulo, v. 5, n. 3, p. 3-9.
- Forti, F. L., Goissis, G., Plepis, A. M. (2006) Modifications on collagen structures promoted by 1,4-dioxane improve thermal and biological properties of bovine pericardium as a biomaterial. *Jornal Biomaterials Application*, v. 20, n. 3, p. 267-85.
- Freter, V. (2007). The genital ducts of some British stenoglossan prosobranchs. *J. Mar. Biol. Ass.,U.K.*, v. 25, p. 173-211.
- Freitas, A. C., Pinheiro, A. L. B., Oliveira, M. G. Ramalho, L. M. P. (2002) Assessment of the behavior of myofibroblasts on scalpel and CO2 laser wounds: An immunohistochemical study in rats. *Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery*. v. 20, n. 4, p. 221-115.
- Friess, W. (1998) Collagen – biomaterial for drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. v. 45, n.4 p. 113-136.
- Fuchino, G.M. (2004). Introduction a l'ethnomédecine. In: Bannerman, R. H.; Burton, J. & Wen-Chien, C. (Ed.). Médecine traditionnelle et couverture des soins de santé. OMS, Genebra, Suíça, v.6, n. 1, p. 17-24.

Gennadios, A.; Bradenburg, A.H.; Weller, C.L.; Testin, R.F. (1993) Effect of pH on properties of wheat gluten and soy protein isolate films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 41, n. 11, p. 1835-1839.

Gennadios, A.; Mchugh, T.H.; Weller, C.L.; Krochta, J.M. (1994) Edible coatings and films based on proteins. In: *Edible Films and Coatings to Improve Quality*. Lancaster: Technomic Publishing Co. v. 3, n. 2, p. 210-278.

Ghopade, V. M.; Gennadios, A.; Hanna, M. A.; Weller, C. L. (1995) Soy protein isolate/poly (ethylene oxide) films. *Cereal Chemistry*, v. 72, n. 6, p. 559-563.

Girardi, R. C. G. (2005) Comportamento de matrizes de colágeno utilizadas no tratamento de feridas planas induzidas em pele de rato. *Dissertação (Mestrado em Farmácia) Universidade de São Carlos, São Paulo* 196pp.

Gnanasambandam, R., Hettiarachchy, N. S., Coleman, M. (1997) Mechanical and barrier properties of rice bran films. *Journal of Food Science*, v. 6, n. 3, p. 392-398.

Gracious R. R. Selvasubramanian, S. Jayasundar, S. (2001) Immunomodulatory activity of *Punica granatum* in rabbits - a preliminary study. *J. Ethnopharmacol.* v. 12, n. 63, p. 1-3, 6-8.

Guirro, E.; Guirro, R. (2002) Bioquímica dos mecanismos inflamatórios. *Ver. Brasileira de Fisioterapia*. São Paulo: v. n 2. p 92-96.

Haga, H., Irahara, C., Kobayashi, R. (2005) Collective movement of epithelial cells on a collagen gel substrate. *Biophysical Journal*, v. 88, n. 3, p. 2250-6.

Helary, C., Ovtracht, L., Coulomb, B., Godeau, G. (2006) Dense fibrillar collagen matrices: A model to study myofibroblast behaviour during wound healing. *Biomaterials*. v. 27, n. 25, p. 4443-4452.

Hupp, J. R. (1996) *Reparação de feridas. Cirurgia oral e maxilo-facial*. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. Cap. 8 54-62p.

Iguchi, S. M. M.; Aikawa, T.; Matsumoto, J. J. (2001). Atividade antibacteriana do muco mucina de caracóis. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 27, n. 3, p. 571-574.

Kagawa, S.; Aya Matsuo, A. (2009). The time-course analysis of gene expression during wound healing in mouse skin. *Legal Medicine*. v. 11, n. 2, p. 70-75.

Kaos, John. (2003) Bandage could repair damaged tissues. *Rev. Dermage Tissue*. v. 4, n. 2, p. 1-6.

Kausshi G. Satya S. Khandelwal R. K. Naik S.N. (2008) Commonly consumed Indian plant food materials in the management of diabetes mellitus. *Diab Met Syndr Clin Res Rev*. v. 82c, n. 2, p. 345-348.

- Kim S. K. Rajapakse N. (2005) Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review. *Carbohydrate Polymers* v 6, n 2, p 357–368.
- Kubota, Y. Torres, L. A., Picos, A. M. F. T (1985) Purificação e caracterização do fator antibacteriano do muco de escargots. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 82, n 2, p. 345-348.
- Kumar, V., Abbas, A. K., Fausto, N. (2005) *Robins patologia-Bases Patológicas das doenças*. Elsevier. cap. 2, p. 31-47.
- Lee, C. H.; Singla, A.; Lee, Y. (2001) Biomedical application of collagen. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 221, n. 2 p. 21-22.
- Longtin, R. (2003) The pomegranate: nature's power fruit? *Journal of the National Cancer Institute* v. 6, n. 3, p. 288-292.
- Loss, M.; Wedler, V.; Kunzi, W. (2000) Artificial skin, splitthickness autograft and cultured autologous keratinocytes combined to treat a severe burn injury of 93% of TBSA. *Burns*, v. 26, n. 7, p. 644-52.
- Lorenzi, A. T; Martins, M.F. (2008). Análise colorimétrica e espectroscópica do muco de caracóis terrestres *Achatina* sp alimentados com ração diferenciada. *R. Bras. Zootec.* v. 37, n. 3, p. 572-579.
- Maciel, M.A.M.; Pinto, A.C. (2002). Plantas Medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química. Nova*, v. 5, n. 3, p. 429-438.
- Mandelbaum, S.H., Di Santis, É.P. (2003). Cicatrização, conceitos atuais e recursos auxiliares. *Revista de Dermatologia*, v. 7, n. 2, p. 1-8.
- Martins, M. F. (2003) Avaliação macro e microscópica da cicatrização de lesões experimentalmente provocadas em pele de coelhos tratadas com secreção mucoglicoproteica do escargot *Achatina fulica*. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, Pirassununga, v. 3, n. 5, p. 213-218.
- Martins, M.F.; Caetano, F.A.M.; Sírio, O. J. ; Yiomasa, M. M.; Mizusaki, C. I.; Figueredo, L. D.; Pacheco, P. (2003). Avaliação do reparo de lesões de pele de coelhos tratadas com secreção mucoglicoprotéica do escargot *Achatina fulica*. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* , São Paulo, v. 6, n. 1, p. 24-29.
- Matos, F.C.A.; Lorenzi, L. (2002). Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Ed. Instituto Plantarum, Nova Odessa-SP, 544 pp.
- Matos, F.J.A. (2010) Descrição das plantas medicinais. In: __. *Farmácias Vivas*. Fortaleza: Editora UFC. v. 8, n. 2, p. 216-217.

Mayer, D.L.B. Barin, G.B.; Silva, F.A.; Araújo, A.A.S (2011) Membrana do biopolímero da cana-de-açúcar: avaliação experimental na orelha média. *Braz. J. Otorhinolaryngol.* v.. 77, n. 1, p. 44-50.

Mcdougall, S; Dallon, J. (2006). Fibroblast migration and collagen deposition during dermal wound healing: mathematical modeling and clinical implications. *Philos Transact Math Physics Engineering Science.* v. 4, n.3, p.1385-1405.

Meléndez, P.A.; Capriles, V.A. (2006). Antibacterial properties of tropical plants from Puerto Rico. *Phytomedicine* v. 12, n. 63, p. 272-278.

Melo, V.A.; Anjos, D.C.S.; Albuquerque Junior, R.L.C.; Melo, D.B.; Carvalho, F.U.R. (2011). Effect of low level laser on sutured wound healing in rats. *Acta Cirúrgica Brasileira (Impresso)*, v. 20, p. 129-134.

Miquel, M.D; Miguel, O.G. (2004). Desenvolvimento de fitoterápicos. São Paulo: Robeeditorial, *Rev. Cura Segura* v. 330, n. 1, p. 138-145.

Morimoto, N.; Saso, Y. (2005) Viability and function of autologous and allogeneic fibroblasts seeded in dermal substitutes after implantation. *Journal of Surgical Research*, v. 125, n. 1, p. 56-67.

Muzzarelli, R.A.A. (2008) Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone. *Carbohydrate Polymers.* v. 12, n. 63, p. 1-8.

Narine, K.; Wever, D.O. (2006). Growth factor modulation of fibroblast proliferation, differentiation, and invasion: implications for tissue valve engineering. *Tissue Engineering*, v. 12, n. 10, p. 2707-16.

Netto, B.D.M.; Lima, A.A.; Scur, E.M. (2007) Avaliação de mastócitos da mucosa intestinal de ratos submetidos à ingestão de ácidos graxos insaturados. *Revista Brasileira de Nutrição*, v 22, n. 3, p. 230-236.

Nicolosi, J.G.; Moraes, A.M. (2005) Biomateriais destinados à terapia de queimaduras: Estudo entre o custo e o potencial de efetividade de curativos avançados. v 22 p 332-336.

Nimni, M.E.; Cheung, D. (1987) Chemically modified collagen: A natural biomaterial for tissue replacement. *Journal of Biomedical*, v. 21, n. 2, p. 741-771.

Noles, S.E.; Tulour, V. (2010) Evaluation of traditional animal protein in treatment of thermal burn wounds in fuzzy rats. *Journal of Burn Care & Rehabilitation*, v. 5, n. 1, p. 519-522.

Nunes, P.S.; Bezerra, M.S.; Costa, L.P.; Cardoso, J.C.; Albuquerque, R.L.C. Jr; Rodrigues, M.O.; Barin, G.B.; Silva, F.A.; Araújo, A.A.S. (2010) Thermal characterization of usnic acid/collagen-based films. *J Therm Anal Calorim.* v. 2, n.4, p. 98-103.

Nunes, P.S.; Albuquerque Junior, R.L.C.; Cavalcante, D.R.R.; Dantas, M.D.M.; Cardoso, J.C.; Bezerra, M.S.; Souza, J.C.C.; Serafini, M.R.; Quintas-Junior, L.J.; Bonjardim, L.R. (2011) Collagen-Based Films Containing Liposome-Loaded Usnic Acid as Dressing for Dermal Burn Healing. *Journal of Biomedicine and Biotechnology (Print)*, v.1 n.1 p. 1-9.

Olsen, D; Luchetel, D.L. (2001). Secretion of mucus granules and others membrane bond structures: a look beyond exocytosis. *Int. Vet. Cytol.*, v. 18, n. 3, p. 95-141.

Organização Mundial de Saúde (2004). Coop. intersetorial em cuidados primários de saúde.

Otsuka-Fuchino, H.O. (2007). Morphological aspects of achacin-treated bacteria. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 104, n. 1, p. 37-42.

Pader, M. (1993) Reological properties of cosmetics and toiletries. New York: Marcel Dekker, v. 7, n. 8, p. 247-273.

Paiva, C. L. (2006). (Ed.). *Achatina fulica* (Moluscos): praga agrícola e ameaça à saúde pública no Brasil. *Rev. Veterinária de Saúde Pública* v. 7, n. 4, p. 6-9.

Pozzetti, J. E. (2009) Componentes químicos e as influências na análise. In: Cong. Pan. de Ciências, Campo Grande. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 19, n. 4, p. 37-42.

Rang, H.P.; Dale, M.M.; Ritter, J.M.; Flower, R.J (2007). *Farmacologia*. 6. ed. Rio de Janeiro: 344pp.

Reibman J, Novato, L. A., Campos, A. M. F. T (2010). Transforming growth factor beta 1, a potent chemoattractant for human neutrophils, bypasses classic signal-transduction pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*; v. 5, n.3, p. 88- 95.

Ribeiro, M. A. G.; Albuquerque Junior, R. L. C. ; Bojardim, L. R. ; Ramalho, L. M. P. ; Pinheiro, A. L. B.(2009) . Immunohistochemical Assessment of Myofibroblasts and Lymphoid Cells During Wound Healing in Rats Subjected to Laser Photobiomodulation at 660 nm. *Photomedicine and Laser Surgery*, v. 27, p. 49-55.

Robbers JE, Speedie MK, Tyler VE. (2007) *Farmacognosia e farmacobiotecnologia*. São Paulo: Ed. Premier, 302pp.

Rocha, J.A.M.; Oliveira, R.G. (2006). Modulação da proliferação fibroblástica e da resposta inflamatória pela terapia de laser de baixa intensidade no processo de reparo tecidual. *Brazilian Dermatology*. v. 81, n. 2, p. 150-156.

Ruszczak, Z. (2003) Effect of collagen matrices on dermal wound healing. *Advanced Drug Delivery Reviews*. v. 55, p. 1595-1611.

- Sacramento, H.T. (2010). A fitoterapia no serviço público. *Plantas Medicinais*, v. 1, p. 10-11.
- Saito, R.E.D. (2005) The effect of helicidine, a *Helix Pomatia* extract, involves prostaglandin E2 release. *Pharmaceutical Biology*, v. 36, n. 1, p. 13-19.
- Salles, J.S.; Rossi, L.A.; Siccer, A.M. (2008). Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências. *Rev. Plantas Medicinais* v. 11, n 3, p. 70-75.
- Scheffler, M.C. (2008). Sistema de cruzamento e variação genética entre populações e progênies e espinheira santa. Tese (Doutorado)/UFPR. Curitiba, Universidade Federal do Paraná, Brasil. 104 pp.
- Schenkel, O. (2003). Interdisciplinaridade e integração dos saberes sobre ervas. *Rev. Plantas Medicinais* v. 1, n. 1, p. 70-75, Porto Alegre.
- Senh, E.; Hernandez, L.; Franco, M. R (2009) Dynamics of reepithelialisation and penetration rate of a bee propolis formulation using cutaneous wounds healing. *Analytica Chimica Acta*, v. 63, n 5, p. 115-120.
- Siani, A. C. (2003). Desenvolvimento tecnológico de fitoterápicos: plataforma tecnológica. Rio de Janeiro. Scriptorio Comunicação, 97pp.
- Silva, M.I.G.; Souza, F.C.F. (2006) Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 2, n. 4, p. 455-462.
- Simkiss, K.; Wilbur, K. M. (2005). The molluscan epidermis and its secretions. *Symp. Zool. Soc., Lond.*, v. 39, n.3, p. 35-76.
- Sírio, J. O. (2008). Verificação da potencialização do efeito cicatrizante do muco de caracóis do gênero *Achatina* promovida por dieta à base de Confrei (*Symphytum officinale* L.). Dissertação, Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal. Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade de São Paulo (USP). Pirassununga, 87p.
- Souza, G.A. (2001) Linguagem médico-popular em Alagoas. *Revista do CHLA*, v. 5, n. 1, p. 57-62.
- Spadaro, G; Acierno, D.; Dispenza; Caderaro, E. Valenza, A. (1996) Physical and Structural Characterization of Blends Made Polyimide 6 and gamma Irradiated Polyethylene, *Radiat. Phys, Chem.* v. 48 p. 23-32.
- Spin-Neto, R.; Pavone, C.; Freitas, R.M.; Marcantonio, R.A.C.; Marcantonio-Júnio, E. (2008). Biomateriais à base de quitosana com aplicação médica e odontológica: revisão de literatura. *Revista de Odontologia da UNESP.* v. 37, n. 2, p. 155-161.

- Summer, G.J.; Levine, J.D. (2008) Proinflammatory cytokines mediating burn-injury pain. *Pain*, v. 135, n. 1-2, p. 98-107.
- Teles, H.M.S. Tedes, L.A., Santana, A.T (2007). Registro de *Achatina fulica* Bowdich, 1822 (Mollusca, Gastropoda) no Brasil: caramujo hospedeiro intermediário da angiostrongilíase. *Rev. Saúde Pública, São Paulo*, v. 31, n. 3, p. 310-312.
- Tenius, F.P.; Ioshii, S.O. (2007) Efeitos do uso crônico da dexametasona na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. v. 82, n. 2, p. 141-149.
- Thomsom, H. L. (2003). The molluscan epidermis and its secretions. *Symp. Zool. Soc. Lond*, n. 39, p. 35-75.
- Varnier, A. (2002) Analysis of pulmonate mucus by infrared spectroscopy. *Journal Molluscan Studies*, v. 6, n. 6, p. 363-371.
- Veiga, JR V.F.; Pinto, A.C.; Maciel, M.A.M. (2010) Plantas medicinais: cura segura? *Química Nova*, v. 28; n 3; p. 519-528.
- Vidal, A.; Fallarero, A.; Pena, B.R. (2003) Studies on the toxicity of *Punica granatum* L. (Punicaceae) whole fruit extracts. *Journal of Ethnopharmacology* v. 4, n. 3, p. 295–300.
- Vieira, D.C. (2007) Estudos da liberação da rolitetraciclina suportada em gel injetável de colágeno aniônico ransana. *Dissertação (Mestrado)- Universidade de São Paulo, São Paulo*.
- Whiting, W.C.; Zernicke, R.F. (2001) *Biomecânica da Lesão Musculoesquelética*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 189pp.

5.0 RESULTADOS

5.1 MANUSCRITO I

Caracterização físico-química de filmes formulados a partir do muco de *Achatina fulica* alimentados com plantas medicinais

***Wagno Alcântara Santana^{a,b}, Cláudia Moura de Melo^{a,b}, Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque-Júnior^{a,b}, Juliana Cordeiro Cardoso^{a,b}**

^a Science and Technology Institute, Aracaju/SE. Brazil; Post-Graduation program on Health and Environment, University Tiradentes. ^b Post-Graduation program on Pharmaceutical Sciences, Federal University of Sergipe. ^c School of Dentistry, Federal University of Sergipe. Aracaju/SE, Brazil.

*Corresponding autor:

Wagno Alcântara Santana (wagnoalcantara@hotmail.com) - Av. Murilo Dantas, 300, Prédio do ITP, Farolândia, Aracaju/SE - CEP 49032-490 Brasil.

Agradecimentos

Gostariamos de agradecer ao Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq) e a Fundação de Apoio a Pesquisa e Inovação Tecnológica do Estado de Sergipe/Brasil (FAPITEC) pelo financiamento.

RESUMO

O muco cutâneo liberado por moluscos tropicais da espécie *Achatina fulica* pode ser utilizado como material formador de filmes por possuir biopolímeros capazes de se estruturarem na forma de rede polimérica. As substâncias presentes neste muco possuem reconhecidas propriedades fungicida, bactericida e cicatrizante. Com o objetivo de desenvolver e caracterizar filmes de *Achatina fulica* alimentadas com diferentes plantas medicinais foram formados grupos de trinta moluscos e oferecida *ad libitum* uma dieta com *Lactuca sativa* (alface) controle de plantas, *Symphytum officinale* L (confrei) e *Punica granatum* (romã). Para caracterizar o muco foram realizadas análises de determinação de proteína, determinação do pH, composição química e eletroforese em gel de poliacrilamida. Os filmes foram elaborados segundo a técnica *casting* seguida da caracterização por meio das análises de avaliação macroscópica, análise colorimétrica, microscopia eletrônica de varredura, grau de intumescimento e transmissão de vapor de água. Os resultados de caracterização do muco mostrou um índice de 90% de proteínas, com uma faixa de pH dentro da neutralidade, constituído de umidade acima de 98%, cinzas entre 0,42% a 0,78% e lipídeos entre 0,05% a 0,1%. A eletroforese em gel de poliacrilamida demonstrou que a fração protéica do muco apresenta massa molar próximas aos padrões albumina bovina (66 kDa), ovalbumina (45 kDa), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (36 kDa), anidrase carbônica (29 kDa). As análises de caracterização de filmes mostraram que a forma macroscópica do filme apresentou características de manipulação satisfatória ao emprego dos mesmos como curativos. O ensaio de colorimetria revelou diferença estatística ($p < 0,001$) de cor entre os filmes com alimentação diferente. A avaliação estrutura microscópica dos filmes revelou formação de formas diferenciadas na superfície do filme, com poros transversais em toda a sua extensão. Os valores encontrados no ensaio do grau de intumescimento em solução de HCl 0,1N, apresentaram maior índice de intumescimento 347%, quando comparado aos filmes avaliados em água destilada 220% em relação a massa inicial. A permeabilidade dos filmes PGG foi maior ($p < 0,05$) que às encontradas nos demais grupos. Este estudo sugere a alimentação dos moluscos com dieta diferenciada pode gerar mucos com diferentes características de permeabilidade e coloração.

Palavras-chave: *Achatina fulica*, muco, filmes, biopolímeros

INTRODUÇÃO

Diversos estudos têm se concentrado em promover a incorporação de compostos bioativos (fármacos sintéticos ou produtos naturais) em biomateriais implantáveis, a exemplo de filmes, especialmente em virtude das vantagens relacionadas a uma aceleração do processo de granulação e epitelização e a liberação controlada do produto incorporado diretamente no tecido danificado (SRIVASTAVA et al., 1990; HELARY et al., 2006; ALVES et al., 2008, ALBUQUERQUE JUNIOR et al, 2009). Estes biomateriais estão sendo utilizados no processo de reparo tecidual, os quais podem ser processados em inúmeras formas, tais como folhas, esponjas, dispersões, géis, filmes, soluções injetáveis, sendo cada tipo adequado de acordo com suas propriedades e características (AOYAGI et al. 2007).

Os filmes constituídos por biopolímeros têm sido muito utilizados no processo de cicatrização por apresentarem capacidade de interagir com as células do tecido lesado, e não somente encobrir a ferida como a maioria das faixas (KAOS, 2003). Os filmes bioativos que são absorvidos e degradados possuem a habilidade de servir de suporte para o crescimento de novos vasos sanguíneos, e possibilitam a nutrição das células que preenchem o tecido afetado e o acesso das células de defesa ao local, ou seja, permitem adesão, migração e proliferação celular (GIRARDI, 2005).

Apesar das proteínas de origem vegetal ser mais amplamente estudadas (AYDT, 1991; GENNADIOS, 1993; GENNADIOS, 1994; GHORPADE, 1995; GNANASAMBANDAM, 1997; BRANDENBURG, 2003), provavelmente devido à sua abundância e baixo custo nos países desenvolvidos, as proteínas animais demonstram excelente capacidade formadora de filme bioativos (NOLES et al, 2010).

A substância mucoglicoproteica liberada pelo molusco tropicais da espécie *Achatina fulica* possui alto teor de proteínas (SÍRIO et al, 2008), que são capazes de formar uma rede polimérica na forma de filme. Atualmente, com o campo da biotecnologia, o uso da malacofauna na produção de filmes tem sido amplamente difundido com o objetivo de aumentar a possibilidade de arsenal terapêutico com produtos de origem natural (AOYAGI et al, 2007). O potencial de cicatrização encontrado no muco (LORENZI; MARTINS, 2008) e a capacidade de incorporar as propriedades de plantas com ações terapêuticas através da incorporação das mesmas na alimentação do molusco, possibilita a produção de novas formas farmacêuticas dentre elas o filme. De acordo com

Diniz (2006), tais produtos apresentam atividade cicatrizante devido ao material mucoglicoproteico enriquecido com compostos químicos adquiridos das ervas introduzidas na dieta do molusco.

O objetivo deste estudo foi desenvolver e caracterizar físico-quimicamente filmes obtidos a partir do muco de *Achatina fulica* alimentadas com diferentes ervas medicinais.

MATERIAL E MÉTODOS

Material biológico

Os moluscos *A. fulica* foram coletados na área urbana de Sergipe/Brasil, de acordo com o método descrito por Fischer e Colley (2005), após aprovação pelo Comitê de Ética (Protocolo 101107). Os moluscos foram submetidos à massagem da glândula podal, a fim de estimular a liberação de secreção mucoglicoproteica pelo espécime. As fezes e muco dos caramujos foram submetidos à avaliação parasitológica (HOFFMAN; JONES; PONS 1934) para garantir a ausência de infecções parasitárias. Os animais foram divididos em três grupos: LSG - Controle, trinta animais alimentados com uma dieta com *Lactuca sativa* (alface), SOG - trinta animais alimentados com uma dieta com *Symphytum officinale* L (confrei) e PGG - trinta animais alimentados com uma dieta com *Punica granatum* (romã). Os animais foram alimentados *ad libitum* e mantidos em laboratório em condições controladas de temperatura e umidade.

Caracterização do muco

Determinação de proteína

A determinação de proteína das três amostras (LSG, SOG e PGG) foi realizada pelo método de Lowry (ZAIA, 2008) utilizando albumina como padrão. O experimento foi realizado na ausência de luz e os dados obtidos pela determinação da absorbância no comprimento de onda de 750 nm usando um espectrofotômetro (Sigma DUR 708 k415, RJ, Brasil).

Determinação do pH

Para determinar o pH do muco em pHmetro (Voltex 5000, modelo W3B, SP, Brasil), foi utilizado o muco diluído em água destilada (1:1). O experimento foi realizado em triplicata com 20 mL da solução para cada leitura.

Composição química

As análises da composição química do muco de *Achatina fulica* (umidade, cinzas e lipídeos) foram realizadas segundo as metodologias descritas pela Association of Official Chemists (AOAC, 1995).

Eletroforese em gel de poliacrilamida

A massa molecular das proteínas foi analisada por um gel de 12,5% e 4% dodecil-sulfato poliacrilamida (SDS-PAGE) como descrito por (Laemmli, 1970). As massas moleculares dos marcadores de proteína no método foram: albumina bovina: 66 kDa; ovalbumina: 45 kDa; Desidrogenase gliceraldeído-3-fosfato: 36 kDa; anidrase carbônica: 29 kDa; tripsinogênio: 24; inibidor de tripsina: 20,1; α -lactoalbumina: 14.2. As proteínas foram visualizadas por coloração com o procedimento de Nitrato de Prata.

Desenvolvimento de Filmes

Os filmes foram preparados por método *casting* com 20 mL de muco e 20% de plastificante (polietilenoglicol 400 - PEG 400 Lot Isotar. 021.423, Farmac, Aracaju, SE, Brasil) em relação à massa seca do muco. Esta dispersão foi vertida em uma placa de acrílico e mantida em capela de exaustão até secagem completa do material.

Caracterização do Filme

Avaliação macroscópica

Essa análise foi realizada por meio de avaliação subjetiva de um avaliador, atribuindo escores classificados como pobres (+), bons (++) e excelentes (+++). As formulações foram submetidas à análise macroscópica utilizando-se critérios preliminares para avaliar o filme de biopolímero quanto: a continuidade (sem quebras e fraturas após secagem), homogeneidade (ausência de partículas insolúveis ou visível a olho nu, ou áreas de opacidade ou cores diferentes), capacidade de gerenciamento (capacidade de ser manuseada sem riscos de ruptura) e a capacidade de formar um filme contínuo (MONTERREY; SOBRAL, 1999).

Análise Colorimétrica

A cor dos filmes foi determinada com um colorímetro Minolta (CR 400; Minolta, Japão). Os valores de L^* , a^* , b^* e ΔE de cada filme foram avaliados por meio de mensurações de refletância. Para a calibração do instrumento foi utilizado uma folha de papel branca A4 tipo CHAMEX, como pano de fundo para as leituras de cor dos filmes (GARCIA e SOBRAL, 2005). As leituras foram obtidas em intervalo de dois minutos, coletando dados no colorímetro digital. As análises foram realizadas no Laboratório de Engenharia de Alimentos de origem vegetal, na Universidade Federal de Sergipe. Os dados foram coletados em triplicata.

Microscopia eletrônica de varredura

A avaliação da microestrutura dos filmes foi realizada utilizando-se um microscópio eletrônico de varredura (modelo IXA - JEOL JSM-6360-LV), da Universidade de Campinas–UNICAMP. Os filmes foram montados em tubos de alumínio, revestido com uma fina camada de ouro e visualizados, com uma tensão de aceleração de 20 kV.

Grau de intumescimento

A razão de intumescimento dos filmes foi determinada utilizando amostras de filmes com o tamanho de 2x3 cm em triplicata. As amostras foram pesadas antes e após o intumescimento, em recipientes contendo 100 mL de HCl 0,1 N ou água destilada. Em períodos pré-determinados, a massa dos filmes foi obtida utilizando balança analítica (Shimadzu AY220, SP, Brasil - precisão 0,0001 g). Antes de cada pesagem o excesso de solução foi removido com papel absorvente e à manipulação dos filmes nesta análise foi realizada com o auxílio de uma pinça. O cálculo do grau de hidratação foi realizado utilizando a seguinte equação 1:

$$\% I = 100 \times M_a / M_s \quad (1)$$

Na qual %I é o grau de intumescimento expresso em percentagem; M_a é a massa de água absorvida; M_s é a massa da película seca.

Transmissão de vapor de água

A permeabilidade dos filmes foi determinada utilizando um método gravimétrico. O filme foi utilizado para selar um recipiente contendo solução saturada de ZnSO₄, o qual gera um ambiente com umidade relativa de 90%. Este sistema foi pesado e colocado em um dessecador contendo sílica. A perda de massa referente a permeação do vapor d'água através do filme foi determinado por pesagens sucessivas em tempos pré-determinados. Cada experimento foi realizado com oito repetições, durante 48 h. A permeabilidade foi calculada utilizando a equação 2:

$$WVP = (w. e) / (t. A. \Delta PV) \quad (2)$$

Na qual *WVP* é a permeabilidade de vapor de água, *w* é a massa perdida, *e* é espessura do filme, *t* é o tempo, *A* é a área do filme e ΔPV é a diferença entre a pressão de vapor de água dentro e fora do recipiente.

Análises estatísticas

Os dados foram reportados como média e desvio padrão para as medidas em triplicata. Os resultados foram testados para a significância estatística pelo ANOVA seguido de Tukey.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização do muco

Determinação de proteína

Os resultados da dosagem de proteína nas amostras do muco de *Achatina fulica* revelaram que a alimentação não influenciou na concentração de proteínas. Observou-se uma diferença entre o teor proteico do muco das espécies de Aracaju-SE (90%), como mostrado na tabela 1, em comparação com os resultados de amostras obtidas por SIRIO (2008) de Pirassununga-SP, onde a porcentagem de proteína encontrada foi 78,76% no muco do caramujo.

Tabela 1. Concentração de proteína do muco de *A. fulica* alimentados com diferentes plantas medicinais

Grupos	Concentração de Proteína (mg/mL)	Concentração de Proteína (%)
LSG	0,380±0,078 ^a	90,82±2,01 ^a
SOG	0,370±0,072 ^a	90,60±1,97 ^a
PGG	0,374±0,068 ^a	90,76±1,78 ^a

Letras iguais na mesma coluna representam valores estatisticamente semelhantes (p>0,05).

Essa diferença nos resultados pode estar relacionada na diferenciação das próprias espécies, bem como estar diretamente ligados aos fatores ambientais onde os espécimes foram coletados (KUBOTA, 1985). Os outros componentes encontrados nas amostras foram apresentados na tabela 2.

Tabela 2 - Composição química do muco produzido pelo caramujo *A. fulica* alimentados com plantas medicinais

Grupos	Umidade (%)	Cinzas (%)	Lipídeos (%)
LSG	99,03	0,42	0,11
SOG	98,82	0,78	0,05
PGG	98,72	0,51	0,19

As amostras de muco revelaram o teor de umidade elevada. Este elevado teor de umidade está diretamente ligado ao número de glândulas exócrinas multicelulares que segregam os seus produtos através dos ductos estruturais na superfície do corpo ou nas cavidades do molusco. Ademais, a mucina, uma glicoproteína presente no muco, complexa a água formando um líquido viscoso, o muco, que protege e lubrifica as superfícies da estrutura do espécime, servindo de barreira contra microrganismos e desidratação (MITRA et al.,1987).

Determinação de pH do muco de Achatina fulica

Os valores de pH das amostras apresentaram-se dentro da faixa de neutralidade (tabela 3). O pH neutro do muco de *A. fulica*, mesmo para os grupos alimentados com plantas medicinais, sugere que os constituintes químicos presentes nas ervas não foram capazes de alterar o potencial hidrogeniônico do muco.

Tabela 3. Determinação de pH do muco de *A. fulica*

Grupos	pH
LSG	7,92
SOG	7,12
PGG	6,87

A faixa de pH entre 4,0 e 7,0 é considerado ideal para formulações farmacêuticas, visto que, a estabilidade química da amostra é obtida nesta faixa de pH. Além disso, a compatibilidade do pH de formulação tópica com o pH tecidual evita o ressecamento da pele, tornando-a menos suscetível a agressões externas. O pH funcional da pele é um importante regulador da produção de ácido láctico, que confere a superfície cutânea uma proteção denominada “manto ácido cutâneo” (LEONARDI et al. 2002).

Eletroforese em gel de poliacrilamida

Os resultados SDS-PAGE (figura 1) mostrou bandas de proteína do muco de *A. fulica* com peso molecular próximos aos padrões (albumina bovina: 66 kDa; ovalbumina: 45 kDa; gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase: 36 kDa; anidrase carbônica: 29 kDa; tripsinogênio).

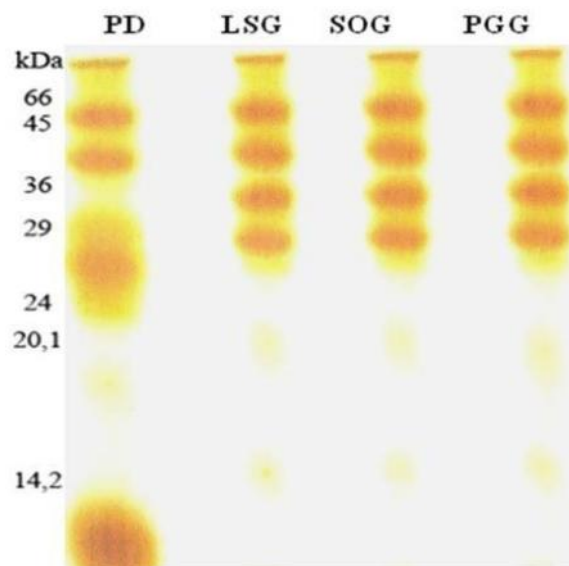


Figura 1: Eletroforese em gel de poliacrilamida muco de *A. fulica* alimentadas com *Lactuca sativa* (LSG) *Symphytum officinale* L. (SOG) e *Punica granatum* (PGG) com alimentação diferenciada. PD, refere-se ao padrão da amostra.

Os grupos LSG, SOG e PGG apresentaram bandas protéicas semelhantes, mostrando que os constituintes químicos presentes na alimentação oferecida aos moluscos não foram capazes de alterar a massa

molecular das proteínas presentes no muco. Este resultado já era esperado, uma vez que moléculas presentes nas plantas medicinais apresentam baixa massa molecular, sendo incapazes de interferir nos resultados de SDS-PAGE.

Caracterização do Filme

Avaliação macroscópica dos filmes

A formulação descrita na metodologia permitiu a formação dos filmes, que estão expostos na Figura 2. Filmes baseados em muco de *Achatina fulica* alimentados com *Lactuca sativa* (LSG) apresentaram coloração transparente e sem pigmentação, enquanto os filmes dos grupos alimentados *Symphytum officinale* L. (SOG) e *Punica granatum* (PGG) apresentaram-se amareladas, porém ainda transparentes. A análise macroscópica dos filmes permite a avaliação da qualidade dos filmes desenvolvidos, uma vez que a aparência dos filmes pode interferir na aceitabilidade do produto (MATTA JR, 2009).

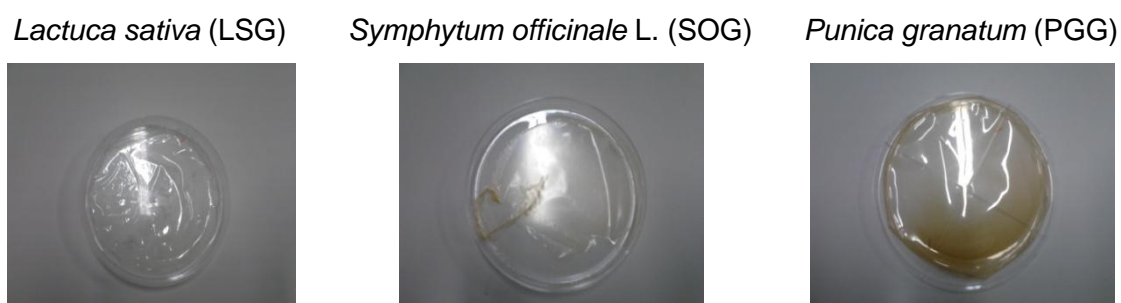


Figura 2. Filmes de polímeros produzidos a partir do muco de *A. fulica* alimentados com diferentes plantas medicinais

Os filmes foram avaliados como homogêneos, contínuos, de fácil manipulação, formação de película contínua, como mostra a Tabela 4.

Tabela 4. Avaliação macroscópica dos filmes obtidos a partir do muco de *Achatina fulica* submetidas a diferentes dietas

Formulações	Homogeneidade	Continuidade	Manuseabilidade	Formação contínua
LSG	+	+	++	+++
SOG	++	++	++	+++
PGG	++	++	++	+++

pobres (+) - bons (++) - excelentes (+++)

Colorimetria

A transparência de um filme pode ser um aspecto positivo, devido a visualização do material recoberto pelo filme. Na área de alimentos esta é uma propriedade desejável, devido a importância do aspecto do produto revestido com o filme para o consumidor (CUQ et al. 1996; RHIM et al. 2006). Todos os filmes apresentaram luminosidade e transparência tendendo ao amarelo, com características de transparência. Essa transparência (baixa opacidade) é importante em situações onde o filme é aplicado na forma de curativos, uma vez que possibilita a área tratada ser visualizada em suas alterações teciduais, além permitir maior aceitação comercial em virtude de combinar uma boa qualidade visual e alto nível de adesão (MATTA JR et al. 2011). Os resultados dos parâmetros de cromaticidade são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Leitura colorimétrica do filmes de *A. fulica* com diferentes alimentações

Grupos	L*	a*	b*	ΔE
LSG	73,2±0,2 ^a	6,0±0,2 ^a	16,8±0,1 ^a	2,8±0,1 ^a
SOG	73,1±0,3 ^a	5,6±0,1 ^a	17,4±1,1 ^a	3,1±0,2 ^a
PGG	66,3±0,7 ^b	8,7±0,2 ^b	31,2±0,9 ^b	18,7±0,4 ^b

Diferentes letras na mesma coluna correspondem à estatística diferente

Os filmes apresentaram-se transparentes, com uma coloração partindo de ligeiramente amarelada a amarelada. Com relação à luminosidade (L*) dos filmes de *Achatina fulica* alimentadas com plantas medicinais, é possível observar que estes valores estão dentro do padrão de luminosidade para filmes produzidos a partir de produtos naturais, quando comparados com filmes de quitosana obtidos por Rhim et al. (2006), para o qual a faixa de valores encontrados esteve entre 66,8 e 85,8. Por outro lado, a análise para o valor de (L*) encontrado para o grupo PGG ($p < 0,001$) indica uma diminuição da luminosidade e um aumento da opacidade do filme. Os parâmetros de (a*) e (b*) descrevem a cor de filmes partindo do branco tomado como padrão para calibração, sendo estas coordenadas cromáticas que influenciam a diferença de cor total (Park et al., 2002). Os valores obtidos na leitura de (a*) e (b*) para os grupos SLG, SOG, revelam resultados estatisticamente diferentes quando

comparados ao grupo PGG ($p= 0,001$), reafirmando a intensificação da cor amarela do filme de *Achatina fulica* alimentada com *Punica granatum* em relação as demais alimentações. Os valores encontrados para ΔE que calcula a diferença total de cores, variou entre 2,8 e 18,7. A diferença observada na coloração dos filmes sugere que alimentação oferecida aos moluscos interfere na coloração tanto do muco quanto do respectivo filme.

Microscopia eletrônica de varredura

As imagens de microfotografias da superfície e fratura(*) dos filmes mostradas na figura 3, exibem estruturas que auxiliam na compreensão do comportamento dos filmes frente à permeabilidade ao vapor de água.

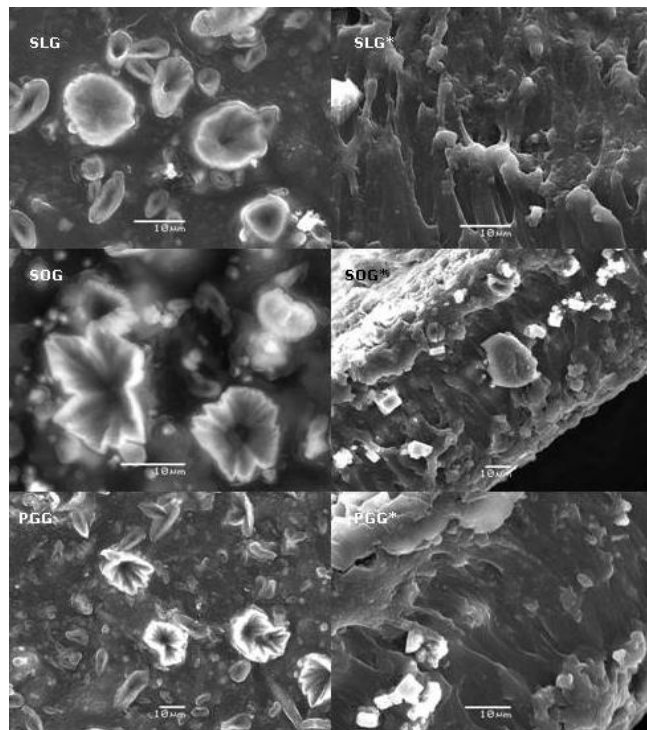


Figura 3. Fotomicrografia dos filmes de *A. fulica* alimentados com *Lactuca sativa* (LSG) *Symphytum officinale* L. (SOG) e *Punica granatum* (PGG)

A superfície dos filmes observada nas fotomicrografias apresenta-se como um arranjo desordenado de fragmentos. Em todos os grupos, as fotomicrografias revelaram uma massa extensa e amorfa, com a presença de relevos ou depressões semelhantes a formas florais. Estes relevos podem decorrer da estrutura tridimensional proteica no pH da dispersão filmógena (muco). Os formatos das estruturas encontradas na superfície deste filme diferem daquelas citadas na literatura, ou seja, arredondados, ovalados e formas irregulares (HEDLEY et al. 2002; THEMEIER et al. 2005).

O aspecto da seção transversal dos filmes foi semelhante para todos os grupos (fratura^(*)), apresentando canais irregulares em toda a extensão do filme, que certamente propiciou a permeabilidade ao vapor d'água (COLOMBO et al., 2000)

Grau de intumescimento

Alguns dos parâmetros investigados na produção de filmes incluem a taxa de penetração da água no sistema (Wan et al., 1991), a velocidade de hidratação e a extensão do intumescimento do polímero (Wan et al., 1995). À medida que aumentam as interações água – polímero, as forças de interação entre as cadeias poliméricas diminuem. A água que penetra no sistema preenche os espaços entre as cadeias poliméricas e difunde-se para as regiões mais densas da rede polimérica, intumescendo o sistema por meio de ligações de hidrogênio (molécula de água e regiões polares do polímero). Conseqüentemente, as cadeias apresentam maior mobilidade rotacional e ocupam mais espaço, permanecendo em um novo estado solvatado (COLOMBO et al., 2000). Numa observação macroscópica do processo de intumescimento progredindo do centro para a matriz, a velocidade de penetração da água no sistema matricial condiciona o modo de liberação do fármaco. O comportamento de intumescimento das matrizes hidrofílicas, resultante de um processo de relaxamento das cadeias poliméricas quando em contato com o meio aquoso, é mecanicamente descrito pela formação de “frentes” (BETTINI et al., 1994, 1997, 1998; COLOMBO et al., 1995,1996).

Os filmes da LSG, SOG e PGG submersos em meio contendo 0,1 N HCl e água destilada, apresentaram comportamentos diferentes conforme apresentados na figura 4.

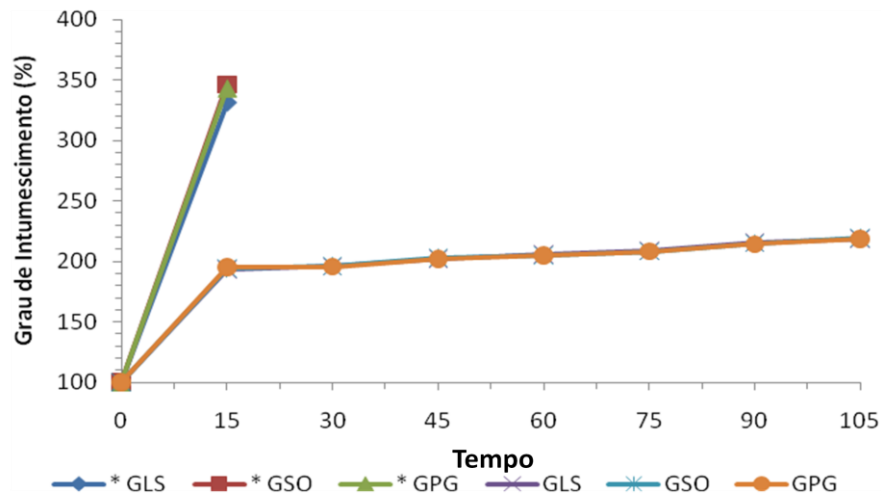


Figura 4. Índice de intumescimento dos filmes de *A. fulica* alimentados com *Lactuca sativa* (LSG) *Symphytum officinale* L. (SOG) e *Punica granatum* (PGG)

Os filmes submetidos a uma solução de HCl 0,1N, apresentaram maior índice de intumescimento (347% em relação a massa inicial), quando comparado aos filmes avaliados em água destilada, que apresentaram (220% em relação a massa inicial), formando um platô, e, somente após 105 minutos, apresentou características sugestivas de dissolução do filme.

Os filmes de LSG, SOG e PGG dissolveram em meio contendo 0,1 N HCL após 15 minutos. Esse comportamento justifica-se pelo meio ao qual o filme foi submetido. Frente ao meio ácido, a estrutura das proteínas presentes no muco, passam por desestruturação passando a expor suas pontes de ligações que exercem afinidade pela molécula da água, resultando em um intumescimento imediato.

Em ambiente com pH tendendo a neutralidade (água destilada), os filmes dos respectivos grupos permaneceram intactos durante todo o tempo experimental (105 minutos). Esse resultado reflete um comportamento esperado, uma vez que as proteínas do muco frente a pH tendendo a neutralidade, apresentam um retardo no processo de intumescimento.

Transmissão de vapor de água

A permeabilidade dos filmes do muco *A. fulica* apresentaram permeabilidade entre 7.0 e 9.2 (tabela 6).

Tabela 6. Determinação da Transmissão de vapor d'água (WVTP) dos filmes de *A. fulica*

Grupos	WVTP (g.mm/m ² .h.Kpa)
LSG	7,93±0,95 ^a
SOG	7,04±0,50 ^a
PGG	9,21±0,61 ^b
CTR NEG	65,55±19,56 ^c
CTR POS	0,35±0,04 ^d

Não houve diferença do valor de permeabilidade entre os filmes LSG e SOG ($p>0,05$). A permeabilidade observada nos grupos controles corresponde ao esperado. Dentre os grupos de filmes, o PGG foi mais permeável do que os filmes SOG e LSG ($p<0,05$). Essa diferença pode estar relacionada com a alteração na composição química gerada pela dieta dos moluscos, uma vez que foi identificada alteração na coloração do filme obtido no grupo PGG, apontando para uma possível presença de substâncias diferenciadas. Tais substâncias podem ter polaridade maior das encontradas no muco obtido de moluscos alimentados pelas demais dietas.

CONCLUSÃO

Os resultados sugerem que algumas propriedades físico-químicas dos filmes de *Achatina fulica* alimentadas com plantas medicinais mostram semelhança nos resultados para os grupos SLG e SOG cuja alimentação foram *Lactuca sativa* e *Symphytum officinale* respectivamente. Os resultados encontrados para o grupo PGG alimentado com *Punica granatum*, mostraram resultados de coloração e permeabilidade diferentes dos grupos anteriormente citados. Este estudo demonstrou que a alimentação dos moluscos pode alterar características do muco produzido pelos mesmos. A presença de constituintes químicos da romã pode estar presente no muco, porém estudos posteriores devem evidenciar esta hipótese.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, D. F. S., CABRAL, F. C. J., CABRALL, P. P. A. C., OLIVEIRA, R. M. J., REGO, A. C. M., MEDEIROS, A. C. Effects of topical application of the honey of melipona subnitida in infected wounds of rats. Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões. v. 35, n. 3, p. 188-193, 2008.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. 1995. Official Methods of Analysis. 16.ed. AOAC, Washington, DC.

AOAGI, S.; ONISHI, H.; MACHIDA, Y. (2007) Novel chitosan wound dressing loaded with minocycline for the treatment of severe burn wounds. International Journal of Pharmaceutics, v. 330, n. 1, p. 138-145.

AYDT, T. P.; WELLER, C. L.; TESTIN, R. F.(1991) Mechanical and barrier properties of edible corn and wheat protein films. Transactions of the ASAE, v. 34, n. 1, p. 207-211.

BETTINI, R., COLOMBO, P., MASSIMO, G., SANTI, P., CATELLANI, P.L., PEPPAS, N.A. (1994) Moving fronts and drug release from hydrophilic matrices. INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CONTROLLED RELEASE OF BIOACTIVE MATERIALS. 21., Nice, France, 1994. Proceedings. Deerfield:Controlled Release Society, v. 21, p. 19-20.

BETTINI, R., COLOMBO, P., PEPPAS, N.A. (1997) Drug concentration profiles during release from hydrophilic matrices. INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CONTROLLED RELEASE OF BIOACTIVE MATERIALS. 24., Stockholm, Sweden. Proceedings. Deerfield: Controlled Release Society, 1997. v. 24, p. 635-636.

BETTINI, R., PEPPAS, N.A., COLOMBO, P.(1998) Polymer relaxation in swellable matrices contributes to drug release". INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CONTROLLED RELEASE OF BIOACTIVE MATERIALS. 25., Las Vegas, Nevada, USA, 1998. Proceedings. Deerfield: Controlled Release Society, 1998. v. 25, p. 36-37.

BRANDENBURG, A. H.; WELLER, C. L.; TESTIN, R. F. (1993) Edible films and coatings from soy protein. Journal of Food Science, v. 58, n. 5, p. 1086-1089.

COLOMBO, P.; BETTINI, R.; MASSIMO, G.; CATELLANI, P.L.; SANTI, P.; PEPPAS, N.A.(1995) Drug diffusion front movement is important in drug release control from swellable matrix tablets. J. Pharm. Sci., New York, v. 84, n. 8, p. 991-997.

COLOMBO, P.; BETTINI, R.; SANTI, P.; DE ASCENTIS,A.; PEPPAS, N.A. (1996) Analysis of the swelling and release mechanisms from drug delivery

systems with emphasis on drug solubility and water transport. *J. Control. Release*, Amsterdam, v. 39, n. 2-3, p. 231-237.

COLOMBO, P.; BETTINI, R.; SANTI, P.(2000) Swellable matrices for controlled drug delivery: gel-layer behaviour, mechanisms and optimal performance. *PSTT*, New York, v. 3, n. 6, p. 198-204.

CUQ, B., GONTARD, N., CUQ, J. L.,GUILBER, S. (1996). Functional properties of myofibrillar protein based biopackaging as affected by film thickness. *Journal of Food Science*, v 61 n 3 p 580–584.

DINIZ, G.(2006) Quase uma nova pele. *Rev. Ciência Hoje*, Paraná. jan, p. 36-39.

GARCIA, F. T., SOBRAL, P. J. A. (2005). Effect of the thermal treatment of the filmogenic solution on the mechanical properties, color and opacity of films based on muscle proteins of two varieties of Tilapia. *LWT - Food Science and Technology*, 38, 289–296.

GIRARDI, R. C. G. (2005) Comportamento de matrizes de colágeno utilizadas no tratamento de feridas planas induzidas em pele de rato. *Dissertação (Mestrado em Farmácia) Universidade de São Carlos, São Paulo 196pp.*

GNANASAMBANDAM, R., HETTIARACHCHY, N. S., COLEMAN, M. (1997) Mechanical and barrier properties of rice bran films. *Journal of Food Science*, v. 6, n. 3, p. 392-398.

GENNADIOS, A.; BRANDENBURG, A. H.; WELLER, C. L.; TESTIN, R. F.(1993) Effect of pH on properties of wheat gluten and soy protein isolate films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 41, n. 11, p. 1835-1839.

GENNADIOS, A.; McHUGH, T. H.; WELLER, C. L.; KROCHTA, J. M.(1995) Edible coatings and films based on proteins *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 47, n. 16, p. 15-19.

GHORPADE, V. M.; GENNADIOS, A.; HANNA, M. A.; WELLER, C. L.(1995) Soy protein isolate/poly (ethylene oxide) films. *Cereal Chemistry*, v. 72, n. 6, p. 559-563.

HARIHARAM, D.;PEPPAS, N.A.; BETTINI, R.;COLOMBO, P.(1994) Mathematical analysis of drug delivery from swellable systems with parcial physical restrictions or impermeable oatings. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.112 n. 1 p. 47-54.

HEDLEY, C. L.; BOGRACHEVA, Y. T.WANG, T. L. (2002)- Correlation of characteristics of gel extrusion module (GEM) tablet formulation rate. *J. Control. Release*, Amsterd., v 5 n 4 p.235-245

HELARY, C., OVTRACHT, L., COULOMB, B., GODEAU, G., GIRAUD-GUILLE, M.M. Dense fibrillar collagen matrices: A model to study myofibroblast behaviour during wound healing. *Biomaterials*. v. 27, n. 25, p. 4443-4452, 2006.

KAOS, JOHN. (2003) Bandage could repair damaged tissues. *Rev. Dermage Tissue* . v. 10, p. 10-15.

KUBOTA, Y. et al. (1985). Purificação e caracterização do fator antibacteriano do muco de escargots. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 82, n 2, p. 345-348.

LAMMLI UK.(1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* v 4 n2 p 680-685.

LORENZI, A. T.; MARTINS, M. F.(2008). Análise colorimétrica e espectroscópica do muco de caracóis terrestres *Achatina* sp alimentados com ração diferenciada. *Revista Brasileira de Zootecnia*, São Paulo, v. 37, n. 3, p.572-579.

MATTA JUNIOR, M. D.(2009) Caracterização de biofilmes obtidos a partir de amido de ervilha (*pisum sativum*) associado à goma xantana e glicerol., Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, Brasil 102pp.

MATTA, JR. D.I. SARMENTOL, S.B. S.; CLAIRE I. G. L.; SILVIO S. (2011) Propriedades de barreira e solubilidade de filmes de amido de ervilha associado com goma xantana e glicerol. *Polímeros*, v. 21 n 1, p. 67-72.

MITRA, D. SARKAR, M. (1987) Further characterization of the cold agglutinin from the snail *Achatina fulica* *Biochem.* v24 n2, p 331-338

NOLES, S.E.; TULOOR, V.; (2010) Evaluation of traditional animal protein in treatment of thermal burn wounds in fuzzy rats. *Journal of Burn Care & Rehabilitation*, v. 5, n. 1, p. 519-522.

PARK, S. Y., MARSH, K. S., RHIM, J. W. (2002). Characteristics of different molecular weight chitosan films affected by the type of organic solvents. *Journal of Food Science*,v 67 n 1p 194–197.

RHIM, J., HONG, S., PARK, H., PERRY, K.W. (2006). Preparation and characterization of chitosan-based nanocomposite films with antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v 5 n 4 p 5814–5822.

SÍRIO, J. O. (2008). Verificação da potencialização do efeito cicatrizante do muco de caracóis do gênero *Achatina* promovida por dieta à base de Confrei (*Symphytum officinale* L.). Dissertação, Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal. Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade de São Paulo (USP). Pirassununga, 87pp.

SRIVASTAVA, S., GORHAM, S. D., FRENCH, D. A., SHIVAS, A. A., COURTNEY, J. M. In vivo evaluation and comparison of collagen, acetylated

collagen and collagen/glycosaminoglycan composite films and sponges as candidate biomaterials. *Biomaterials*. v. 11, p. 155-161, 1990.

THEMEIER, H.; HOLLMANN, J; NEESE, U. LINDAHAUER, M. G. (2005). Carbohydrate films *Polym.*, v6 n1 p.72-79.

WAN, L.S.C.; HENG, P.W.S.; WONG, L.F. (1991) The effect of hydroxypropyl methylcellulose on water penetration into a matrix system. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v. 73, n. 2, p. 111-116.

WAN, L.S.C.; HENG, P.W.S.; WONG, L.F. (1995) Matrix swelling: a simple model describing extent of swelling of HPMC matrices. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v. 116, n. 2, p. 159-168.

ZAIA, I. M. D (2008) Spectrophotometric determination of total protein is used in several areas such as clinical analysis, food science and technology, biochemistry, protein chemistry, physiology. *QUÍMICA NOVA*, v 21 n 6 p 91-98)

5.2 MANUSCRITO II

Assessment of antimicrobial activity and healing potential of mucous secretion
of *Achatina fulica*

Evaluación de la actividad antimicrobiana y la curación potencial de la secreción
mucosa de *Achatina fulica*

Wagno Alcântara Santana^{a,b}, Cláudia Moura de Melo^{a,b}, Juliana Cordeiro
Cardoso^{a,b}, Rose Nely Pereira-Filho^{a,b}, Alessandra Silva Rabelo^a, Francisco
Prado Reis^{a,b}, Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque-Júnior^{a,b}

^a Science and Technology Institute, Aracaju/SE. Brazil; ^b Post-Graduation
program in Health and Environment, University Tiradentes, Aracaju/SE,
Brazil.

*Corresponding autor: Cláudia Moura de Melo
(wagnoalcantara@hotmail.com) - Av. Murilo Dantas, 300, Prédio do ITP,
Farolândia, Aracaju/SE - CEP 49032-490 Brasil.

Aknowledgements: We would like to thank The National Council of Research
(CNPq) and The Foundation to support research and technology innovation in
the state of Sergipe (FAPITEC) for the financial support.

Resumen

La secreción de mucoproteica *Achatina fulica* se ha comunicado con propiedades curativas pueden ser influidos por el tipo de comida que ofrece a espécime. Este estudio investigó el potencial curativo de las películas basadas en la secreción mucosa de *Achatina fulica* alimentaba de plantas diferentes. heridas de una operación en la espalda de ratas Wistar fueron tratados con colágeno películas y películas realizadas a partir de la secreción mucosa de *A.fulica* alimentado de plantas de lechuga (*L. sativa*), utilizando como parámetro en la curación de grupo de control. Después de 3,7,14 y 21 días los animales fueron sacrificados y las heridas fueron evaluados microscópicamente. En días 3 y 7. Las heridas tratadas con moco mostraron mejores tasas de la formación y maduración del tejido de granulación, la epitelización, y más rápido de recambio tipo III de colágeno tipo I en las heridas de 14 y 21 días, hubo una intensa deposición del colágeno tipo I y acelera la regeneración de la piel. Los resultados obtenidos a partir de *A. fulica* alimentados de plantas de lechuga (*L. sativa*) mostraron resultados más palpables. Este estudio sugiere que las películas producidas con secreción mucosa de *A. fulica* éxito puede ser utilizado como apósito, especialmente si los caracoles se alimentan con plantas de lechuga *L. sativa*.

Palabras claves: la curación de heridas, vendajes, los caracoles de tierra, el moco.

Introduction

Dermal second-intention wound healing is a highly complex physiopathological phenomenon of skin repair that involves substantial loss of substance and consequent delay on the scar formation (Martin, 1997; Singer, Clark, 1999). The analysis of the kinetic of this biological process in response to different forms of dermal substitution is important for the development of efficient therapeutic products capable of stimulating the wound healing (Werner, Grose, 2003; Diegelman, Evans, 2004).

In recent years, there have been many recent advances in wound healing and dermal substitution research, but no product described in experimental studies are so far able to fully substitute the natural living skin (Sheakespeare, 2001). It has been demonstrated that the application of occlusive dressings prevents bacterial growth and wound infection and therefore improve wound healing. The decreased infection rates might be a result of the large number of activated neutrophils in the wound fluid, prevention of exogenous bacterial contamination, and prevention of tissue desiccation and necrosis (Seaman, 2002). In this vein, the use of natural polymers has been employed as occlusive dressings in healing of dermal wounds owing to their biocompatibility, nontoxic properties, and ease and safety of the application on dermis (Albuquerque-Júnior et al, 2009; Nunes et al, 2011).

Achatina fulica is a land snail able to produce a glycoproteic secretion which has been demonstrated to present some biological effects, such as antibacterial properties against *gram* positive and negative microorganisms (Iguchi et al, 1982; Kubota et al, 1985; Martins et al, 2003; Sirio et al, 2005, Lorenzi, 2006). Furthermore, mucus of this snail has been tested in surgical wounds of experimental animals and proved to improve the dermal cicatricial repair (Martins et al. 2003; Sirio, 2005).

Therefore, the goal of this study is to assess the antimicrobial activity and healing potential of mucous secretion of *Achatina fulica*, processed as occlusive dressing films, upon dermal cicatricial repair in rodents.

Material and Methods

Snail Samples. Thirty non-infected land snails *Achatina fulica* proceeded from the Snail Research Station (SRS) of the Science and Technology Institute (STI/Aracaju/SE, Brazil), weighing 45 ± 5 g, were selected for this study. The animals were housed in wood timber boxes (35 cm width x 30 cm height), with land bedding added to calcium carbonate (to provide calcium levels required for shell development), containing 30 snails each. The boxes were daily sprinkled with water in order to maintain the humidity. The animals were randomly assigned into experimental group (n=30), was fed with a of plant (*Lactuca sativa*).

Obtention of mucous secretion. In order to avoid contamination of the biological material to be collected, the snails were housed individually in plastic cages (75 x 40 x30 cm) and kept under abstinence from food for 3 days. Subsequently, approximately 5 mL of mucous secretion was collected by manual stimulation of the podal glands of the snails. Euthanasia of the snails was not necessary to obtain the mucus, so that the animals were redelivered to the SRS/STI thereafter.

Antimicrobial activity. Strains of *Candida albicans* ATCC 10231, *Escherichia coli* ATCC 15878, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 1024, *Staphylococcus aureus* ATCC 9080, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 19606, *Fusarium* ATCC 9605, ATCC 5487 *Salmonella* from the BIOSLAB (Rio de Janeiro) was used for microbiological testing. The antimicrobial activity was performed by diffusion wells according to the method described by Sivropoulou et al. (1995). BHI broth was inoculated with the microorganisms and incubated at 37 ° C/24horas. After

this period, the inoculum was adjusted to McFarland scale tube 0.5 (1.5×10^8 CFU) in saline. Before, was inoculated by spreading on plates containing Mueller-Hinton Agar m and Sabouraud agar inocula adjusted to the McFarland scale. We used 5 μ L, 10 μ L and 20 μ L respectively, of mucus containing the feeds, which were deposited into wells and incubated for 24 hours at 37 ° C. The inhibitory activity was determined by measuring the zone of inhibition.

To determine the minimal fungicidal concentration were used tubes containing 5.0 mL of BHI broth, 4 mL of mucus in each group, followed by serial dilution concentrations producing between 290 and 14,800 μ g.mL⁻¹ of mucus (Martins et al. 2003). Was added to tubes 1 mL of each inoculum of 0.5 McFarland (1.5×10^8 CFU) and incubated for 37 ° C/24 hours (Dotto et al, 2006, Parekh ; Chanda, 2007). After this period, 100 mL of the contents of the tubes were inoculated on the surface in Sabouraud agar plates, which were incubated at 37 ° C/24 hours. This experiment was performed in triplicate. After the incubation period the plates were observed that showed fungal growth. As positive controls we used metronidazole (antibacterial) and miconazole (antifungal) commercial at the same concentrations of mucus tested.

Preparation of the films. The film dispersion was prepared using 20 mL of mucus (3.975g) and polyethylene glycol 400 (PEG400), which was employed as plasticizer. The proportion of plasticizer used was 20%w/w of dry mucus. This dispersion was homogeneized and the films were obtained by casting process. The films obtained in this step of the experiment were cut off in square shape (2x2cm) and sterilized in UV rays.

Surgical Procedure and Group Formation. The animals used for the biological assay were one-hundred adult male *Rattus norvegicus albinus*, Wistar lineage, weighing 250-300g. The rats were housed in clear plastic cages with solid floors and loose hardwood chip bedding, and supplied with food and water *ad libitum* in a temperature and humidity-controlled environment. The animals

were anesthetized with intraperitoneal ketamine-xylazine (100 mg/kg – 5 mg/kg) and 1cm² standard-sized square-shaped wounds were performed in the back of the animals. Animals were handled in accordance with the principles of aseptic chain in order to avoid any possibility of exogen bacterial contamination. Subsequently, rats were randomly assigned into three groups of twenty animals each, CG – undressed control group; CoG – dressed with collagen-based films and ACF group dressed with films obtained from mucus of *A. fulica* fed with *Lactuca sativa*.

Histological procedures. After death certification, the area corresponding to the wound region in the back of the animals was surgically removed and the specimens were formalin-fixed and paraffin-embedded according to routine laboratorial techniques. Subsequently, serial 5µm thick sections were obtained and stained in hematoxylin-eosin to perform the analysis of the inflammatory reaction, and picosirius, analyzed under polarized light, to study the deposition of collagen fibers, and toluidin blue, to assess the mast cells population.

Assessment of the inflammatory profile (IP). The intensity of the inflammatory response was assessed in histological sections as follows: - (lack of inflammatory reaction); + (inflammatory cells representing less than 10% of the cell population observed within the wound area); ++ (inflammatory cells representing between 10 and 50% of the cell population observed within the wound area); and +++ (inflammatory cells representing more than 50% of the cell population observed within the wound area). Moreover, the profile inflammatory (IP) was classified as acute (predominance of polymorphonuclear cells) and chronic (predominance of mononuclear cells), and graded as slighter/absent, moderate or severe.

Assesment of the percentage of collagen deposition (COD). Histological sections stained in picosirius and analyzed under polarized light were used to the descriptive analysis of the collagen deposition. Collagen fibers were

analyzed according to their birefringence pattern (greenish/yellow-greenish or orange, orange-reddish), morphological appearance (wavy or stretched, thin or thick, short or long) and disposition (reticularly arranged or interlaced). The quantitative analysis of the area occupied by collagen fibers in the healing area was determined by optical density in the image analysis system in different randomly selected fields. The system used consists of a CCD Sony DXC-101 camera, applied to a Olympus CX31 microscope, from which the images were sent to a monitor (Trinitron Sony). By means of a digitizing system (Olympus C-7070 WIDEZOOM) the images were inserted into a computer (Pentium 133 MHz), and processed by a software (ImageTool). A total of ten fields per case were analyzed at a magnification of 100x. The thresholds for collagen fibers were established for each slide, after enhancing the contrast up to a point at which the fibers were easily identified as birefringent (collagen) bands. The area occupied by the fibers was determined by digital densitometric recognition, by adjusting the threshold level of measurement up to the different color densities of the collagen fibers. The area occupied by the fibers was divided by the total area of the field. The results were expressed in percentage of the skin area fraction occupied by the collagen fibers.

Statistical analysis. Statistical significant difference in the severity of the IP was assessed by chi-squared test, whereas the significances of the differences in the COD rates were verified by analysis of variance (one-way ANOVA) and Tukey test. Each time point was analyzed separately, and two-tailed α -level of $p = 0.05$ was significant.

Ethics Considerations. Prior the beginning of any experimental procedure, this study was approved by our Animal Care and Use Committee (register 101107).

Results and Discussion

Antibacterial activity

In table 1, the results of the antimicrobial tests were presented. Inhibition zone (Iz) was observed against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*, and the higher was the concentration of the mucus the larger was the diameter of the inhibition halos ($p < 0.05$). No significant difference was observed in the inhibitory activity of the mucus regarding to both microorganisms ($p > 0.05$) nor between them and metronidazole ($p > 0.05$). The other microorganisms to be used in this study do not show sensibility to the mucus.

Morphological analysis of the histological sections stained in HE.

The semiquantitative analysis of IP rates is presented table 2. It was observed that the severity of the inflammatory response decreased in the groups along the time, but no significant difference was observed among the groups in any of the experimental periods ($p > 0.05$). However, the pattern of the leukocyte infiltrate varied in the experimental groups along the time, as follows:

3rd day. In CTR and COL there was intense infiltration of neutrophils, particularly in the surface of the specimens, and prominent interstitial edema. Despite foci of tissue lysis could be seen, they were considered inconspicuous. Moreover, in the bottom of the wounds, intense lymphocytic infiltrate was observed in association to dense proliferation of spindle-shaped cells consistent with angioblasts, sometimes forming few small thin capillary vessels. In ACF, extensive hemorrhagic areas and rich network of capillary vessels formation were verified (figure 1 a/b/c).

7th day. CTR showed maintenance of acute neutrophils-rich infiltrate in the top of the wounds, and copious granulation tissue, in a predominantly

angioblastic phase, in the bottom. COL presented exuberant granulation tissue, and deposition of wavy thin delicate bundles of eosinophilic fibrils consistent with collagen. Adipocytic infiltration was occasionally observed. Epithelization was still inconspicuous in both groups. In ACF the granulation tissue was exuberant, but presented in a fibrovascular phase, with prominent fibroblastic proliferation.

14th day. In all groups, there was residual moderate inflammatory infiltrate, rich in lymphocytes, associated with scanty congested blood vessels. In addition, eosinophilic parallel-arranged fibrous bundles, with wavy appearance and varied thickness, could be observed. In COL and ACF, however, the collagen fibers were more apparent, and composed of thicker parallel-arranged fibers.

21st day. No residual inflammatory infiltrate was observed in any control or experimental group. The fibrous connective tissue was dense and moderately cellular, although the collagen fibers tended to be parallel-arranged in CTR but interlaced in COL and ACF. However, neof ormation of cutaneous appendages were more advanced in COL and ACF.

Morphological analysis of the histological sections stained in Sirius red (observed under polarized light).

3rd day. Scanty delicate birefringent greenish and yellow-greenish reticularly-arranged collagen fibrils, with abundant interfibrillar spaces, were observed in all three groups.

7th day. Greenish and yellow-greenish collagen fibrils were scanty and quite delicate in CTR, particularly in the surface of the wounds. In COL, the fibrils were more conspicuous and the reticular arrangement was more apparent, whereas in ACF there was deposition of some few delicate orange fibers in

addition to the yellow-greenish ones, whose arrangement tended to be parallel to the surface of the wounds.

14th day. CTR presented short thin collagen fibrils with both yellow-greenish and orange birefringence, and interfibrillar spaces were quite apparent. In COL, the fibers were longer, but delicate, and there was a significant amount of orange fibers, although greenish ones were abundant. In ACF, orange fibers were predominant, and they were thicker than in the last two groups but less compactly disposed in the surface of the wounds than in the bottom.

21st day. CTR showed thick gross and orange collagen fibers in parallel arrangement. COL and ACF presented gross orange and reddish fibers, but they tended to assume a characteristic interlaced disposition.

In table 3, the results of the morphometrical analysis of the collagen deposition was presented. Both dressed groups showed significantly higher contents of collagen fibers than CTR in all the experimental periods ($p < 0.001$). Moreover ACF exhibited the more expressive rates of COD than COL in 7 ($p = 0.001$) and 14 days ($p = 0.01$).

In this study, the mucous secretion of *A. fulica* inhibited the bacterial growth of both *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Other studies attesting the antibacterial properties of the mucus of invertebrate snails have been previously reported (Iguchi et al, 1982; Kubota et al, 1985; Martins et al, 2003; Sirio et al, 2005, Lorenzi, 2006). It has been proposed that this mucous secretion is rich in lysozyme, opsonines, and other antibacterial and antiviral factors (Fuchino et al, 1992). In addition, mucus of *Achatina fulica* was proved to be rich in Achactin, a high molecular weight glycoprotein belonging to the family of aminoxydase capable of lysing the cytoplasm membrane of bacteria in active proliferative phase, but not in quiescent ones, a toxic effect similar to that produced by penicillin (Ehart et al, 2002). Notwithstanding, despite these

mechanisms may be related to the antimicrobial activity of the mucous secretion, further research is needful in order to fully clarify this issue.

Staphylococcus aureus is the most common cause of posttraumatic skin and soft tissue infections. (Oche, Adedeji, 2004) and this microorganism has been reported as the commonest isolate from the post-operative wound infection (Lilani et al, 2005). *Staphylococcus epidermidis*, on the other hand, has been related to high antibacterial resistance rates and nosocomial infections (Antunes et al, 2008). Therefore, since the healing is known to be affected by tissue bacteria concentrations higher than 10^5 microorganisms per gram (Stratford et al, 2002), the use of dressing materials able to reduce content of these microorganisms in surgical dermal wounds, as performed in this study, might be useful to avoid wound infection and, therefore, favor wound healing (Seaman, 2002).

Previous investigations attesting the healing potential of the mucus of *Achatina fulica* have been reported in this decade (Caetano, 2000; Yomasa et al, 2002; Martins et al, 2003; Sirio et al, 2005), but this is the first one to process this biological material as films for wound dressing. In this study, neither infiltration of eosinophils, a typical morphological sign of allergenic reaction (Chowdary et al, 2003), nor clusters of epithelioid and foreign body giant cells, classical feature of biological incompatibility (Maluf-Meiken et al, 2006) were observed within the wounds, attesting the good acceptability of the films by dermal tissues of the animals.

The time course of the present results obtained from histological analysis of the control group fits with the overall picture regarded as normal dermal healing (Albuquerque-Júnior et al, 2009). However, the use of both wound dressings improved the development of the granulation tissue and, collagen deposition, attesting the significance of wound protection for the healing process (Seaman, 2002; Nunes et al, 2011).

Despite improvement of wound healing had been observed in the group treated collagen-based dressings, as already reported by Albuquerque-Júnior et al (2009), the histological changes evidenced in the group treated with films based on mucous secretion of *Achatina fulica* were more distinguishable. Similarly, the improvement of wound healing resulting from the application of mucous secretion of *A. fulica* has been previously reported (Martins et al, 2003; Sirio et al, 2005), attesting the healing potential of this biological material derived from giant snails.

In this study, the more rapid granulation tissue formation and maturation, as well as the earlier replacement of neutrophils (acute infiltrate) by macrophages and lymphocytes (chronic infiltrate) suggest that the chemical compounds present in those films may play an important role in modulating the angiogenesis and chronification of the inflammatory response, two important events involved in wound healing. However, the mechanisms underlying such biological properties remain unclear. It has been recently demonstrated that mucous secretion of *A. fulica* composed of a rich polysaccharide complex and sialic acid, elements which represent important constituents of the connective tissue (Lorenzi et al, 2008). Besides, an important role played by polysaccharides on the modulation of the inflammatory response had been previously described, attesting the capability of these molecules in preventing intraperitoneal adhesion and abscess formation in a rat peritonitis model (Bae et al, 2004). On the other hand, since no significant difference in the inflammatory intensity was observed in this study, it is suggested that the modulatory activity on the leukocyte infiltrate and blood vessels formation is likely an indirect effect of other biological properties of the films. It is well-established that the release of biological compounds responsible for the chemotaxis of polymorphonuclear leukocytes is influenced by the bacterial content in the infected site (Welch et al, 1981). Thus, it is possible to speculate that the early chronicity of the

inflammatory response may be a result of the antimicrobial activity of the mucus, observed as in this study as in other reports (Kubota et al, 1985; Ehara et al, 2002). In addition, the release of angiogenesis-associated growth factors , such VEGF (vascular-endothelial growth factor) and PDGF (platelet-derived growth factor), after inflammatory chronification is a key-step to the development of the granulation tissue during wound healing (Dielgeman, Evans, 2004), which could support our findings regarded to the enhanced vascularization. However, other detailed investigations assessing the effects of *A. fulica*'s mucous secretion on the inflammatory dynamics and endothelial cells proliferation are necessary to validate this theory.

Collagens are proteins synthesized and degraded by fibroblasts which play a fundamental role in the scar tissue formation. Fibril-forming collagens in soft tissues are represented mainly by type I and III molecules (Junqueira et al, 1983). Type III collagen it is first produced in early stages of wound healing, supposedly to provide a network of adhesive macromolecules capable of orientating the migration of endothelial cells to form the granulation tissue; thereafter, this molecule is gradually replaced by type I collagen, the major molecule responsible for providing tensile strength to the tissue, so that the scar acquires mechanical stability (Albuquerque-Júnior et al, 2009; Nunes et al, 2011). In this study, the use of films based on mucous secretion of *A. fulica* favored a rapid replacement of type III for type I collagen and accelerated the spatial organization of the collagen fibers from parallel disposition to interlaced arrangement, characteristic of normal dermis. Besides, the collagen content was significantly improved by such films during all the time course of the experiment. Despite the precise mechanism responsible for such improvement in the collagenization is still unknown, it is possibly related to the biochemical composition of the mucous secretion, which is rich in mucin (Lorenzi, 2006; Sirio et al, 2008). Mucin is characterized by numerous tandem repeats that contain

proline and are rich in serine asparagine, hydroxylysine and/or threonine residues (Adikwu, 2006). Therefore, as long as these aminoacids are closely involved in the biochemical synthesis of collagen molecules, the presence of high contents of mucin in the mucous secretion of *A. fulica* (data not shown) might be related to the better collagenization observed in this study. Supporting these findings, it has been reported that the application of snail mucin dispersed in detarium gum gel proved to be useful to improve wound healing (Adikwu, Alozie, 2007). Notwithstanding, further investigations are required in order to unravel the precise role played by the mucous secretion's chemical compounds on the collagenization during wound healing.

In conclusion, we have demonstrated that the mucous secretion of *Achatina fulica* presents antibacterial properties against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. In addition, the use of dressing films based on this mucous secretion improved wound healing in rodent model.

Abstract

Achatina fulica's secretion has been recently related to antibacterial, antifungal, and cicatricial properties, and it's influenced by the kind of food offered. Therefore, this study investigated the healing potential of dressing films based on mucous secretion of *Achatina fulica*. Thus, surgical wounds performed in the back wistar rats were dressed with films based on collagen, and on mucous secretion of *A. fulica* fed with *Lactuca sativa*; undresses worked as wounds control. After 3, 7, 14 and 21 days the animals were euthanized, and the wounds were microscopically evaluated. On the 3rd and 7th days dressing films based on mucus provided acceleration of the formation maturation of granulation tissue, better epithelization rates, and more rapid replacement of type III for type I collagen fibers. On the 14th and 21st days, these dressings induced more intense deposition and better architectural disposition of type I

collagen fibers, and hastened the regeneration of cutaneous phaneros. Dressings obtained from *A. fulica* fed with *Lactuca sativa* provided the most expressive results. This study suggests that films produced with mucous secretion of *A. fulica* can be successfully employed as wound dressing, particularly if snails are fed with *Lactuca sativa*.

Keywords: wound healing, wound dressing, land snails, mucus.

References

Albuquerque-Júnior, R. L. C.; Barreto, S. A. L.; Pires, A. J.; Reis, P. F.; Lima, O. S.; Ribeiro, G. M. A. ; Cardoso, C. J. Effect of bovine type-I collagen-based films containing red propolis on dermal wound healing in rodent model. *Int. J. Morphol.*, 27(4):1105-1110, 2009.

Adikwu, M. M. Mucins and their potentials (editorial). *Trop. J. Pharm. Res.* 5: 581-582, 2006.

Adikwu M. U.; alozie b. u. *Scientific Research and Essay Vol. 2 (6)*, pp. 195-198, 2007.

Antunes A. L, Secchi C, Reiter K. C, Perez L. R., Freitas A. L. D'Azevedo P. A. Feasible identification of *Staphylococcus epidermidis* using desferrioxamine and fosfomycin disks. *APMIS*; 116:16-20, 2008.

Bae J. S, Barreto, S. A. The effect of polysaccharides and carboxylcellulose combination to prevent intraperitoneal adhesion and abscess formation in a rat peritonitis model. *J Vet Med Sci*, 66, 1205-1211. 2004.

Caetano, M. D. *Los animales usados en la medicina popular mexicana*. Imprenta Universitária, Ciudad de México, México, 126 pp. 2000.

Chowdary, V. S. et al. A Study on Serum IgE and Eosinophils in Respiratory Allergy Patients. *Indian J Allergy Asthma Immunol*; 17(1) : 21-24, 2003.

Diegelman, E. V. Evans, C. S. Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 13th Ed., Washington D.C., 2004.

Dotto, F. R. The epidemiology of wound infection: a ten-year prospective study of 62, 939 wounds. *Surg Clin Nor Am (Symposium on Surgical infection)*: 20 – 40, 2006.

Ehara, D. Ahmed, M. R.; Gomathi, K.; Chitra, K.; Sehgal, P. K. ; Jayakumar, R. Dermal wound healing processes with curcumin incorporated collagen films. *Biomaterials*, 25(10):1911-7, 2002.

Ehart, W. S. Floyd, D. G. Evolution of snails morphology and function: an integrative approach of adaptation, constraint, and compromise. In: *Mucs Snails. Studies on practice animal and plants*. New York. p. 241-271, 2002.

Fuchino, G. M. Barrett, S. S. H. Introduction a l'ethnomédecine. In: *Bannerman, R. H.; Médecine traditionnelle et couverture des soins de santé*. OMS, Genebra, Suíça, p. 17-24, 1992.

Iguchi, S. M. M.; Aikawa, T.; Matsumoto, J. J. Atividade antibacteriana do muco mucina de caracóis. *Comp. Biochem. Physiol.*, v.27, n. 3, p. 571-574, 1982.

Junqueira L.C. U. et al Dermal collagen distribution. A histochemical and ultrastructural study. *Histochemistry* 79: 397- 403, 1983.

Kubota, Y. Purificação e caracterização do fator antibacteriano do muco de escargots. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 82c, n 2, p. 345-348, 1985.

Lilani. R. P. Parekh, H. Li-Korotky, J. E. Whittaker, "Collagen and picrosirius red staining: a polarized light assessment of fibrillar hue and spatial distribution," *Brazilian Journal of Morphological Sciences*, vol. 22, pp. 97–104, 2005.

Lorenzi A. T, Martins, M. F. Análise colorimétrica e espectroscópica do muco de caracóis terrestres *Achatina sp* alimentados com ração diferenciada. *R. Bras. Zootec.* 37(3): 572-579, 2006.

Lorenz, A.T.; Martins, M. F. Análise colorimétrica e espectroscópica do muco de caracóis terrestres *Achatina* sp alimentados com ração diferenciada. R. Bras. Zootec. v. 37, n. 3, p.572-579, 2008.

Maluf-Meiken, L.C.V. Morphometrical analysis of multinucleated giant cells in subdermal implants of poly-lactic acid in rats. J Mater Sci: Mater Med 17: 481–485, 2006.

Martin, P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. Science. Apr 4;276(5309):75-81, 1997.

Martins, M. F. ; Caetano, F. A. M. ; Sírío, O. J ; Avaliação do reparo de lesões de pele de coelhos tratadas com secreção mucoglicoproteica do escargot *Achatina* . Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science , São Paulo, v. 1, n. 1, p. 1-1, 2003.

Shakespeare, P. Burn wound healing and skin substitutes. Burns.; 27:517Y522, 2001.

Singer, J. L; Clark. C. N. Cutaneous wound healing. New Eng J Med; 341(10): 738-746, 1999.

Nunes, P. S., Albuquerque-Junior, R.L.C., Cavalcante, D. R. R. ; Dantas M. D. M, Cardoso J. C., Bezerra M. S., Souza J. C. C. Serafini M. R, Quitans-jr, L. J., Bonjardim L. R., Collagen-Based Films Containing Liposome-Loaded Usnic Acid as Dressing for Dermal Burn Healing Journal of Biomedicine and Biotechnology, Article ID 761593, 9 pagesdoi:10.1155/2011/761593, 2011.

Onche, I. Adedeji O. Microbiology of Post-operative Wound Infection in Implant Surgery. Nig J Surg Res. 6:1-2, 2004.

Parekh A. ; Chanda J. L. The importance of gown and drape barriers in the prevention of wound infection. Surg Gynecol Obstet 1: 465 – 470, 2007.

Seaman G. C Incidence and parametric determinants of post-operative wound infections in a University Teaching Hospital. Cent Afr J Med 36: 63 – 67, 2002.

Sehn, E.; Hernandes, L.; Franco, S. L.; Gonçalves, C. C. ; Baesso, M. L. Dynamics of reepithelialisation and penetration rate of bee própolis formulation during cutaneous wounds healing. *Acta Chim. Acta*, 635(1):115-20, 2009.

Sírio, O. J. Verificação da potencialização do efeito cicatrizante do muco de caracóis do gênero *Achatina* promovida por dieta a base de Confrei (*Symphytum officinale L.*). Dissertação, Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal. Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade de São Paulo (USP). Pirassununga, 87p, 2005.

Sivopoulou, A, Sheetal, R, Nayak N. Aerobic Micro-organisms in Post-operative Wound Infections and their Antimicrobial Susceptibility Patterns. *J Clin Diag Res*. 10 (4):3392-3396, 1995.

Stratford, H. C.; Tan, M. J.; Philippe, V.; Tan, S. H.; Tan, C. K.; Ku, C. W.; Goh, Y. Y.; Wahli, W.; Michalik, L.; Tan, N. S. Regulation of epithelial-mesenchymal IL-1 signaling by PPARbeta/delta is essential for skin homeostasis and wound healing. *J. Cell Biol.*, 184(6):817-31, 2002.

Welch, W. D., D. Davis, L. D. Thrupp. Effect of antimicrobial agents on human polymorphonuclear leukocyte microbicidal function. *Antimicrob. Agents Chemother.* 20:15- 20, 1981.

Werner, S. ; Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev* 83(3):835-870, 2003.

Yomassa, S.E.F. Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 2002.

Table I- Antimicrobial activity of mucus of *Achatina fulica*

Mucus (μL)	Inibition zone (mm)	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
5	0.00	0.00
10	9.30 \pm 0,1	10.29 \pm 0,2
20	13.15 \pm 0,1	15.20 \pm 0,2
Statistics	$p= 0.0000652$	$p = 0.0000000005$

Table II. Assessment of the intensity of the inflammatory infiltrate in CTR (control group), COL (collagen-based group) and ACF (*Achatina fulica* group) during the time course of the experiment.

Days	Animals	Inflammatory Reaction Intensity		
		CTR	COL	ACF
3	R1	+++	++	+++
	R2	+++	+++	+++
	R3	+++	++	+++
	R4	+++	+++	+++
	R5	++	+++	++
7	R1	+++	++	++
	R2	+++	++	++
	R3	+++	++	++
	R4	+++	+	+
	R5	+++	+	+
14	R1	+	+	+
	R2	++	+	+
	R3	+	+	+
	R4	+	+	+
	R5	++	+	+
21	R1	-	-	-
	R2	-	-	-
	R3	-	-	-
	R4	-	-	-
	R5	-	-	-

(-) = lack of inflammatory reaction; (+) = mild inflammatory infiltrate, representing less than 10%; (++) = moderate inflammatory infiltrate, representing between 10 and 50%; (+++) = intense inflammatory infiltrate, representing more than 50%.

Table III. Assessment of the percentage of collagen deposition (COD) in the tested groups during the time course of the experiment.

Days	Percentage of Collagen Deposition (%)		
	CTR	COL	ACF
3	5,25±0,14 ^a	7,02±0,008 ^b	10,00±0,13 ^c
7	15,61±0,12 ^a	18,01±0,07 ^b	25,06±0,19 ^c
14	29,14±0,18 ^a	35,28±0,09 ^b	38,99±0,12 ^c
21	37,14±0,22 ^a	44,76±0,11 ^b	49,05±0,14 ^c

Different letters in the same line represent significantly different values (p<0.05).

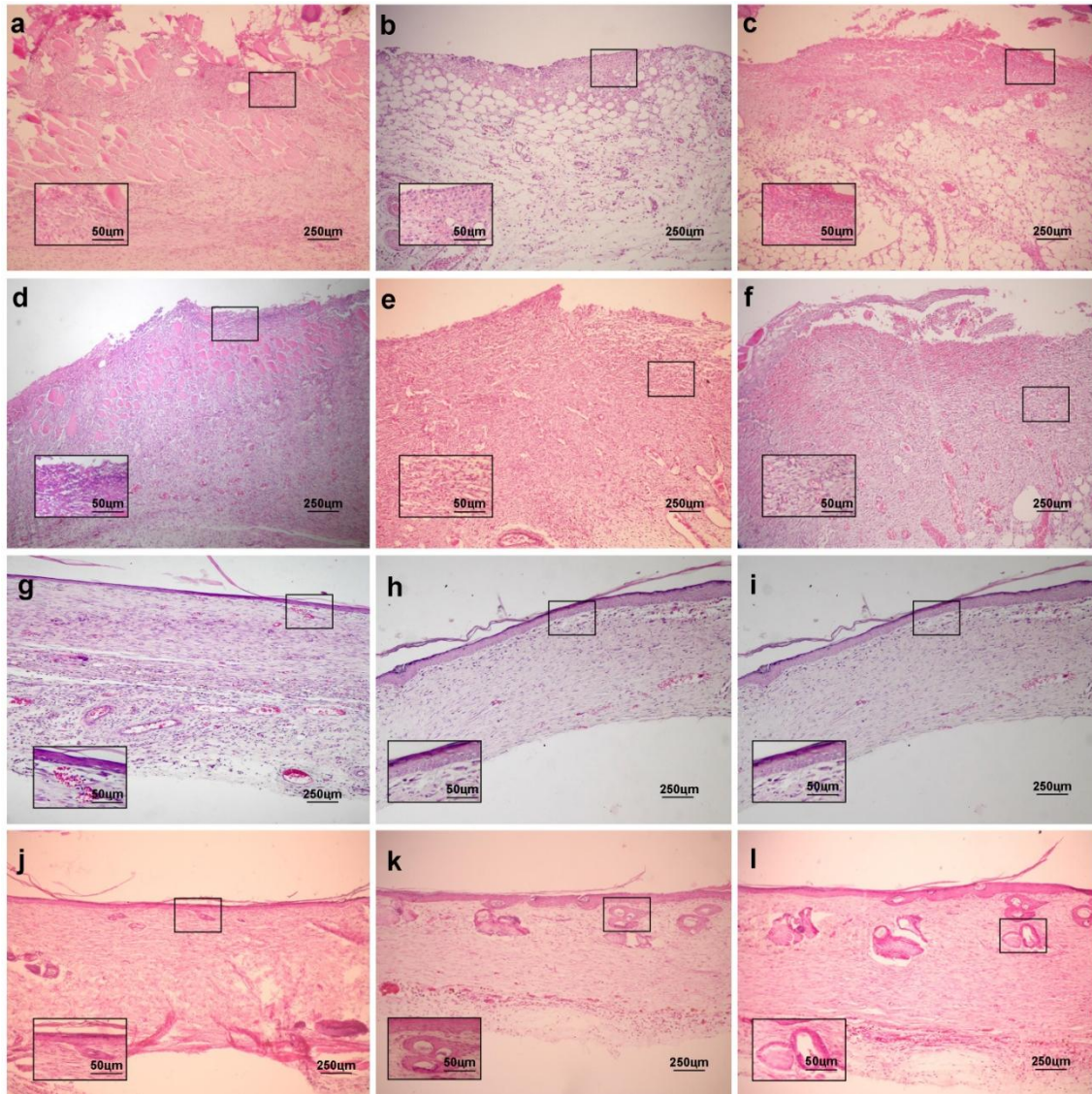


Figure 1. Histological sections stained in HE. Presence of inflammatory infiltrate rich in polymorphonuclear neutrophils in CTR(a), COL (b) and ACF (d). Intense subacute inflammatory response in CTR (d), and granulation tissue well-developed seen in COL (e) and ACF (f) after 7 days. Residual granulation tissue seen in CTR (g) whereas collagen scar formation was observed in Col (h) and ACF (i) after 14 days. Advanced epithelization is also evidenced in all groups. In 21 days, there was lack of inflammatory response in all groups but the neoformation of cutaneous appendages was rudimentary in CTR (g) but quite advanced in COL (h) and ACF (i).

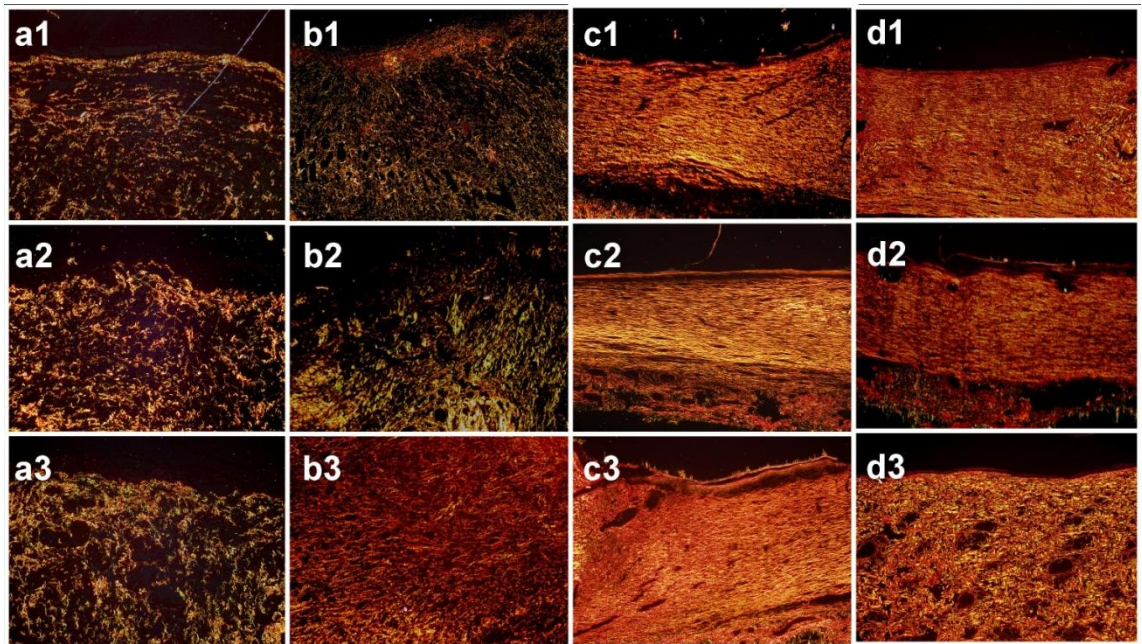


Figure 2. Histological sections observed under polarized light of the groups in 3 (a), 7 (b), 14 (c) and 21 (d) days. Type III collagen is seen as greenish and yellow-greenish fibers, whereas type I collagen is represented by orangish and reddish fibers. Vertically, the experimental groups CTR (1), COL (2), ACF (3). ACF showed earlier replacement of type III for type I collagen in 7 days (b3), denser compactation of parallel-arranged collagen fibers in 14 days (c3), interlaced disposition of the fibers in 21 days (d3) resembling the normal dermis (sirius red/polarization, 100x).

5.3 MANUSCRITO III

Effect of combined application of dressing films based on mucous secretion of *Achatina fulica* and low level laser therapy on wound

Wagno Alcântara Santana^a, Alessandra Silva Rabelo^b, Rose Nely Pereira-Filho^a, Maria Amália Gonzaga Ribeiro^c, Juliana Cordeiro Cardoso^a, Cláudia Moura de Melo^a, Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque-Júnior^a.

^a Science and Technology Institute, Aracaju/SE. Brazil; Post-Graduation program on Health and Environment, University Tiradentes. ^b Post-Graduation program on Pharmaceutical Sciences, Federal University of Sergipe. ^c School of Dentistry, Federal University of Sergipe. Aracaju/SE, Brazil.

*Corresponding autor:

Wagno Alcântara Santana (wagnoalcantara@hotmail.com) - Av. Murilo Dantas, 300, Prédio do ITP, Farolândia, Aracaju/SE - CEP 49032-490 Brasil.

Abstract

The secretion of *Achatina fulica* has recently been related to antibacterial, antifungal and healing, and is influenced by the type of food offered. Therefore, this study investigated the potential for healing dressing films based on secretion of mucus of *Achatina fulica*. Thus, surgical wounds in *Wistar* rats were dressed back films based on mucus secretion of *A. fulica* fed with *Lactuca sativa*; strips served as control wounds. Other treatment with films, rats were treated with the films associated with daily transcutaneous irradiation using a semiconductor diode, calibrated, GaAlAs laser with continuous emission at 660 nm wavelength of 100s (25s point each) The output power used was 40 mW, with a focal point of 0.04 cm², and power density of 1 W/cm². The total energy per session was estimated at 4 J and energy density 20 J/cm² was divided into four different equidistant points (5 J/cm² each) over 7 days. The first irradiation was performed immediately after the surgical procedures. After 3, 7, 14 and 21 days the animals were sacrificed and the wounds were evaluated microscopically. On days 3 and 7 put mucus from films based on the acceleration of maturation of granulation tissue formation, epithelialization and best rates faster replacement of type III to type I collagen fibers On 14 and 21, these dressings induced deposition more intense and better architectural arrangement of collagen fibers type I, and hastened the regeneration of skin phaneros. Dressings obtained from *A. fulica* fed with *Lactuca sativa*, since the most significant results. The study suggests that the films produced with the secretion of mucus of *A. fulica* can successfully be used as a dressing, especially if the snails are fed with *Lactuca sativa*. In an observation to treatment with laser therapy combined dressing films based on mucus secretion of *A. fulica* and laser irradiation appeared to accelerate the remodeling phase of scar healing, providing a better architectural arrangement of collagen fibers.

Keywords: *Achatina fulica*, mucus, films, lasertherapy, skin repair

Resumo

A secreção de *Achatina fulica* tem sido relacionado com propriedades antibacteriana, antifúngica e cicatricial, e é influenciado pelo tipo de alimento oferecido. Portanto, este estudo investigou o potencial de cura de filmes preparados a partir secreção de muco de *Achatina fulica*. Assim, feridas cirúrgicas foram realizadas em ratos *Wistar* e tratadas com filmes de muco de *A. fulica* alimentados com *Lactuca sativa*. Paralelamente ao tratamento com filmes, outro grupo de ratos receberam tratamento com os filmes associados a laserterapia, transcutânea, utilizando um semiconductor de diodo, previamente calibrado, laser GaAlAs, com emissão contínua (CW) a 660 nm de comprimento de onda de 100 s (25 s ponto cada) A potência de saída utilizada foi de 40 mW, com um ponto focal de 0,04 cm², e densidade de potência de 1 W/cm². A energia total por sessão foi estimado em 4 J e a densidade de energia foi de 20 J/cm² distribuídos em 4 diferentes pontos equidistantes (5 J/cm² cada) ao longo de 7 dias com intervalos de 48h. A primeira irradiação realizada imediatamente após os procedimentos cirúrgicos. Após 3, 7, 14 e 21 dias os animais foram sacrificados, e as feridas foram avaliados microscopicamente. Nos dias 3 e 7 as feridas tratadas com filmes a partir do muco mostraram aceleração da maturação e formação de tecido de granulação, melhores taxas de epitelização e substituição mais rápida do tipo III para fibras de colágeno tipo I. Nos dias 14 e 21, esses curativos induziram deposição mais intensa e melhor disposição arquitetônica das fibras de colágeno tipo I, e mostrou a regeneração da fônoros cutâneos. Esta expressiva maturação sugere que os filmes produzidos com a secreção de muco de *A. fulica* pode ser empregada com sucesso como curativo, especialmente se os caracóis são alimentados com *Lactuca sativa*.

A partir da secreção de muco de *A. fulica* a combinação de filmes e laserterapia acelerou a fase de remodelação da ferida, proporcionando melhor arranjo arquitetônico das fibras de colágeno.

Palavras- chaves: *Achatina fulica*, muco, filmes, reparo tecidual, laserterapia

Introduction

When there is tissue loss, it is restored by regeneration or cicatrization. Regeneration is the replacement of damaged cells or tissue by tissue similar to the original, re-establishing the function, whereas cicatrization or repair is characterized by the formation of new connective tissue with substitution of the damaged cells and alteration of the architecture of the tissue. However, this results in a satisfactory functional and structural condition but not like that previous to the injury (Li et al, 2007).

The analysis of the kinetic of this biological process in response to different forms of dermal substitution is important for the development of efficient therapeutic products capable of stimulating the wound healing (Werner, Grose, 2003; Diegelman, Evans, 2004). In recent years, there have been many recent advances in wound healing and dermal substitution research, but no product described in experimental studies are so far able to fully substitute the natural living skin (Shakespeare, 2001). In this vein, the use of natural polymers has been employed in healing of dermal wounds owing to their biocompatibility, nontoxic properties, and ease and safety of the application on dermis (Bae et al, 2004; Allahverdian et al, 2006.).

Achatina fulica is a land snail able to produce a glycoproteic secretion which has been demonstrated to present some biological effects, such as antibacterial properties against *gram* positive and negative microorganisms (Iguchi et al, 1982; Kubota et al, 1985; Fuchino et al, 1992) involved in the

dynamics of the healing process. Furthermore, mucus of this snail has been tested in surgical wounds of experimental animals and proved to improve the dermal cicatricial repair (Martins et al, 2003; Sírío, 2005). More recently it has been proposed that the type of plant offered as food to snails can influence the composition of the mucus by incorporating the secondary metabolites of plants after digestion (Lorenzi, 2008).

Lasers emit a highly concentrated, non-invasive, non-ionising radiation that promote thermal, photochemical and nonlinear effects when in contact with different tissues (Hamblin Demidova, 2006) by increasing mitochondrial respiration and adenosine triphosphate (ATP) synthesis (Morimoto et al, 1994; Ninomiya et al, 2007). Several studies have indicated that laser arrays at low frequencies are quite helpful in modulating different biological activities, such as analgesic (Nes, Poso, 2005; Turhani et al, 2006), anti-inflammatory (Pugliesi et al, 2003; Correa et al, 2007; Boschi et al, 2008; Medrado et al, 2010) and healing effects (Byrnes et al, 2004; Demidova-Rice et al, 2007; Ribeiro et al, 2009a; Chung et al, 2010a).

The use of low-level laser irradiation to speed wound healing first appeared in literature in 1971 (Master et al, 1971). Since then, many studies have been reported attesting the beneficial effects of laser irradiation in different steps of wound healing, such as improvement of collagen synthesis (Conlan et al, 1996), fibroblast proliferation (Pourzarandian et al, 2005), blood vessels formation (Corazza et al, 2006; Melo et al, 2011), and myofibroblasts differentiation (Medrado et al, 2003; Ribeiro et al, 2009b).

The goal of this study was to investigate by histological analysis the effect of the application of dressing films based on mucous secretion of *Achatina fuclica* combined with low level laser irradiation on wound healing in rodent model.

Materials and Methods

Snail Samples

Thirty non-infected land snails *Achatina fulica* proceeded from the Snail Research Station (SRS) of the Science and Technology Institute (STI/Aracaju/SE, Brazil), weighing 45 ± 5 g, were selected for this study. The animals were housed in wood timber boxes (35 cm width x 30 cm height), with land bedding added to calcium carbonate (to provide calcium levels required for shell development), containing 10 snails each. The boxes were daily sprinkled with water in order to maintain the humidity. The ration developed for the snails was formulated according to Pacheco, Martins (1996). Food and water were offered *ad libitum*.

Obtention of Mucous Secretion

In order to avoid contamination of the biological material to be collected, the snails were housed individually in plastic cages (75 x 40 x 30 cm) and kept under abstinence from food for 3 days. Subsequently, approximately 5 mL of mucous secretion was collected by manual stimulation of the podal glands of the snails. Euthanasia of the snails was not necessary to obtain the mucus, so that the animals were redelivered to the SRS/STI thereafter.

Preparation of The Films

The film dispersion was prepared using 20 mL of mucus (3.975g) and polyethylene glycol 400 (PEG400), which was employed as plasticizer. The proportion of plasticizer used was 20%w/w of dry mucus. This dispersion was homogeneized and the films were obtained by casting process. The films obtained in this step of the experiment were cut off in square shape (2x2cm).

Surgical Procedure and Groups Formation

Eighty adults male *Rattus norvegicus albinus*, Wistar lineage (250-300 g) were used in this study under an approved by the Ethics research Committee of Tiradentes University (protocol n° 101107). The rats were housed in clear plastic cages with solid floors and loose hardwood chip bedding, and supplied with food and water *ad libitum* in a temperature and humidity-controlled environment. The animals were anesthetized with intraperitoneal ketamine-xylozine (100 mg/kg – 5 mg/kg) and 1cm² standard-sized square-shaped wounds were performed in the back of the animals. Animals were handled in accordance with the principles of aseptic chain in order to avoid any possibility of exogen bacterial contamination. Subsequently, rats were randomly assigned into four groups of twenty animals each, according to the wound dressing: CTR – untreated control group; ACH – dressed with films obtained from mucus of *A. fulica*; LT – laser-irradiated undressed; ACHLT – mucus of *A. fulica* fed with *Lactuca sativa* dressed and laser-irradiated. Five animals of each group were euthanized at 3, 7, 14 and 21 days after surgical.

Photoirradiation Protocol

Animals were submitted to daily transcutaneous irradiation using a previously calibrated semi-conductor diode laser GaAIAs (Twin Laser , MMOptics, São Paulo, Brazil) with continuous emission (CW) at 660 nm wavelength for 100 s (25 s each point) with interval of 48h for seven days. The output power used was 40 mW, with a focal spot of 0.04 cm², and power density of 1 W/cm². The total energy per session was estimated in 4 J and the energy density was 20 J/cm² distributed in 4 different equidistant points (5 J/cm² each) over the course of 7 days. The first irradiation was performed immediately after the surgical procedures.

Histological procedures

After death certification, the area corresponding to the wound region in the back of the animals was surgically removed and the specimens were formalin-fixed and paraffin-embedded according to routine laboratorial techniques. Subsequently, serial 5µm thick sections were obtained and stained in hematoxylin-eosin to perform the analysis of the inflammatory reaction, and picrosírius, analyzed under polarized light, to study the deposition of collagen fibers, and toluidin blue, to assess the mast cells population. Histopathologic analysis was performed and photographs were obtained with an Olympus light microscope.

Assessment of the Inflammatory Profile (IP)

Histological sections stained in hematoxylin-eosin were used to the descriptive analysis of the inflammatory profile (IP) and epithelization rates (ER). The intensity of the inflammatory response was assessed as follows: + (inflammatory cells representing less than 10% of the cell population observed within the wound area), ++ (inflammatory cells representing between 10 and 50% of the cell population observed within the wound area), and +++ (inflammatory cells representing more than 50% of the cell population observed within the wound area). Moreover, the profile inflammatory (IP) was classified as acute (predominance of polymorphonuclear cells) and chronic (predominance of mononuclear cells), and graded as slighter/absent, moderate or severe.

Assessment of the Ephetelization Rates (ER)

In order to assess the epithelization rates (ER), photomicrographs of the wounds were taken from all the samples (40x) and processed in a software (ImageLab[®], Sof- tium, São Paulo, SP, Brasil). The total wound surface extent (TWE) was assessed, as well as the extent of the epidermal migration from the

normal wound margin to the point where the migrating epithelium stopped processing (ME). ER (%) was determined as follows:

$$ER(\%) = (ME \times 100)/TWE$$

Assesment of the collagen deposition

Histological sections stained in picrosirius and analyzed under polarized light were used to the descriptive analysis of the collagen deposition. Collagen fibers were analyzed according to their birefringence pattern (greenish/yellow-greenish or orange, orange-reddish), morphological appearance (wavy or stretched, thin or thick, short or long) and disposition (reticularly arranged or interlaced). The quantitative analysis of the area occupied by collagen fibers in the healing area was determined by optical density in the image analysis system in different randomly selected fields. The system used consists of a CCD Sony DXC-101 camera, applied to an Olympus CX31 microscope, from which the images were sent to a monitor (Trinitron Sony). The digitizing system was by means of a (Olympus C-7070 WIDEZOOM) the images were inserted into a computer (Pentium 133 MHz), and processed by a software (ImageTool). A total of ten fields per case were analyzed at a magnification of 100x. The thresholds for collagen fibers were established for each slide, after enhancing the contrast up to a point at which the fibers were easily identified as birrefringent (collagen) bands. The area occupied by the fibers was determined by digital densitometric recognition, by adjusting the threshold level of measurement up to the different color densities of the collagen fibers. The area occupied by the fibers was divided by the total area of the field. The results were expressed in percentage of the skin area fraction occupied by the collagen fibers.

Statistical Analysis

Statistical significant difference in the severity of the inflammatory reaction was assessed by chi-squared test, whereas the significances of the differences in the ER, and collagenization rates were verified by analysis of variance (one-way ANOVA) and Tukey test. Each time point was analyzed separately, and two-tailed α -level of $P < 0.05$ was significant.

Results and Discussion

As shown in table 1, the inflammatory content decreased over the experimental time in all groups. However, in seven and 14 days, the irradiated groups (LT and ACHLT) showed significant decrease in the inflammatory content in relation to both non-irradiated ones (CTR and ACH) ($p < 0.05$). The profile of the inflammatory infiltrate presented some differences among the groups. In three days, it was the polymorphonuclear neutrophils were predominant in all groups. However, in seven days, the content of such neutrophils was less expressive in LT and ACHLT when compared to the mononuclear infiltrate (macrophages and lymphocytes). Lymphocytes and some few macrophages constituted the inflammatory infiltrate evidenced in all groups in 14 and, occasionally, 21 days, irrespective to the treatment applied to the wounds. These findings point at an important photobiomodulatory role played by laser rays on the dynamics of the inflammatory response during wound healing, as reported in previous studies (Freitas et al, 2001, Ribeiro et al, 2004, Correia et al, 2007, Boschi et al, 2008) . Such activity might be related to the inhibitory effect of laser energy on the release of prostaglandin and TNF- α (Sakurai et al, 2000), mast cell degranulation (Pereira et al, 2010) and on lymphocytic proliferation (Ribeiro et al, 2009a).

INSERT TABLE 1

The granulation tissue was clearly more exuberant in LT and ACHLT than in the other groups in seven days, but inconspicuous in 14 days. In ACH it was conspicuous in seven days, although less expressive than in the irradiated groups, whereas in 14 days the vascular content was substantially reduced. In CTR, the granulation tissue was more vascular in seven days and less conspicuous, but clearly distinguishable, in 14 days (figure 1). These results suggest that laser irradiation provided more rapid onset of the vascular steps of wound healing. Similar findings were previously reported in other studies (Medrado et al, 2003, Bayat et al, 2006, Ribeiro et al, 2009a) and they are likely related to direct stimulation of angiogenesis induced by laser irradiation (Corazza et al, 2007, Pereira et al, 2010; Melo et al, 2010). Besides, the contents of blood vessel were substantially reduced in the irradiated groups in 14 days, suggesting that laser irradiation improved the angiogenesis in the earlier phases of wound healing without providing undesirable longer-term maintenance of the vascular supply, which could impair the final scar formation (Ribeiro et al, 2009a).

INSERT FIGURE 1

The epithelization rates (ER) were expressed in figure 2. In seven and 14 days, the ER observed in LT and ACHLT were significantly higher than in CTR and ACH ($p < 0.05$), but there was no significant difference in the other experimental times ($p > 0.05$). It has been demonstrated that low level laser irradiation is able to stimulate keratinocyte proliferation *in vitro* (Eduardo et al, 2007), which could explain the more rapid epithelial lining reconstitution in both irradiated groups. In addition, laser-induced improved epithelization during wound healing has also been reported in previous investigations (Ribeiro et al,

2009a, Chung et al, 2010a, Chung et al, 2010b), supporting the histological findings presented in this study.

INSERT FIGURE 2

As showed figure 3, scanty deposition of thin delicate reticular-arranged collagen fibrils exhibiting yellow-greenish birefringence (type III collagen) was observed in all groups after three days. In seven days, the fibers were thicker, but the type III collagen were still predominant in CTR and ACH, whereas in LT and ACHLT, these fibers were predominantly gold or reddish (type I collagen). Moreover, the fibers were more compacted disposed in these last groups. In 14 days days, there was a remarkable improvement of the collagenization and type I collagen fibers were more abundant in all groups. It was evidenced intense deposition of gross thick parallel-arranged collagen bundles, less densely deposited in the top of the scars, with apparent complete replacement of type III for type I collagen fibers, in CTR. In ACH, LT and ACHLT deposition of gross wavy parallel-arranged collagen bundles was also observed, but the density of the collagen disposition in these groups was clearly more intense and compacted than in CTR. In 21 days, CTR and ACH showed dense deposition of type I collagen fibers, but they were still parallel-arranged in CTR and densely interlaced in ACH. On the other hand, LT and ACHLT exhibited deposition of interlaced long delicate collagen fibers, composed of both type I and type III collagen, densely compacted, resembling the normal dermal connective tissue.

INSERT FIGURES 3 AND 4

Type III collagen is produced in early stages of wound healing, likely to orientate the migration of endothelial cells during the granulation tissue

formation, whereas type I collagen is ultimately deposited to provide tensile strength to the tissue, so that the scar acquires mechanical stability (Albuquerque-Júnior et al, 2009; Nunes et al, 2011). Therefore, The replacement of a substantial part of the content of type III collagen for type I molecules during the healing process is an absolutely expected phenomenon. Both dressing films and low level laser irradiation applied in this study induced rapid replacement of type III for type I collagen and improved the spatial organization of the collagen fibers from parallel disposition to interlaced arrangement, characteristic of normal dermis. Regarding the morphometrical analysis of the collagen deposition rates (figure 4), it was observed that all treated groups showed significantly increased rates of collagen deposition in relation to the control group (CTR) over the time, but in seven and 14 days, the irradiated groups presented significantly higher rates compared to CTR and ACH. In 21 days, LT and ACHLT demonstrated the highest collagenization rates, but surprisingly the rates observed in ACHLT were lower than in LT.

The presence of high contents of mucin in the mucous secretion of *A. fulica* (not shown data), a protein rich in aminoacid residues closely related to the biochemical synthesis of collagen molecules, such as serine asparagine, hydroxylysine and/or threonine (Adikwu, 2006), could support the results observed in this study. Besides, other studies showing the improvement of wound healing after treatment with mucous secretion of *A. fulica* has been previously reported (Martins et al, 2003; Sirio et al, 2005), supporting the attesting the healing potential of this biological material derived from giant snails. However, the irradiated groups showed the most distinguished effects on the collagenization. It has been demonstrated that LLLT not only improves the collagen deposition (Ribeiro et al, 2009a) but also provides better architectural organization of the collagen fibers (Medrado et al, 2008). It is likely that such modulatory properties are associated with the laser capability to stimulate

fibroblast, as previously demonstrated in experimental *in vitro* assays (Pereira et al, 2002).

However, the excessive production of type I collagen, as observed in the treated groups, might favor the formation of undesirable hypertrophic scars and keloids (Verhaegen et al, 2009). Therefore, the moderate content of less thick collagen fibers in ACHLT appears to provide low probability of forming hypertrophic scars. Moreover, the balance in the content of both type I and type III collagen fibers as seen in ACHLT suggests that the remodeling phase of the scar, represented by degradation of the gross previously formed connective matrix, followed by gradual deposition of a newly depurated matrix rich in both collagen molecules (Albuquerque-Júnior et al, 2009, Nunes et al 2011), has already installed, which would justify the clear resemblance with the normal histological appearance of the dermal collagen. It must also be stressed that despite the biological effects of the combination of this singular dressing film and low level laser irradiation on the fibroplasia dynamics seem to be likely related to a possible increase in the fibroblast metabolism, as long as both synthesis and degradation of the collagen molecules were apparently stimulated in this study, further investigations are required in order to fully clarify the precise mechanism underlying these healing modulation pathways.

In conclusion, despite low level laser therapy itself was able to improve many steps of wound healing, the combination of dressing films based on mucous secretion of *A. fulica* and laser irradiation seemed to hasten the remodeling phase of the healing scar, providing better architectural arrangement of the collagen fibers.

Acknowledgments

We would like to thank the National Council of Research (CNPq) and the Research and Technological Innovation Supporter Foundation of Sergipe State/Brazil (FAPITEC) for the financial support.

References

- Adikwu, M. M. Mucins and their potentials (editorial). *Trop. J. Pharm. Res.* 5: 581-582, 2006.
- Albuquerque-Júnior, R. L. C.; Barreto, S. A. L.; Pires, A. J.; Reis, P. F.; Lima, O. S.; Ribeiro, G. M. A. ; Cardoso, C. J. Effect of bovine type-I collagen-based films containing red propolis on dermal wound healing in rodent model. *Int. J. Morphol.*, 27(4):1105-1110, 2009.
- Allahverdian S, Carbohydrates and epithelial repair - more than just post-translational modification. *Curr Drug Targets* 2006; 7(5):597-606.
- Bae JS, The effect of polysaccharides and carboxylcellulose combination to prevent intraperitoneal adhesion and abscess formation in a rat peritonitis model. *J Vet Med Sci* 2004; 66:1205-1211.
- Bayat M, Vasheghani MM, Razavi N. Effect of low-level helium-neon laser therapy on the healing of third-degree burns in rats. *J Photochem Photobiol B.* 2006 May 1;83(2):87-93.
- Boschi ES, Leite CE, Saciura VC, Caberlon E, Lunardelli A, Bitencourt S, Melo DA, Oliveira JR. Anti-Inflammatory effects of low-level laser therapy (660 nm) in the early phase in carrageenan-induced pleurisy in rat. *Lasers Surg Med.* 2008 Sep;40(7):500-8.
- Byrnes KR, Barna L, Chenault VM, Waynant RW, Ilev IK, Longo L, Miracco C, Johnson B, Anders JJ. Photobiomodulation improves cutaneous wound healing in an animal model of type II diabetes. *Photomed Laser Surg* 2004;22(4):281–290.

Chung TY, Peplow PV, Baxter GD. Laser photobiomodulation of wound healing in diabetic and non-diabetic mice: effects in splinted and unsplinted wounds. *Photomed Laser Surg.* 2010 Apr;28(2):251-61.

Chung TY, Peplow PV, Baxter GD. Laser photobiostimulation of wound healing: defining a dose response for splinted wounds in diabetic mice. *Lasers Surg Med.* 2010 Nov;42(9):656-64

Conlan MJ, Rapley JW, Cobb CM. Biostimulation of wound healing by low-energy laser irradiation. *J Clin Periodontol* 1996; 23:492–496.

Corazza AV, Jorge J, Kurachi C, Bagnato VS. Photobiomodulation on the angiogenesis of skin wounds in rats using different light sources. *Photomed Laser Surg.* 2007 Apr;25(2):102-6.

Demidova-Rice TN, Salomatina EV, Yaroslavsky AN, Herman IM, Hamblin MR. Low-level light stimulates excisional wound healing in mice. *Lasers Surg Med* 2007;39(9):706–715.

Diegelmann RF, Evans MC. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front Biosci* 2004; 1(9):283-9.

Eduardo FP, Mehnert DU, Monezi TA, Zezell DM, Schubert MM, Eduardo CP et al. Cultured epithelial cells response to phototherapy with low intensity Laser. *Lasers Surg Med* 2007; 39: 365-72.

Freitas AC, Pinheiro AL, Miranda P, Thiers FA, Vieira AL. Assessment of inflammatory effect of 830 Laser light using C-reactive protein levels. *Bras Dent J* 2001; 12: 187-190.

Fuchino HO, Bactericidal action of a glycoprotein from the body surface mucus of giant african snail. *Comparative biochemical Physiology* 1992; 101(3):607-613.

Guerino MR, Baranauskas V, Guerino AC, Parizotto N. Laser treatment of experimentally induced chronic arthritis. *Appl Surf Sci* 2000;154–155:561–564.

Iguchi SMM, Aikawa T, Matsumoto JJ. Antibacterial activity of snail mucus mucin. *Comparative Biochemistry and Physiology* 1982; 72A(3): 571-574.

Kubota Y, et al. Purificação e caracterização do fator antibacteriano do muco de escargots. *Comp. Biochem. Physiol* 1985; 82(2): 345-348.

Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clin Dermatol* 2007; 25:9–18.

Lorenzi AT, Martins MF. Análise colorimétrica e espectroscópica do muco de caracóis terrestres *Achatina sp* alimentados com ração diferenciada. *R. Bras. Zootec* 2008; 37(3): 572-579.

M.R. Hamblin, T.N. Demidova, Mechanisms of low-level light therapy, *Proc.*

Martins MF. Avaliação macro e microscópica da cicatrização de lesões experimentalmente provocadas em pele de coelhos tratadas com secreção mucoglicoproteica do escargot *Achatina fulica*. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal science* 2003; 40(3):213-218.

Medrado AP, Soares AP, Santos ET, Reis SR, Andrade ZA. Influence of laser photobiomodulation upon connective tissue remodeling during wound healing. *J Photochem Photobiol B.* 2008 Sep 18;92(3):144-52.

Medrado, A.P., Pugliese, L.S., Reis, S.R., and Andrade, Z.A. (2003). Influence of low level laser therapy on wound healing and its biological action upon myofibroblasts. *Lasers Surg. Med.* 32, 239–244.

Medrado, A. R. A. P. Pugliese, L.S., Reis, S.R. Effect of low-power Laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. *Lasers in Surgery and Medicine*, v. 31, n. 4, p. 263-267, 2010.

Melo VA, Anjos DCS, ; Albuquerque Júnior RLC, Melo DB, Carvalho FUR. Effect of low level laser on sutured wound healing in rats. *Acta Cir. Bras.* [serial on the Internet]. 2011 Apr [cited 2011 June 27]; 26(2): 129-134.

Mester E, Spiry T, Szende B, Tota JG. Effect of laser rays on wound healing. *Am J Surg* 1971;122(4):532–535.

Morimoto Y, Arai T, Kikuchi M, Nakajima S, Nakamura H. Effect of low-intensity argon laser irradiation on mitochondrial respiration. *Lasers Surg Med* 1994; 15:191–199.

Nes AG, Posso MB. Patients with moderate chemotherapy-induced mucositis: Pain therapy using low intensity Lasers. *Int Nurs Rev* 2005;52:68-72.

Ninomiya T, Hosoya A, Nakamura H, Sano K, Nishisaka T, Ozawa H. Increase of bone volume by a nanosecond pulsed laser irradiation is caused by a decreased osteoclast number and an activated osteoblasts. *Bone* 2007; 40:140–148.

Nunes, P. S. Albuquerque-Junior, R.L.C., Cavalcante, D. R. R. ; Dantas M. D. M, Cardoso J. C., Bezerra M. S., Souza J. C. C. Serafini M. R, Quitans-jr, L. J., Bonjardim L. R., Collagen-Based Films Containing Liposome-Loaded Usnic Acid as Dressing for Dermal Burn Healing *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, Article ID 761593, 9 pagesdoi:10.1155/2011/761593, 2011.

Pereira MC, de Pinho CB, Medrado AR, Andrade Zde A, Reis SR. Influence of 670 nm low-level laser therapy on mast cells and vascular response of cutaneous injuries. *J Photochem Photobiol B*. 2010 Mar 8;98(3):188-92.

Pereira, A.N., Eduardo, C.D.E.P., Matson, E., and Marques, M.M. (2002). Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. *Lasers Surg. Med.* 31, 263–267.

Pourzarandian A, Watanabe H, Ruwanpura SM, Aoki A, Ishikawa I. Effect of low-level Er:YAG laser irradiation on cultured human gingival fibroblasts. *J Periodontol* 2005; 76:187–193.

Pugliese A.M., Latini S., Corradetti R., Pedata F. Brief, repeated, oxygen–glucose deprivation episodes protect neurotransmission from a longer ischemic episode in the in vitro hippocampus: role of adenosine receptors. *Br. J. Pharmacol.* 2003.

Ribeiro M.A.G, Cavalcanti de Albuquerque RL, Santos Barreto AL, Moreno de Oliveira VG, Santos TB, Freitas Dantas CD. Morphological analysis of second-intention wound healing in rats submitted to 16 J/cm² lambda 660-nm laser irradiation. Indian J Dent Res. 2009a Jul-Sep;20(3):390.

Ribeiro MAG,Albuquerque Jr RLC, Ramalho LMP, Pinheiro ALB, Bonjardim LR, Cunha SSC . Immunohistochemical Assessment of Myofibroblasts and Lymphoid Cells During Wound Healing in Rats Subjected to Laser Photobiomodulation at 660 nm. Photo. and laser surgery 2009b; 27(1):49-55.

Ribeiro MS, Silva F, Araújo CE, Oliveira SF, Pelegrini CM, Zorn TM, *et al.* Effect of low-intensity polarized visible Laser radiation on skin burns: A light microscopy study. J Chin Laser Med Surg 2004;22:59-66.

Ribeiro MS, Silva F, Araújo CE, Oliveira SF, Pelegrini CM, Zorn TM *et al.* Effect of low-intensity polarized visible Laser radiation on skin burns: a light microscopy study. J Chin Laser Med Surg 2004; 22: 59-66.

Ribeiro, M.A.; Albuquerque, R.L.; Ramalho, L.M.; Pinheiro, A.L.; Bonjardim, L.R. & Da Cunha, S.S., 2009b. Immunohistochemical Assessment of Myofibroblasts and Lymphoid Cells During Wound Healing in Rats Subjected to Laser Photobiomodulation at 660 nm. Photomed. Laser Surg., 27, 49-55.

Sakurai Y, Tamaguchi M, Abiko Y. Inhibitory effect of low-level Laser irradiation on LPS-stimulated prostaglandin E2 production and cyclooxygenase-2 in human gingival fibroblasts. Eur J Oral Sci 2000; 108: 29-34.

Shakespeare P. Burn wound healing and skin substitutes. Burns 2001; 27:517-522.

Sírio O J (2005). Verificação da potencialização do efeito cicatrizante do muco de caracóis do gênero *Achatina* promovida por dieta à base de Confrei (*Symphytum officinale L.*). Dissertação, Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal. Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade de São Paulo (USP). Pirassununga 2005; 87.

SPIE. 6140 (2006) 1-11.

Turhani D, Scheriau M, Kapral D, Benesch T, Jonke E, Bantleon HP. Pain relief by single low-level laser irradiation in orthodontic patients undergoing fixed appliance therapy. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2006;130(3):371–377.

Verhaegen, P.D., Van Zuijlen, P.P., Pennings N.M., Van Marle J., Niessen, F.B., Van Der Horst, C.M., Middelkoop, E., 2009. Differences in collagen architecture between keloid, hypertrophic scar, normotrophic scar, and normal skin: An objective histopathological analysis. *Wound Repair Regen*, 17, 649-56.

Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev* 2003; 83: 835-870.

Table I. Assessment of the intensity of the inflammatory response in the experimental groups, in 3, 7, 14 and 21 days after the surgical procedures.

Days	Animals	Intensity of the inflammatory response			
		CTR	ACH	LT	ACHLT
3 days	R1	+++	+++	+++	+++
	R2	+++	+++	+++	+++
	R3	+++	+++	+++	+++
	R4	+++	+++	+++	+++
	R5	+++	+++	+++	+++
7 days	R1	+++	+++	++	++
	R2	+++	++	++	++
	R3	+++	++	++	++
	R4	+++	+++	++	++
	R5	+++	++	++	++
14 days	R1	+	+	-	+
	R2	++	+	+	-
	R3	++	+	-	-
	R4	+	++	+	-
	R5	++	++	-	-
21 days	R1	+	-	-	+
	R2	-	-	-	-
	R3	-	-	-	-
	R4	-	-	-	-
	R5	+	-	-	-

(-) – inflammatory infiltrate is absent; (+) – mild inflammatory infiltrate corresponding to less than 10% of stromal cells; (++) moderate inflammatory infiltrate corresponding to more than 10 and less than 50% of stromal cells; (+++) intense inflammatory infiltrate corresponding to more than 50% of stromal cells.

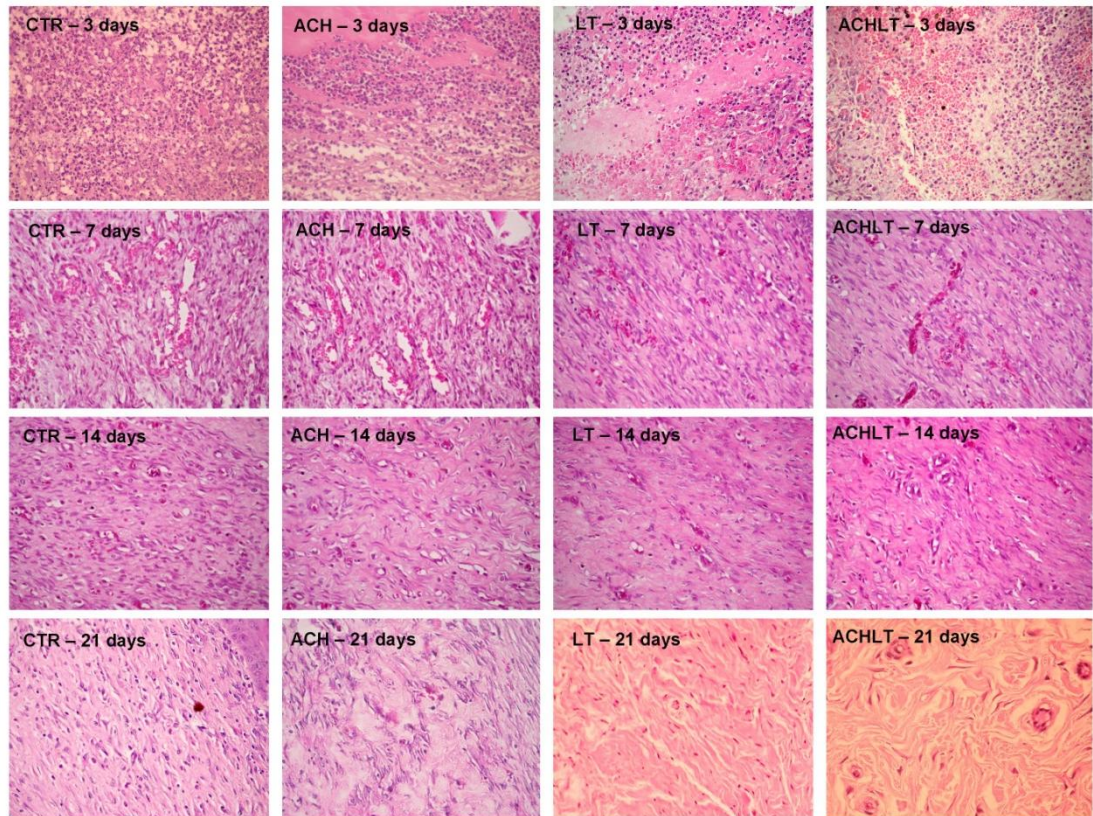


Figure 1. Histological sections showing evolution of the healing process in the experimental groups over the time. In 3 days, acute inflammatory response (predominance of neutrophils) is observed in all groups. In 7 days, the granulation tissue is more vascular in CTR and ACH and more fibroblastic in LT and ACHLT. In 14 days, CTR showed distinguishable residual granulation tissue, in opposition to ACH, Lt and ACHLT. In 21 days, the inflammatory or vascular content are inconspicuous in all groups, but the cicatricial scar is composed of denser and grosser interlaced fibers in LT and ACHLT (HE, 200X).

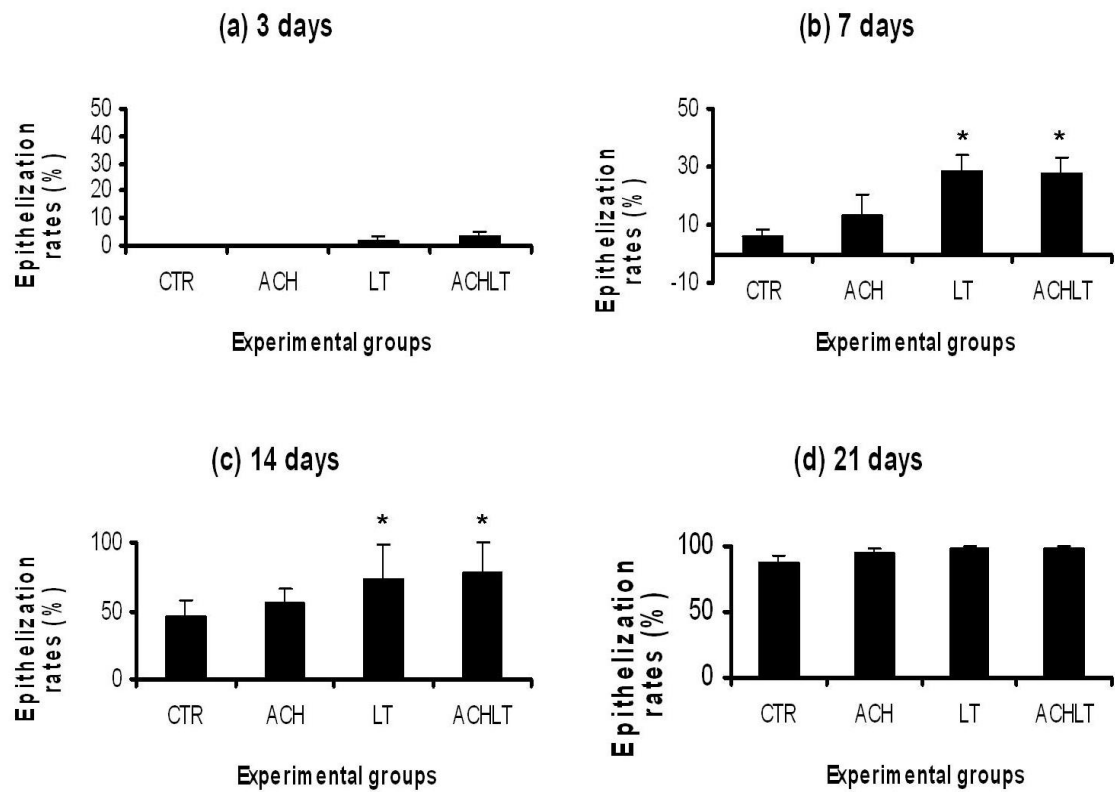


Figure 2. Assessment of the epithelization rates in the experimental groups over the experimental time. (*) Significantly different from CTR and ACH ($p < 0.05$).

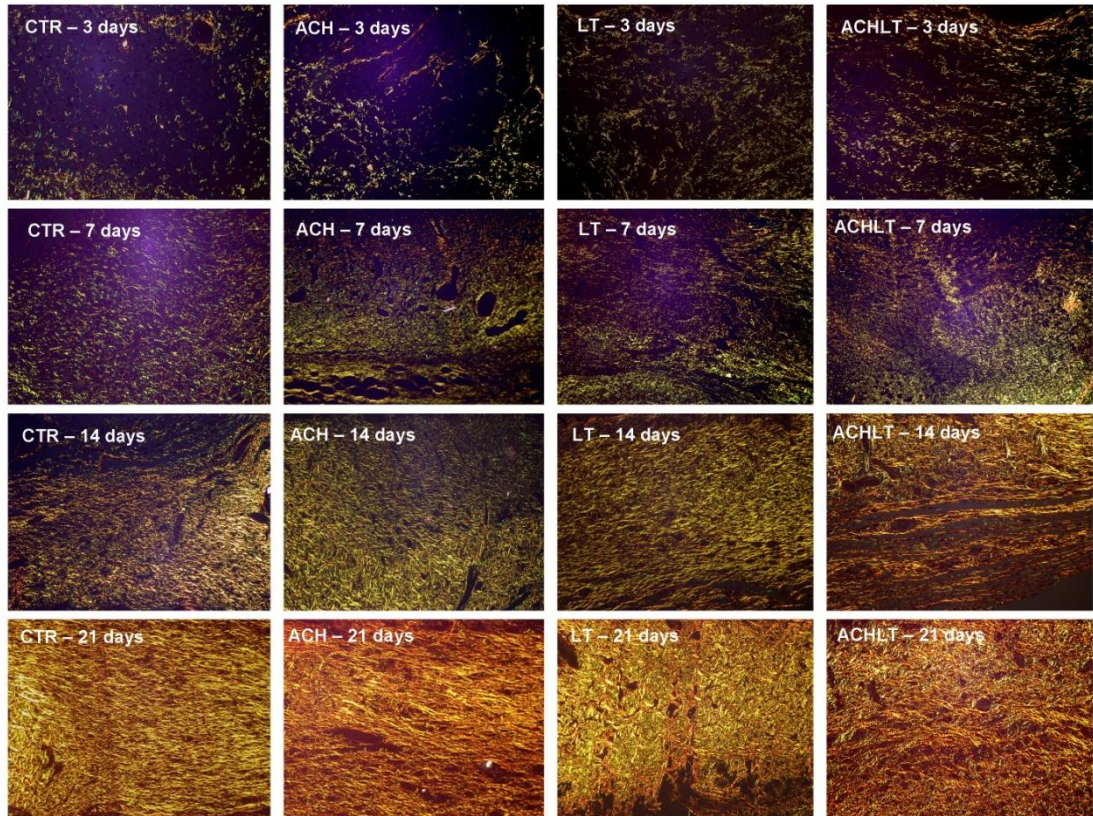


Figure 3. Histological sections showing the evolution of the collagenization in the experimental groups over the time. In 3 days, predominance of reticular-arranged thin delicate fibrils of type III collagen is seen in all groups. In 7 days, partial replacement of type III for type I collagen is observed in the treated groups. In 14 days, the type I collagen fibers are predominantly parallel-arranged and more compacted disposed in LT and ACHLT. In 21 days, the densest organization of type I collagen is evidenced in the groups; the highest density of collagen deposition is seen in LT, whereas in ACHLT, the interlaced fibers are less compacted and composed of both types of collagen (Sirius Red/Polarization, 200x).

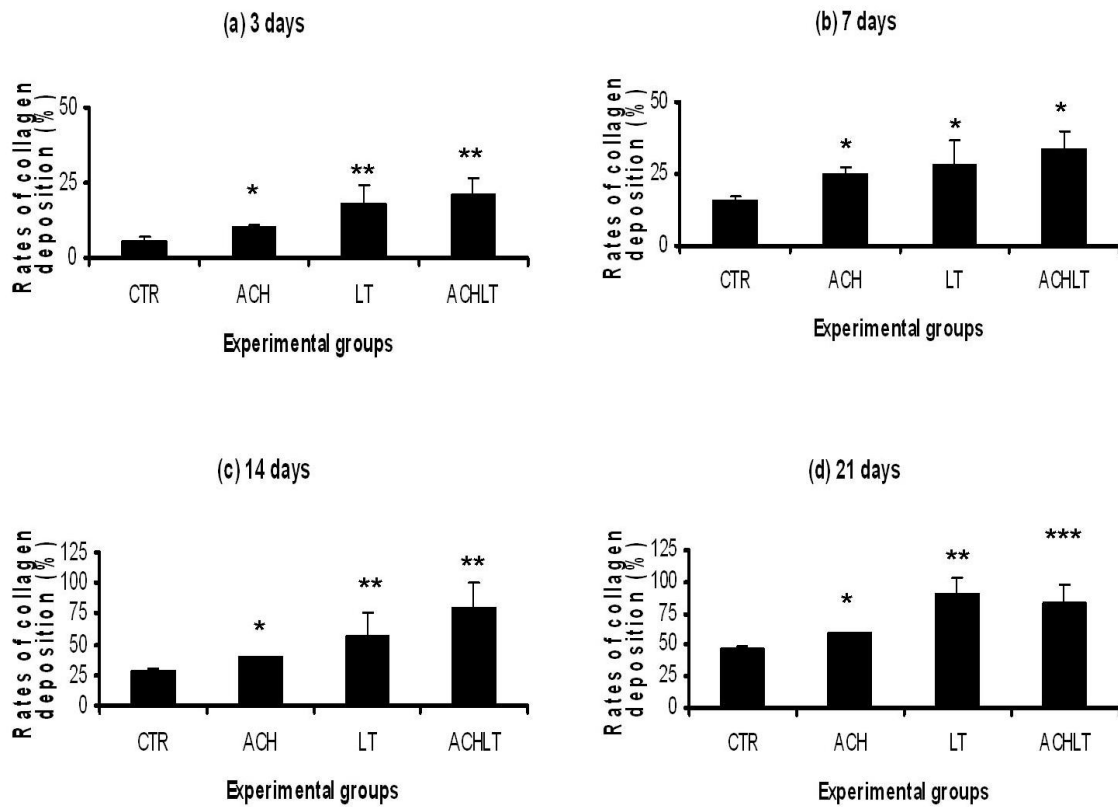


Figure 4. Assessment of the collagen deposition rates in the experimental groups over the time. (*) Significantly different from CTR ($p < 0.05$); (**) significantly different from CTR ($p < 0.01$) and ACH ($P < 0.05$); (***) significantly different from CTR, ACH and LT ($p < 0.05$).

6.0 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Este estudo trata-se de um trabalho multidisciplinar desenvolvido no Programa de Pós Graduação em Saúde Ambiente, que buscou uma melhor compreensão da interação do ser humano com ambiente, além de permitir o desenvolvimento de estratégias adequadas para a utilização sustentável de recursos naturais. A aderência deste a linha de pesquisa de Produtos Naturais em Saúde é justificada ao buscar a prospecção/estudo da espécie invasora *Achatina fulica* e seus sub-produtos em ecossistemas do Nordeste brasileiro visando a obtenção/desenvolvimento de formulações bioativas. Desta forma, os filmes desenvolvidos a partir do muco de *Achatina fulica*, além da avaliação de suas propriedades cicatrizante e bactericida; ora apresentados; demonstram a aplicabilidade deste produto natural em Saúde humana e a inter-relação com questões eco-ambientais, sob o ponto de vista da sustentabilidade. A utilização de filmes a base do muco de *Achatina fulica* demonstra grande potencial como um biofármaco com propriedades cicatrizantes, através do indicativo de sua importância terapêutica para o reparo tecidual de lesões tecidual.

Este estudo sugere ainda que a associação de novas estratégias terapêuticas, como a Laserterapia, estimularam o processo cicatricial. Deste modo, é possível afirmar que a laserterapia associada a zooterapia (Malacoterapia) demonstrou sucesso no reparo cicatricial de feridas, bem como no perfil inflamatório e epitelização. Por outro lado, a incorporação de princípios ativos de plantas medicinais, via alimentação do molusco, agrega a fitoterapia a esta cadeia de áreas da ciência para a resolução da problemática da Cicatrização de feridas. Uma vez que a cicatrização de feridas depende de vários fatores ambientais e fisiológicos, a inter-relação destas diferentes áreas possibilitaria intervenções multidisciplinares e integradas que podem evitar as complicações oriundas de lesões cutâneas, tais como quelóides e cicatrização hipertrófica.

No contexto do desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas, as análises de caracterização do muco e do respectivo filme de *Achatina fulica* demonstraram que, além de poderem ser empregados com efeitos benéficos no reparo de lesões teciduais, os mesmos têm grande viabilidade de utilização na indústria farmacêutica devido às características de manipulação satisfatória como curativos. Os resultados da caracterização físico-química do muco

mostraram elevado conteúdo protéico, provavelmente relacionadas a albumina bovina, ovalbumina, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e anidrase carbônica. Contudo, ensaios mais acurados precisam ser realizados para determinação da aplicabilidade de produtos derivados do muco de *Achatina fulica* em escala de produção.

7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abellha M. L. White, J.W. Heinemann, S. R (2006) Physical characteristics of Snails. In: CRANE, E. *Moluscs a comprehensive survey*. London:.. Cap.6, p.207-239.
- Allahverdian, S. (2006) Carbohydrates and epithelial repair - more than just post-translational modification. *Curr Drug Targets*. v.7 n.5 p.597-606
- Alves, A. G. C.; Souza, R. M. de. (2000). Etnoecologia de um ambiente estuarino no nordeste do Brasil: conhecimento dos “mariscos” (Mollusca: Bivalvia) por mulheres no Canal de Santa Cruz. *Rev. MANGROVE*, . v.3 n. 6 p. 23-27.
- Aviram, M. Dornfeld, L. Kaplan, M. Coleman, R. Gaitini, D. Nitecki, S. Hofman, A. Rosenblat, M. Volkova, N. Presser, D. Attias, J. Hayek, T. Fuhrman, B.(2002) Pomegranate juice flavonoids inhibit low-density lipoprotein oxidation and cardiovascular diseases: studies in atherosclerotic mice and in humans. *Drugs Exp Clin Res*. v.28 n. 2 p.49-62.
- Aslam M. N., Lansky E. P.,(2006) Varani J. Pomegranate as a cosmeceutical source: Pomegranate fractions promote proliferation and procollagen synthesis and inhibit matrix metalloproteinase-1 production in human skin cells. *Journal of Ethnopharmacology*, v.10 n.3 p.311-318.
- Bae J.S, Kaplan, M. Coleman, R. Gaitini. (2004). The effect of polysaccharides and carboxycellulose combination to prevent intraperitoneal adhesion and abscess formation in a rat peritonitis model. *J Vet Med Sci*. v.66 n.7p1205-1211.
- Barbosa, M. J.; Elisabetsky, E.; Laird, S. A. (2005). Medicinal resources of the tropical forest:biodiversity and its importance to human health. Columbia University Press,v.6 n.5 p. 440.
- Barrier, J. (2006). Como controlar a criação do caracol. *Rev. agricultura*. v13 n. 4 p. 32-37.
- Braga L.C. Shupp, J.W. C. Cummings, M. Jett, Takahashi J.A. Carmo L.S. Chartone-Souza E. Nascimento A.M.A.(2005) Pomegranate extract inhibits *Staphylococcus aureus* growth and subsequent enterotoxin production. *Journal of Ethnopharmacology* v.9 n.3 p.335-339.
- Burapadaja, S. Bunchoo, A.(1995) Planta Medicinal. *Rev. Etnobotanica* . v.3, n. 13 p. 32-34.
- Camargo, L.S. (1992) As hortaliças e seu cultivo.Campinas: Fundação Cargill. v.2 n.3 p.252- 254.

Carvalho, H. F., Recco-Pementel, S. M. (2001) Função das células de defesa frente agentes extremos. Rev. Biologia Celular. São Paulo: v.8 n.2 pag. 44:

Carvalho, E. A. B., Andrade, P. P., Silva, N. H., Pereira, E. C., Figueiredo, R. C. B. Q.(2001) Effect of usnic acid from the lichen *Cladonia substellata* on *Trypanosoma cruzi* in vitro: an ultrastructural study. Micron, v. 36, p. 155–161.

Clark, R.A.F.(1996) Wound repair: overview and general considerations. In: molecular and cellular biology of wound repair. New York: Plenum Press. v. 3, n.5 p. 15–16.

Cerda, B. Llorach, R. Ceron, J. J. Espin, J. C. Tomas-Barberan, F. A (2003). Evaluation of the bioavailability and metabolism in the rat of punicalagin, an antioxidant polyphenol from pomegranate juice. Eur. J. Nutr. v.3 n4. p 18-28.

Chidambara, M. K. N. Jayaprakasha, G. K. Singh, R. P. (2002) Studies on antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel extract using in vivo models. J Agric Food Chem. v.17 n.3 p 47-55.

Chou, S. C.; Goldstein, A.; Biochemistry. Journal. (1978), v2.n2 p 75-99.

Chowdary V.S. (2003). A Study on Serum IgE and Eosinophils in Respiratory Allergy Patients. Indian J Allergy Asthma Immunol 2003; v.2 n.1p 21-24

Correa M.T. (2006) Os diferentes metabolitos em uma espécie vegetal e os efeitos farmacológico associados a esses metabólitos Revista Higiene Alimentar, v. 6 n.3 p. 15.

Costa-Neto, E. M. (2000a). “Barata é um santo remédio”: introdução à zooterapia popular no estado da Bahia. UEFS, Feira de Santana, Brasil, Rev. Bras. Prod. Nat. V.3 n.1 p103.

Costa-Neto, E. M. (2000b). Conhecimento e usos tradicionais de recursos faunísticos por uma comunidade afro-brasileira. Resultados preliminares. Interciencia, v25 n9 p 423-431.

Costa-Neto, E. M. (2000c). Zotherapy-based medicinal traditions in Brazil. Honey Bee, v.11 n 2 p 2-4.

Costa-Neto, E. M. (2005). Animal-based medicines: biological prospection and the sustainable use of zotherapeutic resources.v.1 n.2 p 33-43.

Das, A., Mohapatra, S. B. Misra, P. R. Misra, R. K. Pal, B. B.(2001) In vitro vibriocidal activity of *Punica granatum*. Phytomedica v4 n 2:p 49-55.

Das, A. K. Mandal, S. C. Banerjee, S. K. Sinha, S. Saha, B. P. Pal, M.(2001*) Studies on the hypoglycaemic activity of *Punica granatum* seed in streptozotocin induced diabetic rats. Phytother Res. V.5 n.7 p 628-629.

- Diak A, Bani-Jaber O, Amro A, Jones B, Andrews D. (2010) The manufacture and characterization of casein films as novel tablet coatings. *Food Bioprod Process.*v.3 n.2 p 284–290.
- Diez, L. S. (2001). Los moluscos en el Tonalámatl de Aubin. In: Torres, Y. G. (Coord.). *Animals y plantas en la cosmovisión mesoamericana*. Instituto Nacional de Antropología e Historia, Ciudad de México, México,v2 n.1 p. 159-191.
- Dokumcu, Z., Ergun, O., Celik, H. A., Aydemir, S., Sezak, M., Ozok, G., Celik, A. (2008) Clostridial collagenase aggravates the systemic inflammatory response in rats with partial-thickness burns. *Burns*, v. 34, n.1 p. 935 – 944.
- Dong J, Sun Q, Wang J-Y. (2010) Infrared spectroscopic studies of liophilization- and temperature-induced protein aggregation. *Rev. Biomaterials*. v.2 n 6 25 p 3–7.
- Eart, W. S. FLloyd, D. G. & Barrett, S. C. H (2002). Evolution of snails morphology and function: an integrative approach of adaptation, constraint, and compromise. In: *Mucs Snails. Studies on practice animal and plants*. New York.v.3 n 2 p. 241-271.
- Fabra MJ, Talens P, Chiralt A. (2010) Tensile properties and water vapor permeability of sodium caseinate films containing oleic acid– beeswax mixtures. *J Food Eng.*; v.2 n p 393–400.
- Faraco, F. A.; Lacerda, A. C. R. (2004). Contaminação biológica em unidades de conservação – o caso do caramujo africano (*Achatina fulica*, Mollusca, Gastropoda). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE UNIDADES DE CONSERVAÇÃO, 4. Curitiba. Seminários... Curitiba: Proteção à Natureza: Rede Nacional Pró Unidades de Conservação, v. 2, p. 78-84.
- Felger, R. S.; Moser, M. B. (2008). Seri Indian pharmacopoeia. *Economic Botany*, v.28 n.4:p 414-436.
- Figueiredo , N. (2003). Os ‘bichos’ que curam: os animais e a medicina de ‘folk’ em Belém do Pará. *Boletim do Museu Paraense Emílio Göeldi*, v 10 n 1 p 75-91.
- Finkl, C. W. (2005). Os medicamentos do mar. In: Cousteau, J.-Y. (Ed.). *Enciclopédia dos Mares*. Salvat, Rio de Janeiro, Brasil, v.1 n 3 p. 74-75.
- Fleischmajer R, et al. (2003). Type I and type III interactions during fibrillogenesis. *Am NY Acad Sci* ;v 5 n. 5 p 161-75.
- Fleming-Moran, M. (2006). The folk view of natural causation and disease in Brazil and its relation to traditional curing practices. *Boletim do Museu Paraense Emílio Göeldi*, v 8 n 1 p 65-76.

- Foucault, M. (1980) O Nascimento da clínica. RJ, Ver. Forense-Universitária. v.7 n.5 p.597-606
- Giordani, M. C. (2001) História da Grécia - Antigüidade Clássica I, 3ª edição, editora Vozes, Petrópolis, RJ, v 5 n 2p. 126.
- Gordon, R. (1997) A assustadora história da medicina. RJ, Ediouro. Cap.8 p. 36-52.
- Gracious,R.R. Peter L. (2001): Immunomodulatory activity of *Punica granatum* in rabbits –a preliminary study.J. Ethnopharma ,v 2 n1 p 78-85
- Hartree, E.F.(1972) Determination of protein a modification of the Lowry Method that gives a linear photometric response. Analytical Biochemistry,Cambridge, v.48 n 1 p.422-427.
- Holetz, F.B., Pessini, G.L., Sanches, N.R.(2002) Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz v 8 n1 p 1027-1031.
- Hora, J. J. Maydew, E. R. Lansky, E. P. Dwivedi, C. (2003) Chemopreventive effects of pomegranate seed oil on skin tumor development in CD1 mice. J Med Food. V 6 n 3 p 157-61.
- Jeremy B. Rutter, (2002)"The Prehistoric Archaeology of the Aegean": chronology, history, bibliography. v.7 n.5 p.597-606
- Joy R. Borchardt et al. (2008). Antimicrobial activity of native and naturalized plants of Minnesota and Wisconsin. J Med Plants Res. V 2 n 5 p 98-110.
- Junqueira L.C.U. Hermes, D.E.(1983) Dermal collagen distribution. A histochemical and ultrastructural study. *Histochemistry* v 2 n1 p 397- 403.
- Kawaii, S. Lansky, E. P. (2004) Differentiation-promoting activity of pomegranate (*Punica granatum*) fruit extracts in HL-60 human promyelocytic leukemia cells. J. Med. Food. Spring v 7 n 1 p13-18.
- Kim,N.D. Mehta,R. Yu, W.P. Neeman, I. Livney,T. Amichay, A. Poirier, D. Nicholls, P. Kirby, A. Jiang, W.G. Mansel, R. Ramachandran, C. Rabi, T. Kaplan, B. Lansky, E.(2002) Chemopreventive and adjuvant therapeutic potential of pomegranate (*Punica granatum*) for human breast cancer. Breast Cancer Res. Treat. v 7 n 1 p 203-217.
- Kim, N.D. Mehta, R. Yu, W. Neeman, I. Livney, T. Amichay, A. Poirie, D. Nicholls, P. Kirby, A. Jrang, W. Mansel, R.Kohno, H. Suzuki, R. Yasui, Y. Hosokawa, M. Miyashita, K. Tanaka, T.(2004) Pomegranate seed oil rich in conjugated linolenic acid suppresses chemically induced colon carcinogenesis in rats. Cancer Sci. Jun v 9 n 5 p 481-486.

Lages Filho, J. (1934). A medicina popular em Alagoas. Separata dos Arquivos do Instituto Nina Rodrigues, Salvador, Brasil, 27 pp.

Lansky, E.P., Jiang, W., Mo, H., Bravo, L., Froom, P., Yu, W., Harris, N., Neeman, I., Campbell, M.(2005) Possible synergistic prostate cancer suppression by anatomically discrete pomegranate fractions. Investigational New Drugs v6 n 3 p11-20.

Legler, G.; Cols, N. J (1985).;Determinação de proteínas. Rev. Biochem. V6 n 1 p 150, 178.

Lisbão, R.S.; (1990) Alface como alimento funcional. In: INSTITUTO AGRONÔMICO DE CAMPINAS. Instruções agrícolas para o Estado de São Paulo. 5.ed. Campinas, Boletim v 1 n 5 p.11-12.

Lizarelli, R.F.Z. (2005) Protocolos Clínicos Odontológicos - Uso de Laser de Baixa Intensidade. Bons Negócios Editora, 239 pp.

Lowry, O. H.; Cols, N. J.; Farr, A. L. (1972) Biol. Chem, v 9 n 2 p193, 265 .

Maciel, M.A.M.; Pinto, A.C.; Junior, V.F.V.; Grynberg, N.F.; Echevarria, A. (2002) Plantas Medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. Química. Nova,v. 25, n 3; p. 429-438.

Mallman, M. L. W. (1996). A farmacopéia do mar: invertebrados marinhos de interesse médico e a etnomedicina alagoana. Monografia de Especialização, Universidade Federal de Alagoas, Brasil, 78 pp.

Maluf-Meiken L. C. V. (2006). Morphometrical analysis of multinucleated giant cells in subdermal implants of poly-lactic acid in rats. J Mater Sci: Mater Med v 7 n.1: p 481–485

Maroto-Borrego, J.V. (1986) Horticultura: herbácea especial. 2.ed. Madri: Mundi-Prensa, 590p.

Marimoto N. Guedes. L. E. (2005). Viability and function of autologous and allogeneic fibroblasts seeded in dermal substitutes after implantation. J. Surg Res.; v 1 n 2 p 56-67.

Marques, J. G. W. (1995). Pescando pescadores: etnoecologia abrangente no baixo São Francisco alagoano. NUPAUB-USP, São Paulo, Brasil, 304 pp.

Marques, R. C. P. (2003) Evaluation of the mutagenic potential of yangambin and of the hydroalcoholic extract of *Ocotea duckei* by the Ames test.. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, v. 5 n 3 p. 117-120

Martelli, S. M. (2005) Obtenção e caracterização de filmes de queratina de penas de frango.. UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA. Dissertação Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos.128pp

- Martin P. (2000) Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science*. Apr v 4 n 2 p 75-81.
- Martins, A. P. C. (2010) Preparação e Caracterização de Filme bioativos com aplicação em embalagens de alimentos. UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA. DEPARTAMENTO DE QUÍMICA. Dissertação Florianópolis. 221pp
- Matos, E. (2010). Utilização e produção de bivalves pelas populações amazônicas como alternativa econômica. Resumos do 19º Encontro Brasileiro de Malacologia, Rio de Janeiro, Brasil, v.5 n.3 p. 144.
- Mehta, R., Lansky, E.P. (2004) Breast cancer chemopreventive properties of pomegranate (*Punica granatum*) in a mouse mammary organ culture (MMOC). *European Journal of Cancer Prevention* v 13 n 1 p 345-348.
- Melgarejo, P., Artes, F. (2000) Total lipid content and fatty acid composition of oil seed from lesser known sweet pomegranate clones. *Journal of the Science of Food and Agriculture* v 2 n 80:p 1452-1454.
- Moraes, N. S.; Bravin, A. (1998). A Influência e a importância dos moluscos na história e desenvolvimento das raças. *Jornal Brasileiro de Etnobiologia e Etnoecologia*, São Carlos, Brasil, v 4 .n 1 p. 87-98.
- Morimoto N. (2005). Viability and function of autologous and allogeneic fibroblasts seeded in dermal substitutes after implantation. *J. Surg Res.*; v 2 n 5 p 56-67.
- Mori-Okamoto, J. Otawara-Hamamoto, Y. Yamato, H. Yoshimura, H. (2004) Pomegranate extract improves a depressive state and bone properties in menopausal syndrome model ovariectomized mice. *J. Ethnopharmacol.* May v 2 n 1: p 93-101.
- Naranjo-Garcia, E. (1994). Impacto de los moluscos en el ser humano. *Etnobiologia*, Toluca, México, n 1 v. 1 p. 39.
- Negi, P. S. Jayaprakasha, G. K.(2003) Antioxidant and antibacterial activities of *Punica granatum* peel extracts. *J Food Sci.*v 7 n 2 p 68.
- Noda, Y. Kaneyuki, T. Mori, A. Packer, L.(2002) Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: delphinidin, cyanidin, and pelargonidin. *J Agric Food Chem.* Jan v 2 n 5 p 166-71.
- Nomura, H. (2006). Usos e costumes dos animais. Fundação Vingt- Um Rosado/ETFERN/UNED, Mossoró, Brasil, v.7 n.5 p.597-606.
- Nomura, H. (2000). Os moluscos no folclore. Departamento Estadual de Imprensa, Natal, Brasil, 78 pp.

- Ortencio, B. (1997). Medicina popular do Centro-Oeste. Thesaurus, Brasília, Brasil, v 1 n2 302 pp.
- Pena, G Patrus M.; Andrade Filho J. S. (1995) *Angiostrongylus costaricensis*: first record of its occurrence in the State of Espírito Santo, Brazil, and a review of its geographic distribution. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo, v 37, n.4, p. 369-374.
- Prashanth, D., Asha, M.K., Amit, A. (2001) Antibacterial activity of *Punica granatum*. Fitoterapia v 7n 2:p 171-173.
- Ratner, K. B. Bryant. L. I. (2004). where we have been and where we are going. Annu Rev Biomed Eng.;v 6 n 2 p:41-75.
- Rocha, J. M. (2009). Linguagem médico-popular em Alagoas. Revista do CHLA, v.1: n.57-p.62.
- Ronecker, J. P. (1997). O simbolismo animal: mitos, crenças, lendas, arquétipos, folclore, imaginário. Paulus, São Paulo, Brasil, v.7 n.5 p.597-606
- Sambrook, H.E. Russell, A.F. (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press. v.3 n.3 p.697-706
- Santana O.; Colitter, S.; Spencer, V.; (2005). Antimicrobial activity of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* essential oils. Journal Agriculture Food Chemistry, v.43, n.9, p.2384-2388.
- Shakespeare P. (2001) Burn wound healing and skin substitutes. Burns.; v 2 n 7:p 517-522.
- Sastravaha, G, Yotnuengnit, P, Booncong, P, Sangtherapitikul, P.(2003) Adjunctive periodontal treatment with *Centella asiatica* and *Punica granatum* extracts. A preliminary study. J Int Acad Periodontol. v 5 n 3 p 106-115.
- Silva R.A. (2006) Características físico-químicas e atividade antimicrobiana de extratos de própolis da Paraíba, Brasil. Ciência Rural, Santa Maria, v.36; n.6; p.1842-1848.
- Singer, G.L. Clark, J.W. (2002). Cutaneous wound healing. New Eng J Med; v 1 n 10, p 738-746.
- Sonnenberg, P.E. (1985) Olericultura especial. 5.ed. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, v.1, n 6 p187.
- Sprockel OL, Prapaitrakul W, Shivanand PJ. (2010) Permeability of cellulose polymers: water vapor transmission rates. Pharm Pharmacol. v. 4 n 2 p152–157.
- Summer, G. J., Romero, E. A., Bogen, O., Dina, O. A., (2008). Rev. Proinflammatory cytokines mediating burn-injury pain v.3 n 6, p. 155–161.

- Suzuki, O. (2006) Relatório Nacional Sobre as Espécies Exóticas no Território Brasileiro. pp. 155–161.
- Thorwald, J. (1990) O segredo dos médicos antigos. SP, Melhoramentos. v.3 n.1 p.5-16
- Tripathi, S. M. Singh, D. K. (2000) Molluscicidal activity of *Punica granatum* bark and *Canna indica* root. *Braz. J. Med. Biol. Res.* v 3 n 11 p 1351-1355.
- Vasconcelos, M. C. (2001) Ocorrência de *Achatina fulica* no Vale do Paraíba, Estado do Rio de Janeiro, Brasil *Rev. Saúde Pública* v.35 n 6 p 55-66.
- Vasconcelos Lcs, Sampaio Mcc, Sampaio Cc, Higino JS. (2003) Use of *Punica granatum* as an antifungal agent against candidosis associated with denture stomatitis. *Mycoses* v 4 n 6 p 192-206.
- Voravuthikunchai, S. Lortheeranuwat, A. Jeeju, W. Sririrak, T. Phongpaichit, S. Supawita, T. (2004) Effective medicinal plants against enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J. Ethnopharmacol.* Sep v 9 n 4 p 49-54.
- Werner, G.R. Grose, A.S (2003) Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev* v 8 n 3: p 835-870.